

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Optimização de N^1 -alquil- β -lactamas Como Inibidores
Irreversíveis de Proteases de Serina**

Ana Bela Fernandes Santana

**DOUTORAMENTO EM FARMÁCIA
(QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA)**

2009

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia

Subgrupo de Química Farmacêutica e Fitoquímica



**Optimização de N^1 -alquil- β -lactamas Como Inibidores
Irreversíveis de Proteases de Serina**

Ana Bela Fernandes Santana

Dissertação orientada pelo
Professor Doutor Rui Ferreira Alves Moreira

**DOUTORAMENTO EM FARMÁCIA
(QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA)**

2009

Optimização de N^1 -alquil- β -lactamas Como Inibidores Irreversíveis de Proteases de Serina

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Doutor.

Trabalho realizado no extinto Centro de Estudos de Ciências Farmacêuticas e no iMed da Faculdade de Farmácia da U. L., sob orientação do Professor Doutor Rui Ferreira Alves Moreira.

Aos meus pais

Aos meus filhos, Miguel e André

Agradecimentos

Ao Professor Rui Moreira, pela orientação, permanente disponibilidade, ensinamentos e constante incentivo.

Ao Professor Jim Iley, pelo apoio científico assim como pela análise criteriosa e cuidadosa dos resultados apresentados.

Ao Doutor João Neres, pela realização dos estudos de modelização molecular dos derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidiona.

À Paula Gameiro, amiga e colega de bancada de tantos anos, quero agradecer o companheirismo, o esclarecimento de dúvidas, e o partilhar de ideias, entusiasmos e desânimos.

À Emília Valente agradeço a amizade demonstrada em tantas ocasiões, o inesgotável apoio, e a paciência para ouvir as minhas “Teorias”.

À Noélia Duarte e Margarida Madureira agradeço o constante interesse e estímulo para a realização do trabalho de laboratório e para a finalização desta dissertação. Um agradecimento muito especial à Noélia pela cuidadosa leitura desta dissertação.

Pela resolução de pequenas/grandes dificuldades técnicas, que a minha ignorância não permitia ultrapassar, quero agradecer a grande ajuda de todos os colegas de laboratório, especialmente à Rita Capela, Luísa Martins, Tiago Rodrigues, João Lavrado e Jalmira Mulchande.

Pela amizade, constante interesse e incentivo, agradeço sinceramente à Professora Fátima Simões.

Agradeço aos Técnicos Maria Helena Brito e Francisco Manuel Carvalho e também às auxiliares de laboratório, D. Lurdes e D. Maria do Carmo a simpatia e a rápida resposta a todos os pedidos formulados. Um agradecimento especial ao Sr Francisco Carvalho pelo seu profissionalismo em solucionar todas as questões relacionadas com material, solventes, reagentes e equipamento.

Pela preocupação pelo meu bem-estar profissional e financeiro agradeço também à D. Alice Godinho.

Por fim, um grande obrigado à minha família. Aos meus pais, pelo apoio, compreensão e auxílio que sempre me prestaram e que me permitiu concentrar na escrita desta dissertação. Ao António que a queria escrever para a acabar rapidamente e

aos meus filhos, Miguel e André, que esperam pacientemente que o sorriso da mãe regresse.

Índice

Índice Geral	I
Resumo	V
Abstract	VII
Índice de Figuras	IX
Índice de Tabelas	XIII
Símbolos e Abreviaturas	XV
Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Proteases de Serina	3
1.2 Mecanismo Catalítico	4
1.3 Especificidade Enzimática Primária	7
1.4 Preteases de Serina com Acção Inflamatória	8
1.4.1 Os Neutrófilos no Processo Inflamatório	8
1.4.2 Características Estruturais e Funcionais das Proteases de Serina dos Neutrófilos	10
1.4.2.1 Elastase Leucocitária Humana	10
1.4.2.2 Proteinase 3	11
1.4.2.3 Catepsina G	13
1.5 Inibidores Irreversíveis	15
1.5.1 Inibidores Alternativos do Substrato ou Agentes Acilantes	16
1.5.1.1 Benzoxazinonas	17
1.5.1.2 ONO-5046	19
1.5.1.3 <i>Trans</i> - δ -Lactamas Pirrolidínicas	19
1.5.1.4 Diazetidinedionas, Oxo- β -sultamas e Oxo- β -lactamas	21
1.5.2 Inibidores Baseados no Mecanismo	22
1.5.3 Heterociclos como Inibidores Suicidas	23
1.5.3.1 Derivados de Succinimidas	24
1.5.3.2 Derivados de Tiadiazolidinonas	26
1.5.3.3 β -Lactamas Bicíclicas: Cefalosporinas	29

1.5.3.4 β -Lactamas Monocíclicas: Azetidinas.....	33
1.5.4 Mecanismos de Inibição de derivados de Cefalosporinas e Azetidinas.....	39
1.6 Âmbito da Tese.....	43
Capítulo 2: Síntese e Actividade Inibitória de Derivados de <i>N</i>-hidroximetil-2-azetidinas	45
2.1 Introdução.....	47
2.2 Obtenção de Derivados de <i>N</i> -hidroximetil-2-azetidinas	49
2.2.1 Análise Retro-sintética	49
2.2.2 Síntese de 4-Acetoxi-2-azetidinas	53
2.2.3 Síntese de Azetidinas Substituídas em C-4 e <i>N</i> -hidroximetil-2-azetidinas.....	56
2.2.4 Síntese de <i>N</i> -(aminocarboniloxi)metil-2-azetidinas	58
2.2.5 Identificação Espectroscópica de <i>N</i> -(aminocarboniloxi)metil-2-azetidinas.....	60
2.3 Determinação da Actividade Catalítica da HLE (K_m)	63
2.4 Actividade Inibitória de <i>N</i> -(aminocarboniloxi)metil-2-azetidinas na Elastase Humana.....	65
Capítulo 3: Síntese e Actividade Inibitória de Derivados de <i>N</i>-hidroxialquil-2-azetidinas	71
3.1 Introdução.....	73
3.2 Obtenção de Derivados de <i>N</i> -hidroxialquil-2-azetidinas.....	74
3.2.1 Síntese de <i>N</i> -(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil-2-azetidinas.....	75
3.2.2 Síntese de <i>N</i> -(1-aciloxi-1-estoxicarbonil)metil-2-azetidinas.....	78
3.2.3 Identificação Espectroscópica de <i>N</i> -(1-aciloxi-1-estoxicarbonil)metil-2-azetidinas	80
3.2.4 Síntese de <i>N</i> -(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidinas e de <i>N</i> -(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinas	86

3.2.4.1 Ciclização de Oxazolidine-2,4-dionas em Presença de Trietil- amina	89
3.2.5 Identificação Espectroscópica de <i>N</i> -(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidi- nonas	91
3.2.6 Identificação Espectroscópica de <i>N</i> -(1-amino-carboniloxi-1-etoxicar- bonil)metil-2-azetidinonas	98
3.3 Actividade Inibitória dos Derivados de <i>N</i> -hidroxialquil-2-azetidinonas na Elastase Humana	99
3.3.1 Especificidade Enzimática de 3.16fM	108
3.4 Estabilidade em Tampão Fosfato de <i>N</i> -(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidinonas	109
 <i>Capítulo 4: Oxazolidin-2,4-diona Como Inibidores da Elastase Suína</i>	113
4.1 Introdução	115
4.2 Obtenção de Oxazolidine-2,4-dionas	117
4.2.1 Síntese de <i>N</i> -aril-, <i>N</i> -acilaril- e <i>N</i> -sulfonilariloxazolidine-2,4-dionas	119
4.3 Actividade Inibitória de Oxazolidine-2,4-dionas na Elastase Pancreática Suína	122
4.3.1 <i>N</i> -aril-5-metiloxazolidine-2,4-dionas	123
4.3.2 <i>N</i> -acilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona e <i>N</i> -sulfonilaril-5, 5- dime- tiloxazolidine-2,4-diona	123
4.4 Estabilidade de Algumas Oxazolidine-2,4-dionas Sintetizadas	130
4.4.1 Hidrólise em Tampões Fosfato e HEPES	130
4.4.2 Hidrólise Alcalina	132
4.5 Proposta de Mecanismo de Inactivação da Elastase Suína	138
 <i>Conclusões Gerais</i>	143
 <i>Capítulo 5: Parte Experimental</i>	147
5.1 Equipamento	149
5.2 Preparação e Purificação de Solventes e Reagentes	150
5.3 Enzimas e Substratos	151

5.4 Obtenção de Derivados de <i>N</i> -hidroximetil-2-azetidionas	152
5.4.1 Síntese de 4-Acetoxi-2-azetidionas	152
5.4.2 Síntese de Azetidionas Substituídas em C-4	154
5.4.3 Síntese de <i>N</i> -hidroximetil-2-azetidionas	157
5.4.4 Síntese de <i>N</i> -(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas	160
5.5 Obtenção de Derivados de <i>N</i> -hidroxialquil-2-azetidionas.....	165
5.5.1 Síntese de <i>N</i> -(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil-2-azetidionas.....	167
5.5.2 Síntese de <i>N</i> -(1-aciloxi-1-estoxicarbonil)metil-2-azetidionas.....	169
5.5.3 Síntese de <i>N</i> -(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas e de <i>N</i> -(1-amino- carboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas	171
5.6 Obtenção de Oxazolidine-2,4-dionas	174
5.6.1 Síntese de <i>N</i> -aril-5-metiloxazolidine-2,4-dionas	174
5.6.2 Síntese de 5,5-dimetil- <i>N</i> -(4-metoxibenzoil)oxazolidine-2,4-diona.....	177
5.6.3 Síntese de 5,5-dimetil- <i>N</i> -[(4-metilfenil)sulfonil]oxazolidine-2,4-diona	177
5.7 Metanólise de 5,5-dimetil- <i>N</i> -(4-metoxibenzoil)oxazolidine-2,4-diona.....	178
5.8 Estudos Bioquímicos	179
5.8.1 Determinação da Actividade Catalítica da HLE.....	179
5.8.2 Método de Pré-incubação	180
5.8.3 Método Contínuo	181
5.8.4 Titulação da PPE	181
5.9 Estudos Cinéticos	182
5.9.1 Espectroscopia de UV	182
5.9.2 Cromatografia Líquida de Alta Resolução	183
 Apêndice	 185
 Bibliografia	 189

Resumo

A catepsina G (CG), proteinase 3 (PR3) e a elastase leucocitária humana (HLE) são proteases de serina envolvidas em processos inflamatórios e na degradação de várias proteínas da matriz proteica como a elastina e colagénio. O desequilíbrio entre estas proteases de serina e os seus inibidores endógenos origina uma excessiva degradação da elastina provocando patologias graves, tais como, enfisema pulmonar, fibrose cística, artrites reumatóides e síndrome respiratório agudo. A administração de inibidores sintéticos específicos pode resultar numa terapêutica eficaz para estas patologias.

Neste trabalho procedeu-se ao *design*, síntese, estudos de actividade inibitória e estabilidade química a pH fisiológico de novos derivados β -lactâmicos com potencialidade para funcionarem como inibidores irreversíveis, especialmente da HLE.

Foram sintetizadas *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas cuja azetidionona contém em C-3 grupos de reconhecimento primário (etilo ou isopropilo) e grupos electroattractores em C-4 (fenilsulfonilo ou tioheterociclos) que aumentam a reactividade intrínseca do anel β -lactâmico. Na primeira série de inibidores potencialmente suicidas, o átomo *N*-1 foi ligado por um grupo metileno (C-1') a um ácido carbâmico, que funciona como um bom grupo abandonante. Em ensaios *in vitro* com a HLE, estes derivados demonstraram uma actividade inibitória fraca e dependente do tempo com constantes de inibição de segunda-ordem, $k_{obs}/[I]$, que variavam entre 40 a $140 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por sua vez, a actividade catalítica da enzima foi inibida em 40 a 60%. Em tampão fosfato, pH 7,4 a 37°C , são compostos que se hidrolisam muito lentamente.

Com o objectivo de otimizar a derivatização, na segunda série de compostos sintetizada, aumentou-se a nucleofugacidade da amina do anel β -lactâmico com a ligação de C-1' a um segundo grupo electrotractor, o etoxicarbonilo.

As *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas que resultaram da ciclização intramolecular entre o grupo etoxicarbonilo e a função carbamato, demonstraram uma maior capacidade em inibir a HLE conseguindo uma redução de 90 a 97% da sua actividade enzimática. Porém, as constantes de inibição de segunda-ordem são idênticas aos derivados da primeira série variando entre 24 a $144 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Possuem tempos de semi-vida de 0,7 a 12h, em tampão fosfato, pH 7,4 a 37°C .

Em ambas as séries de derivados não se observou, nos ensaios *in vitro*, recuperação da actividade enzimática após um período de 24h, sugerindo uma inibição irreversível da HLE.

A formação inesperada de oxazolidine-2,4-dionas, na segunda série de derivados β -lactâmicos, suscitou o interesse para esta estrutura como potencial inibidor da HLE. Foram sintetizadas *N*-aril-, *N*-acilaril- e *N*-sulfonilariloxazolidine-2,4-dionas. Nos ensaios *in vitro* utilizou-se a elastase suína (PPE) como modelo da HLE. As *N*-aril-5-metiloxazolidine-2,4-dionas não inactivaram a PPE, contudo os compostos *N*-acilaril- e *N*-sulfonilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona inibiram esta enzima com constantes de segunda-ordem superiores a 467 e 255 $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente. De facto, a *N*-acilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona necessitou apenas de 9,3 equivalentes para inactivar completamente a PPE. Após a inibição, verificou-se uma rápida e espontânea recuperação da actividade enzimática, especialmente com o composto *N*-sulfonilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona, provavelmente devido à formação de acil-complexos instáveis, PPE-I.

Palavras-chaves: Inibidores β -lactâmicos, oxazolidiene-2,4-dionas, elastase leucocitária humana (HLE)

Abstract

Cathepsin G (CG), proteinase 3 (PR3) and human leukocyte elastase (HLE) are serine proteases involved in inflammation and in various tissue matrix proteins degradation such as elastin and collagen. The imbalance between these serine proteases and their endogenous inhibitors leads to excessive elastin proteolysis that cause diseases, such as, emphysema, cystic fibrosis, rheumatoid arthritis and acute respiratory syndrome. The administration of specific synthetic inhibitors may consist in an efficient therapeutic of these diseases.

In this work the design, synthesis, inhibitory activity and chemical activity at the physiological pH of new β -lactam derivatives were the aim to achieve potential irreversible inhibitors, especially to HLE.

We synthesized *N*-(aminocarbonyl)methyl-2-azetidiones, where the azetidione contains primary recognition groups at C-3 (ethyl or isopropyl) and electron-withdrawing groups at C-4 (phenylsulfonyl or tiorheterocycles), required for increasing the reactivity of β -lactam ring. In a first series of potential suicide inhibitors, the atom *N*-1 was connected by a methylene group (C-1') to a carbamic acid as a good leaving group. The *in vitro* assays with HLE of these derivatives showed weak time-dependent inhibition with second-order rate constants, $k_{obs}/[I]$, ranging from 40 to 140 $M^{-1}s^{-1}$. In turn, the enzymatic activity was inhibited by 40 to 60%. These compounds hydrolyzed very slowly in phosphate buffer, pH 7,4 at 37°C.

In order to optimize the derivatization, a second series was synthesized where C-1' was attached to a second electron-withdrawing group, ethoxycarbonyl, which increase the ability of β -lactam amine as a leaving group.

The *N*-(oxazolidine-2,4-dione)-2-azetidiones resulted from intramolecular cyclization between the ethoxycarbonyl group and the carbamate function. These compounds demonstrated a great efficiency to inhibit HLE, achieving a reduction in enzymatic activity between 90 to 97%. However, the second-order rate constants were identical to the first series derivatives, ranging from 24 to 144 $M^{-1}s^{-1}$. The half-lives observed for *N*-(oxazolidine-2,4-dione)-2-azetidiones, in phosphate buffer conditions, were between 0,7 to 12 hours.

The *in vitro* assays, realized with both series, the recovery of enzymatic activity wasn't observed after a 24 hours period, suggesting an irreversible inhibition of HLE.

The unexpected formation of oxazolidine-2,4-diones, attracted our interest to this structure as potential inhibitors of HLE, therefore *N*-aryl-, *N*-acylaryl- and *N*-sulphonylarylloxazolidine-2,4-diones were synthesized. *In vitro* assays, we used the porcine elastase (PPE) as a HLE model. *N*-aryl-5-methyloxazolidine-2,4-diones were inactive over PPE, but *N*-acyl- and *N*-sulphonylaryl-5,5-dimethyloxazolidine-2,4-dione were inhibitors with second-order rate constants highest than 467 and 255 M⁻¹s⁻¹, respectively. In fact, *N*-acyl-5,5-dimethyloxazolidine-2,4-dione required only 9,3 equivalents for complete inactivation of PPE. After inhibition, a rapid and spontaneous recovery of enzymatic activity was observed, especially with *N*-sulphonylaryl-5,5-dimethyloxazolidine-2,4-dione, probably due to a unstable acyl-complex PPE-I.

Keywords: β -lactam inhibitors, oxazolidine-2,4-diones, human leukocyte elastase (HLE)

Índice de Figuras

Figura 1.1	Interações entre os sub-sítios enzimáticos e os resíduos de amino-ácidos do substrato	4
Figura 1.2	Rede de ligações de hidrogénio da tríade catalítica	6
Figura 1.3	Especificidade primária das proteases de serina	8
Figura 2.1	Constantes de acoplamento geminais e vicinais dos hidrogénios diastereotópicos dos derivados 2.24b e 2.24e	58
Figura 2.2	Sinal e diagrama de acoplamento do hidrogénio diastereotópico do grupo CH_3CH_2 dos derivados 2.25	61
Figura 2.3	Sinal e diagrama de acoplamento dos hidrogénios diastereotópicos do grupo CH_2Ph do derivado 2.25f	62
Figura 2.4	Esquema das fragmentações correspondentes aos sinais de maior intensidade, presentes no espectro de massa do derivado 2.25b	63
Figura 2.5	Efeito da concentração de <i>N</i> -MeOSuc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val- <i>p</i> NA na velocidade inicial da reacção de hidrólise pela HLE, em HEPES 0,1 M, pH 7,2 a 25°C	65
Figura 2.6	Diminuição da actividade enzimática em função do tempo dos compostos 2.25e (▲), 2.25g (●), 2.25h (■) e 2.25i (◆) em HEPES, pH 7,2 a 25°C, com uma concentração de inibidor na mistura de incubação de $[\text{I}] = 100[\text{E}]$	69
Figura 2.7	Inactivação da HLE pelos derivados 2.25d (●), 2.25e (▲) e 2.25h (■) em HEPES, pH 7,2 a 25°C com uma concentração de inibidor na mistura de incubação de $[\text{I}] = 100[\text{E}]$	70
Figura 3.1	Sinal e diagrama de acoplamento dos hidrogénios diastereotópicos do grupo OCH_2CH_3 do derivado 3.13a	84
Figura 3.2	Sinal e diagrama de acoplamento dos hidrogénios diastereotópicos do grupo OCH_2CH_3 do derivado 3.13b	85
Figura 3.3	Espectros de ^1H -RMN dos derivados 3.16bM e 3.16bm	93
Figura 3.4	Estrutura cristalina do par de enantiómeros do composto 3.16cm	97

Figura 3.5	Diagrama de acoplamento dos hidrogénios diastereotópicos do grupo CH_2Ph do derivado 3.15fM 99
Figura 3.6	Diminuição da actividade enzimática em função do tempo, dos compostos 3.13c (■), 3.16bM (●), 3.16cM (◆), 3.16fM (○) e 3.15fM (▲). Os inibidores (20 μM) foram incubados com a HLE (0,2 μM) em tampão HEPES, pH 7,2 a 25 °C 102
Figura 3.7	Cinética de inibição da HLE pelo derivado 3.16fM . Concentrações de 20 μM (◆), 40 μM (■), 60 μM (▲) e 80 μM (●) de 3.16fM foram incubadas com a HLE (0,2 μM), em tampão HEPES, pH 7,2 a 25°C 104
Figura 3.8	Rectas das constantes de velocidade de primeira-ordem, k_{obs} , para a inactivação da HLE, em função da concentração do inibidor 3.13a (◆), 3.16e (■) e 3.16fM (▲)..... 105
Figura 3.9	Comparação da posição relativa dos diastereoisómeros (4 <i>R</i> ,5' <i>S</i>) de 3.16c , 3.16e e 3.16f , no centro activo da HLE, utilizando a modelização molecular..... 108
Figura 4.1	Curvas representativas do processo de inibição da PPE pelo composto 4.19 utilizando o método contínuo. A absorvância foi monitorizada a 390 nm para as reacções em soluções que contêm 0,2 μM de PPE, 0,3 mM de <i>N</i> -Suc-(L-Ala) ₃ - <i>p</i> -nitroanilida e o inibidor 4.19 em tampão HEPES, pH 7,2 e 5% de DMSO (v/v) a 25°C 125
Figura 4.2	Curvas representativas do processo de inibição da PPE pelo composto 4.20 utilizando o método contínuo. As condições utilizadas são as mencionadas na Figura 4.1 126
Figura 4.3	Inactivação e espontânea recuperação da actividade da PPE inibida pelo composto 4.19 . Concentrações de 50, 100, 200 e 500 μM de 4.19 foram incubadas com 5 μM de PPE em tampão HEPES, pH 7,2 a 25 °C 127
Figura 4.4	Inactivação e espontânea recuperação da actividade da PPE inibida pelo composto 4.20 . Concentrações de 50, 200 e 500 μM

	de 4.20 foram incubadas com 5 μ M de PPE em tampão HEPES, pH 7,2 a 25 °C.	128
Figura 4.5	Rectas das constantes de velocidade de primeira-ordem, k_{obs} , para a inibição da PPE, em função da concentração do inibidor 4.19 (\blacklozenge), e 4.20 (\bullet).	129
Figura 4.6	Inactivação da PPE em função da razão molar entre o inibidor 4.19 e a PPE (5 μ M) em tampão HEPES, pH 7,2 a 25°C (método de pré-incubação).	130
Figura 4.7	Efeito da concentração de HO ⁻ sobre a velocidade de hidrólise dos compostos 3.16bM (\blacklozenge) e 4.20 (\bullet) em soluções de tampão borato com 20% de acetonitrilo (v/v) a 25°C; $\mu=0,50$ M (NaClO ₄); [3.16bM] ₀ = 2 $\times 10^{-5}$ M; [4.20] ₀ = 4 $\times 10^{-5}$ M	133
Figura 4.8	Efeito da concentração de HO ⁻ sobre a velocidade de hidrólise dos compostos 3.23 (\blacksquare) e 4.19 (\blacktriangle) em soluções de tampão borato com 20% de acetonitrilo (v/v) a 25°C; $\mu=0,50$ M (NaClO ₄); [3.23] ₀ = [4.19] ₀ = 4 $\times 10^{-5}$ M.	133
Figura 5.1	Gráfico para a determinação da constante de velocidade de hidrólise do composto 4.18d , em tampão fosfato (PBS), pH 7,4 a 37°C. A absorvância foi seguida a 326 nm.	182
Figura 5.2	Gráfico para a determinação da constante de velocidade de hidrólise do derivado 3.16bM , em tampão fosfato (PBS) com 20% de acetonitrilo (v/v), pH 7,4 a 37°C. A absorvância foi seguida a 240 nm.	183

Índice de Tabelas

Tabela 1.1	Principais actividades biológicas e doenças associadas às proteases HLE, PR3 e CG	15
Tabela 1.2	Estruturas gerais de inibidores suicidas de proteases de serina	24
Tabela 1.3	Derivados de tiadiazolidinonas que apresentam as maiores actividades inibitórias na HLE, PR3 e CG	27
Tabela 2.1	Azetidinonas substituídas em C-4 e <i>N</i> -hidroximetilazetidinonas sintetizadas	56
Tabela 2.2	<i>N</i> -(aminocarboniloxi)metil-2-azetidinonas sintetizadas	59
Tabela 2.3	Velocidades de hidrólise de várias concentrações de substrato pela HLE	64
Tabela 2.4	Actividade inibitória dos compostos 2.25a-e e 2.25g-i na HLE em HEPES, pH 7,2 a 25°C	67
Tabela 3.1	Rendimentos e razões diastereoméricas das <i>N</i> -(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil-2-azetidinonas sintetizadas	77
Tabela 3.2	<i>N</i> -(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinonas sintetizadas.....	79
Tabela 3.3	Desvios químicos (δ /ppm) e constantes de acoplamento (J /Hz) de ^1H -RMN das <i>N</i> -(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinonas	82
Tabela 3.4	Desvios químicos (δ /ppm) de ^{13}C -RMN das <i>N</i> -(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinonas sintetizadas.....	83
Tabela 3.5	Rendimentos e razões diastereoméricas de <i>N</i> -(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidinonas e de <i>N</i> -(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinonas sintetizadas.....	88
Tabela 3.6	Desvios químicos (δ /ppm) e constantes de acoplamento (J /Hz) de ^1H -RMN de <i>N</i> -(oxazolidine-2,4-diona)- 2-azetidinonas	94
Tabela 3.7	Desvios químicos (δ /ppm) de ^{13}C -RMN de <i>N</i> -(oxazolidine-2,4-diona)- 2- azetidinonas	96
Tabela 3.8	Desvios químicos (δ /ppm) e constantes de acoplamento (J /Hz) de ^1H -RMN de <i>N</i> -(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinonas.....	100

Tabela 3.9	Desvios químicos (δ /ppm) de ^{13}C -RMN de <i>N</i> -(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas.....	101
Tabela 3.10	Actividade inibitória dos derivados de <i>N</i> -hidroxialquil-2-azetidionas na HLE em HEPES, pH 7.2, a 25°C.....	103
Tabela 3.11	Constantes de inactivação de primeira-ordem, k_{obs} , da HLE em função das concentrações dos inibidores 3.13a , 3.16e e 3.16fM em HEPES, pH 7,2 a 25°C	105
Tabela 3.12	Valores de k_{obs} e respectivos tempos de semi-vida em tampão fosfato, com 20% de acetonitrilo, pH 7,4 a 37°C e valores teóricos de log P de <i>N</i> -(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas; $[\mathbf{3.16}]_0 = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$	110
Tabela 4.1	Oxazolidine-2,4-dionas sintetizadas.....	120
Tabela 4.2	Valores de k_{obs} e respectivos tempos de semi-vida em tampão fosfato, pH 7,4 a 37°C e em tampão HEPES, pH 7,2 a 25 °C dos compostos 4.18d , 4.19 e 4.20 ; $[\mathbf{4.18d}]_0 = [\mathbf{4.19}]_0 = [\mathbf{4.20}]_0 = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$	131
Tabela 4.3	Constantes de velocidade de inibição de segunda-ordem em HEPES, pH 7,2 a 25°C e constantes velocidade de segunda-ordem para a hidrólise alcalina em tampão borato com 20% de acetonitrilo (v/v) a 25 °C de algumas oxazolidine-2,4-dionas	134

Símbolos e Abreviaturas

ACT	α_1 -antiquimotripsina
Ala	alanina
Ar	arilo
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
BOC	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Bu	butilo
Buⁱ	iso-butilo
Bu^t	<i>tert</i> -butilo
Bz	benzoilo
Bzl	benzilo
CBz	benziloxicarbonilo
ccd	cromatografia em camada delgada
CDI	1,1'-carbonildiimidazol
c.f.	confrontar
CG	catepsina G
Cq	carbono quaternário
¹³C-RMN	ressonância magnética nuclear de ¹³ C
CSI	isocianato de clorossulfonilo
Cys	cisteína
<i>d</i>	duplete
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
E	enzima
eq. mol.	equivalente molar
EREF	<i>enzyme rate enhancement factor</i>
ESI-MS	espectro de massa obtido por <i>electrospray</i> (<i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>)
Et	etilo
Gln	glutamina
Gly	glicina
Hal	halogénio

HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
His	histidina
HLE	elastase leucocitária humana
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão (<i>high performance liquid chromatography</i>)
¹H-RMN	ressonância magnética nuclear de próton
I	inibidor
IC₅₀	concentração de inibidor necessária para inibir 50% da actividade enzimática
Ile	isoleucina
IV	infravermelho
²J	constante de acoplamento geminal
³J	constante de acoplamento vicinal
K_i	constante de dissociação do complexo reversível E·I
k_{inact}	constante de velocidade de primeira-ordem de formação da enzima inibida (E-I) a partir do complexo reversível
k_{obs}	constante de velocidade de inibição de primeira-ordem
K_m	constante de Michaelis
Leu	leucina
LG	grupo abandonante (<i>leaving group</i>)
log P	logaritmo do coeficiente de partilha octanol/água
Lys	lisina
m	múltiplo
M⁺	ião molecular
Me	metilo
MEC	matriz extracelular
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MS-EI	espectro de massa obtido por electroionização (<i>electronic impact mass spectrometry</i>)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
norLeu	norleucina
norVal	norvalina
n-Pr	propilo

OAc	acetato
OMe	metoxi
OTs	tosilato
Ph	fenilo
Phe	fenilalanina
PPE	elastase pancreática suína
Prⁱ	isopropilo
PR3	proteínase 3
Pro	prolina
q	quadripleto
r.d.	razão diastereomérica
s	singuleto
SD	desvio padrão (<i>standard deviation</i>)
sl	singuleto largo
SLPI	inibidor secretório da proteínase leucocitária
sobr	sobreposto
Suc	succinilo
t	tripleto
t.a.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoracético
THF	tetrahidrofurano
TMS	tetrametilsilano
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
t_{1/2}	tempo de semi-vida
UV	espectroscopia de ultra-violeta
v	velocidade
Val	valina
α1-PI	α ₁ -proteínase
μ	força iónica
η	rendimento
σ*	constante de substituição de Taft

Capítulo 1

Introdução

1.1 Proteases de Serina

As proteases de serina representam cerca de um terço de todas as proteases conhecidas.¹ A maioria destas enzimas são endopeptidases, ocorrendo a hidrólise da ligação amida a meio da cadeia polipeptídica do substrato específico, verificando-se a sua maior actividade a pH neutro (pH 7-9).^{1,2} São caracterizadas por apresentarem no seu centro activo um resíduo de serina essencial para a catálise enzimática. Na realidade, a sua acção catalítica depende da tríade catalítica, constituída no caso da quimotripsina, pelos resíduos de Aspartato-102 (Asp-102), Histidina-57 (His-57) e Serina-195 (Ser-195), que se encontra bastante afastada na estrutura primária das enzimas, mas que é reunida no centro activo na estrutura terciária.²

As proteases de serina são agrupadas em clãs tendo como base a evidência de uma única origem evolucionária. A evidência dessa origem comum é demonstrada pela semelhança da estrutura terciária, pela ordem dos resíduos do centro catalítico e frequentemente pela sequência dos amino-ácidos que rodeiam o centro catalítico. Cada clã é formado por uma ou normalmente várias famílias de proteases, sendo uma família, um conjunto de proteases homólogas em que cada membro apresenta uma grande analogia na sua estrutura primária.^{3,4} As cerca de 26000 proteases de serina estão agrupadas em 13 clãs e 40 famílias.

A diferente combinação dos três resíduos da tríade catalítica resulta em quatro clãs (Tríades Catalíticas “Clássicas”) de proteases de serina que sugerem quatro diferentes origens. Estes clãs encontram-se representados pela quimotripsina (His-Asp-Ser), subtilisina (Asp-His-Ser), carboxipeptidase Y (Ser-Asp-His) e CLP protease (Ser-His-Asp).^{1,4}

As proteases da família da quimotripsina são as mais abundantes na natureza podendo ser encontradas em eucariotas, procariotas, bactérias e vírus. Estas enzimas estão envolvidas em muitos processos fisiológicos dos quais se destacam: a digestão (quimotripsina, tripsina e elastase pancreática), resposta imunológica (triptase, catepsina G e elastase leucocitária), coagulação sanguínea (factor de coagulação VIIa, IXa, Xa, XIIa, trombina e proteína C), reprodução (antigénio específico da prostata, acroseína),

fibrinólise (uroquinase, plasmina), degradação e remodelação tecidual, activação de hormonas e factores de crescimento.⁵

1.2 Mecanismo Catalítico

As proteases de serina que apresentam a tríade catalítica “clássica” têm um mecanismo catalítico muito idêntico entre si. Contudo o mecanismo que se irá descrever foi sobretudo analisado na família da quimotripsina.

Para definir as interacções que ocorrem entre o substrato e a enzima, foi necessário desenvolver um sistema de denominações - nomenclatura de Schechter e Berger - no qual os sítios de ligação entre a enzima e o substrato são divididos em sub-sítios a partir da ligação peptídica a cindir. Assim, cada sub-sítio enzimático (S_1 - S_n e S_1' - S_n') vai interagir com um determinado resíduo de amino-ácido do substrato peptídico (P_1 - P_n e P_1' - P_n') como se encontra representado na Figura 1.1.⁶

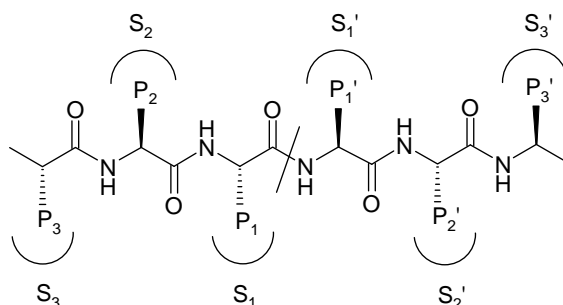


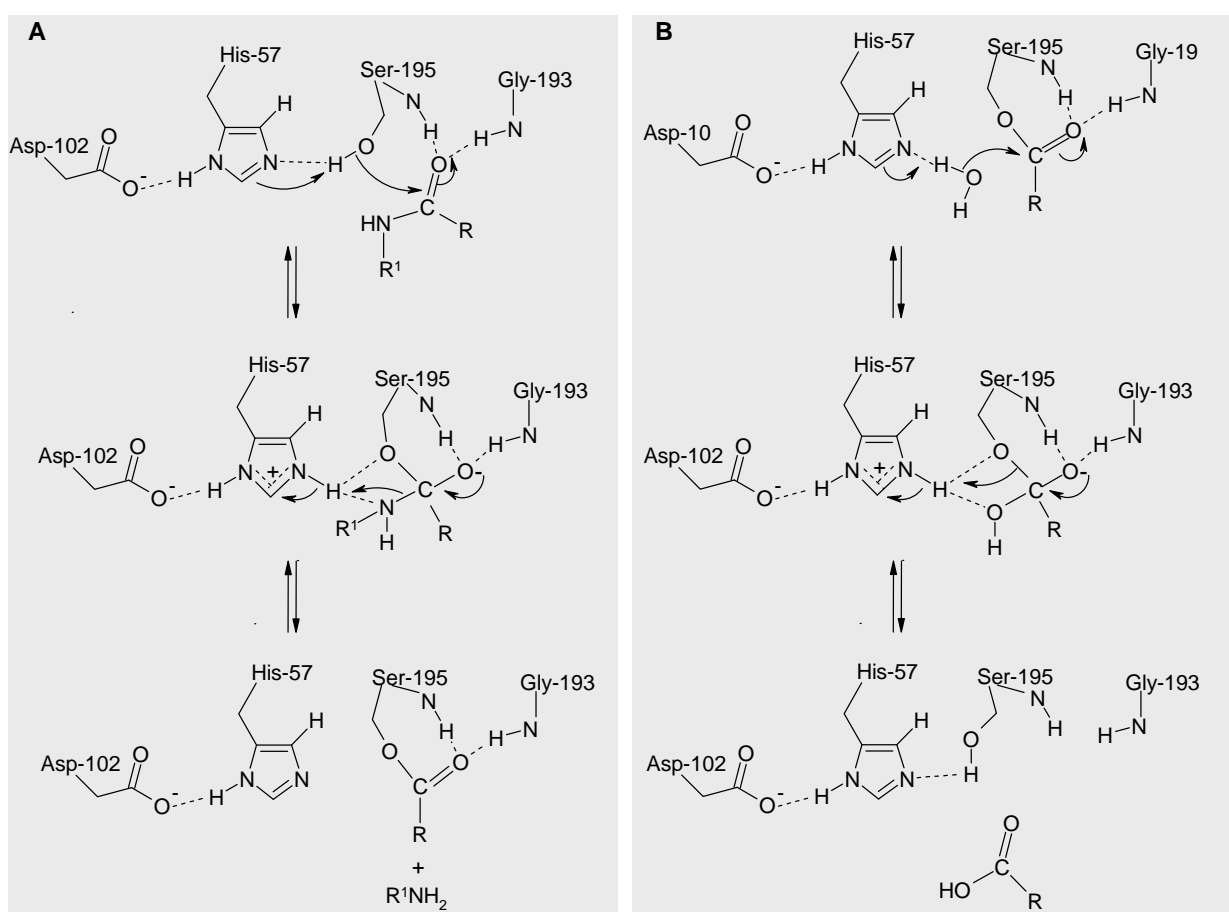
Figura 1.1 Interacções entre os sub-sítios enzimáticos e os resíduos de amino-ácidos do substrato.

O mecanismo catalítico das proteases de serina pode ser dividido em duas partes: a reacção de acilação do resíduo de Ser-195 e a reacção de desacilação (Esquema 1.1- **A** e **B**).

Após a formação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o substrato peptídico, o grupo hidroxilo do resíduo da Ser-195, activado pela catálise básica do anel de imidazol da His-57, actua como nucleófilo e ataca o grupo carbonilo da ligação

amida a cindir (ligação P_1-P_1') formando-se um intermédio tetraédrico de elevada energia potencial.

O intermédio tetraédrico aniónico é estabilizado por ligações de hidrogénio, formadas pelos grupos NH dos resíduos de Ser-195 e Gly-193, que no seu conjunto formam a cavidade oxoaniónica. O colapso deste intermédio tetraédrico ocorre por meio de catálise ácida, por transferência de um protão do anel protonado do imidazol da His-57 ao grupo amino, que se transforma num bom grupo abandonante. A libertação da amina resulta na formação da enzima acilada.



Esquema 1.1

Na reacção de desacilação, uma molécula de água, assistida pela catálise básica do resíduo da His-57, actua como nucleófilo e ataca a acil-enzima formando-se um novo intermédio tetraédrico estabilizado pelos mesmos resíduos de amino-ácidos. O

intermédio colapsa, igualmente *via* catálise ácida pela His-57, originando o fragmento carboxílico, proveniente do substrato, e regenerando a Ser-195.⁵⁻⁸

As mutações experimentais realizadas no resíduo de Aspartato confirmaram que é essencial a sua existência na catálise enzimática. Assim, foi comprovado que a His-57 realiza uma forte ligação de hidrogénio entre o N^{δ1}-H do anel de imidazol e o grupo carboxilato do Asp-102. Esta ligação de hidrogénio permite que o Asp-102 participe na correcta orientação da His-57 relativamente à Ser-195 e como consequência a abstracção do protão do grupo hidroxilo pela His-57 é facilitada, aumentando a nucleofilia da Ser-195.^{1,9} É uma ligação de hidrogénio que se mantém durante toda a reacção catalítica, estando o protão predominantemente localizado (85%) no N^{δ1}, facto corroborado pelo acoplamento de spins ¹⁵N-H e pelo deslocamento químico de ¹⁵N do N^{δ1} da His-57.⁹⁻¹¹

A rede de ligações de hidrogénio presente no centro catalítico desempenha um papel crucial no mecanismo enzimático e na eficiência com que a enzima processa o respectivo substrato. Esta rede orienta e activa o substrato para a catálise, permite o aumento de nucleofilia do grupo hidroxilo da Ser-195 e contribui fundamentalmente para a estabilização: **(i)** da conformação do sítio activo da enzima (Figura 1.2); **(ii)** do estado de transição e do intermédio tetraédrico; **(iii)** da enzima acilada; **(iv)** do resíduo de His-57 protonado.^{5, 10}

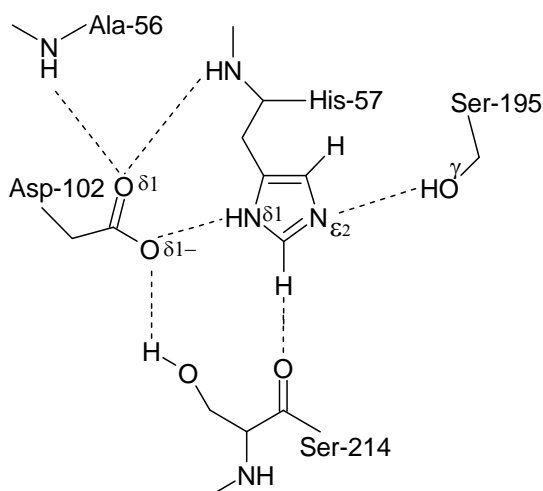


Figura 1.2 Rede de ligações de hidrogénio da tríade catalítica.⁵

Em resumo, a tríade catalítica, a cavidade oxoaniónica e os amino-ácidos que as envolvem estão todos alinhados para facilitar a transferência electrónica e estabilizar as cargas que se desenvolvem à medida que a reacção catalítica progride, o que permite explicar o aumento de velocidade da reacção catalizada por um factor de 10^9 , em relação à reacção não catalisada.⁷

1.3 Especificidade Enzimática Primária

A principal determinação da especificidade de uma protease de serina para um substrato peptídico ou inibidor é o sub-sítio S_1 e o resíduo P_1 , respectivamente (especificidade primária). De acordo com os amino-ácidos existentes no sub-sítio S_1 assim se verifica a preferência da enzima para determinado resíduo P_1 com o qual consegue estabelecer as interacções mais eficientes.

Segundo estes sítios de reconhecimento primário, as proteases de serina podem ser classificadas em: **(i)** proteases semelhantes à quimotripsina se têm preferência por resíduos P_1 grandes e hidrofóbicos como os resíduos de Phe, Tyr ou Trp; **(ii)** proteases semelhantes à tripsina que se ligam em S_1 a resíduos carregados positivamente como os resíduos de Arg ou Lys; **(iii)** proteases semelhantes à elastase que por terem uma cavidade pequena em S_1 se ligam preferencialmente a resíduos pequenos e alifáticos como a Gly, Ala ou Val. (Figura 1.3).^{6,12}

O reconhecimento do substrato também é efectuado, nas proteases de serina, por interacções longe da ligação a cindir (sítios de reconhecimento secundário). Os sub-sítios S_2 - S_n e S_1' - S_n' ou sítios de ligação remotos, podem concertadamente com o sub-sítio S_1 , determinar a especificidade e acelerar a hidrólise do substrato.⁵ Para as elastases, estas interacções secundárias são particularmente importantes porque o seu sub-sítio S_1 é pequeno, acomodando pequenos resíduos P_1 , não permitindo que a ligação S_1 - P_1 seja dominante, ao contrário do que acontece com o reconhecimento efectuado, por exemplo, pela tripsina ao resíduo de Arg em P_1 .¹²

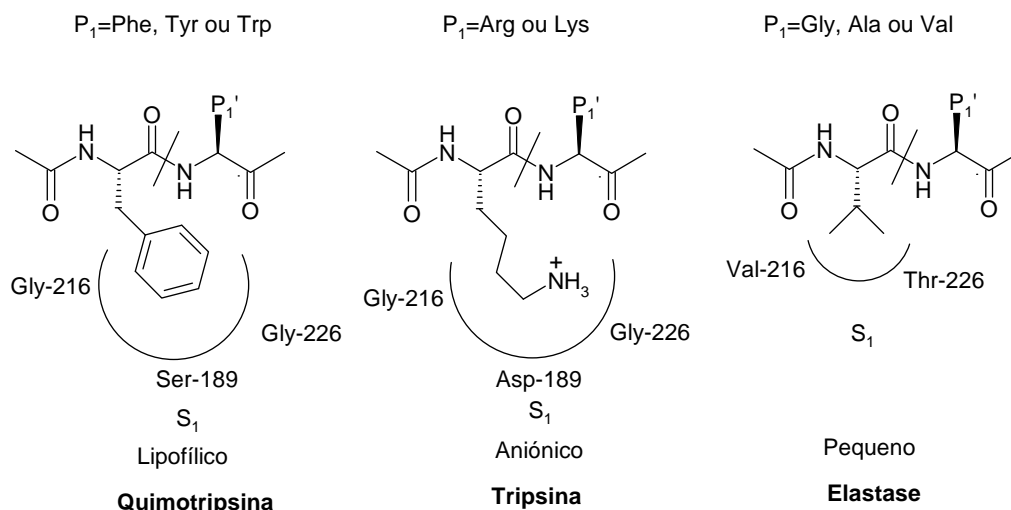


Figura 1.3 Especificidade primária das proteases de serina.⁶

1.4 Proteases de Serina com Acção Inflamatória

1.4.1 Os Neutrófilos no Processo Inflamatório

A inflamação é um fenómeno complexo, caracterizado pela intervenção e interdinâmica de vários tipos de células como, neutrófilos, mastócitos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e mediadores pró-inflamatórios: prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, quimocinas, espécies reactivas oxigenadas, factores de crescimento, receptores celulares e as proteases de serina, especialmente a elastase leucocitária (HLE), catepsina G (CG), proteinase 3 (PR3), quimase e triptase.

Em indivíduos saudáveis, os inibidores endógenos das proteases de serina confinam a actividade das proteases, presentes no meio extracelular, ao ambiente celular circundante. Esta apertada regulação da proteólise enzimática permite um desempenho normal nos processos fisiológicos de migração celular, na reparação e remodelação de tecidos e na penetração das barreiras tecidulares.

Ao surgir um processo inflamatório, os neutrófilos em circulação são das primeiras células que chegam aos locais de inflamação, formando a primeira linha de defesa contra as infecções bacterianas. Como tal, a principal função intracelular das proteases de serina é a digestão de microorganismos fagocitados em combinação com

péptidos anti-microbianos e com o sistema NADPH-oxidase que produz metabolitos oxigenados.^{13,14}

No entanto, quando os neutrófilos são expostos a citocinas e quimocinas resulta uma rápida mobilização dos grânulos azurofílicos para a superfície celular. Uma quantidade mínima das proteases de serina dos neutrófilos é libertada para o meio envolvente, mas a maioria fica ligada à superfície da membrana do neutrófilo onde mantem a sua actividade catalítica, permitindo a penetração de barreiras durante a migração celular, regulando a permeabilidade vascular e tendo actividades pro-inflamatórias durante a resposta inflamatória. Em neutrófilos não estimulados a quantidade de HLE, CG e PR3 expressa pela membrana é reduzida.²

A exagerada e prolongada destruição da matriz proteica dos tecidos, *in vivo*, por parte das proteases de serina dos neutrófilos e da qual resulta danos massivos com consequências fisiopatológicas graves verifica-se quando:

(i) as enzimas no meio extracelular são fracamente inibidas pelos seus inibidores endógenos, também denominados de serpinas, por estes se encontrarem com menor capacidade inibitória devido à sua oxidação provocada por exemplo pelo fumo do tabaco.¹⁵ A insuficiente inibição pode também ser resultante de níveis reduzidos dos inibidores, quer devido a desordens genéticas,¹² quer por inactivação proteolítica das serpinas por várias enzimas como as metaloproteases, HLE e catepsina B.¹⁵

(ii) as enzimas livres que se ligam fortemente ao substrato são resistentes à inactivação pelos inibidores endógenos.^{2,15} Estudos *in vitro* demonstraram que a HLE liga-se fortemente à elastina e cartilagens, tendo sido localizada em cartilagens de articulações de pacientes com artrite reumatóide.²

(iii) os neutrófilos que estão em contacto directo com o substrato podem formar compartimentos estreitos selectivos, muito concentrados em enzimas e que excluem os inibidores de elevada massa molecular,¹⁵ contudo os inibidores da HLE de menor massa molecular conseguem bloquear a catálise enzimática mesmo nestes ambientes.¹⁶

(iv) a migração de inúmeros neutrófilos que foram recrutados por mediadores, para os tecidos, liberta elevadas concentrações de enzimas que superam as quantidades circundantes de inibidores, deslocando o equilíbrio enzima/inibidor e favorecendo o ataque catalítico aos tecidos.^{2, 15, 16}

Para além dos danos tecidulares o processo inflamatório passa igualmente pela activação/inactivação de mediadores pro-inflamatórios, por parte das proteases de serina dos neutrófilos permitindo a regulação, perpetuação ou terminação da resposta inflamatória.^{14, 17}

1.4.2 Características Estruturais e Funcionais das Proteases de Serina dos Neutrófilos

1.4.2.1 Elastase Leucocitária Humana

A elastase leucocitária humana (HLE: EC3.4.21.37) é uma glicoproteína com uma única cadeia polipeptídica de 218 resíduos de amino-ácidos, extremamente catiónica, não contendo resíduos de lisina ou tirosina. É estabilizada por 4 pontes dissulfureto e duas ligações asparagina-hidrato de carbono nos resíduos Asn-109 e Asn-159.^{2,14} Para além de existir nos neutrófilos, em quantidade de 1,1 pg/célula,¹⁸ encontra-se também nos monócitos e mastócitos, em baixas concentrações.¹³

A HLE apresenta 4 isoformas com sequências de amino-ácidos idênticas, diferindo basicamente na natureza do conteúdo em hidratos de carbono¹⁹, o que não altera as constantes cinéticas das isozimas com vários substratos e inibidores.²⁰

O sub-sítio S₁ da HLE é pequeno, hemisférico e hidrofóbico devido à presença de Val-190, Phe-192, Ala-213, Val-216, Phe-228 e da ponte dissulfureto Cys-191-Cys-220.²¹ Como tal, este sub-sítio tem preferência para pequenos resíduos hidrofóbicos, no substrato ou inibidor, como Val, Ala, Leu e Gly.¹³ Contudo, a actividade da HLE não depende somente do sítio de reconhecimento primário, mas também dos sub-sítios de reconhecimento secundários, S₂-S_n e S₁'-S_n', como já foi referido. No caso da HLE, o reconhecimento dos resíduos de amino-ácidos específicos do substrato peptídico é extensível aos sub-sítios S₅ a S₃'.¹² Existe alguma controvérsia neste assunto, porque estudos mais recentes indicam que na região S', a influência na catálise pela HLE limita-se às interacções S₁'-P₁' não se verificando nenhum efeito significativo em interacções para além deste sub-sítio.¹³

O sub-sítio S₂ é delineado por Phe-215, Leu-99 e o anel planar do imidazol da His-57, resultando numa cavidade bastante hidrofóbica. Como consequência, esta

cavidade tem preferência por amino-ácidos em P₂ com cadeias laterais hidrofóbicas de tamanho médio como a prolina.²¹ Os substratos com resíduos de amino-ácidos carregados na posição P₂ (Lys, Arg e Asp) sofrem uma menor catálise pela HLE. Por sua vez, os sub-sítios S₃ e S₄ acomodam preferencialmente resíduos de Ala.¹³

O sub-sítio S₁' é relativamente hidrofóbico, sendo formado por Phe-41 e a ponte Cys-42-Cys-58, podendo acomodar todos os resíduos de amino-ácidos com exceção de Pro, resíduos *N*-metilados e resíduos hidrofóbicos grandes como por exemplo o Trp.²¹

A actividade da HLE e de outras proteases de serina em meio extracelular ou ligadas à membrana dos neutrófilos é regulada pelas já referidas serpinas e também pelo inibidor universal, não específico, α_2 -macroglobulina, que é activo contra os quatro tipos de endopeptidases: proteases de serina, cisteína, aspártica e metaloproteases. É um rápido inibidor plasmático da HLE mas devido ao seu tamanho dificilmente migra do plasma para o espaço tecidual.¹²

As serpinas são inibidores de elevada massa molecular (40 a 50 kDa) formados por 350 a 400 amino-ácidos, constituindo 2% do total das proteínas do plasma humano, dos quais 70% representam o inibidor α_1 -proteinase, α_1 -PI, (ou α_1 -antitripsina).²² A α_1 -PI é uma glicoproteína de 52 kDa que inibe preferencialmente e fortemente a HLE ($K_i = 3.3 \times 10^{-14} \text{ M}^{-1}$)¹², formando um complexo irreversível HLE- α_1 -PI. Cerca de 90% da HLE circulante apresenta-se como um complexo 1:1 com a α_1 -PI, sendo este complexo eliminado do plasma pelo sistema retículo-endotelial.²³ Esta serpina consegue também inibir a PR3, CG, trombina, tripsina e quimotripsina.¹³

Para além das serpinas, existem inibidores das proteases de serina de menor massa molecular, nomeadamente: o inibidor secretório da proteinase leucocitária (SLPI), uma proteína não glicosilada de 11.7 kDa, com 107 amino-ácidos que inibe de maneira reversível tanto a HLE como a CG, e a elafina, uma proteína não glicosilada de 6 kDa, composta por 57 amino-ácidos, que pode ser encontrada nas secreções dos brônquios e na pele.^{12,13}

1.4.2.2 Proteinase 3

A Proteinase 3 (PR3: EC 3.4.21.76) é constituída por uma cadeia polipeptídica de 228 amino-ácidos e tem 54% de homologia com a HLE.² A forma madura desta enzima

é estabilizada por ligações de dissulfureto e ligações glicosídicas. Apresenta uma conformação inactiva no meio ácido dos grânulos azurofílicos, verificando-se a sua activação quando é deslocada para um meio com pH neutro.¹³

Contrariamente à HLE e CG, a PR3 não está restringida aos grânulos azurofílicos, podendo ser encontrada na membrana de vesículas secretórias e em grânulos secundários. Para além dos neutrófilos (com aproximadamente 3,0 pg/célula) a PR3 existe também nos monócitos maduros, nos basófilos e mastócitos.¹⁸

É uma enzima que possui 3 isoformas que diferem na sua estrutura no conteúdo em hidratos de carbono, tal como a HLE.

O sub-sítio S_1 é hemisférico e aparentemente mais pequeno que a cavidade S_1 da HLE, devido às substituições de Val-190 e Ala-213 por Ile-190 e Asp-13, respectivamente.²⁴ Esta cavidade tem preferência em se ligar a resíduos alifáticos mais pequenos, que os indicados para a HLE, como a Ile, Leu e norLeu, embora também se ligue a resíduos como a Ala, Val e norVal.

O sub-sítio S_2 forma uma cavidade profunda e com grande polaridade devido à substituição de Leu-99 por Lys-99. Esta mudança leva a que acomode resíduos em P_2 carregados negativamente.

Contrariamente a S_2 , a pequena cavidade S_1' tem preferência por resíduos P_1' carregados positivamente mas também aceita pequenos resíduos hidrofóbicos.¹³

Em termos gerais, na PR3, os sítios de ligação ao substrato que consistem nos sub-sítios de S_4 a S_3' , são mais polares que os correspondentes na HLE. Na realidade, são os sub-sítios S_2 , S_1' , S_2' e S_3' que determinam a especificidade para a PR3 e que explicam a sua diferença em relação à HLE.^{13,25}

O inibidor endógeno de eleição para esta enzima parece ser o α_1 -PI, no entanto é menos potente a inibir a PR3 do que a HLE. Assim, se ambas as enzimas forem libertadas nas mesmas condições no tracto respiratório, Rao e colaboradores fizeram a previsão, baseada nas constantes cinéticas de inibição entre α_1 -PI e as duas enzimas, que o inibidor se ligará 89% à HLE e 11% à PR3. Como a PR3 não é inibida pelo SLPI, e a grande massa molecular de α_2 -Macroglobulina diminui o seu fluxo para o espaço bronco-alveolar, não existe nenhum inibidor que rapidamente se oponha à sua

actividade elastolítica, sugerindo estes resultados uma potencial participação da PR3 nas doenças inflamatórias do tracto respiratório.^{26,27}

Em pacientes com granulomatose de Wegener, os neutrófilos em circulação expressam nas suas membranas celulares uma grande quantidade de PR3, sendo esta enzima, o principal alvo para os autoanticorpos em circulação, os c-ANCA, produzidos por aquela doença. A ligação entre PR3-ANCA resulta na activação dos neutrófilos, com libertação para o meio extracelular de espécies oxigenadas e proteases que podem contribuir para a grave inflamação vascular que caracteriza esta doença.^{13,18}

1.4.2.3 Catepsina G

A catepsina G (CG: EC 3.4.21.20) é uma enzima formada por uma cadeia polipeptídica de 235 resíduos de amino-ácidos, tem três pontes de dissulfureto e possui a cadeia lateral do resíduo Asp-64 ligada ao seu único hidrato de carbono. Compartilha com a HLE 37% de homologia na sua sequência polipeptídica.²

Para além dos 0.85 pg/neutrófilo,¹⁸ a CG existe em pequena concentração nos manócitos e nos mastócitos não associados ao sistema imunitário, os MC_{TC}, que contêm cerca de 12 pg/célula.²⁸ Estes mastócitos para além de CG armazenam também quimase e triptase, duas enzimas que muito contribuem, para a acção inflamatória em doenças como a asma, artrites reumatóides, fibroses e dermatites atópicas.²⁹⁻³²

A CG foi isolada dos grânulos primários dos neutrófilos como uma mistura de 3 isoformas que diferem, como nas outras enzimas, no seu conteúdo em hidratos de carbono.

Esta enzima acomoda dois tipos de resíduos de amino-ácidos no seu sub-sítio S₁: amino-ácidos hidrofóbicos e grandes como, por exemplo, Phe, Leu e os amino-ácidos positivos, Lys ou Arg. Por sua vez, a ausência da ponte de dissulfureto, Cys-191-Cys-220, melhora a flexibilidade da cavidade S₁ e otimiza a ligação ao substrato.³³

Tal como outras enzimas da família da quimotripsina, o sub-sítio S₂ tem uma grande preferência para o resíduo Pro em P₂ e a presença de Lys-192 na cavidade S₃ poderá sugerir interacções favoráveis com um resíduo ácido em P₃.

Em relação aos sub-sítios S', estudos de modelização molecular indicam que a Ser-40 em S₁' pode formar ligações de hidrogénio com um resíduo de Ser em P₁'.¹³

A serpina específica para a CG é a α_1 -antiquimotripsina (ACT) que possui um resíduo de leucina em P₁, ao contrário da α_1 -PI, que também a inibe, mas cujo resíduo é de metionina. Através de ensaios cinéticos de inibição de ambas as serpinas na CG, Duraton e colaboradores provaram que imediatamente à libertação de CG no plasma, esta é inibida formando complexos reversíveis, enzimaticamente inactivos, com a ACT e α_1 -PI (73% de CG é inibida pela ACT e 27 % pela α_1 -PI). Num segundo passo, estes complexos transformam-se em complexos irreversíveis, característicos das serpinas.³⁴

Para além da sua actividade elastolítica, que apesar de pequena é significativa, porque permite a hidrólise e solubilização de partes da elastina fibrosa que não são catalisáveis pela HLE,³⁵ a CG também tem a capacidade de recrutar, activar e agregar plaquetas.^{34,36} A rápida conversão de angiotensina I em angiotensina II foi outra função biológica da CG comprovada *in vitro*.³⁷

Algumas actividades biológicas da HLE, CG e PR3 estão resumidas na Tabela 1.1. As actividades biológicas foram descobertas principalmente por ensaios *in vitro* e a sua extrapolação para o que ocorre *in vivo* deve ser realizada com cuidado.

É comum nas três enzimas a função de degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) como a elastina, fibronectina, laminina, colagénio e proteoglicanos, embora a protease que possui maior acção proteolítica na elastina é sem dúvida a HLE.² A destruição descontrolada da elastina, componente flexível e altamente hidrofóbico dos tecidos conjuntivos dos pulmões, artérias, pele e ligamentos, por parte das proteases de serina dos neutrófilos pode originar graves doenças como as mencionadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Principais actividades biológicas e doenças associadas às proteases HLE, PR3 e CG.¹³

Actividades Biológicas	Doenças Associadas
Degradação dos componentes da MEC (HLE, PR3 e CG).	Doenças inflamatórias infecciosas: Doença pulmonar obstrutiva crónica Enfisema pulmonar Fibrose cística Síndrome respiratório agudo
Propriedades bactericidas (HLE, PR3 e CG).	
Fragmentação de mediadores inflamatórios (HLE, PR3 e CG).	
Fragmentação de receptores (HLE, CG).	Doenças inflamatórias não infecciosas: Glomerulonefrites Artrites Reumatóides
Degradação de proteínas plasmáticas (HLE, CG).	
Indução da secreção da glândula submucosal nas vias aéreas (HLE, CG).	
Activação de linfócitos e proteases (HLE).	Doenças auto-imunes (PR3): Granulomatose de Wegener
Inactivação de inibidores endógenos (HLE).	
Indução de citocinas e quimocinas (HLE).	
Auto-antigénio na granulomatose de Wegener (PR3).	
Conversão da angiotensina I em angiotensina II (CG).	

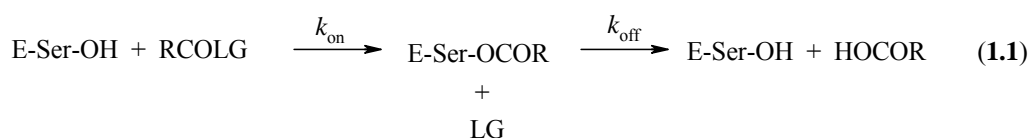
1.5 Inibidores Irreversíveis

O desequilíbrio protease/antiprotease, observado no processo inflamatório agudo e que se transforma num processo crónico, necessita de uma solução terapêutica que pode passar pela síntese de potentes inibidores de baixo peso molecular das proteases de serina que idealmente administrados por via oral ou por inalação, nas doenças das vias respiratórias, permitam inactivar todo o excesso de acção catalítica nefasta e restabelecer o equilíbrio natural protease/antiprotease.

Dos inibidores irreversíveis que foram sintetizados com essa finalidade, os mais interessantes e que serão considerados neste trabalho são os inibidores alternativos do substrato ou agentes acilantes e os inibidores suicidas, que são inibidores baseados no mecanismo.

1.5.1 Inibidores Alternativos do Substrato ou Agentes Acilantes

Agentes acilantes são compostos de baixo peso molecular que inibem as proteases de serina por acilação do resíduo catalítico de Ser-195 formando um intermédio estável acil-enzima. Quando sucede a acilação verifica-se a libertação de um grupo abandonante (LG), a partir do agente acilante.³⁸ Considera-se, nestas condições, a enzima inibida irreversivelmente.³⁹ Através de uma segunda reacção pode ocorrer a regeneração da enzima por intermédio de uma molécula de água.³⁸ Este passo de desacilação, k_{off} , do processo de inibição, deve-se processar muito lentamente permanecendo mais tempo a enzima inibida. Pelo contrário é exigido que a velocidade do passo de acilação, k_{on} , seja elevada para que a razão entre as duas constantes, K_i ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$), que expressa a potência do inibidor, tenha um valor pequeno (Equação 1.1).^{12, 38,39}



A velocidade de acilação é controlada por dois factores importantes: a reactividade química do inibidor e o reconhecimento molecular do inibidor pela enzima alvo. A reactividade química do inibidor é normalmente avaliada pela electrofilia do carbono carbonílico e pela nucleofugacidade ($\text{p}K_a$) do grupo abandonante. Para além destes efeitos electrónicos, efeitos estereoquímicos e de tensão também contribuem para a alteração da reactividade intrínseca. O seu aumento reflecte-se no aumento da velocidade de acilação da enzima alvo, mas consequentemente aumenta também a instabilidade hidrolítica e metabólica do inibidor.

Um máximo reconhecimento molecular do inibidor pela enzima, originado pela formação de interacções não covalentes favoráveis do tipo hidrofóbicas e ligações de hidrogénio aos vários sub-sítios S_n e S_n' resulta numa maior velocidade de acilação. O inibidor ideal será aquele em que a ligação covalente à enzima se deve à optimização do reconhecimento molecular conjugada com uma reduzida reactividade intrínseca do inibidor.³⁸

Os exemplos que a seguir se apresentam são de compostos que inibem as proteases de serina atrás analisadas, principalmente a HLE, cuja possibilidade de inibição foi de grande interesse para os investigadores. A capacidade inibitória destes compostos virá expressa em valores de K_i (k_{off}/k_{on}) ou em valores de IC_{50} , ou seja, a concentração de inibidor necessária para inibir 50% da actividade enzimática de acordo com as condições do ensaio.³⁹

Sempre que possível, serão apresentados os tempos de semi-vida dos inibidores em meio básico e em soluções tamponadas de pH idêntico ao fisiológico (pH 7-8). Segundo Alpegiani e colaboradores a estabilidade hidrolítica é um pré-requisito para a estabilidade em fluidos biológicos, tais como os fluidos epiteliais pulmonares e plasma. Assim, os inibidores que apresentarem um $t_{1/2}$ (pH 7,4 e 37 °C) superior a 12 h podem ser utilizados para administração tópica (aerossóis) e superior a 100 h são potenciais compostos a serem administrados por via sistémica (i.v ou oral).⁴⁰ Seguem-se os mesmos critérios na Secção 1.5.2.

1.5.1.1 Benzoxazinonas

Em 1982, Teshima e colaboradores apresentaram a estrutura da benzoxazinona, **1.1**, como um novo potente inibidor da HLE, CG e quimotripsina. Os primeiros compostos sintetizados para além de pouco selectivos, tinham o inconveniente de serem lábeis à hidrólise em tampão aquoso a pH 7,5.⁴¹

Com o intuito de aumentar a estabilidade hidrolítica assim como a sua potência inibitória, Krantz e colaboradores sintetizaram centenas de derivados de benzoxazinonas com vários substituintes em ambos os anéis, de forma a poderem realizar um estudo aprofundado da relação estrutura/actividade inibitória /estabilidade química.^{42,43}

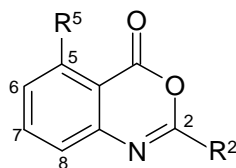
Esse estudo permitiu chegar às seguintes conclusões gerais:

(i) Das três séries sintetizadas – 2-carba, 2-oxi, 2-aminobenzoxazinonas – os compostos com maior actividade inibitória são as 2-oxibenzoxazinonas, sendo o composto **1.1a** o mais potente, embora sejam hidrolisados mais rapidamente em meio básico que as 2-aminobenzoxazinonas. O derivado **1.1a** apresenta um k_{OH^-} de $14,8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto que o k_{OH^-} de **1.1b** é de $2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

(ii) Ao contrário dos substituintes em R⁶ que são desfavoráveis manifestando-se num aumento no K_i, substituintes em R⁵ são muito favoráveis porque diminuem o k_{off} sem alterarem significativamente o k_{on}. Como o grupo carbonilo e o substituinte em R⁵ são coplanares, este não vai interferir no ataque da Ser-195 ao grupo carbonilo. Uma vez a enzima acilada e o anel aberto, a presença de dois substituintes em *orto* força o carbonilo que acila a Ser a rodar para fora do plano do anel aromático, ficando nesta situação ladeado pelos dois grupos em *orto* que impedem o ataque, em ambas as faces, pela água ou outro nucleófilo, diminuindo assim o k_{off}, formando-se por consequência um complexo acil-enzima estável.

(iii) Na série 2-aminobenzoxazinona, o k_{off} diminui se a amina for ramificada ou volumosa, caso da **1.1b**.

De acordo com a cristalografia de Raio X do complexo elastase pancreática suína (PPE)* e 2-*t*BOC-Val-5-Cl-benzoxazinona, o cloro em C-5 (R⁵) estabelece interações hidrofóbicas com o sub-sítio S₁, enquanto que o grupo Bu^t (R²) situa-se nas cavidades S₂' e S₁'.^{39,43}



1.1

1.1a R² = OEt, R⁵ = Et K_i = 0,04 nM (HLE)

1.1b R² = NHPrⁱ, R⁵ = Et K_i = 0,93 nM (HLE)

1.1c R² = NHCH₂Ph, R⁵ = H K_i = 10,0 nM (CG)

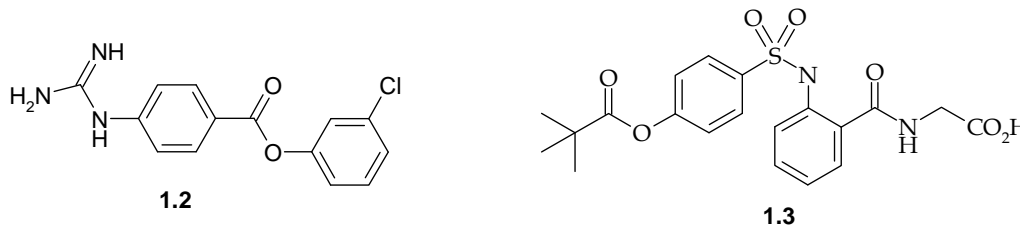
O estudo das benzoxazinonas como inibidores da Catepsina G, demonstrou que os derivados 2-amino eram inibidores mais eficientes que os derivados 2-oxi, sendo o **1.1c** o representante com maior actividade inibitória. O facto das velocidades de acilação dependerem da estrutura do substituinte em C-2, indica que este substituinte interage com o sub-sítio S₁ da CG.⁴⁴ Por sua vez, os substituintes alquílicos em R⁵ são desvantajosos porque diminuem drasticamente o k_{on}.^{45, 46}

* PPE- elastase de origem animal que tem 40 % de analogia com a HLE. São duas enzimas que apresentam centros activos muito semelhantes.

1.5.1.2 ONO-5046

A partir do inibidor da tripsina **1.2**, que apresenta moderada actividade inibitória na HLE, Imaki e colaboradores realizaram várias e sequenciais alterações da sua estrutura, orientados pelos resultados obtidos *in vitro*, que culminaram no surgimento do derivado pivaloiloxibenzeno **1.3**, correntemente denominado ONO-5046.

Embora o derivado **1.3** não fosse o inibidor mais potente de todos os compostos sintetizados ($K_i = 0,2 \mu\text{M}$), era um dos mais estáveis em plasma animal e administrado por via intra-venosa em cobaias tinha o maior efeito inibitório do aumento da permeabilidade dos capilares da pele provocado pela HLE.⁴⁷ Em hamsters suprimiu a danificação dos pulmões induzida pela administração intra-traqueal da HLE e a sua injeção em ratos com artrite protegeu a cartilagem da degradação e reduziu a incidência e a gravidade das artrites induzidas pelo colagénio. No entanto, tem o inconveniente de possuir uma baixa biodisponibilidade, facto que não impediu de ser comercializado no Japão em 2002, sob a forma de injectáveis para o tratamento do síndrome respiratório agudo.⁴⁸



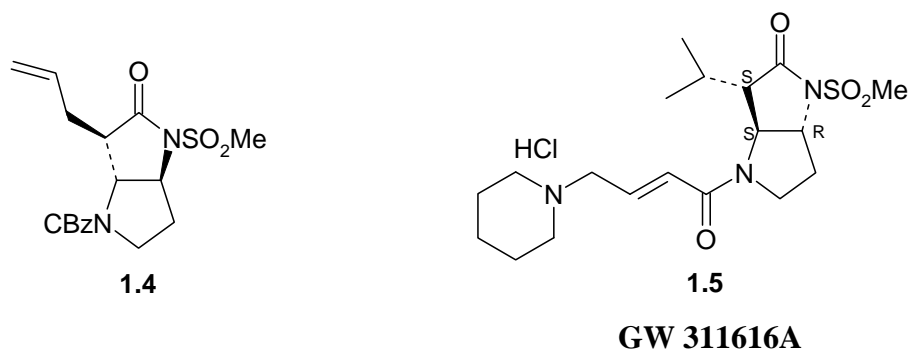
Devido à dificuldade em cristalizar o complexo PPE-ONO-5046, o mecanismo de inactivação enzimático foi comprovado utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa por ESI (*electrospray ionization*) ou LC/ESI-MS. Os resultados indicam que o grupo Bu^t do composto entra na cavidade S₁ da enzima e ocorre a pivaloilação da Ser-195.⁴⁹

1.5.1.3 *Trans*- δ -Lactamas Pirrolidínicas

A derivatização da *trans*-lactama **1.4**, com o objectivo de otimizar parâmetros tais como: potência inibitória na HLE, selectividade enzimática, solubilidade aquosa, biodisponibilidade, estabilidade metabólica e características farmacocinéticas,

permitiram a descoberta da *trans*-lactama pirrolidínica **1.5**, também denominada GW311616A.^{50, 51, 52}

O GW 311616A é um forte inativante da HLE ($k_{obs}/[I]= 757 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $K_i= 0,31 \text{ nM}$), contribuindo certamente para essa inativação a grande tensão anelar da molécula e o grupo activante sulfonilo ligado ao azoto da lactama. Por outro lado, a cristolografia de Raio X entre o complexo PPE e **1.5** comprova que o inibidor se liga covalentemente à Ser do centro activo, havendo uma boa complementaridade e um variado número de interações hidrofóbicas entre o anel piperidinilo do inibidor e a cavidade S_4 da PPE. O resíduo de His da tríade está deslocado da sua posição catalítica contribuindo para a estabilidade do complexo final.⁵²



Este inibidor é selectivo para a HLE em relação a outras proteases de serina como a tripsina, quimotrisina, CG e a plasmina. Apresenta boa biodisponibilidade oral em ratos, cães e hamsters, embora com uma *clearance* plasmática elevada ($t_{1/2}= 1\text{h}$ em cães).^{52, 53}

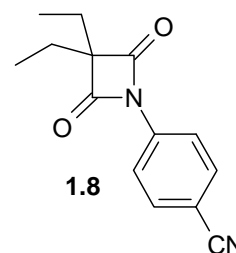
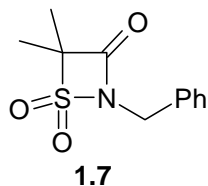
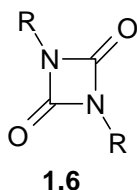
A longa duração da acção inibitória do GW 3116166 é explicada, segundo Macdonald e colaboradores, por se tratar de uma inibição intracelular da HLE, isto é, o derivado **1.5** tem a capacidade de penetrar rapidamente nos neutrófilos circulantes e nos grânulos azurofílicos onde inibe a elastase armazenada. Quando os neutrófilos são recrutados e activados é libertada a elastase que se encontra já inibida.⁵¹ Esta inibição intracelular da HLE não afecta, nos neutrófilos, as suas capacidades de defesa do organismo perante um largo número de microorganismos.⁵²

1.5.1.4 Diazetidinedionas, Oxo- β -sultamas, Oxo- β -lactamas

Os análogos **1.6**, **1.7** e **1.8** são todos agentes acilantes, que se encontram relacionados por alterações isostéricas da 2-azetidionona ou β -lactama, de forma a obter compostos com maior reactividade intrínseca.

A diazetidinediona **1.6**, é preferencialmente um inibidor da quimase com substituintes *p*-metoxibenzilo ou *m*-metoxibenzilo. Contudo, pode ser um inibidor selectivo da HLE quando os substituintes são grupos etilo que garantem especificidade para a cavidade S₁ (IC₅₀ 58 nM).

