38361

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE
(Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca)

XIX CICLO DEL

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE CHIMICHE

NUOVI APPROCCI AD INIBITORI PEPTIDOMIMETICI DELLA HIV-PROTEASI

(CHIM/06)

Dottorando:

Dott. Pietro Campaner

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Giuliana Pitacco

Università degli Studi di Trieste

GPitacco

Relatore:

Chiar.mo Prof. Fabio Benedetti

Università degli Studi di Trieste

Indice

Parte Prima: Introduzione

1. La sindrome da immunodeficienza acquisita 9

1.1 La scoperta del virus HIV 9

1.2 La struttura del virus HIV 10

1.3 Ciclo replicativo del virus HIV 11

1.4 Strategie terapeutiche 13

1.4.1 Inibitori della trascrittasi inversa (RTI) 16

1.4.2 Inibitori della proteasi (PI) 18

1.5 La terapia HAART 19

1.5.1 Effetti collaterali 21

1.5.2 Resistenza ai farmaci 21

1.5.3 Compliance 23

2. La proteasi aspartica del virus HIV-1 25

2.1 Le proteasi ed il loro ruolo biologico 25

2.2 Le proteasi aspartiche 25

2.3 La proteasi da HIV (HIV-PR) 27

2.3.1 Struttura tridimensionale 28

2.3.2 Subsiti del sito catalitico 30

2.3.3 Meccanismo di idrolisi 31

2.3.4 Specificità dell'enzima 32

2.4 Strategie di inibizione 34

2.4.1 Inibitori dell'HIV-proteasi 35

2.5 Drug Design e Inibitori della HIV-PR 36

3. Inibitori peptidomimetici reversibili 39

3.1 Sintesi di isosteri dipeptidici 39

3.2 Isosteri diidrossietilenici 39

3.2.1 Reazioni di condensazione di α-amminoaldeidi 40

3.2.2 Sintesi a partire da zuccheri 41

3.2.3 Sintesi a partire dall'acido tartarico 43

3.2.4 Diamminodioli da amminocidi naturali 44

3.3 Isosteri basati sulla prolina 45

3.3.1 *Il Saquinavir* 47
3.3.2 *Altri isosteri della prolina* 51
3.3.3 *Isosteri diidrossietilenici Xaa-Pro* 55
3.3.4 *Inibitori peptidomimetici basati sul nuovo isostere PhePro* 58

Parte seconda: Risultati e discussione

4 Nuovi isosteri Xaa-Pro 65
4.1 Nuova sintesi di isosteri Xaa-Pro 65
4.1.1 *Sintesi dell'enone **59b*** 66
4.1.2 *Sintesi dell'alcol allilico **52b*** 70
4.1.3 *Conversione dell'alcol allilico 52b nell'isostere Phe-Pro **41b*** 71
4.2 Introduzione di variazioni strutturali sull'isostere **41** 73
4.2.1 Variazione della stereochimica 74
4.2.2 Aumento delle dimensioni dell'anello pirrolidinico 76
4.2.3 Sostituzione al C-5 79
4.2.4 Sostituzione al C3 e C4 84
4.2.5 Sostituzione con un anello condensato 86
4.2.6 Il residuo P1 90
4.2.7 Un approccio alternativo alla sintesi di isosteri Pro-Pro 93
4.2.8 Sintesi di isosteri monoidrossietilenici 95
4.2.9 Isosteri contenenti un triazolo 98
4.3 Sintesi di inibitori peptidomimetici basati su isosteri Xaa-Pro 99
4.4 Valutazione dell'attività biologica e correlazioni struttura-attività 104

5 Inibitori a struttura epossidica 109
5.1 Inibizione irreversibile 109
5.2 Inibitori epossidici dell'HIV-PR 110
5.3 Nuovi inibitori irreversibili a struttura pseudopeptidica 113
5.3.1 Sintesi degli alcoli allilici *E* 114
5.3.2 Sintesi degli alcoli allilici *Z* 118
5.3.3 Sintesi degli inibitori 120
5.3.4 Valutazione dell'attività e correlazioni struttura reattività 121

6 Inibitori misti sito della dimerizzazione-sito catalitico 123

6.1 Il sito della dimerizzazione 123

6.2 Inibitori della dimerizzazione 124

6.3 Inibitori misti 129

6.4 Sintesi degli inibitori 131

6.5 Sintesi del linker e coniugazione degli inibitori 132

6.6 Attività biologica 136

Parte sperimentale 141

Appendice 229

PARTE PRIMA: INTRODUZIONE

1 La sindrome da immunodeficienza acquisita

1.1 La scoperta del virus HIV

Il 1981 rappresenta, nella storia della medicina moderna, una delle date più significative, coincidendo con la scoperta e la descrizione di una nuova sindrome dal decorso maligno non riconducibile ad alcuna malattia già nota;[1] i soggetti colpiti presentavano rare neoplasie a carico dei vasi sanguigni (*sarcoma di Kaposi*) e una notevole vulnerabilità ad infezioni opportunistiche di tipo fungino (*Pneumocystis carinii* e *Candida albicans*),[2] solitamente innocue. Gli studi sul sangue dei pazienti, in prevalenza giovani maschi omosessuali, tossicodipendenti, emofiliaci, neonati e individui soggetti a trasfusioni di sangue, portarono, un anno dopo, all'osservazione che tutti i campioni erano accomunati da una drastica diminuzione dei linfociti T4; l'agente patogeno, quindi, oltre a compromettere seriamente il sistema immunitario, doveva essere presente nel sangue, nel plasma e nel liquido seminale e la patologia si diffondeva mediante contatto sessuale o per contaminazione con sangue infetto. Sulla base di queste considerazioni la nuova malattia venne ufficialmente definita *Sindrome da ImmunoDeficienza Acquisita* (AIDS).

Le caratteristiche e gli effetti di questa nuova sindrome sembravano, in prima approssimazione, riconducibili a quelli riscontrati in infezioni da retrovirus umani HTLV-1 e HTLV-2 (responsabili della leucemia), isolati per la prima volta tra la fine degli anni Settanta e l'inizio degli anni Ottanta;[3] nel 1983, però, nel sangue dei pazienti affetti da AIDS venne individuato un nuovo retrovirus (oggi noto come HIV-1), diverso da quelli conosciuti,[4] che, isolato, venne definitivamente riconosciuto come causa della malattia.[5]

Queste osservazioni, pur portando all'isolamento di un secondo tipo di virus (HIV-2),[6] al rapido sviluppo di un test per l'individuazione del virus nel sangue, ad una riduzione dei rischi di contagio mediante trasfusione ed al monitoraggio dei pazienti infetti, non

---

[1] Gottlieb M. S.; Schroff R.; Schanker H. M.; Weisman J. D.; Fan P. T.; Wolf R. A.; Saxon A *N. Engl. J. Med.* (**1981**), *305*, 1425

[2] Prusiner, S.B. *Science* (**2002**), *298*, 1726

[3] Gallo, R.C. *Science* (**2002**), *298*, 1728

[4] a) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. *Science* (**1983**), *220*, 868; b) Gallo, R.C.; Sarin, P. S.; Gelmann, E. P.; Robert-Guroff, M.; Richardson, E.; Kalyanaraman, V. S.; Mann, D.; Sidhu, G. D.; Stahl, R. E.; Zolla-Pazner, S.; Leibowitch, J.; Popovic, M. *Science* (**1983**), *220*, 865; c) Gallo, R.C.; Montaigner, L. *Sci. Am.* (**1988**), *259*, 40

[5] R. Kulstad Ed., *AIDS: Papers from science 1982-1985 (AAAS, Whashington, DC)* (**1986**).

[6] Clavel, F. ; Guetard, D. ; Brun-Vezinet, F. ; Chamaret, S. ; Rey, M. A. ; Santos-Ferreira, O. *Science* (**1986**), *233*, 343

furono sufficienti ad impedire che l'AIDS, in breve tempo, raggiungesse proporzioni epidemiche in tutto il mondo. Si intensificarono, quindi, sia gli studi sulla struttura e sul meccanismo di azione del virus sia quelli volti alla messa a punto di un'efficace terapia antiretrovirale,[7] e finalmente, nel 1986, venne approvato il primo farmaco anti-HIV (AZT), capace di prolungare di qualche anno la vita dei malati e ancora oggi alla base della terapia anti-AIDS. Il nuovo filone di ricerca così apertosi, grazie ad una più approfondita conoscenza della struttura molecolare del virus e del suo ciclo replicativo, portò, nel 1995, all'approvazione dei primi inibitori della proteasi (PI) e degli inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI), il cui impiego in combinazione con l'AZT ha determinato un'effettiva riduzione tanto nella mortalità dei pazienti quanto nell'insorgenza di infezioni opportunistiche e neoplasie.[8]

Nonostante i numerosi progressi, non esiste a tuttoggi una cura definitiva per questa malattia, la cui incidenza, ormai circoscritta in Europa e Nord America, è in costante e rapido aumento soprattutto nei paesi in via di sviluppo (Asia, Africa Sub-Sahariana e Sud America), rappresentando una delle principali cause di morte.[9] In questi paesi l'elevato costo della terapia (circa 10000 $ all'anno) e la mancanza di infrastrutture per la cura dei malati fanno sì che solo una ridottissima parte della popolazione infetta possa avere accesso alle cure. Lo sviluppo di farmaci più efficaci, la riduzione dei costi della terapia, la messa a punto di sistemi diagnostici per la calibrazione dei dosaggi dei farmaci di più rapido utilizzo e la possibilità di ottenere al più presto un vaccino costituiscono al momento gli obiettivi primari della ricerca per contrastare il dilagare dell'infezione.

1.2 Struttura del virus HIV

Il virus HIV-1 è un lentivirus altamente mutante, appartenente alla classe dei retrovirus, nei quali l'informazione genetica è racchiusa in singoli filamenti di RNA. Le infezioni da lentivirus (quali la "Visna infection" nelle pecore, l'immunodeficienza felina (FIV) e quella delle scimmie (SIV)) sono caratterizzate da un decorso cronico della malattia, un lungo periodo di latenza asintomatica, una persistente replicazione virale ed un coinvolgimento del sistema nervoso centrale.

---

[7] Gallo, R.C. *Immunol. Rev.* (**2002**), *185*, 236

[8] Rubbert, A.; Ostrowski, M. In *HIV Medicine 2003;* Hoffmann, C.; Kamps, B.S., Ed.; Flying Publisher, 15

[9] a) Gallo, R.C. ; Montagnier, L. *Science* (**2002**), *298*, 1730 ; b) http://www.unaids.org

Il virus HIV ha una struttura sferica del diametro di 100 nm ed è costituito da un involucro lipo-proteico, simile alla membrana citoplasmatica delle cellule umane, e da un nucleo; ciascuna particella virale contiene 72 complessi glicoproteici integrati nella membrana lipidica composti da trimeri di una glicoproteina esterna (gp120), da una proteina transmembrana (gp41) e una proteina della matrice (p17) ancorata nella parte interna della membrana. Il nucleo è un capside proteico costituito da un polipeptide (p24) contenente due filamenti identici di RNA, ciascuno dei quali associato alla nucleoproteina p7 e alla trascrittasi inversa p66. All'interno del capside proteico (Fig 1.1) sono contenuti anche i tre enzimi necessari alla replicazione del virus: la trascrittasi inversa (RT) p66, l'integrasi (IN) p32 e la proteasi (PR) p11.[10]

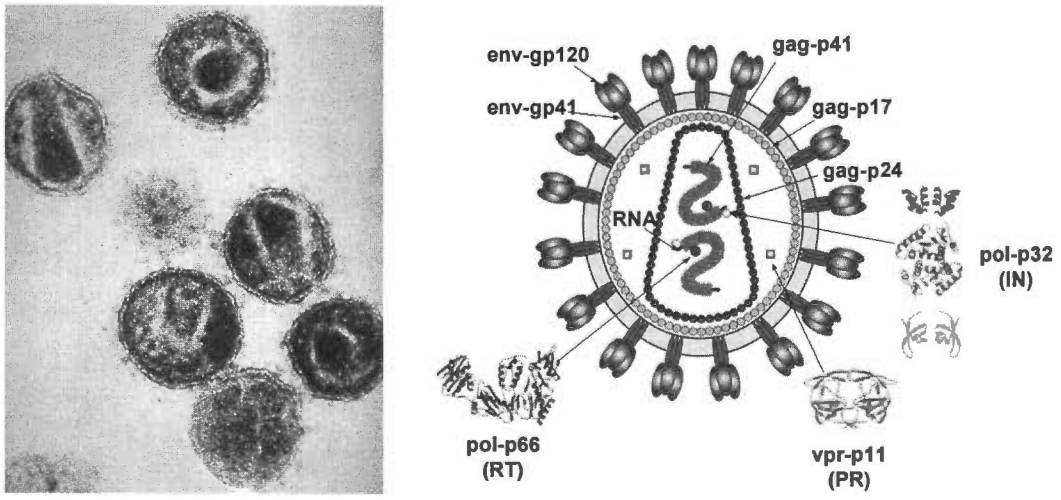


Figura 1.1: immagine al microscopio elettronico e rappresentazione schematica del virus HIV-1

1.3 Ciclo replicativo del virus HIV

Il linfocita T4 rappresenta il bersaglio d'elezione del virus; la sua diminuzione e compromissione all'interno del sistema immunitario causano la distruzione delle difese immunitarie osservata nei malati di AIDS. L'HIV riconosce specificamente la proteina CD4, presente sulla superficie di circa il 60% dei linfociti T; la conseguente interazione fra la proteina CD4 e la proteina gp120 del virus permette alla proteina gp41 di perforare il doppio strato lipidico della cellula. Le membrane virali e cellulari possono così fondersi, facendo sì che il capside proteico penetri all'interno del citoplasma;[11] qui la trascrittasi inversa, enzima presente unicamente nei retrovirus, sintetizza una copia di

[10] a) Volker, E.J. *J. Chem. Ed.* **(1993)**, *70*, 3; b) Gelderblom, H.R.; Gentile, M.; Scheidler, A.; Ozel, M.; Pauli, G. *Zur Struktur und Funktion bei HIV, AIFO* **(1993)**, *5*, 231

[11] a) Peter, F. *Immunity* **(1998)**, *9*, 433; b) Miller, R.H.; Sarver, N. *Nat. Med* **(1997)**, *3*, 389; c) Cullen, B.R.; *Cell* **(1998)**, *93*, 685; d) Bour, S.; Schubert, U.; Strebel, K. *J. Virol.* **(1995)**, *69*, 1510; e) Banda, N.K.; Bernier, J.; Kurahara, D.K.; Kurrle, R.; Haigwood, N.; Sekaly, R.P.; Finkel, T.H. *J. Exp. Med.* **(1992)**, *176*, 1099

DNA a partire dall'RNA virale. Successivamente, l'integrasi virale inserisce nel genoma della cellula ospite il doppio filamento di DNA, che si replicherà ogni volta che la cellula andrà incontro a divisione.[12]

La maggior parte dell'informazione genetica dell'HIV, secondo un'organizzazione tipica dei retrovirus, è contenuta nei geni *gag, pol, env*: i geni *gag* ed *env* codificano per le glicoproteine della membrana virale e per quelle del capside nucleare, mentre il gene *pol* codifica per la trascrittasi inversa e gli altri due enzimi. Gli altri sei geni (*vif, vpu, vpr, tat, rev* e *nef*) contenuti nel virus HIV-1 hanno, invece, una funzione regolatrice del ciclo di replicazione, essendo responsabili della varietà di comportamenti che può assumere l'HIV integrato; il virus, ad esempio, può rimanere silente con formazione di poche particelle e distruzione di poche cellule, oppure manifestarsi come infezione persistente, dato che è la stimolazione immunologica subita dal linfocita, a seguito dell'incontro con l'antigene, a determinare la velocità di replicazione e di produzione di nuovi virioni.[13]

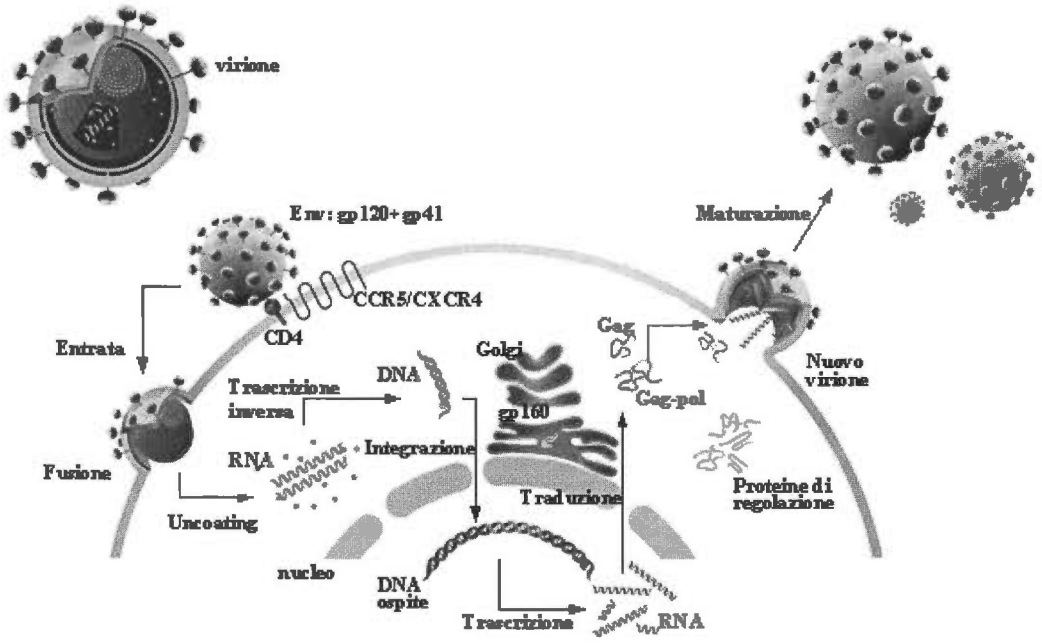
La replicazione comincia con l'espressione del genoma integrato che dà luogo a filamenti di RNA identici agli originari; parte di questi viene inglobata nel capside dei nuovi virus, mentre altri servono alla sintesi di poliproteine inattive, in seguito idrolizzate a dare le proteine strutturali e gli enzimi, determinando la completa maturazione del virus (Schema 1).

La poliproteina codificata dal gene *env* (GP160*env* del peso di 160 KDa) viene idrolizzata da una proteasi della cellula ospite a dare le glicoproteine della membrana esterna; le poliproteine codificate dai geni *gag* e *pol* (Pr55*gag* e Pr165*gag-pol*, 53KDa e 160KDa rispettivamente), invece, vengono idrolizzate esclusivamente dalla proteasi aspartica virale (HIV-PR), a dare le proteine strutturali del capside nucleare e gli enzimi.

---

[12] Zack, J.A.; Arrigo, S.J.; Weitsman, S.R.; Go, A.S.; Haislip, A.; Chen, I.S.Y. *Cell* (**1990**), *61*, 213

[13] a) Wong-Staal, F. *Fundamental Virology;* Fields, B.N.; Knipe, D.M., Ed.; Raven Press LTD, New York (**1991**); b) Chun, T.W.; Carruth, L.; Finzi, D. *Nature* (**1997**), *387*, 183



Schema 1.1: ciclo replicativo del virus HIV-1

1.4 Strategie terapeutiche

Una terapia anti-infettiva efficiente, in generale, deve eliminare l'agente patogeno o impedirne la proliferazione, senza interferire con i meccanismi fisiologici dell'organismo ospite. Nel caso dell'AIDS, tuttavia, non esistendo ancora una cura definitiva, la terapia antivirale mira a prolungare la vita del paziente, garantendogli, per quanto possibile, un'alta qualità di vita e riducendo allo stesso tempo al minimo sia l'insorgenza di infezioni opportunistiche che gli effetti collaterali dei farmaci.[14] La ricerca di sostanze in grado di inibire selettivamente il ciclo di replicazione dell'HIV, senza danneggiare la cellula ospite, risulta particolarmente difficile, poiché il virus viene integrato nel genoma dell'ospite, sfruttandone anche l'apparato sintetico ed enzimatico.

Ogni passaggio del ciclo replicativo potrebbe, in linea di principio, costituire il bersaglio per una cura efficiente;[15] questa osservazione ha motivato la ricerca di una vasta serie di possibili principi attivi. Sono state, ad esempio, realizzate molecole che interagiscono con il recettore CD4 (primo bersaglio del virus al momento dell'infezione della cellula ospite), andando ad inibire, così, l'ancoraggio del virus, (CADA)[16] o che

[14] Hoffmann, C., In *HIV Medicine 2003;* Hoffmann, C., Kamps, B.S., Ed.; Flying Publisher, 120

[15] a) Mitsuya, H.; Yarchoan, R.; Broder, S. *Science* **(1990)**, *249*, 1533; b) Brik, A.; Wong, CH. *Org. Biomol. Chem.* **(2002)**, *1*, 5

[16] Vermeire, K.; Zhang, Y.; Princen, K.; Hatse, S.; Samala, M. F.; Dey, K.; Choi, H.-J.; Ahn, Y.; Sodoma, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; De Clercq, E.; Bell, T. W.; Schols, D. *Virology* **(2002)**, *302*, 342

impediscono il binding della proteina virale gp120 ai recettori CCR5 o CXCR4 (BMS-378806 e KRH-1636),[17] preservando, però, l'espressione di altri recettori cellulari.

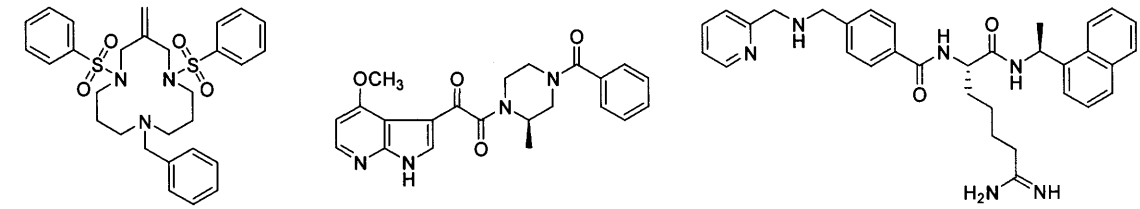


Figura 1.2: esempi di "inibitori dell'entrata"

L'interazione della proteina gp120 dell'HIV con i co-recettori CXCR4 o CCR5, come già descritto, è seguita dall'azione della proteina gp41, responsabile del processo di fusione; per bloccare questo processo è stato realizzato un peptide di 36 amminoacidi (Enfuvirtide o Fuzeon),[18] corrispondente ai residui 127-162 della proteina gp41 o ai residui 643-678 del precursore gp160, in grado di interagire con la superficie idrofobica della proteina gp41. Molecole non peptidiche che distorgono la struttura ad α-elica della gp41 funzionano secondo un principio analogo.[19]

Durante il processo di trascrizione inversa RNA-DNA, cioè il passaggio che porta l'RNA a singolo filamento a dare un DNA provirale a doppio filamento, si ha la formazione di una struttura duplex ibrida RNA·DNA. Affinché la formazione del DNA virale possa essere completa, è necessario che la Ribonucleasi H stacchi l'RNA dal duplex; sono stati individuati dichetoacidi e N-idrossiimmidi che agiscono a questo livello,[20] impedendo l'azione della HIV-RNAasi.

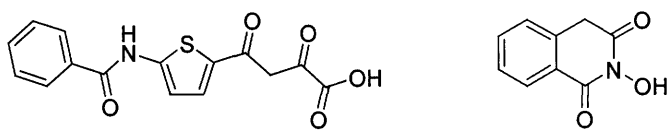


Figura 1.3: esempi di inibitori della Ribonucleasi H

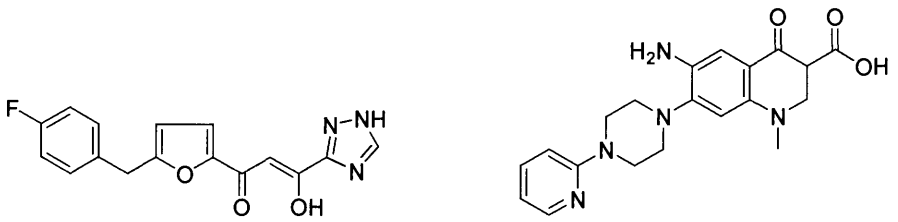
[17] Wang, T.; Zhang, Z.; Wallace, O. B.; Deshpande, M.; Fang, H.; Yang, Z.; Zadjura, L. M.; Tweedie, D. L.; Huang, S.; Zhao, F.; Ranadive, S.; Robinson, B. S.; Gong, Y.-F.; Ricarrdi, K.; Spicer, T. P.; Deminie, C.; Rose, R.; Wang, H.-G. H.; Blair, W. S.; Shi, P.-Y.; Lin, P.-f.; Colonno, R. J.; Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* (**2003**), *46*, 4236

[18] Kilby, J. M.; Hopkins, S.; Venetta, S. M.; DiMassimo, B.; Cloud, G. A.; Lee, J. Y.; Alldredge, L.; Hunter, E.; Lambert, D.; Bolognesi, D.; Matthews, T.; Johnson, M. R.; Nowak, M. A.; Shaw, G. M.; Saag, M. S. *Nat. Med.* (**1998**), *4*, 1302

[19] Ernst, J. T.; Kutzki, O.; Debnath, A. K.; Jiang, S.; Lu, H.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem., Int. Ed.* (**2002**), *41*, 278

[20] a) Shaw-Reid, C. A.; Munshi, V.; Graham, P.; Wolfe, A.; Witmer, M.; Danzeisen, R.; Olsen, D. B.; Carroll, S. S.; Embrey, M.; Wai, J. S.; Miller, M. D.; Cole, J. L.; Hazuda, D. J. *J. Biol. Chem.* (**2003**), *278*, 2777; b) Klumpp, K.; Hang, J. Q.; Rajendran, S.; Yang, Y.; Derosier, A.; Wong Kai In, P.; Overton, H.; Parkes, K. E. B.; Cammack, N.; Martin, J. A. *Nucleic Acids Res.* (**2003**), *31*, 6852

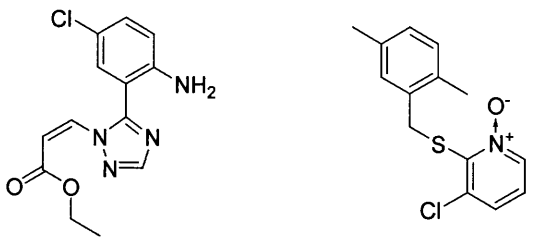
Un altro ottimo bersaglio per una terapia mirata è rappresentato dall'integrasi,[21] enzima che permette l'inserimento del DNA virale nel genoma della cellula ospite, dato che al momento non esistono prove dell'esistenza di enzimi con funzione analoga all'interno delle cellule umane. I dati riguardanti la struttura di questo enzima sono tuttavia ancora frammentari e i progressi nella messa a punto di inibitori sono molto limitati;[22] per questa ragione, gran parte dei farmaci di questo tipo apparsi sul mercato negli ultimi anni sono stati rapidamente ritirati[23] o hanno appena raggiunto la fase di sperimentazione clinica.[24]



S-1360 WM5

Figura 1.4: esempi di inibitori dell'integrasi

Studi preliminari hanno recentemente mostrato risultati molto incoraggianti per quanto riguarda una ulteriore classe di farmaci, la cui funzione è quella di impedire il processo di traduzione e quindi la sintesi di nuovo materiale virale.[25]



PKF 050-638 JPL-133

Figura 1.5: esempi di inibitori della traduzione

---

[21] Nair, V. *Rev. Med. Virol.* (**2002**), *12*, 179

[22] a) Bujacz, G.; Alexandratos, J.; Zhou-Liu, Q. *FEBS Lett.* (**1996**), *398*, 175; b) Goldgur, Y.; Craigie, R.; Cohen, G. H.; Fujiwara, T.; Yoshinaga, T.; Fujishita, T.; Sugimoto, H.; Endo, T.; Murai, H.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**1999**), *96*, 13040; c) Chen, J.C.; Krucinski, J.; Miercke, L.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (**2000**), *97*, 8233

[23] Debyser, Z.; Cherepanov, P.; Van Maele, B. *Antivir. Chem. Chemother.* (**2002**), *13*, 1

[24] a) Yoshinaga, T.; Sato, A.; Fujisita, T.; Fujiwara, T. *9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Seattle, WA. (**2002**); b) Grobler, J. A.; Stillmock, K.; Hu, B.; Witmer, M.; Felock, P.; Espeseth, A. S.; Wolfe, A.; Egbertson, M.; Bourgeois, M.; Melamed, J.; Wai, J. S.; Young, S.; Vacca, J.; Hazuda, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**2002**), *99*, 6661

[25] a) Lagoja, I. M.; Pannecouque, C.; Musumeci, L.; Froeyen, M.; Van Aerschot, A.; Balzarini, J.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. *Helv. Chim. Acta* (**2002**), *85*, 1883; b) Lagoja, I. M.; Pannecouque, C.; Van Aerschot, A.; Witvrouw, M.; Debyser, Z.; Balzarini, J.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* (**2003**), *46*, 1546

Al momento sono disponibili tre classi di farmaci per il trattamento dell'infezione da HIV:

-) inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI);

-) inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI);

-) inibitori della proteasi (PI), disponibili sia in formulazioni individuali che in combinazione con altri agenti retrovirali.[26]

1.4.1 Inibitori della trascrittasi inversa (RTI)

I primi farmaci ad essere approvati per il trattamento clinico dell'AIDS furono gli inibitori nucleosidici (NRTIs) della trascrittasi inversa che vennero scoperti ed utilizzati ancora prima che fosse nota la struttura cristallografica completa dell'enzima, basandosi solo sulla conoscenza del suo meccanismo di azione e saggiando l'attività anti-HIV di composti già noti.[27] La struttura di queste molecole differisce da quella dei nucleosidi per la mancanza di un ossidrile nelle posizioni 2' o 3', oppure per la sostituzione di questo con un diverso gruppo funzionale (un'azide nel caso dell'AZT). Il loro inserimento nel filamento di DNA virale in crescita impedisce la formazione di un legame 3'-5' fosfodiestereo e quindi un ulteriore allungamento della catena. Questa classe di composti comprende analoghi della timidina quali la zidovudina (ZDV o AZT) e la stavudina (d4T), la didanosina (ddi), un analogo dell'inosina che viene convertito nella dideossiadenosina, analoghi della citidina quali la zalcitabina (ddc) e la lamivudina (3TC). Strutture quali la (-)-2'-deossi-3'-ossa-4'-tiocitidina (dOTC),[28] la *β*-D-2',3'-dideidro-2',3'-dideossi-5-fluorocitidina (*β*–D-d4FC)[29] e il (-)-*β*-D-2,6-diaminopurin diossolano (DAPD),[30] pur essendosi dimostrate efficaci anche in casi di resistenza al comune trattamento farmacologico, sono attualmente ancora in fase di studio preclinico (Fig. 1.6).

---

[26] Hoffmann, C. In *HIV Medicine 2003;* Hoffmann, C.; Kamps, B.S. Ed.; Flying Publisher, 53

[27] Kohlstaedt, L. A.; Wang, J.; Friedman, J. M.; Rice, P. A.; Steitz, T. A. *Science* (**1992**), *256*, 1783

[28] Stoddart, C. A.; Moreno, M. E.; Linquist-Stepps, V. D.; Bare, C.; Bogan, M. R.; Gobbi, A.; Buckheit, R. W., Jr.; Bedard, J.; Rando, R. F.; McCune, J. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* (**2000**), *44*, 783

[29] Schinazi, R. F.; Mellors, J.; Bazmi, H.; Diamond, S.; Garber, S.; Gallagher, K.; Geleziunas, R.; Klabe, R.; Pierce, M.; Rayner, M.; Wu, J. T.; Zhang, H.; Hammond, J.; Bacheler, J.; Manion, D. J.; Otto, M. J.; Stuyver, L.; Trainor, G.; Liotta, D. C.; Erickson-Viitanen, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* (**2002**), *46*, 1394.

[30] Furman, P. A.; Jeffrey, J.; Kiefer, L. L.; Feng, J. Y.; Anderson, K. S.; Borroto-Esoda, K.; Hill, E.; Copeland, W. C.; Chu, C. K.; Sommadossi, J. P.; Liberman, I.; Schinazi, R. F.; Painter, G. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* (**2001**), *45*, 158

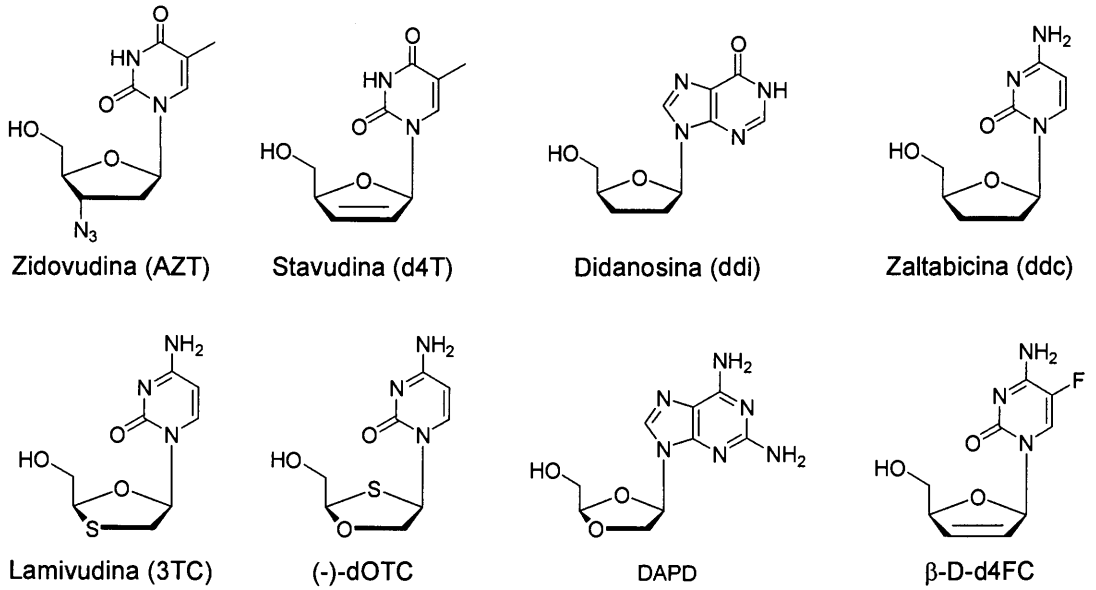


Figura 1.6: principali inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI)

Gli analoghi nucleosidici si legano nel sito attivo rendendolo inaccessibile al substrato; sono caratterizzati da un'elevata biodisponibilità ed il loro impiego è alla base di qualsiasi terapia anti-AIDS, anche in combinazione con altri antiretrovirali. L'elevata attività antivirale ha dimostrato il ruolo cruciale svolto dalla trascrittasi inversa nel ciclo replicativo ed ha portato allo sviluppo e all'impiego clinico di una nuova serie di inibitori non-nucleosidici (NNRTI). Questi composti, tra cui Efavirenz, Nevirapin, Delavirdin (Fig. 1.7), si legano all'enzima in modo non competitivo e con elevata specificità per l'HIV-1, in una posizione adiacente al sito in cui ha luogo la polimerizzazione dei nucleosidi, mentre non inibiscono la replicazione di altri retrovirus quali HIV-2 e SIV.[31] Nel complesso risultante la forma del sito attivo viene modificata ed il processo di trascrizione dell'RNA virale risulta significativamente rallentato.[32]

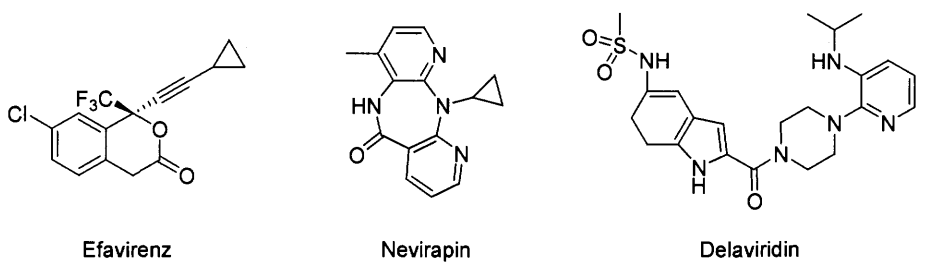


Figura 1.7: principali inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI)

Gli NNRTI si sono dimostrati particolarmente efficaci soprattutto nei trattamenti combinati, dato che, in generale, il loro impiego come agente monoterapico determina

[31] De Clercq, E. *Antiviral Res.* (**1998**), *38*, 153
[32] Tomasselli, A. G.; Heinrikson, R. L. *Biochim. Biophys Acta* (**2000**), *1477*, 189

un rapido sviluppo di resistenza,[33] anche se sono attualmente in corso studi promettenti su composti di nuova generazione (TMC125 o Etravirina).[34]

1.4.2 Inibitori della proteasi

L'idrolisi delle poliproteine da parte della proteasi virale è un passaggio necessario per la formazione di nuove particelle infette; è stato dimostrato che virioni contenenti proteasi cataliticamente inattive non possono giungere a maturazione.[35] Il ruolo cruciale svolto da questo enzima nel ciclo replicativo lo rende uno dei bersagli migliori nella terapia anti-HIV.[36] L'introduzione degli inibitori della HIV proteasi (PI), nella seconda metà degli anni Novanta, può infatti essere considerato un punto di svolta nello sviluppo di un' efficace terapia anti-AIDS.

Gli inibitori di questa classe si collocano tra i primi esempi efficienti di farmaci la cui struttura è stata progettata razionalmente in base alle caratteristiche del recettore bersaglio. Partendo dalla struttura cristallografica della HIV-PR e dalle conoscenze sugli inibitori di altre proteasi aspartiche e della renina in particolare,[37] si sono ottenuti degli inibitori peptidomimetici fortemente complementari con la struttura del sito attivo. Caratteristica peculiare di questi composti è la presenza di un isostere dipeptidico, in grado di mimare lo stato di transizione dell'idrolisi di un legame ammidico, incorporato in una sequenza peptidica troncata, che riproduce, in prossimità del legame scissile, le caratteristiche del substrato originario. L'inibitore viene così riconosciuto all'interno del sito attivo dell'enzima con un'affinità maggiore rispetto al substrato originale, ma l'attività catalitica è impedita dalla presenza dell'isostere non-idrolizzabile.[38]

---

[33] Staszewski S.; Morales-Ramirez, J.; Tashima, K T. *N. Engl. J. Med.* (**1999**), *341*, 1865

[34] Gazzard, B. G.; Pozniak, A. L.; Rosenbaum, W.; Yeni, G. P.; Staszewski, S.; Arasteh, K.; De Dier, K.; Peeters, M.; Woodfall, B.; Stebbing, J.; van 't Klooster, G. A. *AIDS* (**2003**), *17*, F49-F54.

[35] Kohl, N. E.; Emini, W. A.; Schleif, L. J. ; Davis, L. J.; Davis, J. C.; Heimbach, J. C. ; Dixon, R. A. F.; Scolnick, E. M.; Sigal, I. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**1988**), *85*, 4686

[36] a) Kramer, R. A.; Schaber, M. D.; Skalka, A. M.; Ganguly, K.; Wong-Staal, F.; Reddy, E. P. *Science* (**1986**), *231*, 1580; b) Huff, J.R. *J. Med. Chem.* (**1991**), *34*, 2305

[37] a) Vacca, J. P.; Condra, J. H. *Drug. Discov. Today* (**1997**), *2*, 261; b) Wlodawer, A.; Vondrasek, J. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (**1998**), *27*, 249; c) Gago, F. *Drugs* (**1999**), *1*, 309

[38] Eron, J. R. *Clin. Infect. Dis. 2000* (**2001**), *30 Suppl 2*, S160

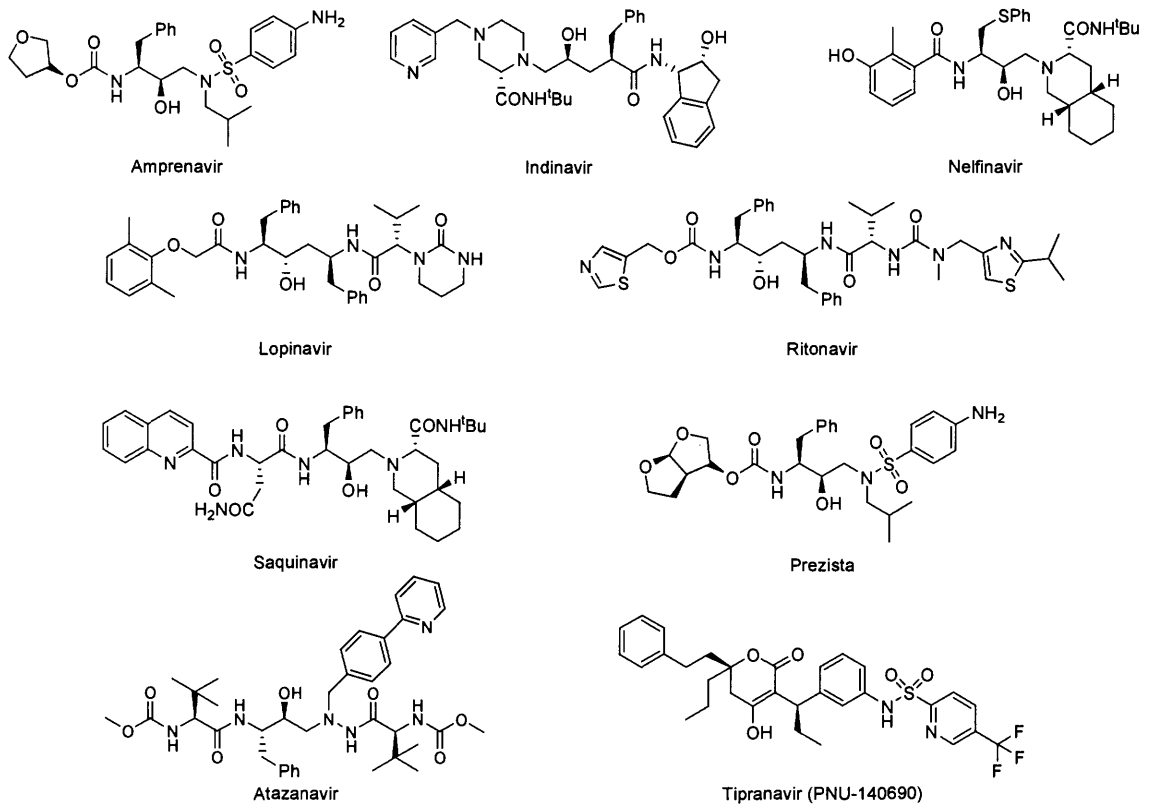


Figura 1.8: inibitori dell'HIV-proteasi (PI) approvati dall'FDA

In figura 1.8 sono riportati i principi attivi approvati dall'FDA (Food and Drug Admnistration)[39] utilizzati in terapia o attualmente in fase di studio clinico (TMC114 o Prezista). Recentemente, vista l'insorgenza di resistenza al trattamento con i comuni inibitori peptidomimetici dell'HIV-PR, sono stati introdotte strutture non peptidiche quali possibili alternative terapeutiche (PNU-140690 o Tipranavir), che si sono dimostrate, almeno negli studi clinici preliminari, più versatili.[40]

1.5 La terapia HAART

La rapidità con cui l'infezione da HIV evolve verso la malattia vera e propria varia molto da soggetto a soggetto: le statistiche riportano che circa il 5% dei sieropositivi si ammala di AIDS nel giro di tre anni, mentre il 12% sviluppa la malattia dopo vent'anni dall'infezione.[41] È stato dimostrato che esiste una correlazione diretta tra la quantità di RNA virale, il numero di cellule $CD4^+$ (linfociti T4 che presentano la proteina CD4 sulla membrana cellulare esterna) presenti nel plasma e la velocità di progressione della

[39] Izawa, K.; Onishi, T. *Chem. Rev.* (**2006**), *106*, 2811

[40] Turner, S. R.; Strohbach, J. W.; Tommasi, R. A.; Aristoff, P. A.; Johnson, P. D.; Skulnick, H. I.; Dolak, L. A.; Seest, E. P.; Tomich, P. K.; Bohanon, M. J.; Horng, M. M.; Lynn, J. C.; Chong, K. T.; Hinshaw, R. R.; Watenpaugh, K. D.; Janakiraman, M. N.; Thaisrivongs, S. *J. Med. Chem.* (**1998**), *41*, 3467

[41] a) Munoz, A.; Xu, J.; *Stat. Med.* (**1996**), *15*, 2459; b) Phair, J.; Jacobson, L.; Detels, R.; Rinaldo, C.; Saah, A.; Schrager, L. *J. Acquired Immune Def. Syndr.* (**1992**), *5*, 490; c) Sheppard, H. W.; Lang, W.; Ascher, M. S.; Vittinghoff, E.; Winkelstein, W. *AIDS* (**1993**), *7*, 1159

malattia; in particolare, un aumento nel livello di RNA virale ed un calo nel numero di cellule $CD4^+$ indicano un rapido progresso dell'AIDS.[42] Quale sia il momento migliore per iniziare la terapia antiretrovirale è da sempre materia di un controverso dibattito: il tempestivo ricorso al trattamento farmacologico se da un lato riduce il rischio di sviluppare l'AIDS conclamato e prolunga le aspettative di vita del paziente, dall'altro pone il problema della tossicità a lungo termine dei farmaci e aumenta il rischio di sviluppo di ceppi virali resistenti. Considerati i pesanti effetti collaterali dei trattamenti ed il fatto che una cura definitiva non è disponibile nell'immediato futuro, le linee guida pubblicate, negli Stati Uniti[43] e in Gran Bretagna,[44] suggeriscono di non iniziare il trattamento fino a quando la conta delle cellule $CD4^+$ nel plasma è superiore a 200/μL.
L'acronimo inglese HAART (*highly active antiretroviral therapy*), coniato al "World AIDS Conference" di Vancouver nel 1996, indica il protocollo terapeutico comunemente adottato per il trattamento dell'infezione da HIV, consistente nella somministrazione di una combinazione di inibitori della proteasi e della trascrittasi inversa;[45] tale approccio si è dimostrato capace di mantenere l'RNA virale nel plasma al di sotto del limite di rilevabilità (50 copie/μL) e di elevare la conta dei $CD4^+$ ad un valore compreso tra 200/μL e 500/μL. La prova più evidente del rafforzamento del sistema immunitario e quindi del successo della terapia è data dalla drastica diminuzione nell'insorgenza di infezioni opportunistiche e della mortalità ad esse associata, osservata nei pazienti a partire dal 1995, anno di introduzione del trattamento combinato.[46] Accanto agli indiscutibili miglioramenti apportati alla qualità della vita dei malati vanno comunque considerati anche i pesanti effetti collaterali della terapia antivirale: la tossicità degli inibitori della proteasi, l'insorgenza di resistenze e la *compliance* dei pazienti.

---

[42] a) Mellors, J. W.; Munoz, A.; Giorgi, J. V.; Margolick, J. B.; Tassoni, C. J.; Gupta, P.; Kingsley, L. A.; Todd, J. A.; Phair, J.; Detels, R.; Rinaldo, C.; Saah, A. *Ann. Intern. Med.* (**1997**), *126*, 946; b) Lyles, R.H.; Munoz, A.; Yamashita, T. E. *J. Infect. Dis.* (**2000**), *181*, 872
[43] Yeni, P. G. ; Hammer, S. M.; Carpenter, C. C. *JAMA* (**2002**), *288*, 222
[44] Brithish HIV Association (http://www.bhiva.org), *HIV Med 2001* (**2001**), *2*, 276
[45] Ho, D. D. *N. Engl. J. Med.* (**1996**), *333*, 450
[46] a) Palella, F. J.; Delaney, K. M.; Moorman, A. C.; Loveless, M. O.; Fuhrer, J.; Satten, G. A.; Aschman, D. J.; Holmberg, S. D. *N. Engl. J. Med.* (**1998**), *338*, 853; b) Jacobson, M. A.; French, M. *AIDS* (**1998**), *12 (Suppl. A),* S157; c) Powderly, W. G.; Landay, A.; Lederman, M. M. *J. Am. Med. Assoc.* (**1998**), *280*, 72

1.5.1 Effetti collaterali

Disfunzioni nel metabolismo di lipidi e carboidrati sono gli effetti più evidenti del massiccio ricorso ad inibitori della proteasi.[47] La maggior parte dei pazienti in trattamento sviluppa una sindrome detta "lipodistrofia" che si manifesta con un elevato accumulo di grasso corporeo; sono molto frequenti anche casi di aumento ingiustificato dei livelli di colesterolo e trigliceridi nel sangue, molto dannosi per il sistema cardiovascolare, così come quelli di iperglicemia, iperinsulinemia e diabete mellito. La causa di queste anomalie metaboliche non è ancora completamente nota, ma è opinione generale che sia imputabile all'interferenza degli inibitori con proteasi aspartiche cellulari o altre proteine cruciali nel metabolismo di zuccheri e lipidi.[48]

1.5.2 Resistenza ai farmaci

La maggior parte degli insuccessi nel trattamento HAART sono dovuti allo sviluppo di ceppi virali resistenti ai farmaci. La replicazione dell'HIV è molto rapida (in un individuo non soggetto a trattamento con inibitori vengono generati circa 10^9 virioni al giorno) e con frequenti errori di trascrizione durante la replicazione del DNA; ciò porta alla comparsa, in un individuo infetto, di una miriade di particelle virali geneticamente diverse. Il trattamento farmacologico costituisce un potente fattore di selezione e stimola la produzione di specie resistenti a questi composti, la cui costante replicazione amplifica il fenomeno. Spesso il paziente, già dopo poche settimane dall'inizio del trattamento, mostra un aumento dei livelli di RNA plasmatici e non risponde più alla combinazione di farmaci, che deve quindi essere modificata. Il fatto che nella maggior parte dei casi le specie mutate siano insensibili ad un'intera classe di composti (ad esempio inibitori della HIV-PR) riduce di molto le opzioni terapeutiche a disposizione ed è di ostacolo allo sviluppo di nuovi inibitori.[49]

Sebbene gli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa siano in uso da più di quindici anni, il meccanismo con cui si sviluppa resistenza nei loro confronti è stato chiarito solo di recente studiando la struttura cristallografica del complesso catalitico tra la RT ed un generico deossinucleoside trifosfato. I risultati sono stati quindi estesi agli inibitori nucleosidici ed hanno evidenziato come nell'enzima resistente i residui mutati siano

---

[47] a) Kaufmann, G. R.; Cooper, D. A. *Curr. Opin. Anti-Infect. Invest. Drugs* (**1999**), *1*, 166; b) Martinez, E.; Gatell, J. M. *Curr. Opin. Infect. Dis.* (**1999**), *12*, 13

[48] Carr, A.; Cooper, D. A. *Lancet* (**2000**), *356*, 1423

[49] Wlodawer, A. *Annu. Rev. Med.* (**2002**), *53*, 595

tipicamente localizzati in prossimità del sito attivo.[50] L'analisi delle caratteristiche steriche di queste mutazioni può inoltre spiegare perché la resistenza ad una classe di inibitori è in grado di sensibilizzare l'enzima anche verso una classe diversa, fornendo le basi per una terapia sequenziale.

Per gli inibitori non-nucleosidici l'insorgere di ceppi mutati è particolarmente rapido poiché, in questo caso, il sito di legame non è parte del sito attivo dell'enzima, mentre in genere le mutazioni coinvolgono residui affacciati nella parte interna dello stesso sito di legame.[51] Non è chiaro perciò, quale sia il modo migliore per minimizzare la resistenza, se combinare, cioè, gli NNRTI con altri inibitori oppure iniziare il trattamento con elevati dosaggi; normalmente, comunque, gli NNRTI vengono somministrati in combinazione con inibitori della proteasi.[52]

Uno studio sulle mutazioni derivanti dall'impiego di inibitori della proteasi ha evidenziato come l'impiego di farmaci differenti sia causa della mutazione di circa un terzo dei residui della HIV-PR. Sebbene la maggior parte di queste mutazioni sia localizzata nelle vicinanze del sito di riconoscimento, molte altre sono presenti lungo tutta la proteina; la comparsa delle mutazioni è generalmente sequenziale: quelle più remote sono originate da quelle primarie, in prossimità, cioè, del sito di legame.[53]

Al momento esistono due tipi di test per valutare la resistenza ai farmaci.[54] Il primo è un saggio di tipo genotipico che esamina le sequenze proteiche di trascrittasi e proteasi per individuare quali residui amminoacidici siano mutati rispetto al virus wild-type. I risultati così ottenuti sono spesso di difficile interpretazione a causa della limitata disponibilità di dati in grado di correlare gli effetti della sostituzione degli amminoacidi con la sensibilità agli inibitori disponibili. Il secondo è un test fenotipico: coltivando *in vitro* il virus presente in alcuni pazienti è possibile stabilire la concentrazione ottimale di una specifica combinazione di farmaci necessaria per l'inibizione. Questi test sono molto validi da un punto di vista biochimico: avere infatti a disposizione un quadro aggiornato delle mutazioni nelle sequenze peptidiche degli enzimi dovute all'utilizzo degli inibitori (della proteasi e della trascrittasi) costituisce il principale punto di partenza per lo sviluppo razionale di nuovi farmaci.

---

[50] Huang, H.; Chopra, R.; Verdine, G. L.; Harrison, S. C. *Science* (**1998**), *282*, 1669
[51] De Clercq, E. *Antiviral Res.* (**1998**), *38*, 153
[52] Peiperl, L. *HIV InSite knowledge base* (**2001**), http://hivinsite.ucsf.edu
[53] Schinazi, R. F.; Larder, B. A.; Mellors, J. W. *Int. Antiviral News* (**1997**), *5*, 129
[54] Wolf, E. In *HIV Medicine 2003*; Hoffmann, C.; Kamps, B. S., Ed.; Flying Publisher, 285.

1.5.3 Compliance

L'elevata velocità di replicazione del virus e la sua propensione a mutare, combinate al problema della resistenza ai farmaci, obbligano i pazienti ad assumere dosi elevate di inibitori ad intervalli di tempo ristretti e rigidamente fissati nell'arco di una giornata. Il mancato rispetto delle prescrizioni (compliance del paziente) è molto pericoloso perché può portare a recrudescenze dell'infezione e all'incremento delle varianti resistenti; per queste ragioni la scelta di iniziare la terapia risulta critica anche per il malato: una volta cominciata, questa non solo non può più essere interrotta, ma i tempi e le dosi di somministrazione devono essere definite e ben osservate, provocando notevoli disagi al paziente, che motivano la ricerca di sistemi di calibrazione dei dosaggi rapidi, efficaci ed economici.[55]

La terapia HAART è in grado di ridurre i livelli di RNA virale sotto i limiti di rilevabilità, ma la possibilità di una cura definitiva è preclusa dal fatto che il virus è in grado di nascondersi e proliferare, creando delle riserve cellulari di infezione latenti.[56] La principale riserva è costituita da linfociti T4 contenenti una copia integrata di DNA virale: queste cellule non possono essere eliminate dal sistema immunitario perché non presentano antigeni virali sulla loro superficie esterna e le attuali terapie non sono in grado di attaccare e distruggere il materiale genetico in esse contenuto. Particelle virali sono state isolate anche da cellule dei linfonodi, nel sistema nervoso centrale e nei macrofagi; questi ultimi, in particolare, non vengono uccisi dal virus e sono in grado di produrre continuamente nuovi virioni.[57]

Nei paesi occidentali il trattamento farmacologico ha indubbiamente avuto successo, riducendo drasticamente il numero di casi di AIDS conclamato e la mortalità ad esso associata; la natura pandemica della malattia e le limitazioni dei regimi terapeutici rendono tuttavia necessario lo sviluppo di nuove e più efficaci terapie. La messa a punto di nuovi inibitori dai quali attingere per lo sviluppo di nuovi farmaci è un passo obbligato in questa direzione.

---

[55] a) Akeb, F.; Ferrua B.; Creminon, C.; Roptin, C.; Grassi, J.; Nevers, M. C.; Guedj, R.; Garraffo, R.; Duval, D., *J. Immun. Methods* (**2002**), *263*, 1; b) Azoulaya, S.; Neversb, M.C.; Créminonb, C.; Heripretc, L.; Garraffod, R.; Durantc, J.; Dellamonicac, P.; Grassib, J.; Guedja, R.; Duvala, D., *J. Immun. Methods* (**2004**), *295*, 37

[56] Blankson, J.; Persuad, D.; Siciliano, R. F. *Curr. Opin. Infect. Dis.* (**1999**), *1*, 25

[57] Saag, M. S.; Kilby, J. M. *Nat. Med* (**1999**), *5*, 609

2 La proteasi aspartica del virus HIV-1

2.1 Le proteasi ed il loro ruolo biologico

Gli enzimi proteolitici possono essere classificati in quattro classi principali: proteasi aspartiche, cisteiniche, seriniche e metallo proteasi.[1] Catalizzando l'idrolisi dei legami peptidici con elevata efficienza e selettività, le proteasi regolano numerosi processi fisiologici (digestione, crescita, differenziazione dei tessuti, migrazione cellulare, meccanismi di difesa immunitaria e apoptosi) e rivestono un ruolo essenziale in numerose patologie (ipertensione,[2] cancro, malaria, morbo di Alzheimer,[3] epatite, infezioni da *Candida*[4] ed AIDS), rappresentando quindi un importante obiettivo farmacologico.[5]

Le proteasi possono essere suddivise, in base al meccanismo con cui si esplica l'attività catalitica, in due grandi gruppi. Il primo comprende gli enzimi che effettuano una catalisi di tipo nucleofilo utilizzando l'ossidrile in posizione β di un residuo di serina (proteasi seriniche) oppure il gruppo tiolico della cisteina (proteasi cisteiniche); il meccanismo prevede l'attacco del nucleofilo al gruppo carbonilico del legame ammidico formando un estere, oppure un tioestere, che viene successivamente idrolizzato da una molecola d'acqua. Gli enzimi della seconda classe utilizzano, invece, una molecola d'acqua attivata per attaccare il carbonile ammidico del legame scissile; la molecola d'acqua può essere attivata da un catione metallico (metalloproteasi) o dal gruppo carbossilico in posizione β di due residui di acido aspartico presenti nel sito attivo (proteasi aspartiche).

2.2 Le proteasi aspartiche

Gli enzimi di questo tipo si ritrovano nei vertebrati, nei funghi, nelle piante; una nuova forma di proteasi aspartiche è stata isolata nei retrovirus.

Come in tutte le altre famiglie, i singoli enzimi presiedono a diverse funzioni. I più noti enzimi gastrici (pepsina, gastrina e chimosina) regolano i processi digestivi; la catepsina D, un enzima lisosomiale, presiede alla degradazione di proteine intracellulari; la renina idrolizza in modo specifico una singola proteina, producendo un decapeptide precursore

---

[1] Barret, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. Ed *Handbook of proteolytic enzymes*, Acad. Press (**1998**).
[2] Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D.P. *J. Med. Chem.* (**2000**), *43*, 305
[3] a) Rochefort, H.; Liaudet-Coopman, E. *APMIS* (**1999**), *107*, 86; b) Papassotiropoulos, A.; Bagli, M.; Feder, O.; Jessen, F.; Maier, W.; Rao, M. L.; Ludwig, M.; Schwab, S. G.; Heun, R. *Neurosci. Lett.* (**1999**), *262*, 171
[4] Sanglard, D.; Hube, B.; Monod, M.; Odds, F. O.; Gow, N. A. *Infect. Immun.* (**1997**), *65*, 3539
[5] Seife, C. *Science* (**1997**), *277*, 1602

della angiostatina II, un octapeptide che è il maggiore fattore di controllo della pressione arteriosa. Nel regno dei funghi, le proteasi aspartiche controllano principalmente la sporulazione. Nei retrovirus, infine, la maggior parte delle proteine virali viene sintetizzata in forma di poliproteine idrolizzate dalle proteasi retrovirali durante l'attivazione del virus.

La maggior parte delle proteasi aspartiche fungine e tutte quelle dei vertebrati vengono sintetizzate come zimogeni inattivi e contengono un ulteriore segmento N-terminale di circa 45 amminoacidi, che viene idrolizzato durante l'attivazione.[6]

Negli eucarioti, generalmente, le proteasi aspartiche cellulari, renina e repsina ad esempio, sono dei monomeri del peso di circa 35 kDa, contenenti due domini topologicamente simili e costituite approssimativamente da 300 amminoacidi; studiando le sequenze peptidiche si è riscontrata un'omologia di circa il 5% tra tutti i membri della famiglia.

Le proteasi retrovirali sono considerevolmente più piccole, generalmente non contengono più di 120-130 amminoacidi e sono attive come omodimeri simmetrici contenenti un unico sito attivo formato da residui dei due monomeri; questo tipo di architettura molecolare è unico tra gli enzimi, non essendo infatti noti altri esempi di siti attivi costruiti nello stesso modo.[7]

Tutte le proteasi aspartiche presentano due triadi conservate Asp-Thr/Ser-Gly che, attraverso una serie di legami idrogeno ("fireman's grip"), strutturano il sito attivo e partecipano all'attività catalitica.[8]

Tutti gli enzimi appartenenti a questa classe finora descritti sono delle endoproteasi: idrolizzano, in modo specifico, cioè, i legami ammidici situati all'interno di una determinata sequenza peptidica (in genere tra residui idrofobici). Nel sito attivo, generalmente, vengono ospitati da 6 a 10 amminoacidi del substrato polipeptidico; alcune proteasi aspartiche possiedono uno o più "flap" (costituiti da un β loop) che una volta ripiegati sul substrato interagiscono con esso garantendo un'elevata selettività tanto nel riconoscimento quanto nel processo di idrolisi.[9]

---

[6] Davies, R. D. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* (**1990**), *19*, 189
[7] Wlodawer, A.; Gustchina, A. *Biochim. Biophys. Acta* (**2000**), *1477,* 16
[8] Cairns, J.; Overbaugh, J. *Nature* (**1988**), *142*, 335
[9] James, M. N. G.; Sielecki, A. R. *Biological Macromolecules and assemblies: Active Sites of Enzymes* JohnWiley & Sons: New York, (**1987**), *vol 3*, 413

Le catene laterali del substrato polipeptidico vengono ospitate all'interno di subsiti del sito catalitico, descritti utilizzando la nomenclatura di Schechter e Berger:[10] i residui amminoacidici all'estremità N-terminale del legame scissile vengono indicati con $P_1 \ldots P_n$ (cui corrispondono i subsiti $S_1 \ldots S_n$); mentre quelli all'estremità C-terminale con $P_1' \ldots P_n'$ corrispondenti ai subsiti $S_1' \ldots S_n'$ (fig 2.1).

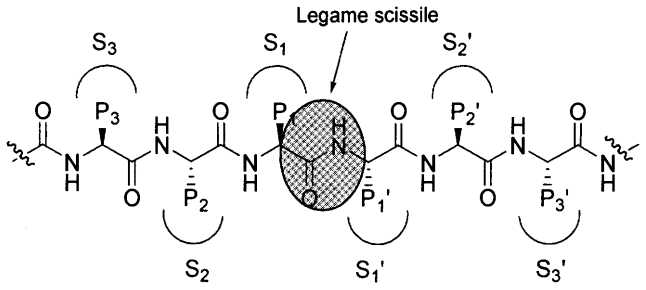


Figura 2.1: rappresentazione schematica dei subsiti del sito attivo

2.3 La Proteasi da HIV (HIV-PR)

La HIV-PR è un enzima essenziale nel ciclo replicativo del virus: idrolizzando le poliproteine PR55*gag* e PR160*gag/pol*, espresse dai geni *gag* e *pol* permette la maturazione delle particelle virali. Essendo un comune bersaglio della terapia anti-AIDS, questo enzima è uno dei più studiati e conosciuti in termini di struttura e funzione: presso il *Brookehaven Protein Data Bank* (http://www.rcsb.org/pdb/) sono attualmente depositate più di 270 strutture relative all'HIV-proteasi, sue forme mutanti e complessi con vari inibitori.

Studi di omologia hanno rivelato la presenza della triade conservata Asp-Thr-Gly[11] e numerose indagini hanno fornito prove sostanziali della sua appartenenza alla famiglia delle proteasi aspartiche.

La mutazione del residuo di aspartato in posizione 25 (Asp_{25}) con vari residui, tra cui Asn,[12] Thr[13] e Ala,[14] ha fornito proteine prive di attività catalitica; l'HIV-PR viene inibita *in vitro* dalla pepstatina, inibitore di origine naturale selettivo per le proteasi

[10] Schechter, I.; Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (**1967**), *27,* 157
[11] Stahl, F.W. *Nature* (**1988**), *142*, 112
[12] Darke, P.L. ; Leu, C. T. ; Davis, L. J. ; Heimbach, J. C. ; Diehl, R. E. ; Hill, W. S. ; Dixon, R. A. ; Sigal, I. S. *J. Biol. Chem.* (**1989**), *264*, 2307
[13] Seelmeir, S.; Schmidt, H.; Turk, V.; Von der Helm, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**1988**), *85*, 6612
[14] Mous, J. ; Heimer, E. P. ; Le Grice, S. J. J. *J. Virol.* (**1988**), *62*, 1433

aspartiche[15] e la sua struttura cristallografica mostra un sito attivo riconducibile a quello degli altri enzimi di questa classe.[16]

2.3.1 Struttura tridimensionale

La proteasi del virus HIV-1 nella sua forma attiva è un omodimero a simmetria C_2, in cui ciascun monomero è costituito da 99 amminoacidi e contribuisce alla formazione dell'unico sito attivo; la stabilità del dimero dipende in massima parte da una rete di legami idrogeno intermolecolari tra le strutture β dei segmenti N- e C-terminali dei due monomeri.[17]

Il sito attivo è costituito dai residui 8, 23, 25, 27-30, 32, 47-50, 53, 80-82 e 84 di ciascun monomero (fig. 2.2); le triadi catalitiche Asp_{25}-Thr_{26}-Gly_{27} e $Asp_{25'}$-$Thr_{26'}$-$Gly_{27'}$ sono situate sul fondo della cavità, all'interno di un loop stabilizzato da una rete di legami idrogeno. I loop di ciascun monomero, inoltre, sono interconnessi da quattro legami idrogeno nella cosiddetta configurazione "*fireman's grip*".[18]

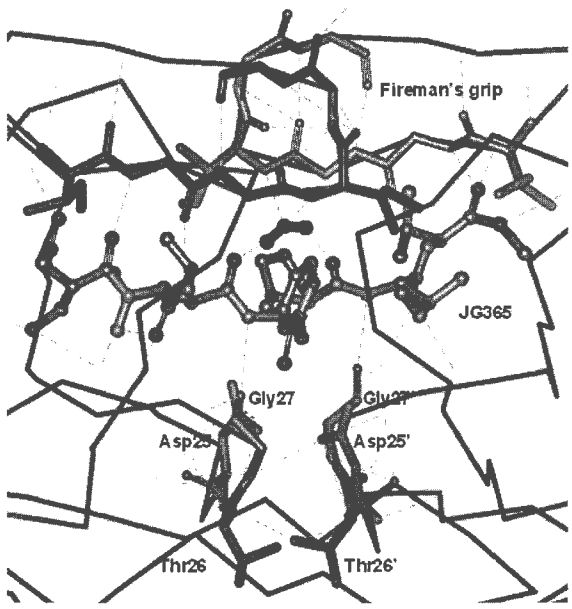


Figura 2.2: struttura cristallografica del sito attivo del complesso tra l'HIV-PR e l'inibitore JG-365 ("ball&stick"). In verde è evidenziata la rete di legami idrogeno che stabilizza il complesso nella configurazione detta "fireman's grip" (PDB file: 7HVP)

I residui catalitici Asp_{25} e $Asp_{25'}$ hanno un'orientazione quasi coplanare e la vicinanza (2.8-3 Å) tra i due atomi di ossigeno di ciascun carbossile indica la presenza di un idrogeno acido condiviso tra i due residui di aspartato. I gruppi carbossilici sono inoltre

[15] Hansen, J.; Billich, S.; Schulze, T.; Sukrow, S.; Moelling, K. *EMBO J.* (**1988**), *7*, 1785
[16] Wlodawer, A.; Miller, M.; Jaskolski, M.; Sathyanarayana, B. K.; Baldwin, E.; Weber, I. T.; Selk, L. K.; Clawson, L.; Schneider, J.; Kent, S. B. H. *Science* (**1989**), *245*, 616
[17] Weber, I.T. *J. Biol. Chem.* (**1990**), *256*, 10492
[18] Pearl, L.; Blundell, T. L. *FEBS Lett.* (**1984**), *174*, 96

connessi mediante una molecola d'acqua disposta a ponte tra i due, alla distanza di un legame idrogeno.[7]

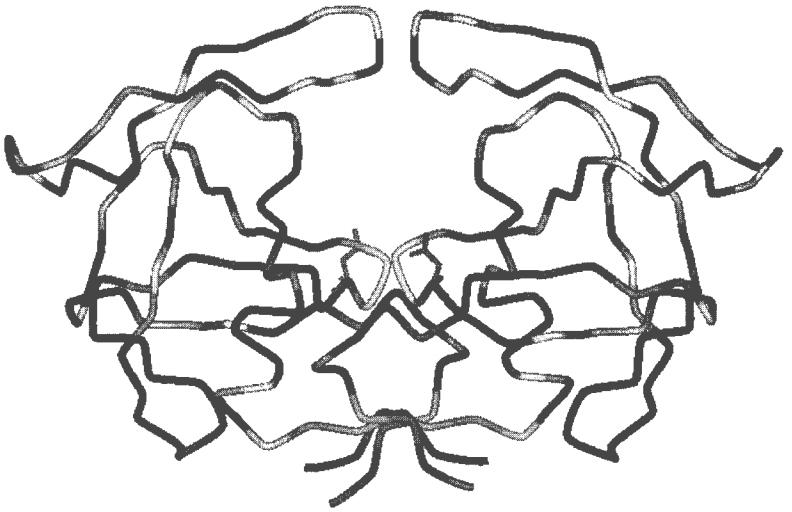


Figura 2.3: struttura cristallografica dell'apoenzima dell'HIV-PR (PDB file 1HSI), in cui i flap hanno una conformazione aperta (in verde sono evidenziati gli Asp25 e Asp25')

Il segmento Ile_{47}-Gly-Gly-Ile-Gly-Gly_{52} ed il corrispondente 47'-52' formano i cosiddetti "flap", strutture flessibili che coprono il sito attivo e svolgono un ruolo importante nel riconoscimento e nel legame di substrati e inibitori.[19] La HIV proteasi, in presenza di un ligando nel sito attivo, subisce un cambiamento conformazionale: i due monomeri ruotano intorno all'asse del dimero di circa due gradi, determinando un leggero restringimento della cavità ed un avvicinamento dei flap di circa 7Å. Nell'apoenzima i "flap" hanno una conformazione aperta (fig 2.3), ma in presenza di un ligando si chiudono sopra di esso determinando le interazioni responsabili della selettività nella catalisi.

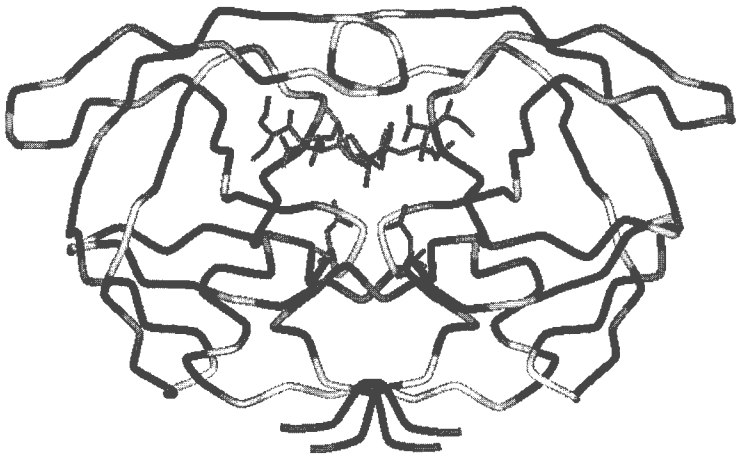


Figura 2.4: struttura cristallografica del complesso HIV-PR-inibitore JG-365 (PDB file: 7HVP), in cui i flap sono chiusi sopra il ligando (in verde sono evidenziati gli Asp25 e Asp25')

[19] Gustchina, A.; Weber, I. T. *FEBS Lett.*, (**1990**), *269*, 269

La maggior parte delle strutture cristallografiche di complessi dell'HIV-proteasi con inibitori rivela la presenza di una seconda molecola d'acqua (detta anche "flap water"), non riscontrabile nelle proteasi aspartiche eucariote, coordinata tetraedricamente tra i gruppi carbonilici in P_1 e P_1' ed i gruppi ammidici dei residui Ile_{50} e $Ile_{50'}$ dei "flap" (fig 2.5) e completamente inaccessibile al solvente.[20]

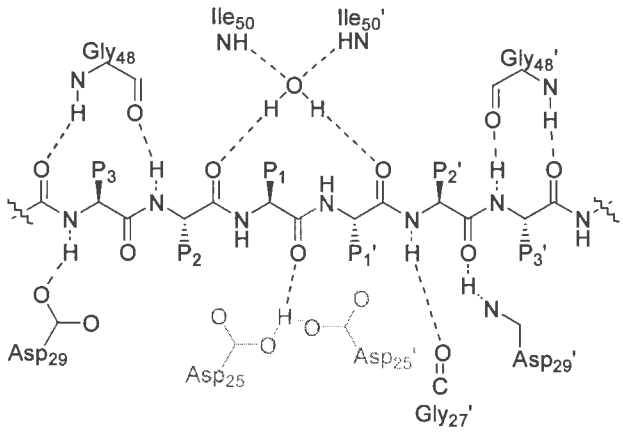


Figura 2.5: rappresentazione schematica dei legami idrogeno tra la proliproteina ed il sito attivo

2.3.2 Subsiti del sito catalitico

Le catene laterali del substrato poliproteico, o degli inibitori, vengono ospitate in subsiti del sito attivo, descritti secondo la nomenclatura di Schechter e Berger (cfr. Par. 2.2). La simmetria dell'HIV proteasi fa sì che i subsiti $S_1..S_n$ e $S_{1'}..S_{n'}$ siano identici. I subsiti S_1 e $S_{1'}$ interagiscono con i residui in posizione P_1 e $P_{1'}$ e sono costituiti principalmente da amminoacidi idrofobici (ad esempio Arg_8, Leu_{23}, Gly_{27}, Gly_{48}, Gly_{49}, Ile_{50}, Pro_{81} e Val_{82}) ad eccezione dei residui catalitici di aspartato. I subsiti S_2 e $S_{2'}$ sono delle tasche interne ed hanno dimensioni ridotte rispetto a $S_1/S_{1'}$ e $S_3/S_{3'}$; sono inoltre più specifici e questo limita la scelta dei residui in $P_2/P_{2'}$ tanto nei substrati quanto negli inibitori. Sebbene questi subsiti siano parzialmente idrofobici (ad esempio Ala_{28}, Asp_{29}, Asp_{30}, Val_{32}, Ile_{47}, Gly_{49}, Ile_{50} e Ile_{84}) possono essere occupati anche da catene laterali idrofile. I subsiti S_3 ed $S_{3'}$ (costituiti da Arg_8, Leu_{23}, Asp_{29}, Gly_{48}, Gly_{49}, Pro_{81} e Val_{82}) sono invece in grado di ospitare residui di natura e dimensioni diverse; ciò dipende dalla capacità di instaurare interazioni polari, alifatiche e ioniche con ligandi diversi. Questi subsiti sono inoltre piuttosto grandi e largamente esposti al solvente.[21]

[20] Tomasselli, A. G.; Thaisrivongs, S.; Heinrikson, R. *Adv. Drug Des.* **(1996)**, *2*, 173
[21] Wlodawer, A.; Herickson, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **(1993)**, *62*, 543

I subsiti $S_4/S_{4'}$ e $S_5/S_{5'}$ non sono stati finora descritti nel dettaglio perché non è disponibile un gran numero di strutture della proteasi complessata con ligandi aventi residui anche in $P_4/P_{4'}$ e $P_5/P_{5'}$.[22]

2.3.3 Meccanismo di idrolisi

L'attività catalitica delle proteasi aspartiche è stata ampiamente studiata e numerose ipotesi sono state avanzate circa il meccanismo d'azione.[23] Nella maggioranza dei casi, i risultati ottenuti sono consistenti con una catalisi acido-base di tipo generale da parte dei due residui di acido aspartico presenti nel sito attivo ed escludono, per questa classe di enzimi, tanto l'attivazione della molecola d'acqua con acidi di Lewis (come Zn^{2+} nel caso delle metalloproteasi) quanto la formazione di intermedi covalenti (come nel caso di proteasi seriniche e cisteiniche).[24]

Tra i vari meccanismi proposti, quello comunemente accettato è stato descritto da Suguna sulla base della struttura cristallografica del complesso tra la proteasi aspartica del *Rhizopys chinensis* ed un inibitore peptidico.[25] La dipendenza della velocità di idrolisi dal pH indica che, a pH fisiologico, solo uno dei due residui catalitici di acido aspartico è deprotonato;[26] secondo il meccanismo proposto, tale residuo di aspartato attiva l'attacco nucleofilo di una molecola d'acqua, localizzata tra i due gruppi carbossilici, al carbonile del legame ammidico scissile, generando un intermedio tetraedrico carico negativamente. La protonazione dell'azoto ammidico da parte del secondo acido origina un intermedio zwitterionico che si decompone nello stadio lento dell'idrolisi (fig. 2.6).[27]

---

[22] Tozser, J.; Gustchina, A.; Weber, I. T.; Blaha., I.; Wondrak, E. M.; Oroszlan, S. *FEBS Lett.* (**1991**), *279*, 356

[23] a) Hofmann, T.; Dunn, B. M.; Fink, A. L. *Biochemistry* (**1984**), *23*, 6956; b) Fruton, J. S. *Adv. Enzymol.* (**1976**), *44*, 1

[24] a) Antonov, V. K.; Ginodman, L. M.; Rumsh, L. D.; Kapitanikov, Y. V.; Barsheskaya, T. N.; Yavashev, L. P.; Gurova, A. G.; Volkova, L. I. *Eur. J. Biochem.* (**1981**), *117*, 195; b) Schmidt, P. G.; Holladay, M. W.; Salituro, F. G.; Rich, D. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (**1985**), *129*, 597

[25] Suguna, K.; Padlan, E. A.; Smith, C. W.; Carlson, W. D.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**1987**), *84*, 6612

[26] Hofmann, T.; Hodges, R. S.; James, M. N. G. *Biochemistry* (**1984**), *23*, 635

[27] Hyland, L.J.; Tomaszek, T. A.; Meek, T. D. *Biochemistry* (**1991**), *30*, 8454

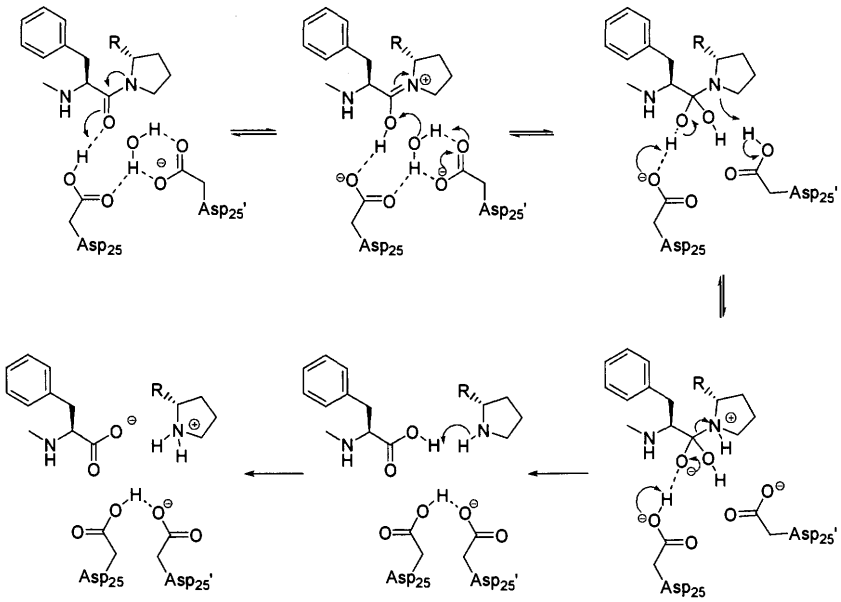


Figura 2.6: meccanismo di idrolisi dell'HIV-PR

La struttura del sito attivo dell'HIV-proteasi e la presenza dei due "flap" inducono il substrato ad assumere un conformazione che ne facilita l'idrolisi. In particolare la formazione di una fitta rete di legami idrogeno e la coordinazione tetraedrica della molecola d'acqua tra i carbonili in P_1 e $P_{1'}$ ed i gruppi amminici dei residui Ile_{50} e $Ile_{50'}$ (fig 2.5) distorce il ligando dalla conformazione planare attivando il legame scissile all'idrolisi. La parziale perdita di risonanza ammidica dovuta alla distorsione dalla planarità rende il carbonile più elettrofilo nei confronti della molecola d'acqua.[28]

2.3.4 Specificità dell'enzima

L'idrolisi del legame ammidico ed il meccanismo con cui si esplica la catalisi da parte dei residui di acido aspartico e della molecola d'acqua rappresentano l'evento conclusivo di un più vasto processo chimico che prevede il riconoscimento ed il legame di una sequenza peptidica.[29] La determinazione delle sequenze riconosciute all'interno del sito attivo è fondamentale per un approccio razionale alla progettazione di inibitori efficienti. Quando vennero individuati i nove siti di idrolisi delle poliproteine *gag* e *gag/pol* (fig 2.7),[30] fu subito chiaro che la proteasi da HIV è molto versatile in termini di riconoscimento del substrato, sebbene si possa individuare un'alternanza di residui idrofobici ed idrofilici negli amminoacidi adiacenti il legame scissile. A differenza della

[28] a) Pearl, L. *FEBS Lett.* (**1987**), *214*, 8; b) Miller, M., Schneider, J.; Sathyanarayana, B. K.; Toth, M. V.; Marshal, G. R.; Clawsen, L.; Selk, L.; Kent, S. B. H.; Wlodawer, A. *Science* (**1989**), *246*, 1149; c) Chatfield, D. C.; Brooks, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* (**1995**), *117*, 5561

[29] Darke, P. L.; Nutt, R. F. ; Brady, S. F. ; Garsky, V. M. ; Ciccarone, T. M. ; Leu, C-T. ; Lumma, P. K. ; Freidinger, R. M. ; Veber, D. F. ; Sigal, I. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (**1988**), *156*, 297

[30] Pearl, L.; Taylor, W. *Nature* (**1987**), *328*, 482

maggior parte degli enzimi proteolitici, che mostrano una spiccata preferenza per un particolare amminoacido in posizione P_1 e/o $P_{1'}$, l'HIV proteasi è in grado di idrolizzare diversi tipi di legami ammidici, compresi quelli aventi la prolina in $P_{1'}$ (Fig 2.6).[31]

A: Arg-Lys-Ile-LeuPhe-Leu-Asp-Gly
B: Ala-Glu-Thr-PheTyr-Val-Asp-Gly
C: Ala-Arg-Val-LeuAla-Glu-Ala-Met
D: Ala-Thr-Ile-MetMet-Gln-Arg-Gly
E: Arg-Gln-Ala-AsnPhe-Leu-Gly-Lys
F: Pro-Gly-Asn-PheLeu-Gln-Ser-Arg
G: Ser-Phe-Asn-PhePro-Ile-Ser-Pro
H: Thr-Leu-Asn-PhePro-Ile-Ser-Pro
I : Ser-Gly-Asn-TyrPro-Ile-Val-Gln

Figura 2.7: Siti di idrolisi delle poliproteine *gag* e *gag/pol*

I siti di idrolisi possono essere raggruppati in due categorie. Un gruppo corrisponde all'idrolisi tra due residui idrofobici, peraltro alquanto diversi tra di loro in ciascun caso (sequenze A-F). Il secondo (sequenze G-I) comprende legami tra un residuo aromatico (Tyr o Phe) e un residuo di prolina (Pro). Questa specificità fa rientrare la HIV-PR all'interno di una classe di enzimi noti come "Prolilpeptidasi",[32] enzimi diversi per struttura, meccanismo d'idrolisi, funzione biologica, ma tutti accomunati dall'attività idrolitica su sequenze peptidiche contenenti la prolina. (Fig. 2.8).

Enzima	**Substrato**
Prolil oligopeptidasi (EC 3.4.21.26)	Angiotensina, Bradichinina, Neurotensina, Vasopressina
Dipeptidil dipeptidasi IV (EC 3.4.14.5)	Glucagone
Dipeptidil dipeptidasi II (EC 3.4.14.2)	Met-callostatina
Aminopeptidsi P (EC 3.4.11.9)	Eritropoietina, Prolactina, Ormone della crescita, Interleucina 2
Prolidasi (EC 3.4.13.19)	Metaboliti del collagene
Prolil carbossipeptidasi (EC 3.4.16.2)	Angiotensina 2, angiotensina C
HIV-PR (EC 3.4.23-1)	Poliproteine virali *gag* e *gag/pol*

Figura 2.8: esempi di Prolilpeptidasi

L'idrolisi di legami ammidici aventi la prolina come residuo N-terminale è piuttosto rara e costituisce una peculiarità delle proteasi retrovirali;[33] nei mammiferi, in

[31] a) DeboucK, C.; Gorniak, J. C.; Strickler, J. E.; Meek, T. D.; Metcalf, B. W.; Rosenberg, M. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (**1987**), *84*, 8903; b) Graves, M. C.; Lim, J. J.; Heimer, E. P.; Kramer, R. A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (**1988**), *85*, 2449

[32] a) Cunningham, D. F.; O'Connor, B. *Biochim. Biophys. Acta* (**1997**), *1343*, 160; b) Vanhoof, G.; Goossens, F.; De Meester I.; Hendriks, D.; Scharpé, S. *FASEB J.* (**1995**), *9*, 736

[33] Griffiths, J. T.; Phylip, L. H. ; Konvalinka, J. ; Strop, P. ; Gustchina, A. ; Wlodawer, A. ; Davenport, R. J.; Briggs, R. ; Dunn, B. M. ; Kay, J. *Biochemistry* (**1992**), *31*, 5193

particolare, non sono note endo-proteasi cellulari aventi la medesima specificità (Figura 2.8).[34]

2.4 Strategie di inibizione

Il sito attivo delle proteasi aspartiche non contiene gruppi sufficientemente nucleofili da poter essere chimicamente modificati da inibitori irreversibili; i residui catalitici di acido aspartico possono essere alchilati solamente da forti elettrofili, come gli epossidi, che però, in genere, sono potenzialmente citotossici.[35]

La gran parte degli inibitori finora messi a punto si lega all'enzima mediante delle interazioni di tipo non-covalente (legami idrogeno, interazioni ioniche o di Van der Waal) e sono quindi di tipo reversibile. I risultati migliori, in termini di inibizione, si ottengono quando l'enzima ha un'affinità maggiore per l'inibitore rispetto al substrato naturale. In accordo con il principio di Pauling, per il quale in una reazione enzimatica lo stato di transizione è legato al sito attivo con maggiore affinità rispetto a substrato e prodotti,[36] l'incorporazione di un analogo dello stato di transizione all'interno di una struttura pseudopeptidica si è rivelata uno degli approcci migliori per la progettazione di inibitori efficienti. Si definisce "isostere dello stato di transizione" una struttura stabile, in grado di mimare le caratteristiche stereo-elettroniche dello stato di transizione dell'idrolisi di un legame ammidico, ma che non può essere idrolizzata dalla proteasi. Studi condotti sulla pepstatina, inibitore naturale contenente la statina (fig 2.7) rivelano che l'elevata attività dipende anche dal fatto che l'inibitore nel sito attivo impedisce la formazione di legami idrogeno tra i residui di aspartato e la molecola d'acqua.[37] Alcuni isosteri frequentemente utilizzati nella sintesi di inibitori delle proteasi aspartiche sono riportati in figura 2.9.[38]

---

[34] a) Kräusslich, H-G.; Ingraham, R. H.; Skoog, M. T.; Wimmer, E.; Pallai, P.V.; Carter, C. A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (**1989**), *86*, 807 ; b) Graves, M. C.; Meidel, M. C.; Pan, Y-C. E.; Manneber, M. ; Lahm, H-W.; Grüninger-Leicht, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (**1990**),*168*, 30

[35] a) Meek, T. D. ; Dayton, B. D. ; Metcalf, B. W. ; Dreyer, G. B. ; Strickler, J. E. ; Gorniak, J. G. ; Rosenberg, M. ; Moore, M. L. ; Magaard, V. W. ; Debouck, C. P*roc. Natl. Acad. Sci. USA* (**1989**), *86*, 1841; b) Said, B.; Matsumoto, D. C.; Hamade, A. K.; Shank, R. C. *Biochem, Biophys, Res. Commun.* (**1999**), *261*, 844

[36] Pauling, L. *Chem. Eng. News.* (**1946**), *24*, 1375

[37] Rich, D. H. *J. Med. Chem.* (**1985**), *28*, 263

[38] a) Wlodawer, A.; Erickson, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* (**1993**), *62*, 543; b) Martin, J. A.; Redshaw, S.; Thomas, G. J. *Progress in Medicinal Chemistry* (**1995**), *32*, 239; c) Chen, C. A.; Sieburth, S. M.; Glekas, A.; Hewitt, G. W.; Trainor, G. L.; Vitanen, S. E.; Garber, S. S.; Cordova, B.; Jeffry, S.; Klabe, R. M. *Chem. Biol.* (**2001**), *8*, 1161; d) Ahn, J. M.; Boyle, N. A.; MacDonald, M. T.; Janda, K. D. *Mini Rev. Med. Chem.* (**2002**), *2*, 463

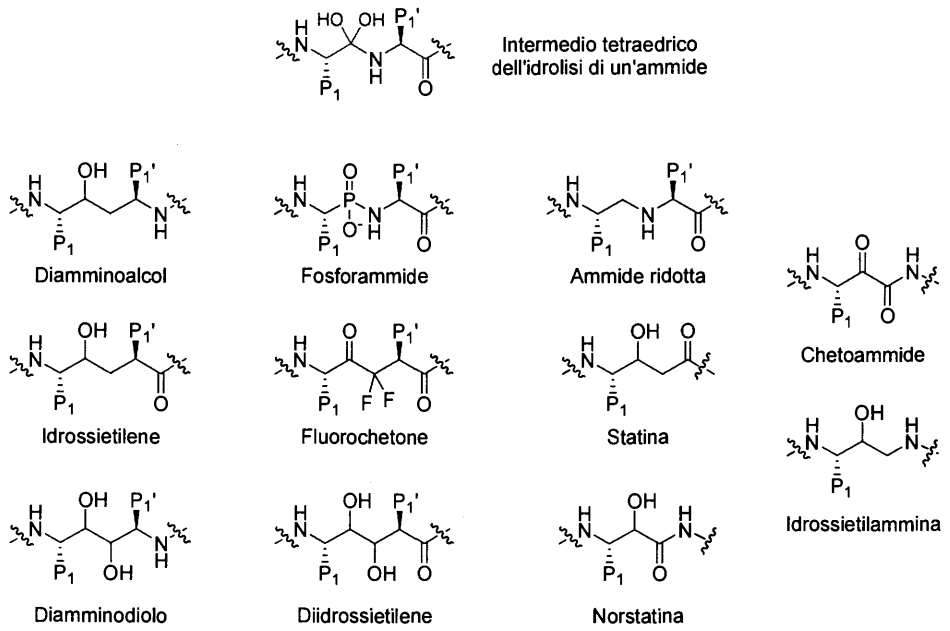


Figura 2.9: principali tipi di isosteri dipeptidici

2.4.1 Inibitori dell'HIV-proteasi

La messa a punto dei primi inibitori dell'HIV proteasi ha avuto origine dalle ricerche condotte sull'inibizione della renina, per una possibile cura per l'ipertensione (cfr. Par. 2.2), utilizzando inibitori peptidomimetici contenenti un isostere non idrolizzabile (Fig 2.9).[39]

L'introduzione di un ossidrile in corrispondenza del legame scissile, all'interno di una struttura che riproduce il substrato originario, si è rivelata finora l'approccio più efficiente nello sviluppo di inibitori della HIV proteasi. Il gruppo ossidrilico, infatti, rimpiazza la molecola d'acqua posizionata tra gli aspartati catalitici, creando con questi delle interazioni simili a quelle dello stato di transizione. Quasi tutti gli inibitori approvati dall'FDA contengono isosteri di questo tipo (Fig. 1.8). Per ottenere un'inibizione specifica, comunque, vanno prese in considerazione le caratteristiche strutturali dell'intera proteina.

I substrati polipeptidici naturali rappresentano un'ampia varietà di sequenze (Fig. 2.6) ed un'idrolisi efficiente si ottiene con catene peptidiche contenenti almeno sette residui.[40] L'elevata eterogeneità dei siti di idrolisi implica che l'HIV-PR è in grado di interagire con il ligando in modi diversi, a seconda delle caratteristiche strutturali, ma anche che esistono diverse combinazioni di possibili interazioni. Il fatto che non tutti i

[39] Tomasselli, A. G.; Heinrikson, R. L. *Biochim. Biophys. Acta* (**2000**), *1477*, 189

[40] Moore, M. L.; Bryan, W. M.; Fakhoury, S. A.; Magaard, V. W.; Huffman, W. F.; Dayton, B. D.; Meek, T. D.; Hyland, L.; Dreyer, G. B.; Metcalf, B. W., Strickler, J. E.; Gorniak, J. G.; Debouck, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (**1989**), *159*, 420

siti vengano idrolizzati con uguale efficienza indica che alcune sequenze non hanno un'affinità ottimale con il sito attivo e che esiste, quindi, un meccanismo di regolazione che stabilisce l'ordine di priorità nell'idrolisi.[41]

Tutte le sequenze riconosciute nel sito attivo presentano due residui idrofobici in corrispondenza del legame scissile; questa preferenza è comune a tutti i tipi di proteasi aspartiche e guida la scelta dei residui in posizione P_1 e $P_{1'}$ nella maggior parte degli inibitori peptidomimetici.[42] L'analisi delle strutture cristallografiche dell'HIV-PR rivela che gli inibitori all'interno del sito attivo assumono una conformazione estesa di tipo β; le catene laterali dell'inibitore vanno ad occupare i subsiti enzimatici generando delle interazioni non-covalenti (legami idrogeno e interazioni idrofobiche) che costituiscono il principale contributo all'energia di complessazione.[21] Sono le dimensioni dei subsiti e la natura dei residui presenti ad indirizzare la scelta delle possibili catene laterali (peptidiche o meno) degli inibitori.

I primi inibitori messi a punto avevano uno spiccato carattere peptidico mostrando notevole specificità per la proteasi ed elevata efficienza nei test su colture cellulari. L'uso dei peptidi come farmaci, però, è normalmente compromesso dalle loro proprietà intrinseche: elevata instabilità metabolica nei confronti degli enzimi proteolitici, bassa biodisponibilità e ridotti profili farmacologici. Per ridurre queste limitazioni le strutture peptidiche vengono modificate introducendo gruppi che ne conservano le proprietà biologiche, ma aumentano la stabilità migliorandone anche le proprietà farmacocinetiche; strutture così modificate prendono il nome di "peptidomimetici".

Per essere efficaci gli inibitori della proteasi da HIV devono, quindi, possedere un ridotto carattere peptidico, essere stabili alla degradazione da parte di enzimi proteolitici non selettivi, avere una buona permeabilità di membrana, elevati tempi di vita plasmatici e cellulari ed, infine, una buona biodisponibilità orale. I risultati migliori si ottengono con molecole di ridotto peso molecolare ($\leq$ 1000 Da) e contenenti dei gruppi che ne aumentano la solubilità.[43]

2.5 Drug Design ed inibitori della HIV-PR

La scoperta di nuovi farmaci è generalmente un processo lungo e difficoltoso che coinvolge diverse discipline. Un approccio frequentemente utilizzato, detto "high

---

[41] Krausslich, H. G.; Scheneider, H.; Zybarth, G.; Carter, C. A.; Wimmer, E. *J. Virol.* (**1988**), *62*, 4393

[42] Pettit, S. C.; Simsic, J.; Loeb, D. D.; Everitt, L.; Hutchinson, C. A. III; Swanstrom, R. *J. Biol. Chem.* (**1991**), *266*, 14539

[43] Swanstrom, R.; Eron, J. *Pharmacol. Ther.* (**2000**), *86*, 145

throughput screening", consiste nel saggiare un gran numero di sostanze (sintetiche o naturali), per verificare se alcune di queste abbiano un effetto sulla patologia in esame. Nel caso dell'AIDS, ad esempio, si possono cercare principi attivi in grado di bloccare la replicazione virale in colture cellulari infette. In questo modo si ottengono delle molecole attive, la cui struttura viene successivamente modificata in modo da ottimizzarne le proprietà farmacologiche e farmacocinetiche. Processi di questo tipo sono comunque lenti, costosi e potenzialmente pericolosi, richiedendo la manipolazione di terreni di coltura infetti.