A ligação de 4-metilfenilo aos azotos do anel origina um composto com especificidade primária para a CG e α -quimotripsina bovina (IC₅₀ de 2,3 e 2,4 nM, respectivamente) mas com fraca actividade inibitória na quimase, HLE, trombina, tripsina e plasmina.⁵⁴



A oxo- β -sultama **1.7**, extremamente instável em meio básico, inactiva a PPE com uma razoável constante de velocidade de inibição de segunda-ordem de 768 M⁻¹ s⁻¹ a pH 6.⁵⁵ Por comparação com a cinética de inibição das β -sultamas, foi proposto que no mecanismo de inibição se forma a acilação do resíduo da Ser da enzima e não a sua sulfonilação, teoricamente possível, e que se verifica nas β -sultamas.^{55, 56}

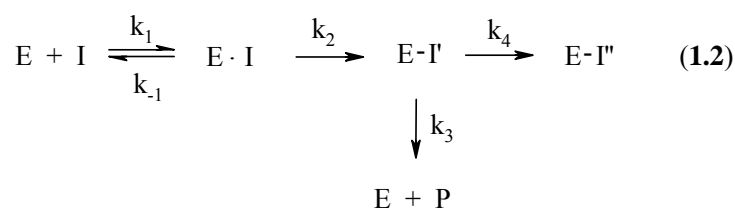
A oxo- β -lactama **1.8**, é a mais potente da série *N*-arilo sintetizada, inibindo a PPE e a HLE com *K_i* de 6,02 μ M e 63,5 nM, respectivamente, sendo no entanto das mais lábeis à hidrólise alcalina.

A actividade da PPE diminui rapidamente quando a enzima é incubada com um análogo do composto **1.8**, (*p*-Cl em vez de *p*-CN) verificando-se um valor de inibição ligeiramente superior aos 80%. A recuperação espontânea da actividade enzimática é

contudo rápida em presença de excesso de inibidor, verificando-se uma actividade de 80% após aproximadamente 8h do início do ensaio.⁵⁷

1.5.2 Inibidores Baseados no Mecanismo

Inibidores baseados no mecanismo ou inibidores suicidas (I) são agentes químicos, intrinsecamente não reactivos, selectivos para uma protease alvo (E), que após a formação do complexo reversível de Michaelis (E·I) acilam o resíduo Ser-195 do centro activo da enzima formando um complexo acil-enzima estável (E-I'). Com a formação deste complexo gera-se um segunda funcionalidade, um centro electrofilico altamente reactivo, que se encontrava latente na molécula original e que tem a finalidade de reagir com um segundo resíduo do centro activo por adição nucleofílica, adição de Michael, normalmente com a His-57. Embora também seja possível a sua acilação, a alquilação da His-57 origina uma dupla ligação ao centro activo ficando assim a enzima inibida irreversivelmente (E-I'') (Equação 1.2).^{12, 39, 58}



Neste complexo final, a reacção de desacilação da Ser-195 pode ocorrer, mas a enzima continua inactiva devido à segunda ligação à His-57, que é uma ligação C-N difícil de quebrar. Para que ocorra a adição nucleofílica com o resíduo de His é necessário que o centro electrofilico, gerado pela maquinaria enzimática, se encontre espacialmente a uma distância susceptível ao ataque do azoto do imidazol da His, caso contrário, a enzima só sofre acilação podendo recuperar a sua actividade enzimática. Nesta situação, o inibidor comportando-se como um simples agente acilante.

1.5.3 Heterociclos como Inibidores Suicidas

São muitos os exemplos de inibidores suicidas que podemos encontrar na literatura. A Tabela 1.2 pretende fornecer uma amostragem das estruturas bases dos inibidores mais significativos em termos de potência inibitória das proteases de serina. Nela constam ftalimidas **1.9**, succinimidas^{59,60} **1.10**, isocumarinas^{6, 60} **1.11**, haloenol-lactonas¹² **1.12**, sacarinas^{39,60} **1.13**, tiadiazolidinonas **1.14** e β -lactamas⁶¹⁻⁶³: cefalosporinas **1.15** e azetidionas **1.16** e **1.17**.

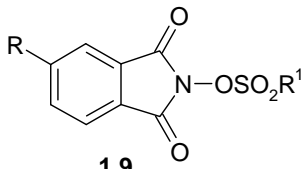
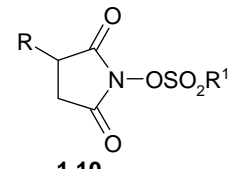
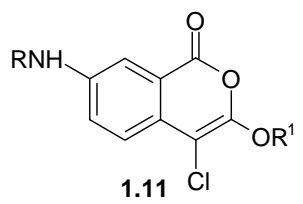
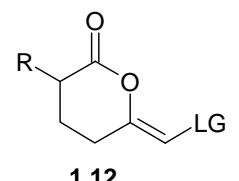
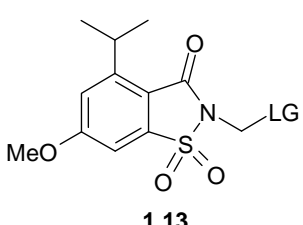
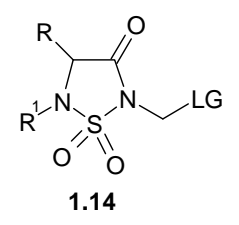
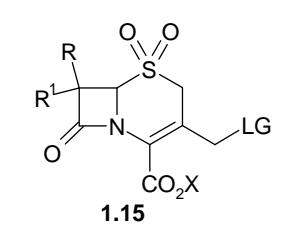
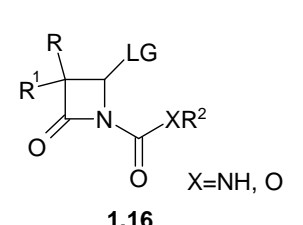
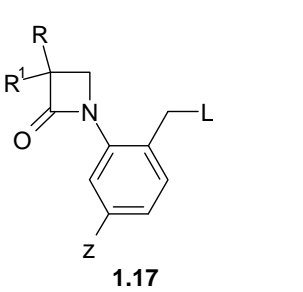
Na análise dos vários compostos presentes na Tabela 1.2, verifica-se que a simplificação estrutural (comparar **1.11**, **1.13**, **1.15** com **1.12**, **1.14** e **1.16**) assim como a substituição por bioisósteros (comparar **1.9** com **1.13** e **1.10** com **1.14**) foram estratégias utilizadas no seu *design*.

Os valores da cinética de inibição para estes compostos vêm expressos em K_i , $k_{obs}/[I]$, IC_{50} ou k_{inact}/K_i . O K_i é a constante de dissociação do complexo de Michaelis, E·I, e resulta da razão entre k_1 e k_{-1} (Equação 1.2). O $k_{obs}/[I]$ é a constante de velocidade de segunda-ordem observada na inativação da enzima pelo inibidor.³⁹ A forma mais frequente de indicar a potência de um inibidor é pela constante de inibição de segunda-ordem k_{inact}/K_i ou k_2/K_i (segundo a Equação 1.2) que se relaciona com $k_{obs}/[I]$ pela Equação 1.3.⁶⁴ Sempre que o ensaio *in vitro* se realize em condições em que $\{1+[S]/K_m\}$ é semelhante a 1, por consequência $k_{obs}/[I] \cong k_{inact}/K_i$. Caso contrário, a constante de inibição k_{inact}/K_i , calculada através da representação gráfica de k_{obs} vs $[I]$, é corrigida tendo em conta a concentração de substrato utilizada e a constante de Michaelis.

$$k_{obs}/[I] = (k_{inact}/K_i) \{1+[S]/K_m\} \quad (1.3)$$

Os derivados de succinimidas, de tiadiazolodionas, de cefalosporinas e azetidionas, estão estruturalmente relacionados com os compostos sintetizados neste trabalho, sendo de seguida abordada, a relação estrutura/atividade inibitória nas proteases referidas, especialmente na HLE, de cada um destes derivados.

Tabela 1.2 Estruturas gerais de inibidores suicidas de proteases de serina

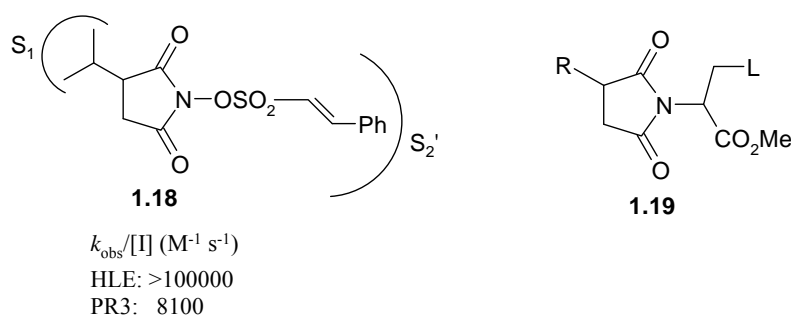
Inibidores Bicíclicos	Inibidores Monocíclicos	
 <p>1.9</p>	 <p>1.10</p>	
 <p>1.11</p>	 <p>1.12</p>	
 <p>1.13</p>	 <p>1.14</p>	
 <p>1.15</p>	 <p>1.16</p>	 <p>1.17</p>

1.5.3.1 Derivados de Succinimidas

Os derivados da *N*-hidroxisuccinimida relatados por Groutas e colaboradores em 1989, eram compostos cuja variação química dos radicais R (por exemplo o benzilo, isopropilo, isobutilo) e R¹ (por exemplo o fenilo, metilo, 1 e 2 naftilo e *trans*-stirilo) de **1.10** originaram inibidores irreversíveis da HLE, com valores de $k_{obs}/[I]$ de 84 a mais de 100000 M⁻¹ s⁻¹.

Um dos compostos mais potentes é o **1.18**, em que o grupo isopropilo interage com o sub-sítio S_1 da enzima, revelando-se essencial para a inativação enzimática, uma vez que a sua substituição por H o transforma num composto inactivo.⁶⁵ No caso da PR3, os grupos etilo e propilo em R maximizam a inativação enzimática enquanto que substituintes como o benzilo e o n-butilo diminuem drasticamente a inativação.⁶⁶ Por sua vez, o *trans*-stirilo prolonga-se pela região S_n' da HLE e é concebível que ocorra uma interacção favorável envolvendo o anel fenilo do inibidor e o sub-sítio S_2' da enzima.

Após a inibição da HLE pelo derivado **1.18**, verifica-se uma transitória e parcial recuperação da actividade enzimática, que depois inverte para uma gradual e irreversível perda da actividade, que se mantém após 48 h em presença de excesso de inibidor. São compostos pouco específicos pois inibem facilmente a α -quimotripsina e a CG.

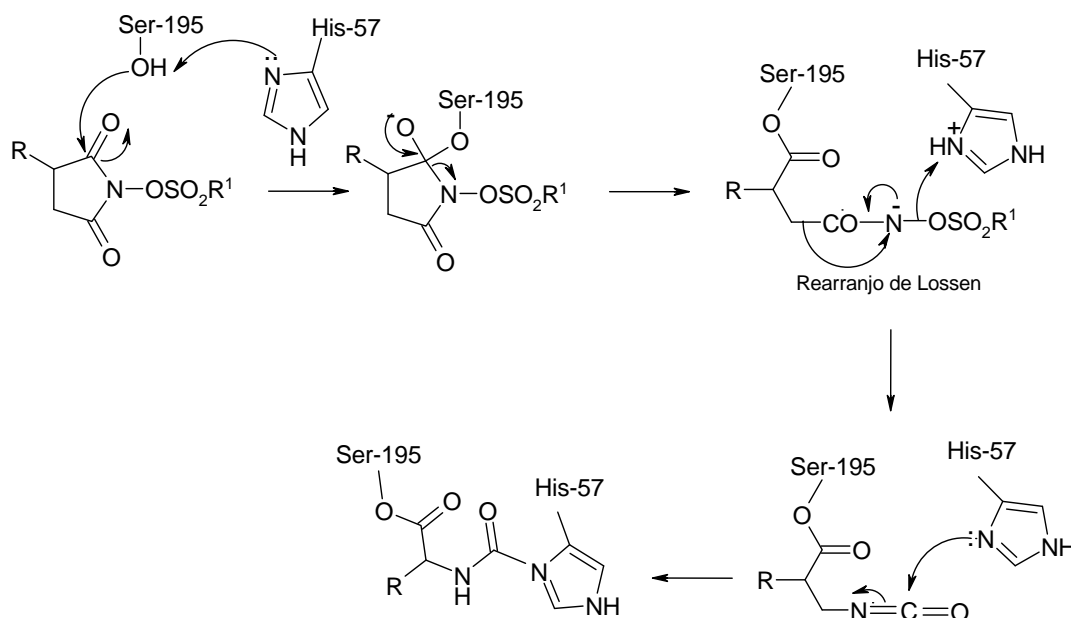


É de salientar que a presença de um bom grupo abandonante ligado ao azoto da succinimida é essencial para a inibição da HLE. Por exemplo o análogo de **1.18**, em que o grupo $\text{OSO}_2\text{CHCHPh}$ é substituído pelo grupo OCH_2Ph , é um composto inactivo.⁶⁵

Igualmente os derivados **1.19** não inibem a HLE, independentemente da natureza do grupo abandonante ($\text{L}=\text{OH}$, SH , $\text{S}(\text{O})_n\text{Bzl}$, $\text{OPO}(\text{OEt})_2$, imidazol) ou da natureza do grupo R.⁶⁷ Estes resultados sugerem que a reactividade intrínseca dos derivados de succinimidas está fortemente dependente do grupo sulfoniloxi.

Utilizando ^{13}C -RMN de elevada resolução e o composto 3-benzil-*N*-[(metilsulfonil)oxi]succinimida, marcado em C-5, Groutas e colaboradores conseguiram confirmar o mecanismo inicialmente proposto para a inibição da HLE pelos derivados de

sucinimidas. Num primeiro passo ocorre a acilação da Ser-195, o que induz a formação de um isocianato *via* um instantâneo rearranjo de Lossen, que num segundo passo pode reagir com o resíduo de imidazol da His-57 (Esquema 1.2).^{65, 65a}

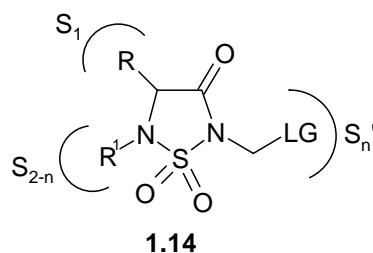


Esquema 1.2

1.5.3.2 Derivados de Tiadiazolidinonas

Foram essencialmente os investigadores Groutas e colaboradores que desenvolveram os derivados de tiadiazolidinonas como novos inibidores das proteases de serina, HLE, PR3 e CG. A criteriosa escolha dos vários substituintes na estrutura **1.14**, permitiria, segundo estes autores, que estes compostos atingissem uma elevada selectividade e potência inibitória, pois exploravam os sub-sítios S_n e S_n' como mostra o modelo de ligação à enzima indicado em **1.14**.

O grupo R tem como finalidade a especificidade enzimática primária (S_1) permitindo inibidores selectivos entre a HLE e CG. Esta selectividade é sempre mais difícil entre enzimas como a HLE e a PR3, devido à sua grande homologia, apesar do sub-sítio S_1 de PR3 ser mais pequeno. As diferenças mais marcadas entre estas duas enzimas encontram-se nos sub-sítios S_n' , especialmente o S_2' , área que interacciona com o grupo abandonante LG. Por sua vez, o sub-sítio S_2 ou eventualmente S_2-S_n , acomoda o substituinte R^1 .

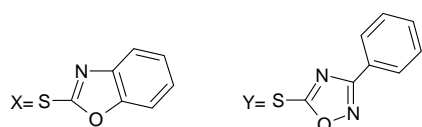


Do vasto trabalho desenvolvido por estes investigadores salientam-se 5 séries que se encontram representadas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 – Derivados de tiadiazolidinonas que apresentam as maiores actividades inibitórias na HLE, PR3 e CG.^{64, 68-72}

Ser.	HLE			PR3			CG	
	LG	R ¹	k_{inact}/K_i	LG	R ¹	k_{inact}/K_i	LG	k_{inact}/K_i
A ^{64,68}	3-CF ₃ C ₆ H ₄ SO ₂ -	Bzl	240 000	4-ClC ₆ H ₄ CH ₂ SO ₂ -	Bzl	20 300	PhSO ₂ -	11 200
B ⁶⁹	2,6-Cl ₂ C ₆ H ₃ CO ₂ -	Me	4 928 300	2,6-Cl ₂ C ₆ H ₃ CO ₂ -	PhCH(CH ₂ CO ₂ H)	196 400	CH ₃ CO ₂ -	10 600
C ⁷⁰	Y	Bzl	174 440	X	Me	16 350	Y	17 130
D ⁷¹	CBz- <i>D</i> -Phe	Me	1 056 800	CBz- <i>D</i> -Phe	Me	157 300	<i>D</i> -Phe (TFA)	2 330
E ⁷²	MeSO ₂ (R ²)N-	Me	229 400	MeSO ₂ (R ²)N-	Bzl	30 100	MeSO ₂ (R ²)N-	5 400

1.14, R= Buⁱ (HLE, PR3); R=R¹= Bzl (CG); **Série E**, R²=COCH₂NHCBz (HLE, PR3); R²=CO₂Bu (CG)



A selectividade para a CG é conseguida em todas as séries utilizando o grupo benzilo em R e R¹. A potência inibitória na CG destes derivados é mais fraca, comparativamente com derivados da mesma série.

Foi seleccionado o grupo isobutilo para o substituinte em R, devido à preferência da HLE para o resíduo de Leu, enquanto que em R¹ os compostos mais potentes na inibição da HLE e PR3 apresentam na sua estrutura o grupo metilo ou o grupo benzilo. O grupo metilo tem vantagens em relação ao benzilo porque dá origem a complexos HLE-I mais estáveis, sendo a recuperação da actividade enzimática lenta e em alguns

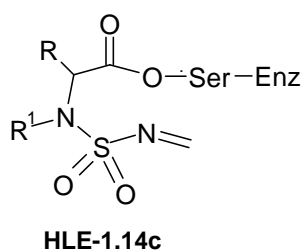
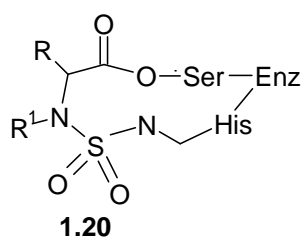
casos parcial após 24 horas, como é o caso do composto **1.14a** ($R = \text{Bu}^i$, $R^1 = \text{Me}$, $\text{LG} = \text{SO}_2\text{Ph}$).⁶⁴

Nas várias séries, a actividade inibitória está estritamente relacionada com o carácter hidrofóbico do grupo abandonante, que lhe permite estabelecer as melhores interacções com os sub-sítios S_n' , e com a sua nucleofugacidade, verificando-se uma maior actividade em inibidores com menores valores de pK_a .

Os derivados das séries B e D são os mais potentes, observando-se nestes últimos, que quando o LG é um (D)-amino-ácido o composto tem o dobro da potência que o correspondente derivado com o (L)-amino-ácido.⁷¹

Na série E, o grupo metilo da sulfonamida interage potencialmente com o sub-sítio S_1' enquanto que o grupo R^2 tem a finalidade de estabelecer ligações com os resíduos de amino-ácidos da cavidade S_2' . A incubação do derivado **1.14b** ($R = \text{Bu}^i$, $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{NHBoc}$) com a HLE levou a uma rápida inactivação da enzima, requerendo somente 3 equivalentes de inibidor para a sua inibição total. A acil-enzima formada é estável, recuperando a enzima cerca de 30% da sua actividade enzimática num período de 24 h.⁷²

O mecanismo de dupla inibição da HLE ou “double hit”, com formação do complexo **1.20**, foi sempre o mecanismo postulado para os vários derivados das tiadiazolidinonas **1.14**. Contrariando esta hipótese, a estrutura cristalina do complexo final HLE-**1.14c** ($R^1 = n\text{-Pr}$, $R^2 = \text{Me}$, $\text{LG} = 2,6\text{-diclorobenzoato}$), recentemente conseguida, mostra que o oxigénio do resíduo de Ser-195 está covalentemente ligado ao carbono carbonílico do inibidor e a distância entre o carbono da dupla ligação do grupo $\text{SO}_2\text{NH}=\text{CH}_2$ e o azoto do imidazol da His-57 é de 3.577 Å. Sendo esta distância demasiado longa para permitir uma ligação covalente é eliminada a possibilidade de formação do complexo **1.20**. A ligação de hidrogénio formada entre a His-57 e um dos oxigénios da sulfona colabora certamente para a estabilidade do complexo final.⁷³

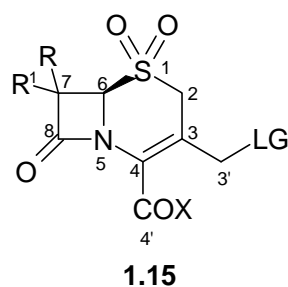


1.5.3.3 β -Lactamas Bicíclicas: Cefalosporinas

O desenvolvimento de derivados de cefalosporinas **1.15**, como potenciais inibidores da HLE deveu-se a um grupo da Merck, que foi pioneiro não só na sua aplicação mas também na escolha dos critérios para avaliar o potencial farmacológico dos derivados de cefalosporinas sintetizados. Pela primeira vez a actividade do derivado *in vivo* (no ensaio pulmonar do hamster, desenvolvido também pela Merck) torna-se o teste primário para determinar a eficácia do composto por via intraquial, assim como o seu comportamento farmacocinético. Como segundo critério escolheram a estabilidade em pH 8 (tampão MOPS a 25°C) para avaliar a sua estabilidade química relativa. Por fim, consideraram a sua potência inibitória *in vitro*.

Na realidade, frequentemente observavam-se potentes inibidores da HLE *in vitro*, que administrados em hamsters, por via intratraqueal, eram fracos inibidores da hemorragia pulmonar induzida pela HLE, ou eventualmente inactivos. É consensual que a HLE prefere inibidores hidrofóbicos e não polares, mas no meio pulmonar os compostos volumosos e polares são mais retidos, exercendo a sua acção, ao contrário dos compostos pequenos e não polares que podem ser rapidamente absorvidos, perdendo assim eficácia na inibição da HLE localizada ao nível pulmonar.⁷⁴

No extenso trabalho realizado na derivatização das cefalosporinas foram vários os substituintes introduzidos nos dois anéis e que seguidamente serão discutidos.



Varição da Natureza dos Substituintes em C-7 - Os substituintes na posição C-7 devem ser pequenos e pouco impedidos estereoquimicamente, uma vez que são substituintes de reconhecimento enzimático que se ajustam à cavidade S₁ da HLE. A existência de um substituinte em C-7 é importante para a actividade inibitória, pois a presença de dois hidrogénios (**1.15a**, X=OBu^t e LG=OAc), origina um composto

inactivo. Por sua vez, a estereoselectividade também é relevante nesta posição, porque as cefalosporinas com substituintes na posição 7- β são inibidores fracos ou inativos comparadas com os respectivos análogos 7- α .

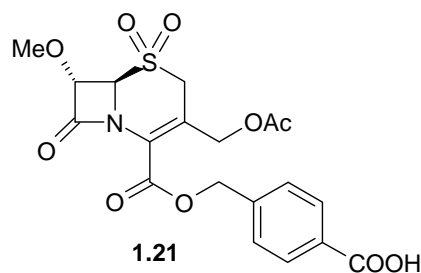
Foram estudados vários substituintes em C-7, entre os quais o α -MeO, α -HCOO, α -MeCOO, α -Et, α -Cl, α -F e α -MeOCONH. Os mais activos inibidores da HLE são os compostos que possuem em C-7, α -MeO, α -HCOO e α -Cl, com X=OBu^t e LG =OAc. Os respectivos valores de $k_{obs}/[I]$ são de 19 000, 59 000 e 161 000 M⁻¹s⁻¹.⁷⁵

Varição da oxidação em S-1 - Nos compostos substituídos na posição 7- α , as sulfonas em S-1 têm uma potência inibitória mais elevada em relação aos correspondentes sulfidos e sulfóxidos. A estabilização destes derivados sulfonados por ligações de hidrogénio que se formam entre os oxigénios do grupo sulfona e as cadeias laterais dos resíduos de Val-216 e Gln-194 e o aumento de reactividade química do anel β -lactâmico, atribuído à presença do grupo sulfona, são dois factores que fundamentam a maior potência inibitória em relação aos correspondentes sulfidos.⁷⁵

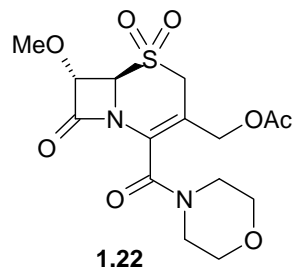
Varição da Natureza dos Substituintes em C-4 - Os substituintes em C-4 estabelecem interacções com os sub-sítios S₁'-S₂' da HLE. A enzima requer que o grupo carboxílico em C-4 esteja derivatizado para que ocorra uma inibição efectiva. No entanto, a remoção do grupo em C-4 (substituição de COX por H, 7- α -MeO, LG = OAc) resulta num composto com alguma actividade inibitória (IC₅₀ = 7 μ M).⁷⁶

Foram várias as derivatizações efectuadas na posição C-4: o grupo carbonilo foi ligado a álcoois formando ésteres, tióis formado tioésteres,^{40,77} aminas primárias e secundárias formando amidas, grupos alquilo ou arilo formando cetonas e a amino-ácidos protegidos⁷⁸.

Em geral, os ésteres são mais activos do que as amidas nesta posição, quando o derivado contem em C-7 um grupo α -OMe e o LG é o grupo OAc. Na série dos ésteres, os substituintes benziloxi *p*-carboxilatos (presente em **1.21**) e *m*-carboxilatos demonstraram *in vitro* as maiores actividades inibitórias na HLE. Na série das amidas, as amidas secundárias são menos potentes na sua inibição que os correspondentes ésteres. A amida cíclica **1.22**, revelou a mais elevada actividade inibitória *in vitro*.⁷⁶



$$k_{\text{obs}}/[I] = 57\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



$$k_{\text{obs}}/[I] = 35\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Em termos de estabilidade em tampão MOPS (pH 8,0, 25°C) os ésteres são pouco estáveis sendo imediatamente hidrolisados. Pelo contrário, as amidas são mais estáveis à hidrólise, verificando-se tempos de semi-vida de 13 a 46 horas. Por exemplo, os tempos de semi-vida de **1.21** e **1.22** são de 5 h e 13 h, respectivamente.

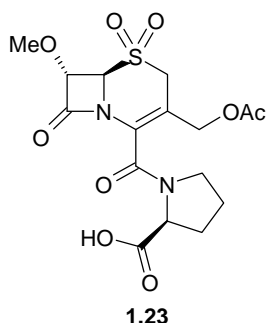
A actividade *in vivo* foi estudada para os ésteres e amidas sintetizadas, utilizando o ensaio da hemorragia pulmonar induzida pela HLE, onde foram obtidos resultados inesperados. A administração intratraquial de **1.21**, 5 minutos antes da administração da HLE, inibe 98% da hemorragia pulmonar, todavia a actividade inibitória tem uma vida curta. Contrariamente, **1.22** é inactivo *in vivo*, o que prova que a presença de uma amida em C-4 não é suficiente para existir actividade inibitória *in vivo*.⁷⁴

Tendo em conta os três critérios de selectividade anteriormente mencionados, dos vários ésteres e amidas sintetizadas, foram escolhidos os derivados **1.23**, **1.24** e **1.25** como os mais promissores para serem candidatos a aerossóis tópicos.

Todos estes derivados têm acções biológicas muito semelhantes, e os análogos **1.24** e **1.25** que incorporam um tioheterociclo grande e polar, o anel de triazina em C-3', proporcionam boa actividade inibitória *in vitro*, boa estabilidade em tampão MOPS (pH 8, 25°C) e grande actividade *in vivo*. Contudo, a escolha para um candidato a aerossol tópico recaiu no composto **1.23**, devido principalmente à facilidade da sua síntese.

O derivado da L-prolina **1.23**, demonstrou ter as melhores propriedades químicas, físicas e biológicas. É extremamente selectivo para a HLE não inibindo ou sendo um fraco inibidor de enzimas como a trombina, plasmina, CG, pepsina e papaína. A inactivação completa da HLE é conseguida com 3 equivalentes de **1.23**, no entanto, a enzima recupa a sua actividade lenta e espontaneamente.⁷⁴ O tempo de semi-vida de reactivação a 25 °C foi de 39 h, enquanto, a 37° C foi de 9 h.⁷⁹ Infelizmente a

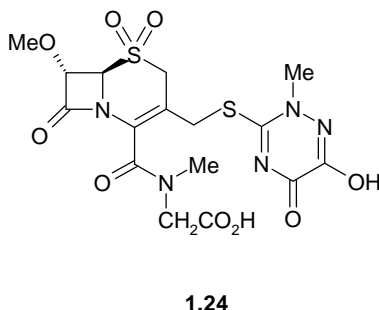
administração de **1.23** por via oral não é viável devido à sua baixa estabilidade química, testada em sangue de rato, onde apresenta um tempo de semi-vida inferior a 10 min.⁷⁴



$$k_{\text{obs}}/[I] = 3\,800\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 21\text{ h}$$

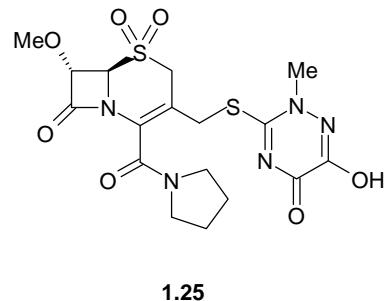
$$\% \text{ inib. in vivo} = 94$$



$$k_{\text{obs}}/[I] = 6\,200\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 22\text{ h}$$

$$\% \text{ inib. in vivo} = 98$$

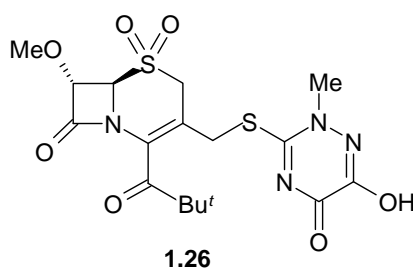


$$k_{\text{obs}}/[I] = 13\,400\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 20\text{ h}$$

$$\% \text{ inib. in vivo} = 91$$

As cetonas em C-4 e que possuem α -Cl em C-7 têm uma fraca e insatisfatória estabilidade hidrolítica e como tal não serão mencionadas. Os análogos, 7- α -OMe, são mais estáveis, sendo o composto **1.26**, com o anel de triazina em C-3', o mais potente da série. Em tampão fosfato, pH 7,4 a 37 °C tem um tempo de semi-vida de 16 h, enquanto que toda a série tem em média um tempo de semi-vida de 20 h. No geral, são compostos mais estáveis que os correspondentes ésteres e com maior actividade inibitória que as correspondentes amidas (**1.26** vs **1.24** ou **1.25**).⁴⁰



$$k_{\text{obs}}/[I] = 45\,000\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$$

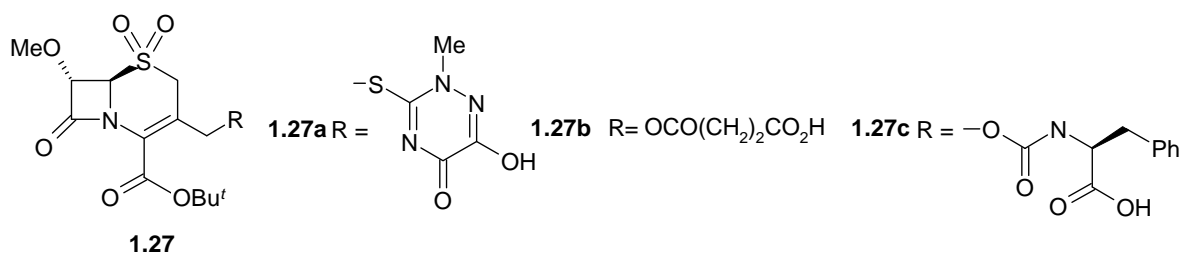
Variação da Natureza dos Substituintes em C-3' - Os substituintes em C-3' têm uma forte influência na reactividade do anel β -lactâmico. A potência inibitória das diferentes β -lactamas varia, dependendo das interacções estereoquímicas com a enzima, da capacidade do grupo em C-3' como grupo atrator de electrões ou como grupo abandonante. A actividade é ligeiramente melhorada quando LG é um muito bom grupo

abandonante, embora a actividade inibitória seja determinada essencialmente por efeitos electrónicos e estereoquímicos.⁸⁰

Na série dos ésteres de **1.15** (7α -OMe, X = OBU^t) a introdução de um grupo metilo em C-3, isto é, a ausência de um grupo abandonante em C-3', resulta num composto ainda com razoável actividade inibitória.

Análogos como o **1.27a**, **1.27b** e **1.27c** manifestam valores de 8 600, 13 800 e 63 900 M⁻¹s⁻¹, respectivamente, para as constantes de inibição de segunda-ordem, nos ensaios *in vitro*. Nos ensaios *in vivo*, também mantêm valores elevados de inibição da hemorragia pulmonar de 90%, 98% e 87%, contudo, a inibição rapidamente diminui com doses baixas.

Com amidas em C-4, são de realçar os derivados com tioheterociclos polares em C-3', como os compostos **1.24** e **1.25**, já mencionados.⁷⁴

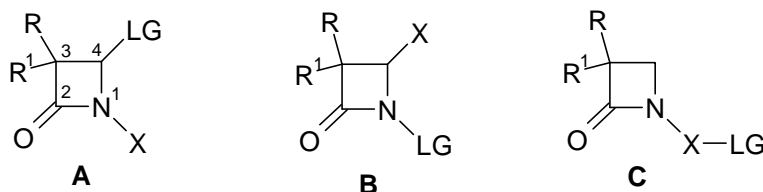


1.5.3.4 β-Lactamas Monocíclicas: Azetidionas

As cefalosporinas apesar de demonstrarem boa selectividade e potência inibitória na HLE, *in vitro*, e boa actividade por via intratraqueal ou subcutânea, *in vivo*, eram compostos com fraca estabilidade plasmática e nenhuma biodisponibilidade oral o que minimizava o seu potencial valor como agentes terapêuticos para administração oral.

Com o objectivo de encontrar um inibidor da HLE para administração oral, o grupo da Merck procedeu à simplificação estrutural das cefalosporinas para o núcleo β-lactâmico monocíclico e considerou que após algumas modificações (com substituintes adequados em C-3, C-4 e N-1), esta estrutura poderia evidenciar uma melhor actividade inibitória na HLE conjuntamente com uma boa estabilidade hidrolítica e plasmática, o que permitiria o surgimento de agentes activos por via oral.⁸¹⁻⁸³

Em termos gerais, os inibidores β -lactâmico monocíclicos, potencialmente suicidas, que têm sido sintetizados e testados podem-se agrupar em 3 grandes classes, representadas pelas estruturas gerais **A**, **B** e **C**.



Nestas estruturas R, R¹ são substituintes de reconhecimento enzimático, X, são grupos atratores de electrões com a finalidade de activar quimicamente a β -lactama (por exemplo Ar, CO, SO₂) e LG são bons grupos abandonantes essenciais para promover a inibição suicida.⁸⁴ A estrutura **A** pode ser identificada com as *N*-carbamoilazetidionas em que R=R¹= Et, X= CONHCHR¹Ar e LG= OAr; a estrutura **B** com as *N*-sulfonilarilazetidionas em que R= Et, R¹= H, X= CO₂R e LG= SO₂Ar e que se comportam só como agentes acilantes uma vez que o potencial grupo abandonante não é libertado do intermédio acil-enzima⁸⁵⁻⁸⁷ e por fim a estrutura **C** que se pode identificar com as *N*-arilazetidionas se R, R¹= Hal e X-LG= ArCH₂-Hal ou com as *N*-alcoxicarbonilazetidionas se R= Hal, R¹= H, e X-LG= CO-OR.

As *N*-arilazetidionas **1.17** (Tabela 1.2) comportam-se cineticamente como inibidores irreversíveis, não se observando recuperação da actividade enzimática, inclusive após eliminação do excesso do inibidor do meio de incubação, por centrifugação. Contudo, são inibidores medianos da HLE, com constantes de segunda-ordem, k_{inact}/K_i , que variam entre 29 e 1802 M⁻¹ s⁻¹.⁸⁸⁻⁹⁰ Por sua vez, as *N*-alcoxicarbonilazetidionas são agentes acilantes, formando acil-enzimas pouco estáveis.⁹¹⁻⁹⁴

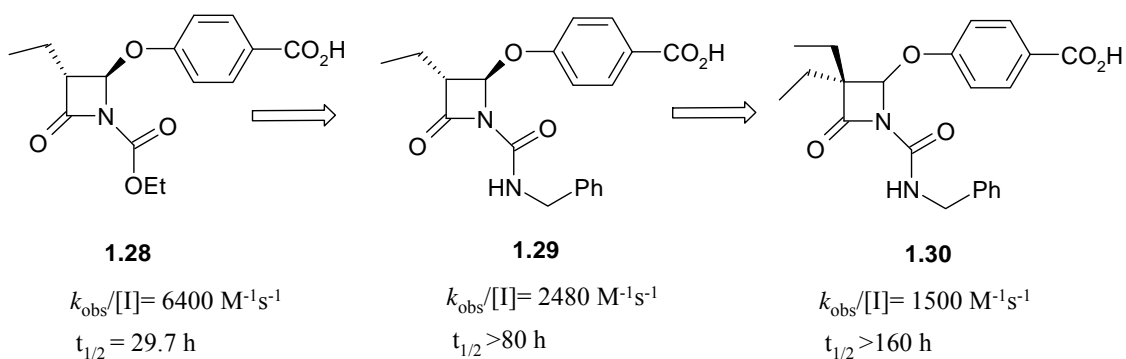
N-carbamoilazetidionas

Com o objectivo de descobrir um inibidor da HLE que pudesse ser administrado por via oral, o grupo da Merck, seguindo os mesmos critérios de selectividade mencionados para as cefalosporinas, desenvolveu um vasto e minucioso trabalho na

derivatização das β -lactâmas monocíclicas, principalmente em derivados *N*-carbamoilados, que teve o seu apogeu nos anos 90.

Nos primeiros trabalhos, introduziram-se vários substituintes nas posições C-3, C-4 e N-1. Em 1991, Hagmann e colaboradores, testaram em C-3 um único substituinte alquílico à semelhança das cefalosporinas. Estes substituintes eram essencialmente o grupo etilo ou o grupo *n*-propilo em posição α . Na série *N*-etoxicarbonilo (N -COOC₂H₅) os substituintes em C-4 variavam entre OCH₂COOH, SCH₂COOH, SO₂CH₂COOH e OPh-4-COOH. A estereoquímica dos inibidores era predominantemente *trans* (mistura racémica) e apesar da inibição ser dependente do tempo, a sua potência nos ensaios *in vitro*, era modesta comparada com os derivados das cefalosporinas (kobs/[I] de 158 a 6350) sendo o mais activo o análogo que tinha como grupo abandonante um ácido fenólico (OPh-4-COOH). No entanto, os ensaios *in vivo*, por administração intratraqueal do inibidor, evidenciavam alguns compostos como bons inibidores da hemorragia pulmonar induzida pela HLE. Os compostos das séries *N*-carbamoilo (N^1 CONHCH₂Ph) e *N*-sulfonilarilo (N^1 SO₂Ph-4-CH₃) têm comportamentos idênticos *in vitro* e *in vivo*, ou seja, fracos inibidores da HLE *in vitro* são excelentes inibidores *in vivo*, isto porque a actividade no pulmão depende da *clearance* do inibidor nessa região.⁹⁵

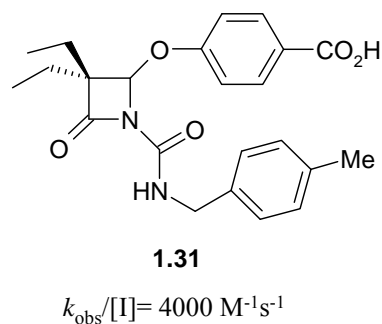
Como foi referido anteriormente, a estabilidade química do inibidor a ser administrado por via oral, é um pré-requisito indispensável para que possa alcançar intacto o alvo terapêutico. Nos derivados de azetidionas, o aumento da estabilidade química foi conseguido com três modificações estruturais. A primeira alteração foi a introdução em C-4 de um fenol ácido (**1.28**), que poderia por outro lado, aumentar a solubilidade aquosa do composto facilitando os ensaios *in vivo*. A segunda alteração consistiu na formação de uma ureia em N-1 (**1.29**), possivelmente porque o grupo carbamoilo é intrinsecamente menos electroattractor que o grupo carboxialquilo, diminuindo a reactividade da β -lactama. A terceira alteração foi a inserção na face β de C-3 de um segundo grupo etilo (**1.30**), o que não iria interferir com o ataque do hidroxilo do resíduo da Ser-125 da HLE ao carbonilo da β -lactama, porque este se faz pela face α . No entanto, impediria estereoquimicamente o ataque de outro nucleófilo não específico pela face β do anel.^{82,83}



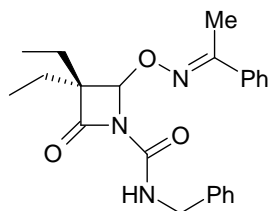
Partindo do composto **1.30** (mistura racémica), que mostrou ser estável em sangue humano a 37 °C durante 12 h e ter actividade *in vivo* depois de dosagem oral em hamsters (56% de inibição da hemorragia), Shah e Hagmann^{82,96}, procederam a modificações no grupo carbamoilo e no grupo fenoxi de C-4 com o intuito de encontrar inibidores mais potentes na elastase e que demonstrassem actividade por via oral.

No grupo carbamoilo, o benzeno da ureia ocupa uma região da HLE, onde muitos substituintes podem ser acomodados e onde as interacções de Van-der-Waals predominam sobre as ligações de hidrogénio ou outras interacções iónicas. Como tal, foram testados substituintes no anel aromático, como grupos Me, Et, OMe, COMe, NO₂, OH e NH₂. Os resultados indicaram que substituintes grandes e hidrofóbicos em posição *para*, como o Ph, ou dois substituintes metilo no anel, aumentam significativamente a potência inibitória *in vitro*, mas não *in vivo*.

O derivado **1.31** revelou-se o mais interessante, com 86% de inibição da hemorragia pulmonar, induzida pela HLE, quando foi administrado oralmente, 30 minutos antes da HLE. Na realidade, a actividade do derivado não se modificou quando foi administrado 1 h antes da HLE.⁸²



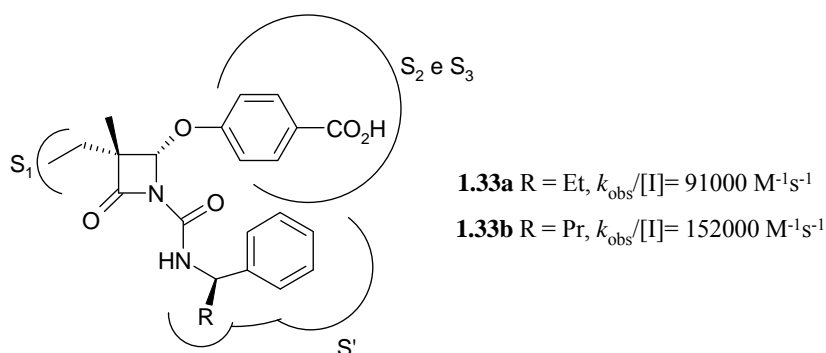
A substituição em C-4 realizada por Macchia e colaboradores por um grupo benzilidene-aminoxi, com menor nucleofugacidade que os ariloxi, formou o composto **1.32**, que manifestou um aumento da constante de inibição de segunda-ordem para 44000 M⁻¹ s⁻¹, em comparação com o inibidor **1.30**.^{97,98}



1.32

O grande desenvolvimento na potência das *N*-carbamoilazetidionas como inibidores da HLE e da hemorragia pulmonar, por via oral, surgiu com o estudo da estereoquímica dos substituintes fenoxi em C-4 e da estereoquímica dos substituintes no carbono metilénico do grupo benzilo, em C-1'. Por exemplo, a mudança do grupo etilo da face β do anel para um metilo ou propilo gerou um estereocentro que permitiu analisar a potência dos diastereoisómeos com grupos 4 α -fenoxi e 4 β -fenoxi. Os resultados indicam que a HLE requer para a sua inibição uma estereoquímica 4 α ou 4 S em C-4 para os substituintes fenoxi. No caso dos grupos Me, Et ou Pr que foram introduzidos em C-1' a estereoquímica ideal é a *R* mantendo-se a estereoquímica *S* em C-4. Os compostos **1.33a** e **1.33b** são os mais potentes neste estudo com 98% e 94% de inibição da hemorragia pulmonar por administração oral.

A modelização molecular de **1.33a** com a HLE, indica que a configuração *S* em C-4 permite que o grupo fenoxi se situe num canal formado pelos dois sub-sítios S_2 e S_3 , enquanto que a configuração *R* não consegue adoptar esta orientação, devendo-se estender o grupo fenoxi para o solvente. O grupo benzilo da ureia encaixa-se na região S_n' e o substituinte em C-1' com configuração *R* é projectado para uma pequena cavidade hidrofóbica da região S_n' aumentando a potência do composto. Pelo contrário, a configuração *S* é orientada em direcção ao solvente e portanto não afecta a ligação do inibidor à enzima.⁹⁹



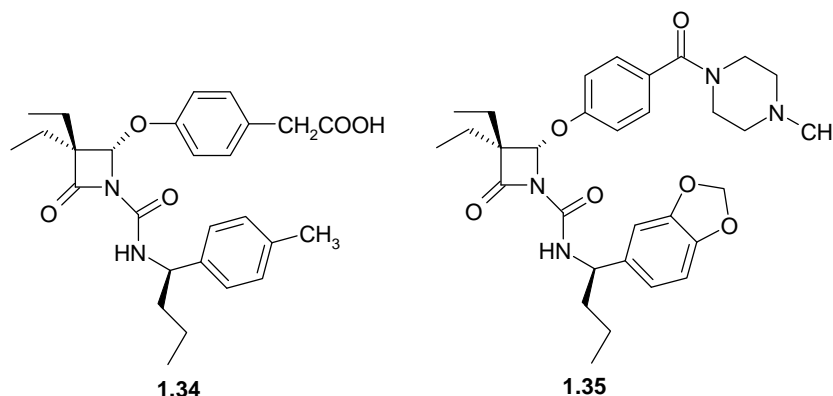
Escolhida a estereoquímica preferencial em C-4 e C-1', mantiveram-se os dois grupos etilo em C-3, pois estes conferem um balanço óptimo entre estabilidade, potência inibitória e eficácia *in vivo*. Com estas características sintetizaram-se os mais promissores derivados β -lactâmicos monocíclicos para administração oral, dos quais se destacam os compostos **1.34** e **1.35**.

O inibidor **1.34** (também denominado L-680,833), com um constante de velocidade de inibição de segunda-ordem *in vitro*, $k_{obs}/[I]$, de $622000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (IC_{50} $0,4 \mu\text{M}$), necessita de 1,3 equivalentes para inibir aproximadamente 99% da HLE.¹⁰⁰ Verifica-se que a reactivação da enzima, após a remoção do excesso de inibidor ou de qualquer metabolito formado, tem um tempo de semi-vida de 11 h (pH 7,5, 37 °C), o que permite considerar o composto **1.34**, em termos de funcionalidade como um inibidor irreversível. Em meio básico, a pH 11,3, é rapidamente degradado com um tempo de semi-vida de 76 min, contudo é estável a pH 7,5 e pH 2,0 a 37 °C. Demonstrou também ser estável mais de 48 h, às preparações que mimetizavam os fluidos gastro-intestinal e intestinal e por consequência conclui-se que a biodisponibilidade de **1.34** não é limitada pela sua estabilidade.^{83,101}

Em ensaios *in vivo*, ficou comprovado que este inibidor tem uma biodisponibilidade de aproximadamente 23%, uma boa distribuição pelo sangue e pelos tecidos, principalmente no tecido pulmonar e uma actividade prolongada conseguindo produzir uma inibição da hemorragia superior a 50% durante 13 a 14h, após uma dose oral de 3 mg/kg administrada em hamsters.⁸³

O inibidor **1.35** (também denominado L-694,458 ou DMP 777), difere do anterior porque ao nível estrutural em vez do grupo ácido carboxílico contem um grupo metil piperazina ligeiramente básico e ao nível funcional consegue inibir a elastase intracelular, assim como a elastase libertada pelos leucócitos.¹⁰² Verificou-se que **1.35** é altamente selectivo para a elastase humana, com um IC_{50} de 36 nM.⁵⁰

Trata-se de um inibidor com uma biodisponibilidade de 39% após uma administração oral de 10 mg/Kg, em macaco rhesus. Esta fraca biodisponibilidade é explicada pela baixa estabilidade metabólica nos microsomas hepáticos e pela metabolização de **1.35** que ocorre no jejuno do macaco rhesus.¹⁰²

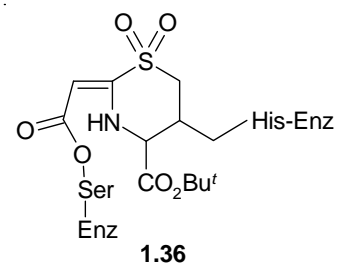


1.5.4 Mecanismos de Inibição de Derivados de Cefalosporinas e Azetidionas

A maioria dos mecanismos de inibição enzimática referidos na literatura, foi comprovada, por estudos de cinética enzimática, por análise do complexo final E-I (em que E é normalmente a PPE) utilizando RMN, espectrometria de massa e cristalografia de Raio X e ainda por caracterização dos produtos resultantes da inibição enzimática.

Na análise que se segue, é de considerar que quando um inibidor suicida se encontra em presença da PPE ou HLE, em solução tamponada, pode ocorrer a formação de vários complexos finais, estruturalmente diferentes, que coexistem no meio experimental.

Navia e colaboradores obtiveram a estrutura cristalina **1.36** para o complexo formado pela PPE inibida pelo *tert*-butil-7 α -clorocefalosporina e a partir deste resultado propuseram um mecanismo de “double-hit” para as cefalosporinas com um átomo de cloro em C-7 e um bom grupo abandonante em C-3’.

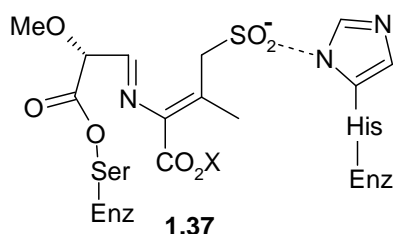


Neste mecanismo, a abertura do anel β -lactâmico pelo grupo hidroxilo da Ser-195, seguido da expulsão do 3’-acetato, perda de HCl, e adição de Michael ao azoto do anel de imidazol da His-57, origina o complexo **1.36**.

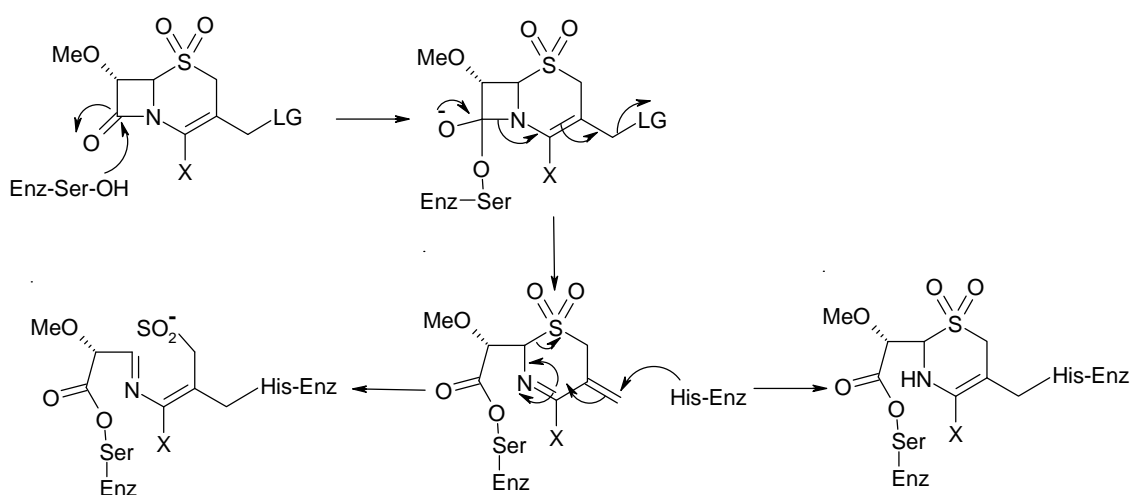
Contudo, nas cefalosporinas que possuem um mau grupo abandonante em C-7 como o metoxi, estudos cristalográficos preliminares sugerem que este grupo permanece no complexo final E-I.⁷⁵ Nestes derivados, quando em C-3’ se encontra um

bom grupo abandonante, pode-se formar uma segunda ligação covalente entre o resíduo da His-57 e o C-3', ficando a enzima acilada e alquilada. Knight e colaboradores, de acordo com os seus estudos cinéticos, propõem um mecanismo de inibição em que o complexo que se forma entre estas cefalosporinas e a HLE, pode apresentar duas estruturas: com o anel de dihidrotiazina aberto ou com o anel fechado (Esquema 1.3)^{79, 80}

No caso em que não exista um grupo abandonante em C-3', por exemplo o grupo metilo em C-3, então não é possível o anterior mecanismo de adição da His-57, sendo aceite o mecanismo em que se forma um anião sulfinato, por abertura do anel dihidrotiazina.

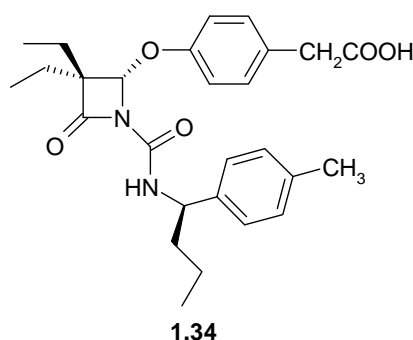


O complexo **1.37**, pode ser estabilizado por uma ponte salina entre o anião sulfinato e a His-57 por exemplo, ou por uma mudança conformacional que provoque uma diminuição na acessibilidade do carbonilo ligado à Ser-195 a qualquer nucleófilo externo.⁸⁰



Esquema 1.3

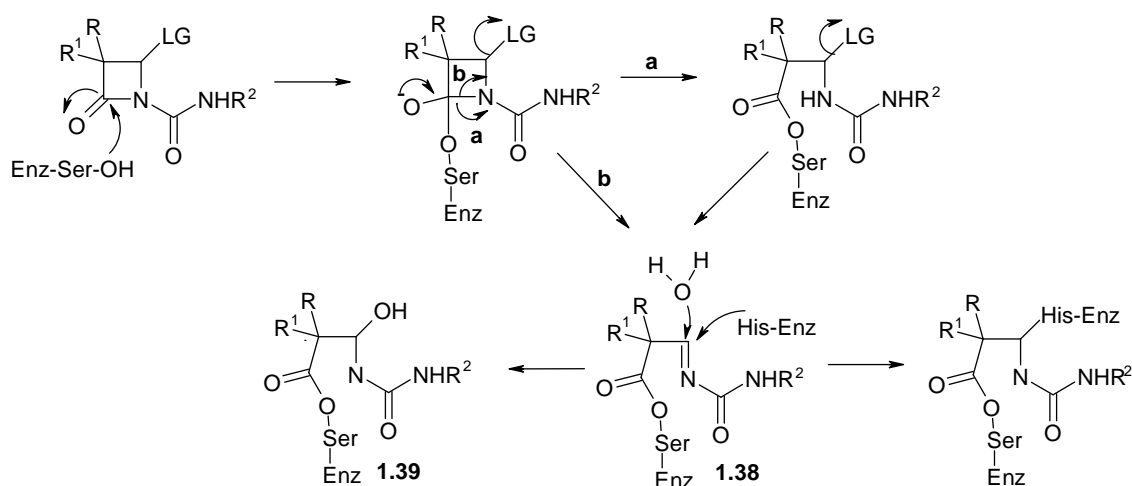
As β -lactamas monocíclicas da classe de **1.34** formam complexos relativamente estáveis com a HLE com tempos de semi-vida de reactivação da actividade enzimática de 3 a 15 h (37°C e a pH 7,5). Green e colaboradores verificaram que a estabilidade do complexo final E-I era insensível à força iónica e à natureza do grupo abandonante em C-4, contudo era dependente da estereoquímica de C-4 e da natureza dos substituintes da ureia. Na realidade, o derivado com os mesmos substituintes que **1.34** mas que não apresenta grupo abandonante em C-4, apesar de ser menos potente na inibição da HLE que o **1.34**, produz um complexo tão estável como o complexo HLE-**1.34**.



Por sua vez, quando a estereoquímica de C-4 do inibidor é *S*, o complexo HLE-I resultante é menos estável que o complexo da HLE com o inibidor com estereoquímica *R* em C-4. Atendendo a que o grupo abandonante em C-4 não está presente no complexo HLE-I final, o que foi comprovado por espectrometria de massa, é explicada a influência da estereoquímica de C-4 na estabilidade do complexo se no mecanismo de inibição existir um passo reaccional com preferência esterequímica, sendo este passo anterior à saída do grupo abandonante.

Os substituintes em C-1' intervêm na estabilidade do complexo HLE-I, tendo-se verificado que o grupo propilo em relação ao grupo etilo aumenta duas vezes a estabilidade daquele complexo. Igualmente a estereoquímica de C-1' afecta a estabilidade do complexo. Assim, os inibidores com C-1' com estereoquímica *R* formam complexos muito mais estáveis com a HLE que os inibidores com estereoquímica *S*. Outro factor que afecta a estabilidade do complexo final HLE-I são os substituintes no anel fenilo da ureia.¹⁰¹

Considerando todos estes resultados, o mecanismo de inibição proposto para as *N*-carbamoilazetidionas inicia-se pelo ataque do hidroxilo da Ser-195 ao grupo carbonilo da β -lactama, pela face α do anel, formando um intermédio tetraédrico. O colapso deste intermédio por abertura do anel e saída concertada do grupo abandonante 4*S* ou saída posterior do grupo abandonante 4*R*, resulta numa acil-enzima que contém uma imina **1.38** (Esquema 1.4).^{84,103}

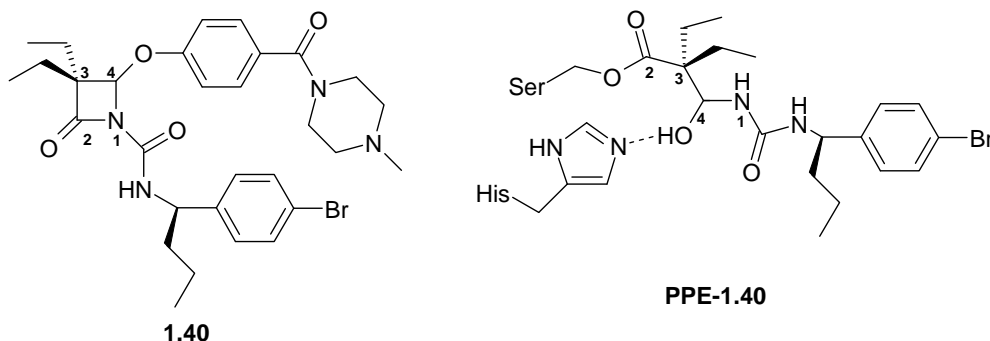


Esquema 1.4

Este complexo E-I' pode ser desacilado e regenerar a enzima activa, ou pode sofrer uma mudança conformacional que provoca uma diminuição da acessibilidade ao grupo carbonilo que acila a Ser-195 a qualquer nucleófilo externo, o que consequentemente aumenta o tempo de semi-vida do complexo acil-enzima.¹¹⁸ Em alternativa a estas duas opções, o grupo imina recém-gerado pode sofrer a adição do resíduo da His-57, como foi provado com a *terc*-butil-7 α -clorocefalosporina ou de uma molécula de água formando uma *(S)*-carbinolamina, **1.39**. Esta reacção foi defendida por Underwood e colaboradores após o estudo dos complexos formados pela PPE e HLE com várias *N*-carbamoilazetidionas, utilizando técnicas de espectrometria de massa por ionização com *electrospray* e RMN bi-dimensional.¹⁰³

A cristologia de Raio X do complexo PPE-**1.40** confirmou a formação da *(S)*-carbinolamina. Para a estabilidade da *(S)*-carbinolamina, no complexo final contribui a

ponte de hidrogénio formado entre o grupo hidroxilo introduzido e o resíduo de His-57.¹⁰⁴

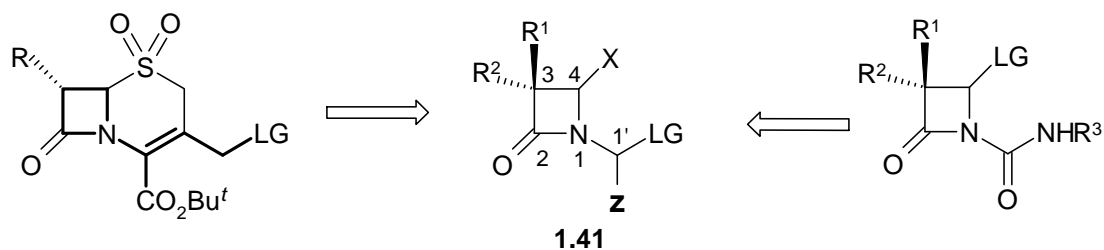


1.6 Âmbito da Tese

Com o objectivo de sintetizar novos derivados β -lactâmicos monocíclicos, que funcionassem como potentes inibidores da HLE, considerou-se no seu desenho a simplificação estrutural das cefalosporinas e toda a informação disponível sobre reactividade enzimática e estabilidade química de β -lactamas monocíclicas, de modo a otimizar os substituintes do anel β -lactâmico (Esquema 1.5). Considerando estes dados, os novos derivados deveriam incorporar na 2-azetidinona, as unidades estruturais essenciais para: **(i)** o reconhecimento molecular por parte da HLE; **(ii)** permitir o mecanismo de inibição suicida; **(iii)** que a reactividade intrínseca dos derivados promova uma inibição potente e selectiva da HLE; **(iv)** serem estáveis a pH fisiológico.

Como tal, nos derivados de estrutura geral **1.41**, a β -lactama ou a 2-azetidinona deve ser substituída em C-3 por grupos alquílicos, (por exemplo R^1 , $R^2 = Et, Pr^i$), essenciais à especificidade primária da enzima, em C-4 por grupos X atratores de electrões, que activam quimicamente o anel β -lactâmico. O N-1 da azetidinona liga-se a potenciais grupos abandonantes, LG, por um grupo metilénico, estratégia essencial para a dupla inibição enzimática. Numa segunda série de compostos a reactividade do anel β -lactâmico é reforçada pela introdução na ponte metilénica de um segundo grupo atractor de electrões, Z.

Neste trabalho é relatada a síntese de derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidionas (**1.41a** Z=H) e determinada a sua actividade inibitória na HLE por ensaios *in vitro* (Capítulo 2). No Capítulo 3 é descrita a síntese da segunda série dos derivados β -lactâmicos, os derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidionas (**1.41b** Z= grupo atractor de electrões). Os compostos sintetizados são analisados relativamente à sua potência inibitória na HLE e estabilidade química em tampão fosfato a pH fisiológico.



Esquema 1.5

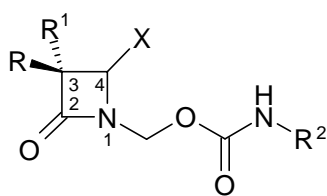
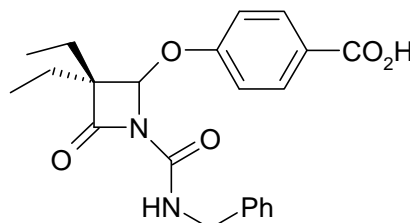
Os compostos obtidos no Capítulo 3 desencadearam o interesse nas oxazolidine-2,4-dionas como novos potenciais inibidores da elastase. No Capítulo 4 são apresentados os resultados dos testes realizados *in vitro* com a PPE e as aril-, acilaril- e sulfonilariloxazolidine-2,4-dionas sintetizadas. Os estudos da estabilidade química destes compostos a pH fisiológico e pH alcalino são também divulgados.

Capítulo 2

Síntese e Actividade Inibitória de Derivados de N-hidroximetil-2-azetidinonas

2.1 Introdução

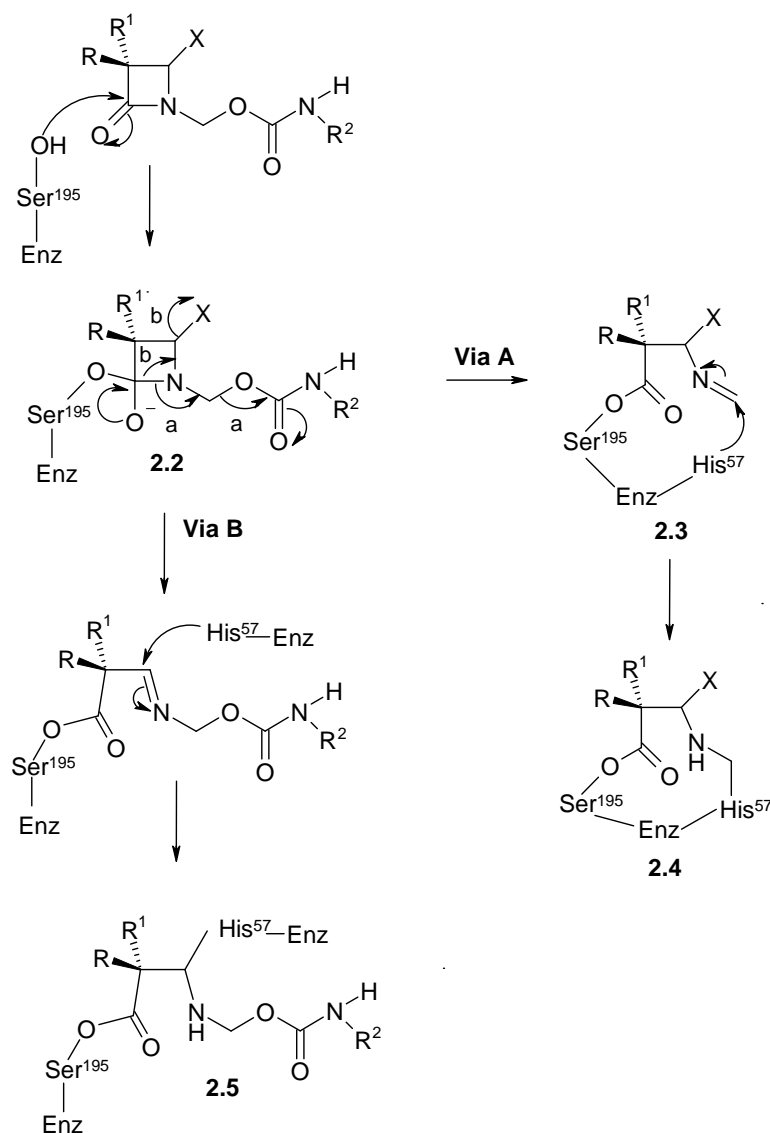
Os compostos β -lactâmicos **2.1**, que pretendemos sintetizar, para funcionarem como inibidores suicidas da HLE deverão ter em C-3 grupos alquílicos pequenos e pouco volumosos que possam interactuar com o sub-sítio S_1 como por exemplo o grupo isopropilo ou à semelhança das *N*-carbamoilazetidionas dois grupos etilo, visíveis na estrutura **1.30**. Em C-4 os grupos atractores de electrões X, que tornam a β -lactama mais reactiva, serão arilsulfonilos, por analogia com as cefalosporinas que apresentam um grupo sulfona ligado a C-6, ou heterociclos como por exemplo o grupo 2-mercaptobenzoxazol. Ficou demonstrado por cristalografia, que nos derivados peptídicos α -ceto benzoxazol, o anel de benzoxazol estabelecia ligações de hidrogénio com o grupo imidazol da His-57 permitindo a estabilização do intermédio tetraédrico hemicetal.⁶⁰ Coloca-se a hipótese duma possível estabilização por este processo do complexo acilado formado por **2.1** e a HLE, caso não ocorra uma segunda ligação covalente à enzima.

**2.1****1.30**

Como grupos abandonantes (LG) foram escolhidos ácidos carbâmicos de aminas primárias porque para além de apresentarem uma boa nucleofugacidade (pK_a 3.79 para $C_6H_5NHCO_2H$)¹⁰⁵, essencial para o mecanismo suicida, os carbamatos são grupos funcionais pouco propícios ao ataque enzimático da HLE, ou de outros nucleófilos, por possuírem uma baixa reactividade.¹⁰⁶

O mecanismo proposto para a inibição irreversível da HLE por estes derivados β -lactâmicos encontra-se representado no Esquema 2.1. Inicia-se pelo ataque do resíduo da Ser-195 ao carbonilo do anel β -lactâmico formando o intermediário tetraédrico **2.2**.

A regeneração do carbonilo e consequente colapso deste intermédio originam: a acil-enzima, a abertura do anel β -lactâmico e a formação da imina **2.3**, por consequente libertação do carbamato (**Via A**). Esta imina é susceptível de ataque por adição de Michael do imidazol do resíduo da His-57, ficando a enzima duplamente ligada ao inibidor formando o complexo **2.4**. No caso de em C-4 existirem bons grupos abandonantes, a **Via B** representa uma segunda hipótese de ligação à enzima por alquilação. Como os grupos atractores de electrões escolhidos para C-4 são também grupos abandonantes, utilizados por exemplo por Groutas e colaboradores nos derivados de tiadiazolidinonas^{64,68,70} (c.f Capítulo I), a formação do complexo **2.5** coloca-se como uma hipótese viável no mecanismo suicida destes potenciais inibidores.

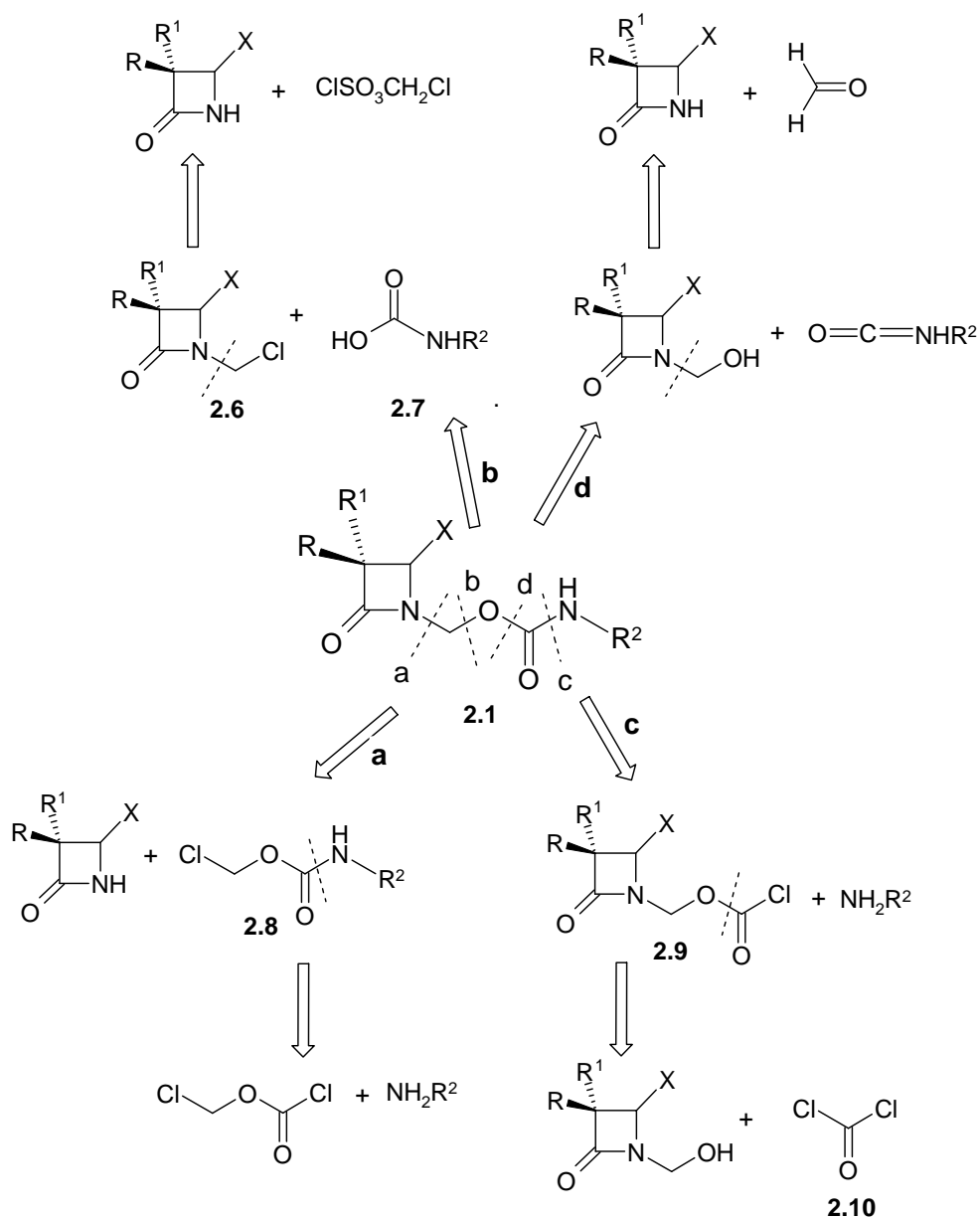


Esquema 2.1

2.2 Obtenção de Derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidionas

2.2.1 Análise Retro-sintética

As *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas **2.1**, são compostos que podem ser sintetizados, segundo a análise retro-sintética representada no Esquema 2.2, por quatro processos químicos.

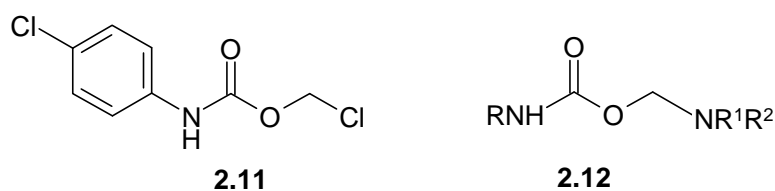


Esquema 2.2

No **método a** o produto **2.1** resulta da reacção entre a azetidinona ou o respectivo sal sódico (uma vez que a azetidinona é um nucleófilo fraco e necessita ser activada) com o clorometilcarbamato **2.8** de uma amina primária aromática ou alifática. Patonay e colaboradores conseguiram sintetizar clorometilcarbamatos de aminas primárias alifáticas e aromáticas, utilizando metodologias diferentes consoante a amina. Os clorometil *N*-alquil carbamatos foram obtidos, com rendimentos superiores a 70%, a partir do cloroformato e de 2,5 equivalentes da respectiva amina em hexano à temperatura de -5 °C. Como produtos secundários formaram-se pequenas quantidades de ureias simétricas. Os clorometil *N*-aril carbamatos, como o **2.11**, foram sintetizados com 1 equivalente da respectiva amina utilizando como base adicional a trietilamina, em diclorometano à temperatura de 0-5° C.