La ricerca di molecole bioattive ("lead compounds") risulta notevolmente semplificata qualora siano noti i processi biologici alla base della patologia. Nel caso dell'AIDS si sa che la causa è il virus HIV e che l'infezione può essere bloccata inibendo gli enzimi coinvolti nel suo ciclo replicativo (trascrittasi e proteasi); la conoscenza della struttura molecolare del bersaglio restringe notevolmente, quindi, il campo di indagine. Gli enzimi, inoltre, possono essere facilmente clonati, purificati ed impiegati in test su larga scala, consentendo di limitare i saggi su cellule infette solo alle molecole più efficaci.

Negli ultimi anni il "drug discovery" ha fortemente beneficiato dell'avanzamento tecnologico nel campo della chimica computazionale e del gran numero di strutture tridimensionali ad alta risoluzione di proteine ed enzimi attualmente disponibili. Le strutture cristallografiche dell'HIV-PR e di suoi complessi con inibitori sono un eccellente punto di partenza per i cosiddetti "structure-based drug design" e "de novo design". Nota la struttura del sito attivo di un enzima, o di un recettore proteico, e la natura dei residui che lo costituiscono, è possibile progettare *ex-novo* dei ligandi ad esso complementari o modificare strutture già note. I programmi di molecular modeling, infatti, permettono di individuare dettagliatamente le interazioni tra enzima e ligando e la struttura di quest'ultimo può essere progettata in modo da massimizzare queste interazioni all'interno del sito attivo. Le strutture ottimizzate vengono a questo punto sintetizzate e saggiate *in vitro* ed *in vivo*; non sempre l'attività biologica dei composti così ottenuti rispecchia, però, la previsione teorica e per questa ragione i cicli di modeling, sintesi e valutazione dell'attività biologica vengono ripetuti più volte.[38]

L'approccio computazionale è affetto da numerose limitazioni ed in particolare non è facile considerare l'effetto del solvente sull'energia totale del sistema, ma costituisce comunque un valido strumento per indirizzare la scelta preliminare delle strutture.

Gli inibitori della HIV-PR attualmente disponibili sul mercato sono stati messi a punto mediante una combinazione degli approcci sopra descritti e possono essere visti come il

risultato dello sforzo congiunto di varie discipline: cristallografia a raggi X, molecular modeling, chimica farmaceutica, biologia molecolare, biochimica, farmacologia, medicina applicata e, non ultima vista la complessità delle strutture, sintesi organica.

3 Inibitori peptidomimetici reversibili

3.1 Sintesi di isosteri dipeptidici

Nell'ultimo decennio sono stati sintetizzati numerosi inibitori dell'HIV proteasi, a partire da differenti tipi di isosteri dipeptidici (Fig. 2.9). Un'analisi dell'attività biologica rivela che i risultati migliori, in termini di efficacia e selettività, si ottengono con inibitori peptidomimetici basati su isosteri idrossietilenici che mimano la fenilalanina, i quali possiedono non solo un'elevata affinità per il sito attivo dell'enzima (Par. 2.3.4), ma anche delle buone proprietà farmacocinetiche.

Nell'ambito della sintesi organica, l'osservazione che la configurazione assoluta dei carboni carbinolici degli isosteri idrossietilenici ha effetto sull'affinità dell'inibitore per il sito attivo ha motivato lo sviluppo di numerose di metodologie stereoselettive per ottenere questi pseudopeptidi come singoli diastereoisomeri in forma enantiomericamente pura.

3.2 Isosteri diidrossietilenici

Un possibile approccio alla progettazione di inibitori dell'HIV proteasi è basato sulla simmetria C_2 dell'enzima nella sua forma attiva.[1] Un ipotetico asse di simmetria, che riproduce l'asse C_2 della proteasi, viene tracciato attraverso il legame C-N del legame ammidico (Fig. 3.1). Cancellando la porzione P' del peptide ed eseguendo un'operazione di simmetria C_2 sulla porzione P si ottiene un α-dichetone; rimpiazzando i due gruppi carbonilici con due gruppi -OH, più favorevoli per la possibilità di comportarsi sia da accettori che da donatori di legami idrogeno, si ottengono i tre possibili diamminodioli diastereoisomeri; se i residui R ed R' sono diversi si ottengono analoghi asimmetrici. Legando entrambe le estremità amminiche di un diamminodiolo ad una catena peptidica si ottengono inibitori peptidomimetici in cui la normale alternanza di legami ammidici risulta invertita. Uno dei vantaggi legati all'utilizzo di diamminodioli come nuclei centrali consiste nella possibilità di funzionalizzare le due estremità amminiche terminali con catene peptidiche uguali o diverse e, quindi, di produrre anche inibitori non simmetrici di struttura generale P_n--P_2-P_1-$P_{1'}$-$P_{2'}$--$P_{n'}$.

[1] a) Erickson, J.; Neidhart, D. J.; VanDrie, J.; Kempf, D. J.; Wang, X. C.; Norbeck, D. W.; Plattner, J. J.; Rittenhouse, J. W.; Turon, M.; Wideburg, N.; Kohlbrenner, W. E.; Simmer, R.; Helfrich, R.; Paul, D. A.; Knigge, M. *Science* (**1990**), *249*, 527; b) Kempf, D. J.; Norbeck, D. W.; Codacovi, L.; Wang, X. C.; Kohlbrenner, W. E.; Wideburg, N. E.; Paul, D. A.; Knigge, M. F.; Vasavanonda, S.; Craig-Kennard, A.; Saldivar, A.; Rosenbrook, W., Jr.; Clement, J. J.; Plattner, J. J.; Erickson, J. *J. Med. Chem.* (**1990**), *33*, 2687

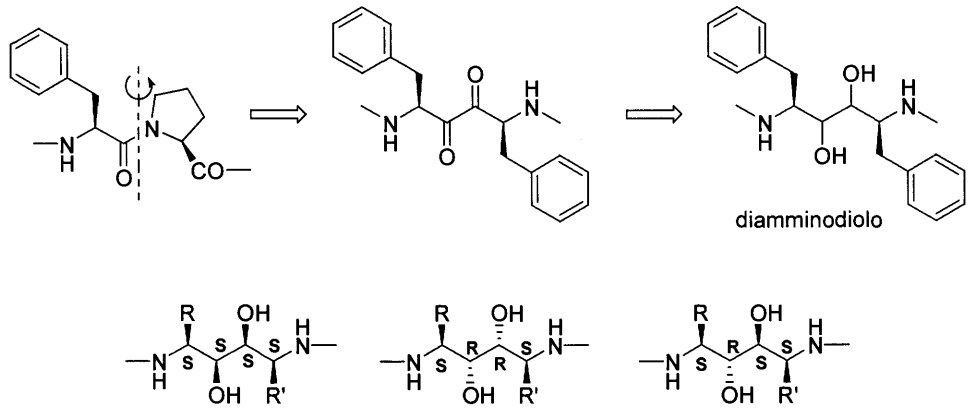


Figura 3.1: rappresentazione schematica dell'operazione di simmetria C_2 da cui si ottengono le strutture degli isosteri idrossietilenici; in evidenza le strutture dei tre possibili diamminodioli diastereoisomeri

In letteratura sono riportati numerosi esempi di sintesi di 1,4-diammino-2,3-dioli a simmetria C_2, che possono essere classificati in due grandi gruppi sulla base dell'approccio seguito:

1- condensazione pinacolica di α-amminoaldeidi.

2- modificazione di molecole chirali di origine naturale tra cui zuccheri ed amminoacidi.

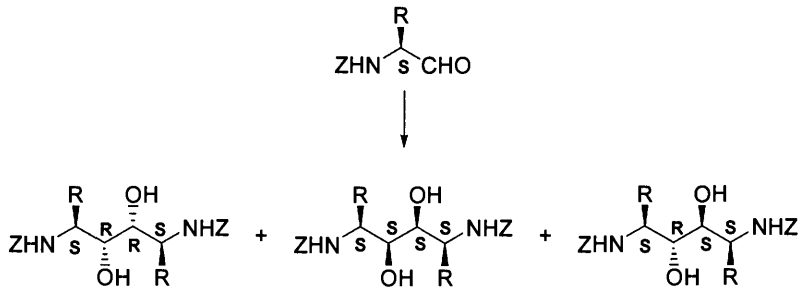
3.2.1 Reazioni di condensazione di α-amminoaldeidi

La dimerizzazione riduttiva di α-amminoaldeidi in presenza di metalli di transizione è stata la prima metodologia descritta e costituisce l'approccio convergente più diretto per la sintesi di diamminodioli a simmetria C_2. Il substrato è costituito da amminoaldeidi protette all'atomo di azoto in α, derivanti da amminoacidi naturali quali fenilalanina, valina, leucina, lisina, metionina e triptofano.

Il primo esempio di dimerizzazione riduttiva condotta su amminoaldeidi è la condensazione del N-Boc-fenilalaninale nelle condizioni proposte da McMurry ($TiCl_3(DME)_2$ in presenza della coppia Zn-Cu).[2] Questa reazione fornisce una miscela 2:1:1 dei tre diamminodioli diastereoisomeri: (*S,R,R,S*), (*S,S,S,S*) e (*S,R,S,S*) (Schema 3.1).[3] Sebbene la separazione dei prodotti sia piuttosto difficoltosa, la formazione di una miscela ha il vantaggio pratico di fornire tutti i possibili stereoisomeri in quantità sufficiente per la sintesi e la valutazione dell'attività biologica di inibitori basati su questi nuclei centrali.

[2] McMurry, J. E. *Chem. Rev.* (**1989**), *89,* 1513

[3] Kempf, D. J.; Norbeck, D. W.; Codavoci, L.; Wang, X. C.; Kohlbrenner, W. E.; Wideburg, N. E.; Paul, D. A.; Knigge, M. F.; Vasavanonda, S.; Craig-Kennard, A.; Saldivar, A.; Rosenbrook, W.; Clement, J. J.; Plattner, J. J.; Erickson, J. *J. Med. Chem* (**1990**), *33*, 2687



Schema 3.1: diastereoisomeri ottenibili per condensazione pinacolica di α-amminoaldeidi in presenza di metalli di transizione. Z=Boc, Cbz; R=Bn, ^{i}Bu, ^{i}Pr, $(CH_2)_4NHCbz$, $(CH_2)_2SCH_3$, CH_2-(3-indolil)

Utilizzando il complesso di vanadio(III) $[V_2Cl_3(THF)_6]_2[Zn_2Cl_6]$ ed un'aldeide chelante, tipicamente N-Cbz-α-amminoaldeidi, si può ottenere, a seconda della natura del residuo R e dell'ingombro sterico del gruppo proteggente, il diastereoisomero (*S,R,R,S*) con una selettività superiore all'80%.[4] Il prodotto principale viene facilmente isolato mediante conversione della miscela nei corrispondenti acetonidi e successiva cristallizzazione. Altri complessi di metalli di transizione possono essere utilizzati per la condensazione di α-amminoaldeidi: i risultati migliori si ottengono con lo ioduro di samario(II),[5] ed il complesso $NbCl_3(DME)$.[6] L'applicabilità di questo approccio, tuttavia, è limitata solamente alla sintesi di diamminodioli simmetrici, aventi cioè, residui R ed R' identici: utilizzando, infatti, due differenti aldeidi si ottengono miscele di tutti i possibili prodotti di condensazione. Inoltre, solamente il diamminodiolo (*S,R,R,S*) è accessibile in buone rese con questa metodologia.

3.2.2 Sintesi a partire da zuccheri

I polialcoli derivanti dalla riduzione di zuccheri, esosi in particolare, sono validi precursori chirali nella sintesi di isosteri diidrossietilenici. Un substrato contenente centri asimmetrici a configurazione nota e fissata consente di ottenere il prodotto voluto, evitando procedure sintetiche stereoselettive, spesso risultanti in miscele di diastereoisomeri difficilmente separabili. La maggior parte delle sintesi proposte in letteratura riguarda gli isomeri (*S,R,R,S*); infatti, inibitori simmetrici e pseudosimmetrici basati su questi nuclei presentano una buona biodisponibilità ed attività *in vivo*.[2-7]

---

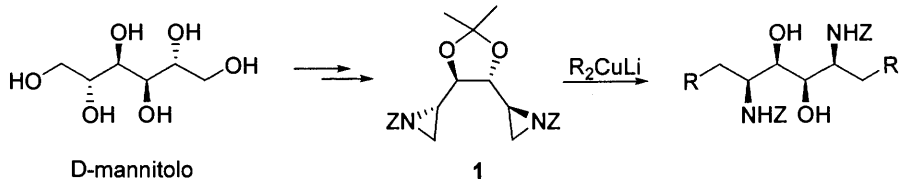
[4] Konradi, A. W.; Pedersen, S. F. *J. Org. Chem.* (**1992**), *57*, 28

[5] Budt, K. H.; Peyman, A.; Hansen, J.; Knolle, J.; Meichsner, C.; Paessens, A.; Ruppert, D.; Stowasser, B. *Bioorg. Med. Chem.* (**1995**), *3*, 559

[6] Kammermeier, B.; Beck, G.; Holla, W.; Jacobi, D.; Napiersky, B.; Jendralla, H. *Chem. Eur. J.* (**1996**), *2*, 307

[7] Hosur, M. V.; Bhat, T. N.; Kempf, D. J.; Baldwin, E. T; liu, B.; Gulnik, S.; Wideburg, N. E.; Norbeck, D. W.; Appelt, K.; Erickson, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* (**1994**), *116*, 847

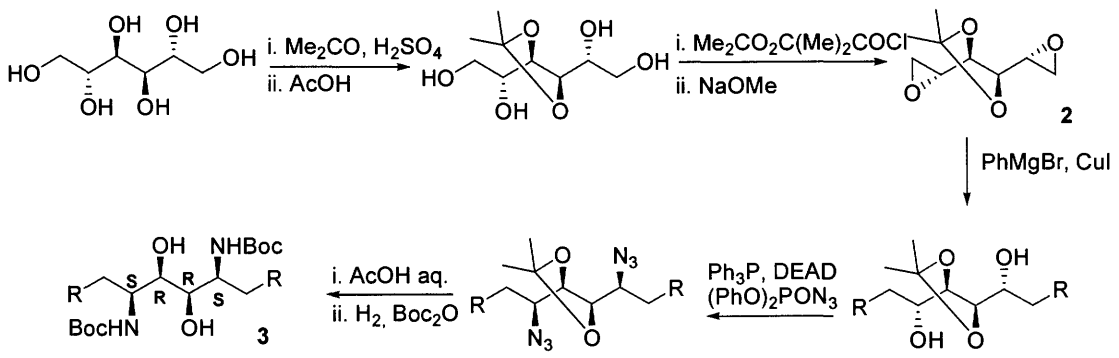
Una delle possibili strategie sintetiche si basa sull'addizione stereoselettiva di organocuprati ad una bis-aziridina **1** (Schema 3.2), derivante dal D-mannitolo[8] oppure dal D-treitolo.[9]



Schema 3.2: sintesi di diamminodioli diastereoisomeri a partire da D-mannitolo e D-treitolo via bis-aziridina. R=CH_3, *n*Bu; Z=Boc, Ts

Le aziridine sono indubbiamente degli intermedi molto versatili nella sintesi di diamminodioli, ma il loro impiego è limitato dal fatto che l'apertura dell'anello è piuttosto difficoltosa, a meno che l'atomo di azoto non sia legato ad un gruppo attivante (come un estere od un tosilato), e dal fatto che, al contrario degli ossirani, non esistono metodologie dirette per la loro sintesi.

Molto più comuni sono, quindi, le metodologie basate su epossidi derivanti da zuccheri. Numerosi autori hanno impiegato questo tipo di approccio ottenendo, a partire dal medesimo di-epossido **2**, derivante dal D-mannitolo, diamminodioli a simmetria C_2 del tipo (*S,R,R,S*) **3**, come riportato nello Schema 3.3.[10]



Schema 3.3: sintesi di diamminodioli a partire da un di-epossido derivante dal D-mannitolo

I residui R vengono introdotti utilizzando reattivi di Grignard (R = Ph, Bn) in presenza di sali di rame (CuI), condizioni, queste, che garantiscono la completa stereoselettività nell'apertura dell'anello epossidico. I gruppi amminici terminali derivano dalla riduzione delle corrispondenti azidi, introdotte mediante sostituzione degli ossidrili attivati come mesilato, oppure mediante reazione di Mitsunobu. Lo stesso approccio

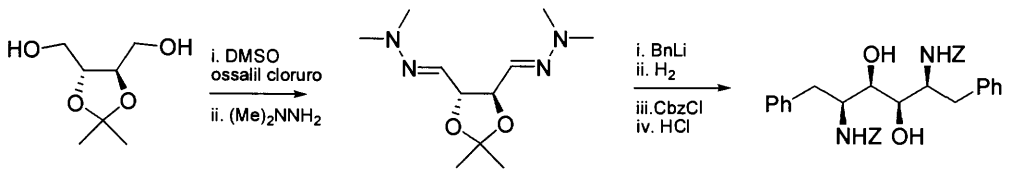
[8] a) Dureault, A.; Tranchepain, I.; Depezay, J. C. *J. Org. Chem.* (**1989**), *54*, 5324; b) Dureault, A.; Greck, C.; Depezay, J. C. *Tetrahedron Lett.* (**1986**), *27*, 4157

[9] Kang, S. H.; Ryu, D. H. *Chem. Commun.* (**1996**), 355

[10] a) Chenera, B.; Bohem, J. C.; Dreyer, G. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1991**), *1*, 219; b) Dreyer, G. B.; Bohem, J. C.; Chenera, B.; DesJarlais, R. C.; Hassell, A. M.; Meek, T. D.; Tomaszek, T. A. *Biochemistry* (**1993**), *32*, 937; c) Gosh, A. K.; McKee, S. P.; Thompson, W. J. *J. Org. Chem.* (**1991**), *56*, 6500

può essere utilizzato per ottenere diamminodioli asimmetrici con differenti residui R ed R'.[11] Rispetto al precedente richiede la conversione di due gruppi ossidrilici nelle corrispondenti ammine, presenta, però, il vantaggio di poter introdurre non solo funzioni amminiche libere, ma anche protette con gruppi facilmente rimovibili come Boc e/o Cbz.

I tetrosi ridotti rappresentano un'altra classe di substrati chirali utilizzata per questo tipo di sintesi; in questo caso, però, è necessario introdurre due nuovi centri chirali nella molecola. Ne è un esempio la sintesi di diamminodioli simmetrici (*S,R,R,S*) a partire dal D-treitolo (schema 3.4).[12] I due nuovi centri chirali vengono introdotti sfruttando la completa stereoselettività dell'addizione di BnLi al bis-idrazone intermedio **4**, ottenuto dall'aldeide derivante dall'ossidazione degli ossidrili terminali del D-treitolo protetto.



4

Schema 3.4: sintesi di diamminodioli simmetrici a partire dal D-treitolo. Z=Cbz

3.2.3 Sintesi a partire dall'acido tartarico

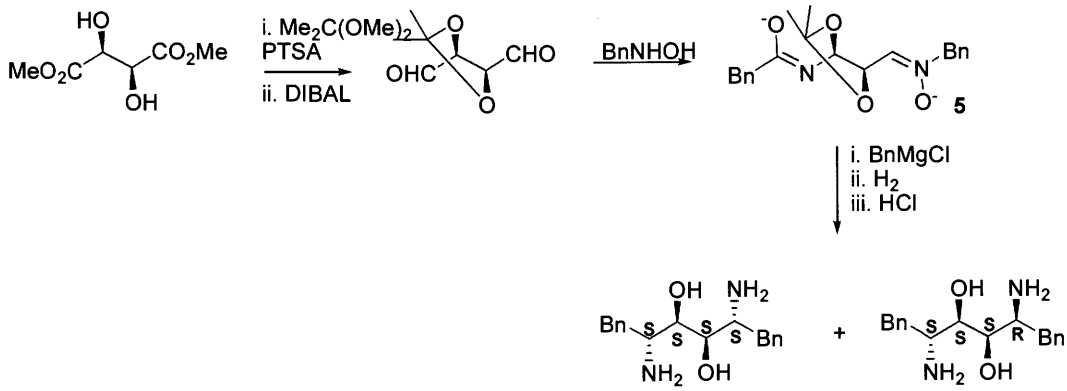
L'acido tartarico, oltre che come precursore del treitolo,[13] è stato utilizzato in altre sintesi di diamminodioli; un esempio è riportato nello Schema 3.5. L'approccio sfrutta la chimica dei nitroni **5**, facilmente ottenibili dal dimetilestere dell'acido tartarico per trattamento con benzil-idrossilammina (Schema 3.5). L'addizione stereoselettiva di un reattivo di Grignard introduce i due nuovi centri chirali con una selettività superiore all'85%.[14]

[11] Zuccarello, G.; Bouzide, A.; Kuarnstrom, I.; Niklasson, J.; Svensson, S. C. T.; Brisander, M.; Danielsson, H.; Nillroth, U.; Karlen, A.; Classon, B.; Samuelsson, B. *J. Org. Chem.* (**1998**), *63*, 4898

[12] Baker, W. R.; Condon, S. L. *J. Org. Chem.* (**1993**), *58*, 3277

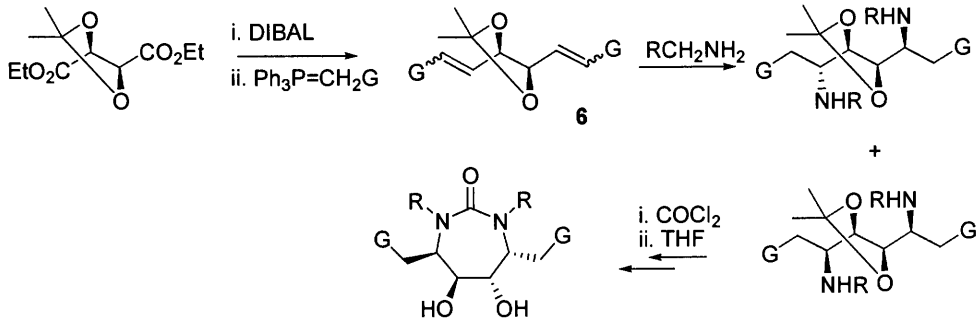
[13] Rossano, L. T.; Lo, Y. S.; Anzalone, L.; Lee, Y. C.; Meloni, D. J.; Moore, J. R.; Gale, T. M.; Arnett, J. F. *Tetrahedron Lett.* (**1995**), *36*, 4967

[14] a) Dondoni, A.; Franco, S.; Junquera, S.; Merchan, F. L.; Merino, P.; Tejero, T.; Bertolasi, V. *Chem. Eur. J.* (**1995**), *1*, 505; b) Dondoni, A.; Perrone, D.; Rinaldi, M. *J. Org. Chem.* (**1998**), *63*, 9252



Schema 3.5: sintesi di diamminodioli a partire da un dinitrone derivante dal dimetil-L-tartrato

Un secondo esempio è rappresentato dalla reazione di Michael del bis-enone **6** derivante dal dietil L-tartarato con un'ammina primaria (schema 3.6).[15] L'applicabilità di questa procedura è, tuttavia, limitata dalla necessità di avere un gruppo attivante (G), estere o nitrile, direttamente legato all'alchene che rende difficile l'introduzione di gruppi alchilici in quelle posizioni. La stereoselettività dipende comunque dalla geometria degli alcheni e va da 11:1, nel caso dell'enone (Z,Z), a 5:1, nel caso dell'enone (E,E). La possibilità di impiegare solamente alchil ammine nella reazione di addizione limita la sintesi unicamente alla produzione di derivati alchilati all'azoto.



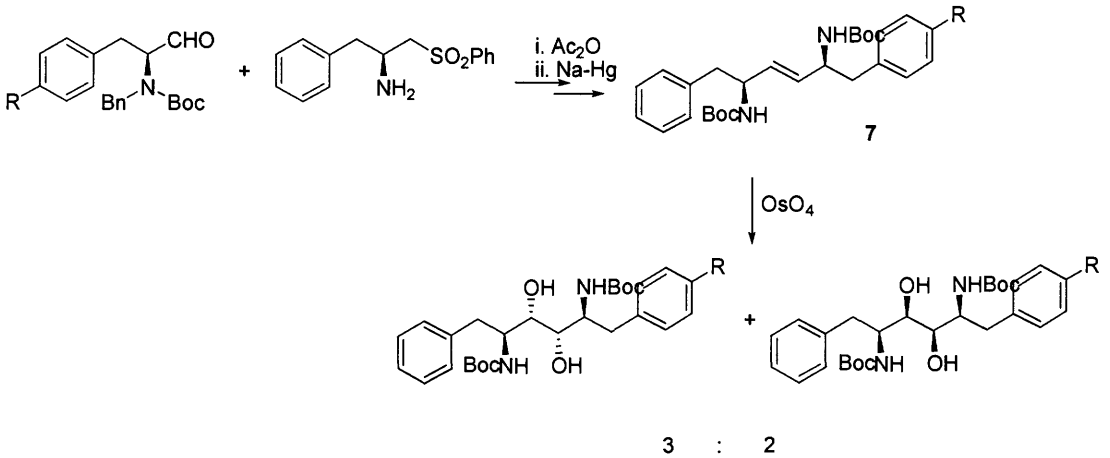
Schema 3.6: sintesi di diamminodioli a partire da un bis-enone derivante dal dietil L-tartrato

3.2.4 Diamminodioli da amminoacidi naturali

Escludendo le reazioni di condensazione pinacolica di α-amminoaldeidi, in letteratura non sono riportate numerose sintesi di diamminodioli a partire da α-amminoacidi.

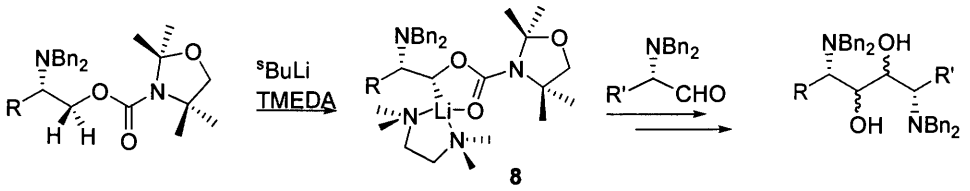
Un primo esempio[16] è rappresentato dalla diidrossilazione con OsO_4 (schema 3.7) di un alchene *trans* **7**, ottenuto nelle condizioni di olefinazione di Julia. Questo approccio di tipo convergente consente la differenziazione dei residui laterali dell'isostere e, quindi, la sintesi di diamminodioli non simmetrici. La reazione di diidrossilazione ha, però, una bassa stereoselettività e fornisce una miscela 3:2 dei due dioli diastereoisomeri.

[15] Schreiner, E. P.; Pruckner, A. *J. Org. Chem.* (**1997**), *62*, 5380
[16] Gurjar, M. K.; Pal, S.; Rama Rao, A. V. *Tetrahedron* (**1997**), *53*, 4769



Schema 3.7: sintesi di diamminodioli mediante diidrossilazione di un alchene

Una selettività molto maggiore si ottiene, invece, nella reazione di condensazione di una N,N-dibenzil-α-amminoaldeide con il sale di litio del tetrametil-ossazolidin-carbammato di un N,N-dibenzil-α-amminoalcol **8** (Schema 3.8).[17] Il carbammato viene litiato con una selettività di 9:1 all'idrogeno *pro-R*, mentre la condensazione dell'aldeide è completamente stereoselettiva e fornisce il diastereoisomero (*S,S,S,S*), quale prodotto principale.



Schema 3.8: sintesi di diamminodioli a partire N,N-dibenzil amminoalcoli

3.3 Isosteri basati sulla prolina

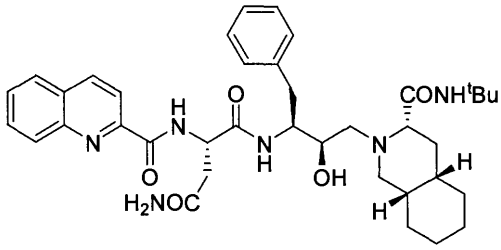
La prolina, tra gli amminoacidi naturali, è l'unico a contenere un gruppo amminico secondario; la sua particolare struttura conferisce caratteristiche strutturali e funzionali peculiari alle proteine ed ai peptidi che la contengono.

Tra gli enzimi specifici per substrati contenti la prolina, oltre alla HIV-PR ed altre proteasi retrovirali,[18] vanno ricordate le peptidil-prolil *cis/trans* isomerasi che assistono il "folding" proteico catalizzando l'isomerizzazione di legami peptidici Xaa-Pro e sono recettori di farmaci immunosopressori.[19] L'importante ruolo biologico svolto da queste

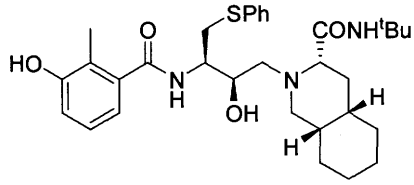
[17] Weber, B.; Kolczewski, S.; Frölich, R.; Hoppe, D. *Synthesis* (**1999**), 1593
[18] DeClercq, E. *Nature Reviews Drug Discovery* (**2003**), *1*, 13
[19] Dugave, C.; Demange, L.; *Chem. Rev.* (**2003**), *103*, 2475

specie ha stimolato la sintesi di analoghi della prolina e peptidomimetici basati su isosteri di tipo Xaa-Pro.[20]

Nel caso dell'HIV-PR sono stati messi a punto diversi inibitori basati su isosteri Tyr-Pro oppure Phe-Pro; nella maggior parte dei casi queste molecole contengono gruppi in grado di mimare le caratteristiche stereoelettroniche dell'anello a cinque termini e, allo stesso tempo, di massimizzare le interazioni con i subsiti idrofobici dell'enzima. Un esempio è rappresentato da Saquinavir e Nelfinavir, inibitori della proteasi attualmente utilizzati come farmaci per la cura dell'AIDS, nei quali la prolina non è presente come tale, ma inclusa all'interno di un raggruppamento di tipo decaidro-isochinolinico.



Saquinavir



Nelfinavir

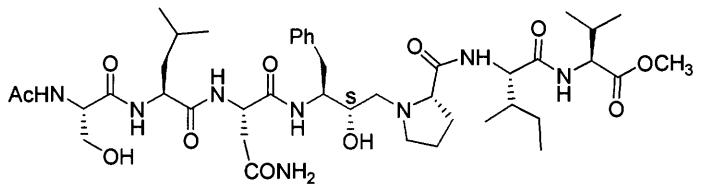
In letteratura sono riportati anche esempi di nuclei centrali contenenti l'anello pirrolidinico, in particolare idrossietilammine, derivati dell'acido fosfinico, α-chetoammidi, pirrolidinoni e peptidi modificati. Tuttavia, il fatto che la prolina contenga un gruppo amminico secondario limita in qualche modo l'approccio alla progettazione e alla sintesi di suoi analoghi; infatti, in letteratura non sono descritti corrispettivi degli isosteri idrossietilenici visti in precedenza, contenenti la pirrolidina. Tutti gli isosteri del tipo Xaa-Pro riportati vengono sintetizzati a partire dalla prolina stessa, alchilando l'azoto secondario che viene quindi incorporato nella struttura dell'isostere. In questo modo si ottengono isosteri con un'estremità amminica ed una carbossilica, come un normale dipeptide, a differenza di quanto accade con isosteri diamminodiolici i quali, avendo due estremità amminiche, introducono un'inversione nella sequenza peptidica. La scoperta del Saquinavir può essere portata come esempio di questo approccio.

[20] a) Hanessian, S.; Yun, H.; Hou, Y.; Tintelnot-Blomley, M. *J. Org. Chem.* (**2005**), *70*, 6746; b) Augeri, D. J.; Robl, J. A.; Betebenner, D. A.; Magnin, D. R.; Khanna, A.; Robertson, J. G.; Wang, A.; Simpkins, L. M.; Taunk, P.; Huang, Q.; Han, S.-P.; Abboa-Offei, B.; Cap, M.; Xin, L.; Tao, L.; Tozzo, E.; Welzel, G. E.; Egan, D. M.; Marcinkeviciene, J.; Chang, S. Y.; Biller, S. A.; Kirby, M. S.; Parker, R. A.; Hamann, L. G. *J. Med. Chem.* (**2005**), *48*, 5025; c) Venäläinen, J. I.; Wallén, E. A. A.; Poso, A.; García-Horsman, J. A.; Männistö, P. T. *J. Med. Chem.* (**2005**), *48*, 7093; d) Rancourt, J.; Cameron, D. R.; Gorys, V.; Lamarre, D.; Poirier, M.; Thibeault, D.; Llinàs-Brunet, M. *J. Med. Chem.* (**2004**), *47*, 2511

3.3.1 Il Saquinavir

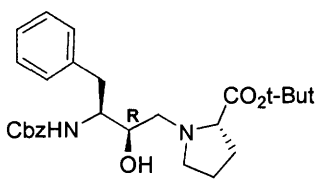
Il Saquinavir è il primo inibitore dell'HIV proteasi ad essere stato approvato dall'FDA per il trattamento dell'AIDS nel 1995. La sua messa a punto rappresenta un eccellente esempio di "drug discovery", combinando le conoscenze sulla struttura dell'enzima bersaglio, la sua specificità, l'esperienza acquisita nell'inibizione della renina, con una scelta razionale dell'isostere non idrolizzabile.

Vista la specificità dell'enzima verso legami ammidici di tipo Tyr-Pro e Phe-Pro (cfr. Par. 2.3.4) il gruppo di ricerca della Roche scelse di utilizzare, come isostere, l'idrossietilammina contenente l'anello della prolina, già impiegata per la sintesi dell'inibitore eptapeptidico JG-365 il cui diastereoisomero *S* (configurazione assoluta del carbonio ossidrilico) ha una costante di inibizione (K_i) pari a 0.24 nM.[21]

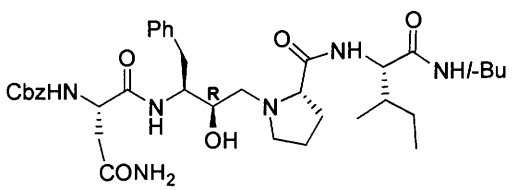


JG-365

Gli inibitori peptidomimetici contengono numerosi centri chirali: mentre quelli presenti in catena laterale generalmente derivano da amminoacidi naturali, la configurazione assoluta dei carboni asimmetrici presenti nell'isostere può essere scelta di volta in volta adottando un opportuno protocollo sintetico stereoselettivo ed i dati sperimentali rivelano che questa ha una marcata influenza sull'attività dell'inibitore. I vari diastereoisomeri, infatti, creando interazioni differenti con i residui, si legano al sito attivo con affinità diversa. Nel caso del Saquinavir, i primi test vennero condotti su entrambi i diastereoisomeri del pseudo-dipeptide **9**, il quale mostrò un ridotto ma incoraggiante IC_{50} (concentrazione di inibitore necessaria ad inibire del 50% l'attività dell'enzima) pari a 6.5 μM, nel caso del diasteroisomero *R*. L'aggiunta di un residuo di asparagina in posizione P_2 e di un isoleucil-*iso*-butilammide in $P_{2'}$ **10**, ridusse di un ordine di grandezza l'IC_{50} portandolo al valore di 130 nM.



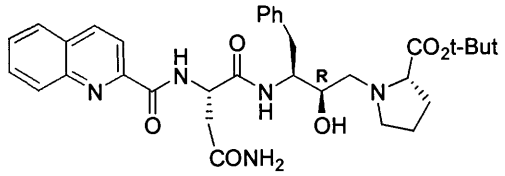
9
IC_{50}=6.5 mM



10
IC_{50}=130 nM

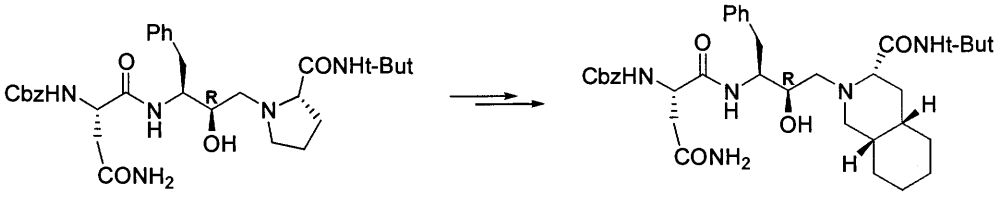
[21] Swain, A. L.; Miller, M. M.; Green, J.; Rich, D. H.; Schneider, J.; Kent, S. B. H.; Wlodawer, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**1990**), *87,* 8805

A differenza di quanto osservato in inibitori più lunghi, ad esempio il JG-365, in cui il diasteroisomero *S* si è rivelato più potente, nel caso di questi pseudo-tripeptidi il diasteroisomero *R* ha un'efficacia maggiore. Una volta individuate le catene laterali si passò all'ottimizzazione del gruppo da legare all'estremità N-terminale; tra le oltre cinquanta strutture esaminate, l'acido 2-chinaldico fornì i risultati migliori in termini di stabilità e affinità, come dimostrato dall'inibitore **11**.



11
IC_{50}=23 nM

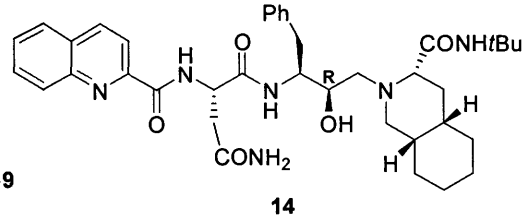
Prendendo come punto di riferimento l'ammide **12** e seguendo un approccio sistematico del tutto simile si cercarono degli analoghi della prolina da inserire in posizione $P_{1'}$. Gli studi strutturali ed il molecular modeling indicarono, infatti, che un anello a cinque termini non ha dimensioni tali da occupare completamente il subsito $S_{1'}$ e per questo motivo la ricerca si orientò verso strutture bicicliche. La sostituzione della prolina con una *cis*-decaidroisochinolina (**13**) fornì un IC_{50} di 2.7 nM per il diastereoisomero R, mentre quello S si rivelò sostanzialmente inattivo.



12
IC_{50}=210 nM

13
IC_{50}=2.7 nM

Infine, incorporando il terminale N-2-chinolinico in questa struttura, si osservò un ulteriore aumento dell'efficacia; l'inibitore Ro 31-8959 (Saquinavir) **14** venne considerato un promettente "lead", sottoposto a ulteriori test biologici e quindi approvato per il trattamento sull'uomo.[22]



Inibitore Ro 31-8959

14
IC_{50}=0.4 nM

[22] King, F. D. In *Medicinal Chemistry Princples and Practice;* King, F. D. Ed.; Royal Society of Chemistry Cambridge (**2002**)

La struttura cristallografica del complesso dell'HIV-proteasi con il Saquinavir (Fig. 3.1) indica che l'inibitore si lega, come previsto, in conformazione estesa e che l'ossidrile dell'isostere è situato tra i residui catalitici di aspartato. La stereochimica *S,S,S* dell'anello della decaidroisochinolina è ottimale per l'attività, in quanto occupa quasi completamente il subsito $S_{1'}$, mentre i metili del gruppo *tert*-butilico si sistemano nel subsito $S_{2'}$. Rispetto ad altri inibitori dell'HIV proteasi, l'ammide terminale è spostata di circa 1.8 Å, il che preclude la sua estensione in $S_{3'}$.[23]

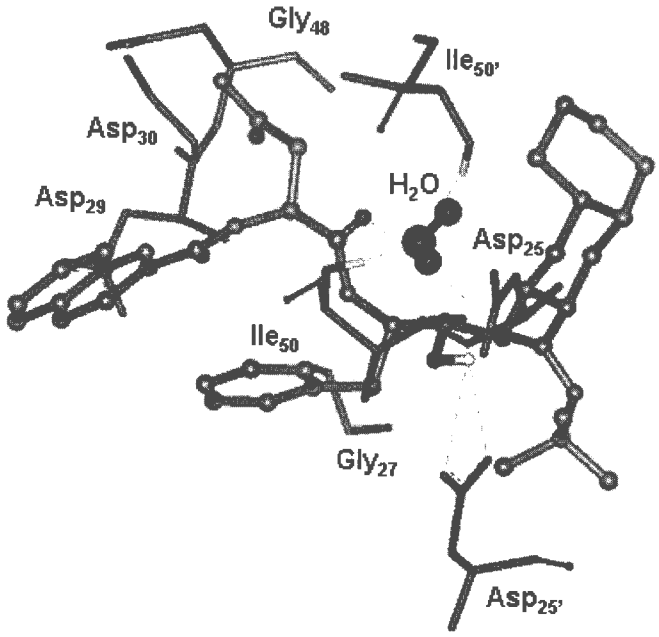


Figura 3.1: struttura cristallografica del complesso tra HIV-PR e Saquinavir. Le linee tratteggiate rappresentano i legami idrogeno tra l'inibitore, la molecola d'acqua ed i residui Asp_{25}, $Asp_{25'}$, Ile_{50} e $Ile_{50'}$. Per il Saquinavir è stata utilizzata la rappresentazione "ball&stick".

Nonostante la ridotta biodisponibilità orale (1-4%) dovuta ad uno scarso assorbimento ed un'estesa degradazione ad opera del citocromo P450, il Saquinavir mostra un'eccellente attività soprattutto nelle terapie combinate con Ritonavir ed inibitori della trascrittasi inversa, inibendo HIV-1 e HIV-2 con valori di IC_{50} inferiori a 0.5 nM. Inoltre, il suo impiego in concentrazioni fino a 10 μM non causa inibizione delle altre proteasi aspartiche umane renina, pepsina, gastricina, catepsina D ed E.

La struttura dell'idrossietilammina **15**, descritta da Rich all'inizio degli anni '90,[24] ed utilizzata per produrre l'inibitore JG-365, è stata progettata sulla base della sua stretta somiglianza con l'intermedio tetraedrico derivante dall'idrolisi del legame ammidico

[23] Krohn, A.; Redshaw, S.; Ritchie, J. C.; Graves, B. J.; Hatada, M. H. *J. Med. Chem.* (**1991**), *34*, 3340

[24] a) Rich, D. H.; Green, J.; Toth, M. V.; Marshall, G. R.; Kent, S. B. H. *J. Med. Chem.* (**1990**), *33*, 1285; b) Rich, D.H.; Prasad, J. V. N. V.; Sun, C-Q.; Green, J.; Mueller, R.; Houseman, K.; MacKenzie, D.; Malkovsky, M. *J. Med. Chem.* (**1992**), *35*, 3803

Phe-Pro (Fig. 3.2) nella sequenza p17/p24 (Ser-Leu-Asn-Phe-Pro-Ile-Val) **16** della poliproteina substrato naturale dell'HIV-PR.

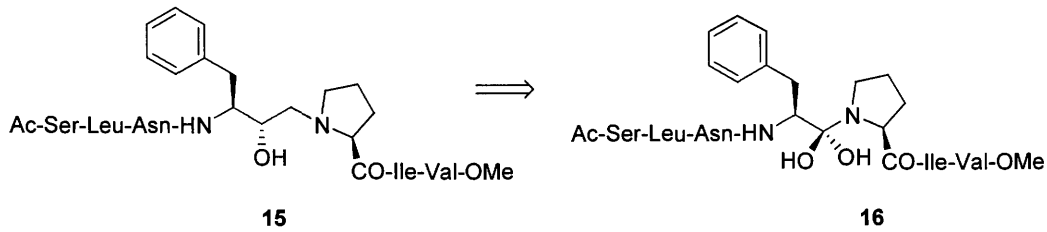
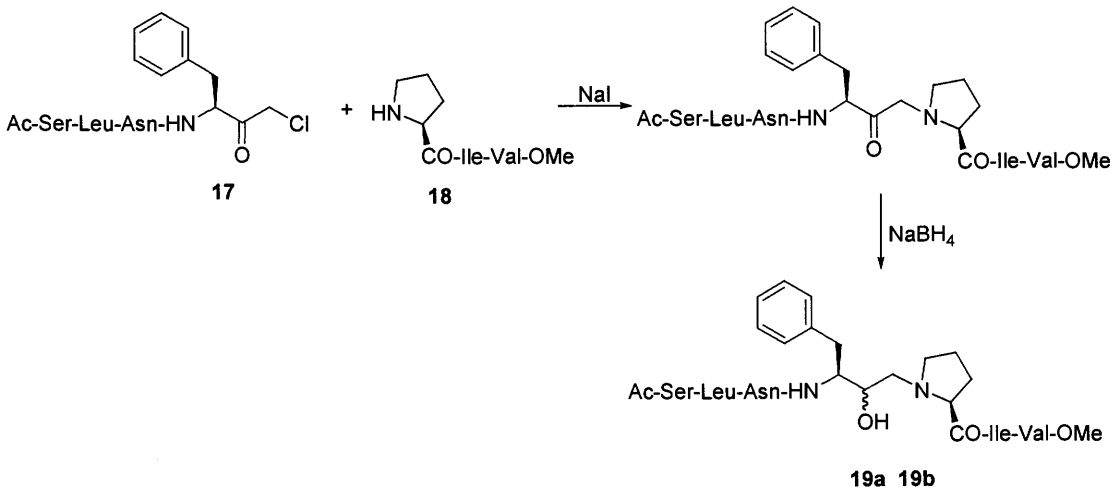


Figura 3.2: idrossietilammina Phe-Pro e intermedio tetraedrico dell'idrolisi della sequenza p17/p24

L'isostere Phe-Pro idrossietilamminico viene inserito all'interno della catena peptidica dell'inibitore alchilando l'azoto pirrolidinico del tripeptide HN-Pro-Ile-Val-OMe **17** (Schema 3.9) con il cloro-metil-chetone **18** derivante dal tetrapeptide Ac-Ser-Leu-Asn-Phe, in presenza di NaI.[25] La riduzione con $NaBH_4$ del gruppo carbonilico fornisce una miscela equimolare dei due alcoli diastereoisomeri **19a** e **19b**.

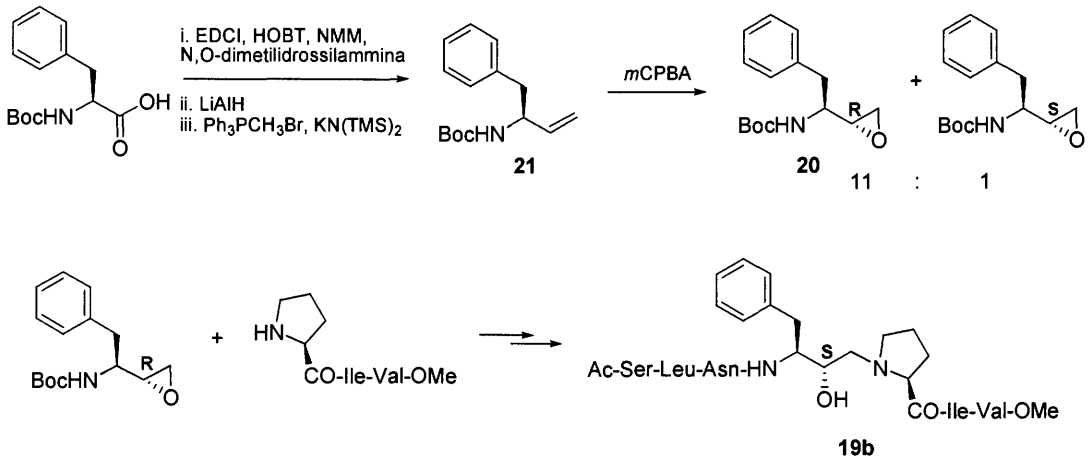


Schema 3.9: sintesi dell'idrossietilammina Phe-Pro per alchilazione con un peptidil cloro-metil-chetone

La procedura è stata, in seguito, adattata all'ottenimento del diastereoisomero **19b** (*S,S,S*), che presenta un'attività maggiore nei confronti della proteasi (Schema 3.10), alchilando la prolina con l'epossido **20**, ottenuto dall'allilammina **21** derivante dalla N-Boc-fenilalanina.[26]

[25] Godfrey, j. D.; Gordon, E. M.; Von Langen, D.; Engebrecht, J.; Pluscec, J. *J. Org. Chem.* (**1986**), *51*, 3073

[26] Luly, J. R.; Dellaria, J.F.; Plattner, J. J.; Soderquist, J.L.; Yi, N. *J. Org. Chem.* (**1987**), *52*, 1487



Schema 3.10: sintesi dell'isomero S dell'inibitore JG-365 mediante alchilazione di un epossido

3.3.2 Altri isosteri della prolina

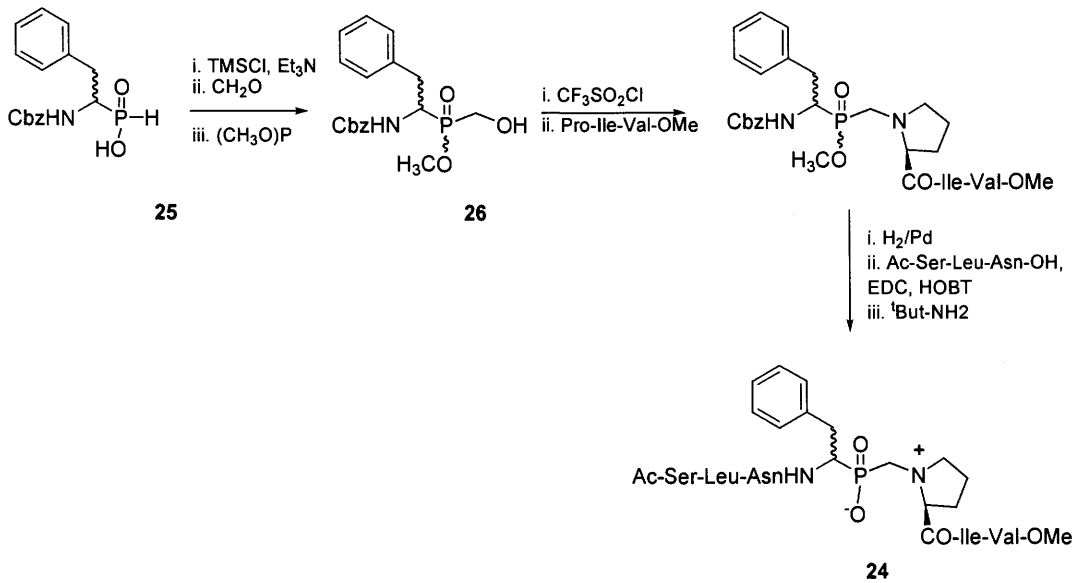
Un secondo esempio di analogo dello stato di transizione dell'idrolisi del legame ammidico Phe-Pro è costituito dai derivati dell'acido fosfinico **22**.[27] Questa struttura deriva dalla modificazione di un fosfonammidato **23**, analogo largamente utilizzato per l'inibizione di proteasi;[28] l'introduzione di un metilene tra fosforo ed azoto fornisce un isostere non idrolizzabile, che a pH fisiologico è presente in forma zwitterionica (Fig. 3.3).

Figura 3.3: analoghi dello stato di transizione basati sul fosforo

L'inibitore **24** (K_i 8.2 nM) si ottiene (Schema 3.11) dall'N-Cbz-1-ammino-2-feniletil fosfito **25** che viene convertito nel corrispondente fosfinato **26** per trattamento con formaldeide e trimetilfosfito. Il gruppo alcolico primario viene attivato con CF_3SO_2Cl ed utilizzato per l'alchilazione del tripeptide HN-Pro-Ile-Val-OMe (Schema 3.12).

[27] Ikeda, S.; Ashley, J. A.; Wirsching, P.; Janda, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* (**1992**), *114*, 7604

[28] a) Bartlett, P. A.; Marlowe, C. K. *Science* (**1987**), *235*, 569; b) Bartlett, P. A.; Marlowe, C. K. *Biochemistry* (**1983**), *22*, 4618; c) Thorset, E. D.; Harris, E. E.; Peterson, E. R.; Greenlee, W. J.; Patchett, A. A.; Ulm, E. H.; Vassil, T. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**1982**), *79*, 2176; d) Jacobsen, N. E.; Bartlett, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* (**1981**), *103*, 654



Schema 3.11: Sintesi di inibitori peptidomimetici basati su un analogo fosforilato

Migliori risultati, in termini di inibizione, si ottengono utilizzando pseudodipeptidi basati su un'α-chetoammide **27** (Fig. 3.4).[29] La struttura cristallografica del complesso con l'HIV-PR rivela che questi inibitori si legano al sito attivo nella loro forma idrata mediante una serie di legami idrogeno che blocca l'attività catalitica dei residui di aspartato 25 e 25' (Fig. 3.4).

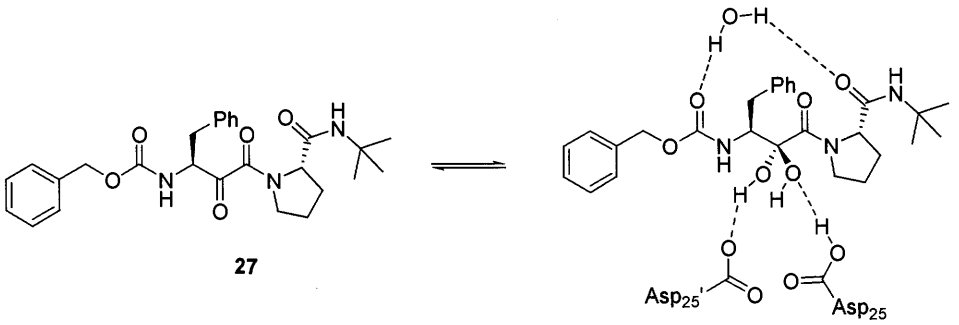


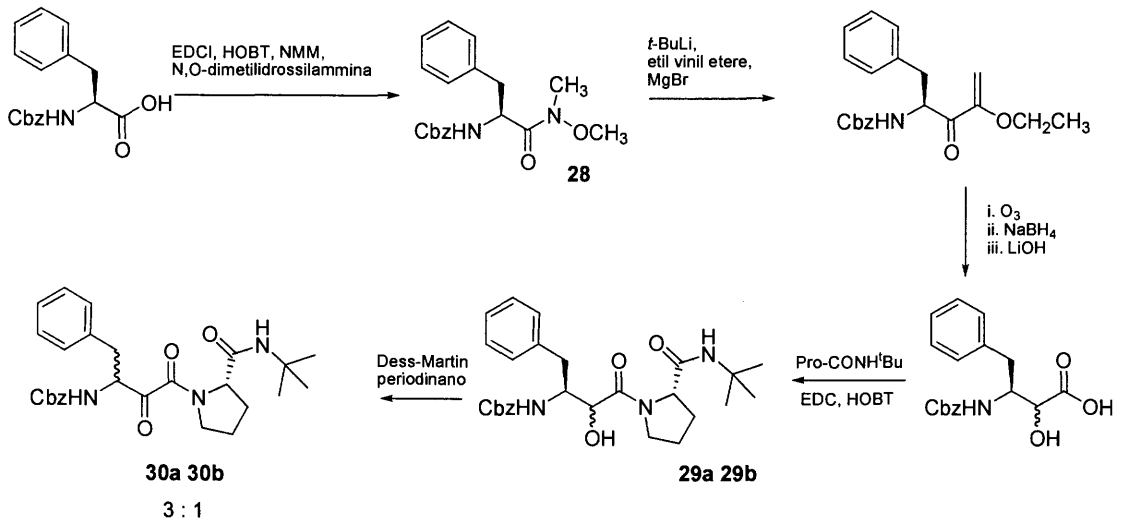
Figura 3.4: Rappresentazione schematica delle interazioni di un'α-chetoammide con i residui catalitici di aspartato 25 e 25' nel sito attivo dell'HIV-PR

La sintesi si realizza a partire dalla N-Cbz-fenilalanina (Schema 3.12), la cui ammide di Weinreb **28**,[30] viene alchilata con α-etossi-vinilmagnesio bromuro. Ozonolisi, riduzione con $NaBH_4$, idrolisi del gruppo estereo e coupling con la *tert*-butilammide della prolina fornisce una miscela di α-idrossi ammidi isomere **29a** e **29b** che viene ossidata con periodinano per dare una miscela 3:1 delle corrispondenti α-chetoammidi **30a** e **30b**.

[29] a) Munoz, B.; Giam, C-Z.; Wong, C-H. *Bioorg. Med. Chem.* (**1994**), *2*, 1085; b) Slee, D. H.; Laslo, K. L.; Elder, J. H.; Ollmann, I. R.; Gustchina, A.; Kervinen, J.; Zdanov, A.; Wlodawer, A.; Wong, C-H. *J. Am. Chem. Soc.* (**1995**), *117*, 11867

[30] Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* (**1981**), *22*, 3815

L'epimerizzazione del carbonio α della fenilalanina è dovuta all'elevata acidità del protone adiacente al carbonio carbonilico ed è tipica di questa classe di composti.[31]



Schema 3.12: Sintesi dell'α-chetoammide isostere di Phe-Pro

La specificità dell'HIV-PR per l'idrolisi di legami Phe-Pro e Tyr-Pro è stata sfruttata anche per la messa a punto di inibitori non basati su analoghi dello stato di transizione.[32] In questo caso gli inibitori sono degli pseudodipeptidi nei quali la prolina è stata sostituita da un 2-benzil-pirrolidin-3-olo **31** oppure da un 2-benzil-pirrolidin-3-one **32**, (Fig. 3.4). Queste strutture, mediante interazioni non covalenti, si legano con elevata affinità al sito attivo rendendolo inaccessibile al substrato. L'anello pirrolidinico sostituito interagisce con il subsito $S_{1'}$ ($Ile_{50'}$, $Ile_{84'}$, $Leu_{23'}$) attraverso i metileni dell'anello, e con il subsito $S_{2'}$ ($Ile_{47'}$, $Val_{32'}$) attraverso il residuo benzilico in posizione 2. L'anello aromatico della fenilanina, o della tirosina, occupa il subsito S_1 (Ile_{50}, Ile_{84}, Leu_{23}), mentre il gruppo *tert*-butilico si sistema nel subsito S_2 (Ile_{47}, Val_{32}). I dipeptidi interagiscono anche con i residui di aspartato catalitici attraverso il legame con una molecola d'acqua (Fig. 3.4).

[31] Harbeson, S. L.; Abelleria, S. M.; Akiyama, A.; *J. Med. Chem.* (**1994**), *37*, 451

[32] a) Bouygues, M.; Medou, Quelever, G.; Chermann, J-C.; Camplo, M.; Kraus, J-L *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1998**), *8*, 277; b) Bouygues, M.; Medou, M.; Chermann, J-C.; Camplo, M.; Kraus, J-L. *Eur. J. Med. Chem.* (**1998**), *33*, 445; c) Courcambeck, J.; Bihel, F.; De Michelis, C.; Quelever, G.; Kraus, J-L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (**2001**), 1421

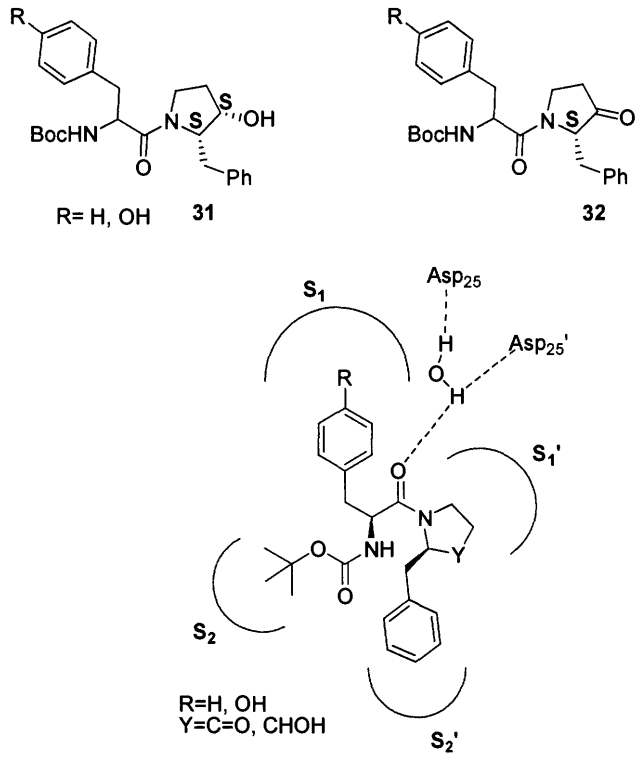
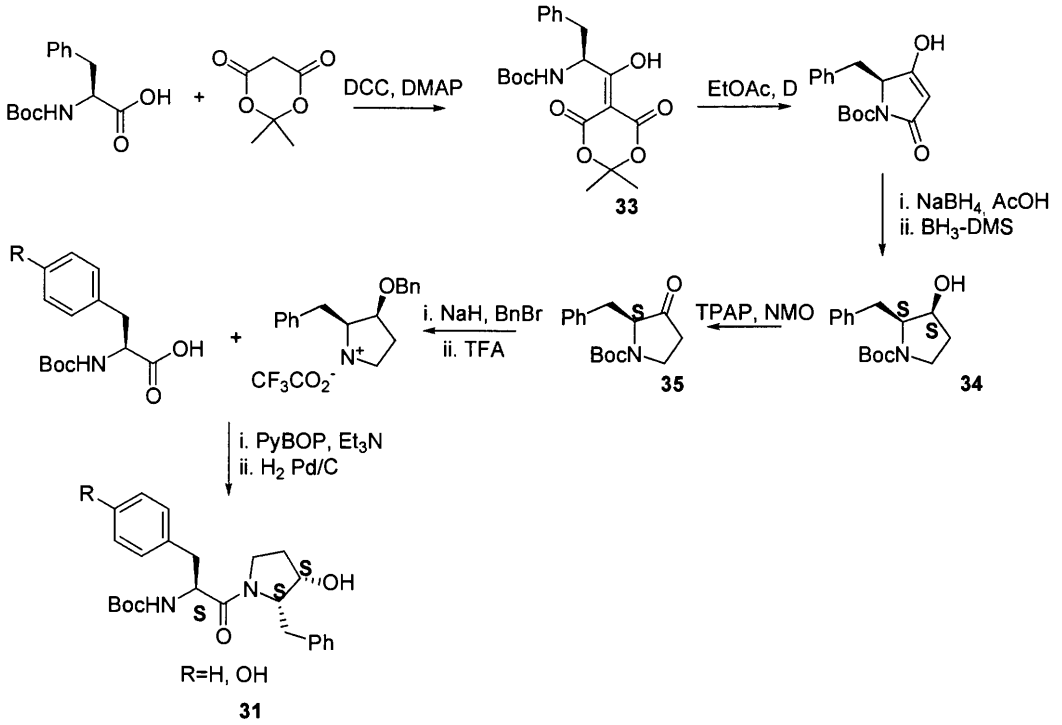


Figura 3.4: struttura degli pseudodipeptidi contenti l'anello pirrolidinico funzionalizzato e rappresentazione schematica delle loro interazioni con il sito attivo dell'HIV-PR

L'approccio sintetico è di tipo enantioconvergente (Schema 3.13) e permette di ottenere il (2*S*,3*S*)-benzil-pirrolidin-3-olo **34** ed il corrispondente (2*S*)-2-benzil-pirrolidin-3-one **35** in forma enantiomericamente pura a partire dalla N-Boc-L-fenilalanina. L'addizione dell'acido di Meldrum's all'amminoacido attivato fornisce l'acido tetramico N-sostituito **33**.[33] Dalla riduzione del gruppo carbonilico e del lattame si ottiene il (2*S*,3*S*)-2-benzil-pirrolidin3-olo **34**, che viene ossidato al corrispondente (2*S*)-2-benzil-pirrolidin-3-one **35**. I derivati pirrolidinici vengono quindi condensati con L-fenilalanina o (OBz)-L-tirosina a dare i corrispondenti pseuododipeptidi.

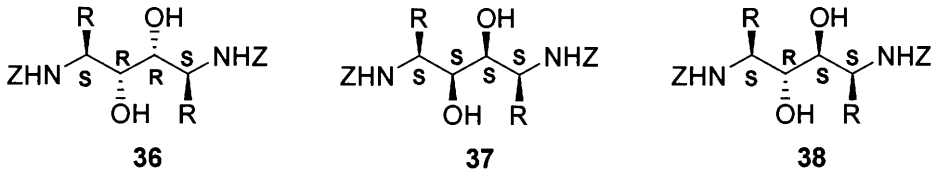
[33] a) Jouin, P.; Castro, B.; Nisato, D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (**1987**), 1177 ; b) Galeotti, N.; Poncet, J.; Chinche, L.; Jouin, P. *J. Org. Chem.* (**1993**), *58*, 5370



Schema 3.13: sintesi di (2*S*,3*S*)-2-benzil-pirrolidin-3-olo e (2*S*)-2-benzil-pirrolidin-3-one

3.3.3 Isosteri diidrossietilenici Xaa-Pro

Fino alla prima metà degli anni Novanta, la maggior parte delle sintesi di diamminodioli apparse in letteratura riguardava i diastereoisomeri (*S,R,R,S*) **36**, ottenuti principalmente mediante reazioni di condensazione pinacolica o modificazione di zuccheri (cfr. Par. 3.2.1 e Par 3.2.2). Nonostante i dati di attività biologica indicassero un'elevata efficacia anche per gli inibitori basati su diamminodioli (*S,S,S,S*) **37** ed (*S,S,R,S*) **38**,[34] era possibile ottenere questi nuclei centrali solamente come sottoprodotti delle reazioni di condensazione pinacolica oppure mediante inversione di configurazione del prodotto principale (*S,R,R,S*) **36**.

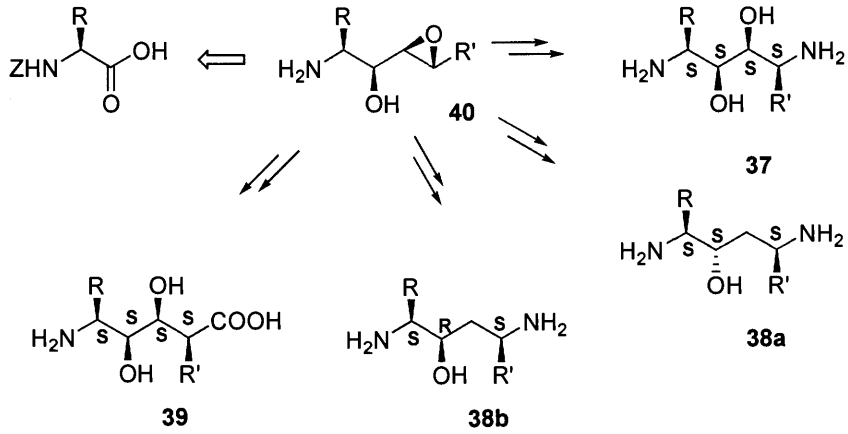


36 **37** **38**

La possibilità di disporre di un approccio stereoselettivo per la sintesi dei differenti diastereoisomeri avrebbe, quindi, permesso di studiare nel dettaglio l'influenza della stereochimica non solo sull'attività degli inibitori, ma anche sulle proprietà farmacocinetiche, la biodisponibilità e la solubilità. Recentemente è stata messa a punto

[34] Kempf, D. J.; Codavoci, L.; Wang, X. C.; Kohlbrenner, W. E.; Wideburg, N. E.; Saldivar, A.; Vasavanonda, S.; Marsh, K.; Bryant, P.; Sham, H. L.; Green, B. G.; Betebenner, D.; Erickson, J.; Norbeck, D. W. *J. Med. Chem.* (**1993**), *36*, 320

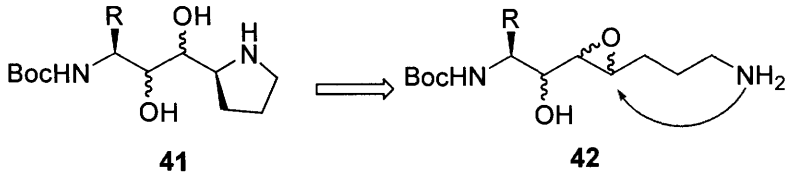
una metodologia generale (Schema 3.14) per la sintesi stereoselettiva di diamminodioli di tipo (*S,S,S,S*) **37**,[35] diamminoalcoli epimeri al C_2 **38a-38b**[36] e diidrossi-δ-amminoacidi **39**[37] basata sull'apertura regio- e stereoselettiva con differenti nucleofili del medesimo epossialcol **40** derivante da un amminoacido naturale.



Schema 3.14: metodologia generale per l'ottenimento di diamminodioli, diamminoalcoli e diidrossi-δ-amminoacidi a partire da un comune intermedio epossialcolico

Questa nuova sintesi espande considerevolmente lo scopo dell'approccio sintetico agli inibitori della HIV-PR in termini di controllo stereochimico e versatilità, poiché i due gruppi amminici terminali di diamminodioli e diamminoalcoli (**37** e **38**) possono essere differenziati tramite gruppi proteggenti tra loro ortogonali, estendendo, allo stesso tempo, la sintesi a residui R ed R' non necessariamente identici.

Questa metodologia è stata successivamente estesa alla sintesi di un nuovo tipo di isosteri di dipeptidi contenenti l'anello della prolina **41**. Il nuovo approccio (Schema 3.15) è basato sull'apertura intramolecolare, anziché intermolecolare come nello schema 3.14, dell'anello epossidico da parte di un ammino gruppo opportunamente posizionato all'estremità della catena dell'intermedio **42**, generando così l'anello pentatomico desiderato.[38]



Schema 3.15: formazione di un anello pirrolidinico mediante ciclizzazione intramolecolare di un gruppo amminico terminale su un epossialcol

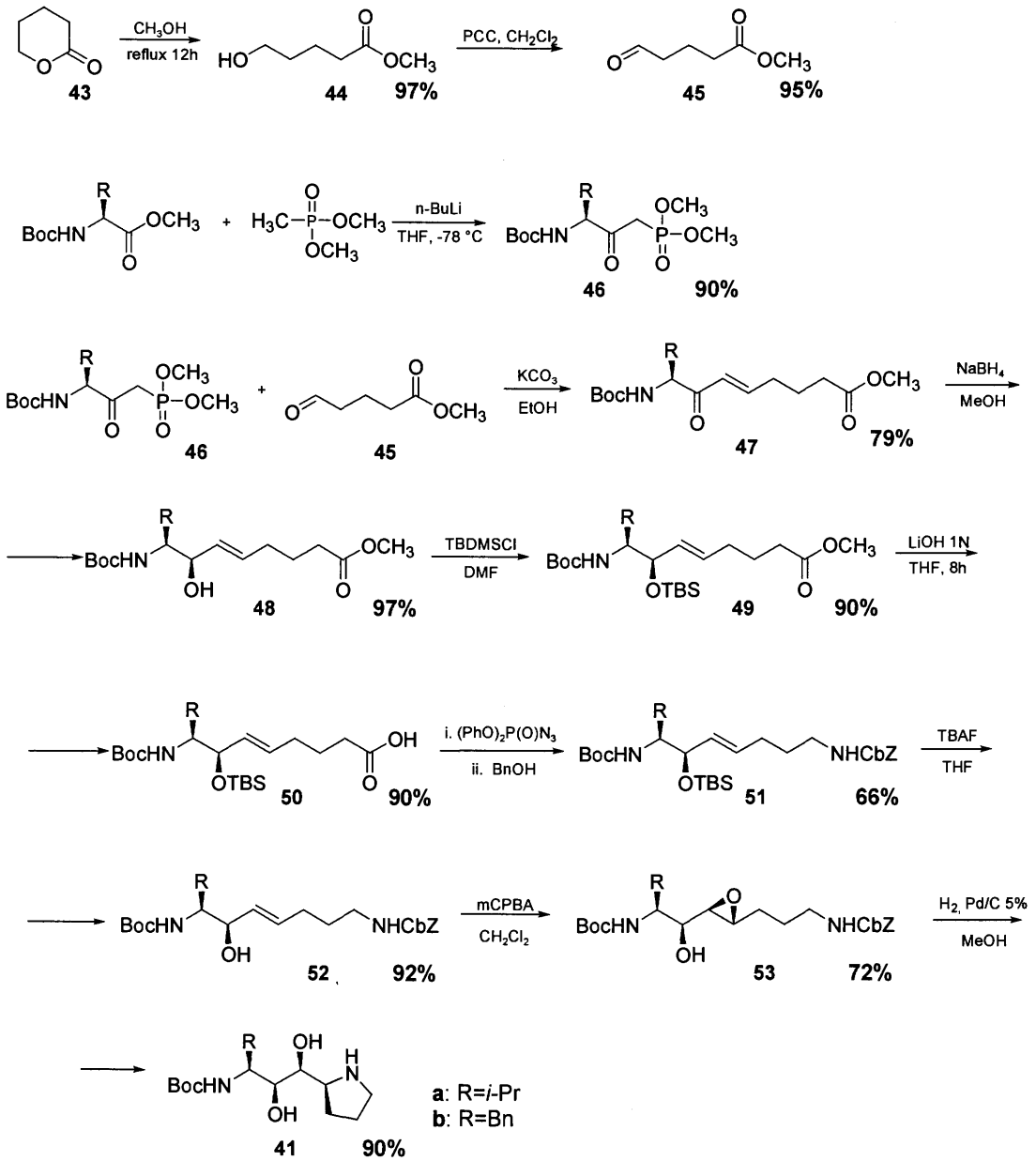
[35] Benedetti, F.; Miertus, S.; Norbedo, S.; Tossi, A.; Zlatoidsky, P. *J. Org. Chem.* (**1997**), *62*, 9348

[36] a) Benedetti, F.; Norbedo, S. *Tetrahedron Lett.* (**2000**), *41*, 10071; b) Benedetti, F.; Berti, F.; Norbedo, S. *J. Org. Chem.* (**2002**), *67*, 8635

[37] Benedetti, F.; Magnan, M.; Miertus, S.; Norbedo, S.; Parat, D.; Tossi, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1999**), *9*, 3027

[38] Benedetti F.; Berti F.; Dinon F.; Nardin G.; Norbedo S. *Org. Lett.* (**2004**), *6*, 1017

La sintesi completa dei diamminodioli **41a** e **41b**, a partire dal δ-valerolattone, è riportata nello schema 3.16. I diamminodioli **41a** e **41b** si ottengono con una resa complessiva del 20% a partire dal fosfonato **46**, il che rappresenta un risultato accettabile considerando il gran numero di passaggi previsti dalla sintesi.[39]



Schema 3.16: sintesi degli isosteri Val-Pro **41a** e Phe-Pro **41b**

Più nel dettaglio, l'aldeide **45** si ottiene in due passaggi dal δ-valerolattone **43**, secondo la procedura riportata da Huckstep:[40] il δ-valerolattone viene convertito nel 5-idrossi-valerato di metile **44** e quindi ossidato utilizzando piridinio clorocromato (PCC) in

[39] Benedetti, F.; Berti, F.; Campaner, P.; Dinon, F.; Tossi, A. PD2004A000151
[40] Huckstep, M.; Taylor, R. J. K.; Canton, M. P. L. *Synthesis* (**1982**), 881

diclorometano.[41] La successiva olefinazione degli N-Boc-fosfonati **46a-b** fornisce come unici prodotti gli enoni **47a-b** a configurazione *E*, che vengono ridotti stereoselettivamente ad alcoli allilici **48a-b**. Dopo temporanea protezione dell'ossidrile come *tert*-butil-dimetilsilil etere (**49a-b**), il gruppo estereo terminale viene idrolizzato ed il secondo gruppo amminico viene introdotto a questo punto della sintesi mediante un *Riarrangiamento di Curtius*.[42] Conducendo il riarrangiamento in presenza di alcol benzilico, sono stati ottenuti in un unico passaggio i derivati **51a-b**, protetti al gruppo ω-amminico come Cbz, con una resa del 66%. Dopo deprotezione dell'ossidrile allilico (**52a-b**) ed epossidazione con acido *m*-cloroperbenzoico,[43] si ottengono i *sin* epossialcoli **53a-b** con una resa del 70%. Il passaggio finale consiste nella rimozione del gruppo Cbz; l'epossiammina **42a-b** ciclizza spontaneamente, in modo *5-eso* con un meccanismo S_N2 a dare il diamminodiolo (*S,S,S,S*) **41a-b**. La stereochimica (*S,S,S,S*) del diamminodiolo **41a** è stata confermata dalla risoluzione della struttura cristallina ai raggi X.[38]

3.3.4 Inibitori peptidomimetici basati sul nuovo isostere PhePro

Una piccola serie di inibitori (Figura 3.5), ottenuti accoppiando l'isostere Phe-[Ψ]-Pro ([Ψ]=CH_2OHCH_2OH) **41b** a catene laterali derivate dall'inibitore JG365[44] o a catene già utilizzate in precedenza su isosteri Phe-[Ψ]-Phe,[45] ha mostrato eccellenti valori di attività (espressi in termini di IC_{50}, cioè la concentrazione minima di inibitore in grado di ridurre del 50% l'attività enzimatica) nel range nanomolare.

[41] Piancatelli, G.; Scettri, A.; D'Auria, M. *Synthesis* (**1982**), 245
[42] Ninomiya, K.; Shioiri, T.; Yamada, S. *Tetrahedron* (**1974**), *30*, 2151
[43] a) Henbest, H. B.; Nicholls, B. *J. Chem. Soc.* (**1959**), 221; b) Hoveyda, A. H.; Evans, D. A.; Fu, G. C. *Chem. Rev.* (**1993**), *93*, 1307
[44] Swain, A. L.; Miller, M. M.; Green, J.; Rich, D. H.; Schneider, J.; Kent, S. B. H.; Wlodawer, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**1990**), *87*, 8805
[45] a) Tossi, A.; Bonin, I.; Antcheva, N.; Norbedo, S.; Benedetti, F.; Miertus, S.; Nair, A. C.; Maliar, T.; Dal Bello, F.; Palu, G.; Romeo, D. *Eur. J. Biochem.* (**2000**), *267*, 1715; b) Tossi, A.; Benedetti, F.; Norbedo, S.; Skrbec, D.; Berti, F.; Romeo, D. *Bioorg. Med. Chem.* (**2003**), *11*, 4719

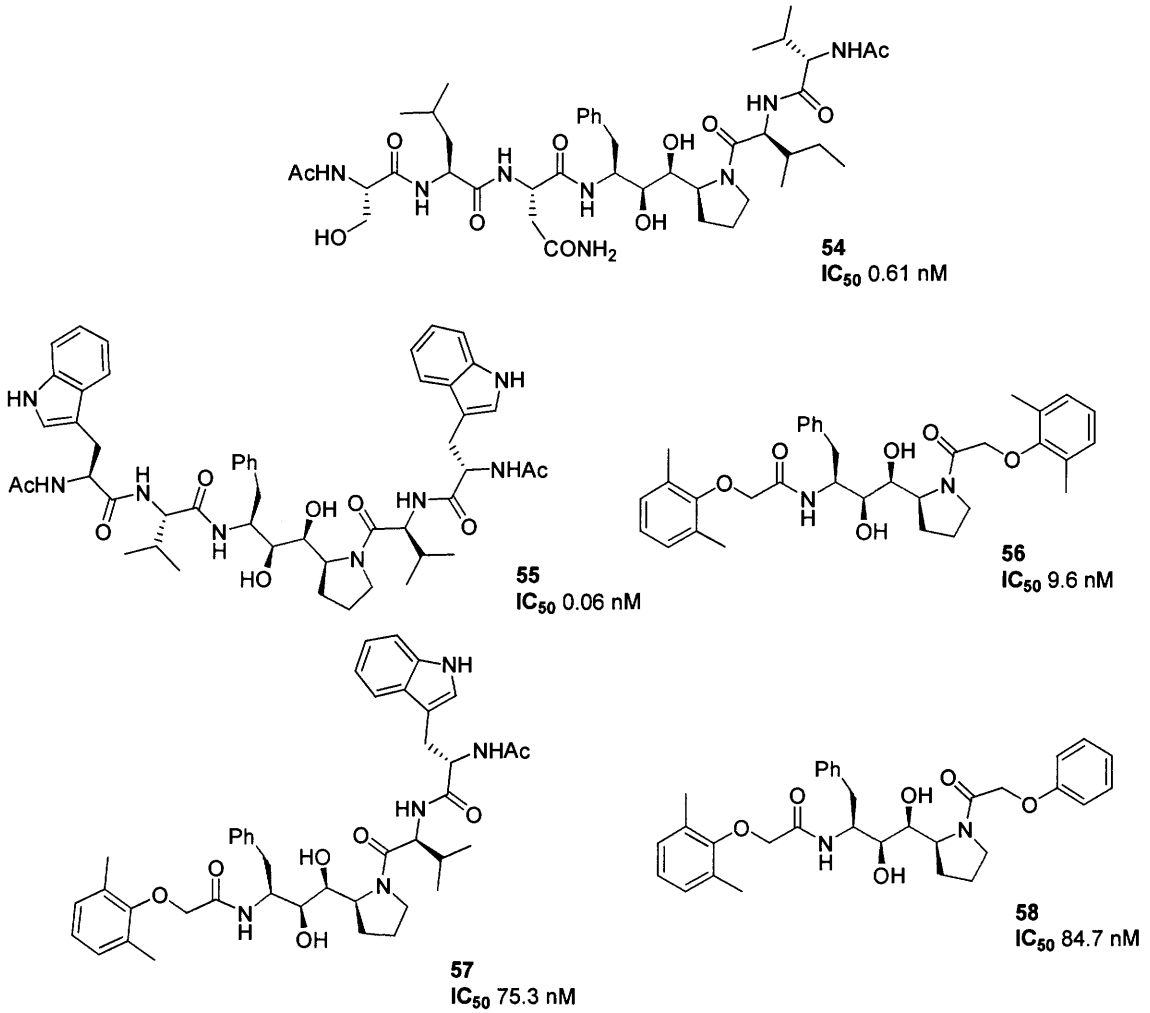


Figura 3.5: primi inibitori realizzati contenenti il nuovo isostere Phe-[Ψ]-Pro **41b**

In particolare, l'eptapeptide **54** mostra attività confrontabile con quella dell'inibitore di riferimento JG-365. Lo pseudo–esapeptide **55** si dimostra ancora più attivo di un ordine di grandezza: la sequenza Triptofano-Valina appare effettivamente particolarmente importante per l'attività, e la sostituzione di una o di entrambe le catene Trp-Val con un residuo capace di occupare la sola posizione P_2, come nel caso dei composti **57** e **58** porta ad una diminuzione di affinità di circa due ordini di grandezza. Il residuo di DmPoa è però in grado di consentire un recupero di attività di circa 10 volte rispetto a quello di Poa, e così il derivato **56** risulta ancora molto attivo. I nuovi inibitori basati sull'isostere PhePro, in particolare quando almeno una delle due posizioni P_3 risulta occupata, presentano attività inibitorie dello stesso ordine di grandezza, se non addirittura inferiori, di quelle di alcuni degli inibitori attualmente in uso nella pratica clinica (Ritonavir: IC_{50} 3.0 nM; Indinavir: IC_{50} 1.3 nM; Nelfinavir: IC_{50} 1.9 nM).

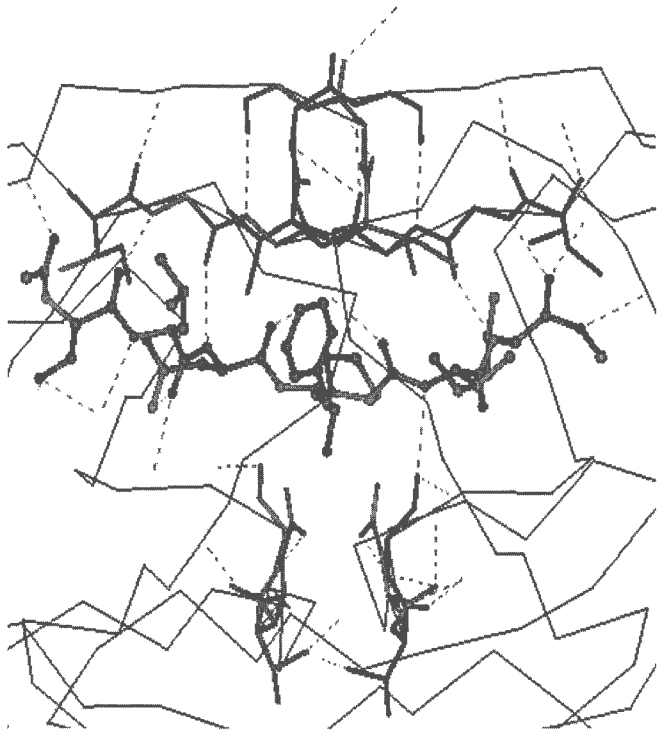


Figura 3.6: struttura cristallografica del sito attivo del complesso tra l'HIV-PR e l'inibitore **JG-365** ("ball&stick"). In verde sono riportati i residui di aspartato catalitici e la rete di legami idrogeno che stabilizza il complesso nella configurazione detta "fireman's grip". (PDB file: 7HVP)

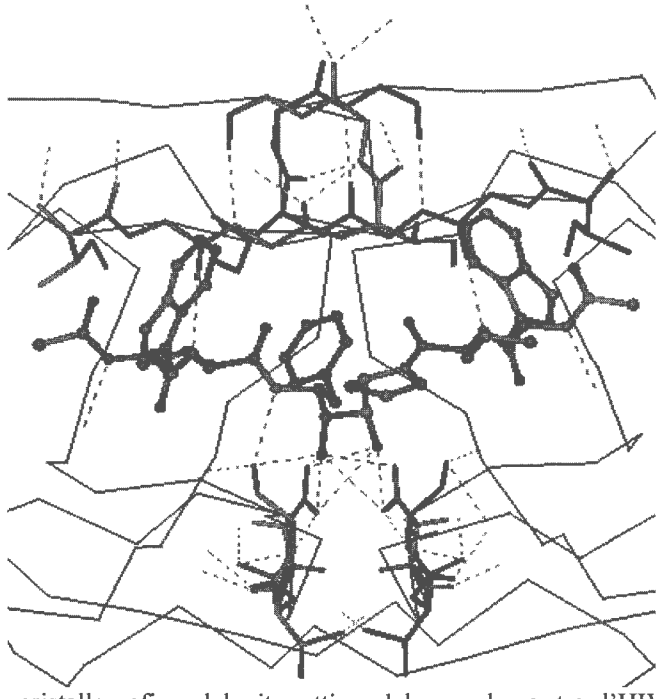


Figura 3.7: struttura cristallografica del sito attivo del complesso tra l'HIV-PR e l'inibitore **55** ("ball&stick"). In verde sono riportati i residui di aspartato catalitici e la rete di legami idrogeno che stabilizza il complesso nella configurazione detta "fireman's grip". (PDB file: 2A1E)

Studi preliminari di citotossicità e attività antivirale su cellule infette condotti in collaborazione con il Dipartimento di Virologia del Centro Nazionale di Malattie Infettive di Sofia (Bulgaria), mostrano che gli inibitori **55** e **56** possiedono bassa

citotossicità e buona attività anti-replicativa sul virus,[46] confermando quindi l'interesse per questo nuovo tipo di isostere. L'analisi della struttura cristallografica del complesso tra l'inibitore **55** e una HIV-PR (I84V),[47] oltre a confermare la potenziale applicabilità terapeutica dei nuovi inibitori,[48] permette di osservare come la struttura pseudosimmetrica dell'inibitore Ac-TrpVal-Phe-[Ψ]-Pro-ValTrp-Ac **55**, scelto come "lead compound", assume (Figura 3.7), all'interno del sito, una conformazione estesa paragonabile a quella del JG-365 (Figura 3.6) e fornisce utili informazioni per ulteriori elaborazioni strutturali.

[46] Argirova, R. comunicazione personale

[47] Geremia, S.; Demitri, N.; Wuerges, J.; Benedetti, F.; Berti, F.; Tell, G.; Randaccio, L. *ChemMedChem.* (**2006**), *1*, 186

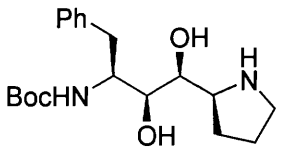
[48] Il mutante I84V è una delle HIV-PR più diffuse nei pazienti affetti da HIV, contro la quale alcuni degli inibitori attualmente in uso risultano inefficaci perché non riconosciuti a livello del sito catalitico: a) Skalova, T.; Dohnalek, J.; Duskovs, J.; Petrokovs, H.; Hradilek, M.; Soucek, M.; Konvalinka, J.; Hasek, J. *J. Med. Chem.* (**2006**), *49*, 5777; b) Kovalevsky, A. Yu.; Tie, Y.; Liu, F.; Boross, P. I.; Wang, Y.-F.; Leshchenko, S.; Ghosh, A. K.; Harrison, R. W.; Weber, I. T. *J. Med. Chem.* (**2006**), *49*, 1379; c) Tie, Y.; Boross, P. I. ; Wang, Y.-F.; Gaddis, L.; Hussain, A. K.; Leshchenko, S.; Ghosh, A. K.; Louis, J. M.; Harrison, R. W.; Weber, I. T. *J. Mol. Biol.* (**2004**), *338*, 341

PARTE SECONDA: RISULTATI E DISCUSSIONE

4 Nuovi isosteri Xaa-Pro

4.1 Nuova sintesi di isosteri di tipo Xaa-Pro

Sulla base dei risultati precedentemente ottenuti e descritti nell'introduzione (Par. 3.3.4), anche considerando che i dati biologici sono disponibili per un numero relativamente piccolo di inibitori, è senz'altro possibile affermare che il nucleo centrale PhePro **41b** possiede caratteristiche estremamente promettenti, tali da farlo ritenere un serio candidato per la preparazione di nuovi inibitori della HIV-PR.



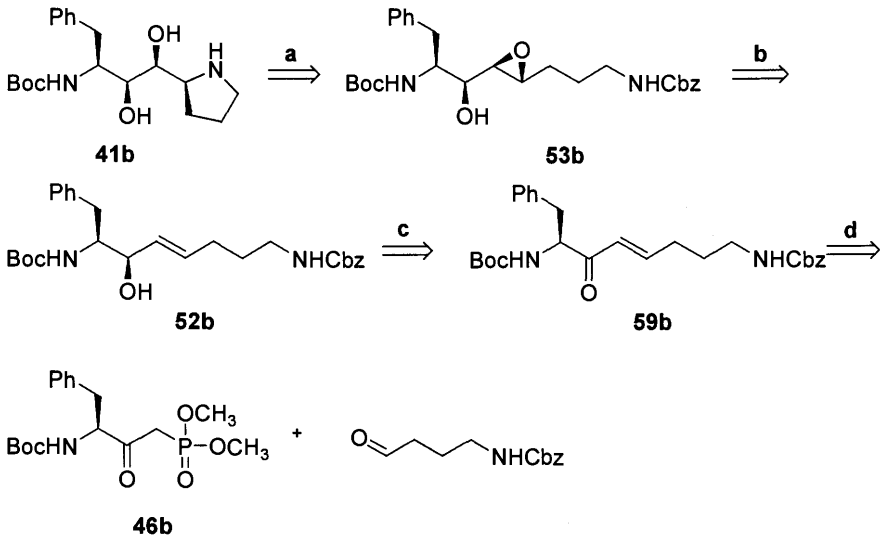
41b

Figura 4.1: l'isostere PhePro **41b**

Lo sviluppo di nuovi inibitori è tuttavia fortemente limitato dalla metodologia a disposizione per la sintesi di **41** (Schema 3.16), che prevede molti passaggi, condizionando tanto la resa finale che un eventuale scale up del processo ed offre poche possibilità di introdurre variazioni sulla struttura dell'isostere, in particolare sull'anello pirrolidinico.

Per questo motivo, il primo obiettivo del lavoro di tesi è stato l'ottimizzazione dell'approccio sintetico originale; quest'ultimo (Schema 3.16) è alquanto laborioso, in particolare nell'introduzione del gruppo amminico della prolina, che viene introdotto durante la sintesi attraverso un riarrangiamento di Curtius, passaggio che richiede inoltre la temporanea protezione dell'alcol allilico, che però deve essere dopo deprotetto per controllare la stereochimica dell'epossidazione.

La sintesi di **41b** è stata quindi ripianificata, sempre a partire dalla fenilanina, sulla base dell'analisi retrosintetica riportata nello schema 4.1.

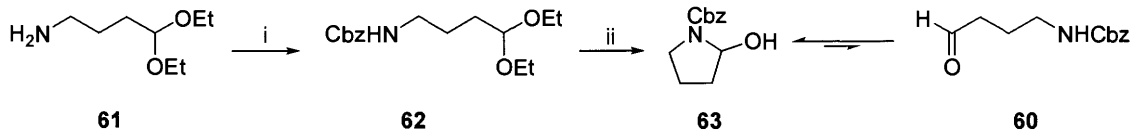


Schema 4.1: analisi retrosintetica

L'ultima parte della nuova sintesi (passaggi a e b) coincide con quella precedentemente descritta; in questo caso, invece, l'introduzione del secondo gruppo amminico viene anticipata a livello della sintesi dell'enone **59b** per reazione di Horner-Emmons del fosfonato della N-Boc fenilalanina **46b** con la 4-ammino-butirraldeide, ortogonalmente protetta rispetto a **46b**.

4.1.1 Sintesi dell'enone 59b

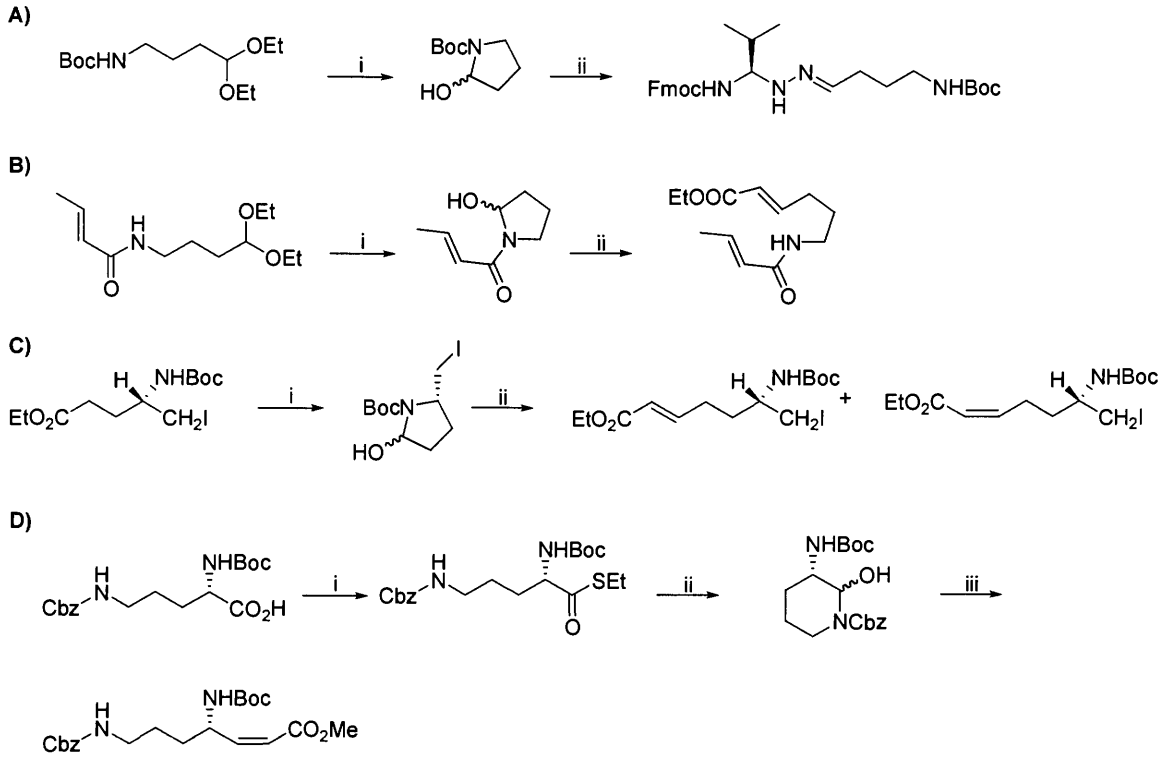
La prima via seguita inizia con la sintesi della N-Cbz-4-amminobutirraldeide **60** a partire dal dietil acetale della 4-ammino-butirraldeide **61**, commercialmente disponibile; la strategia (Schema 4.2) prevede la protezione del gruppo amminico primario come benzilossicarbonil **62**, seguita dall'idrolisi acida dell'acetale. In queste condizioni, però, la deprotezione del gruppo aldeidico è seguita da una spontanea ciclizzazione a dare N-Cbz-2-idrossi-pirrolidina **63**.