Na continuação do seu trabalho, Patonay e colaboradores fizeram reagir os clorometilcarbamatos secundários com aminas primárias e secundárias alifáticas obtendo ureias em vez do composto de substituição nucleofílica **2.12**, o que confirma a nucleofugacidade do grupo clorometoxi.¹⁰⁷

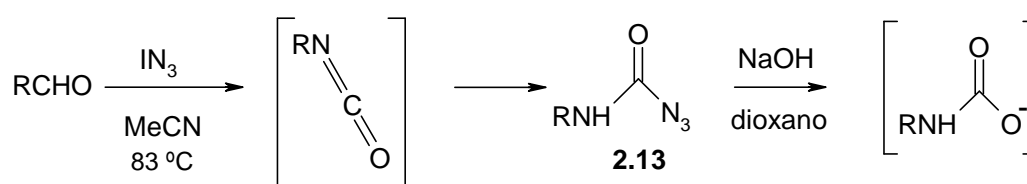
Na reacção de alquilação entre o sal da azetidinona e clorometilcarbamatos de aminas primárias ou com os mais electrofílicos iodometilcarbamatos, pode colocar-se a hipótese do sal da azetidinona abstrair o hidrogénio do carbamato, numa reacção ácido-base, originando a sua degradação com formação do correspondente isocianato e libertação do grupo clorometoxi, tornando-se assim difícil a síntese da *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidinona pretendida por este método.



O **método b** consiste na reacção entre a *N*-clorometilazetidinona **2.6**, e o ácido carbámico respectivo, **2.7**. Os ácidos carbámicos ou os respectivos carbamatos são muito instáveis e o seu isolamento não é possível, contudo podem ser gerados *in situ* no meio reaccional. Li e colaboradores conseguiram a síntese de (aciloxi)metilcarbamatos

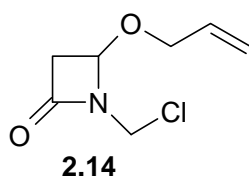
a partir da carbamilação, *in situ*, de benzilamina e benzilmetilamina com dióxido de carbono, em presença de um agente alquilante e carbonato de céσιο em DMF ($R^1RNH/CO_2/ICH_2OCOBu^t/ Cs_2CO_3$, DMF/ t.a.), contudo não fazem referência a aminas aromáticas.¹⁰⁸

Recentemente, foi publicado um processo de síntese de carbamatos, gerados também *in situ* mas que utiliza carbamoil azidas **2.13**. Trata-se de um método mais complexo que origina com bons rendimentos carbamoil azidas de aminas alifáticas e aromáticas a partir de aldeídos (Esquema 2.3).¹⁰⁹

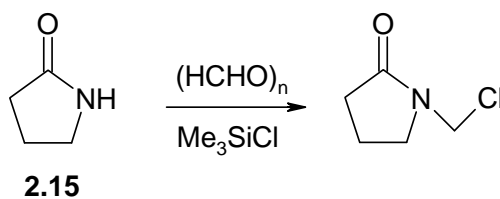


Esquema 2.3

Em relação à *N*-clorometilazetidionona **2.6**, a sua síntese pode ser realizada através de dois passos. No primeiro passo, ocorre a formação da *N*-hidroximetilazetidionona, por reacção do paraformaldeído ou formaldeído e a respectiva azetidionona, a temperaturas de 115 °C ou de refluxo. Após a purificação do produto por cromatografia, este reage com o cloreto de tionilo em THF, a baixas temperaturas (-15 °C) e origina a *N*-clorometilazetidionona. Assim sintetizado, o composto **2.14** é descrito como instável o que não permitiu a sua purificação por cromatografia.¹¹⁰



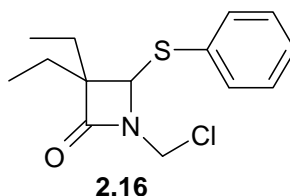
No entanto, foi divulgado que a γ -lactama não substituída **2.15**, pode ser clorometilada, num único passo reaccional, com um rendimento de 82%, se reagir com clorotrimetilsilano e paraformaldeído (Esquema 2.4).¹¹¹



Esquema 2.4

Utilizando os mesmos reagentes, Neres conseguiu sintetizar a clorometil-2-azetidionona **2.16**, que se revelou muito instável, impossibilitando a sua purificação. Esta instabilidade reflectiu-se nos rendimentos obtidos (5-10%), quando **2.16** reagiu com o benzoato de sódio, comprovando não ser o intermédio mais apropriado para esta reacção.^{111a}

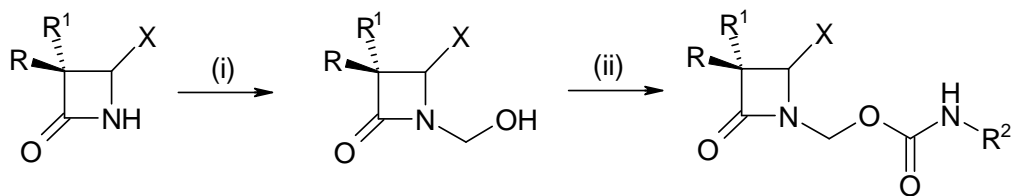
Na retro-síntese da *N*-clorometilazetidionona poder-se-ia considerar como potencial reagente o clorossulfato de clorometilo, porque contém um forte centro electrofílico e um bom grupo abandonante (ClSO₃), sendo referido como o reagente de eleição para a síntese de ésteres clorometílicos a partir de ácidos carboxilícos.¹¹²



No **método c**, o clorocarboniloximetilo da azetidionona **2.9**, reage com uma amina primária alifática ou aromática em presença de uma base para obtenção de **2.1**. O *N*-(clorocarboniloxi)metilazetidionona pode ser obtido pelo processo tradicional de síntese de ésteres clorofórmicos, isto é, pela reacção entre um álcool, neste caso o *N*-hidroximetilazetidionona e o tóxico fosgénio **2.10**.¹¹³

A necessidade de sintetizar a *N*-hidroximetilazetidionona, comum ao **método d**, transforma o **método c** num processo mais complexo (3 passos) e mais tóxico que o **método d**. Neste, a *N*-hidroximetilazetidionona obtida na reacção da azetidionona com formaldeído, em presença de carbonato de potássio,¹¹⁴ reage com o isocianato em meio apolar anidro, tendo como catalizador a trietilamina (Esquema 2.5). Por ser o método

que está melhor documentado e com menor número de passos, foi seleccionado para a síntese dos derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidionas.



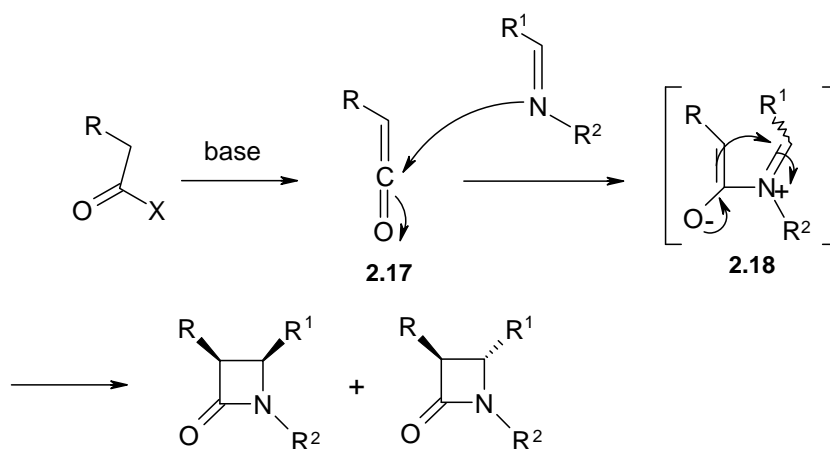
(i) HCHO/K₂CO₃/EtOH; (ii) R²NCO/ NEt₃/CH₂Cl₂

Esquema 2.5

2.2.2 Síntese de 4-Acetoxi-2-azetidionas

Existem várias estratégias de síntese de 2-azetidionas, entre elas podem-se citar as [2+2] cicloadições de cetenos a bases de Schiff (reacção de Staudinger), [2+2] ciclo adições de ésteres enolatos a bases de Schiff, [2+2] cicloadições do isocianato clorossulfonilo (CSI) a acetoxialcenos e ciclizações N1-C2, N1-C4 e C3-C4.¹¹⁵

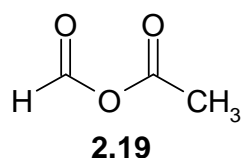
A reacção de Staudinger é sem dúvida o método mais frequentemente utilizado para a síntese do anel β-lactâmico. O seu mecanismo envolve a reacção de ciclização [2+2] entre um ceteno **2.17** (gerado *in situ* a partir de um cloreto de ácido) e uma imina, que origina o intermédio **2.18**. O fecho do anel forma os produtos finais β-lactâmicos que podem ser *cis* ou *trans* ou uma mistura dos dois (Esquema 2.6).^{116,117}



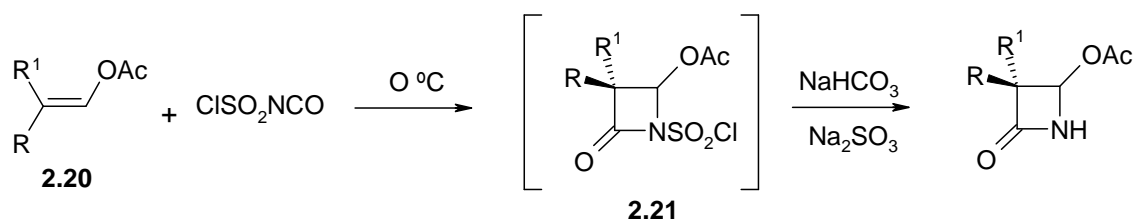
Esquema 2.6

Para a síntese de *N*-(aminocarbonilo)metil-2-azetidionas, e atendendo que se pretende variar os substituintes em C-4, é necessário uma azetidiona inicial que tenha um bom grupo abandonante em C-4 como por exemplo o grupo acetoxi.

Na reacção de Staudinger, o grupo R¹ presente na β-lactama em C-4 é proveniente da imina, que por sua vez é formada pela reacção entre um aldeído que contém o substituinte R¹ e uma amina com o substituinte R². Como tal, se o carbonilo do aldeído se ligar ao grupo acetoxi obtemos uma espécie química totalmente diferente, um anidrido **2.19**, que ao reagir com a amina forma amidas (fórmica e acética), sendo quimicamente impossível utilizar a reacção de Staudinger na síntese de 4-acetoxi-2-azetidionas.

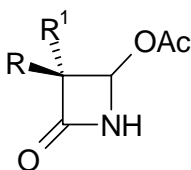


O método de Clauss foi o escolhido para a síntese de 4-acetoxi-2-azetidionas. Consiste na reacção do acetoxialceno **2.20**, com o isocianato de clorossulfonilo (CSI) que por ciclo-adição [2+2] forma a *N*-clorossulfonilo-4-acetoxi-azetidiona **2.21**. Este intermédio ao ser tratado com bicarbonato de sódio e sulfito de sódio resulta na 4-acetoxi-2-azetidiona pretendida (Esquema 2.7).¹¹⁸



Esquema 2.7

Utilizando este método sintetizaram-se as 4-acetoxi-2-azetidionas **2.22a** e **2.22b**.



2.22a R=R¹=Et

2.22b R=Prⁱ, R¹=H

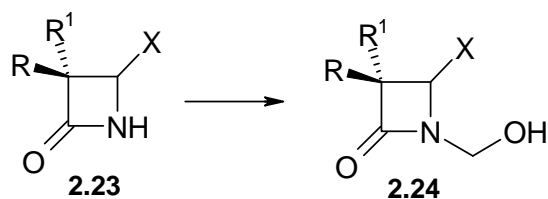
A partir dos aldeídos, 2-etilbutiraldeído e 3-metilbutiraldeído, obtiveram-se os acetoxialcenos, 1-acetoxi-2-etil-1-butenos (**2.20a** R=R¹= Et) e 1-acetoxi-3-metil-1-butenos (**2.20b** R= Prⁱ, R¹= H) respectivamente, por reacção dos referidos aldeídos com anidrido acético em presença de acetato de sódio, à temperatura de refluxo. Ambos os precursores de **2.22a** e **2.22b**, foram purificados por destilação, obtendo-se rendimentos muito diferentes, 85% para o primeiro e 4,5% para o segundo.

Na reacção de ciclo-adição dos referidos acetoxialcenos com o isocianato de clorossulfonilo e posterior tratamento com bicarbonato de sódio e sulfito de sódio, o produto **2.22a**, devido à sua instabilidade química foi recristalizado de hexano, com um rendimento de 34%, enquanto que o produto **2.22b** foi purificado por cromatografia em coluna obtendo-se um baixo rendimento (1,3%). Este baixo rendimento atribui-se em parte à formação de um grande número de produtos secundários que dificultaram o seu isolamento. No entanto, uma análise detalhada das 4-acetoxi-2-azetidionas sintetizadas pelo mesmo método, por Firestone e colaboradores, revela que o rendimento da reacção aumenta com a diminuição do número de átomos de carbono do substituinte em C-3 da β-lactama. Assim, para os grupos etilo, n-propilo e n-butilo em C-3 obtiveram rendimentos de 16,3%, 3,3% e 1%, respectivamente. No caso de **2.22b** coloca-se a hipótese do aumento de volume do Prⁱ, dificultar a ciclo-adição formando-se menor quantidade do produto pretendido.¹¹⁸

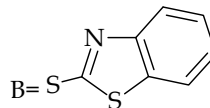
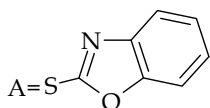
2.2.3 Síntese de Azetidionas Substituídas em C-4 e *N*-hidroximetil-2-azetidionas

Para proceder à substituição do grupo acetoxi em C-4 das azetidionas pelos grupos tiofenoxi, 2-tiobenzoxazol e 2-tiobenzotiazol fez-se reagir o sal sódico dos referidos grupos, gerado *in situ*, por reacção com uma solução de hidróxido de sódio com a respectiva azetidionona, em acetona. Os derivados **2.23a-c** (Tabela 2.1) foram purificados por cromatografia em coluna obtendo-se rendimentos entre os 44 a 55%. O produto com maior rendimento **2.23b**, necessitou de mais tempo para completar a reacção verificando-se o desaparecimento da azetidionona, do meio reaccional, por ¹H-RMN. Com um comportamento diferente dos anteriores o composto **2.23d** precipitou no meio reaccional, tendo sido recolhido por filtração a pressão reduzida e purificado por recristalização de etanol.

Tabela 2.1- Azetidionas substituídas em C-4 e *N*-hidroximetilazetidionas sintetizadas



Comp	R	R ¹	X
2.23a	Et	Et	SC ₆ H ₅
2.23b, 2.24b	Et	Et	A
2.23c, 2.24c	Pr ⁱ	H	A
2.23d, 2.24d	Et	Et	B
2.23e, 2.24e	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅



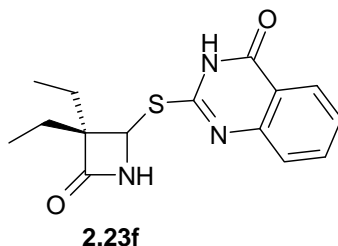
O desaparecimento do sinal dos hidrogénios do grupo acetoxi a 2,12-2,14 ppm, nos espectros de ¹H-RMN, conjuntamente com o surgimento dos sinais dos hidrogénios

aromáticos a 6,88-7,47 ppm e o deslocamento do hidrogénio de C-4 de 5,60 ppm para 4,79 ppm (**2.23a**); 6,23 (**2.23b**); 6,51 (**2.23c**) e 6,06 (**2.23d**) comprovam as substituições em C-4.

É de salientar que no $^1\text{H-RMN}$ do composto **2.23c**, observa-se a 6,51 ppm o sinal do hidrogénio em C-4, desdobrado em duplete por acoplamento com o hidrogénio em C-3. A baixa constante de acoplamento vicinal (1,5-2,0 Hz) entre estes dois hidrogénios indica que se encontram em posição *trans*.¹¹⁸

Na oxidação do grupo tiofenilo de **2.23a** a fenilsulfona, utilizou-se ácido 3-cloroperbenzóico em diclorometano, à temperatura ambiente, obtendo-se 71% do produto oxidado **2.23e**. No espectro de infravermelho justifica-se a sua formação pelo aparecimento de duas bandas fortes de alongamento simétrico e assimétrico das ligações S=O a 1150 e 1295 cm^{-1} , respectivamente.

Utilizando o mesmo método tentou-se sintetizar o composto **2.23f** mas sem sucesso.



Os derivados **2.24b-e** foram obtidos por adaptação do processo indicado por Nagai e colaboradores, no qual os intermédios **2.23b-e** são dissolvidos numa solução aquosa de formaldeído a 37 % à qual se adiciona carbonato de potássio.¹¹⁴ Caso ocorram dificuldades na dissolução dos compostos junta-se etanol, o que aconteceu com os compostos com tioheterociclos em C-4. A reacção decorreu à temperatura ambiente e foi controlada por ccd.

Igualmente nesta reacção o produto **2.24d** precipitou no meio reaccional, tendo sido recolhido por filtração. Neste caso, a sua solubilidade em alguns solventes orgânicos permitiram a sua purificação por cromatografia em coluna.

Como os derivados **2.24** têm um estereocentro em C-4, os hidrogénios metilénicos do grupo CH_2OH são diastereotópicos, apresentando-se nos espectros de ^1H -RMN por um sistema AX (**2.24c** e **2.24d**) ou AB (**2.24b** e **2.24e**), em que cada hidrogénio é representado por um duplo duplete.¹¹⁹ No caso dos compostos **2.24b** e **2.24e** as constantes de acoplamento geminais observadas, 2J , são de 8,6 e 11,5 Hz, respectivamente. Devido aos diferentes ambientes magnéticos que rodeiam cada hidrogénio diastereotópico, verifica-se em cada composto, duas constantes de acoplamento com o hidrogénio do grupo hidroxilo, 3J , consoante o acoplamento se efectue com o H_a ou com o H_b (Figura 2.1).

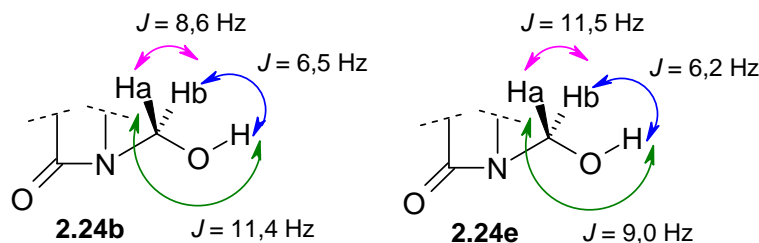


Figura 2.1- Constantes de acoplamento geminais e vicinais dos hidrogénios diastereotópicos dos derivados **2.24b** e **2.24 e**.

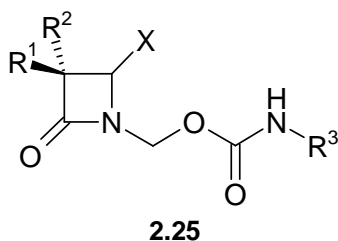
No composto **2.24c** o sinal do hidrogénio do grupo hidroxilo surge como um tripleto devido à fusão dos picos internos do duplo duplete.

2.2.4 Síntese de *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas

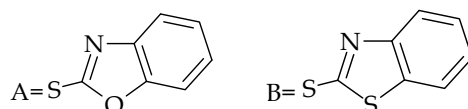
As *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas **2.25a-i**, foram obtidas com rendimentos de 21-89% (Tabela 2.2) por reacção entre os intermédios **2.24b-e** e vários isocianatos, alguns substituídos em *para* por grupos dadores ou atractores de electrões, em presença do catalizador trietilamina e utilizando como solvente o diclorometano previamente seco. Regra geral, as reacções foram rápidas à temperatura ambiente, observando-se o desaparecimento dos intermédios *N*-hidroximetilados, por ccd, em apenas 1 a 2h (**2.25a-f**). Nas condições reaccionais utilizadas o isocianato estava presente em ligeiro excesso em relação à *N*-hidroximetilazetidionona (1,1 eq. mol.). A

dificuldade na purificação de alguns destes derivados, por cromatografia em coluna ou cristalização, devido aos produtos secundários formados, reflectiu-se nos seus baixos rendimentos.

Tabela 2.2- *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas sintetizadas

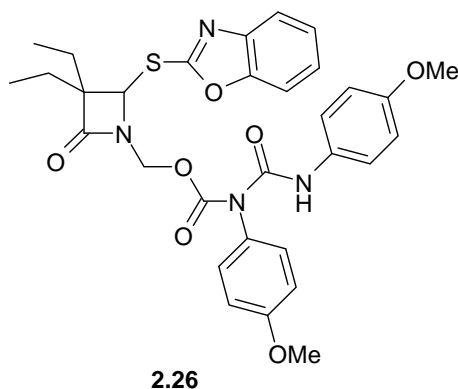


Comp	R ¹	R ²	X	R ³	η (%)
2.25a	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	33
2.25b	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	4-MeC ₆ H ₄	27
2.25c	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	4-MeOC ₆ H ₄	74
2.25d	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	4-MeCOC ₆ H ₄	89
2.25e	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	4-Me ₂ NC ₆ H ₄	85
2.25f	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	21
2.25g	Et	Et	A	4-MeOC ₆ H ₄	27
2.25h	Et	Et	B	4-MeOC ₆ H ₄	57
2.25i	Pr ⁱ	H	A	4-MeOC ₆ H ₄	73



Verificou-se que as *N*-hidroximetil-2-azetidionas com tioheterociclos são menos reactivas que as *N*-hidroximetil-2-azetidionas com o grupo fenilsulfonilo em C-4, necessitando aquelas reacções, para ficarem completas, de um aumento da quantidade de isocianato (2 eq. mol.) e trietilamina (2 eq. mol.) e do tempo de reacção. Nestas condições formaram-se vários produtos secundários. Por exemplo, na reacção de **2.24b** com o isocianato de 4-metoxifenilo foi isolado o produto secundário **2.26** com um

rendimento de 17 %. A sua estrutura foi determinada por RMN e espectrometria de massa.



2.2.5 Identificação Espectroscópica de *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas

Todos os compostos sintetizados e representados na Tabela 2.2 originaram espectros de ^1H e ^{13}C -RMN, MS-EI ou ESI-MS e análises elementares consistentes com estrutura proposta. Estes dados encontram-se descritos no Capítulo 5. Salientam-se a seguir os aspectos mais importantes desses espectros.

Espectroscopia de Infravermelho

Nos vários espectros de I.V. das *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas, distinguem-se as bandas referentes aos principais grupos funcionais que provam a identidade destes derivados: os alongamentos da ligação do grupo carbonilo da função β -lactâmica a $1780\text{-}1772\text{ cm}^{-1}$, da ligação do grupo carbonilo do carbamato a $1734\text{-}1723\text{ cm}^{-1}$, da ligação N-H do carbamato entre 3375 e 3319 cm^{-1} e das já referidas ligações S=O a $1321\text{-}1314\text{ cm}^{-1}$ e $1157\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$.

Ressonância Magnética Nuclear

A existência de um estereocentro em C-4 nos compostos *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas, **2.25a-h**, transforma todos os hidrogénios metilénicos em hidrogénios diastereotópicos, magneticamente não equivalentes¹²⁰, o que se traduz, nos vários espectros de ^1H -RMN, pela similaridade dos sinais correspondentes aos hidrogénios diastereotópicos dos grupos etilo, CH_3CH_2 , e dos grupos NCH_2O .

No grupo etilo, o sinal de cada hidrogénio diastereotópico pode ser classificado com um duplo quadruplo sobreposto (*dq* sobr) devido ao acoplamento com o hidrogénio geminal e com os três hidrogénios vicinais, apresentando 2J de 14,9 Hz e 3J de 7,5 Hz (Figura 2.2). Nos espectros destes derivados, é usual encontrar a sobreposição de dois *dq* sobr, referentes a dois hidrogénios, o que torna o sinal final mais complexo.

Por sua vez, os sinais dos dois hidrogénios do grupo NCH_2O , foram simplificados em relação aos intermédios **2.24**, e surgem como dois dupletos com 2J de 11,4-11,7 Hz, cujos deslocamentos variam entre 4,66-5,04 ppm e 5,02-5,43 ppm.

No composto **2.25i**, os metilos do grupo isopropilo, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, de C-3 são também grupos diastereotópicos¹²⁰ originando dois dupletos a 1,12 e 1,16 ppm ($^3J = 6,8$ Hz), por acoplamento de cada metilo com o hidrogénio vicinal. Os substituintes Pr^i em C-3 e 2-tiobenzoxazol em C-4 continuam com estereoquímica *trans*, comprovada pelo duplete a 6,56 ppm, que comporta uma reduzida constante de acoplamento vicinal (2,0-2,2 Hz), entre os hidrogénios em C-4 e C-3.

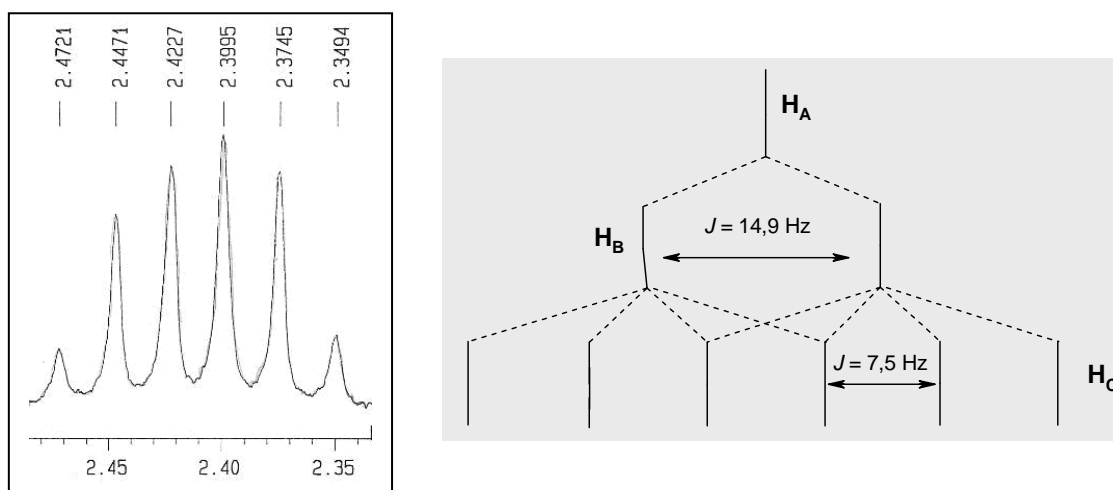


Figura 2.2- Sinal e diagrama de acoplamento do hidrogénio diastereotópico do grupo CH_3CH_2 dos derivados **2.25**.

Os hidrogénios diastereotópicos do grupo benzilo, CH_2Ph , do composto **2.25f**, que surgem a 4,27 ppm, formam um sistema ABC com um sinal aparentemente complexo, mas perfeitamente explicado pelo diagrama de acoplamento da Figura 2.3. Os hidrogénios geminais acoplam entre si com 2J de 14,7 Hz e por sua vez cada hidrogénio diastereotópico acopla com o hidrogénio do átomo de azoto do grupo carbamato com 3J de 5,6 Hz, surgindo no espectro dois duplos dupletos parcialmente sobrepostos.

Nos espectros de RMN de ^{13}C das *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas é possível comprovar as funcionalidades principais destes compostos, isto é, a permanência da β -lactama e a formação da função carbamato, pelos sinais dos carbonos dos respectivos grupos carbonilo aproximadamente a 172 ppm e 153 ppm, respectivamente.

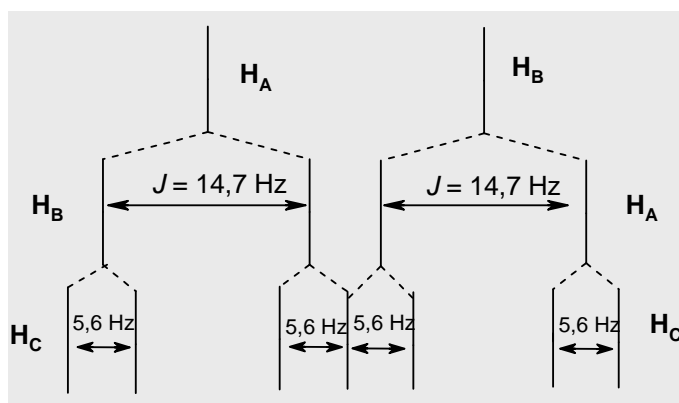
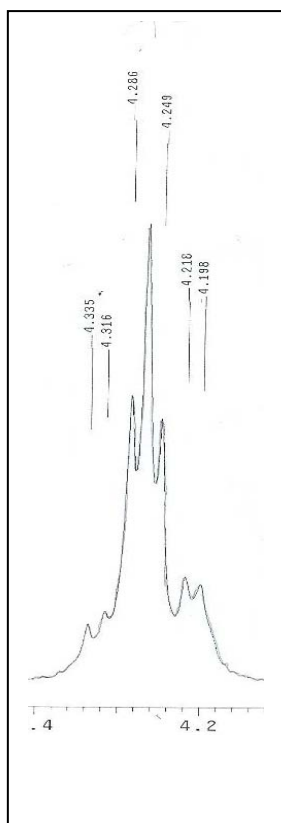


Figura 2.3- Sinal e diagrama de acoplamento dos hidrogénios diastereotópicos do grupo CH_2Ph do derivado **2.25f**.

Espectrometria de Massa

Na espectrometria de massa das *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas sintetizadas, foi realizada a sua ionização por impacto electrónico (MS-EI) ou por *electrospray* (ESI-MS). Os espectros por electroionização apresentam, para além dos sinais de baixa intensidade correspondentes aos iões M^+ , MH^+ ou $[M-CO_2]^+$, vários sinais comuns a m/z 77, 125 e 156 de elevada intensidade.

Na Figura 2.4 representa-se, como exemplo, o esquema de fragmentação do derivado **2.25b** que originou os iões de maior estabilidade correspondentes aos sinais de maior intensidade.

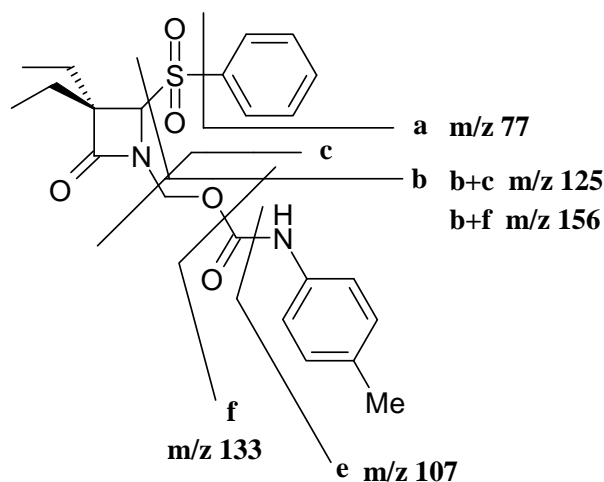


Figura 2.4- Esquema das fragmentações correspondentes aos sinais de maior intensidade presentes no espectro de massa do derivado **2.25b**.

2.3 Determinação da Actividade Catalítica da HLE (K_m)

Um dos factores mais importantes que influenciam a velocidade das reacções enzimáticas é a concentração do substrato. O parâmetro cinético, K_m da HLE foi determinado utilizando várias concentrações de substrato cromogénio, *N*-MeOSuc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-*p*-nitroanilida, de acordo com a Tabela 2.3. Utilizou-se 2×10^{-8} M de HLE para a hidrólise do substrato a 25 °C, em tampão HEPES 0,1M e pH 7,2. A absorvância da *p*-nitroanilina libertada foi acompanhada durante 120 s a um compri-

mento de onda de 410 nm. As velocidades iniciais tabeladas representam a média e respectivos desvios-padrão, de 3 a 5 ensaios efectuados, nestas condições.

Tabela 2.3. Velocidades de hidrólise de várias concentrações de substrato pela HLE.

[S]/mM	$10^3 v \pm SD/ \text{min}^{-1}$
0,02	$19,9 \pm 2,2$
0,1	$47,3 \pm 10,2$
0,3	$77,6 \pm 7,6$
0,6	$81,2 \pm 1,6$
0,8	$92,2 \pm 0,8$
1	$112 \pm 13,5$

A representação gráfica de v em função de $[S]$ forma uma curva típica de cinética de Michaelis-Menten (Figura 2.5), que se pode classificar como uma secção de uma hipérbole rectangular de Equação 2.1, sendo v as velocidades iniciais, V ou V_{max} o valor máximo da velocidade inicial e K_m a constante de Michaelis.¹²¹

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

Com o tratamento matemático¹²² dos valores obtidos, determinou-se um K_m de $0,142 \pm 0,053$ mM ($r^2 = 0,94$) para a HLE, o que está em conformidade com o valor de 0,14 mM publicado por Nakajima e colaboradores.¹²³ O baixo valor de K_m é indicativo da grande eficiência de hidrólise do substrato utilizado pela HLE.¹²¹

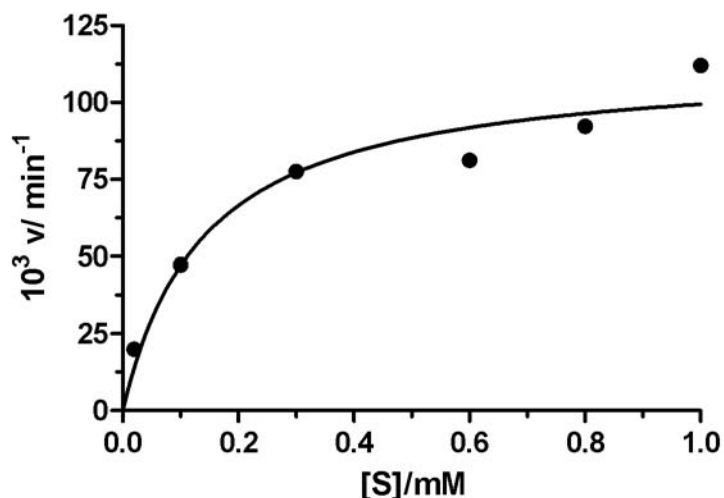


Figura 2.5- Efeito da concentração de *N*-MeOSuc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-*p*NA na velocidade inicial da reacção de hidrólise pela HLE, em HEPES 0,1 M, pH 7,2 a 25°C

2.4 Actividade Inibitória de *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas na Elastase Humana

A actividade inibitória das *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas sintetizadas, **2.25a-e** e **2.25g-i**, em relação à HLE foi determinada, utilizando o método de pré-incubação de Kitz e Wilson.¹²⁴

Neste método, o inibidor em excesso é incubado a 25 °C com a HLE em tampão HEPES, 0,1 M, pH 7,2. A tempos pré-estabelecidos são retiradas alíquotas desta mistura de incubação e são colocadas em soluções de HEPES, 0,1 M, pH 7,2 que contêm o substrato *N*-MeOSuc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-*p*-nitroanilida. Este substrato ao ser degradado pela HLE não inibida, liberta *p*-nitroanilina, cuja variação da absorvância, durante 60 s, é monitorizada a 410 nm. Por este processo, são determinadas as velocidades (v) de degradação do substrato aos vários intervalos de tempo pré-estabelecidos (t). A constante de velocidade de primeira-ordem observada na inibição da enzima, k_{obs} , é obtida pelo declive da recta definida pela Equação 2.2, onde v_0 é a velocidade de degradação do substrato pela HLE quando o inibidor está ausente.

$$\ln(v/v_0) = -k_{\text{obs}}t \quad (2.2)$$

Nas condições do ensaio, se a concentração do inibidor é muito superior à concentração total da enzima, então k_{obs} relaciona-se com a concentração total do inibidor pela Equação 2.3, em que k_{inact} é a constante de velocidade de primeira-ordem da conversão do complexo reversível (E·I) na enzima inibida irreversivelmente (E-I'), e como já foi referido, K_i é a constante de dissociação do complexo E·I (Equação 1.2).

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}}{[I] + K_i} [I] \quad (2.3)$$

A Equação 2.3 pode ainda ser simplificada na Equação 2.4 se o valor de K_i for muito mais elevado que o valor de I ($K_i \gg [I]$)

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}}{K_i} [I] \quad (2.4)$$

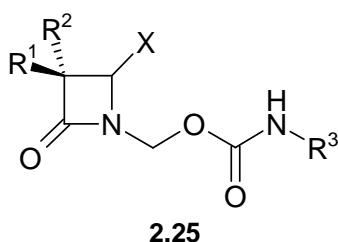
A representação gráfica dos vários valores de k_{obs} obtidos para as várias concentrações do inibidor, origina uma recta que passa pela origem dos eixos cujo declive é igual à constante de velocidade de inactivação de segunda-ordem, k_{inact}/K_i ou $k_{\text{obs}}/[I]$.

Nos ensaios realizados, a potência das *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas é expressa pela constante de inibição de segunda-ordem, $k_{\text{obs}}/[I]$, que foi obtida pela razão entre o k_{obs} e a concentração do inibidor utilizada no ensaio de pré-incubação (em todos os ensaios foi mantida a razão $[I]/[E]=100$).

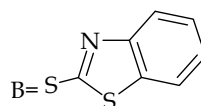
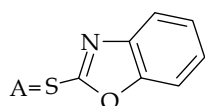
Como se pode observar na Tabela 2.4, os derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidionas sintetizados são fracos inibidores da HLE. Nos compostos em que X é o grupo fenilsulfonilo, a substituição em *para* no anel de benzeno da função carbamato é importante para a actividade inibitória, sendo o melhor substituinte o grupo metoxi,

verificando-se para o composto **2.25c**, uma constante de inibição de segunda-ordem de $100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Tabela 2.4- Actividade inibitória dos compostos **2.25a-e** e **2.25g-i** na HLE em HEPES, pH 7,2 a 25°C .



Comp	R ¹	R ²	X	R ³	$k_{\text{obs}}^{\text{a}}/[\text{I}]/ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
2.25a	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	41,9 ^b
2.25b	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	4-MeC ₆ H ₄	60,9 ^b
2.25c	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	4-MeOC ₆ H ₄	100 ^b
2.25d	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	4-MeCOC ₆ H ₄	85,8
2.25e	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	4-Me ₂ NC ₆ H ₄	71,8
2.25g	Et	Et	A	4-MeOC ₆ H ₄	40,0
2.25h	Et	Et	B	4-MeOC ₆ H ₄	102
2.25i	Pr ⁱ	H	A	4-MeOC ₆ H ₄	104

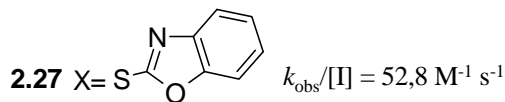
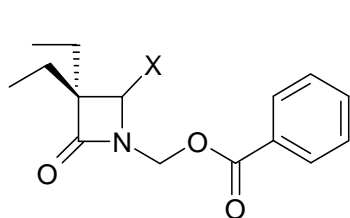


^a representa a média de 2 a 4 ensaios de pré-incubação; ^b valores obtidos da referência 21

A substituição em C-4 do grupo fenilsulfonilo pelo grupo 2-tiobenzoxazol provoca uma diminuição na actividade inibitória (**2.25g** vs **2.25c**), facto que ocorre também com as *N*-(carboniloxi)metil-2-azetidionas, **2.27** e **2.28**. Pelo contrário, o grupo 2-tiobenzotiazol de **2.25h** é equivalente ao grupo fenilsulfonilo na influência da acção inibitória.

Os resultados da inactivação enzimática dependem também da especificidade primária, como é comprovado pelo derivado **2.25i**, cujo grupo isopropilo possivelmente

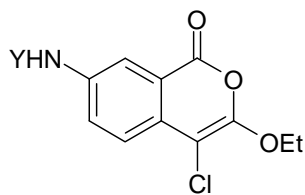
estabeleceu uma melhor interacção com o sub-sítio S₁ que o grupo etilo de **2.25g**, aumentando assim a potência inibitória.



Estudos de modelização molecular, com os derivados *N*-hidroximetil-2-azetidionas colocados no centro activo da HLE, demonstraram que os substituintes em C-4 aumentam as interacções do tipo Van-der-Waals com amino-ácidos do centro activo, e a presença da sulfona permite a formação de ligações de hidrogénio com o NH do resíduo de Val-216. Foi também observado uma enantiosselectividade enzimática para os enantiómeros com a configuração *R*.¹²⁵

A incubação dos inibidores **2.25e, g, h** e **2.25i** com a HLE, provoca uma perda lenta e parcial da actividade enzimática ao longo do tempo. A percentagem de inibição da HLE varia entre os 40 a 60% após sensivelmente 5 h (Figura 2.6). Em todos os derivados testados não se verificou recuperação da actividade enzimática, no meio de incubação, num período de 24 h, o que indicia a irreversibilidade da inibição.

Na linearização gráfica dos resultados $\ln(v/v_0)$ vs t verificou-se que a cinética de inibição tem um comportamento bifásico, que já tinha sido observado na inibição da PPE pelos derivados acil, carbamil, tiocarbamil e guanidino de 7-amino-4-cloro-3-etoxi-isocumarinas **2.29**. Nestes casos, a potência inibitória destes derivados era baseada na inactivação de 60-80% da actividade enzimática, que ocorria nos primeiros 1-2 minutos de incubação. Após este período, a segunda fase de inibição ocorria mais lentamente até atingir a completa inactivação da PPE.¹²⁶



2.29

Y = MeCO; MeHNCO; EtNHCS; H₂NC(=NH₂⁺)

Com os derivados **2.25d-i** a constante de primeira-ordem, k_{obs} , é determinada nos primeiros 15 a 25 minutos de inactivação da HLE, o que corresponde a uma inibição de 14-25% (Figura 2.7). Igualmente, a segunda fase de inibição ocorre mais lentamente mas sem atingir a completa inactivação da enzima após um período de 24 h.

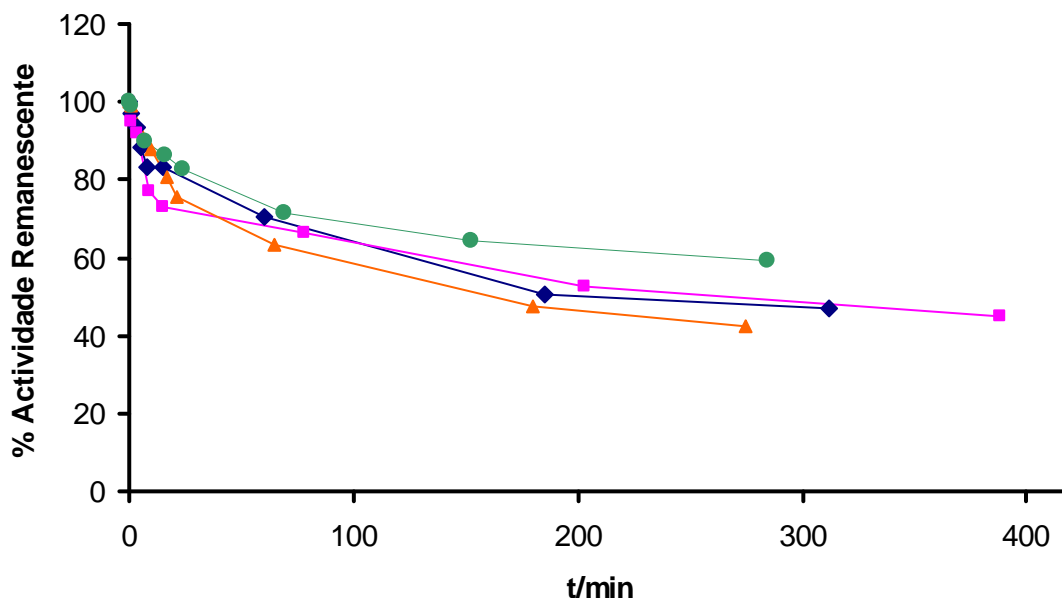


Figura 2.6- Diminuição da actividade enzimática em função do tempo dos compostos **2.25e** (▲), **2.25g** (●), **2.25h** (■) e **2.25i** (◆) em HEPES, pH 7,2 a 25°C, com uma concentração de inibidor na mistura de incubação de $[I] = 100[E]$.

O estudo da estabilidade do composto **2.25c**, em tampão fosfato, pH 7,4 a 37°C, demonstrou que este composto é hidrolisado muito lentamente, com um tempo de semi-vida superior a 208 dias. Por comparação, as correspondentes *N*-(carboniloxi)metil-2-azetidinonas são mais instáveis, apresentando o análogo **2.28**, que difere estruturalmente de **2.25c** somente no grupo abandonante, um tempo de semi-vida de aproximadamente

125 dias.¹²⁵ Segundo estes resultados a menor reactividade e nucleofugacidade do grupo abandonante é fundamental para a estabilidade de **2.25c**.

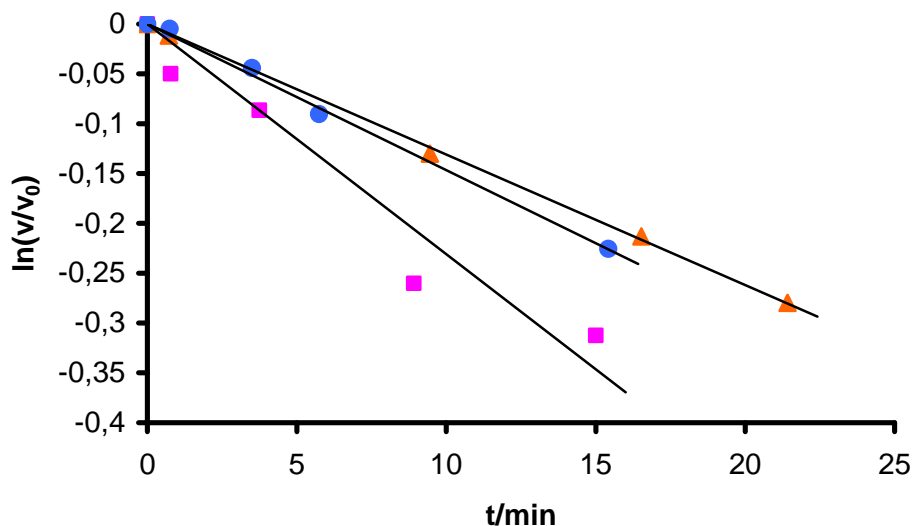


Figura 2.7 – Inativação da HLE pelos derivados **2.25d** (●), **2.25e** (▲) e **2.25h** (■) em HEPES, pH 7,2 a 25°C com uma concentração de inibidor na mistura de incubação de $[I] = 100[E]$.

Em resumo, as *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidinonas são compostos que diminuem a actividade da HLE com uma cinética bifásica, cuja primeira fase atinge 14-25% de inibição e a partir da qual são determinadas as constantes de segunda-ordem que variam entre 40 a 104 $M^{-1} s^{-1}$, sendo os compostos mais eficazes os que têm em C-4 o grupo fenilsulfonilo ou o grupo 2-tiobenzotiazol e o carbamato *p*-metoxifenilo. Para todos os derivados testados, não se verificou recuperação da actividade enzimática, no meio de incubação, durante 24 h.

A grande estabilidade associada a um valor teórico de 3,2 para o $\log P$ ¹²⁷ de **2.25c**, sugerem que as *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidinonas podem ser consideradas bons candidatos para administração intra-venosa ou oral, embora tenham a desvantagem de serem fracos inibidores da HLE.

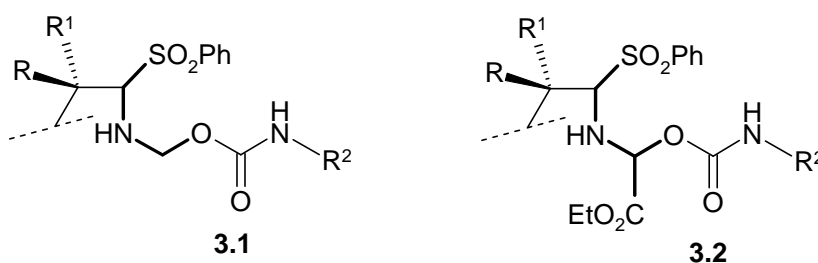
Capítulo 3

Síntese e Actividade Inibitória de Derivados de N-hidroxiálquil-2-azetidionas

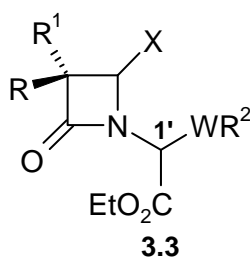
3.1 Introdução

Atendendo aos resultados obtidos no capítulo anterior, em que os derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidionas demonstraram provocar uma inibição fraca mas dependente do tempo na HLE, é necessário agora encontrar as alterações estruturais que possam otimizar essa inibição. Reconhece-se que a reactividade intrínseca do anel β -lactâmico é importante para a inibição e que esta reactividade ao ataque de um nucleófilo, como o átomo de oxigénio do grupo hidroxilo da Ser-195, depende essencialmente da nucleofugacidade do grupo abandonante quando ocorre o colapso do intermédio tetraédrico.

No caso dos derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidionas o grupo abandonante é uma amina secundária **3.1**, com os dois carbonos vicinais ligados a dois grupos com efeito indutivo atrator de electrões, como por exemplo o SO_2Ph e o OCONHR ($\text{p}K_a$ de **3.1** $\cong 2$)¹²⁸. Pode-se aumentar a nucleofugacidade desta amina, isto é, baixar o seu $\text{p}K_a$, se um dos carbonos vicinais se encontrar ligado a mais um grupo com efeito electroattractor como o grupo etoxicarbonilo representado na estrutura **3.2**.



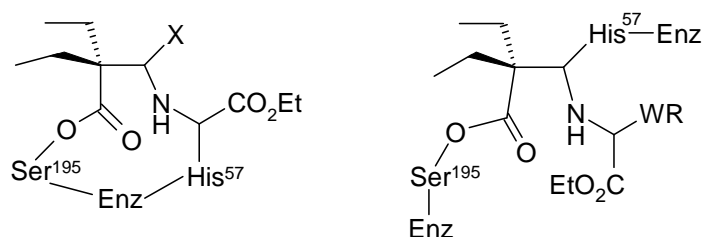
Considerando o que foi exposto, existe grande interesse em sintetizar os potenciais inibidores **3.3**.



W = OCO, OCONH

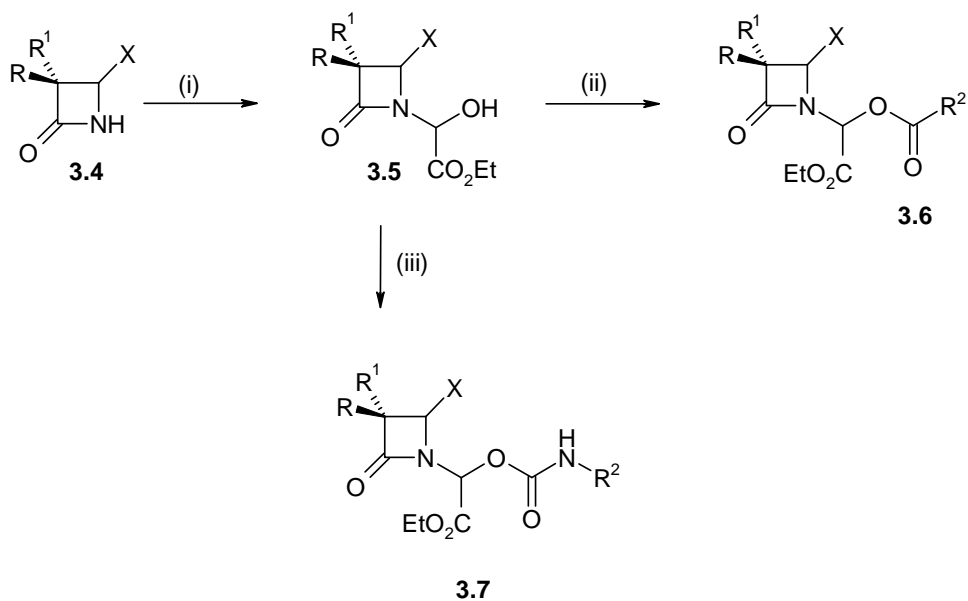
Na estrutura **3.3** são mantidos os dois grupos etilo em C-3, X representa grupos atratores de electrões como os utilizados no capítulo anterior e introduziu-se o grupo fenoxi. Foi também utilizada a azetidiona não substituída em C-4, a 3,3-dietil-2-azetidiona. Os grupos abandonantes ligados a C-1' são representados por ácidos carboxílicos ou ácidos carbâmicos.

O mecanismo de inibição suicida proposto para estes derivados é idêntico ao representado no Esquema 2.1 e espera-se a formação dos seguintes complexos de inactivação enzimática:



3.2 Obtenção de Derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidionas

O processo geral de síntese dos derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidionas (Esquema 3.1) é semelhante ao processo sintético dos derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidionas. O primeiro composto a ser obtido é a *N*-(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil-2-azetidiona **3.5**, através da reacção da β -lactama **3.4**, com o glioxalato de etilo em tolueno, seguindo-se a reacção deste intermédio com o cloreto de ácido ou o isocianato pretendido, em diclorometano com trietilamina, para a formação da *N*-(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidiona **3.6**, ou da *N*-(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidiona **3.7**, respectivamente.

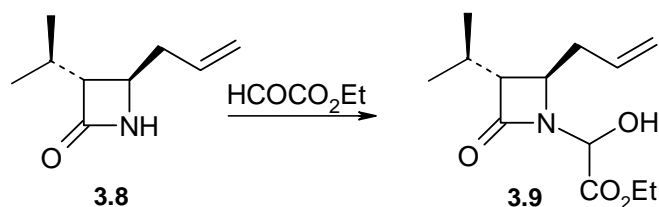


(i) HCOCO_2Et /tolueno; (ii) $\text{R}^2\text{COCl}/\text{NEt}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$; (iii) $\text{R}^2\text{NCO}/\text{NEt}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Esquema 3.1

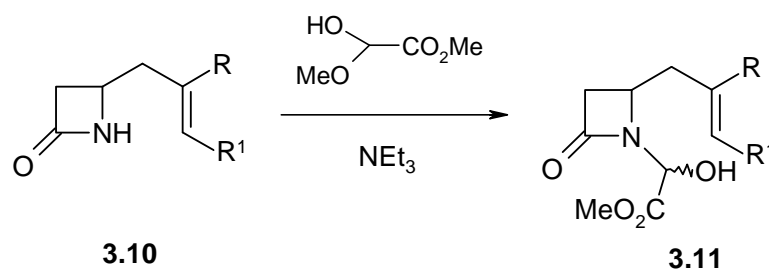
3.2.1 Síntese de *N*-(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil-2-azetidionas

Barret e coloradores referem a síntese da etoxicarbonil-hidroximetilazetidinona **3.9**, com um rendimento de 86%, quando adicionam a azetidinona **3.8**, a 1,5 eq. mol. de glioxalato de etilo (50% em tolueno) em tolueno e refluxam a mistura reaccional durante 19 h. (Esquema 3.2).^{129,130} O mesmo processo é indicado por outros autores para a reacção entre azetidinonas com o mais impedido estereoquimicamente, glioxalato de *terc*-butilo.¹³¹



Esquema 3.2

Em alternativa, Oumach e colaboradores sintetizaram os *N*-hidroxiésteres **3.11**, por reacção das azetidinonas **3.10**, com o 2-hidroxi-2-metoxiacetato de metilo em presença de trietilamina em THF (Esquema 3.3). O método consiste no aquecimento a 60 °C, durante 3 h sob vácuo elevado (0,1 mmHg), do resíduo da mistura reaccional, obtido por evaporação do THF após a mistura reaccional ter inicialmente reagido durante 1 h à temperatura ambiente. Obtiveram uma proporção 1:1 para os dois diastereoisómeros de **3.11**.¹³²



Esquema 3.3

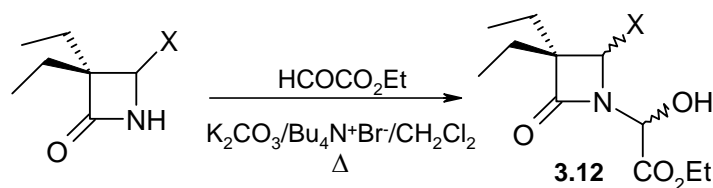
Seguindo a metodologia de Barret procedeu-se à síntese de **3.12b** (Tabela 3.1) colocando-se em refluxo lento durante 8 horas a 3,3-dietil-4-fenilsulfonil-2-azetidinona **2.23e**, com a solução a 50% de glioxalato de etilo em tolueno (3 eq. mol.). Desta reacção resultou uma mistura complexa de produtos, da qual se isolou por cromatografia em coluna 29% do produto pretendido mas ainda impuro.

Ao analisar a síntese das *N*-hidroximetilazetidinonas (c.f. Capítulo 2), constatou-se que a reacção ocorria em meio básico devido à presença do carbonato de potássio, que se dissolvia na solução aquosa de formaldeído. Por analogia com esta reacção, adicionou-se à mistura formada pela solução de glioxalato de etilo e **2.23e** diclorometano como solvente, para o refluxo se efectuar a temperaturas não muito elevadas, carbonato de potássio para aumentar a nucleofilia de **2.23e** e o catalizador de transferência de fase, o brometo de tetrabutilamónio, com a finalidade de solubilizar em meio orgânico o carbonato de potássio. As proporções entre a base e o catalizador foram testadas, chegando-se à conclusão que 0,8 equivalentes da base para 0,4 equivalentes do catalizador era a relação que permitia obter um espectro de ¹H-RMN optimizado da mistura reaccional.

Na realidade, o produto **3.12b** tem um segundo estereocentro em C-1', em relação ao respectivo reagente e como tal existe a possibilidade de se formarem quatro enantiómeros, que agrupados em pares constituem dois diastereoisómeros. O espectro de ¹H-RMN da mistura reaccional é complexo devido à duplicação dos sinais provenientes dos diastereoisómeros, aos quais se juntam os sinais dos produtos secundários. No entanto, os sinais que se evidenciam e que caracterizam a formação de **3.12b** são os dois tripletos a 1,30 ppm e 1,32 ppm dos três hidrogénios do grupo CH₃CH₂O e os dois dupletos do hidrogénio do estereocentro C-1' a 5,17 ppm e 5,49 ppm.

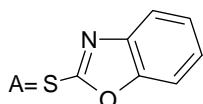
Utilizando este método foram sintetizados os compostos *N*-(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil-2-azetidionas que constam na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Rendimentos e razões diastereoméricas das *N*-(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil-2-azetidionas sintetizadas.



Comp.	X	η(%)	r.d.
3.12a	H	85	–
3.12b	SO ₂ Ph	86	1,5:1 ^a
3.12c	A	92	1,25:1 ^a
3.12d	OPh	74	1,25:1 ^a

^a obtido a partir da análise dos espectros de ¹H-RMN da mistura de diastereoisómeros
r. d. razão diastereomérica



Os novos intermédios, a 3,3-dietil-4-fenoxi-2-azetidionona e a 3,3-dietil-2-azetidionona, foram obtidos a partir da 4-acetoxi-3,3-dietil-2-azetidionona **2.22a**. O primeiro, por

reacção de **2.22a** com o fenol e NaOH em acetona como já foi descrito no capítulo anterior. No segundo, adaptou-se a técnica descrita por Ogilvie e colaboradores, que consiste na redução da 4-acetoxi-2-azetidinona não substituída em C-3 com NaBH₄ em etanol a 0 °C.¹³³ A 3,3-dietil-2-azetidinona formou-se, nestas condições, a partir de **2.22a** com um rendimento de 30 %.

Os rendimentos obtidos na síntese de **3.12a-d** são elevados, mas não resultam de uma operação de purificação. Após evaporação dos solventes, os compostos iónicos (base e catalizador) são retirados da mistura reaccional e o resíduo resultante é utilizado na síntese dos compostos finais.

Embora não se tenha procedido à separação do par de diastereoisómeros formados em cada reacção, a análise dos espectros de ¹H-RMN da mistura reaccional permitiu determinar a sua proporcionalidade. Para esta determinação consideraram-se os dois singletos dos prótons de C-4 e os dois dupletos de C-1' de ambos os diastereoisómeros. A razão entre as integrações dos sinais referidos, corresponde à proporcionalidade dos diastereoisómeros isolados. Todos os compostos encontram-se completamente caracterizados no Capítulo 5.

3.2.2 Síntese de *N*-(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinonas

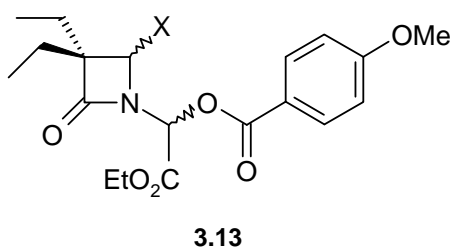
Os ésteres **3.13a-c** (Tabela 3.2) foram obtidos na reacção dos intermédios **3.12a-c** com o cloreto de *p*-metoxibenzoílo, em diclorometano anidro, à temperatura ambiente, utilizando como catalizador a trietilamina.

A escolha deste cloreto para todos os ésteres sintetizados prende-se com os resultados obtidos com os derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidinonas. De facto, dos compostos sintetizados, o derivado **2.25c**, que apresenta na sua estrutura o carbamato *p*-metoxifenilo, é um dos mais potentes na inactivação da HLE.

Os rendimentos dos produtos oscilaram entre os 24 e 65%, sendo a formação de vários produtos secundários a principal razão para a dificuldade encontrada no isolamento dos produtos pretendidos, por cromatografia em coluna, e para o baixo rendimento de **3.13a** e **3.13b**.

Tal como os intermédios **3.12**, os derivados, **3.13b** e **3.13c** têm dois estereocentros em C-4 e C-1', formando-se assim dois diastereoisómeros. Na síntese de **3.13b** só foi possível isolar um dos diastereoisómeros, estando o outro diastereoisómero na mistura reaccional certamente em quantidades vestigiais. No caso do derivado **3.13c**, os dois diastereoisómeros co-eluíram na cromatografia em coluna, e posteriores tentativas de isolamento não foram eficazes. A análise da proporcionalidade dos dois diastereoisómeros formados foi efectuada, tal como nos anteriores compostos, a partir das integrações dos dois pares de singletos correspondentes aos protões em C-4 e OCH₃, referentes a cada um dos diastereoisómeros, presentes no espectro de ¹H-RMN. Em cada par de sinais a razão entre as integrações foi de aproximadamente 1:1.

Tabela 3.2- *N*-(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas sintetizadas.

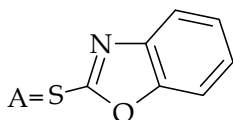


Comp	X	η(%)	r.d.
3.13a	H	27	–
3.13b	SO ₂ Ph	24	1:0 ^a
3.13c	A	65	1:1 ^b

^a obtida a partir dos rendimentos relativos dos diastereoisómeros isolados

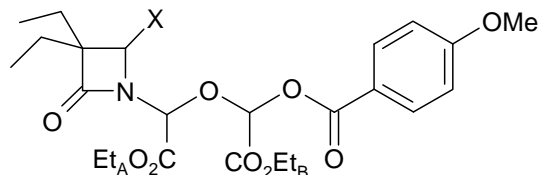
^b obtida a partir da análise do espectro de ¹H-RMN da mistura dos dois diastereoisómeros

r.d. razão diastereomérica



Isolaram-se e identificaram-se por RMN e espectrometria de massa os produtos secundários **3.14a** e **3.14b** provenientes das reacções de formação de **3.13a** e **3.13b**. É possível explicar a sua formação se considerarmos que os intermédios **3.12a** e **3.12b**,

por não se encontrarem puros, possam conter em pequena quantidade os compostos hidroxilo com dois grupos etoxicarbonilo.



3.14a X= H (2%)

3.14b X= SO₂Ph (3%)

3.2.3 Identificação Espectroscópica de *N*-(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas

Todos os compostos representados na Tabela 3.2 originaram espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, ESI-MS e análises elementares consistentes com a estrutura proposta. Alguns desses dados encontram-se descritos no Capítulo 5.

Espectroscopia de Infravermelho

Nos espectros de I.V. as bandas de alongamento das ligações carbonilo, dos principais grupos funcionais das *N*-(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas sintetizadas, ou seja dos grupos NCO, OCOAr e COOEt, ocorrem a frequências muito próximas, verificando-se sobreposições de bandas. A banda a 1757 cm⁻¹, no caso de **3.13a** e as bandas a cerca de 1790 cm⁻¹, no caso de **3.13b** e **3.13c** são provenientes da forte ligação carbonilo da β-lactama. Nos 3 compostos, os grupos carbonilo dos ésteres aromáticos manifestam-se com bandas a 1720-1724 cm⁻¹. No espectro de **3.13c**, encontra-se perfeitamente visível, a banda do carbonilo do éster CO₂Et a 1756 cm⁻¹.

Ressonância Magnética Nuclear

As Tabelas 3.3 e 3.4 compilam os principais dados espectroscópicos de ¹H e ¹³C que caracterizam e identificam os derivados **3.13a-c**.

Conjuntamente com os hidrogénios diastereotópicos dos grupos CH_2CH_3 em C-3, já referidos no Capítulo 1, temos nestes compostos os hidrogénios diastereotópicos do grupo $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, que nos espectros de ^1H -RMN apresentam um único sinal. Estes hidrogénios, magneticamente diferentes, acoplam entre si e cada um acopla com os três hidrogénios vicinais. O sinal formado, considerando a sua multiplicidade, pode ser classificado como dois duplos quadripletos sobrepostos ($2 \times dq$ sobr). Nos derivados **3.13a-c**, os sinais dos referidos hidrogénios diferem nos três compostos, no entanto, mantêm as constantes de acoplamento vicinais, 3J , de 7,2 Hz e as constantes de acoplamento geminais, 2J , de 10,6-10,8 Hz.

Os diferentes padrões de acoplamento observados para os três sinais, são provocados pelos diferentes ambientes magnéticos, que afectam os dois hidrogénios diastereotópicos, em cada um dos compostos, que por consequência vão provocar distintos sinais iniciais não acoplados que podem ter deslocamentos químicos próximos ou afastados. Assim, o $\Delta\delta$ entre os dois sinais não acoplados dos hidrogénios diastereotópicos de **3.13a** é de 0,048 ppm. Esta diferença obriga a uma sobreposição dos quatro quadripletos formando um sinal com 12 picos. Contrariamente a estes, os dois hidrogénios diastereotópicos de **3.13b** têm um $\Delta\delta$ de 0,088 ppm o que permite uma maior expansão do sinal, evitando a sobreposição de picos, resultando um sinal de 16 picos (Figuras 3.1 e 3.2).

Para além dos hidrogénios mencionados, acrescenta-se ao derivado **3.13a** os hidrogénios diastereotópicos em C-4, que se manifestam no espectro de ^1H -RMN por um duplo duplete com uma constante de acoplamento geminal, 2J , de 6 Hz.

É interessante verificar que nos espectros de ^1H -RMN dos produtos secundários **3.14a** e **3.14b**, os dois hidrogénios diastereotópicos do grupo CO_2Et_A seguem o padrão de acoplamento comum aos compostos **3.13** ($2 \times dq$ sobr, $^3J=7,2$; $^2J=10,6$ Hz), enquanto que no grupo CO_2Et_B , o sinal daqueles hidrogénios simplifica-se num quadripleto ($^3J=7,2$ Hz).

Tabela 3.3- Desvios químicos (δ /ppm) e constantes de acoplamento (J /Hz) de ^1H -RMN das N -(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas.

Comp	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CHX	NCHO	OCH_2	OCH_2CH_3	OCH_3	$\text{S(O)}_n\text{ArH}$ $n=0,2$ AA'XX' ($n=2$)	O=CArH AA'XX'
3.13a	0,97 3H, <i>t</i> , $J=7,5$ 1,00 3H, <i>t</i> , $J=7,5$	1,65-1,78 4H, <i>m</i>	3,32 1H, <i>d</i> , $J=5,9$ 3,34 1H, <i>d</i> , $J=6,0$	6,48 1H, <i>s</i>	4,30 2H, $2\times dq$ sobr, $J=7,2; 10,8$	1,31 3H, <i>t</i> , $J=7,2$	3,87 3H, <i>s</i>	6,94 2H, <i>d</i> , $J=9,0$ ArH <i>m</i> 8,01 2H, <i>d</i> , $J=9,0$ ArH <i>o</i>	
3.13b	0,91 3H, <i>t</i> , $J=7,4$ 1,07 3H, <i>t</i> , $J=7,4$	1,72 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3;14,8$ 1,84-1,99 2H, <i>m</i> 2,43 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,5; 14,9$	4,88 1H, <i>s</i>	6,42 1H, <i>s</i>	4,12 2H, $2\times dq$ sobr, $J=7,2; 10,8$	1,24 3H, <i>t</i> , $J=7,2$	3,88 3H, <i>s</i>	7,55 2H, <i>t</i> , $J=7,4$ ArH <i>m</i> 7,68 1H, <i>t</i> , $J=7,4$ ArH <i>p</i> 8,00 2H, <i>d</i> , $J=7,4$ ArH <i>o</i>	
3.13c	0,85 e 0,86 3H, $2\times t$, $J=7,5$ 1,04 e 1,31 3H, $2\times t$, $J=7,2$	1,51 e 1,75 2H, $2\times dq$ sobr $J=7,3$ e $7,5; 14,8$ e $14,9$ 1,94-2,14 2H, <i>m</i>	6,55 e 6,60^a 1H, $2\times s$	6,39 e 6,53^a 1H, $2\times s$	3,65 e 3,83 1H, $2\times dq$ sobr $J=7,15; 10,6$ e $10,8$ 4,32 1H, $2\times dq$ sobr, $J=7,15; 10,7$	1,18 e 1,19 3H, $2\times t$, $J=7,4$	3,80 e 3,85 3H, $2\times s$	6,67-7,92 8H, <i>m</i>	

^a incerteza na atribuição

Tabela 3.4- Desvios químicos (δ /ppm) de ^{13}C -RMN das *N*-(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinonas sintetizadas.

Comp.	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CEt_2	O=CN	CHX	NCHO	OCOAr	CO_2Et	OCH_2	OCH_2CH_3	OCH_3	$\text{S(O)}_n\text{Car}$ $n=0,2$	O=CCar
3.13a	8,66 8,70	25,31	60,67	172,72	47,98	72,16	163,95	165,07	62,40	14,05	55,47		113,77; 120,99(C _q) 132,10; 164,87(C _q)
3.13b	8,41 8,83	20,45 24,51	67,73	170,85	77,26	71,10	164,05	a	62,85	13,90	55,48	129,03; 129,36 134,45; 138,45	113,86; 120,85 132,33; 164,44
3.13c	8,18 8,95	20,57 20,81 24,39 24,58	67,02 67,11	172,22 172,59	72,88 ^b 73,54 ^b	72,20 ^b 73,34 ^b	163,85	a	62,67 63,39	13,71 14,24	55,64	110,48; 110,67; 112,43; 112,84 113,67; 114,02; 120,00; 120,37 124,39; 124,58; 124,97; 125,04 130,74; 132,01; 132,29 146,90; 164,34; 180,43	

a ausência ou sobreposição do respectivo sinal no espectro

b incerteza na atribuição

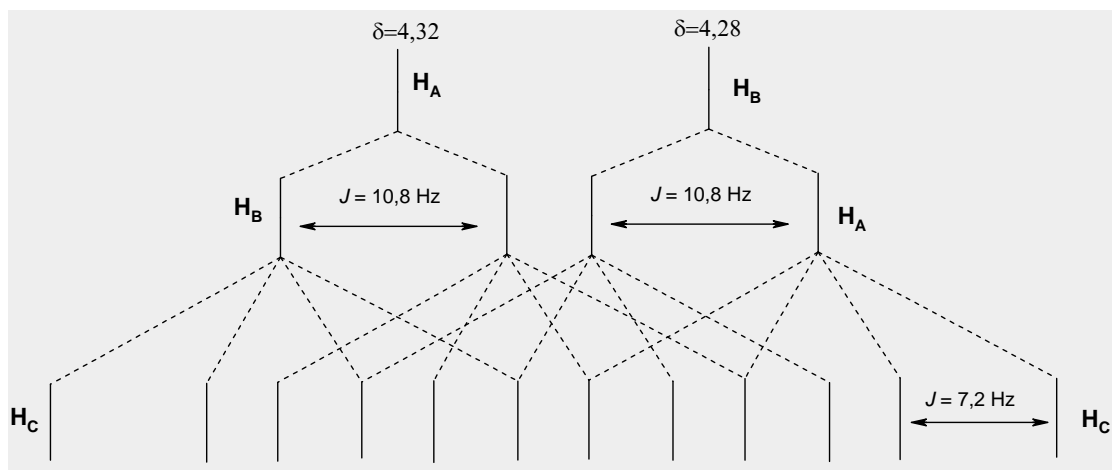
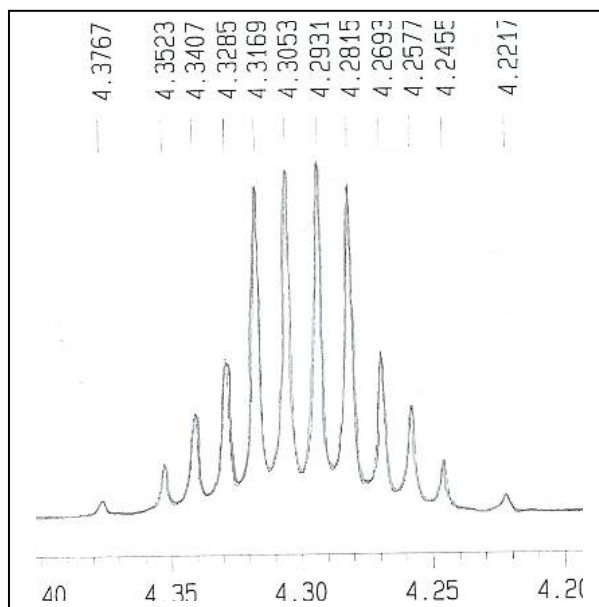


Figura 3.1- Sinal e diagrama de acoplamento dos hidrogénios diastereotópicos do grupo OCH_2CH_3 do derivado **3.13a**.

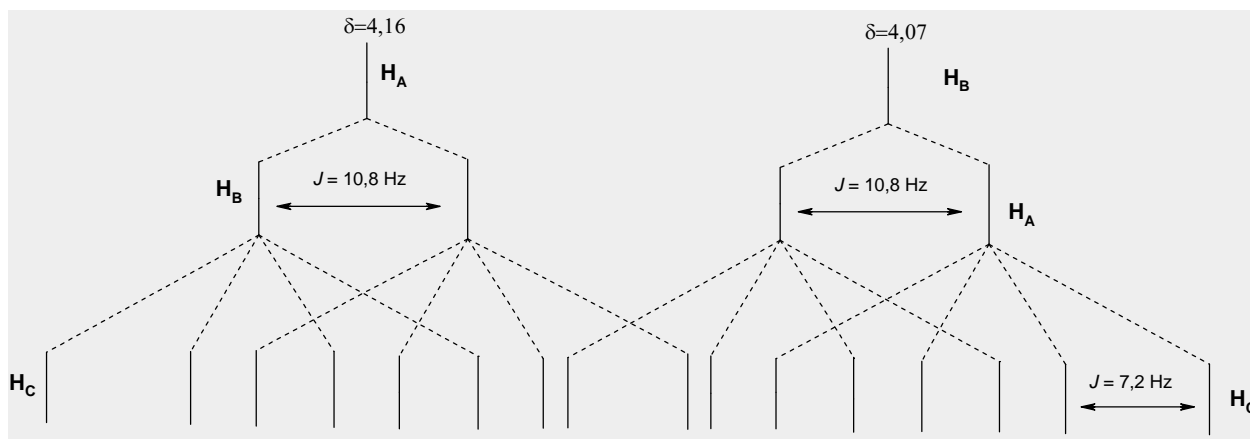
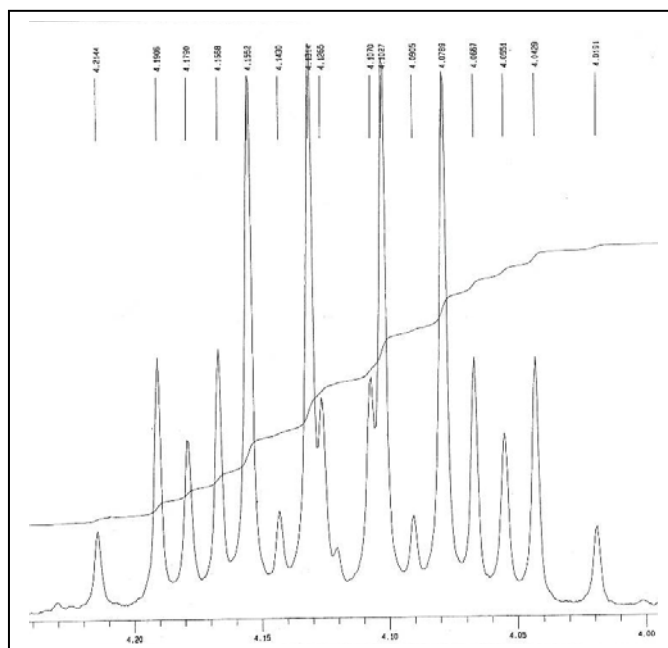
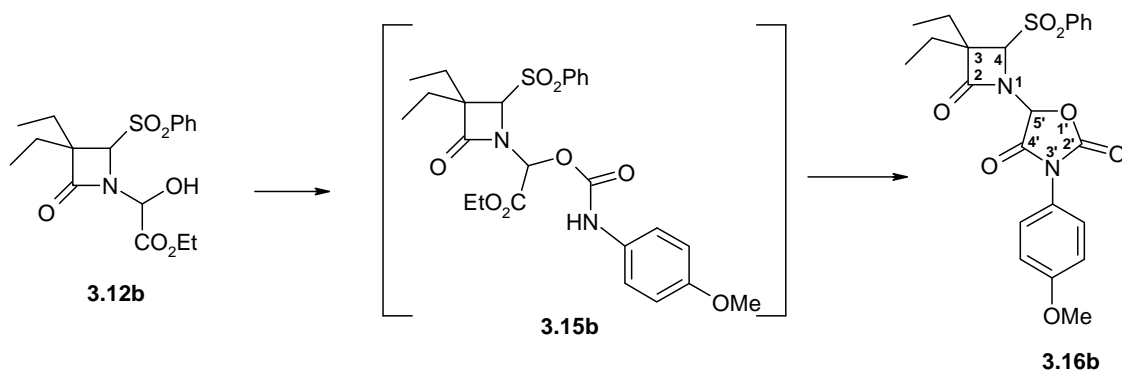


Figura 3.2- Sinal e diagrama de acoplamento dos hidrogénios diastereotópicos do grupo OCH_2CH_3 do derivado **3.13b**.

3.2.4 Síntese de *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas e de *N*-(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas

Com o objectivo de sintetizar as *N*-(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas (ver **3.3**, W=OCONH), testou-se o intermédio **3.12b** (Esquema 3.4). Ao **3.12b** em diclorometano, previamente seco, adicionou-se o isocianato de *p*-metoxifenilo (1,1 eq. mol.) e trietilamina (1 eq. mol.), prosseguindo a reacção à temperatura ambiente. O seguimento do desaparecimento de **3.12b** por ccd possibilitou identificar o fim da reacção. Evaporou-se a trietilamina e a purificação do resíduo resultante foi realizado por cromatografia em coluna. Foram recolhidos todos os produtos formados e identificados por $^1\text{H-RMN}$. Surpreendentemente nenhum dos produtos era o derivado aminocarboniloxi pretendido, o que facilmente se reconhecia pela ausência do grupo etoxicarbonilo nos espectros de $^1\text{H-RMN}$. Uma análise dos dados de espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ e espectrometria de massa indicavam que o composto maioritário formado tinha a estrutura **3.16b**, que poderia resultar de uma ciclização intramolecular do derivado carbamato acíclico **3.15b**. (Esquema 3.4).



Esquema 3.4

Sabendo que estes derivados também têm dois estereocentros, em C-4 e C-5' (Esquema 3.4), o composto **3.16b** seria o diastereoisómero maioritário, **3.16bM**, enquanto que o diastereoisómero minoritário **3.16bm**, eluiu noutra fracção, facilmente identificável pela similaridade dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ dos dois produtos isolados.

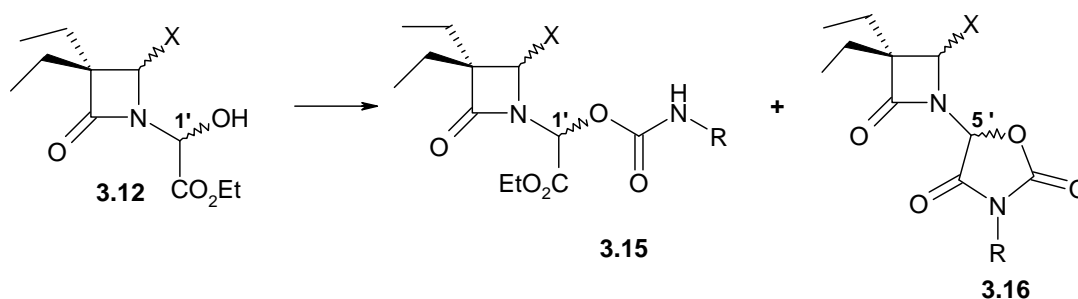
Nas mesmas condições reaccionais, fizeram-se várias experiências, utilizando as *N*-(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil-2-azetidinona sintetizados **3.12a-d**, que reagiram com vários isocianatos. Os produtos formados, os rendimentos assim como as razões diastereoméricas estão compilados na Tabela 3.5.

A reacção do *N*-(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metilo da azetidinona não substituída em C-4 **3.12a**, com o isocianato de benzilo deu origem à *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidinona **3.16a**, com 33% de rendimento. Nenhum dos produtos formados e isolados foi identificado como o derivado acíclico correspondente **3.15a**. A adição do mesmo isocianato ao *N*-(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metilo da azetidinona substituída em C-4 com o grupo fenilsulfonilo **3.12b**, resultou na formação dos dois diastereoisómeros da *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidinona **3.16c**, isoláveis por cromatografia em coluna, na proporção de 2:1. A mesma proporção tinha sido obtida entre os dois diastereoisómeros isolados do derivado **3.16b**, quando **3.12b** reagiu com o isocianato de *p*-metoxifenilo. Conclui-se com estes resultados que o tamanho dos substituintes em C-4 (**3.16a** vs **3.16c**) ou o aumento do pK_a do grupo amino do carbamato (**3.16b** vs **3.16c**) não afectam a ciclização intramolecular na formação das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidinonas.

Isolou-se, com um rendimento razoável, a mistura dos dois diastereoisómeros da oxazolidine-2,4-diona **3.16e**, que co-eluíram na cromatografia em coluna. A dificuldade na separação dos diastereoisómeros é comum para os derivados das azetidinonas com o grupo 2-tiobenzoxazol em C-4. A proporcionalidade de 2,3:1 entre os dois diastereoisómeros, foi estabelecida pela análise dos dois pares de singuletos, correspondentes aos prótons em C-4 e $ArCH_3$.

Todavia, existe um factor que afecta a formação das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidinonas: o impedimento estereoquímico no isocianato. Quando o 2-isocianobenzoato de metilo e o derivado **3.12b** reagem, o produto formado na reacção, contrariamente às anteriores, é o carbamato acíclico **3.15d**. Este resultado justifica-se pela dificuldade do ataque do azoto da amina do carbamato ao carbono carbonílico do grupo etoxicarbonilo quando aquele azoto se encontra na vizinhança de um grupo volumoso como o 2-metoxicarbonilo presente no anel aromático do isocianato.

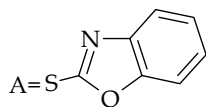
Tabela 3.5 - Rendimentos e razões diastereoméricas de *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas e de *N*-(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil) metil-2-azetidionas sintetizadas.



r.d.	η (%)	← Comp	X	R	Comp →	η (%)	r.d.
--	33	3.16a	H	C ₆ H ₅ CH ₂	3.15a	0	--
2:1	50	3.16b	SO ₂ C ₆ H ₅	4-MeOC ₆ H ₄	3.15b	0	--
2:1	40	3.16c	SO ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	3.15c	0	--
--	0	3.16d	SO ₂ C ₆ H ₅	2-MeO ₂ CC ₆ H ₄	3.15d	19	1,2:1
2,3:1 ^a	63	3.16e	A	4-MeC ₆ H ₄	3.15e	0	--
1,5:1	43	3.16f	OC ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	3.15f	17	n.d.

^aobtida a partir da análise do espectro de ¹H-RMN da mistura dos dois diastereoisómeros. As restantes proporcionalidades foram obtidas a partir dos rendimentos relativos dos diastereoisómeros.

r.d. razão diastereomérica; n.d. não determinado



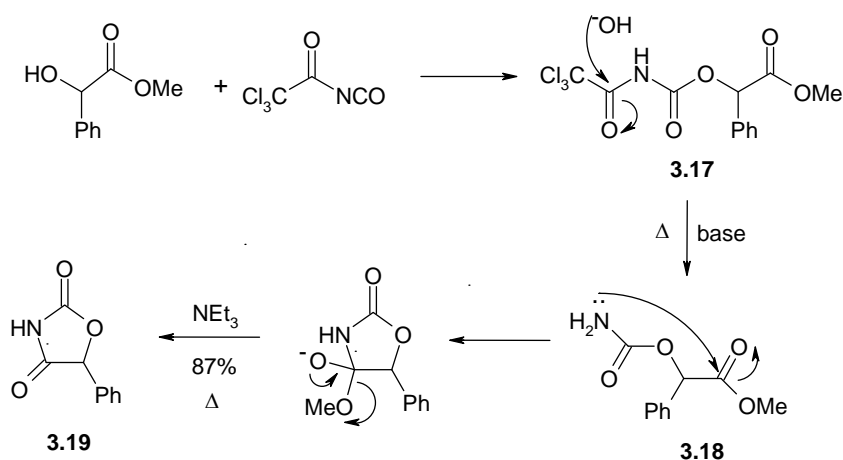
Surpreendentemente, a reacção entre o intermédio **3.12d**, em que a azetidionona apresenta um grupo fenoxi em C-4, e o isocianato de benzilo, originou uma mistura de produtos, a *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionona **3.16f**, e o correspondente composto carbamato acíclico **3.15f**. Verificou-se que no espectro de ¹H-RMN da mistura reaccional, a integração dos picos referentes aos hidrogénios em C-4, dos dois diastereoisómeros de **3.16f**, apresentavam uma proporcionalidade de 1,3:1, enquanto a integração dos picos referentes aos hidrogénios em C-1', dos dois diastereoisómeros de

3.15f, apresentavam uma proporcionalidade de 1:0,3. Após o isolamento dos compostos por cromatografia em coluna, as proporcionalidades alteraram-se ligeiramente para 1,5:1, no caso de **3.16f**, enquanto que no caso de **3.15f**, o diastereoisómero maioritário **3.15fM** foi isolado com 17 % de rendimento e o isolamento do minoritário **3.15fm** foi em quantidade muito reduzida, possibilitando unicamente a sua identificação por ^1H -RMN. A complexidade da mistura reaccional obtida nesta reacção dificultou o isolamento dos produtos pretendidos influenciando assim as suas proporcionalidades.

3.2.4.1 Ciclização de Oxazolidine-2,4-dionas em Presença de Trietilamina

São vários os processos químicos referidos na literatura que descrevem a síntese de oxazolidine-2,4-dionas, no entanto, o método que mais se aproxima do executado na síntese das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas é o que envolve a reacção entre α -hidroxiésteres e aril ou alquil isocianatos. Por exemplo, a 3,5,5-trimetiloxazolidine-2,4-diona foi obtida por tratamento do éster α -hidroxi-isobutirato de etilo com isocianato de metilo, resultando desta reacção o intermediário acíclico com a função éster e carbamato, cuja ciclização se processou por aquecimento sem a intervenção de catalizadores.¹³⁴

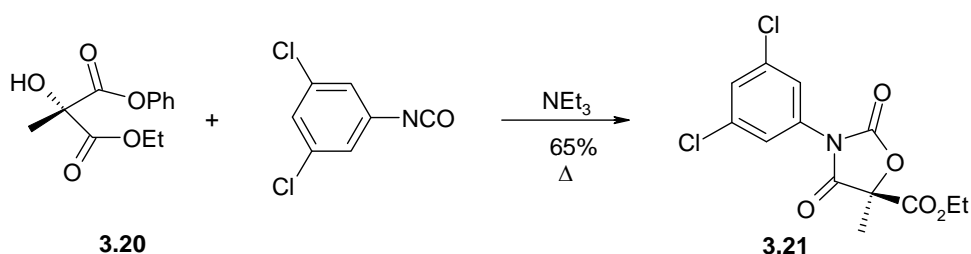
Recentemente, foi publicado um método inovador da síntese de oxazolidine-2,4-dionas não substituídas em N-3, que possibilitou uma análise mecanística (Esquema 3.5) comprovando que o fecho do anel do carbamato acíclico é facilitado por aquecimento térmico em presença de uma base como por exemplo a trietilamina.



Esquema 3.5

O progresso da reacção, foi monitorizado por LC-MS, que esclareceu que a formação do tricloroacetilcarbamato **3.17** ocorre rapidamente em diclorometano ou THF. No passo seguinte, a existência do carbamato primário **3.18** foi observada quando a mistura reaccional foi aquecida em etanol. Todavia, o produto final **3.19** só foi conseguido quando o aquecimento se realizava em presença de uma base, especificamente a trietilamina.¹³⁵

Guanti e colaboradores sintetizaram o clozolinato **3.21**, uma *N*-ariloxazolidine-2,4-diona com acção anti-fúngica, a partir do α -hidroxiéster **3.20**, isocianato de 3,5-diclorofenilo (1,4 eq. mol.) e trietilamina em hexano seco (Esquema 3.6).¹³⁶

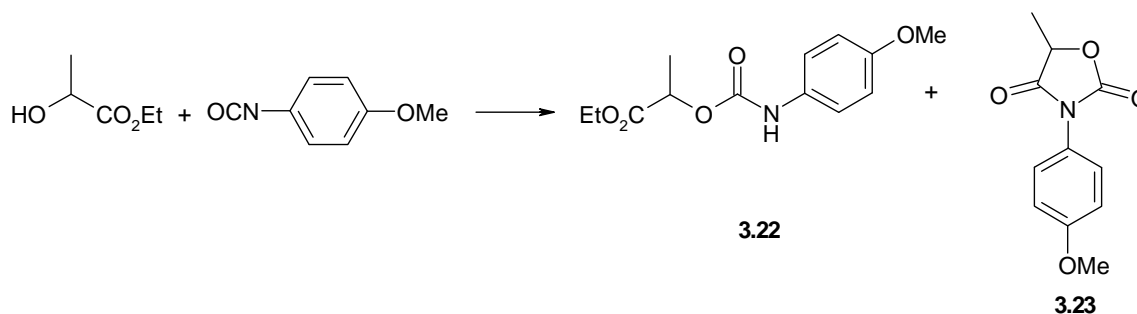


Esquema 3.6

A formação do produto só ocorreu após o refluxo da mistura reaccional, durante uma noite. Na ciclização do clozolinato, a utilização de refluxo é plausível devido ao maior impedimento estereoquímico ao ataque do azoto ao carbono carbonílico, na reacção intra-molecular, porque o carbono adjacente tem dois substituintes (CO_2Ph e CO_2Et), o que não se verifica nas sínteses das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas, **3.16**. Em compensação, o grupo fenoxi presente em **3.20**, é um melhor grupo abandonante que o grupo etoxi, dos intermédios **3.16a-f**.

O que estas três sínteses documentam é a importância do aquecimento do meio reaccional, preferencialmente em presença de um catalizador, para que ocorra a reacção de ciclização intramolecular do intermédio formado à temperatura ambiente. Como tal, no caso das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas surpreende o facto da ciclização ocorrer facilmente e rapidamente à temperatura ambiente.

Na tentativa de esclarecer qual a influência do anel β -lactâmico no processo de ciclização intramolecular, testou-se a reacção entre o α -hidroximetilacetato de etilo e o isocianato de *p*-metoxifenilo, nas mesmas condições de síntese dos derivados **3.16**. O grupo metilo substitui nesta reacção a β -lactama, enquanto o isocianato foi o utilizado na síntese de **3.16b**. O resultado confirma a dificuldade da ciclização à temperatura ambiente, em presença de trietilamina, obtendo-se 42% do composto acíclico **3.22** e só 4% da correspondente oxazolidine-2,4-diona **3.23** (Esquema 3.7).



Esquema 3.7

Este resultado sugere que a relativa facilidade de ciclização intramolecular observada à temperatura ambiente, nos derivados **3.16**, se deve à influência da β -lactama.

3.2.5 Identificação Espectroscópica de *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas

Todas as *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas representadas na Tabela 3.5 originaram espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ESI-MS e análises elementares consistentes com a estrutura proposta. Alguns desses dados encontram-se descritos no Capítulo 5.

Espectroscopia de Infravermelho

Os grupos carbonilo das principais funções das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas estão representados, nos vários espectros de I. V., por três bandas muito próximas de diferentes intensidades. A banda de menor intensidade, situada a 1824-

1830 cm^{-1} é proveniente do alongamento da função carbonilo do grupo OCON, a banda de intensidade intermédia a 1780-1790 cm^{-1} corresponde à absorção do carbonilo da β -lactama, por fim a banda mais intensa, a 1751-1758 cm^{-1} resulta do alongamento do carbonilo do grupo CCON.¹³⁴

Ressonância Magnética Nuclear

As Tabelas 3.6 e 3.7 reúnem os dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C que caracterizam os derivados **3.16** sintetizados.

Em termos gerais, os espectros de ^1H -RMN dos diastereoisómeros maioritários (**3.16b,c,e,fM**) pouco diferem em relação aos diastereoisómeros minoritários (**3.16b,c,e,f m**), como se exemplifica com a Figura 3.3, correspondente aos espectros de **3.16bM** e **3.16bm**, respectivamente.

Nestes dois espectros, para além da total separação ou alguma sobreposição dos sinais correspondentes aos hidrogénios CH_2CH_3 , a divergência mais evidente é o deslocamento do sinal do protão do estereocentro C-5', presente a 6,20 ppm no espectro de **3.16bM** e a 5,58 ppm no espectro de **3.16bm** ($\Delta\delta = 0,62$). Contudo, esta diferença é menor se compararmos o mesmo sinal nos espectros dos diastereoisómeros **3.16cM** e **3.16cm** ($\Delta\delta = 0,43$) e inexistente nos espectros dos diastereoisómeros **3.16fM** e **3.16fm**.

Como é evidenciado pela Tabela 3.6, com excepção do espectro de **3.16fM** cujo sinal dos hidrogénios diastereotópicos, NCH_2Ph , sofreu uma isocronia acidental¹²⁰ e se manifesta espectroscopicamente por um singuleto a 4,43 ppm, nos restantes espectros os respectivos hidrogénios estão perfeitamente definidos por um sistema AB ($\Delta\nu/J \cong 1,2-1,7$) com uma constante acoplamento geminal de 14,5 Hz ou de 15,4 Hz.

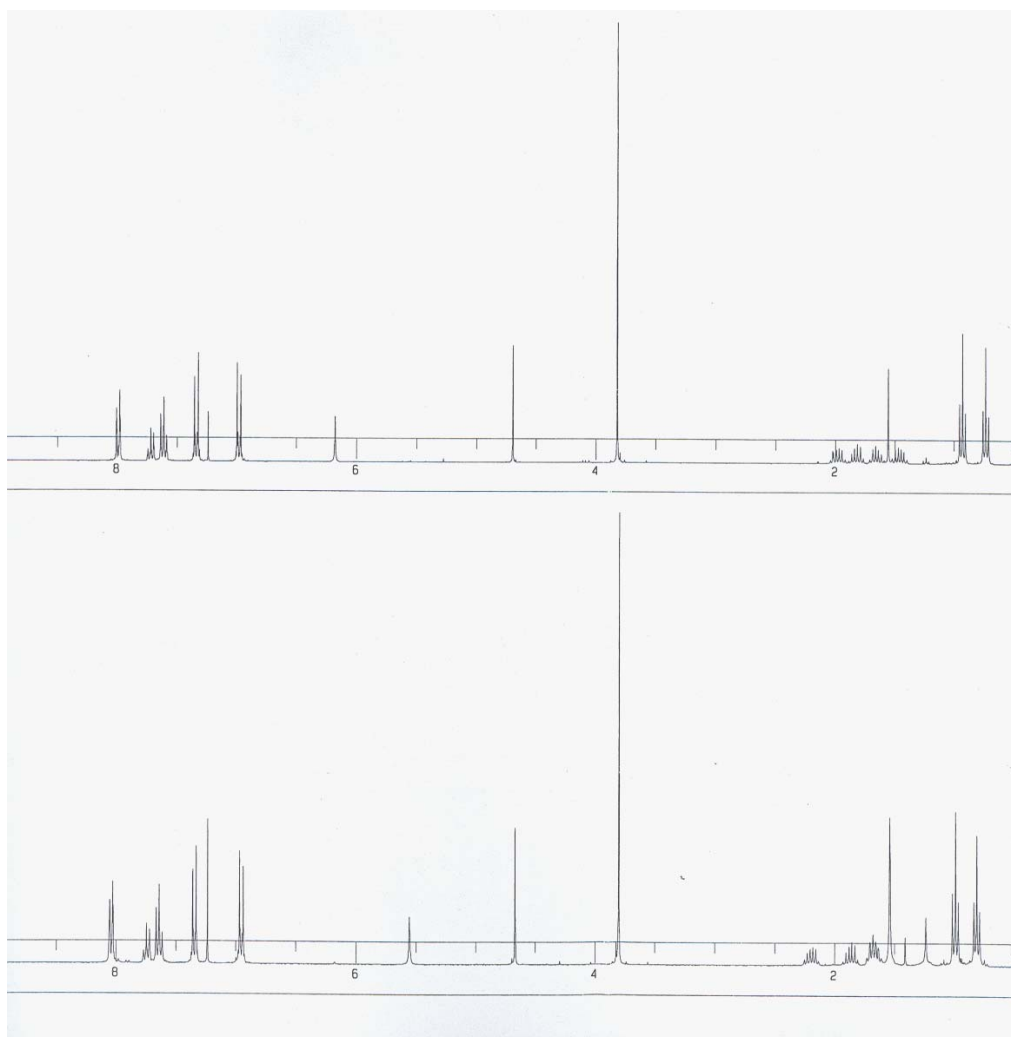


Figura 3.3- Espectros de ¹H-RMN dos derivados **3.16bM** e **3.16bm**.

Tabela 3.6 – Desvios químicos (δ /ppm) e constantes de acoplamento (J /Hz) de ^1H -RMN de N -(oxazolidine-2,4-diona)- 2-azetidionas.

Comp.	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CHX	NCHO	XArH $\text{X}=\text{O}, \text{S}, \text{SO}_2$ $\text{AA}'\text{XX}'\text{M}(\text{O}, \text{SO}_2)$	$\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{ArH}$ $n=0, 1$ $\text{AA}'\text{XX}' (n=0)$	Outros			
3.16a	0,95 3H, <i>t</i> , $J=7,4$	1,61-1,76 4H, <i>m</i>	3,05 1H, <i>d</i> , $J=5,1$	6,02 1H, <i>s</i>		7,29-7,40 5H, <i>m</i>	4,67 1H, <i>d</i> , $J=14,5$			
	0,96 3H, <i>t</i> , $J=7,4$							3,07 1H, <i>d</i> , $J=5,1$	4,73 1H, <i>d</i> , $J=14,5$ CH_2Ph	
3.16bM	0,76 3H, <i>t</i> , $J=7,4$	1,49 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3; 15$	4,71 1H, <i>s</i>	6,20 1H, <i>s</i>	7,63 2H, <i>t</i> , $J=7,4$; <i>ArHm</i>	7,00 2H, <i>d</i> , $J=9,1$; <i>ArHm</i>	3,84 3H, <i>s</i> CH_3O			
	0,97 3H, <i>t</i> , $J=7,5$							1,68 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3; 14,8$	7,74 1H, <i>t</i> , $J=7,4$; <i>ArHp</i>	7,37 2H, <i>d</i> , $J=9,1$; <i>ArHo</i>
								1,85 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3; 14,8$	8,02 2H, <i>d</i> , $J=7,4$; <i>ArHo</i>	
								2,00 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3; 14,8$		
3.16bm	0,82 3H, <i>t</i> , $J=7,4$	1,63-1,75 2H, <i>m</i>	4,69 1H, <i>s</i>	5,58 1H, <i>s</i>	7,66 2H, <i>t</i> , $J=7,3$; <i>ArHm</i>	6,98 2H, <i>d</i> , $J=9,2$; <i>ArHm</i>	3,81 3H, <i>s</i> CH_3O			
	1,0 3H, <i>t</i> , $J=7,5$							1,89 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3; 14,7$	7,76 1H, <i>t</i> , $J=7,3$; <i>ArHp</i>	7,37 2H, <i>d</i> , $J=9,2$; <i>ArHo</i>
								2,22 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3; 14,8$	8,06 2H, <i>d</i> , $J=7,3$; <i>ArHo</i>	
3.16cM	0,70 3H, <i>t</i> , $J=7,4$	1,49 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3; 14,8$	4,55 1H, <i>s</i>	5,60 1H, <i>s</i>		7,23-7,85 10H, <i>m</i>	4,54 1H, <i>d</i> , $J=14,5$			
	0,89 3H, <i>t</i> , $J=7,5$							1,59 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,4; 14,9$		4,60 1H, <i>d</i> , $J=14,3$
								1,78 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,4; 14,9$		CH_2Ph
								2,04 1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3; 14,8$		

Tabela 3.6 – Desvios químicos (δ /ppm) e constantes de acoplamento (J /Hz) de ^1H -RMN de N -(oxazolidine-2,4-diona)- 2-azetidionas (continuação).

Comp.	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CHX	NCHO	XArH X=O, S, SO_2 $\text{AA'XX'M (O, SO}_2)$	$\text{N(CH}_2)_n\text{ArH}$ $n=0, 1$ AA'XX' (n=0)	Outros
3.16cm (CD_3CN)	0,76 3H, <i>t</i> , $J=7,4$ 0,93 3H, <i>t</i> , $J=7,5$	1,62 1H, <i>dq</i> <i>sobr</i> , $J=7,3; 14,8$ 1,77 2H, <i>m</i> 2,24 1H, <i>dq</i> <i>sobr</i> , $J=7,3; 14,6$	4,93 1H, <i>s</i>	5,17 1H, <i>s</i>		7,25-7,96 10H, <i>m</i>	4,56 1H, <i>d</i> , $J=15,4$ 4,64 1H, <i>d</i> , $J=15,2$ CH_2Ph
3.16e	0,83 e 0,83 3H, $2 \times t$, $J=7,4$ 1,15 e 1,20 3H, $2 \times t$, $J=7,4$	1,42-2,07 4H, <i>m</i>	6,50 e 6,53 1H, $2 \times s$	5,59 e 5,76 1H, $2 \times s$		7,16-7,84 8H, <i>m</i>	2,33 e 2,35 3H, $2 \times s$ CH_3Ar
3.16fM	1,03 3H, <i>t</i> , $J=7,5$ 1,03 3H, <i>t</i> , $J=7,5$	1,71 1H, <i>dq</i> <i>sobr</i> , $J=7,3; 14,8$ 1,78-188 2H, <i>m</i> 1,95 1H, <i>dq</i> <i>sobr</i> , $J=7,4; 15,0$	5,54 1H, <i>s</i>	5,88 1H, <i>s</i>	6,83 2H, <i>d</i> , $J=7,5$; <i>ArHo</i> 7,06 1H, <i>t</i> , $J=7,5$; <i>ArHp</i>	7,16-7,34 7H, <i>m</i>	4,43 2H, <i>s</i> CH_2Ph
3.16fm	1,02 3H, <i>t</i> , $J=7,5$ 1,03 3H, <i>t</i> , $J=7,5$	1,72 1H, <i>dq</i> <i>sobr</i> , $J=7,4; 14,8$ 1,78-188 2H, <i>m</i> 1,96 1H, <i>dq</i> <i>sobr</i> , $J=7,4; 15,1$	5,57 1H, <i>s</i>	5,88 1H, <i>s</i>	6,82 2H, <i>d</i> , $J=7,5$; <i>ArHo</i> 7,05 1H, <i>t</i> , $J=7,5$; <i>ArHp</i>	7,18-7,31 7H, <i>m</i>	4,36 1H, <i>d</i> , $J=14,5$ 4,44 1H, <i>d</i> , $J=14,5$ CH_2Ph

Tabela 3.7 – Desvios químicos (δ /ppm) de ^{13}C -RMN de *N*-(oxazolidine-2,4-diona)- 2-azetidinonas.

Comp.	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CEt_2	$\text{O}=\text{CN}$	CHX	NCHO	OCON	CONR	Car	Outros
3.16a	8,83	25,32	62,29	173,40	46,91	78,42	153,77	166,41	128,87; 128,93	44,41
		25,36							129,15; 134,38	CH_2Ph
3.16bM	7,98	19,65	67,14	171,53	78,14	77,16	160,18	165,48	114,73; 122,92 (Cq); 127,45; 129,43	55,56
	8,61	24,68							129,75; 135,12; 135,53 (Cq); 152,59 (Cq)	CH_3O
3.16bm	8,48	20,17	67,41	172,22	78,74	78,15	160,74	166,30	115,15; 123,33 (Cq); 127,90; 129,76	55,95
	9,05	24,93							130,25; 135,56; 137,41 (Cq)	CH_3O
3.16cM	8,70	20,31	68,13	172,11	78,37	78,05	153,80	166,46	129,23; 129,48; 129,68; 129,88	45,15
	9,28	25,33							130,37; 134,47 (Cq); 135,59; 137,37(Cq)	CH_2Ph
3.16cm (CD_3CN)	8,06	20,14	67,50	171,88	79,62	77,36	154,15	166,41	128,59; 129,12; 129,45; 130,38	44,19
	8,49	24,77							135,12 (Cq); 135,63; 138,08 (Cq)	CH_2Ph
3.16e	7,95	20,66	67,51	171,49	78,00	72,41	152,15	164,75	110,71; 110,79; 112,50; 112,70; 124,99; 125,04	24,11
	8,03	21,17	67,94	171,99	78,62	72,76		164,96	125,31; 125,65; 125,74; 127,34 (Cq); 127,44 (Cq)	21,24
	8,63	24,12							128,20 (Cq); 130,13; 130,18; 130,22; 139,90 (Cq)	CH_3Ar
	8,67	24,47							146,71 e 146,85 (Cq); 179,96 e 180,17 (Cq)	
3.16fM	8,79	21,76	65,95	171,44	87,06	77,41	153,38	166,06	116,98; 123,63; 128,75; 128,83	44,36
	9,13	23,95							129,05, 130,28; 134,03 (Cq); 156,12 (Cq)	CH_2Ph
3.16fm	8,85	21,94	65,76	171,50	86,02	77,29	153,70	166,35	116,14; 116,75; 123,24; 128,73	44,29
	9,17	23,93							128,83; 130,07; 133,83 (Cq); 156,05 (Cq)	CH_2Ph

Cristalografia de Raio X

Das duas estruturas cristalinas do derivado **3.16c**, somente os cristais de **3.16cm** foram adequados para a cristalografia de Raio X. (Figura 3.4)

Confirmou-se que **3.16cm** é formado por um par de enantiómeros, nos quais os dois anéis das oxazolidine-2,4-dionas encontram-se quase planares, enquanto que as orientações espaciais dos substituintes C-3 e C-4, nas duas azetidinonas, estão invertidas. As configurações absolutas, observadas na cristalografia, dos estereocentros assinalados por C₁ na azetidinona e C₁ na oxazolidinediona são *S* e *R*, e *R* e *S* nos estereocentros C₃₁ e C₃₄ do segundo enantiómero.

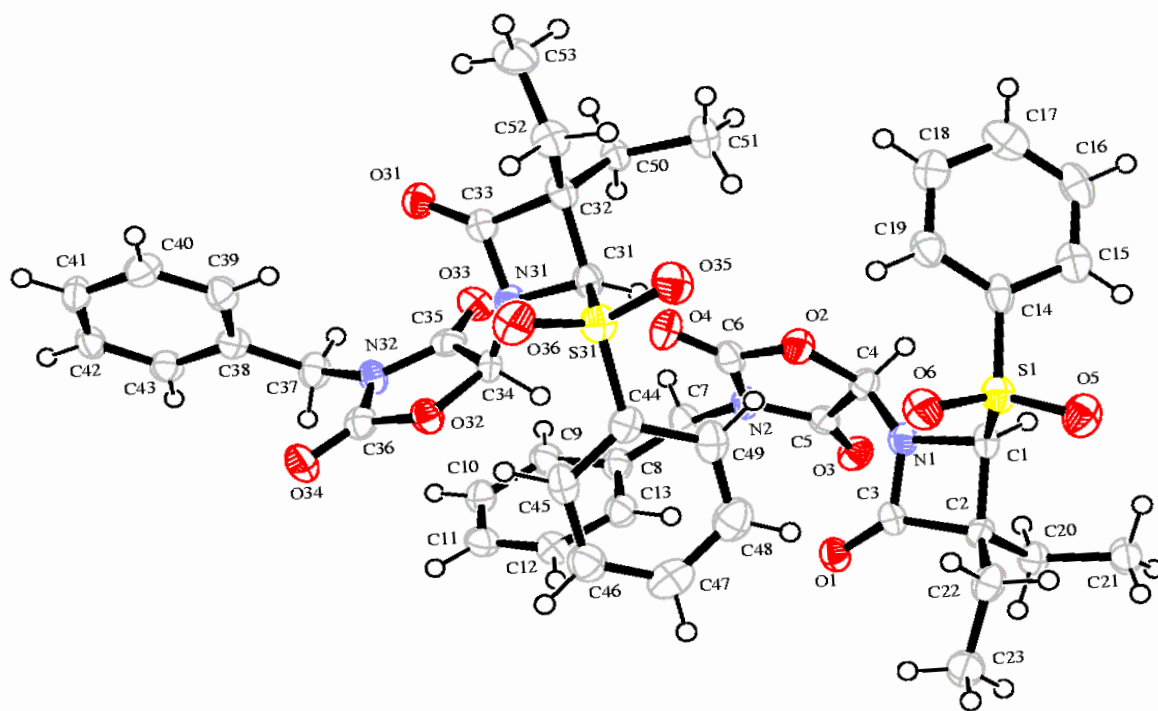


Figura 3.4- Estrutura cristalina do par de enantiómeros do composto **3.16cm**.

3.2.6 Identificação Espectroscópica de *N*-(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas

Os dados complementares de I.V., ESI-MS e análises elementares que identificam e caracterizam as *N*-(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas sintetizadas podem ser consultados no Capítulo 5.

Ressonância Magnética Nuclear

Os dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C dos compostos *N*-(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas estão organizados nas Tabelas 3.8 e 3.9.

Completamente diferente da multiplicidade do sinal do grupo NHCH_2Ph do composto *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionona **2.25f** (c.f. Capítulo 2), o sistema ABC dos hidrogénios diastereotópicos do derivado **3.15fM** surge no respectivo espectro de ^1H -RMN a δ 4,38 ppm, como um aparente duplete, cuja expansão revela um sinal mais complexo, formado por dois picos intensos, cada um ladeado por um par de picos de muito fraca intensidade, sendo o total de 6 picos. Neste sinal, verifica-se uma constante de acoplamento geminal, 2J , de 14,7 Hz e uma constante vicinal, 3J , de 5,9 Hz. A sobreposição total de dois dupletos, como é demonstrado pela Figura 3.5, fundamenta o sinal observado.

Também nestes derivados e comparando os espectros dos diastereoisómeros **3.15dM** e **3.15dm**, os deslocamentos dos sinais correspondentes aos hidrogénios de C-1' são os mais divergentes. Contudo é de salientar as diferentes manifestações dos dois prótons dos grupos OCH_2CH_3 , que no caso do espectro de **3.15dM** se conseguem diferenciar pelos sinais a 3,86 e 4,01 ppm, enquanto que surgem no espectro de **3.15dm** como um único sinal a 4,24 ppm formado por 14 picos, o que implica uma sobreposição dos dois duplos quadripletos totalmente diferente das indicadas nos diagramas de acoplamentos das Figuras 3.1 e 3.2.

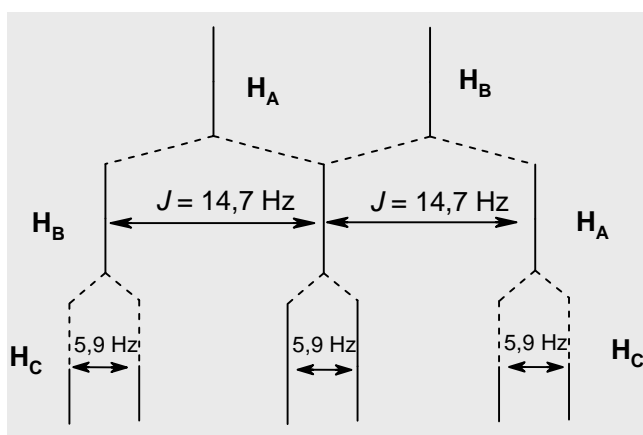


Figura 3.5 – Diagrama de acoplamento dos hidrogénios diastereotópicos do grupo CH_2Ph do derivado **3.15fM**.

3.3 Actividade Inibitória dos Derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidinonas na Elastase Humana

Foi utilizado o método de pré-incubação de Kitz e Wilson previamente descrito (c.f. Secção 2.4, Capítulo 2) para determinar a actividade inibitória na HLE dos derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidinonas sintetizados. Os resultados indicam que são fracos inibidores da HLE, com constantes de segunda-ordem que variam entre $10,3$ e $144 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 3.10).

Tal como os derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidinonas, a maioria dos compostos sintetizados, apresenta uma cinética de inibição bifásica, em que o k_{obs} é calculado na primeira fase de inibição, isto é, durante os primeiros 15-18 minutos, o que no caso das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidinonas corresponde a cerca de 70-85% de inactivação da HLE quando o derivado é dos mais potentes como o **3.16fm** (85%) ou o **3.16cM** (70%), ocorrendo também 60-40% de inactivação quando o derivado é mais fraco como o **3.16bM** (55%) ou **3.16a** (40%). Para o mesmo tempo de inibição, os derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidinonas apresentavam uma baixa percentagem de inactivação (14-25%),

Tabela 3.8- Desvios químicos (δ /ppm) e constantes de acoplamento (J /Hz) de ^1H -RMN de N -(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas.

Comp	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CHX	NCHO	OCH_2	OCH_2CH_3	NH	ArH	Outros
3.15dM	1,05	1,79	4,93	6,45	3,86	1,13	10,85	7,05-8,41	3,96
	3H, <i>t</i> , $J=7,3$	1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3$; 14,7	1H, <i>s</i>	1H, <i>s</i>	1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,2$; 10,6	3H, <i>t</i> , $J=7,2$	1H, <i>sl</i>	9H, <i>m</i>	3H, <i>s</i>
	1,09	1,98			4,01				CH_3OCO
	3H, <i>t</i> , $J=7,4$	1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3$; 14,6			1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,2$; 10,5				
3.15dm	0,90	1,69	4,63	5,66	4,24	1,26	10,75	7,05-8,33	3,95
	3H, <i>t</i> , $J=7,3$	1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,5$; 15,1	1H, <i>s</i>	1H, <i>s</i>	2H, $2\times dq$ sobr, $J=7,2$; 9,9	3H, <i>t</i> , $J=7,2$	1H, <i>sl</i>	9H, <i>m</i>	3H, <i>s</i>
	1,05	1,81-1,97							CH_3OCO
	3H, <i>t</i> , $J=7,5$	2H, <i>m</i>							
3.15fM	1,00	1,68	5,50	6,33	4,13-4,44	1,26	5,23	6,86	4,34
	3H, <i>t</i> , $J=7,6$	1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,3$; 14,7	1H, <i>s</i>	1H, <i>s</i>	2H, <i>m</i>	3H, <i>t</i> , $J=7,2$	1H, <i>tl</i> , $J=5,6$	2H, <i>d</i> , $J=7,9$	1H, <i>dd</i> , $J=5,9$; 14,7
	1,03	1,75-1,85						OArHo	4,41
	3H, <i>t</i> , $J=7,6$	2H, <i>m</i>						2H, <i>t</i> , $J=7,4$	1H, <i>dd</i> , $J=5,9$; 14,7
	1,92						OArHp	CH_2Ph	
	1H, <i>dq</i> sobr, $J=7,4$; 14,9						7,26-7,36		
							7H, <i>m</i>		

Tabela 3.9 - Desvios químicos (δ /ppm) de ^{13}C -RMN de *N*-(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas.

Comp.	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CEt_2	$\text{O}=\text{CN}$	CHX	NCHO	OCONH	CO_2Et	OCH_2	OCH_2CH_3	<i>Car</i>	Outros
3.15dM	8,66 8,91	20,59 24,59	68,48	170,97	77,42	70,55	150,65	168,65	62,79	13,87	114,93 (Cq); 119,03; 122,32 ; 129,28; 129,40; 130,90 134,25; 134,74; 138,36 (Cq); 140,87 (Cq)	52,45 CH_3OCO 164,10 CH_3OCO
3.15dm	8,35 8,73	19,98 24,39	67,30	170,97	78,51	74,01	150,77	168,25	62,92	13,90	115,19 (Cq); 118,97; 122,35 128,81; 129,61; 130,95 134,57; 134,62, 138,05 (Cq) 140,69 (Cq)	52,43 CH_3OCO 164,14 CH_3OCO
3.15fM	8,84 9,24	22,21 23,97	65,44	170,85	87,09	71,73	154,09	165,19	62,61	14,12	116,74; 122,97; 127,81 127,90; 128,93; 129,94 138,15 (Cq); 158,84 (Cq)	45,38 CH_2Ph

o que diferencia os dois grupos de derivados, uma vez que a comparação entre os valores das constantes de segunda-ordem, não revela diferenças significativas ($40\text{-}104\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ vs $10,3\text{-}144\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$).

Verificou-se que os derivados **3.13**, **3.15** e **3.16** provocam uma redução da actividade da HLE ao longo do tempo (Figura 3.6) que pode ser quase total, como é demonstrado pelos derivados **3.16cM**, **3.16fM** e **3.15fM**, com 90-97% de inactivação da HLE, após sensivelmente 3h do início do ensaio, ou uma redução parcial que vai aumentando ao longo do tempo para valores de 80% de inactivação após 5 a 6 h, no caso dos compostos **3.16bM** e **3.13c**. Nos vários ensaios realizados, também não foi observada a recuperação parcial ou total da actividade da HLE durante um período de 24 h.

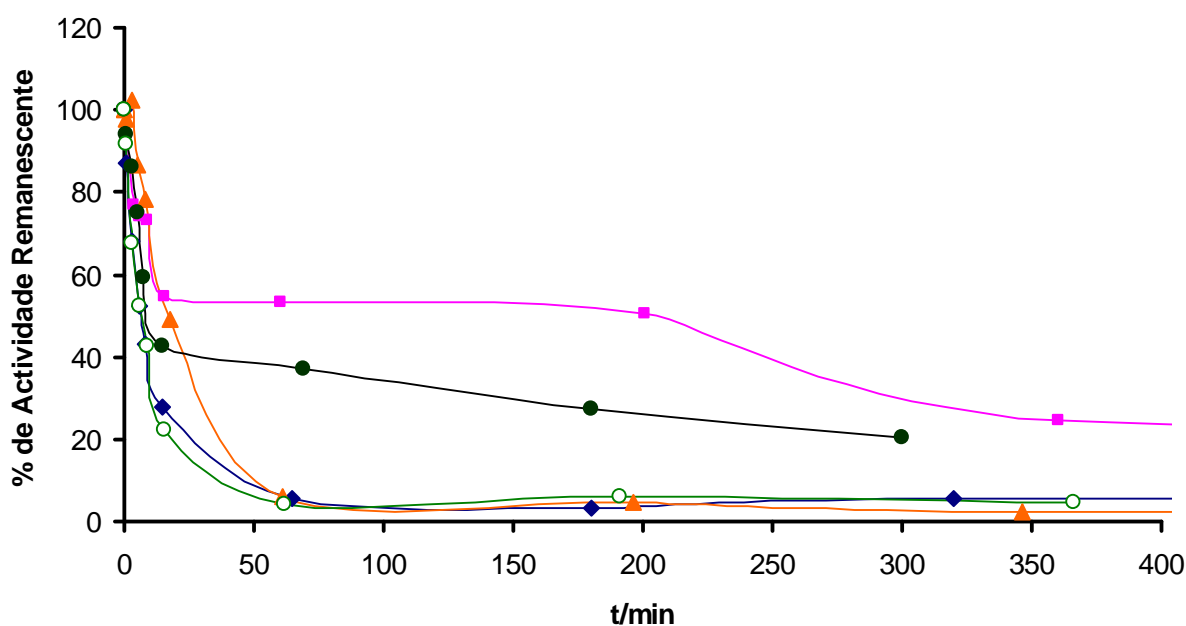


Figura 3.6- Diminuição da actividade enzimática em função do tempo, dos compostos **3.13c** (■), **3.16bM** (●), **3.16cM** (◆), **3.16fM** (○) e **3.15fM** (▲). Os inibidores (20 μM) foram incubados com a HLE (0,2 μM) em tampão HEPES, pH 7,2 a 25 °C.

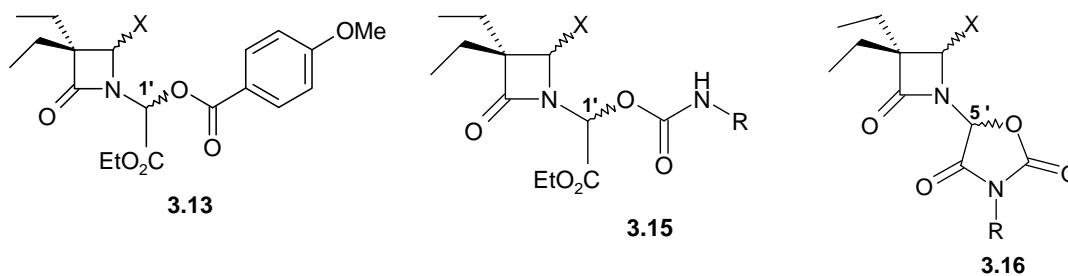
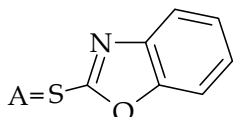


Tabela 3.10- Actividade inibitória dos derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidionas na HLE em HEPES, pH 7,2, a 25°C.

Comp.	X	R	$k_{obs}^a / [I] / M^{-1} s^{-1}$
3.13a	H	--	10,7 ^b
3.13b	SO ₂ C ₆ H ₅	--	12,9
3.13c	A	--	24,4
3.15dM	SO ₂ C ₆ H ₅	2-MeO ₂ CC ₆ H ₄	26,6
3.15fM	OC ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	38,2
3.16a	H	C ₆ H ₅ CH ₂	23,9
3.16bM			43,2
3.16bm	SO ₂ C ₆ H ₅	4-MeOC ₆ H ₄	49,7
3.16cM			68,5
3.16cm	SO ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	51,0
3.16e	A	4-MeC ₆ H ₄	80,0 ^b
3.16fM			115 ^b
3.16fm	OC ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	144
2.25c			100

^a representa a média de 2 a 4 ensaios de pré-incubação ^b valor calculado a partir do gráfico k_{obs} vs [I]. Os restantes resultados foram obtidos pela razão entre o valor de k_{obs} e [I] em que [I] = 20 μM e [HLE] = 0,2 μM.



Os valores das constante de velocidade de primeira-ordem, k_{obs} , foram obtidos para as várias concentrações de **3.13a**, **3.16e** e **3.16fM** pela metodologia inerente ao método de Kitz e Wilson, e que se exemplifica para o derivado **3.16fM** (Figura 3.7). Na Tabela 3.11, agrupam-se os valores de k_{obs} para as várias concentrações dos compostos **3.13a**, **3.16e** e **3.16fM**.

Por sua vez, a representação gráfica dos valores de k_{obs} em função das várias concentrações dos compostos **3.13a**, **3.16e** e **3.16fM**, permitiu a obtenção, a partir do declive das rectas traçadas, das respectivas constantes de segunda-ordem, $k_{\text{obs}}/[I]$ (Figura 3.8). Para os restantes derivados os resultados de $k_{\text{obs}}/[I]$ foram obtidos pela razão entre o valor de k_{obs} e $[I]$ em que $[I]=20 \mu\text{M}$ e $[\text{HLE}]=0,2 \mu\text{M}$.

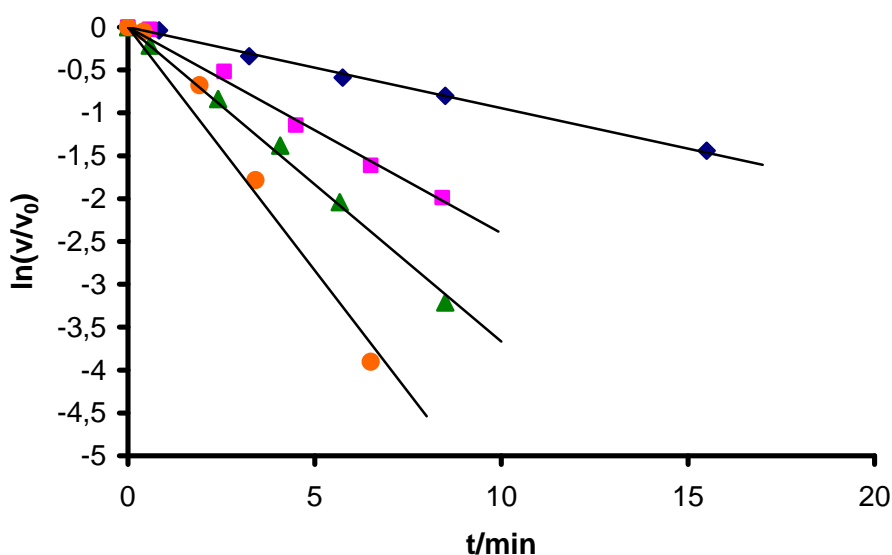


Figura 3.7- Cinética de inibição da HLE pelo derivado **3.16fM**. Concentrações de 20 μM (◆), 40 μM (◻), 60 μM (▲) e 80 μM (●) de **3.16fM** foram incubadas com a HLE (0,2 μM), em tampão HEPES, pH 7,2 a 25°C.

Como se pode observar na Figura 3.8 as rectas k_{obs} vs $[I]$ dos derivados **3.16e** e **3.16fM** passam pela origem dos eixos, obedecendo à Equação 2.4. No caso do derivado **3.13a** a recta não passa pela origem, interceptando o eixo do y quando $[I]=0$, facto também observado por Kitz e Wilson na inibição da acetilcolinesterase por alguns ésteres de ácidos metanosulfónicos. Estes investigadores concluíram que, para a gama

de concentrações de inibidor que foram estudadas, neste tipo de inibição, se formam complexos reversíveis E·I em quantidade sinificativa.¹²⁴

Tabela 3.11- Constantes de inactivação de primeira-ordem, k_{obs} , da HLE em função das concentrações dos inibidores **3.13a**, **3.16e** e **3.16fM** em HEPES, pH 7,2 a 25°C.

$10^5[I]/M$	$10^3 k_{obs}/s^{-1}$		
	3.13a	3.16e	3.16fM
2		1.57	1.51
4	1.91	2.33	4,20
6	2.18	4.43	6.43
8			8.46
10	2.67	7.71	
20	3.56		

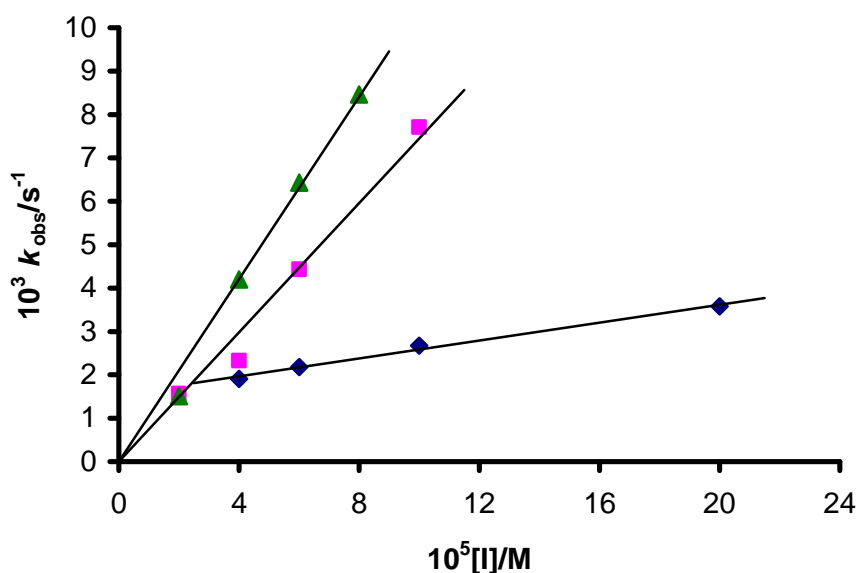
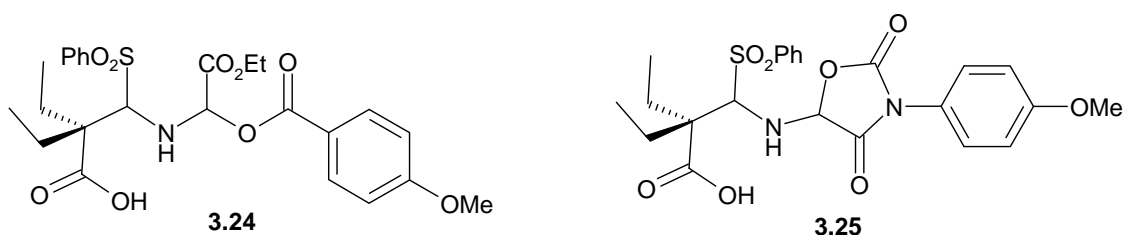


Figura 3.8- Rectas das constantes de velocidade de primeira-ordem, k_{obs} , para a inactivação da HLE, em função da concentração do inibidor **3.13a** (◆), **3.16e** (■) e **3.16fM** (▲).

Da análise da Tabela 3.10 pode-se constatar que, dos 3 grupos de derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidionas sintetizados, as *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas **3.16** são os compostos mais potentes na inibição da HLE, seguindo-se os carbamatos *N*-(aminocarboniloxietoxicarbonil)metil-2-azetidionas **3.15**, sendo os mais fracos os ésteres *N*-(aciloxietoxicarbonil)metil-2-azetidionas **3.13**.

Nos ésteres **3.13**, a introdução de um grupo atractor de electrões em C-4 é pouco eficiente, não se verificando aumento (**3.13a** vs **3.13b**) ou provocando um ligeiro aumento da actividade inibitória (**3.13a** vs **3.13c**). Por outro lado, o composto **3.13b** é sensivelmente 8 vezes menos potente na inibição da HLE que o correspondente análogo carbamato *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionona **2.25c**, e 4 vezes menos potente que a correspondente oxazolidine-2,4-diona **3.16bM**. Em termos químicos **3.13b** e **3.16bM** têm β -lactamas com reactividades relativamente semelhantes, pois os pK_a dos grupos abandonantes, isto é, as aminas **3.24** e **3.25**, que resultam do ataque ao carbono carbonílico das β -lactamas são de $-1,82$ e de $-0,86$, respectivamente.¹⁰⁵



Segundo estes valores e atendendo unicamente à reactividade, o derivado **3.13b** seria ligeiramente mais potente, contrariamente ao que se verifica.

Esta fraca actividade inibitória dos ésteres *N*-(aciloxietoxicarbonil)metil-2-azetidionas pode ser explicada pelos estudos de modelização molecular. Foi demonstrado, que no centro activo da HLE a distância entre o carbono carbonílico da β -lactama dos ésteres **3.13** e o átomo de oxigénio do grupo hidroxilo do resíduo de Ser-195 é consideravelmente elevada, de 3,0 a 3,2 Å, comparada com a distância observada ($d < 3$ Å) entre o oxigénio da Ser-195 e o carbono carbonílico das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas **3.16**, ou do derivado **2.25c**.^{125,128}

Contrariamente aos ésteres anteriormente analisados, as *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas **3.16**, são inibidores com maior actividade inibitória se possuírem grupos electroatractores em C-4. Por exemplo, o composto **3.16a** é 2 a 6 vezes menos potente que os restantes derivados. Uma vez que não existe uma relação entre, os valores de σ^* ou de pK_a dos potenciais grupos abandoantes em C-4 de **3.16a**, **3.16c** e **3.16f** e a actividade inibitória na HLE, as diferentes actividades inibitórias reflectem essencialmente os diferentes reconhecimentos moleculares desses substituintes pela enzima.

Nestes derivados, é também de salientar que, para o mesmo substituinte em C-4, o grupo ligado a N-3' pouco influência o valor da constante de inibição de segunda-ordem (**3.16bM** vs **3.16cM**).

Outro aspecto a considerar é a aparente falta de estereosselectividade na inibição da HLE em relação aos diastereoisómeros ou pares de enantiómeros de **3.16b**, **3.16c** e **3.16f**, cujas actividades inibitórias são similares.

A modelização molecular realizada com os 4 estereoisómeros de **3.16e** (4*R*,5'*R*; 4*S*,5'*S*; 4*R*,5'*S* e 4*S*,5'*R*) no centro activo da HLE, sugere que só os diastereoisómeros (4*R*,5'*S*) e (4*S*,5'*S*) interactuam com a HLE, forçando o anel da β -lactama a inserir-se o mais possível no centro activo da enzima, de maneira a orientar o carbono carbonilo da β -lactama para a proximidade do oxigénio do grupo hidroxilo da Ser-195 ($d < 3 \text{ \AA}$). As interacções que contribuem para esta organização são as forças de Van-der-Waals que se estabelecem entre o grupo 2-tiobenzoxazol em C-4 e os resíduos de Leu-99 e His-57, conjuntamente com as interacções entre o anel *N*-arilo da oxazolidine-2,4-diona com os resíduos hidrofóbicos de Phe-41 e Cys-42. Igualmente se constatou que ocorrem padrões semelhantes de interacções entre os inibidores **3.16c** e **3.16f** e o centro activo da enzima.

Apesar dos diferentes substituintes nas estruturas dos enantiómeros (4*R*,5'*S*) dos derivados **3.16c**, **3.16e** e **3.16f**, as distâncias entre os carbonos dos grupos carbonilo das β -lactamas e o oxigénio do grupo hidroxilo da Ser-195 não são afectadas, sendo para aqueles derivados de 2,7; 2,9 e 2,6 \AA (Figura 3.9),¹²⁸ o que se reflecte nas correspondentes actividades inibitórias, cujos valores, no máximo, duplicam.

Este estudo aponta para a possibilidade de somente um dos enantiómeros de cada par, presentes em cada composto isolado (**3.16M** ou **3.16m**), ser acessível ao oxigénio do grupo hidroxilo da Ser-195, e permite concluir que os valores tabelados estão associados a um erro inerente ao facto de 50% da concentração do inibidor corresponder ao enantiómero pouco activo.

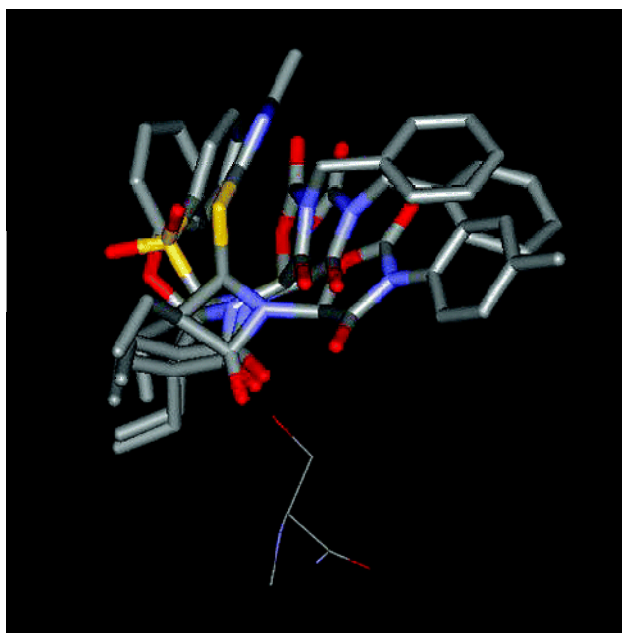


Figura 3.9- Comparação da posição relativa dos diastereoisómeros (*4R,5'S*) de **3.16c**, **3.16e** e **3.16f**, no centro activo da HLE, utilizando a modelização molecular.¹²⁸

A *N*-(1-aminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinona **3.15fM**, embora provoque uma inibição de 97% da actividade da HLE (Figura 3.6), tem uma constante de inibição de segunda-ordem que não ultrapassa os $38,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, sendo 3 a 4 vezes menos potente que o seu análogo cíclico **3.16f**.

3.3.2 Especificidade Enzimática de **3.16fM**

Testou-se o derivado **3.16fM** na elastase pancreática suína, PPE, utilizando o método de pré-incubação previamente referido (c.f. Secção 4.3.1, Capítulo 4), tendo-se obtido para $[\text{PPE}]/[\mathbf{3.16fM}]=139$ ($[\text{PPE}]=7,2 \times 10^{-7}\text{M}$, em HEPES, pH 7,2 a 25 °C e 5%

de DMSO) uma constante de velocidade de inibição de segunda-ordem, $k_{\text{obs}}/[\text{I}]$, de $10,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sensivelmente 11 vezes menor que a observada para a HLE. Face a este resultado pode-se acrescentar que as *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas, representadas pelo **3.16fM**, apresentam especificidade para a HLE em relação à PPE.

3.4 Estabilidade em Tampão Fosfato de *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas

Realizou-se o estudo da estabilidade de algumas *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas em tampão fosfato (PBS) com 20% de acetonitrilo, pH 7,4 a 37°C (Tabela 3.12). O acetonitrilo, presente no meio tamponado, foi necessário para completa solubilização dos substratos testados.

A determinação da velocidade de hidrólise dos compostos, k_{obs} , foi efectuada por cromatografia líquida de alta resolução, HPLC, seguindo-se nas reacções de primeira-ordem, o desaparecimento do substrato até 3 a 4 meias vidas. Estas reacções são regidas pela expressão de velocidade dada pela Equação 3.1, onde k_{obs} é a constante de velocidade de *pseudo*-primeira-ordem.

$$\text{vel} = k_{\text{obs}} [\mathbf{3.16}] \quad (3.1)$$

O k_{obs} do derivado **3.16bM** foi confirmado por espectroscopia de U.V., nas mesmas condições dos ensaios por HPLC, tendo-se obtido um resultado idêntico ao tabelado ($26,75 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

Os substratos **3.16bM** e **3.16bm** são os mais instáveis, com tempos de semi-vida inferiores a 1 h. Estes derivados caracterizam-se pelo N-3' se ligar a um grupo *p*-metoxifenilo. Em contraste, verifica-se um aumento nos tempos de semi-vida, bastante acentuado, nos derivados que contêm na sua estrutura um grupo benzilo ligado ao N-3' em vez do grupo aromático. Por exemplo, o composto **3.16 cM** é sensivelmente 17 vezes mais estável que o **3.16bM**.

Tabela 3.12- Valores de k_{obs} e respectivos tempos de semi-vida em tampão fosfato, com 20% de acetonitrilo, pH 7,4 a 37°C e valores teóricos de log P de *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas; $[3.16]_0 = 2 \times 10^{-5}$ M.

Comp.	Tampão Fosfato		log P ¹²⁷ Teórico*
	$10^5 k_{\text{obs}}/\text{s}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{h}$	
3.16a	7,10	2,7	1,76
3.16bM	27,71	0,7	2,51
3.16bm	25,79	0,75	2,51
3.16cM	1,61	12	2,52
3.16fM	2,38	8,1	3,16

*Calculado para o composto sem estereoquímica definida

Nas benziloxazolidine-2,4-diona-2-azetidionas, o **3.16cM** é o derivado mais estável com um tempo de semi-vida de 12h. Na realidade, a estabilidade destes derivados (**3.16a**, **cM**, **fM**) é claramente afectada pelo efeito electrónico do grupo presente em C-4, observando-se que a constante de hidrólise de *pseudo*-primeira-ordem, k_{obs} , diminui com o aumento do efeito indutivo, atractor de electrões, dos substituintes em C-4, como se pode comprovar pelos respectivos valores de σ^* ($\sigma_{\text{H}}^* = 0,49$; $\sigma_{\text{OPh}}^* = 2,43$ e $\sigma_{\text{SO}_2\text{Ph}}^* = 3,25$).¹³⁷

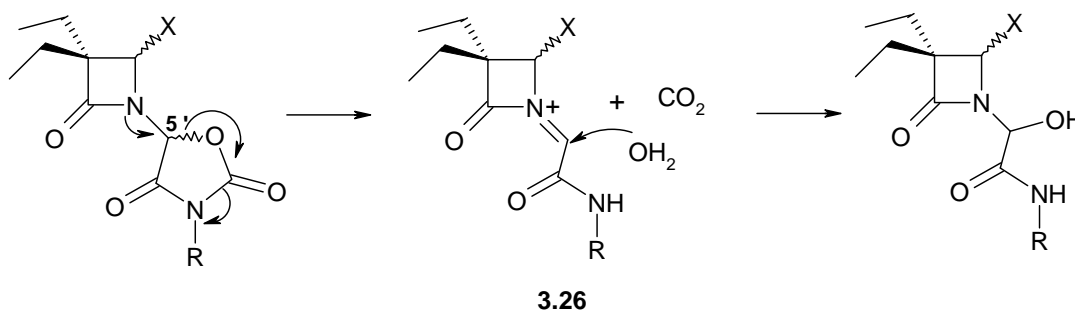
A interpretação dos resultados tabelados sugere que a hidrólise química não ocorre no anel β -lactâmico. Esta hipótese é suportada por dois aspectos químicos: primeiro, as aminas que resultam da abertura do anel β -lactâmico de **3.16cM** e **3.16bM** têm idêntica nucelofugacidade, com $\text{p}K_{\text{a}}$ de -1,14 e -0,86 respectivamente¹⁰⁵ e por consequência a reactividade e a hidrólise das duas β -lactamas seria semelhante, o que não se verifica, pois os dois compostos apresentam uma grande diferença de estabilidade. Segundo, seria de esperar que o aumento do efeito electroattractor do grupo em C-4 influenciase a reactividade do anel β -lactâmico, ficando o carbonilo em C-2 mais susceptível ao

ataque de nucleófilos, com conseqüente aumento do k_{obs} , no entanto, observa-se o efeito contrário.

A relação encontrada entre o k_{obs} e o efeito electrónico dos substituintes em C-4 da β -lactama, conjuntamente com o estudo de Valente e colaboradores, permite considerar o mecanismo do Esquema 3.8 como o mais provável para a hidrólise em tampão fosfato das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas.^{138, 139}

A hidrólise verifica-se por *via* ião imínio **3.26**, que se forma mais facilmente com a diminuição do efeito electrotractor do grupo em C-4 e permite compreender os diferentes tempos de semi-vida encontrados para os derivados **3.16a**, **3.16cM** e **3.16fM**.

Segundo este mecanismo, a abertura do anel é facilitada quando R é aromático pois a carga negativa formada em N-3' pode ser estabilizada por ressonância com os dois grupos, carbonilo e arilo. O produto resultante é menos estável quando R é um grupo benzilo e a ressonância da carga negativa se limita ao carbonilo adjacente. Assim, a estabilidade dos produtos de hidrólise propostos, possivelmente explica a diferença entre os tempos de semi-vida de **3.16cM** e **3.16bM**, contudo, e devido à grande reactividade das *N*-ariloxazolidine-2,4-dionas¹³⁴, não é de excluir a contribuição da hidrólise dos grupos carbonilo da oxazolidine-2,4-diona para a maior instabilidade de **3.16bM**.



Esquema 3.8

Os dados apresentados revelam que os inibidores testados não cumprem os critérios de estabilidade de Alpegiani e por isso são inadequados para administração, todavia o derivado **3.16cM** poderia ser um candidato para administração tópica.

Os valores de log P obtidos teoricamente,¹²⁷ atribuem a estes inibidores uma razoável versatilidade na sua distribuição pelo organismo, sendo o derivado **3.16fM** o mais lipofílico.

Em resumo, neste capítulo conseguiram-se sintetizar 3 grupos de compostos com grande analogia estrutural: os ésteres *N*-(aciloxicarbonil)metil-2-azetidionas **3.13**, os carbamatos *N*-(aminocarboniloxietoxicarbonil)metil-2-azetidionas **3.15** e as *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas **3.16**, com rendimentos que variaram entre os 17 a 63%.

É no grupo das *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas que se encontram os derivados com as maiores percentagens de inactivação da HLE (>90 %) e com as maiores velocidades de inibição ($115,3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $144,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), sem que se verifique a recuperação da actividade enzimática, no meio de incubação, durante um período de 24h.

Aparentemente, dos quatro estereoisómeros que se formam em cada derivado **3.16**, só os diastereoisómeros (*4R,5'S*) e (*4S, 5'S*) interagem de maneira efectiva com o centro activo da HLE, sugerindo uma inibição diastereosselectiva.

Foi estudada a estabilidade de algumas *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas em tampão fosfato, pH 7,4 a 37°C e os resultados revelaram que são compostos que se hidrolisam rapidamente com tempos de semi-vida que oscilam entre 0,7 e 12 h.

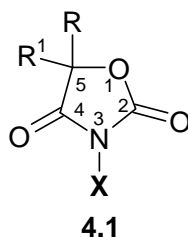
Capítulo 4

Oxazolidine-2,4-dionas Como Inibidores da Elastase Suína

4.1 Introdução

A procura de novos protótipos heterocíclicos para a inibição da HLE e a inadvertida obtenção de oxazolidine-2,4-dionas no Capítulo 3, impulsionou-nos a empreender um estudo com o objectivo de descobrir o potencial inibitório de oxazolidine-2,4-dionas

4.1 sobre a elastase humana ou a elastase suína.

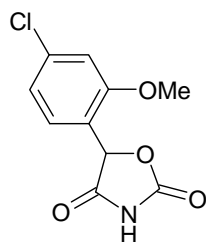


O sistema anelar da oxazolidine-2,4-diona é conhecido desde 1878 e muitos derivados foram sintetizados desde essa data. As *N*-alquinoxazolidine-2,4-dionas são moléculas razoavelmente estáveis em soluções ácidas mas que se hidrolisam rapidamente em meio alcalino.¹³⁴

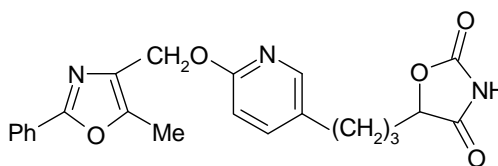
Em termos farmacológicos, esta classe de compostos tem principalmente actividade anti-epiléptica. A 3,5,5-trimetiloxazolidine-2,4-diona ou trimetadiona tem sido utilizada como anticonvulsivante, especialmente no tratamento do pequeno mal epiléptico e em situações de resistência a outros tratamentos.¹³⁴ Foram-lhe também atribuídas propriedades analgésicas com uma potência idêntica à aspirina.¹⁴⁰ Embora nos Estados Unidos na América ainda seja comercializada,¹⁴¹ em Portugal foi retirada do mercado, possivelmente devido aos seus efeitos secundários.¹⁴²

Se o átomo de azoto da oxazolidine-2,4-diona não se encontrar alquilado então os derivados têm efeito hipnótico, sedativo e narcótico moderado. A acção farmacológica também depende dos substituintes em C-5, como tal, a 5,5-difeniloxazolidine-2,4-diona é ineficiente no pequeno mal, mas permite controlar ataques do grande mal epiléptico.¹³⁴

Ensaio *in vivo* realizados por Schnur, Momose e colaboradores demonstraram que as oxazolidine-2,4-dionas **4.2** e **4.3** tinham actividade antidiabética, funcionando como agentes hipoglicémicos, potencialmente úteis para o tratamento da diabetes tipo 2 ou diabetes *mellitus* não insulino-dependente.^{143, 144}

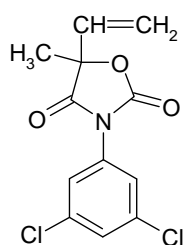


4.2

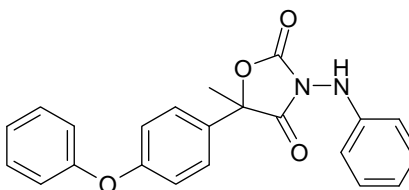


4.3

Para além das actividades farmacológicas mencionadas, as oxazolidine-2,4-dionas têm sido utilizadas também como pesticidas, mais especificamente como fungicidas, constituindo exemplos a vinclozoline **4.4** e a famoxadone **4.5**.^{145, 146}

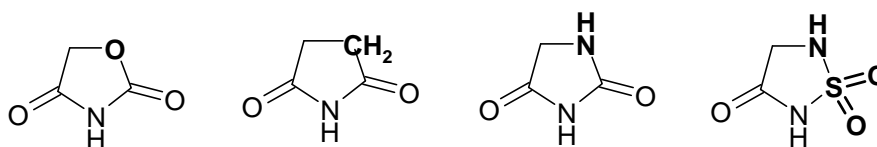


4.4



4.5

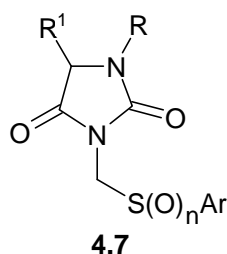
A analogia estrutural entre as oxazolidine-2,4-dionas e as succinimidas, as hidantoínas **4.6** e as tiadiazolidinonas é evidente e resulta da substituição por bioisósteros clássicos e não clássicos, de átomos ou grupos de átomos do anel heterocíclico.