Schema 4.2: i) $(Cbz)_2O$, CH_2Cl_2, 0 °C; ii) $AcOH/H_2O$

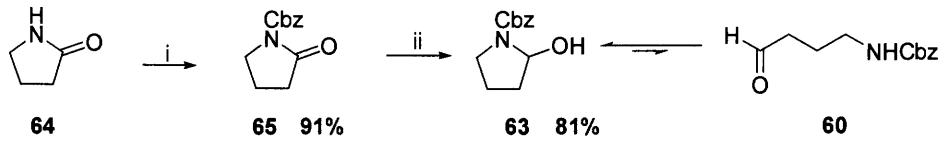
È noto comunque che in sistemi di questo tipo l'amminoalcol ciclico, termodinamicamente più stabile, è in equilibrio con la corrispondente aldeide (Schema 4.3) e ne può, quindi, rappresentare un equivalente sintetico.[1]

[1] a) Johnson, T.; Quibell, M.; Turnell, W. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (**1993**), 2843; b) Ihara, M.; Kirihara, T.; Kawaguchi, A.; Tsuruta, M.; Fukumoto, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (**1987**), 1719; c) Marco-Contelles, J.; Bernabé, M. *Tetrahedron Lett.* (**1994**), *35*, 6361; d) Jeon, J.; Hong, S.-K.; Oh, J. S.; Kim, Y. G. *J. Org. Chem.* (**2006**), *71*, 3310



Schema 4.3: A) i) HCl 10%, THF, rt; ii) Fmoc-Val-$NHNH_2$, THF, Δ; **B)** i) HCl 3%, acetone, rt; ii) TEPA, CH_3CN, Δ; **C)** i) DIBALH, toluene, -78 °C; ii) Ph_3PCHCO_2Et, EtOH, rt; **D)** i) *i*BuOCOCl, TEA, DME, EtSH, TEA, 0 °C; ii) Pd/C 10%, Et_3SiH, $MgSO_4$, acetone, rt; iii) KHMDS, THF, 18-crown-6, $(CF_3CH_2O)_2P(O)CH_2CO_2Me$, -78 °C

Allo stesso tempo, però, la N-Cbz-2-idrossi-pirrolidina **63** può essere peraltro più facilmente ottenuta da un lattame opportuno; infatti, proteggendo il 2-pirrolidinone **64** commercialmente disponibile per trattamento con benzil cloroformiato in presenza di una base opportuna si ottiene il lattame protetto al gruppo amminico **65**, da cui, per semplice riduzione, si ottiene il prodotto desiderato **63** (Schema 4.4).



Schema 4.4: i) CbzCl, NaH, DMF, rt; ii) DIBALH, THF, -78 °C

I passaggi soprariportati sono già descritti in letteratura, ma, sempre nell'ottica di mettere a punto una sintesi la più possibile veloce ed economica, sono comunque state ricercate condizioni alternative. La protezione del lattame viene di solito effettuata per trattamento con nBuLi in tetraidrofurano (THF) anidro a -78 °C,[2] condizioni che garantiscono buoni recuperi finali, ma abbastanza laboriose dal punto di vista pratico; si è preferito quindi utilizzare una base diversa quale il sodio idruro (NaH) in

[2] Giovannini, A.; Savoia, D.; Umani-Ronchi, A. *J. Org. Chem.* (**1989**), *54*, 228

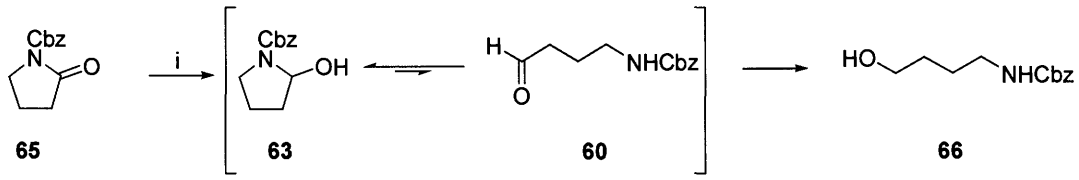
dimetilformammide a temperatura ambiente,[3] condizioni, queste, più veloci e con rese paragonabili.

La riduzione di un generico lattame protetto viene comunemente condotta con diisobutil alluminio idruro (DIBALH) in THF anidro a –78 °C;[4] cercando di utilizzare reagenti più economici e che permettano di lavorare più facilmente anche su larga scala (la formazione di sali di alluminio derivanti dal riducente spesso rende difficoltoso il recupero del prodotto desiderato), sono state ricercate condizioni di reazione diverse (Tabella 4.1).[5]

Riducente	Solvente	Tempo (min)	T (°C)	Resa (%)
DIBALH	THF	120	-78	91
$LiBH_4$	CH_3OH	5	0	90
$NaBH_4$/AcOH	Diossano	120	80	60

Tabella 4.1: condizioni di riduzione per il lattame **65**

Utilizzando, invece, $LiAlH_4$ (Schema 4.5) risulta favorita la formazione del prodotto alcolico derivante dalla riduzione dell'aminale ciclico, anche diminuendo i tempi di reazione.



Schema 4.5: i) $LiAlH_4$, THF, 0 °C

L'aminale ciclico **63** (cioè l'equivalente sintetico dell'aldeide lineare **60**) è stato quindi fatto reagire con il fosfonato **46b** derivante dalla reazione della N-Boc-L-fenilalanina con il sale di litio del metil-dimetilfosfonato.[6]

Conducendo, tuttavia, la reazione nelle condizioni abitualmente utilizzate per l'olefinazione di Horner-Emmons[7] si è ottenuto quasi esclusivamente il prodotto **67b** come miscela 1:1 dei due possibili diastereoisomeri, derivante dall'attacco nucleofilo dell'azoto carbammico legato al Cbz sul doppio legame coniugato (Schema 4.6), mentre

[3] Takeuchi, Y.; Tokuda, S.; Takagi, T.; Koike, M.; Abe, H.; Harayama, T.; Shibata, Y.; Kim, H.; Wataya, Y. *Heterocycles* (**1999**), *51*, 1869

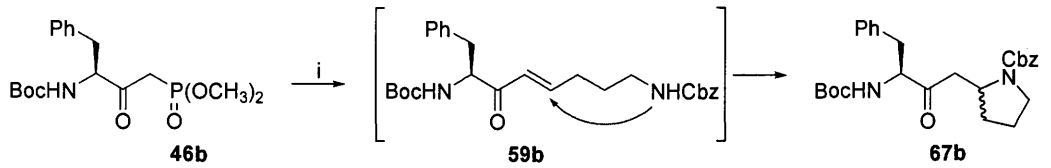
[4] a) Iwasaki, T.; Horikawa, H.; Matsumoto, K.; Miyoshi, M. *J. Org. Chem.* (**1979**), *44*, 1552; b) Dieter, R. K.; Sharma, R. R. *J. Org. Chem.* (**1996**), *61*, 4180

[5] Louwrier, S.; Tuynman, A.; Hiemstra, H. *Tetrahedron* (**1996**), *52*, 2629; b) Takeuchi, Y.; Azuma, K.; Oshige, M.; Abe, H.; Nishioka, H.; Sasaki, K.; Harayama, T. *Tetrahedron* (**2003**), *59*, 1639

[6] a) Chakravarty, P.K.; Combs, P.; Roth, A.; Greenlee, W.J. *Tetrahedron Lett.* (**1987**), *28*, 611; b) Benedetti, F.; Berti, F.; Norbedo, S. *J. Org. Chem.*, (**2002**), *67*, 8635; c) Buckley III, T.F.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* (**1981**), *103*, 6157

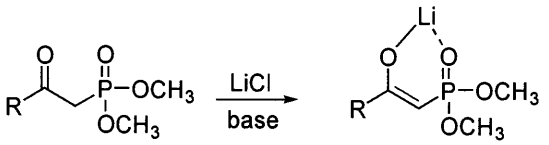
[7] Mikolajczyk, M.; Balczewski, P. *Synthesis* (**1987**), 659

il chetone α,β-insaturo **59b** risulta presente solo in tracce, anche riducendo i tempi di reazione.



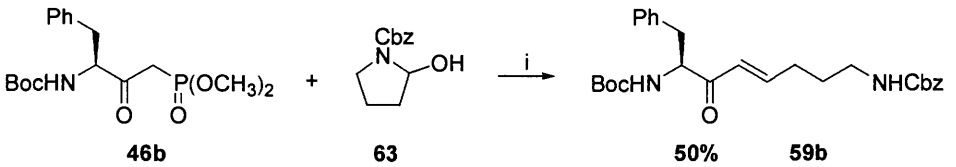
Schema 4.6: i) **63**, base, EtOH, rt

La formazione del prodotto di ciclizzazione risulta favorita tanto conducendo la reazione in etanolo con carbonato di sodio come base che in THF ed in presenza di una base molto forte quale il KO*t*Bu, oppure impiegando di-azabiciclo undecene (DBU) in presenza di LiCl.[8] Queste condizioni sono normalmente utilizzate per attivare il fosfonato in presenza di substrati sensibili alle basi (quali, ad esempio, amminochetoni e loro derivati suscettibili di epimerizzazione); il catione Li^+, infatti, formando un complesso con il fosfonato aumenta l'acidità del metilene adiacente al fosforo (Schema 4.7) che può quindi essere facilmente deprotonato utilizzando una base organica, come il diaza-biciclo undecene (DBU) oppure la di-*iso*-propiletilammina (DIPEA).



Schema 4.7: attivazione del fosfonato mediante LiCl/DBU (o DIPEA)

I risultati migliori sono stati ottenuti conducendo la reazione in presenza di K_2CO_3, ma utilizzando acetonitrile come solvente (apolare, con una elevata costante dielettrica, 36, e con buona capacità di solvatare i sali inorganici),[9] condizioni anche queste utilizzate in presenza di substrati base-sensibili.[10] Controllando i tempi di reazione così da non superare il 50% di conversione, è possibile prevenire la ciclizzazione di **59b** a **67** che si forma solo in tracce (4%) (Schema 4.8).



Schema 4.8: i) K_2CO_3, CH_3CN, rt

[8] Blanchette, M. A.; Choy, W.; Davis, J. T.; Essenfeld, A. P.; Masamune, S.; Roush, W. R. Sakai, T. *Tetrahedron Lett.* (**1984**), *25*, 2183

[9] Drago, R. S.; Purcell, K. F. "*Non-Aqueous Solvent Systems*", Ed. T. C. Waddington, Academic Press, London (**1965**), 243-248

[10] Koskinen, A. M. P.; Koskinen, P. M. *Synlett.* (**1993**), 501

Quantunque in queste condizioni la resa di **59b** non supera mai il 50%, il fosfonato **46b** e l'N-Cbz-2-pirrolidinolo **63** possono essere recuperati e riutilizzati.

4.1.2 Sintesi dell'alcol allilico 52b

Avendo a disposizione l'enone **59b**, in cui sono presenti due gruppi amminici ortogonalmente protetti la sintesi prosegue con l'ottimizzazione della riduzione.

La stereoselettività nella riduzione e, più in generale, nell'addizione di nucleofili ad α-amminochetoni è controllata dall'induzione asimmetrica e può essere spiegata utilizzando i modelli di Cram chelato[11] e di Felkin-Anh.[12] Secondo il primo modello (Fig. 4.2 A), la presenza di uno ione metallico favorisce la chelazione tra il gruppo carbonilico ed il gruppo amminico protetto, bloccando il substrato in una conformazione in cui NHR'' ed il gruppo carbonilico sono eclissati, mentre l'idrogeno ed R' sono disposti sui lati opposti del carbonile. L'attacco dell'idruro, quindi, avviene preferenzialmente dal lato del sostituente meno ingombrato portando all'alcol *anti*. Secondo il modello di Felkin-Anh (Fig. 4.2 B), invece, il substrato adotta la conformazione nella quale il gruppo NHR'' si dispone ortogonalmente al carbonile, massimizzando, così, le interazioni stereoelettroniche nello stato di transizione.[13]

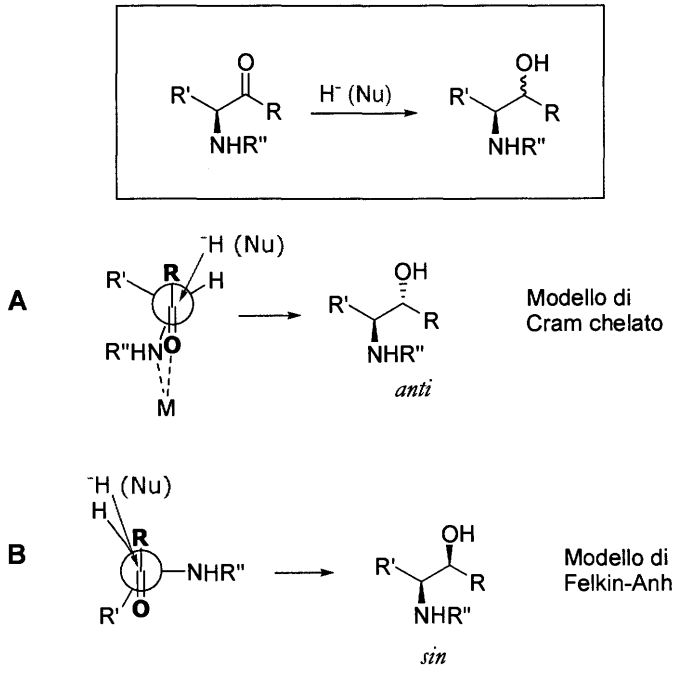


Figura 4.2: rappresentazione schematica dei modelli di Cram e Felkin-Anh per la riduzione di α-amminochetoni

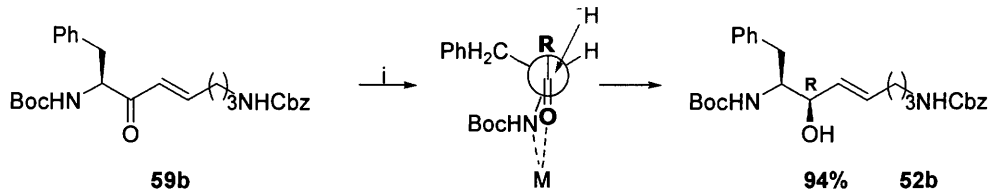
[11] a) Cram, D. J.; Abd Elhafez, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* (**1952**), *74*, 5828; b) Reetz, M. T. *Acc. Chem. Res.* (**1993**), *26*, 462; c) Mengel, A.; Reiser, O. *Chem. Rev.* (**1999**), *99*, 1191

[12] a) Felkin, H.; Chérest, M.; Prudent, N. *Tetrahedron Lett.* (**1968**), 2199; b) Anh, N. T.; Einsenstein, O. *Nouv. J. Chim.* (**1977**), *1*, 61

[13] Einsenstein, O.; Hoffmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* (**1980**), *102*, 6184

L'attacco del nucleofilo dal lato del sostituente meno ingombrato fornisce, in questo caso, il prodotto *sin*.

La riduzione del chetone α,β-insaturo **59b** con $NaBH_4$ in metanolo avviene secondo il modello di Cram-chelato. Tuttavia, essendo la catena laterale benzilica poco ingombrata, la stereoselettività è bassa e la reazione fornisce una miscela 2:1 dei due alcoli allilici diastereoisomeri (*S,R*) e (*S,S*), comunque separabili per cristallizzazione frazionata. Utilizzando invece litio tri-*tert*-butossialluminio idruro (LTBAH) in etanolo (Schema 4.9),[14] si ottiene, come unico prodotto di reazione, l'alcol allilico (*S,R*) **52b**, la cui stereochimica è stata confermata per confronto con un campione dello stesso prodotto ottenuto utilizzando il primo protocollo sintetico messo a punto (Schema 3.16).



Schema 4.9: i) LTBAH, EtOH, -78 °C

L'elevata selettività osservata nella riduzione con LTBAH può essere spiegata ipotizzando la formazione di un complesso stabile tra l'alluminio del riducente e l'ammino chetone, che subisce attacco da parte dell'idruro sulla faccia meno ingombrata secondo il modello di Cram chelato (Fig. 4.2 A). La chelazione è facilitata dalla tendenza dell'alluminio, in un solvente alcolico, a scambiare rapidamente leganti alcossidici[15] attraverso un meccanismo dissociativo;[16] se si conduce, infatti, la stessa reazione in un solvente non-alcolico, ad esempio THF, non si osserva alcuna diastereoselettività.

4.1.3 Conversione dell'alcol allilico 52b nell'isostere Phe-Pro 41b

Gli ultimi passaggi della sintesi coincidono con quelli già visti in precedenza nell'introduzione (Schema 3.16), ma vengono comunque brevemente descritti per completezza.

Il passaggio successivo è la *sin*-epossidazione del diamminoalcol (*S,R*) **52b** con acido *m*-cloroperbenzoico; sfruttando il controllo della selettività da parte dell'ossidrile libero

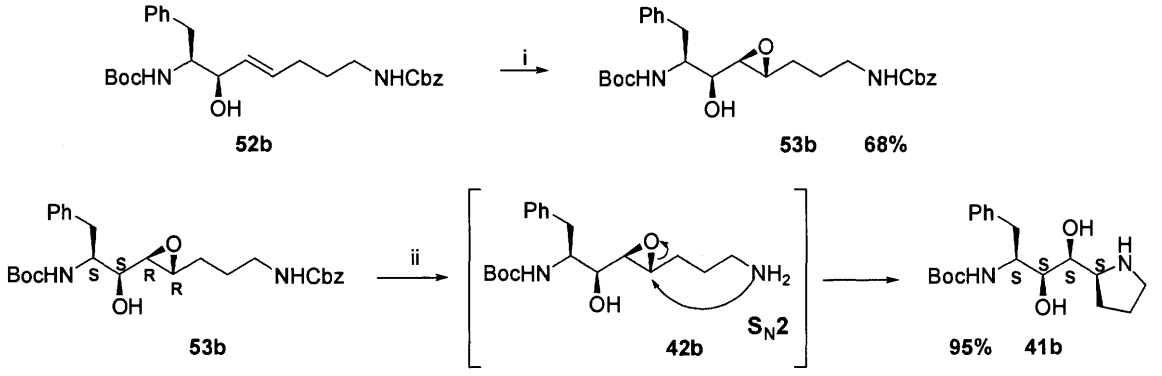
[14] Hoffman, R. V.; Maslouh, N.; Cervantes-Lee, F. *J. Org. Chem.* (**2002**), *67*, 1045

[15] a) Haubenstock, H.; Eliel, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* (**1962**), *84*, 2363; b) Brown, H. C.; Shoaf, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* (**1964**), *86*, 1079

[16] Brown, A. J.; Howarth, O. W.; Moore, P.; Parr, W. J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (**1978**), 1776

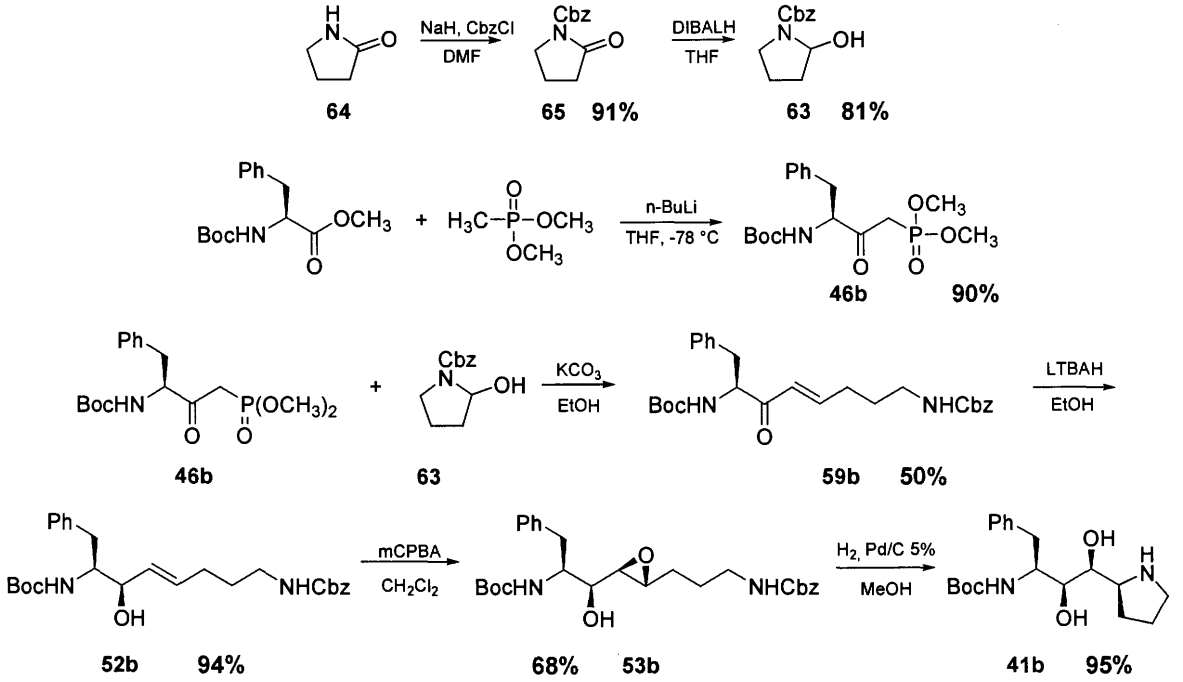
si ottiene, come unico prodotto, il *sin* epossialcol **53b** con una resa del 68% (Schema 4.10).

Il passaggio finale consiste nella rimozione del gruppo Cbz mediante idrogenazione catalitica che libera il gruppo amminico; l'epossiammina **42b** ciclizza spontaneamente, in modo *5-eso* con un meccanismo S_N2 a dare il diamminodiolo (*S,S,S,S*) **41b** con completa regio- e stereoselettività.



Schema 4.10: i) *m*CPBA, CH_2Cl_2, 0 °C; ii) MeOH, H_2, Pd/C 10%, rt

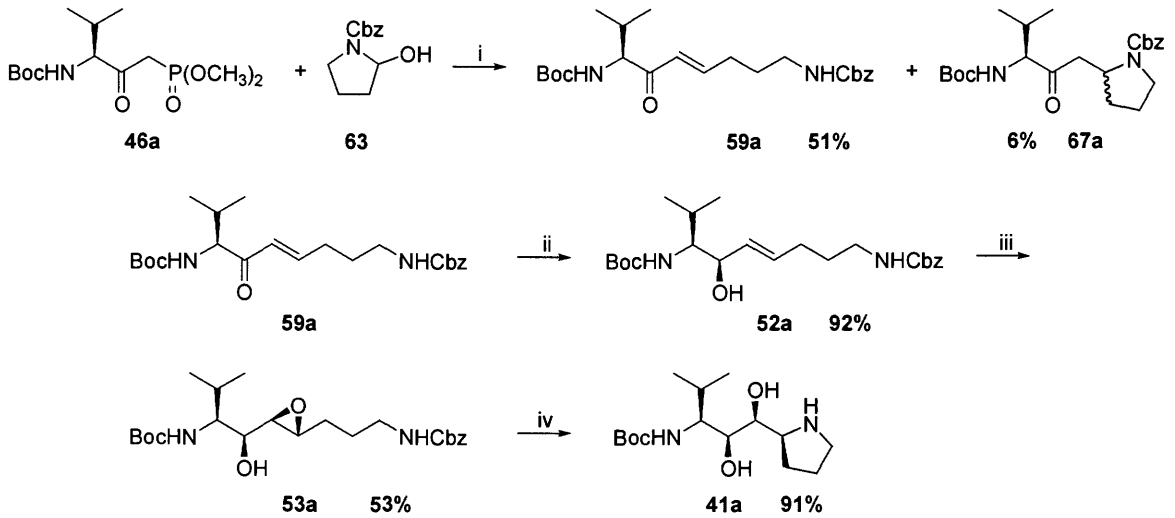
La sintesi completa dell'isostere Phe-Pro **41b**, a partire dal 2-pirrolidinone, è riportata nello schema 4.11; come si può osservare, il diamminodiolo **41b** si ottiene con una resa complessiva del 30% a partire dal fosfonato **46b**, contro il 20% della sintesi precedente (Cfr. Par. 3.3.3), e con un notevole risparmio tanto nei costi della sintesi quanto nel numero di passaggi richiesti.[17]



Schema 4.11: sintesi dell'isostere Phe-Pro **41b**

[17] Dinon, F.; Campaner, P.; Berti, F.; Tossi, A.; Benedetti, F. PCT/EP2005/052770

Lo stesso approccio è stato quindi applicato alla sintesi dell'isostere Val-[Ψ]-Pro **41a** (Schema 4.12), già sintetizzato in precedenza via riarrangiamento di Curtius (Cfr. Par. 3.4.4). In questo caso, il fosfonato **46a**, derivante dalla reazione della N-Boc-L-valina metilestere con il sale di litio del metil-dimetilfosfonato, è stato fatto reagire con il 2-Cbz-pirrolidinolo **63**, ottenendo come prodotto principale l'enone **59a**, in cui sono presenti due gruppi amminici ortogonalmente protetti, ed in piccola percentuale (6%) il prodotto di ciclizzazione intramolecolare **67a**.



Schema 4.12: i) K_2CO_3, CH_3CN, rt; ii) $NaBH_4$, MeOH, 0 °C; iii) *m*CPBA, CH_2Cl_2, 0 °C; iv) H_2, Pd/C 5%, MeOH, rt

La sintesi procede quindi con la riduzione del gruppo carbonilico: in questo caso il maggiore ingombro del gruppo isopropilico della valina garantisce una buona stereoselettività anche con $NaBH_4$ in metanolo a 0 °C (Cfr. Par. 3.4.4); si ottiene così l'alcol allilico **52a** come miscela di diastereoisomeri in rapporto 8:1. La successiva conversione di **52a** nell'isostere Val-Pro **41a** era stata già descritta.[18] Anche in questo caso la nuova sintesi permette di migliorare significativamente la resa dell'isostere che passa dal 14%, nell'approccio che parte dal valerolattone, al 23% attuale.

4.2 Introduzione di variazioni strutturali sull'isostere 41

Il nuovo ed efficiente protocollo messo a punto è stato anche utilizzato per introdurre una ampia serie di variazioni sulla struttura di base dell'isostere (Figura 4.3).

[18] Benedetti F.; Berti F.; Dinon F.; Nardin G.; Norbedo S. *Org. Lett.* (**2004**), *6*, 1017

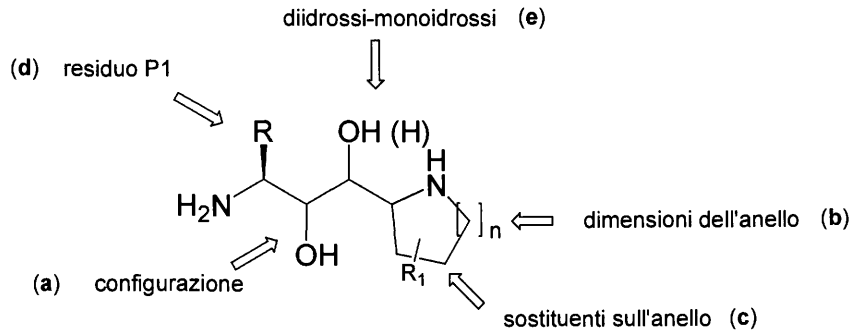


Figura 4.3: variazioni strutturali introducibili sulla struttura di base **41**

In particolare, in questa tesi l'attenzione si è rivolta alla possibilità di:

(a) variare la stereochimica dei centri chirali che vengono introdotti nel corso della sintesi

(b) variare le dimensioni dell'anello pirrolidinico corrispondente al residuo della Pro

(c) funzionalizzare lo stesso anello con opportuni sostituenti

(d) introdurre sostituenti diversi in corrispondenza del residuo P1

(e) estendere la sintesi anche a isosteri di tipo monoidrossietilenico

4.2.1 Variazione della stereochimica

E' noto che la configurazione dell'isostere può influenzare tanto l'attività *in vitro* quanto quella *in vivo* di inibitori peptidomimetici della HIV-PR.[19] La diversa orientazione spaziale degli ossidrili condiziona infatti le interazioni che il diolo instaura con i residui catalitici di aspartato e con gli altri gruppi presenti all'interno del sito attivo.[20] La possibilità di disporre di più stereoisomeri per ciascuna struttura è quindi preziosa nella ricerca della migliore attività biologica.

In una precedente tesi di dottorato[21] era stata descritta la sintesi dei due isosteri PhePro **68** e **69**, a configurazione rispettivamente (*S,R,R,R*) e (*S,R,R,S*), diastereoisomeri del diamminodiolo **41b** (*S,S,S,S*) (Schema 4.13). La sintesi, basata sull'inversione di configurazione dell'alcol allilico **48b** via ciclizzazione ad ossazolidinone[22] e sulla successiva introduzione del gruppo amminico terminale via riarrangiamento di Curtius, risultava però alquanto lunga (12 passaggi per **68** e 13 passaggi per **69**) e conseguentemente le rese erano modeste (10% e 5%, rispettivamente).

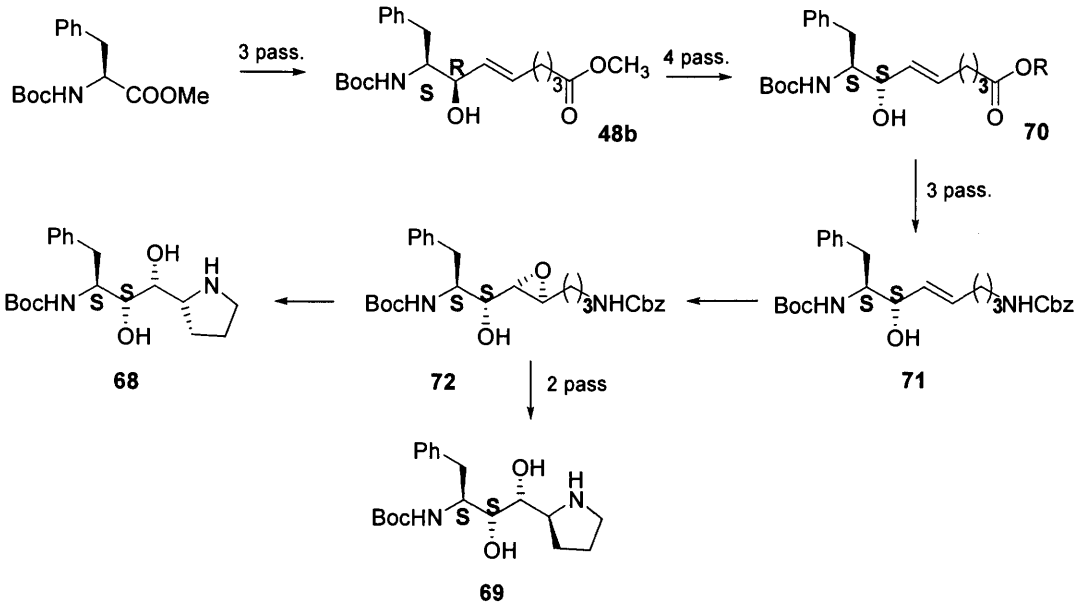
---

[19] a) K.-H. Budt, et al., *Bioorg. Med. Chem.* (**1995**), *5*, 559; b) M. V. Hosur, et al., *J. Am. Chem. Soc.* (**1994**), *116*, 847; c) J. Konvalinka, et al., *Eur. J. Biochem.* (**1997**), *250*, 559; d) Myers, A.G., et al., *J. Am. Chem. Soc.* (**2001**), *123*, 7207

[20] Hosur, M. V.; Bhat, T. N.; Kempf, D. J.; Baldwin, E. T.; Liu, B.; Gulnik, S.; Wideburg, N. E.; Norbeck, D. W.; Appelt, K.; Erickson, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* (**1994**), *116*, 847

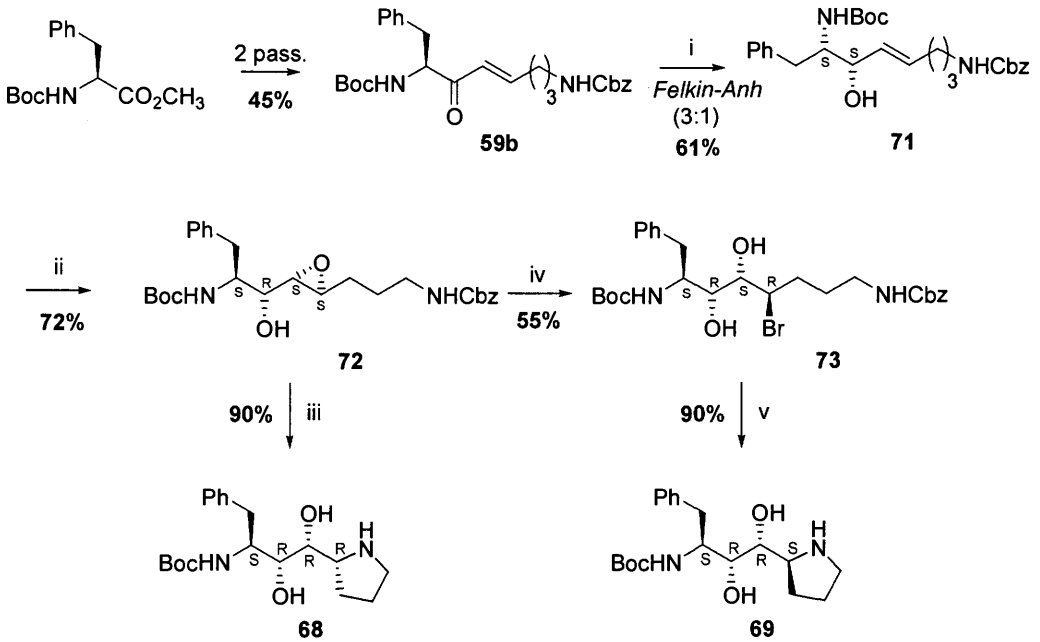
[21] Dinon, F. Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, XVI Ciclo

[22] Benedetti, F.; Norbedo, S. *Tetrahedron Lett.* (**2000**), *39*, 10071



Schema 4.13: sintesi degli isosteri **68** e **69**

E' stato possibile in questo caso migliorare sensibilmente la sintesi accoppiando l'utilizzo di N-Cbz-prolinolo **63** come precursore dell'enone **59b** a una riduzione *sin*-stereoselettiva dello stesso enone (Schema 4.14).



Schema 4.14: i) L-Selectride, MeOH, -78 °C; ii) *m*CPBA, CH_2Cl_2, 0 °C; iii) H_2, Pd/C 5%, MeOH, rt; iv) LiBr, Amberlist 15, CH_3CN, -20 °C; v) H_2, Pd/C 5%, DIPEA, MeOH.

E' stato recentemente dimostrato[23] che la riduzione di α-amminochetoni con tri-*sec*butil boroidruro (L-Selectride), in solventi polari quali il metanolo, fornisce preferibilmente amminoalcoli *sin*. Applicando queste condizioni alla riduzione dell'enone **59b**, si

[23] Rodriguez, A. C.; Picó Ramos, A.; Hawkes, G. E.; Berti, F.; Resmini, M. *Tetrahedron: Asymm.* **(2004)**, *15*, 1847

ottiene effettivamente come prodotto principale l'alcol allilico a configurazione (*S,S*) **71** (Schema 4.14), identico a quello precedentemente ottenuto per inversione di configurazione (Schema 4.13). Quantunque la stereoselettività della riduzione non sia molto alta (3:1) i due diastereoisomeri possono essere facilmente separati per semplice cromatografia su colonna di gel di silice. La sintesi procede quindi analogamente a quanto già visto per l'isostere **41b**; semplice *sin*-epossidazione condotta con acido *m*-cloroperbenzoico e la successiva rimozione della protezione benzilossicarbonilica portano all'isostere PhePro **68** (Schema 4.14). Per la sintesi dell'isostere (*S,R,R,S*) **69** è invece necessaria una doppia inversione di configurazione al carbonio epossidico: il bromo-diolo **73** è stato quindi ottenuto con una resa del 55%, per trattamento dell'epossido **72** con LiBr e Amberlist 15 in acetonitrile a –20 °C;[24] l'Amberlist 15 funge da catalizzatore acido per l'attivazione dell'anello epossidico, mentre regio- e stereo-selettività osservate sono imputabili alla formazione di un complesso tra il Li^+ ed i due ossigeni dell'epossialcol **72**. Mantenendo la temperatura a -20 °C si evita la perdita del gruppo *tert*-butossicarbonilico, che viene, invece, completamente rimosso se la reazione è condotta a temperatura ambiente. L'ultimo passaggio della sintesi è la rimozione mediante idrogenolisi del gruppo Cbz terminale, cui segue la ciclizzazione spontanea dell'epossiammina intermedia, in presenza di DIPEA, che porta al diamminodiolo (*S,R,R,S*) **85** (Schema 4.14). In questo modo la resa del diamminodiolo **68** passa da 10% (per 12 passaggi) a 18% (per soli 5 passaggi) e quella di **69** da 5% (13 passaggi) a 14% (6 passaggi).

4.2.2 Aumento delle dimensioni dell'anello pirrolidinico

La base razionale per questo tipo di modifica proviene dalla struttura cristallografica (Cfr. Par. 3.4.5) del complesso tra l'inibitore **55**, contenente l'isostere PhePro a configurazione (*S,S,S,S*) **41b**, e l'HIV-proteasi (mutante I84V) (Figura 4.4).

[24] a) Bonini, C.; Giuliano, C.; Righi, G.; Rossi, L. *Synth. Commun.* (**1992**), *22*, 1863; b) Bonini, C.; Righi, G. *Synthesis* (**1994**), 225

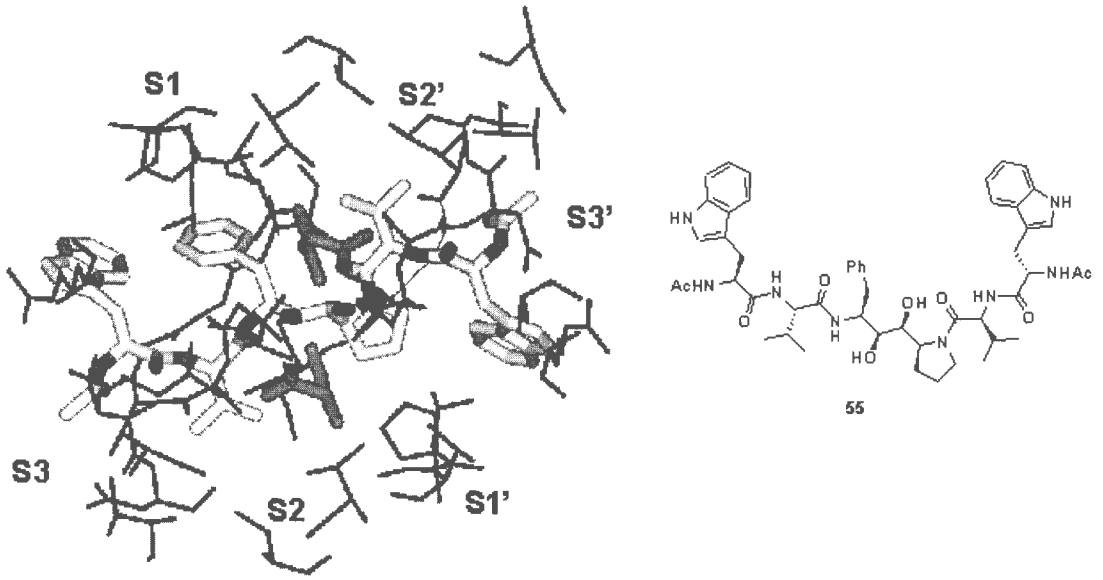


Figura 4.4: dettaglio della struttura cristallografica del complesso tra l'inibitore **55** e la HIV-proteasi mutante I84V

Dall'analisi della struttura, si può osservare come l'anello pirrolidinico non occupi completamente la tasca presente a livello del subsito S1'; in linea di principio, per poter ottimizzare le interazioni con l'enzima, e quindi l'efficienza dell'inibitore, tutto lo spazio disponibile all'interno del sito di legame dovrebbe essere occupato dall'inibitore stesso. Una simile situazione, nello sviluppo dell'inibitore commerciale Saquinavir, aveva portato alla sostituzione dell'anello della prolina presente nel lead JG365 con un raggruppamento biciclico di tipo decaidroisochinolinico (Figura 4.5).

Nel nostro caso si è cercato invece di migliorare l'occupazione del subsito S1 espandendo l'anello eterociclico che mima la prolina nella posizione P1' dell'isostere.

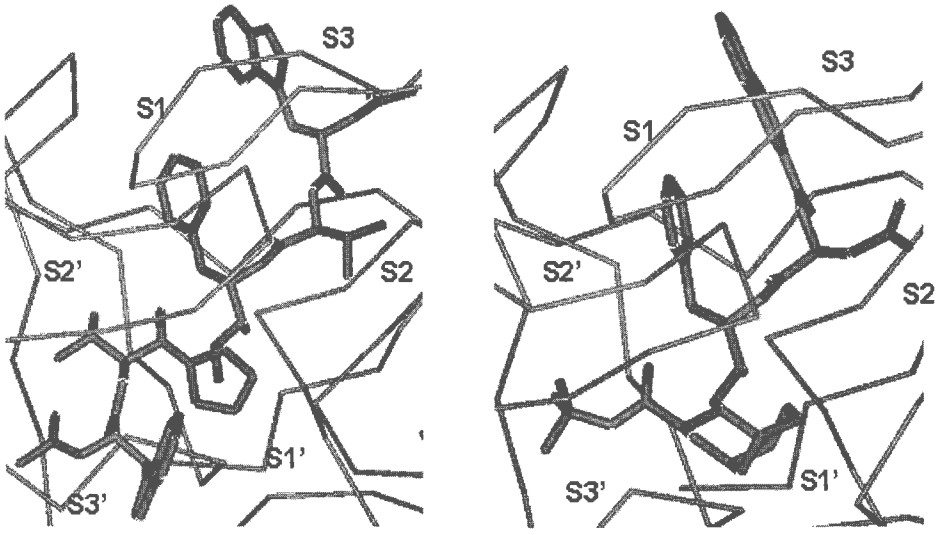
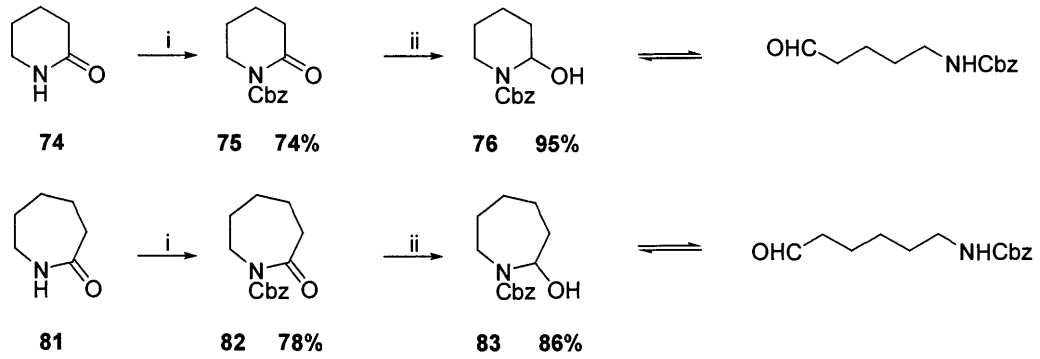


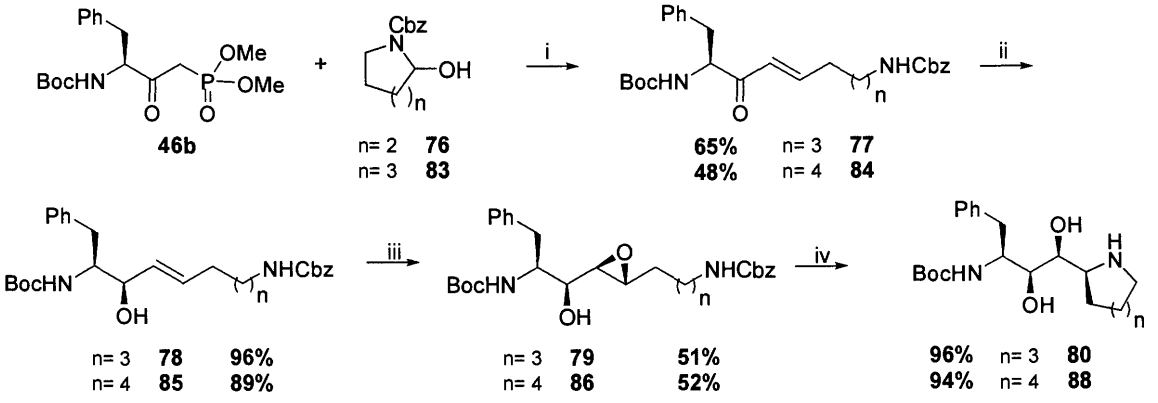
Figura 4.5: confronto tra le strutture dei complessi della HIV-PR con l'inibitore **55** (a sinistra) e con Saquinavir (a destra)

A questo scopo l'approccio generale già descritto è stato esteso ai due amminoalcoli **78** e **85**, facilmente ottenibili, rispettivamente dal δ-valerolattame **74** e dall'ε-caprolattame **81** per trattamento con benzilcloroformiato e successiva riduzione del gruppo carbonilico (Schema 4.15).



Schema 4.15: i) NaH, CbzCl, DMF, rt; ii) DIBALH, THF, - 78 °C

La sintesi procede quindi analogamente a quanto visto in precedenza, cioè (Schema 4.16) con la reazione di olefinazione di Horner-Emmons del fosfonato **46b** (con la formazione, anche in questo caso, in piccola percentuale, dei prodotti di ciclizzazione intramolecolare) e la successiva riduzione diastereoselettiva, per trattamento con LTBAH, degli enoni risultanti **77** e **84**. Quindi, per *sin*-epossidazione, in presenza di acido *m*-cloro perbenzoico, degli alcoli allilici (*S,R*) **78** e **85**, si ottengono le corrispondenti epossiammine N-Cbz protette **79** e **86**, da cui, per idrogenazione catalitica e successiva ciclizzazione intramolecolare con meccanismo S_N2, si ottengono i due nuovi isosteri **80** e **88**.



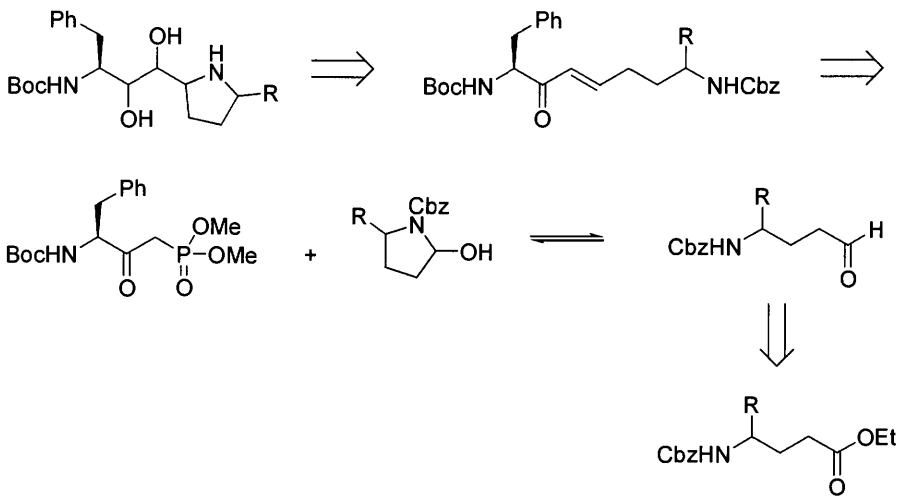
Schema 4.16: i) K_2CO_3, CH_3CN, rt; ii) LTBAH, EtOH, -78 °C; iii) *m*CPBA, CH_2Cl_2, 0 °C; iv) H_2, Pd/C 5%, MeOH, rt

In questo modo, è stato possibile ottenere, sempre in modo completamente regio- e stereoselettivo, degli isosteri in cui l'anello pirrolidinico diventa un anello a 6 (qualora si parta dal δ-valerolattame) o a 7 termini (nel caso si usi l'ε-caprolattame).

Nel caso del ciclo a 7 termini, va però precisato che la reazione di ciclizzazione risulta essere estremamente più lenta, in analogia con quanto già osservato nella ciclizzazione di epossicarbanioni;[25] infatti, mentre nel caso dei cicli a 5 e 6 termini la chiusura avviene spontaneamente, nella corrispondente reazione della epossiammina **87** (Schema 4.16) è necessario, dopo la deprotezione, riscaldare la miscela di reazione a riflusso in *i*PrOH per 48 h per avere una conversione completa nell'isostere **88**.

4.2.3 Sostituzione al C-5

E' stata inizialmente presa in considerazione l'introduzione di un sostituente nella posizione adiacente l'azoto dell'anello pirrolidinico; una semplice analisi retrosintetica riconduce gli isosteri desiderati a 2-idrossipirrolidine 5-sostituite, in equilibrio tautomerico con le corrispondenti γ-amminoaldeidi, a loro volta ottenibili per riduzione di γ-amminoacidi (Schema 4.17).



Schema 4.17: analisi retrosintetica per l'isostere in cui è presente un sostituente sull'anello pirrolidinico

Dal momento che la olefinazione delle γ-amminoaldeidi e successiva conversione negli isosteri segue l'approccio consueto, il problema si sposta sulla sintesi dei precursori γ-amminoacidi sostituiti in γ. L'omologazione di α-amminoacidi rappresenta una strategia conveniente in quanto, in questo caso, il sostituente è presente nell'amminoacido di partenza e la sua stereochimica può essere preservata.

Diverse possibilità sono proposte in letteratura per la sintesi di γ-amminoacidi (Figura 4.6).

[25] Benedetti, F.; Berti, F.; Fabrissin, S.; Gianferrara, T. *J. Org. Chem.* (**1994**), *59*, 1518

La metodologia A), cioè la doppia omologazione di Arndt-Eistert,[26] richiede l'iterazione di due passaggi identici e l'utilizzo di un reagente potenzialmente pericoloso quale il diazometano, mentre l'utilizzo di intermedi quali le tosil-aziridine (via sintetica C) ottenute a partire da α-ammino alcoli richiede condizioni molto energiche (HBr al 47% a riflusso) per la deprotezione;[27] il metodo D), infine, che pur porta ad un pirrolidinone N-protetto con un sostituente in posizione 5 come intermedio,[28] è complessivamente caratterizzato da rese modeste. Si è deciso quindi di seguire lo schema B), che è veloce, versatile e generalmente caratterizzato da buone rese.[29]

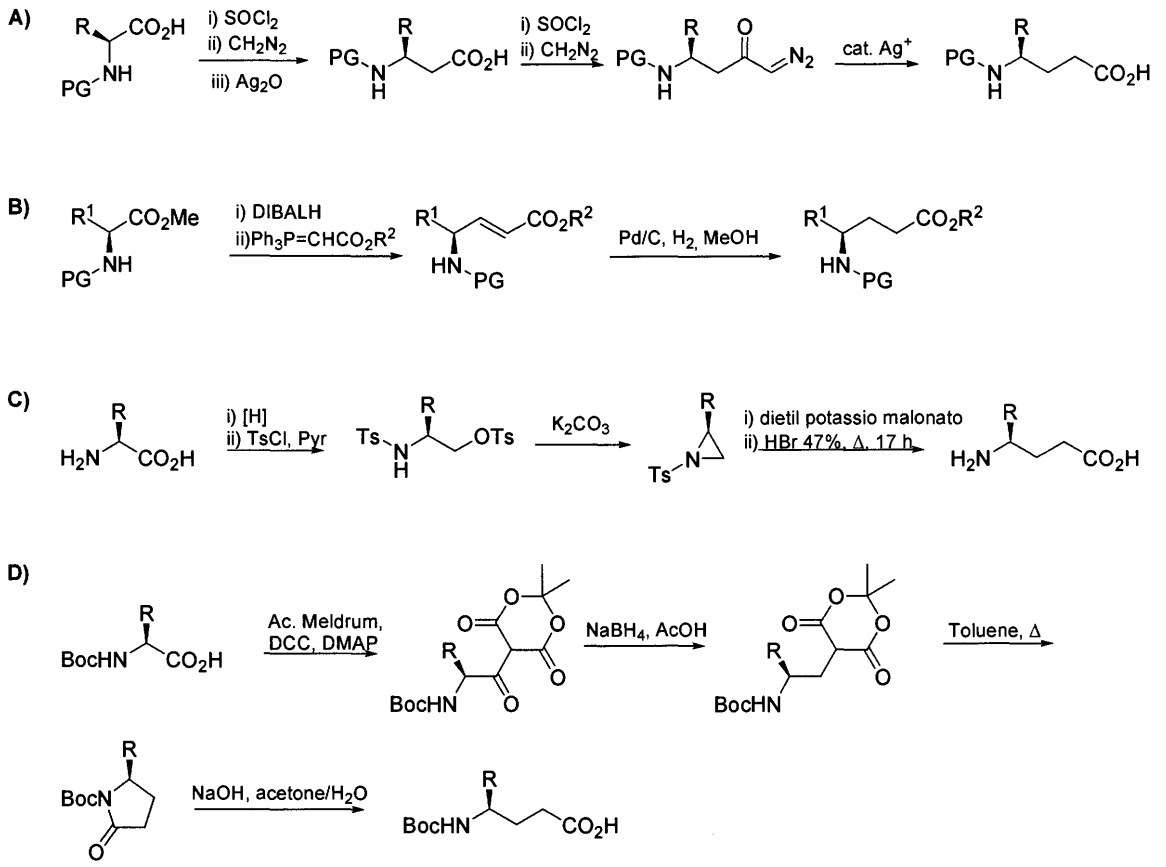
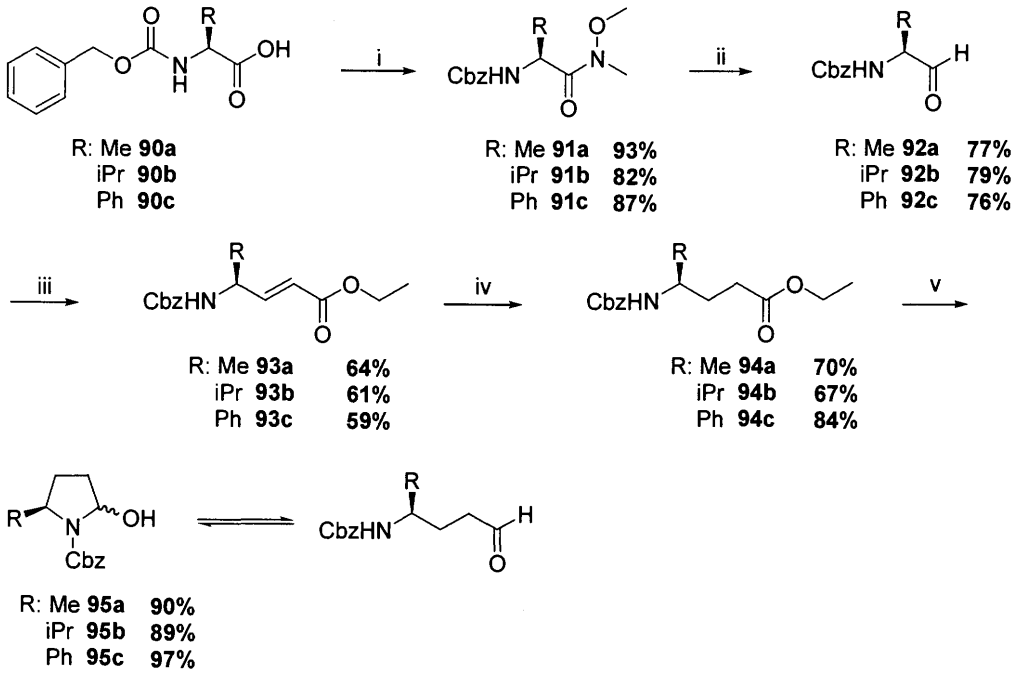


Figura 4.6: metodologie proposte in letteratura per l'omologazione di α-amminoacidi

Lo schema effettivamente seguito per l'omologazione (Schema 4.18) prevede la trasformazione dell'α-amminoacido (L-alanina, L-valina, L-fenilglicina), protetto all'azoto come Cbz, nella corrispondente ammide di Weinreb,[30] che, per trattamento

[26] a) Buchschacher, P.; Cassal, J. M.; Furst, A.; Meier, W. *Helv. Chim. Acta* (**1977**), 2747; b) Boeglin, D. ; Heitz, A. ; Martinez, J.; Fehrentz, J.-A. *Eur. J. Org. Chem.* (**2003**), 3139
[27] Tseng, C. C.; Terashinma, S.; Yamada, S. *Chem. Pharm. Bull.* (**1977**), *25*, 29
[28] Smreina, M.; Majer, P.; Majerova, E.; Guerassina, T. A.; Eissenstat, M. A. *Tetrahedron* (**1997**), *53*, 12867
[29] Hanessian, S.; Schaum, R. *Tetrahedron Lett.* (**1997**), *38*, 163
[30] Fehrentz, J.-A.; Castro, B., *Synthesis* (**1983**), 676

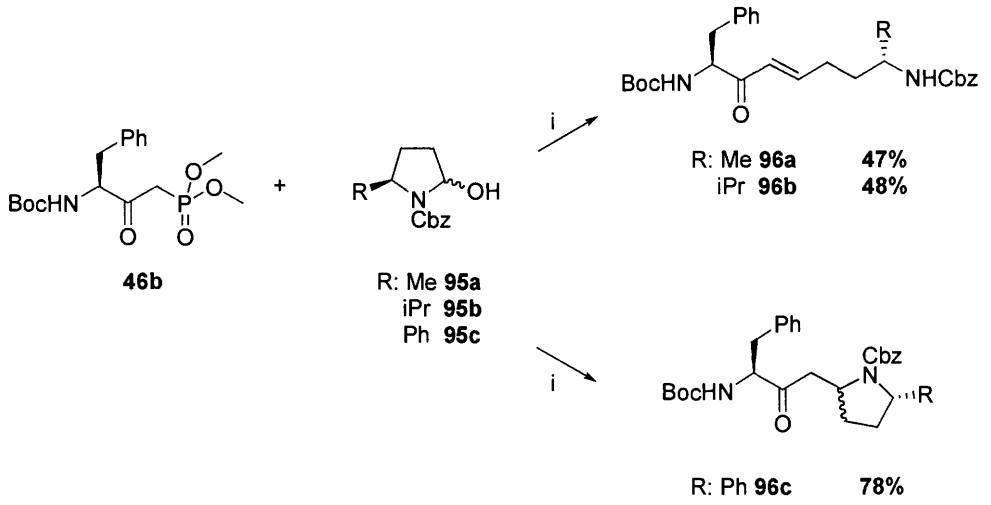
con $LiAlH_4$, porta all'aldeide.[31] Questa viene fatta reagire con trietil-fosfono acetato in THF anidro a -78 °C in presenza di KO*t*Bu a dare un etilestere α,β-insaturo,[32] che, per idrogenazione catalitica chemoselettiva in presenza di $Pd/BaSO_4$[33] porta all'etil estere del corrispondente γ-amminoacido (l'utilizzo di catalizzatori diversi quali Pd/C al 5% o 3% comporta un parziale distacco della protezione benzilossicarbonilica dal gruppo amminico).[34] Infine la riduzione del gruppo estereo con DIBALH in diclorometano anidro a –78 °C porta all'aldeide desiderata sotto forma di aminale ciclico.



Schema 4.18: i) N,O-dimetilidrossilammina cloridrato, NMM, *i*BuCOCl, DCM, -15 °C; ii) $LiAlH_4$, THF, 0 °C; iii) TEPA, KO*t*Bu, THF, -78 °C; iv) $Pd/BaSO_4$, H_2, MeOH, rt; v) DIBALH, DCM, -78 °C

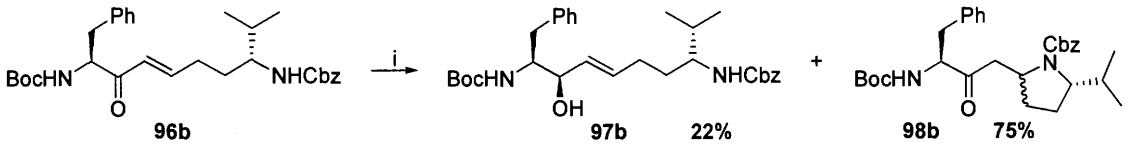
Così ottenuti gli aminali N-Cbz protetti **95a** e **95b**, seguendo un approccio del tutto analogo a quello seguito per la sintesi degli isosteri Phe-Pro già descritti, li si è fatti reagire, nelle condizioni di olefinazione di Horner-Emmons, con il fosfonato derivante dalla Boc-L-fenilalanina metilestere **46b**, ottenendo gli enoni **96a** e **96b**, in cui sono presenti due estremità amminiche ortogonalmente protette e un sostituente, con stereochimica definita, adiacente al gruppo amminico terminale Cbz protetto (Schema 4.19). Nel caso dell'aminale **95c** la reazione porta invece alla esclusiva formazione del prodotto **96c**, dovuto alla addizione intramolecolare del secondo gruppo amminico sul doppio legame dell'enone e quindi la sintesi è stata abbandonata per R = Ph.

[31] Schirlin, D.; Baltzer, S.; Altenburger, J.M.; Tarnus, C.; Remy, J.M. *Tetrahedron* (**1996**), *52*, 305
[32] Murray, W.V.; Sun, S.; Turchi, I.J.; Brown, F.K.; Gauthier, A. D. *J. Org. Chem.* (**1999**), *64*, 5930
[33] Ghosh, A. K.; Krishnan, K. *Tetrahedron Lett.* (**1998**), *39*, 947
[34] Misiti, D.; Zappia, G.; Delle Monache, G. *Synthesis* (**1999**), *5*, 873



Schema 4.19: i) K_2CO_3, CH_3CN, rt

La successiva riduzione dell'enone **96b** per trattamento con LTBAH ha portato però, a differenza di quanto osservato per gli enoni precedentemente descritti, ad una miscela di prodotti, costituita dall'alcol allilico **97b** desiderato, a configurazione (*S,R,S*), e, in maggior quantità (circa il 75%), al prodotto **98b**.



Schema 4.20: i) LTBAH, ETOH, -78 °C

La propensità alla ciclizzazione osservata in questo caso potrebbe dipendere da due fattori:

- la basicità del riducente che può promuovere la deprotonazione del carbammato rendendolo più nucleofilo.
- un effetto conformazionale, dovuto alla presenza del sostituente sulla catena che ciclizza. E' noto infatti che lunghe catene alchiliche non funzionalizzate assumono in soluzione una conformazione estesa sfavorevole alla ciclizzazione (Figura 4.7 A); nel caso, invece, uno dei metileni porti uno o più sostituenti, anche nella posizione adiacente all'eventuale gruppo nucleofilo (nel caso in esame il gruppo NHCbz), le conformazioni *anti* o *gauche* del legame C-C adiacente la sostituzione si equivalgono energicamente, con conseguente aumento delle probabilità che la catena assuma la conformazione piegata necessaria per la ciclizzazione (Figura 4.7 B).[35] Questo effetto è particolarmente marcato quando sulla catena sono presenti due sostituenti in posizione

[35] Allinger, N. L.; Zalkow, V. *J. Org. Chem.* (**1960**), *25*, 701

geminale (effetto *gem*-dimetilico)[36] ma è avvertibile anche nel caso sia presente un unico sostituente.

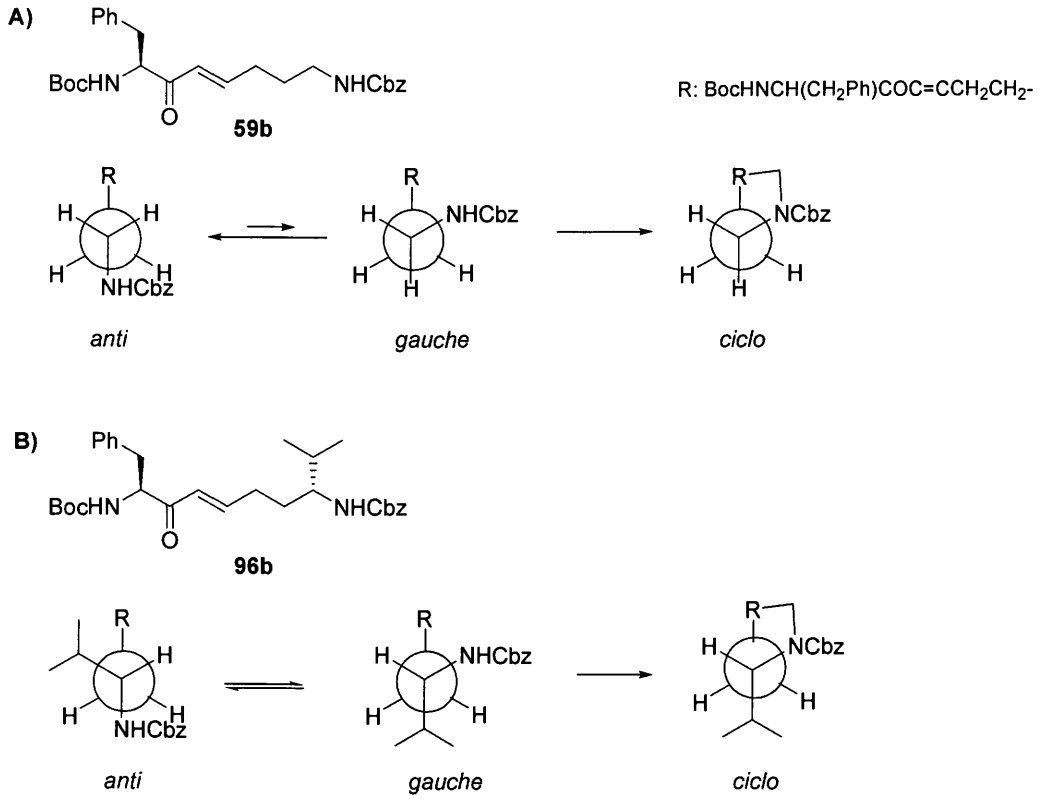
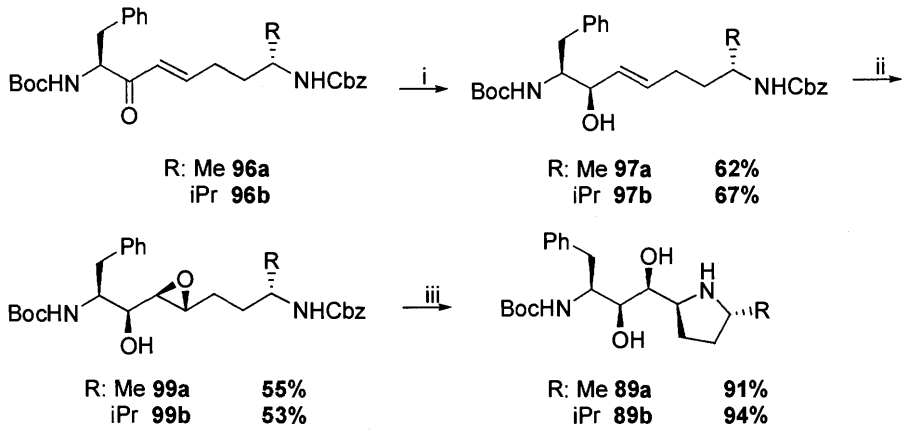


Figura 4.7: proiezioni di Newman per la ciclizzazione dell'enone non sostituito **59b** (**A**) e **96b** (**B**)

Assumendo quindi che la ciclizzazione dell'enone **96b** sia almeno in parte imputabile anche alle caratteristiche del riducente e alla sua basicità (l'unico parametro che può essere variato in questo caso), si è preferito utilizzare un riducente meno basico, anche se a spese della diastereoselettività. La riduzione è stata perciò condotta con $LiBH_4$ in MeOH a -15 °C ($NaBH_4 \cdot CeCl_3$ ha dato gli stessi risultati), ottenendo una miscela 3:1 di alcoli (*S,R,S*) e (*S,S,S*), che sono facilmente separabili per cromatografia flash su colonna di gel di silice. Gli alcoli allilici **97a,b** (*S,R,S*) così ottenuti sono stati epossidati con *m*CPBA in diclorometano ottenendo i corrispondenti *sin* epossialcoli **99a,b**. Infine, per idrogenazione catalitica su Pd/C 5%, in seguito alla rimozione della protezione benzilossicarbonilica dall'estremità amminica e conseguente ciclizzazione intramolecolare 5-*eso*, si ottengono gli isosteri **89a** e **89b** (Schema 4.21).

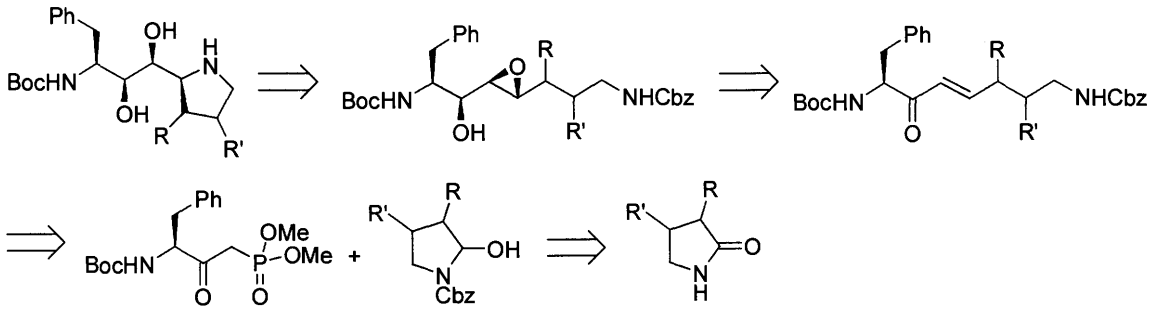
[36] Jung, M. E.; Piizzi, G. *Chem. Rev.* (**2005**), *105*, 1735



Schema 4.21: i) $LiBH_4$, MeOH, -15 °C; ii) *m*CPBA, CH_2Cl_2, 0 °C; iii) H_2, Pd/C 5%, MeOH, rt

4.2.4 Sostituzione al C3 e C4

Come ulteriore esempio di isostere sostituito è stata presa in considerazione la doppia sostituzione al C3 e C4 dell'anello della prolina. In questo caso (Schema 4.22) risulta conveniente ricondurre l'anello sostituito a un γ-lattame; infatti la sintesi di questi composti, anche in forma enantiomericamente pura,[37] è ben documentata in letteratura.



Schema 4.22: analisi retrosintetica per l'isostere in cui sono presenti due sostituenti sull'anello pirrolidinico

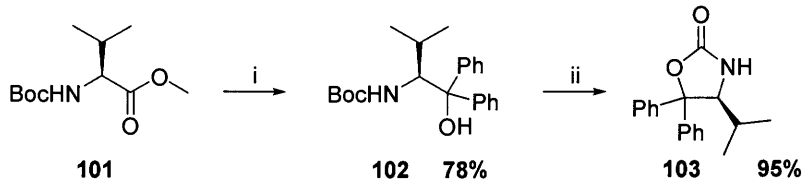
A titolo di esempio, si è deciso di utilizzare come lattame di partenza l'N-Cbz-(3*R*,4*S*)-3-metil-4-fenilpirrolidin-2-one **107**, che reca due sostituenti (Me e Ph) che possono garantire un miglior riempimento del subsito S_1' da parte dell'anello pirrolidinico (Cfr. Figure 4.4 e 4.5) e la cui sintesi è già nota.[38] La sintesi utilizza il 4-(*S*)-isopropil-5,5-difenilossazolidin-2-one **103** come ausiliario chirale,[39] che viene sintetizzato in due

[37] a) Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R. *Chem. Rev.* (**1996**), *96*, 835; b) Akiba, T.; Tamura, O.; Hashimoto, M.; Kobayashi, Y.; Katoh, T.; Nakatani, K.; Kamada, M.; Hayakawa, I.; Terashima, S. *Tetrahedron* (**1994**), *50*, 3905; c) Evans, D. A.; Bartroli, H.; Shih, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* (**1981**), *103*, 2127; d) Evans, E. A.; Sjogren, E. B. *Tetrahedron Lett.* (**1985**), *26*, 3788; e) Bonner, M. P.; Thornton, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* (**1991**), *113*, 1299; f) Davies, S. G.; Sanganee, H. J. *Tetrahedron: Asymm.* (**1995**), *6*, 671; g) Cividino, P.; Py, S.; Delair, P.; Greene, A. E. *J. Org. Chem.* (**2007**), *72*, 485

[38] Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* (**1999**), *82*, 2365

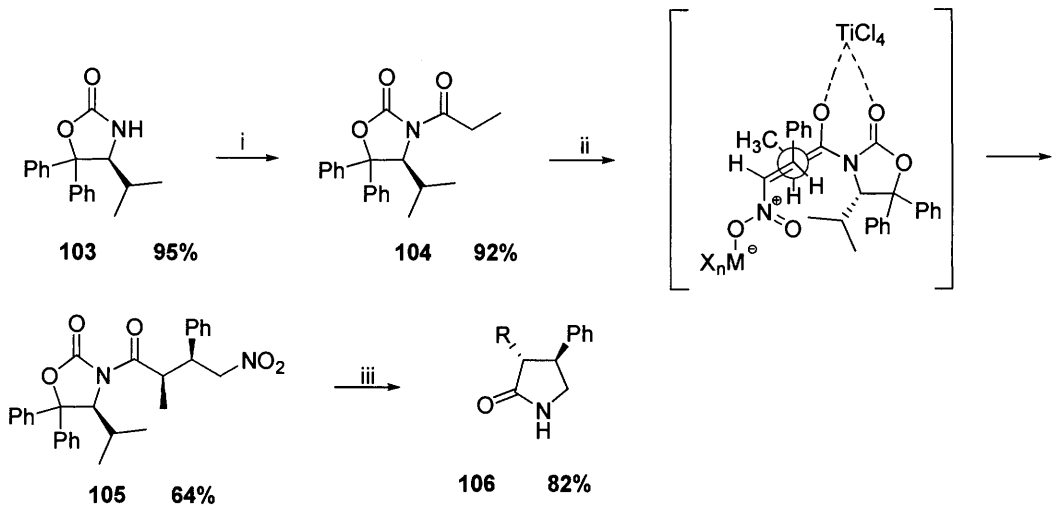
[39] a) Hintermann, T.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* (**1998**), *81*, 2093; b) Alexander, K.; Cook, S.; Gibson, C. L.; Kennedy, A. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (**2001**), 1538

passaggi dal metil estere della N-Boc-L-Valina metilestere **101**, come descritto nello Schema 4.23.[40]



Schema 4.23: i) PhMgBr, THF, -40 °C; ii) NaH 60%, THF, rt

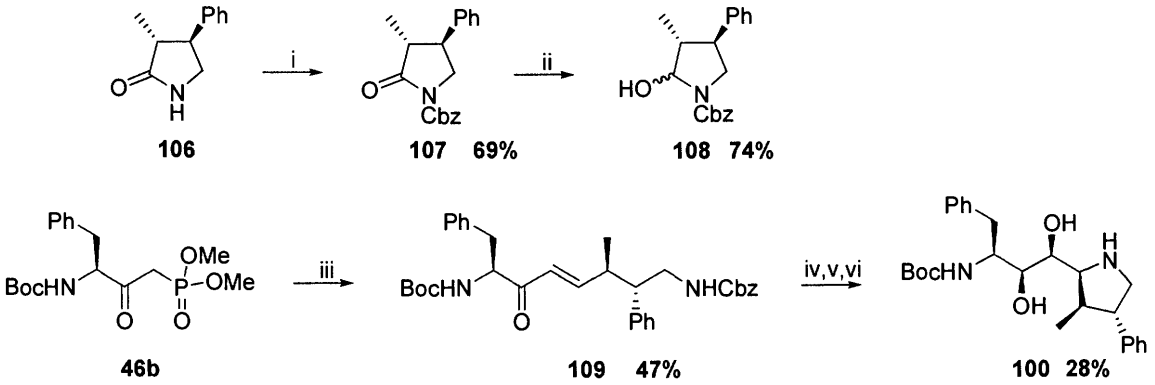
L'ausiliario **103** viene quindi acilato e, mediante addizione di β-nitrostirene al corrispondente enolato di titanio e successiva idrogenazione catalitica,[41] si ottiene con buone rese il lattame **106** assieme all'ausiliario **103** che viene così rigenerato (Schema 4.24).



Schema 4.24: i) NaH, propionil cloruro, DMF, rt; ii) $TiCl_4$, DIPEA, β-nitrostirene, DCM, -78 °C; iii) H_2, Ni Raney, EtOH/EtOAc, rt

La sintesi continua quindi analogamente a quanto già più volte descritto (Schema 4.25), cioè con la protezione del lattame mediante trattamento con benzilossicarbonil cloruro e sua riduzione a dare il corrispondente aminale ciclico **108**; dalla reazione di olefinazione di Horner-Emmons si recupera l'enone **109**, che viene ridotto, in questo caso con $NaBH_4$ a dare l'alcol allilico corrispondente, come miscela 1:3 di diastereoisomeri *sin* e *anti*. Il diastereoisomero desiderato viene separato per cromatografia, *sin*-epossidato e successivamente sottoposto ad idrogenazione catalitica che porta all'isostere **100**.

[40] Delair, P.; Einhorn, C.; Einhorn, J.; Luche, J. L. *J. Org. Chem.* (**1994**), *59*, 4680
[41] Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Jaun, B. *Chem. Eur. J.* (**2002**), *8*, 573



Schema 4.25: i) CbzCl, NaH, DMF, rt; ii) DIBALH, THF, -78 °C; iii) **108**, K_2CO_3, CH_3CN, rt; iv) $NaBH_4 \cdot CeCl_3$, MeOH, 0 °C; v) *m*CPBA, CH_2Cl_2, 0 °C; vi) H_2, Pd/C 5%, MeOH, rt

4.2.5 Sostituzione con un anello condensato

Come ultimo esempio di sostituzione è stata presa in considerazione l'introduzione di un fenile condensato tra le posizioni 4,5 e 3,4 dell'anello della pirrolidina (Figura 4.8). Applicando la solita analisi retrosintetica, i due isosteri **112** e **117** possono essere ricondotti, rispettivamente, alla 2-idrossi indolina **115** e alla 1-idrossi isoindolina **121**.

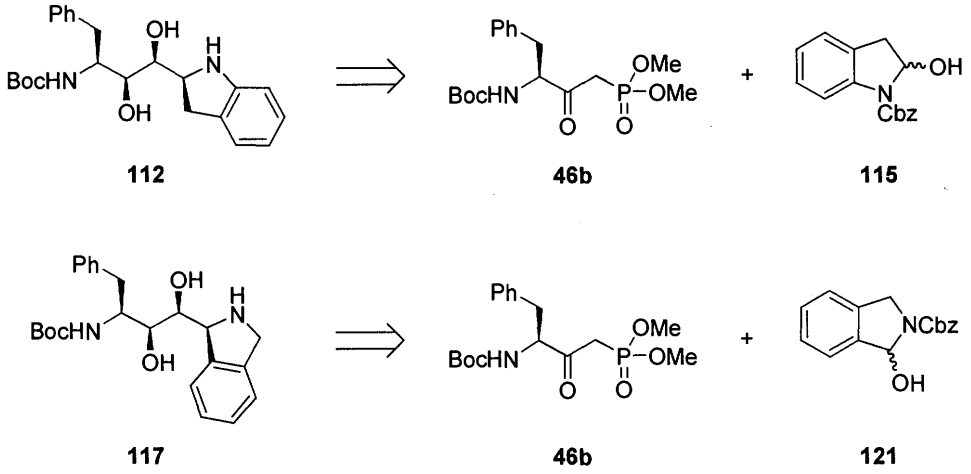
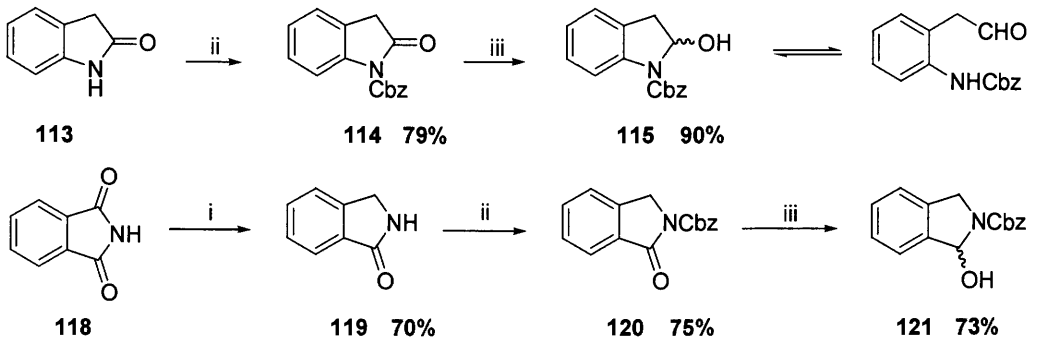


Figura 4.8: isosteri contenenti residui aromatici condensati sull'anello pirrolidinico

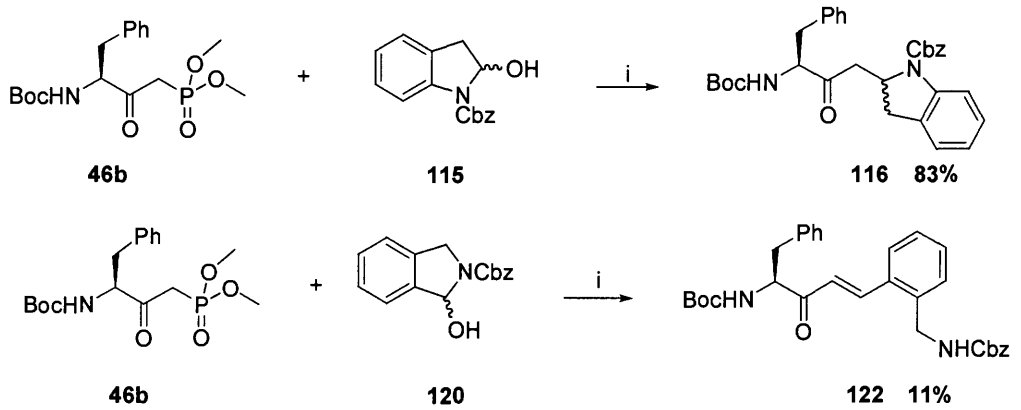
I due precursori **115** e **121** sono quindi stati ottenuti, secondo l'approccio consueto, a partire dal 2-indolinone **113**[42] e dall'isoindolinone **119**,[43] come riportato nello Schema 4.26.

[42] Rajeswaran, W.G.; Cohen, L. A. *Tetrahedron* (**1998**), *54*, 11375
[43] Norman, M.H.; Minick D.J.; Rigdon, G.C. *J. Med. Chem.* (**1996**), *39*, 149



Schema 4.26: i) AcOH/HCl, Sn, Δ; ii) CbzCl, NaH, DMF, rt; iii) DIBALH, THF, -78 °C

Dalla reazione di olefinazione dell'amminoalcol **115** con il fosfonato della Boc-L-Phe **46b** si ottiene, tuttavia, esclusivamente il prodotto di ciclizzazione **116,** come miscela dei due possibili diastereoisomeri in rapporto circa 1:1 (Schema 4.27). Nel caso dell'isomero **121**, a temperatura ambiente si ottiene l'enone desiderato, ma in resa del tutto insoddisfacente (11%), mentre a caldo si ottiene, anche in questo caso, il solo prodotto di ciclizzazione.



Schema 4.27: i) K_2CO_3, CH_3CN, rt

Altrettanto scoraggiante è stato il tentativo di ottenere l'isostere **112** con un approccio radicalmente diverso, basato sulla *sin*-diidrossilazione del corrispondente alchene **123** (Figura 4.9).

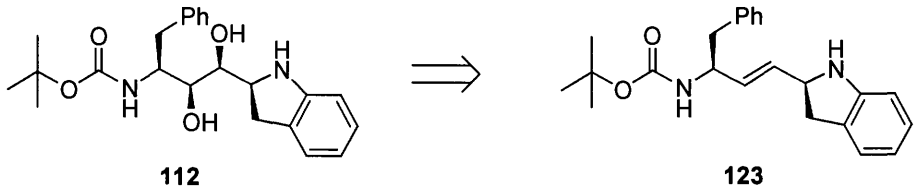
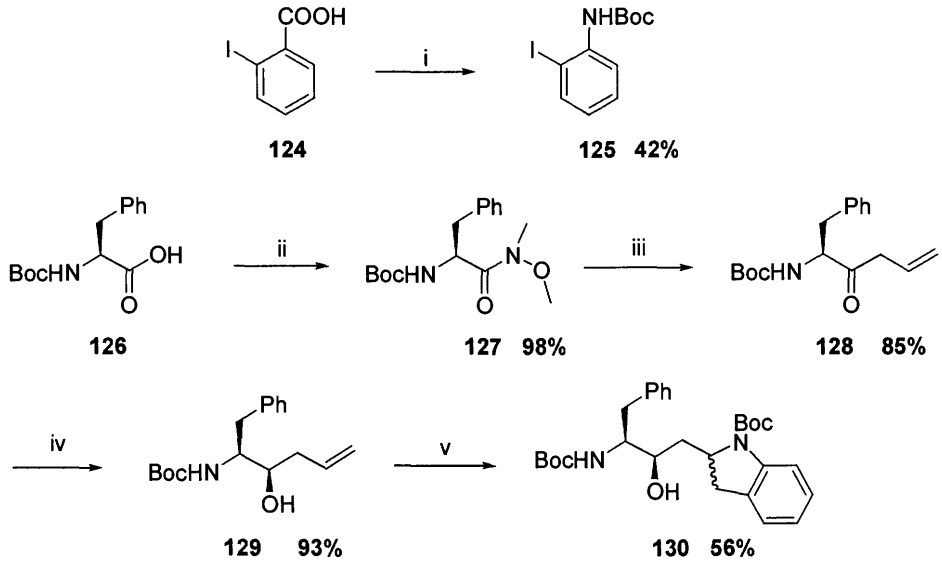


Figura 4.9: approccio retrosintetico alternativo

La sintesi di tale alchene è stata intrapresa a partire dalla Boc-L-Phe **126** (Schema 4.28), la cui ammide di Weinreb **127** viene fatta reagire con allil magnesio bromuro per dare il chetone **128**, in cui è presente un doppio legame terminale.[44] La riduzione dell'ammino

[44] Kranz, M.; Kessler, H. *Tetrahedron Lett.* (**1996**), *37*, 5359

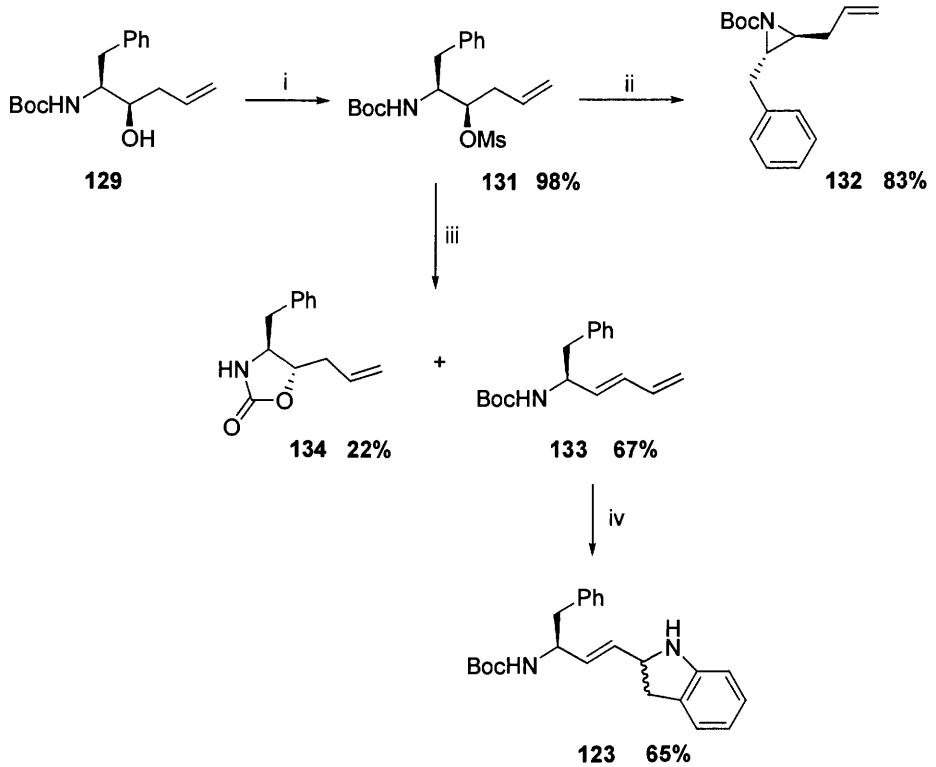
chetone con LTBAH porta ad un unico alcol allilico a configurazione (*S,R*) **129**, ma la reazione di quest'ultimo con la 2-iodo-anilina opportunamente protetta (**125**)[45] nelle condizioni previste dalla reazione di Heck[46] non porta al prodotto **130** atteso.



Schema 4.28: i) *t*BuOH, TEA, $(PhO)_2PON_3$; ii) *i*BuCOCl, NMM, N,O-idrossilammina cloridrato, DCM, -15 °C; iii) allil magnesio bromuro, THF, -40 °C; iv) LTBAH, EtOH, -78 °C; v) **125**, $Pd(OAc)_2$, Na_2CO_3, DMF, Δ

L'alcool **129** è stato quindi convertito nel corrispondente mesilato **131** (Schema 4.29); la reazione del mesilato con KO*t*Bu porta esclusivamente alla formazione della aziridina **132** mentre, per trattamento del mesilato con DBU, si ottiene il diene coniugato **133** assieme all'ossazolidinone **134** che deriva dall'attacco del carbonile del Boc sul mesilato.[47] Infine, la reazione di Heck del diene **133** con la 2-iodo-anilina **125** porta effettivamente all'alchene desiderato (**123**) che però si ottiene come miscela 1:1 dei due possibili diastereoisomeri che non è stato possibile separare. Anche questa strada, peraltro alquanto tortuosa, è stata quindi abbandonata.

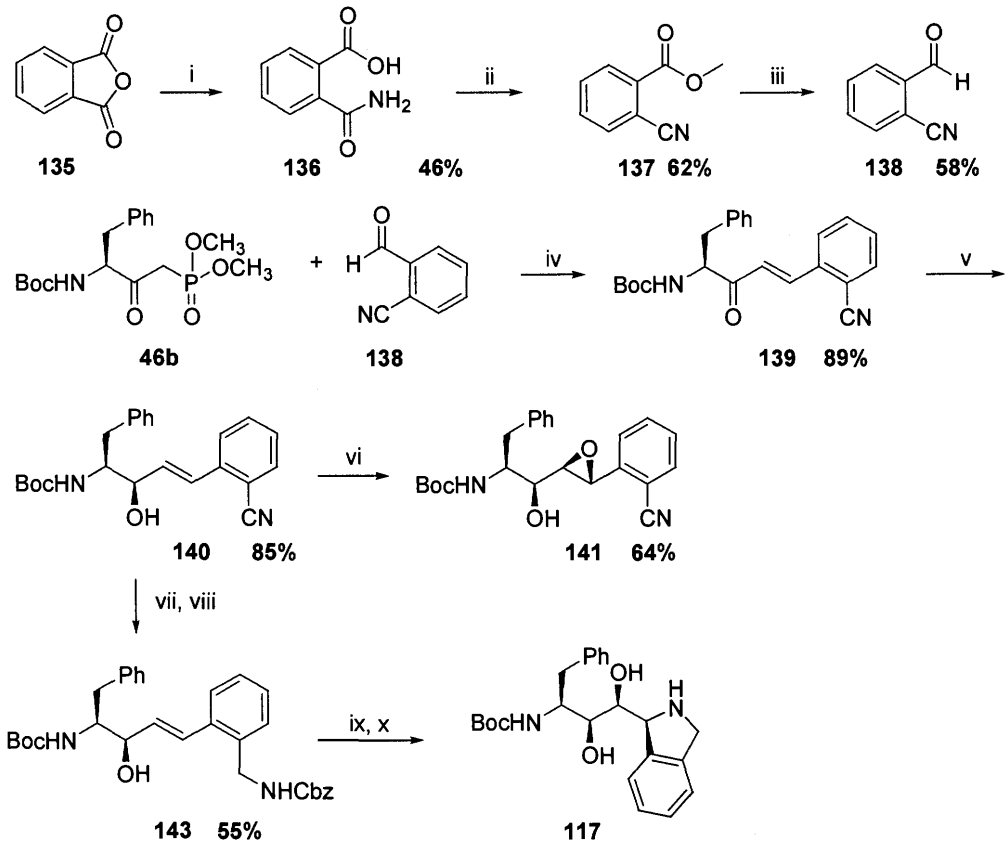
[45] Wensbo, D.; Gronowitz, S. *Tetrahedron* (**1990**), *52*, 14975
[46] Larock, R.C.; Barrios-Pena, N.; Narayanan, K. *J. Org. Chem.* (**1990**), *55*, 3447
[47] Benedetti, F.; Norbedo, S. *Tetrahedron Lett.* (**2000**), *39*, 10071



Schema 4.29: i) MsCl, TEA, DCM, 0 °C; ii) KO*t*Bu, THF, -78 °C; iii) DBU, toluene, Δ; iv) N-Boc-2-iodo anilina, $Pd(OAc)_2$, Na_2CO_3, DMF, Δ

Più promettente appare attualmente l'approccio riportato nello Schema 4.30; questa sintesi parte dalla 2-ciano benzaldeide **138** (ottenuta dall'anidride ftalica **135**, attraverso il corrispondente acido ftalamico **136**)[48] che viene fatta reagire con il fosfonato della Boc-Phe-OMe **46b**, portando al corrispondente enone **139** con buone rese. L'enone è stato quindi convertito nel corrispondente alcol allilico (*S,R*) **140**, che è stato quindi epossidato per trattamento con *m*CPBA in diclorometano a 0 °C (**141**). Qualsiasi tentativo di riduzione del nitrile a gruppo amminico (Pd/C al 10%, 5%, 3%, $Pd/BaSO_4$, PtO_2) ha portato alla contemporanea riduzione dell'epossido a 1,3-diolo. Il trattamento, del alcol allilico **140** con $BH_3 \cdot Me_2S$ non presenta invece problemi (con $LiAlH_4$ e $NaBH_4 \cdot NiCl_2$ si ha la contemporanea riduzione del doppio legame) e, dopo protezione, si ottiene l'ammina **143**. La semplice epossidazione e deprotezione di quest'ultima, secondo quanto visto in precedenza, dovrebbe portare all'isostere **117.**

[48] Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* (**1962**), *84*, 2196

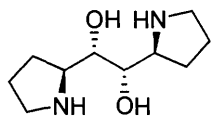


Schema 4.30: i) NH_3 conc; ii) MsCl, MeOH, Pyr; iii) DIBALH, THF, -78 °C; iv) K_2CO_3; EtOH, rt; v) LTBAH, EtOH, -78 °C; vi) *m*CPBA, DCM, 0 °C; vii) $BH_3 \cdot$ DMS 1N, THF, 0 °C; viii) CbzOSu, TEA, DCM; ix) *m*CPBA, DCM, 0 °C; x) H_2, Pd/C, MeOH, rt

La sintesi descritta, pur portando ad un alcol allilico in cui sono presenti due estremità amminiche ortogonalmente protette e che potrà facilmente essere trasformato nel corrispondente epossido e quindi, mediante idrogenazione catalitica, nell'isostere **117**, è abbastanza laboriosa e richiede sicuramente la ricerca di condizioni di reazione migliori.

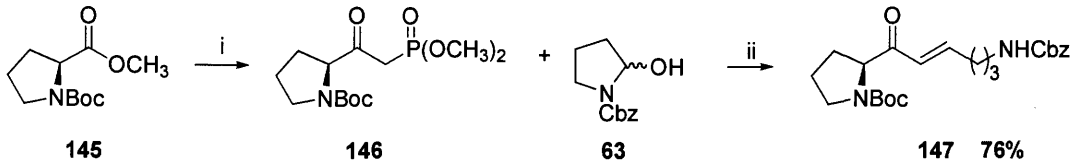
4.2.6 Il residuo P1

Vista la simmetria C_2 della HIV-proteasi (Cfr. Par. 2.3.1 e Figura 2.3) e la specificità di questo enzima per sequenze peptidiche in cui sia presente la prolina (Cfr. Par. 2.3.4), si è scelto, come ulteriore esempio di variazione a livello del residuo P1, di sintetizzare l'isostere diamminodiolico **144**, contenente due anelli pirrolidinici correlati da un asse simmetria C_2. La sintesi di questo composto rappresenta anche un test della validità del metodo, vista la ben nota tendenza dei derivati della prolina a discostarsi dalla comune reattività associata agli altri amminoacidi.



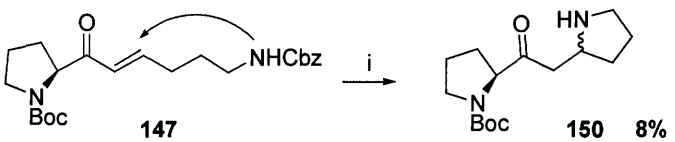
144

La sintesi parte dal metil estere della N-Boc-L-prolina **145** che viene convertito nel corrispondente fosfonato **146** e fatto quindi reagire con il 2-pirrolidinolo Cbz protetto **63**, in acetonitrile e in presenza di K_2CO_3,[49] a dare il *trans*-enone **147** (J=15.7 Hz) in cui sono già presenti le due estremità amminiche ortogonalmente protette (Schema 4.31).



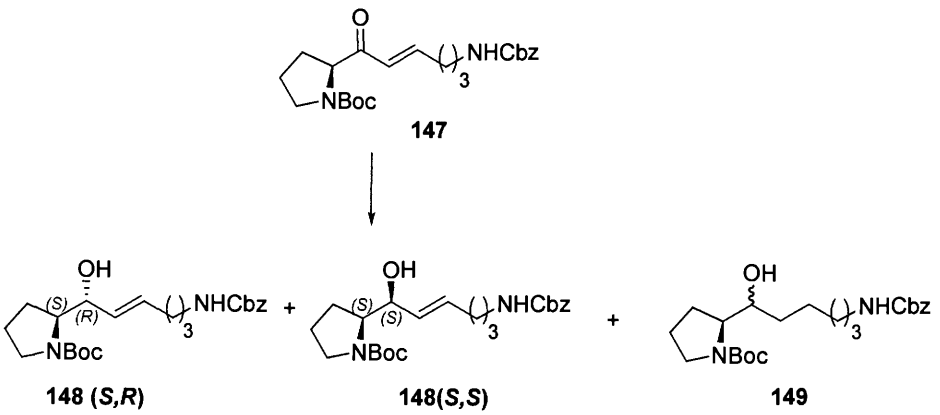
Schema 4.31: i) $LiCH_2P(O)(OCH_3)$, THF, -78 °C; ii) K_2CO_3, CH_3CN, rt

Anche in questo caso (Schema 4.32), come già visto per la sintesi degli isosteri ValPro **41a** e PhePro **41b,** si osserva la formazione, in quantità pari a circa l'8%, del prodotto di ciclizzazione **150** dovuto alla addizione intramolecolare del gruppo amminico terminale sul doppio legame dell'enone, che avviene in modo non stereoselettivo portando a una miscela 1:1 dei due possibili diastereoisomeri.



Schema 4.32: i) K_2CO_3, CH_3CN, rt

La successiva riduzione del chetone α,β-insaturo **147** a dare l'alcol allilico **148** (Schema 4.33) si è rivelata piuttosto difficoltosa, data la scarsa reattività del gruppo carbonilico.



Schema 4.33: riduzione dell'enone **147**

Utilizzando $NaBH_4$ in metanolo l'addizione 1,4 compete con quella 1,2 fornendo una miscela 1:1 di alcol allilico ed alcol saturo, difficilmente separabili per via cromatografica.

La formazione del prodotto derivante dall'addizione 1,4 è piuttosto comune nella riduzione di enoni in cui il carbonile è adiacente ad anelli a cinque o sei termini a causa

[49] Koskinen, A. M. P.; Kallatsa, O. A. *Tetrahedron* (**2003**), *59*, 6947

dell'ingombro sterico del ciclo.[50] Il problema della chemoselettività può essere risolto effettuando la riduzione con $NaBH_4$ in presenza di una quantità stechiometrica di $CeCl_3$.[51] Il catione metallico complessa il carbonile rendendolo più elettrofilo e sfavorendo la riduzione dell'alchene. Utilizzando queste condizioni è stato effettivamente risolto il problema della chemoselettività, ma non quello della stereoselettività, visto che la riduzione fornisce una miscela 1:1 dei due alcoli allilici **148**-(*S,R*) e **148**-(*S,S*).

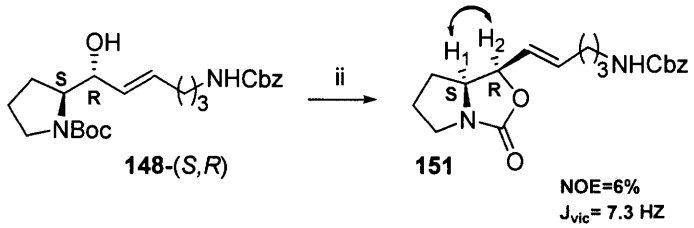
Visti i risultati poco soddisfacenti ottenuti con il $NaBH_4$ sono stati presi in considerazione altri riducenti (Tabella 4.2). Con $LiBH_4$ in metanolo anidro a -15 °C si ottiene una miscela 3:1 di alcoli *anti* e *sin*, mentre l'alcol saturo risulta presente solo in tracce. Con il litio tri-*tert*-butossialluminio idruro (LTBAH) in etanolo non si osserva alcuna reattività tra –78 e –50 °C, limite massimo oltre il quale l'etanolisi dell'idruro di alluminio compete con la riduzione.

Agente riducente	Solvente	Tempo (min)	T (°C)	(*S,R*):(*S,S*):alcol saturo
$NaBH_4$	MeOH	60	0	1 : 1 : 1
$NaBH_4 \cdot CeCl_3,7H_2O$	MeOH	60	0	1 : 1 : -
$LiBH_4$	MeOH	30	-15	3 : 1: 0.3
LTBAH	EtOH	60	-78	nessuna reazione
DIBALH	toluene	180	-78	95 : 5: -

Tabella 4.2: condizione di riduzione per l'enone **147**

La riduzione con DIBAL ha dato risultati più incoraggianti, fornendo un unico alcol allilico **148**-(*S,R*) (Schema 4.34). Per confermare la configurazione del nuovo centro chirale, l'alcol **148**-(*S,R*) è stato convertito nel corrispondente ossazolidinone **151**; la costante di accoppiamento di 7.3 Hz fra i protoni vicinali H_1 ed H_2 è in accordo con i dati riportati in letteratura per sistemi biciclici simili ed è consistente con una disposizione *sin*-planare dei due idrogeni,[52] corrispondente ad una configurazione assoluta *R* per il secondo centro chirale. Il valore di *Nuclear Overhauser Effect* tra gli stessi protoni, pari a 6%, supporta ulteriormente l'attribuzione.

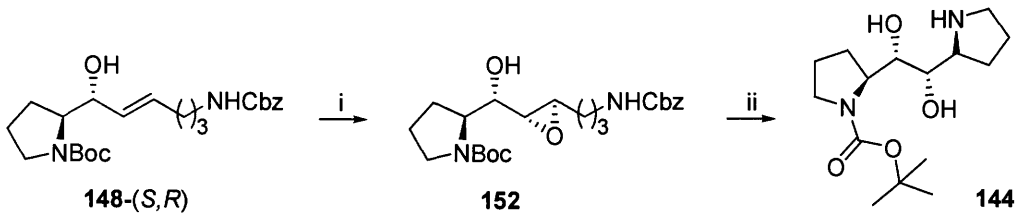
[50] Seyden-Penne, J. In *Reductions by Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis* JohnWiley & Sons: New York (**1997**).
[51] Gemal, A. L.; Luche, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* (**1981**), *103*, 5454
[52] Ibuka, T.; Taga, T.; Habashita, H.; Nakai, K.; Tamamura, H.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* (**1993**), *58*, 1207



Schema 4.34: i) DIBAL, toluene, -78 °C; ii) NaH, THF, rt

La reazione con DIBAL, tuttavia, è risultata soddisfacente solamente se condotta in piccola scala (≤500 mg). In reazioni condotte in scala più grande la conversione non è completa, mentre utilizzando un eccesso di riducente si osserva sia una parziale riduzione del doppio legame C=C sia un calo drastico nella resa. In questo caso risulta più conveniente la riduzione con $LiBH_4$ in metanolo seguita dalla separazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice dell'isomero *S,R*.

L'alcol allilico **148**-(*S,R*) così ottenuto viene epossidato per trattamento con *m*CPBA in diclorometano per dare il solo *sin* epossialcol **152** che viene successivamente sottoposto ad idrogenazione catalitica per rimuovere la protezione benzilossicarbonilica; l'epossiammina che così si forma ciclizza spontaneamente l'isostere ProPro **144** desiderato a configurazione tutta *S*, come evidenziato dall'analisi NMR del prodotto deprotetto (Schema 4.35).



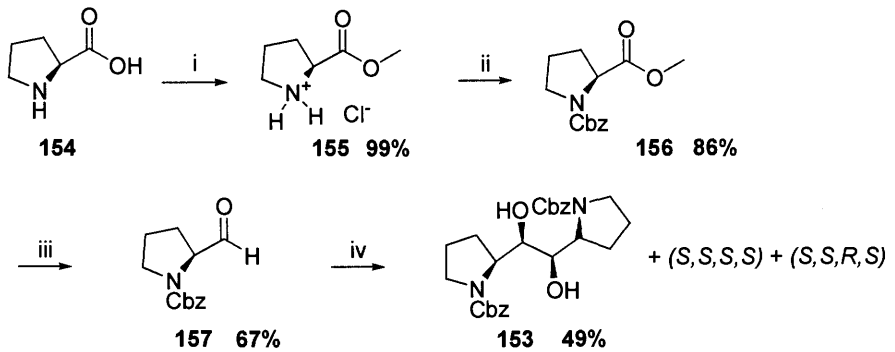
Schema 4.35: i) *m*CPBA, CH_2Cl_2, 0 °C; ii) H_2, Pd/C 5%, CH_3OH, rt

4.2.7 Un approccio alternativo alla sintesi di isosteri Pro-Pro

La struttura simmetrica (dopo deprotezione) del nuovo isostere rende possibile un diverso, e in linea di principio più semplice, approccio sintetico basato sulla condensazione pinacolica di amminoaldeidi (Cfr. Par. 3.2.1). A questo scopo il metilestere della N-Cbz-L-prolina **156** viene convertito nell'aldeide **157** per riduzione con DIBALH in diclorometano anidro a –78 °C.[53] L'aldeide così ottenuta è stata utilizzata senza purificazione e sottoposta alla reazione pinacolica, in diclorometano anidro e a temperatura ambiente, con Zn in presenza di $VCl_3 \cdot (THF)_3$ (Schema 4.36).[54]

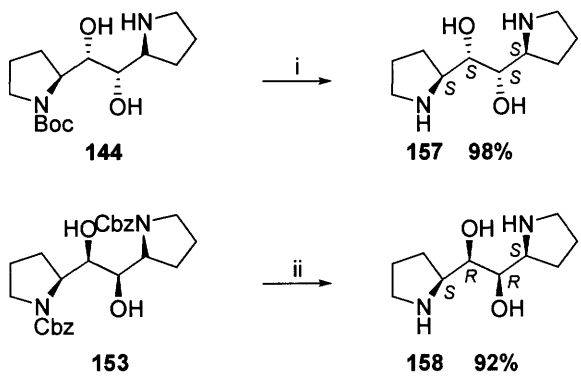
[53] Takeuchi, Y.; Yamada, A.; Suzuki, T.; Koizumi, T. *Tetrahedron* (**1996**), *52*, 225

[54] a) Freudenberger, J. H.; Konradi, A. W.; Pedersen, S. F., *J. Am. Chem. Soc.* (**1989**), *111*, 8014; b) Konradi, A.W.; Pedersen, S.F., *J. Org. Chem.* (**1992**), *57*, 28; c) Kempf, D. J.; Sowin, T. J.; Doherty, E. M.; Hannick, S. M.; Codavoci, L.; Henry, R. F.; Green, B. E.; Spanton, S. G.; Norbeck, D. W., *J. Org. Chem.* (**1992**), *57*, 5692



Schema 4.36: i) $SOCl_2$, CH_3OH, 0 °C; ii) CbzOSu, TEA, CH_2Cl_2, rt; iii) DIBALH, CH_2Cl_2, -78 °C; iv) $[V_2Cl_3(THF)_6]_2[Zn_2Cl_6]$, CH_2Cl_2

Dalla reazione di condensazione, si ottiene una miscela di isomeri (*S,R,R,S*) (**153**), (*S,S,S,S*), e (*S,S,R,S*) in rapporto 5:1:1, facilmente separabili mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice. La configurazione (*S,R,R,S*) del prodotto principale **153** è stata determinata dal confronto dello spettro NMR, ottenuto dopo deprotezione, con quello dell'isostere **144**, di cui era stata già dimostrata la configurazione (*S,S,S,S*), similmente deprotetto. L'analisi NMR indica che il diamminodiolo ottenuto dalla deprotezione di **153** è simmetrico, ma diverso da quello (*S,S,S,S*) che deriva da **144** (Schema 4.37). Essendo necessariamente *S* la configurazione dei due carboni che derivano dalla prolina, la configurazione di **153** non può che essere (*S,R,R,S*), come già osservato per reazioni analoghe condotte su aminali derivanti da α-amminoacidi diversi (Cfr. Par. 3.2.1). I due approcci sintetici qui descritti possono quindi essere considerato complementari dal punto di vista della stereochimica.



Schema 4.37: i) TFA/CH_2Cl_2, rt; ii) H_2, Pd/C 10%, MeOH, rt

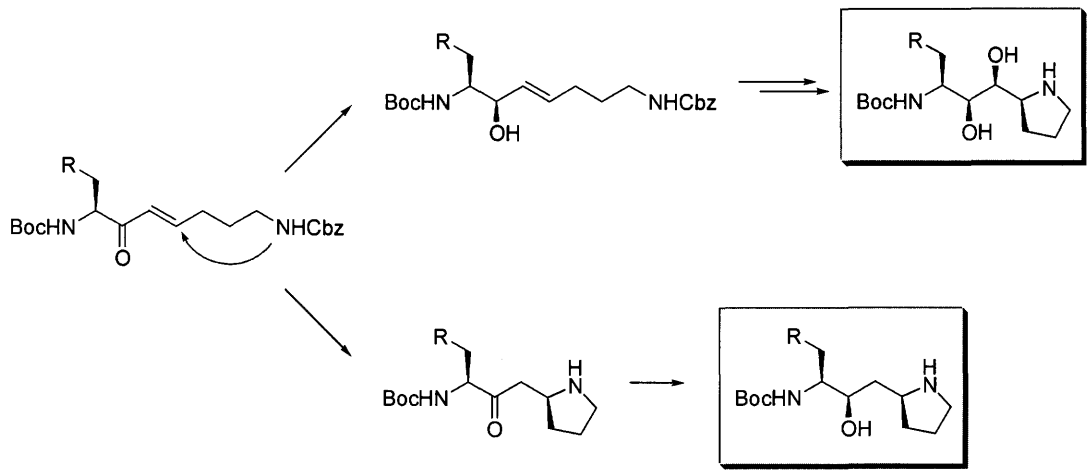
Strutture altamente simmetriche come quelle dei nuovi isosteri **157** e **158** sono particolarmente interessanti, potendo trovare applicazione come nuclei centrali di potenziali inibitori non solo della HIV-PR, ma anche di altri enzimi specifici per la prolina;[55] inoltre, per le particolari caratteristiche strutturali della prolina, l'inserimento

[55] Cunningham, D. F.; O'Connor, B., *Biochim. Biophys. Acta* (**1997**), *1343*, 160

di un isostere Pro-Pro in una catena peptidica,[56] potrebbe dare origine a strutture pseudopetidiche dotate di interessanti proprietà conformazionali; infine il grande interesse destato recentemente dai derivati della prolina nel campo della sintesi asimmetrica ne suggerisce il possibile utilizzo quale ausiliari chirali[57] e catalizzatori organici.[58]

4.2.8 Sintesi di isosteri monoidrossietilenici

La addizione intramolecolare di ammine a chetoni α,β-insaturi derivanti da amminoacidi (Schema 4.38) rappresenta un'attraente approccio alla sintesi di isosteri monoidrossietilenici Xaa-Pro in quanto consente di utilizzare come intermedi gli stessi enoni già impiegati nella sintesi degli isosteri diidrossietilenici.



Schema 4.38: possibile sintesi di isosteri diamminodiolici e diammino alcolici a partire da un intermedio comune

La reazione, come si è visto nei capitoli precedenti, avviene molto facilmente, anche quando non è desiderata, ma in realtà, malgrado i tentativi fatti, non è stato finora possibile ottenere altro che miscele dei possibili diastereoisomeri in rapporto pari circa a 1:1. In Figura 4.10 sono riportati tutti i prodotti di ciclizzazione di enoni sinora ottenuti.

---

[56] a) Vanhoof, G.; Goossens, F.; De Meester, I.; Hendriks, D.; Scharpé, S., *The FASEB Journal* (**1995**), *9*, 736; b) Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E.; Castel, S.; Albericio, F.; Royo, M., *J. Am. Chem. Soc.* (**2005**), *127*, 9459; c) Fillon, Y. A. ; Anderson, J. P.; Chmielewski, J., *J. Am. Chem. Soc.* (**2005**), *127*, 11798; d) Rai, R.; Aravinda, S.; Kanagarajadurai, K.; Raghothama, S.; Shamala, N.; Balaram, P., *J. Am. Chem. Soc.*, (**2006**) *128*, 7916

[57] a) Vartak, A. P.; Young, V. G., Jr.; Johnson, R.L., *Org. Lett.* (**2005**), *7*, 35; b) Chi, Y.; Gellman, S. H., *Org. Lett.* (**2005**), *7*, 4253; c) Zhou, Y.; Shan, X. *Org. Lett.* (**2006**), *71*, 9510

[58] a) Pan, Q.; Zou, B.; Wang, Y.; Ma, D. *Org. Lett.* (**2004**), *6*, 1009; b) Mosse', S.; Alexakis, A. *Organic Lett.* (**2005**), *7*, 4361; c) Zanardi, F.; Sartori, A.; Curti, C.; Battistini, L.; Rassu, G.; Nicastro, G.; Casiraghi, G. *J. Org. Chem.* (**2007**), *72*, 1814

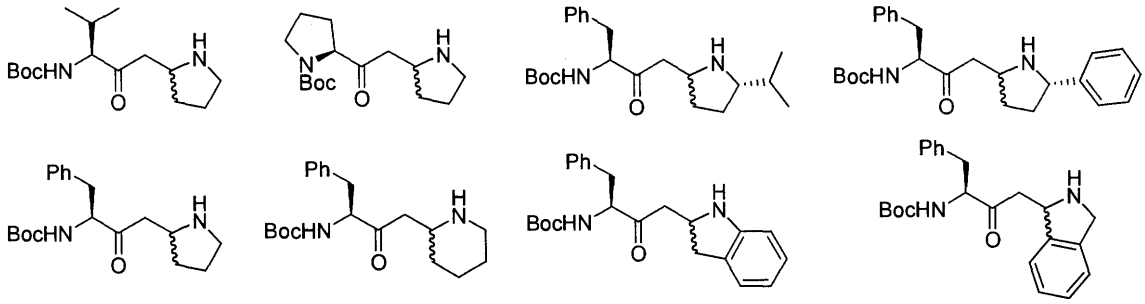
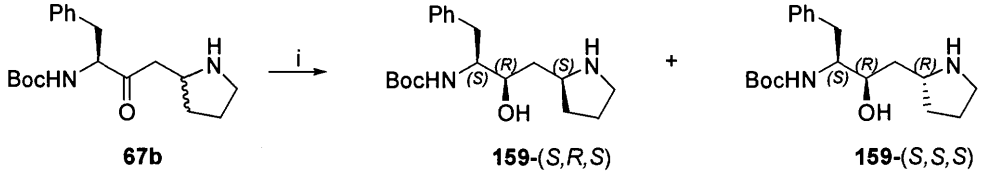


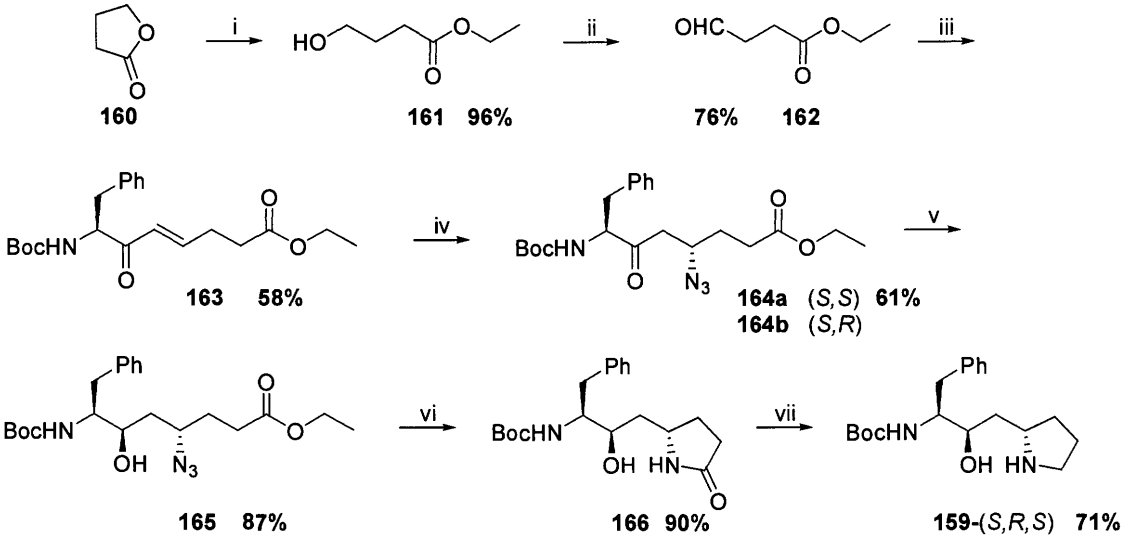
Figura 4.10: chetoni ottenuti da ciclizzazione intramolecolare come miscela 1:1 di diastereoisomeri

In nessun caso è stato possibile separare le coppie di diastereoisomeri così ottenuti e nell'unico caso in cui la miscela di chetoni **67b** è stata convertita nella corrispondente miscela di alcoli **159**-(*S,R,S*) e **159**-(*S,S,S*) (Schema 4.39), anche la separazione, per cromatografia su colonna, di questi ultimi si è rivelata molto difficile.



Schema 4.39: i) LTBAH, EtOH, -78 °C

Questi risultati preliminari hanno motivato la messa a punto di un approccio alternativo (Schema 4.40), che riprende la prima sintesi dell'isostere PhePro **41b** (Cfr. Par 3.4.4) e sfrutta l'addizione 1,4 di azide controllata da uno stereocentro remoto.[59]



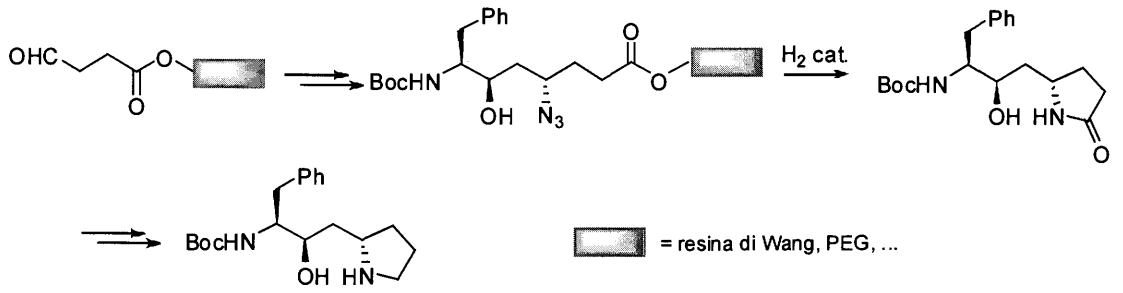
Schema 4.40: i) EtOH, H_2SO_4, Δ; ii) PCC, CH_2Cl_2, rt; iii) **46b**, K_2CO_3, EtOH; iv) $TMSiN_3$, AcOH, CH_2Cl_2, base, -18 °C; v) LTBAH, EtOH, - 78 °C; vi) H_2, Pd/C 10%, MeOH, rt; vii) $BH_3 \cdot Me_2S$, THF, 0 °C

L'enone **163** è stato quindi preparato per olefinazione del fosfonato **46b** con l'aldeide **162,** a sua volta ottenuta per semplice etanolisi del γ-butirrolattone **160** e successiva

[59] Adamo, I.; Benedetti, F.; Berti, F.; Campaner, P. *Org. Lett.* (**2006**), *8*, 51

ossidazione con clorocromato di piridinio (PCC). L'addizione coniugata di trimetilsililazide a **163** è stata condotta nelle condizioni già ottimizzate per l'addizione di azide ad α-amminoenoni (AcOH, CH_2Cl_2, brucina, –18 °C) e procede con moderata stereoselettività, portando alle due chetoazidi diastereoisomere **164a,b** (*S,S*) e (*S,R*) in rapporto circa 3:1. La chetoazide **164a**-(*S,S*), la cui configurazione è stata determinata per confronto con strutture analoghe,[60] è stata separata per cromatografia su colonna e il carbonile è stato ridotto con LTBAH per dare l'azidoalcol **165** con completa stereoselettività; quest'ultimo è stato sottoposto ad idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C al 10%, trasformando così il gruppo azido in gruppo amminico che spontaneamente ciclizza sul gruppo estereo terminale portando ad un lattame a 5 termini (**166**), che può già essere considerato un isostere PhePro di tipo monoidrossietlenico. La successiva riduzione del gruppo carbonilico del lattame a gruppo metilenico per trattamento con $BH_3 \cdot Me_2S$[61] permette di ottenere l'isostere **159**-(*S,R,S*) desiderato.

Questo tipo di approccio risulta estremamente versatile, offrendo numerosi spunti per sviluppi futuri. Da una parte si presta a modifiche sulla struttura dell'anello che mima la prolina, seguendo un approccio simile a quello visto per la sintesi dei diammino-dioli. Dall'altra, la presenza di un gruppo carbossilico terminale, facilmente derivatizzabile, negli intermedi **162-165** si presta anche ad una eventuale estensione alla sintesi in fase solida (su resina di Wang) o in fase liquida (su PEG) (Schema 4.41). In questo caso non sarebbe richiesto uno specifico passaggio per il distacco dal supporto che sarebbe automaticamente indotto dalla ciclizzazione dell'amminoestere.



Schema 4.41: sintesi supportata dell'isostere PhePro monoidrossietilenico **159**-(*S,R,S*)

[60] Adamo, I. Tesi di Dottorato XVIII Ciclo

[61] Felluga, F.; Pitacco, G.; Prodan, M.; Pricl, S.; Visintin, M.; Valentin, E. *Tetrahedron: Asymm.* (**2001**), *12*, 3241

4.2.9 Isosteri contenenti un triazolo

Negli ultimi anni[62] l'utilizzo della cosiddetta "click chemistry", cioè la reazione tra un'azide ed un generico alchino con formazione di un triazolo funzionalizzato, ha acquisito un ruolo importante nella sintesi di molecole biologicamente attive.[63]

Recentemente, questo tipo di approccio è stato utilizzato anche per la sintesi di analoghi di inibitori della HIV-PR quali l'Amprenavir e l'Indinavir (Cfr. Fig. 1.8), portando a strutture che hanno dimostrato attività confrontabili, se non addirittura migliori, di quelle degli inibitori di riferimento (Figura 4.11).[64]

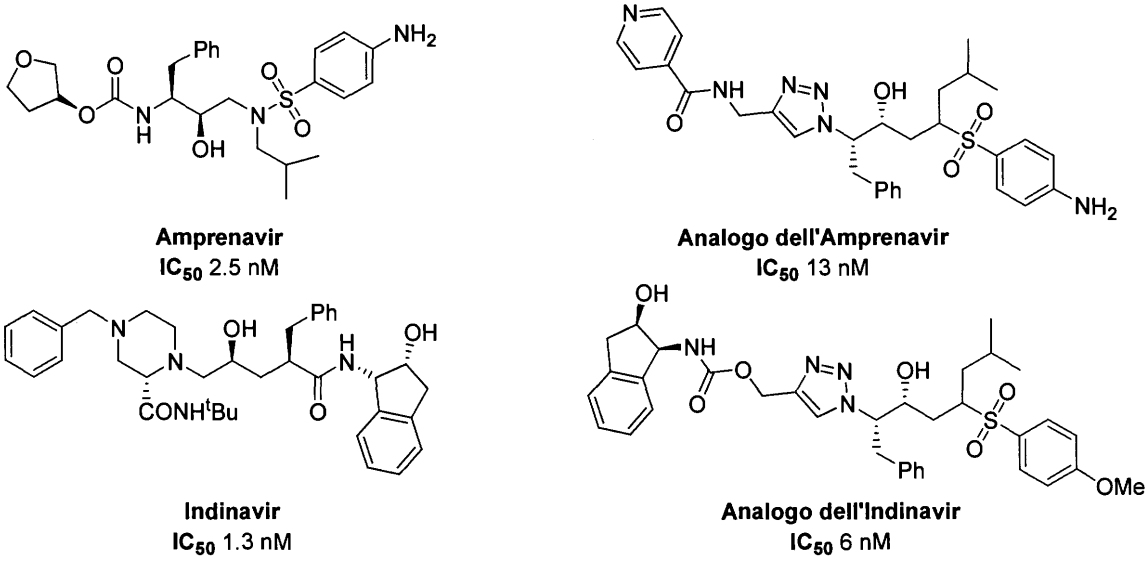


Figura 4.11: Amprenavir, Indinavir e loro analoghi contenenti un triazolo

Partendo dall'osservazione che anelli pirrolidinici e triazoli possono essere considerati degli analoghi,[65] con il vantaggio per questi ultimi dato dalla possabilità di creare una fitta rete di legami idrogeno all'interno del sito catalitico dell'HIV-PR stabilizzando il complesso enzima-inibitore,[66] è possibile sfruttare questo tipo di chimica per ottenere isosteri PhePro, in cui l'anello pirrolidinico, corrispondente al residuo della prolina, sia sostituito da un triazolo. Come primo esempio di questo nuovo approccio è stato scelto

---

[62] a) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem.* (**2001**), *113*, 2056; b) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem.* Int. Ed. (**2001**), *40*, 2004

[63] a) Seo, T. S.; Li, Z.; Ruparel, H.; Ju, J. *J. Org. Chem.* (**2003**), *68*, 609; b) Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynspan, F.; Radic, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem.* (**2002**), *114*, 1095; c) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* (**2003**), *125*, 3192; d) Speers, A. E.; Adam, G. C.; Cravatt, B. F. *J. Am. Chem. Soc.* (**2003**), *125*, 4686

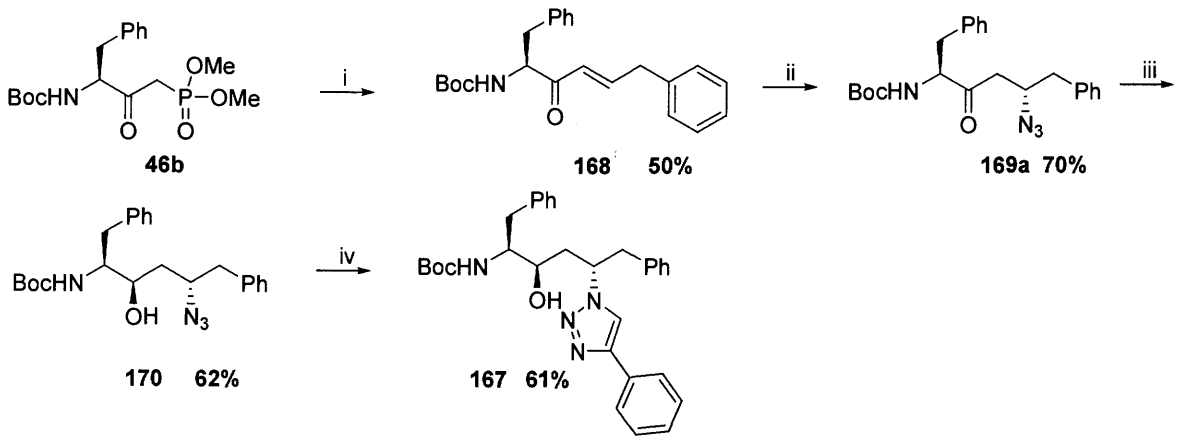
[64] Brik, A.; Muldoon, Lin, Y.-C.; Elder, J. H.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H. *ChemBioChem* (**2003**), *4*, 1246

[65] Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discovery Today* (**2003**), *8*, 1128

[66] Whiting, M.; Tripp, J. C.; Lin, Y.-C.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Elder, J. H.; Sharpless, K. B.; Fokin, V.V. *J. Med. Chem.*(**2006**), *49*, 7697

come obiettivo il triazolo **167** nel quale è presente un sostituente fenile che dovrebbe garantire una migliore occupazione del subsito S_1' dell'enzima.

La sintesi messa punto sfrutta quanto già descritto nel Par. 4.2.8, cioè l'addizione 1,4 di azide controllata da uno stereocentro remoto ad un opportuno composto carbonilico α,β-insaturo.[59] Condotta l'olefinazione di Horner-Emmons con fenilacetaldeide sul β-chetofosfonato **57b** a dare l'enone **215**, la sintesi procede con l'addizione di trimetil sili azide ($TMSiN_3$) in presenza di L-Pro-OMe (o brucina) come base, ottenendo una miscela delle chetoazidi **216a** (*S,S*) e **216b** (*S,R*) in rapporto 5:1; le chetoazidi sono facilmente separabili mediante cristallizzazione frazionata da etere diisopropilico (Schema 4.42).



Schema 4.42: i) fenilacetaldeide, K_2CO_3, EtOH, rt; ii) $TMSiN_3$, AcOH, L-Pro-OMe, CH_2Cl_2, -18 °C; iii) LTBAH, EtOH, -78 °C; iv) fenilacetilene, $CuSO_4/Cu_s$, *t*BuOH/H_2O, rt

La sintesi prosegue con la riduzione stereoselettiva con LTBAH del gruppo carbonilico dell'azide **169a**-(*S,S*) che dà l'azidoalcol noto[67] **170** a configurazione (*S,R,S*). Su questo è stata, infine, condotta la cicloaddizione di fenilacetilene, portando all'isostere **167** con una resa totale del 13% dal fosfonato **46b**.

4.3 Sintesi di inibitori peptidomimetici basati su isosteri Xaa-Pro

Il lavoro sin qui descritto ha portato alla sintesi di una piccola libreria di nuovi isosteri di dipeptidi Phe-Pro e Pro-Pro (Figura 4.12) che si affiancano al capostipite **41b** ottenuto in precedenza.[68]

[67] Benedetti, F.; Berti, F.; Norbedo, S. *J. Org. Chem.* (**2002**), *67,* 8635
[68] Dinon, F.; Campaner, P.; Berti, F.; Tossi, A.; Benedetti, F. PCT/EP2005/052770

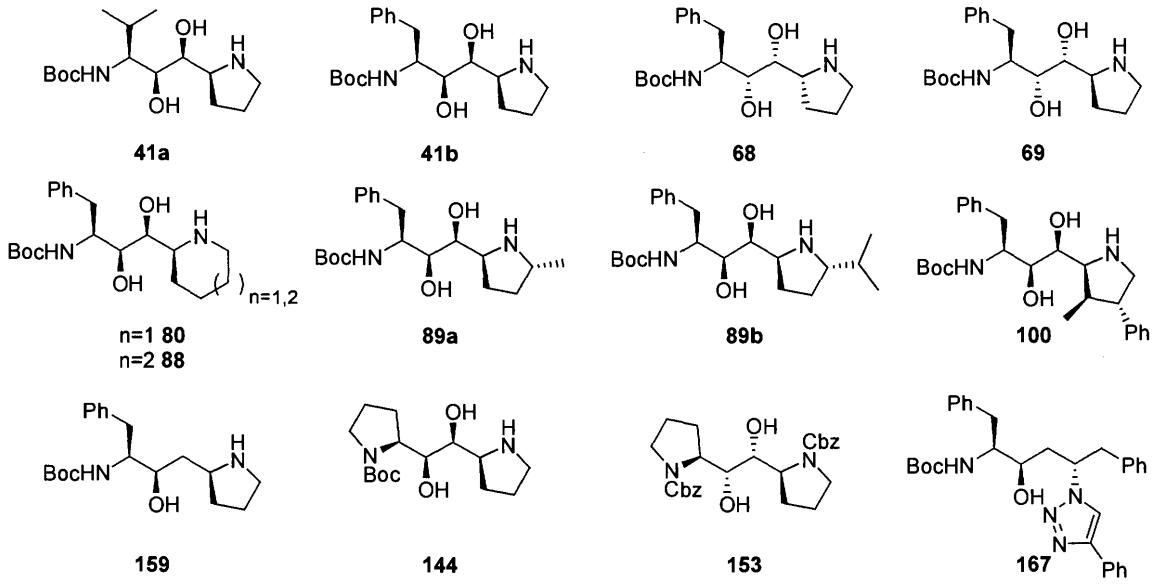
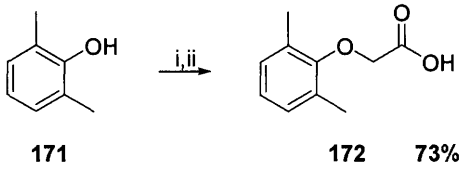


Figura 4.12: nuovi isosteri Xaa-Pro realizzati

Partendo da alcuni membri della libreria (**68, 80, 144, 167**) è stato possibile anche affrontare un primo studio sull'attività biologica di alcuni semplici inibitori e sulle sue correlazioni con la struttura. Utilizzando le comuni condizioni di sintesi peptidica in soluzione è stato quindi ottenuto un nuovo piccolo set di inibitori, le cui catene laterali, per analogia con quelle dei primi inibitori realizzati (Cfr. Fig. 3.5) contengono l'acido 2,6-dimetil fenossiacetico e/o il dipeptide Trp-Val nel quale il terminale amminico è acetilato.

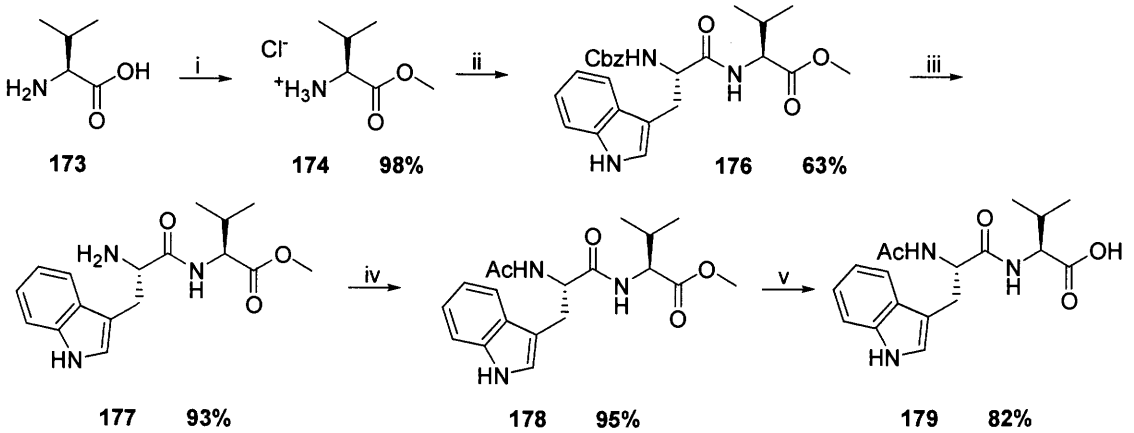
L'acido 2,6-dimetil fenossiacetico (DmPOA) è stato ottenuto per semplice alchilazione del 2,6-dimetil fenolo **171** con acido cloroacetico in H_2O e idrossido di sodio come base[69] oppure utilizzando bromoacetato di metile, a dare un metilestere che per idrolisi basica porta all'acido **172** (Schema 4.43).



Schema 4.43: i) Br-acetato di metile, K_2CO_3, DMF, rt; ii) LiOH 1N/THF, rt

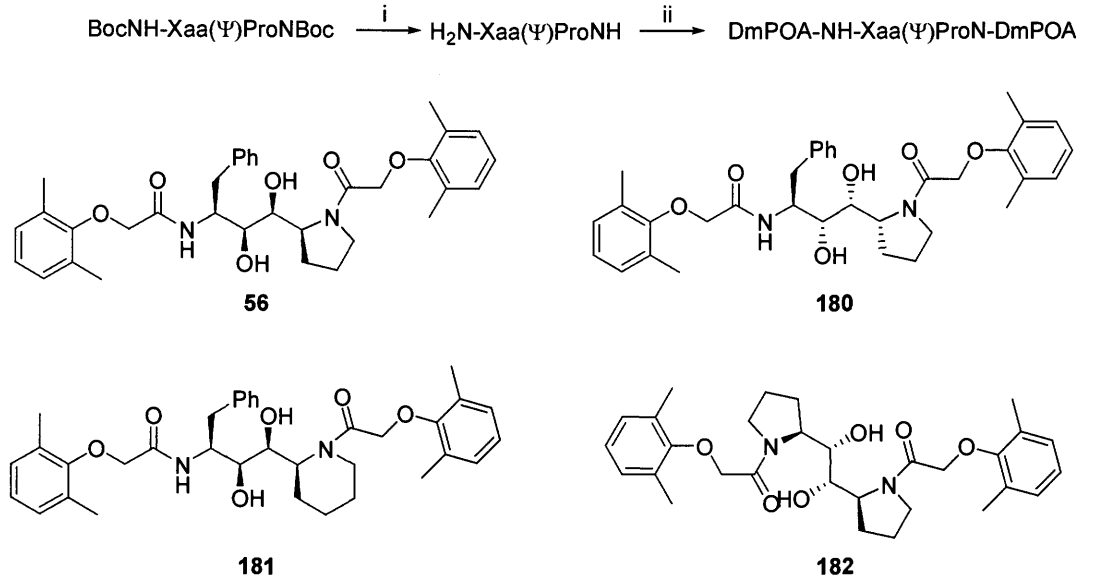
La sintesi del dipeptide Ac-NH-TrpVal-OH parte dalla L-Valina metilestere **174**, che viene fatta reagire con l'N-Cbz triptofano **175**, in presenza di N-etilcarbodiimmide (EDC) e 1-H-idrossibenzotriazolo (HOBT) come agenti condensanti e attivanti, per dare il dipeptide **176**, da cui per deprotezione del gruppo Cbz, acetilazione ed idrolisi basica del metilestere si ottiene l'acido **179** (Schema 4.44).

[69] Yamansarova, E. T.; Kukovinets, A. G.; Kukovinets, O. S.; Zainullin, R. A.; Galin, F. Z.; Kunakova, R. V.; Zorin, V. V.; Tolstikov, G. A. *Russ. J. Org. Chem.* (**2001**), *37*, 246



Schema 4.44: i) $SOCl_2$, MeOH, Δ; ii) Cbz-L-Trp-OH, EDC, HOBT, NMM, CH_3CN, rt; iii) H_2, Pd/C 10%, MeOH, rt; iv) Ac_2O, CH_2Cl_2, rt; v) LiOH 1N/THF, rt

Le catene laterali così ottenute sono state quindi accoppiate con il nucleo centrale dell'isotere come riportato nello schema generale. Gli inibitori sintetizzati in questa prima serie sono tutti simmetricamente sostituiti: quindi l'isostere N-Boc protetto viene inizialmente deprotetto con acido trifluoroacetico (TFA) e quindi fatto reagire con 2 equivalenti dell'acido opportuno (DmPOA **172** oppure il dipeptide **179**). Dalla reazione degli isosteri **68, 80, 144** con l'acido 2,6-dimetil-fenossiacetico, utilizzando la stessa procedura standard di coupling per la sintesi peptidica in soluzione (EDC/HOBT), sono stati così ottenuti gli inibitori **180, 181, 182** (Schema 4.45).



Schema 4.45: i) TFA/CH_2Cl_2, rt; ii) **172**, EDC, HOBT, NMM, CH_3CN, rt

E' interessante notare come, nel caso dell'inibitore **182**, gli spettri ^1H e ^{13}C NMR (Figura 4.13 e Figura 4.14) siano molto semplificati, a causa della simmetria della molecola. Ciò rappresenta anche una convincente prova indiretta della correttezza delle configurazioni attribuite ai centri stereogenici dell'isostere.

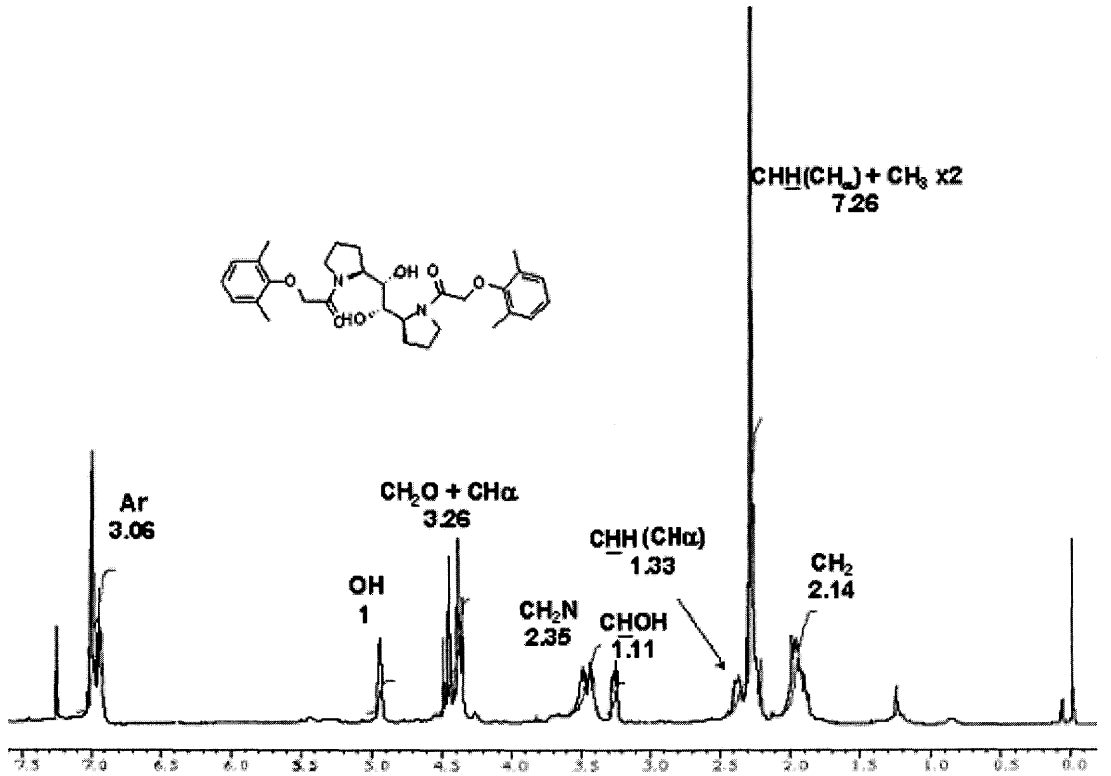


Figura 4.13: spettro ^{1}H-NMR dell'inibitore **182**

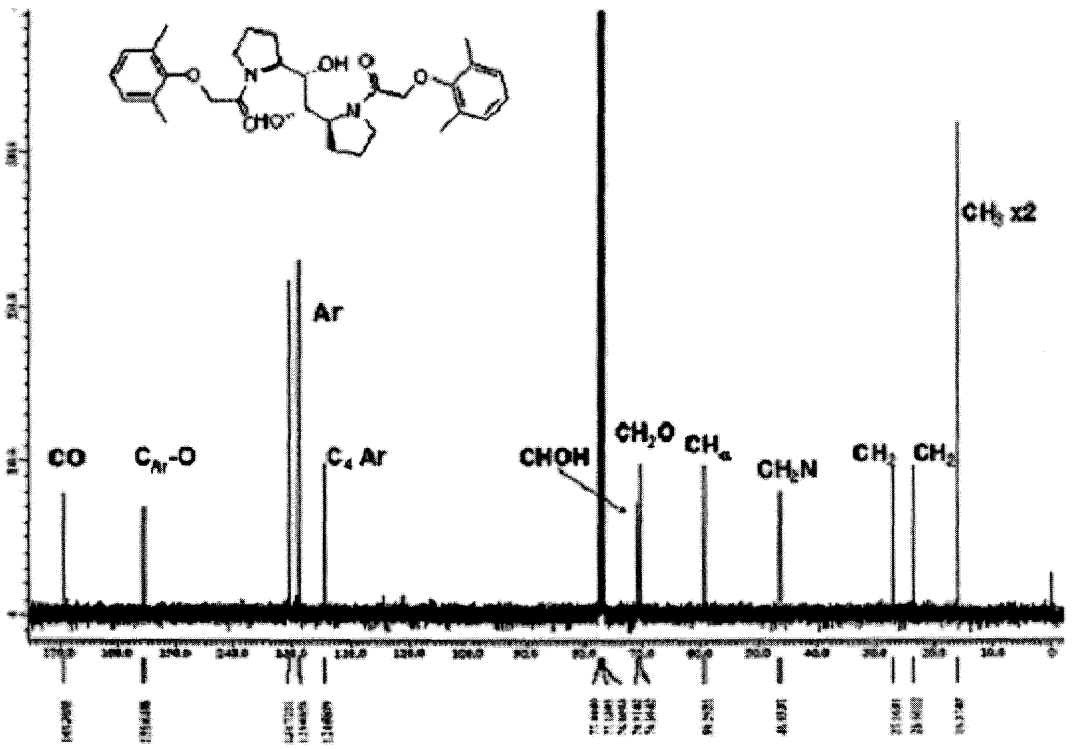
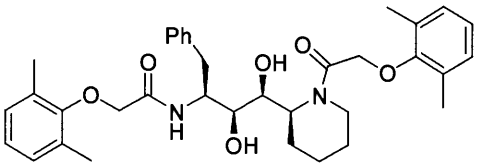
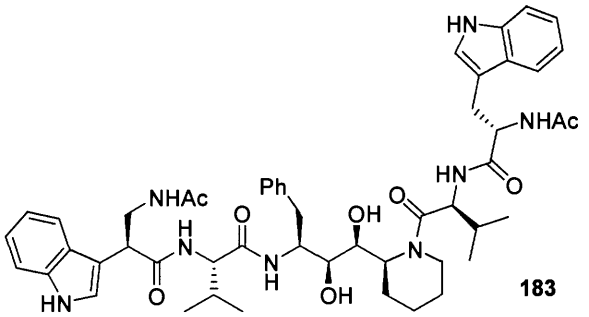


Figura 4.14: spettro ^{13}C-NMR dell'inibitore **182**

Più complessa, a causa della scarsa reattività dell'azoto dell'anello eterociclico, è stata la sintesi degli inibitori **181** e **183**.

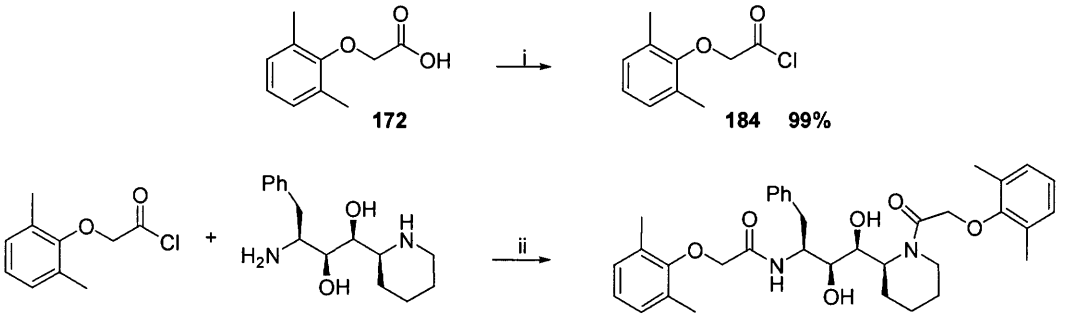


181



183

Infatti, mentre il legame ammidico con il gruppo amminico primario si forma rapidamente,[70] la formazione del secondo legame ammidico con la piperidina è molto più lenta, a differenza di quanto osservato nella sintesi degli altri inibitori. La scarsa reattività dell'anello piperidinico rispetto all'anello pirrolidinico può essere correlata alla diversa nucleofilicità degli etereoatomi dei due eterocicli: la pirrolidina è infatti notevolmente più nucleofila rispetto all'omologo superiore.[71] Nel caso dell'inibitore **181**, in cui sono presenti due residui di DmPOA, il problema è stato risolto convertendo l'acido dimetilfenossiacetico **172** nel più reattivo cloruro acilico **184**.[72] La reazione con l'isostere deprotetto è, in questo caso, completa in 48 h (Schema 4.46).



172 **184** 99% **184** **80a** **181** 46%

Schema 4.46: i) $SOCl_2$, EtOAc, Δ; ii) $NaHCO_3$, EtOAc/H_2O, rt

Nel caso dell'inibitore **183,** invece, dopo un primo tentativo infruttuoso con PYBOP/HOBT/*sin*-collidina,[73] per assemblare i dipeptidi al nucleo dell'isostere è stato utilizzato il metodo delle anidridi miste[74] (Schema 4.47).

---

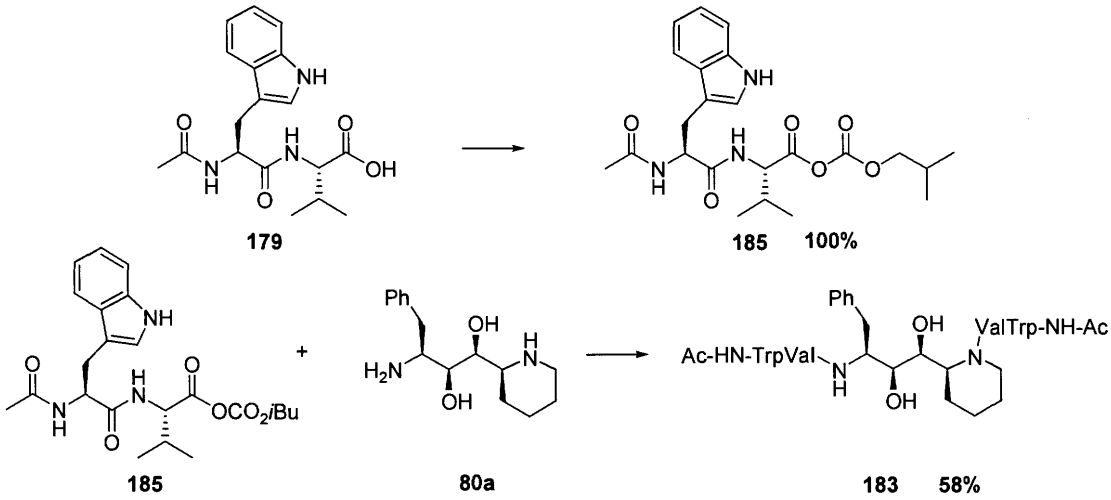
[70] Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* (**1993**), *115*, 4397

[71] Morton, A. A. "*The Chemistry of Heterocyclic compounds*", McGraw-Hill, New York, N.Y., (**1946**)

[72] Stoner, E. J.; Cooper, A. J.; Dickman, D. A.; Kolaczkowski, L.; Lallaman, J. E.; Liu, J.-H.; Oliver-Shaffer, P. A.; Patel, K. M.; Paterson, J. B. Jr.; Plata, D. J.; Riley, D. A.; Sham, H. L.; Stengel, P. J.; Tien, J.-H. J. *Org. Proc. Res. Dev.* (**2000**), *4*, 264

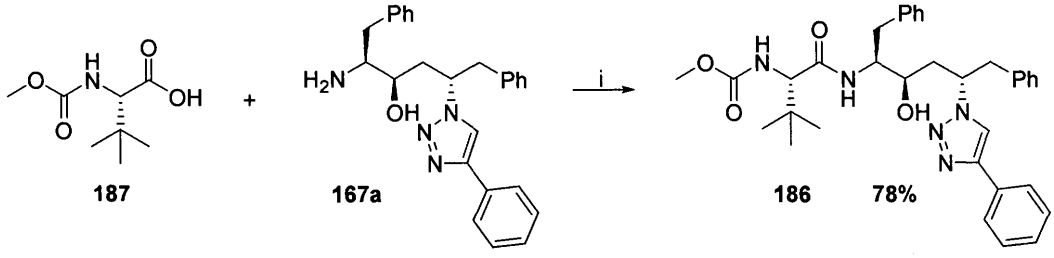
[73] Frérot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M.-N.; Jouin, P. *Tetrahedron* (**1991**), *47*, 259

[74] a) Pettit, G.R.; Nelson, P.S.; Holzapfel, C.W. *J. Org. Chem.* (**1985**), *50*, 2654; b) Tsuda, Y.; Teno, N.; Okada, Y.; Nagamatsu, Y.; Okamoto, U. *Chem. Pharm. Bull.* (**1988**), *36*, 3119



Schema 4.47: i) *i*BuOCOCl, NMM, CH_2Cl_2, -15 °C; ii) NMM, CH_2Cl_2, rt

Anche la sintesi dell'inibitore **186** ha utilizzato le stesse condizioni di coupling peptidico standard viste in precedenza (EDC, HOBT, NMM), utilizzando la N-metossi-L-*tert*-leucina come catena laterale (Schema 4.48), previa deptrotezione del gruppo *tert*-butossicarbonilico dall'isostere **167**.



Schema 4.48: i) EDC, HOBT, NMM; CH_3CN, rt

4.4 Valutazione dell'attività biologica e correlazioni struttura-attività

Ultimata la sintesi di questo primo piccolo set di strutture, si è passati alla fase di valutazione della loro attività biologica utilizzando il metodo descritto nell'Appendice. In Figura 4.15 sono riportati gli IC_{50} degli inibitori ottenuti in questa tesi assieme a quelli di inibitori precedentemente studiati, utili per un confronto.

Da un confronto delle attività di questo set di inibitori si possono ricavare alcune considerazioni conclusive:

1) **Le catene laterali**. Nel caso di inibitori basati su isosteri Xaa-Pro, l'attività è molto buona, con valori di IC_{50} dell'ordine del nanomolare quando sono presenti catene laterali di carattere peptidico e dimensioni tali da garantire una buona occupazione anche dei subsiti S2, S2', S3 ed S3' (inibitori **55** e **183**). L'attività invece peggiora drasticamente nel caso l'inibitore perda queste caratteristiche.

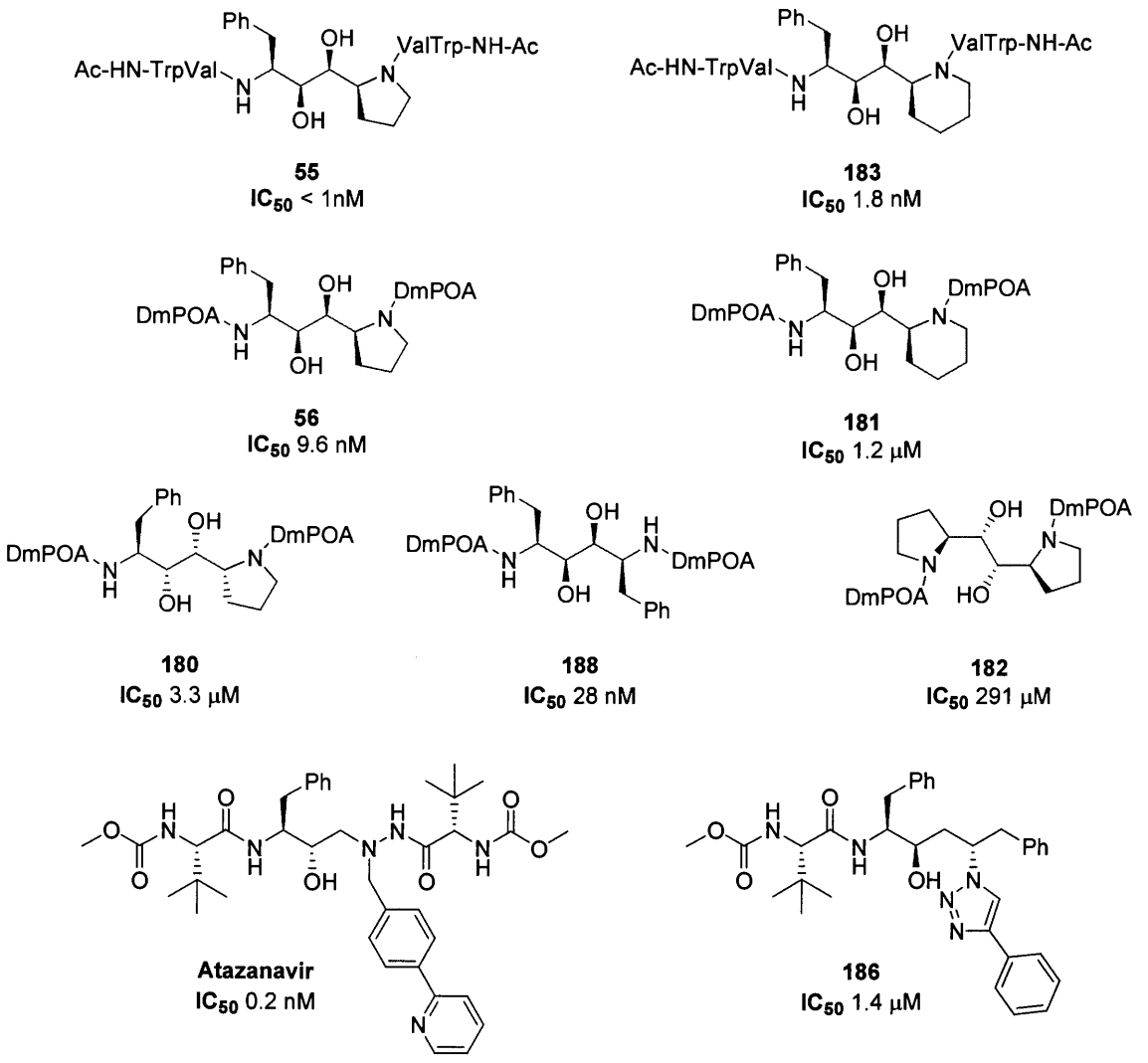


Figura 4.15: attività biologica di inibitori peptidomimetici

2) **Le dimensioni dell'anello**. L'aumento delle dimensioni dell'anello eterociclico (inibitori **55,56** e **181,183**), contrariamente a quanto previsto, non porta ad alcun miglioramento dell'attività, che anzi peggiora, particolarmente nel caso della coppia di inibitori di dimensioni più ridotte **56** e **183**. Il risultato è alquanto sorprendente e potrebbe forse essere collegato alla maggiore flessibilità del ciclo pentatomico che potrebbe garantire un miglior adattamento al sito catalitico. Lo studio di inibitori contenenti un ciclo eptatomico e pirrolidine sostituite potrà meglio chiarire questo aspetto.

3) **La stereochimica dei centri chirali.** Come si può notare, passando da un inibitore basato sull'isostere PhePro (*S,S,S,S*) (**56**) all'inibitore **180** nel quale la stereochimica del nucleo centrale è (*S,R,R,R*), l'attività biologica diminuisce drasticamente. Una variazione nell'attività di un fattore quasi 10^3 è molto maggiore di quanto si osserva generalmente, al variare della configurazione dei

soli gruppi ossidrile, in inibitori basati su isosteri diidrossietilenici e monoidrossietilenici[75] e potrebbe essere associato alla struttura dell'anello pirrolidinico corrispondente al residuo di prolina del substrato naturale dell'enzima, in cui la configurazione (*R*) di **180** è opposta rispetto a quella dell'amminoacido naturale (*S*), con conseguente perdita di affinità per il sito catalitico.

4) **La simmetria del nucleo centrale**. E' interessante notare come, dei tre inibitori **188**, **56** e **182**, basati su isosteri dei dipeptidi Phe-Phe, Phe-Pro e Pro-Pro, il più attivo sia il secondo, nonostante gli altri due posseggano la stessa simmetria C2 che caratterizza la proteasi. Questo risultato supporta l'ipotesi che i due gruppi Asp catalitici della proteasi si trovino in un diverso stato di protonazione.[76] In questo caso, infatti, la simmetria intrinseca della proteasi verrebbe perturbata, nel complesso con i suoi inibitori, dalle diverse interazioni che i due gruppi Asp_{25}-COOH (donatore/accettore di legame idrogeno) e $Asp_{25'}$-COO^- (solo accettore) possono stabilire con l'inibitore. L'ipotesi é supportata da uno studio sulla struttura cristallografica del complesso tra la proteasi e un inibitore simmetrico, che indica che quest'ultimo viene effettivamente legato in maniera non simmetrica.[77] In questo caso, evidentemente, una struttura simmetrica, come quelle di 7 e 9, non gode di alcun vantaggio e, tra le due, è più efficace quella che garantisce una migliore occupazione dei subsiti S_1 e S_1'.

5) **L'inibitore 186.** Rispetto all'inibitore di riferimento Atazanavir (Reyataz®), del quale condivide una delle due catene laterali di N-(metossicarbonil)-L-*tert*-leucina, questo inibitore risulta circa 1000 volte meno reattivo. Le dimensioni di questo inibitore sono peraltro molto ridotte e questo ne limita la possibilità di interagire con il sito dell'enzima, particolarmente nelle regioni S_2' e S_3'. Il valore di IC_{50}, comunque significativo considerando queste limitazioni, supporta

---

[75] a) Rich, D. H.; Sun, C. Q.; Vara Prasad, J. V. N.; Pathiasseril, A.; Toth, M. V.; Marshall, G. R.; Clare, M.; Mueller, R. A.; Houseman, K. *J. Med. Chem.* (**1991**), *34*, 1222; b) Krihn, A.; Redshaw, S.; Ritchie, J. C.; Graves, B. J.; Hatada, M. H. *J. Med. Chem.* (**1991**), *34*, 3340; c) Roberts, N. A.; Martin, J. A.; Kinchington, D.; Broadhurst, A. V.; Craig, J. C.; Duncan, I. B.; Galpin, S.; Handa, B. K.; Kay, J.; Krohn, A.; Lambert, R. W.; Merrett, J. H.; Mills, J. S.; Parkes, K. E. B.; Redshaw, S.; Ritchie, A. J.; Taylor, D. L.; Thomas, G. J.; Machin, P. J. *Science* (**1990**), *248*, 358

[76] a) Hosur, T. M. V.; Bhat, N.; Kempf, D. J.; Baldwin, E. T.; Liu, B.; Gulnik, S.; Wideburg, N. E.; Norbeck, D. W.; Appelt, K.; Erickson, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* (**1994**), *116*, 847; b) Kempf, D. J.; Codacovi, L.; Chun Wang, X.; Kohlbrenner, W. E.; Wideburg, N. E.; Saldivar, A.; Vasavanonda, S.; Marsh, K. C.; Bryant, P. *J. Med. Chem.* (**1993**), *36*, 320; c) Kempf, D. J.; Norbeck, D. W.; Codacovi, L.; Chun Wang, X.; Kohlbrenner, W. E.; Wideburg, N. E.; Paul, D. A.; Saldivar, A.; Knigge, M. F. Vasavanonda, S.; Marsh, K. C.; Bryant, P. *J. Med. Chem.* (**1990**), *33*, 2687

[77] A questo proposito cfr. PDB-id.: 1HVJ, 1HVI, 1HVK, 9HVP

tuttavia la fattibilità di questo approccio, caratterizzato da una sintesi molto più semplice rispetto a quella dell'Atazanavir[78] e che si presta a introdurre facilmente, al posto del gruppo benzilico terminale, altri sostituenti in grado di garantire migliori interazioni con i subsiti S_2', S_3'.

[78] Mestan, J.; Poncioni, B.; Rösel, J.; Stover, D.; Tintelnot-Blomley, M.; Acemoglu, F.; Beck, W.; Boss, E.; Eschbach, M.; Hürlimann, T.; Masso, E.; Roussel, S.; Ucci-Stoll, K.; Wyss, D.; Lang, M. *J. Med. Chem.* (**1998**), *41*, 3387

5 Inibitori a struttura epossidica

5.1 Inibizione irreversibile

Lo sviluppo di mutanti resistenti[1] è il problema principale di tutte le terapie contro l'infezione da HIV. Una strategia per minimizzare lo sviluppo di resistenza potrebbe consistere nello sviluppo di inibitori irreversibili dalla proteasi di HIV. Gli inibitori irreversibili, a differenza di quelli reversibili sono meno sensibili a mutazioni che, modificando l'affinità del sito catalitico, possono rallentare, ma non necessariamente bloccare, la reazione con l'inibitore stesso.[2] I residui catalitici di acido aspartico nel sito attivo rappresentano un target ideale: infatti, se tali inibitori sono selettivi nell'alchilare questi gruppi, l'enzima viene inattivato irreversibilmente; inoltre, un eventuale mutazione dei gruppi aspartici, selezionata dall'inibitore, genererebbe comunque un enzima privo di attività.[3]

Nel caso di proteasi a serina[4] e a cisteina, quali la catepsina B,[5] una strategia comunemente utilizzata per l'inibizione irreversibile è basata sull'utilizzo di epossidi peptidomimetici (Figura 5.1) che vanno facilmente ad alchilare i residui nucleofili di Ser e Cys.

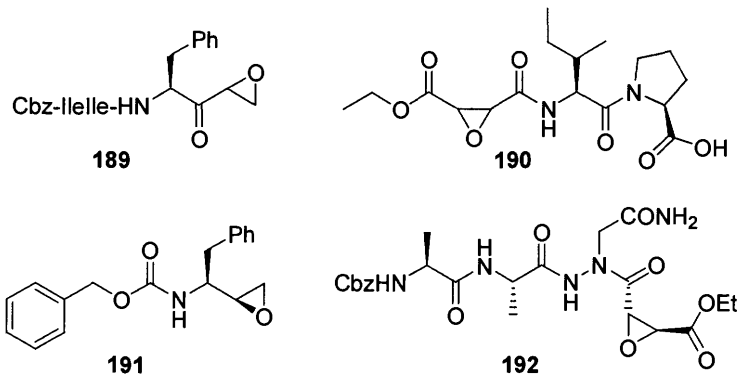


Figura 5.1: esempi di inibitori irreversibili di proteasi a serina e a cisteina

[1] Klabe, R.M.; Bacheler, L.T.; Ala, P.J.; Erickson-Viitanen, S.; Meek, J.L. *Biochemistry* (**1998**), *37*, 8735
[2] a) Richman, D.D. *Nature* (**2001**), *410*, 995; b) Brik, A.; Wong, C.-H. *Org. Biomol. Chem.* (**2003**), *1*, 5
[3] Kohl, N.E.; Emini, E.A.; Schleif, W.A.; Davis, L.J.; Heimbach, J.C.; Dixon, R.A.F.; Scolnick, E.M.; Sigal, I.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**1988**), *85*, 4686
[4] Spaltenstein, A.; Leban, J. J.; Huang, J. J.; Reinhardt, K. R.; Viveros, O. H.; Sigafoos, J.; Crouch, R. *Tetrahedron Lett.* (**1996**), *37*, 1343
[5] a) Demarcus, M.; Ganadu, M. L.; Mura, G. M.; Porcheddu, A.; Quaranta, L.; Reginato, G.; Taddei, M. *J. Org. Chem.* (**2001**), *66*, 697; b) Asgian, J. L.; James, K. E.; Li, Z. Z.; Carter, W.; Barrett, A. J.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* (**2002**), *45*, 4958; c) James, K. E.; Asgian, J. L.; Li, Z. Z.; Ekici, O. D.; Rubin, J. R.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* (**2004**), *47*, 1553; d) Albeck, A.; Persky, R.; Kliper, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1995**), *5*, 1767

Per questi inibitori, grazie alla risoluzione della struttura cristallografica del complesso con l'enzima bersaglio (PDB id: 1csb),[6] è stato effettivamente possibile dimostrare il meccanismo di inibizione irreversibile, dovuto all'apertura dell'anello epossidico e conseguente alchilazione dei residui responsabili della attività enzimatica all'interno del sito catalitico.

Nel caso delle proteasi aspartiche questa strategia potrebbe apparire a prima vista impraticabile, vista la ridotta nucleofilicità degli acidi carbossilici che non reagiscono facilmente con epossidi. Tuttavia, è stato proposto che la presenza contemporanea nel sito catalitico della HIV-PR di due residui di aspartato, uno dei quali protonato, può rendere più reattivo l'enzima attraverso un meccanismo nel quale il residuo ionizzato si comporta da nucleofilo mentre quello protonato attiva l'epossido[7] (Figura 5.2)

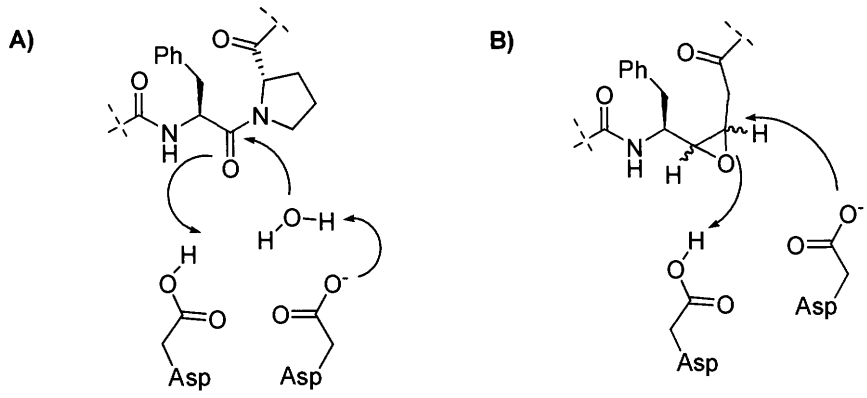


Figura 5.2: idrolisi del substrato (**A**) ed inibizione irreversibile della HIV-PR (**B**)

5.2 Inibitori epossidici dell'HIV-PR

Un'inibizione di tipo irreversibile è stata dimostrata per l'1,2-epossi-3-(*p*-nitrofenossi)propano (EPNP) **193** (Figura 5.3), una piccola molecola che, non solo inibisce in modo irreversibile e non selettivo la HIV-PR, ma si è rivelato attivo su tutte le proteasi aspartiche.[8]

---

[6] Turk, D.; Podobnik, M.; Popovic, T.; Katunuma, N.; Bode, W.; Huber, R.; Turk, V. *Biochemistry* (**1995**), *34*, 4791

[7] a) Mavri, J. *Int. J. Quantum. Chem.* **1998**, *69*, 753

[8] a) Salto, R.; Babè, L.M.; Li, J.; Rosè, J.R.; Yu, Z.; Burlingame, A.; De Voss, J.J.; Sui, Z.; Ortiz de Montellano, P. R.; Craick, C.S. *J. Biol.Chem.* (**1994**), *269*, 10691; b) Caldera, P. S.; Yu, Z.; Knegtel, R. M. A.; McPhee, F.; Burlingame, A. L.; Craik, C. S.; Kuntz, I. D.; Ortiz de Montellano, P. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1997**), *5*, 2019; c) Hyland, L. J.; Tomaszek, T. A., Jr; Roberts, G. D.; Carr, S. A.; Magard, V. W.; Bryan, H. L.; Fakhoury, S. A.; Moore, M. L.; Culp, J. S.; DesJarlais, R. L.; Meek, T. D. *Biochemistry* (**1991**), *30*, 8441

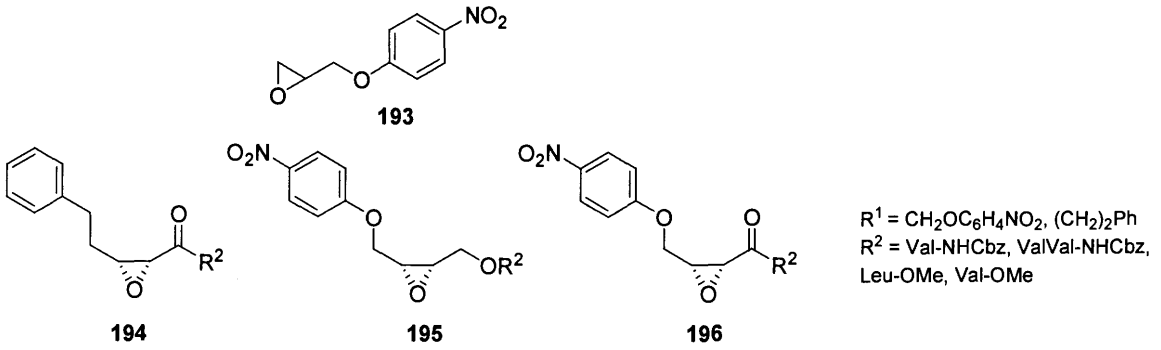


Figura 5.3: struttura dell'EPNP e derivati

L'EPNP, date le ridotte dimensioni (il gruppo *p*-NO_2-fenossi può occupare solo il sito S_1), è un debole inibitore della HIV-proteasi (IC_{50}=11 mM); altri inibitori (**194-196**) a struttura epossidica (Figura 5.3), ottenuti mantenendo il gruppo *p*-nitrofenossi e sostituendo l'epossido in posizione 2 con gruppi amminoacidici, si sono dimostrati moderatamente più attivi[9] o strutture lattamiche a 7 termini in cui è presente un gruppo epossidico.[10]

Partendo dalla struttura cristallografica del complesso tra la HIV-PR e l'aloperidolo **197**,[11] un antipsicotico che inibisce debolmente la proteasi (IC_{50} 125 μM), sono stati individuati alcuni epossidi non peptidici strutturalmente compatibili con il sito attivo della proteasi (Figura 5.4).[12]

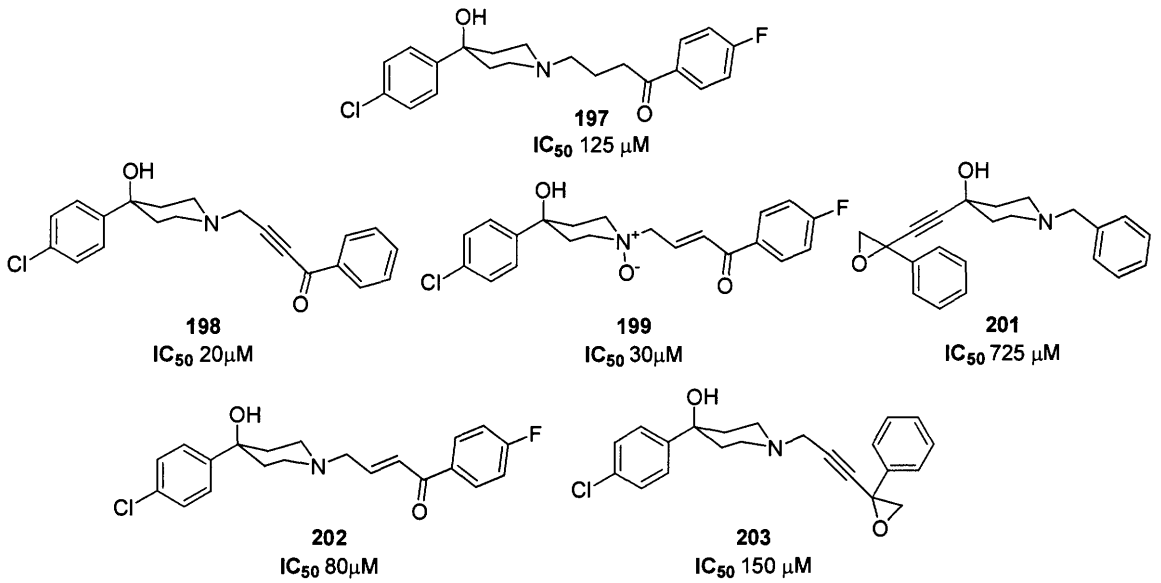


Figura 5.4: Aloperidolo e derivati

[9] Abell, A.D.; Hoult, D.A.; Bergman, D.A.; Fairlie, D.P. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* (**1997**), *7*, 2853

[10] Zaman, S.; Campaner, P. Abell, A. D., *Bioorg. Med. Chem.*, (**2006**), *14*, 8323

[11] Rutenber, E.; Fauman, E. B.; Keenan, R. J.; Fong, S.; Furth, P. S.; Ortiz de Montellano, P. R.; Meng, E.; Kuntz, I. D.; DeCamp, D. L.; Salto, R.; Rosè, J. R.; Craik, C. S.; Stroud, R. M. *J. Biol. Chem.* (**1993**), *268*, 15343

[12] DesJarlais, R.; Seibel, G.; Kuntz, I.; Furth, P.; Alvarez, J.; Ortiz de Montellano, P.; DeCamp, D.; Babè, L.; Craick, C.S. *Proctl. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**1990**), *87*, 6644

E' stato dimostrato che gli inibitori così ottenuti alchilano selettivamente uno dei due residui aspartici del sito attivo[13] dimostrandosi poco reattivi nei confronti dei residui di cisteina presenti nella proteasi, al contrario di quanto avviene con strutture simili nelle quali l'epossido è rimpiazzato da un chetone α,β insaturo.[14] L'attività, tuttavia, è modesta con IC_{50} compresi tra il milli- e il micromolare.

Migliori risultati sono stati ottenuti inserendo l'anello epossidico all'interno di strutture peptidiche e peptidomimetiche che garantiscono un buon riconoscimento da parte della proteasi.[15] Alcuni esempi sono riportati nella Figura 5.5.

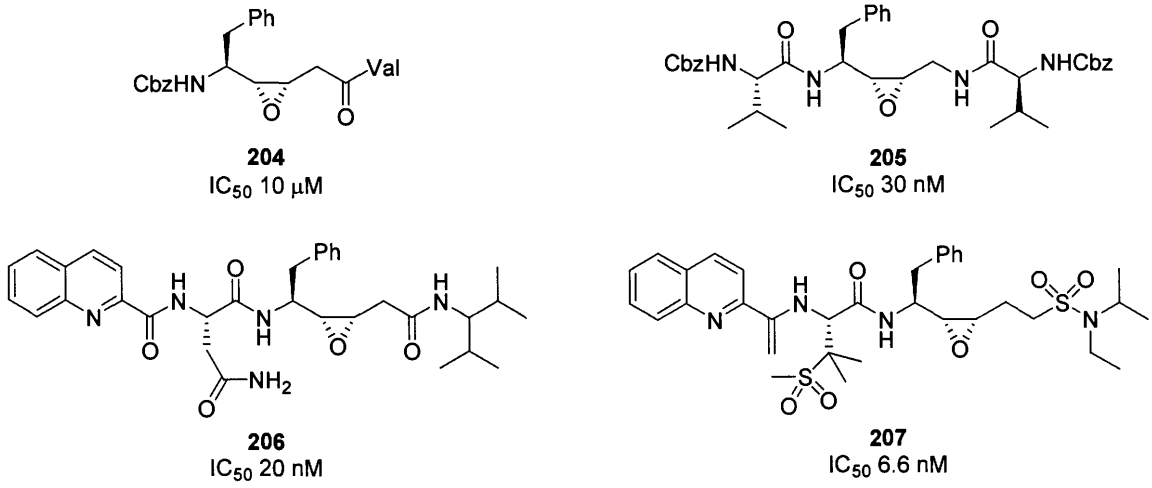


Figura 5.5: inibitori della HIV-PR basati su epossidi peptidomimetici

Alcuni tra questi inibitori sono caratterizzati da una buona attività, con IC_{50} nell'ordine del nanomolare, dimostrando quindi che questo può essere considerato un promettente approccio all'inibizione irreversibile della HIV-PR.

---

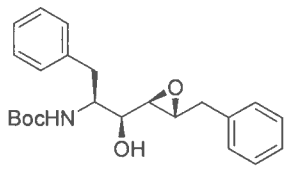
[13] Yu, Z.; Caldera, P.; McPhee, F.; De Voss, J.J.; Jones, P.R.; Burlingame, A.L.; Kuntz, I.D.; Craick, C.S.; Ortiz de Montellano, P.R. *J. Am. Chem. Soc.* (**1996**), *118*, 5846

[14] De Voss, J.J.; Sui, Z.; DeCamp, D.L.; Salto, R.; Babè, L.M.; Craick, C.S.; Ortiz de Montellano, P.R. *J. Med. Chem.* (**1994**), *37*, 665

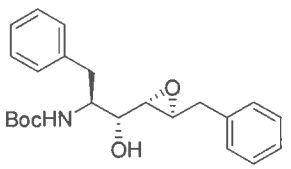
[15] a) Moelling, K.; Schulze, T.; Knoop, M. T.; Kay, J.; Jupp, R.; Nicolaou, G.; Pearl, L. H. *FEBS Lett.* (**1990**), *261*, 373. b) Pal, R.; Gallo, R. C.; Sarnagadharan, M. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**1988**), *85*, 9283. c) Mann, A.; Quaranta, L.; Reginato, G.; Taddei, M. *Tetrahedron Lett.* (**1996**), *37*, 2651. d) Grant, S. K.; Moore, M. L.; Fakhoury, S. A.; Tomaszek, Jr, T. A.; Meek, T. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1992**), *2*, 1441. e) Lee, C. S.; Choy, N.; Park, C.; Choi, H.; Son, Y. C.; Kim, S.; Ok, J. H.; Yoon, H.; Kim, S. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1996**), *6*, 589. f) Kempf, D. J.; Norbeck, D. W.; Codacovi, L.; Wang, X. C.; Kohlbrenner, W. E.; Wideburg, N. E.; Paul, D. A.; Knigge, M. F.; Vasavanonda, S.; Craig-Kennard, A.; Saldivar, A.; Rosenbrook, W. Jr.; Clement, J. J.; Plattner, J. J.; Erickson, J. *J. Med. Chem.* (**1990**), *33*, 2687. g) Park, C.; Koh, J. S.; Son, Y. C.; Choi, H.; Lee, C. S.; Choy, N.; Moon, K. Y.; Jung, W. H.; Kim, S. C.; Yoon, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1995**), *5*, 1843. h) Choy, N.; Choi, H.; Jung, W. H.; Kim, C. R.; Yoon, H.; Kim, S. C.; Lee, T. G.; Koh, J. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1997**), *20*, 2635

5.3 Nuovi inibitori irreversibili a struttura pseudopeptidica

Alcuni anni addietro era stata descritta la sintesi degli epossialcoli **208a** e **208b** e il loro utilizzo quali precursori di isosteri diidrossietilenici[16] e mono-idrossietilenici[17] del dipeptide Phe-Phe. La scarsa reattività di questi epossidi, che possono a loro volta essere considerati degli isosteri Phe-Phe, aveva suggerito un possibile utilizzo di strutture simili quali inibitori selettivi della HIV-PR; non sorprendentemente, l'attività biologica di queste semplici molecole di piccole dimensioni era modesta, con valori di IC_{50} attorno a 600 μM.[18]



208a



208b

Dal docking di una delle strutture di riferimento (**208a**) all'interno del sito catalitico della HIV-PR (Figura 5.6), è possibile osservare come i subsiti S2, S3 e S2', S3' non siano completamente occupati dall'inibitore.

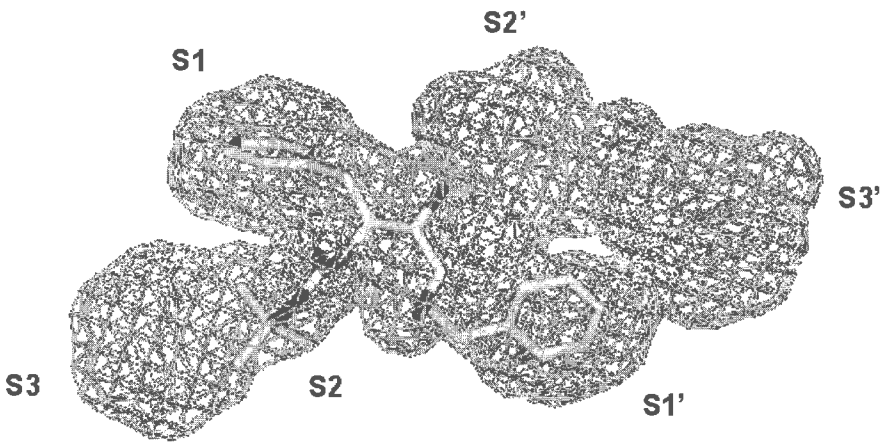
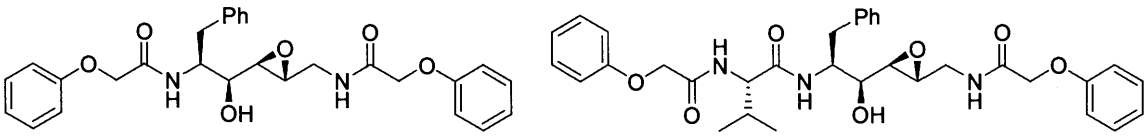


Figura 5.6: docking dell'inibitore di riferimento **208a** all'interno del sito catalitico della HIV-PR

A partire dalla struttura **208a** era stata quindi sviluppata una prima serie di due epossidi **209** e **210** modificati in maniera mirata a migliorare l'occupazione dei subsiti S3-S3' (Figura 5.7). I risultati erano stati incoraggianti, in particolare per l'inibitore **210**, caratterizzato da un IC_{50} pari a 39 μM.

---

[16] Benedetti, F.; Miertus, S.; Norbedo, S.; Tossi, A.; Zlatoidzky, P. *J Org. Chem.* (**1997**), *62*, 9348
[17] Benedetti, F.; Berti, F.; Norbedo, S. *J. Org. Chem.* (**2002**), *67*, 8635
[18] Benedetti, F.; Berti, F.; Miertus, S.; Romeo, D.; Schillani, F.; Tossi, A., *ARKIVOC* (**2003**), *14*, 140

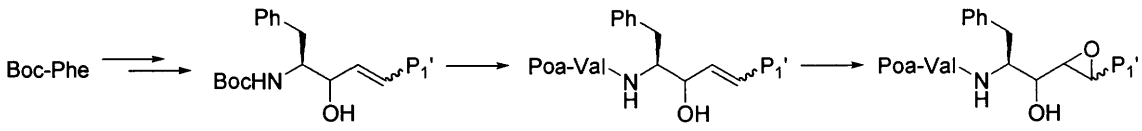


209
IC_{50} 150 μM

210
IC_{50} 39 μM

Figura 5.7: primi inibitori ottenuti a partire dalla struttura del lead compound **208a**

Nel corso di questo lavoro di dottorato è stata ampliata la serie di inibitori focalizzando l'attenzione sul residuo in posizione P1', sulla stereochimica dei centri chinali, introdotti in modo stereocontrollato nel corso della sintesi, e sulla geometria dell'anello epossidico (*trans* o *cis*). Il gruppo fenilico in P1 è stato mantenuto per tutti gli inibitori della serie, in quanto è noto che determina interazioni favorevoli a livello del sottosito enzimatico S1,[19] ed è stato conservato nelle posizioni P2/P3, il residuo della fenossiacetilvalina (PoaVal) che aveva già dato buoni risultati tanto nel caso dell'epossido **210** che in altri inibitori reversibili basati su isosteri diidrossietilenici.[20]
In tutti i casi si è cercato di contenere il peso molecolare entro il limite dei 500 Da, come pure il numero di residui in grado di formare legami idrogeno, nel tentativo, così, di rispettare alcuni dei parametri che generalmente garantiscono una buona biodisponibilità per un principio attivo.[21]
La sintesi segue lo Schema generale 5.1, nel quale la N-Boc fenilalanina viene inizialmente convertita nel pertinente alcol allilico a geometria *E* oppure *Z*; questo viene quindi accoppiato con la fenossiacetilvalina mentre l'epossidazione del doppio legame costituisce il passaggio finale. Come gruppi nella posizione P1' sono stati considerati il fenile, il benzile e il 4-fenossibenzile per gli epossidi *trans* e il solo fenile per quelli *cis*.



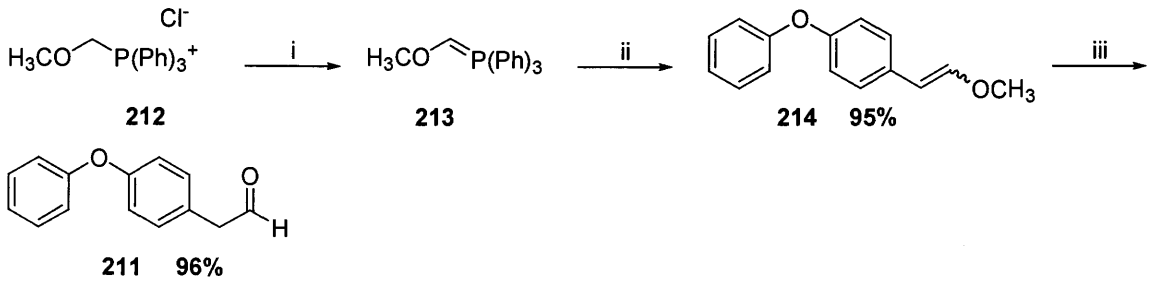
Schema 5.1: strategia generale per la sintesi di epossidi peptidomimetici

5.3.1 Sintesi degli alcoli allilici *E*

Per la sintesi degli alcoli allilici a geometria *E* del doppio legame è stato adottato lo stesso approccio sintetico già descritto per gli inibitori Phe-Pro, basato sulla reazione di olefinazione di Horner-Emmons di un fosfonochetone derivante dalla

[19] Tossi, A.; Antcheva, N.; Romeo, D.; Miertus, S. *J. Peptide Res.* (**1995**), *8*, 328
[20] Tossi, A.; Bonin, I.; Antcheva, N.; Norbedo, S.; Benedetti, F.; Miertus, S.; Nair, A.C.; Maliar, T.; Del Bello, F.; Palù, G.; Romeo, D., *Eur. J. Biochem.* (**2000**), *267*, 1715
[21] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Del. Rev.* (**1997**), *23*, 3

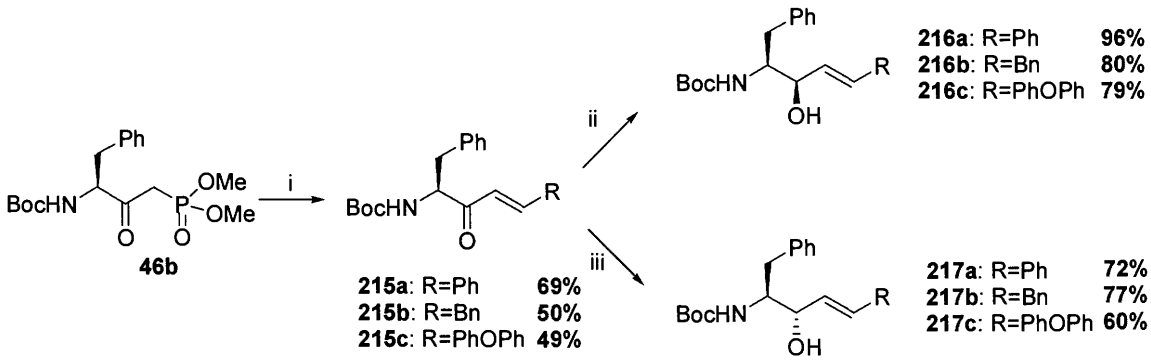
fenilalanina con una opportuna aldeide. A questo scopo è stato quindi necessario sintetizzare preliminarmente la 4-fenossifenilacetaldeide **211** per omologazione della 4-fenossibenzaldeide disponibile commercialmente. Per l'omologazione è stata seguita la strategia riportata da Wünsch[22] per la sintesi di aldeidi fenilacetiche protette (Schema 5.2). Il primo passaggio consiste in una reazione di olefinazione di Wittig della *p*-fenossi benzaldeide con l'ilide **213** che si ottiene trattando il metossimetiltrifenilfosfonio cloruro **212** con potassio *tert*-butossido. L'enoletere **214** così ottenuto può essere, infine, idrolizzato ad aldeide **211** con acido cloridrico a riflusso per una notte.



Schema 5.2: i) KO*t*Bu, THF, -10 °C; ii) *p*-fenossibenzaldeide, THF, -10 °C; iii) THF/H_2O, HCl conc., Δ

I chetoni α,β-insaturi **215a-c** sono stati quindi preparati per reazione di Horner-Emmons, variante della reazione di Wittig selettiva per l'alchene *trans*,[23] del fosfonato **46b** già descritto, rispettivamente, con aldeide benzoica, fenilacetica e 4-fenossifenilacetica (Schema 5.3). Negli ultimi due casi è preferibile interrompere la reazione a bassa conversione per evitare l'isomerizzazione degli alcheni **215b,c** nei più stabili isomeri β,γ-insaturi, nei quali il doppio legame è coniugato con l'anello aromatico, e per limitare la formazione di prodotti di autocondensazione dell'aldeide che rendono difficile la successiva purificazione del prodotto. La stereochimica *trans* del doppio legame è confermata dalla costante di accoppiamento tra i due idrogeni vinilici, compresa tra 15.5 e 16 Hz.