4.6

Para a escolha dos grupos químicos a introduzir em C-5 e N-3 do anel da oxazolidine-2,4-diona, foi necessário considerar o historial destes análogos como inibidores enzimáticos. Assim, as succinimidas só têm actividade inibitória na HLE se o anel estiver activado por ligação do azoto a um grupo sulfoniloxi (**1.18**, c. f. Introdução), caso contrário, a ligação a uma cadeia etílica com um bom abandonante

não activa suficientemente o anel e o composto é inactivo na inibição (por exemplo o composto **1.19**). Contrariamente às succinimidas, as tiadiazolidinonas têm um anel suficiente reactivo, provavelmente devido à grande nucleofugacidade do grupo abandonante ($RR^1NSO_2NHCH_2LG$) proveniente da acilação da enzima, sendo potentes inibidores da HLE, mesmo quando o azoto entre o carbonilo e o sulfonilo se liga por uma ponte metilénica a um grupo abandonante (como na estrutura **1.14**). No caso das hidantoínas, que têm propriedades físico-químicas muito semelhantes às oxazolidine-2,4-dionas, Groutas e colaboradores testaram-nas como inibidores da HLE, PR3 e CG, não observando inactivação destas enzimas quando os derivados sintetizados tinham a estrutura **4.7**.⁶⁸



R = isobutilo, benzilo

R¹ = H, benzilo;

n = 0, 2

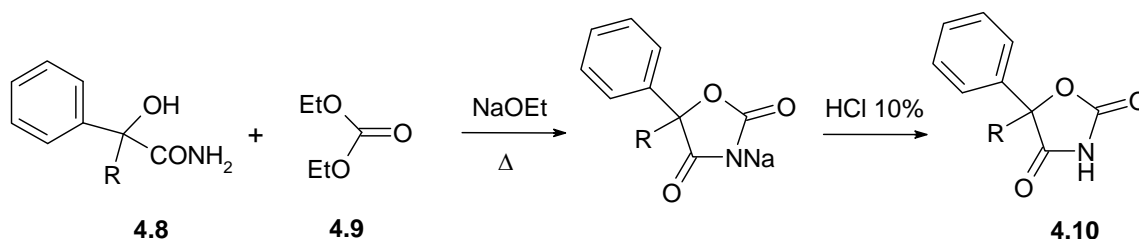
Atendendo a estas informações, foram escolhidos o grupo metilo como grupo de reconhecimento em C-5, uma vez que a actividade inibitória dos compostos sintetizados iria ser testada na PPE (c.f. Secção 4.3) e para activar o anel da oxazolidine-2,4-diona, os grupos aril, acilaril e sulfonilaril por ligação ao N-3.

4.2 Obtenção de Oxazolidine-2,4-dionas

Na obtenção de oxazolidine-2,4-dionas, para além das reacções de alquil ou aril isocianatos com ésteres de ácidos α -hidroxílicos que originam oxazolidine-2,4-dionas substituídas em N-3 (c.f. Secção 3.2.4.1, Capítulo 3) existem vários outros processos referenciados na literatura, dos quais se salientam os seguintes:

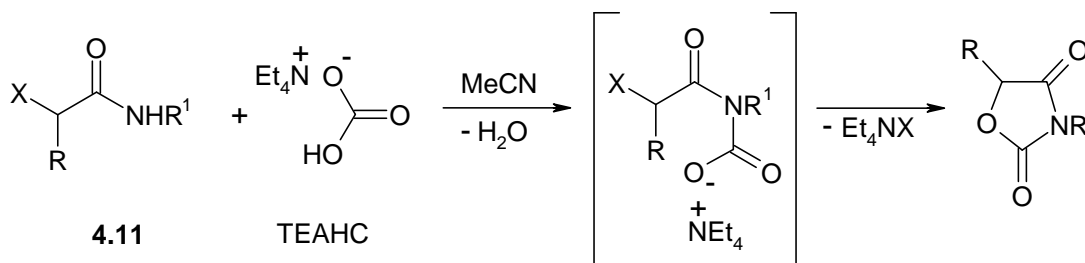
A condensação de amidas de ácidos α -hidroxílicos **4.8** com carbonatos dialquílicos **4.9**, em presença de etóxido de sódio, é um processo divulgado em 1945,¹³⁴ mas ainda utilizado por Zha e colaboradores em 2004 (Esquema 4.1), para a formação

das oxazolidine-2,4-dionas **4.10** (R=alquilo). No entanto, este processo tem o inconveniente de ser pouco eficiente para a síntese de oxazolidine-2,4-dionas substituídas em N-3.¹⁴⁷



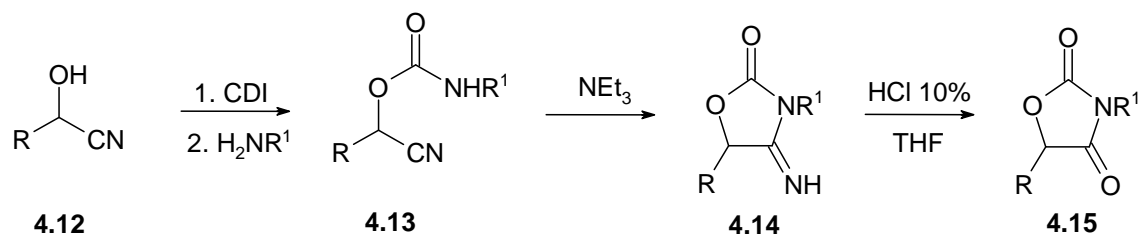
Esquema 4.1

Cesa e colaboradores utilizaram a carboxilação, pelo agente TEAHC, das amidas secundárias **4.11** que possuem um bom grupo abandonante (X = Cl, Br ou Ots) na posição α (Esquema 4.2) para obterem as *N*-benzil e *N*-feniloxazolidine-2,4-dionas não substituídas em C-5 com rendimentos de 41 a 87%, enquanto que para as 3,5-dialquinoxazolidine-2,4-dionas os rendimentos foram de 75 a 96%.¹⁴⁸



Esquema 4.2

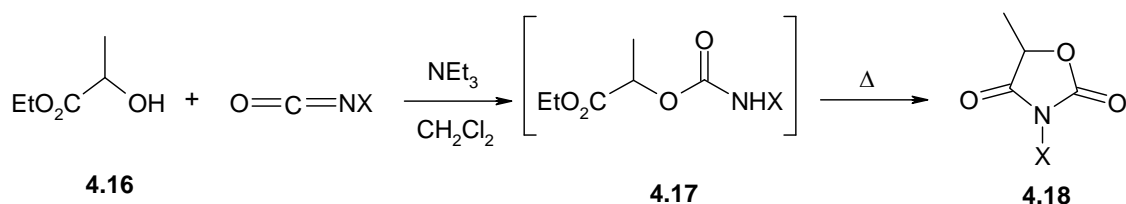
O processo reaccional que envolve 4 passos, efectuados de maneira sequencial, sem isolamento dos intermédios formados (“one pot reaction”) e representado no Esquema 4.3. A reacção entre a cianohidrina **4.12** e o 1,1'-carbonildiimidazole (CDI), forma um intermédio imidazolido que reage rapidamente com a amina primária originando o carbamato acíclico **4.13**. O fecho do anel de **4.13**, por catálise básica pela trietilamina, à temperatura ambiente, produz a 4-imino-oxazolidine-2-ona **4.14**, a qual é subsequentemente hidrolisada em meio ácido originando **4.15** com rendimentos de 53-73% (R= alquilo, arilo, heteroarilo; R¹= alquilo, arilo).¹⁴⁹



Esquema 4.3

4.2.1 Síntese de *N*-aril-, *N*-acilaril- e *N*-sulfonilariloxazolidine-2,4-dionas

Para a síntese dos compostos 3-aryl e 3-benzil-5-metiloxazolidine-2,4-diona, **4.18a-d** e **3.23**, agrupados na Tabela 4.1, utilizou-se a técnica discutida no Capítulo 3 e indicada no Esquema 4.4. Após a adição dos reagentes, o éster α -hidroxílico **4.16** e o respectivo isocianato, ao diclorometano anidro e em presença de trietilamina, a reacção prosseguiu durante 1h à temperatura ambiente, sendo posteriormente colocada em refluxo e controlada por ccd durante este período, para assegurar a completa ciclização do intermédio acíclico **4.17**. Na síntese do composto **4.18d**, foi necessário diluir a mistura reaccional para a completa dissolução do isocianato de *p*-nitrofenilo, o que possivelmente dificultou a ciclização, porque a reacção permaneceu incompleta apesar do aumento do tempo de refluxo para 11h, mais 5h que o refluxo dos restantes compostos. Este facto reflectiu-se no rendimento obtido (25%).

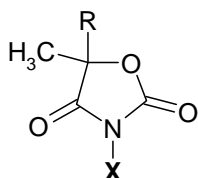


Esquema 4.4

Através deste método tentou-se a formação da *N*-sulfonilaril-5-metiloxazolidine-2,4-diona (**4.18e**, X= *p*-MeOC₆H₄SO₂), utilizando como reagentes o isocianato de *p*-metoxibenzenosulfonilo e o composto **4.16**. Apesar de se ter duplicado a quantidade da trietilamina (2 eq. mol.) e aumentado o tempo de refluxo para 21 h, a ciclização

intramolecular não ocorreu e todos os compostos isolados eram estruturalmente diferentes da oxazolidine-2,4-diona pretendida, de acordo com a análise dos respectivos espectros de $^1\text{H-RMN}$.

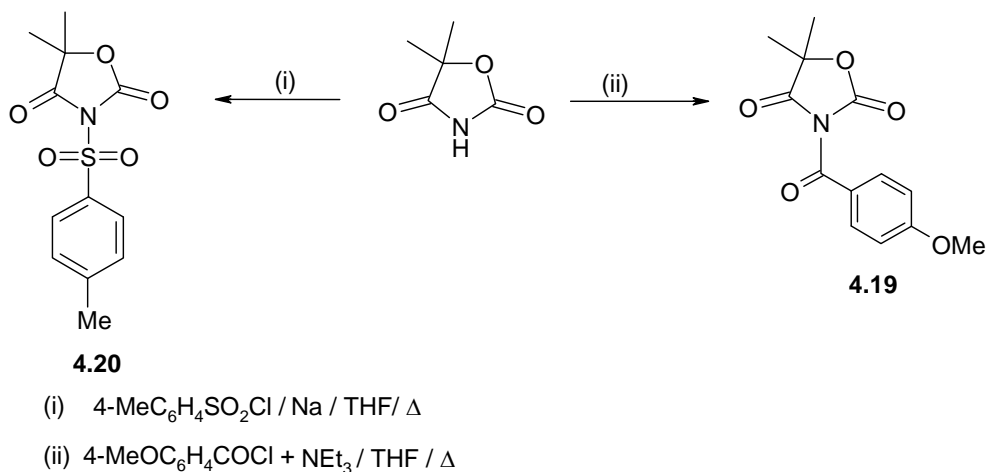
Tabela 4.1- Oxazolidine-2,4-dionas sintetizadas.



Comp.	R	X	$\eta(\%)$
4.18a	H	C_6H_5	27
4.18b	H	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	51
4.18c	H	4- ClC_6H_4	46
4.18d	H	4- $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$	25
3.23*	H	4- MeOC_6H_4	46
4.19	CH_3	4- $\text{MeOC}_6\text{H}_4\text{CO}$	41
4.20	CH_3	4- $\text{MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_2$	22

*c.f. Secção 3.4.2.1

Adaptou-se o processo de síntese patenteado por Theissen¹⁵⁰ para a síntese da *N*-acilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona **4.19** (Esquema 4.5). Primeiro, fez-se reagir o cloreto de *p*-metoxibenzoilo com a trietilamina em THF anidro e à suspensão formada adicionou-se a 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona. A mistura reaccional foi colocada em refluxo e seguida por $^1\text{H-RMN}$. Ao fim de 17 h, verificou-se o desaparecimento do sinal a 1,63 ppm correspondente aos dois grupos metilo em C-5 da 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona e a máxima intensidade no sinal a 1,73 ppm dos dois grupos metilo do produto, confirmando a completa transformação do reagente no produto **4.19**. Purificou-se o produto por cromatografia em coluna obtendo-se um rendimento de 41%.



Esquema 4.5

Na obtenção da *N*-sulfonilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona **4.20**, experimentou-se a técnica de síntese de **4.19**, utilizando-se o cloreto de *p*-metilbenzenosulfonilo e a 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona. O seguimento da reacção por ¹H-RMN (60 MHz), é neste caso, mais difícil devido à semelhança dos deslocamentos entre os dois grupos metilo do reagente e do produto, tornando-se este processo duvidoso para estabelecer o progresso da reacção. Após 17 h de refluxo da mistura reaccional procedeu-se ao isolamento dos produtos por cromatografia em coluna, tendo-se surpreendentemente recuperado quase a totalidade da 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona. Obteve-se um resultado idêntico quando se fez reagir a 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona com NaH em THF e posteriormente se juntou o cloreto de *p*-metilbenzenosulfonilo, ficando a mistura reaccional em agitação à temperatura ambiente, durante 22h.

O *N*-sulfonilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona **4.20** foi sintetizado por reacção do cloreto de *p*-metilbenzenosulfonilo (1 eq. mol.) com ligeiro excesso de 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona (1,2 eq. mol.), em presença de vestígios de sódio. Sendo o cloreto de *p*-metilbenzenosulfonilo o reagente limitante, foi possível determinar o fim da reacção por ccd, seguindo o seu desaparecimento. Por sua vez, os vestígios de sódio no meio reaccional possibilitaram a lenta formação do sal da 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona (evitando a formação de um grande precipitado como aconteceu com o NaH), que reagiu rapidamente com o cloreto de *p*-metilbenzenosulfonilo num meio reaccional

sob refluxo. Por fim, o produto foi recristalizado obtendo-se por este método 22% de **4.20** (Esquema 4.5).

Todos os compostos representados na Tabela 4.1 originaram espectros de ^1H e ^{13}C -RMN, EI-MS e análises elementares consistentes com as estruturas propostas. Estes dados encontram-se descritos no Capítulo 5.

4.3 Actividade Inibitória das Oxazolidine-2,4-dionas na Elastase Pancreática Suína.

No Capítulo 3 foi utilizada a PPE, em testes *in vitro*, com o intuito de elucidar a especificidade enzimática do inibidor **3.16fM**. No presente Capítulo utiliza-se a PPE como modelo da HLE, para testar as oxazolidine-2,4-dionas sintetizadas, devido à homologia que apresenta com a HLE (40%) e à sua maior acessibilidade em termos económicos.

A PPE (E.C.3.4.21.36) é uma enzima constituída por uma única cadeia peptídica de 240 amino-ácidos, estabilizada por 4 pontes de dissulfureto e sem hidratos de carbono. As duas elastases são bastante semelhantes especialmente nos seus centros activos, com as tríades catalíticas estruturalmente similares. Também têm como substrato fisiológico a elastina.²¹

Contudo, existem diferenças significativas entre as duas enzimas. É de realçar os diferentes sub-sítios S_1 . Enquanto a HLE prefere amino-ácidos mais volumosos como a valina, devido às maiores dimensões da sua cavidade S_1 , a PPE prefere a alanina como o amino-ácido de reconhecimento. Este aspecto tem consequências na actividade inibitória de alguns compostos como as *N*-carbamoil-2-azetidionas, em que substituintes dietílicos em C-3 do anel β -lactâmico resultam em inibidores muito fracos da PPE,^{151,152} em contraste com os análogos dimetílicos que são inibidores relativamente potentes.¹⁵¹

Outra diferença a considerar é a grande diferença nas estabilidades entre os complexos PPE-I e HLE-I, constatada por Knight, utilizando também *N*-carbamoil-2-azetidionas como inibidores. Assim, para o mesmo inibidor, a reactivação da

actividade da PPE é cerca de 9 vezes mais rápida comparada com a reactivação da actividade da HLE.¹⁵¹

4.3.1 *N*-Aril-5-metiloxazolidine-2,4-dionas

A inibição da PPE, pelos compostos *N*-benzil- e *N*-aril-5-metiloxazolidine-2,4-diona, **4.18a-d** e **3.23**, foi determinada pelo método de pré-incubação de Kitz e Wilson, previamente descrito, tendo-se utilizado o tampão HEPES 0,1 M, pH 7,2 a 25°C, e como substrato cromogénio da PPE a *N*-Suc-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilida.

Em presença de um largo excesso molar dos compostos **4.18a-d** e **3.23** em relação à PPE, não se observou a sua inactivação. Foram utilizadas concentrações de 3×10^{-3} M para **4.18a,b** e **3.23**, ($[I] = 600[PPE]$), de $7,5 \times 10^{-4}$ M para **4.18c** ($[4.18c] = 150[PPE]$) e de $1,5 \times 10^{-3}$ M para **4.18d** ($[4.18d] = 300[PPE]$)

Para avaliar a hipótese destes compostos se comportarem como substratos da PPE seguiu-se a hidrólise do composto **4.18d** por espectroscopia de U.V, na ausência e na presença da PPE, em HEPES, pH 7,2 a 25°C, com 2% de DMSO (v/v). Para uma concentração de 2×10^{-5} M de **4.18d**, observou-se uma constante de hidrólise de primeira-ordem, K_{obs} , de $4,22 \times 10^{-5} s^{-1}$ na ausência de PPE e de $5,00 \times 10^{-5} s^{-1}$ em presença de 8×10^{-7} M de PPE, concluindo-se assim, através desta amostragem, que as *N*-aril-5-metiloxazolidine-2,4-dionas sintetizadas não são substratos da PPE.

4.3.2 *N*-Acilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona e *N*-sulfonilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona

Nos ensaios preliminares realizados, utilizando o método de pré-incubação, verificou-se que os compostos **4.19** e **4.20** inibiam muito rapidamente a PPE, tornando-se este método inadequado na determinação do k_{obs} . Em alternativa é frequente a aplicação do método contínuo para o cálculo do k_{obs} .

No método contínuo, a PPE é adicionada a uma solução de tampão HEPES, pH 7,2 a 25 °C que contem o potencial inibidor e o substrato *N*-Suc-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilida,

sendo a absorvância (A) monitorizada a 390 nm durante 1200 s, após a adição da enzima. A monitorização do progresso da hidrólise de *N*-Suc-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilida em presença do inibidor e conseqüente libertação da *p*-nitroanilina traduz-se graficamente (A vs t) por um curva típica que pode ser descrita pela Equação 4.1.

$$A = v_s t + (v_0 - v_s) (1 - e^{-k_{obs} t}) / k_{obs} + A_0 \quad (4.1)$$

Nesta equação, A é a absorvância a 390 nm, v_0 é a velocidade da reacção a $t = 0$, v_s é a velocidade da reacção no estado estacionário, isto é, quando a libertação da *p*-nitroanilina se mantém praticamente constante assim como o valor de A ao longo do tempo, k_{obs} é a constante observada de velocidade de inibição de primeira-ordem e A_0 é a absorvância a $t = 0$.^{64,153}

As curvas obtidas pelo método contínuo, da inibição da PPE pelos compostos **4.19** e **4.20** a várias concentrações, estão representadas na Figura 4.1 e 4.2. Para ambos os inibidores, em qualquer das concentrações testadas, as curvas não são adequadas ao modelo representado pela Equação 4.1, principalmente porque não atingem um estado estacionário essencial para a definição do parâmetro v_s , tornando-se igualmente este método impróprio para o cálculo do k_{obs} .

O aumento gradual da libertação de *p*-nitroanilina que se verifica a partir sensivelmente dos 400 s, nas curvas de **4.19**, com concentrações de $0,1 \times 10^{-4}$ M e $0,3 \times 10^{-4}$ M, pode ser atribuída à instabilidade do complexo formado PPE-I, e subsequente recuperação da actividade da PPE que continua a degradar o substrato cromogénio. Este aspecto é ainda mais relevante para o composto **4.20**, cujas curvas do progresso de inibição parecem sugerir maior instabilidade no complexo acil-enzima formado (Figura 4.2).

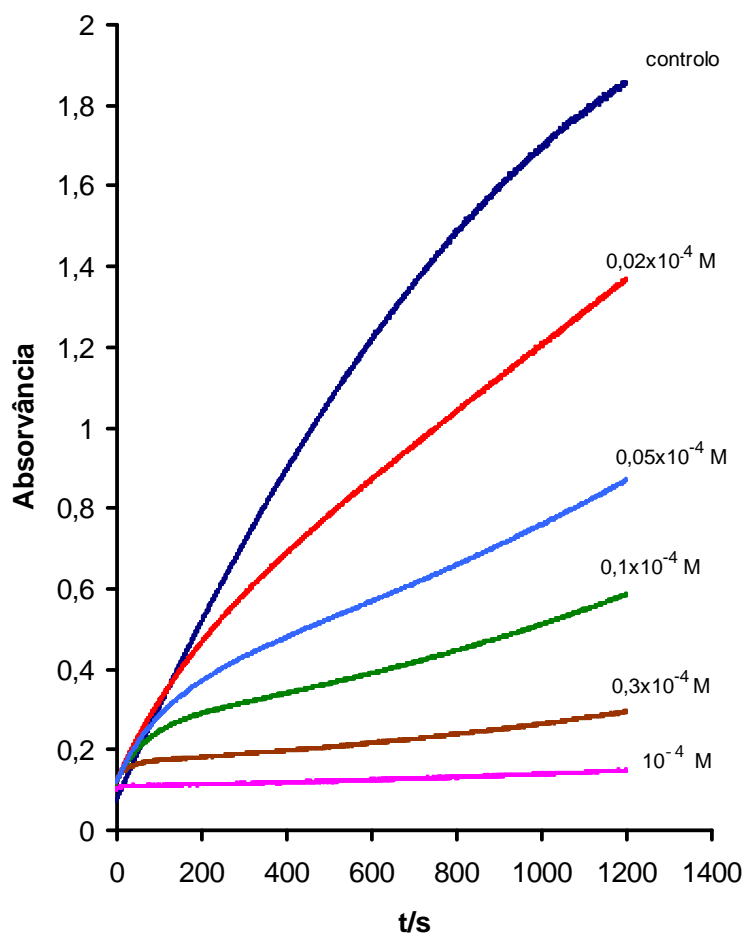
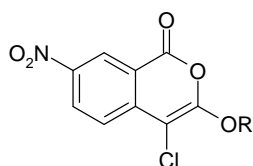


Figura 4.1- Curvas representativas do processo de inibição da PPE pelo composto **4.19** utilizando o método contínuo. A absorvância foi monitorizada a 390 nm para as reações em soluções que contêm 0,2 μ M de PPE, 0,3 mM de *N*-Suc-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilida e o inibidor **4.19** em tampão HEPES, pH 7,2 e 5% de DMSO (v/v) a 25°C.

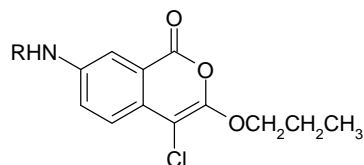
Harper e Kerrigan constataram resultados idênticos quando testaram as 3-alcoxi-4-cloro-7-nitroisocumarinas **4.21** e 7-(aminocarbonil)-4-cloro-3-propoxi-isocumarinas **4.22**, em ensaios *in vitro*. No método de pré-incubação, a inativação da PPE ou da HLE era muito rápida, com mais de 80% de inibição enzimática logo na primeira alíquota examinada, aos 6-15 s, e o método contínuo não era aplicável, como método alternativo, devido à instabilidade dos complexos acil-enzima. Os k_{obs} dos referidos inibidores foram determinados pelo método de pré-incubação, mas considerando que, para cada inibidor, o valor obtido para a respectiva constante de velocidade de inibição era o valor mínimo, do intervalo de valores possíveis, atendendo à inexactidão do

processo de cálculo. De facto, o k_{obs} era determinado utilizando apenas a actividade da enzima na ausência de inibidor e a actividade remanescente da enzima (v/v_0) obtida na primeira alíquota do ensaio de pré-incubação.^{154,155}



R = Me, Et

4.21



R = CH₃CO, CH₃SCH₂CO, CH₃CH₂OCO, CH₃CH₂HNCO

4.22

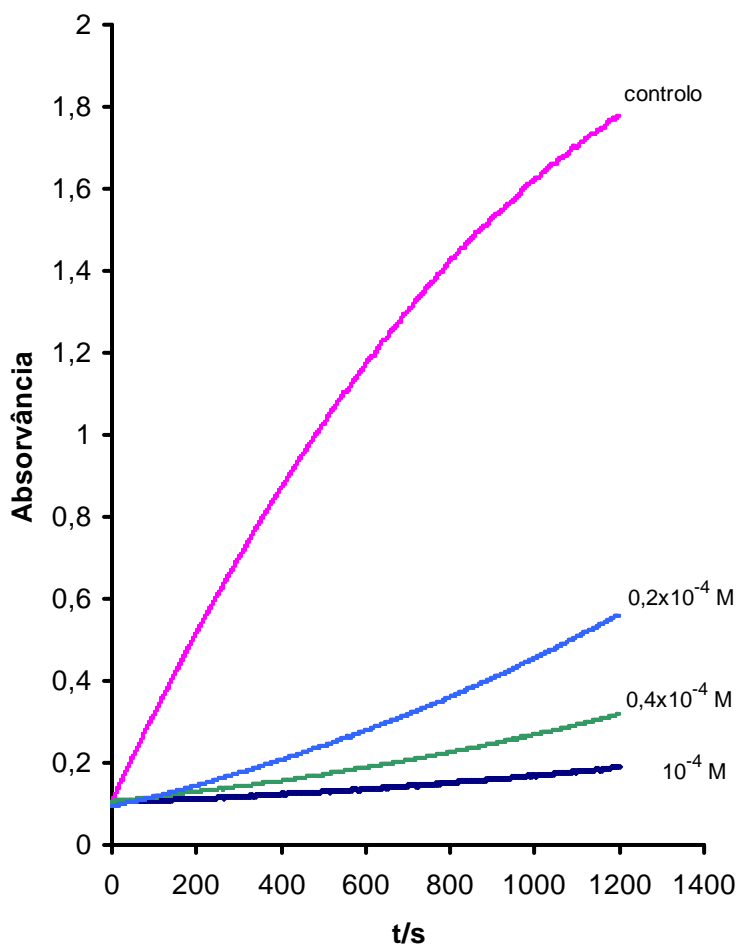


Figura 4.2- Curvas representativas do processo de inibição da PPE pelo composto **4.20** utilizando o método contínuo. As condições utilizadas são as mencionadas na Figura 4.1.

Neste trabalho foi adoptado o procedimento de Harper e Kerrigan para o cálculo da constante de inibição de primeira-ordem da PPE pelos compostos **4.19** e **4.20**.

O composto **4.19** provoca uma diminuição da actividade da PPE ao longo do tempo, atingindo um valor mínimo em função da concentração do inibidor. Esta concentração também afecta o processo de recuperação da actividade enzimática (Figura 4.3). Assim, quando a concentração de **4.19** é de 50 μM ($[I]=10[PPE]$), verifica-se uma inactivação enzimática de 81%, que aumenta para 89,9% com a duplicação da concentração do inibidor, conseguindo uma inactivação máxima de 96,2% em presença de 500 μM de **4.19** ($[I]=100[PPE]$).

No meio de incubação em que o inibidor está mais diluído a recuperação da actividade enzimática é mais evidente. Após a inibição máxima, a PPE recuperou 38,8% e 22% da sua actividade, no meio de incubação contendo 50 μM e 100 μM de **4.19**, em 60 e 67 min. No tempo que decorreu o ensaio (61 min) não se observou recuperação da actividade da PPE com concentrações de 500 μM do inibidor.

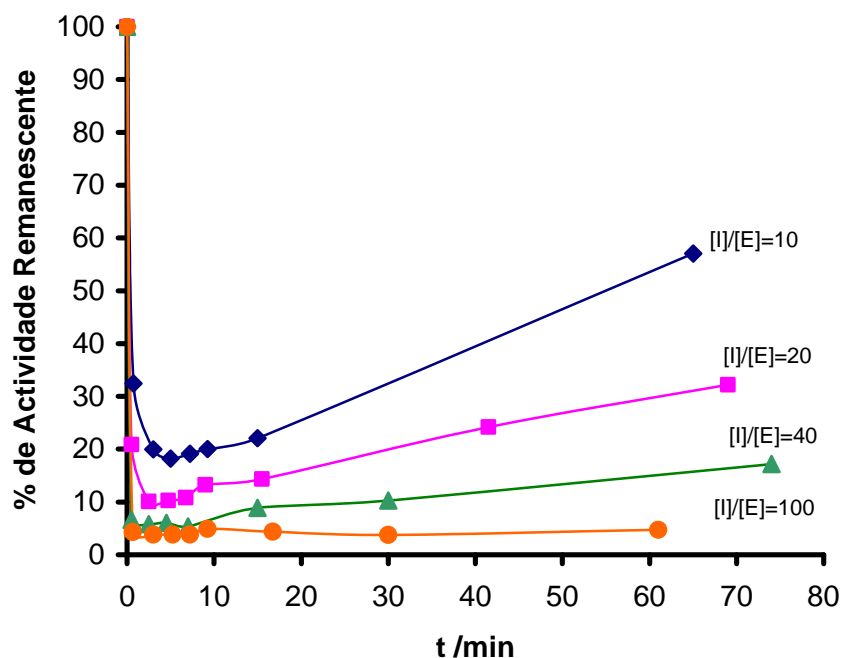


Figura 4.3- Inactivação e espontânea recuperação da actividade da PPE inibida pelo composto **4.19**. Concentrações de 50, 100, 200 e 500 μM de **4.19** foram incubadas com 5 μM de PPE em tampão HEPES, pH 7,2 a 25 $^{\circ}\text{C}$.

O comportamento do composto **4.20** em termos de inactivação da PPE é semelhante ao descrito para o composto **4.19**, contudo a grande diferença reside na recuperação da actividade da PPE (Figura 4.4). Os valores máximos de inibição que conseguem ser detectados, ocorrem aproximadamente após 30 s do início do ensaio e são de 37%, 76%, e 92% para concentrações de 50, 200 e 500 μM de **4.20**. Para estas concentrações, a recuperação da actividade da PPE é praticamente total após 10 min, 22 min e 72 min do início do ensaio de pré-incubação. O motivo para esta rápida recuperação da actividade enzimática é provavelmente o que já foi apontado para o ensaio contínuo: a grande instabilidade do complexo PPE-**4.20**.

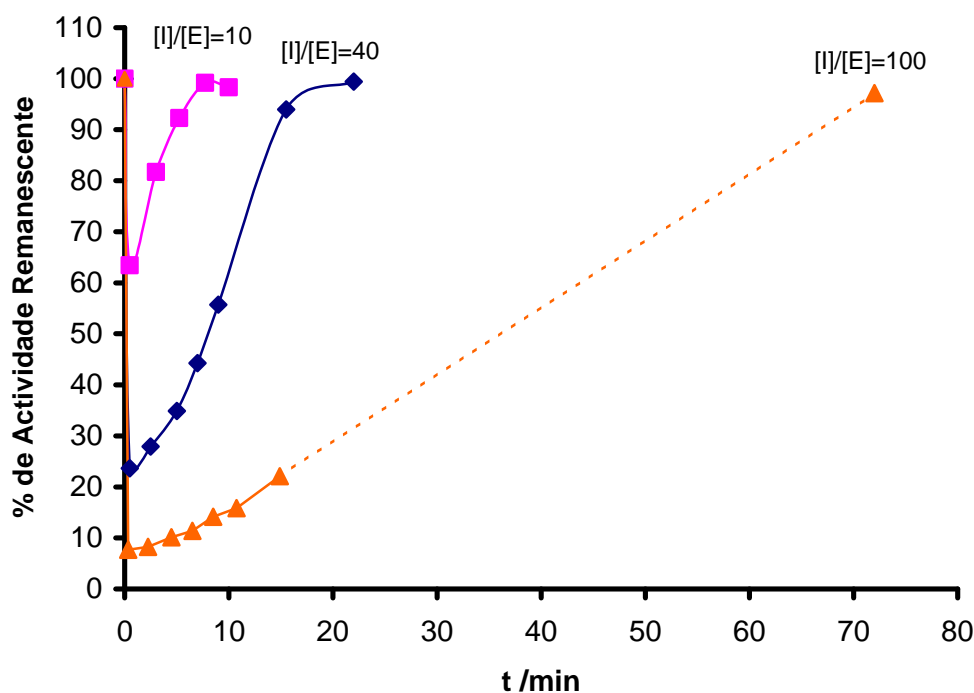


Figura 4.4- Inactivação e espontânea recuperação da actividade da PPE inibida pelo composto **4.20**. Concentrações de 50, 200 e 500 μM de **4.20** foram incubadas com 5 μM de PPE em tampão HEPES, pH 7,2 a 25 °C.

As constantes de inibição de segunda-ordem, $k_{\text{obs}}/[I]$, dos compostos **4.19** e **4.20** foram obtidas pelos declives das rectas apresentadas na Figura 4.5, e representam o valor mínimo para essas constantes. O valor de k_{obs} foi calculado, considerando somente v_0 e v_1 , sendo v_1 a velocidade de degradação do substrato cromogénio pela

PPE após 20-30s de incubação do inibidor **4.19** ou **4.20** com a enzima (primeira alíquota). Nestas condições, a actividade inibitória de **4.19** e **4.20** é superior a $467,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $254,6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente.

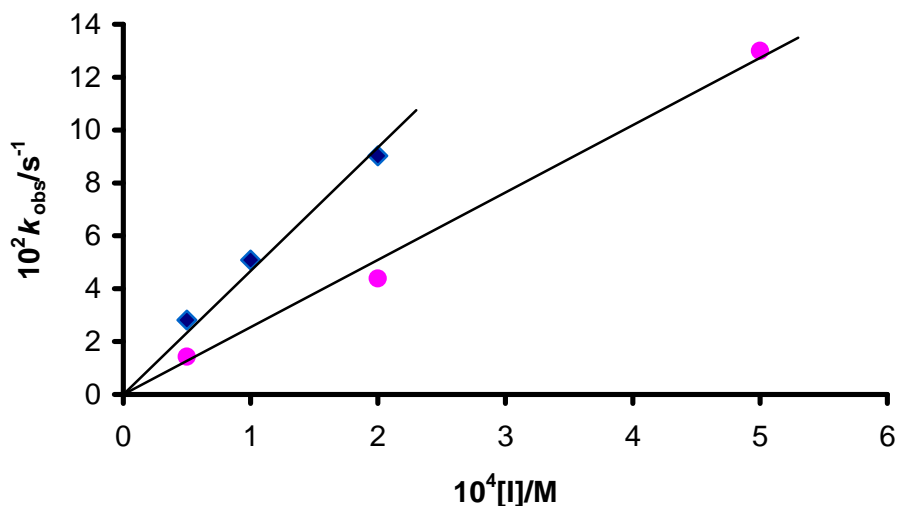


Figura 4.5- Rectas das constantes de velocidade de primeira-ordem, k_{obs} , para a inibição da PPE, em função da concentração do inibidor **4.19** (◆), e **4.20** (●).

Para a análise da eficiência da inibição do composto **4.19** recorreu-se à titulação da actividade da PPE por aquele inibidor. Esta titulação permite determinar o número de moléculas do inibidor necessárias para inactivar uma molécula de enzima. O composto **4.20** por provocar uma inibição transitória da PPE não é o inibidor mais apropriado para este tipo de ensaio. Utilizando o mesmo procedimento do método de pré-incubação, 15 minutos após a incubação de determinada concentração de **4.19** com a PPE, retirou-se uma alíquota do meio de incubação, seguindo-se a determinação da velocidade de degradação do substrato pela enzima, v . O número de equivalentes de **4.19** requeridos para a inactivação da PPE foi calculado pelo gráfico da fracção de actividade remanescente da enzima aos 15 min, v/v_0 , versus a razão inicial entre o inibidor e enzima, isto é $[\mathbf{4.19}]/[E]_0$. Verificou-se uma relação linear entre as duas variáveis até uma inactivação próxima dos 70% (Figura 4.6). A extrapolação desta parte linear da curva para $v/v_0=0$, demonstra que é necessário aproximadamente 9,3 equivalentes de **4.19** para a inactivação completa da PPE, resultado que confere ao inibidor **4.19** uma boa eficiência na inactivação da PPE. Comparável a esta eficiência, encontra-se na

literatura o derivado β -lactâmico **4.23**, que necessita de 9 e 4 equivalentes molar para a completa inativação da PPE e HLE, respectivamente.⁸⁸

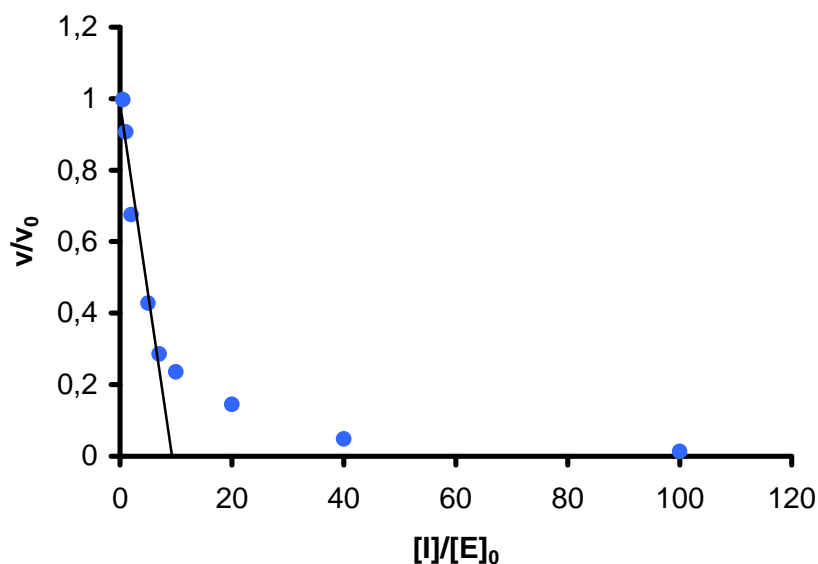
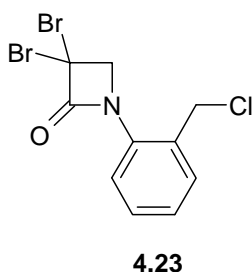


Figura 4.6- Inativação da PPE em função da razão molar entre o inibidor **4.19** e a PPE ($5\mu\text{M}$) em tampão HEPES, pH 7,2 a 25°C (método de pré-incubação).



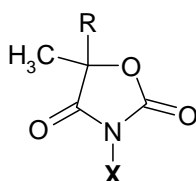
4.4 Estabilidade de Algumas Oxazolidine-2,4-dionas Sintetizadas

4.4.1 Hidrólise em Tampões Fosfato e HEPES

A hidrólise química das oxazolidine-2,4-dionas seleccionadas, **4.18d**, **4.19** e **4.20**, nos tampões fosfato, pH 7,4 a 37°C e HEPES, 0,1 M, pH 7,2 a 25°C , foi monitorizada por espectroscopia de U.V. Os valores das constantes de *pseudo*-primeira-ordem, k_{obs} ,

assim como os respectivos tempos de semi-vida, $t_{1/2}$, em ambos os tampões, encontram-se na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Valores de k_{obs} e respectivos tempos de semi-vida em tampão fosfato, pH 7,4 a 37°C e em tampão HEPES, pH 7,2 a 25 °C dos compostos **4.18d**, **4.19** e **4.20**; $[4.18d]_0 = [4.19]_0 = [4.20]_0 = 4 \times 10^{-5}$ M.

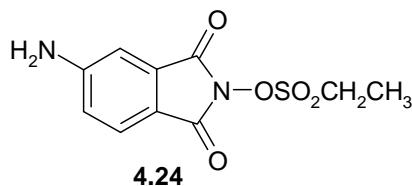


Comp	R	X	Tampão Fosfato ^a		Tampão HEPES ^b	
			$10^4 k_{obs}/s^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$	$10^4 k_{obs}/s^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$
4.18d	H	4-NO ₂ C ₆ H ₄	2,98	38,7	0,515	224
4.19	Me	4-MeOC ₆ H ₄ CO	6,93	16,7	5,50	21,0
4.20	Me	4-MeC ₆ H ₄ SO ₂	16,8	6,86	8,65	13,4

^a PBS pH=7,4; 37°C; ^b pH=7,2; 25°C
Soluções com 0,4 % de DMSO

Em tampão fosfato, os compostos escolhidos são todos muito instáveis com tempos de semi-vida que oscilam entre 6,86 e 38,7 min. Reconhecendo-se que o grupo exocíclico arilsulfonilo exerce um maior efeito eletroatractor, não é de surpreender a grande reactividade química da correspondente oxazolidine-2,4-diona. A instabilidade do composto **4.20** é análoga ao derivado da ftalimida **4.24**, com um tempo de semi-vida de 6,1 min em tampão Tris, pH 7,5.¹⁵⁶

Embora os compostos **4.19** e **4.20** sejam promissores como inibidores da PPE e possivelmente da HLE, a sua instabilidade a pH e temperatura fisiológica torna-os completamente inadequados, sendo necessário apropriadas alterações estruturais de maneira a diminuir a reactividade química.



Embora sejam ainda muito instáveis, os compostos **4.19** e **4.20** são ligeiramente mais estáveis em tampão HEPES do que em tampão fosfato.

4.4.2 Hidrólise Alcalina

A hidrólise alcalina foi estudada para os compostos **3.16bM**, **3.23**, **4.19** e **4.20** por espectroscopia de U.V. Este estudo foi realizado a 25 °C, em soluções de tampão borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) dado que as reacções em soluções de hidróxido de sódio eram muito rápidas, tendo um erro experimental elevado. A força iónica das soluções foi mantida constante a 0,50 M por adição de NaClO_4 e por questões de solubilidade dos substratos foi necessário adicionar 20% de acetonitrilo. O pH das soluções finais foi medido por um potenciómetro.

As constantes catalíticas de segunda-ordem, k_{HO^-} (Tabela 4.3) foram determinadas a partir dos gráficos da constante de *pseudo*-primeira-ordem, k_{obs} , em função de $[\text{HO}^-]$ como mostram as Figuras 4.7 e 4.8. A inexistência de ordenada na origem indica a ausência de reacção espontânea, e como tal, k_{obs} é definida pela Equação 4.2, onde k_{HO^-} representa o coeficiente de velocidade de segunda-ordem para o processo com catálise básica específica.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{HO}^-}[\text{HO}^-] \quad (4.2)$$

É de realçar, que por estes compostos possuírem vários centros electrofilicos, a constante de velocidade de *pseudo*-primeira-ordem observada para a hidrólise alcalina destes compostos resulta da contribuição, em maior ou menor grau, de todas as reacções paralelas de hidrólise que ocorrem nos vários centros susceptíveis de ataque do ião hidróxido.

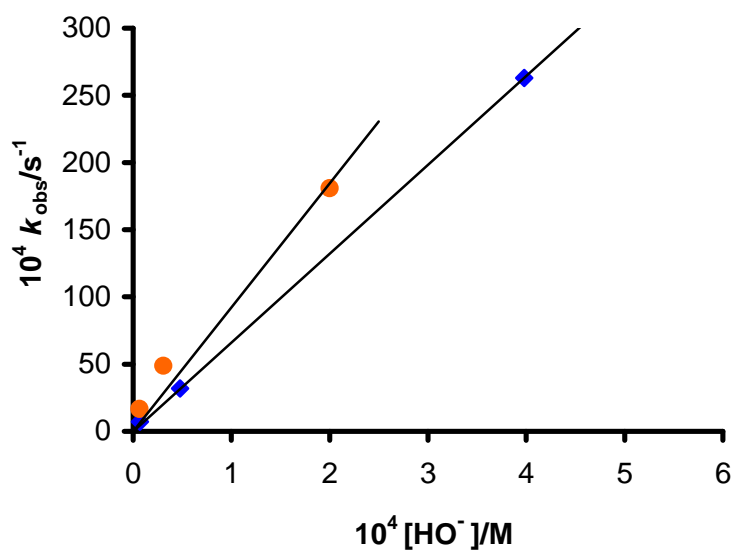


Figura 4.7- Efeito da concentração de HO^- sobre a velocidade de hidrólise dos compostos **3.16bM** (\blacklozenge) e **4.20** (\bullet) em soluções de tampão borato com 20% de acetonitrilo (v/v) a 25°C; $\mu=0,50$ M (NaClO_4); $[\mathbf{3.16bM}]_0=2\times 10^{-5}$ M; $[\mathbf{4.20}]_0=4\times 10^{-5}$ M.

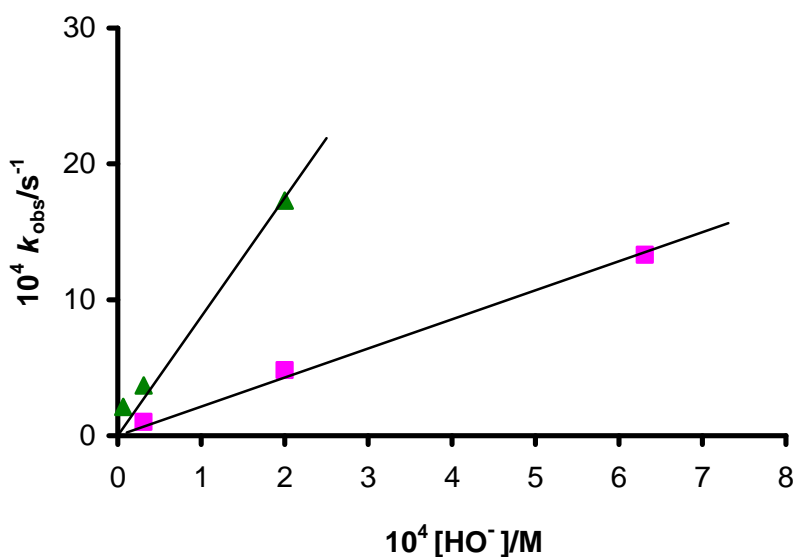
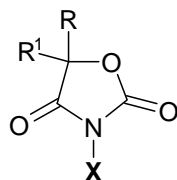


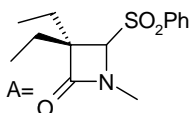
Figura 4.8- Efeito da concentração de HO^- sobre a velocidade de hidrólise dos compostos **3.23** (\blacksquare) e **4.19** (\blacktriangle) em soluções de tampão borato com 20% de acetonitrilo (v/v) a 25°C; $\mu=0,50$ M (NaClO_4); $[\mathbf{3.23}]_0= [\mathbf{4.19}]_0=4\times 10^{-5}$ M.

Tabela 4.3- Constantes de velocidade de inibição de segunda-ordem em HEPES, pH 7,2 a 25°C e constantes de velocidade de segunda-ordem para a hidrólise alcalina em tampão borato com 20% de acetonitrilo (v/v) a 25 °C de algumas oxazolidine-2,4-dionas.



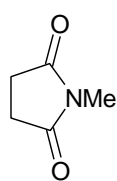
Comp.	R	R ¹	X	$k_{\text{obs}}/[I] / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{HO}^-} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	EREF ^a
3.16bM	A	H	4-MeOC ₆ H ₄	43,2 ^b	66,1	---
3.23	Me	H	4-MeOC ₆ H ₄	I	2,14	---
4.19	Me	Me	4-MeOC ₆ H ₄ CO	>467 ^c	8,75	>53,4
4.20	Me	Me	4-MeC ₆ H ₄ SO ₂	>255 ^c	92,2	>2,77

I-inactivo; ^a “enzyme rate-enhancement factor”; ^b inibição da HLE; ^c inibição da PPE

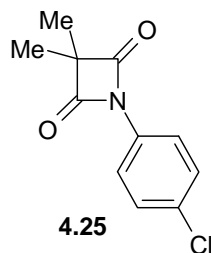


Os valores obtidos para k_{HO^-} são bastante elevados (Tabela 4.3), representando a rápida hidrólise em meio básico dos derivados testados e que é consequência da sua reactividade intrínseca.

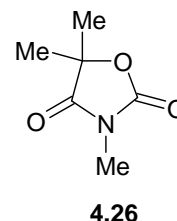
O composto menos reactivo é a *N*-ariloxazolidine-2,4-diona **3.23**, com um k_{HO^-} de 2,14 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, ligeiramente superior ao valor encontrado para a constante alcalina, a 30°C, da *N*-metilsucinimida e bastante inferior ao valor de k_{HO^-} da 4-oxo- β -lactama **4.25**, de elevada tensão anelar (25°C, 20% de acetonitrilo (v/v)). Contudo, o valor é idêntico ao calculado na hidrólise alcalina da trimetadiona **4.26**, a 30°C.^{38,57,157}



$$k_{\text{HO}^-} = 0,825 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



$$k_{\text{HO}^-} = 9,67 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



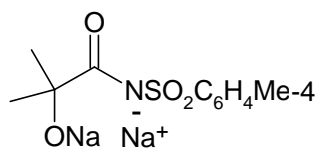
$$k_{\text{HO}^-} = 2,40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

A adição de mais um grupo carbonilo exocíclico ao anel de oxazolidine-2,4-diona, como se verifica no derivado **4.19**, aumenta por um lado a reactividade do anel, uma vez que o N-3 ligado ao grupo carbonilo em C-4 (porção amida do anel) ou ao grupo carbonilo em C-2 (porção carbamato) é um melhor grupo abandonante por ser um azoto acilado. Por outro lado, um novo centro electrofílico permite uma decomposição adicional do substrato, traduzindo-se este somatório de centros electrofílicos, potencialmente hidrolisáveis, numa quadruplicação do k_{HO^-} em relação ao composto **3.23**.

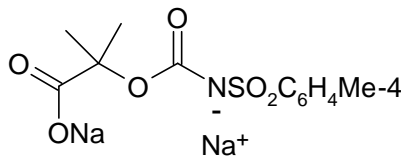
A alteração do grupo carbonilo exocíclico para um grupo sulfonilo incrementa cerca de onze vezes a constante de hidrólise alcalina, k_{HO^-} , da oxazolidine-2,4-diona. Quando existem os dois tipos de centros electrofílicos numa molécula como se verifica em **4.20**, os nucleófilos atacam preferencialmente o(s) grupo(s) carbonilo de maneira a libertar o anião sulfonamida, como tal o ataque do ião hidroxido ao grupo sulfonilo não é uma reacção a considerar para justificar o aumento do k_{HO^-} . No entanto, em sulfonamidas com elevada tensão anelar e activadas como as *N*-acil- β -sultamas ou as 3-oxo- β -sultamas, verifica-se a hidrólise com cisão da ligação S-N e libertação do grupo amida.^{38,55}

O aumento da reactividade intrínseca da *N*-arilsulfoniloxazodine-2,4-diona **4.20**, em relação à **4.19** pode ser atribuída ao facto do grupo sulfonilo possuir um elevado carácter electrotractor o qual activa os grupos carbonilo endocíclicos em relação ao ataque nucleofílico do HO^- , conjugado com a grande nucleofugacidade dos aniões *N*-acilssulfonamida **4.27** e *N*-alcoxicarbonilssulfonamida **4.28**, que resultam da hidrólise da porção amida ou da porção carbamato, por cisão das respectivas ligações C-N da oxazolidine-2,4-diona. A grande nucleofugacidade destes aniões explica-se pela

estabilização da carga negativa do átomo do azoto, devido ao efeito polarizante do grupo sulfonilo, como sugere Sykes e colaboradores³⁸, possivelmente associado ao efeito de ressonância do grupo carbonilo adjacente.

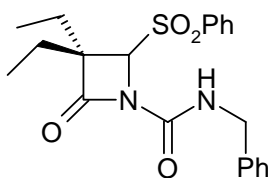


4.27



4.28

Os compostos **3.16bM** e **3.23** divergem estruturalmente no substituinte em C-5: o primeiro tem uma β -lactama substituída e o segundo, um grupo metilo. Surpreendentemente, a esta diferença corresponde uma proporção de 31:1 entre as constantes de velocidades de segunda-ordem da hidrólise básica dos dois compostos. Por outro lado, os compostos **3.16bM** e **4.29** têm os mesmos substituintes em C-3 e C-4 da β -lactama, enquanto que **4.29** tem um melhor grupo abandonante que o grupo de **3.16bM**, no entanto, a proporção entre as duas constantes de velocidade é de 465:1.¹⁵² Sabendo que o mecanismo de hidrólise de **4.29** é por ataque ao carbonilo β -lactâmico¹⁵² e considerando a magnitude das duas constantes k_{HO^-} , exclui-se como processo de hidrólise a abertura da β -lactama no composto **3.16bM**. Assim, a rápida hidrólise de **3.16bM** só pode ser atribuída ao ataque aos grupos carbonilo da oxazolidine-2,4-diona, activados pela presença de N-1 da β -lactama em C-5. Indubitavelmente são necessários estudos mais detalhados que permitam definir os factores que provocam a rápida decomposição deste derivado em meio básico.



4.29

$$k_{\text{HO}^-} = 0,142 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

EREF-“enzyme rate enhancement factor”

O EREF (Tabela 4.3) é um indicador quantitativo da capacidade de determinada enzima em usar todo o seu aparato enzimático para aumentar a velocidade da reacção que catalisa. Considerando que determinado composto se comporta como um inibidor então o EREF é dado pelo coeficiente entre a constante de velocidade de inibição de segunda-ordem, k_{inact}/K_i ou $k_{\text{obs}}/[I]$, e a constante de velocidade de segunda-ordem da reacção de hidrólise do inibidor pelo HO^- , k_{HO^-} . O EREF aumenta quando existe um máximo reconhecimento molecular, através de interacções não covalentes favoráveis entre a enzima e o inibidor e a reactividade intrínseca do inibidor é suficiente para que ocorra uma rápida acilação da enzima. Em contrapartida, a hidrólise química do inibidor deve ter limites, sendo apropriados os valores de k_{HO^-} entre 0,01 e 1,0 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Segundo Sykes e colaboradores, a magnitude da constante de velocidade de segunda-ordem para a hidrólise alcalina de potenciais inibidores enzimáticos é um indicador para avaliar não só o poder acilante do inibidor mas também a sua estabilidade hidrolítica e metabólica.³⁸

O valor de k_{HO^-} para a oxazolidine-2,4-diona **3.23** indica uma reactividade intrínseca suficiente para facilmente acilar a PPE, sendo provável que a sua falta de actividade inibitória, se deva fundamentalmente a uma deficiente reconhecimento primário devido à presença de um único grupo metilo em C-5.

Para o inibidor **3.16bM** o cálculo do EREF não tem significado, porque a acilação da HLE e a hidrólise alcalina do inibidor ocorrem em diferentes grupos carbonilo. É o carbonilo da β -lactama que acila a enzima inactivando-a, enquanto que o valor de k_{HO^-} é proveniente essencialmente da hidrólise dos grupos carbonilo da oxazolidine-2,4-diona.

Os restantes valores de EREF são baixos, embora sejam superiores a um, significando que a acilação do grupo hidroxilo do resíduo de Ser-195 é favorecida enzimaticamente em relação ao ataque químico dos grupos carbonilo pelo hidroxido. Estes resultados indicam que o reconhecimento enzimático dos inibidores é muito pobre

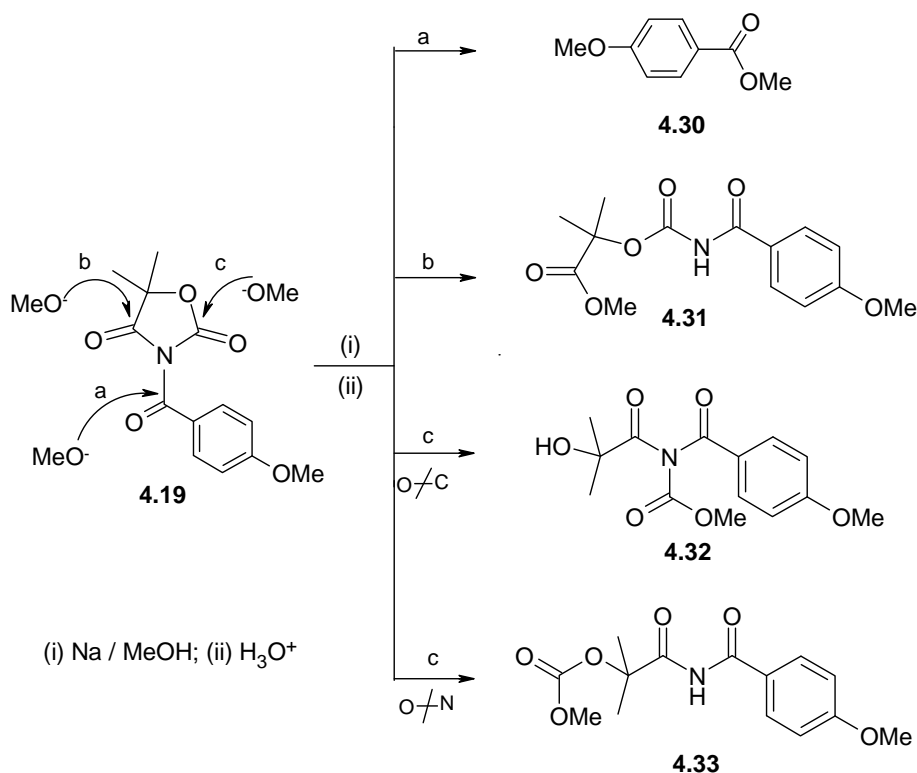
e a inibição por acilação da enzima se faz essencialmente à custa de uma grande facilidade de transferência do grupo acilo dos inibidores para a enzima.

4.5 Proposta de Mecanismo de Inativação da Elastase Suína

A metanólise é referida na literatura como um bom modelo para prever o processo de acilação de proteases de serina, como a PPE, e a partir daí tirar elações sobre o respectivo mecanismo de inibição. Groutas e colaboradores utilizaram este método por exemplo em derivados de sacarinas e de succinimidas.^{65,158}

Metanólise de N-acilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona (4.19)

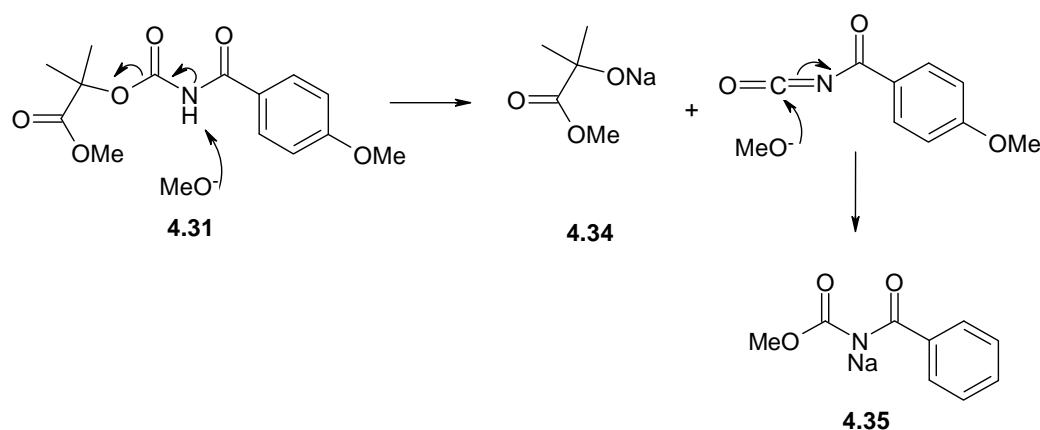
Atendendo que o composto **4.19** tem três centros electrofílicos que podem sofrer ataque nucleofílico por parte do ião metóxido, é possível considerar a ocorrência de três reacções paralelas e a formação dos quatro produtos representados no Esquema 4.6.



Esquema 4.6

O composto **4.19** reagiu rapidamente com um equivalente molar de metóxido de sódio gerado no meio reaccional por adição de sódio ao metanol super-seco. A reacção foi controlada por ccd, a qual indicava a formação de 3 produtos. O resíduo obtido após evaporação do solvente, foi acidificado com HCl aquoso e os produtos foram extraídos com diclorometano. O isolamento dos produtos efectuou-se por cromatografia preparativa obtendo-se os compostos **4.30** e **4.31** com rendimentos de 29 % e 16 %, respectivamente. Não foi possível isolar o terceiro produto por este se encontrar possivelmente em quantidades vestigiais.

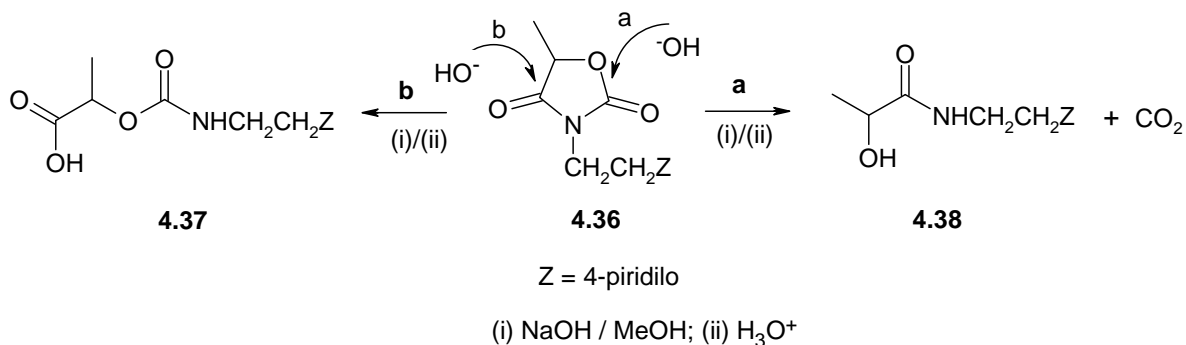
A ordem de reactividade dos carbonilos presentes em **4.19**, e de acordo com os rendimentos obtidos, é aparentemente: carbonilo exocíclico > carbonilo em C-4 > carbonilo em C-2. Pode-se colocar a hipótese do composto **4.30** se formar por reacção subsequente entre o composto **4.31** e o metóxido, apesar das restrições estequiométricas. Esta hipótese é refutada em termos químicos, uma vez que a reacção ácido-base entre o ião metóxido e o composto **4.31** é certamente favorecida em relação ao ataque nucleofílico do ião ao carbonilo do anel aromático (Esquema 4.7). Como produtos finais seriam obtidos os compostos **4.34** e **4.35**.



Esquema 4.7

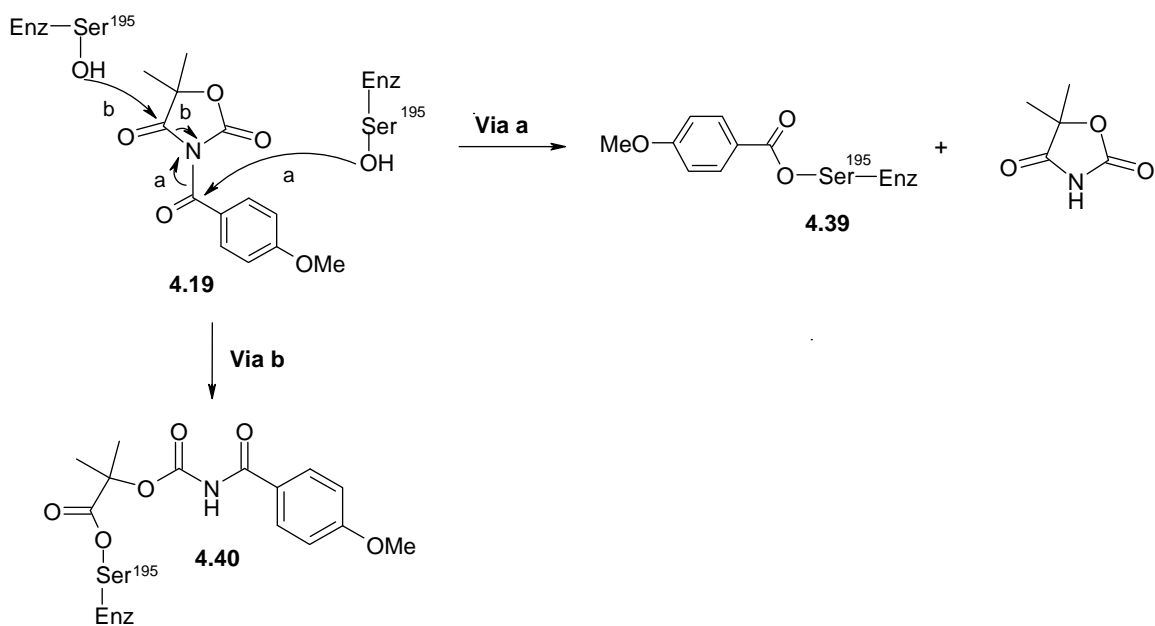
A maior reactividade do carbonilo em C-4 em relação ao carbonilo em C-2 da oxazolidine-2,4-diona, foi corroborada por Seymour e colaboradores quando hidrolisaram a *N*-piridiletioxazolidene-2,4-diona **4.36**, em meio com ligeiro excesso de hidróxido de sódio a 20 °C. Foram isolados como produtos de hidrólise o α -

carboniloxicarbamato **4.37** e a α -hidroxiamida **4.38**, com 52% e 12% de rendimento, respectivamente. As reacções **a** e **b** de formação dos produtos estão representadas no Esquema 4.8.¹⁵⁹ Também o fungicida famoxadona **4.5**, uma *N*-anilino-oxazolidine-2,4-diona, sofre as mesmas reacções em meio básico, formando-se os correspondentes α -hidroxiamida e α -carboniloxicarbamato.¹⁴⁶



Esquema 4.8

Considerando os produtos formados na metanólise do derivado **4.19**, propõe-se o seguinte mecanismo de inibição da PPE (Esquema 4.9), com formação do complexo maioritário PPE-I, **4.39** (Via a) e do complexo minoritário **4.40** (Via b).

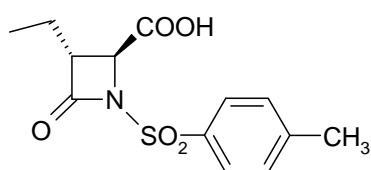
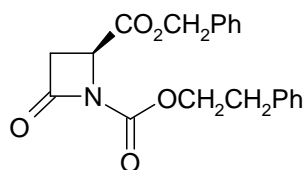


Esquema 4.9

No caso do inibidor **4.20** o mecanismo de inibição da PPE será por acilação, por ataque do grupo hidroxilo do resíduo de serina ao carbonilo da amida (C-4) da oxazolidine-2,4-diona, não se colocando como hipótese mecanística a sua sulfonilação. Por exemplo, a *N*-sulfonilaril-2-azetidionona **4.41** inibe a PPE com a formação de um complexo acil-enzima, que foi comprovado por cristalografia de Raio X.⁸⁶

Verifica-se que quando existem num anel heterocíclico, um grupo carbonilo e um grupo sulfonilo, como nos derivados das sacarinas e das tiadiazolidinonas, a enzima tem preferência para o grupo carbonilo ficando acilada.^{19,73} De facto, só foi confirmada a sulfonilação da PPE quando o inibidor é uma *N*-acil- β -sultama onde o grupo sulfonilo endocíclico está activado.^{55,56,160}

O ataque do grupo hidroxilo do resíduo da Ser-195 a um carbonilo exocíclico não é inédito deste trabalho. Gérard e colaboradores, ao procederem à hidrólise enzimática do composto 1,4-bis(alcoxicarbonil)-2-azetidionona **4.42** observaram que a PPE hidrolisava o éster em C-4 em vez da amida da β -lactama ou do carbamato em N-1.⁹⁴

**4.41****4.42**

Em resumo, quando a 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona é activada por acilação ou sulfonação de *N*-3 (**4.19** e **4.20**), desenvolvem-se agentes acilantes da PPE, que inibem rapidamente e totalmente a enzima, ($[I]=100[PPE]$) com constantes de velocidade de inibição de segunda-ordem superiores a 255 e 467 $M^{-1} s^{-1}$. Contudo a recuperação da actividade enzimática, num meio com excesso de inibidor, é igualmente rápida e total principalmente no derivado *N*-sulfonilaril-5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona.

São compostos instáveis em tampão fosfato (pH 7,4 a 37°C) com tempos de semi-vida de 16,7 min e 6,86 min, e portanto pouco apropriados farmacologicamente. Em meio básico apresentam constantes de velocidade de hidrólise elevadas, com valores de 4,8 e 61 $M^{-1} s^{-1}$, indicativas do elevado potencial de transferência do grupo acilo, isto é,

de uma acilação rápida da enzima, no entanto, segundo os valores calculados para o EREF, o reconhecimento enzimático destes derivados é diminuto.

O mecanismo proposto para a inibição da PPE pela *N*-acilariloxazolidine-2,4-diona **4.19**, envolve a acilação da enzima, principalmente pelo carbonilo exocíclico da oxazolidine-2,4-diona.

Conclusões Gerais

A análise dos resultados apresentados ao longo desta dissertação permite tirar as seguintes conclusões:

1- Sintetizaram-se duas séries de derivados N^1 -alquil- β -lactâmicos. Na primeira série, as N -(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas, em teste *in vitro*, demonstraram que são fracos inibidores da HLE, com constantes de inibição de segunda-ordem que variam entre 40 a 104 $M^{-1}s^{-1}$, calculadas nos primeiros 15 a 25 minutos de inibição bifásica. Neste período, a inibição da actividade da HLE é de 14 a 25 %, continuando a aumentar gradualmente ao longo do tempo até um máximo de 60%, em alguns derivados, mantendo-se este resultado ao fim de 24 h. A ausência de recuperação da actividade pela HLE durante o tempo de ensaio sugere uma inibição irreversível. A pH 7,4 e à temperatura de 37°C são compostos que se hidrolisam muito lentamente, sendo portanto fracos acilantes de nucleófilos.

Na segunda série, as N -(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas são os derivados mais promissores, embora apresentem uma actividade inibitória na HLE análoga aos derivados da primeira série com constantes de inibição de segunda-ordem que variam entre 24 a 144 $M^{-1} s^{-1}$. A grande diferença reside na inibição que provocam na HLE. Inicialmente, a actividade enzimática é reduzida a 25 % continuando a diminuir lentamente para um mínimo de 3-10%, no caso dos inibidores mais potentes, que estruturalmente são aqueles que apresentam grupos electroattractores em C-4 do anel β -lactâmico. No período de 24h não se observou recuperação espontânea da actividade da HLE, apontando também este resultado para uma inibição irreversível. Atribui-se à presença do anel de oxazolidine-2,4-diona a causa da instabilidade destes derivados, que a pH fisiológico têm tempos de semi-vida que variam entre 0,7 e 12 h.

Considerando estes dados, ficou demonstrado neste trabalho que a derivatização por N^1 -alquilação de β -lactamas é pouco eficiente na inibição da HLE em comparação com as N -carbamoil-2-azetidionas. A reactividade intrínseca da β -lactama é insuficiente quando N-1 se liga a um grupo alquilo, sendo essencial a sua ligação a um grupo moderadamente electroattractor para que ocorra um aumento na potência inibitória.

2- As oxazolidine-2,4-dionas activadas por ligação de N-3 ao grupo acilaril, **4.19**, ou sulfonilaril, **4.20**, inactivam a PPE com constantes de segunda-ordem superiores a $445 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $255 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. A inibição é total e eficiente quando $[I]=100[\text{PPE}]$. Na realidade, são necessários 9,3 equivalentes de *N*-acilariloxazolidine-2,4-diona para a inibição de 1 equivalente de PPE. Porém não são inibidores viáveis porque:

(i) A inibição é transitória, observando-se uma rápida recuperação da actividade enzimática, especialmente para o composto **4.20**, possivelmente devido à formação de complexos acilados instáveis, PPE-I.

(ii) São compostos instáveis em tampão fosfato, pH 7,4 a 37 °C, com tempos de semi-vida de 7 min (**4.20**) e 17 min (**4.19**).

(iii) O seu reconhecimento enzimático é diminuto, de acordo com os valores de EREF e a inibição por acilação da PPE deve-se essencialmente a uma boa transferência do grupo acilo como comprovam os elevados valores de k_{OH^-} ($8,8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $92,2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para **4.19** e **4.20**, respectivamente).

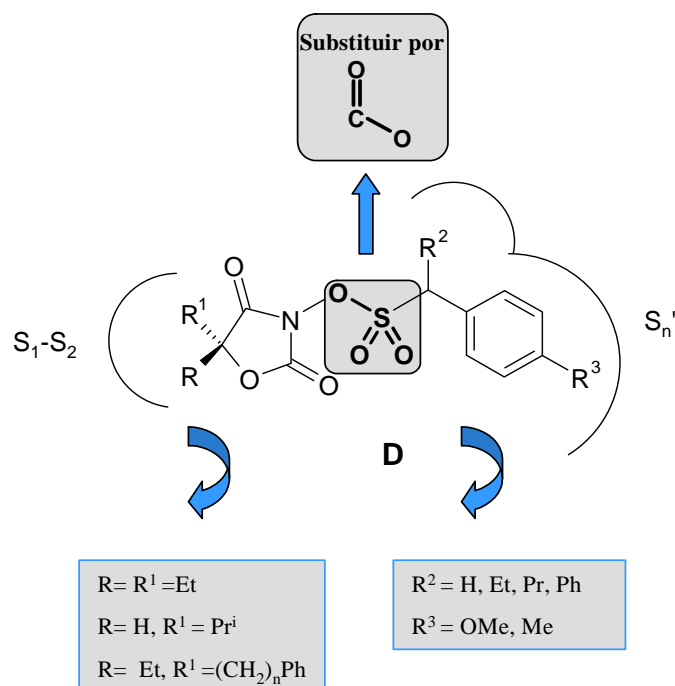
Através da introdução de substituintes adequados na estrutura base da oxazolidine-2,4-diona pode-se alcançar um maior reconhecimento enzimático e em simultâneo aumentar a estabilidade dos derivados, minimizando os inconvenientes anteriormente mencionados. No entanto, como a rápida recuperação da actividade enzimática pode ser atribuída, em parte, à PPE (c.f. Seccção 4.3), recomenda-se que os ensaios enzimáticos dos compostos sintetizados e dos compostos que a seguir se sugerem sejam executados utilizando a HLE.

O composto **D** reúne várias alterações estruturais que podem favorecer a actividade inibitória das oxazolidine-2,4-dionas na HLE e conferir-lhe adequadas propriedades farmacocinéticas.

Os grupos etilo ou isopropilo em C-5 podem aumentar o reconhecimento enzimático por interacção com o sub-sítio S_1 e o substituinte $(\text{CH}_2)_n\text{Ph}$ ($n= 1-3$) por interacção com o sub-sítio S_2 . Em simultâneo, estes grupos podem diminuir a hidrólise química ao provocarem um impedimento estereoquímico ao carbonilo em C-4, o mais susceptível de ataque nucleofílico. Mulchande e colaboradores observaram que a substituição dos dois grupos metilo em C-3 da *N*-(4-clorofenil)azetidine-2,4-diona por

dois grupos etilo diminuía o k_{OH^-} de $9,67 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para $0,581 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sem que a actividade inibitória fosse afectada.⁵⁷

Por sua vez, para diminuir a reactividade do anel, sugere-se a ligação de N-3 a grupos menos electroatractores que o carbonilo ou o sulfonilo como o carboniloxi ou o sulfoniloxi. A interacção com sub-sítios de ligação remota da enzima, possivelmente com a zona S' , pode ser efectuada pelos substituintes R^2 e R^3 , favorecendo também o reconhecimento enzimático.



Capítulo 5

Parte Experimental

5.1 Equipamento

Os pontos de fusão indicados na caracterização dos compostos sintetizados foram determinados numa placa de Kofler e não estão corrigidos.

Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrofotómetro Nicolet Impact 400 FTIR, acoplado a um microprocessador, utilizando os compostos puros, normalmente em filme sobre discos de cloreto de sódio. Indicam-se, para cada composto, as bandas de absorção mais significativas.

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN foram traçados em espectrómetros JEOL PMX-60 (60 MHz), JEOL LA 300 (300 MHz), JEOL JNM-EX 400 (400 MHz) ou Bruker 400 Ultra-Shield (400 MHz), utilizando como solventes clorofórmio deuterado (CDCl_3), acetonitrilo deuterado (CD_3CN) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Os desvios químicos, δ , são expressos em partes por milhão (ppm), em referência ao padrão interno de Me_4Si (TMS).. As constantes de acoplamento, J , são expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de massa de baixa resolução, obtidos por impacto electrónico foram realizados num espectrómetro VGMass Lab 20-250 ou num HP5988A, por sua vez os espectros de massa por ESI (ESI-MS) foram traçados num espectrómetro VG Quattro LCMS.

As análises elementares foram efectuadas no Instituto de Tecnologia Nuclear, Sacavém, Portugal, na Medac Ltd, Brunel Science Centre, Englefield Green, Egham, TW20 0JZ, UK e na Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

As leituras de pH foram realizadas num potenciómetro micro pH 2002 Crison.

Os estudos cinéticos por espectroscopia de ultravioleta foram efectuados nos espectrofotómetros Shimadzu UV-2100 e Shimadzu UV-1603, acoplados aos controladores de temperatura CPS-260, de maneira a manter uma temperatura constante nas células, com uma precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$. Nos estudos cinéticos por cromatografia líquida de alta pressão, utilizou-se um sistema constituído por uma bomba isocrática Merck-Hitachi L-6000, um injector de amostras com um *loop* Rheodyne de 20 μl , um registador Merck D2500A e um detector de díodos L-300, Photo Diode Array, da Merck-Hitachi. A coluna utilizada foi RP-8 Lichrospher[®] 100, 125 \times 4 mm, com partículas de 5 μm .

Os estudos enzimáticos foram realizados nos espectrofotômetros Shimadzu UV-2100 e no Perkin-Elmer Lambda 2.

Cromatografia

Para a cromatografia em camada delgada (ccd) usaram-se placas de sílica-gel Merck Kieselgel F₂₅₄ de espessura 0,25 mm e para a cromatografia em coluna utilizou-se sílica-gel 60 de granulometria 70-230 mesh (Merck).

5.2 Preparação e Purificação de Solventes e Reagentes

Solventes

Os solventes utilizados nas reacções químicas, diclorometano, THF e etanol foram previamente tratados para ficarem isentos de água. O diclorometano foi seco com cloreto de cálcio, destilado de hidreto de cálcio ou pentóxido de fósforo, e recolhidos em crivos moleculares 4Å. O THF foi refluxado de fio de sódio e benzofenona, destilado e armazenado com crivos moleculares 4Å. O etanol super seco foi obtido por refluxo do etanol de grau analítico com magnésio metálico e cristais de iodo durante 2 horas, destilado e recolhido em crivos moleculares 4Å.

Os solventes usados na recristalização dos compostos eram de grau analítico da Merck, enquanto que os utilizados nas cromatografias em camada delgada ou em coluna eram puros também da Merck. Na cromatografia líquida de alta pressão usaram-se solventes Lichrosolv[®] da Merck.

A água desionizada utilizada na preparação de soluções para os estudos cinéticos, químicos ou enzimáticos, foi obtida pela passagem de água destilada numa resina de troca iónica Millipore, sendo recolhida com uma resistividade de 10 mΩcm.

Reagentes

Os reagentes utilizados como: isocianatos, cloretos de ácidos carboxílicos, tiois, 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona, cloreto de p-metilbenzenosulfonilo, fenol, 2-hidroxi-isobutirato de metilo eram da Aldrich ou Merck e foram utilizados sem qualquer purificação prévia.

A trietilamina foi destilada de lentilhas de hidróxido de potássio e armazenada a 5°C. O K_2CO_3 da Merck foi sempre mantido na estufa e o brometo de tetrabutílamônio fornecido pela Fluka foi armazenado no excicador. A solução aquosa de formaldeído a 37% era da Merck, enquanto que a solução de glioxalato de etilo (50% em tolueno) era da Fluka. O ácido 3-cloroperbenzóico, também da Fluka, tinha 70% de pureza.

As soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio, utilizadas nos estudos cinéticos, foram obtidas por diluição de soluções Tritisol[®] da Merck.

Os tampões PBS e HEPES eram da Sigma–Aldrich. O $Na_2B_4O_7$ utilizado na preparação do tampão borato era da Merck de grau analítico.

5.3 Enzimas e Substratos

A elastase leucocitária humana (HLE) assim como a elastase pancreática suína (PPE) foram adquiridas à Calbiochem, e armazenadas a -20 °C. Os respectivos substratos, *N*-MeOSuc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-*p*-nitroanilida e *N*-Suc-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilida, foram fornecidos pela Sigma-Aldrich.

As técnicas de síntese, dos vários compostos apresentados nesta dissertação, que a seguir serão relatadas, não foram optimizadas e a maioria dos rendimentos resulta de uma única experiência.

5.4 Obtenção de Derivados de *N*-hidroximetil-2-azetidionas

5.4.1 Síntese de 4-Acetoxi-2-azetidionas

Síntese de Acetoxialcenos

*Técnica Geral*⁸²

Adicionou-se ao aldeído pretendido (2,14 mol) o anidrido acético (320,3 g; 3,14 mol) e o acetato de sódio (22,0g; 0,268 mol), ficando a mistura resultante em refluxo durante 2 dias. Após este período, a mistura reaccional foi vertida cuidadosamente e com agitação sobre diclorometano (360 ml), H₂O (360 ml) e gelo (180 g). Procedeu-se a seguir à neutralização da mistura com Na₂CO₃ (400 mg), controlando o pH com papel indicador. Separam-se as duas fases que se formaram, sendo a fase aquosa extraída com diclorometano (500 ml). Juntaram-se as duas fases orgânicas e procedeu-se à sua lavagem com solução saturada de NaCl e secagem com MgSO₄, sendo o filtrado concentrado por evaporação do solvente a pressão reduzida. Purificaram-se os produtos por destilação a pressão reduzida ou à pressão atmosférica.

1-Acetoxi-3-etil-1-buteno, 2.21a

p. eb. 85-115 °C (75 mm Hg); η = 85 %

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 0,93 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, CH₃CH₂); 0,97 (3H, *t*, $J=7,6$ Hz, CH₃CH₂); 1,96 (2H, *q*, $J=7,2$ Hz, CH₃CH₂); 2,06 (3H, *s*, COCH₃); 2,09 (2H, *q*, $J=7,6$ Hz, CH₃CH₂); 6,80 (1H, *s*, C=CH)

1-Acetoxi-3-metil-1-buteno, 2.21b

p. eb. > 140 °C; η = 4,2 %

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 0,97 (3H, *s*, CH₃CH); 1,10 (3H, *s*, CH₃CH); 2,13 (3H, *s*, COCH₃); 1,97-2,53 (1H, *m*, (CH₃)₂CH); 5,48 (1H, *dd*, $J=7,8$; 13,2 Hz, PrⁱCH); 7,17 (1H, *dd*, $J=13,2$; 2 Hz, CHOCO).

Síntese de 4-Acetoxi-2-azetidionas

*Técnica Geral*¹¹⁸

A uma solução do apropriado acetoxialceno, **2.21**, (89 mmol) em diclorometano (23 ml), arrefecida em banho de gelo, foi adicionado gradualmente por ampola de adição o isocianato de clorossulfonilo (15,1 g; 107 mmol). Finalizada a adição, a mistura reaccional foi mantida em banho de gelo durante 1h, sendo depois colocada à temperatura ambiente ficando a reagir uma noite. Após este período, a mistura reaccional foi vertida lentamente e com agitação sobre uma mistura gelada de água (11 ml), gelo (50 g), NaHCO₃ (25 g), Na₂SO₃ (9 g). Manteve-se esta mistura arrefecida em banho de gelo durante a adição, a uma temperatura inferior a 5°C. Depois da adição a mistura resultante ficou em agitação mecânica durante 1-2 horas à temperatura ambiente. O precipitado que se formou foi recolhido por filtração a pressão reduzida e o filtrado foi extraído com diclorometano (2x200 ml). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (80 ml) e seca com sulfato de magnésio anidro. A seguir à evaporação do solvente a pressão reduzida, o produto foi purificado por recristalização ou por cromatografia em coluna.

1-Acetoxi-3,3-dietil-2-azetidionona, 2.22 a

Recristalizado de hexanol por gradiente térmico

Óleo amarelo; $\eta = 34\%$

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 1,00 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, CH₃CH₂); 1,03 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, CH₃CH₂); 1,65-1,90 (4H, *m*, CH₃CH₂); 2,14 (3H, *s*, COCH₃); 5,60 (1H, *s*, CHOCO); 6,51 (1H, *sl*, NH)

¹³C-NMR δ_C (CDCl₃): 8,41 (CH₃CH₂); 8,68 (CH₃CH₂); 20,92 (O=CCH₃); 21,54 (CH₃CH₂); 23,51 (CH₃CH₂); 64,12 (CEt₂); 79,73 (CHO); 171,05 (OCO); 171,90 (O=CN)

MS-ESI m/z 186 (MH⁺)

1-Acetoxi-3-isopropilo-2-azetidiona, 2.22b

Eluente cromatográfico: misturas de hexano:acetato de etilo ((7,5:2,5), (1:1), (2,5:7,5)) e acetato de etilo.

Óleo amarelo; $\eta=1,3$ %

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 1,04 (3H, *d*, $J=7,0$ Hz, CH_3CH); 1,09 (3H, *d*, $J=7,0$ Hz, CH_3CH); 2,12 (3H, *s*, COCH_3); 2,15-2,23 (1H, *m*, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 3,04 (1H, *d*, $J=8,0$ Hz, Pr^iCH); 5,59 (1H, *s*, CHOCO); 6,57 (1H, *sl*, NH)

5.4.2 Síntese de Azetidonas Substituídas em C-4

*Técnica Geral*⁸²

Uma solução do apropriado ariltiol (11,9 mmol) em acetona (12-16 ml) e NaOH 1N (14 ml, 14 mmol) ficou em agitação durante 10 a 20 minutos à temperatura ambiente. Juntou-se uma solução de **2.22** (10,8 mmol) em acetona (9 ml) e a mistura resultante esteve em agitação durante 2 a 4 horas ou uma noite (**2.23b**). A reacção foi controlada por ccd. Quando a reacção terminou, concentrou-se a mistura reaccional por evaporação da acetona a pressão reduzida e extraiu-se a fase aquosa resultante com éter sulfúrico (2×70 ml). A fase etérea foi de seguida lavada com água (60 ml), solução saturada de NaCl (60 ml) e seca com sulfato de magnésio anidro. Após evaporação do solvente a pressão reduzida, o produto foi purificado por cromatografia em coluna.

3,3-Dietil-4-tiofenil-2-azetidiona, 2.23a

Eluente cromatográfico: éter de petróleo/ éter sulfúrico (6:4).

Óleo amarelo; $\eta= 53$ %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3240, 2968, 1755

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,95 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2); 1,10 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2); 1,68-2,05 (4H, *m*, CH_3CH_2); 4,79 (1H, *s*, CHS); 6,73 (1H, *sl*, NH); 7,26-7,44 (5H, *m*, ArH)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,56 (CH_3CH_2); 8,88 (CH_3CH_2); 22,84 (CH_3CH_2); 24,48 (CH_3CH_2); 66,95 (Et_2C); *(CHS) 127,89; 129,44; 132,16; 133,00; 135,00 (Car); 170,00 ($\text{O}=\text{CNH}$) (* possivelmente sobreposto ao sinal de CDCl_3)

MS-EI m/z (%): 235 (11, M^+); 192 (5, $[\text{Et}_2\text{C}=\text{CHSPh}]^+$); 126 (71, $[\text{M-SPh}]^+$); 98 (100, Et_2CCO^+); 43 (62, HNCO^+)

4-(1,3-Benzoxazol-2-iltio)-3,3-dietil-2-azetidiona, 2.23b

Recristalizado de diclorometano/ éter de petróleo

p.f.: 178-179 °C; $\eta = 55\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3239, 2969, 1766, 1362, 1321, 1140

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,85 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,15 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,47 (1H, *dq*, $J=7,3$; 14,8 Hz, CH_3CH_2); 1,67 (1H, *dq*, $J=7,4$; 15,2 Hz, CH_3CH_2); 1,85-2,07 (2H, $2 \times dq$ sobr, $J=7,5$, 15,2 Hz, CH_3CH_2); 6,23 (1H, *s*, CHS); 6,43 (1H, *sl*, NH); 7,22-7,60 (4H, *m*, ArH)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,02 (CH_3CH_2); 8,76 (CH_3CH_2); 21,49 (CH_3CH_2); 24,12 (CH_3CH_2); 67,62 (Et_2C); 70,36 (CHS); 110,76; 111,94; 124,52; 125,14; 131,15; 146,98 (Car); 172,15 ($\text{O}=\text{CNH}$); 179,67 ($\text{SC}=\text{N}$).

MS-ESI m/z 277 (MH^+)

4-(1,3-Benzoxazol-2-iltio)-3-isopropil-2-azetidiona, 2.23c

Eluente cromatográfico: diclorometano seguido de diclorometano/ acetato de etilo (9,5:0,5).

p.f. 157-159 °C; $\eta = 44\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3269, 2960, 1771, 1478, 1363

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 1,13 (3H, *d*, $J=6,5$ Hz, CH_3CH); 1,16 (3H, *d*, $J=6,5$ Hz, CH_3CH); 2,19-2,28 (1H, *m*, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 3,53 (1H, *dd*, $J=2,0$; 8,5Hz, $(\text{CHC}=\text{O})$); 6,33 (1H, *sl*, NH); 6,51 (1H, *d*, $J=1,5$ Hz, CHS); 7,29-7,47 (4H, *m*, ArH)

MS-EI m/z (%): 262 (16, M^+); 151 (68, $[\text{ArSH}]^+$); 112 (100, $[\text{M-SAr}]^+$); 84 (50, Pr^iCHCO^+)

4-(1,3-Benzotiazol-2-iltio)-3,3-dietil-2-azetidinona, 2.23d

Na síntese deste produto formou-se um grande precipitado. Recolheu-se o precipitado por filtração a pressão reduzida. O filtrado foi concentrado por evaporação da acetona e novamente filtrado. O resíduo obtido das duas filtrações foi recristalizado de etanol por gradiente térmico.

p.f. 203-206 °C; η = 44 %

I.V. (filme) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3190, 2959, 1753, 1581, 1453, 1275

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (DMSO- d_6): 0,21 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 0,54 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 0,86 (1H, *dq*, $J=7,5$; 14,7 Hz, CH_3CH_2); 1,03 (1H, *dq*, $J=7,5$; 15,0 Hz, CH_3CH_2); 1,19-1,46 (2H, *m*, CH_3CH_2); 6,06 (1H, *s*, *CHS*); 6,88 (1H, *td*, $J=7,6$; 0,5 Hz, *ArH*); 6,99 (1H, *td*, $J=7,3$; 1,5 Hz, *ArH*); 7,30 (1H, *dd*, $J=7,9$; 1,5 Hz, *ArH*); 7,46 (1H, *d*, $J=8,4$ Hz, *ArH*); 8,49 (1H, *s*, *NH*)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (DMSO- d_6): 7,71 (CH_3CH_2); 8,54 (CH_3CH_2); 21,29 (CH_3CH_2); 23,83 (CH_3CH_2); 65,99 (Et_2C); 70,91 (*CHS*); 114,32; 122,26; 124,76; 126,38; 127,15; 141,64 (*Car*); 170,81 ($\text{O}=\text{CN}$); 189,53 ($\text{SC}=\text{N}$).

MS-EI m/z (%): 292 (7, M^+); 167 (100, $[\text{ArSH}]^+$); 98 (44, Et_2CCO^+)

Síntese de 3,3-dietil-4-fenilsulfonil-2-azetidinona, 2.23e

A uma solução de **2.23a** (1 g; 4,35 mmol) em diclorometano (18 ml), previamente arrefecida em gelo durante 10 minutos, foi adicionado o ácido 3-cloroperbenzóico a 70% (3,4 g; 10,65 mmol). A reacção foi mantida no gelo e em agitação durante 30 minutos, ao fim dos quais foi colocada à temperatura ambiente. O evoluir da reacção foi verificado por ccd. Após 2 hora e 30 minutos à temperatura ambiente procedeu-se à diluição da mistura reaccional com diclorometano (40 ml) e éter sulfúrico (20 ml), lavagem com uma solução de NaHCO_3 a 4,6% (2×50 ml) e solução saturada de NaCl (50 ml) seguido da secagem com sulfato de magnésio anidro. A remoção do solvente desta solução a pressão reduzida permitiu obter um resíduo que foi purificado por cromatografia em coluna.

3,3-Dietil-4-fenilsulfonil-2-azetidiona, 2.23e

Eluente cromatográfico: éter sulfúrico/éter de petróleo (8:2) seguido de éter sulfúrico.

p.f: 156-158 °C; $\eta = 71$ %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3215, 3063, 2970, 1763, 1582, 1458, 1295, 1150

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,96 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,09 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,71 (1H, *dq*, $J=7,5$; 14,7 Hz, CH_3CH_2); 1,94 (1H, *dq*, $J=7,5$; 14,8 Hz, CH_3CH_2); 2,06 (1H, *dq*, $J=7,5$; 14,9 Hz, CH_3CH_2); 2,39 (1H, *dq*, $J=7,5$; 15,0 Hz, CH_3CH_2) 4,32 (1H, *s*, CHSO_2); 6,26 (1H, *sl*, *NH*); 7,62 (2H, *t*, AA' , $J=7,3$ Hz, *ArHm*); 7,72 (1H, *t*, *M*, $J=7,3$ Hz, *ArHp*); 7,93 (2H, *d*, XX' , $J=7,3$ Hz, *ArHo*).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,57 (CH_3CH_2); 8,59 (CH_3CH_2); 20,32 (CH_3CH_2); 24,85 (CH_3CH_2); 67,85 (Et_2C); 74,29 (CHSO_2), 128,55; 129,75; 134,84; 138,15 (*Car*); 171,73 ($\text{O}=\text{CN}$).

MS-EI m/z (%): 268 (0,3; MH^+); 224 (2,1; $[\text{Et}_2\text{C}=\text{CHSO}_2\text{Ph}]^+$); 126 (53; $[\text{M}-\text{SO}_2\text{Ph}]^+$); 98 (100; Et_2CCO^+); 77 (35, C_6H_5^+).

5.4.4 Síntese de *N*-hidroximetil-2-azetidionas***Técnica Geral***¹¹⁴

À mistura de **2.23** (0,65 mmol) e K_2CO_3 (0,12 a 0,24 mmol) juntou-se etanol (1 ml) e gradualmente a solução aquosa de formaldeído a 37 %, com agitação vigorosa e aquecimento moderado, até dissolução completa dos reagentes. O composto **2.23e** (0,25 g; 0,94 mmol) não necessitou de etanol para se dissolver na solução de formaldeído a 37% (2,7 ml). A reacção esteve à temperatura ambiente durante 2-3 horas (**2.23b-d**) ou uma noite (**2.23e**) e no final, observado por ccd, evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O resíduo obtido foi diluído em diclorometano e a suspensão resultante filtrada. O filtrado foi seco com Mg_2CO_3 anidro e evaporado a pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna

4-(1,3-Benzoxazol-2-iltio)-3,3-dietil-N-(hidroximetil)-2-azetidinona, 2.24b

Eluente cromatográfico: misturas de diclorometano: acetato de etilo

p.f.: 154-156°C; $\eta = 76\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3396, 2971, 1760, 1472, 1367, 1147

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,86 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,17 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,46 (1H, *dq*, $J=7,5$; 14,9 Hz, CH_3CH_2); 1,66 (1H, *dq*, $J=7,5$; 15 Hz, CH_3CH_2); 1,86-2,07 (2H, *m*, CH_3CH_2); 4,08 (1H, *dd*, $J=8,6$; 6,5 Hz, NCH_2O); 4,29 (1H, *dd*, $J=8,6$; 11,4 Hz, NCH_2O); 5,15 (1H, *dd*, $J=6,5$; 11,4 Hz, *OH*); 6,36 (1H, *s*, *CHS*); 7,26 (4H, *m*, *SArH*)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,11 (CH_3CH_2); 8,67 (CH_3CH_2); 21,00 (CH_3CH_2), 23,79 (CH_3CH_2); 64,50 (NCH_2O); 66,14 (Et_2C); 71,50 (*CHS*); 110,78; 111,50; 124,61; 125,36; 131,00; 146,95 (*Car*); 173,00 ($\text{O}=\text{CN}$); 180,00 ($\text{SC}=\text{N}$)

MS-EI m/z (%): 307 (7,5; MH^+); 289 (16,3; $[\text{M-OH}]^+$); 156 (97,0; $[\text{M-SAr}]^+$); 128 (100, $[\text{156-CH}_2\text{CH}_2]^+$)

4-(1,3-Benzoxazol-2-iltio)-N-(hidroximetil)-3-isopropil-2-azetidinona, 2.24c

Eluente cromatográfico: diclorometano

p.f. 153-155°C; $\eta = 49\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3421, 2946, 1766, 1472, 1364

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 1,12 (3H, *d*, $J=7,0$ Hz, CH_3CH_2); 1,16 (3H, *d*, $J=6,5$ Hz, CH_3CH_2); 2,18-2,23 (1H, *m*, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 3,07 (1H, *t*, $J=7,5$ Hz, *OH*); 3,51 (1H, *dd*, $J=2$ Hz; 8,5 Hz, Pr^iCHCO); 4,42 (1H, *dd*, $J=8,0$; 12,0 Hz, NCH_2O); 4,92 (1H, *dd*, $J=7,0$; 12,0 Hz, NCH_2O); 6,56 (1H, *d*, $J=2,0$ Hz, *CHS*); 7,28-7,41 (4H, *m*, *ArH*).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 19,92 (CH_3); 20,48 (CH_3); 23,11($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 63,35 (Pr^iCHCO); 63,98 (NCH_2O); 66,49 (*CHS*); 110,52; 110,94; 125,00; 125,45; 129,04; 146,94 (*Car*); 167,83 ($\text{O}=\text{CN}$); 180,15 ($\text{SC}=\text{N}$)

MS-EI m/z (%): 292 (14,7; M^+); 151 (64,1; $[\text{ArSH}]^+$); 142 (100, $[\text{M-SAr}]^+$); 84 (54,3; $[\text{Pr}^i\text{CHCO}]^+$)

4-(1,3-Benzotiazol-2-iltio)-3,3-dietil-N-(hidroximetil)-2-azetidiona, 2.24d

O precipitado que se formou na síntese de **2.24d** foi recolhido por filtração a pressão reduzida e foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente diclorometano seguido de diclorometano/acetato de etilo (9:1).

p.f.: 149-152 °C; η = 62 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3396, 2946, 1740, 1453, 1383, 1058

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CD_3CN): 0,76 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,12 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,47 (1H, *dq*, $J=7,3$; 14,7 Hz, CH_3CH_2); 1,67 (1H, *dq*, $J=7,5$; 15,2 Hz, CH_3CH_2); 1,85-2,06 (2H, *m*, CH_3CH_2); 4,16 (1H, *dd*, $J=8,1$; 14,8 Hz, NCH_2O); 4,17 (1H, *s*, *OH*); 4,95 (1H, *dd*, $J=10,3$; 15,1 Hz, NCH_2O); 6,85 (1H, *s*, *CHS*); 7,31-7,75 (4H, *m*, *ArH*).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CD_3CN): 8,35 (CH_3CH_2); 9,06 (CH_3CH_2); 22,08 (CH_3CH_2); 25,22 (CH_3CH_2); 64,90 (NCH_2O); 66,72 (Et_2C); 73,05 (*CHS*); 115,26; 122,67; 125,80; 127,82; 128,32; 142,78 (*Car*); 172,5 ($\text{O}=\text{CN}$); 192,22 ($\text{SC}=\text{N}$).

3,3-Dietil-4-fenilsulfonil-N-(hidroximetil)-2-azetidiona, 2.24e

Eluente cromatográfico: éter sulfúrico.

p.f. 90-93 °C; η = 71 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3450; 3066; 2973; 1769; 1312; 1150

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,84 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,04 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,63 (1H, *dq*, $J=7,3\text{Hz}$, CH_3CH_2); 1,78-2,01 (2H, *m*, CH_3CH_2); 2,34 (1H, *dq*, $J=7,5$; 15,0 Hz, CH_3CH_2); 2,85 (1H, *dd*, $J=6,2$; 9 Hz, *OH*); 4,43 (1H, *dd*, $J=11,5$; 9,0 Hz, NCH_2O); 4,60 (1H, *s*, *CHS*); 4,78 (1H, *dd*, $J=11,5$; 6,2 Hz, NCH_2O); 7,63 (2H, *t*, AA' , $J=7,4$ Hz, *ArHm*); 7,73 (1H, *t*, *M*, $J=7,4$ Hz, *ArHp*); 8,00 (2H, *d*, XX' , $J=7,5$ Hz, *ArHo*).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,36 (CH_3CH_2); 8,82 (CH_3CH_2); 20,13 (CH_3CH_2), 24,2 (CH_3CH_2); 64,77 (NCH_2O); 67,00 (Et_2C); *(*CHS*); 128,72; 129,66; 134,67; 138,5 (*Car*) (* possivelmente sobreposto ao sinal de CDCl_3)

MS-EI m/z (%): 280 (0,3; [M-OH]⁺), 224 (1,1; [Et₂C=CHSO₂Ph]⁺); 156 (61,8; [M-SO₂Ph]⁺); 128 (100; [156-CH₂CH₂]⁺); 98 (61,9; Et₂CCO⁺); 77 (49, C₆H₅⁺)

5.4.5 Síntese de *N*-(aminocarboniloxi)metil-2-azetidionas

Técnica Geral

A uma solução de *N*-hidroxialquil-2-azetidionona **2.24(b-e)** (0,51 mmol) em diclorometano anidro (1,5-5 ml) foi adicionado o isocianato adequado (0,53mmol (**2.24e**) ou 1,02 mmol (**2.24b-d**)) e trietilamina (0,51-1,02 mmol). A mistura reaccional ficou em agitação durante 1-10 h à temperatura ambiente. A evolução da reacção foi seguida por ccd e o fim da reacção determinado pelo desaparecimento de **2.24**. No caso de se observar a formação de um precipitado, este é eliminado por filtração antes de se proceder à remoção do solvente e da trietilamina por evaporação a pressão reduzida. O resíduo obtido foi de seguida purificado por cromatografia em coluna seca utilizando como eluente diclorometano seguido de misturas de diclorometano/ acetato de etilo ou por recristalização de acetona /éter de petróleo (**2.25a,b**)

3,3-Dietil-*N*-[(Fenilaminocarboniloxi)metil]4-fenilsulfonil-2-azetidionona, 2.25a

p.f. 140-143 °C; η=33 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3331, 2971, 1779, 1734, 1542, 1319, 1217

¹H-NMR δ_{H} (CDCl₃+CD₃CN): 0,88 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,03 (3H, *t*, *J*=7,1 Hz, CH₃CH₂); 1,67 (1H, *dq*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,79-1,98 (2H, *m*, CH₃CH₂); 2,32 (1H, *dq*, *J*=7,5; 15 Hz, CH₃CH₂); 4,76 (1H, *d*, *J*=11,7 Hz, NCH₂O); 4,84 (1H, *s*, CHSO₂); 5,02 (1H, *d*, *J*=11,7 Hz, NCH₂O); 7,06 (1H, *t*, *J*=6,6 Hz, OCNArH); 7,31 (4H, *m*, OCNArH); 7,65 (2H, *t*, AA', *J*=7,5 Hz, SO₂ArH*m*); 7,76 (1H, *t*, M, *J*=7,5 Hz, SO₂ArH*p*); 8,0 (2H, *d*, XX', *J*=7,8 Hz, SO₂ArH*o*).

¹³C-NMR δ_{C} (CDCl₃+CD₃CN): 8,85 (CH₃CH₂); 9,30 (CH₃CH₂); 21,53 (CH₃CH₂); 25,64 (CH₃CH₂); 65,80 (NCH₂O); 68,80 (Et₂C); 78,08 (CHSO₂); 120,32; 124,69; 129,79; 129,97; 130,80; 135,73; 140,35 (Car); 153,45 (OCONH); 172,96 (O=CN).

MS-EI m/z (%): 372 (1,9; [M-CO₂]⁺); 280 (2,6; [M-PhNHCO₂]⁺); 156(44,5; [M-(SO₂Ph + OCNHPh)]⁺); 125 (100; Et₂C-CO-N=CH); 77 (22,6; C₆H₅⁺).

Análise (%) Encontrada: C 59,64; H 6,15; N 6,84; C₂₁H₂₄N₂O₅S requer: C 60,6; H 5,8; N 6,7

3,3-Dietil-4-fenilsulfonil-N-[[4-Metilfenil]aminocarboniloxi]metil}-2-azetidiona, 2.25b

p.f 169-172 °C; η= 30 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3319, 2971, 1772, 1734, 1530, 1319, 1211

¹H-NMR δ_{H} (CDCl₃): 0,87 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,06 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,61 (1H, *dq*, *J*=7,3 Hz, CH₃CH₂); 1,86 (1H, *dq*, *J*=7,3; 13,0 Hz, CH₃CH₂); 1,95 (1H, *dq*, *J*=7,3; 13,3 Hz, CH₃CH₂); 2,29 (3H, *s*, ArCH₃); 2,41 (1H, *dq*, *J*=7,3; 15,0 Hz, CH₃CH₂); 4,71 (1H, *s*, CHSO₂); 4,73 (1H, *d*, *J*=11,6Hz, NCH₂O); 5,12 (1H; *d*, *J*=11,6 Hz, NCH₂O) 6,48 (1H, *sl*, NH); 7,09 (4H, *m*, AA'BB', NHArH); 7,60 (2H, *t*, AA', *J*=7,5 Hz, SO₂ArHm); 7,69 (1H, *t*, M, *J*=7,3 Hz, SO₂ArHp); 7,96 (2H, *d*, XX', *J*=7,2 Hz SO₂ArHo).

¹³C-NMR δ_{C} (CDCl₃): 8,37 (CH₃CH₂); 8,81 (CH₃CH₂); 20,32 (CH₃CH₂); 20,73 (ArCH₃); 24,67 (CH₃CH₂); 64,51 (NCH₂O); 67,85 (Et₂C); *(CHSO₂); 119,26; 128,75; 129,59; 134,59; 138,88 (Car); 172 (O=CN) (* possivelmente sobreposto ao sinal de CDCl₃)

MS-EI *m/z* (%): 430 (0,2; M⁺); 386 (8,2; [M-CO₂]⁺); 156 (54,5; [M-(SO₂Ph+OCNHC₆H₄-4-Me)]⁺) 125 (100; $\text{Et}_2\text{C}=\text{CO}-\overset{\cdot}{\text{N}}=\text{CH}$); 107 (53,6; [4-CH₃C₆H₄NH₂]⁺); 77 (19,5; C₆H₅⁺)

Análise (%) Encontrada: C 61,24; H 5,91; N 6,32; C₂₂H₂₆N₂O₅S requer: C 61,38; H 6,09; N 6,51

3,3-Dietil-4-fenilsulfonil-N-[[4-Metoxifenil]aminocarboniloxi]metil}-2-azetidiona, 2.25c

p.f. 127-128 °C; η= 74 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3375, 2971, 1778, 1732, 1515, 1314, 1150

¹H-NMR δ_{H} (CDCl₃): 0,87 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,06 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,64 (1H, *dq*, *J*=7,3; 14,7 Hz, CH₃CH₂); 1,80-2,01 (2H, 2×*dq* sobr, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂);

2,41 (1H, *dq*, $J=7,5$, 14,9 Hz, CH_3CH_2); 3,76 (3H, *s*, OCH_3); 4,72 (1H, *d*, $J=11,4$ Hz, NCH_2O); 4,72 (1H, *s*, CHSO_2); 5,12 (1H, *d*, $J=11,4$ Hz, NCH_2O); 6,44 (1H, *sl*, *NH*); 6,82 (2H, *d*, AA' , $J=9,0$ Hz, NHArHm); 7,16 (2H, *d*, XX' , $J=8,4$ Hz, NHArHo); 7,60 (2H, *t*, AA' , $J=7,4$ Hz, SO_2ArHm); 7,70 (1H, *t*, *M*, $J=7,4$ Hz, SO_2ArHp); 7,96 (2H, *d*, XX' , $J=7,3$ Hz, SO_2ArHo).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,67 (CH_3CH_2); 9,10 (CH_3CH_2); 20,60 (CH_3CH_2); 24,96 (CH_3CH_2); 55,76 (OCH_3); 65,19 (NCH_2O); 68,12 (Et_2C); *(CHSO_2); 114,56; 120,74 129,05; 129,87; 134,85; 138,89 (*Car*); 172,29 ($\text{O}=\text{CN}$). (* possivelmente sobreposto ao sinal de CDCl_3)

MS-EI m/z (%): 446 (17,6; M^+); 402 (100; $[\text{M}-\text{CO}_2]^+$)

Análise (%) Encontrada: C 58,98; H 5,72; N 6,12; $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ requer: C 59,18; H 5,87; N 6,27

***N*-{[(4-Acetilfenil)aminocarboniloxi]metil}-3,3-dietil-4-fenilsulfonil-2-azetidiona, 2.25d**

p.f. 148-150 °C; $\eta=89\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3331, 3061, 2971, 1780, 1740, 1670, 1319, 1154

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,84 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,05 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,61 (1H, *dq*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,88 (2H, $2 \times dq$ sobr, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 2,41 (1H, *dq*, $J=7,5$, 14,9 Hz, CH_3CH_2); 2,55 (3H, *s*, COCH_3); 4,70 (1H, *s*, CHSO_2); 4,86 (1H, *d*, $J=11,6$ Hz, NCH_2O); 5,16 (1H, *d*, $J=11,4$ Hz, NCH_2O); 6,97 (1H, *sl*, *NH*); 7,37 (2H, *d*, AA' , $J=8,6$ Hz, NHArHo); 7,61 (2H, *t*, AA' , $J=7,4$ Hz, SO_2ArHm); 7,71 (1H, *t*, *M*, $J=7,4$ Hz, SO_2ArHp); 7,90 (2H, *d*, XX' , $J=8,4$ Hz, NHArHm); 7,98 (2H, *d*, XX' , $J=7,3$ Hz, SO_2ArHo).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,36 (CH_3CH_2); 8,82 (CH_3CH_2); 20,28 (CH_3CH_2); 24,66 (CH_3CH_2); 26,41 (COCH_3); 64,77 (NCH_2O); 67,83 (Et_2C); 77,69 (CHSO_2); 117,80; 128,76; 129,66; 132,68; 134,69; 141,48 (*Car*); 151,68 (OCONH); 172,29 ($\text{O}=\text{CN}$); 196,76 (COCH_3).

ESI-MS m/z 459 (MH^+)

Análise (%) Encontrada: C 60,16; H 5,75; N 6,08; $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ requer: C 60,25; H 5,72; N 6,11

3,3-Dietil-4-fenilsulfonil-N-[[4-Dimetilaminofenil]aminocarboniloxi]metil]-2-azetidina, 2.25e

p.f. 159-162 °C; $\eta = 85\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3341, 3066, 2970, 1777, 1723, 1321, 1157

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,87 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,06 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,63 (1H, *dq*, $J=7,4$ Hz, CH_3CH_2); 1,80-2,02 (2H, *m*, CH_3CH_2); 2,41 (1H, *dq*, $J=7,4$, 14,9 Hz, CH_3CH_2); 2,89 (6H, *s*, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 4,68 (1H, *d*, $J=11,5$ Hz, NCH_2O); 4,73 (1H, *s*, CHSO_2); 5,09 (1H, *d*, $J=11,5$ Hz, NCH_2O); 6,37 (1H, *sl*, *NH*); 6,65 (2H, *d*, AA' , $J=8,8$ Hz, NHArHm); 7,09 (2H, *d*, XX' , $J=8,3$ Hz, NHArHo); 7,59 (2H, *t*, AA' , $J=7,4$ Hz, SO_2ArHm); 7,69 (1H, *t*, *M*, $J=7,4$ Hz, SO_2ArHp); 7,96 (2H, *d*, XX' , $J=7,4$ Hz, SO_2ArHo).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,81 (CH_3CH_2); 8,84 (CH_3CH_2); 20,33 (CH_3CH_2); 24,68 (CH_3CH_2); 40,90 (NCH_3); 41,62 (NCH_3); 64,52 (NCH_2O); 67,82 (Et_2C); *(CHSO_2); 113,13; 121,11; 128,78; 129,59; 134,56; 138,88 (*Car*); 152,49 (OCONH); 172,08 (O=CN) (* possivelmente sobreposto ao sinal de CDCl_3).

ESI-MS m/z 460 (MH^+)

Análise (%) Encontrada: C 60,01; H 6,42; N 8,95; $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ requer: C 60,11; H 6,36; N 9,14

N-[(Benzilaminocarboniloxi)metil]-3,3-dietil-4-fenilsulfonil-2-azetidina, 2.25f

p.f. 75-78 °C; $\eta = 21\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3362, 3074, 2967, 1780, 1725, 1319, 1150

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,87 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2); 1,07 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2); 1,58 (1H, *m*, CH_3CH_2); 1,80-2,01 (2H, *m*, CH_3CH_2); 2,42 (1H, *dq*, $J=7,5$, 14,7 Hz, CH_3CH_2); 4,27 (2H, $2 \times dd$ *sobr*, $J=5,6$; 14,7 Hz, NCH_2Ar); 4,66 (1H, *d*, $J=11,1$ Hz, NCH_2O); 4,70 (1H, *s*, CHSO_2); 5,03 (1H, *sl*, *NH*); 5,07 (1H, *d*, $J=11,4$ Hz, NCH_2O); 7,20-7,34 (5H, *m*, $\text{AA}'\text{BB}'\text{M}$, CH_2ArH); 7,60 (2H, *t*, AA' , $J=7,5$ Hz, SO_2ArHm); 7,71 (1H, *t*, *M*, $J=7,4$ Hz, SO_2ArHp); 7,96 (2H, *d*, XX' , $J=7,5$ Hz, SO_2ArHo).

MS-EI m/z (%): 431 (4,6; MH⁺); 387 (8,3; [MH-CO₂]⁺); 156 (96,6; [M-(SO₂Ph+OCNHCH₂Ph)]⁺); 125 (80,0; $\text{Et}_2\text{C}=\text{CO}-\overset{\curvearrowright}{\text{N}}=\text{CH}$); 91 (100; [C₆H₅CH₂]⁺); 77 (45,5, C₆H₅⁺)

Análise (%) Encontrada: C 62,34; H 6,43; N 6,90; C₂₂H₂₆N₂O₅S requer: C 61,38; H 6,09; N 6,51

4-(1,3-Benzoxazol-2-iltio)-3,3-dietil-N-[[4-metoxifenil]aminocarboniloxi]metil}-2-azetidiona, 2.25g

p.f. 189-192 °C; η= 27 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3313, 2970, 1777, 1723, 1525, 1361

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 0,88 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,16 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,50 (1H, *dq*, *J*=7,3; 14,7 Hz, CH₃CH₂); 1,71 (1H, *dq*, *J*=7,4, 15 Hz, CH₃CH₂); 1,86-2,10 (2H, *m*, CH₃CH₂); 3,78 (1H, *s*, OCH₃); 5,04 (1H, *d*, *J*=11,5 Hz, NCH₂O); 5,40 (1H, *d*, *J*=11,4 Hz, NCH₂O); 6,34 (1H, *sl*, NH); 6,37 (1H, *s*, CHS); 6,81 (2H, *d*, AA', *J*=9 Hz, NHAr*Hm*); 7,10-7,32 (6H, *m*, Ar*H*)

¹³C-NMR δ_C (CDCl₃): 8,10 (CH₃CH₂); 8,64 (CH₃CH₂); 20,93 (CH₃CH₂); 24,20 (CH₃CH₂); 55,46 (OCH₃); 64,14 (NCH₂O); 66,50 (Et₂C); 73,63(CHS); 110,77; 111,34; 114,18; 120,63; 124,43; 124,95; 130,00; 130,82; 146,98; 156,30 (Car); 152,22 (OCONH); 172,15 (O=CN); 180,30 (SC=N).

ESI-MS m/z 473 (MNH₄⁺)

Análise (%) Encontrada: C 60,63; H 5,65; N 9,09; C₂₃H₂₅N₃O₅S requer: C 60,64; H 5,53; N 9,22.

4-(1,3-Benzotiazol-2-iltio)-3,3-dietil-N-[[4-metoxifenil]aminocarboniloxi]metil}-2-azetidiona, 2.25h

p.f. 177- 179 °C; η= 57 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3319, 2971, 1774, 1734, 1515, 1299, 1250

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 0,85 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,15 (3H, *t*, *J*=7,3 Hz, CH₃CH₂); 1,54 (1H, *dq*, *J*=7,3 Hz, CH₃CH₂); 1,75 (1H, *dq*, *J*=7,5; 15 Hz, CH₃CH₂); 1,94-2,10 (2H, *m*, CH₃CH₂); 3,78 (1H, *s*, OCH₃); 5,01 (1H, *d*, *J*=11,4 Hz, NCH₂O); 5,43 (1H, *d*,

$J=11,5$ Hz, NCH_2O); 6,33 (1H, *sl*, NH); 6,81 (2H, *d*, AA' , $J=9$ Hz, $NHArHm$); 6,97 (1H, *s*, CHS); 7,11-7,63 (6H, *m*, ArH)

$^{13}C-NMR$ δ_C ($CDCl_3$): 7,58 (CH_3CH_2); 8,16 (CH_3CH_2); 20,75 (CH_3CH_2); 24,24 (CH_3CH_2); 55,05 (OCH_3); 64,07 (NCH_2O); 66,04 (Et_2C); 73,71(CHS); 113,35; 113,74; 120,25; 121,05; 124,15; 126,28; 126,89; 140,82 (Car); 171,89 ($O=CN$); 190,74 ($SC=N$).

$MS-ESI$ m/z 472 (MH^+)

Análise (%) Encontrada: C 58,64; H 5,41; N 8,83; $C_{23}H_{25}N_3O_4S_2$ requer C 58,58; H 5,34; N 8,91.

4-(1,3-Benzoxazol-2-iltio)-3-isopropil-*N*-{[(4-Metoxifenil)aminocarboniloxi]metil}-2-azetidinona, 2.25i

p.f. 174-177 °C; $\eta=73$ %

I.V. (filme) $\nu_{m\acute{a}x}/cm^{-1}$: 3317, 3066, 2970, 1777, 1730, 1518, 1361, 1034

^1H-NMR δ_H ($CDCl_3$): 1,12 (3H, *d*, $J=6,8$ Hz, CH_3); 1,16 (3H, *d*, $J=6,8$ Hz, CH_3); 2,16-2,28 (1H, *m*, $(CH_3)_2CH$); 3,52 (1H, *dd*, $J=8,5$; 2,2 Hz, Pr^iCHCO); 3,78 (1H, *s*, OCH_3); 5,13 (1H, *d*, $J=11,6$ Hz, NCH_2O); 5,28 (1H, *d*, $J=11,4$ Hz, NCH_2O); 6,14 (1H, *sl*, NH); 6,56 (1H, *d*, $J=2,0$ Hz, CHS); 6,76-7,25 (8H, *m*, ArH)

$^{13}C-NMR$ δ_C ($CDCl_3$): 20,12 (CH_3); 20,74 (CH_3); 27,73 ($(CH_3)_2CH$); 55,70 (OCH_3); 63,85 (Pr^iCHCO); 68,15(CHS); 110,37; 110,95; 114,31; 120,74; 124,90; 128,89; 132,96; 147,40 (Car); 167,93 ($O=CN$)

$MS-ESI$ m/z 459 (MNH_4^+)

Análise (%) Encontrada: C 59,77; H 5,18; N 9,28; $C_{22}H_{23}N_3O_5S$ requer: C 59,85; H 5,25; N 9,51.

5.5 Obtenção de Derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidinonas

Para a síntese dos derivados de *N*-hidroxialquil-2-azetidinonas, utilizaram-se as 3,3-dietil-2-azetidinonas substituídas em C-4, **2.23b** e **2.23e**, e sintetizaram-se a 3,3-dietil-2-azetidinona e a 3,3-dietil-4-fenoxi-2-azetidinona.

*Síntese de 3,3-dietil-2-azetidinona*¹³³

A uma solução de 4-acetoxi-3,3-dietil-2-azetidionona, **2.22a**, (1 g, 5.4 mmol) em etanol absoluto (5 ml) a 0°C, foi adicionado NaBH₄ (0.22 g, 5.9 mmol) e a suspensão resultante foi mantida em agitação a 0°C durante 1h. Seguidamente, adicionaram-se à suspensão resinas ácidas Amberlite (5 g) e a mistura reaccional permaneceu em agitação por mais 30 minutos. Após filtração da mistura reaccional e evaporação do solvente, o resíduo obtido foi lavado com acetato de etilo (200 ml) e filtrado. O sólido que ficou no funil foi lavado com diclorometano (20 ml). Depois da completa remoção do solvente de lavagem, o produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente diclorometano-acetato de etilo (7:3).

3,3-Dietil-2-azetidionona

Óleo branco; 28 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$ 3266, 2967, 1743, 1460

¹H-NMR δ_{H} (CDCl₃): 0,92 (6H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,62 (4H, *q*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 3,02 (2H, *s*, CH₂N); 5,64 (1H, *sl*, NH)

¹³C-NMR δ_{C} (CDCl₃): 8,97 (CH₃CH₂); 25,50 (CH₃CH₂); 45,31(CH₂N); 61,80 (Et₂C); 174.30 (O=CN)

ESI-MS *m/z* 128 (MH⁺).

3,3-Dietil-4-fenoxi-2-azetidionona

Seguiu-se a técnica descrita na Secção 5.4.2, substituindo o ariltiol por fenol.

Eluente cromatográfico: diclorometano: acetato de etilo (9,5:0,5)

p.f. 53-56 °C; η = 37 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3258, 2970, 1763, 1494, 1231

¹H-NMR δ_{H} (CDCl₃): 1,03 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,07 (3H, *t*, *J*=7,5 Hz, CH₃CH₂); 1,73-1,85 (3H, *m*, CH₃CH₂); 1,96 (1H, *dq*, *J*=7,5, 15,1 Hz, CH₃CH₂); 5,37 (1H, *s*, CHOPh); 6,56 (1H, *sl*, NH); 6,88 (2H, *d*, AA', *J*=7,7 Hz, ArH_o); 7,04 (1H, *t*, M, *J*=7,4 Hz, ArH_p); 7,32 (2H, *t*, XX', *J*=7,5 Hz, ArH_m)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,64 (CH_3CH_2); 8,90 (CH_3CH_2); 21,72 (CH_3CH_2); 23,80 (CH_3CH_2); 64,68 (Et_2C); 83,41 (CHOPh); 115,87; 122,41; 129,84; 156,40 (Car); 172,57 (O=CN)

ESI-MS , m/z 219 (MH^+).

5.5.1 Síntese de *N*-(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil-2-azetidionas

Técnica Geral

A uma solução da apropriada 2-azetidionona, **2.23**, (1,45 mmol) em diclorometano anidro (1.6 ml) foi adicionado glicoxalato de etilo (4,35 mmol; 0,87 ml de solução a 50%), K_2CO_3 (0,16 g; 1,16 mmol) e brometo de tetrabutilamónio (TBAB) (0,187 g; 0,58 mmol). A mistura resultante foi colocada em refluxo durante 80-120 min e seguida por ccd. O excesso da solução de glicoxalato de etilo e diclorometano foram evaporados a pressão reduzida. Ao resíduo obtido, foi removido o K_2CO_3 e o TBAB por cromatografia em coluna com uma pequena quantidade de sílica-gel e usando como eluente a mistura diclorometano:acetato de etilo (8:2). Os produtos obtidos foram utilizados nas reacções subsequentes sem mais purificações.

3,3-Dietil-*N*-[(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil]-2-azetidionona, 3.12a

Óleo amarelo; $\eta = 85\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3433, 2970, 1729, 1662, 1242

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,94 (3H, *t*, $J=7,5$ Hz, CH_3CH_2); 0,95 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2); 1,30 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 1,62-1,70 (4H, *m*, CH_3CH_2); 2,96 (1H, *d*, $J=5,3$ Hz, CH_2N); 3,19 (1H, *d*, $J=5,3$ Hz, CH_2N); 4,21-4,40 (2H, *m*, OCH_2); 5,47 (1H, *s*, CHOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,73 (CH_3CH_2); 14,01 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 25,24 (CH_3CH_2); 45,94 (CH_2N); 60,13 (OCH_2); 62,85 (Et_2C); 71,31 (NCHO); 169,24 (CO_2Et); 172,65 (O=CN)

ESI-MS m/z 230 (MH^+).

3,3-Dietil-N-[(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil]-4-fenilsulfonil-2-azetidiona, 3.12b

Óleo; $\eta = 86\%$ (mistura do par de enantiómeros)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3451, 2975, 1775, 1756, 1327, 1312, 1263

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,73 e 0,81 (3H, $2 \times t$, $J=7,4$ Hz, CH_3CH_2); 0,98 e 1,00 (3H, $2 \times t$, $J=7,4$ Hz, CH_3CH_2); 1,30 e 1,32 (3H, $2 \times t$, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 1,53-2,41 (4H, m , CH_3CH_2); 4,04 e 5,04 (1H, $2 \times d$, $J=8,4$ e $7,2$ Hz, OH); 4,15-4,40 (2H, m , OCH_2); 4,60 e 4,63 (1H, $2 \times s$, CHS); 5,17 e 5,49 (1H, $2 \times d$, $J=8,4$ e $7,2$ Hz, NCHO); 7,58 (2H, t , AA', $J=7,4$ Hz, ArH_m); 7,70 (1H, t , M, $J=7,4$ Hz, ArH_p); 7,98 (2H, d , XX', $J=7,4$ Hz, ArH_o)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,15; 8,30 e 8,76 (CH_3CH_2); 14,03 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 20,00; 20,07; 24,09 e 24,21 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 63,14 e 63,50 (OCH_2); 65,93 e 67,09 (Et_2C); 72,42 e 72,68 (NCHO); 76,92 e 77,69 (CHS); 129,03; 129,48; 134,67; 137,69; 167,69; 169,23 (Car) 171,15 e 171,92 (O=CN)

ESI-MS m/z 387 (MNH_4^+).

4-(1,3-Benzoxazol-2-iltio)-3,3-dietil-N-[(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil]-2-azetidiona, 3.12c

Óleo; $\eta = 92\%$ (mistura do par de enantiómeros)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3423, 3082, 1777, 1751, 1360, 1323, 1283

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 0,82 e 0,83 (3H, $2 \times t$, $J = 7,4$ Hz, CH_3CH_2); 1,08 e 1,41 (3H, $2 \times t$, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 1,14 e 1,15 (3H, $2 \times t$, $J = 7,4$ Hz, CH_3CH_2); 1,37-2,03 (4H, m , CH_3CH_2); 3,54-4,50 (2H, m , OCH_2); 3,78 e 4,11 (1H, $2 \times d$, $J = 7,7$ e $8,3$ Hz, OH); 5,12 e 5,33 (1H, $2 \times d$, $J = 7,7$ e $8,1$ Hz, NCHO); 6,32 e 6,46 (1H, $2 \times s$, CHS), 7,22-7,70 (4H, m , ArH)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,03 e 8,69 (CH_3CH_2); 13,62 e 14,10 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 20,59; 20,85 e 24,02 (CH_3CH_2); 63,05 e 63,85 (OCH_2); 66,55 (Et_2C); 71,03 (NCHO); 72,31 e 72,67 (CHS); 110,53; 112,75; 124,54; 124,74; 130,77; 146,92 (Car); 167,69 (CO_2Et); 171,54 (O=CN); 180,77 (SC=N)

ESI-MS m/z 379 (MH^+).

3,3-Dietil-N-[(1-etoxicarbonil-1-hidroxi)metil]-4-fenoxi-2-azetidinona, 3.12d

Óleo; $\eta = 74$ % (mistura do par de enantiómeros)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3404, 3065, 1749, 1492, 1225, 1084

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 1,02 e 1,03 (3H, $2 \times t$, $J = 7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,05 e 1,05 (3H, $2 \times t$, $J = 7,5$ Hz, CH_3CH_2); 1,30 e 1,31 (3H, $2 \times t$, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 1,65-1,99 (4H, m , CH_3CH_2); 3,92 e 5,17 (1H, $2 \times d$, $J = 5,7$ e 6,8 Hz, OH); 4,17-4,42 (2H, m , OCH_2); 5,51-5,54 (2H, m , CHOPh e NCHO); 6,85-7,36 (5H, m , ArH)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 8,64 e 9,08 (CH_3CH_2); 13,97 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 22,14 e 23,77 (CH_3CH_2); 63,12 (OCH_2); 64,62 (Et_2C); 69,90 e 71,54 (NCHO), 85,16 e 86,92 (CHOPh); 116,36; 122,76; 129,82; 156,92 (Car); 169,23 (CO_2Et); 170,00 e 171,54 ($\text{O}=\text{CN}$)

ESI-MS m/z 321 (M^+)

5.5.2 Síntese de N-(1-aciloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidinonas***Técnica Geral***

A uma solução de **3.12** impuro (1,2 mmol) em diclorometano anidro (2 ml), arrefecida em banho de gelo, foi adicionado cloreto de 4-metoxibenzoílo (0,248g, 1,45 mmol) e trietilamina (1,45 mmol). Após 20 min, a mistura reaccional foi retirada do gelo e aqueceu lentamente à temperatura ambiente, ficando em agitação mais 120 minutos. O evoluir da reacção foi seguido por ccd. O resíduo obtido depois da evaporação do diclorometano e do excesso de trietilamina foi purificado por cromatografia em coluna. Na primeira coluna foi usado como eluente misturas de éter etílico-éter de petróleo e na segunda coluna o eluente foi diclorometano seguido de diclorometano- acetato de etilo (9,8:0,2). Com esta técnica isolaram-se os produtos **3.13 a-c**

Os dados de $^1\text{H-RMN}$ para estes compostos, encontram-se representados na Tabela 3.4 e os dados de $^{13}\text{C-RMN}$ na Tabela 3.5.

3,3-Dietil-*N*-{[1-(4-metoxibenzoil)oxi-1-etoxicarbonil]metil}-2-azetidinona, 3.13a

p.f. 52-53 °C; $\eta = 27\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2969, 1757, 1720, 1606, 1257, 1086

ESI-MS m/z 363 (MH⁺)

Análise (%) Encontrada C 62,70; H 6,94; N 3,74; C₁₉H₂₅NO₆ requer: C 62,80; H 6,93; N 3,85

3,3-Dietil-4-fenilsulfonil-*N*-{[1-(4-metoxibenzoil)oxi-1-etoxicarbonil]metil}-2-azetidinona, 3.13b

p.f. 110-112 °C; $\eta = 24\%$ (diastereoisómero maioritário)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2974, 1788, 1724, 1327, 1606, 1257, 1083

ESI-MS m/z 504 (MH⁺);

Análise (%) Encontrada: C 59,94; H 5,65; N 2,86; C₂₅H₂₉NO₈S requer: C 59,63; H 5,80; N 2,78

4-(1,3-Benzoxazol-2-iltio)-3,3-dietil-*N*-{[1-(4-metoxibenzoil)oxi-1-etoxicarbonil]metil}-2-azetidinona, 3.13c

Os dois diastereoisómeros (52:48) co-eluíram nas duas colunas.

p.f. 35-40 °C; $\eta = 65\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2972, 1789, 1756, 1721, 1358, 1259, 1081

ESI-MS m/z 513 (MH⁺)

Análise (%) Encontrada: C 60,91; H 5,50; N 5,38; C₂₆H₂₈N₂O₇S requer: C 60,92; H 5,51; N 5,47

5.5.3 Síntese de *N*-(oxazolidine-2,4-diona)-2-azetidionas e de *N*-(1-amino carboniloxi-1-etoxicarbonil)metil-2-azetidionas

Técnica Geral

A uma solução de **3.12** impuro (0,51 mmol) em diclorometano anidro (1,8 ml), foi adicionado o respectivo isocianato (0,53 a 0,61 mmol) e trietilamina (0,51mmol). A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente durante 60 a 90 min e foi seguida por ccd. O resíduo obtido depois da evaporação do diclorometano e do excesso de trietilamina foi purificado por cromatografia em coluna. Na primeira coluna foi usado como eluente misturas de éter etílico-éter de petróleo e na segunda coluna o eluente foi diclorometano seguido de diclorometano- acetato de etilo (9,8:0,2). Com esta técnica isolaram-se os produtos **3.16a-c,e,f** e ainda **3.15d,f**.

Os dados de $^1\text{H-RMN}$ para estes compostos, encontram-se representados na Tabela 3.6 e 3.8 e os dados de $^{13}\text{C-RMN}$ na Tabela 3.7 e 3.9.

***N*-(3-Benziloxazolidine-2,4-diona-5-il)-3,3-dietil-2-azetidionona, 3.16a**

p.f. 54-56 °C; $\eta = 33 \%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2969, 1821, 1751, 1440, 1379, 1345

ESI-MS m/z 334 (MNH_4^+).

Análise (%) Encontrada: C 64,41; H 6,44; N 8,66; $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$ requer: C 64,54; H 6,37; N 8,86

3,3-Dietil-4-fenilsulfonil-*N*-[3-(4-metoxifenil)oxazolidine-2,4-diona-5-il]-2-azetidionona, 3.16b

Diastereoisómero maioritário, 3.16bM

É ainda recristalizado de acetona-éter de petróleo.

p.f. 139-141 °C; $\eta = 33 \%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2974, 1826, 1755, 1789, 1515, 1254, 1368, 1333, 1254

ESI-MS m/z 490 (MNH_4^+)

Análise (%) Encontrada: C 58,46; H 5,73; N 5,41; C₂₃H₂₄N₂O₇S requer: C 58,46; H 5,12; N 5,93

Diastereoisómero minoritário, 3.16bm

p.f. 89-91 °C; η = 17 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2971, 1824, 1785, 1757, 1515, 1331, 1303, 1254

ESI-MS m/z 490 (MNH₄⁺).

Análise (%) Encontrada: C 58,46; H 5,21; N 5,66; C₂₃H₂₄N₂O₇S requer: C 58,46; H 5,12; N 5,93

***N*-(3-Benziloxazolidine-2,4-diona-5-il)-3,3-dietil-4-fenilsulfonil-2-azetidinona, 3.16c**

Diastereoisómero maioritário, 3.16cM

p.f. 54-56 °C; η = 27 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2973, 1827, 1789, 1751, 1443, 1334, 1155

ESI-MS m/z 475 (MNH₄⁺);

Análise (%) Encontrada: C 60,55; H 5,38; N 6,13; C₂₃H₂₄N₂O₆S requer: C 60,51; H 5,30; N 6,13

Diastereoisómero minoritário, 3.16cm

p.f. 170-173 °C; η = 13 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2973, 1826, 1788, 1752, 1443, 1333, 1155

ESI-MS m/z 475 (MNH₄⁺)

Análise (%) Encontrada: C 60,09; H 5,38; N 5,93; C₂₃H₂₄N₂O₆S requer: C 60,51; H 5,30; N 6,13

4-(1,3-Benzoxazol-2-iltio)-3,3-dietil-*N*-[3-(4-metilfenil)oxazolidine-2,4-diona-5-il]-2-azetidinona, 3.16e

Os dois diastereoisómeros (70:30) co-eluíram nas duas colunas.

p.f. 89-96 °C; η = 63 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2973, 1831, 1788, 1758, 1408, 1356

ESI-MS m/z 466 (MH⁺).

Análise (%) Encontrada: C 61,90; H 5,10; N 8,71; $C_{24}H_{23}N_3O_5S$ requer: C 61,92; H 4,98; N 9,03

***N*-(3-Benziloxazolidine-2,4-diona-5-il)-3,3-dietil-4-fenoxi-2-azetidinona, 3.16f**

Diastereoisómero maioritário, 3.16fM

p.f. 88-90 °C; $\eta = 26 \%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2971, 1824, 1783, 1752, 1440, 1376, 1344, 1223

ESI-MS m/z 409 (MH^+).

Análise (%) Encontrada: C 67,78; H 5,71; N 6,08; $C_{23}H_{24}N_2O_5$ requer: C 67,63; H 5,92; N 6,98

Diastereoisómero minoritário, 3.16fm

Óleo amarelo claro; $\eta = 17 \%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2970, 1834, 1781, 1753, 1492, 1376, 1345, 1223

ESI-MS m/z 409 (MH^+)

Análise (%) Encontrada: C 67,81; H 6,07; N 6,67; $C_{23}H_{24}N_2O_5$ requer: C 67,63; H 5,92; N 6,98

3,3-Dietil-4-fenilsulfonil-*N*-{[1-etoxicarbonil-1-(2-metoxicarbonilfenil)amino-carboniloxi]metil}-2-azetidinona, 3.15d

Diastereoisómero maioritário, 3.15dM

Recristalizado de éter etílico-éter de petróleo.

p.f. 117-119 °C; $\eta = 11 \%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3264, 2974, 1790, 1747, 1693, 1532, 1269, 1205

ESI-MS m/z 564 (MNH_4^+)

Análise (%) Encontrada: C 57,18; H 5,67; N 5,08; $C_{26}H_{30}N_2O_9S$ requer: C 57,13; H 5,53; N 5,13

Diastereoisómero minoritário, 3.15dm

p.f. 115-117 °C; $\eta = 8 \%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3263, 2973, 1789, 1748, 1531, 1452, 1268, 1206

ESI-MS m/z 564 (MNH_4^+)

Análise (%) Encontrada: C 56,47; H 5,73; N 4,68; C₂₆H₃₀N₂O₉S requer: C 57,13; H 5,53; N 5,13

***N*-[(1-Benzilaminocarboniloxi-1-etoxicarbonil)metil]-3,3-dietil-4-fenoxi-2-azetidino
na, 3.15f**

Diastereoisómero maioritário, 3.15fM (único isolado)

Óleo; $\eta = 17\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3365, 2971, 1781, 1763, 1736, 1493, 1224

ESI-MS m/z 455 (MH⁺)

Análise (%) Encontrada: C 66,03; H 6,65; N 5,92; C₂₅H₃₀N₂O₆ requer: C 66,06; H 6,65; N 6,16.

5.6 Obtenção de Oxazolidine-2,4-dionas

5.6.1 Síntese de *N*-aril-5-metiloxazolidine-2,4-dionas

Técnica Geral

À solução formada pelo 2-hidroxi-isobutirato de metilo (0,20 g; 1,7 mmol) em diclorometano anidro (5,7 ml) adicionou-se o isocianato pretendido (1,87 mmol) e a trietilamina (0,19 g; 1,87 mmol). A mistura reaccional esteve em agitação durante 1 h, à temperatura ambiente, sendo depois colocada em refluxo durante 5-11 h. O evoluir da reacção foi seguido por ccd. Após este período, o solvente e a trietilamina foram removidos por evaporação a pressão reduzida e os compostos purificados por cromatografia em coluna.

***N*-Fenil-5-metiloxazolidine-2,4-diona, 4.18a**

Eluente cromatográfico: diclorometano

p.f. 138-140°C; $\eta = 27\%$

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3063, 2940, 1823, 1736, 1413, 1319, 1185

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 1,74 (3H, *d*, $J=7,2$ Hz, CH₃); 5,54 (1H, *q*, $J=7,2$ Hz, CH₃CH); 7,43-7,54 (5H, *m*, AA'BB'M, ArH)

¹³C-NMR δ_C (CDCl₃): 16,63 (CH₃); 75,92 (CH₃CH); 125,52; 128,97; 129,39; 130,76 (Car); 153,93 (OCON); 172,39 (O=CN)

MS-EI *m/z* (%): 191 (26,5; M⁺); 119 (100; [C₆H₅NCO]⁺); 91 (25,6 [M-OCCHCH₃OCO]⁺); 77 (18,1, C₆H₅⁺)

***N*-Benzil-5-metiloxazolidine-2,4-diona, 4.18b**

Eluente cromatográfico: diclorometano/hexano (8:2) seguido de diclorometano

p.f. 98-100°C; $\eta=51$ %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3023, 1823, 1734, 1440, 1345

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 1,60 (3H, *d*, $J=7,2$ Hz, CH₃); 4,69 (2H, *s*, CH₂Ar); 4,87 (1H, *q*, $J=7,2$ Hz, CH₃CH); 7,32-7,37 (5H, *m*, AA'BB'M, ArH)

¹³C-NMR δ_C (CDCl₃): 16,61 (CH₃); 43,73 (CH₂Ar); 76,22 (CH₃CH); 128,5; 128,80; 128,90; 134,70 (Car); 155,06 (OCON); 173,26 (O=CN)

MS-EI *m/z* (%): 205 (68,2; M⁺); 106 (53,3; [C₆H₅CH₂NH]⁺); 91 (68,1; [C₆H₅CH₂]⁺); 77 (26,1; C₆H₅⁺)

Análise (%) Encontrada: C 64,27; H 5,56; N 6,84; C₁₁H₁₁NO₃ requer: C 64,38; H 5,40; N 6,83

***N*-(4-Clorofenil)-5-metiloxazolidine-2,4-diona, 4.18c**

Eluente cromatográfico: diclorometano

p.f. 148-151 °C; $\eta=46$ %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3020, 1808, 1724, 1407, 1179

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 1,74 (3H, *d*, $J=6,8$ Hz, CH₃); 5,05 (1H, *q*, $J=6,8$ Hz, CH₃CH); 7,44 (2H, *d*, AA', $J=8,8$ Hz, NArH_{*m*}); 7,50 (2H, *d*, BB', $J=8,8$ Hz, NArH_{*o*})

¹³C-NMR δ_C (CDCl₃): 16,79 (CH₃); 75,97 (CH₃CH); 126,60; 129,29; 129,58; 134,74 (Car); 153,53 (OCON); 172,07 (O=CN)

MS-EI m/z (%): 225 (37,3; M⁺); 227 (12,3; (M+2)⁺); 153 (100, [4-ClC₆H₄NCO]⁺); 111 (13,6; 4-ClC₆H₄⁺)

Análise (%) Encontrada: C 52,86; H 3,21; N 6,16; C₁₀H₈ClNO₃ requer: C 53,23; H 3,57; N 6,21.

5-Metil-N-(4-nitrofenil)oxazolidine-2,4-diona, 4.18d

Eluente cromatográfico: hexano/acetato de etilo (7:3). Recristalizado de diclorometano/hexano

p.f. 155-157 °C; η= 25 %

I.V. (filme) ν_{máx}/cm⁻¹: 3164, 1823, 1740, 1517, 1345, 1172

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 1,77 (3H, *d*, *J*=8,0 Hz, CH₃); 5,11 (1H, *q*, *J*=8,0 Hz, CH₃CH); 7,81 (2H, *d*, AA', *J*=8,0 Hz, NArH_o); 7,39 (2H, *d*, XX', *J*=8,0 Hz, NArH_m)

¹³C-NMR δ_C (CDCl₃): 16,77 (CH₃); 76,02 (CH₃CH); 124,63; 125,48; 136,36; 147,02 (Car); 152,75 (OCON); 171,56 (O=CN)

MS-EI m/z (%): 236 (82,6; M⁺); 164 (100; [4-NO₂C₆H₅NCO]⁺); 149 (63,7; [(4-NO₂C₆H₅NCH)⁺)

Análise (%) Encontrada: C 50,29; H 2,99; N 11,62; C₁₀H₈N₂O₅ requer: C 50,85; H 3,41; N 11,86.

5-Metil-N-(4-metoxifenil)oxazolidine-2,4-diona, 3.23

Eluente cromatográfico: éter etílico/hexano (1:1)

p.f. 141-144°C; η= 46 %

I.V. (filme) ν_{máx}/cm⁻¹: 3177, 1804, 1728, 1617, 1415

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 1,73 (3H, *d*, *J*=7,2 Hz, CH₃); 3,86 (3H, *s*, OCH₃); 5,03 (1H, *q*, *J*=7,2 Hz, CH₃CH); 7,02 (2H, *d*, AA', *J*=8,8 Hz, NArH_m); 7,32 (2H, *d*, XX', *J*=9,2 Hz, NArH_o)

¹³C-NMR δ_C (CDCl₃): 16,81 (CH₃); 55,56 (OCH₃); 75,94 (CH₃CH); 114,65; 123,30; 126,98; 154,26 (Car); 159,76 (OCON); 172,65 (O=CN)

MS-EI m/z (%): 221 (98,3; M⁺); 149 (100, [4-MeOC₆H₄NCO]⁺); 134 (84,4; [(4-MeOC₆H₄NCH)⁺])

Análise (%) Encontrada: C 59,73; H 4,51; N 6,16; C₁₁H₁₁NO₄ requer: C 59,73; H 5,01; N 6,33.

5.6.2 Síntese de 5,5-dimetil-N-(4-metoxibenzoil)oxazolidine-2,4-diona, 4.19

A uma solução de cloreto de 4-metoxibenzoílo (0,307 g; 1,80 mmol) em THF anidro (6,4 ml) foi adicionado uma solução de trietilamina (0,182 g; 1,80 mmol) em THF (0,4 ml). Após 10 minutos em agitação à temperatura ambiente, juntou-se à suspensão formada a 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona (0,150 g; 1,16 mmol). A mistura reaccional resultante foi colocada em refluxo durante 17 h, sendo seguida por ¹H-RMN. Diluiu-se a mistura reaccional com acetona (50 ml), filtrou-se e evaporou-se os solventes orgânicos a pressão reduzida. O produto **4.19** foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente hexano/acetato de etilo (7:3) e recristalizado de diclorometano/éter de petróleo.

p.f 79-81 °C; η= 41 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3100, 1817, 1753, 1709, 1600, 1345, 1262, 1179

¹H-NMR δ_{H} (CDCl₃): 1,73 (6H, s, CH₃); 3,92 (3H, s, OCH₃); 7,01 (2H, d, AA', J= 9,2 Hz, COArH_m); 7,85 (2H, d, XX', J= 9,2 Hz, COArH_o)

¹³C-NMR δ_{C} (CDCl₃): 23,84 (CH₃); 55,77 (OCH₃); 84,00 ((CH₃)₂C); 114,46; 123,00; 133,37; 150,93 (Car); 163,44 (OCON); 165,58 (COAr); 173,81 (O=CN)

MS-EI m/z (%): 263 (10,3; M⁺); 135 (100, [4-MeOC₆H₄CO]⁺); 107 (5,3; [4-MeOC₆H₄]⁺)

Análise (%) Encontrada: C 59,07; H 4,99; N 5,28; C₁₃H₁₃NO₅ requer: C 59,31; H 4,98; N 5,32.

5.6.3 Síntese de 5,5-dimetil-N-[(4-metilfenil)sulfonil]oxazolidine-2,4-diona, 4.20

Foram adicionados vestígios de sódio metálico à solução formada pelo cloreto de 4-metilbenzenosulfonilo (0,17 g; 0,89 mmol) e 5,5-dimetiloxazolidine-2,4-diona (0,15

g; 1,16 mmol) em THF anidro. A mistura reaccional ficou em refluxo durante 3 h e o evoluir da reacção foi seguido por ccd. Após diluição da mistura reaccional com diclorometano (15 ml) procedeu-se à sua filtração e o solvente do filtrado foi evaporado a pressão reduzida. O resíduo obtido, foi recristalizado de diclorometano/éter de petróleo obtendo-se o produto **4.20**.

p.f. 119-121°C; η = 22 %

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3049, 2971, 1811, 1772, 1587, 1389, 1300, 1172

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (CDCl_3): 1,56 (6H, *s*, CH_3); 2,50 (3H, *s*, ArCH_3); 7,43 (2H, *d*, AA', $J=8,4$ Hz, SO_2ArH_m); 8,06 (2H, *d*, XX', $J=8,4$ Hz, SO_2ArH_o)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (CDCl_3): 21,90 (CH_3); 23,61 (ArCH_3); 83,44 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$); 128,78; 130,25; 133,68; 147,28 (*Car*); 148,13 (OCON); 170,81 (O=CN)

MS-EI m/z (%): 283 (2,6; M^+); 219 (68,5; $[\text{M-SO}_2]^+$); 155 (48,1; $[\text{4-MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_2]^+$); 91 (85,2; $[\text{4-MeC}_6\text{H}_4]^+$); 70 (100; $[\text{Me}_2\text{CCO}]^+$)

Análise (%) Encontrada: C 50,95; H 4,18; N 4,88; $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ requer: C 50,88; H 4,62; N 4,94.