[22] Wünsch, B. *Arch. Pharm.* (**1990**), *323*, 493
[23] a) Mikolajczyk, M.; Balczewski, P. *Synthesis* (**1987**), *6*, 659; b) Maryanoff, B.E.; Reitz, A.B. *Chem. Rev.* (**1989**), *89*, 863



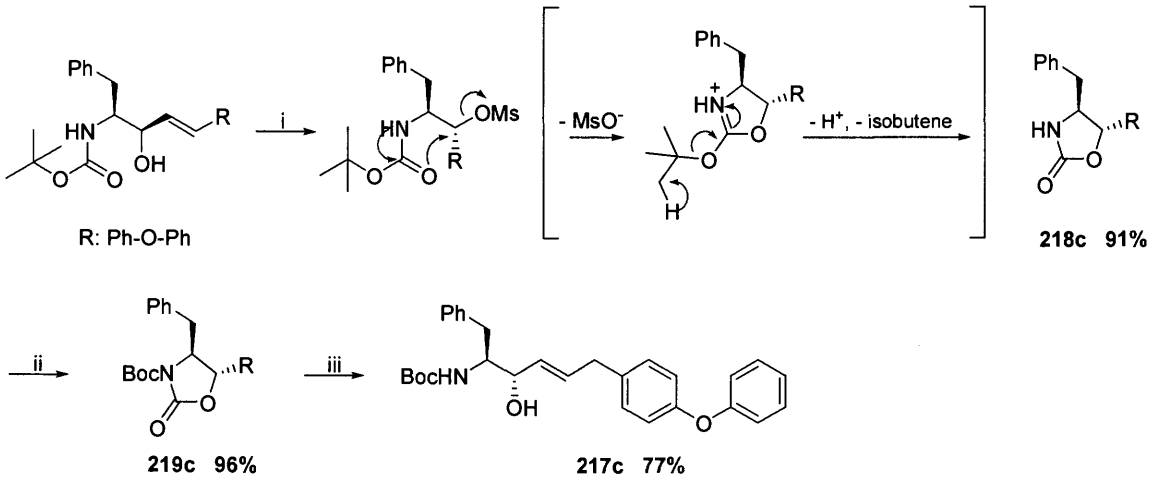
Schema 5.3: i) R-CHO (R: Ph, Bn, PhOPh), K_2CO_3, EtOH, rt; ii) LTBAH, EtOH, -78 °C; iii) L-Selectride, MeOH, -78 °C

Dalla riduzione degli enoni **2156a-c** con litio-tri-*t*-butossi alluminio idruro (LTBAH) si ottengono quindi, con buone rese e con elevata diastereoselettività (>95:5), gli alcoli allilici a configurazione (*S,R*),[24] mentre la stessa reazione condotta con tri-sec-butil boroidruro (L-Selectride) in metanolo a -78 °C porta preferibilmente agli alcoli allilici a configurazione (*S,S*).[25] In questo caso però, mentre la diastereoselettività è buona (9:1) nel caso della riduzione degli enoni **215a,b**, nella riduzione di **215c** si osserva una drastica riduzione della stessa, (3:1), accompagnata anche da un aumento dei tempi di reazione e dalla formazione dell'alcol saturo.

I risultati ottenuti sono consistenti con il modello stereochimico Cram chelato, per la riduzione con LTBAH, e Felkin-Anh per quella con L-Selectride.

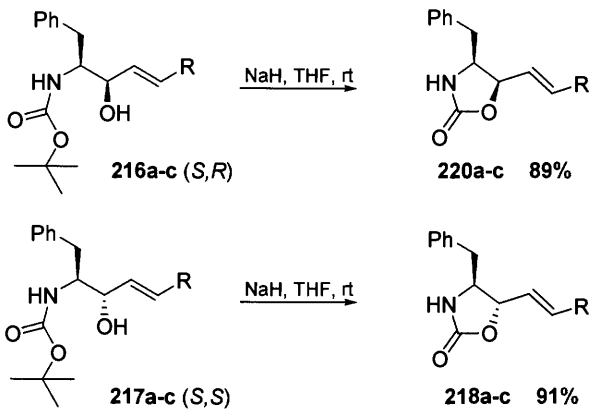
Vista la scarsa selettività della riduzione e il conseguente calo di resa rispetto agli altri alcoli, nel caso dell'alcol **217c** (*S,S*), è possibile pensare di variare il protocollo sintetico (Schema 5.4); la sintesi infatti di un unico alcol allilico a configurazione (*S,R*), la successiva epimerizzazione tramite conversione nel corrispondente mesilato, la ciclizzazione secondo un meccanismo di tipo S_N2 a dare l'ossazolidinone **218c**, la riprotezione **219c** e successiva idrolisi consentono di ottenere l'alcol allilico **217c** a configurazione (*S,S*) (Cfr. anche Par. 4.2.1).[26]

[24] Hoffman, R. V. ; Maslouh, N. ; Cervantes-Lee, F. *J. Org. Chem.* (**2002**), *67*, 1045
[25] Rodriguez, A. C.; Picó Ramos, A.; Hawkes, G. E.; Berti, F.; Resmini, M. *Tetrahedron: Asymm.* (**2004**), *15*, 1847
[26] Benedetti, F.; Norbedo, S. *Tetrahedron Lett.* (**2000**), *41*, 10071



Schema 5.4: i) MsCl, DCE, 0 °C; ii) Boc_2O, NaH, THF, rt; iii) K_2CO_3, $MeOH/H_2O$, rt

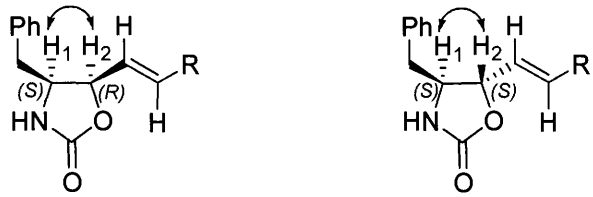
La dimostrazione che la configurazione relativa dei due centri chirali negli isomeri ottenuti è *unlike* (e quindi quella assoluta è *S,R*) o *like* (*S,S*) è stata ottenuta sintetizzando i corrispondenti ossazolidinoni **218a-c** e **220a-c** (Schema 5.5).[27]



Schema 5.5: sintesi degli ossazolidinoni

La struttura degli ossazolidinoni è stata confermata da misure di NOE (Figura 5.8). Negli ossazolidinoni **220a-c**, che derivano dagli alcoli **216a-c**, i due idrogeni legati ai carboni chirali sono in *cis*, mentre negli ossazolidinoni **218a-c**, in cui si ipotizza una configurazione *like*, i due idrogeni sono in *anti* e quindi relativamente lontani. Infatti, saturando il segnale H-C_1 degli ossazolidinoni **220a-c** si osserva un innalzamento medio dell'11% nel segnale di H-C_2, mentre nel caso degli ossazolidinoni **218a-c** si osserva un innalzamento attorno al 2%. Gli effetti NOE osservati confermano quindi una struttura *cis* per gli ossazolidinoni **220a-c** ed una struttura *anti* per gli ossazolidinoni **218a-c**.

[27] a) Sakaitani, M; Ohfune, Y. *J. Am. Chem. Soc.* (**1990**), *112*, 1150; b) Dondoni, A.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Pedrini, P. *J. Org. Chem.* (**1990**), *55*, 1439; c) Chung, S.-K.; Kang, D.-H. *Tetrahedron: Asymm.* (**1997**), *8*, 3027



Ossazolidinone	NOE (%)
220a	11
218c	2
220b	12
218b	2.3
220a	11.8
218a	2.6

Figura 5.8: NOE degli ossazolidinoni

Poiché la configurazione del C_1 in **218a-c** e **220a-c** è necessariamente *S* in quanto deriva da un aminoacido della serie naturale, rimane assegnata la configurazione *R* del C_2 degli ossazolidinoni **220a-c** e quella *S* degli ossazolidinoni **218a-c**. Anche gli alcoli **216a-c** (*S,R*) e **217a-c** (*S,S*) da cui derivano devono possedere la stessa configurazione, in accordo con quanto previsto per la stereoselettività della reazione di riduzione degli enoni **215a-c**.

Per questa via é stato quindi possibile realizzare un piccolo set di alcoli allilici *trans* (Figura 5.9), che differiscono per stereochimica e natura di uno dei residui presenti.

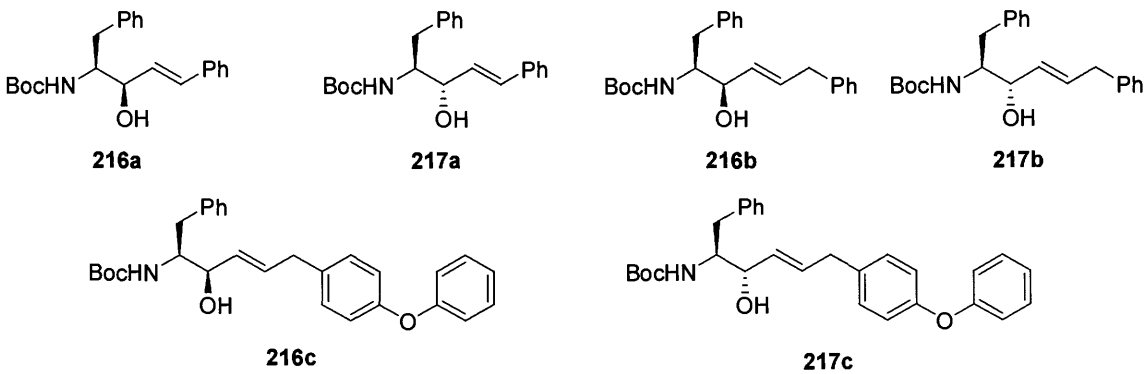


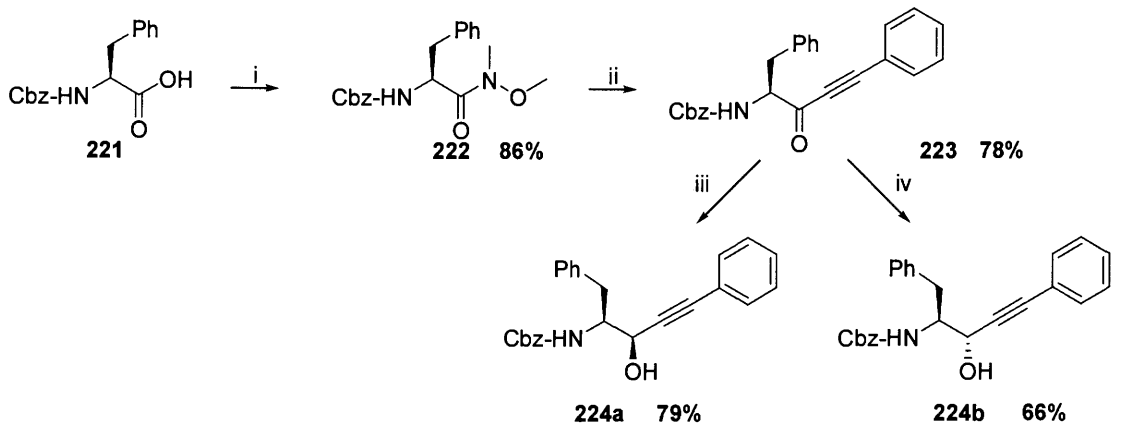
Figura 5.9: alcoli allilici *trans*

5.3.2 Sintesi degli alcoli allilici *Z*

In questo caso (Schema 5.6) la sintesi parte dalla fenilalanina N-Cbz protetta **221** che viene inizialmente convertita nella corrispondente ammide di Weinreb **222**[28] che può essere direttamente utilizzata, senza ulteriore purificazione, nel successivo passaggio di

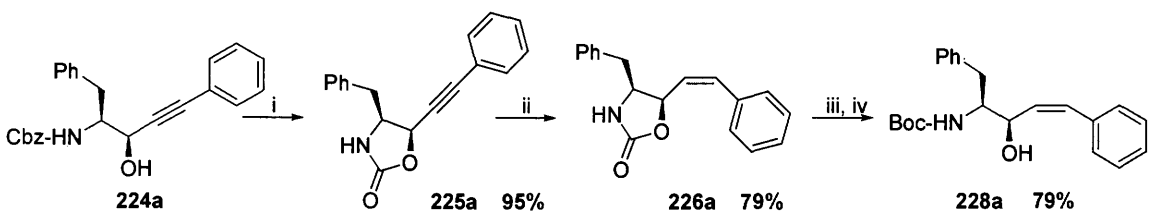
[28] a) Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* (**1981**), *22*, 3815; b) Angelastro M. R., Peet N. T., Bey, P.; *J. Org. Chem.* (**1989**), *54*, 3913

addizione di feniletinil litio (ottenuto in situ per reazione tra fenilacetilene e n-BuLi).[29] La riduzione del risultante inone **223**, con LTBAH e con L-Selectride procede analogamente a quanto visto in precedenza per gli alcoli allilici *Z* e fornisce i due alcoli **224a** a configurazione (*S,R*) e **224b** (*S,S*) la cui stereochimica è stata, anche in questo caso, confermata dalla misura dell'effetto NOE nei rispettivi ossazolidinoni.



Schema 5.6: i) *i*BuOCOCl, CH_2Cl_2, *N,O*-dimetilidrossilammina cloridrato, -15 °C; ii) *n*BuLi, fenilacetilene, THF, -40 °C; iii) LTBAH, EtOH, -78 °C; iv) L-Selectride, MeOH, -78 °C

Il successivo passaggio di riduzione del triplo legame ha rappresentato il passaggio più complesso della sintesi. La scelta del gruppo proteggente Cbz dell'amminoacido di partenza era stata dettata dal tentativo di ridurre il numero di passaggi della sintesi, postulando che fosse possibile, in un unico passaggio, ridurre selettivamente il triplo legame e rimuovere la protezione Cbz. In realtà, anche utilizzando il catalizzatore di Lindlar drogato con HCOOH, chinolina, 2,2'-bipiridile si è sempre ottenuto l'alcol saturo, senza, per contro, distacco del gruppo proteggente. Gli alcoli desiderati sono stati quindi ottenuti (Schema 5.7) trasformando gli alcoli **224a,b** nei corrispondenti ossazolidinoni (**225a,b**), che sono stati successivamente idrogenati in presenza di non più dello 0.1% di catalizzatore di Lindlar drogato con chinolina, riprotetti con Boc (**227a,b**) ed idrolizzati (**228a,b**).[30]



Schema 5.7: i) NaH, THF, rt; ii) H_2, Pd/$BaSO_4$, chinolina, EtOH, rt; iii) Boc_2O, NaH, THF; iv) K_2CO_3, MeOH/H_2O, rt

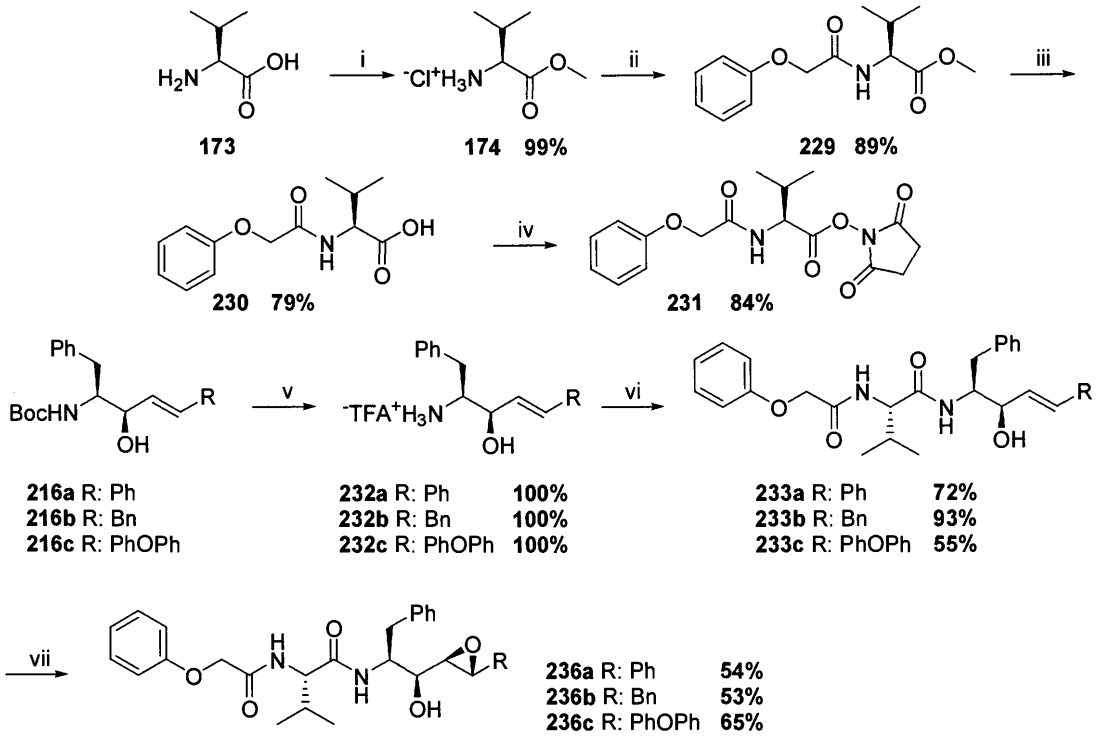
[29] Qu, B.; Collum, D. B. *J. Org. Chem.* (**2006**), *71*, 7117
[30] Kano, S.; Yokomatsu, T.; Iwasawa, H.; Shibuya, S.; *Chem. Pharm. Bull.*, (**1988**), *36*, 3296

La geometria *cis* degli alcoli allilici così ottenuti é confermata dal valore di 11.7 Hz per la costante di accoppiamento tra i protoni vinilici (contro 16.1 Hz per i corrispondenti alcoli *trans*).

5.3.3 Sintesi degli inibitori

Avendo a disposizione una serie di alcoli allilici con sterochimica ben definita, si è quindi passati alla sintesi degli inibitori a struttura epossidica.

La fenossiacetilvalina è stata facilmente ottenuta dalla valina in tre passaggi (Schema 5.8) mentre gli alcoli allilici sono stati deprotetti per trattamento con acido trifluoroacetico in diclorometano.[31] L'accoppiamento degli amminoalcoli con la fenossiacetilvalina **230** è stato effettuato attivando quest'ultima come N-idrossisuccinimidoil estere (**231**) e usando dicicloesilcarbodimmide come agente condensante (Schema 5.8).[32] Allo scopo di evitare reazioni indesiderate l'estere attivato è stato purificato ed usato in quantità stechiometrica per l'accoppiamento con gli amminoalcoli. Infine, gli alcoli **233a-c** (*S,S,R*) e **234a-c** (*S,S,S*) *trans*, **235a** (*S,S,R*) e **235b** (*S,S,S*) *cis* così ottenuti sono stati *sin*-epossidati con acido m-cloroperbenzoico per dare un set di 8 inibitori (Cfr. Fig. 5.10).

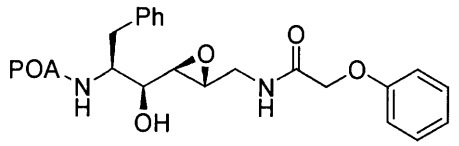


Schema 5.8: i) $SOCl_2$, MeOH, Δ; ii) POA, EDC, HOBT, NMM, CH_3CN, rt; iii) LiOH 1N/THF, rt; iv) N-idrossisuccinimmide, DCC, diossano, rt; v) TFA/CH_2Cl_2 4/6, rt; vi) POAVal-OSu, TEA, CH_2Cl_2, rt; vii) *m*CPBA, CH_2Cl_2, 0 °C

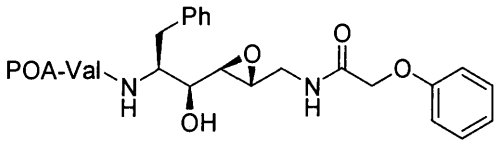
[31] Kappeler, H.; Schwyzer, R. *Helv. Chim. Acta* (**1960**), *43*, 1453.
[32] Anderson, G.W.; Zimmerman, J.E.; Callahan, F.M. *J. Am. Chem. Soc.* (**1964**), *86*, 1839

5.3.4 Valutazione dell'attività e correlazioni struttura reattività

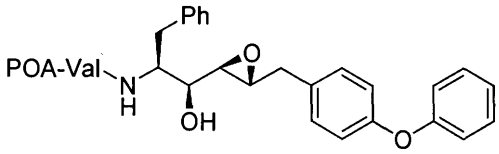
Gli epossidi ottenuti sono stati inizialmente valutati come inibitori competitivi. Affinché l'inibitore (irreversibile) sia sufficientemente selettivo per il suo bersaglio è infatti indispensabile che possegga una buona affinità per l'enzima dal quale dovrebbe, idealmente, essere sequestrato. I valori di IC_{50} sono quindi stati ottenuti in maniera del tutto analoga a quanto già visto per gli inibitori reversibili basati su isosteri Phe-Pro e sono riportati in Figura 5.10, in cui sono riportati per confronto anche i valori di IC_{50} degli inibitori epossidici precedentemente ottenuti.



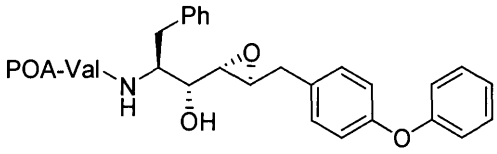
209 IC_{50} 150 μM



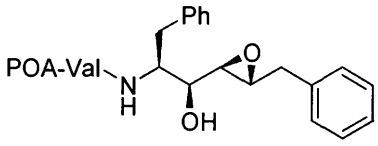
210 IC_{50} 39 μM



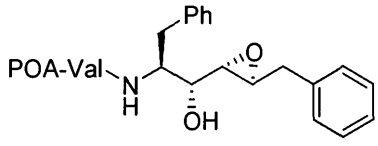
236c IC_{50} 56 μM



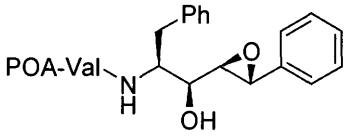
237c IC_{50} 48 μM



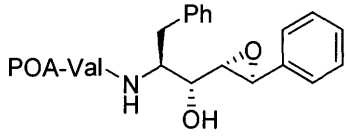
236b IC_{50} 1.7 μM



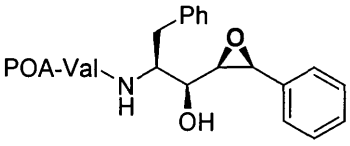
237b IC_{50} 0.6 μM



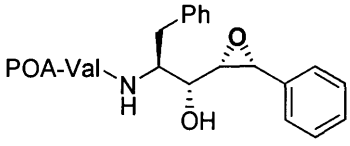
236a IC_{50} 6.7 μM



237a IC_{50} 2.4 μM



238a IC_{50} 5.2 μM



238b IC_{50} 2.9 μM

Figura 5.10: inibitori epossialcolici e relativi valori di IC_{50}

Il set di inibitori è sufficientemente ampio da consentire di individuare alcune correlazioni qualitative tra struttura e attività.

1) Confrontando l'inibitore **209** con tutti gli altri è immediatamente evidente che la presenza della valina in posizione P2 migliora notevolmente l'attività

dell'inibitore; probabilmente la valina si inserisce nella tasca S2 (vedi Fig. 5.6) e il POA va ad occupare, almeno parzialmente il subito S3.

2) L'attività è favorita da residui di piccole dimensioni sull'anello ossiranico (inibitori **236b-238b**). Probabilmente, data la rigidità dell'epossido, il sostituente in questa posizione non riesce ad accedere ai subsiti S2' e S3', che rimangono comunque inoccupati, ma va ad impegnare solamente la tasca S1', relativamente piccola e comunque poco compatibili con residui di dimensioni maggiori come quelli degli epossidi **209-237c**.
3) Un gruppo benzilico in posizione P1' (inibitori **236b** e **237b**) è più efficiente di un fenile (inibitori **236a-238b**), probabilmente perché, essendo più flessibile, riesce ad adattarsi meglio alla conformazione del subito S1'.
4) La stereochimica *cis/trans* dell'epossido (inibitori **236a-238b**) ha un effetto modesto sull'attività. La modellizzazione di queste strutture potrebbe forse chiarire se ciò consegue a una riorientazione del sostituente (fenile) dal subito S1' nella serie *trans* al subito S2' nella serie *cis* (figura 5.6), ferma restando la posizione dell'anello ossiranico nel sito dell'enzima, o se, viceversa, è l'anello triatomico che si riorienta in modo da mantenere il fenile in S1'.
5) Negli epossidi *trans*, la configurazione (*S,R,S,S*) (inibitori **237b e 237a**) è preferita rispetto a quella (*S,S,R,R*) (**236b** e **236a**); la situazione si ripete anche negli epossidi *cis* (**238a** e **238b**).

Per ottenere evidenze di inibizione irreversibile è attualmente in corso uno studio dettagliato sul meccanismo di azione dell'inibitore **237b**, il più attivo della serie, condotto studiando la variazione di attività proteolitica nel tempo, per altro poco significativa visto che l'enzima è comunque soggetto ad autoprotolisi, e cercando di risolvere, con tecniche cristallografiche e con la spettrometria di massa, la struttura (covalente/non covalente) del complesso enzima-inibitore. Comunque, la buona attività di alcuni degli inibitori ottenuti (**236b, 237b, 237a**) indica sin d'ora che l'approccio è promettente, mentre le correlazioni trovate tra struttura e attività pongono una base razionale alla progettazione di nuovi, più efficienti, inibitori.

6 Inibitori misti sito della dimerizzazione-sito catalitico

6.1 Il sito della dimerizzazione

L'assemblaggio delle due unità monomeriche costituenti la proteasi del virus HIV-1 porta alla formazione del sito catalitico e quindi alla forma (Figura 6.1) attiva dell'enzima.

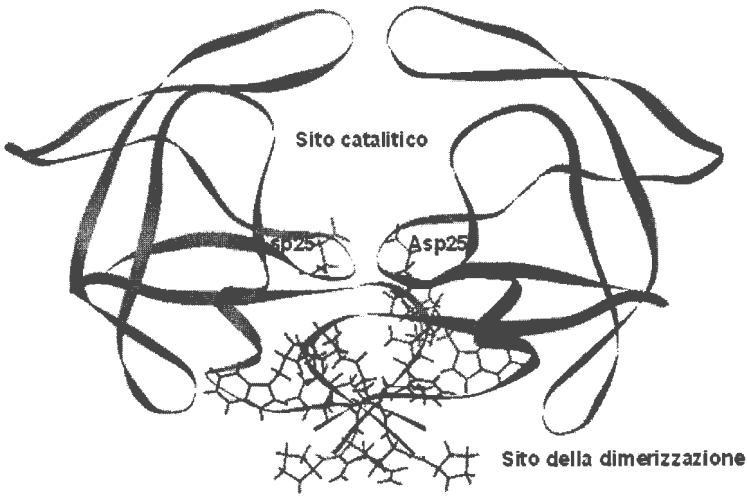


Figura 6.1: rappresentazione del sito della dimerizzazione e del sito catalitico della HIV-1 proteasi

In particolare, i residui amminoacidici in posizione 1-6 (Pro, Gln, Ile/Phe, Thr/Ser, Leu, Trp) della sequenza N-terminale e quelli della sequenza C-terminale in posizione 95-99 (Cys/Ala, Thr/Ser, Leu, Asn, Phe/Leu) di ciascun monomero si interdigitano in una struttura a β-foglietto antiparallelo (Figura 6.2), altamente ordinata[1] e conservata[2] anche nella HIV-PR mutanti.

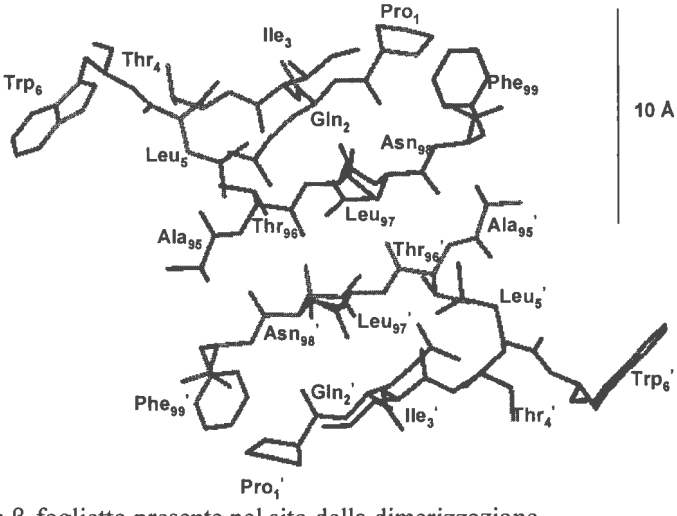


Figura 6.2: struttura a β-foglietto presente nel sito della dimerizzazione

---

[1] Weber, I. T. *J. Biol. Chem.* (**1990**), *265*, 10492

[2] a) Wlodawer, A.; Miller, M.; Jaskòlski, M.; Sathyanarayana, B. K.; Baldwin, E.; Weber, I. T.; Selk, L. M.; Clawson, L.; Schneider, J.; Kent, S. B. H. *Science* (**1989**), *245*, 616; b) Gustchina, A.; Weber, I. T. *Proteins* (**1991**), *10*, 325; c) Schinazi, R. F.; Larder, B. A.; Mellors, J. W. *Antiviral News* (**1997**), *5*, 129

Il β-foglietto antiparallelo appena descritto, in cui le catene di ciascun monomero si dispongono ad una distanza di circa 10 Å l'una dall'altra, concorre per più del 75% alla formazione del dimero, e quindi dell'enzima nella sua forma attiva,[3] grazie ad una fitta rete di legami idrogeno e interazioni di Van der Waals.[4]

6.2 Inibitori della dimerizzazione

L'alterazione della struttura dimerica utilizzando piccole sequenze peptidiche è un approccio che è stato inizialmente proposto per diverse tipologie di enzimi coinvolti nell'insorgenza di varie patologie, quali, ad esempio, la ribonucleotide riduttasi virale dell'*Herpes simplex*[5] o la proteasi virale della mieloblastosi aviaria.[6]

Nel caso della proteasi da HIV, l'evidenza che essa sia in grado di espletare la propria azione solo come struttura dimerica, derivante sia da studi sul folding di due unità monomeriche di cui una mutata[7] sia dall'analisi della dipendenza dell'attività catalitica dalla concentrazione enzimatica,[8] ha permesso l'applicazione di un approccio del tutto analogo.

I primi inibitori realizzati sfruttando questo principio sono stati corte sequenze peptidiche contenenti gli stessi amminoacidi delle sequenze N- e C- terminali presenti nel sito della dimerizzazione, troncate e/o acilate al gruppo amminico terminale (Fig. 6.3).[9] Una volta verificata l'effettiva efficacia degli inibitori proposti e chiarito il loro meccanismo d'azione a livello del sito della dimerizzazione,[10] queste strutture sono state il punto di partenza per una serie di studi dedicati, da un lato, all'ottimizzazione della sequenza iniziale, dall'altro, alla sintesi di inibitori non più lineari, ma ramificati ed intercalati da linker di diverse tipologie.

---

[3] Ishima, R.; Ghirlando, R.; Tozser, J.; Gronenborn, A. M.; Torchia, D. A.; Louis, J. M. *J. Biol. Chem.* (**2001**), *276*, 49110

[4] Todd, M. J.; Semo, M.; Freire, E. *J. Mol. Biol.* (**1998**), *283*, 475

[5] a) Cohen, E. A.; Gaudreau, P.; Brazeau, P.; Langelier, Y. *Nature* (**1986**), *321*, 441; b) Dutia, B. M.; Frame, M. C.; Subak-Sharpe, J. H.; Clark, W. N.; Marsden, H. S. Nature (**1986**), *321*, 439

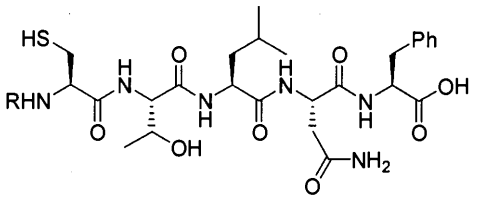
[6] Katoh, I.; Ikawa, Y.; Yoshinaka, Y. *J. Virol.* (**1989**), *63*, 2226

[7] Babé, L. M.; Pichuantes, S.; Craik, C. S. *Biochemistry* (**1990**), *30*, 106

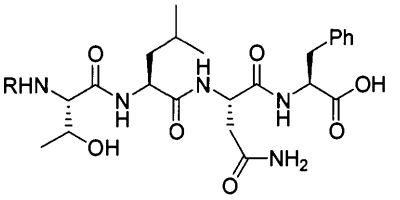
[8] Cheng, Y.S. E.; Yin, F. H.; Foundling, S.; Blomstrom, D.; Kettner, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**1990**), *87*, 9660

[9] a) Schramm, H. J.; Nakashima, H.; Schramm, W.; Wakayama, H.; Yamamoto, N. *Biochem. Biophys Res. Commun.* (**1991**), *179*, 847; b) Franciskovich, J.; Houseman, K.; Mueller, R.; Chmielewski, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1993**), *3*, 765; c) Schramm, H.; Billich, A.; Jaeger, E.; Rucknagel, K.; Arnold, G.; Schramm, W. *Biochem. Biophys Res. Commun.* (**1993**), *194*, 595

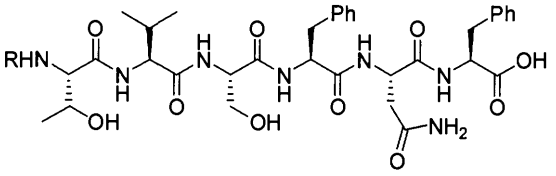
[10] Zhang, Z.; Poorman, R.; Maggiora, L.; Heinrikson, R.; Kezdy, F. *J. Biol. Chem.* (**1991**), *266*, 15591



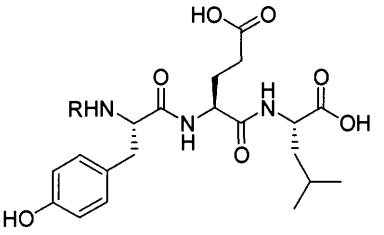
239a IC_{50}=150μM (R=H)
239b IC_{50}=500μM (R=Ac)



240a IC_{50}=660μM (R=H)
240b IC_{50}=1500μM (R=Ac)



241a IC_{50}=80μM (R=Ac)
241b IC_{50}=0.5μM (R=Palmitoil)



242a IC_{50}=75μM (R=H)
242b IC_{50}=34μM (R=Ac)
242c IC_{50}=150nM (R=Palmitoil)

Figura 6.3: inibitori della dimerizzazione a singola catena peptidica

Tra i primi esempi proposti, le due sequenze N- e C- terminali presenti nel sito della dimerizzazione risultano spaziate da catene con un numero di atomi variabile da 10 a 16, fino alla determinazione di una lunghezza ottimale pari a 14 unità metileniche, cioè simile alla distanza di 10 Å intercorrente tra le catene amminoacidiche nel sito (Figura 6.4).

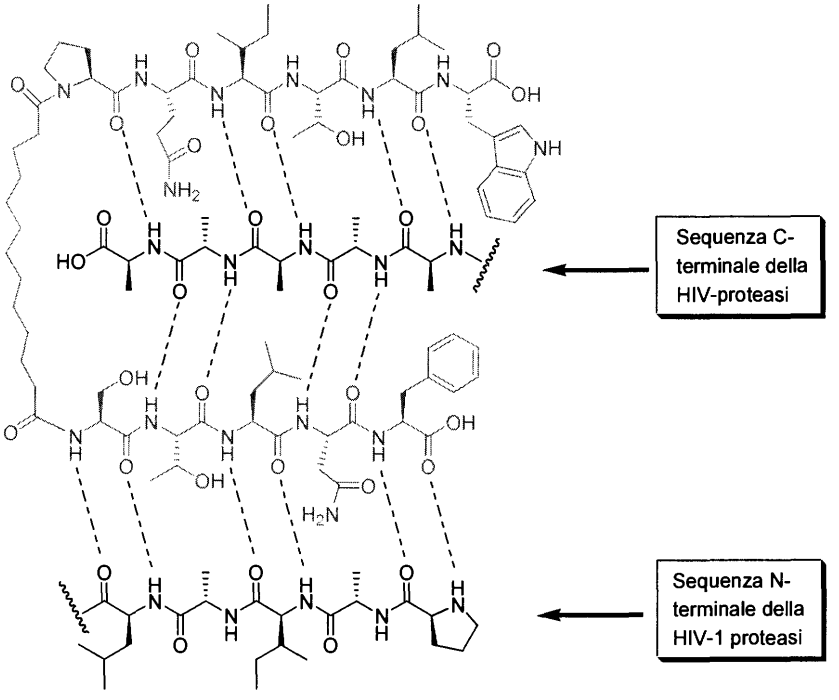


Figura 6.4: meccanismo proposto per inibitori della dimerizzazione spaziati da un linker

I gruppi spaziatori proposti presentano legami singoli[11] o doppi (sia con configurazioni di tipo *E* che *Z*),[12] piccoli peptidi contenenti 3 residui di Gly,[13] catene polieteree o gruppi amminici,[14] nell'ottica di verificare la dipendenza dell'attività biologica dalla idrofobicità del linker e dalla possibilità di formare legame idrogeno (Figura 6.5).

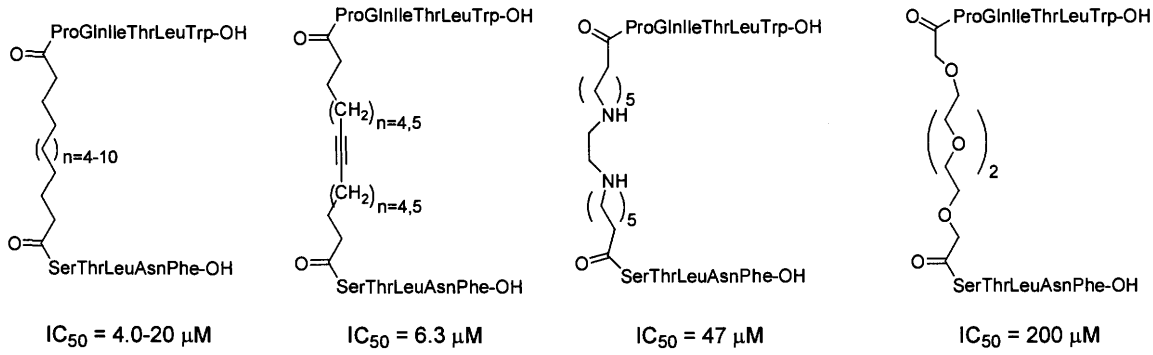


Figura 6.5: tipologie di linker proposti in letteratura

A partire dalle strutture sopra descritte sono state proposte strutture più rigide, in cui il linker è caratterizzato dalla presenza di unità di tipo steroideo (androstadiolo), guanidinico biciclico, fluorenile, piridina o naftalene,[15] per forzare le due catene peptidiche presenti sull'inibitore a disporsi il più possibile parallele tra di loro (Figura 6.6).[16]

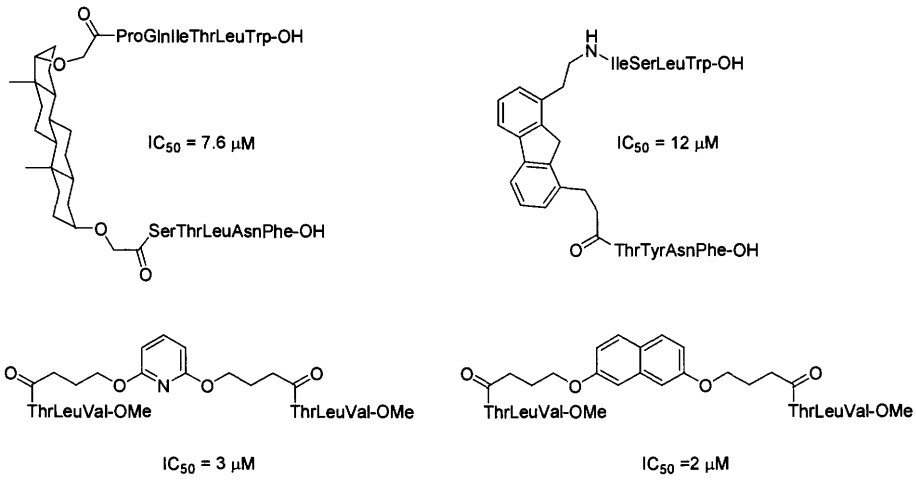


Figura 6.6: inibitori della dimerizzazione contenenti gruppi spaziatori rigidi

---

[11] Zutshi, R.; Franciskovich, J.; Shultz, M.; Schweitzer, B.; Bishop, P.; Wilson, M.; Chmielewski, J. *J. Am. Chem. Soc.* (**1997**), *119*, 4841

[12] Ulysse, L. G.; Chmielewski, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**1998**), *8*, 3281

[13] Babe, L. M.; Rose, J.; Craik, C. S. *Protein Sci.* (**1992**), *1*, 1244

[14] Zutshi, R.; Shultz, M. D.; Ulysse, L.; Lutgring, R.; Bishop, P.; Schweitzer, B.; Vogel, K.; Franciskovich, J.; Wilson, M.; Chmielewski, J. *Synlett.* (**1998**), *10*, 1040

[15] a) Bouras, A.; Bogetto, N.; Benetalah, Z.; de Rosny, E.; Sicsic, S.; Reboud-Ravaux, M. *J. Med. Chem.* (**1999**), *42*, 957; b) Breccia, P.; Boggetto, N.; Pérez-Fernandez, R.; Van Gool, M.; Takahashi, M.; René, L.; Prados, P.; Badet, B.; Reboud-Ravaux, M.; de Mendoza, J. *J. Med. Chem.* (**2003**), *46*, 5196

[16] Song, M.-C.; Rajesh, S. ; Hayashi, Y.; Kiso, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**2001**), *11*, 2465

Nel tentativo di compensare la scarsa attività degli inibitori descritti, sono state cercate soluzioni alternative. Sono stati infatti proposti, da un lato, gruppi spaziatori semirigidi a struttura eteroaromatica ("*molecular tongs*"),[17] cercando un compromesso tra allineamento ottimale delle catene peptidiche e possibilità di formare legami idrogeno all'interno del sito della dimerizzazione, dall'altro, linker quali la tris(2-aminometil)ammina (TREN), che, potendo assumere conformazioni di diversa rigidità in seguito alla coordinazione di ioni metallici (Zn^{2+}), offrono la possibilità di modulare l'attività della proteina mediante una regolazione di tipo allosterico.[18]

Gli sviluppi più interessanti e promettenti, tuttavia, sono legati all'utilizzo di catene peptidiche a basso peso molecolare, in cui il numero di amminoacidi presenti risulta notevolmente ridotto (Figura 6.7).[19]

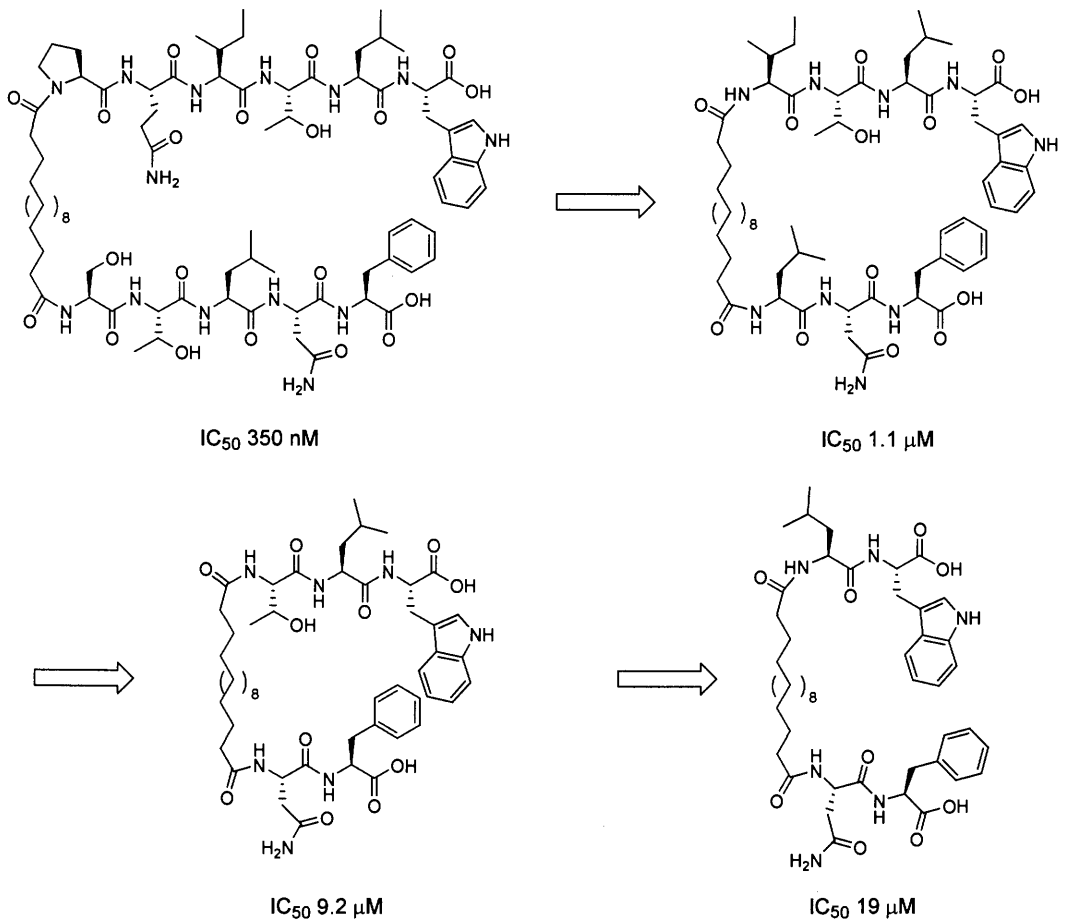


Figura 6.7: inibitori della dimerizzazione con corte catene peptidiche

[17] Merabet, N.; Dumond, J.;Collinet, B.; Van Baelinghem, L.; Boggetto, N.; Ongeri, S.; Ressad, F.; Reboud-Ravaux, M.; Sicsic, S. *J. Med. Chem.* (**2004**), *47*, 6392

[18] Valente, S.; Gobbo, M.; Licini, G.; Scarso, A.; Scrimin, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* (**2000**), *40*, 3899

[19] Shultz, M. D.; Ham, Y.-W.; Lee, S.-G.; Davis, D. A.; Brown, C.; Chmielewski, J. *J. Am. Chem. Soc.* (**2004**), *126*, 9886

Per queste nuove strutture i valori di IC_{50} risultano sì inferiori rispetto a quelli contenenti catene peptidiche più lunghe, ma non drasticamente diminuiti; questa osservazione ha permesso di capire meglio il loro meccanismo d'azione, ipotizzando una dipendenza dell'attività non tanto dalla formazione di una rete di legame idrogeno tra i gruppi ammidici delle catene peptidiche presenti sull'inibitore e quelle nel sito della dimerizzazione, quanto dalla natura dei residui. Questa assunzione ha portato alla sintesi di una nuova generazione di inibitori di tipo pseudopeptidico a basso peso moleocolare, in cui sono presenti gruppi aromatici variamente funzionalizzati,[20] amminoacidi non naturali[21] o piccoli peptidi, in cui gli azoti dei legami ammidici sono alchilati (Figura 6.8).[22]

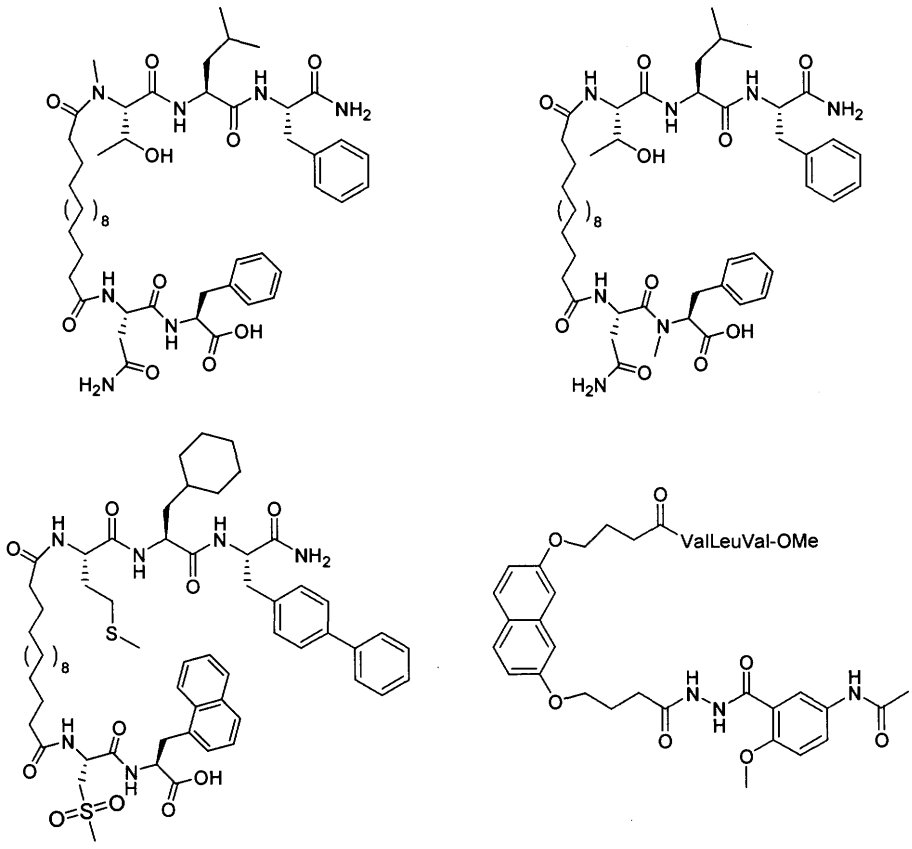


Figura 6.8: nuovi inibitori della dimerizzazione a struttura pseudopeptidica

I valori di attività biologica risultano del tutto confrontabili con quelli delle strutture di base, con variazioni comprese tra il 5 e il 10%, permettendo così di confermare l'ipotesi iniziale ed aprendo quindi la strada alla sintesi di inibitori non necessariamente a base peptidica.

---

[20] Bannwarth, L.; Kessler, A.; Pèthe, S.; Collinet, B.; Merabet, N.; Boggetto, N.; Sicsic, S.; Reboud-Ravaux, M.; Ongeri, S. *J. Med. Chem.* (**2006**), *49*, 4657

[21] a) Lee, S.G.; Chmielewski, J. *Chem. & Biol.* (**2006**), *13*, 421; b) Hwang, Y. S.; Chmielewski, J. *J. Med. Chem.* (**2005**), *48*, 2239

[22] Bowman, M. J.; Chmielewski, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**2004**), *14*, 1395

6.3 Inibitori misti

Da quanto detto risulta evidente che qualora si fosse in grado di impedire il folding della proteasi (cioè la formazione del dimero) se ne bloccherebbe in modo permanente l'attività proteolitica.[23]

Tuttavia, gli inibitori descritti nel Paragrafo 6.2 sono generalmente caratterizzati da attività biologica modesta, con valori di IC_{50} dell'ordine del μM, e quindi da scarsa efficacia;[24] d'altro canto, essendo la regione di dimerizzazione fortemente conservata anche nelle forme mutanti dell'enzima, essi, a differenza degli inibitori reversibili agenti a livello del sito catalitico, mantengono l'attività anche contro virus mutanti. Queste considerazioni hanno ispirato una nuova classe di inibitori nelle quali un inibitore del sito catalitico e un inibitore attivo sul sito della dimerizzazione sono collegati da un opportuno spaziatore (Figura 6.9). Le strutture così ottenute dovrebbero essere in grado di coniugare l'attività dei due diversi inibitori, sommandone le caratteristiche.

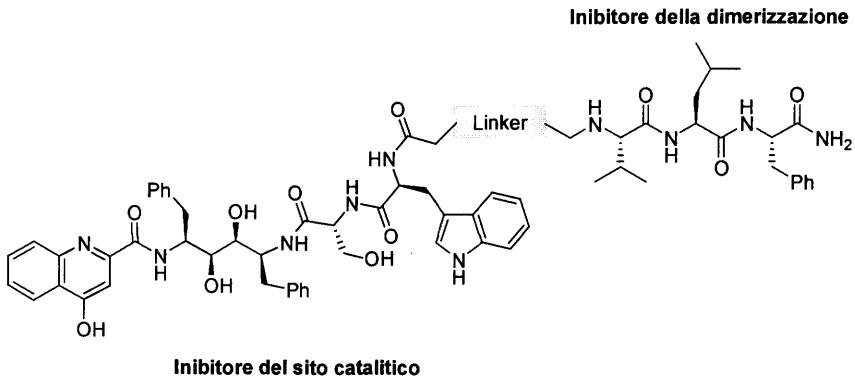


Figura 6.9: schema generale di inibitori misti sito catalitico-sito della dimerizzazione

Un approccio, per certi versi, simile è stato riportato in letteratura[25] e prevede la coniugazione di due farmaci anti-HIV a uno stesso supporto solubile, caratterizzato da legami facilmente idrolizzabili *in vivo* che permettono il rilascio dei due principi attivi (Figura 6.10). In quel caso però, gli inibitori KNI-727 e AZT erano attivi su bersagli diversi, rispettivamente la proteasi e la trascrittasi inversa. Nel nostro caso, invece, l'obiettivo è di ottenere dei coniugati che:

i) accoppiano inibitori che agiscono sullo stesso bersaglio ma con meccanismi diversi e, possibilmente, in modo sinergico;

ii) contenendo una porzione riconosciuta anche da HIV-PR mutate, siano attivi anche verso forme mutanti del virus.

---

[23] Scramm, H. J. et al., *Antiviral Res.* (**1996**), *30*, 155

[24] Sluis-Cramer, N.; Tachejian, G, *Eur. J. Biochem.* (**2002**), *269*, 5103

[25] Matsumoto, H.; Kimura, T.; Hamawaki, T.; Kumagai, A.; Goto, T.; Sano, K.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. *Bioorg. Med. Chem.* (**2001**), *9*, 1589

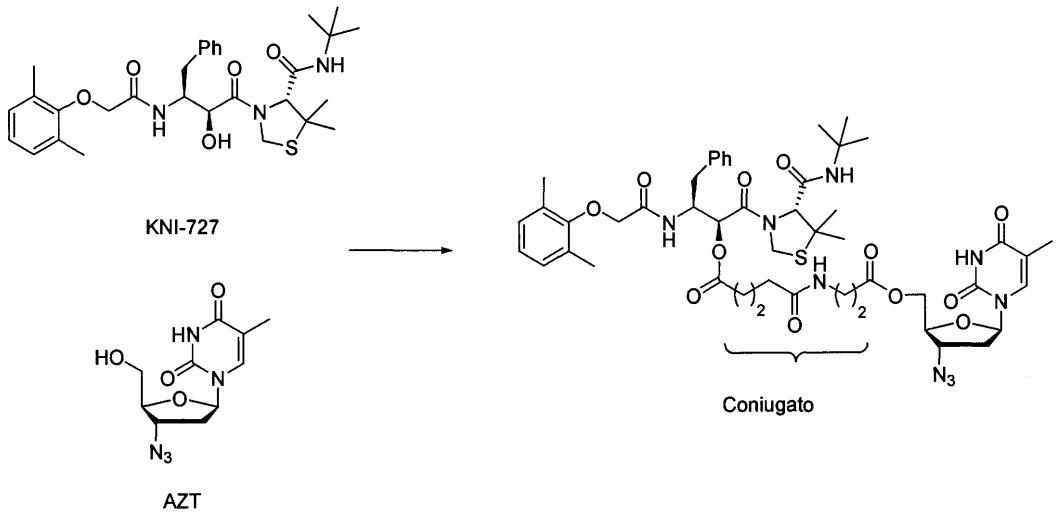


Figura 6.10: inibitori della HIV-PR e della HIV-RT coniugati ad un linker idrolizzabile

In Figura 6.11 sono riportati gli inibitori del sito catalitico e della dimerizzazione presi in considerazione in questo studio.

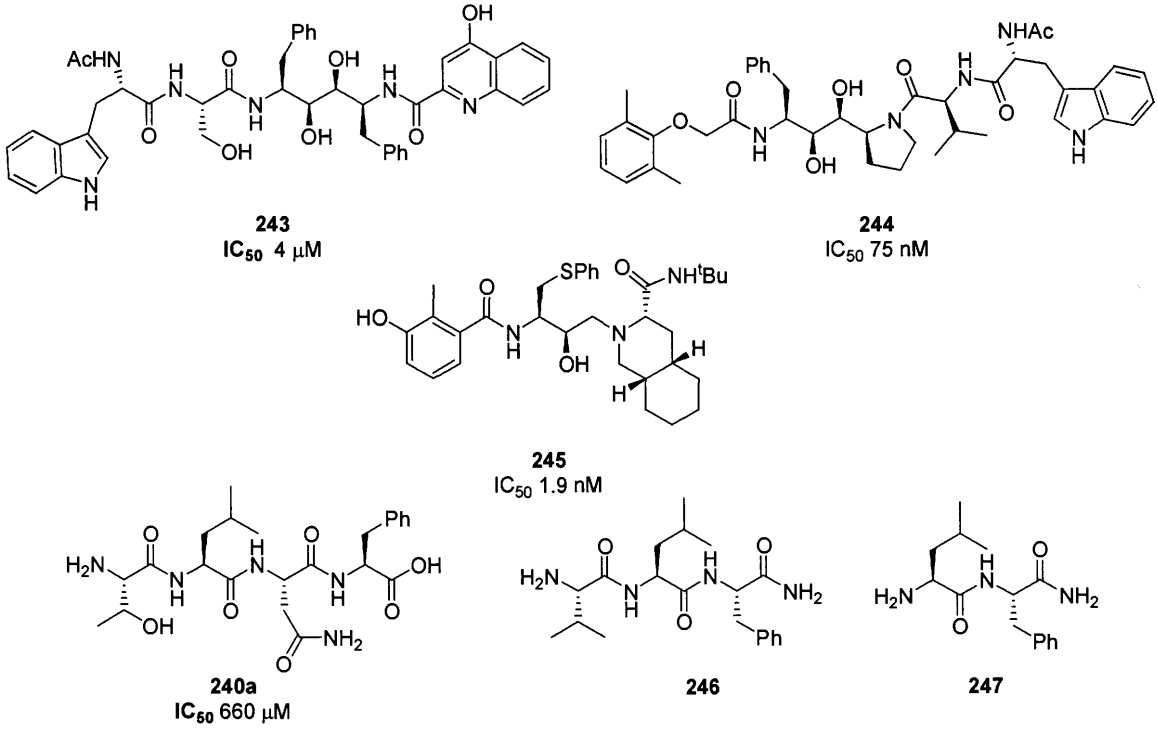


Figura 6.11: inibitori del sito catalitico e della dimerizzazione

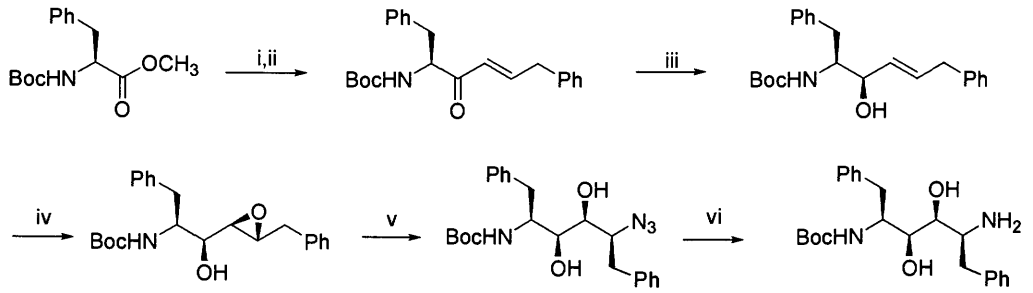
243 e **244** sono inibitori del sito catalitico basati su isosteri diidrossietilenici Phe-Phe e Phe-Pro, già descritti in precedenza,[26,27] mentre **245** é un inibitore commerciale correntemente utilizzato nella terapia dell'AIDS (Nelfinavir o Viracept®). I tre inibitori

[26] Tossi, A.; Bonin, I.; Antcheva, N.; Norbedo, S.; Benedetti, F.; Miertus, S.; Nair, A. C.; Maliar, T.; Dal Bello, F.; Palù, G.,; Romeo, D. *Eur. J. Biochem.* (**2000**), *267*, 1715.
[27] Dinon, F.; Campaner, P.; Berti, F.; Tossi, A.; Benedetti, F. PCT/EP2005/052770

così scelti coprono un intervallo di attività (IC_{50}) che va dal nano- al micromolare. Il peptide **240a** è stato proposto come inibitore della dimerizzazione (Cfr. Fig. 6.3) con una moderata attività (IC_{50} = 660 μM), mentre **246** e **247** sono state proposte come le sequenze peptidiche più corte riconosciute a livello del sito della dimerizzazione (Cfr. Fig. 6.7 e 6.8).

6.4 Sintesi degli inibitori

Per quanto riguarda il primo isostere sono state utilizzate condizioni di reazione già riportate in letteratura (Schema 6.1).[28]



Schema 6.1: i) dimetilmetil fosfonato, Boc-Phe-OMe, THF, -78 °C; ii) fenilacetaldeide, K_2CO_3, EtOH; iii) LTBAH, EtOH, -78 °C; iv) *m*CPBA, DCM, 0 °C; v) Et_2AlN_3, toluene, -78 °C; vi) H_2, Pd/C, MeOH, rt

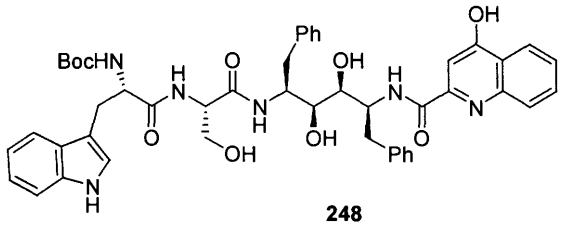
La sintesi, seguendo l'approccio generale descritto nel Capitolo 4, parte dal metilestere della L-fenilalanina, protetta come Boc, che viene convertito nel corrispondente fosfonato. La successiva reazione di olefinazione con fenilacetaldeide nelle condizione di Horner-Emmons porta al composto carbonilico α,β-insaturo che viene quindi ridotto con litio tri-*tert*butossi-alluminio idruro (LTBAH) per dare, con buone rese, il corrispondente alcol allilico (*S,R*), successivamente *sin*-epossidato con acido meta-cloro-perbenzoico (*m*CPBA). L'epossialcol (*S,S,R,R*) così ottenuto viene trattato con dietilalluminio azide, per dare, con elevata regio e diastereoselettività, l'azido alcol (*S,S,S,S*) da cui, per semplice idrogenazione in presenza di Pd/C al 10% (w/w), si ottiene l'isostere desiderato.

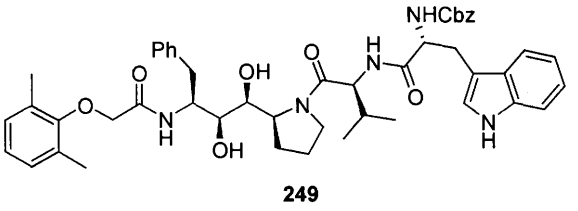
L'isostere mimico del dipeptide PhePro, invece, è stato utilizzato secondo l'approccio già descritto, a partire dall'N-Boc-fosfonato della Boc-L-Phe-OMe e dal 2-pirrolidinone (Cfr. Par. 4.1).

Sugli isosteri così ottenuti sono state assemblate le catene laterali secondo un comune protocollo di coupling peptidico in soluzione, utilizzando EDC e HOBT come agenti condensanti e attivanti, in presenza di N-metilmorfolina. Essendo le due catene laterali diverse, sono necessari due successivi passaggi: nel primo viene introdotta la prima

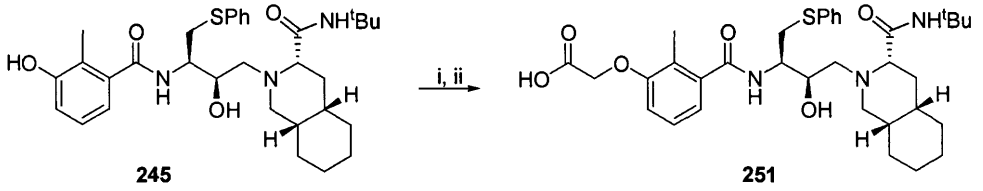
[28] Benedetti F.; Miertus, S.; Norbedo, S.; Tossi, A.; Zlatoidzky, P. *J. Org. Chem.*, (**1997**), *62*, 9348

catena laterale sull'estremità amminica libera presente sull'isostere; il gruppo Boc viene quindi rimosso dal terminale protetto e il successivo coupling con la seconda catena laterale consente di ottenere con buone rese gli inibitori **248** e **249**, del tutto analoghi a **243** e **244** tranne che per la presenza di un terminale amminico protetto anziché acetilato. Quest'ultimo verrà poi utilizzato nella successiva reazione di coniugazione al linker, evitando, così, di modificare porzioni dell'inibitore necessarie per l'attività, quali ad esempio i gruppi ossidrilici.





Il Nelfinavir, estratto dalla forma commerciale, è stato modificato, come descritto nello Schema 6.2, per introdurre un gruppo carbossilico libero che sarà successivamente utilizzato per la coniugazione.



Schema 6.2: i) Bromoacetato di metile, K_2CO_3, DMF,rt; ii) LiOH, 1N/THF

Infine, i tre semplici peptidi **240a**, **246** e **247** sono stati ottenuti nelle stesse condizioni (EDC, HOBT, NMM) già descritte per il coupling delle catene laterali sugli isosteri.

6.5 Sintesi del linker e coniugazione degli inibitori

Trattandosi di uno studio preliminare, è stato scelto come linker il polietilenglicole (PEG), facilmente disponibile, quantunque sia stato riportato che inibitori della dimerizzazione legati a catene polieteree sono caratterizzati da attività inibitoria ridotta.[29] Peraltro, in considerazione della dipendenza dell'attività degli inibitori della proteasi da HIV dalla loro capacità di attraversare le membrane cellulari,[30] questo effetto potrebbe essere compensato dalla ben nota capacità del PEG di migliorare la

[29] Shultz, M. D.; Chmielewski, J. *Tetrahedron: Asymm.* (**1997**), *8*, 3881

[30] a) Bilello, J. A.; Bilello, P. A.; Stellrecht, K.; Leonard, J.; Norbeck, D. W.; Kempf, D. J.; Robins, T.; Drusano, G. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* (**1996**), *40*, 1491; b) Nascimbeni, M.; Lamotte, C.; Peytavin, G.; Farinotti, R.; Clavel, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* (**1999**), *43*, 2629; c) Herold, D. A.; Keil, K.; Bruns, D. E., *Biochem. Pharmacol.*, (**1989**), *38*, 73; d) Naian, J. O.; van Oss, C. J.,*Immunological Investigations*, (**1992**), *21*, 594 ; e) Greenwald R. B., et al., *J. Med. Chem.*, (**1996**), *39*, 424; f) Zalipsky, S.; Gilson, C.; Zilk, A., *Eur. Polym. J.*, (**1983**), *19*, 1177

biodisponibilità dei farmaci ad esso legati.In letteratura sono già descritti alcuni coniugati tra il PEG e inibitori della HIV-PR attualmente utilizzati in terapia (Saquinavir, Indinavir, Nelfinavir);[31] in tutti gli esempi descritti, la presenza del polietilenglicole conferisce al coniugato il carattere di profarmaco, per quanto, anche variando al natura del legame principio attivo-supporto, il rilascio sia sempre molto lento.[32]

Dovendo supportare sulle estremità della catena molecole diverse, è necessario che i gruppi funzionali terminali del PEG siano differenziabili. In letteratura è riportata la sintesi, a partire da un diammino-PEG commercialmente disponibile, di un polietilenglicole in cui le due estremità sono ortogonalmente protette;[33] questo approccio, tuttavia, é condizionato dalla limitata disponibilità di pesi molecolari del polimero di partenza. Per superare questa limitazione, è stato sviluppato un approccio sintetico generale, in cui le estremità amminiche ortogonalmente protette vengono introdotte successivamente su un diidrossiPEG (MW=6000) commercialmente disponibile (Schema 6.3).[34] La sintesi parte dall'1,3-diamminopropano, che viene monoprotetto come Cbz, mentre il secondo gruppo amminico viene convertito in isocianato per trattamento con trifosgene e 2,6-lutidina in diclorometano. L'ammina così attivata viene fatta reagire con un PEG di-OH in presenza di stagno dibutildilaurato,[35] portando così ad una miscela di PEG mono- e di-derivatizzato; trattando la miscela con N,N'-disuccinimidil carbonato e quindi con 1,3-diamminopropano è possibile introdurre un gruppo amminico libero la cui presenza viene anche sfruttata per la purificazione dal derivato diprotetto mediante cromatografia a scambio cationico o separazione "in batch", cioè utilizzando pH differenti.

---

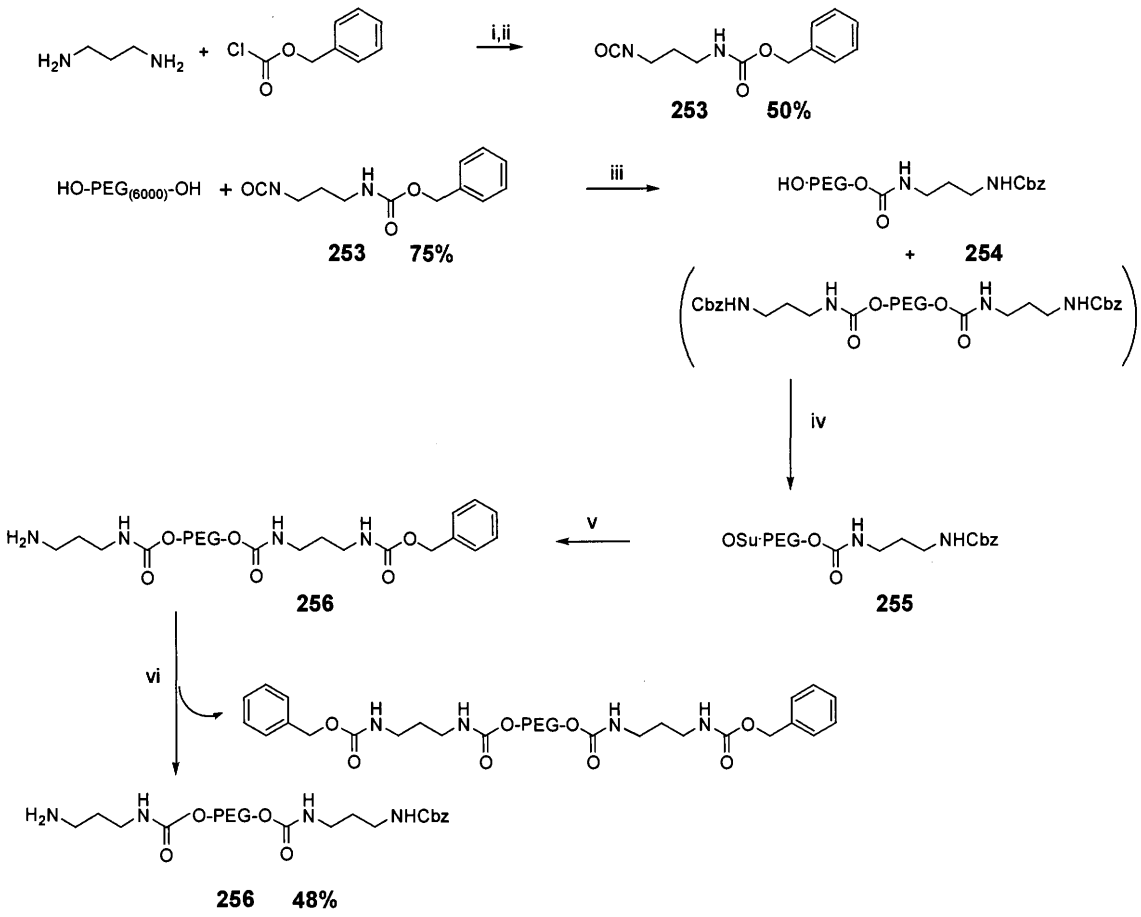
[31] Gaucher, B. ; Rouquayrol, M. ; Roche, D. ; Greiner, J.; Aubertin, A.-M.; Vierling, P. *Org. Biomol. Chem.* (**2004**), *2*, 345

[32] a) Rouquayrol, M.; Gaucher, B.; Roche, D. ; Greiner, J. ; Vierling, P. *Pharm. Res.* (**2002**), *19*, 1704; b) Gunaseelan, S.; Debrah, O.; Wan, L.; Leibowitz, M. J.; Rabson, A. B.; Stein, S.; Sinko, P. J., *Biocon. Chem.* (**2004**), *15*, 1322; c) D'Souza, A. J. M.; Topp, E. M. *J. Pharm. Sciences*, (**2004**), *93*, 1962

[33] Ehteshami, G.; Sharma, D.; Porath, J.; Guzman, R. Z. *Reactive&Functional Polymers* (**1997**), *35*, 135

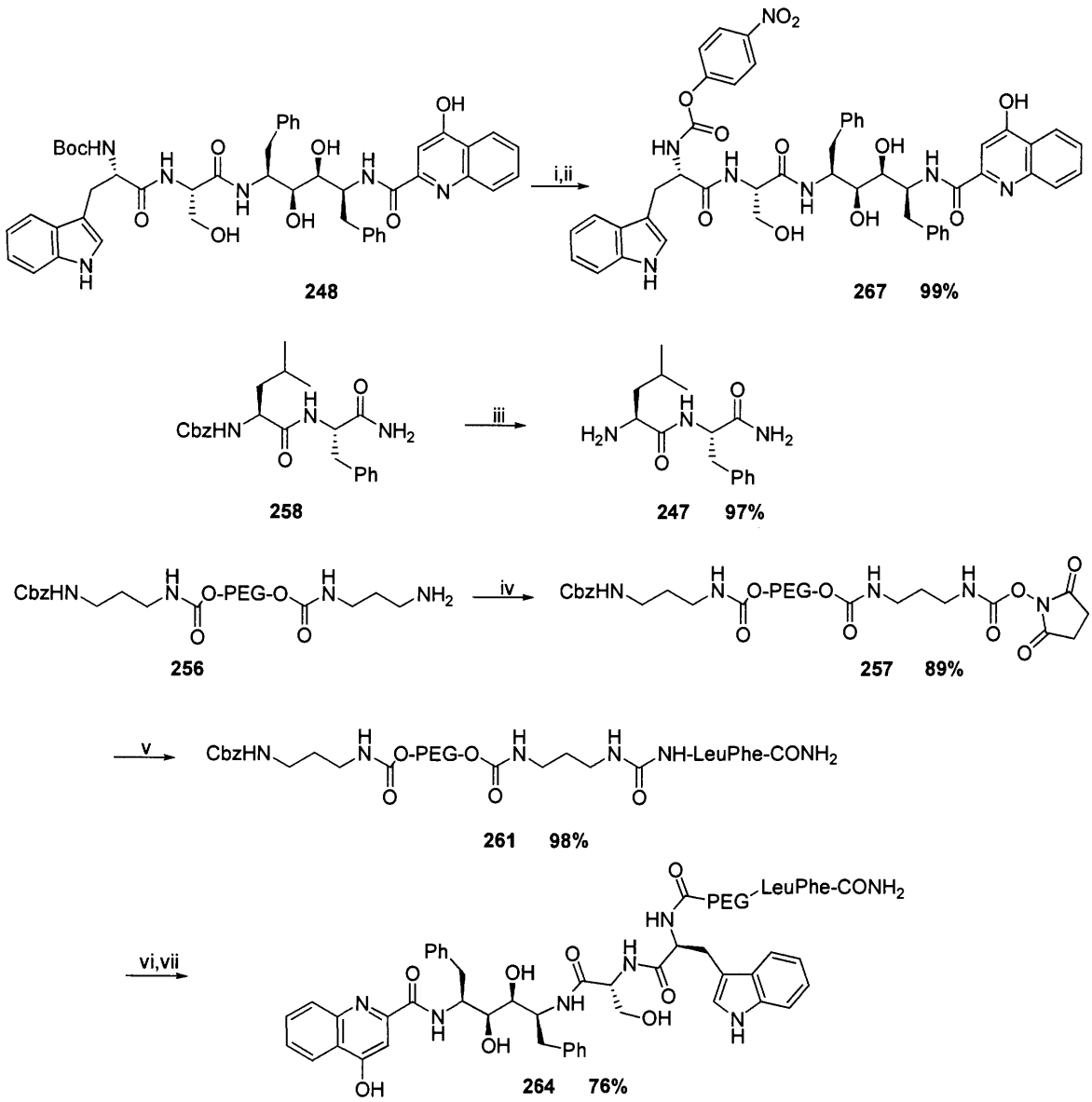
[34] a) Bonora, G.M.; Campaner, P.; Drioli, S., PD2004-000159; PCT/EP2005/052876; b) Campaner, P.; Bonora, G.M.; Drioli, S., *Lett. Org. Chem.* (**2006**), *10*, 773

[35] a) Ozaki, S. *Chem. Rev.* (**1972**), *72*, 457; b) Mauler, R. S. ; Galland, G. B. ; Samios, D.; Tokumoto, S. *Eur. J. Polym.* (**1995**), *31*, 51; c) Yao, N.; Jamieson, A. M. *Polymer* (**2000**), *41*, 2925



Schema 6.3: i) DCM, 0 °C; ii) trifosgene, 2,6-lutidina, DCM, rt; iii) Sn dibutil dilaurato, DCM, rt; iv) N,N'-(disuccinimidil)dicarbonato, DCM/CH_3CN/Pyr, rt; v) 1,3-diamminopropano, DCM, rt; vi) Sephadex C-50

Ottenuto così il linker **256**, si è proceduto al coupling degli inibitori, attivando indifferentemente il gruppo amminico libero del supporto polimerico o quello della catena peptidica da coniugare. A titolo di esempio è riportata, nello Schema 6.4, la sintesi del coniugato **264** tra l'inibitore della dimerizzazione **247** e l'inibitore del sito catalitico **248**. L'inibitore della dimerizzazione **258** viene deprotetto alla estremità amminica mediante idrogenazione catalitica (**247**) e quindi coniugato, mediante formazione di un legame di tipo urea, al linker precedentemente attivato come N-OSu (**257**); rimossa quindi la protezione benzilossicarbonilica dalla seconda estremità amminica del linker, il secondo inibitore (**248**), precedentemente attivato mediante formazione di un legame ureidico labile per reazione con *p*-NO_2-fenil cloroformiato (**267**), viene coniugato sfruttando nuovamente la formazione di un legame di tipo urea (**264**).



Schema 6.4: i) TFA/DCM, rt; ii) *p*-NO_2-Ph cloroformiato, DIPEA, CH_2Cl_2, rt; iii) **258**, H_2, Pd/C 10%, MeOH, rt; iv) **256**, *N,N*-disuccinimidil dicarbonato, TEA, CH_2Cl_2, rt; v) **247**, TEA, CH_2Cl_2, rt; vi) H_2, Pd/C, HCl, MeOH, rt; vii) **267**, TEA, CH_2Cl_2, rt

Lo stesso approccio è stato seguito per la sintesi dei coniugati **265** e **266**, con l'unica variante che nella sintesi di quest'ultimo il derivato del Nelfinavir **266** è stato coniugato attraverso il gruppo carbossilico libero, utilizzando le comuni condizioni di coupling peptidico in soluzione (Figura 6.12).

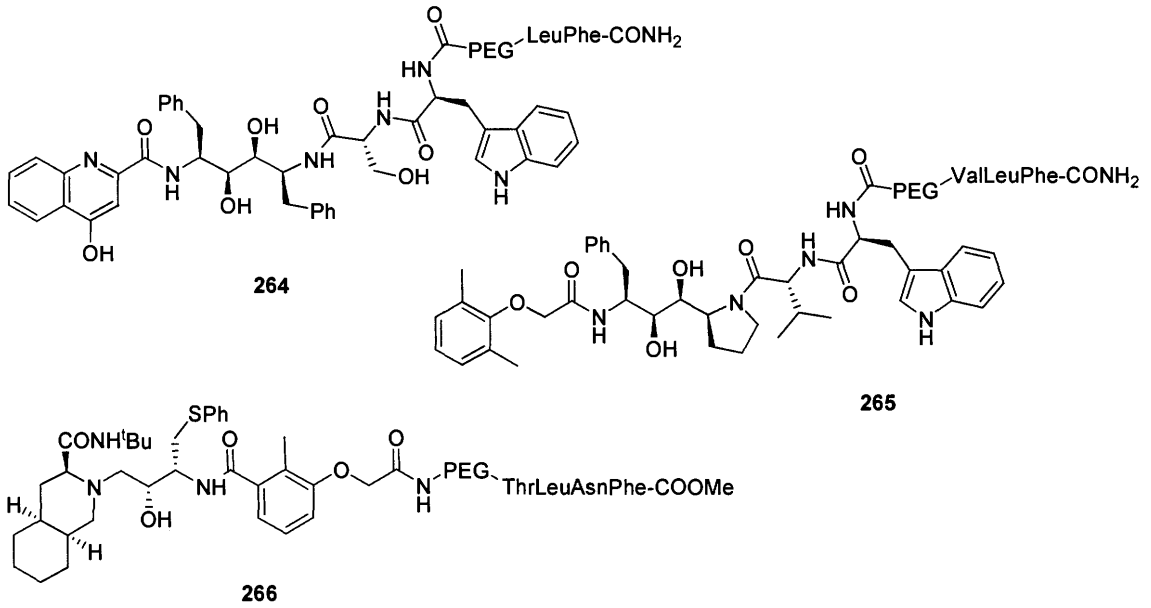


Figura 6.12: inibitori misti realizzati

6.6 Attività biologica

In Figura 6.13 sono riportati i valori di IC_{50} dei coniugati così ottenuti, costruiti seguendo la logica di coniugare inibitori della dimerizzazione con attività via via decrescente ad inibitori del sito catalitico con attività via via maggiore.

Preliminarmente alla valutazione dei coniugati era stato verificato che la HIV-PR non viene inibita dal solo linker non modificato, anche a concentrazioni elevate; si può quindi assumere che, anche nei coniugati, il contributo all'inibizione dovuto al linker sia trascurabile. Con questa premessa, appare particolarmente interessante il coniugato **265** che risulta non solo il più attivo nella serie, ma anche più attivo dei suoi due componenti presi singolarmente; è possibile quindi ipotizzare che, in questo caso, effettivamente si manifesti un effetto cooperativo tra i due inibitori. Uno studio dettagliato sul meccanismo di inibizione potrà meglio chiarire la natura dell'effetto osservato. Gli altri due coniugati **264** e **266** sono significativamente meno attivi e, in entrambi i casi, l'attività è intermedia tra quella dei singoli inibitori che li compongono; il calo di attività, rispetto ai più efficienti inibitori del sito catalitico, è modesto (un fattore 10) per **264** e molto più marcato (un fattore all'incirca 1000) nel coniugato del Nelfinavir **266**.

In realtà il comportamento di quest'ultimo coniugato può essere spiegato analizzando la struttura ai raggi X del complesso tra il Nelfinavir e la HIV-PR (Figura 6.13).

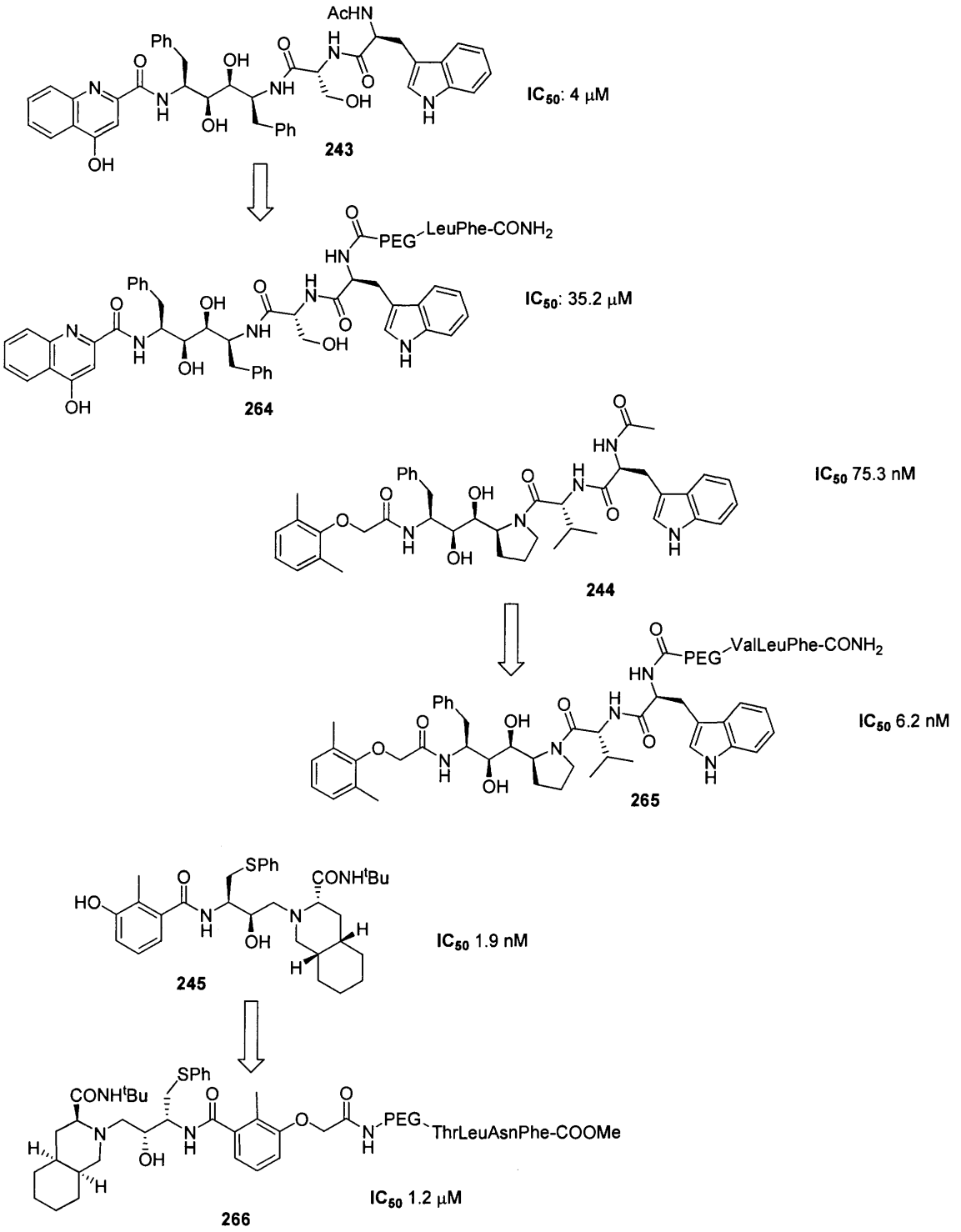


Figura 6.13: attività degli inibitori misti

Si può infatti osservare come, nel complesso, il gruppo fenolico dell'inibitore sia coinvolto, come donatore, in un legame idrogeno con l'aspartato in posizione 30 (Asp30) dell'enzima; qualora l'OH venga modificato, come nel coniugato **266**, l'interazione non può più sussistere, con conseguente calo dell'affinità. Ciò è stato verificato misurando l' IC_{50} del derivato carbossilato del Nelfinavir **251** utilizzato per la sintesi del coniugato che risulta effettivamente essere più elevato (23 nM) rispetto a

quello del Nelfinavir stesso (1.9 nM). Considerando ancora che il gruppo fenolico del Nelfinavir, occupando il subsito S2, si trova in una posizione abbastanza interna al sito catalitico dell'enzima (Figura 6.14) è lecito attendersi che tale calo sia ancora più accentuato qualora la modifica avvenga ad opera di una catena di dimensioni maggiori come quella del polietilenglicole.

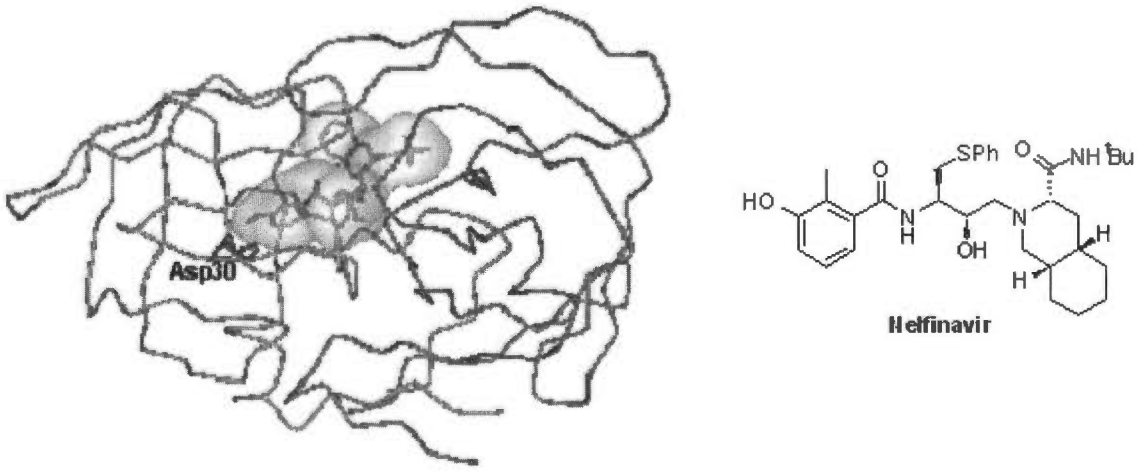


Figura 6.14: struttura cristallografica ai raggi X del complesso tra la HIV-PR e il Nelfinavir (PDB ID: 1ohr)

In conclusione si può osservare che la attività degli inibitori viene comunque conservata e, in un caso, addirittura migliorata, possibilmente attraverso un effetto cooperativo; inibitori più efficaci potranno essere ottenuti attraverso una ottimizzazione delle strutture, soprattutto per quanto riguarda le dimensioni del linker, e passando a inibitori della dimerizzazione in grado di interdigitare tra la struttura a foglietto β della regione di dimerizzazione della proteasi.

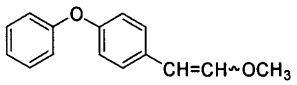
Infine, anche per queste prime strutture al momento disponibili, potrebbe essere interessante studiare il comportamento in saggi cellulari sul virus *wild type* e su mutanti, per valutare se la prevista attività su proteasi mutate è anche accompagnata da un miglioramento nella permeabilità cellulare, quale effetto secondario della coniugazione al PEG.[36]

[36] D'Souza, A. J. M.; Topp, E. M. *J. Pharm. Sciences*, **(2004)**, *93*, 1962

PARTE SPERIMENTALE

Parte Sperimentale

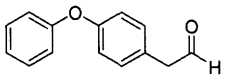
I punti di fusione sono stati determinati con apparecchio Buchi 510 e non sono stati corretti. Gli spettri ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR a 400 MHz sono stati registrati con uno strumento Jeol EX400, in soluzione di $CDCl_3$ (se non diversamente indicato), utilizzando Me_4Si (TMS) come standard interno. Gli spettri di massa ESI (ElectroSpray Ionization) sono stati ottenuti con uno spettrometro API 1 Perkin-Elmer SICIEX. Gli spettri di massa MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) sono stati ottenuti con uno spettrometro PE Biosystems Voyager System 6080. Le misure di attività ottica sono state effettuate con un polarimetro Perkin-Elmer 261, alla lunghezza d'onda della riga D del sodio (λ=581 nm). Gli spettri IR sono stati registrati con uno strumento ATAVAR 320 a trasformata di Fourier. Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati su uno spettrometro Perkin Elmer LS50B. Le cromatografie "flash" su colonna di gel di silice sono state eseguite usando come fase stazionaria Silica-Gel 60 (Merck) (230÷400 Mesh). Per la cromatografia su strato sottile sono state usate lastre Merck, ricoperte con Silica-Gel 60F-254, per uno spessore di 0.25 mm, e sviluppate con I_2 oppure con una soluzione acquosa di $KMnO_4$ e H_2SO_4. Il tetraidrofurano (THF) è stato distillato, seccato su KOH e ridistillato da sodio-benzofenone; il diclorometano (DCM) è stato seccato su $CaCl_2$ e distillato. L'acetonitrile e la dimetilformammide (DMF) anidri sono stati acquistati dalla Fluka. Il metanolo (MeOH) e l'etanolo (EtOH) sono stati anidrificati su CaH_2 e quindi distillati. Gli amminoacidi naturali N-Cbz, N-Boc protetti utilizzati per la sintesi peptidica e l'acido tri-nitro benzensolfonico (TNBS) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich, Fluka, Lancaster o dalla ACROS Organics.



Cis/trans 4-fenossi-1-(2-metossivinil)benzene (214)

Metossimetiltrifenilfosfonio cloruro **212** (9.23 g, 26.93 mmoli) viene sospeso in 30 ml di THF anidro sotto atmosfera di argon e raffreddato a –10 °C; si aggiunge quindi, a piccole porzioni, KO*t*Bu (3.77 g, 33.7 mmoli), mantenendo la temperatura al di sotto dei –10 °C. Si gocciola quindi una soluzione di 4-fenossibenzaldeide (3.53 mL, 20.2 mmoli) in 20 mL di THF anidro, mantenendo la temperatura a –10 °C ed il sistema viene lasciato per 16 h a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon. La miscela è stata poi versata in 50 ml di acqua, la fase acquosa è stata estratta con etere dietilico (2x50 mL) ed il solvente rimosso mediante distillazione a pressione ridotta. Si ottengono 6.75 g di olio giallo, che viene ripreso con 20 mL di acqua e 35 mL di metanolo ed estratto nuovamente con etere dietilico. La fase organica viene lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl, seccata su Na_2SO_4 anidro ed il solvente rimosso mediante distillazione a pressione ridotta. Si ottengono 4.58 g (95%) di un olio giallo, corrispondente ad una miscela 1:1 dei due isomeri *cis* e *trans*, che viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

IR: (nujol, cm^{-1}): 1640 (C=C); 1600, 1500 e 1480 (Ph); 1240 (C-O). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 3.66 (s, 3H, CH_3O); 3.75 (s, 3H, CH_3O); 5.20 (d, 1H, Ar-C<u>H</u>= cis; J=7.0 Hz); 5.80 (d, 1H, Ar-C<u>H</u>= trans, J=13.0 Hz); 6.09 (d, 1H, =CH-O cis; J=7.0 Hz); 6.89-7.87 (m, 19H, Ar e =CH-O trans). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 56.5 (CH_3O); 60.6 (CH_3O); 104.4 (Ph-<u>C</u>H=); 104.9 (Ph-<u>C</u>H=); 118.4 (Ar); 118.5 (Ar); 118.9 (Ar); 119.4 (Ar); 122.9 (Ar); 126.3 (Ar); 129.5 (Ar); 129.6 (Ar); 129.6 (Ar); 132.1 (Ar); 131.3 (Ar); 131.6 (Ar); 147.1 (=<u>C</u>H-OCH_3); 148.3 (=<u>C</u>H-OCH_3); 154.8 (Ar); 155.0 (Ar); 157.6 (Ar).

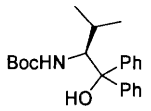


4-fenossifenilacetaldeide (211)

Cis/trans 4-fenossi-1-(2-metossivinil)benzene **214** (1 g, 4.42 mmoli) viene sciolto in una miscela THF/H_2O 7:3, acidificata a pH 1 con HCl concentrato e riscaldata a riflusso per una notte. La miscela viene poi neutralizzata con $NaHCO_3$ ed estratta con etere dietilico; la fase organica viene lavata con una soluzione satura di NaCl e seccata su Na_2SO_4 anidro. Eliminato mediante distillazione a pressione ridotta, si

ottengono 900 mg (96%) di un olio giallo, che viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

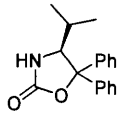
IR (nujol, cm^{-1}): 2720 (C<u>H</u>O); 1725 (C=O); 1600 e 1580 (Ar). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 3.66 (d, 2H, CH_2; J=2.0Hz); 6.91-7.69 (m, 9H, Ar); 9.75 (t, 1H, CHO; J=2.0Hz). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 49.7 (CH_2); 118.9 (Ar); 119.2 (Ar); 123.4 (Ar); 129.7 (Ar); 130.9 (Ar); 132.0 (Ar); 156.7 (Ar-O); 156.9 (Ar-O); 199.2 (CHO).



***tert*-butil-(*S*)-1-idrossi-3-metil-1,1-difenilbutan-2-il carbammato (102)**

Ad una soluzione di Boc-L-Val-OMe **101** (4 g, 17 mmol) in THF anidro, raffreddata a –78 °C ed in atmosfera di argon, viene aggiunta una soluzione di fenil magnesio bromuro 3 M in dietil etere (28 mL, 85 mmol). Il sistema viene lasciato in agitazione per 16 h a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon, quindi idrolizzato per aggiunta di una soluzione acquosa satura di NH_4Cl ed estratto ripetutamente con etil acetato (3x30 mL). Le fasi organiche riunite vengono di seguito lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl, seccate su Na_2SO_4 anidro ed il solvente rimosso mediante distillazione a pressione ridotta, ottenendo un solido giallo che viene ricristallizzato da DCM/esano. Si ottengono 4.8 g (78%) di un solido giallino.

P.f.: 192-193 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -61.7 (c=58.6, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.89 (d, 3H, CH_3, J=6.6 Hz); 0.90 (d, 3H, CH_3, J=6.6 Hz); 1.33 (s, 9H, [C(C<u>H</u>$_3$)$_3$]); 1.83 (m, 1H, [C<u>H</u>(CH_3)$_2$]); 2.93 (brs, 1H, OH); 4.65 (dd, 1H, C<u>H</u>NH, J=2 e 10.3 Hz); 5.13 (d, 1H, NH, J=10.2 Hz); 7.14-7.62 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.26 (CH_3); 22.8 (CH_3); 28.4 [C(<u>C</u>H$_3$)$_3$]; 28.93 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 59.26 (CHNH); 79.24 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 82.51 (COH); 125.42-128.41 (C Ar); 145.76 (Ar C_1); 146.46 (Ar C_1); 156.41 (CONH).



(*S*)-5,5-difenil-4-isopropil-1,3-ossazolidin-2-one (103)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale, 1.51 g (95%) di un solido bianco (purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela CH_2Cl_2/CH_3OH 9:1), partendo da **102** (2 g, 5.6 mmol) e NaH al 60% in olio minerale (450 mg, 11 mmol).

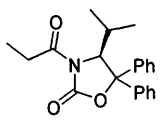
P.f.: 251-252 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -253.1 (c=0.1, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-DMSO-d_6): 0.51 (d, 3H, CH_3, J=5.8 Hz); 0.90 (d, 3H, CH_3, J=6.2 Hz); 1.84 (m, 1H, [C<u>H</u>(CH_3)$_2$]); 4.44 (s, 1H,

CHNH); 7.14-7.68 (m, 10H, Ar x2); 8.13 (s, 1H, NH). **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d_6): 15.08 (CH_3); 20.74 (CH_3); 29.64 [$\underline{C}H(CH_3)_2$]; 64.78 (CHNH); 88.22 (C-O); 125.66-128.93 (C Ar); 140.38 (Ar C_1); 145.92 (Ar C_1); 157.91 (CONH).

Procedura generale per l'acilazione del (*S*)-5,5-difenil-4-isopropil-1,3-ossazolidin-2-one

A) Ad una soluzione di (*S*)-5,5-difenil-4-isopropil-1,3-ossazolidin-2-one **103** (1 eq) in THF anidro, raffreddata a –78 °C ed in atmosfera di argon, si aggiunge una soluzione 1.6 M di nBuLi in esano (1.04 eq), lasciando quindi in agitazione per 1 h a –78 °C. Si aggiunge quindi l'acil cloruro distillato di fresco (1.1 eq), lasciando in agitazione a –78 °C per 16 h a temperatura ambiente; si idrolizza quindi con una soluzione acquosa satura di NH_4Cl, si estrae ripetutamente con etil acetato. Le fasi organiche riunite vengono di seguito lavate con una soluzione acquosa satura di $NaHCO_3$, con una soluzione acquosa satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4; eliminato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1.

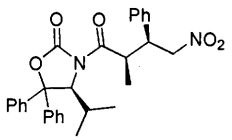
B) NaH 60% sospensione in olio minerale (1.1 eq) viene aggiunto, a 0 °C, ad una soluzione di (*S*)-5,5-difenil-4-isopropil-1,3-ossazolidin-2-one **103** (1 eq) in THF anidro (50 mL). Si agita per 2 h a temperatura ambiente e si aggiunge l'acil cloruro (o la corrispondente anidride) distillato di fresco (1.2 eq). Si lascia in agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon per 16 h; la soluzione viene quindi versata in acqua ghiacciata, estratta con acetato d'etile (2x50 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di $NaHCO_3$, una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1.



(*S*)-4-(1-metiletil)-3-(1-oxopropil)-5,5-difenilossazolidin-2-one (104)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale A, 3.85 g (92%) di un solido bianco, partendo da **103** (3.5 g, 12.5 mmol), nBuLi 1.6 M in esano (8.3 mL, 13 mmol) e propionil cloruro (1.3 mL, 15 mmol).

P.f.: 111-112 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -239.7 (c=0.74, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.71 (d, 3H, CH_3, J=6.6 Hz); 0.85 (d, 3H, CH_3, J=6.9 Hz); 1.03 (t, 3H, CH_3CH_2, J=7.3 Hz); 1.95 (m, 1H, [C<u>H</u>(CH_3)$_2$]); 2.68 (m, 1H, C<u>H</u>H); 2.86 (m, 1H, CH<u>H</u>); 5.37 (d, 1H, C<u>H</u>N, J=3.4 Hz); 7.14-7.68 (m, 10H, Ar x2); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 8.69 (CH_3); 16.36 (CH_3); 21.83 (CH_3); 28.92 (CH_2); 29.75 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 64.44 (CHN); 89.31 [C(Ph)$_2$]; 125.61-128.92 (C Ar); 138.31 (Ar C_1); 142.54 (Ar C_1); 153.03 (CO); 173.85 (CO)

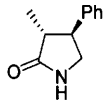


(*S*)-4-isopropil-3-[(2*R*,3*S*)-2-metil-4-nitro-3-fenilbutanoil]-5,5-difenilossazolidin-2-one (105)

Ad una soluzione di (*S*)-4-(1-metiletil)-3-(1-oxopropil)-5,5-difenilossazolidin-2-one **104** (3.5 g, 0.01 mol), in diclorometano anidro mantenuta in agitazione in atmosfera di argon, si aggiungono, nell'ordine, a –78 °C, $TiCl_4$ (1.25 mL, 0.011 mol) e, dopo 10 minuti, EtN(*i*Pr)$_2$ (2.13 mL, 0.012). Il sistema viene lasciato in agitazione a 0 °C per 30 minuti, quindi nuovamente raffreddato a –78 °C, addizionato di una soluzione in diclorometano di β-nitrostirene (1.7 g, 0.011 mol) e $TiCl_4$ (1.25 mL, 0.011 mol) e quindi lasciato in agitazione a –78 °C per 8 h. Si idrolizza quindi con una soluzione acquosa satura di NH_4Cl, si diluisce con H_2O e si estrae ripetutamente con diclorometano; le fasi organiche riunite vengono quindi di seguito lavate con HCl 1N, H_2O e quindi addizionate di una soluzione acquosa 1 N di NaOH. L'emulsione risultante viene lasciata in agitazione per 10 minuti, quindi acidificata con HCl 6N, estratta ripetutamente con diclorometano e le fasi organiche riunite nuovamente lavate con HCl 1N (3x), H_2O (3x), una soluzione acquosa satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Eliminato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1, recuperando 3.23 g (64%) di un solido bianco.

P.f.: 151-152 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = -122.1 (c=1.0, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.30 (d, 3H, CH_3, J=6.6 Hz); 0.90 (d, 3H, CH_3, J=6.9 Hz); 1.67 (m, 1H, [C<u>H</u>(CH_3)$_2$]); 3.74 (dt, 1H, CHPh, J=10.2, 4.2 Hz); 4.09 (dq, 1H, CHCO, J=10.3, 6.9 Hz); 4.64 (dd, 1H, C<u>H</u>HNO_2, J=12.3, 4.3 Hz); 4.78 (dd, 1H, C<u>H</u>HNO_2, J=12.3, 10.1 Hz); 5.33 (d, 1H, C<u>H</u>N, J=3.6 Hz); 7.19-7.43 (m, 15H, Ar x3); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 16.4 (CH_3); 16.71 (CH_3); 21.83

(CH_3); 29.56 [$\underline{C}H(CH_3)_2$]; 40.01 (CH); 46.69 (CH); 65.6 (CHN); 78.6 (CH_2); 90.01 [$C(Ph)_2$]; 125.67-129.01 (C Ar); 137.25 (Ar C_1); 142.18 (Ar C_1); 153.1 (CO); 175.10 (CO)



(3*R*,4*S*)-3-metil-4-fenilpirrolidin-2-one (106)

(*S*)-4-isopropil-3-[(2*R*,3*S*)-2-metil-4-nitro-3-fenilbutanoil]-5,5-difenilossazolidin-2-one **105** (3.2 g, 6 mmol) viene sciolto in metanolo in presenza di Pd/C al 10% (10% in peso rispetto al substrato) e lasciato in agitazione per 16 h a temperatura ambiente ed in atmosfera di H_2. Rimosso il catalizzatore mediante filtrazione su celite ed eliminato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo viene purificato per cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente etil acetato (100%). Si recuperano 1 g (91%) di un solido bianco.

P.f.: 103-104 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = +73.5 (c=0.95, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.20 (d, 3H, CH_3, J=7.0 Hz); 2.53-2.61 (m, 1H, $C\underline{H}CH_3$); 3.17 (q, 1H, $C\underline{H}$Ph, J=9.5 Hz); 3.39 (t, 1H, $C\underline{H}H$, J=9.6 Hz); 3.62-3.67 (m, 1H, $CH\underline{H}$); 6.59 (brs, 1H, NH); 7.26-7.39 (m, 5H, Ar); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.0 (CH_3); 43.4 (CH); 47.6 (CH_2); 50.0 (CH); 127.3-128.9 (C Ar); 140.4 (Ar C_1); 179.7 (CO)

Procedure generali per la protezione dei lattami

A) Ad una soluzione di lattame (21 mmol) in DMF anidra (25 mL) raffreddata a 0 °C si aggiunge una dispersione di NaH al 60% in olio minerale (31.5 mmol). Dopo aver agitato la miscela per 15', si aggiunge una soluzione di benzilossicarbonil cloruro (31.5 mmol) in DMF anidra (15 mL). La miscela viene agitata fino a completezza della reazione, versata lentamente in acqua ghiacciata ed estratta ripetutamente con etil acetato. Le fasi organiche riunite vengono lavate successivamente con acqua, una soluzione acquosa satura di NaCl e quindi seccate su sodio solfato anidro. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etil acetato 1:1. o diclorometano/etil acetato 6:4.

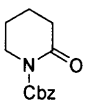
B) Ad una soluzione di lattame (30 mmol) in THF anidro (100 mL) raffreddata a –78 °C sotto atmosfera di argon viene aggiunta una soluzione 2.5 N di n-BuLi in esano (30 mmol), mantenendo la temperatura sotto i –60 °C. La miscela viene agitata per 30 minuti, quindi si aggiunge lentamente una soluzione di benzil cloroformiato (Cbz-Cl)

(30 mmol) in THF anidro (30 mL). La soluzione viene agitata per 2 h a –78 °C, quindi neutralizzata con una soluzione acquosa di NH_4Cl ed estratta con etere dietilico (3x50 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl, seccate su Na_2SO_4 anidro ed il solvente rimosso mediante distillazione a pressione ridotta; il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela acetato di etile/etere di petrolio 1:1.

N-Cbz-pirrolidinone (65)

Si ottengono 4 g (91%) di olio incolore, secondo al metodologia generale A, a partire da 2-pirrolidinone **64** (1.7 g, 1.53 mL, 20 mmol), NaH al 60% in olio minerale (1.20 g, 30 mmol) e benzilossicarbonil cloruro (4.28 mL, 30 mmol).

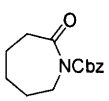
^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 1.92 (quint, 2H, CH_2, J=7.7 Hz); 2.43 (t, 2H, CH_2, J=7.7 Hz); 3.72 (t, 2H, CH_2, J=6.9 Hz); 5.20 (s, 2H, CH_2Ph); 7.30 (m, 5H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.53 (CH_2); 32.76 (CH_2); 46.31 (CH_2); 67.89 (CH_2Ph); 128.20-128.74 (C Ar); 135.48 (C Ar); 151.48 (CO); 174.12 (CO).



N-Cbz-δ-valerolattame (75)

Si ottengono 7.83 g (22.3 mmol, 74%) di un olio incolore, secondo al metodologia generale B, a partire da δ-valerolattame **74** (3.0 g, 30 mmol), una soluzione 2.5 N di n-BuLi in esano (12.2 mL, 30 mmol), benzil cloroformiato (4.3 mL, 30 mmol).

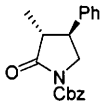
IR (nujol, cm^{-1}): 1770 (CO), 1710 (CO). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.40-2.20 (m, 2H, CH_2); 2.30-2.70 (m, 2H, CH_2); 3.60-3.80 (m, 2H, CH_2); 5.12 (s, 2H, CH_2Ph); 7.20-7.50 (m, 5H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 22.4 (CH_2); 26.6 (CH_2); 32.0 (CH_2); 43.8 (CH_2); 65.9 (CH_2Ph); 127.2-129.0 (C Ar); 136.56 (C Ar); 152.3 (CO); 172.2 (CO).



N-Cbz-ε-caprolattame (82)

Si ottengono 8.5 g (78%) di olio incolore, secondo al metodologia generale A, a partire da ε-caprolattame **81** (5 g, 44 mmol), NaH al 60% in olio minerale (2.65 g, 66 mmol) e benzilossicarbonil cloruro (9.5 mL, 66 mmol).

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 1.62 (m, 6H, CH_2 x3); 2.56 (t, 2H, CH_2CO); 3.73 (t, 2H, CH_2N); 5.19 (s, 2H, CH_2Ph); 7.20-7.36 (m, 5H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 23.51 (CH_2); 28.63 (CH_2); 29.07 (CH_2); 39.39 (CH_2); 46.34 (CH_2); 68.42 (CH_2Ph); 126.84-128.55 (C Ar); 135.67 (C_1 Ar); 154.25 (CO); 175.56 (CO).



N-Cbz-(3*R*,4*S*)-3-metil-4-fenilpirrolidin-2-one (107)

Si ottengono 880 mg (69%) di un solido giallino, secondo la metodologia generale A, a partire da (3*R*,4*S*)-3-metil-4-fenilpirrolidin-2-one **106** (770 mg, 4.39 mmol), NaH al 60% in olio minerale (263 mg, 6.59 mmol) e benzilossicarbonil cloruro (941 μL, 6.59 mmol).

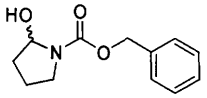
$[\alpha]_D^{25}$ = +19.1 (c=0.85, MeOH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.22 (d, 3H, CH_3, J=7.0 Hz); 2.54-2.69 (m, 1H, C<u>H</u>CH_3); 3.01 (m, 1H, C<u>H</u>Ph); 3.64 (m, 1H, C<u>H</u>H); 4.13 (m, 1H, CH<u>H</u>); 5.18 (s, 2H, CH_2 Cbz); 7.26-7.4 (m, 10H, Ar x2); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.34 (CH_3); 41.96 (CH); 46.38 (CH_2); 51.18 (CH); 68.17 (CH_2O); 127.4-128.72 (C Ar); 135.48 (Ar C_1); 138.8 (Ar C_1); 151.45 (CO); 175.02 (CO)

Procedure generali per la riduzione dei lattami

A) Ad una soluzione di N-Cbz-lattame (22.5 mmol) in metanolo anidro (100 mL) raffreddata a 0 °C viene lentamente aggiunto $NaBH_4$ (22.5 mmol). La soluzione viene quindi agitata per 15 minuti a 0 °C e si aggiunge di seguito acqua fredda (150 mL); la fase acquosa viene estratta con acetato di etile (3x70 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela acetato di etile/etere di petrolio 1:1.

B) Ad una soluzione di N-Cbz-lattame (23 mmol) in THF anidro (100 mL), raffreddata a -78 °C ed in atmosfera di argon, viene lentamente aggiunta una soluzione 1.2 M di diisobutil-alluminio idruro (DIBALH) in toluene (34 mmol). La soluzione viene quindi agitata per 2 h a –78 °C e quindi addizionata, a –78 °C, di acetone (10 mL) e di una soluzione acquosa satura di NH_4Cl (30 mL). Il sistema viene quindi lasciato andare a temperatura ambiente, lasciato sotto agitazione per circa 40 minuti e quindi filtrato su celite. La fase organica viene quindi separata e la fase acquosa estratta con acetato di etile (2x70 mL); le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione

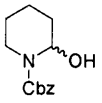
satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela acetato di etile/etere di petrolio 1:1.



N-Cbz-2-pirrolidinolo (63)

Si recuperano 4.11 g (81%) di un olio incolore, secondo la metodologia generale B, a partire da Cbz-2-pirrolidinone **65** (5 g, 23 mmol) e DIBALH 1.2 M in toluene (28.5 mL, 34 mmol).

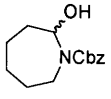
^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 1.64-1.88 (m, 2H, CH_2); 1.95-2.15 (m, 2H, CH_2); 2.96 (bs, 1H, OH); 3.31 (quint, 1H, CH_2, J=8.4 Hz); 3.56 (m, 1H, CH_2); 5.12 (s, 2H, CH_2Ph); 5.51 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 7.33 (m, 5H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 22.07-22.85 (CH_2); 32.96-33.87 (CH_2); 45.85-46.27 (CH_2); 65.10-66.98 (CH_2Ph); 81.30-81.99 (CHOH); 127.02-128.58 (C Ar); 136.56-141.18 (C Ar); 155.56 (CO).



N-Cbz-δ-valerolattame ridotto (76)

Si ottengono 5.03 g (21.3 mmol, 95%) di olio incolore, secondo la metodologia generale A, a partire da lattame **75** (5.25 g, 22.5 mmol) e $NaBH_4$ (852 mg, 22.5 mmol).

IR (nujol, cm^{-1}): 3280 (OH); 1770 (CO). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.44-1.90 (m, 7H, CH_2 x3 e OH); 3.18 (td, 1H, CH_2, J=12.6 Hz, 3.0 Hz); 3.89 (d, 1H, CH_2, J=11.7 Hz); 5.15 (s, 2H, CH_2Ph); 5.79 (m, 1H, CHOH); 7.32-7.40 (m, 5H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.6 (CH_2); 24.7 (CH_2); 30.5 (CH_2); 39.4 (CH_2); 67.2 (CH_2Ph); 79.30-81.0 (CHOH); 125.6-128.1 (C Ar); 136.4 (C Ar); 160.2 (CO).

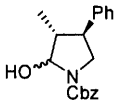


N-Cbz-ε-caprolattame ridotto (83)

Si recuperano 4.35 g (86%) di un olio giallo, secondo la metodologia generale B, a partire da lattame **82** (5 g, 20 mmol) e DIBALH 1.2 M in toluene (25 mL, 30 mmol).

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 1.15-1.74 (m, 7H, CH_2 x3 e C<u>H</u>H); 2.16 (m, 1H, CH<u>H</u>); 3.10 (m, 1H, C<u>H</u>H); 3.70 (m, 1H, CH<u>H</u>); 4.32 (d, 1H, OH, J=3.6 Hz); 5.11 (m, 2H, CH_2Ph); 5.59 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 7.13-7.33 (m, 5H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 22.8 (CH_2); 28.9-

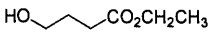
29.3 (CH_2); 29.6-29.7 (CH_2); 34.5-34.9 (CH_2); 41.1-41.3 (CH_2); 67.2-67.3 (CH_2Ph); 79.6-79.9 (CHOH); 127.7-129.1 (C Ar); 136.67 (C_1 Ar); 157.0 (CO).



(3*R*,4*S*)-benzil-2-idrossi-3-metil-4-fenilpirrolidin-1-carbossilato (108)

Si ottengono 640 mg (74%) di un olio giallino, secondo la metodologia generale B, a partire da N-Cbz-(3*R*,4*S*)-3-metil-4-fenilpirrolidin-2-one **107** (860 mg, 2.78 mmol) e DIBALH 1.2 M in toluene (3.5 mL, 4.17 mmol).

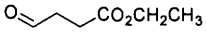
^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 1.2-1.23 (m, 3H, CH_3); 2.52-2.67 (m, 1H, C<u>H</u>CH_3); 3.0-3.11 (m, 2H, C<u>H</u>Ph e OH); 3.62-3.65 (m, 1H, C<u>H</u>H); 4.09-4.14 (m, 1H, CH<u>H</u>); 5.18 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.49 (m, 1H, CHOH); 7.24-7.49 (m, 10H, Ar x2); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.1 (CH_3); 38.87-40.1 (CH); 46.36-46.41 (CH_2); 51.18-51.33 (CH); 67.76-67.8 (CH_2O); 80.76-81.23 (CHOH); 127.2-138.7 (Ar); 154.55 (CO)



4-idrossi butanoato di etile (161)

Una soluzione di γ-butirrolattone **160** (10 mL, 13 mmol) e acido solforico concentrato (0.1 mL) in etanolo anidro (250 mL) viene mantenuta a riflusso per 16 ore, raffreddata a temperatura ambiente e addizionata con $NaHCO_3$ (1 g, 11.9 mmol). La miscela viene agitata per 20 minuti, filtrata ed il solvente rimosso a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

IR (film liquido, cm^{-1}): 3451 (OH), 1735 (C=O). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.19 (t, 3H, CH_3); 2.32-2.46 (m, 4H, CH_2 x2); 3.60 (m, 2H, CH_2O); 4.08 (q, 2H, CH_2O). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.27 (CH_3); 27.79 (<u>C</u>H_2); 31.12 (<u>C</u>H_2); 60.57 (CH_2O); 61.96 (CH_2O); 174.13 (CO).



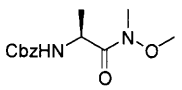
3-formil-propanoato di etile (162)

Ad una sospensione di clorocromato di piridinio (PCC) (22 g, 0.102 mol) in diclorometano anidro (150 mL) si aggiunge una soluzione di 4-idrossi butanoato di etile **161** (9 g, 0.068 mol) in diclorometano anidro (50 mL), sotto atmosfera di argon. La miscela viene agitata per due ore, diluita con dietil etere (250 mL) e filtrata su celite. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela 1:1 dietil etere/etere di petrolio. Si ottengono 6.75 g (76%) di liquido incolore.

IR (film liquido, cm^{-1}): 1735 (2xC=O). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.05 (t, 3H, CH_3, J=7.3 Hz); 2.41 (t, 2H, CH_2, J=6.9 Hz); 2.59 (t, 1H, CH_2, J=6.9 Hz); 3.92 (q, 2H, OCH_2); 9.60 (s, 1H, CHO). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 13.97 (CH_3); 26.43 (CH_2); 38.37 (CH_2); 60.51 (CH_2O); 172.06 (CO); 199.98 (CHO).

Procedura generale per la sintesi delle ammidi di Weinreb

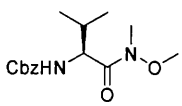
Ad una soluzione di amminoacido N-protetto (15 mmol) in diclorometano si aggiunge 4-metilmorfolina (30 mmol), raffreddando poi a –15 °C; si aggiunge, quindi, isobutil cloroformiato (15 mmol) e si lascia in agitazione a –15 °C per 20 minuti. La soluzione viene addizionata di N,O-dimetil-idrossilammina cloridrato (16 mmol) ed il sistema lasciato in agitazione per 1 h a –15 °C e per 3 h a temperatura ambiente. La soluzione viene quindi versata in acqua (50 mL), si separa la fase organica che viene di seguito lavata con una soluzione acquosa al 10% di acido citrico (w/v), acqua, una soluzione acquosa satura di NaCl ed infine seccata su Na_2SO_4 anidro. Eliminato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 95:5.



N^{α}-Cbz-L-alanina N-metossi-N-metilammide (91a)

Si ottengono 2.2 g (93%) di un solido bianco, secondo la metodologia generale, a partire da N-Cbz-L-alanina **90a** (2 g, 8.96 mmol), NMM (2.52 mL, 18 mmol), isobutil-cloroformiato (1.16 mL, 8.96 mmol) e N,O-dimetil-idrossilammina cloridrato (918 mg, 9.41 mmol).

P.f.: 145-146 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -16.0 (c=1.0, CH_3OH).**^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.30 (d, 3H, CH_3, J=7 Hz); 3.15 (s, 3H, NCH_3); 3.70 (s, 3H, OCH_3); 4.70 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.06 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.70 (d, 1H, NH, J=8.0 Hz); 7.29 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.57 (CH_3); 32.16 (NCH_3); 47.15 (CHNH); 61.61 (CH_3O); 66.70 (CH_2 Cbz); 128.03-128.5 (C Ar); 136.53 (C_1 Ar); 155.80 (CO); 173.28 (CO).

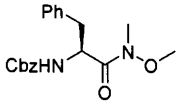


N^{α}-Cbz-L-valina N-metossi-N-metilammide (91b)

Si ottengono 3.82 g (82%) di un olio incolore, secondo la metodologia generale, a partire da N-Cbz-L-valina **90b** (4 g, 16 mmol), NMM (4.5 mL, 32 mmol), isobutil-

cloroformiato (2.1 mL, 16 mmol) e N,O-dimetil-idrossilammina cloridrato (1.64 g, 17 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -18.5 (c=0.9, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.87 (d, 3H, CH_3; J=7.0 Hz); 0.91 (d, 3H, CH_3; J=6.8 Hz); 1.97 (m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$); 3.17 (s, 3H, NCH_3); 3.74 (s, 3H, OCH_3); 4.60 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.07 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.51 (d, 1H, NH, J=9.5 Hz); 7.28 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.62 (CH_3); 19.0 (CH_3); 28.0 [<u>C</u>H$(CH_3)_2$]; 31.34 (NCH_3); 55.67 (CHNH); 61.68 (CH_3O); 66.86 (CH_2 Cbz); 128.05-128.54 (C Ar); 136.46 (C_1 Ar); 156.52 (CO); 172.60 (CO).



N$^\alpha$-Cbz-L-fenilalanina N-metossi-N-metilammide (222)

Si ottengono 2.47 g (86%) di un olio incolore, secondo la metodologia generale, a partire da N-Cbz-L-fenilalanina **221** (2.5 g, 8.35 mmol), NMM (2.35 mL, 17 mmol), isobutil-cloroformiato (1.1 mL, 8.35 mmol) e N,O-dimetil-idrossilammina cloridrato (872 mg, 8.77 mmol).

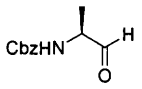
$[\alpha]_D^{25}$ = 29.0 (c=1.23, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 2.90 (dd, 1H, C<u>H</u>H, J=7 Hz, J=13.4 Hz); 3.08 (dd, 1H, C<u>H</u>H, J=6 Hz, J=13.4 Hz); 3.14 (s, 3H, NCH_3); 3.68 (s, 3H, OCH_3); 5.04 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.07 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.64 (d, 1H, NH, J=7.3 Hz); 7.29 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 32.16 (NCH_3); 38.68 (CH_2); 52.25 (CHNH); 61.61 (CH_3O); 66.78 (CH_2 Cbz); 126.93-129.51 (C Ar); 136.53 (C_1 Ar); 155.93 (CO); 172.01 (CO).

Procedure generali per la sintesi delle aldeidi

A) $LiAlH_4$ (2.5 mmol) viene aggiunto, a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon, ad una soluzione di N-metossi-N-metil-N$^\alpha$-(benzilossicarbonilammino)-carbossiammide (2 mmol) in dietil etere anidro (30 mL) (nel caso della N$^\alpha$-Cbz-L-alanina N-metossi-N-metilammide la reazione viene condotta in THF anidro). La sospensione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon per 1 h, raffreddata in bagno a ghiaccio, addizionata di una soluzione acquosa 1N di $KHSO_4$ (10 mL) ed estratta ripetutamente con etere dietilico. Le fasi organiche riunite vengono di seguito lavate con una soluzione acquosa 3 N di HCl, una soluzione acquosa satura di $NaHCO_3$, una soluzione acquosa satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4

anidro. Eliminato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo può essere utilizzato senza ulteriori purificazioni.

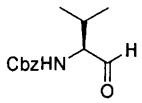
B) Ad una soluzione in diclorometano anidro del metilestere di un amminoacido N-Boc (o N-Cbz) protetto (35 mmol), raffreddata a –78 °C ed in atmosfera di argon, viene aggiunta una soluzione 1.2 M di DIBALH in toluene (52.5 mmol). La soluzione viene quindi agitata per 2 h a –78 °C e quindi addizionata, a –78 °C, di acetone (10 mL) e di una soluzione acquosa satura di NH_4Cl (30 mL). Il sistema viene quindi lasciato andare a temperatura ambiente, lasciato sotto agitazione per circa 40 minuti e quindi filtrato su celite. La fase organica viene quindi separata e la fase acquosa estratta con acetato di etile (2x70 mL); le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela acetato di etile/etere di petrolio 1:1.



N-Cbz-L-alaninale (92a)

Si ottengono 1.22 g (77%) di un olio incolore, secondo la metodologia generale A, a partire da N^{α}-Cbz-L-alanina N-metossi-N-metilammide **91a** (2 g, 7.66 mmol) e $LiAlH_4$ (320 mg, 8.43 mmol), che viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

$[\alpha]_D^{25}$ = -19.9 (c = 1.0, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.30 (d, 3H, CH_3, J=7 Hz); 4.24 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.08 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.62 (brd, 1H, NH); 7.31 (m, 5H, Ar); 9.49 (s, 1H, CHO). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.73 (CH_3); 55.94 (CHNH); 66.91 (CH_2 Cbz); 127.83-128.64 (C Ar); 136.25 (C_1 Ar); 156.06 (CO); 199.47 (CHO).

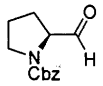


N-Cbz-L-valinale (92b)

Si ottengono 2.35 g (79%) di un olio incolore, secondo la metodologia generale A, a partire da N^{α}-Cbz-L-valina N-metossi-N-metilammide **91b** (3.7 g, 12.6 mmol) e $LiAlH_4$ (525 mg, 13.8 mmol), che viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

$[\alpha]_D^{25}$ = -6.0 (c = 1.0 CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.84 (d, 3H, CH_3; J=7.0 Hz); 0.96 (d, 3H, CH_3; J=6.8 Hz); 2.33 (m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$); 4.30 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.07 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.51 (d, 1H, NH, J=9.5 Hz); 7.25 (m, 5H, Ar); 9.58 (s, 1H, CHO). **^{13}C-NMR**

(δ-$CDCl_3$): 17.60 (CH_3); 19.06 (CH_3); 29.06 [$\underline{C}H(CH_3)_2$]; 64.68 (CHNH); 66.86 (CH_2 Cbz); 128.05-128.54 (C Ar); 136.46 (C_1 Ar); 155.89 (CO); 200.46 (CHO).



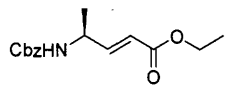
N-Cbz-prolinale (156)

Si ottengono 1.5 g (67%) di un olio incolore, secondo la metodologia generale B, a partire da N^{α}-Cbz-L-prolina-metilestere **155** (2.5 g, 9.7 mmol) e DIBALH 1.2 M in toluene (12 mL, 14.5 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -62.6 (c = 1.0, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$ coppia di rotameri): 1.63-1.90 (m, 4H, CH_2 x2); 3.40 (m, 2H, CH_2); 4.12 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.0-5.05 (m, 2H, CH_2 Cbz); 7.19-7.25 (m, 5H, Ar); 9.33-9.42 (m, 1H, CHO); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$ coppia di rotameri): 23.63-24.48 (CH_2); 26.56-27.66 (CH_2); 46.71-47.29 (CH_2); 64.89-65.30 (CHNH); 66.81-67.09 (CH_2 Cbz); 127.89-128.49 (C Ar); 136.43-136.62 (C_1 Ar); 154.39-155.25 (CO); 199.86-199.95 (CHO).

Procedura generale per l'omologazione degli amminoacidi

Ad una soluzione di trietil-fosfonoacetato (TEPA) (13 mmol) in THF anidro (50 mL), a 0 °C ed in atmosfera di argon viene aggiunto, KO*t*Bu (13 mmol) ed il sistema viene lasciato in agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon per 20 minuti, quindi raffreddato a –78 °C ed addizionato di una soluzione in THF contenente l'N-Cbz-aminale (10 mmol). Si lascia quindi in agitazione per 2 h a –78 °C, si aggiunge una soluzione acquosa al 5% di $NaHCO_3$ (100 mL) e si estrae ripetutamente con etil acetato; le fasi organiche riunite vengono di seguito lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4. Eliminato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela etil-acetato/etere di petrolio 1:1.

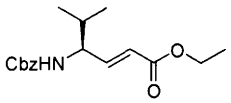


Acido-(4*S*)-4-benzilossicarbonilammino-pent-2-enoico etil estere (93a)

Si ottengono 924 mg (64%) di un solido bianco, secondo la metodologia generale, a partire da N-Cbz-L-alaninale **92a** (1.08 g, 5.22 mmol), TEPA (1.36 mL, 6.79 mmol) e KO*t*Bu (786 mg, 6.79 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -30.2 (c = 0.44, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.21 (t, 3H, CH_3, J=7.3 Hz); 1.30 (d, 3H, CH_3, J=7 Hz); 4.12 (q, 2H, CH_2O); 4.41 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.06 (s, 2H, CH_2

Cbz); 5.27 (d, 1H, NH, J=6.9 Hz); 5.89 (d, 1H, C<u>H</u>=CH, J=15.7 Hz); 6.81 (dd, 1H, CH=C<u>H</u>, J= 4.76, J=11 Hz); 7.30 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.26 (CH_3); 20.16 (CH_3); 47.65 (CHNH); 60.53 (CH_2O); 66.85 (CH_2 Cbz); 120.41 (<u>C</u>H=CH); 126.94-128.57 (C Ar); 136.46 (C_1 Ar); 149.01 (CH=<u>C</u>H); 155.67 (CO); 166.39 (COOEt).



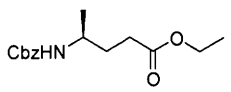
Acido-(4*S*)-4-benzilossicarbonilammino-5-metil-es-2-enoico etil estere (93b)

Si ottengono 1.8 g (61%) di un olio incolore, secondo la metodologia generale, a partire da N-Cbz-L-valinale **92b** (2.26 g, 9.61 mmol), TEPA (2.5 mL, 12.5 mmol) e KO*t*Bu (1.44 g, 12.5 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = 0.5 (c = 0.91, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.87 (d, 3H, CH_3; J=7.0 Hz); 0.92 (d, 3H, CH_3; J=6.8 Hz); 1.27 (t, 3H, CH_3, J=7.3 Hz); 1.84 (m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$); 4.17 (m, 3H, C<u>H</u>NH e CH_2O); 5.08 (m, 3H, CH_2 Cbz e NH); 5.89 (d, 1H, C<u>H</u>=CH, J=15.7 Hz); 6.80 (dd, 1H, CH=C<u>H</u>, J=5.5, J=10.2 Hz); 7.30 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.25 (CH_3); 18.10 (CH_3); 18.91 (CH_3); 32.23 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 57.46 (CHNH); 60.51 (CH_2O); 67.01 (CH_2 Cbz); 121.89 (<u>C</u>H=CH); 128.18-128.60 (C Ar); 136.40 (C_1 Ar); 146.86 (CH=<u>C</u>H); 156.03 (CO); 166.23 (COOEt).

Procedura generale per la riduzione degli amminoacidi omologati

L'N-Cbz amminoestere α,β-insaturo (1 mmol) viene disciolto in etil acetato distillato ed addizionato di Pd/C 3% (5% in peso rispetto al substrato) e lasciato in agitazione in atmosfera di H_2. Al termine della reazione (circa 45 minuti), il catalizzatore viene eliminato mediante filtrazione su celite, il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela etil acetato/etere di petrolio 4:6.

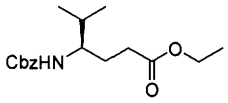


Acido-(4*S*)-4-benzilossicarbonilammino-pentanoico etil estere (94a)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 803 mg (70%) di un solido bianco, a partire da acido-(4S)-4-benzilossicarbonilammino-pent-2-enoico etil estere **93a** (1.14 g, 4.1 mmol) e Pd/C 3% (57 mg).

P.f.: 46-47 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = +8.4 (c = 1.95, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.09 (d, 3H, CH_3, J=7 Hz); 1.19 (t, 3H, CH_3, J=7.3 Hz); 1.71 (m, 2H, CH_2); 2.27 (t, 2H, CH_2, J=7.3 Hz);

3.68 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.06 (q, 2H, CH_2O); 4.94 (brd, 1H, CHN<u>H</u>); 5.04 (s, 2H, CH_2 Cbz); 7.28 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.22 (CH_3); 21.26 (CH_3); 31.14 (CH_2); 31.91 (CH_2); 46.94 (CHNH); 60.48 (CH_2O); 66.58 (CH_2 Cbz); 126.91-128.50 (C Ar); 136.71 (C_1 Ar); 155.96 (CO); 173.69 (COOEt).



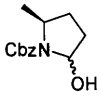
Acido-(4*S*)-4-benzilossicarbonilammino-5-metil-esanoico etil estere (94b)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 1.0 g (67%) di un solido bianco, a partire da Acido-(4S)-4-benzilossicarbonilammino-5-metil-es-2-enoico etil estere **93b** (1.5 g, 4.9 mmol) e Pd/C 3% (75 mg).

$[\alpha]_D^{25}$ = -1.8 (c=2.7, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.84 (d, 3H, CH_3, J=7.0 Hz); 0.89 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 1.19 (t, 3H, CH_3, J=7.3 Hz); 1.57 (m, 1H, C<u>H</u>H); 1.71 (m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$); 1.81 (m, 1H, CH<u>H</u>); 2.32 (t, 2H, CH_2, J=7.3 Hz); 3.48 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.07 (q, 2H, CH_2O); 4.75 (d, 1H, NH, J=9.5 Hz); 5.08 (s, 2H, CH_2 Cbz); 7.30 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.25 (CH_3); 17.86 (CH_3); 19.02 (CH_3); 27.42 (CH_2); 31.43 (CH_2); 32.52 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 56.26 (CHNH); 60.45 (CH_2O); 66.61 (CH_2 Cbz); 127.81-128.53 (C Ar); 136.77 (C_1 Ar); 156.55 (CO); 173.71 (COOEt).

Procedura generale per l'ottenimento delle aldeidi degli amminoacidi omologati

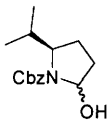
Ad una soluzione in diclorometano anidro dell'N-Cbz amminoestere (35 mmol), raffreddata a –78 °C ed in atmosfera di argon, viene aggiunta una soluzione 1.2 M di DIBALH in toluene (45.5 mmol). La soluzione viene quindi agitata per 1 h a –78 °C e quindi addizionata, a –78 °C, di acetone (10 mL) e di una soluzione acquosa satura di NH_4Cl (30 mL). Il sistema viene quindi lasciato andare a temperatura ambiente, lasciato sotto agitazione per circa 40 minuti e quindi filtrato su celite. La fase organica viene quindi separata e la fase acquosa estratta con acetato di etile (2x70 mL); le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo può essere utilizzato senza ulteriori purificazioni.



(5*S*)-benzil-2-idrossi-5-metilpirrolidin-1-carbossilato (95a)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 840 mg (90%) di un olio incolore, a partire da Acido-(4S)-4-benzilossicarbonilammino-pentanoico etil estere **94a** (1.56 g, 5.6 mmol) e DIBALH 1.2 M in toluene (5.6 mL, 6.7 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = +1.41 (c = 0.5, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.30 (d, 3H, CH_3, J=7 Hz); 1.76-1.96 (m, 4H, CH_2 x2); 3.86 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.14 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.52 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 7.33 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 21.16 (CH_3); 30.73-30.95 (CH_2); 31.34-31.59 (CH_2); 53.65-54.44 (CHNH); 66.97 (CH_2 Cbz); 82.63-83.35 (CHOH); 127.41-128.60 (C Ar); 136.59 (C_1 Ar); 155.66 (CO).



(5*R*)-benzil-2-idrossi-5-isopropilpirrolidin-1-carbossilato (95b)

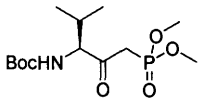
Si ottengono, secondo la metodologia generale, 900 mg (89%) di un olio incolore, a partire da Acido-(4S)-4-benzilossicarbonilammino-5-metil-esanoico etil estere **94b** (1.18 g, 3.84 mmol) e DIBALH 1.2 M in toluene (4 mL, 5 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = +1.3 (c = 0.45, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.85 (d, 3H, CH_3; J=7.0 Hz); 0.90 (d, 3H, CH_3; J=6.8 Hz); 1.72-1.90 (m, 5H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$ e CH_2 x2); 3.75 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.10 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.56 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 7.34 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.12 (CH_3); 19.78 (CH_3); 23.41-24.41 (CH_2); 29.09-30.46 (CH_2); 31.43-32.52 [<u>C</u>H$(CH_3)_2$]; 63.29-63.93 (CHNH); 67.01 (CH_2 Cbz); 83.78-83.81 (CHOH); 127.99-128.60 (C Ar); 136.53 (C_1 Ar); 156.28 (CO).

Procedura generale per la sintesi di fosfonati

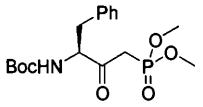
Ad una soluzione di dimetil-metilfosfonato (225 mmol) in THF anidro (200 mL) raffreddata a –78 °C sotto atmosfera di argon, viene aggiunta una soluzione di *n*-BuLi in esano 2.5M (225 mmol) in modo che la temperatura non superi i –60 °C. La miscela viene agitata per 15 minuti, quindi si aggiunge lentamente una soluzione di amminoacido (45 mmol) in THF anidro (100 mL). La soluzione viene agitata per due ore a –78 °C e per un'ora a –30 °C, quindi neutralizzata con una soluzione acquosa di acido citrico al 20%; la fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (3x75 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di $NaHCO_3$, una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela

dietil etere/etere di petrolio 1:1 quindi metanolo/dietil etere 1:9, oppure mediante cristallizzazione da etere diisopropilico.



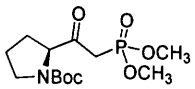
(3*S*)-Acido-(3-*tert*-butossicarbonilammino-4-metil-2-osso-pentil)-fosfonico dimetil estere (46a)

Si ottengono 13.1 g di olio giallo (93%) secondo la metodologia generale, partendo da Boc-L-valina metil estere **101** (10.0g. 43.2 mmol), metil-dimetil fosfonato (23.2 mL, 216 mmol) e *n*-BuLi (86.4 mL, 216 mmol). $[\alpha]_D^{25}$ = -25 (c=0.4, MeOH). **IR** (film liquido cm^{-1}): 3450 (NH), 1711 (C=O), 1250 (P=O). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.77 (d, 3H, C$\underline{H}_3$, J=6.6 Hz); 0.97 (d, 3H, C$\underline{H}_3$, J=6.6 Hz); 1.44 (s, 9H, (C$\underline{H}_3$)$_3$C); 2.26 [m, 1H, C$\underline{H}$(CH_3)$_2$]; 3.06 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$PO, J_1=14.6 Hz, J_2=22.1 Hz); 3.26 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$PO, J_1=14.6 Hz, J_2=22.1 Hz); 3.74 (m, 6H, (C$\underline{H}_3$O)$_2$P); 4.28 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.29 (d, 1H, N$\underline{H}$, J=8.8 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 16.52 ($\underline{C}H_3$CH); 19.74 ($\underline{C}H_3$CH); 29.12 [($\underline{C}H_3$)$_2$CH]; 38.65 (d, $\underline{C}H_2$P, J=131.4 Hz); 52.03 ($\underline{C}H_3$O); 62.75 ($\underline{C}$HNH); 79.84 [(CH_3)$_3\underline{C}$]; 155.93 ($\underline{C}$ONH); 201.45 (d, $\underline{C}$O, J=7.3 Hz). **ES-MS** (m/z): 362 $[MK]^+$, 346 $[MNa]^+$, 324 $[MH]^+$.



(3*S*)-Acido-(3-*tert*-butossicarbonilammino-2-osso-4-fenil-butil)-fosfonico dimetil estere (46b)

Si ottengono 12.4 g di solido bianco (89%) secondo la metodologia generale, partendo da N-Boc-L-fenilalanina metil estere (10 g, 35.8 mmol), metil-dimetil fosfonato (23.0 mL, 214 mmol) e *n*-BuLi (86 mL, 214 mmol). P.f.=65-67 °C (etere diisopropilico). $[\alpha]_D^{25}$ = -52 (c=0.4, MeOH). **IR** (KBR cm^{-1}): 3280 (NH), 1723, 1713 (C=O), 1225 (P=O). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.39 (s, 9H, (C$\underline{H}_3$)$_3$C); 2.93 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$Ph, J_1=8.3 Hz, J_2=14.2 Hz,); 3.18 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$Ph, J_1=6.1 Hz, J_2=14.2 Hz); 3.10 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$PO, J_1=14.2 Hz, J_2=22.0 Hz); 3.26 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$PO, J_1=14.2 Hz, J_2=22.0 Hz); 3.75 (d, 3H, OC$\underline{H}_3$, $J_{H\text{-}P}$=11.5 Hz); 3.77 (d, 3H, OC$\underline{H}_3$, $J_{H\text{-}P}$=11.5 Hz); 4.55 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.43 (d, 1H, N$\underline{H}$, J=7.8 Hz); 7.24 (m, 5H, C$\underline{H}$, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.31 [$\underline{C}H_3$)$_3$C]; 36.97 ($\underline{C}H_2$Ph); 38.31 (d, $\underline{C}H_2$P, J=130 Hz); 53.15 ($\underline{C}H_3$O); 61.27 ($\underline{C}$HNH); 80.14 (CH_3)$_3\underline{C}$); 126.95-129.38 (C Ar); 136.56 (C Ar); 155.34 (CONH); 201.03 (d, $\underline{C}$O, J=5.5 Hz). **ES-MS** (m/z): 410 $[MK]^+$, 394 $[MNa]^+$, 372 $[MH]^+$.



(2*S*)-Acido-2-[2-(Dimetossi-fosforil)-acetil]-pirrolidin-1-carbossilico *tert*-butil estere (146)

Si ottengono 6.85 g (70%) di un olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da N-Boc-L-prolina metil estere **145** (7.0 g, 30.5 mmol), metil dimetilfosfonato (9.8 mL, 91.7 mmol) e *n*-BuLi (36.6 mL, 91.7 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -54.2 (c=0.5, MeOH). **IR** (film liquido cm^{-1}): 1693 (C=O), 1255 (P=O). **^{1}H-NMR** (δ-DMSO-d_6 90 °C): 1.39 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.78 (m, 2H, CH_2); 1.98 (m, 1H, CH_2); 2.13 (m, 1H, CH_2); [3.24 e 3.29 (dd, 2H, $C\underline{H}_2PO$, J_1= 3.5 Hz, J_{H-P}=21.2 Hz)]; 3.36 (m, 2H, CH_2N); 3.69 (d, 6H, $(C\underline{H}_3)_2OP$, J_{H-P}=10.6 Hz); 4.36 (dd, 1H, $C\underline{H}N$, J_1=4.8 Hz, J_2=8.8 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d_6 90 °C): 23.79 (CH_2), 28.59 [$(\underline{C}H_3)_3C$, CH_2]; 36.63 (d, CH_2P, J=132.7 Hz); 47.08 (CH_2N); 52.97 (CHN); 66.14 (d, CH_3O, J=3.8 Hz); 79.64 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 154.72 (CO); 201.61 (d, $\underline{C}O$, J=6.9 Hz). **ES-MS** (m/z): 359 $[MK]^+$, 343 $[MNa]^+$, 322 $[MH]^+$.

Procedura generale per la sintesi degli enoni

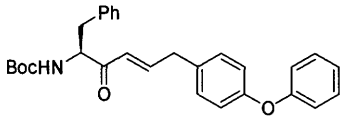
A) Una soluzione di aldeide (1 eq) in etanolo assoluto viene aggiunta, sotto agitazione, ad una soluzione di fosfonato (1 eq) e K_2CO_3 (1 eq), seccato a 75 °C per 12 ore, in etanolo assoluto (200 mL). La miscela viene agitata a temperatura ambiente per 16 ore, il residuo solido viene filtrato e la soluzione neutralizzata con acido acetico glaciale. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo distribuito tra acetato d'etile ed una soluzione satura di $NaHCO_3$. La fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (2x50 mL) e le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa satura di sodio bisolfito, quindi con una soluzione acquosa satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela 1:1 di etere etilico ed etere di petrolio.

B) Ad una soluzione di fosfonato (12 mmol) in acetonitrile anidro (120 mL) si aggiungono nell'ordine: LiCl (12 mmol), seccato a 220 °C per 4h, aldeide (10 mmol) e diaza-biciclo-undecene (DBU) (10 mmol). La miscela viene agitata per 16h a temperatura ambiente, neutralizzata con una soluzione acquosa di HCl al 10% e diluita con etile acetato (150 mL). La fase organica viene lavata con una soluzione satura di

$NaHCO_3$, una soluzione satura di NaCl e seccata su $NaSO_4$ anidro. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela di dietil etere/etere di petrolio 1:1.

C) Ad una sospensione di K_2CO_3 (36 mmol), seccato in stufa per 16 h a 75 °C, in acetonitrile anidro (120 mL) si aggiunge il fosfonato (12 mmol), lasciando quindi in agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon per 15 minuti. Si aggiunge quindi goccia a goccia una soluzione dell'aldeide (12 mmol) in acetonitrile anidro; il sistema viene quindi lasciato sotto agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon per 48 h, neutralizzata con una soluzione acquosa al 10% (w/v) di acido citrico ed estratta con etile acetato (3x). La fase organica viene lavata con H_2O, con una soluzione satura di NaCl e seccata su $NaSO_4$ anidro. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela di etil acetato/diclorometano 4/6.

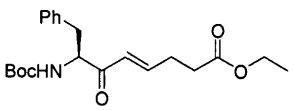
D) Ad una soluzione in THF anidro di litio fenilacetilide (preparata in situ a partire da 2 eq di fenilacetilene e 2 eq di n-BuLi 2.5 M in esano), raffreddata a –30 °C ed in atmosfera di argon, si aggiunge una soluzione in THF anidro di ammide di Weinreb N-Cbz protetta (1 eq). Il sistema viene mantenuto in agitazione per 2 h a –30 °C, quindi neutralizzato con HCl 1N e ripetutamente estratto con dietil etere. Le fase organiche riunite vengono quindi di seguito lavate con acqua, con una soluzione acquosa satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Eliminato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente un miscela etere di petrolio/etere dietilico (gradiente da 8/2 a 3/7).



Trans-(5*S*)-6-fenil-1-(4-fenossifenil)-5-(terbutossicarbonilamino)-2-esen-4-one (215c)

Si ottengono, secondo la metodologia generale A, ma lasciando la reazione procedere per soli 25 minuti, 950 mg (49%) di un olio giallino, a partire da 4-fenossifenilacetaldeide **211** (890 mg, 4.22 mmoli), fosfonato **46b** (1.57 g, 4.22 mmoli) e (583 mg, 4.22 mmoli).

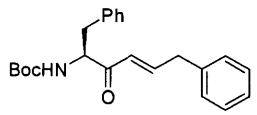
$[\alpha]_D^{25}$ = -5.0 (c=0.2, MeOH). **IR**: (nujol, cm^{-1}): 3415 e 3340 (NH); 1690 (C=O); 1620 (C=C); 1580 (Ph). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.41 (s, 9H, t-Bu); [2.98 (dd, 1H; J=5.7, 13.7Hz) e 3.06 (dd, 1H; J=7.0 e 13.7Hz); CH_2-Ph]; 3.45 (d, 2H, C$\underline{H}_2$-CH=; J=6.6Hz); 4.80 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.25 (d, 1H, NH; J=7.5Hz); 6.07 (d, 1H, =CH-CO; J=15.7Hz); 6.93-7.35 (m, 15H, Ar e =C$\underline{H}$-CH_2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.3 [C($\underline{C}H_3)_3$]; 38.1 (CH_2); 38.6 (CH_2); 58.3 (CHNH); 79.7 [$\underline{C}(CH_3)_3$]; 118.7 (Ar); 119.2 (Ar); 123.2 (Ar); 126.8 (Ar); 127.9 (Ar); 128.4 (=$\underline{C}$H-CO); 129.3 (Ar); 129.4 (Ar); 129.7 (Ar); 130.1 (Ar); 131.9 (Ar); 136.1 (Ar); 147.6 (=$\underline{C}$H-CH_2); 155.1 (CONH); 156.0 (Ar); 197.5 (CO). **ES-MS** (m/z): 458 $[MH]^+$; 475 $[M+NH_4]^+$; 402 [MH-isobutene]$^+$; 358 $[MH-Boc]^+$



(7*S*)-Acido-7-*tert*-butossicarbonilamino-6-osso-8-fenil-oct-4-enoico etil estere (163)

Si ottengono 3.75 g (58%), secondo la metodologia generale A, di un olio incolore (che può essere cristallizzato da esano) partendo da 3-formil-propanoato di etile **162** (2.25 g, 17.3 mmol), fosfonato **46b** (6.45 g 17.3 mmol) e K_2CO_3 (2.4 g, 17.3 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = +0.69 (c=0.65, MeOH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.21 (t, 3H, CH_3, J=7.3 Hz); 1.36 [s, 9H, ($C\underline{H}_3)_3C$)]; 2.37 (m, 4H, CH_2 x2); 2.36 (q, 2H, C$\underline{H}_2$, J=6.9 Hz); 2.45 (t, 2H, C$\underline{H}_2$, J=7.32 Hz); 2.96 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$Ph, J_1=5.5 Hz, J_2=13.7 Hz); 3.06 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$Ph, J_1=6.9, Hz, J_2=13.7 Hz); 4.08 (q, 2H, CH_2O, J=6.9 Hz); 4.75 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.27 (d, 1H, N$\underline{H}$, J=7.3 Hz); 6.10 (d, 1H, C$\underline{H}$CO, J=15.7 Hz); 6.84 (m, 1H, C$\underline{H}CH_2$); 7.05 (d, 2H, C$\underline{H}$ Ar, J=6.9 Hz); 7.21 (m, 3H, C$\underline{H}$ Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.2 (CH_3); 27.66 ($\underline{C}H_2$); 28.36 [($\underline{C}H_3)_3C$]; 32.34 (CH_2); 38.52 (CH_2Ph); 58.51 (CH_2O); 60.71 (CHNH); 79.68 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.88 (C Ar); 127.83 ($\underline{C}$H=CH); 128.44-129.52 (C Ar); 136.21 (C_1 Ar); 147.09 ($\underline{C}$H=CH); 155.15 (CONH); 172.1 ($\underline{C}O_2CH_2CH_3$); 197.21 (CO).

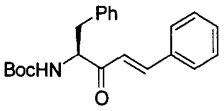


(5*S*)-1,6-difenil-5-(tertbutossicarbonilammino)-2-esen-4-one (168)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale A, ma lasciando la reazione procedere per soli 25 minuti, 13.0 g (50%) di un olio giallo (che può essere cristallizzato a dare un solido bianco per aggiunta di etere diisopropilico/etere di petrolio 1:1), partendo da

fenilacetaldeide (8.35 mL, 71.4 mmol), fosfonato **46b** (26.5 g, 71.4 mmol) e K_2CO_3 (9.87 g, 71.4 mmol).

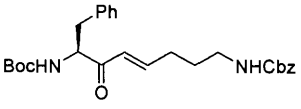
P.f. = 75-78 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = +0.77 (c=1, MeOH). **IR** (nujol, cm^{-1}): 3360 (NH); 1690 (CO); 1623 (C=C); 1602 (Ph); **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.40 (s, 9H, tBu); [2.97 (dd, 1H, J=5.9, 13.7 Hz) e 3.06 (dd, 1H, J=6.8, 13.7 Hz) CH_2Ph]; 3.48 (d, 2H, =CH-$\underline{CH_2}$), J=6.6 Hz ; 4.79 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.26 (d, 1H, NH, J=7.8 Hz); 6.08 (d, 1H, =CH-CO, J=15.6 Hz); 7.03 (dt, 1H, =C$\underline{H}$-CH_2, J=6.6, 15.6 Hz); 7.10 (m, 4H, Ar orto); 7.15-7.36 (m, 6H, Ar meta e para); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.3 [C($\underline{C}H_3)_3$]; 38.5 (CH_2); 38.8 (CH_2); 58.4 (CHNH); 79.7 [$\underline{C}(CH_3)_3$]; 126.8 (Ar); 126.9 (Ar); 128.0 (=$\underline{C}$H-CO); 128.4 (Ar); 128.7 (Ar); 128.8 (Ar); 129.5 (Ar); 136.1 (Ar C1); 147.7 (=$\underline{C}$H-CH_2); 155.1 (CONH); 197.4 (CO)



(4*S*)-1,5-difenil-4-(*tert*-butossicarbonilammino)-1-pent-3-one (215a)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale, 2.6 g (69%) di un solido bianco, partendo da benzaldeide (1.09 mL, 10.7 mmol), fosfonato **46b** (4 g, 10.7 mmol) e K_2CO_3 (1.48 g, 10.7 mmol).

P.f. = 106.5-107 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -3.0 (c=1.59, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.44 (s, 9H, tBu); 3.11 (m, 2H, CH_2Ph); 4.92 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.41 (d, 1H, NH, J=7.3 Hz); 6.69 (d, 1H, =CH-CO, J=15.7 Hz); 7.16-7.45 (m, 10H, Ar x2); 7.60 (d, 1H, C$\underline{H}$=CH-CO, J=15.7 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.44 [C($\underline{C}H_3)_3$]; 38.55 (CH_2); 59.2 (CHNH); 79.7 [$\underline{C}(CH_3)_3$]; 123.14 (Ar); 126.9 (Ar); 128.5 (=$\underline{C}$H-CO); 128.6 (Ar); 129.0 (Ar); 129.6 (Ar); 130.9 (Ar); 134.3 (Ar C1); 136.3 (Ar C_1); 144.3 (=$\underline{C}$H-CH_2); 155.1 (CONH); 197.3 (CO). **ES-MS** (m/z): 390 $[MK]^+$, 374 $[MNa]^+$, 352 $[MH]^+$.

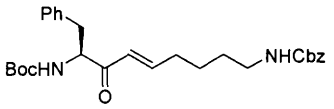


Benzil-(4*E*,7*S*)-7-[(*tert*-butossicarbonil)ammino]-6-osso-8-fenil-oct-4-enil-carbammato (59b)

Si ottengono, secondo la metodologia generale C, 2.3 g (50%) di un solido bianco, a partire da N-Cbz-pirrolidinolo **63** (2.3 g, 1 mmol), fosfonato **46b** (3.87 g, 1 mmol) e K_2CO_3 (4.14 g, 3 mmol).

P.f. = 75-77 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -0.59 (c=0.73, MeOH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.35 (s, 9H, $(CH_3)C$); 1.59 (t, 2H, CH_2, J=6.9 Hz); 2.18 (q, 2H, C$\underline{H_2}$, J=6.9 Hz); [2.96 (dd, 1H,

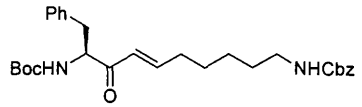
J=5.9, 13.7 Hz) e 3.05 (dd, 1H, J=6.8, 13.7 Hz) CH_2Ph]; 3.15 (q, 2H, CH_2, J=6.2 Hz); 4.77 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.99 (brs, 1H, NH); 5.12 (s, 2H, CH_2Ph); 5.31 (d, 1H, J=7.7 Hz); 6.09 (d, 1H, C<u>H</u>=CH, J=15.7 Hz); 6.85 (m, 1H, CH=C<u>H</u>); 7.10-7.34 (m, 10H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.38 [C(<u>C</u>H_3) e CH_2]; 29.78 (CH_2); 38.45 (CH_2); 40.45 (CH_2); 58.46 (CHNH); 66.74 (CH_2Ph); 79.77 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 126.9 (<u>C</u>H=CH-CH_2); 128.91-129.54 (C Ar); 136.28 (C_1 Ar); 136.62 (C_1 Ar); 148.42 (CH=<u>C</u>H-CH_2); 155.22 (CONH); 156.51 (CONH); 197.46 (CO). **ES-MS** (m/z): 505.1 $[MK]^+$, 489.1 $[MNa]^+$, 484.2 $[MNH_4]^+$, 465.1 $[MH]^+$



(1*S*,2*E*)-acido carbammico-(1-benzil-8-benzilossicarbonilammino-2-oxo-octa-3-enil)-*tert*-butil estere (77)

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 1.02 g (65%) di solido bianco, a partire da lattame ridotto **76** (800 mg, 3.4 mmol), fosfonato **46b** (1.26 g, 3.4 mmol), LiCl (1.44 g, 3.4 mmol) e DBU (440 mg, 2.8 mmol)

P.f. = 72-73 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -0.62 (c=0.73, MeOH). **IR** (nujol, cm-1): 3362 (NH), 1743, 1691 (CO), 1620 (C=C). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.40 (s, 13H, C(CH_3)$_2$ e CH_2 x2); 2.16 (bs, 2H, CH_2); 3.05 (m, 4H, CH_2Ph e CH_2); 4.77 (m, 2H, NHCbz e C<u>H</u>NH); 5.08 (s, 2H, CH_2Ph); 5.25 (d, 1H, NH, J=6.9 Hz); 6.11 (d, 1H, C<u>H</u>=CH, J=15.7 Hz); 6.85 (m, 1H, CH=C<u>H</u>); 7.29 (m, 10H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 25.06 (CH_2); 28.40 [C(<u>C</u>H_3)]; 29.57 (CH_2); 32.18 (CH_2); 38.59 (CH_2Ph); 40.73 (CH_2NH); 58.37 (CHNH); 66.74 (CH_2Ph); 79.76 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 126.9 (<u>C</u>H=CH-CH_2); 128.19-129.55 (C Ar); 136.28 (C_1 Ar); 136.64 (C_1 Ar); 149.04 (CH=<u>C</u>H-CH_2); 155.20 (CONH); 156.47 (CONH); 197.48 (CO). **ES-MS** (m/z): 519.3 $[MK]^+$, 503.2 $[MNa]^+$, 498.2 $[MNH_4]^+$, 481.2 $[MH]^+$

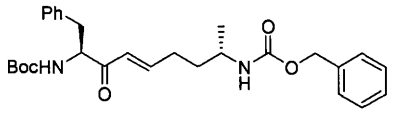


(1*S*,2*E*)-acido carbammico-(1-benzil-9-benzilossicarbonilammino-2-oxo-non-3-enil)-*tert*-butil estere (84)

Si ottengono, secondo la metodologia generale C, 1.8 g (48%) di un olio incolore, a partire da lattame ridotto **83** (2.68 g, 10.7 mmol), fosfonato **46b** (4.0 g, 10.7 mmol) e K_2CO_3 (4.45 g, 32 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -0.79 (c=0.55, MeOH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.36 (s, 13H, C(CH_3)$_2$ e CH_2 x2); 2.04 (bs, 2H, CH_2); 2.78-3.05 (m, 4H, CH_2Ph e CH_2); 4.68 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.0 (s, 2H,

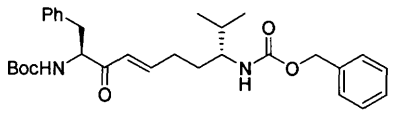
CH_2Ph); 5.48 (m, 2H, NH x2); 6.02 (d, 1H, C<u>H</u>=CH, J=15.7 Hz); 6.80 (m, 1H, CH=C<u>H</u>); 7.03-7.24 (m, 10H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 26.27 (CH_2); 27.57 (CH_2); 28.34 [C(<u>C</u>H_3)]; 29.69 (CH_2); 32.47 (CH_2); 38.10 (CH_2Ph); 40.86 (CH_2NH); 58.40 (CHNH); 66.32 (CH_2Ph); 79.47 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 126.76 (<u>C</u>H=CH-CH_2); 127.33-129.48 (C Ar); 136.52 (C_1 Ar); 136.93 (C_1 Ar); 149.39 (CH=<u>C</u>H-CH_2); 155.25 (CONH); 156.63 (CONH); 197.51 (CO)



(1*S*,3*E*,7S)-1-benzil-7-benzilossicarbonilammino-2-osso-oct-3-enilcarbammato) *tert*-butil estere (96a)

Si ottengono, secondo la metodologia generale C, 874 mg (47%) di un olio incolore, a partire da (S)-benzil-2-idrossi-5-metilpirrolidin-1-carbossilato **95a** (910 mg, 3.87 mmol), fosfonato **46b** (1.44 g, 3.87 mmol) e K_2CO_3 (1.6 g, 12 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -0.81 (c=0.6, MeOH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.12 (d, 3H, CH_3, J=6.2 Hz); 1.37 (s, 9H, (CH_3)C); 1.52 (m, 2H, CH_2); 2.2 (m, 2H, CH_2); [2.96 (dd, 1H, J=5.9, 13.7 Hz) e 3.06 (dd, 1H, J=6.8, 13.7 Hz) CH_2Ph]; 3.71 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.68 (d, 1H, CHN<u>H</u>, J=9.5 Hz); 4.77 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.1 (s, 2H, CH_2Ph); 5.27 (d, 1H, J=7.3 Hz); 6.09 (d, 1H, C<u>H</u>=CH, J=15.7 Hz); 6.85 (m, 1H, CH=C<u>H</u>); 7.09-7.34 (m, 10H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 21.29 (CH_3); 28.41 [C(<u>C</u>H_3)]; 29.32 (CH_2); 35.46 (CH_2); 38.49 (CH_2); 46.84 (CHNH); 58.43 (CHNH); 66.68 (CH_2Ph); 79.71 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 126.9 (<u>C</u>H=CH-CH_2); 127.53-129.57 (Ar); 136.3 (C_1 Ar); 136.63 (C_1 Ar); 148.68 (CH=<u>C</u>H-CH_2); 155.2 (CONH); 155.83 (CONH); 197.4 (CO).

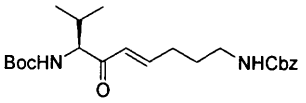


(1*S*,3*E*,7*S*)-1-benzil-7-benzilossicarbonilammino-8-metil-2-osso-non-3-enilcarbammato) *tert*-butil estere (96b)

Si ottengono, secondo la metodologia generale C, 754 mg (48%) di un olio incolore, a partire da (R)-benzil-2-idrossi-5-isopropilpirrolidin-1-carbossilato **95b** (813 mg, 3.1 mmol), fosfonato **46b** (1.15 g, 3.1 mmol) e K_2CO_3 (1.28 g, 9.3 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -0.59 (c=0.7, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.86 (d, 3H, CH_3, J=6.96 Hz); 0.89 (d, 3H, CH_3, J=6.96 Hz); 1.37 (m, 10H, (CH_3)C e C<u>H</u>H); 1.56 (m, 1H, CH<u>H</u>); 1.72 (m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$); 2.2 (m, 2H, CH_2); [2.96 (dd, 1H, J=5.9, 13.7 Hz) e 3.06 (dd, 1H, J=6.8, 13.7 Hz) CH_2Ph]; 3.50 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.57 (d, 1H, CHN<u>H</u>, J=9.5 Hz); 4.79 (m,

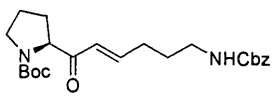
1H, C<u>H</u>NH); 5.08 (s, 2H, CH_2Ph); 5.26 (d, 1H, J=5.1 Hz); 6.07 (d, 1H, C<u>H</u>=CH, J=15.7 Hz); 6.85 (m, 1H, CH=C<u>H</u>); 7.09-7.35 (m, 10H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 16.8 (CH_3); 19.8 (CH_3); 28.38 [C(<u>C</u>H_3)]; 28.43 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 29.3 (CH_2); 35.41 (CH_2); 38.47 (CH_2); 57.4 (CHNH); 58.36 (CHNH); 66.6 (CH_2Ph); 79.8 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 126.9 (<u>C</u>H=CH-CH_2); 128.89-129.56 (C Ar); 136.3 (C_1 Ar); 136.54 (C_1 Ar); 148.4 (CH=<u>C</u>H-CH_2); 155.3 (CONH); 156.48 (CONH); 197.4 (CO). **ES-MS** (m/z): 547.2 $[MK]^+$, 531.1 $[MNa]^+$, 526.2 $[MNH_4]^+$, 509.2 $[MH]^+$



Benzil (4*E*,7*S*)-7-[(*tert*-butossicarbonil)ammino]-8-metil-6-osso-non-4-enilcarbammato (59a)

Si ottengono, secondo al metodologia generale C, 320 mg (51%) di un olio incolore, partendo da N-Cbz pirrolidinolo **63** (334 mg, 1.51 mmol), fosfonato **46a** (490 mg, 1.51 mmol) e K_2CO_3 (627 mg, 4.54 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = +4.16 (c=1.9, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.72 (d, 3H, C<u>H</u>$_3$CH, J=6.6 Hz); 0.94 (d, 3H, C<u>H</u>$_3$CH, J=6.6 Hz); 1.38 (s, 9H, (C<u>H</u>$_3$)$_3$C); 1.62 (t, 2H, C<u>H</u>$_2$, J=6.9 Hz); 2.06 (m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$); 2.19 (q, 2H, C<u>H</u>$_2$, J=6.9 Hz); 3.14 (q, 2H, C<u>H</u>$_2$, J=6.2 Hz); 4.44 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.09 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.17 (brs, 1H, NH); 5.26 (d, 1H, N<u>H</u>, J=8.8 Hz); 6.19 (d, 1H, C<u>H</u>=CH, J=15.7 Hz); 6.90 (dt, 1H, C<u>H</u>=CH, J_1=8.0 Hz, J_2=15.7 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 16.77 (CH_3); 19.90 (CH_3); 28.30 [(<u>C</u>H_3)$_3$C]; 28.44 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 29.79 (<u>C</u>H_2); 30.78 (<u>C</u>H_2); 40.49 (CH_2); 62.15 (CHNH); 66.65 (CH_2 Cbz); 79.51 [(CH_3)$_3$<u>C</u>]; 127.98-128.14 (C Ar); 128.54 (<u>C</u>H=CH); 136.64 (Ar C_1); 147.94 (<u>C</u>H=CH); 155.98 (<u>C</u>ONH); 156.53 (<u>C</u>ONH); 198.34 (<u>C</u>O). **ES-MS** (m/z): 457 $[MK]^+$, 441 $[MNa]^+$, 436 $[MNH_4]^+$, 419 $[MH]^+$

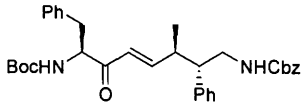


(2*S*)-Acido-(6-benzilossicarbonilammino-es-2-enoil)-pirrolidin-1-carbossilico *tert*-butil estere (147)

Si ottengono, secondo la metodologia generale C, 1.80 g (76%) di un olio incolore, a partire da Boc-Pro-fosfonato **146** (1.82 g, 5.69 mmol), N-Cbz-pirrolidinolo **63** (1.26 g, 5.69 mmol) e K_2CO_3 (2.36 g, 17 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -29.6 (c=0.58, CH_3OH). ^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$ coppia di rotameri): 1.31-1.40 [s, 9H, (C<u>H</u>$_3$)$_3$C)]; 1.61-1.80 (m, 5H, C<u>H</u>$_2$, HC<u>H</u>CH, C<u>H</u>$_2$); 2.21 (m, 1H, <u>H</u>CH); 2.22 (q, 2H, C<u>H</u>$_2$, J=7.3 Hz); 3.17 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$N); 3.48 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$N); 4.31-4.51 (m, 1H,

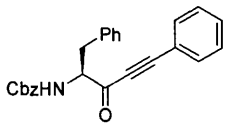
CHN); 5.04 (brs, 3H, CH_2 Cbz e NH); 6.20 (d, 1H, CH=CH, J=15.7 Hz); 6.90 (m, 1H, CH=CH). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$ coppia di rotameri): 23.76-24.31 (CH_2 x2); 28.31-28.49 [$(CH_3)_3C$]; 29.25 (CH_2); 29.84-30.36 (CH_2); 40.53 (CH_2); 46.77-46.93 (CH_2N); 63.41-64.26 (CHN); 66.68 (CH_2 Cbz); 79.73-80.03 [$(CH_3)_3C$]; 125.98 (C_4 Ar); 126.95 (CH=CH); 128.13-128.55 (C Ar); 136.60 (C_1 Ar); 147.29 (CH=CH); 153.95-154.10 (CON); 156.50 (CON); 198.47198.78 (CO). **ES-MS** (m/z): 455.1 $[MK]^+$, 439.1 $[MNa]^+$, 434.2 $[MNH_4]^+$, 417.2 $[MH]^+$, 317 [M-isobutene]



Acido (2S,3R,7S)-7-*tert*-butossicarbonilammino-3-metil-6-osso-2,8-difenil-oct-4-enil)-carbammico benzil estere (109)

Si ottengono, secondo al metodologia generale C, 317 mg (47%) di un olio incolore, partendo da (3*R*,4*S*)-benzil-2-idrossi-3-metil-4-fenilpirrolidin-1-carbossilato **108** (377 mg, 1.21 mmol), fosfonato **46b** (450 mg, 1.21 mmol) e K_2CO_3 (502 mg, 3.63mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = +1.13 (c=1.9, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.19 (m, 3H, CH_3); 1.33 (s, 9H, $(CH_3)C$); 2.51 (m, 1H, CH); 2.98-3.1 (m, 3H, CHPh e CH_2Ph); 3.36-3.53 (m, 2H, CH_2); 4.69 (m, 1H, CHNH); 5.07 (s, 2H, CH_2Ph); 5.25 (d, 1H, J=5.1 Hz); 6.06 (d, 1H, CH=CH, J=15.7 Hz); 6.84 (m, 1H, CH=CH); 7.1-7.41 (m, 15H, Ar x3). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.1 (CH_3); 28.38 [$C(CH_3)$]; 38.47 (CH_2); 39.41 (CH); 44.41 (CH_2); 49.0 (CH); 58.34 (CHNH); 66.7 (CH_2Ph); 79.9 [$C(CH_3)_3$]; 127.3-129.8 (C Ar e CH=C); 136.2 (C_1 Ar); 139.31 (C_1 Ar); 148.3 (CH=CH-CH_2); 155.7 (CONH); 156.42 (CONH); 197.3 (CO).

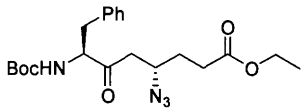


(4*S*)-N-Cbz-4-amino-1,5-difenil-1-pentin-3-one (223)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale D, 4.77 g (78%) di un solido giallino, partendo da N^{α}-Cbz-L-fenilalanina N-metossi-N-metilammide **222** (5.51 g, 16 mmol), fenilacetilene (3.6 mL, 32 mmol) e nBuLi 2.5 M in esano (12.8 mL, 32 mmol).

P.f. = 89-91 °C; **$[\alpha]_D^{25}$** = -26.6 (c=1.32, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 3.31 (d, 2H, CH_2Ph, J=6 Hz); 4.90 (m, 1H, CHNH); 5.13 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.50 (d, 1H, NH, J=8 Hz); 7.20-7.54 (m, 15H, Ar x3). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 37.44 (CH_2); 62.51 (CHNH); 67.10 (CH_2); 86.42 (C≡C-CO); 95.30 (C≡C-CO); 119.49 (C≡C-C_{Ar}); 127.27-133-40 (C

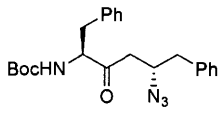
Ar); 135.58 (Ar C1); 136.40 (Ar C1); 155.83 (CONH); 185.53 (CO). **ES-MS** (m/z): 422 $[MK]^+$, 406 $[MNa]^+$, 401 $[MNH_4]^+$, 384 $[MH]^+$.



***tert*-butil (2*S*,5*S*)-7-(etossicarbonil)-5-azido-3-osso-1-fenileptan-2-il carbammato (164)**

Una soluzione di trimetilsililazide ($TMSiN_3$) (1.75 ml, 11.2 mmol) e acido acetico (768 μL, 11.2 mmol) in diclorometano (50 ml) viene tenuta in agitazione per 20 minuti ed in atmosfera di argon a –18 °C. Si aggiunge quindi una soluzione di (7*S*)-Acido-7-*tert*-butossicarbonilamino-6-osso-8-fenil-oct-4-enoico etil estere **163** (1.0 g, 2.7 mmol) e brucina (210 mg, 0.53 mmol) in diclorometano (25 ml), lasciando quindi in agitazione per 16 h a –18 °C ed in atmosfera di argon. A conversione completa (TLC: etere di petrolio/etere dietilico 1:1), il solvente viene eliminato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etere dietilico (gradiente da 95/5 a 1/1). Si recuperano 680 mg (61%) di un olio giallino.

$[\alpha]_D^{25}$ = -37.5 (c=0.6, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.18 (t, 3H, CH_3, J=7.3 Hz); 1.36 [s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$)]; 1.61-1.74 (m, 2H, CH_2); 2.27-2.55 (m, 4H, CH_2 x2); 2.84 (q, 1H, $C\underline{H}_2$, J=6.9 Hz); 2.96 (dd, 1H, $C\underline{H}_2Ph$, J_1=5.5 Hz, J_2=13.7 Hz); 3.88 (m, 1H, CHN_3); 4.05 (q, 2H, CH_2O, J=6.9 Hz); 4.40 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.21 (d, 1H, N<u>H</u>, J=7.3 Hz); 7.10 - 7.23 (m, 5H, C<u>H</u> Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.21 (CH_3); 28.28 [$(\underline{C}H_3)_3C$]; 29.65 ($\underline{C}H_2$); 30.69 (CH_2); 37.05 (CH_2Ph); 53.56 (CHN_3); 57.12 (CHNH); 60.6 (CH_2O); 79.74 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 127.08-129.26 (C Ar); 136.17 (C_1 Ar); 155.34 (CONH); 172.61 (<u>C</u>O); 206.55 (CO).



***tert*-Butil (1*S*,4*S*)-4-Azido-1-benzil-2-ossi-5-fenilpentil-carbammato (169)**

Una soluzione di trimetilsililazide ($TMSiN_3$) (1.8 ml, 13.7 mmol) e acido acetico (0.85 ml, 13.7 mmol) in diclorometano (50 ml) viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon per 20 minuti. Si aggiunge quindi (5*S*)-1,6-difenil-5-(*tert*butossicarbonilammino)-2-esen-4-one **168** (1.0 g, 2.7 mmol) e L-prolina metilestere (70 mg, 0.54 mmol) in diclorometano (25 ml), seguendo l'andamento della reazione mediante TLC (etere di petrolio/etere dietilico 1:1). A conversione completa, il solvente

viene eliminato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etere dietilico 1:1. Eliminato il solvente, il diastereoisomero maggioritario viene isolato mediante cristallizzazione da etere diisopropilico, recuperando 780 mg (70%) di un solido bianco.

P.f. = 84-85 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = -41 (c=0.2, CH_3OH); **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$) 1.35 [s, 9H, $C(C\underline{H}_3)_3$]; 2.43 (dd, 1H, C<u>H</u>H, J=4, 17 Hz); 2.60 (dd, 1 H, CH<u>H</u>, J=8, 17 Hz); 2.75 (d, 2H, CH_2, J=6 Hz); 2.98 (m, 2H, CH_2); 4.07 (m, 1H, CHN_3); 4.46 (q, 1H, C<u>H</u>NH, J=7 Hz); 5.10 (d, 1H, NH, J=7Hz); 7.08-7.31 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.3 [$C(CH_3)_3$]; 37.5 (CH_2); 40.7 (CH_2); 44.5 (CH_2); 59.1 (CHN_3); 60.6 (CHNH); 80.2 [<u>C</u>$(CH_3)_3$]; 127.1-129.41 (C Ar); 136.07 (C_1 Ar); 137.0 (C_1 Ar); 155.3 (CO); 206.95 (CO). **ESI-MS** (*m/z*): 409 $[MH]^+$, 353 $[MH-C4H8]^+$

Procedura generale per la riduzione degli enoni

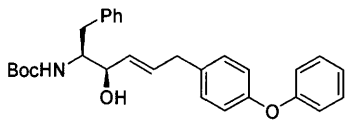
A) Litio boroidruro (10 mmol) viene aggiunto, sotto agitazione, ad una soluzione di enone (10 mmol) in metanolo (100 mL) raffreddata a 0 °C. La reazione viene seguita mediante cromatografia su strato sottile (dietil etere/etere di petrolio 1:1), una volta giunta a completezza la miscela viene neutralizzata con acido acetico glaciale ed il solvente rimosso mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene distribuito tra acetato d'etile ed una soluzione satura di $NaHCO_3$, la fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (2x70 mL) e le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato mediante ricristallizzazione da di-*iso*-propil etere oppure per cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela etere etilico/etere di petrolio.

B) Litio tri-*tert*-butossialluminioidruro (8.1 mmol) viene sospeso in etanolo assoluto (30 mL) precedentemente raffreddato a –78 °C sotto atmosfera di argon. Una soluzione di enone (2.7 mmol) in etanolo assoluto (40 mL) viene aggiunta alla sospensione in modo che la temperatura non superi i –60 °C. Al termine della reazione, la miscela viene addizionata con una soluzione acquosa di acido citrico al 10% (16 mL), diluita con acqua (50 mL) ed estratta con acetato d'etile (3x50 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate ripetutamente con una soluzione acquosa satura di NaCl, seccate su $NaSO_4$ anidro ed il solvente allontanato mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice,

utilizzando come eluente una miscela 8:2 di etere etilico ed etere di petrolio o diclorometano/etil acetato 6:4.

C) Sodio boroidruro (10 mmol) viene aggiunto, sotto agitazione, ad una soluzione di enone (10 mmol) in metanolo (100 mL) raffreddata a 0 °C. La reazione viene seguita mediante cromatografia su strato sottile (dietil etere/etere di petrolio 1:1), una volta giunta a completezza la miscela viene neutralizzata con acido acetico glaciale ed il solvente rimosso mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene distribuito tra acetato d'etile ed una soluzione satura di $NaHCO_3$, la fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (2x70 mL) e le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato mediante ricristallizzazione da di-*iso*-propil etere oppure per cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela etere etilico/etere di petrolio.

D) Ad una soluzione di enone (2.1 mmol) in 30 mL di MeOH distillato, raffreddata a –78 °C e in atmosfera di Argon, viene aggiunta L-Selectride 1.0 M in THF (6.3 mmol). Dopo 3 h, si acidifica a pH 5 con HCl 1N ed il solvente viene eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene ripartito tra etil acetato ed una soluzione satura di $NaHCO_3$ e la fase acquosa ripetutamente estratta con etil acetato (3x30 mL). Le fasi organiche riunite vengono quindi lavate con una soluzione satura di NaCl, anidrificate su Na_2SO_4 anidro, il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, usando come eluente una miscela etere di petrolio/etil acetato (gradiente 8/2 – 1/1).

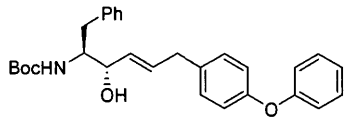


(4*R*,5*S*)-6-fenil-1-(4-fenossi)fenil-4-idrossi-5-(*tert*-butossicarbonilamino)-2-esene (216c)

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 755 mg (79%) di un solido bianco, a partire da enone **215c** (950 mg, 2.08 mmoli) e LTBAH (1.58 g, 6.2 mmol).

P.f. = 94-96 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = -21 (c=0.52, CH_3OH); **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.35 (s, 9H, t-Bu); [2.75 (m, 1H) e 2.85 (dd, 1H, J=5.3, 13.6 Hz) CH_2Ph]; 3.00 (m, 1H, OH); 3.38 (d, 2H, $C\underline{H}_2$-CH=; J=6.4); 3.96 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.20 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.60 (d, 1H, NH; J=6.6Hz); 5.60 (dd, 1H, =<u>C</u>H-CH; J=6.0, 15.3Hz); 5.90 (dt, 1H, =<u>C</u>H-CH_2;

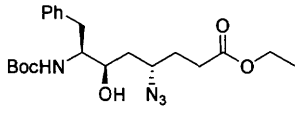
J=6.4, 15.3Hz); 6.85-7.40 (m, 14H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.2 [($\underline{C}H_3)_3C$]; 36.1 (CH_2Ph); 38.0 ($\underline{C}H_2$-CH=); 56.6 (CHNH); 74.3 (CHOH); 79.7 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 118.5 (Ar); 119.1 (Ar); 123.0 (Ar); 126.4 (Ar); 128.4 (Ar); 129.2 (Ar); 129.6 (Ar); 129.7 (Ar); 130.0 (=$\underline{C}$H-CH); 132.5 (CH_2-$\underline{C}$H=); 134.8 (Ar); 137.9 (Ar); 155.4 (CONH); 156.3 (Ar-O); 157.5 (Ar-O). **ES-MS** (m/z): 460 $[MH]^+$; 404 $[MH\text{-isobutene}]^+$; 386 $[MH\text{-}H_2O\text{-isobutene}]^+$



(4*S*,5*S*)-6-fenil-1-(4-fenossi)fenil-4-idrossi-5-(*tert*-butossicarbonilamino)-2-esene (217c)

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 800 mg (60%) di un solido bianco, a partire da enone **215c** (1.32 g, 2.9 mmoli) e L-Selectride 1.0 M in THF (8.7 mL, 8.7 mmol).

P.f. = 78-80°C. $[\alpha]_D^{25}$ = -36 (c=0.52, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.38 (s, 9H, t-Bu); 2.42 (m, 1H, OH); 3.32 (d, 2H, $C\underline{H}_2$-CH=; J=6.6); 3.79 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 4.09 (m, 1H, C$\underline{H}$OH); 4.86 (d, 1H, NH, J=8.8Hz); 5.58 (dd, 1H, =C$\underline{H}$-CH; J=6.0, 15.4Hz); 5.81 (dt, 1H, =C$\underline{H}$-CH_2; J= 6.6, 15.4 Hz); 6.9-7.3 (m, 14H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.3 [($\underline{C}H_3)_3C$]; 37.9 ($C\underline{H}_2$-CH=); 38.0 (CH_2-Ph); 56.2 (CHNH); 79.3 (CHOH); 79.4 [$(CH_3)_3C$]; 118.5 (Ar); 119.0 (Ar); 122.9 (Ar); 126.3 (Ar); 128.4 (Ar); 129.3 (Ar); 129.6 (Ar); 129.7 (Ar); 130.8 (Ar); 131.4 (=$\underline{C}$H-CH); 131.6 (=$\underline{C}$H-CH_2); 138.2 (Ar); 155.4 (CONH); 156.1 (Ar-O); 157.4 (Ar-O). **ES-MS** (m/z): 460 $[MH]^+$; 404 $[MH\text{-isobutene}]^+$; 386 $[MH\text{-}H_2O\text{-isobutene}]^+$

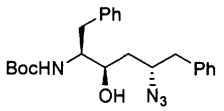


***tert*-butil (2*S*,3*R*,5*S*)-7-(etossicarbonil)-5-azido-3-idrossi-1-fenileptan-2-il carbammato (165)**

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 349 mg (87%) di solido bianco, partendo da *tert*-butil (2*S*,5*S*)-7-(etossicarbonil)-5-azido-3-osso-1-fenileptan-2-il carbammato **164** (401 mg, 0.96 mmol) e LTBAH (487 mg, 1.91 mmol mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -4.7 (c=0.3, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.16 (t, 3H, CH_3, J=7.3 Hz); 1.30 [s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$)]; 1.61-1.73 (m, 2H, CH_2); 2.27-2.38 (m, 4H, CH_2 x2); 2.72 (m, 1H,

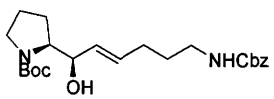
C<u>H</u>H); 2.94 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$Ph); 3.56 (brs, 1H, OH); 3.75 (m, 3H, C<u>H</u>N$_3$, C<u>H</u>NH, C<u>H</u>OH); 4.08 (q, 2H, CH$_2$O, J=6.9 Hz); 4.83 (d, 1H, N<u>H</u>, J=7.3 Hz); 7.15 -7.21 (m, 5H, C<u>H</u> Ar). **^{13}C-NMR** (δ-CDCl$_3$): 14.21 (CH$_3$); 28.41 [(<u>C</u>H$_3$)$_3$C]; 29.32 (<u>C</u>H$_2$); 30.65 (CH$_2$); 37.51 (CH$_2$Ph); 56.74 (CHN$_3$); 59.97 (CHNH); 60.7 (CH$_2$O); 71.36 (CHOH); 78.76 [(CH$_3$)$_3$<u>C</u>]; 126.45-129.30 (C Ar); 138.0 (C$_1$ Ar); 156.29 (CONH); 173.1 (<u>C</u>O)



***tert*-butil (2*S*,3*R*,5*S*)-5-azido-3-idrossi-1,6-difenil-esan-2-il carbammato (170)**

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 9435 mg (62%) di solido bianco, partendo da *tert*-Butil (1*S*,4*S*)-4-Azido-1-benzil-2-ossi-5-fenilpentil-carbammato **169** (700 mg, 1.71 mmol) e LTBAH (870 mg, 3.42 mmol).

[α]$_D^{25}$ = -5 (c=0.2, CH$_3$OH); **^{1}H-NMR** (δ-CDCl$_3$): 1.35 [s, 9H, C(C<u>H</u>$_3$)$_3$]; 1.58 (m, 2H, CH$_2$); 2.28-2.86 (m, 4H, CH$_2$ x2); 3.56 (brs, 1H, OH); 3.87-3.89 (m, 3H, C<u>H</u>NH, C<u>H</u>OH, CHN$_3$); 4.58 (d, 1H, CHNH, J=7 Hz); 7.20-7.32 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-CDCl$_3$): 28.34 [C(CH$_3$)$_3$]; 36.40 (CH$_2$); 37.53 (CH$_2$); 41.7 (CH$_2$); 57.18 (CHN$_3$); 60.97 (CHNH); 70.87 (CHOH); 80.0 [<u>C</u>(CH$_3$)$_3$]; 126.66-129.43 (C Ar); 137.12 (C$_1$ Ar); 138.38 (C$_1$ Ar); 156.7 (CO)

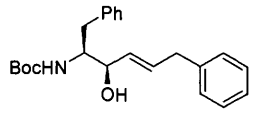


(2*S*)-Acido-2-[(1*R*)-6-Benzilossicarbonilammino-1-idrossi-es-2-enil]-pirrolidin-1-carbossilico *tert*-butil estere (148)

Si ottengono, secondo la metodologia generale A, 1.1 g (51%) di un olio incolore, a partire da (2*S*)-Acido-(6-benzilossicarbonilammino-es-2-enoil)-pirrolidin-1-carbossilico *tert*-butil estere **147** (2.16 g, 5.18 mmol) e LiBH$_4$ (5.18 mmol).

[α]$_D^{25}$ = -43.8 (c=0.5, CH$_3$OH). **^{1}H-NMR** (δ-CDCl$_3$ coppia di rotameri): 1.43 (s, 9H, (C<u>H</u>$_3$)$_3$C)); 1.57-1.85 (m, 5H, C<u>H</u>$_2$, HC<u>H</u>, C<u>H</u>$_2$); 1.99-2.04 (m, 3H, <u>H</u>CH, C<u>H</u>$_2$); 3.13 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$N); 3.16 (brs, 1H, CHO<u>H</u>); 3.41 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 3.76-3.87 (bs, 1H, C<u>H</u>N); 5.04 (m, 3H, CH$_2$ Cbz e NH); 5.39 (dd, 1H, C<u>H</u>=CH, J$_1$=5.8 Hz, J$_2$=15.7 Hz); 5.62 (m, 1H, C<u>H</u>=CH). **^{13}C-NMR** (δ-CDCl$_3$ coppia di rotameri): 23.95 (<u>C</u>H$_2$); 25.40 (<u>C</u>H$_2$); [28.29 e 28.47 ((<u>C</u>H$_3$)$_3$C)]; 29.35 (<u>C</u>H$_2$); 29.45-29.54 (<u>C</u>H$_2$); [40.59 e 41.06 (<u>C</u>H$_2$NHCbz)]; [47.54 e 48.18 (<u>C</u>H$_2$N)]; 62.71 (<u>C</u>HN); 66.56 (CH$_2$ Cbz); 75.61 (CHOH); [80.41 e 80.52 ((CH$_3$)$_3$<u>C</u>)]; 127.87-131.25 (C Ar e <u>C</u>H=CH); 132.42

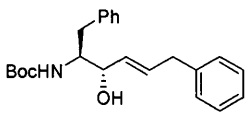
(CH=CH); 156.49 (CO); 157.91 (CO). **ESI-MS** (m/z):): 419.2 $[MH]^+$; 441.1 $[MNa]^+$; 457.2 $[MK]^+$



(4*R*,5*S*)-1,6-difenil-4-idrossi-5-(*tert*-butossicarbonilammino)-2-esene (216b)

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 800 mg (80%) di un solido bianco, a partire da enone **168** (1.0 g, 2.74 mmol) e LTBAH (2.10 g, 8.22 mmol).

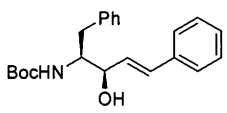
P.f. = 104-106 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -26.2 (c=1.0, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.36 (s, 9H, ^{t}Bu); [2.74 (m, 1H) e 2.84 (dd, 1H, J=5.5, 14.3 Hz) CH_2Ph]; [3.39 (dd, 1H, J=6.8, 21.4 Hz) e 3.45 (dd, 1H, J=6.8, 21.4 Hz, CH_2Ph]; 3.95 (m, 1H, CHNH); 4.20 (m, 1H, CHOH); 4.56 (brs, 1H, NH); 5.60 (dd, 1H, =CH-CHOH, J=6.2, 15.4 Hz); 5.91 (dt, 1H, =CH-CH_2, J=6.8, 15.4 Hz); 7.14-7.35 (m, 10H, Ar); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.09 [C(CH_3)$_3$]; 36.23 (CH_2); 38.8 (CH_2); 56.7 (CHNH); 79.81 [C(CH_3)$_3$]; 126.27 (Ar); 126.9 (Ar); 128.0 (=CH-CO); 128.4 (Ar); 128.7 (Ar); 128.8 (Ar); 129.5 (Ar); 138.1 (Ar C1); 140.03 (=CH-CH_2); 156.4 (CONH); **ES-MS** (m/z): 368 $[MH]^+$; 390 $[MNa]^+$; 312 $[MH\text{-isobutene}]^+$; 268 $[MH\text{-Boc}]^+$.



(4*S*,5*S*)-1,6-difenil-4-idrossi-5-(*tert*-butossicarbonilammino)-2-esene (217b)

Si ottengono, secondo la metodologia generale D, 1.0 g (77%) di un solido bianco, a partire da enone **168** (1.29 g, 3.53 mmol) e L-Selectride 1.0 M in THF (10.3 mL, 10.6 mmol).

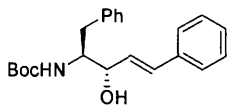
P.f. = 99-100 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = -59.9 (c=0.39, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.29 (s, 9H, ^{t}Bu); [2.89 (m, 1H) e 2.93 (dd, 1H, J=5.5, 14.3 Hz) CH_2Ph]; [3.35 (dd, 1H, J=6.8, 21.4 Hz) e 3.37 (dd, 1H, J=6.8, 21.4 Hz, CH_2Ph]; 3.83 (m, 1H, CHNH); 4.10 (m, 1H, CHOH); 4.95 (d, 1H, NH, J=8.8 Hz); 5.61 (dd, 1H, =CH-CHOH, J=5.8, 15.4 Hz); 5.83 (dt, 1H, =CH-CH_2, J=6.8, 15.4 Hz); 7.14-7.35 (m, 10H, Ar); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.28 [C(CH_3)$_3$]; 38.15 (CH_2); 38.8 (CH_2); 56.40 (CHNH); 79.48 [C(CH_3)$_3$]; 126.22 (Ar); 126.42 (Ar); 128.54 (=CH-CO); 128.65 (Ar); 129.47 (Ar); 131.64 (Ar); 138.50 (Ar C_1); 140.02 (=CH-CH_2); 156.21 (CONH).



(3*R*,4*S*)-1,5-difenil-3-idrossi-4-(*tert*-butossicarbonilammino)-1-pentene (216a)

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 1.1 g (96%) di un solido bianco, a partire da enone **215a** (1.14 g, 3.25 mmol) e LTBAH (2.5 g, 9.75 mmol).

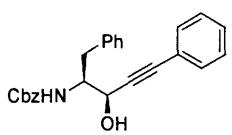
P.f. = 116-117 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = +17.1 (c=0.39, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.36 (s, 9H, ^{t}Bu); [2.74 (m, 1H) e 2.95 (dd, 1H, J=5.5, 14.3 Hz) CH_2Ph]; 3.57 (brs, 1H, OH); 4.08 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.40 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.80 (d, 1H, NH, J=7.3 Hz); 6.28 (dd, 1H, =C<u>H</u>-CHOH, J=6.2, 15.7 Hz); 6.70 (d, 1H, =C<u>H</u>-CH_2, J=16.1 Hz); 7.21-7.40 (m, 10H, Ar x2); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.38 [C(<u>C</u>H_3)$_3$]; 36.29 (CH_2); 56.8 (CHNH); 74.70 (CHOH); 79.89 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 126.51 (Ar); 126.9 (Ar); 128.0 (=<u>C</u>H-CO); 128.4 (Ar); 128.7 (Ar); 128.8 (=<u>C</u>H-CH_2); 129.5 (Ar); 138.0 (Ar C_1); 138.1 (Ar C_1); 156.5 (CONH); **ES-MS** (m/z): 354 $[MH]^+$; 376 $[MNa]^+$; 392 $[MK]^+$.



(3*S*,4*S*)-1,5-difenil-3-idrossi-4-(*tert*-butossicarbonilammino)-1-pentene (217a)

Si ottengono, secondo la metodologia generale D, 1.1 g (72%) di un solido bianco, a partire da enone **215a** (1.52 g, 4.33 mmol) e L-Selectride (13 mL, 13 mmol).