5.7 Metanólise de 5,5-dimetil-N-(4-metoxibenzoil)oxazolidine-2,4-diona

Após a dissolução do sódio metálico (4,0 mg; 0,174 mmol) em metanol super seco (1 ml) juntou-se o composto **4.19** (40,0 mg; 0,152 mmol). Controlou-se a reacção, que decorreu à temperatura ambiente, por ccd, verificando-se o desaparecimento de **4.19** ao fim de 2 minutos. Após evaporação do solvente da mistura reaccional, o resíduo obtido foi acidificado com uma solução de HCl (0,1N) até pH 1-2. Seguidamente diluiu-se a mistura acídica com água e procedeu-se a uma extracção com diclorometano (3× 20 ml). A fase orgânica total foi seca com sulfato de sódio e o diclorometano evaporado a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia preparativa utilizando como desenvolvimento éter etílico/hexano (6:4). Foram recolhidos os produtos **4.30** e **4.31**.

4-Metoxibenzoato de metilo, 4.30

$\eta = 29 \%$

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 3,88 (3H, *s*, CH₃OCO); 3,91 (3H, *s*, CH₃OAr); 6,94 (2H, *d*, AA', *J*=9,2 Hz, COAr*Hm*); 8,02 (2H, *d*, XX', *J*=9,2 Hz, COAr*Ho*)

MS-EI *m/z* (%): 166 (71,7; M⁺); 135 (100; [MeOC₆H₄CO]⁺); 107 (28,5; [MeOC₆H₄]⁺); 77 (48,4; C₆H₅⁺)

2-[(Benzoilamino)carbonil]oxi]-2-metilpropanoato de metilo, 4.31

$\eta = 16 \%$

¹H-NMR δ_H (CDCl₃): 1,67 (6H, *s*, (CH₃)₂CO); 3,79 (3H, *s*, CH₃OCO); 3,89 (3H, *s*, CH₃OAr); 6,97 (2H, *d*, AA', *J*=8,8 Hz, COAr*Hm*); 7,83 (2H, *d*, XX', *J*=8,8 Hz, COAr*Ho*); 8,11 (1H, *sl*, NH)

MS-EI *m/z* (%): 295 (35,7; M⁺); 177 (36,1; [4-MeOC₆H₄CONCO]⁺); 135 (100; [MeOC₆H₄CO]⁺); 107 (11,4; [4-MeOC₆H₄]⁺); 59 (44,9; MeOCO⁺)

5.8 Estudos Bioquímicos**5.8.1 Determinação da Actividade Catalítica da HLE**

Adicionou-se 10 μ l de HLE (20 μ M em DMSO) a 990 μ l do tampão HEPES 0,1M, pH 7,2 que se encontrava a 25°C. Após 1 min, retirou-se uma alíquota de 100 μ l da solução anterior, que se transferiu para uma célula de quartzo termostatada a 25°C que continha 880 μ l de tampão HEPES e 20 μ l da solução do substrato cromogénio, MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-NA. A absorvância da *p*-nitroanilina libertada, por degração do sustrato, foi monitorizada a 410 nm durante 120 s. A variação da absorvância em função do tempo permitiu determinar a velocidade de hidrólise do substrato pela enzima (*v*). As soluções de substrato testadas foram de 1,0; 5,0; 15,0; 30,0; 40,0 e 50 mM (em DMSO) e cada concentração foi ensaiada em triplicado ou quadruplicado.

5.8.2 Método de Pré-incubação

Os ensaios foram realizados a 25°C em tampão HEPES 0,1M, pH 7,2. Os substratos enzimáticos foram o MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-NA no caso da HLE e *N*-Suc-(Ala)₃-*p*-NA no caso da PPE. As soluções *stock* dos substratos assim como dos inibidores foram efectuadas em dimetilsulfóxido. A actividade enzimática de cada enzima foi monitorizada por detecção da libertação de *p*-nitroanilina, produto de hidrólise dos substratos, a 410 nm (HLE) ou a 390 nm (PPE).

Inibição da HLE

Os ensaios iniciavam-se por adição de 20 µl da solução *stock* do inibidor (1mM-10mM) à solução de incubação, a 25°C, que continha 10 µl de HLE (20 µM em tampão acetato, pH 5,0) e 970 µl de tampão HEPES. A intervalos de tempo pré-estabelecidos (aproximadamente 0,5; 3; 5; 7; 15; 60; 180; 360 e 1440 min) foram retiradas alíquotas (100 µl) da solução de incubação, para células de quartzo de 1ml, termostatadas a 25°C, com 880 µl de tampão HEPES 0,1M, pH 7,2 e 20 µl de MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-NA (50 mM em DMSO). A absorvância da *p*-nitroanilina foi monitorizada a 410 durante 60 s.

Inibição da PPE

Adicionavam-se 50 µl da solução *stock* do inibidor (1mM-60mM) à solução de incubação, a 25°C, que continha 100 µl de PPE (50 µM em tampão HEPES) e 850 µl de tampão HEPES. A intervalos de tempo pré-estabelecidos (aproximadamente 0,5; 3; 5; 7; 15; 60; 90 min) foram retiradas alíquotas (100 µl) da solução de incubação, para células de quartzo de 1ml, termostatadas a 25°C, com 890 µl de tampão HEPES 0,1M, pH 7,2 e 10 µl de *N*-Suc-(Ala)₃-*p*-NA (12,5mM em DMSO). A absorvância da *p*-nitroanilina foi monitorizada a 390 nm durante 60 s.

Com estes procedimentos, foram seguidas as velocidades de inibição enzimática e determinou-se, em cada ensaio, a constante de velocidade de primeira-ordem, k_{obs} , pela

representação gráfica de $\ln (v_t/v_0)$ *versus* tempo. Cada inibidor foi testado sobre a HLE ou PPE duas a quatro vezes.

O controlo dos ensaios de incubação foi sempre efectuado seguindo-se o procedimento descrito, mas substituindo-se a solução do inibidor por igual volume de dimetilsulfóxido. Considerou-se este ensaio controlo correspondente a 100% da actividade da enzima.

5.8.3 Método Contínuo

Foi adicionado 10 μ l de solução *stock* de PPE (20 μ M em tampão HEPES 0,1M, pH 7,2), a uma célula a 25°C, com 940 μ l de tampão HEPES 0,1M a pH 7,2; 20 μ l de DMSO, 20 μ l de *N*-Suc-(Ala)₃-*p*-NA (15mM em DMSO) e 10 μ l de inibidor **4.19** (0,2; 1,0; 3,0 e 10,0 mM em DMSO) ou **4.20** (2,0; 4,0 e 10 mM em DMSO). A reacção que se processou após adição de PPE foi monitorizada a 390 nm durante 20 minutos. Cada concentração foi ensaiada em duplicado ou triplicado.

5.8.4 Titulação da PPE

Em cada ensaio, é adicionando 50 μ l da solução *stock* do inibidor **4.19** à solução de incubação a 25°C, que continha 100 μ l de PPE (50 μ M em tampão HEPES) e 850 μ l de tampão HEPES, 0,1M, pH 7,2. Após 15 minutos de incubação é verificada a actividade enzimática por transferência de uma alíquota (100 μ l) para uma célula de quartzo, termostatada a 25°C, com 10 μ l de *N*-Suc-(Ala)₃-*p*-NA (12,5 mM em DMSO) e 890 μ l do tampão HEPES, sendo monitorizada a absorvância a 390 nm durante 60 s. As soluções *stock* de **4.19** tinham as concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0; 4,0 e 10 mM (em DMSO). Cada concentração de inibidor foi ensaiada em duplicado ou triplicado. O número de equivalentes de **4.19** necessários para inibir a PPE foi calculado como foi descrito por Knight e Waley, por representação gráfica da % da actividade enzimática remanescente ($[E]_t/[E]_0$) *versus* a razão entre o inibidor e a enzima ($[I]/[E]_0$).

5.9 Estudos Cinéticos

5.9.1 Espectroscopia de U.V.

Uma alíquota de 6 ou 12 μl de uma solução do substrato a estudar (10mM em acetonitrilo ou dimetilsulfóxido), foi injectada numa célula de quartzo, previamente termostatado à temperatura pretendida (25 ou 37°C) durante 10 minutos, contento 3 ml da solução tampão apropriada. A concentração final em substrato da solução formada foi de 2×10^{-5} M ou 4×10^{-5} M. As reacções foram monitorizadas no comprimento de onda que originasse a maior diferença entre A_0 (absorvância no tempo zero) e A_∞ (absorvância no fim da reacção) e encontram-se na Tabela 5.1.

As reacções efectuados em tampão PBS, HEPES e borato ocorreram em condições de pseudo-primeira-ordem e os coeficientes observados, k_{obs} , foram calculados a partir da Equação 5.1, onde A_t , A_0 e A_∞ são os valores de absorvância do substrato no tempo t , t_0 e t_∞ .

$$\ln [(A_t - A_\infty)/(A_0 - A_\infty)] = -k_{\text{obs}}t \quad (5.1)$$

A partir dos gráficos $\ln (A_t - A_\infty)$ versus tempo traçados para os vários substratos obtiveram-se rectas cujos declives indicam os valores das constantes de velocidade de hidrólise observadas, k_{obs} , como se representa na Figura 5.1.

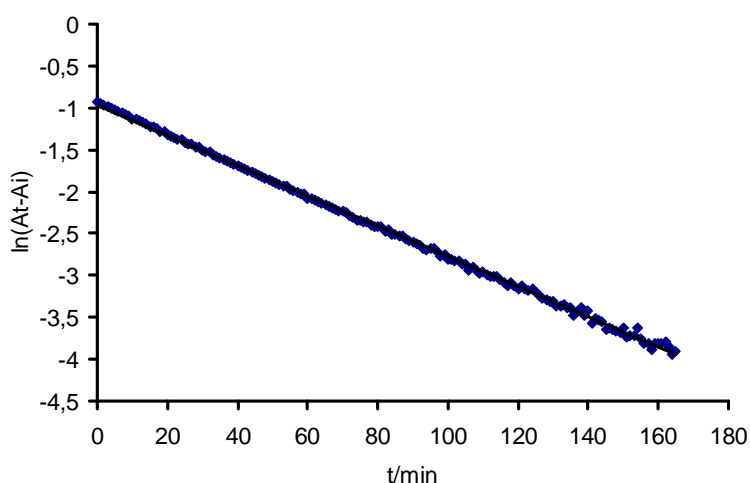


Figura 5.1- Gráfico para a determinação da constante de velocidade de hidrólise do composto **4.18d**, em tampão fosfato (PBS), pH 7,4 a 37°C. A absorvância foi seguida a 326 nm.

5.9.2. Cromatografia Líquida de Alta Resolução

Uma alíquota de 10 μl da solução stock de substrato (10mM em acetonitrilo) foi injectada num frasco, colocado previamente num banho termostatado a 37°C, contendo 5 ml de tampão fosfato com 20% de acetonitrilo (v/v). A concentração final da solução formada foi de 2×10^{-5} M. Ao longo do tempo foram retiradas amostras de 20 μl da mistura reaccional, as quais foram injectadas num aparelho de HPLC. O eluente utilizado foi uma mistura de acetonitrilo/água (55:45) sendo a análise realizada ao comprimento de onda de 215, 240 ou 260 nm.

Os valores de k_{obs} foram determinados pela representação gráfica de $\ln(\text{área})_t$ em função do tempo, como se exemplifica na Figura 5.2. As rectas representadas por este processo têm como equação geral a Equação 5.2.

$$\ln(\text{área})_t = -k_{\text{obs}}t \quad (5.2)$$

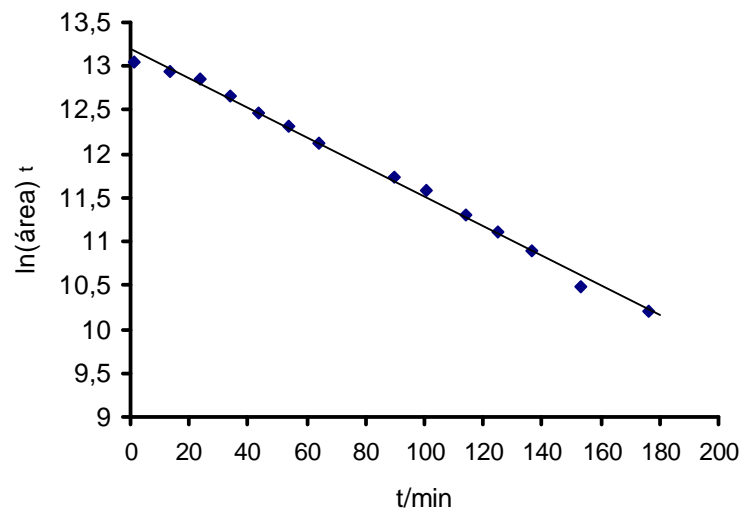


Figura 5.2- Gráfico para a determinação da constante de velocidade de hidrólise do derivado **3.16bM**, em tampão fosfato (PBS) com 20% de acetonitrilo (v/v), pH 7,4 a 37°C. A absorvância foi seguida a 240 nm.

Apêndice

Apêndice A. Hidrólise alcalina dos compostos **3.16bM**, **3.23**, **4.19** e **4.20**.

Tabela A.1 -Efeito da concentração de HO^- sobre a velocidade de hidrólise dos compostos **3.16bM**, **3.23**, **4.19** e **4.20** em soluções de tampão borato com 20% de acetonitrilo (v/v) a 25 °C; $\mu=0,50$ M (NaClO_4); $[\mathbf{3.16bM}]_0= 2 \times 10^{-5}$ M; $[\mathbf{3.23}]_0= 4 \times 10^{-5}$ M ; $[\mathbf{4.19}]_0= 4 \times 10^{-5}$ M; $[\mathbf{4.20}]_0= 4 \times 10^{-5}$ M.

3.16bM		
pH	$10^4 [\text{HO}^-]/\text{M}$	$10^4 k_{\text{obs}}/\text{s}^{-1}$
8,84	0,069	7,10
9,68	0,479	31,8
10,6	3,98	263
$k_{\text{OH}^-}= 66,10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $r^2= 0,999$		

3.23		
pH	$10^4 [\text{HO}^-]/\text{M}$	$10^4 k_{\text{obs}}/\text{s}^{-1}$
9,49	0,309	1,01
10,3	2,00	4,82
10,8	6,31	13,3
$k_{\text{OH}^-}= 2,14 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $r^2= 0,994$		

4.19		
pH	$10^4 [\text{HO}^-]/\text{M}$	$10^4 k_{\text{obs}}/\text{s}^{-1}$
8,82	0,066	2,11
9,49	0,309	3,70
10,3	2,00	17,3
$k_{\text{OH}^-}= 8,75 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $r^2= 0,976$		

4.20

pH	10^4 [HO⁻]/ M	$10^4 k_{\text{obs}}/ \text{s}^{-1}$
8,82	0,066	16,7
9,49	0,309	48,8
10,3	2,00	181

$k_{\text{OH}^-} = 92,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $r^2 = 0,965$

Bibliografia

- 1- Page, M. J.; Cera, Di E.; Serine peptidases: Classification, structure and function, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, *65*, 1220-1236.
- 2- Owen, C. A.; Campbell, E. J.; The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J. Leuk. Bio.*, **1999**, *65*, 137-150.
- 3- Yousef, G. M.; Elliott, M. B.; Kopolovic, A. D.; Serry, E.; Diamandis, E. P.; Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2004**, *1698*, 77-86.
- 4- PDB: Merops 8.5.<http://merops.sanger.ac.uk/10-11-2009>
- 5- Hedstrom, L.; Serine protease mechanism and specificity, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4501-4523.
- 6- Pochet, L.; Frédérick, R.; Masereel, B.; Coumarin and isocoumarin as serine protease inhibitors, *Curr. Pharm. Des.*, **2004**, *10*, 3781-3796.
- 7- Perona, J.J.; Craik, C. S.; Structural basis of substrate specificity, *Protein Science*, **1995**, *4*, 337-360.
- 8- Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P.; Protease inhibitors: Current status and future prospects, *J. Med Chem.*, **2000**, *43*, 305-341.
- 9- Polgár, L.; The catalytic triad of serine peptidases, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2005**, *62*, 2161-2172.
- 10- Topf, M.; Várnai, P.; Richards, W. G; Ab Initio QM/MM Dynamics simulation of the tetrahedral intermediate of serine proteases: Insights into the active site hydrogen-bonding network, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14780-14788.
- 11- Ishida, T.; Low-barrier hydrogen bond hypothesis in the catalytic triad residue of serine proteases: Correlation between structural rearrangement and chemical shifts in the acylation process, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 5413-5420.
- 12- Bernstein, P. R.; Edwards, P. D.; Williams, J. C.; Inhibitors of human leukocyte elastase, *Progress in Medicinal Chemistry*, **1994**, Vol.31, 59-120, Ellis, G.P. and Luscombe, D. K (editors).
- 13- Korkmaz, B.; Moreau, T.; Gauthier, F.; Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions, *Biochimie*, **2008**, *90*, 227-242.
- 14- Pham, C. T. N., Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **2008**, *40*, 1317-1333.

- 15-** Owen, C. A.; Campbell, E. J.; Extracellular proteolysis: New paradigms for an old paradox, *J. Lab. Clin. Med.*, **1999**, *134*, 341-351.
- 16-** Kawabata, K.; Hagio, T.; Matsuoka, S.; The role of neutrophil elastase in acute lung injury, *Eur. J. Pharmacol.*, **2002**, *451*, 1-10.
- 17-** Wiedow, O.; Meyer-Hoffert, U.; Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation, *J. Int. Med.*, **2005**, *257*, 319-328.
- 18-** Campbell, E. J.; Campbell, M. A.; Owen, C. A.; Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: Quantification catalytic activity, and susceptibility to inhibition, *J. Immunol.*, **2000**, *165*, 3366-3374.
- 19-** Hlasta, D. J.; Pagani, E. D.; Human leukocyte elastase inhibitors, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **1994**, Chapter 20, 195-204.
- 20-** Green, B. G.; Weston, H.; Ashe, B. M.; Doherty, J.; Finke, P.; Hagmann, W.; Lark, M.; Mao, J.; Maycock, A.; Moore, V.; Munford, R.; Shah, S. Walakovits, L. Knight, W. B.; PMN elastases: A comparison of the specificity of human isozymes and the enzyme from other species toward substrates and inhibitors, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1991**, *286*, 284-292.
- 21-** Bode, W.; Meyer, E.; Powers, J. C.; Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 1951-1963.
- 22-** Gent, D.; Sharp, P.; Morgan, K.; Kalsheker, N.; Serpins: structure, function and molecular evolution, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **2003**, *35*, 1536-154.
- 23-** Pradella, M.; Nemetz, L.; Bovo, C.; Visentin, M.; Clemen, P.; Zappalà, G.; Ossani, M.; Plebani, M.; Quantitative cytochemistry of human leukocyte elastase compared with plasma elastase and acute phase proteins in inflammatory diseases, *Clin. Chim. Acta*, **1995**, *239*, 91-101.
- 24-** Fujinaga, M.; Chernaia, M. M.; Halenbeck, R.; Koths, K.; James, M. N. G.; The crystal structure of PR3, a neutrophil serine proteinase antigen of Wegener's granulomatosis antibodies, *J. Mol. Biol.*, **1996**, *262*, 267-278.
- 25-** Korkmaz, B.; Attucci, S.; Hazouard, E.; Ferrandière, Martine, Jourdan, M. L., Brillard-Bourdet, M.; Juliano, L.; Gauthier, F.; Discriminating between the activities of human neutrophil elastase and proteinase 3 using serpin-derived fluorogenic substrates, *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 39074-39081.

- 26- Duranton, J.; Bieth, J. G.; Inhibition of proteinase 3 by α_1 -antitrypsin in vitro predicts very fast inhibition in vivo, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **2003**, *29*, 57-61.
- 27- Rao, N. V.; Wehner, N. G., Marshall, B. C.; Gray, W. R.; Gray, B. H.; Hoidal, J. R.; Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine protease, *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 9540-9548.
- 28- Church, M. K.; Levi-Schaffer, F.; The human mast cell, *J. Allergy Clin Immunol.*, **1997**, *99*, 155-160.
- 29- Miller, H. R. P.; Pemberton, A. D.; Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut, *Immunology*, **2002**, *105*, 375-390.
- 30- Hallgren, J., Pejler, G.; Biology of mast cell tryptase, *FEBS J.*, **2006**, *273*, 1871-1895.
- 31- Cairns, A. J.; Inhibitors of mast cell tryptase beta as therapeutics for treatment of asthma and inflammatory disorders, *Pulm. Pharm. Ther.*, **2005**, *18*, 55-66.
- 32- He, S.; Walls, A. F.; Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells *in vivo*, *Brit. J. Pharm.*, **1998**, *125*, 1491-1500.
- 33- Polanowska, J., Krokoszynska, I., Czapinska, H., Watorek, W., Dadlez, M.; Otlewski, J., Specificity of human cathepsin G, *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1386*, 189-198.
- 34- Duranton, J., Adam, C., Bieth, J.; Kinetic mechanism of the inhibition of cathepsin G by α_1 -antichymotrypsin and α_1 -proteinase inhibitor, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 11239-11245.
- 35- Boudier, C.; Holle, C.; Bieth, J. G.; Stimulation of the elastolytic activity of leukocyte elastase by leukocyte cathepsin G, *J. Biol. Chem.*, **1981**, *256*, 10256-10258.
- 36- Kinlough-Rathbone, R. L.; Perry, D. W.; Rand, M. L.; Packham, M. A.; Effects of cathepsin G pretreatment of platelets on their subsequent responses to aggregating agents, *Thrombosis Research*, **1999**, *95*, 315-323.
- 37- Owen, C. A.; Campbell, E. J.; Angiotensin II generation at the cell surface of activated neutrophils: Novel cathepsin G-mediated catalytic activity that is resistant to inhibition, *J. Immunol.*, **1998**, *160*, 1436-1443.

- 38-** Sykes, N. O.; Macdonald, S. J. F.; Page, M. I.; Acylating agents as enzyme inhibitors and understanding their reactivity for drug design, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2850-2856.
- 39-** Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D.; James, K. E.; Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4639-4750.
- 40-** Alpegiani, M.; Bissolino, P.; Corigli, R.; Del Nero, S.; Perrone, E.; Rizzo, V.; Sacchi, N.; Cassineli, G.; Franceschi, G.; Cephem sulfones as inactivators of human leukocyte elastase. 5.¹ 7 α -Methoxy- and 7- α -chloro-1,1-dioxocephem 4-cetones, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4003-4019.
- 41-** Teshima, T.; Griffin, J. C.; Powers, J. C.; A new class of heterocyclic serine protease inhibitors, *J. Biol. Chem.* , **1982**, *257*, 5085-5091.
- 42-** Krantz, A.; Spencer, R. W.; Tam, T. F.; Thomas, E.; Copp, L. J.; Design of alternate substrate inhibitors of serine proteases. Synergistic use of alkyl substitution to impede enzyme-catalyzed deacylation, *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 589-591.
- 43-** Krantz, A.; Spencer, R. W.; Tam, T. F.; Liak, T. J.; Copp, L. J.; Thomas, E. M.; Rafferty, S. P., Design and synthesis of 4H-3,1-benzoxazin-4-ones as potent alternate substrate inhibitors of human leukocyte elastase, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 464-479.
- 44-** Gütschow, M., Neumann, U.; Inhibition of cathepsin G by 4H-3,1-benzoxazin-4-ones, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 1935-1942.
- 45-** Gütschow, M., Neumann, U.; Sieler, J.; Eger, K.; Studies on 2-benzyloxy-4H-3,1-benzoxazin-4-ones as serine protease inhibitors, *Pharmaceutica Acta Helveticae*, **1998**, *73*, 95-103.
- 46-** Gütschow, M.; Kuerschner, L.; Pietsch, M.; Ambrozak, A.; Neumann, U.; Günther, R.; Hofmann, H.; Inhibition of cathepsin G by 2-amino-3,1-benzoxazin-4-ones: Kinetic investigations and docking studies., *Arch. Biochem. Biophys.*, **2002**, *402*, 180-191.
- 47-** Imaki, K.; Okada, T.; Nakayama, Y.; Nagao, Y.; Kobayashi, K.; Sakai, Y.; Mohri, T.; Amino, T.; Nakai, H, Kawamura, M.; Non-peptidic inhibitors of human neutrophil elastase: The design and synthesis of sulfonanilide-containing inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, *4*, 2115-2134.
- 48-** Abbenante, G.; Fairlie, D. P.; Protease inhibitors in the clinic, *Med. Chem.*, **2005**, *1*, 71-104.

- 49-** Nakayama, Y.; Odagaki, Y.; Fujita, S.; Matsuoka, S.; Hamanaka, N.; Nakai, H.; Toda, M.; Clarification of mechanism of human sputum elastase inhibition by a new inhibitor, ONO-5046, using electrospray ionization mass spectrometry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 2349-2353.
- 50-** Macdonald, S. J. F.; Belton, D. J.; Buckley, D. M.; Spooner, J. E.; Anson, M. S.; Harrison, L. A.; Mills, K.; Upton, R. J.; Dowle, M. D.; Smith, R. A.; Molloy, C. R.; Risley, C.; Syntheses of *trans*-5-oxo-hexahydro-pyrrolo[3,2-*b*]pyrroles and *trans*-5-oxo-hexahydro-furo[3,2-*b*]pyrroles (pyrrolidine *trans*-lactams and *trans*-lactones): New pharmacophores for elastase inhibition, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 3919-3922.
- 51-** Macdonald, S. J. F.; Dowle, M. D.; Harrison, L. A.; Spooner, J. E.; Shah, S.; Johnson, M. R.; Inglis, G. G. A.; Clarke, G. D. E.; Belton, D. J.; Smith, R. A.; Molloy, C. R.; Dixon, M.; Murkitt, G.; Godward, R. E.; Skarzynski, T.; Singh, O. M. P.; Kumar, K. A.; Hodgson, S. T.; MacDonald, E.; Hardy, G. W.; Finch, H.; Intracellular inhibition of human neutrophil elastase by orally active pyrrolidine-*trans*-lactams, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 243-246.
- 52-** Macdonald, S. J. F.; Dowle, M. D.; Harrison, L. A.; Shah, P.; Johnson, M. R.; Inglis, G. G. A.; Clarke, G. D. E.; Humphreys, D.; Molloy, C. R.; Amour, A.; Dixon, M.; Murkitt, G.; Godward, R. E.; Padfield, T.; Skarzynski, T.; Singh, O. M. P.; Kumar, K. A.; Fleetwood, G.; Hodgson, S. T.; Hardy, G. W.; Finch, H.; The discovery of a potent, intracellular, orally bioavailable, long duration inhibitor of human neutrophil elastase-GW311616A a development candidate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 895-898.
- 53-** Macdonald, S. J. F.; Dowle, M. D.; Harrison, L. A.; Clarke, G. D. E.; Inglis, G. G. A.; Johnson, M. R.; Shah, P.; Smith, R. A.; Amour, A.; Fleetwood, G.; Humphreys, D.; Molloy, C. R.; Dixon, M.; Godward, R. E.; Wonacott, A. J.; Singh, O. M. P.; Hodgson, S. T.; Hardy, G. W.; Discovery of further pyrrolidine *trans*-lactams as inhibitors of human neutrophil elastase (HNE) with potential as development candidates and the crystal structure of HNE complexed with an inhibitor (GW475151), *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 3878-3890.
- 54-** Aoyama, Y.; Uenaka, M.; Konoike, T.; Hayasaki-kajiwara, Y.; Naya, N.; Nakajima, M.; Inhibition of serine proteases: activity of 1,3-diazetidone-2,4-diones, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 1691-1694.

- 55-** Tsang, W.; Ahmed, N.; Hemming, K.; Page, M. I.; Reactivity and selectivity in the inhibition of elastase by 3-oxo- β -sultams and in their hydrolysis, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 3993-4000.
- 56-** Tsang, W. Y.; Ahmed, N.; Harding, L. P.; Hemming, K.; Laws, A. P. Page, M. P.; Acylation versus sulfonylation in the inhibition of elastase by 3-oxo- β -sultams, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 8946-8947.
- 57-** Mulchande, J.; Guedes, R. C., Tsang, W.; Page, M. I.; Moreira, R.; Iley, J.; Azetidine-2,4-diones (4-oxo- β -lactams) as scaffolds for designing elastase inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 1783-1790.
- 58-** Groutas, W. C.; Zhong, J.; Recent developments in the design of mechanism-bases and alternate substrate inhibitors of serine proteases, *Curr Top. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 1203-1216.
- 59-** Martyn, D. C.; Moore, M. J. B.; Abell, A. D. Succinimide and saccharine-based enzyme-activated inhibitors of serine proteases, *Curr. Pharm. Des.*, **1999**, *5*, 405-415.
- 60-** Walker, B.; Lynas, J. F.; Strategies for the inhibition of serine proteases, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, *58*, 596-624.
- 61-** Konaklieva, M. I.; β -Lactams as inhibitors of serine enzymes, *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents*, **2002**, *1*, 215-238.
- 62-** Veinberg, G.; Vorona, M.; Shestakova, I.; Kanepe, I.; Lukevics, E.; Design of β -lactams with mechanism based nonantibacterial activities, *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *10*, 1741-1757.
- 63-** Konaklieva, M. I.; Plotkin, B. J.; The Relationship between inhibitors of eukaryotic and prokaryotic serine, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 721-739.
- 64-** Groutas, W. C.; Kuang, R.; Venkataraman, R.; Epp, J. B.; Ruan, S.; Prakash, O.; Structure-based design of a general class of mechanism-based inhibitors of the serine proteinases employing a novel amino acid-derived heterocyclic scaffold, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 4739-4750.
- 65-** Groutas, W. C.; Brubaker, M. J.; Stanga, M. A.; Castrisos, J. C.; Crowley, J. P.; Schatz, E. J.; Inhibition of human leukocyte elastase by derivatives of *N*-hydroxysuccinimide. A structure-activity-relationship study, *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 1607-1611. **65a.** Groutas, W. C.; Stanga, M. A.; Brubaker, M. J.; ¹³C NMR evidence for an enzyme-induced Lossen rearrangement in the mechanism-based inactivation of α -

- chymotrypsin by 3-benzyl-*N*-((methylsulfonyl)oxy)succinimide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 1931-1932.
- 66-** Groutas, W. C.; Hoidal, J. R.; Brubaker, M. J.; Stanga, M.A.; Venkataman, R.; Gray, B. H.; Rao, N. V.; Inhibitors of human leukocyte proteinase-3, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 1085-1087.
- 67-** Groutas, W. C.; Brubaker, M. J.; Chong, L. S.; Venkataraman, R.; Huang, H.; Epp, J. B.; Kuang, R.; Hoidal, J. R.; Design, synthesis and biological evaluation of succinimide derivatives as potential mechanism-based inhibitors of human leukocyte elastase, cathepsin G and proteinase 3, *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, *3*, 375-381.
- 68-** Groutas, W. C.; Kuang, R.; Ruan, S.; Epp, J. B.; Venkataraman, R.; Truong, T. M.; Potent and specific inhibition of human leukocyte elastase, cathepsin G and proteinase 3 by sulfone derivatives employing the 1,2,5-thiadiazolidin-3-one 1,1 dioxide scaffold, *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, *6*, 661-671.
- 69-** Kuang, R.; Epp, J. B.; Ruan, S.; Chong, L. S.; Venkataraman, R.; Tu, J.; He, S.; Truong, T. M.; Groutas, W. C.; Utilization of the 1,2,5-thiadiazolidin-3-one 1,1 dioxide scaffold in the design of potent inhibitors of serine proteases: SAR studies using carboxylates, *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 1005-1016.
- 70-** He, S.; Kuang, R.; Venkataraman, R.; Tu, J.; Truong, T. M.; Chan, H.; Groutas, W. C.; Potent inhibition of serine proteases by heterocyclic sulfide derivatives of 1,2,5-thiadiazolidin-3-one 1,1 dioxide, *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 1713-1717.
- 71-** Groutas, W. C.; Epp, J. B.; Kuang, R.; Ruan, S.; Chong, L. S.; Venkataraman, R.; Tu, J.; He, S.; Yu, H.; Fu, Q.; Li, Y. H.; Truong, T. M.; Vu, N. T.; 1,2,5-Thiadiazolidin-3-one 1,1 dioxide: A powerful scaffold for probing the S' subsites of (chymo)trypsin-like serine proteases, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, *385*, 162-169.
- 72-** Groutas, W. C.; He, S.; Kuang, R.; Ruan, S.; Tu, J.; Chan, H.; Inhibition of serine proteases by functionalized sulfonamides coupled to the 1,2,5-thiadiazolidin-3-one 1,1 dioxide scaffold, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 1543-1548.
- 73-** Huang, W.; Yamamoto, Y.; Li, Y.; Dou, D.; Alliston, K. R.; Hanzlik, R. P.; Williams, T. D.; Groutas, W. C.; X-ray snapshot of the mechanism of inactivation of human neutrophil elastase by 1,2,5-thiadiazolidin-3-one 1,1-dioxide derivatives, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 2003-2008.

- 74-** Finke, P. E.; Shah, S. K.; Ashe, B. M.; Ball, R. G.; Blacklock, T. J.; Bonney, R. J.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Cotton, M.; Davies, P.; Dellea, P. S.; Dorn, Jr, C. P.; Fletcher, D. S.; O'Grady, L. A.; Hagmann, W. K.; Hand, K. M.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Mumford, R. A.; Osinga, D. G.; Sohar, P.; Thompson, K. R.; Weston, H.; Doherty, J. B.; Inhibition of human leukocyte elastase. 4. Selection of substituted cephalosporin (L-658,758) as a topical aerosol, *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 3731-3744.
- 75-** Doherty, J. B.; Ashe, B. M.; Barker, P. L.; Blacklock, T. J.; Butcher, J. W.; Chandler, G. O.; Dahlgren, M. E.; Davies, P.; Dorn, Jr, C. P. Finke, P. E.; Firestone, R. A.; Hagmann, W. K.; Halgren, T.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Navia, M. A.; O'Grady, L.; Pisano, J. M.; Shah, S. K.; Thompson, K. R.; Weston, H.; Zimmerman, M.; Inhibition of human leukocyte elastase. 1. Inhibition by C-7-substituted cephalosporin *tert*-butyl esters, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 2513-2521.
- 76-** Finke, E. P.; Ashe, B. M.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Navia, M. A.; Shah, S. K.; Thompson, K. R.; Underwood, D. J.; Weston, H.; Zimmerman, M.; Doherty, J. B.; Inhibition of human leukocyte elastase. 2. Inhibition by substituted cephalosporin esters and amides, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 2522-2528.
- 77-** Alpegiani, M.; Baici, A.; Bissolino, P.; Carminati, P.; Cassinelli, G.; Del Nero, S.; Franceschi, G.; Orezzi, P.; Perrone, E.; Rizzo, V.; Sacchi, N.; Synthesis and evaluation of new elastase inhibitors. I. 1,1-Dioxocephem-4-thiolesters, Abstr., *Eur. J. Med. Chem.*, **1992**, *27*, 875-890.
- 78-** Koteva, K. P.; Cantin, A. M.; Neugebauer, W. A.; Escher, E.; Synthesis and evaluation of novel β -lactam inhibitors of human leukocyte elastase, *Can. J. Chem.*, **2001**, *79*, 377-387.
- 79-** Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Green, B. G.; Ashe, B. M.; Gale, P.; Weston, H.; Finke, P. E.; Hagmann, W. K.; Shah, S. K.; Doherty, J. B.; Mechanism of inhibition of human leukocyte elastase by two cephalosporin derivatives, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 4980-4986.
- 80-** Shah, S. K.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Finke, P. E.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Doherty, J. B.; Inhibition of human leukocyte elastase. 3. Synthesis and activity of 3'-substituted cephalosporins, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 2529-2535.

- 81-** Hagmann, W. K.; Thompson, K. R.; Shah, S. K.; Finke, P. E.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Maycock, A. L.; Doherty, J. B.; The effect of N-acyl substituents on the stability of monocyclic β -lactam inhibitors of human leukocyte elastase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992**, *7*, 681-684.
- 82-** Shah, S. K.; Dorn, Jr, C. P.; Finke, P. E.; Hale, J. J.; Hagmann, W. K.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Kissinger, A. L.; Ashe, B.M.; Weston, H.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Dellea, P. S.; Fletcher, D. S.; Hand, K. M.; Mumford, R. A.; Underwood, D. J.; Doherty, J. B.; Orally active β -lactam inhibitors of human leukocyte elasyase-1. Activity of 3,3-diethyl-2-azetidiones, *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 3745-3754.
- 83-** Doherty, J. B.; Shah, S. K.; Finke, P. E.; Dorn, JR, C. P.; Hagmann, W. K.; Hale, J.J.; Kissinger, A. L.; Thompson, K. R.; Brause, K.; Chandler, G. O.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Gale, P.; Mumford, R. A.; Anderssen, O. F.; Williams, H. R.; Nolan, T. E.; Frankenfield, D. L.; Underwood, D.; Vyas, K. P.; Kari, P. H.; Dahlgren, M. E.; Mao, J.; Fletcher, D. S.; Dellea, P. S.; Hand, K. M.; Osinga, D. G.; Peterson, L. B.; Williams, D. T.; Metzger, J. M.; Bonney, R. J.; Humes, J. L.; Pacholok, S. P.; Hanlon, W. A.; Opas, E.; Stolk, J.; Davies, P.; Chemical, biochemical, pharmacokinetic and biological properties of L-680,833: A potent, orally active monocyclic β -lactam inhibitor of human polymorphonuclear leukocyte elastase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 8727-8731.
- 84-** Beauve, C.; Bouchet, M.; Touillaux, R.; Fastrez, J.; Marchand-Brynaert, J.; Synthesis, reactivity and biochemical evaluation of 1,3-substituted azetid-2-ones as enzyme inhibitors, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 13301-13320.
- 85-** Knight, W. B.; Swiderek, K. M.; Sakuma, T.; Calaycay, J.; Shively, J. E.; Lee, T. D.; Covey, T. R.; Shushan, B.; Green, B. G.; Chabin, R.; Shah, S.; Mumford, R.; Dickinson, T. A., Griffin, P. R.; Electrospray ionization mass spectrometry as a mechanistic tool: Mass of human leucocyte elastase and a β -lactam-derived E-I complex, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 2031-2035.
- 86-** Wilmouth, R. C.; Westwood, N. J.; Anderson, K.; Brownlee, W.; Claridge, T. D. W.; Clifton, I. J.; Pritchard, G. J.; Aplin, R. T.; Schofield, C. J.; Inhibition of elastase by N-sulfonylaryl β -lactams: Anatomy of a Stable Acyl-Enzyme Complex, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 17506-17513.

- 87-** Wilmouth, R. C.; Kassamally, S.; Westwood, N. J.; Sheppard, R. J.; Claridge, T. D. W.; Aplin, R. T.; Wright, P. A.; Pritchard, G. J.; Schofield, C. J.; Mechanistic insights into the inhibition of serine proteases by monocyclic lactams, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 7989-7998.
- 88-** Vergely, I; Boggetto, N.; Okochi, V.; Golpayegani, S.; Reboud-Ravaux, M.; Kobaiter, R.; Joyeau, R.; Wakselman, M.; Inhibition of human leukocyte elastase by functionalized *N*-aryl azetidins-2-ones: substituent effects at C-3 and benzylic positions, *Eur. J. Med. Chem.*, **1995**, *30*, 199-208.
- 89-** Joyeau, R.; Felk, A.; Guillaume, S.; Wakselman, M.; Vergely, I.; Doucet, C.; Boggetto, N.; Reboud-Ravaux, M.; Synthesis and inhibition of human leukocyte elastase by functionalized *N*-aryl azetidins-2-ones: Effect of different substituents on the aromatic ring, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1996**, *48*, 1218-1230.
- 90-** Doucet, C.; Vergely, I.; Reboud-Ravaux, M.; Guilhem, J.; Kobaiter, R.; Joyeau, R.; Wakselman, M.; Inhibition of human leukocyte elastase by functionalized *N*-aryl-3,3-dihaloazetidins-2-ones. Stereospecific synthesis and chiral recognition of dissymmetrically C₃-substituted β -lactams, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 739-751.
- 91-** Beauve, C.; Tjoens, G.; Touillaux, R.; Lamotte-Brasseur, J.; Marchand-Brynaert, J.; Fastrez, J.; 1-Alkoxy-carbonyl-3-bromoazetidins-2-ones as potential elastase inhibitors, *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 1441-1447.
- 92-** Gérard, S.; Nollet, G.; Put, J. V.; Marchand-Brynaert, J.; 1-Alkoxy-carbonyl-3-haloazetidins-2-ones as elastase (PPE) inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 3955-3964.
- 93-** Gérard, S.; Dive, G.; Clamot, B.; Touillaux, R.; Marchand-Brynaert, J.; Synthesis, hydrolysis, biochemical and theoretical evaluation of 1,4-bis(alkoxy-carbonyl)azetidins-2-ones as potential elastase inhibitors, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 2423-2433.
- 94-** Gérard, S.; Galleni, M.; Dive, G.; Marchand-Brynaert, J.; Synthesis and evaluation of N1/C4-substituted β -lactams as PPE and HLE inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 129-138.
- 95-** Hagmann, W. K.; Shah, S. K.; Dorn, C. P.; O'Grady, L. A.; Hale, J. J.; Finke, P. E.; Thompson, K. R.; Brause, K. A.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Dahlgren, M. E.; Maycock, A. L.; Dellea, P. S.; Hand, K. M.; Osinga, D. G.; Bonney, R. J.; Davies, P.; Fletceter, D.

- S.; Doherty, J. B.; Prevention of human leukocyte elastase-mediated lung damage by 3-alkyl-4-azetidiones, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1991**, *10*, 545-550.
- 96-** Hagmann, W. K.; Kissinger, A. L.; Shah, S. K.; Finke, P. E.; Dorn, C. P.; Brause, K. A.; Ashe, B. m.; Weston, H.; Maycock, A. L.; Knight, W. B.; Della, P. S.; Fletcher, D. S.; Hand, K. M.; Osinga, D.; Davies, P.; Doherty, J. B.; Orally active β -lactam inhibitors of human leukocyte elastase. 2. Effect of C-4 substitution, *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 771-777.
- 97-** Balsamo, A.; Asti, C.; Belfiore, M. S.; Brandolini, L.; Cercignani, G.; Gentili, D.; Macchia, M.; Mantovanini, M.; Orlandini, E.; Rossello, A.; New β -lactam monocyclic inhibitors of human elastases: Synthesis and anti-elastase properties of 1-carbamoyl-4-methyleneaminoxazetidione derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*; **1997**, *32*, 889-894.
- 98-** Macchia, B.; Gentili, D.; Macchia, M.; Mamone, F.; Martinelli, A.; Orlandini, E.; Rossello, A.; Cercignani, G.; Pierotti, R.; Allegetti, M.; Asti, C.; Caselli, G.; Synthesis, inhibitory activity towards human leukocyte elastase and molecular modelling studies of 1-carbamoyl-4-methyleneaminoxazetidiones, *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, *35*, 53-67.
- 99-** Finke, P. E.; Shah, S. K.; Fletcher, D. S.; Ashe, B. M.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Della, P. S.; Hand, K. M.; Maycock, A. L.; Osinga, D. G.; Underwood, D. J.; Weston, H.; Davies, P.; Doherty, J. B.; Orally active β -lactam inhibitors of human leukocyte elastase. 3. Stereospecific synthesis and structure-activity relationships for 3,3-dialkylazetid-2-ones, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 2449-2462.
- 100-** Chabin, R.; Green, B. G.; Gale, P.; Maycock, A. L.; Weston, H.; Dorn, C. P.; Finke, P. E.; Hagmann, W. K.; Hale, J. J.; MacCoss, M.; Shah, S. K.; Underwood, D.; Doherty, J. B.; Knight, W. B.; Mechanism of inhibition of human leucocyte elastase by monocyclic β -lactams, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 8970-8980.
- 101-** Green, B. G.; Chabin, R.; Mills, S.; Underwood, D.; Shah, S. K.; Kuo, D.; Gale, P.; Maycock, A. L.; Liesch, J.; Burgey, C. S.; Doherty, J. B.; Dorn, C. P.; Finke, P. E.; Hagmann, W. K.; Hale, J. J.; MacCoss, M.; Westler, W. M.; Knight, W. B.; Mechanism of inhibition of human leucocyte elastase by β -lactams. 2. Stability, reactivation kinetics and products of β -lactam-derived E-I complexes, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 14331-14343.
- 102-** Vicent, S. H.; Painter, S. K.; Luffer-Atlas, D.; Karanam, B. V.; McGowan, E.; Cioffe, C.; Doss, G.; Chiu, S. H.; Orally active inhibitors of human leukocyte elastase.

II. Disposition of L-694,458 in rats and rhesus monkeys, *Drug Metab. Dispos*, **1997**, *25*, 932-939.

103- Underwood, D. J.; Green, B. G.; Chabin, R.; Mills, S.; Doherty, J. B.; Finke, P. E.; MacCoss, M.; Shah, S. K.; Burgey, C. S.; Dickinson, T. A.; Griffin, P. R.; Lee, T. E.; Swiderek, K. M.; Covey, T.; wrestler, W. M.; Knight, W. B.; Mechanism of inhibition of human leucocyte elastase by β -lactams. 3. Use of electrospray ionization mass spectrometry and two-dimensional NMR techniques to identify β -lactam-derived E-I complexes, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 14344-14355.

104- Taylor, P.; Anderson, V.; Dowden, J.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J.; Loughran, K.; Walkinshaw, M. D.; Novel mechanism of inhibition of elastase by β -lactams is defined by two crystal complexes, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 24901-24905.

105- SPARC On-Line Calculator V4.2, <http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/>, 16-06-2009. Valores de pK_a para os sais de amónia conjugados das aminas **3.17** e **3.18**, respectivamente.

106- March, J; Advanced organic chemistry, reactions, mechanisms and structure, 4 th Ed, John Wiley & Sons, New York, 1992.

107- Patonay, T.; Patonay-Péli, E.; Zolnai, L.; Mogyoródi, F.; α -Haloalkyl Haloformates and Related Compounds 3. A facile synthesis of symmetrical and unsymmetrical ureas *via* chloromethyl carbamates, *Syn. Commun.*, **1996**, *26*, 4253-4265.

108- Li, Z.; Bitha, P.; Lang Jr, S. A.; Lin, Y.; Synthesis of (alkoxycarbonyloxy)methyl, (acyloxy)methyl and (oxodioxolenyl)methyl carbamates as bioreversible prodrug moieties for amines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *22*, 2909-2912.

109- Marinescu, L.; Thinggaard, J.; Thomson, I. B.; Bols, M.; Radical azidonation of aldehydes, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 9453-9455.

110- Bachi, M. D.; Frolow, F.; Hoornaert, C.; Free radical annelation in the synthesis of bicyclic β -lactams. 4. Exo vs. endo cyclizations in the construction of the (\pm)-1-oxacepham and (\pm)-1-oxahomocepham systems, *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 1841-1849.

111- Menezes, T. M. B. M. C.; Reactividade de ésteres carboxamido-, sulfonamido- e imido-metálicos de penicilinas, Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia de Lisboa, **1997**, *45*. **111 a.** Neres, J. - resultados não publicados.

- 112- Santana, A. B. F.; Síntese de pró-fármacos de anti-inflamatórios não esteróides, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia de Lisboa, **1999**, 36.
- 113- Babad, H.; Zeiler, A. G.; The chemistry of phosgene, *Chem. Rev.*, **1973**, 73, 75-91.
- 114- Nagai, H.; Shiozawa, T.; Achiwa, K.; Terao, Y.; Convenient synthesis of optically active β -lactams by enzymatic resolution, *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, 41, 1933-1938.
- 115- Laurent, M.; Cérésiat, M.; Marchand-Brynaert, J.; Synthesis of (1'R, 3S, 4S)-3-[1'-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)ethyl]-4-(cyclopropylcarbonyloxy)azetidin-2-one, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 3755-3766
- 116- Méndez, L.; Testero, S. A.; Mata, E.; Versatile and efficient solid-supported synthesis of C3-anchored monocyclic β -lactam derivatives, *J. Comb. Chem.*, **2007**, 9, 189-192.
- 117- Singh, G. S.; Recent progress in the synthesis and chemistry of azetidinones, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 7631-7649.
- 118- Firestone, R. A.; Barker, P. L.; Pisano, J. M.; Ashe, B. M.; Dahlgren, N.M. E.; Monocyclic β -lactam inhibitors of human leukocyte elastase, *Tetrahedron*, **1990**, 46, 2255-2262.
- 119- Silvestrain, R.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; Spectrometric identification of organic compounds, 5th Ed, John Wiley & Sons, New York, 1991.
- 120- Friebolin, H.; Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy, WILEY-VCH, Weinheim, **2005**.
- 121- Lehninger, A.L.; Bioquímica, Ediciones Omega, S.A, Barcelona, 1995.
- 122- GraphPad Prism, versão 5.02
- 123- Nakajima, K.; Powers, J. C.; Ashe, B. M.; Zimmerman, M.; Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase, *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 4027-4032
- 124- Kitz, R.; Wilson, I.B.; Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.*, **1962**, 237, 3245-3249.
- 125- Clemente, A.; Domingos, A.; Grancho, A. P.; Iley, J.; Moreira, R.; Neres, J.; Palma, N.; Santana, A.B., Valente, E., Design, synthesis and stability of *N*-acyloxymethyl- and *N*-aminocarbonyloxymethyl-2-azetidinones as human leukocyte elastase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2001**, 11, 1065-1068.

- 126-** Powers, J. C.; Oleksyszyn, J.; Narasimhan, S.L.; Kam, C.; Reaction of porcine pancreatic elastase with 7-substituted 3-alkoxy-4-chloroisocoumarins: Design of potent inhibitors using the crystal structure of the complex formed with 4-chloro-3-ethoxy-7-guanidinoisocoumarin, *Biochemistry*, **1990**, *29*, 3108-3118.
- 127-** ALOGPS 2.1, www.vcclab.org, 16-06-2009.
- 128-** Moreira, R.; Santana, A.B.; Iley, J.; Neres, J.; Douglas, K. T., Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Design, synthesis, and enzymatic evaluation of *N*¹-acyloxyalkyl- and *N*¹-oxazolidin-2,4-dion-5-yl-substituted β -lactams as novel inhibitors of human leukocyte elastase, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4861-4870.
- 129-** Barret, A. G. M.; Baugh, S. P. D.; Braddock, D. C.; Flack, K.; Gibson, V. C.; Giles, M. R.; Marshall, E. L.; Procopiou, P. A.; White, A. J. P.; Williams, D. J.; Rapid entry into mono-, bi-, and tricyclic β -lactam arrays via alkene metathesis, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 7893-7907.
- 130-** Jacobsen, M. F.; Turks, M.; Hazell, R.; Skrydstrup, T.; SmI₂-mediated cyclizations of derivatized β -lactams for the highly diastereoselective construction of functionalized prolines, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 2411-2417.
- 131-** Branch, C. L.; Nayler, J. H. C.; Pearson, M. J.; Synthesis of some 1-oxadethiaceph-3-ems, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1978**, 1450-1452.
- 132-** Oumoch, S.; Rousseau, G.; A new access to racemic carbacephems, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1996**, *133*, 997-1003.
- 133-** Ogilvie, W.W.; Durst, T.; Oxidation of 3-alkylidene- β -lactams. A preparation of 3-alkenyl-3-hydroxy- β -lactams, *Can. J. Chem.*, **1988**, *66*, 304-309.
- 134-** Clark-Lewis, J. W.; 2,4-Oxazolidinediones, *Chem. Rev.*, **1958**, *58*, 63-99.
- 135-** Li, Y.H.; Zhang, L.; Tseng, P.; Zhang, Y.; Jin, Y.; Shen, J.; Jin, J.; A facile one-pot synthesis of 3-unsubstituted-2,4-oxazolidinediones via *in situ* generation of carbamates from α -hydroxyesters using trichloroacetyl isocyanate, *Tetrahedron Letters*, **2009**, *50*, 790-792.
- 136-** Guanti, G; Banfi, L.; Powles, K.; Rasparini, M.; Scolastico, C.; Fossati, N.; Asymmetric synthesis of (R)-(-)-chlozolate through a chemoenzymatic procedure, *Tetrahedron:Asymmetry*, **2001**, *12*, 271-277.
- 137-** Perrin, D.D.; Dempsey, B.; Serjeant, E. P.; p*K*_a Prediction for organic acids and bases, Chapman and Hall, London, **1981**.

- 138-** Moreira, R.; Calheiros, T.; Cabrita, J.; Mendes, E.; Pimentel, M.; Iley, J.; Acyloxymethyl as a drug protecting group. Part 3. Tertiary *O*-amidomethyl esters of penicillin G: Chemical hydrolysis and anti-bacterial activity, *Pharm. Res.*, 1996, 13, 70-75.
- 139-** Valente, E.; Gomes, J. R. B.; Moreira, R. Iley, J.; Kinetics and mechanism of hydrolysis of *N*-acyloxymethyl derivatives of azetidin-2-one, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 3359-3367.
- 140-** Spielman, M. A.; Some analgesic agents derived from oxazolidine-2,4-dione, *J. Am. Chem. Soc.*, **1944**, 66, 1244.
- 141-** U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/>
- 142-** Índice Nacional Terapêutico, Tupam Editores, Lisboa, **1998**, 66, 587.
- 143-** Schnur, R. C.; Morville, M.; Improved glucose tolerance in rats treated with oxazolidinediones, *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 770-778.
- 144-** Momose, Y.; Maekawa, T.; Yamano, T.; Kawada, M.; Odaka, H.; Ikeda, H.; Sohda, T.; Novel 5-substituted 2,4-thiazolidinedione and 2,4-oxazolidinedione derivatives as insulin sensitizers with antidiabetic activities, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1518-1534.
- 145-** Pospíšil, L.; Sokolová, R.; Colombi, M.P.; Giannarelli, S.; Fuoco, R.; Electrochemical properties of three dicarboximide-type pesticides: vinclozoline, iprodione and procymidone, *J. Electroanal. Chem.*, **1999**, 472, 33-41.
- 146-** Jernberg, K. M.; Lee, P. W.; Fate of famaxadone in the environment, *Pestic Sci.*, **1999**, 55, 566-614.
- 147-** Zha, C.; Brown, G.B.; Brouillette, W. J.; Synthesis and structure-activity relationship studies for hydantoin and analogues as voltage-gated sodium channel ligands, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 6519-6528.
- 148-** Cesa, S.; Mucciante, V.; Rossi, L.; Tetraethylammonium hydrogen carbonate in organic synthesis: Synthesis of oxazolidine-2,4-diones, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 193-200.
- 149-** Kurz, T.; Widyan, K.; Microwave-assisted conversion of *N*-substituted oxazolidin-2,4-diones into α -hydroxyamides, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 7247-7251.
- 150-** Theissen, R. J.; Herbicidal *N*-(5,5-dimethyloxazolidenyl)-2,4-dione)-5-(substituted phenoxy)-2-substituted benzamides, **U.S.**, 4367090, **1983**.

151- Knight, W.B.; Green, B.G.; Chabin, R.M.; Gale, P.; Mycocoock, A. L.; Weston, H.; Kuo, D. W.; Westler, W. M.; Dorn, C. P.; Finke, P. E.; Hagmann, W. K.; Hale, J. J.; Liesch, J.; MacCoss, M.; Navia, M. A.; Shah, S. K.; Underwood, D.; Doherty, J. B.; Specificity, stability, and potency of monocyclic β -lactam inhibitors of human leucocyte elastase, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 8160-8170.

152- Mulchande, J.; Martins, L.; Moreira, R.; Archer, M.; Oliveira, T.F.; Iley, J.; The efficiency of C-4 substituents in activating the β -lactam scaffold towards serine proteases and hydroxide ion, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 2617.

153- Yang, Q.; Li, Y.; Dou, D.; Gan, X.; Mohan, S.; Groutas, C. S.; Stevenson, L. E.; Lai, Z.; Alliston, K. R.; Zhong, J.; Williams, T. D.; Groutas, W. C.; Inhibition of serine proteases by a new class of cyclosulfamide-based carbamylating agents, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**, *475*, 115-120.

154- Harper, J. W.; Powers, J. C.; Reaction of serine proteases with substituted 3-alkoxy-4-chloroisocoumarins and 3-alkoxy-7-amino-4-chloroisocoumarins: New reactive mechanism-based inhibitors, *Biochemistry*, **1985**, *24*, 7200-7213.

155- Kerrigan, J. E.; Oleksyszyn, J.; Kam, C.; Selzler, J.; Powers, J.; Mechanism-based isocoumarin inhibitors for human leukocyte elastase. Effect of the 7-amino substituent and 3-alkoxy group in 3-alkoxy-7-amino-4-chloroisocoumarins on inhibitory potency, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 544-552.

156- Vagnoni, L. M.; Gronostaj, M.; Kerrigan, J. E.; 6-Acylamino-2-[(ethylsulfonyl)oxy]-1*H*-isoindole-1,3-diones mechanism-based inhibitors of human leukocyte elastase and cathepsin G: Effect of chirality in the 6-acylamino substituent on inhibitory potency and selectivity, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 637-645.

157- Gallelli, J. F.; Kostenbauder, H. B.; Kinetics of base-catalyzed hydrolysis of trimethadione, *J. Pharm. Sci.*, **1963**, *52*, 649-656.

158- Groutas, W. C.; Houser-Archield, N.; Chong, L. S.; Venkataraman, R.; Epp, J. B.; Huang, H.; McClenaham, J.J.; Efficient inhibition of human leukocyte elastase and cathepsin G by saccharin derivatives, *J. Med. Chem.*; **1993**, *36*, 3178-3181.

159- Seymour, L. S.; Rose, I. M.; Roskin, E.; Freedman, L.; Pyridylethylated oxazolidinediones. II, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 386-390.

160- Hincheliffe, P. S.; Wood, J. M.; Davis, A. M.; Austin, R. P.; Beckett, R. P.; Page, M. I.; Structure-reactivity relationships in the inactivation of elastase by β -sultams, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 67-80.

Durante este trabalho foram publicados os artigos que seguidamente serão apresentados.



Pergamon

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 11 (2001) 1065–1068

BIOORGANIC &
MEDICINAL
CHEMISTRY
LETTERS

Design, Synthesis and Stability of *N*-Acyloxymethyl- and *N*-Aminocarbonyloxymethyl-2-azetidinones as Human Leukocyte Elastase Inhibitors

A. Clemente,^a A. Domingos,^a A. P. Grancho,^a J. Iley,^b R. Moreira,^{c,*} J. Neres,^c
N. Palma,^{d,e} A. B. Santana^c and E. Valente^c^aINETI, Dep. Biotecnologia, Estrada das Palmeiras, 1649 Lisboa, Portugal^bChemistry Department, The Open University, Milton Keynes MK7 6AA, UK^cCECF, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Forças Armadas, 1600 Lisboa, Portugal^dCentro de Química Fina e Biotecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2825 Monte de Caparica, Portugal^eInstituto Superior de Ciências da Saúde-Sul, 2829 Monte de Caparica, Portugal

Received 27 November 2000; revised 13 February 2001; accepted 23 February 2001

Abstract—A series of *N*-acyloxymethyl- and *N*-aminocarbonyloxymethyl derivatives of 2-azetidinones, **3**, with different substituent patterns at the β -lactam C-3 and C-4 positions, were designed as potential mechanism-based inhibitors for human leukocyte elastase and found to exhibit inhibitory potency and selectivity for the enzyme. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

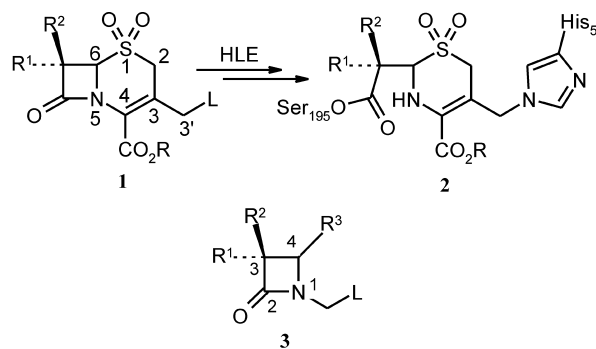
Human leukocyte elastase (HLE, EC 3.4.21.37) is a serine protease that has received great attention because it efficiently degrades various tissue matrix proteins such as elastin.¹ The imbalance between HLE and its endogenous inhibitors and the subsequent excessive elastin proteolysis has been implicated in acute and chronic inflammatory diseases of the lungs.^{2,3} Thus, specific inhibitors of HLE capable of restoring the protease/antiprotease imbalance might be beneficial in such pathologies.^{4,5}

Cephalosporin sulfones, e.g., **1**, are potent, mechanism-based irreversible HLE inhibitors.^{6–8} A structural requirement of **1** is the presence of a good leaving group L (e.g., acetate) at the 3'-position, which is thought to provide an electrophilic center for the nucleophilic attack of histidine-57 following initial serine-195 attack at the β -lactam carbonyl atom (Scheme 1). We reasoned that simple β -lactams **3**, in which L is a good leaving group such as a carboxylic or carbamic acid, would also be capable of inhibiting HLE via a similar 'double-hit' mechanism. From our previous experience with the chemistry of *N*-acyloxymethylamides,^{9,10} appending a

leaving group with $pK_a > 4$ would be expected to increase substantially the stability of **3** in aqueous buffers and thus increase their ability to reach their target. We now report the synthesis and biochemical evaluation of C-3 and C-4 substituted *N*-acyloxymethyl and *N*-aminocarbonyloxymethyl-2-azetidinones.

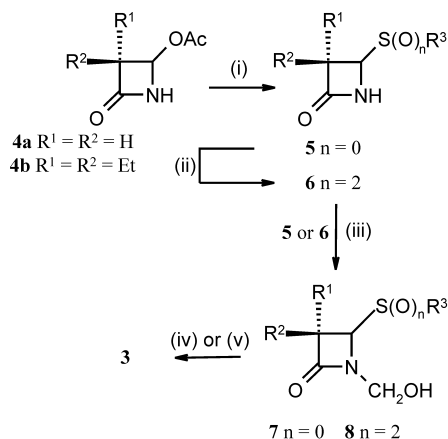
Compounds **3** were prepared (Scheme 2) by known methods,¹¹ using the appropriate 4-acetoxy-2-azetidinones **4**^{1b} as starting materials.

Compounds **3** were found to be time-dependent irreversible inhibitors of HLE, the inhibitory activity (Table 1)



Scheme 1.

*Corresponding author. Tel.: +351-21-794-6416; fax: +351-21-794-6470; e-mail: rmoreira@ff.ul.pt



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) R³SH/NaOH/acetone; (ii) MCPBA; (iii) HCHO/aq K₂CO₃; (iv) RCOCl/Et₃N; RNCO/Et₃N.

being expressed by the bimolecular rate constant $k_{\text{obs}}/[I]$ determined by Kitz and Wilson's pre-incubation method.^{12,13} The irreversible nature of the inactivation was shown when no significant reactivation of enzyme activity was detected upon dialyzing HLE against pH 7.2 HEPES buffer for 24 h. Independently, the native enzyme itself was found to retain activity after dialysis. Inhibition toward pancreatic porcine elastase (PPE) was also evaluated,¹⁴ but none of the compounds studied inactivated this enzyme at $[I]/[E] = 200$. The compounds **3** displayed variable inhibitory potencies towards HLE, the unsubstituted prototype **3a** being a fair inhibitor (Table 1). Unfortunately, compound **3b** could not be evaluated under the assay conditions due to solubility problems. For comparison, data for two cephalosporins is also presented in Table 1. Inspection of the data in Table 1, allows the following conclusions to be drawn.

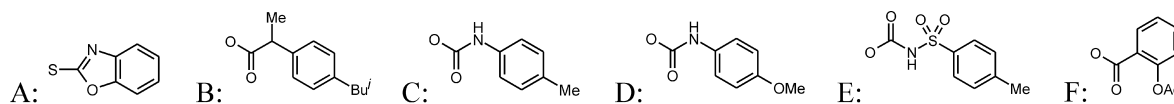
Table 1. Second-order rate constants, $k_{\text{obs}}/[I]$, for the inhibition of HLE and PPE by *N*-acyloxymethyl- and *N*-aminocarbonloxymethyl-2-azetidiones **3** at 25 °C, and half-lives in pH 7.4 phosphate buffer at 37 °C

Compound	R ¹	R ²	R ³	L	$k_{\text{obs}}/[I]$, M ⁻¹ s ⁻¹		Stability $t_{1/2}$ /h
					HLE	PPE	
3a	H	H	H	OCOC ₆ H ₅	35.5	NI ^a	1.3
3b	H	H	H	B	ND	ND ^b	ND
3c	H	H	SO ₂ C ₆ H ₅	OCOC ₆ H ₅	18.7	NI	978
3d	H	H	SC ₆ H ₅	OCOC ₆ H ₅	NI	ND	ND
3e	H	H	A	OCOC ₆ H ₅	43.2	NI	ND
3f	Et	Et	A	OCOC ₆ H ₅	52.8	NI	316
3g	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	OCOC ₆ H ₅	67.5	NI	2995
3h	Et	Et	SC ₆ H ₅	OCOC ₆ H ₅	2.2	ND	ND
3i	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	OCOC ₆ H ₅	41.9	NI	ND
3j	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	C	60.9	NI	ND
3k	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	D	100.3	NI	> 5000
3l	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	E	32.3	ND	ND
8b	Et	Et	SO ₂ C ₆ H ₅	OH	NI	ND	ND
9	H	H	H	OH	NI	ND	ND
1a ^{7a}	MeO	H	—	OAc	19000	—	—
1b ^{7b}	MeO	H	—	F	0.11 μM ^c	—	19

^aNo inhibition.

^bNot determined.

^cIC₅₀.



Substitution at C-3

Substitution at this position generally leads to more potent inhibitors. Incorporation of two ethyl groups at C-3 increases inhibition up to ca. 4-fold (compounds **3c** and **3g**). This finding is in agreement with the known S₁ subsite specificity of HLE toward small hydrophobic substituents with three or four carbon atoms¹⁵ and is identical to the reported preference of HLE toward C-3 substituted *N*-acyl-2-azetidiones.^{11,16}

Substitution at C-4

The phenyl sulfones **3c** and **3g** are more potent inhibitors of HLE than the corresponding sulfides, **3d** and **3h**, respectively. This result compares to the superior HLE inhibitory activity displayed by cephalosporin sulfones **1** relative to their sulfide counterparts.^{6,7} However, there is not an absolute requirement for a sulfone at C-4 to achieve HLE inhibition, as shown by the inhibition displayed by the sulfides **3e** and **3f** as well as by the 2-fold greater inhibitory potency of **3a** over its sulfone-containing analogue **3c**. The superior activity displayed by the 4-phenylsulfone and 4-(2'-thiobenzoxazolyl) derivatives can be ascribed to the electronegativity of these substituents, which is likely to increase the reactivity of the β-lactam carbonyl group. Alternatively, both sulfone and 2-mercaptobenzoxazole may function as leaving groups after the β-lactam ring opening (Scheme 3, path B). A similar mechanism, in which a sulfone serves as a leaving group, has been suggested for the β-lactamase inhibition by sulbactam.¹⁷ Indeed, it was recently reported that the use of 2-mercaptobenzoxazole and related sulfides as leaving groups in the 1,2,5-thiadiazolidin-3-

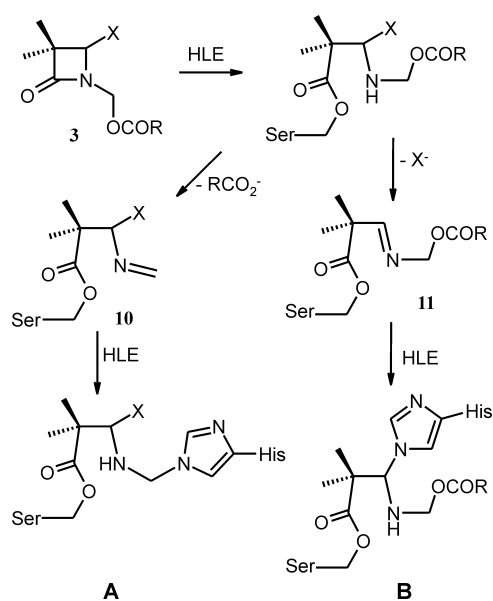
one 1,1-dioxide scaffold resulted in highly potent HLE inhibitors.¹⁸

Nature of the Leaving Group L

Both carboxylate and carbamic acid leaving groups lead to active compounds, the most active compound being the 4-methoxyphenylcarbamic acid derivative **3k**. Use of a poor leaving group, L=OH, (**8b** and **9**) leads to the loss of inhibitory activity. Modification of the leaving group by using an ionizable functionality to increase solubility reduced inhibitory potency (compare compounds **3j** and **3l**, the latter of which has pK_a ca. 3¹⁹).

Stability

The stability study carried out in pH 7.4 phosphate buffer reveals that reactivity is mainly dependent on the C-4



Scheme 3.

substituent (Table 1). Indeed, while the unsubstituted compound **3a** is rapidly hydrolyzed with $t_{1/2}$ of ca. 80 min, its 4-phenylsulfone analogue **3c** presents a 750-fold increase in stability. Introducing the C3 substituents leads to further increase in stability (**3c** vs **3g**). Carbamate leaving groups lead to improved stability, when compared to a carboxylate leaving group (**3g** vs **3k**).

Molecular Modeling

The molecular interactions between the inhibitors **3** and HLE (PDB code 1hne) were studied with the program GOLD.^{20–22} Docking results show that the presence of ethyl groups at C3 consistently restricts the degrees of freedom of ligand binding as compared to the non-substituted analogues (compounds **3d/3h**, **3c/3g** and **3e/3f**), and helps anchor the ligand in the S₁ subsite forcing the carbonyl C2 into close vicinity of the Ser195 hydroxyl oxygen ($d < 3\text{\AA}$).

Substitution at C4 greatly enhances the van der Waals contacts with Leu99 and His57. Moreover, the presence of a sulfone (compounds **3c** and **3g** compared to **3d** and **3h**, respectively) enables a further stabilization of the complex by hydrogen bonding to the NH of Val216 (2.5 Å) (Fig. 1). The larger benzoxazolyl moiety of **3f** seems to force the β -lactam ring deeper inside the active site, reducing the distance between C2 and Ser195 hydroxyl oxygen. Comparative docking experiments with the C4 substituted inhibitors (e.g., **3k**) indicate that only *R*-enantiomers consistently interact with the β -lactam carbonyl carbon atom accessible to the serine hydroxyl oxygen. This finding suggests that a stereospecific synthesis of the *R*-enantiomers alone should improve inhibitor potency.

Interestingly, our docking results with the intermediate **11** do not support the hypothetical mechanism in which the substituents at C4 would function as the leaving group (Scheme 3, path B). In fact, all docked configurations of intermediate **11** show that the electron deficient C4 atom becomes sterically inaccessible to the

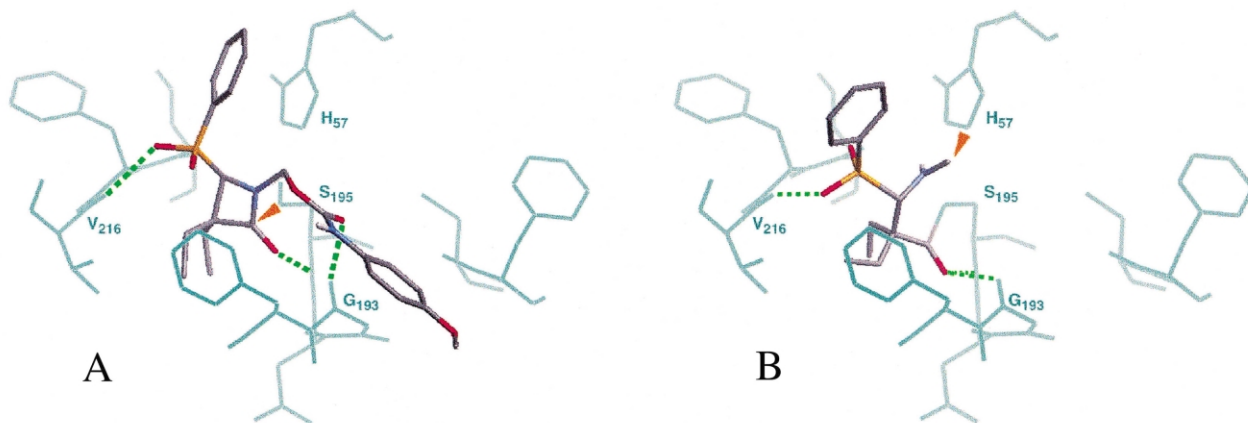


Figure 1. Molecular docking of inhibitors into the active site of HLE (see text for details of docking procedure). A: Inhibitor **3k** interacting with active site by van der Waals contacts and hydrogen bonding (green dashed lines). B: Best scoring docked configuration of intermediate **10**, covalently bound to Ser195. Orange arrows show close contacts between enzyme nucleophiles and electron deficient atoms of the ligand.

His57 nitrogen atom. In contrast, the alternative mechanism involving the intermediate **10** (Scheme 3, path A) appears to be compatible with our docking experiments. Figure 1B shows this intermediate bound to the active site Ser195 and with the methylene group facing the NE2 atom of His57 ($d = 2.7 \text{ \AA}$).

In conclusion, *N*-acyloxymethyl- and *N*-aminocarbonyloxymethyl-2-azetidinones **3** are time-dependent irreversible inhibitors of HLE. Derivatives **3** containing either a phenyl sulfone or a 2'-mercaptobenzoxazolyl substituent at C-4 and a *gem*-diethyl at C-3 were the most potent inhibitors. The results are consistent with, though do not prove, the mechanism A depicted in Scheme 3, with substituents at C-4 enhancing the reactivity of the β -lactam carbonyl. Ongoing studies aimed at optimizing inhibitory potency and elucidating the mechanism of action of these compounds are currently in progress.

Acknowledgements

This project was supported by the contract PRAXIS/QUI/10039/98.

References and Notes

- Janoff, A.; Scherer, J. *J. Exp. Med.* **1968**, *128*, 1137.
- Snider, G. L.; Ciccolella, D. F.; Morris, S. M. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1991**, *624*, 45.
- Stockley, R. A.; Hill, S. L.; Burnett, D. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1991**, *624*, 257.
- Hastla, D. J.; Pagani, E. D. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1994**, *29*, 195.
- Bernstein, P. R.; Edwards, P. D.; Williams, J. C. *Prog. Med. Chem.* **1994**, *31*, 59.
- Doherty, J. B.; Ashe, B. M.; Argenbright, L. W.; Barker, P.; Bonney, L.; Chandler, G. O.; Dahlgren, M. E.; Dorn, C. P.; Finke, P. E.; Firestone, R. A.; Fletcher, D.; Hagmann, W. K.; Mumford, R.; O'Grady, L.; Maycock, A. L.; Pisano, J. M.; Shah, S. K.; Thompson, K. R.; Zimmerman, M. *Nature* **1986**, *322*, 192.
- (a) Shah, S. K.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Finke, P. E.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Doherty, J. B. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2529. (b) Veinberg, G.; Shestakova, I.; Petruslanis, L.; Grigan, N.; Musel, D.; Zeile, D.; Kanepe, I.; Domrachova, I.; Kalvinsh, I.; Strakovs, A.; Lukevics, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 843.
- Navia, M. A.; Springer, J. P.; Lin, T.-Y.; Williams, H. R.; Firestone, R. A.; Pisano, J. M.; Doherty, J. B.; Finke, P. E.; Hogsteen, K. *Nature* **1987**, *327*, 79.
- Iley, J.; Moreira, R.; Rosa, E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1991**, 563.
- Iley, J.; Moreira, R.; Calheiros, T.; Mendes, E. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1634.
- (a) Gu, H.; Fedor, L. R. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5655. (b) Shah, S. K.; Dorn, C. P.; Finke, P. E.; Hale, J. J.; Hagmann, W. K.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Kissinger, A. L.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Dellea, P. S.; Fletcher, D. S.; Hand, K. M.; Mumford, R. A.; Underwood, D. J.; Doherty, J. B. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3745.
- Kitz, R.; Wilson, I. B. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3245.
- HLE (Calbiochem, Germany) was assayed spectrophotometrically at 25°C by monitoring the release of 4-nitroaniline from MeO-Suc-Ala-Pro-Val-4-nitroanilide at 410 nm. Typically, the inhibitor in DMSO was mixed with the enzyme in pH 7.2 HEPES buffer and placed in a constant-temperature bath. Aliquots were withdrawn at different time intervals and transferred to a cuvette containing the substrate in HEPES buffer. After incubating for 30 s, the absorbance change was followed for 60 s.
- Inhibition toward PPE was assayed as for HLE, using Suc-Ala-Ala-Ala-4-nitroanilide as substrate.
- Bode, W.; Meyer, E.; Powers, J. C. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1451.
- Firestone, R. A.; Barker, P. L.; Pisano, J. M.; Ashe, B. M.; Dahlgren, M. E. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2255.
- Mossova, I.; Mobashery, S. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 162.
- He, S.; Kuang, R.; Venkatamaran, R.; Tu, J.; Truong, T. M.; Chan, H.-K.; Groutas, W. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1713.
- Vigroux, A.; Bergon, M.; Bergonzi, C.; Tisnès, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11787.
- Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727.
- Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43.
- GOLD uses a genetic algorithm to search the conformational space of the ligand molecule while docking it to the active site of the enzyme. A scoring function evaluating torsion potential as well as van der Waals and hydrogen bonding interactions is used to evaluate the interaction energies and to rank the putative modes of binding. During docking simulation of each inhibitor, up to 10^7 different conformations of the ligand are assessed and fitted to the active site. Due to the non-deterministic nature of genetic algorithms, 20 independent runs were performed for each inhibitor in order to judge the consistency of the docked solutions. Final docked structures were subjected to local energy minimization using Sybyl²³ with MMFF94s force field.²⁴
- Sybyl, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- Halgren, T. *J. Comp. Chem.* **1999**, *20*, 720.

Design, Synthesis, and Enzymatic Evaluation of *N*¹-Acyloxyalkyl- and *N*¹-Oxazolidin-2,4-dione-5-yl-Substituted β -lactams as Novel Inhibitors of Human Leukocyte Elastase

Rui Moreira,^{*,†} Ana Bela Santana,[†] Jim Iley,^{*,‡} João Neres,[§] Kenneth T. Douglas,[§] Peter N. Horton,^{||} and Michael B. Hursthouse^{||}

CECF, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Forças Armadas, 1600-083 Lisboa, Portugal, Department of Chemistry, The Open University, Milton Keynes MK7 6AA, U.K., Wolfson Centre for Rational Structure-Based Design of Molecular Diagnostics, School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, University of Manchester, Manchester M13 9PL, U.K., and EPSRC National Crystallography Service, School of Chemistry, University of Southampton, Highfield, Southampton SO17 1BJ, U.K.

Received February 11, 2005

Human leukocyte elastase (HLE) is a serine protease that very efficiently degrades various tissue matrix proteins such as elastin. The imbalance between HLE and its endogenous inhibitors leads to excessive elastin proteolysis and is considered to be responsible for the onset of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). A novel series of C-3-, C-4-, and N-1-substituted azetidion-2-ones were prepared as potential mechanism-based inhibitors of HLE to restore the protease/antiprotease imbalance. *N*-Acyloxyalkylazetidion-2-ones, **4**, and their carbamate counterparts, **5**, are weak HLE inhibitors, being 5 times less active than their bicyclic oxazolidin-2,4-dione-substituted analogues, **6**, containing an electron-withdrawing substituent at C-4. Compounds **6** containing a C-4 substituent exist as two diastereomeric pairs of enantiomers, each pair presenting similar inhibitory activity against HLE. Comparative docking experiments with the C-4-substituted oxazolidin-2,4-dione inhibitors **6** suggest that only the 4*R*,5'*S* and 4*S*,5'*S* diastereomers consistently interact with the β -lactam carbonyl carbon atom accessible to the serine hydroxyl oxygen.

Introduction

Human leukocyte (or neutrophil) elastase (HLE, EC 3.4.21.37) is a member of the chymotrypsin superfamily of serine proteases that very efficiently degrades various tissue matrix proteins such as elastin, when released from the azurophilic granules of polymorphonuclear leukocytes (neutrophils)¹ due to inflammatory stimuli and mediators.^{2,3} In healthy individuals, the proteolytic activity of HLE is regulated by potent antiproteases such as α_1 -antitrypsin and secretory leukocyte proteinase inhibitor. The imbalance between HLE and its endogenous inhibitors leads to excessive elastin proteolysis and destruction of connective tissues and is considered to be responsible for the onset of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which includes emphysema and chronic obstructive bronchitis.^{4,5} Selective inhibitors of neutrophil elastase can restore the protease/antiprotease imbalance and thus are important candidates for the treatment of COPD and other inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis and cystic fibrosis.^{7–10}

β -Lactams are well-known serine protease inhibitors that acylate the nucleophilic serine residue of a wide range of enzymes,¹¹ including HLE.⁸ Cephalosporin sulfones, for example, **1**, have been reported as one of



the first β -lactam irreversible inhibitors of HLE.^{12–15} Compound **1** and other cephalosporin sulfone analogues promote the acylation of the catalytic serine and alkylation of the histidine residue, probably via a mechanism-based inhibition pathway.¹⁶ The need for improving oral bioavailability prompted the design of monocyclic β -lactams. Merck's pioneering work led to the development of several β -lactam inhibitors, for example, **2**, that contain a phenol leaving group at C-4,^{17–19} two of them reaching clinical trials.⁵ Recently, we reported that β -lactams **3** (LG = OCOR or OCONHR) (see Scheme 1) are time-dependent inhibitors of HLE.²⁰ These β -lactams were designed as potential mechanism-based inhibitors because the leaving group (LG) in **3** can be expelled following the initial Ser-195 attack at the β -lactam carbonyl atom to generate an electrophilic imine within the enzyme active site (Scheme 1). This reactive functionality has the potential of reacting with a second amino acid residue within the active site (e.g., His-57), leading to an inactivated enzyme through a double hit. In addition to a good leaving group, LG, compounds **3** contain two ethyl groups at C-3 required for molecular recognition by the enzyme and an electron-withdrawing substituent, EWG, at C-4 required for

* To whom correspondence should be addressed: Tel +351 217946477; fax +351 217946470; e-mail rmoreira@ff.ul.pt or j.n.iley@open.ac.uk.

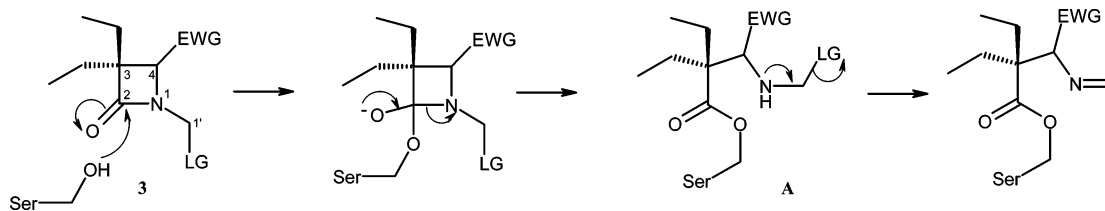
[†] Universidade de Lisboa.

[‡] The Open University.

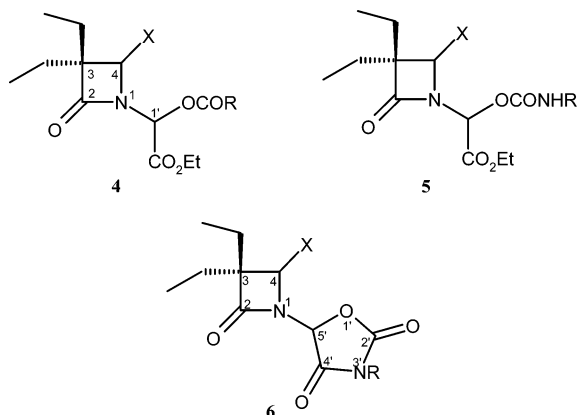
[§] University of Manchester.

^{||} University of Southampton.

Scheme 1



Scheme 2

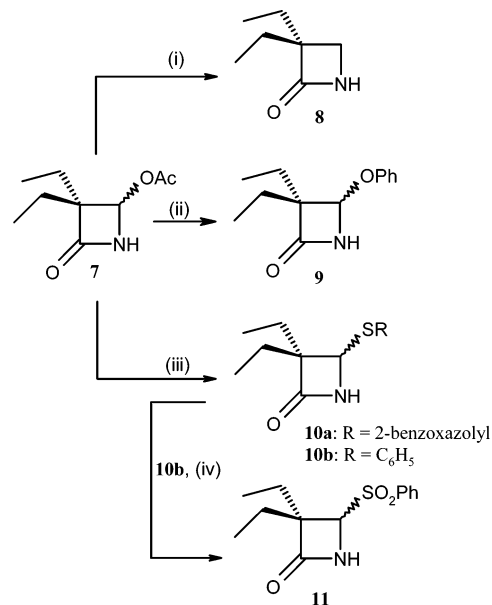


increasing the acylating power of the β -lactam.²⁰ In this paper, we report the design, synthesis, and *in vitro* HLE inhibitory activity of a novel series of acyloxymethyl- (**4**), aminocarbonyloxymethyl- (**5**), and oxazolidin-2,4-dione-5-yl-substituted β -lactam analogues (**6**) (Scheme 2).

In designing the target inhibitors, we took into consideration the electronic factors that can enhance the reactivity of β -lactams. Strong evidence has been put forward suggesting that the driving force for β -lactam reactivity toward nucleophiles lies on the leaving group ability of the amine formed from the decomposition of the tetrahedral intermediate, rather than on the strain energy in the four-membered ring or on the reduced amide resonance.²¹ For the β -lactams **3**, a C-4 electron-withdrawing substituent such as SO_2Ph and the acyloxymethyl moiety reduce the $\text{p}K_a$ of the amine leaving group (A, Scheme 1) to ca. 2,²² a value in the region of those reported for other reactive β -lactam inhibitors (e.g., cephalosporin antibiotics²³). To further decrease the $\text{p}K_a$ of the amine leaving group and thus improve the enzyme inhibitory activity, we decided to incorporate the electron-withdrawing ethoxycarbonyl substituent at the N¹-alkyl group of the azetidin-2-one ring, that is, **4** (Scheme 2). Indeed, the calculated $\text{p}K_a$ values for the amine leaving group, which result from the β -lactam ring opening of **4**, range from ca. 0.7 (X = OPh) to -0.5 (X = SO_2Ph).²⁴ Similar, although slightly higher, $\text{p}K_a$ values can be calculated for the amine leaving group resulting from the β -lactam ring opening of carbamate analogues **5** and their cyclic counterparts **6**. The oxazolidin-2,4-dione derivatives **6** were also selected as potential inhibitors of HLE because they are likely to be the active form of the carbamates **5**, since α -carbamoyl esters cyclize rapidly to the corresponding oxazolidin-2,4-diones.^{25,26}

Results and Discussion

Chemistry. The synthetic pathway to compounds **4–6** used 4-acetoxy-3,3-diethylazetidin-2-one (**7**)¹⁷ as the starting material to give direct access to the differently

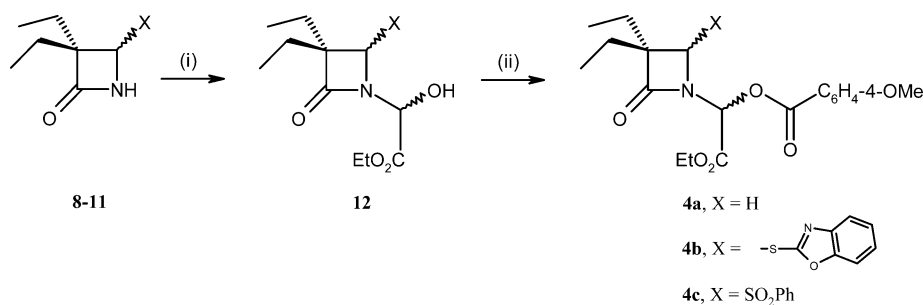
Scheme 3^a

^a (i) NaBH_4 , EtOH; (ii) PhOH, NaOH, acetone; (iii) RSH, NaOH, acetone; (iv) MCPBA, DCM.

C-4-substituted azetidin-2-one key intermediates **8–10** (Scheme 3). Reduction of compound **7** with NaBH_4 in ethanol at 0°C gave 3,3-diethylazetidin-2-one, **8**, in 30% yield. Reaction of **7** with phenol,¹⁷ thiophenol,²⁷ or 2-mercaptobenzoxazole and sodium hydroxide in acetone at room temperature gave the corresponding C-4-substituted β -lactams **9**, **10a**, and **10b**, respectively. Treatment of thioether **10b** with 3-chloroperbenzoic acid (MCPBA) yielded the sulfone **11** (Scheme 3).

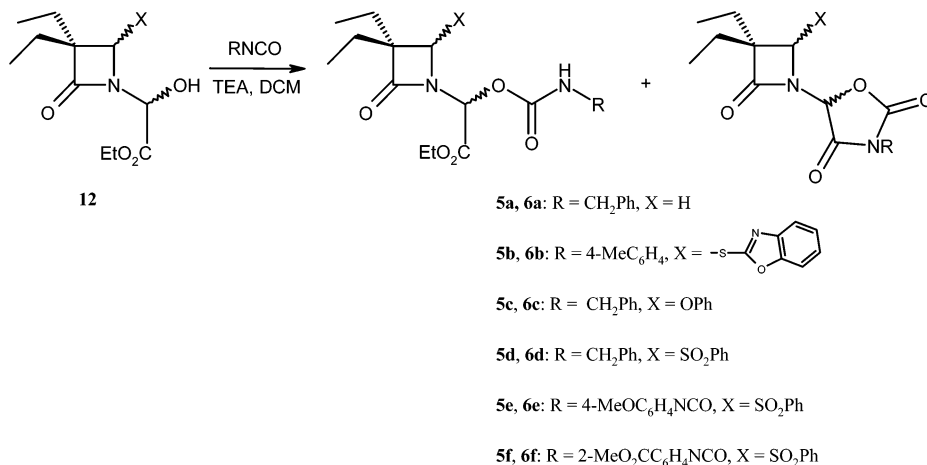
The acyloxymethyl- (**4**), aminocarbonyloxymethyl- (**5**), and oxazolidin-2,4-dione-5-yl-substituted β -lactams (**6**) were all prepared from the corresponding alcohols **12** (Schemes 4 and 5). Condensation of the appropriate azetidin-2-one **8–11** with ethyl glyoxalate in toluene or benzene²⁸ afforded a complex reaction mixture from which the alcohols **12** were isolated in very poor yield. In contrast, when compounds **8–11** were refluxed with ethyl glyoxalate, K_2CO_3 , and tetrabutylammonium bromide (TBAB) in DCM, the alcohols **12** were obtained in 80–85% yield. The reaction of the C-4-substituted azetidin-2-ones **9–11** with ethyl glyoxalate generates a new chiral center; thus, two diastereomeric pairs for **12b–d** (X = 2-thiobenzoxazole, OPh, and SO_2Ph , respectively) were obtained in ratios of ca. 1:1, as determined by ^1H NMR analysis of the crude mixtures.

The esters **4** were prepared by reacting the appropriate diastereomeric alcohol mixture **12** with 4-methoxybenzoyl chloride in DCM containing triethylamine. A characteristic feature of the ^1H NMR spectrum of **4a** (X = H, R = 4-MeOC₆H₄) is the resonance of the C-1' OCHN group, which appears as a singlet at 6.5 ppm.

Scheme 4^a

^a (i) EtO₂CCHO, TBAB, K₂CO₃, DCM, reflux 1.5 h; (ii) 4-MeOC₆H₄COCl, TEA, DCM.

Scheme 5

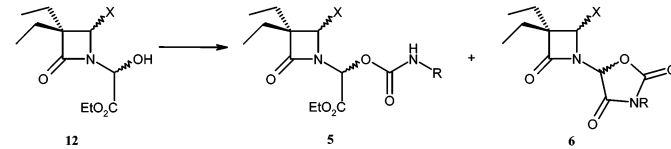



The C-4 proton signal of **4a** appears as two doublets with a geminal coupling constant of $^2J = 6.0$ Hz, reflecting the diastereotopic nature of the methylene protons. Moreover, the ester CH₂O signal appears as two doublets of quartets, also with a geminal coupling constant ($^2J = 10.7$ Hz). For the derivative **4b** (X = 2-thiobenzoxazole, R = 4-MeOC₆H₄), two diastereomeric pairs of enantiomers were to be expected and their formation was confirmed by the doubling of some of the ¹³C NMR signals: CH₂CH₃, C-2, C-4, C-5, CH₂CH₃O, and CH₃O. Compound **4b** was isolated as a 1:1 mixture of diastereomers according to the ¹H NMR analysis. Similarly, two diastereomeric pairs of enantiomers are to be expected for compound **4c** (X = SO₂Ph, R = 4-MeOC₆H₄), but in this case, it proved possible to isolate a sample of one of the diastereomeric pairs in a pure state by column chromatography; the other pair was always contaminated.

When the C-4-unsubstituted alcohol **12a** was reacted with benzylisocyanate in DCM and triethylamine (1 mol equiv), the isolated product was the corresponding oxazolidine-2,4-dione **6a** (X = H, R = Bz) with no traces of the carbamate counterpart (Table 1, entry 1). The oxazolidine-2,4-dione **6b** (X = 2-thiobenzoxazole, R = C₆H₄-4-Me), derived from the racemic alcohol **12b**, was isolated as a 2:1 mixture of two coeluting diastereomeric pairs of enantiomers (Table 1, entry 2), as determined by analysis of the pairs of singlets at δ 5.8–5.9 ppm (C-5'H) and 4.7–4.8 ppm (C-4H). For the oxazolidine-2,4-diones **6c–e**, each diastereomeric pair of enantiomers was easily separated by column chromatography. The structure and absolute stereochemistry for the crystalline minor diastereomeric pair of **6d** was confirmed by X-ray crystallography.²⁹

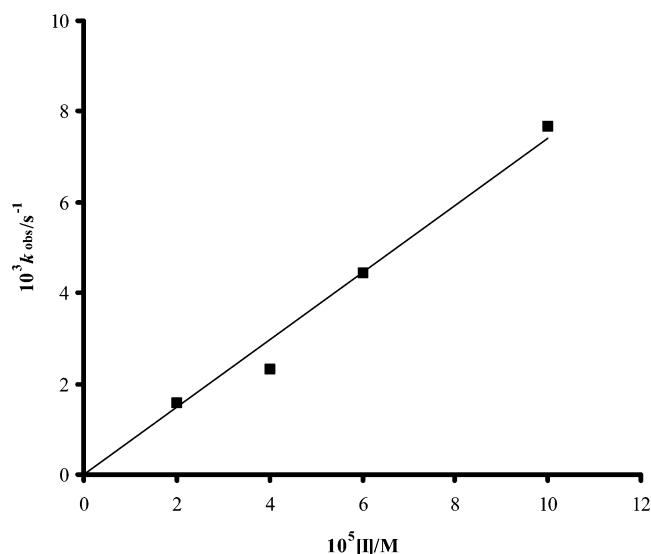
Interestingly, during the purification process for **6c**, the carbamate counterpart **5c** (X = OPh, LG = OCONHCH₂Ph) was also isolated (Table 1, entry 4). Unfortunately, although both diastereomeric pairs of enantiomers for **5c** were observed in the ¹H NMR spectrum of the reaction mixture, only one pair was isolated as a pure fraction. In contrast, when the sterically hindered 2-methoxycarbonylphenylisocyanate reacted with the alcohol **12d**, only the corresponding carbamate **5f** was isolated as separable diastereomeric pairs of enantiomers (Table 1, entry 6). These results suggest that carbamates are initially formed in the reaction mixture but then cyclize rapidly to form the corresponding oxazolidine-2,4-diones. Indeed, carbamates have been postulated as intermediates in the synthesis of oxazolidine-2,4-diones, particularly those containing *N*-aryl substituents, from 2-hydroxy esters and isocyanates.^{25,26} In the present case, the formation of oxazolidine-2,4-diones **6** is apparently not affected by the p*K*_a of the corresponding carbamate or by the size of the substituent at the β -lactam C-4 position.

Inhibition of HLE. All β -lactam derivatives **4–6** inhibited HLE in a time-dependent manner, suggesting that these compounds behave as irreversible inhibitors. The irreversible nature of the inactivation was shown in a routine assay, when no reactivation of enzyme activity was detected even after 4 days of dialysis at 25 °C. The inhibitory potency of compounds **4–6** against HLE was assessed using Kitz and Wilson's incubation method.³⁰ Accordingly, the inactivation of HLE may be represented by the minimal reaction depicted in eq 1, where E·I represents the noncovalent enzyme–inhibitor complex, E~I is the covalently bound complex, *K*_I represents the dissociation constant of the E·I complex,

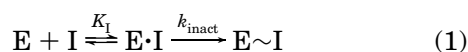
Table 1. Products and Corresponding Yields for the Reactions of Alcohol Intermediates **12** with Isocyanates


Entry	Reactants			Products						
	12	X	Isocyanate	Yield/%	Diastereomeric ratio	Yield/%	Diastereomeric ratio	R		
1	12a	H	C ₆ H ₅ CH ₂ NCO	5a	0	--	6a	33	--	C ₆ H ₅ CH ₂
2	12b		4-MeC ₆ H ₄ NCO	5b	0	--	6b	63	2.3:1 ^a	4-MeC ₆ H ₄
3	12c	OC ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂ NCO	5c	17 ^c	ND	6c	43	1.5:1 ^b	C ₆ H ₅ CH ₂
4	12d	SO ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂ NCO	5d	0	--	6d	40	2:1 ^b	C ₆ H ₅ CH ₂
5	12d	SO ₂ C ₆ H ₅	4-MeOC ₆ H ₄ NCO	5e	0	--	6e	50	2:1 ^b	4-MeOC ₆ H ₄
6	12d	SO ₂ C ₆ H ₅	2-MeO ₂ CC ₆ H ₄ NCO	5f	19	1.2:1 ^b	6f	0	--	2-MeO ₂ CC ₆ H ₄

^a From ¹H NMR analysis. ^b From yields of isolated diastereomeric pairs. ^c Only one diastereomeric pair was isolated.

**Figure 1.** Plot of the first-order rate constant, k_{obs} , for the inactivation of HLE by compound **6b** versus the inhibitor concentration.

and k_{inact} is the first-order rate constant for the chemical inactivation step. The values of k_{obs} were determined from plots of $\ln(v/v_0)$ versus incubation time. Due to solubility problems with some of the inhibitors, we were forced to work in the linear region corresponding to eq 2 (Figure 1). In these conditions, eq 2 simplifies to eq 3, and thus the second-order rate constants for inactivation were expressed as $k_{\text{obs}}/[I]$. The corresponding values for compounds **4–6** are presented in Table 2.



$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}[I]}{K_I + [I]} \quad (2)$$

$$\frac{k_{\text{inact}}}{K_I} = \frac{k_{\text{obs}}}{[I]} \quad (3)$$

The data presented in Table 2 reveal some interesting features. First, it can be observed that *N*-(oxazolidin-

Table 2. Second-Order Rate Constants, $k_{\text{obs}}/[I]$, for the Inhibition of HLE by Compounds **4–6**

compound	$k_{\text{obs}}/[I]/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	
	major diastereomeric pair of enantiomers	minor diastereomeric pair of enantiomers
4a	10.7	
4b	12.9	<i>a</i>
4c	24.4 ^b	
5c	38.2	<i>a</i>
5f	26.6	<i>c</i>
6a	23.9	
6b	80.0 ^b	
6c	115.3	144.2
6d	68.5	51.0
6e	43.2	49.7
2^d	1500	
3^e	100.3	

^a Not determined; single pair of enantiomers. ^b Two pairs of enantiomers. ^c No inhibition at 20 μM . ^d **2**, X = CO₂H, R = Ph from ref 17. ^e **3**, EWG = SO₂Ph, LG = OCONHC₆H₄-4-OMe from ref 20.

2,4-dion-5-yl)azetidin-2-ones **6** are more potent than their ester, **4**, and carbamate, **5**, analogues. For example, the oxazolidin-2,4-dione **6b** is ca. 6 times more potent than its ester counterpart **4b**, while the major diastereomeric pair of **6d** is ca. 3 times more active than **4c**. Moreover, introducing an ortho substituent in the carbamate moiety, that is, **5f**, leads to complete loss of activity for the minor diastereomer, while the major displays only marginal activity. Second, oxazolidin-2,4-diones **6** containing an electron-withdrawing substituent at C-4 of the β -lactam ring display higher inhibitory activity (**6c,d** versus **6a**), although there is no obvious correlation between the $k_{\text{obs}}/[I]$ values and the Taft σ^* parameter. An electron-withdrawing substituent at C-4 is likely to increase the rate of nucleophilic attack of Ser-195 hydroxyl at the β -lactam carbonyl group or to increase the rate of decomposition of the tetrahedral intermediate by decreasing the $\text{p}K_{\text{a}}$ of the corresponding amine leaving group. In contrast, C-4 electron-withdrawing substituents have a minimal effect on the inhibitory activity exerted by the weak inhibitors **4a–c**. Third, there is an apparent lack of stereospecificity in the inhibition by oxazolidin-2,4-dione deriva-

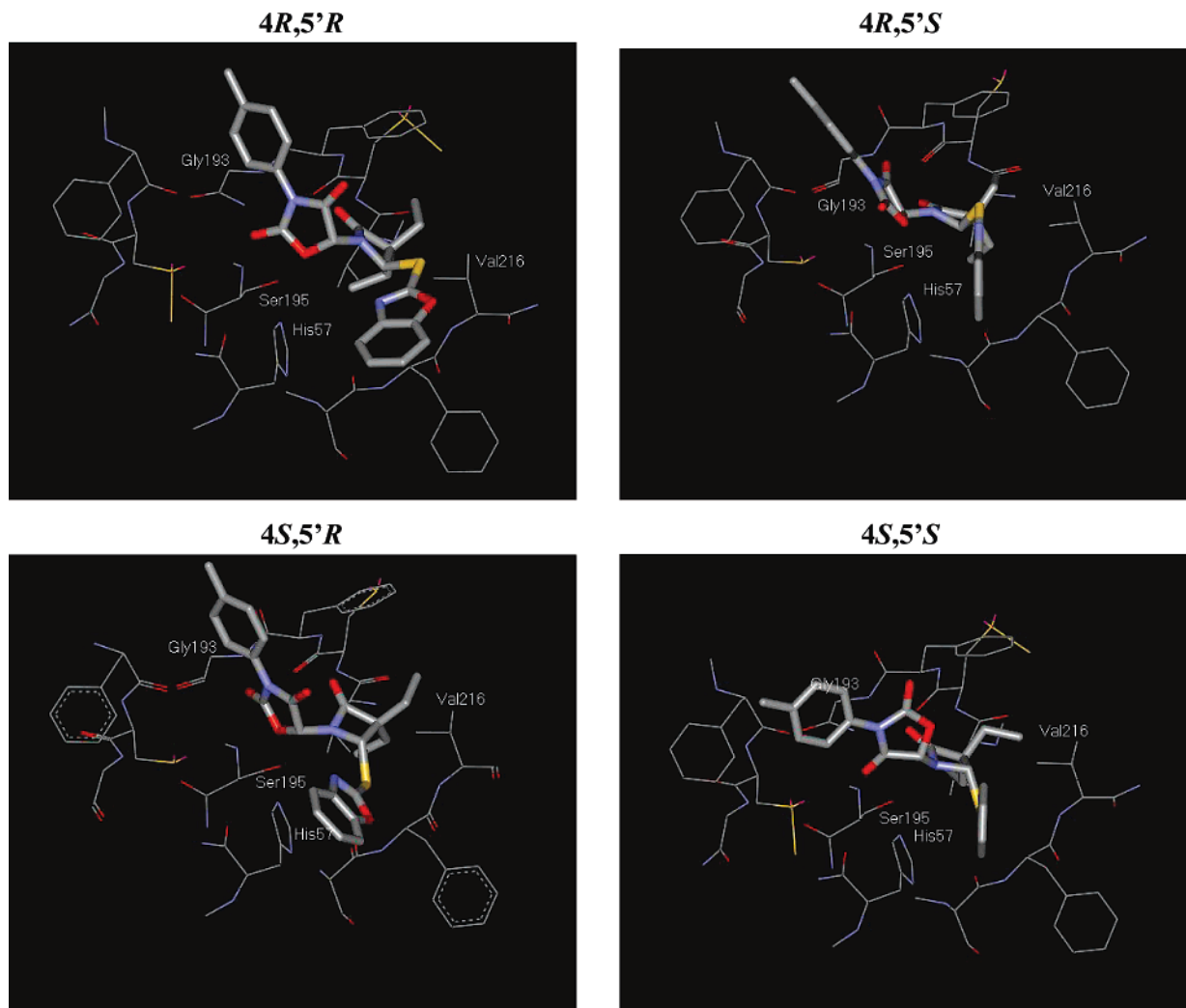


Figure 2. Molecular docking of diastereomeric pairs of **6b** into the active site of HLE (see text for details of docking procedure).

tives **6**, as suggested by the relatively small differences in the $k_{\text{obs}}/[\text{I}]$ values for each of the diastereomeric pairs of enantiomers **6c–e**. This lack of stereospecificity might suggest that the enzyme–inhibitor complex for any of the stereoisomers is able to provide an appropriate stereochemical orientation and distance between the Ser-195 hydroxyl group and the β -lactam carbonyl carbon atom. Nucleophilic attack at a carbonyl carbon atom can take place within a cone of 30° on each side of the carbonyl plane,³¹ and thus there are a number of possible productive orientations between the enzyme and inhibitor reactive sites. Another possible explanation for the lack of stereospecificity observed for **6c–e** is that the tetrahedral transition states resulting from the nucleophilic attack of the Ser-195 residue at the β -lactam carbonyl group are equally stabilized. It has been suggested that the stereospecificity in enzymatic reactions is determined in the transition-state rather than in the enzyme–inhibitor complexes.^{32,33}

In contrast to the oxazolidin-2,4-diones **6**, compounds **4** and **5** are less active than the previously reported counterparts **3** (Table 2). Since the amines generated from β -lactam ring opening of **4**, **5**, and **6** have similar leaving group abilities, such loss of activity most likely reflects poorer enzyme molecular recognition of **4** and **5**.

Molecular Modeling. To understand the trends observed in the enzyme assays, the molecular interactions between the more potent oxazolidin-2,4-dione inhibitors **6** and HLE were studied using the program Sybyl 6.8.³⁴ By use of the crystal structure of **6d** as a guide, the lowest energy conformer of each possible enantiomer and diastereomer of **6a–d** (see Experimental Section) was positioned into the HLE binding cavity according to the model proposed by Shah et al. for *N*-acyl β -lactams,¹⁷ in which the inhibitor is bound to the active site with (1) the hydroxyl group of Ser-195 in a position to interact with the β -lactam carbonyl carbon atom, (2) the β -lactam carbonyl oxygen atom pointing toward the oxyanion hole defined by the backbone of Ser-195 and Gly-193, and (3) the 3,3-diethyl group occupying the S_1 pocket. Finally, the geometry of each isomer docked in the HLE active site was further energy minimized as described in the Experimental section.

The docking study with the C-4-unsubstituted inhibitor **6a** revealed that the interaction of the corresponding 5'S (see Scheme 2 for numbering of **6**) enantiomer with HLE presents the β -lactam carbonyl atom as slightly more accessible to the Ser-195 hydroxyl oxygen when compared with its 5'R isomer (3.1 versus 3.3 Å). For those inhibitors containing a substituent at C-4 of the β -lactam ring, the interaction with the HLE active

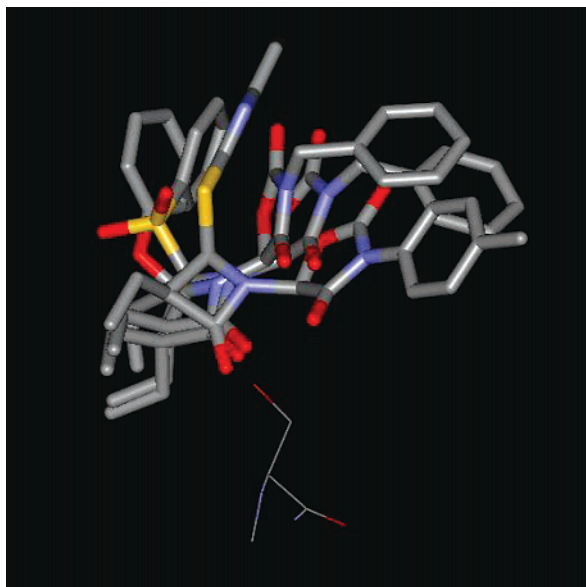


Figure 3. Superimposition of the (4*R*,5'*S*) diastereomers for compounds **6b–d**. For simplicity, only Ser-195 is shown.

site varies for each of the four diastereomers (4*R*,5'*R*; 4*S*,5'*S*; 4*R*,5'*S*, and 4*S*,5'*R*). Figure 2 shows all isomers of **6b** docked into the HLE active site in the conformation corresponding to that predicted to lead to the most favorable energy, in which the two ethyl groups at C-3 are accommodated within the S_1 subsite. However, only diastereomers 4*R*,5'*S* and 4*S*,5'*S* interact in a manner that seems to force the β -lactam ring deeper inside the active site, orienting the β -lactam carbonyl carbon atom close to Ser-195 hydroxyl oxygen ($d < 3\text{\AA}$). This is due, in part, to enhanced van der Waals contacts between the C-4 benzoxazolyl moiety with Leu-99 and His-57 and additional stabilizing interactions between the *N*-aryl ring in the oxazolidin-2,4-dione moiety and the Phe-41 and Cys-42 hydrophobic residues. Interestingly, for those inhibitors with a phenoxy or phenyl sulfone substituent at C-4 (**6c** and **6d**, respectively), a similar pattern of interaction with the elastase active site was observed. Figure 3 compares the relative docked positions of the 4*R*,5'*S* diastereomers of **6b–d** in the HLE active site. There is a close superposition of the β -lactam rings of **6b–d**. Despite the slight relative displacement of C-4 and N-1 substituents, the distance between the β -lactam carbonyl carbon atom and the Ser-195 hydroxyl oxygen atom is not significantly affected: 2.9, 2.6, and 2.7 \AA for the 4*R*,5'*S* isomers of **6b**, **6c**, and **6d**, respectively. This result is consistent with only a 2-fold difference in the inhibitory activities of **6b–d**. In contrast, the distance between the β -lactam carbonyl carbon atom and the Ser-195 hydroxyl oxygen atom in compounds **4** is consistently higher (3.0–3.2 \AA) than those observed with **6** or those previously reported for their counterparts **3**, which might explain their lower activity.

Figure 4 shows a model of the tetracoordinate intermediate of the 4*R*,5'*S* **6b** isomer, which corresponds to the first intermediate in the reaction coordinate leading to the inactivation of the Michaelis–Menten inhibitor–elastase complex. This structure was obtained by creating a covalent bond between the side chain oxygen atom of Ser-195 and the carbonyl carbon atom of the β -lactam

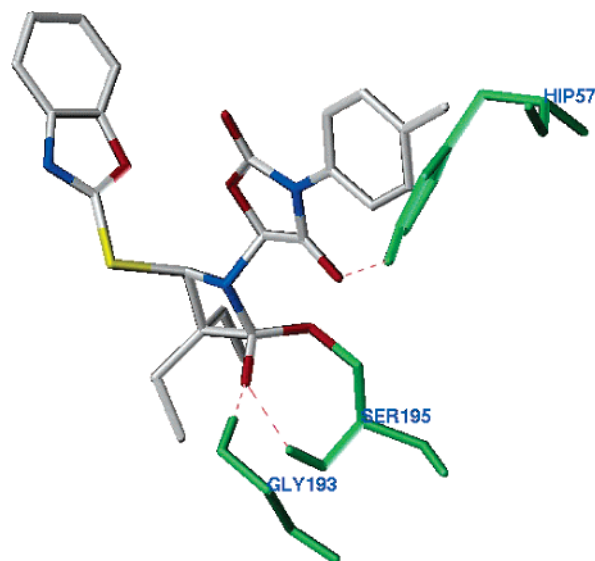


Figure 4. Model of the putative tetrahedral intermediate formed from the attack of Ser-195 hydroxyl group at the β -lactam carbonyl carbon atom of the (4*R*,5'*S*) diastereomer of **6b**, stabilized by the active site oxoanion hole. The energy minimization for this complex was done as described in the text for the Michaelis–Menten complexes.

ring of the **6b** isomer, followed by energy minimization of the complex. This tetracoordinate intermediate is stabilized in the “oxy-anion” pocket, defined by hydrogen bonding with the Gly-193 and Ser-195 NH sites, in a similar way to that reported for the tetracoordinate intermediate derived from the Merck *N*-acyl β -lactams. In addition, the presence of the oxazolidin-2,4-dione moiety enables a further stabilization of the intermediate by hydrogen bonding to the NH of His-57. The same type of stabilization by Gly-193 and Ser-195 NH's was observed for the tetrahedral intermediates derived from the remaining compounds **6**.

Conclusion

N-(Oxazolidin-2,4-dion-5-yl)azetid-2-ones, **6**, are novel time-dependent irreversible inhibitors of HLE that were rationally designed on the basis of both the active-site topology and the catalytic mechanism for the enzyme reaction with substrates. The inhibitory potency displayed by **6** can be ascribed, in part, to the effect of the oxazolidin-2,4-dione moiety on the leaving group ability of the amine formed from the decomposition of the tetrahedral intermediate resulting from the nucleophilic attack of Ser-195 hydroxyl group at the β -lactam carbonyl carbon. In agreement with structure–activity relationships for other monocyclic β -lactams, we found that the most active inhibitors **6** contain an electron-withdrawing substituent at C-4. Compounds **6** containing a C-4 substituent exist as two diastereomeric pairs of enantiomers. Interestingly, for each inhibitor, both diastereomeric pairs of enantiomers exhibit similar inhibitory activity against HLE. One possible explanation for this apparent lack of stereospecificity is that the corresponding enzyme–inhibitor complexes might provide the proper stereochemical orientation and distance between the Ser-195 hydroxyl group and the β -lactam carbonyl carbon atom. Comparative docking experiments with the C-4-substituted *N*-(oxazolidin-2,4-dion-5-yl)azetid-2-one inhibitors **6** suggest that only

the 4*R*,5'*S* and 4*S*,5'*S* diastereomers consistently interact with the β -lactam carbonyl carbon atom accessible to the serine hydroxyl oxygen. This finding suggests that a stereospecific synthesis of these diastereomers alone should improve inhibitor potency.

Experimental Section

Abbreviations. brs, broad singlet; Bzl, benzyl; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; d, doublet; DCM, dichloromethane; dd, double doublet; dt, double triplet; HLE, human leukocyte elastase; MCPBA, *meta*-chloroperbenzoic acid; ppm, parts per million; q, quartet; s, singlet; t, triplet; TBAB, tetrabutylammonium bromide; TEA, triethylamine; THF, tetrahydrofuran; TLC, thin-layer chromatography; TMS, tetramethylsilane.

General. Melting points were determined using a Kofler camera Bock Monoscope M and are uncorrected. The IR spectra were recorded on a Nicolet Impact 400 FTIR spectrophotometer, and only the most significant absorption bands are reported. The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a JEOL LA 300 spectrometer (300 MHz) in CDCl_3 solutions unless otherwise stated; chemical shifts, δ , are expressed in ppm in reference to Me_4Si (TMS). Low-resolution mass spectra were recorded using either VG Mass Lab 20-250 EI-MS or VG Quattro LCMS instruments. Elemental analyses were performed by Medac Ltd, Brunel Science Centre, Cooper's Hill Lane, Englefield Green, Egham TW20 0JZ, U.K. Enzyme assays were carried out using either Perkin-Elmer Lambda 20 or Shimadzu UV-2100PC spectrophotometers. Solvents and buffer materials for enzyme kinetics were of analytical reagent grade and bought from Merck (Germany) or Sigma-Aldrich (Spain). DCM was dried with CaCl_2 and stored with preactivated molecular sieves (4 Å). Both thin-layer chromatography (TLC) aluminum foil plates covered with silica 60 F254 (0.25 mm) and silica gel 60 (70–230 mesh ASTM) for preparative column chromatography were also purchased from Merck. HLE was obtained from Calbiochem. The HLE substrate, *N*-methoxysuccinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-valyl-*p*-nitroanilide (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA) was obtained from Sigma-Aldrich. The 4-acetoxy-3,3-diethylazetid-2-one starting material, **7**, was prepared as reported in the literature.¹⁷

3,3-Diethylazetid-2-one (8). To a solution of 4-acetoxy-3,3-diethylazetid-2-one, **7** (1 g, 5.4 mmol), in absolute ethanol (5 mL) at 0 °C, NaBH_4 (0.22 g, 5.9 mmol) was added, and the resulting suspension was kept at 0 °C for 1 h. Amberlite acid resin (5 g) was added to the suspension, and the reaction mixture stirred for a further 30 min. The reaction mixture was then filtered, and the solvent was evaporated. The resulting residue was washed with ethyl acetate (200 mL) and filtered. The solid in the filter was washed with DCM (20 mL). The organic solutions were combined, the solvents were removed, and the residue was purified by chromatography on silica gel using DCM–ethyl acetate (7:3) to give **8** as a colorless oil (28%); ν_{max} (film) 3266, 2967, 1743, 1460 cm^{-1} ; δ ^1H NMR 0.92 (6H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.62 (4H, q, $J = 7.5$ Hz), 3.02 (2H, s), 5.64 (1H, brs); δ ^{13}C NMR 8.97, 25.50, 45.31, 61.80, 174.30; ESI-MS m/z 128 (MH^+).

General Procedure for the Synthesis of C-4-Substituted 3,3-Diethylazetid-2-ones 9–11. A solution of the appropriate arylthiol (1,3-benzoxazole-2-thiol or benzenethiol) or phenol (11.9 mmol) in acetone (12 mL) and 1 M NaOH (14 mmol, 14 mL) was stirred for 10–20 min at room temperature. 4-Acetoxy-3,3-diethylazetid-2-one, **7** (10.8 mmol), in acetone (9 mL) was added, and the resulting mixture was stirred at room temperature, reaction progress being monitored by TLC. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the resulting water layer was extracted with diethyl ether (2 \times 70 mL). The organic layers were washed with water (60 mL) and brine (60 mL), dried over MgSO_4 , and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel or crystallization. Data for compounds **9–11** can be found in the Supporting Information.

General Procedure for *N*-(1-Ethoxycarbonyl-1-hydroxy)methylazetid-2-ones 12. To a stirred solution of

8–11 (1.45 mmol) in dry DCM (1.6 mL) was added ethyl glyoxalate (4.35 mmol, 0.87 mL of 50% solution), K_2CO_3 (0.16 g, 1.16 mmol), and tetrabutylammonium bromide (TBAB, 0.187 g, 0.58 mmol). This mixture was refluxed during 80–120 min and followed by TLC. The excess of ethyl glyoxalate solution and DCM was evaporated, and the residue was chromatographed on a small amount of silica gel and DCM–ethyl acetate 80:20 as eluant to remove the K_2CO_3 and TBAB. The products so obtained were used in the subsequent reaction without further purification. Data for compounds **12** can be found in the Supporting Information.

General Synthesis of *N*-{[1-(4-Methoxybenzoyl)oxy-1-ethoxycarbonyl]methyl}azetid-2-ones 4. To a cold solution of the crude **12** (1.2 mmol) in dry DCM (2 mL) was added 4-methoxybenzoyl chloride (0.248 g, 1.45 mmol) and triethylamine (1.45 mmol). After 20 min, the mixture was allowed to reach room temperature and was stirred for a further 2 h. The residue obtained after evaporation of the DCM was purified by sequential column chromatography: in a first column, mixtures of diethyl ether–light petroleum were used as eluants, and in a second column, DCM followed by DCM–ethyl acetate (98:2) were used as eluants.

3,3-Diethyl-*N*-{[1-(4-methoxybenzoyl)oxy-1-ethoxycarbonyl]methyl}azetid-2-one (4a). Yellow crystals (27%); mp 52–53 °C; ν_{max} (film) 2969, 1757, 1720, 1606, 1257, 1086 cm^{-1} ; δ ^1H NMR 0.97 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.00 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.31 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.65–1.78 (4H, m), 3.32 (1H, d, $J = 5.9$ Hz), 3.34 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 3.87 (3H, s), 4.30 (2H, 2 \times dq, $J = 7.2, 10.8$ Hz), 6.48 (1H, s), 6.94 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 8.01 (2H, d, $J = 9.0$ Hz); δ ^{13}C NMR 8.66, 8.70, 14.05, 25.31, 47.98, 55.47, 60.67, 62.40, 71.17, 113.77, 120.99, 132.10, 163.95, 164.87, 165.07, 172.72; ESI-MS m/z 363 (MH^+); Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_6$) C, H, N.

4-(1,3-Benzoxazol-2-ylthio)-3,3-diethyl-*N*-{[1-(4-methoxybenzoyl)oxy-1-ethoxycarbonyl]methyl}azetid-2-one (4b). The two diastereomers (52:48 mixture) coeluted in the two columns; light yellow crystals (65%); mp 35–40 °C; ν_{max} (film) 2972, 1789, 1756, 1721, 1358, 1259, 1081 cm^{-1} ; δ ^1H NMR 0.85 and 0.86 (3H, 2 \times t, $J = 7.5$ Hz), 1.04 and 1.31 (3H, 2 \times t, $J = 7.2$ Hz), 1.18 and 1.19 (3H, 2 \times t, $J = 7.4$ Hz), 1.46–2.14 (4H, m), 3.60–4.41 (2H, m), 3.80 and 3.85 (3H, 2 \times s), 6.39 and 6.53 (1H, 2 \times s), 6.55 and 6.60 (1H, 2 \times s), 6.66–7.92 (8H, m); δ ^{13}C NMR 8.18, 8.95, 13.71, 14.24, 20.57, 20.81, 24.39, 24.58, 55.64, 62.67, 63.39, 66.84, 66.93, 72.02, 72.70, 73.16, 73.36, 110.48, 110.67, 112.43, 112.84, 113.67, 114.02, 124.39, 124.58, 124.97, 125.04, 132.01, 132.29, 146.90, 163.85, 164.34, 172.22, 180.43; ESI-MS m/z 513 (MH^+); Anal. ($\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$) C, H, N.

3,3-Diethyl-*N*-{[1-(4-methoxybenzoyl)oxy-1-ethoxycarbonyl]methyl}-4-(phenylsulfonyl)azetid-2-one (4c). Only one major diastereomer was isolated; white crystals (24%); mp 110–112 °C; ν_{max} (film) 2974, 1788, 1724, 1327, 1606, 1257, 1083 cm^{-1} ; δ ^1H NMR 0.91 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.07 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.24 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.72 (1H, dq, $J = 7.3, 14.8$ Hz), 1.84–1.99 (2H, m), 2.43 (1H, dq, $J = 7.5, 14.9$ Hz), 3.88 (3H, s), 4.12 (2H, 2 \times dq, $J = 7.2, 10.8$ Hz), 4.88 (1H, s), 6.42 (1H, s), 6.97 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.55 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 7.68 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 8.00 (2H, d, $J = 7.4$ Hz), 8.07 (2H, d, $J = 9.0$ Hz); δ ^{13}C NMR 8.41, 8.83, 13.90, 20.45, 24.51, 55.48, 62.85, 67.73, 71.10, 77.26, 113.86, 120.85, 129.03, 129.36, 132.33, 134.45, 138.45, 164.44, 164.05, 170.85; ESI-MS m/z 504 (MH^+); Anal. ($\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_8\text{S}$) C, H, N.

Reaction of *N*-{[1-(1-Ethoxycarbonyl-1-hydroxy)methyl]azetid-2-ones 12 with Isocyanates. The desired isocyanate (0.53–0.61 mmol) and triethylamine (0.51 mmol) were added to a solution of crude **12** (0.51 mmol) in distilled DCM (1.8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 60–90 min. The residue obtained after evaporation of DCM and triethylamine was purified by column chromatography as described above for compounds **4**.

***N*-(3-Benzyloxazolidin-2,4-dion-5-yl)-3,3-diethylazetid-2-one (6a).** Light yellow crystals (33%); mp 54–56 °C; ν_{max} (film) 2969, 1821, 1751, 1440, 1379, 1345 cm^{-1} ; δ ^1H NMR 0.95 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 0.96 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.61–1.76 (4H,

m), 3.05 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 3.07 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 4.67 (1H, d, $J = 14.5$ Hz), 4.73 (1H, d, $J = 14.5$ Hz), 6.02 (1H, s), 7.29–7.40 (5H, m); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 8.83, 25.32, 25.36, 46.91, 44.41, 62.29, 78.42, 128.87, 128.93, 129.15, 134.38, 153.77, 166.41, 173.40; ESI-MS m/z 334 (MNH_4^+); Anal. ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$) C, H, N.

4-(1,3-Benzoxazol-2-ylthio)-3,3-diethyl-N-[3-(4-methylphenyl)oxazolidin-2,4-dion-5-yl]azetidid-2-one (6b). The two diastereomers (70:30 mixture) coeluted in two consecutive columns; light yellow crystals (63%); mp 89–96 °C; ν_{max} (film) 2973, 1831, 1788, 1758, 1408, 1356 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 0.83 and 0.83 (3H, 2 \times t, $J = 7.5$ Hz), 1.15 and 1.20 (3H, 2 \times t, $J = 7.3$ Hz), 1.42–2.07 (4H, m), 2.33 and 2.35 (3H, 2 \times s), 5.59 and 5.76 (1H, 2 \times s), 6.50 and 6.53 (1H, 2 \times s), 7.16–7.84 (8H, m); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 7.94, 8.02, 8.62, 8.66, 20.65, 21.16, 21.34, 24.11, 24.46, 67.50, 67.94, 72.40, 72.75, 78.00, 78.62, 110.71, 110.79, 112.50, 112.70, 124.99, 125.04, 125.31, 125.65, 125.74, 127.34, 127.44, 128.20, 130.13, 130.18, 130.22, 139.90, 146.71, 146.85, 152.15, 164.96, 171.49, 179.96; ESI-MS m/z 466 (MH^+); Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$) C, H, N.

N-[1-(Benzylaminocarbonyloxy-1-ethoxycarbonyl)-methyl]-3,3-diethyl-4-phenoxyazetidid-2-one (5c). Only one diastereomer was isolated; colorless oil (17%); ν_{max} (film) 3365, 2971, 1781, 1763, 1736, 1493, 1224 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 1.00 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 1.03 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 1.26 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.68 (1H, dq, $J = 7.3, 14.7$ Hz), 1.75–1.85 (2H, m), 1.92 (1H, dq, $J = 7.4, 14.9$ Hz), 4.13–4.44 (2H, m), 4.34 (1H, d, $J = 15$ Hz), 4.41 (1H, d, $J = 15$ Hz), 5.23 (1H, t, $J = 5.6$ Hz), 5.50 (1H, s), 6.33 (1H, s), 6.86 (2H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.03 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 7.26–7.36 (7H, m); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 8.84, 9.24, 14.12, 22.21, 23.97, 45.38, 62.61, 65.44, 71.73, 87.09, 116.74, 122.97, 127.81, 127.90, 128.93, 129.94, 158.83, 154.09, 165.19, 170.85; ESI-MS m/z (%) 455 (MH^+); Anal. ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$) C, H, N.

N-(3-Benzylloxazolidin-2,4-dion-5-yl)-3,3-diethyl-4-phenoxyazetidid-2-one (6c). Major diastereomer; white crystals (26%); mp 88–90 °C; ν_{max} (film) 2971, 1824, 1783, 1752, 1440, 1376, 1344, 1223 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 1.03 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.71 (1H, dq, $J = 7.3, 14.8$ Hz), 1.78–1.88 (2H, m), 1.95 (1H, dq, $J = 7.4, 15$ Hz), 4.43 (2H, s), 5.54 (1H, s), 5.88 (1H, s), 6.83 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.06 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.16–7.34 (7H, m); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 8.79, 9.13, 21.76, 23.95, 44.36, 65.95, 77.65, 87.06, 116.98, 123.63, 128.75, 128.83, 129.05, 130.28, 134.03, 156.12, 153.38, 166.06, 171.44; ESI-MS m/z 409 (MH^+); Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$) C, H, N. Minor diastereomer; light yellow oil (17%); ν_{max} (film) 2970, 1834, 1781, 1753, 1492, 1376, 1345, 1223 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 1.02 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.03 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.72 (1H, dq, $J = 7.4, 14.8$ Hz), 1.78–1.88 (2H, m), 1.96 (1H, dq, $J = 7.4, 15.1$ Hz), 4.36 (1H, d, $J = 14.5$ Hz), 4.44 (1H, d, $J = 14.5$ Hz), 5.57 (1H, s), 5.88 (1H, s), 6.82 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.05 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.18–7.31 (7H, m); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 8.56, 8.88, 21.66, 23.64, 44.00, 65.47, 76.92, 87.74, 116.14, 116.75, 123.24, 128.73, 128.83, 130.07, 133.83, 156.05, 153.34, 166.06, 171.23; ESI-MS m/z 409 (MH^+); Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$) C, H, N.

N-(3-Benzylloxazolidin-2,4-dion-5-yl)-3,3-diethyl-4-(phenylsulfonyl)azetidid-2-one (6d). Major diastereomer; white crystals (27%); mp 54–56 °C; ν_{max} (film) 2973, 1827, 1789, 1751, 1443, 1334, 1155 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 0.70 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 0.89 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.49 (1H, dq, $J = 7.3, 15$ Hz), 1.59 (1H, dq, $J = 7.4, 14.9$ Hz), 1.78 (1H, dq, $J = 7.4, 14.9$ Hz), 2.04 (1H, dq, $J = 7.3, 14.8$ Hz), 4.54 (1H, d, $J = 14.5$ Hz), 4.55 (1H, s), 4.60 (1H, d, $J = 14.3$ Hz), 5.60 (1H, s), 7.23–7.85 (10H, m); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 8.70, 9.28, 20.31, 25.33, 45.15, 68.13, 78.05, 78.37, 129.23, 129.48, 129.68, 129.88, 130.37, 134.47, 135.59, 137.37, 153.80, 166.46, 172.11; ESI-MS m/z 475 (MNH_4^+); Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$) C, H, N.

Minor diastereomer; white crystals (13%); mp 170–173 °C; ν_{max} (film) 2973, 1826, 1788, 1752, 1443, 1333, 1155 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 0.76 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 0.93 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.62 (1H, dq, $J = 7.3, 14.8$ Hz), 1.77 (2H, m), 2.24 (1H, dq, $J = 7.3, 14.6$ Hz), 4.53 (1H, d, $J = 15.4$ Hz), 4.64 (1H, d, $J = 15.2$ Hz), 4.93 (1H, s), 5.17 (1H, s), 7.25–7.96 (10H, m); $\delta^{13}\text{C}$ NMR (CD_3CN) 8.06, 8.49, 20.14, 24.77, 44.19, 67.50, 77.36,

79.62, 128.59, 129.12, 129.45, 130.38, 135.12, 135.63, 138.08, 154.15, 166.41, 171.88; ESI-MS m/z 475 (MNH_4^+). Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$) C, H, N.

3,3-Diethyl-N-[3-(4-methoxyphenyl)oxazolidin-2,4-dion-5-yl]-4-(phenylsulfonyl)azetidid-2-one (6e). Major diastereomer; recrystallized from acetone–light petroleum; white crystals (33%); mp 139–141 °C; ν_{max} (film) 2974, 1826, 1755, 1789, 1515, 1368, 1333, 1254 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 0.76 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 0.97 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.49 (1H, dq, $J = 7.3, 15$ Hz), 1.68 (1H, dq, $J = 7.3, 14.8$ Hz), 1.85 (1H, dq, $J = 7.3, 14.8$ Hz), 2.00 (1H, dq, $J = 7.3, 14.8$ Hz), 3.84 (3H, s), 4.72 (1H, s), 6.20 (1H, s), 7.00 (2H, d, $J = 9.1$ Hz), 7.37 (2H, d, $J = 9.1$ Hz), 7.63 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 7.74 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 8.02 (2H, d, $J = 7.4$ Hz); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 7.98, 8.61, 19.65, 24.68, 55.56, 67.14, 77.16, 78.14, 114.73, 122.92, 127.45, 129.43, 129.75, 135.11, 135.53, 152.59, 160.18, 165.48, 171.53; ESI-MS m/z 490 (MNH_4^+); Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$) C, H, N. Minor diastereomer; white crystals (17%); mp 89–91 °C; ν_{max} (film) 2971, 1824, 1785, 1757, 1515, 1331, 1303, 1254 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 0.82 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.0 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.63–1.75 (2H, m), 1.89 (1H, dq, $J = 7.3, 14.7$ Hz), 2.22 (1H, dq, $J = 7.3, 14.8$ Hz), 3.81 (3H, s), 4.69 (1H, s), 5.58 (1H, s), 6.98 (2H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.37 (2H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.66 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.76 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 8.06 (2H, d, $J = 7.3$ Hz); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 8.48, 9.05, 20.17, 24.93, 55.95, 67.41, 78.15, 78.89, 115.15, 123.33, 127.90, 129.76, 130.25, 135.56, 137.41, 160.74, 166.3, 172.22; ESI-MS m/z (%) 490 (MNH_4^+); Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$) C, H, N.

3,3-Diethyl-N-[1-ethoxycarbonyl-1-(2-methoxycarbonylphenyl)amino-carboxyloxy]-methyl-4-(phenylsulfonyl)azetidid-2-one (5f). Major diastereomer; recrystallized from diethyl ether–light petroleum; white crystals (11%); mp 117–119 °C; ν_{max} (film) 3264, 2974, 1790, 1747, 1693, 1532, 1269, 1205 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 1.05 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.09 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.13 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.79 (1H, dq, $J = 7.3, 14.7$ Hz), 1.98 (1H, dq, $J = 7.3, 14.6$ Hz), 2.10 (1H, dq, $J = 7.3, 14.9$ Hz), 2.48 (1H, dq, $J = 7.3, 14.8$ Hz), 3.96 (3H, s), 3.86 (1H, dq, $J = 7.2, 10.6$ Hz), 4.01 (1H, dq, $J = 7.2, 10.5$ Hz), 4.93 (1H, s), 6.45 (1H, s), 7.05–8.41 (9H, m), 10.85 (1H, brs); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 8.66, 8.91, 13.87, 20.59, 24.59, 52.45, 62.79, 68.48, 70.55, 77.42, 114.93, 119.03, 122.32, 129.28, 129.40, 130.90, 134.25, 134.74, 138.36, 140.87, 150.78, 164.10, 168.65, 170.97; ESI-MS m/z 564 (MNH_4^+); Anal. ($\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$) C, H, N.

Minor diastereomer; white crystals (8%); mp 115–117 °C; ν_{max} (film) 3263, 2973, 1789, 1748, 1531, 1452, 1268, 1206 cm^{-1} ; $\delta^1\text{H}$ NMR 0.89 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.05 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.26 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.69 (1H, dq, $J = 7.5, 15.1$ Hz), 1.81–1.97 (2H, m), 2.38 (1H, dq, $J = 7.3, 14.7$ Hz), 3.95 (3H, s), 4.24 (2H, 2 \times dq, $J = 7.2, 9.9$ Hz), 4.63 (1H, s), 5.66 (1H, s), 7.05–8.33 (9H, m), 10.75 (1H, brs); $\delta^{13}\text{C}$ NMR 8.35, 8.73, 13.90, 19.98, 24.39, 52.43, 62.92, 67.30, 74.01, 78.51, 115.19, 118.97, 122.35, 128.81, 129.61, 130.95, 134.57, 134.62, 138.05, 140.69, 150.77, 164.14, 168.25, 170.97; ESI-MS m/z 564 (MNH_4^+); Anal. ($\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$) C, H, N.

HLE Inhibition Studies. Assays were performed at 25 °C in 0.1 M pH 7.2 HEPES buffer. The substrate used was MeO–Suc–Ala–Ala–Pro–Val–*p*-NA, and stock solutions were made up in DMSO. Enzyme activity was monitored by following the appearance of the *p*-nitroaniline product at 410 nm. Reactions were started by addition of inhibitor stock solution in DMSO (20 μL) to the incubation solution containing HLE (10 μL from a 20 μM stock solution in pH 5.0 acetate buffer) and HEPES buffer (970 μL). At various time intervals the HLE activity was assayed by diluting 100 μL aliquots of the incubation solution into 880 μL of 0.1 M pH 7.2 HEPES buffer and 20 μL of the substrate 50 mM stock solution. Initial rates were monitored over a period of 60 s, and the gradients of the slopes obtained were used as a measure of enzyme activity. In all cases, assays of control incubations were performed at the same time as inhibitor incubations. Pseudo-first-order rate constants of inactivation, k_{obs} , were obtained from plots of % activity (v/v_0) against time, where v is the initial rate at time t and v_0 is the initial rate of the control incubation. In the same experimental conditions, the K_m value for the hydrolysis of

MeO–Suc–Ala–Ala–Pro–Val–*p*–NA by HLE is 0.16 ± 0.05 mM, which compares favorably with the value of 0.14 mM reported by Nakajima et al.³⁵

Molecular Modeling. The structures of all enantiomers and diastereomers of compounds **6a–d** were energy-minimized using the MMFF94s force field.³⁶ The HLE structure used (PDB code 1HNE³⁷) was obtained by deletion from the active site of the ligand (methoxysuccinyl–Ala–Ala–Pro–Ala chloromethyl ketone) present in the crystal structure and prepared using WHATIF³⁸ (for addition of hydrogen atoms and optimization of hydrogen bonds) and the Biopolymer module of Sybyl. Histidine protonation states were assigned according to their surrounding environment. Inhibitors were modeled in the active site using the model proposed by Shah et al. for *N*-acyl β -lactams,¹⁷ and energy minimization of the complex was performed on a region comprising all residues in the protein within a distance of 6 Å from the atoms of the ligand using the MMFF94s force field.³⁶ All minimization procedures were performed using a simplex initial optimization, gradient termination ($0.001 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-1}$), and a distance-dependent dielectric function.

Acknowledgment. This work was supported by the project POCTI/QUI/10039/98/2001 (Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal), FEDER, and the British Council.

Supporting Information Available: Synthesis procedure for compound **11**, all spectroscopic data for compounds **9–12**, and the crystal data for the minor diastereomeric pair of enantiomers of **6d**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Dewald, B.; Rindler-Ludwig, R.; Bretz, U.; Bagliolini, M. Subcellular Localization and Heterogeneity of Neutral Proteases in Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Exp. Med.* **1975**, *141*, 709–770.
- Snider, G. L.; Ciccolella, D. F.; Morris, S. M. Putative Role of Neutrophil Elastase in the Pathogenesis of Emphysema. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1991**, *624*, 45–49.
- Stockley, R. A.; Hill, S. L.; Burnett D. Proteinases in Chronic Lung Infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1991**, *624*, 257–266.
- Kawabata, K.; Hagio, T.; Matsuoka, S. The Role of Neutrophil Elastase in Acute Lung Injury. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *451*, 1–10.
- Anderson, G. P.; Shinagawa, K. *Curr. Opin. Anti-Inflammatory Immunomodulatory Invest. Drugs* **1999**, *1*, 29–34.
- Barnes, P. J. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 269–280.
- Hastla, D. J.; Pagani, E. D. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1994**, *29*, 195–204.
- Bernstein, P. R.; Edwards, P. D.; Williams, J. C. Inhibitors of Human Leukocyte Elastase. *Prog. Med. Chem.* **1994**, *31*, 59–120.
- Babine, R. E.; Bender, S. L. Molecular Recognition of Protein–Ligand Complexes: Applications to Drug Design. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1359–1472.
- Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305–341.
- Page, M. I.; Laws, A. P. The Chemical Reactivity of β -Lactams, β -Sultams and β -Phospholactams. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5631–5638.
- Doherty J. B.; Ashe, B. M.; Argenbright, L. W.; Barker, P.; Bonney, L.; Chandler, G. O.; Dahlgren, M. E.; Dorn, C. P.; Finke, P. E.; Firestone, R. A.; Fletcher, D.; Hagmann, W. K.; Mumford, R.; O'Grady, L.; Maycock, A. L.; Pisano, J. M.; Shah, S. K.; Thompson, K. R.; Zimmerman, M. Cephalosporin Antibiotics Can Be Modified to Inhibit Human Leukocyte Elastase. *Nature* **1986**, *322*, 192–194.
- Doherty J. B.; Ashe, B. M.; Barker, P.; Blacklock, T. J.; Butcher, J. W.; Chandler, G. O.; Dahlgren, M. E.; Davies, P.; Dorn, C. P.; Finke, P. E.; Firestone, R. A.; Hagmann, W. K.; Halgren, T.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Navia, M. A.; O'Grady, L.; Pisano, J. M.; Shah, S. K.; Thompson, K. R.; Weston, H.; Zimmerman, M. Inhibition of Human Leukocyte Elastase. 1. Inhibition by C-7 Substituted Cephalosporin *tert*-Butyl Esters. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2513–2521.
- Finke, P. E.; Ashe, B. M.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Navia, M. A.; Shah, S. K.; Thompson, K. R.; Underwood, D. J.; Weston, H.; Zimmerman, M.; Doherty J. B. Inhibition of Human Leukocyte Elastase. 2. Inhibition by Substituted Cephalosporin Esters and Amides. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2522–2528.
- Shah, S. K.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Finke, P. E.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Doherty J. B. Inhibition of Human Leukocyte Elastase. 3. Synthesis and Activity of 3'-Substituted Cephalosporins. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2529–2535.
- Navia, M. A.; Springer, J. P.; Lin, T.-Y.; Williams, H. R.; Firestone, R. A.; Pisano, J. M.; Doherty J. B.; Finke, P. E., and Hogsteen, K. Crystallographic Study of a β -Lactam Inhibitor Complex with Elastase at 1.84 Å Resolution. *Nature* **1987**, *327*, 79–82.
- Shah, S. K.; Dorn, C. P.; Finke, P. E.; Hale, J. J.; Hagmann, W. K.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Kissinger, A. L.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Dellea, P. S.; Fletcher, D. S.; Hand, K. M.; Mumford, R. A.; Underwood, D. J.; Doherty, J. B. Orally Active β -Lactam Inhibitors of Human Leukocyte Elastase. 1. Activity of 3,3-Diethyl-2-Azetidinones. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3745–3754.
- Hagmann, W. K.; Kissinger, A. L.; Shah, S. K.; Finke, P. E.; Dorn, C. P.; Brause, K. A.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Maycock, A. L.; Knight, W. B.; Dellea, P. S.; Fletcher, D. S.; Hand, K. M.; Osinga, D.; Davies, P.; Doherty, J. B. Orally Active β -Lactam Inhibitors of Human Leukocyte Elastase. 2. Effect of C-4 Substitution. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 771–777.
- Finke, P. E.; Shah, S. K.; Fletcher, D. S.; Ashe, B. M.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Dellea, P. S.; Hand, K. M.; Maycock, A. L.; Osinga, D.; Underwood, D. J.; Weston, H.; Davies, P.; Doherty, J. B. Orally Active β -Lactam Inhibitors of Human Leukocyte Elastase. 3. Stereospecific Synthesis and Structure–Activity Relationship for 3,3-Dialkylazetidino-2-ones. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2449–2462.
- Clemente, A.; Domingos, A.; Grancho, A. P.; Iley, J.; Moreira, R.; Neres, J.; Palma, N.; Santana, A. B.; Valente, E. Design, Synthesis and Stability of *N*-Acyloxymethyl- and *N*-Aminocarbonyloxymethyl-2-Azetidinones as Human Leukocyte Elastase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1065–1068.
- Page, M. I. The Mechanisms of Reactions of β -Lactam Antibiotics. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1987**, *23*, 165–210.
- Valente, E.; Gomes, J. R. B.; Moreira, R.; Iley, J. Kinetics and Mechanism of Hydrolysis of *N*-Acyloxymethyl Derivatives of Azetidino-2-one. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3359–3367.
- Proctor, P.; Gensmantel, N. P.; Page, M. I. The Chemical Reactivity of Penicillins and other β -Lactam Antibiotics. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1982**, 1185–1192.
- Perrin, D. D.; Dempsey, B.; Serjeant, E. P. *pK_a Prediction for Organic Acids and Bases*; Chapman and Hall: London, 1981. Using the assumptions set out on pp 38–40 of this reference, together with the equation $\text{pK}_a = 10.59 - 3.23\Sigma\sigma^*$ derived for the dissociation of $\text{R}'\text{R}''\text{NH}_2^+$, we calculated pK_a values of 0.71 and -0.57 for the conjugated ammonium salts of $\text{HO}_2\text{CCEt}_2\text{CH}(\text{OPh})\text{NHCH}(\text{CO}_2\text{Et})\text{OCOMe}$ and $\text{HO}_2\text{CCEt}_2\text{CH}(\text{SO}_2\text{Ph})\text{NHCH}(\text{CO}_2\text{Et})\text{OCOMe}$, respectively. The requisite σ^* values are as follows: $\text{R}' = -\text{CH}(\text{OPh})\text{CET}_2\text{O}_2\text{H}$, 1.24; $-\text{CH}(\text{SO}_2\text{Ph})\text{CET}_2\text{O}_2\text{H}$, 1.62; $\text{R}'' = -\text{CH}(\text{CO}_2\text{Et})\text{OCOMe}$, 1.82.
- Clark-Lewis, J. W. 2,4-Oxazolinediones. *Chem. Rev.* **1958**, *58*, 63–99.
- Guanti, G.; Banfi, L.; Powles, K.; Rasparini, M.; Scolastico, C.; Fossati, N. Asymmetric Synthesis of (*R*)-(-)-Chlzolinate Through a Chemoenzymatic Procedure. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 271–277.
- Gu, H.; Fedor, L. R. Base-Catalyzed Elimination of Para-Substituted Thiophenoxides from 4-(Arylthio)azetidino-2-ones. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5655–5657.
- Branch, C. L.; Nayler, J. H. C.; Pearson, M. J. Synthesis of Some 1-Oxadethiaceph-3-ems. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 1450–1452.
- Crystal data for the minor diastereomeric pair **6d**. A suitable crystal was selected, and data were collected on a Bruker Nonius KappaCCD area detector at the window of a Bruker Nonius FR591 rotating anode ($\lambda_{\text{Mo K}\alpha} = 0.71073 \text{ \AA}$) driven by COLLECT and DENZO software at 120 K. The structure was determined in SHELXS-97 and refined using SHELXL-97. $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$, $M = 456.50$, monoclinic, space group = $P2_1/n$, $a = 12.4900(8) \text{ \AA}$, $b = 17.5457(13) \text{ \AA}$, $c = 20.2917(12) \text{ \AA}$, $\beta = 101.760(4)^\circ$, $U = 4353.5(5) \text{ \AA}^3$, $T = 120(2) \text{ K}$, $Z = 8$, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.192 \text{ mm}^{-1}$, 38 243 reflections measured, 9874 unique ($R_{\text{int}} = 0.1287$), which were used in all calculations. Final $R_1 = 0.0680$, $wR_2 = 0.1246$ [$F^2 > 2\sigma(F^2)$], $R_1 = 0.2052$, $wR_2 = 0.1654$ (all data). The crystallographic data (excluding structure factors) for the minor diastereomeric pair **6d** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication

numbers CCDC262210. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, U.K. (Fax +44(0)-1223-336033 or e-mail deposit@ccdc.cam.ac.uk).

- (30) Kitz, R.; Wilson, I. B. Esters of Methanesulfonic Acid as Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3245–3249.
- (31) Lightstone, F. C.; Bruice, T. C. Ground State Conformations and Entropic and Enthalpic Factors in the Efficiency of Intramolecular and Enzymatic Reactions. 1. Cyclic Anhydride Formation by Substituted Glutarates, Succinate and 3, 6- Endoxo- Δ^4 -Tetrahydrophthalate Monophenyl Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2595–2605.
- (32) Wipff, G.; Dearing, A.; Weiner, P. K.; Blaney, J. N.; Kollman, P. A. Molecular Mechanics Studies of Enzyme–Substrate Interactions: The Interaction of L- and D- *N*- Acetyltryptophanamide with α -Chymotrypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 997–1005.
- (33) Chung, S. J.; Chung, S.; Lee, H. S.; Kim, E.-J.; Oh, K. S.; Choi, H. S.; Kim, K. S.; Kim, Y. J.; Hahn, J. H.; Kim, D. H. Mechanistic Insight into the Inactivation of Carboxypeptidase A by α -Benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidine-4-acetic Acid, a Novel Type of Irreversible Inhibitor of Carboxypeptidase A with No Stereospecificity. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 6462–6471.
- (34) *Sybyl 6.8*, Tripos Inc.: St. Louis, MO, 2001.
- (35) Nakajima, K.; Powers, J. C.; Ashe B. M. and Zimmerman, M. Mapping the Extended Substrate Binding Site of Cathepsin G and Human Leukocyte Elastase. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 4027–4032.
- (36) Halgren, T. MMFF VI MMFF94s Option for Energy Minimization Studies. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 720–729.
- (37) Navia, M. A.; McKeever, B. M.; Springer, J. P.; Lin, T. Y.; Williams, H. R.; Fluder, E. M.; Dorn, C. P.; Hoogsteen, K. Structure of Human Neutrophil Elastase in Complex with a Peptide Chloromethyl Ketone Inhibitor at 1.84 Å Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 7–11.
- (38) Vriend, G. WHAT IF: A Molecular Modeling and Drug Design Program. *J. Mol. Graphics* **1990**, *8*, 52–56.

JM0501331