P.f. = 114-117 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = -43.0 (c=0.33, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.36 (s, 9H, ^{t}Bu); [2.80 (m, 1H) e 3.00 (dd, 1H, J=5.5, 14.3 Hz) CH_2Ph]; 3.17 (brs, 1H, OH); 3.93 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.28 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.04 (d, 1H, NH, J=8.4 Hz); 6.24 (dd, 1H, =C<u>H</u>-CHOH, J=5.8, 16.1 Hz); 6.60 (d, 1H, =C<u>H</u>-CH_2, J=15.7 Hz); 7.21-7.32 (m, 10H, Ar x2); **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.40 [C(<u>C</u>H_3)$_3$]; 38.02 (CH_2); 56.48 (CHNH); 72.50 (CHOH); 79.60 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 126.46 (Ar); 126.9 (Ar); 128.0 (=<u>C</u>H-CO); 128.4 (Ar); 128.7 (Ar); 128.8 (=<u>C</u>H-CH_2); 129.5 (Ar); 138.5 (Ar C_1); 138.1 (Ar C_1); 156.29 (CONH); **ES-MS** (m/z): 354 $[MH]^+$; 376 $[MNa]^+$; 392 $[MK]^+$.

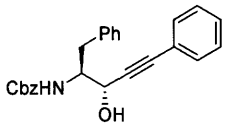


(3*R*,4*S*)-N-Cbz-4-amino-3-idrossi-1,5-difenil-1-pentino (224a)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale B, 1.6 g (79%) di un solido bianco, partendo da inone **223** (2.0 g, 5.2 mmol) e LTBAH (4.0 g, 16 mmol).

P.f. = 122-124 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = +15.40 (c=1.05, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 2.95 (dd, 2H, CH_2Ph, J=7 Hz); 3.04 (d, 2H, CH_2Ph, J=7 Hz); 3.22 (brs, 1H, OH); 4.28 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.68 (d, 1H, C<u>H</u>OH, J=3 Hz); 5.07 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.17 (d, 1H, NH, J=9 Hz); 7.26-7.47 (m, 15H, Ar x3). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 37.54 (CH_2); 57.39 (CHNH);

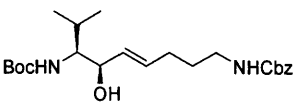
65.29 (CHOH); 67.18 (CH_2); 86.41 (C≡C-CO); 87.23 (C≡C-CO); 122.17 (C≡C-C_{Ar}); 126.87-129.30 (C Ar); 136.26 (Ar C1); 137.24 (Ar C1); 156.91 (CONH).



(3S,4S)-N-Cbz-4-amino-3-idrossi-1,5-difenil-1-pentino (224b)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale D, 1.3 g (66%) di un solido bianco, partendo da inone **223** (1.95 g, 5.09 mmol) e L-Selectride 1N in THF (15.3 mL, 15.2 mmol).

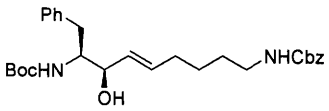
P.f. = 119-121 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = +3.59 (c=0.48, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 2.94 (dd, 2H, CH_2Ph, J=7 Hz); 3.13 (d, 2H, CH_2Ph, J=7 Hz); 3.55 (brs, 1H, OH); 4.22 (m, 1H, CHNH); 4.66 (d, 1H, CHOH, J=3 Hz); 5.09 (s, 2H, CH_2 Cbz); 5.41 (d, 1H, NH, J=8.8 Hz); 7.26-7.47 (m, 15H, Ar x3). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 37.03 (CH_2); 57.24 (CHNH); 64.04 (CHOH); 66.97 (CH_2); 86.29 (C≡C-CO); 87.81 (C≡C-CO); 122.42 (C≡C-C_{Ar}); 126.73-131.97 (C Ar); 136.50 (Ar C1); 137.74 (Ar C1); 156.80 (CONH).



(7*S*,6*R*)-Acido-(7-*tert*-butossicarbonilammino-6-idrossi-8-metil-non-4-enil)-carbammico benzil estere (52a)

Si ottengono, secondo la metodologia generale C, 506 mg (92%) di un solido bianco, partendo da enone **59a** (547 mg, 1.3 mmol) e $NaBH_4$ (49 mg, 1.3 mmol).

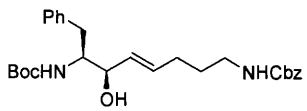
P.f. = 80-81 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -19.8 (c=0.57, CH_3OH). **IR** (film cm^{-1}): 3452 (OH), 3383 (NH), 1712 (C=O). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.93 (m, 6H, $(CH_3)_2CH$); 1.41 [s, 9H, $(CH_3)_3C$]; 1.58 (quint, 2H, CH_2, J=6.9 Hz); 1.74 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$); 2.09 (m, 2H, CH_2); 2.84 (bs, 1H, OH); 3.18 (m, 2H, CH_2NH); 3.48 (m, 1H, CHNH); 4.13 (m, 1H, CHOH); 4.80 (bs, 2H, NHCO x2); 5.08 (s, 2H, CH_2Ph); 5.44 (dd, 1H, CH=CH, J_1=6.6 Hz, J_2=15.4 Hz); 5.65 (m, 1H, CH=CH); 7.34 (m, 5H, CH Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.56 (CH_3); 20.14 (CH_3); 28.33 [$CH(CH_3)_3$]; 28.84 ($CH(CH_3)_2$); 29.08 (CH_2); 29.19 (CH_2); 39.97 (CH_2NH_2); 60.82 (CHNH); 66.58 (CH_2Ph); 73.44 (CHOH); 79.43 [$(CH_3)_3C$], 126.30-128.46 (C Ar); 129.77 (CH=CH); 132.07 (CH=CH); 136.54 (C Ar); 156.34 (CONH); 157.36 (CONH). **ES-MS** (m/z): 459 $[MK]^+$, 443 $[MNa]^+$, 421 $[MH]^+$.



(8*S*,7*R*)-acido-carbammico-(8-*tert*-butossicarbonilammino-7-idrossi-9-fenil-non-5-enil)-benzil estere (78)

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 4.70 g di solido bianco (96%), partendo da enone **77** (5 g, 10.4 mmol) e LTBAH (6.62 g, 26 mmol).

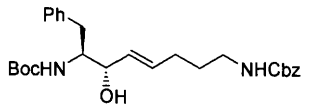
P.f.=76-78 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -24.3 (c=0.41, CH_3OH). **IR** (film liquido, cm^{-1}): 3348 (NH), 1688, (C=O), 1620 (C=C). ^{1}**H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.26-1.51 (m, 13H, $(CH_3)_3C$ e CH_2 2x); 2.09 (m, 2H, CH_2); 2.80 (m, 2H, CH_2Ph-β); 3.16 (m, 2H, $C\underline{H}_2NH$); 3.94 (bs, 1H, $C\underline{H}NH$); 4.13 (bs, 1H, CHOH); 4.78 (bs, 1H, NH); 4.86 (bs, 1H, NH); 5.07 (s, 2H, CH_2Ph); 5.53 (dd, 1H, $C\underline{H}$=CH, J=15.16, J=6.2); 5.67 (m, 1H, CH=$C\underline{H}$); 7.19-7.33 (m, 10H, Ar x2). ^{13}**C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.2 [$(\underline{C}H_3)_3C$]; 29.18 (CH_2); 31.69 (CH_2); 36.12 (CH_2Ph); 40.72 (CH_2NH); 56.58 (CHNH); 66.57 (CH_2Ph); 76.31 (CHOH); 79.54 [$\underline{C}(CH_3)_3$]; 126.31-129.23 (C Ar); 133.20 (C Ar); 136.57 ($\underline{C}$H=CH); 138.07 (CH=$\underline{C}$H); 156.35 (CO); 156.43 (CO). **ES-MS** (m/z): 521.2 $[MK]^+$, 505.2 $[MNa]^+$, 483.2 $[MH]^+$.



(7*S*,6*R*)-Acido-7-*tert*-butossicarbonilammino-6-idrossi-8-fenil-oct-4-enil)-carbammico benzil estere (52b)

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 1.52 g (94%) di un solido bianco, partendo da enone **59b** (1.62 g, 3.48 mmol) e LTBAH (2.65 g, 10.2 mmol).

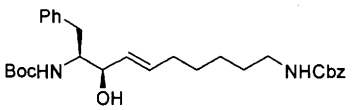
P.f. = 113-114 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -20.23 (c=0.44, CH_3OH). **IR** (film cm^{-1}): 3451 (OH), 3341 (NH), 1713 (C=O). ^{1}**H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.35 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.60 (m, 2H, CH_2); 2.12 (m, 2H, CH_2); 2.79 (m, 2H, CH_2Ph β); 3.12 (bs, 1H, OH); 3.22 (m, 2H, $C\underline{H}_2NH$); 3.79 (bs, 1H, $C\underline{H}NH$); 4.12 (bs, 1H, $C\underline{H}OH$); 4.78 e 4.93 (bs, 2H, 2x $N\underline{H}CO$); 5.10 (s, 2H, CH_2Ph); 5.51 (dd, 1H, $C\underline{H}CH$, J_1=15.4 Hz, J_2=6.6 Hz); 5.67 (m, 1H, $C\underline{H}CH$); 7.34 (m, 10H, Ar x2). ^{13}**C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.39 [$C(\underline{C}H_3)_3$]; 29.07 (CH_2); 29.17 (CH_2); 36.46 ($\underline{C}H_2CHNH$); 40.13 (CH_2NH_2); 56.81 (CHNH); 66.75 (CH_2Ph); 74.72 (CHOH); 79.69 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.37-129.38 (C Ar); 129.98 ($\underline{C}$H=CH); 132.35 (CH=$\underline{C}$H); 136.66 (C_1 Ar); 138.16 (C_1 Ar); 156.53 (CONH); 156.60 (CONH). **ES-MS** (m/z): 507 $[MK]^+$, 491 $[MNa]^+$, 469 $[MH]^+$.



(7*S*,6*S*)-Acido-7-*tert*-butossicarbonilammino-6-idrossi-8-fenil-oct-4-enil)-carbammico benzil estere (71)

Si ottengono 610 mg (61%) di un solido bianco, secondo la metodologia generale D, partendo da enone **59b** (1.0 g, 2.14 mmol) e L-Selectride 1.0 M in THF (6.4 mL, 6.42 mmol).

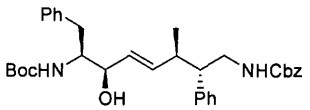
P.f.= 87-89 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -36.8 (c=0.5, CH_3OH). **IR** (film cm^{-1}): 3452 (OH), 3341 (NH), 1713 (C=O). ^{1}**H-NMR** (δ-CD_3CN 50 °C): 1.32 [s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$]; 1.56 (quint, 2H, CH_2, J=6.9 Hz); 2.05 (q, 2H, $C\underline{H}_2$, J=6.9 Hz); 2.67 (dd, 1H, CH_2Ph, J_1=9.2 Hz, J_2=13.7 Hz); 2.89 (dd, 1H, CH_2Ph, J_1=5.8 Hz, J_2=13.7 Hz); 3.12 (q, 2H, $C\underline{H}_2NH$, J=6.6 Hz); 3.70 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.01 (s, 1H, C<u>H</u>OH); 5.06 (bs, 3H, $C\underline{H}_2Ph$ + N<u>H</u>CO); 5.39 (s, 1H, N<u>H</u>CO); 5.49 (dd, 1H, C<u>H</u>=CH, J_1=6.2 Hz, J_2=15.4 Hz); 5.63 (m, 1H, C<u>H</u>=CH); 7.34 (m, 10H, Ar x2). ^{13}**C-NMR** (δ-CD_3CN 50 °C): 27.95 [$CH(\underline{C}H_3)_3$]; 29.04 ($CH_2\underline{C}H_2CH_2$); 29.19 ($CH\underline{C}H_2CH_2$); 37.41 (CH_2Ph); 40.16 (CH_2NH_2); 56.75 (CHNH); 65.97 (CH_2Ph); 72.70 (CHOH); 78.54 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.08-128.47 (C Ar); 131.14 (<u>C</u>H=CH); 131.48 (CH=<u>C</u>H); 137.50 (C_1 Ar); 139.36 (C_1 Ar); 155.96 (CONH); 156.50 (CONH). **ES-MS** (m/z): 507 $[MK]^+$, 491 $[MNa]^+$, 469 $[MH]^+$.



(9*S*,8*R*)-acido-carbammico-(9-*tert*-butossicarbonilammino-8-idrossi-10-fenil-dec-6-enil)-benzil estere (85)

Si ottengono, secondo la metodologia generale B, 840 mg (89%) di un solido bianco, partendo da enone **84** (940 mg, 1.9 mmol) e LTBAH (1.45 g, 5.7 mmol).

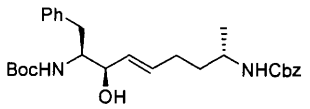
P.f. = 69-70 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -6.44 (c=0.47, CH_3OH). ^{1}**H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.26-1.49 (m, 15H, $(CH_3)_3C$ e CH_2 3x); 2.04 (m, 2H, CH_2); 2.72 (m, 1H, CH_2Ph-β); 2.84 (m, 1H, CH_2Ph-β); 3.16 (m, 2H, $C\underline{H}_2NH$); 3.92 (brs, 1H, C<u>H</u>NH); 4.12 (bs, 1H, C<u>H</u>OH); 4.74 (bs, 1H, NH); 4.89 (bs, 1H, NH); 5.11 (s, 2H, CH_2Ph); 5.48 (dd, 1H, C<u>H</u>=CH, J=15.3, J=6.6); 5.68 (m, 1H, CH=C<u>H</u>); 7.19-7.34 (m, 10H, Ar x2). ^{13}**C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 26.2 (CH_2); 28.3 [$(\underline{C}H_3)_3C$]; 28.66 (CH_2); 29.78 (CH_2); 32.23 (CH_2); 36.12 (CH_2Ph); 41.08 (CH_2NH); 56.70 (CHNH); 66.66 (CH_2Ph); 74.46 (CHOH); 79.52 [$\underline{C}(CH_3)_3$]; 126.41-129.36 (C Ar); 132.4 (CH=<u>C</u>H); 136.72 (C_1 Ar); 138.2 (C_1 Ar); 156.52 (CONH); 156.60 (CONH).



Acido (2*S*,3*R*,6*R*,7*S*)-7-tert-butossicarbonilammino-6-idrossi-3-metil-2,8-difenil-oct-4-enil)-carbammico benzil estere (110)

Si ottengono, secondo la metodologia generale C, 178 mg (59%) di un solido bianco, partendo da enone **109** (300 mg, 0.54 mmol) e $NaBH_4$ (20 mg, 0.54 mmol).

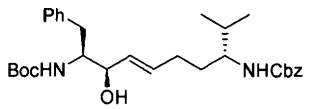
$[\alpha]_D^{25}$ = -7.21 (c=0.3, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.18 (m, 3H, CH_3); 1.32 (s, 9H, $(CH_3)C$); 2.49 (m, 1H, CH); 2.96-3.12 (m, 4H, CHPh, CH_2Ph e OH); 3.35-3.52 (m, 2H, CH_2); 4.09 (m, 1H, CHOH); 4.71 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.11 (s, 2H, CH_2Ph); 5.55 (dd, 1H, J=15.3 Hz, 6.4 Hz); 5.71 (m, 1H, C<u>H</u>=CH); 7.09-7.39 (m, 15H, Ar x3).). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.2 (CH_3); 28.39 [C(<u>C</u>H_3)]; 38.46 (CH_2); 39.40 (CH); 44.39 (CH_2); 49.0 (CH); 57.0 (CHNH); 66.6 (CH_2Ph); 74.4 (CHOH); 79.6 [<u>C</u>$(CH_3)_3$]; 127.3-129.8 (C Ar e CH=C); 136.1 (C_1 Ar); 139.3 (C_1 Ar); 156.2 (CONH); 156.56 (CONH)



Acido (1*S*,2*R*,7*S*)-(1-benzil-7-benzilossicarbonilammino-2-idrossi-oct-3-enil)-carbammico *tert*-butil estere (97a)

Si ottengono, secondo la metodologia generale C, 252 mg (65%) di un solido bianco, partendo da enone **96a** (387 mg, 0.84 mmol) e $NaBH_4$ (30 g, 0.84 mmol).

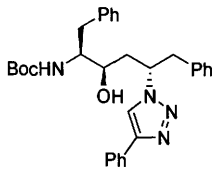
$[\alpha]_D^{25}$ = -16.2 (c=0.44, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.10 (d, 3H, CH_3, J=6.2 Hz); 1.33 (m, 10H, $(C\underline{H}_3)_3C$ e C<u>H</u>H); 1.56 (m, 1H, CH<u>H</u>); 2.11 (m, 2H, CH_2); 2.84 (m, 2H, CH_2Ph); 3.69 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.04 (m, 2H, C<u>H</u>OH e C<u>H</u>NH); 4.62 (bs, 1H, NHCO); 5.11 (m, 3H, CH_2Ph e NH); 5.43 (dd, 1H, C<u>H</u>CH, J_1=15.4 Hz, J_2=6.6 Hz); 5.59 (m, 1H, C<u>H</u>CH); 7.19-7.37 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 21.49 (CH_3); 28.42 [C(<u>C</u>$H_3)_3$]; 29.02 (CH_2); 32.90 (CH_2); 36.57 (CH_2); 46.25 (CHNH); 56.80 (CHNH); 66.59 (CH_2Ph); 75.45 (CHOH); 79.51 [$(CH_3)_3$<u>C</u>]; 126.35-129.37 (C Ar); 130.65 (<u>C</u>H=CH); 132.62 (CH=<u>C</u>H); 136.64 (C_1 Ar); 138.3 (C_1 Ar); 155.99 (CONH); 156.19 (CONH).



Acido (1*S*,6*R*,7*S*)-(7-*tert*-butossicarbonilammino-6-idrossi-1-isopropil-8-fenil-oct-4-enil)-carbammico benzil estere (97b)

Si ottengono, secondo la metodologia generale C, 255 mg (67%) di un solido bianco, partendo da enone **96b** (380 mg, 0.75 mmol) e $NaBH_4$ (28 g, 0.75 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -15.7 (c=0.45, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.87 (d, 3H, CH_3, J=6.59 Hz); 0.87 (d, 3H, CH_3, J=6.59 Hz); 1.32 (m, 10H, $(C\underline{H}_3)_3C$ e C<u>H</u>H); 1.57 (m, 1H, CH<u>H</u>); 1.68 (m, 1H, $CH(CH_3)_3$); 2.10 (m, 2H, CH_2); 2.79 (d, 2H, CH_2Ph β, J=6.59); 3.33 (brs, 1H, OH); 3.61 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 3.79 (bs, 1H, C<u>H</u>NH); 4.08 (m, 2H, C<u>H</u>OH e C<u>H</u>NH); 4.63 (bs, 1H, NHCO); 5.13 (s, 2H, CH_2Ph); 5.44 (dd, 1H, C<u>H</u>CH, J_1=15.4 Hz, J_2=6.6 Hz); 5.59 (m, 2H, C<u>H</u>CH e NH); 7.19-7.37 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.71 (CH_3); 19.50 (CH_3); 28.42 [$C(\underline{C}H_3)_3$]; 29.23 (CH_2); 31.63 ($\underline{C}H(CH_3)_2$); 32.89 (CH_2); 37.02 (CH_2); 54.99 (CHNH); 57.0 (CHNH); 66.89 (CH_2Ph); 75.47 (CHOH); 79.48 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.35-129.37 (C Ar); 130.66 (<u>C</u>H=CH); 132.63 (CH=<u>C</u>H); 136.65 (C_1 Ar); 138.4 (C_1 Ar); 156.66 (CONH); 157.34 (CONH).



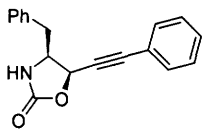
***tert*-butil (2*S*,3*R*,5*S*)-3-idrossi-1,6-difenil-5-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-esan-2-il-carbammato (167)**

tert-butil (2*S*,3*R*,5*S*)-5-azido-3-idrossi-1,6-difenil-esan-2-il carbammato **170** (100 mg, 0.24 mmol) viene sciolto in *t*BuOH ed addizionato di fenilacetilene (27 μL, 0.24 mmol) e di una soluzione acquosa 300 μM di $CuSO_4$ (200 μL) in presenza di trucioli di Cu. Il sistema viene lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 48 h, addizionato di poche gocce di ammoniaca concentrata, diluito con diclorometano, lavato con H_2O, con una soluzione acquosa satura di NaCl, seccato su Na_2SO_4 anidro ed il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Per cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela tere di petrolio/acetato di etile (gradiente 6/4-3/7), si recuperano 87 mg (61%) di un solido giallino.

$[\alpha]_D^{25}$ = -8.4 (c=0.2, CH_3OH); **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.34 [s, 9H, $C(C\underline{H}_3)_3$]; 2.05 (m, 1H, C<u>H</u>H); 2.44 (m, 1H, CH<u>H</u>); 2.69 (m, 2H, CH_2Ph); 3.21 (m, 2H, CHO e C<u>H</u>HPh); 3.38 (m, 1H, CH<u>H</u>Ph); 3.75 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.20 (brs, 1H, OH); 4.63 (d, 1H, NH, J=6.9 Hz); 4.97 (m, 1H, CHN); 6.96-7.72 (m, 16H, Ar x3 e C=C<u>H</u>). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.32 [$C(CH_3)_3$]; 36.68 (CH_2); 38.09 (CH_2); 42.52 (CH_2); 57.81 (CHNH); 60.71 (CHN); 80.35 [$\underline{C}(CH_3)_3$]; 121.12-130.67 (C Ar); 137.08 (C_1 Ar); 137.47 (C_1 Ar); 146.76 (C Ar); 157.24 (CO)

Procedura generale per la sintesi di ossazolidinoni

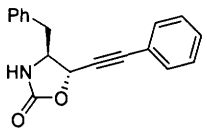
NaH (60% sospensione in olio minerale) (2.6 mmol) viene aggiunto ad una soluzione di alcol (1.3 mmol) in THF anidro (3 mL/mmol). La miscela viene agitata a temperatura ambiente e sotto atmosfera di argon per 16 ore, addizionata con una soluzione acquosa di NH_4Cl al 10% (3 mL) ed agitata per ulteriori 15 minuti. La fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (3x5 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. L'evaporazione del solvente a pressione ridotta fornisce un prodotto che viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etil acetato 1:1 (o CH_2Cl_2/CH_3OH 9:1 dove diversamente specificato).



(4*S*,5*R*)- 4-benzil-5-feniletinil-ossazolidin-2-one (225a)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale, 560 mg (95%) di un olio incolore, partendo da alcol **224a** (820 mg, 2.13 mmol) e NaH 60% in olio minerale (170 mg, 4.26 mmol).

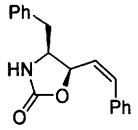
$[\alpha]_D^{25}$ = +5.56 (c=0.5, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 3.0 (dd, 2H, CH_2Ph, J=7 Hz); 3.21 (d, 2H, CH_2Ph, J=7 Hz); 4.18 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.50 (d, 1H, CHO, J=5.7 Hz); 6.21 (brs, 1H, NH); 7.26-7.44 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 38.44 (CH_2); 56.82 (CHNH); 70.97 (CHO); 81.82 (<u>C</u>≡C-CO); 90.77 (C≡<u>C</u>-CO); 121.52 (C≡C-$\underline{C}_{Ar}$); 127.23-129.47 (C Ar); 132.0 (Ar C1); 136.68 (Ar C_1); 158.27 (CONH).



(4*S*,5*S*)-4-benzil-5-feniletinil-ossazolidin-2-one (225b)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale, 294 mg (96%) di un olio giallino, partendo da alcol **224b** (422 mg, 1.1 mmol) e NaH al 60% in olio minerale (90 mg, 2.2 mmol).

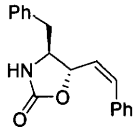
$[\alpha]_D^{25}$ = -139.6 (c=0.96, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 2.96 (d, 2H, CH_2Ph, J=7.3 Hz); 4.19 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.09 (d, 1H, CHO, J=5.8 Hz); 6.66 (brs, 1H, NH); 7.23-7.38 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 40.59 (CH_2); 60.86 (CHNH); 71.05 (CHO); 83.99 (<u>C</u>≡C-CO); 88.21 (C≡<u>C</u>-CO); 121.48 (C≡C-$\underline{C}_{Ar}$); 127.41-129.41 (C Ar); 131.98 (Ar C_1); 135.48 (Ar C_1); 158.42 (CONH).



(4*S*,5*R*)-4-benzil-5-(*Z*)-feniletinil-ossazolidin-2-one (226a)

Una miscela di ossazolidinone **225a** (666 mg, 2.4 mmol), Pd-$BaSO_4$ (4 mg), chinolina distillata (4 mg) in metanolo viene lasciata in agitazione in atmosfera di H_2 a temperatura ambiente per 1 h. Il catalizzatore viene quindi eliminato mediante filtrazione su celite, il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etil acetato 4:1. Si ottengono 530 mg (79%) di un solido giallino.

$[\alpha]_D^{25}$ = -12.91 (c=0.45, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 2.76 (dd, 2H, CH_2Ph, J=7 Hz); 2.89 (d, 2H, CH_2Ph, J=7 Hz); 4.08 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.52 (m, 2H, CHO e CHN<u>H</u>); 5.93 (dd, 1H, C<u>H</u>=CH-Ph, J=9.5, 11 Hz); 6.91 (d, 1H, CH=C<u>H</u>-Ph, J=11.6 Hz); 7.14-7.38 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 37.57 (CH_2); 57.62 (CHNH); 75.98 (CHO); 124.25 (C=C-$\underline{C}_{Ar}$); 127.21-129.13 (C Ar e C=C-Ar); 135.44 (C=C-Ar); 136.28 (Ar C1); 136.88 (Ar C1); 158.60 (CONH).



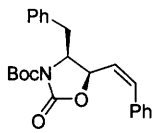
(4*S*,5*S*)-4-benzil-5-(*Z*)-feniletinil-ossazolidin-2-one (226b)

Una miscela di ossazolidinone **225b** (843 mg, 3 mmol), Pd-$BaSO_4$ (5 mg), chinolina distillata (5 mg) in metanolo viene lasciata in agitazione in atmosfera di H_2 a temperatura ambiente per 1 h. Il catalizzatore viene quindi eliminato mediante filtrazione su celite, il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etil acetato 4:1. Si ottengono 728 mg (87%) di un solido giallino.

P.f.: 97-99 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -173.3 (c=1.06, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 2.76 (d, 2H, CH_2Ph, J=5.5 Hz); 3.81 (q, 1H, C<u>H</u>NH, J=6.6, 6 Hz); 5.03 (dd, 1H, CHO, J=5.8, 9.9 Hz); 5.70 (t, 1H, C<u>H</u>=CH-Ph, J=11 Hz); 6.31 (brs, 1H, NH); 6.77 (d, 1H, CH=C<u>H</u>-Ph, J=11.3 Hz); 7.06-7.30 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 40.31 (CH_2); 60.47 (CHNH); 77.57 (CHO); 126.84 (C=C-$\underline{C}_{Ar}$); 128.05-129.26 (C Ar e C=C-Ar); 135.38 (C=C-Ar); 135.82 (Ar C_1); 136.63 (Ar C_1); 159.10 (CONH)

Procedura generale per la protezione degli ossazolidinoni

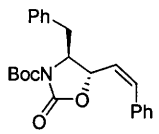
Sodio idruro 60% sospensione in olio minerale (5.06 mmol) viene aggiunto ad una soluzione di ossazolidinone (4.6 mmol) in THF anidro (50 mL). Si agita per 2 ore a temperatura ambiente e si aggiunge di-*tert*-butil-dicarbonato (5.5 mmol). La reazione viene seguita mediante cromatografia su strato sottile (dietil etere) ed una volta giunta a completezza si aggiunge un volume di una soluzione acquosa di acido citrico al 10% (w/v). Si estrae con acetato d'etile (2x50 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di $NaHCO_3$, una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto utilizzato senza ulteriori purificazioni.



(4*S*,5*R*)-N-Boc-4-benzil-5-(*Z*)-feniletinilossazolidin-2-one (227a)

Si ottengono, seguendo la metodologia generale, 333 mg (99%) di un olio giallino, partendo da ossazolidinone **226a** (246 mg, 0.88 mmol), NaH al 60% in olio minerale (39 mg, 0.97 mmol) e Boc_2O (231 mg, 1.06 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -32.1 (c=0.51, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.35 (s, 9H, $[C(CH_3)_3]$); 3.06 (d, 2H, CH_2Ph, J=6.9 Hz); 4.58 (q, 1H, CHO, J=6.6, 13.5 Hz); 5.27 (dd, 1H, CHN, J=1.1, 7.3 Hz); 5.83 (dd, 1H, C<u>H</u>=CH-Ph, J=6.6, 13.5 Hz); 6.77 (d, 1H, CH=C<u>H</u>-Ph, J=11.7 Hz); 6.97-7.27 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 27.88 $[C(CH_3)_3]$; 35.67 (CH_2); 59.99 (CHN); 74.35 (CHO); 83.85 $[C(CH_3)_3]$; 123.05 (C=C-$\underline{C}_{Ar}$); 126.96-129.57 (C Ar e C=C-Ar); 135.20 (C=C-Ar); 136.43 (Ar C_1); 137.35 (Ar C_1); 149.05 (CO); 151.51 (CO)



(4*S*,5*S*)-N-Boc-4-benzil-5-(*Z*)-feniletinilossazolidin-2-one (227b)

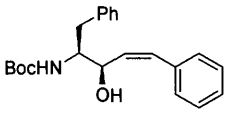
Si ottengono, seguendo la metodologia generale, 160 mg (99%) di un olio giallino, partendo da ossazolidinone **226b** (119 mg, 0.42 mmol), NaH al 60% in olio minerale (19 mg, 0.47 mmol) e Boc_2O (111 mg, 0.51 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -62.4 (c=0.56, $CHCl_3$). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.59 (s, 9H, $[C(CH_3)_3]$); 2.82 (dd, 1H, C<u>H</u>HPh, J=9, 14 Hz); 3.19 (dd, 1H, C<u>H</u>HPh, J=4, 14 Hz); 4.24 (dt, 1H, CHO, J=3, 9 Hz); 5.02 (dd, 1H, CHN, J=3, 10 Hz); 5.65 (dd, 1H, C<u>H</u>=CH-Ph, J=10, 11 Hz); 6.72

(d, 1H, CH=C<u>H</u>-Ph, J=11 Hz); 6.86-7.34 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.5 [$C(CH_3)_3$]; 35.56 (CH_2); 59.87 (CHN); 73.4 (CHO); 83.65 [$C(CH_3)_3$]; 122.95 (C=C-$\underline{C}_{Ar}$); 126.78-129.64 (C Ar e C=C-Ar); 135.15 (C=C-Ar); 136.58 (Ar C_1); 137.22 (Ar C_1); 152.05 (CO); 152.9 (CO)

Procedura generale per l'idrolisi degli ossazolidinoni

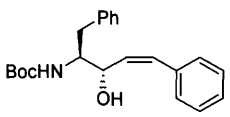
L'ossazolidinone N-Boc protetto (4.6 mmol) viene sciolto in una miscela metanolo/acqua 4:1 (20 mL) ed addizionato di K_2CO_3 (8.7 mmol). La miscela viene agitata per 16 h a temperatura ambiente e neutralizzata con acido acetico glaciale; si concentra la soluzione ad 1/5 del suo volume e si estrae con etil acetato (2x25 mL). Le fasi organiche riunite vengono di seguito lavate con una soluzione acquosa satura di $NaHCO_3$, con una soluzione acquosa satura di NaCl e quindi seccate su Na_2SO_4. Eliminato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etil acetato 1:1.



(2*S*,3*R*)-N-Boc-2-amino-3-idrossi-1,5-difenil-4-(*Z*)-pentene (228a)

Si procede seguendo la procedura generale, partendo da 334 mg (0.88 mmoli) di ossazolidinone **227a** e 243 mg (1.76 mmoli) di K_2CO_3; dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono 249 mg (80%) di un solido bianco.

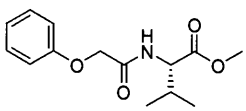
$[\alpha]_D^{25}$ = -91.7 (c=0.39, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.37 (s, 9H, [$C(CH_3)_3$]); 2.73-2.86 (m, 2H, CH_2Ph); 3.44 (brs, 1H, OH); 4.02 (m, 1H, CHO); 4.61-4.67 (m, 2H, C<u>H</u>NH e NH); 5.83 (dd, 1H, C<u>H</u>=CH-Ph, J=2.2, 9.5 Hz); 6.71 (d, 1H, CH=C<u>H</u>-Ph, J=11.7 Hz); 7.08-7.34 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.35 [$C(\underline{C}H_3)_3$]; 36.51 (CH_2); 57.13 (CHNH); 70.09 (CHO); 79.98 [$\underline{C}(CH_3)_3$]; 126.42 (C=C-$\underline{C}_{Ar}$); 127.50-130.11 (C Ar e C=C-Ar); 133.38 (C=C-Ar); 136.43 (Ar C_1); 137.88 (Ar C_1); 156.73 (CONH). **ESI-MS (m/z):** 354.2 $[MH]^+$; 376.1 $[MNa]^+$, 392.1 $[MK]^+$



(2*S*,3*S*)-N-Boc-2-amino-3-idrossi-1,5-difenil-4-(*Z*)-pentene (228b)

Si procede seguendo la procedura generale, partendo da 160 mg (0.4 mmoli) di (4*S*,5*S*)-N-Boc-4-benzil-5-(*Z*)-feniletinilossazolidin-2-one **227b** e 116 mg (0.85 mmoli) di K_2CO_3; dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono 120 mg (81%) di un solido bianco.

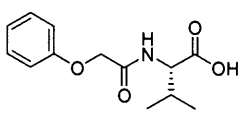
P.f.: 118-119 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -162.3 (c=0.5, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.39 (s, 9H, [$C(CH_3)_3$]); 2.33 (brs, 1H, OH); 2.88 (m, 2H, CH_2Ph); 3.89 (m, 1H, CHO); 4.55 (dd, 1H, C<u>H</u>NH, J=1.8, 6.2 Hz); 5.01 (d, 1H, NH, J=9.1 Hz); 5.77 (dd, 1H, C<u>H</u>=CH-Ph, J=9.8, 11 Hz); 6.55 (d, 1H, CH=C<u>H</u>-Ph, J=11.7 Hz); 7.01-7.26 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.35 [C(<u>C</u>H_3)$_3$]; 36.51 (CH_2); 57.13 (CHNH); 70.09 (CHO); 79.98 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 126.42 (C=C-<u>C</u>$_{Ar}$); 127.50-130.11 (C Ar e C=C-Ar); 133.38 (C=C-Ar); 136.43 (Ar C_1); 137.88 (Ar C_1); 156.73 (CONH).



(*S*)-N-fenossiacetilvalina metilestere (229)

Si ottengono 2.03 g (89%) di un olio giallo, seguendo la procedura generale per la sintesi dei peptidi, a partire da 1.314 g (8.64 mmol) di acido fenossiacetico, 1.133 g (8.64 mmol) di L-Valina metilestere cloridrato **174**, 1.167 g (8.64 mmol) di HOBT, 2.42 mL (0.017 mol) di NMM e 1.99 g (0.01 mol) di EDC.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.85 (d, 3H, CH_3; J=7.0Hz); 0.89 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 2.17 (m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$); 3.69 (s, 3H, OCH_3); 4.51 (m, 2H, CH_2O); 4.57 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 6.88 (d, 2H, Ar orto; J=8.6Hz); 6.95 (t, 1H, Ar para; J=7.3); 7.08 (d, 1H, NH; J=9.0Hz); 7.22 (m, 2H, Ar meta). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.7 (CH_3); 18.9 (CH_3); 31.3 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 52.2 (OCH_3); 56.7 (CHNH); 67.3 (CH_2O); 114.8 (Ar orto); 122.2 (Ar para); 129.8 (Ar meta); 157.2 (Ar-O); 168.2 (CO); 171.9 (CO)

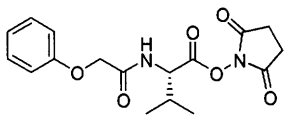


(*S*)-N-fenossiacetilvalina (230)

2.03 g (7.65 mmol) di (S)-N-fenossiacetilvalina metilestere **229** vengono sciolti in una miscela THF/LiOH 0.5 N 1:1; la soluzione viene agitata fino a completezza (TLC: CH_2Cl_2/CH_3OH, 9:1) quindi acidificata a pH 4 con HCl 10%. La fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (3x50 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su $NaSO_4$. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta ed il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia flash su gel di

silice utilizzando CH_2Cl_2/CH_3OH, 9:1 come miscela eluente. Si recuperano 1.52 g (79%) di un solido bianco.

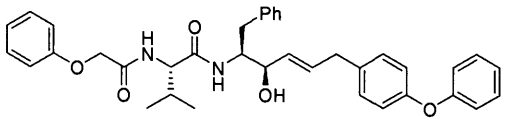
P.f. = 128-130 °C. **IR** (nujol, cm^{-1}): 3372 e 3345 (NH); 1712 (C=O acido); 1625 (C=O ammide); 1562, 1459 (Ar). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.85 (d, 3H, CH_3; J=7.0Hz); 0.92 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 2.26 (m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$); 4.57 (m, 2H, CH_2O); 4.63 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 6.88 (d, 2H, Ar orto; J=8.6Hz); 6.95 (t, 1H, Ar para; J=7.3); 7.08 (d, 1H, NH; J=9.0Hz); 7.30 (m, 2H, Ar meta); 11.18 (s, 1H, COOH). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.5 (CH_3); 18.9 (CH_3); 31.0 [<u>C</u>H$(CH_3)_2$]; 56.7 (CHNH); 67.1 (CH_2O); 114.8 (Ar orto); 122.2 (Ar para); 129.7 (Ar meta); 157.0 (Ar-O); 169.1 (CO); 175.0 (CO).



(*S*)-N-fenossiacetilvalina N-idrossisuccinimidoilestere (231)

Ad una soluzione di 1.5 g (5.97 mmoli) di (*S*)-N-fenossiacetilvalina **230** e 0.69 g (5.97 mmoli) di N-idrossisuccinimmide in circa 50 ml di diossano anidro si aggiungono, sotto agitazione 1.23g (5.97 mmoli) di dicicloesilcarbodiimmide. La miscela viene agitata per 2 ore a temperatura ambiente, quindi si filtra il precipitato e si elimina il solvente mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene purificato sciogliendolo in acetato di etile e filtrando il residuo insolubile. Il solvente viene eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Si ottengono 1.75 g (84%) di un olio incolore molto viscoso.

IR (nujol cm^{-1}): 3450 e 3350 (NH);1810 (C=O estere); 1770 e 1730 (immide); 1680 (C=O ammide); 1600 e 1580 (Ar). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.02 (d, 3H, CH_3; J=5.9Hz); 1.04 (d, 3H, CH_3; J=5.7Hz); 2.38 (m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$); 2.84 (m, 4H, C<u>H</u>$_2$-C<u>H</u>$_2$); 4.57 (s, 2H, OCH_2); 5.00 (dd, 1H, C<u>H</u>-NH; J=4.9, 9.0); 6.95 (d, 2H, Ar orto; J=7.9Hz); 7.04 (m, 2H, Ar para + NH); 7.3 (m, 2H, Ar meta). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.3 (CH_3); 18.7 (CH_3); 25.6 (<u>C</u>H_2-<u>C</u>H_2); 31.6 [<u>C</u>H$(CH_3)_2$]; 54.9 (CHNH); 67.2 (CH_2O); 114.8 (Ar orto); 122.3 (Ar para); 129.8 (Ar meta); 157.0 (Ar-O); 167.2 (CO); 168.2 (CO); 168.5 (CO)

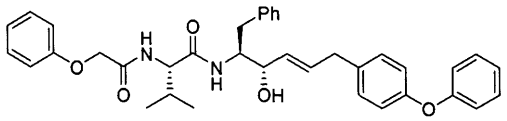


(4*R*,5*S*,2'*S*)-6-fenil-5-[N-(N-fenossiacetilvalil)amino]-1-(4-fenossifenil)-4-idrossi-2-esene (233c)

Alcol **216c** (430 mg, 0.94 mmoli) viene sciolto in 2 mL di diclorometano; si aggiunge poi 1 mL di acido trifluoroacetico. Dopo 10 minuti si evapora il solvente mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene ripartito tra 10 mL di diclorometano ed una soluzione satura di bicarbonato di sodio, viene lavato con una soluzione satura di NaCl e seccato su Na_2SO_4. La soluzione dell'alcool deprotetto viene poi trattata con (*S*)-N-fenossiacetilvalina N-idrossisuccinimidoilestere **231** (330 mg, 0.94 mmoli) e trietilammina (130 μL, 0.94 mmoli). Dopo 12 ore la miscela viene lavata con una soluzione di acido cloridrico diluito, con una soluzione satura di bicarbonato di sodio e infine con una soluzione acquosa satura di NaCl; viene poi seccata su Na_2SO_4 anidro e il solvente viene eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1, ottenendo 300 mg (55%) di un solido bianco.

P.f.=155-158°C. $[\alpha]_D^{25}$ = -19 (c=0.35, MeOH). **IR**: (nujol, cm^{-1}): 3250 (NH e OH); 1660 (C=O); 1640 (C=C); 1580 (Ar); 1380 (CH_3). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.75 (d, 3H, CH_3; J=6.8 Hz); 0.86 (d, 3H, CH_3; J=6.8 Hz); 2.08 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; [2.71 (dd, 1H, J=9.5 e 14.2 Hz) e 2.92 (dd, 1H, J=5.1 e 14.2 Hz) C<u>H</u>$_2$Ph]; 3.38 (d, 2H, C<u>H</u>$_2$-CH=; J=6.6 Hz); 4.15-4.33 (m, 3H, C<u>H</u>NH, C<u>H</u>NH e C<u>H</u>OH); 4.34-4.50 (m, 2H, CH_2O); 5.61 (dd, 1H, =C<u>H</u>-CH; J=6.0, 15.2 Hz); 5.94 (dt, 1H, =C<u>H</u>-CH_2; J=7.0, 15.2 Hz); 6.50 (d, 1H, NH; J=8.6 Hz); 6.80-7.40 (m, 20H, Ar e NH). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.8 (CH_3); 19.3 (CH_3); 30.2 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 35.2 (CH_2); 38.0 (CH_2); 55.3 (CHNH); 58.3 (CHNH); 66.9 (CH_2O); 74.1 (CHOH); 114.6 (Ar); 118.5 (Ar); 118.9 (Ar); 119.1 (Ar); 122.2 (Ar); 123.0 (Ar); 126.4 (Ar); 128.3 (Ar); 129.1 (Ar); 129.3 (CH=); 129.6 (Ar); 129.7 (Ar); 129.8 (Ar); 132.6 (CH=); 134.7 (Ar C_1); 137.6 (Ar C_1); 155.4 (Ar C-O); 156.9 (Ar C-O); 157.4 (Ar C-O); 168.5 (CO); 170.8 (CO)

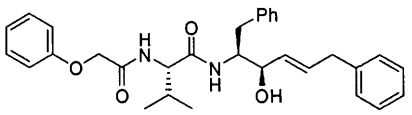
ESI-MS (m/z): 593 $[MH]^+$; 575 $[MH-H_2O]^+$; 610 $[M+NH_4]^+$



(4*S*,5*S*,2'*S*)-6-fenil-5-[N-(N-fenossiacetilvalil)amino]-1-(4-fenossifenil)-4-idrossi-2-esene (234c)

Si procede come nel caso precedente, partendo da alcol **217c** (300 mg, 0.65 mmoli), (*S*)-N-fenossiacetilvalina N-idrossisuccinimidoilestere **231** (216 mg, 0.65 mmoli) e trietilammina (91 μL, 0.65 mmoli). Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1, ottenendo 150 mg (39 %) di un solido bianco.

P.f. = 125-128 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = - 42 (c=0.32, MeOH). **IR**: (nujol, cm^{-1}): 3250 (NH e OH); 1670 (C=O); 1640 (C=C). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.79 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 0.88 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 2.07 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; 2.7-3.1 (m, 3H, CH_2Ph e OH); 3.30 (d, 2H, C<u>H</u>$_2$-CH=; J=6.4 Hz); 4.10-4.30 (m, 3H, C<u>H</u>NH, C<u>H</u>NH, C<u>H</u>OH); [4.43 (d, 1H; J=15.0 Hz) e 4.50 (d, 1H; J=15.0 Hz) CH_2O]; 5.53 (dd, 1H, =C<u>H</u>-CH; J=5.7, 15.2 Hz); 5.85 (dt, 1H, =C<u>H</u>-CH_2; J=6.4, 15.2 Hz); 6.63 (d, 1H, NH; J=9.0 Hz); 6.80-7.40 (m, 20H, Ar e NH). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.0 (CH_3); 19.3 (CH_3); 30.5 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 37.9 (CH_2); 38.0 (CH_2); 54.9 (CHNH); 58.6 (CHNH); 67.0 (CH_2O); 71.8 (CHOH); 114.7 (Ar); 118.6 (Ar); 119.0 (Ar); 122.2 (Ar); 123.0 (Ar); 126.4 (Ar); 128.4 (Ar); 129.3 (Ar); 129.5 (Ar); 129.6 (Ar); 129.8 (CH=); 131.3 (Ar); 131.7 (CH=); 134.5 (Ar C_1); 137.8 (Ar C_1); 155.4 (Ar C-O); 156.9 (Ar C-O); 157.0 (Ar C-O); 168.5 (CO); 170.3 (CO). **ESI-MS** (m/z): 593 $[MH]^+$; 615 $[M+Na]^+$

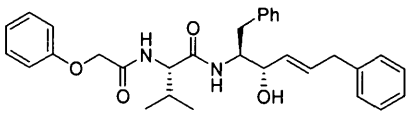


(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-[(2*S*,3*R*,4*E*)-3-idrossi-1,6-difenil-es-4-en-2-il]-3-metilbutanammide (233b)

Si procede come nel caso precedente partendo da alcol **216b** (300 mg, 0.81 mmoli), (*S*)-N-fenossiacetilvalina N-idrossisuccinimidoilestere **231** (282 mg, 0.81 mmoli) e trietilammina (114 μl, 0.81 mmoli). Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1, ottenendo 374 mg (93%) di un solido bianco.

$[\alpha]_D^{25}$ = - 20.5 (c=0.3, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.74 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 0.85 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 2.08 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; 2.7-3.12 (m, 3H, CH_2Ph +

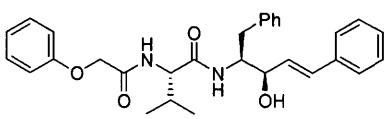
OH); 3.41 (d, 2H, C$\underline{H}_2$-CH=; J=6.2 Hz); 4.17-4.43 (m, 5H, C$\underline{H}$NH, C$\underline{H}$NH, C$\underline{H}$OH, CH_2O]; 5.60 (dd, 1H, =C$\underline{H}$-CH; J=5.7, 15.2 Hz); 5.95 (dt, 1H, =C$\underline{H}$-CH_2; J=6.4, 15.2 Hz); 6.33 (d, 1H, NH; J=8.8 Hz); 6.90-7.32 (m, 16H, Ar + NH). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.83 (CH_3); 19.36 (CH_3); 30.33 [$\underline{C}H(CH_3)_2$]; 35.49 (CH_2); 38.86 (CH_2); 55.48 (CHNH); 58.44 (CHNH); 67.09 (CH_2O); 74.29 (CHOH); 114.83 (Ar); 122.3 (Ar); 126.3- 129.19 (Ar); 129.92 (CH=); 130.1 (CH=); 137.73 (Ar C_1); 139.87 (Ar C_1); 157.09 (Ar C-O); 168.6 (CO); 170.97 (CO). **ESI-MS** (m/z): 501.2 $[MH]^+$, 523.2 $[M+Na]^+$, 539.1 $[M+K]^+$



(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-[(2*S*,3*S*,4*E*)-3-idrossi-1,6-difenil-es-4-en-2-il]-3-metilbutanammide (234b)

Si procede come nel caso precedente partendo da alcol **217b** (240 mg, 0.65 mmoli), (*S*)-N-fenossiacetilvalina N-idrossisuccinimidoilestere **231** (228 mg, 0.65 mmoli) e trietilammina (92 μl, 0.65 mmoli). Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1, ottenendo 317 mg (96%) di un solido bianco.

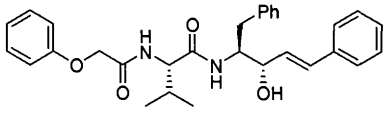
$[\alpha]_D^{25}$ = - 40 (c=0.3, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.77 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 0.87 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 2.05 [m, 1H, C$\underline{H}(CH_3)_2$]; 2.7-3.1 (m, 3H, CH_2Ph + OH); 3.31 (d, 2H, C$\underline{H}_2$-CH=; J=6.2 Hz); 4.18-4.22 (m, 3H, C$\underline{H}$NH, C$\underline{H}$NH, C$\underline{H}$OH); [4.47 (d, 1H; J=15.0 Hz) e 4.50 (d, 1H; J=15.0 Hz) CH_2O]; 5.53 (dd, 1H, =C$\underline{H}$-CH; J=5.7, 15.2 Hz); 5.85 (dt, 1H, =C$\underline{H}$-CH_2; J=6.4, 15.2 Hz); 6.59 (d, 1H, NH; J=8.8 Hz); 6.80-7.40 (m, 16H, Ar + NH). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.0 (CH_3); 19.4 (CH_3); 30.64 [$\underline{C}H(CH_3)_2$]; 38.07 (CH_2); 38.73 (CH_2); 54.99 (CHNH); 58.64 (CHNH); 67.14 (CH_2O); 71.88 (CHOH); 114.82 (Ar); 122.3 (Ar); 126.23- 129.39 (Ar); 129.88 (CH=); 131.7 (CH=); 138.02 (Ar C_1); 139.73 (Ar C_1); 157.14 (Ar C-O); 168.56 (CO); 170.42 (CO).



(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-[(2*S*,3*R*,4*E*)-3-idrossi-1,5-difenil-pent-4-en-2-il]-3-metilbutanammide (233a)

Si procede come nel caso precedente partendo da alcol **216a** (810 mg, 2.29 mmoli), (*S*)-N-fenossiacetilvalina N-idrossisuccinimidoilestere **231** (798 mg, 2.29 mmoli) e trietilammina (322 µl, 2.29 mmoli). Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1, ottenendo 800 mg (72%) di un solido bianco.

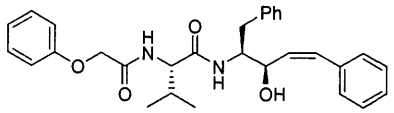
$[\alpha]_D^{25}$ = -18.9 (c=0.29, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.72 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 0.79 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 1.99 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; 2.83 (m, 1H, OH); 2.86-3.01 (m, 2H, CH_2Ph); 4.15-4.47 (m, 5H, CH_2O, C<u>H</u>OH, C<u>H</u>NH x2]; 6.17 (dd, 1H, =C<u>H</u>-CH; J=5.7, 15.2 Hz); 6.7 (d, 1H, =C<u>H</u>-CH_2; J=15.7 Hz); 6.77-7.44 (m, 17H, Ar e NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.01 (CH_3); 19.39 (CH_3); 30.62 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 37.97 (CH_2); 55.25 (CHNH); 58.81 (CHNH); 67.05 (CH_2O); 72.01 (CHOH); 114.79 (Ar); 122.29 (Ar); 126.54 (Ar); 128.51 (CH=); 127.87-129.71 (Ar); 129.85 (CH=); 136.53 (Ar C_1); 138.09 (Ar C_1); 157.09 (Ar C-O); 168.68 (CO); 170.6 (CO). **ESI-MS** (m/z): 487.3 $[MH]^+$, 509.3 $[M+Na]^+$, 525.3 $[M+K]^+$



(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-[(2*S*,3*S*,4*E*)-3-idrossi-1,5-difenil-pent-4-en-2-il]-3-metilbutanammide (234a)

Si procede come nel caso precedente partendo da alcol **217a** (780 mg, 2.2 mmoli), (*S*)-N-fenossiacetilvalina N-idrossisuccinimidoilestere **231** (766 mg, 2.2 mmoli) e trietilammina (310 µl, 2.2 mmoli). Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1, ottenendo 813 mg (76%) di un solido bianco.

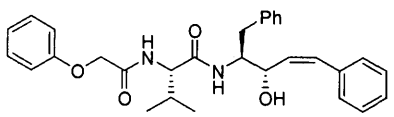
$[\alpha]_D^{25}$ = -45 (c=0.4, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.74 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 0.82 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz $_3$); 2.02 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; 2.86 (m, 1H, OH); 2.91-3.04 (m, 2H, CH_2Ph); 4.20-4.46 (m, 5H, CH_2O, C<u>H</u>OH, C<u>H</u>NH x2]; 6.2 (dd, 1H, =C<u>H</u>-CH; J=5.7, 15.2 Hz); 6.6 (d, 1H, =C<u>H</u>-CH_2; J=15.7 Hz); 6.80-7.37 (m, 17H, Ar e NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.05 (CH_3); 19.4 (CH_3); 30.72 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 37.97 (CH_2); 55.29 (CHNH); 58.63 (CHNH); 67.05 (CH_2O); 71.9 (CHOH); 114.8 (Ar); 122.17 (Ar); 126.52 (Ar); 128.2 (CH=); 128.49-129.47 (Ar); 129.84 (CH=); 136.57 (Ar C_1); 138.15 (Ar C_1); 157.1 (Ar C-O); 168.8 (CO); 170.63 (CO). **ESI-MS** (m/z): 501.2 $[MH]^+$, 523.2 $[M+Na]^+$, 539.1 $[M+K]^+$



(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-[(2*S*,3*R*,4*Z*)-3-idrossi-1,5-difenil-pent-4-en-2-il]-3-metilbutanammide (235a)

Si procede come nel caso precedente partendo da alcol **228a** (169 mg, 0.48 mmoli), (*S*)-N-fenossiacetilvalina N-idrossisuccinimidoilestere **231** (167 mg, 0.48 mmoli) e trietilammina (67 μl, 0.48 mmoli). Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1, ottenendo 173 mg (74%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.78 (d, 3H, CH_3, J=6.7 Hz); 0.84 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 2.11 [m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$]; 2.74-2.93 (m, 2H, CH_2Ph); 3.44 (brs, 1H, OH); 4.27-4.57 (m, 4H, CH_2O, C<u>H</u>NH, C<u>H</u>OH); 4.67 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.85 (dd, 1H, =C<u>H</u>-CH; J=5.7, 15.2Hz); 6.56 (d, 1H, =C<u>H</u>-CH_2; J=12 Hz); 6.87-7.29 (m, 17H, Ar x3 e NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.07 (CH_3); 19.49 (CH_3); 30.85 [<u>C</u>H$(CH_3)_2$]; 38.2 (CH_2); 55.58 (CHNH); 58.47 (CHNH); 67.1 (CH_2O); 72.04 (CHOH); 114.81 (Ar); 122.2-129.85 (Ar e CH=); 136.19 (Ar C_1); 137.89 (Ar C_1); 157.11 (Ar C-O); 168.76 (CO); 170.72 (CO). **ESI-MS** (m/z): 501.2 $[MH]^+$, 523.2 $[M+Na]^+$, 539.1 $[M+K]^+$



(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-[(2*S*,3*S*,4*Z*)-3-idrossi-1,5-difenil-pent-4-en-2-il]-3-metilbutanammide (235b)

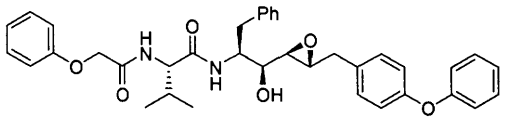
Si procede come nel caso precedente partendo da alcol **228b** (97 mg, 0.28 mmoli), (*S*)-N-fenossiacetilvalina N-idrossisuccinimidoilestere **231** (97.2 mg, 0.28 mmoli) e trietilammina (40 μl, 0.28 mmoli). Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1, ottenendo 106 mg (78%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.78 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 0.85 (d, 3H, CH_3, J=6.8 Hz); 2.13 [m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$]; 2.83-3.01 (m, 2H, CH_2Ph); 3.61 (brs, 1H, OH); 4.29-4.51 (m, 4H, CH_2O, C<u>H</u>NH, C<u>H</u>OH); 4.65 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.73 (dd, 1H, =C<u>H</u>-CH; J=5.7, 15.2Hz); 6.51 (dt, 1H, =C<u>H</u>-CH_2; J=6.4, 15.2Hz); 6.9-7.33 (m, 17H, Ar x3 e NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.08 (CH_3); 19.51 (CH_3); 30.87 [<u>C</u>H$(CH_3)_2$]; 38.19 (CH_2); 55.59 (CHNH); 58.5 (CHNH); 67.1 (CH_2O); 67.57 (CHOH); 114.83 (Ar); 122.3-

129.84 (Ar e CH=); 136.16 (Ar C_1); 137.92 (Ar C_1); 157.13 (Ar C-O); 168.77 (CO); 170.74 (CO).

Procedura generale per la sintesi degli epossialcoli

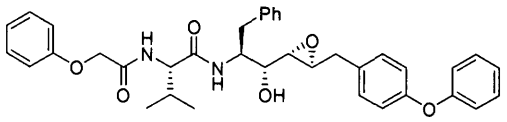
Una soluzione di acido *meta*-cloro-perbenzoico (*m*CPBA) (1.8 mmol) in diclorometano (10 mL) viene aggiunta ad una soluzione di alcol allilico (1.5 mmol) in diclorometano (10 mL), raffreddata a 0 °C. La miscela viene agitata a temperatura ambiente per 16 ore, diluita con due volumi di diclorometano, lavata con una soluzione acquosa di sodio metabisolfito al 10% (2x25 mL), una soluzione satura di $NaHCO_3$ (2x25 mL), una soluzione satura di NaCl e seccata su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela diclorometano/etile acetato (gradiente da 7:3 a 4:6).



(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,2'*S*)-2,3-epossi-6-fenil-5-[N-(N-fenossiacetilvalil)amino]-1-(4-benzilfenil)-4-idrossi-esano (236c)

Si procede seguendo la procedura generale, partendo da 100mg (0.17 mmoli) di **233c** e 58 mg (0.20 mmoli) di acido m-cloroperbenzoico al 60% in peso. Dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono circa 65 mg (65%) di un solido bianco.

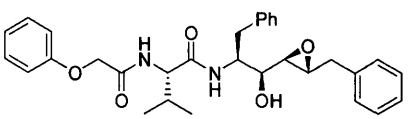
P.f. = 150-154 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -17 (c=0.37, CH_3OH). **IR**: (nujol cm^{-1}): 3450 e 3250 (NH e OH); 1640 (C=O). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.71 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 0.82 (d, 3H, CH_3; J=6.6Hz); 2.08 [m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$]; 2.60-3.00 (m, 6H, C<u>H</u>$_2$Ph, C<u>H</u>$_2$-CHO, OC<u>H</u>-CH, OH); 3.22 (m, 1H, OC<u>H</u>-CH_2); 3.70 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 3.94 (s, 2H, CH_2); 4.10 (m, 1H, C<u>H</u>NH Val); 4.25-4.45 (m, 3H, CH_2O e C<u>H</u>NH Phe); 6.42 (d, 1H, NH Phe; J=9.0Hz); 6.80-7.40 (m, 20H, Ar e NH Val). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.5 (CH_3); 19.3 (CH_3); 29.8 [<u>C</u>H$(CH_3)_2$]; 35.8 (CH_2); 37.4 (CH_2); 41.5 (CH_2); 54.1 (CHNH Phe); 55.7 (<u>C</u>HO-CH_2); 58.6 (<u>C</u>HO-CH); 58.7 (CH-NH Val); 66.9 (CH_2O); 70.5 (CHOH); 114.6 (Ar); 122.2 (Ar); 126.0 (Ar); 126.5 (Ar); 128.4 (Ar); 128.8 (Ar); 129.0 (Ar); 129.1 (Ar);129.7 (Ar); 129.8 (Ar); 130.0 (Ar); 134.5 (Ar C_4); 137.2 (Ar C_1); 139.6 (Ar C_1); 140.9 (Ar C_1); 156.9 (Ar C-O); 169.0 (CO); 170.3 (CO). **ES-MS** (m/z): 608 $[MH]^+$; 630 $[M+Na]^+$; 646 $[M+K]^+$



(2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,2'*S*)-2,3-epossi-6-fenil-5-[N-(N-fenossiacetilvalil)amino]-1-(4-benzilfenil)-4-idrossi-esano (237c)

Si procede come nel caso precedente partendo da 100mg di **234c** (0.17 mmoli) e 70 mg (0.24 mmoli) di acido m-cloroperbenzoico al 60% in peso. Dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono circa 70 mg (69%) di un solido bianco.

P.f. = 140-145 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -30 (c=0.37, CH_3OH). **IR**: (nujol cm^{-1}): 3450 e 3200 (NH e OH); 1640 (C=O); 1600 (Ar). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.79 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 0.87 (d, 3H, CH_3; J=6.6Hz); 2.14 [m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$]; 2.6-3.0 (m, 6H, CH_2Ph, C<u>H</u>$_2$-CHO, OC<u>H</u>-CH, OH); 3.49 (m, 1H, OC<u>H</u>-CH_2); 3.70 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 3.91 (s, 2H, CH_2); 4.25 (m, 1H, C<u>H</u>NH Val); 4.40-4.65 (m, 3H, CH_2O e C<u>H</u>NH Phe); 6.70 (m, 1H, NH Phe); 6.80-7.40 (m, 20H, Ar e NH Val). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.8 (CH_3); 19.3 (CH_3); 30.2 [<u>C</u>H$(CH_3)_2$]; 37.2 (CH_2); 37.7 (CH_2); 41.5 (CH_2); 53.6 (CHNH Phe); 56.1 (<u>C</u>HO-CH_2); 58.6 (<u>C</u>HO-CH); 59.4 (CHNH Val); 67.0 (CH_2O); 70.3 (CHOH); 114.8 (Ar); 122.2 (Ar); 126.0 (Ar); 126.5 (Ar); 128.4 (Ar); 128.7 (Ar); 128.8 (Ar); 129.1 (Ar); 129.2 (Ar); 129.3 (Ar); 129.8 (Ar); 134.4 (Ar C_1); 137.5 (Ar C_1); 139.5 (Ar C_1); 141.0 (Ar C_1); 157.0 (Ar C-O); 168.7 (CO); 170.6 (CO)

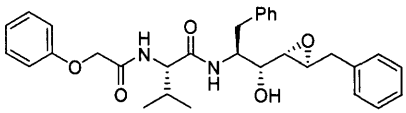


(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-{(1*S*,2*S*)-1-[(2*R*,3*R*)-3-benzilossiran-2-il]-1-idrossi-3-fenilpropan-2-il}-3-metilbutanammide (236b)

Si procede seguendo la procedura generale, partendo da 286 mg (0.57 mmoli) di alcol **233b** e 119 mg (0.68 mmoli) di acido m-cloroperbenzoico al 60% in peso. Dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono circa 156 mg (53%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.71 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 0.82 (d, 3H, CH_3; J=6.6Hz); 2.08 [m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$]; 2.76-2.98 (m, 6H, CH_2Ph, C<u>H</u>$_2$-CHO, OC<u>H</u>-CH, OH); 3.25 (m, 1H, OC<u>H</u>-CH_2); 3.67 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.15 (m, 2H, C<u>H</u>NH x2); 4.43 (m, 2H, CH_2O); 6.9-7.32 (m, 17H, Ar x3 e NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.67 (CH_3); 19.35 (CH_3); 30.09 [<u>C</u>H$(CH_3)_2$]; 35.83 (CH_2); 37.94 (CH_2); 54.21 (CHNH); 55.92

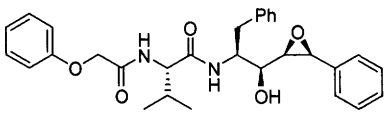
(CHO-CH_2); 58.78 (CHO-CH); 60.51 (CHNH); 67.10 (CH_2O); 71.13 (CHOH); 114.78 (Ar); 122.36-129.05 (Ar); 136.98 (Ar C_1); 137.52 (Ar C_1); 157.09 (Ar C-O); 169.20 (CO); 170.55 (CO)



(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-{(1*R*,2*S*)-1-[(2*S*,3*S*)-3-benzilossiran-2-il]-1-idrossi-3-fenilpropan-2-il}-3-metilbutanammide (237b)

Si procede seguendo la procedura generale, partendo da 247 mg (0.49 mmoli) di alcol **234b** e 102 mg (0.59 mmoli) di acido m-cloroperbenzoico al 60% in peso. Dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono circa 158 mg (62%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.81 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 0.89 (d, 3H, CH_3; J=6.6Hz); 2.12 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; 2.70-3.03 (m, 6H, CH_2Ph, C<u>H</u>$_2$-CHO, OC<u>H</u>-CH, OH); 3.51 (m, 1H, OC<u>H</u>-CH_2); 3.74 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.29 (m, 2H, C<u>H</u>NH x2); 4.45 (q, 2H, CH_2O, J=15.0, 16.5 Hz); 6.92-7.25 (m, 17H, Ar x3 e NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.03 (CH_3); 19.5 (CH_3); 30.59 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 37.77 (CH_2); 38.0 (CH_2); 53.66 (CHNH); 56.19 (<u>C</u>HO-CH_2); 58.63 (<u>C</u>HO-CH); 59.76 (CHNH); 67.14 (CH_2O); 70.72 (CHOH); 114.84 (Ar); 122.3-129.89 (Ar); 136.90 (Ar C_1); 137.74 (Ar C_1); 157.16 (Ar C-O); 168.8 (CO); 170.71 (CO)

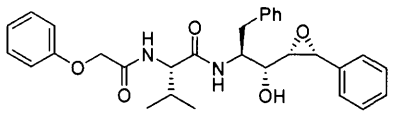


(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-{(1*S*,2*S*)-1-idrossi-3-fenil-1-[(2*R*,3*S*)-3-fenilossiran-2-il]-propan-2-il}-3-metilbutanammide (238a)

Si procede seguendo la procedura generale, partendo da 107 mg (0.2 mmoli) di alcol **235a** e 71 mg (0.25 mmoli) di acido m-cloroperbenzoico al 60% in peso. Dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono 64 mg (62%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.76 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 0.85 (d, 3H, CH_3; J=6.6Hz); 2.19 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; 2.6-2.64 (m, 2H, CH_2Ph); 3.09-3.11 (m, 1H, CHO); 3.24-3.27 (m, 1H, CHO); 3.79 (brs, 1H, OH); 4.05-4.07 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.14 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.39 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.54 (m, 2H, CH_2O); 6.79-7.26 (m, 17H, Ar x3 e NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.08 (CH_3); 19.47 (CH_3); 30.54 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 37.82 (CH_2); 51.61 (CHNH); 57.33 (<u>C</u>HO-CH_2); 58.49 (<u>C</u>HO-CH); 60.94 (CHNH); 67.1

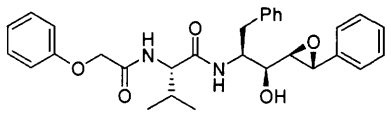
(CH_2O); 72.04 (CHOH); 114.81 (Ar); 122.25-129.98 (Ar); 136.32 (Ar C_1); 137.69 (Ar C_1); 157.11 (Ar C-O); 168.91 (C=O); 170.53 (C=O)



(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-{(1*R*,2*S*)-1-idrossi-3-fenil-1-[(2*S*,3*R*)-3-fenilossiran-2-il]-propan-2-il}-3-metilbutanammide (238b)

Si procede seguendo la procedura generale, partendo da 77 mg (0.16 mmoli) di alcol **235b** e 55 mg (0.19 mmoli) di acido m-cloroperbenzoico al 60% in peso. Dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono 47 mg (59%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.77 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 0.86 (d, 3H, CH_3; J=6.6Hz); 2.17 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; 2.59-2.65 (m, 2H, CH_2Ph); 3.11-3.13 (m, 1H, CHO); 3.26-3.27 (m, 1H, CHO); 3.83 (brs, 1H, OH); 4.06-4.07 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.14 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.35 (t, 1H, C<u>H</u>OH, J=8.4 Hz); 4.52 (m, 2H, CH_2O); 6.75 (d, 1H, NH, J=6.2 Hz); 6.81 (m, 1H, NH); 6.93-7.28 (m, 15H, Ar x3). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 18.01 (CH_3); 19.20 (CH_3); 30.57 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 37.85 (CH_2); 51.50 (CHNH); 57.35 (<u>C</u>HO-CH_2); 58.53 (<u>C</u>HO-CH); 60.97 (CHNH); 67.09 (CH_2O); 69.59 (CHOH); 114.83 (Ar); 122.3-129.94 (Ar); 136.32 (Ar C_1); 137.71 (Ar C_1); 157.08 (Ar C-O); 168.95 (C=O); 170.49 (C=O)

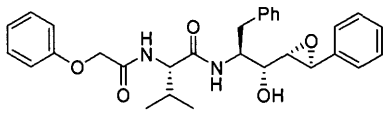


(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-{(1*S*,2*S*)-1-idrossi-3-fenil-1-[(2*R*,3*R*)-3-fenilossiran-2-il]-propan-2-il}-3-metilbutanammide (236a)

Si procede seguendo la procedura generale, partendo da 100 mg (0.2 mmoli) di alcol **233a** e 71 mg (0.25 mmoli) di acido m-cloroperbenzoico al 60% in peso. Dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono circa 55.4 mg (54%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.79 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 0.84 (d, 3H, CH_3; J=6.6Hz); 2.08 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; 2.93-3.0 (m, 3H, CH_2Ph, OH); 3.07 (m, 1H, OC<u>H</u>-CH); 3.5 (m, 1H, OCH); 3.75 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.24-4.41 (m, 4H, C<u>H</u>NH x2 e CH_2O); 6.80-7.4 (m, 17H, Ar x3 e NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.95 (CH_3); 19.28 (CH_3); 30.48 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 37.85 (CH_2); 54.20 (CHNH); 55.26 (<u>C</u>HO-CH_2); 58.67 (<u>C</u>HO-CH); 63.67 (CHNH); 67.15 (CH_2O); 69.79 (CHOH); 114.7 (Ar); 122.3 (Ar); 125.74 -

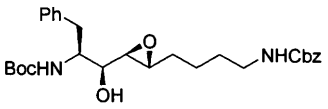
129.88 (Ar); 136.29 (Ar C_1); 137.62 (Ar C_1); 157.07 (Ar C-O); 168.84 (CO); 170.7 (CO)



(2*S*)-2-(2-fenossiacetammido)-N-{(1*R*,2*S*)-1-idrossi-3-fenil-1-[(2*S*,3*S*)-3-fenilossiran-2-il]-propan-2-il}-3-metilbutanammide (237a)

Si procede seguendo la procedura generale, partendo da 100 mg (0.2 mmoli) di alcol **234a** e 71 mg (0.25 mmoli) di acido m-cloroperbenzoico al 60% in peso. Dopo purificazione mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, si ottengono circa 47.2 mg (46%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.79 (d, 3H, CH_3; J=6.8Hz); 0.84 (d, 3H, CH_3; J=6.6Hz); 2.08 [m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$]; 2.93-3.0 (m, 3H, CH_2Ph, OH); 3.04 (m, 1H, OC<u>H</u>-CH); 3.5 (m, 1H, OCH); 3.71 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.26-4.49 (m, 4H, C<u>H</u>NH x2 e CH_2O); 6.80-7.26 (m, 17H, Ar x3 e NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.97 (CH_3); 19.28 (CH_3); 30.57 [<u>C</u>H(CH_3)$_2$]; 37.90 (CH_2); 54.19 (CHNH); 55.22 (<u>C</u>HO-CH_2); 58.66 (<u>C</u>HO-CH); 63.75 (CHNH); 67.0 (CH_2O); 69.81 (CHOH); 114.8 (Ar); 122.3 (Ar); 125.73 - 129.88 (Ar); 136.34 (Ar C_1); 137.67 (Ar C_1); 157.08 (Ar C-O); 168.83 (C=O); 170.7 (C=O)

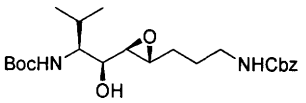


(1*S*,2*S*)-acido-{(2*R*,3*R*)-4-[3-(2-*tert*-butossicarbonilammino-1-idrossi-3-fenil-propil)-ossiranil-butil]}-carbammico-benzil-estere (79)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 2.10 g (51%) di solido bianco, partendo da alcol allilico **78** (4.00 g, 8.3 mmol) e acido meta-cloro-perbenzoico (mCPBA) (2.90 g, 9.95 mmol).

P.f. = 103-105 °C. **$[\alpha]_D^{25}$** = -8.7 (c=0.32, CH_3OH). **IR** (nujol, cm^{-1}): 3341 (NH), 1686, (C=O), 1620 (C=C). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.34 (m, 13H, ($C\underline{H}_3$)$_3$C e 2x$C\underline{H}_2$); 1.49 (m, 2H, $C\underline{H}_2$); 1.97 (d, 1H, CHO<u>H</u>, J=4.04Hz); 2.84 (m, 3H, C<u>H</u>O e $C\underline{H}_2$Ph-β); 2.96 (s, 1H, C<u>H</u>O); 3.16 (m, 2H, $C\underline{H}_2$NH); 3.53 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 3.98 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.81 (m, 1H, CHN<u>H</u>); 4.94 (m, 1H, CH_2N<u>H</u>); 5.06 (s, 2H, CH_2Ph); 7.20-7.33 (m, 10H, C Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 23.10 (CH_2); 28.38 [C(<u>C</u>H_3)]; 29.74 (CH_2); 31.04 (CH_2); 36.27 (CH_2Ph); 40.88 (CH_2NH); 55.03 (CHO); 56.06 (CHO); 59.14 (CHNH); 66.74 (CH_2Ph);

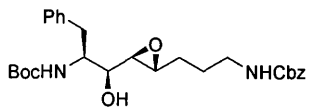
71.97 (CHOH); 79.62 [$\underline{C}(CH_3)_3$]; 126.54-128.57 (C Ar); 136.68 (C Ar); 137.78 (C Ar); 155.76 (CO); 156.54 (CO). **ES-MS** (m/z): 521.2 $[MNa]^+$, 499.2 $[MH]^+$.



(1*S*,2*S*)-Acido-1-{[(2*R*,3*R*)-3-(3-benzilossicarbonilammino-propil)-ossiranil]-idrossi-metil}-2-metill-propil)-carbammico *tert*-butil estere (53a)

Si ottengono 131 mg (53%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **52a** (240 mg, 0.57 mmol) e acido *meta*-cloroperbenzoico (200 mg, 0.68 mmol).

P.f.= 90-91 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = +9.6 (c=0.25, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.87 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.7 Hz); 0.94 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 1.41 (s, 11H, $(C\underline{H}_3)_3C$ e $C\underline{H}_2$); 1.63 (m, 2H, $C\underline{H}_2$); 2.05 (m, 1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$); 2.71 (d, 1H, $CHO\underline{H}$, J=6.6 Hz); 2.86 (bs, 1H, $C\underline{H}O$); 2.95 (bs, 1H, $C\underline{H}O$); 3.21 (m, 2H, $C\underline{H}_2NH$); 3.45 (m, 1H, $C\underline{H}OH$); 3.62 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 4.62 (d, 1H, $CHN\underline{H}$, J=9.5 Hz); 5.00 (bs, 1H, $CH_2N\underline{H}$); 5.06 (s, 2H, CH_2Ph); 7.32 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.09 (CH_3); 20.09 (CH_3); 26.42 (CH_2); 28.45 [$(\underline{C}H_3)_3C$ e $(CH_3)_2\underline{C}H$]; 28.74 (CH_2); 40.59 (CH_2NH); 56.27 (CHO); 58.38 (CHNH); 59.55 (CHO); 66.69 (CH_2Ph); 70.98 (CHOH); 79.59 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 128.17-129.30 (C Ar); 136.64 (C Ar); 156.45 (CONH); 156.52 (CONH). **ES-MS** (m/z): 475 $[MK]^+$, 459 $[MNa]^+$, 403 $[MNa-C_4H_8]^+$, 381 $[MH-C_4H_8]^+$, 337 $[MH-Boc]^+$.

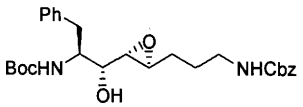


(1*S*,2*S*)-Acido-{(2*R*,3*R*)-3-[3-(2-*tert*-butossicarbonilammino-1-idrossi-3-fenil-propil)-ossiranil]-propil}-carbammico benzil estere (53b)

Si ottengono 300 mg (68%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **52b** (426 mg, 0.91 mmol) e acido *meta*-cloroperbenzoico (314 mg, 1.1 mmol).

P.f.= 99-101 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = 8.33 (c=0.3, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.35 (s, 11H, $(C\underline{H}_3)_3C$ e $C\underline{H}_2$); 1.61 (m, 2H, $C\underline{H}_2$); 2.63 (d, 1H, $CHO\underline{H}$, J=6.2 Hz); 2.86 (bs, 1H, $C\underline{H}O$); 2.96 (m, 3H, $C\underline{H}O$ e $C\underline{H}_2Ph$ β); 3.23 (m, 2H, $C\underline{H}_2NH$); 3.55 (bs, 1H, $C\underline{H}OH$); 3.99 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 4.71 (m, 1H,$CHN\underline{H}$); 4.88 (bs, 1H, $CH_2N\underline{H}$); 5.08 (s, 2H, CH_2Ph); 7.32 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 26.46 (CH_2); 28.33 [$(\underline{C}H_3)_3C$]; 28.66 (CH_2); 36.57 (CH_2Ph β); 40.60 (CH_2NH); 55.68 (CHO); 58.43 (CHO); 58.99 (CHNH); 66.75 (CH_2Ph); 71.70 (CHOH); 79.66 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.62-129.45 (C Ar);

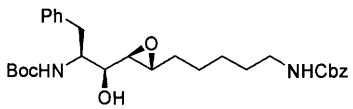
136.62 (C_1 Ar); 137.61 (C_1 Ar); 156.47 (CONH x2). **ES-MS** (m/z): 523 $[MK]^+$, 507 $[MNa]^+$, 485 $[MH]^+$, 429 $[MH-C_4H_8]^+$.



(1*S*,2*R*)-Acido-{(2*S*,3*S*)-3-[3-(2-*tert*-butossicarbonilammino-1-idrossi-3-fenil-propil)-ossiranil]-propil}-carbammico benzil estere (72)

Si ottengono 571 mg (72%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **71** (770 mg, 01.64 mmol) e acido *meta*-cloroperbenzoico (567 mg, 1.98 mmol).

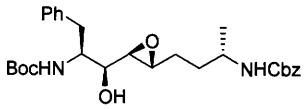
$[\alpha]_D^{25}$ = -14.4 (c=0.25, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-CD_3CN 70 °C, coppia di rotameri): 1.33 (bs, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.59 (m, 4H, (2x$C\underline{H}_2$)); 2.72-2.91 (m, 4H, $C\underline{H}_2Ph$ e $C\underline{H}O$ x2); 3.14 (m, 2H, CH_2N); 3.25 (bs, 1H, OH); [3.32 e 3.44 (bs, 1H, $C\underline{H}OH$)]; 3.88 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 5.06 (s, 2H, CH_2Ph); 5.15 (bs, 1H, NH); 5.53 (m, 1H, NH); 7.37 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C NMR** (δ-CD_3CN 70 °C, coppia di rotameri): 26.12 (CH_2); 27.74 [$(\underline{C}H_3)_3C$]; 28.62 (CH_2); 37.71 (CH_2Ph); 40.57 (CH_2NH); [55.38 e 55.73 (CHNH)]; 58.61 (CHO); 59.92 (CHO); 65.90 (CH_2Ph); [71.05 e 72.63 (CHOH)]; 78.67 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 127.69-129.37 (C Ar); 137.67 (C_1 Ar); 139.06 (C_1 Ar); [155.79 e 156.51 (CONH)]. **ES-MS** (m/z): 523 $[MK]^+$, 507 $[MNa]^+$, 485 $[MH]^+$, 429 $[MH-C_4H_8]^+$.



(1*S*,2*S*)-Acido-{(2*R*,3*R*)-5-[3-(2-*tert*-butossicarbonilammino-1-idrossi-3-fenil-propil)-ossiranil]-pentil}-carbammico benzil estere (86)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 361 mg (52%) di solido bianco, partendo da alcol allilico **85** (670 mg, 1.35 mmol) e acido meta-cloro-perbenzoico (mCPBA) (466 mg, 1.62 mmol).

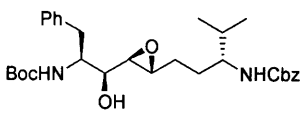
$[\alpha]_D^{25}$ = -11.7 (c=0.3, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.34-1.44 (m, 15H, $(C\underline{H}_3)_3C$ e 3x$C\underline{H}_2$); 1.47 (m, 2H, $C\underline{H}_2$); 2.84 (m, 3H, $C\underline{H}O$ e $C\underline{H}_2Ph$-β); 2.97 (s, 1H, $C\underline{H}O$); 3.17 (m, 2H, $C\underline{H}_2NH$); 3.55 (m, 1H, $C\underline{H}OH$); 3.99 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 4.77 (m, 1H, $CHN\underline{H}$); 4.86 (m, 1H, $CH_2N\underline{H}$); 5.07 (s, 2H, CH_2Ph); 7.21-7.32 (m, 10H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 25.57 (CH_2); 26.49 (CH_2); 28.38 [$C(\underline{C}H_3)$]; 29.88 (CH_2); 31.35 (CH_2); 36.31 (CH_2Ph); 40.95 (CH_2NH); 55.08 (CHO); 56.17 (CHO); 59.12 (CHNH); 66.67 (CH_2Ph); 71.89 (CHOH); 79.63 [$\underline{C}(CH_3)_3$]; 126.54-129.47 (C Ar); 136.70 (C Ar); 137.76 (C Ar); 155.75 (CO); 156.51 (CO).



(1*S*,2*S*)-Acido-{(2*R*,3*R*)-3-[3-(2-*tert*-butossicarbonilammino-1-idrossi-3-fenil-propil)-ossiranil]- (1*S*)-metil-propil}-carbammico benzil estere (99a)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 71 mg (55%) di solido bianco, partendo da alcol allilico **97a** (125 mg, 0.52 mmol) e acido meta-cloro-perbenzoico (mCPBA) (180 mg, 0.63 mmol).

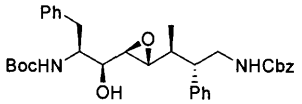
$[\alpha]_D^{25}$ = 8.2 (c=0.4, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.12 (d, 3H, CH_3, J=6.2 Hz); 1.29 (m, 10H, $(C\underline{H}_3)_3C$ e C<u>H</u>H); 1.54 (m, 1H, C<u>H</u>H); 2.07-2.12 (m, 3H, CHO<u>H</u> e CH_2); 2.81 (m, 3H, C<u>H</u>O e $C\underline{H}_2$Ph-β); 2.95 (m, 1H, C<u>H</u>O); 3.67 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.15 (m, 2H, C<u>H</u>OH e C<u>H</u>NH); 4.59 (bs, 1H, NHCO); 5.13 (m, 3H, CH_2Ph e NH); 7.19-7.37 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 21.1 (CH_3); 28.38 [$C(\underline{C}H_3)_3$]; 29.12 (CH_2); 32.86 (CH_2); 36.45 (CH_2); 45.35 (CHNH); 55.1 (CHO); 56.11 (CHO); 57.95 (CHNH); 66.58 (CH_2Ph); 71.75 (CHOH); 79.89 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.25-129.37 (C Ar); 136.56 (C_1 Ar); 137.9 (C_1 Ar); 155.79 (CONH); 156.26 (CONH).



(1*S*,2*S*)-Acido-{(2*R*,3*R*)-3-[3-(2-*tert*-butossicarbonilammino-1-idrossi-3-fenil-propil)-ossiranil]- (1*S*)-propil-propil}-carbammico benzil estere (99b)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 67 mg (53%) di solido bianco, partendo da alcol allilico **97b** (125 mg, 0.24 mmol) e acido meta-cloro-perbenzoico (mCPBA) (84 mg, 0.29 mmol).

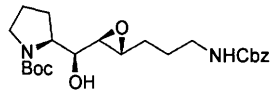
$[\alpha]_D^{25}$ = 8.8 (c=0.4, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$):): 0.86 (d, 3H, CH_3, J=6.6 Hz); 0.9 (d, 3H, CH_3, J=6.6 Hz); 1.3 (m, 10H, $(C\underline{H}_3)_3C$ e C<u>H</u>H); 1.56 (m, 1H, C<u>H</u>H); 1.66 (m, 1H, $CH(CH_3)_3$); 2.1-2.12 (m, 3H, CHO<u>H</u> e CH_2); 2.81 (m, 3H, C<u>H</u>O e $C\underline{H}_2$Ph-β); 2.95 (m, 1H, C<u>H</u>O); 3.29 (brs, 1H, OH); 3.77 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.15 (m, 2H, C<u>H</u>OH e C<u>H</u>NH); 4.67 (brs, 1H, NHCO); 5.15 (m, 3H, CH_2Ph e NH); 7.19-7.37 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.69 (CH_3); 19.46 (CH_3); 28.39 [$C(\underline{C}H_3)_3$]; 29.22 (CH_2); 31.59 ($\underline{C}H(CH_3)_2$); 32.89 (CH_2); 37.25 (CH_2); 55.12 (CHO); 56.15 (CHO); 54.97 (CHNH); 57.9 (CHNH); 66.85 (CH_2Ph); 71.8 (CHOH); 79.9 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.2-129.4 (C Ar); 136.54 (C_1 Ar); 137.89 (C_1 Ar); 155.76 (CONH); 156.87 (CONH).



***tert*-butil (1*S*,2*S*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,3*S*)-4-benzilossicarbonilamino-3-fenilbutan-2-il)ossiran-2-il)-1-idrossi-3-fenilpropan-2-il carbammato (111)**

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 93 mg (51%) di solido bianco, partendo da alcol allilico **110** (178 mg, 0.32 mmol) e acido meta-cloro-perbenzoico (mCPBA) (110 mg, 0.38 mmol).

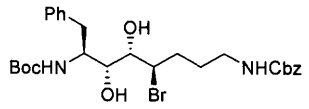
$[\alpha]_D^{25}$ = 6.7 (c=0.36, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.1 (d, 3H, CH_3, J=6 Hz); 1.32 (s, 9H, $(CH_3)C$); 1.98 (brs, 1H, OH); 2.49 (m, 1H, CH); 2.89-3.12 (m, 5H, CHPh, CH_2Ph, CHO x2); 3.33-3.53 (m, 3H, CH_2 e C<u>H</u>OH); 4.11 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.09 (m, 3H, CH_2Ph e NH); 7.16-7.4 (m, 15H, Ar x3). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.16 (CH_3); 28.35 [C(<u>C</u>H_3)]; 36.47 (CH_2Ph); 39.67 (CH); 44.6 (CH_2); 49.48 (CH); 55.06 (CHO); 56.2 (CHO); 59.23 (CHNH); 71.95 (CHOH); 79.76 [<u>C</u>$(CH_3)_3$]; 126.51-129.2 (C Ar); 136.7 (C Ar); 137.6 (C Ar); 155.67 (CO); 156.45 (CO).



(*S*)-*tert*-butil 2-((*S*)-((2*R*,3*R*)-3-(3-benzilossicarbonilamminopropil)ossiran-2-il)(idrossi)metil)pirrolidin-1-carbossilato (152)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 223 mg (53%) di un olio incolore, partendo da alcol allilico **148** (407 mg, 0.97 mmol) e acido meta-cloro-perbenzoico (mCPBA) (336 mg, 1.17 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = 9.7 (c=0.3, MeOH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.42 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.61-1.98 (m, 5H, $C\underline{H}_2$, HC<u>H</u>, $C\underline{H}_2$); 2.77 (m, 1H, C<u>H</u>O); 2.89 (m, 1H, C<u>H</u>O); 3.20 (m, 2H, $C\underline{H}_2NH$); 3.42 (brs, 1H, OH); 3.62 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 3.91 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.08 (m, 3H, CH_2Ph e NH); 7.18-7.32 (m, 10H, C Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 24.31 (CH_2); 25.66 (CH_2); 28.53 [C(<u>C</u>H_3)]; 28.87 (CH_2); 29.75 (CH_2); 40.62 (CH_2NH); 47.59 (CH_2N); 55.19 (CHO); 58.8 (CHO); 60.95 (CHNH); 66.63 (CH_2 Cbz); 72.4 (CHOH); 80.04 [<u>C</u>$(CH_3)_3$]; 127.95-128.55 (C Ar); 136.67 (C Ar); 156.15 (CO); 156.49 (CO).



(4R,5R,6R,7S)-Acido(4-bromo-7-*tert*-butossicarbonilammino-5,6-diidrossi-8-fenil-octil)-carbammico benzil estere (73)

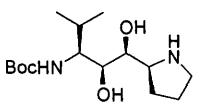
Ad una soluzione di epossialcol **72** (300 mg, 0.41 mmol) in CH_3CN (4 mL) raffreddata a – 20 °C si aggiungono Amberlist 15 (134 mg, 0.41 mmol) e LiBr (143 mg, 1.65

mmol) e la reazione viene seguita mediante cromatografia su strato sottile ($EtOAc/CH_2Cl_2$ 4:6). La miscela viene agitata a –20 °C fino a completa scomparsa del reagente, il solido viene allontanato mediante filtrazione ed il solvente rimosso a pressione ridotta. Il residuo viene ripreso con etile acetato (25 mL) e la fase organica viene lavata con acqua (10 mL), una soluzione satura di NaCl e seccata su $NaSO_4$ anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela etile acetato/diclorometano 1:1. Si ottengono 127 mg (55%) di olio.

$[\alpha]_D^{25}$ = -10 (c=0.4, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.37 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$)); [1.51 e 1.79 (m, 2H, $C\underline{H}_2$]; 1.72 (m, 2H, $C\underline{H}_2$); 2.86 (m, 2H, $C\underline{H}_2Ph$); 3.14 (m, 2H, $C\underline{H}_2NH$); 3.80 (m, 3H, C<u>H</u>NH e C<u>H</u>OH); 4.22 (m, 1H, C<u>H</u>Br); 4.86 (d, 1H, N<u>H</u>, J=8.8 Hz); 4.92 (bs, 1H, N<u>H</u>); 5.09 (s, 2H, $C\underline{H}_2Ph$); 7.34 (m, 10H, C<u>H</u> Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 27.87($\underline{C}H_2$); 28.33 ($CH(\underline{C}H_3)_3$); 29.83 ($\underline{C}H_2$); 38.41 ($\underline{C}H_2Ph$); 40.23 ($\underline{C}H_2NH$); 54.10 (<u>C</u>HNH); 66.77 ($\underline{C}H_2Ph$); 71.17 (<u>C</u>HOH); 75.83 (<u>C</u>HOH); 80.30 ($(CH_3)_3\underline{C}$); 126.63, 128.08, 128.18, 128.47, 128.62, 129.24 (<u>C</u>H Ar); 136.64, 137.64 (<u>C</u> Ar); 156.58 (<u>C</u>ONH).

Procedura generale per la sintesi degli isosteri Xaa-Pro

Una soluzione di epossialcol (0.3 mmol) in metanolo (10 mL) viene agitata per 16 ore sotto atmosfera di idrogeno in presenza di Pd/C 5%. Il catalizzatore viene rimosso mediante filtrazione su celite ed il solvente allontanato a pressione ridotta. Il residuo viene cristallizzato utilizzando una miscela toluene/esano oppure dietil etere/esano.

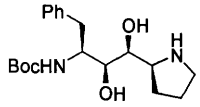


(1*S*,2*S*,3*S*,2'*S*)-Acido-(2,3-Diidrossi-1-isopropil-3-pirrolidin-2'-il-propil)-carbammico *tert*-butil estere (41a)

Si ottengono 63 mg (91%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **53a** (100 mg, 0.23 mmol).

P.f. =129-130 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -12.5 (c=0.16, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.82 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 0.91 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 1.43 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.58 (m, 1H, CH_2); 1.76 (m, 2H, CH_2); 1.90 (m, 1H, CH_2); 2.27 (m, 1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$); 2.85 (m, 1H, $C\underline{H}_2NH$); 2.92 (m, 1H, $C\underline{H}_2NH$); 3.42 (d, 1H, C<u>H</u>OH, J=4.0 Hz); 3.58 (m, 3H, C<u>H</u>NH x2 e C<u>H</u>OH); 4.24 (bs, 2H, CHO<u>H</u> x2); 4.57 (d, 1H, N<u>H</u>CO, J=8.4 Hz). **^{13}C-**

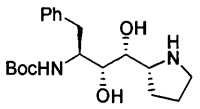
NMR (δ-$CDCl_3$): 15.31 ($\underline{C}H_3)_2CH$); 20.30 ($\underline{C}H_3)_2CH$); 25.11 (CH_2); 26.10 $(CH_3)_2\underline{C}H$); 27.63 (CH_2); 28.39 ($\underline{C}H_3)_3C$); 45.89 (CH_2NH); 56.14 (CHNH); 61.67 (CHNH); 70.28 (CHOH); 71.64 (CHOH); 80.09 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 157.83 (CONH).



(1*S*,2*S*,3*S*,2'*S*)-Acido-(1-benzil-2,3-diidrossi-3-pirrolidin-2-il-propil)-carbammico *tert*-butil estere (41b)

Si ottengono 69 mg (95%), di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **53b** (100 mg, 0.206 mmol).

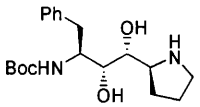
P.f. =167 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -38.8 (c=0.35, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.33 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.57 (m, 1H, CH_2); 1.76 (m, 2H, CH_2); 1.91 (m, 1H, CH_2); 2.86 (m, 1H, CH_2Ph); 2.92 (m, 1H, $C\underline{H}_2NH$); 2.98 (m, 1H, $C\underline{H}_2NH$); 3.13 (d, 1H, CH_2Ph, J=13.9 Hz); 3.53-3.66 (m, 3H, C<u>H</u>OH x2, C<u>H</u>NH); 3.91 (bs, 1H, C<u>H</u>NH); 4.62 (bs, 3H, CHO<u>H</u> x2, NHCO); 7.34 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 25.16 (CH_2); 27.30 (CH_2); 28.32 [$(CH_3)_3C$]; 36.54 (CH_2Ph); 45.87 (CH_2NH); 52.78 (CHNH); 61.90 (CHNH ring); 69.64 (CHOH); 73.05 (CHOH); 80.15 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.45-129.58 (C Ar); 137.92 (C_1 Ar); 157.11 (CONH). **ES-MS** (m/z): 351 $[MH]^+$, 295 $[MH-C_4H_8]^+$.



(1*S*,2*R*,3*R*,2'*R*)-Acido-(1-benzil-2,3-diidrossi-3-pirrolidin-2-il-propil)-carbammico *tert*-butil estere (68)

Si ottengono 65.4 mg (92%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **72** (98 mg, 0.203 mmol).

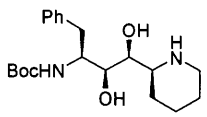
$[\alpha]_D^{25}$ = -17.1 (c=0.3, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.23-1.37 (m, 11H, $(C\underline{H}_3)_3C$ e CH_2); 1.64 (m, 2H, $C\underline{H}_2$); 2.85-2.89 (m, 4H, $C\underline{H}_2Ph$ β, $C\underline{H}_2NH$); 3.29 (m, 1H, C<u>H</u>NH ring); 3.47 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 3.58 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 3.82 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 3.95 (brs, 2H, O<u>H</u>); 5.22 (d, 1H, N<u>H</u>, J=8.4 Hz); 7.12-7.25 (m, 5H, C<u>H</u> Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 24.84 ($\underline{C}H_2$); 25.72 ($\underline{C}H_2$); 28.41 ($(\underline{C}H_3)_3C$); 39.13 ($\underline{C}H_2Ph$); 46.12 ($\underline{C}H_2NH$); 53.39 (<u>C</u>HNH); 60.25 (<u>C</u>HNH); 71.14 (<u>C</u>HOH); 72.38 (<u>C</u>HOH); 79.58 ($(CH_3)_3\underline{C}$); 126.37, 128.42, 128.43, 129.47 (<u>C</u>H Ar); 138.38 (<u>C</u> Ar), 156.08 (<u>C</u>ONH)



(1*S*,2*R*,3*R*,2'*S*)-Acido-(1-benzil-2,3-diidrossi-3-pirrolidin-2-il-propil)-carbammico *tert*-butil estere (69)

Si ottengono 59 mg (75%), di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da bromodiolo **73** (127 mg, 0.22 mmol).

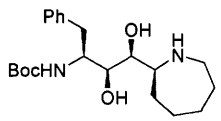
$[\alpha]_D^{25}$ = -14.3 (c=0.28, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-CD_3OD): 1.33 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.57 (m, 1H, $C\underline{H}_2$); 1.78 (m, 2H, $C\underline{H}_2$); 1.91 (m, 1H, $C\underline{H}_2$); 2.78-2.90 (m, 4H, $C\underline{H}_2Ph$ e $C\underline{H}_2NH$); 3.65-3.82 (m, 3H, 2x$C\underline{H}OH$, $C\underline{H}NH$); 4.06 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 7.34 (m, 5H, $C\underline{H}$ Ar). **^{13}C-NMR** (δ-CD_3OD): 24.29 ($\underline{C}H_2$ ring); 25.42 ($\underline{C}H_2$ ring); 28.39 ($(\underline{C}H_3)_3C$); 39.28 ($\underline{C}H_2Ph$); 45.56 ($\underline{C}H_2NH$); 53.25 ($\underline{C}HNH$); 60.63 ($\underline{C}HNH$); 74.14 ($\underline{C}HOH$); 77.36 ($\underline{C}HOH$); 80.20 ($(CH_3)_3\underline{C}$); 126.45, 128.54, 129.46 ($\underline{C}H$ Ar); 137.95 ($\underline{C}$ Ar); 158.01 ($\underline{C}ONH$).



(1*S*,2*S*,3*S*,2'*S*)-acido-(1-benzil-2,3-idrossi-3-piperidin-2-il-propil)-carbammico tert-butil estere (80)

Si ottengono 350 mg (0.96 mmol, 96%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **79** (500 mg, 1 mmol).

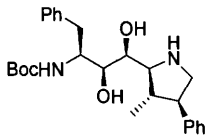
P.f. = 120-123 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -39.3 (c=0.4, CH_3OH). **IR** (nujol, cm^{-1}): 3385 (NH), 3190 (OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.33 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.43-1.81 (m, 6H, CH_2 x3); 2.48 (td, 2H, $C\underline{H}_2CH$ anello, J=9.16 Hz, J=2.56 Hz); 2.85 (m, 1H, CH_2Ph); 3.05 (m, 1H, $C\underline{H}NH$ anello); 3.14 (m, 1H, CH_2Ph, J=13.9 Hz); 3.40 (bs, 1H, $C\underline{H}OH$); 3.46 (m, 1H, $C\underline{H}OH$); 3.95 (bs, 1H, $C\underline{H}NH$); 4.40 (m, 1H, NHCO); 7.26 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 24.55 (CH_2); 25.91 (CH_2); 28.07 (CH_2); 28.29 [$(\underline{C}H_3)_3C$]; 36.41 (CH_2Ph); 46.53 (CH_2NH); 51.74 (CHNH); 60.27 (CHNH); 70.58 (CHOH); 74.05 (CHOH); 80.46 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.51-129.64 (C Ar); 137.66 (C_1 Ar); 157.47 (CONH). **ES-MS** (m/z): 403.4 $[MK]^+$, 387.3 $[MNa]^+$, 365.3 $[MH]^+$.



***tert*-butil (2*S*,3*S*,4*S*)-3,4-diidrossi-4-[(*S*)-isoindolin-1-il]-1-fenilbutan-2-il-carbammato (88)**

Si ottengono 69 mg (94%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **86** (100 mg, 0.19 mmol).

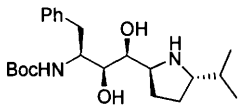
$[\alpha]_D^{25}$ = -41.1 (c=0.4, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.21-1.49 (m, 15H, $(C\underline{H}_3)_3C$ e 3x$C\underline{H}_2$); 2.64-2.88 (m, 4H, $C\underline{H}_2$ e $C\underline{H}_2$Ph-β); 3.10 (m, 2H, $C\underline{H}_2$NH); 3.49 (m, 2H, C<u>H</u>OH e C<u>H</u>NH); 3.57 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 3.96 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.69 (d, 1H, NHCO, J=7.4 Hz); 7.19-7.25 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 25.78 (CH_2); 26.06 (CH_2); 29.36 (CH_2); 28.34 [$(\underline{C}H_3)_3C$]; 36.28 (CH_2Ph); 41.89 (CH_2NH); 53.31 (CHNH); 59.46 (CHNH); 69.67 (CHOH); 74.80 (CHOH); 80.14 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.46-129.49 (C Ar); 137.79 (C_1 Ar); 157.06 (CONH).



***tert*-butil (2*S*,3*S*,4*S*)-3,4-diidrossi-4-[(2*S*,3*S*,4*R*)-3-metil-4-fenilpirrolidin-2-il]-1-fenilbutan-2-il-carbammato (100)**

Si ottengono 34 mg (93%), di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **111** (50 mg, 0.08 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -17.8 (c=0.15, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.08 (d, 3H, CH_3, J=6.9 Hz); 1.32 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 2.09 (m, 1H, CH); 2.8-3.11 (m, 5H, CH_2, CH_2Ph e CHPh); 3.49-3.65 (m, 3H, C<u>H</u>OH x2, C<u>H</u>NH); 3.92 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.61 (bs, 3H, CHO<u>H</u> x2, NHCO); 7.34 (m, 10H, Ar x2). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 14.1 (CH_3); 28.3 [$(CH_3)_3C$]; 32.89 (CH); 36.58 (CH_2Ph); 48.47 (CH_2NH); 49.5 (CH); 52.71 (CHNH); 60.86 (CHNH ring); 69.68 (CHOH); 73.11 (CHOH); 80.11 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.45-129.58 (C Ar); 137.92 (C_1 Ar); 138.6 (C_1 Ar); 157.02 (CONH).

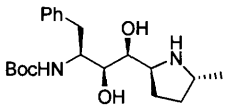


***tert*-butil (2*S*,3*S*,4*S*)-3,4-diidrossi-4-[(2*S*,5*S*)-5-isopropilpirrolidin-2-il]-1-fenilbutan-2-il-carbammato (89b)**

Si ottengono 47 mg (94%), di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **99b** (67 mg, 0.13 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -12.8 (c=0.4, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 0.74 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 0.79 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 1.32 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.59-1.89 (m, 4H, CH_2 x2); 2.02 (m, 1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$); 2.88 (m, 1H, CH_2Ph); 2.99 (m, 2H, $C\underline{H}_2$NH e C<u>H</u>NH); 3.01 (m, 1H, $C\underline{H}_2$NH); 3.10 (m, 1H, CH_2Ph); 3. 49-3.65 (m, 3H, C<u>H</u>OH x2, C<u>H</u>NH); 3.89 (bs, 1H, C<u>H</u>NH); 4.59 (bs, 3H, CHO<u>H</u>, NHCO); 7.29 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-

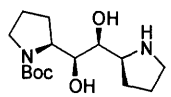
$CDCl_3$): 17.84 (CH_3); 18.81 (CH_3); 24.99 (CH_2); 28.41 [C($\underline{C}H_3)_3$]; 31.09 [$(CH_3)_2\underline{C}H$]; 33.2 (CH_2); 36.4 (CH_2); 51.1 (CHNH); 52.59 (CHNH); 57.07 (CHNH); 69.65 (CHOH); 73.0 (CHOH); 80.02 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.3-129.9 (C Ar); 137.76 (C_1 Ar); 157.12 (CONH)



***tert*-butil (2*S*,3*S*,4*S*)-3,4-diidrossi-4-[(2*S*,5*R*)-5-metilpirrolidin-2-il]-1-fenilbutan-2-il-carbammato (89a)**

Si ottengono 47 mg (91%), di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **99a** (71 mg, 0.14 mmol).

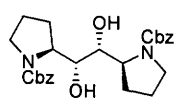
$[\alpha]_D^{25}$ = -10.3 (c=0.45, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.13 (d, 3H, CH_3, J=6.2 Hz); 1.29 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.61-1.92 (m, 4H, CH_2 x2); 2.85 (m, 1H, CH_2Ph); 2.92 (m, 2H, $C\underline{H}_2NH$ e $C\underline{H}NH$); 2.97 (m, 1H, $C\underline{H}_2NH$); 3.11 (m, 1H, CH_2Ph); 3.51-3.67 (m, 3H, $C\underline{H}OH$ x2, $C\underline{H}NH$); 3.91 (bs, 1H, $C\underline{H}NH$); 4.6 (bs, 3H, $CHO\underline{H}$, NHCO); 7.32 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 21.1 (CH_3); 25.16 (CH_2); 28.38 [C($\underline{C}H_3)_3$]; 33.4 (CH_2); 36.4 (CH_2); 51.3 (CHNH); 52.69 (CHNH); 61.71 (CHNH); 69.61 (CHOH); 72.95 (CHOH); 80.11 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.4-130.0 (C Ar); 137.86 (C_1 Ar); 157.09 (CONH)



(S)-tert-butil 2-[(1S,2S)-1,2-diidrossi-2-((S)-pirrolidin-2-il)etil]pirrolidina-1-carbossilato (144)

Si ottengono 47.9 mg (95%), di un olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **152** (73 mg, 0.17 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ = -18.8 (c=0.35, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.42 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.86-2.19 (m, 8H, CH_2 x4); 3.35 (m, 4H, CH_2N x2); 3.64 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 3.78 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 3.87 (m, 1H, $C\underline{H}OH$); 3.91 (m, 1H, $C\underline{H}OH$). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 23.26 (CH_2); 24.23 (CH_2); 27.14 (CH_2); 27.37 (CH_2); 28.36 [$(CH_3)_3C$]; 45.24 (CH_2NH); 47.20 (CH_2NH); 58.57 (CHNH); 61.97 (CHNH ring); 68.45 (CHOH); 71.12 (CHOH); 80.62 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 156.96 (CONH). **ES-MS** (m/z): 301 $[MH]^+$

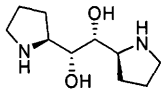


Di-benzilossicarbonil-(1*R*,2*R*)-1,2-di((*S*)-pirrolidin-2-il)etan-1,2-diolo (153)

Una sospensione di $VCl_3 \cdot (THF)_3$ (1.35 g, 3.6 mmol) e Zn in polvere (128 mg, 1.96 mmol) in diclorometano anidro (15 mL) viene mantenuta in agitazione per 1 h a

temperatura ambiente ed in atmosfera di Argon. Si aggiunge quindi una soluzione di Cbz-L-Prolinale **156** (760 mg, 3.27 mmol) in diclorometano anidro (15 mL), lasciando quindi il sistema in agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di Argon per 16 h. Alla soluzione si aggiunge quindi HCl 1 N (30 mL) e si lascia in agitazioen per ulteriori 16 h; separata la fase organica, la fase acquosa viene estratta con diclorometano (2x), le fasi organiche riunite vengono di segutio lavate con HCl 1N, con H_2O, con una soluzione acquosa satura di NaCl, seccate su Na_2SO_4 anidro ed il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene purificato per cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etil acetato (gradiente 9/1-2/8). Si ottengono 758 mg (49%) di un olio giallo.

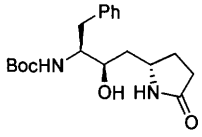
$[\alpha]_D^{25}$ = -54.6 (c=0.58, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.61-1.96 (m, 4H, CH_2 x2); 3.35-3.56 (m, 3H, CH_2N e CH_α); 4.22 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 5.11 (s, 2H, CH_2 Cbz); 7.31 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 24.16 (CH_2); 28.13 (CH_2); 47.30 (CH_2N); 60.79 (CH_α); 67.39 (CH_2Ph); 74.86 (CHOH); 128.03-128.64 (C Ar); 136.63 (C_1 Ar); 157.88 (CONH).



(1*R*,2*R*)-1,2-di((*S*)-pirrolidin-2-il)etan-1,2-diolo (158)

Di-benzilossicarbonil-(1*R*,2*R*)-1,2-di((*S*)-pirrolidin-2-il)etan-1,2-diolo (**153**) (76.2 mg, 0.16 mmol) viene sciolto in metanolo, addizionato di Pd/C al 10% (8 mg) e lasciato in agitazione in atmosfera di idrogeno ed a temperatura ambiente per 16 h. Eliminato il catalizzatore mediante filtrazione su celite e rimosso il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, si recuperano 30 mg (92%) di un olio giallino.

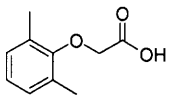
$[\alpha]_D^{25}$ = -28.8 (c=0.5, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.53-2.08 (m, 4H, CH_2 x2); 2.88-2.94 (m, 2H, CH_2N); 3.32-3.38 (m, 1H, CH_α); 3.45-3.49 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.64 (brs, 2H, NH e OH). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 25.54 (CH_2); 28.47 (CH_2); 46.51 (CH_2N); 61.55 (CH_α); 73.58 (CHOH)



Acido [1(*S*)-benzil-2(*R*)-idrossi-3(*S*)-(5-osso-pirrolidin-2-il)-propil]-carbammico tert-butil estere (166)

Una soluzione di azido alcol **165** (272 mg, 0.65 mmol) in metanolo e Pd/C al 10% (28 mg) viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di H_2 per 16 h.

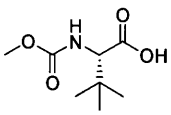
Il catalizzatore viene rimosso mediante filtrazione su celite ed il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Si ottengono189 mg (84%) di un olio giallino. $[\alpha]_D^{25}$ = -19.1 (c=0.21, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.28 (s, 9H, $(C\underline{H}_3)_3C$); 1.65 (m, 2H, CH_2); 2.01-2.21 (m, 4H, CH_2 x2); 2.87 (m, 1H, CH_2Ph); 3.41 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 3.91 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.04 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.94 (d, 1H, NHCO, J=8 Hz); 7.16 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 28.33 [$(CH_3)_3C$]; 29.7 (CH_2); 30.22 (CH_2); 35.52 (CH_2Ph); 39.98 (CH_2); 50.42 (CHNH); 54.39 (CHNH); 70.11 (CHOH); 79.76 [$(CH_3)_3\underline{C}$]; 126.37-129.54 (C Ar); 137.92 (C_1 Ar); 155.76 (CONH); 173.58 (CO)



Acido 2,6-dimetil-fenossiacetico (172)

2.44 g (0.02 moli) di 2,6-dimetil fenolo **171** vengono sciolti in 10 ml di una soluzione acquosa al 50% di NaOH; la miscela così ottenuta viene aggiunta nel corso di 2 ore a 1.91 g (0.02 moli) di acido cloroacetico sotto agitazione a 110-120 °C e controllando che il pH della soluzione sia sempre attorno a 9. La miscela viene lasciata sotto agitazione a questa temperatura per 1 ora; la soluzione viene quindi raffreddata in bagno a ghiaccio e acidificata con H_2SO_4 2 N fino a pH debolmente acido. Il precipitato può essere purificato mediante cristallizzazione da toluene/esano o tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice usando come eluente una miscela 7:3 CH_2Cl_2/CH_3OH. Si ottengono 2.6 g (73%) di un solido bianco.

P.f. = 119-120.5 °C. **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 2.28 (s, 6H, CH_3 x2); 4.33 (s, 2H, CH_2O); 6.8-7.01 (m, 3H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 16.2 (CH_3); 68.63 (CH_2O); 124.78 (C_4 Ar); 129.12-130.68 (Ar); 154.85 (C_1 Ar); 173.79 (CO).



***N*-(metossicarbonil)-*L*-*tert*-leucina (187)**

Ad una soluzione di L-*tert*-leucina (2.0 g, 0.015 mol) in diossano (8 mL) e NaOH 2N (25 mL) si aggiunge, nel corso di 1.5 h, metil cloroformiato (2.3 mL, 0.03 mol). La soluzione viene quindi riscaldata per 18 h a 60 °C, raffreddata a temperatura ambiente ed estratta con diclorometano (2x). La fase acquosa viene quindi acidificata a pH 2 per aggiunta di HCl 2N ed estratta con etile sacetato (3x); le fasi organiche riunite vengono di seguito lavate con una soluzione satura di NaCl, seccate su Na_2SO_4 anidro ed il

solvente rimosso mediante distillazione a presssione ridotta. Il residuo può essere cristallizzato per aggiunta di esano a 0 °C.

P.f. = 108-109 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -8.17 (c=0.45, CH_3OH). **^{1}H-NMR** (δ-CD_3OD): 1.01 (s, 9H, CH_3 x3); 3.65 (s, 3H, CH_3O); 4.02 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 5.06 (brs, 1H, OH); 6.94 (d, 1H, NH, J=8.8 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-CD_3OD): 25.9 [C(<u>C</u>H_3)$_3$]; 33.6 [C(<u>C</u>H_3)$_3$]; 51.4 (CH_3O); 62.8 (CHNH); 158.0 (CO); 173.3 (CO).

Procedura generale per la sintesi dei peptidi

L'amminoacido N-Cbz protetto (o il generico acido da coniugare) (1 eq) viene sciolto nella minima quantità di CH_3CN anidro oppure THF anidro, necessaria a solubilizzarlo; si aggiungono 1-idrossibenzotriazolo (HOBT) (1 eq), di-*iso*-propiletilammina (DIPEA), oppure N-metilmorfolina (NMM) (2 eq) e il metil estere del secondo amminoacido (1 eq), la soluzione viene raffreddata a 0 °C e si aggiunge N-etil-carbodiimmide cloridrato (EDC), (7.2 mmol). Dopo aver controllato che il pH sia debolmente basico (pH=8.0-8.5), la miscela viene agitata per 1h a 0 °C, quindi portata a temperatura ambiente e agitata per ulteriori 16h. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il residuo ripartito tra acetato d'etile e acqua, la fase organica viene lavata con una soluzione a acquosa di acido citrico al 10% (25 mL), una soluzione satura di $NaHCO_3$, una soluzione satura di NaCl e seccata su $NaSO_4$. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto grezzo purificato mediante cromatografia flash su gel di silice utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1.

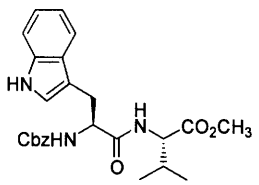
Procedura generale per l'acetilazione e deprotezione dei dipeptidi

Ad una soluzione del metil estere del dipeptide N-Cbz protetto (1.1 mmol) in metanolo (10 mL) si aggiunge una quantità catalitica di Pd/C 10% (o $Pd(OH)_2$) e la miscela viene agitata in atmosfera di H_2 fino a completezza (TLC CH_2Cl_2/CH_3OH, 9:1). La miscela viene filtrata su celite, il solvente allontanato mediante distillazione a pressione ridotta. Il prodotto grezzo viene sciolto in una miscela anidride acetica/CH_2Cl_2 1:1 (5 mL) e agitata fino a completezza (TLC: CH_2Cl_2/CH_3OH, 9:1). Il solvente viene rimosso a pressione ridotta. L'eccesso di anidride acetica viene rimosso per co-evaporazione con toluene (4x40 mL). Il residuo viene sciolto in una miscela THF/LiOH 0.5 N 1:1, la soluzione viene agitata fino a completezza (TLC: CH_2Cl_2/CH_3OH, 9:1), quindi acidificata a pH 4 con HCl 10%. La fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (3x5 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate

su $NaSO_4$. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta ed il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia flash su gel di silice utilizzando CH_2Cl_2/CH_3OH, 9:1 come miscela eluente.

Procedura generale per la rimozione del Boc

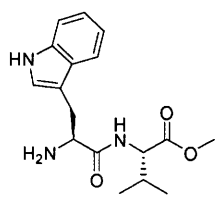
Il generico diamminodiolo N-Boc-protetto (0.15 mmol) viene sciolto una soluzione al 40% di acido trifluoroacetico in diclorometano (1 mL/100 mg di diamminodiolo) e la miscela viene agitata per 1h. Il solvente viene allontanato per distillazione a pressione ridotta mentre l'eccesso di TFA viene rimosso per co-evaporazione con dietil etere (5x20 mL). Il residuo viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.



N-Cbz-L-Trp-L-Val-OMe (176)

Si ottengono 1.7 g (63%) di solido giallo secondo la metodologia generale A, partendo da N-Cbz-L-triptofano **175** (2.03g, 6 mmol), HOBT (810 mg, 6 mmol), DIPEA (3.1 mL, 18 mmol), L-valina metil estere **174** (1.01g, 6 mmol), EDC (1.38g, 7.2 mmol).

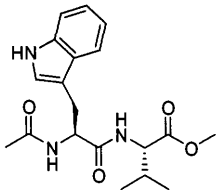
^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.73 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 0.77 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 1.99 (m, 1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$); 3.18 (dd, 1H, $C\underline{H}_2CH$, J_1=7.7 Hz, J_2=14.6 Hz); 3.29 (m, 1H, $C\underline{H}_2CH$); 3.61 (s, 3H, CH_3O); 4.39 (dd, 1H, $C\underline{H}NH$, J_1=5.1 Hz, J_2=8.4 Hz); 4.56 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 5.10 (s, 2H, CH_2Ph); 5.63 (d, 1H, NH, J=6.9 Hz); 6.35 (d, 1H, NH, J=7.3 Hz); 7.02-7.32 (m, 10H, Ar x2); 7.65 (d, 1H, NH, J=7.3 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.84 (CH_3); 18.81 (CH_3); 28.58 ($\underline{C}H_2CH$); 31.21 [$(CH_3)_2\underline{C}H$]; 52.15 (CH_3O); 55.68 (CHNH); 57.47 (CHNH); 67.08 (CH_2Ph); 110.34-136.35 ($\underline{C}H$ e $\underline{C}$ Ar); 156.16 (CONH); 171.47, 171.84 ($\underline{C}ONH$ e $\underline{C}O_2CH_3$). **ES-MS** (m/z): 490 $[MK]^+$, 474 $[MNa]^+$, 452 $[MH]^+$.



H_2N-Trp-Val-COOMe (177)

Si ottengono, partendo da 2.44 g (5.41 mmoli) di N-Cbz-TrpVal-COOMe **176**, 1.6 g (93%) di un olio giallo che non necessita di ulteriori purificazioni.

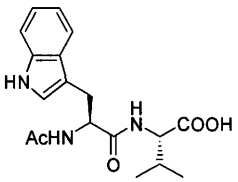
^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.87 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 0.90 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 1.68 (brs, 2H, NH_2); 2.14 (m, 1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$); 2.91 (dd, 1H, $C\underline{H}_2CH$, J_1=7.7 Hz, J_2=14.6 Hz); 3.38 (m, 1H, $C\underline{H}_2CH$); 3.72 (m, 4H, $C\underline{H}_3O$ + $C\underline{H}NH$); 4.52 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 7.02-7.62 (m, 5H, $C\underline{H}$ Ar); 7.93 (d, 1H, $N\underline{H}$, J=7.3 Hz); 9.08 (s, 1H, NH). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.94 (CH_3); 19.09 (CH_3); 29.37 ($\underline{C}H_2CH$); 31.01 [$(CH_3)_2\underline{C}H$]; 52.20 (CH_3O); 55.76 (CHNH); 57.07 (CHNH); 110.34-136.35 ($\underline{C}H$ e $\underline{C}$ Ar); 172.58, 175.30 ($\underline{C}ONH$ e $\underline{C}O_2CH_3$).



Ac-N-Trp-Val-OMe (178)

Si ottengono 1.72 g (95%) di un solido giallino che viene utilizzato senza ulteriori purificazioni a partire da 1.6 g (5.04 mmoli) di **177**, secondo la metodologia generale.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 0.78 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 0.81 (d, 3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 1.88 (s, 3H, $-CH_3$); 2.02 (m, 1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$); 3.19 (m, 2H, CH_2); 3.58 (s, 3H, CH_3O); 4.38 (dd, 1H, $C\underline{H}NH$, J_1=5.1 Hz, J_2=8.4 Hz); 4.90 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 7.02-7.32 (m, 7H, $C\underline{H}$ Ar e NH x 2); 8.75 (s, 1H, NH). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 17.92 (CH_3); 18.93 (CH_3); 23.04 (CH_3); 28.46 ($\underline{C}H_2CH$); 31.09 [$(CH_3)_2\underline{C}H$]; 52.10 (CH_3O); 54.15 (CHNH); 57.71 (CHNH); 110.34-136.35 ($\underline{C}H$ e $\underline{C}$ Ar); 170.62, 171.91, 172.20 ($\underline{C}ONH$ e $\underline{C}O_2CH_3$). **ES-MS** (m/z): 490 $[MK]^+$, 474 $[MNa]^+$, 452 $[MH]^+$.

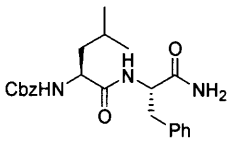


N-Ac-L-Trp-Val-OH (179)

Si ottengono 310 mg (82%) di solido giallo secondo la metodologia generale, partendo da N-Ac-L-Trp-L-Val-OMe **178** (0.5 g, 1.1 mmol).

^{1}H-NMR (δ-CD_3OD): 0.91 (m, 6H, $(C\underline{H}_3)_2CH$); 1.98 (s, 3H, $C\underline{H}_3CONH$); 2.13 (m, 1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$); 3.09 (dd, 1H, $C\underline{H}_2CH$, J_1=8.42 Hz, J_2=15.0 Hz); 3.26 (dd, 1H, $C\underline{H}_2CH$, J_1=6.2 Hz, J_2=15.4 Hz); 4.33 (d, 1H, $C\underline{H}NH$, J=5.5 Hz); 4.75 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 6.97-7.09 (m, 3H, $C\underline{H}$ Ar); 7.30 (d, 1H, $C\underline{H}$, J=8.1 Hz); 7.58 (d, 1H, $C\underline{H}$, J=6.9 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-CD_3OD): 16.98 (CH_3); 18.17 (CH_3); 21.15 (CH_3CO); 27.45 ($\underline{C}H_2CH$); 30.59 [$(CH_3)_2\underline{C}H$]; 54.16 (CHNH); 57.66 (CHNH); 109.66-136.69 ($\underline{C}H$ e $\underline{C}$ Ar); 171.84,

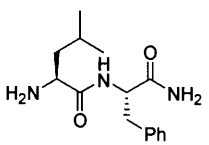
172.92, 173.16 (CONH e CO_2CH_3). **ES-MS** (m/z): 384 $[MK]^+$, 362 $[MNH_4]^+$, 368 $[MNa]^+$, 346 $[MH]^+$.



N-Cbz-Leu-Phe-CONH$_2$ (258)

Si ottengono 1.92 g (97%) di un solido bianco secondo la metodologia generale A, partendo da N-Cbz-L-leucina (1 g, 3.77 mmol), HOBT (510 mg, 3.77 mmol), NMM (1.06 mL, 7.54 mmol), L-fenilalanina-ammide cloridrato (756 mg, 3.77 mmol), EDC (867 mg, 3.77 mmol).

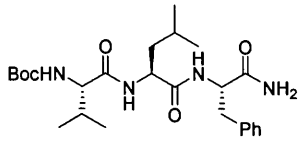
^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 0.73 (d, 3H, $(CH_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 0.85 (d, 3H, $(CH_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 1.35 (m, 2H, $(CH_3)_2CH_2$); 1.45 (m, 1H, $(CH_3)_2CH$); 2.85 (m, 1H, CHH); 3.0 (m, 1H, CHH); 4.0 (m, 1H, CHNH); 4.51 (m, 1H, CHNH); 5.07 (s, 2H, CH_2Ph); 7.04-7.41 (m, 13H, Ar x2, NH, $CONH_2$); 7.82 (d, 1H, NH, J=7.3 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d_6): 22.0 (CH_3); 23.45 (CH_3); 24.68 $[(CH_3)_2CH]$; 38.21 (CH_2); 40.56 (CH_2); 53.96 (CHNH); 54.05 (CHNH); 66.01 (CH_2Ph); 128.18-129.8 (Ar); 137.54 (C_1 Ar); 138.25 (C_1 Ar); 156.16 (CO); 172.41 (CO); 173.28 (CO). **ES-MS** (m/z): 450 $[MK]^+$, 434 $[MNa]^+$, 429 $[MNH_4]^+$, 412 $[MH]^+$.



NH$_2$-Leu-Phe-CONH$_2$ (247)

Si ottengono 229 mg (97%) di un olio giallo, che non necessita di ulteriori purificazioni, partendo da 350 mg di N-Cbz-Leu-Phe-CONH$_2$ **258**.

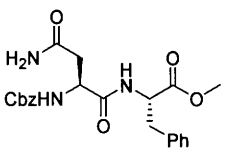
^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 0.73 (d, 3H, $(CH_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 0.86 (d, 3H, $(CH_3)_2CH$, J=6.6 Hz); 1.11 (m, 1H, $(CH_3)_2CH$); 1.40-1.60 (m, 4H, $(CH_3)_2CH_2$ e NH_2); 2.88 (m, 1H, CHH); 3.12 (m, 1H, CHH); 3.31 (q, 1H, CHNH, J=4.4, J=5.5 Hz); 4.65 (q, 1H, CHNH, J=8.05, J=6.9 Hz); 5.78 (s, 1H, CONHH); 6.46 (s, 1H, CONHH); 7.21-7.41 (m, 5H, Ar); 7.86 (d, 1H, NH, J=8.0 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d_6): 21.44 (CH_3); 23.37 (CH_3); 24.79 $[(CH_3)_2CH]$; 37.87 (CH_2); 43.85 (CH_2); 53.46 (CHNH); 53.64 (CHNH); 126.96-129.37 (Ar); 136.88 (C_1 Ar); 173.66 (CO); 176.19 (CO).



Boc-Val-Leu-Phe-CONH$_2$ (259)

Si ottengono 354 mg (90%) di un solido bianco secondo la metodologia generale A, a partire da NH$_2$-LeuPhe-CONH$_2$ **247**, (229 mg, 0.83 mmol), N-Boc-L-Valina (180 mg, 0.83 mmol), HOBT (111 mg, 0.83 mmol), NMM (232 μL, 1.65 mmol), EDC (190 mg, 0.99 mmol).

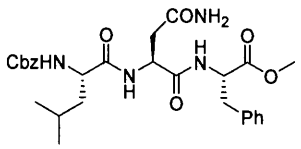
^{1}H-NMR (δ-DMSO-d$_6$): 0.77-0.84 (m, 12H, CH$_3$ x4); 1.38 (s, 9H, [C(C<u>H</u>$_3$)$_3$]); 1.55 (m, 1H, (CH$_3$)$_2$C<u>H</u>); 1.91 (m, 1H, (CH$_3$)$_2$C<u>H</u>); 2.50 (m, 1H, C<u>H</u>H); 2.83 (m, 1H, C<u>H</u>H); 2.96 (m, 1H, CH<u>H</u>); 3.34 (m, 1H, CH<u>H</u>); 3.75 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.30 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.43 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 6.75 (brs, 1H, NH); 7.11 (brs, 1H, NH); 7.18-7.24 (m, 5H, Ar); 7.33 (brs, 1H, NH); 7.84 (brs, 2H, NH$_2$). **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d$_6$): 18.35 (CH$_3$); 19.45 (CH$_3$); 21.70 (CH$_3$); 23.24 (CH$_3$); 24.79 [(C<u>H</u>$_3$)$_2$CH]; 28.27 [C(<u>C</u>H$_3$)$_3$]; 30.30 [(C<u>H</u>$_3$)$_2$CH]; 37.68 (CH$_2$); 41.06 (CH$_2$); 51.12 (CHNH); 53.64 (CHNH); 60.04 (CHNH); 126.34-129.27 (Ar); 137.84 (C$_1$ Ar); 155.59 (CO); 171.34 (CO); 171.71 (CO); 172.70 (CO).



Cbz-Asn-Phe-COOMe (269)

Si ottengono 1.92 g (97%) di un solido bianco secondo la metodologia generale A, partendo da N-Cbz-L-asparagina (1.23 g, 4.63 mmol), HOBT (625 mg, 4.63 mmol), NMM (1.02 mL, 9.26 mmol), L-fenilalanina-metilestere cloridrato (1 g, 4.63 mmol), EDC (1.065 g, 5.56 mmol).

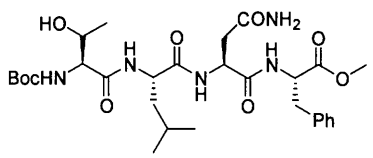
^{1}H-NMR (δ-DMSO-d$_6$): 2.39-2.50 (m, 2H, CH$_2$); 2.97-3.04 (m, 2H, CH$_2$); 3.52 (s, 3H, CH$_3$O); 4.43-4.48 (m, 2H, C<u>H</u>NH x2); 5.03 (s, 2H, CH$_2$Ph); 6.96 (brs, 1H, NH); 7.04-7.36 (m, 5H, Ar); 8.30 (d, 1H, NH, J=7.3 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d$_6$): 37.09 (CH$_2$); 37.80 (CH$_2$); 52.04 (CH$_3$O); 52.53 (CHNH); 54.13 (CHNH); 128.68-129.03 (C Ar); 137.55 (C$_1$ Ar); 156.25 (CO); 171.81 (CO); 172.14 (CO); 172.30 (CO). **ES-MS** (m/z): 466 [MK]$^+$, 450 [MNa]$^+$, 445 [MNH$_4$]$^+$, 428 [MH]$^+$.



N-Cbz-Leu-Asn-Phe-COOMe (270)

2.8 g (6.55 mmol) di Cbz-AsnPhe-COOMe **269** vengono sciolti in metanolo, addizionati di $Pd(OH)_2$ (10% in peso rispetto al substrato) e lasciati sotto agitazione per 1.5 h in atmosfera di H_2. Al termine della reazione, il catalizzatore viene eliminato mediante filtrazione su celite ed il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta, recuperando 1.91 g (99%) di un olio incolore che viene usato direttamente senza purificazione. Si conduce quindi di seguito il coupling secondo la metodologia generale A, recuperando 3.13 g (89%) di un solido bianco, a partire da 1.91 g (6.51 mmol) di NH_2-AsnPhe-COOMe, 1.72 g (6.51 mmol) di Cbz-L-Leu, 880 mg (6.51 mmol) di HOBT, 1.43 mL (0.013 mol) di NMM e 1.5 g (7.81 mmol) di EDC.

^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 0.70-0.84 (m, 6H, CH_3 x2); 1.41 (m, 2H, CH_2); 1.62 (m, 1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$); 2.50 (m, 2H, CH_2); 2.98 (m, 2H, CH_2); 3.59 (s, 3H, CH_3O); 4.05 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 4.44 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 4.56 (m, 1H, $C\underline{H}NH$); 5.03 (s, 2H, CH_2 Cbz); 6.95 (brs, 1H, NH); 7.18-7.36 (m, 12H, Ar x2 e $CONH_2$); 8.30 (m, 2H, NH x2). **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d_6): 21.91 (CH_3); 23.64 (CH_3); 24.71 [$(C\underline{H}_3)_2CH$]; 37.23 (CH_2); 37.76 (CH_2); 41.19 (CH_2); 49.96 (CH_3O); 52.33 (CHNH); 53.64 (CHNH); 54.37 (CHNH); 65.99 (CH_2 Cbz); 128.84-129.60 (C Ar); 137.45 (C_1 Ar); 137.53 (C_1 Ar); 156.38 (CO); 171.60 (CO); 172.02 (CO); 172.13 (CO); 172.74 (CO). **ES-MS** (m/z): 563 $[MNa]^+$, 541 $[MH]^+$.



N-Boc-Thr-Leu-Asn-Phe-COOMe (260)

2.65 g (4.9 mmol) di Cbz-LeuAsnPhe-COOMe **270** vengono sciolti in metanolo, addizionati di $Pd(OH)_2$ (10% in peso rispetto al substrato) e lasciati sotto agitazione per 3 h in atmosfera di H_2. Al termine della reazione, il catalizzatore viene eliminato mediante filtrazione su celite ed il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta, recuperando 2.2 g (98%) di un olio incolore che viene usato direttamente senza purificazione. Si conduce quindi di seguito il coupling secondo la metodologia generale A, recuperando 2.45 g (75%) di un solido giallino, a partire da 2.2 g (5.41 mmol) di NH_2-LeuAsnPhe-COOMe, 1.18 g (5.41 mmol) di Boc-L-Thr, 731 mg (5.41 mmol) di HOBT, 1.19 ml (0.011 mol) di NMM e 1.24 g (6.5 mmol) di EDC.

^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 0.80-0.86 (m, 6H, CH_3 x2); 1.03 (d, 3H, CH_3, J=5.5 Hz); 1.38 (s, 9H, [C(C$\underline{H}_3$)$_3$]); 1.61 (m, 1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$); 2.40 (m, 1H, $(CH_3)C\underline{H}OH$); 2.49 (m, 2H, CH_2); 2.96 (m, 2H, CH_2); 3.34 (s, 1H, OH); 3.55 (s, 3H, CH_3O); 3.89 (m, 2H, CH_2); 4.33 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 4.42 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 4.54 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 4.78 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 6.36 (d, 1H, NH, J=8.0 Hz); 6.92 (brs, 1H, NH); 7.18-7.31 (m, 6H, Ar e NH); 7.87 (d, 1H, NH, J=8.0 Hz); 8.06 (m, 2H, $CONH_2$). **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d_6): 19.36 (CH_3); 21.91 (CH_3); 23.64 (CH_3); 24.71 [($C\underline{H}_3)_2CH$]; 28.29 [C($\underline{C}H_3)_3$]; 37.23 (CH_2); 37.76 (CH_2); 41.19 (CH_2); 50.01 (CH_3O); 52.33 (CHNH); 53.64 (CHNH); 54.37 (CHNH); 59.2 (CHNH); 67.36 [$CH_3(\underline{C}H)OH$]; 79.8 [$C(CH_3)_3$]; 128.84-129.60 (Ar); 137.41 (C_1 Ar); 156.34 (CO); 171.56 (CO); 172.10 (CO); 172.17 (CO); 172.82 (CO). **ES-MS** (m/z): 646.3 $[MK]^+$, 630.4 $[MNa]^+$, 625.3 $[MNH_4]^+$, 608.5 $[MH]^+$

Procedure generali per la sintesi degli inibitori

A) L'amminoacido N-protetto (o il generico acido da coniugare) (1.2 eq) viene sciolto in etil acetato ed addizionato, in bagno a ghiaccio, di cloruro di tionile (1.4 eq), aggiungendo eventualmente la minima quantità di DMF necessaria a solubilizzare il tutto. La soluzione viene scaldata per circa 5 h a 50 °C, lasciata raffreddare a temperatura ambiente ed aggiunta, nel corso di 5-10 minuti, ad una miscela 1/1 etile acetato/acqua contenente il metil estere del secondo amminoacido, con il gruppo NH_2 libero (1 eq) e $NaHCO_3$ (5 eq). Valutato il raggiungimento della completezza della reazione mediante TLC, le due fasi vengono separate e la fase organica viene di seguito lavata con una soluzione acquosa al 5% (w/v) di $NaHCO_3$, acqua, una soluzione acquosa satura di NaCl, seccata su sodio solfato anidro ed il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo grezzo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1 o per ricristallizzazione da DCM/Et_2O o acetone/esano.

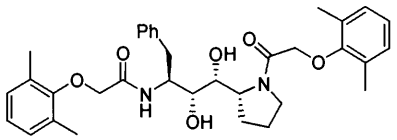
B) Il peptide N-protetto (o generica catena laterale da coniugare) (1 eq) viene disciolto in DCM anidro, raffreddato a –15 °C, addizionato di NMM (2 eq), 1.1 eq di isobutilcloroformiato e lasciato a –15 °C per 1-2 h. Si aggiunge quindi il diamminodiolo deprotetto all'estremità amminica, si lascia in agitazione per 1 h alla stessa temperatura e poi temperatura ambiente per 16 h. La soluzione viene quindi versata in acqua ed estratta con DCM (2x); le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa di acido citrico (10% w/v), acqua, una soluzione acquosa satura di NaCl,

anidrificate su sodio solfato anidro ed il solvente quindi rimosso mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo grezzo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1 o per ricristallizzazione da DCM/Et_2O o acetone/esano.

C) Il peptide N-protetto (o generica catena laterale da coniugare) (1 eq) viene disciolto in DMF anidra, addizionato di PYBOB (1 eq), HOBT (1 eq), *sin*-collidina (2 eq) ed il nucleo centrale. La reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di Argon fino a completezza; il solvente viene quindi allontanato mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo ripartito tra etil acetato e acqua. La fase organica viene quindi lavata con una soluzione acquosa di $KHSO_4$ (5% w/v), acqua, una soluzione acquosa satura di $NaHCO_3$, una soluzione acquosa satura di NaCl e seccata su sodio solfato anidro. Una volta allontanato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo grezzo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1 o per ricristallizzazione da DCM/Et_2O o acetone/esano.

D) Ad una soluzione di peptide (o generica catena laterale da coniugare) (1 eq) ed N-idrossisuccinimmide (1 eq) in diossano anidro si aggiunge, sotto agitazione, dicicloesilcarbodiimmide (1 eq). La miscela viene agitata per 2 ore a temperatura ambiente, quindi si filtra il precipitato e si elimina il solvente mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene purificato sciogliendolo in acetato di etile e filtrando il residuo insolubile. Il solvente viene eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo grezzo può essere purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1 o per ricristallizzazione da DCM/Et_2O o acetone/esano.

La generica catena laterale attivata (1 eq) viene quindi aggiunta ad una soluzione del nucleo centrale (1 eq) in diclorometano soluzione dell'alcool deprotetto in presenza di trietilammina (TEA) o N-metilmorfolina (NMM) (1 eq). Dopo 12 ore la miscela viene lavata con una soluzione di acido cloridrico diluito, con una soluzione satura di bicarbonato di sodio e infine con una soluzione acquosa satura di NaCl; viene poi seccata su Na_2SO_4 anidro ed il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1.

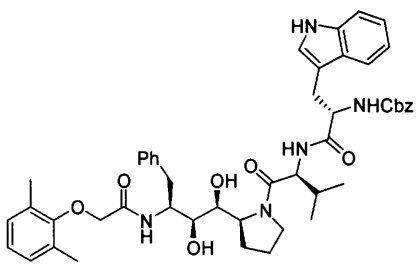


Inibitore DmPoa-Phe-[Φ]-Pro-DmPoa (180)

L'inibitore viene sintetizzato seguendo la metodologia generale per la sintesi dei peptidi a partire da acido-2,6-dimetil-fenossiacetico (DmPoa) **172** (67.2 mg, 0.37 mmol), HOBT (50 mg, 0.37 mmol), NMM (82 μL, 0.75 mmol), EDC (86 mg, 0.45 mmol) e diamminodiolo **68** deprotetto dal Boc secondo la metodologia generale (46.7 mg, 0.18 mmol). Si ottengono 64 mg (60%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 1.92 (m, 3H, C$\underline{H}_2$ e $\underline{H}$CH); 2.17 (s, 6H, 2xC$\underline{H}_3$); 2.23 (m, 1H, HC$\underline{H}$); 2.27 (s, 6H, 2xC$\underline{H}_3$); 3.03 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$Ph, J_1=8.8 Hz, J_2=14.3 Hz); 3.25 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$, J_1=5.1 Hz, J_2=9.1 Hz); 3.37 (dd, 1H, C$\underline{H}_2$, J_1=6.9 Hz, J_2=9.1 Hz); 3.40 (m, 3H, C$\underline{H}_2$Ph e C$\underline{H}$OH); 3.50 (m, 1H, C$\underline{H}$OH); 3.93 (d, 1H, O$\underline{H}$, J=6.2 Hz); 4.11 (dd, 2H, C$\underline{H}_2$O; J_1=15.4 Hz, J_2=24.5 Hz); 4.20-4.39 (m, 6H, C$\underline{H}$NH, C$\underline{H}_2$O); 4.54 (d, 1H, O$\underline{H}$, J=4.7 Hz); 6.97 (m, 6H, C$\underline{H}$ Ar e N$\underline{H}$); 7.25 (m, 7H, C$\underline{H}$ Ar).

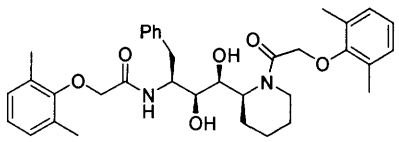
^{13}C-NMR (δ-$CDCl_3$): 16.32 ($\underline{C}H_3$); 16.42 ($\underline{C}H_3$); 23.67 ($\underline{C}H_2$); 27.06 ($\underline{C}H_2$); 38.78 ($\underline{C}H_2$Ph); 46.56 ($\underline{C}H_2$N); 52.58 ($\underline{C}$HNH); 60.78 ($\underline{C}$HNH); 68.62 ($\underline{C}H_2$O); 70.44 ($\underline{C}$HOH); 70.52 ($\underline{C}H_2$O); 73.22 ($\underline{C}H_2$OH); 124.64, 126.59 ($\underline{C}$ Ar); 128.51, 129.10, 129.58, 130.62, 130.71 ($\underline{C}$H Ar); 138.06, 154.40, 155.50 ($\underline{C}$ Ar); 169.05, 169.55 ($\underline{C}$ONH).



Inibitore DmPoa-Phe-[Φ]-Pro-Val-Trp-NH-Cbz (249)

Questo inibitore è stato sintetizzato introducendo direttamente il peptide N-Cbz-TrpVal-OH e quindi il DmPoa. Si ottengono 128 mg (58%) di solido bianco secondo la metodologia generale per la sintesi peptidica C, partendo da N-Cbz-TrpVal-OH (125 mg, 0.28 mmol), acido-2,6-dimetil-fenossiacetico (DmPoa) **172** (41 mg, 0.23 mmol) e diamminodiolo **41b** (98 mg, 0.28 mmol)

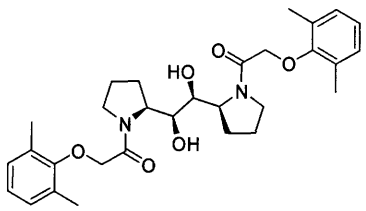
ESI-MS (m/z): 870.4 $[MK]^+$, 854.5 $[MNa]^+$, 849.4 $[MNH_4]^+$, 832.3 $[MH]^+$



Inibitore DmPoa-Phe-[Φ]-Pip-DmPoa (181)

L'inibitore viene sintetizzato seguendo la metodologia generale A per la sintesi degli inibitori, a partire da acido-2,6-dimetil-fenossiacetico (DmPoa) **172** (65.3 mg, 0.36 mmol) e diamminodiolo **80** deprotetto dal Boc secondo la metodologia generale (55.2 mg, 0.15 mmol). Si ottengono 41 mg (46%) di un solido bianco.

ESI-MS (m/z): 611.7 $[MNa]^+$, 589.7$[MH]^+$

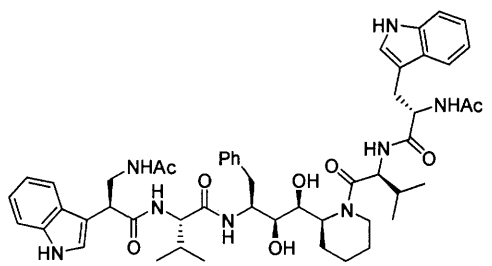


Inibitore DmPoa-Pro-[Φ]-Pro-DmPoa (182)

L'inibitore viene sintetizzato seguendo la metodologia generale per la sintesi dei peptidi a partire da acido-2,6-dimetil-fenossiacetico (DmPoa) **172** (57.4 mg, 0.32 mmol), HOBT (43 mg, 0.32 mmol), NMM (70 μL, 0.64 mmol), EDC (73 mg, 0.38 mmol) e diamminodiolo **144** deprotetto dal Boc secondo la metodologia generale (32 mg, 0.16 mmol). Si ottengono 56.1 mg (67%) di un olio giallino.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 1.94-1.98 (m, 2H, CH_2); 2.24 (brs, 7H, $CH\underline{H}CH_\alpha$ e CH_3 x2); 2.36 (m, 1H, $C\underline{H}HCH_\alpha$); 3.25 (m, 1H, $C\underline{H}OH$); 3.43-3.49 (m, 2H, CH_2N); 4.35-4.45 (m, 3H, $C\underline{H}NH$, $C\underline{H}_2O$); 4.93 (d, 1H, $O\underline{H}$, J=4.4 Hz); 6.95-7.01 (m, 3H, $C\underline{H}$ Ar)

^{13}C-NMR (δ-$CDCl_3$): 16.37 ($\underline{C}H_3$); 23.66 ($\underline{C}H_2$); 27.16 ($\underline{C}H_2$); 46.65 ($\underline{C}H_2N$); 59.29 ($\underline{C}HNH$); 70.39 ($\underline{C}H_2O$); 70.91 ($\underline{C}HOH$); 124.56 (C_4 Ar); 129.08 (C Ar); 130.72 (C Ar); 155.64 (C_{Ar}-O); 169.36 (CO)

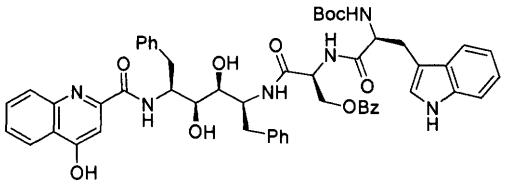


Inibitore N-Ac-TrpVal-Phe-[Φ]-Pip-ValTrp-N-Ac (183)

L'inibitore viene sintetizzato seguendo la metodologia generale B per la sintesi degli inibiori, a partire da N-Ac-TrpVal-COOH **179** (224 mg, 0.65 mmol), NMM (183 μL,

1.3 mmol), *i*BuCOCl (84 μL, 0.65 mmol) e diamminodiolo **80** deprotetto dal Boc secondo la metodologia generale (118.5 mg, 0.32 mmol). Si ottengono 146 mg (49%) di un solido giallino.

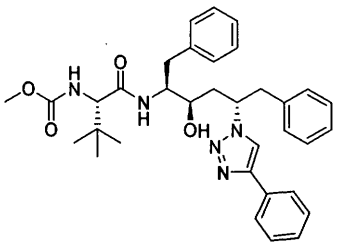
ESI-MS (m/z): 870.4 $[MK]^+$, 854.5 $[MNa]^+$, 849.4 $[MNH_4]^+$, 832.3 $[MH]^+$



Inibitore Kyn-Phe-[Φ]-Phe-Ser(OBz)-Trp-NH-Boc (248)

Questo inibitore è stato sintetizzato introducendo gli amminoacidi in catena laterale uno dopo l'altro nell'ordine: Kyn, N-Boc-(OBz)-serina, NH-Boc-triptofano. Si ottengono 176 mg (65%) di solido bianco secondo la metodologia generale per la sintesi peptidica, partendo da acido chinurenico (Kyn) (57 mg, 0.3 mmol), N-Boc-(OBz)-serina (72 mg, 0.24 mmol), NH-Ac-triptofano (39 mg, 0.15 mmol) e diamminodiolo PhePhe (120.5 mg, 0.3 mmol).

ESI-MS (m/z): 973.5 $[MK]^+$, 957.7 $[MNa]^+$, 935.5 $[MH]^+$

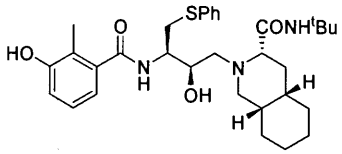


Metil (*S*)-1-(2*S*,3*R*,5*S*)-3-idrossi-1,6-difenil-5-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-esan-2-ilcarbamoil)-2,2-dimetilpropilcarbammato (186)

L'inibitore viene sintetizzato seguendo la metodologia generale per la sintesi dei peptidi a partire da N-metossi-L-*tert*-leucina **187** (9.5 mg, 0.05 mmol), HOBT (7 mg, 0.05 mmol), NMM (11 μL, 0.1 mmol), EDC (11.6 mg, 0.06 mmol) e nucleo centrale **167** deprotetto dal Boc secondo la metodologia generale (25.8 mg, 0.05 mmol). Si ottengono 22.9 mg (78%) di solido giallino.

^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 0.34 [s, 9H, $C(C\underline{H}_3)_3$]; 1.41 (m, 1H, C<u>H</u>H); 1.78 (m, 1H, CH<u>H</u>); 1.99 (m, 1H, C<u>H</u>H); 2.4 (m, 1H, C<u>H</u>H); 2.48 (m, 1H, CHO); 2.74 (m, 2H, CH_2Ph); 3.03 (s, 3H, OCH_3); 3.35 (m, 2H, C<u>H</u>NH e OH); 4.58 (m, 2H, C<u>H</u>NH e CHN); 6.17 (d, 1H, NH, J=9.9 Hz); 6.59-6.97 (m, 12H, Ar); 7.22 (d, 1H, NH, J=8.4 Hz); 7.34 (m, 3H, Ar); 7.93 (s, 1H, C=CH); **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d_6): 26.66 [$C(\underline{C}H_3)_3$]; 33.82 ($C(\underline{C}H_3)_3$); 36.47 (CH_2); 38.55 (CH_2); 41.76 (CH_2); 51.53 (CH_3O); 55.59 (CHN); 59.71

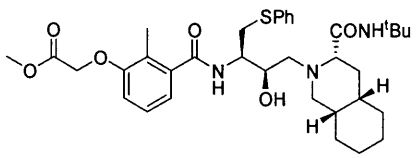
(CHNH); 62.72 (CHNH); 68.56 (CHOH); 121.12-131.25 (C Ar); 137.52 (C_1 Ar); 139.13 (C_1 Ar); 145.82 (C Ar); 156.51 (CO); 170.0 (CO)



Nelfinavir (245)

Una compressa di Viracept® contenente 295 mg di Nelfinavir mesilato viene triturata in mortaio e poi sospesa in 10 mL di etanolo. La sospensione viene agitata vigorosamente per 30 minuti, quindi filtrata. Il solido viene risospeso in 5 mL di etanolo e agitato nuovamente per 30 minuti. Si filtra e la soluzione viene portata a secco mediante distillazione a pressione ridotta; si effettua quindi una cromatografia flash su colonna di gel di silice, usando come eluente una miscela 90:10:1 di cloroformio, metanolo e trietilammina. Si ottengono 250 mg di Nelfinavir.

^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 1.15 (s, 9H, tBu); 1.23-1.35 (m, 3H, CH_2 e CHH); 1.47-1.60 (m, 5H, CH_2 x2 e CH dec); 1.60-1.85 (m, 2H, C<u>H</u>H e CH dec); 1.85-2.07 (m, 2H, C<u>H</u>HN e CHHN dec); 2.13 (s, 3H, CH_3Ar); 2.50 (m, 2H, CHN dec e CH<u>H</u>N); 2.95 (m, 1H, CH<u>H</u>N dec); 3.15 (m, 1H, C<u>H</u>HSPh); 3.56 (m, 1H, CH<u>H</u>SPh); 3.93 (m, 1H, CHOH); 4.31 (m, 1H, CHNH); 4.81 (bs, 1H, NH*t*Bu); 6.79 (d, 1H, CH Ar, J = 2.9 Hz); 6.81 (d, 1H, CH Ar, J = 2.2 Hz); 6.98 (m, 1H, NH, J = 8.8 Hz); 7.15 (m, 1H, CH Ar); 7.27 (m, 2H, CH Ar); 7.48 (m, 2H, CH Ar); 7.89 (d, 1H, NH, J = 8.8 Hz); 9.38 (bs, 1H, OH fenolo). **^{13}C-NMR** (δ-DMSO-d6): 13.2 (CH_3); 20.9 (CH_2); 25.7 (CH_2); 26.4 (CH_2); 28.8 [C(<u>C</u>H_3)$_3$]; 30.5 (CH_2); 31.2 (CH_2); 32.2 (CH_2SPh); 33.9 (CH); 36.1 (CH); 50.5 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 51.5 (CHNH); 58.5 (CH_2N); 59.0 (CH_2N); 69.1 (CHOH); 69.4 (CHN); 115.7 (Ar); 118.3 (Ar); 122.0 (Ar); 125.5 (Ar <u>C</u>-CH_3); 126.2 (Ar); 128.3 (Ar); 129.2 (Ar); 137.5 (Ar <u>C</u>-CO); 139.9 (Ar <u>C</u>-SPh); 155.9 (Ar <u>C</u>-OH); 169.8 (CO); 173.6 (CO); **ESI-MS** (m/z): 568 $[MH]^+$, 590 $[MNa]^+$.

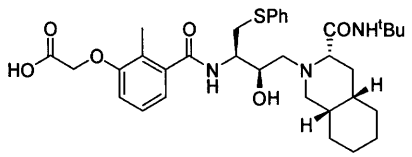


Nelfinavir acetato di metile (271)

Una sospensione di 250 mg (0.44 mmol) di Nelfinavir **245**, 50 mL (0.53 mmol) di bromoacetato di metile e 608 mg (0.44 mmol) di K_2CO_3 in acetone anidro viene mantenuta sotto agitazione e riscaldata a riflusso per 3 giorni. Successivamente tale

sospensione viene portata a temperatura ambiente e filtrata. Si rimuove il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, purificando poi il prodotto mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, usando come eluente una miscela 95 : 5 diclorometano/metanolo. Si ottengono 260 mg (0.41 mmol, 92%) di un olio incolore.

^{1}H-NMR (δ-$CDCl_3$): 1.07 [s, 9H, $C(CH_3)_3$]; 1.2-1.5 (m, 5H); 1.5-1.8 (m, 4H); 1.9-2.2 (m, 4H); 2.33 (s, 3H, CH_3Ar); 2.45 (m, 1H); 2.55 (m, 2H); 2.92 (dd, 1H, C<u>H</u>HN, J=1.6, 11.4 Hz); [3.41 (dd, 1H; J=4.8, 13.6 Hz) e 3.73 (dd, 1H; J=9.1, 13.6 Hz) CH_2SPh]; 3.79 (s, 3H, CH_3O); 4.07 (m, 1H, C<u>H</u>OH); 4.47 (m, 1H, C<u>H</u>NH); 4.63 (s, 2H, COC<u>H_2</u>OAr); 5.68 (bs, 1H, NH^{t}Bu); 6.75 (m, 1H, Ar H in orto a OAr); 7.12-7.30 (m, 6H, Ar e C<u>H</u>NH); 7.43 (d, 2H, CH Ar, J=7.3 Hz). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 12.8 (CH_3Ar); 20.4 (CH_2); 25.9 (CH_2); 26.2 (CH_2); 28.2 (CH_2); 28.3 [C(<u>C</u>H_3)$_3$]; 30.8 (CH_2); 33.6 (CH_2SPh); 35.2 (CH_2<u>C</u>HCH_2 dec); 36.0 (CH_2<u>C</u>HCH_2 dec); 51.0 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 52.1 (CH_3O); 54.4 (CHNH); 58.6 (CH_2N); 59.5 (CH_2N); 65.8 (CH_2O); 70.2 (CHOH); 70.4 (CO<u>C</u>HN); 113.0 (Ar); 120.9 (Ar); 126.1 (Ar); 126.2 (Ar); 126.3 (Ar); 128.9 (Ar); 129.9 (Ar); 135.7 (Ar); 137.7 (Ar); 156.3 (Ar C-O); 169.3 (CO); 171.3 (CO); 173.9 (CO). **ESI-MS** (m/z): 641 $[MH]^+$; 662 $[MK]^+$; 1280 $[2MH]^+$.

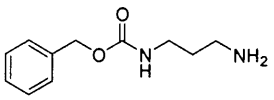


Nelfinavir acetato (251)

70 mg (0.11 mmol) di Nelfinavir acetato di metile **271** vengono sciolti in 3 mL di diossano; si aggiungono 0.22 mL di una soluzione 0.5 M di litio idrossido (0.11 mmol) e si agita la miscela a temperatura ambiente per 30 minuti. Si neutralizza la soluzione con HCl 1M e si elimina il solvente mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene ripreso con acetato di etile e la fase organica viene lavata con acqua e NaCl saturo e poi seccata su sodio solfato anidro. Il solvente viene eliminato mediante distillazione a pressione ridotta, ottenendo 43 mg (63%) di un solido bianco.

^{1}H-NMR (δ-acetone-d_6): 1.22 [s, 9H, $C(CH_3)_3$]; 1.34-1.80 (m, 12H); 2.29 (s, 3H, CH_3Ar); 2.63-3.05 (m, 2H); 3.28 (m, 2H); 3.53-3.76 (m, 3H); 4.12 (m, 2H, CH_2O); 4.28 (m, 2H, C<u>H</u>OH, C<u>H</u>NH); 6.68 (m, 1H, Ar); 6.85 (m, 1H, Ar); 6.98 (m, 1H, Ar); 7.00-7.48 (m, 7H, Ar, NH x 2). **^{13}C-NMR** (δ-acetone-d_6): 12.7 (CH_3); 13.8 (CH_2); 22.8 (CH_2); 26.1 (CH_2); 28.2 [C(<u>C</u>H_3)$_3$]; 33.2 (CH_2); 34.6 (CH); 36.2 (CH); 40.2 (CH_2SPh); 51.2 [<u>C</u>(CH_3)$_3$]; 53.1 (CHNH); 59.7 (CH_2N); 65.6 (CH_2N); 66.3 (CH_2O); 69.1 (CHOH);

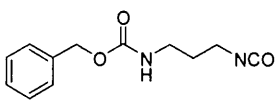
70.7 (CHN); 112.7 (Ar); 120.3 (Ar); 126.0 (Ar); 126.4 (Ar); 128.6 (Ar); 129.2 (Ar); 129.4 (Ar); 137.1 (Ar); 139.1 (Ar); 156.8 (Ar); 170.2 (CO); 170.3 (CO); 170.4 (CO); **ES-MS** (m/z): 626 $[MH]^+$; 648 $[MNa]^+$.



N-(benzilossicarbonil)-1,3-propandiammina (252)

Ad una soluzione di 1,3-diamminopropano (1 mL) in CH_2Cl_2 (60 ml) in bagno a ghiaccio viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di benzilcloroformiato (0.5 eq) in CH_2Cl_2 (25 mL); il sistema è lasciato sotto agitazione in bagno a ghiaccio per circa 1 h, controllando alla TLC l'andamento della reazione (eluente: $CHCl_3$: EtOH : NH_3OH = 6.5 : 3 : 0.5) evidenziando le macchie con vapori di iodio. Al termine della reazione, si filtra la soluzione su filtro a pieghe per separare il precipitato bianco formatosi (ammina diprotetta) e la si estrae con una soluzione 0.1 N di HCl (controllando l'acidità del pH della fase acquosa). Portato il pH della fase acquosa ad un valore compreso tra 8.5 e 9, la si è estratta con CH_2Cl_2 per separare ammina libera e ammina monoprotetta. Dall'eliminazione del CH_2Cl_2 al Rotavapor si ottiene un olio di colore giallo che, una volta ripreso con Et_2O in bagno a ghiaccio, fornisce 212 mg (50%) di un solido bianco identificato con l'N-Z-1,3-diamminopropano.

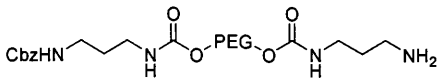
P.f.: 83-84 °C; **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.63 (tt, 2H, CH_2, J= 6.6, 6.6 Hz); 2.77 (t, 2H, CH_2, J=6.6 Hz); 3.28 (m, 2H, CH_2); 5.08 (s, 2H, CH_2O); 5.45 (br, 1H, NHCO); 7.28-7.35 (m, 5H, Ar). **^{13}C-NMR** (δ-$CDCl_3$): 32.6 (CH_2); 39.1(CH_2); 39.6 (CH_2); 66.6 (CH_2); 128.1 (Ar); 136.6 (Ar C_1); 156.6 (CO)



Benzil-3-isocianato propil carbammato (253)

Trifosgene (296 mg, 1 mmol) viene disciolto in CH_2Cl_2 anidro (3 ml) e lasciato sotto agitazione in atmosfera di Argon; si aggiunge, goccia a goccia nel corso di 30 minuti, una soluzione costituita da 2,6-lutidina (300 μl) e N-Z-1,3-diamminopropano **252** (208 mg, 1 mmole). Il sistema viene lasciato sotto agitazione in atmosfera di Argon per circa 1.5 h; il solvente viene quindi eliminato mediante distillazione a pressione ridotta, ottenendo un olio rossastro, da cui, per aggiunta di Et_2O, precipita un solido identificato con la mono-ammina non derivatizzata, la cui eliminazione per filtrazione consente di recuperare un olio nero (75%).

IR (film liquido, cm^{-1}): 2275 (NCO); 1713 (CO); **^{1}H-NMR** (δ-$CDCl_3$): 1.6 (m, 2H, CH_2); 2.8 (t, 2H, CH_2); 3.3 (m, 2H, CH_2); 5.12 (s, 2H, CH_2O); 5.45 (br, 1H, NHCO); 7.29-7.4 (m, 5H, Ar). **^{13}C NMR** (δ-$CDCl_3$): 31.4 (CH_2); 38.2 (CH_2); 39.6 (CH_2); 40.3 (CH_2); 66.8 (CH_2); 122.1 (NCO); 128.1-128.6 (Ar); 136.6 (Ar C_1); 156.7 (CO)



Z-NH(CH_2)$_3$-CO-O-PEG-O-CO-(CH_2)$_3$-NH_2 (256)

Stagno dibutil-dilaurato (20 μl) viene aggiunto a OH-PEG_{6000}-OH (1.0 g, 0.167 mmol), precedentemente ricristallizzato, coevaporato con CH_2Cl_2 anidro (x2) ed asciugato alla pompa rotativa. La soluzione così ottenuta viene aggiunta goccia a goccia ad una seconda soluzione contenente benzil-3-isocianato propil carbammato (2.5 eq) in diclorometano anidro (3 mL). Il sistema viene lasciato sotto agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon per 18 h; il prodotto viene precipitato per aggiunta di terbutil-metil etere (MTBE) in bagno a ghiaccio, filtrato su Gooch 3G, lavato di seguito con etere dietilico e quindi ricristallizzato da etanolo caldo/freddo. La miscela di PEG-derivati così ottenuta (1 g, 0.167 mmol) viene coevaporata con diclorometano anidro (x 2) e fatta asciugare alla pompa rotativa; il residuo viene quindi disciolto in una miscela di solventi (3.5 mL di CH_2Cl_2, 1 mL di CH_3CN e 0.5 mL di piridina anidri) e fatto reagire con N,N'-(disuccinimidil)carbonato (171 mg, 0.668 mmol). Lasciato il sistema 16 h in agitazione a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon, il prodotto viene fatto precipitare per aggiunta di MTBE in bagno a ghiaccio, filtrato su Gooch 3G, lavato con etere dietilico e ricristallizzato da etanolo caldo/freddo. 1 g del prodotto grezzo così ottenuto viene coevaporato con diclorometano anidro (x 2), fatto asciugare alla pompa rotativa, quindi sciolto nella minima quantità di CH_2Cl_2 anidro e fatto reagire con 1,3-diaminopropano (3 eq). Il sistema viene lasciato in agitazione per 18 h a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon, quindi fatto precipitare per aggiunta di MTBE in bagno a ghiaccio, filtrato su Gooch 3G, lavato con etere dietilico e ricristallizzato da etanolo caldo/freddo.

a) Purificazione su colonna a scambio cationico

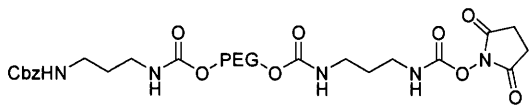
La miscela di PEG-derivati precedentemente ottenuta (1.0 g) viene fatta passare attraverso una colonna (2.5 x 30 cm) impaccata con SP-Sephadex C50 equilibrata in acqua milliQ. Le frazioni (10 ml) vengono raccolte utilizzando un flusso pari a 1.40 ml/min, continuando l'eluizione finchè si rileva assorbimento UV/Vis a 260 nm, dovuto alla presenza del gruppo Cbz.; a questo punto, il prodotto desiderato può essere

recuperato eluendo con una soluzione 0.1 M di HCl in H_2O milliQ. Le frazioni contenenti il H_2N-CO-O-PEG-O-CO-NH-Z, una volte riunite, vengono evaporate mediante distillazione a pressione ridotta ad una temperatura non superiore ai 35°C. Il solido bianco così ottenuto viene quindi sciolto in acetonitrile anidro e filtrato per eliminare eventuali tracce di sali presenti. La fase organica viene di seguito seccata su Na_2SO_4, concentrata mediante distillazione a pressione ridotta ed il PEG-derivato viene fatto precipitare per aggiunta di MTBE in bagno a ghiaccio, filtrato su Gooch 3G, lavato con etere dietilico e conservato su KOH anidro. Il grado di funzionalizzazione viene valutato Tramite analisi spettrofotometrica (test del TNBS) si determina un grado di funzionalizzazione pari a 0.98 moli di gruppi NH_2 per mole di Z-NH$(CH_2)_3$-CO-O-PEG-O-CO-$(CH_2)_3$-NH_2, ottenendo 400 mg di prodotto puro.

b) Purificazione in "batch"

40 ml di resina SP-Sephadex C50 vengono sospesi in H_2O milliQ, equilibrati ed addizionati di 2.0 g della miscela di prodotti disciolti in 10 mL di H_2O milliQ, lasciando il sistema così ottenuto sotto moderata agitazione per circa mezz'ora. La resina viene quindi lavata, su Gooch 3G, con 150 mL di H_2O milliQ; una volta eliminata l'acqua mediante distillazione a pressione ridotta, si recuperano 1.25 g del PEG-derivato di-derivatizzato. La resina viene quindi trattata con 90 mL di una soluzione acquosa 0.1 M di HCl; il solvente viene quindi eliminato mediante distillazione a pressione ridotta, ottenendo un solido bianco che viene nuovamente disciolto in acetonitrile anidro, filtrato per eliminare eventuali tracce di sali presenti e precipitato da MTBE, ottenendo così 0.65 g del prodotto desiderato.

^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 1.5 (m, 2H, CH_2); 1.7 (m, 2H, CH_2); 2.8 (t, 2H, C$\underline{H_2}$NH$_2$); 2.9-3.1 (m, 6H, C$\underline{H_2}$NHCO); 3.2-3.8 (m, 588H, PEG_{6000}); 4.0 (s, 4H, PEG-C$\underline{H_2}$-O-linker); 5.12 (s, 2H, CH_2 Cbz); 7.1 (brs, 2H, NHCO); 7.29-7.4 (m, 6H, Ar e NHCO); 7.7 (brs, 2H, NH_2)



Z-NH$(CH_2)_3$-CO-O-PEG-O-CO-$(CH_2)_3$-NHOSu (257)

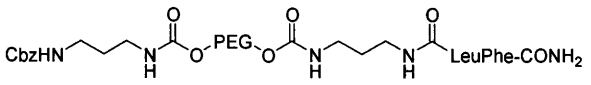
Z-NH$(CH_2)_3$-CO-O-PEG-O-CO-$(CH_2)_3$-NH_2 **256** (250 mg, 0.039 mmol) viene coevaporato con CH_2Cl_2 anidro (x2) ed asciugato alla pompa rotativa. Il PEG-derivato viene quindi disciolto in una miscela di solventi (3.5 mL di CH_2Cl_2, 1 mL di CH_3CN e 0.5 mL di piridina anidri) e fatto reagire con N,N'-(disuccinimidil)carbonato (40 mg,

0.158 mmol), mantenendo il pH tra 8 e 9 per aggiunta di trietilammina (TEA). Il sistema viene lasciato sotto agitazione per 18 h a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon, quindi precipitato da etere dietilico in bagno a ghiaccio, filtrato su Gooch 3G, lavato con etere dietilico e quindi ricristallizzato da etanolo caldo/freddo.

^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 1.48 (m, 2H, CH_2); 1.7 (m, 2H, CH_2); 2.7 (s, 4H, CH_2 x2); 2.8 (t, 2H, C$\underline{H_2}$NH$_2$); 2.8-3.06 (m, 8H, C$\underline{H_2}$NHCO x4); 3.2-3.8 (m, 588H, PEG_{6000}); 4.0 (s, 4H, PEG-C$\underline{H_2}$-O-linker); 5.10 (s, 2H, CH_2 Cbz); 7.1 (brs, 2H, NHCO); 7.27-7.4 (m, 7H, Ar e NHCO)

Procedura generale per il coupling dei peptidi sul PEG attivato

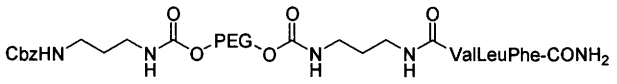
Z-NH(CH_2)$_3$-CO-O-PEG-O-CO-(CH_2)$_3$-NH-OSu **257** (1 eq) viene coevaporato con CH_2Cl_2 anidro (x2) ed asciugato alla pompa rotativa. Il PEG-derivato viene quindi disciolto nella minima quantità di CH_2Cl_2 e fatto reagire con l'NH$_2$-peptide (5 eq), mantenendo il pH tra 8 e 9 per aggiunta di trietilammina (TEA). Il sistema viene lasciato sotto agitazione per 18 h a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon, quindi precipitato da etere dietilico in bagno a ghiaccio, filtrato su Gooch 3G, lavato con etere dietilico e quindi ricristallizzato da etanolo caldo/freddo.



Z-NH(CH_2)$_3$-CO-O-PEG-O-CO-(CH_2)$_3$-NH-LeuPhe-CONH$_2$ (261)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 98 mg (98%) a partire da Z-PEG-NH-OSu **257** (100 mg) e NH$_2$-LeuPhe-CONH$_2$ **247** (21 mg).

^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 0.8-0.9 (m, 6H, CH_3 x2); 1.2 (m, 2H, CH_2); 1.4-1.6 (m, 5H, CH_2 x2 e CH(CH_3)$_2$); 2.9 (s, 4H, CH_2 x2); 2.8-3.06 (m, 8H, C$\underline{H_2}$NHCO x4); 3.2-3.8 (m, 588H, PEG_{6000}); 4.0 (m, 5H, PEG-C$\underline{H_2}$-O-linker e C$\underline{H}$NH); 4.4 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.10 (s, 2H, CH_2 Cbz); 6.1 (m, 2H, NH); 7.27-7.4 (m, 12H, Ar e NHCO); 7.8 (m, 1H, NHCO)

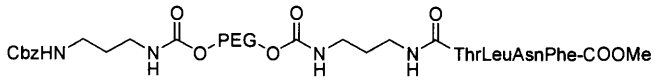


Z-NH(CH_2)$_3$-CO-O-PEG-O-CO-(CH_2)$_3$-NH-ValLeuPhe-CONH$_2$ (262)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 100 mg (94%) a partire da Z-PEG-NH-OSu **257** (100 mg) e NH$_2$-ValLeuPhe-CONH$_2$ **246** (50 mg).

^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 0.7-0.9 (m, 12H, CH_3 x4); 1.2 (m, 2H, CH_2); 1.4-1.6 (m, 6H, CH_2 x2 e CH(CH_3)$_2$ x2); 2.9 (s, 4H, CH_2 x2); 2.8-3.06 (m, 8H, C$\underline{H_2}$NHCO x4); 3.2-3.8

(m, 588H, PEG_{6000}); 4.0 (m, 5H, PEG-C$\underline{H}_2$-O-linker e C$\underline{H}$NH); 4.2 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 4.4 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 5.10 (s, 2H, CH_2 Cbz); 6.1 (m, 2H, NH); 7.1-7.4 (m, 12H, Ar e NHCO); 7.8 (m, 1H, NHCO); 7.9 (m, 1H, NHCO)



Z-NH(CH_2)$_3$-CO-O-PEG-O-CO-(CH_2)$_3$-NH-ThrLeuAsnPhe-COOMe (263)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 102 mg (98%) a partire da Z-PEG-NH-OSu **257** (100 mg) e NH_2-ThrLeuAsnPhe-OMe **240a** (39 mg).

^{1}H-NMR (δ-DMSO-d_6): 0.7-0.08 (m, 6H, CH_3 x2); 1.0 (d, 3H, CH_3, J=5 Hz); 1.4-1.6 (m, 6H, CH_2 x2 e C$\underline{H}$(CH_3)$_2$); 2.4 (m, 1H, C$\underline{H}$(CH_3)OH); 2.9 (s, 4H, CH_2 x2); 2.8-3.06 (m, 8H, C$\underline{H}_2$NHCO x4); 3.2-3.8 (m, 588H, PEG_{6000}); 4.0 (m, 5H, PEG-C$\underline{H}_2$-O-linker e C$\underline{H}$NH); 4.2 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 4.4 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 4.6 (m, 1H, C$\underline{H}$NH); 4.9 (m, 1H, NH); 5.10 (s, 2H, CH_2 Cbz); 6.1 (m, 1H, NH); 6.3 (m, 1H, NH); 6.9 (m, 1H, NH); 7.1-7.4 (m, 12H, Ar e NHCO); 7.8 (m, 1H, NHCO); 8.0 (m, 1H, NHCO); 8.1 (m, 1H, NHCO)

Procedura generale per il coupling degli inibitori del sito catalitico sul PEG-NH_2

Lo Z-PEG-peptide viene sciolto in metanolo, addizionato di Pd/C al 5% (10% in peso rispetto al substrato) e HCl concentrato fino a pH 2, lasciando quindi in agitazione per 16 h a temperatura ambiente ed in atmosfera di H_2. La miscela viene filtrata su celite, il solvente allontanato mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene ripetutamente coevaporato con acetonitrile (2x), quindi precipitato da etere dietilico in bagno a ghiaccio, filtrato su Gooch 3G, lavato con etere dietilico e ricristallizzato da etanolo caldo/freddo.

L'inibitore peptidomimetico (1 eq), una volta deprotetto secondo le metodologie generali descritte, viene disciolto in diclorometano, raffreddato a 0 °C, addizionato di p-NO_2-fenil cloroformiato (1 eq) e NMM (1.2 eq). La soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 h, lavata con una soluzione acquosa al 10% (w/v) di $NaHCO_3$ (2x), con una soluzione acquosa al 10% (w/v) di acido citrico, con una soluzione acquosa satura di NaCl e seccata su Na_2SO_4 anidro; eliminato il solvente mediante distillazione a pressione ridotta, il residuo viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

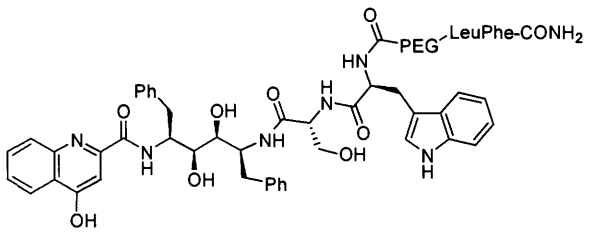
L'NH_2-(CH_2)$_3$-CO-O-PEG-O-CO-(CH_2)$_3$-NH-peptide cloridrato (1 eq) viene coevaporato con CH_2Cl_2 anidro (2x) ed asciugato alla pompa rotativa. Il PEG-derivato

viene quindi disciolto nella minima quantità di CH_2Cl_2 e fatto reagire con il peptidomimetico attivato (5 eq), mantenendo il pH tra 8 e 9 per aggiunta di trietilammina (TEA). Il sistema viene lasciato sotto agitazione per 18 h a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon, quindi precipitato da etere dietilico in bagno a ghiaccio, filtrato su Gooch 3G, lavato con etere dietilico e quindi ricristallizzato da etanolo caldo/freddo.

La completa rimozione del gruppo Cbz, così come la completa funzionalizzazione dell'estremità amminica del PEG con l'inibitore del sito catalitico, sono state valutate tramite spettrofotometria UV, mediante il saggio del TNBS per la misura della percentuale dei gruppi amminici liberi. In un matraccio da 10 mL si pesano circa 2 mg di PEG-derivato (pesata esatta), si aggiungono 9 mL di tampone borato 0.1 M (pH 9.3) e 250 μL di una soluzione 0.03 M di TNBS in tampone borato 0.1 M, portando poi a volume con lo stesso tampone. L'assorbanza viene misurata dopo 30 minuti ad una lunghezza d'onda di 421 nm, in corrispondenza della quale è stato determinato un coefficiente di estinzione molare pari a 12850.

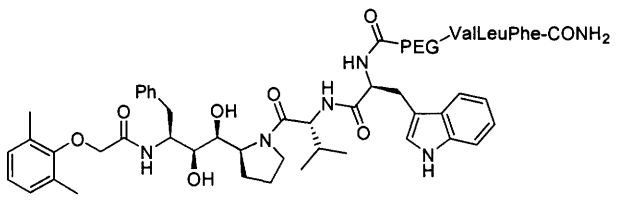
$$\mu\text{moli/g} = \frac{A_\lambda \cdot \varepsilon^{-1} \cdot 10^6 \cdot \text{mL(solvente)}}{\text{mg di prodotto}}$$

Dall'equazione sopra descritta si ricava la percentuale di gruppi amminici ancora liberi.



Kyn-Phe-[Φ]-Phe-Ser-Trp-NH-CO-NH$(CH_2)_3$-CO-O-PEG-O-CO-$(CH_2)_3$-NH-LeuPhe-$CONH_2$ (264)

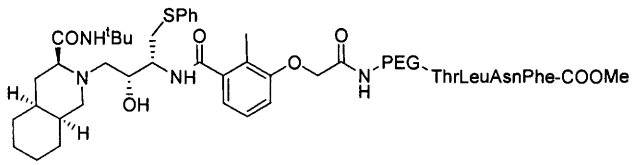
Si ottengono, secondo la metodologia generale, 68 mg (76%) a partire da Z-PEG-NH-LeuPhe-$CONH_2$ **261** (100 mg) e Kyn-Phe-[Φ]-Phe-Ser-Trp-NH-p-NO_2-Ph **267** (15 mg). Percentuale di NH_2 liberi: 0.6%



DmPOA-Phe-[Φ]-Pro-Val-Trp-NH-CO-NH$(CH_2)_3$-CO-O-PEG-O-CO-$(CH_2)_3$-NH-ValLeuPhe-$CONH_2$ (265)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 48 mg (50%) a partire da Z-PEG-NH-ValLeuPhe-$CONH_2$ **262** (87 mg) e DmPOA-Phe-[Φ]-Pro-Val-Trp-NH-p-NO_2-Ph **268** (14 mg).

Percentuale di NH_2 liberi: 1%



Nelfinavir-CO-NH(CH_2)$_3$-CO-O-PEG-O-CO-(CH_2)$_3$-NH-ThrLeuAsnPhe-COOMe (266)

Si ottengono, secondo la metodologia generale, 51 mg (53%) a partire da Z-PEG-NH-ThrLeuAsnPhe-COOMe **263** (100 mg) e Nelfinavir-COOH **251** (10 mg).

Percentuale di NH_2 liberi: 0.8%; **MALDI-TOF** (m/z): picco polidisperso a 7520 Da (calc. 7373)

Condizioni sperimentali per i saggi di inibizione

I saggi vengono effettuati registrando l'aumento di fluorescenza dovuto alla scissione, da parte della proteasi di HIV-1, del substrato fluorogenico Abz-NF*-6 **272** (MW: 940.0). Per questo substrato sono state misurate, utilizzando la proteasi di HIV-1 sintetica, le seguenti costanti: K_m = 37 ± 8 μM ; V_{max} = 690 ± 90 nmol·min^{-1}·(mg proteasi)$^{-1}$ K_{cat} = 0.29 ± 0.03 S^{-1}; K_{cat}/K_m = 7.8 ± 0.3 mM^{-1}

Preparazione dei tamponi

Tampone MES:100 mM acido 2-[N-morfolino]etansulfonico (MES)/NaOH, pH = 5.5; 400 mM NaCl; 1 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA); 1 mM ditiotreitolo (DTT).

Tampone MES/BSA: 100 mM acido 2-[N-morfolino]-etansulfonico (MES)/NaOH, pH = 5.5; 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT (ditiotreitolo); 1 mg/ml albumina di siero bovino (BSA).

Preparazione delle soluzioni di substrato e di proteasi

Substrato Abz-NF*-6 121: soluzione stock: 10 mg/ml (10.6 mM) in DMSO

Soluzione per il saggio: 10 μl della soluzione stock vengono diluiti in 1.99 ml di tampone MES (pH 5.5) ottenendo una concentrazione finale 53 μM.

HIV-1 proteasi: soluzione stock: 0.4 mg/ml in tampone 10 mM sodio fosfato pH = 6.5; 1 mM EDTA; 10% glicerolo; 0.05% mercaptoetanolo; 50-100 mM NaCl. In queste condizioni la proteasi presenta una attività specifica pari a $3.5 \cdot 10^{-4}$ nmol/min/mg.

10 μL della soluzione concentrata di enzima vengono portati a 100 μL con il tampone MES/BSA (soluzione PR 1/10); 10 μL della soluzione PR 1/10 vengono poi portati a 100 μL con il tampone MES/BSA (soluzione PR 1/100).

Condizioni del saggio

Lo strumento viene impostato ad una lunghezza d'onda di eccitazione (λ_{exc}) di 325 nm e una lunghezza d'onda di emissione (λ_{em}) di 420 nm. 114 μL di substrato 121 (53 μM) vengono posti in una cuvette con 75 μL di tampone MES in modo da ottenere una concentrazione finale di 30 μM. La cuvette viene inserita nello spettrofluorimetro termostatato a 25 °C e si registra l'intensità di fluorescenza. Dopo circa 1.5 minuti viene iniettata la HIV-PR (11 μL, soluzione diluita PR 1/100) ottenendo una concentrazione di enzima pari a 10 nm. Si registra l'aumento di fluorescenza; dopo circa 1 minuto viene

iniettata la soluzione di inibitore che si vuole testare (2 μL). Per gli inibitori testati sono state preparate, per pesata, 15 soluzioni madre in DMSO, diluite poi con DMSO oppure con tampone MES, ottenendo le concentrazioni riportate in tabella:

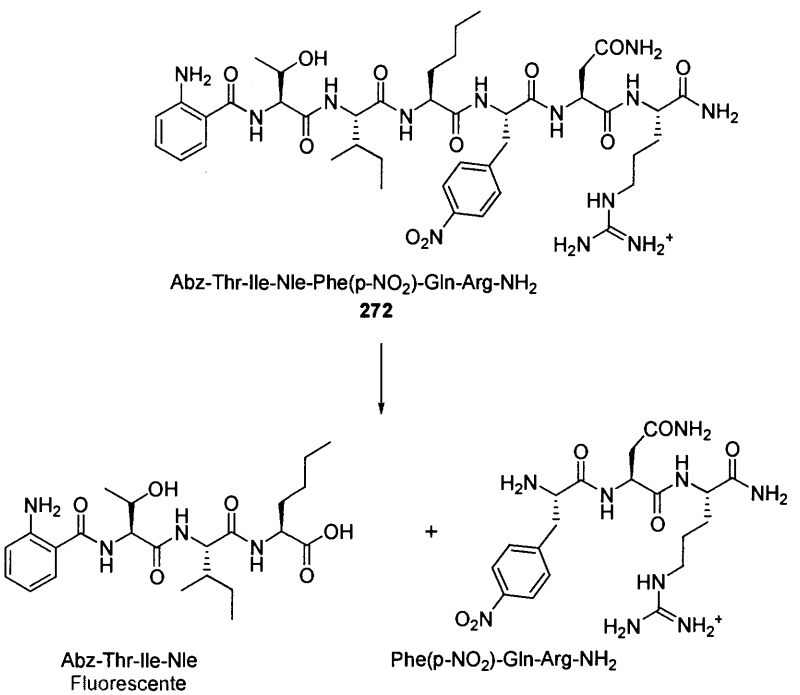
Inibitore	Sol. madre (M)	Dil. 1 (M)	Dil. 2 (M)	Dil. 3 (M)	Dil. 4 (M)	Dil. 5 (M)	Dil. 6 (M)	Dil. 7 (M)
237c	$5.8 \cdot 10^{-2}$	$5.8 \cdot 10^{-3}$	$5.8 \cdot 10^{-4}$	$2.9 \cdot 10^{-4}$	$15 \cdot 10^{-4}$	$5.8 \cdot 10^{-5}$	$5.8 \cdot 10^{-6}$	-
237c	$7 \cdot 10^{-2}$	$7 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$	$3.5 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-5}$	$3.5 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-6}$	-
236b	$6 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$15 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-6}$	-
237b	$7.1 * 10^{-2}$	$3.5 * 10^{-2}$	$3.5 * 10^{-3}$	$1.7 * 10^{-4}$	$3.5 * 10^{-4}$	$3.5 * 10^{-6}$	$3.5 * 10^{-7}$	
236a	$4.9 \cdot 10^{-2}$	$4.9 \cdot 10^{-3}$	$2.45 \cdot 10^{-3}$	$4.9 \cdot 10^{-4}$	$4.9 \cdot 10^{-5}$	$4.9 \cdot 10^{-6}$	-	-
237a	$7.0 \cdot 10^{-2}$	$7.0 \cdot 10^{-3}$	$3.5 \cdot 10^{-3}$	$7.0 \cdot 10^{-4}$	$7.0 \cdot 10^{-5}$	$7.0 \cdot 10^{-6}$	-	-
238a	$9.1 \cdot 10^{-2}$	$9.1 \cdot 10^{-3}$	$4.55 \cdot 10^{-3}$	$9.1 \cdot 10^{-4}$	$9.1 \cdot 10^{-5}$	$9.1 \cdot 10^{-6}$	-	-
238b	$9.1 \cdot 10^{-2}$	$9.1 \cdot 10^{-3}$	$4.55 \cdot 10^{-3}$	$9.1 \cdot 10^{-4}$	$9.1 \cdot 10^{-5}$	$9.1 \cdot 10^{-6}$	-	-
266	$8.4 \cdot 10^{-3}$	$4.2 \cdot 10^{-3}$	$4.2 \cdot 10^{-4}$	$4.2 \cdot 10^{-5}$	$4.2 \cdot 10^{-6}$	$4.2 \cdot 10^{-7}$	-	-
264	$5.8 \cdot 10^{-3}$	$2.9 \cdot 10^{-3}$	$5.8 \cdot 10^{-4}$	$5.8 \cdot 10^{-5}$	$5.8 \cdot 10^{-6}$	$5.8 \cdot 10^{-7}$	-	-
265	$6.7 \cdot 10^{-3}$	$6.7 \cdot 10^{-4}$	$6.7 \cdot 10^{-5}$	$6.7 \cdot 10^{-6}$	$6.7 \cdot 10^{-7}$	$6.7 \cdot 10^{-8}$	$6.7 \cdot 10^{-9}$	-
180	$1 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$6.2 \cdot 10^{-4}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
182	$4.4 \cdot 10^{-2}$	$2.2 \cdot 10^{-2}$	$4.4 \cdot 10^{-3}$	$4.4 \cdot 10^{-4}$	$4.4 \cdot 10^{-5}$	$4.4 \cdot 10^{-6}$	$4.4 \cdot 10^{-7}$	-
181	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$0.6 \cdot 10^{-2}$	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-5}$	$1.2 \cdot 10^{-6}$	$1.2 \cdot 10^{-7}$	-
183	$1.3 \cdot 10^{-2}$	$0.7 \cdot 10^{-2}$	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-5}$	$1.3 \cdot 10^{-6}$	$1.3 \cdot 10^{-7}$	$1.3 \cdot 10^{-8}$
186	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$1.9 \cdot 10^{-3}$	$1.9 \cdot 10^{-4}$	$9.8 \cdot 10^{-5}$	$1.9 \cdot 10^{-5}$	$1.9 \cdot 10^{-6}$	$1.9 \cdot 10^{-7}$	$1.9 \cdot 10^{-8}$

Appendice

Valutazione dell'attività inibitoria

La valutazione della attività biologica, e quindi della effettiva capacità di inibire la HIV-proteasi, è fondamentale non solo per saggiare gli inibitori sintetizzati, ma anche per disporre di un riferimento per la progettazione di molecole di maggiore efficacia.[1]

Il saggio si basa sull'utilizzo di substrati fluorogenici largamente impiegati in biochimica grazie alla loro elevata sensibilità. La tecnica, definita "intramolecular fluorescence resonance energy transfer" (FRET)[2] prevede l'introduzione, in un opportuno substrato che sia riconosciuto dall'enzima, di un gruppo fluorescente ("fluorescent donor") e un gruppo ("quenching acceptor") caratterizzato da un cromoforo che assorbe alla stessa lunghezza d'onda di emissione del gruppo fluorescente. Il substrato utilizzato è l'esapeptide Abz-Thr-Ile-Nle-Phe(p-NO_2)-Gln-Arg-NH_2,[3] esapeptide la cui struttura riprende quella del sito di idrolisi p24/p15 della poliproteina virale gag-pol, dove la p-NO_2-fenilalanina costituisce il gruppo donatore, mentre l'acido 2-ammino-benzoico (Abz) quello accettore.



[1] a) Scholz, D.; Billich, A.; Charpiot, B.; Ettmayer, P.; Lehr, P.; Rosenwirth, B.; Schreiner, E.; Gstach, H. *J. Med. Chem.* (**1994**), *37*, 3079; b) Sham, H. L.; Kempf, D. J.; Molla, A.; Marsh, K. C.; Kumar, G. N.; Chen, C.-M.; Kati, W.; Stewart, K.; Lal, R.; Hsu, A.; Betebenner, D.; Korneyeva, M.; Vasavanonda, S.; McDonald, E.; Saldivar, A.; et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* (**1998**), *42*, 3218; c) Sham,H. L.; Zhao, C.; Stewart, K. D.; Betebenner, D. A.; Lin, S.; Park, C. H.; Kong, X.-P.; Rosenbrook, W. Jr.; Herrin, T.; Madigan, D.; et al. *J. Med. Chem.* (**1996**), *39*, 392

[2] a) Matayoshi, E. D.; Wang, G. T.; Krafft, G. A.; Erickson, J. *Science* (**1990**), *247*, 954; b) Lee, T.; Laco, G. S.; Torbett, B. E.; Fox, H. S.; Lerner, D. L.; Elder, J. H.; Wong, C.-H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**1998**), *95*, 939

[3] Toth, M.; Marshall, G. R. *Int. Peptide Protein Res.* (**1990**), *36*, 544

Per il saggio è stata utilizzata HIV-1 proteasi ricombinante disponibile commercialmente. L'intrinseca fluorescenza della p-NO_2-fenilalanina a 420 nm (assorbimento a 325 nm) risulta drasticamente diminuita dalla presenza del residuo di acido 2-amminobenzoico che esercita un effetto di quenching; questo effetto diventa insignificante a distanze superiori ai 100 Å e, quindi, dopo l'idrolisi del substrato da parte della proteasi, si ha emissione di fluorescenza.

In questo modo l'attività idrolitica della HIV-1 proteasi può essere seguita in continuo a pH 5.5, pH ottimale per l'attività idrolitica dell'enzima,[4] semplicemente misurando l'incremento di intensità di fluorescenza contro il tempo. Se alla soluzione contenente il substrato e la proteasi si aggiunge un composto in grado di inibire la proteasi stessa si osserva una decisa diminuzione nell'incremento dell'intensità di fluorescenza, diminuzione proporzionale alla capacità inibitoria.

Il grado di inibizione viene valutato confrontando le velocità iniziali della reazione catalizzata in presenza di quantità variabili di inibitore, ricavate dalla parte lineare delle corrispondenti curve di variazione di fluorescenza contro il tempo (Figura 1).

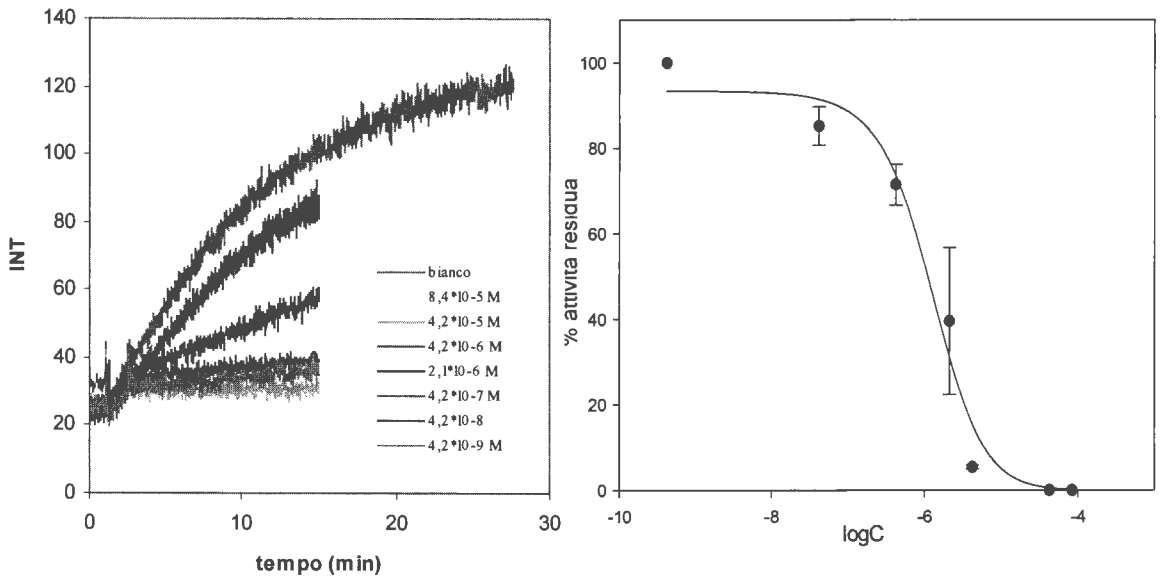


Figura 1: curve di fluorescenza al variare della concentrazione di inibitore (sinistra) e andamento della attività enzimatica residua contro il logaritmo della concentrazione di inibitore (destra)

Il valore di IC_{50} si ottiene riportando in grafico le pendenze in funzione delle diverse concentrazioni (espresse in termini logaritmici) alle quali si osserva l'inibizione ed interpolando il valore corrispondente al 50% di inibizione.

[4] a) Jordan, S. P.; Zugay, J.; Darke, P. L.; Kuo, L. C. J. Biol. Chem. (**1992**), *267*, 20028; b) Darke, P. L.; Jordan, S. P.; Hall, D. L.; Zugay, J. A.; Shafer, J. A.; Kuo, L. C. *Biochemistry* (**1994**), *33*, 98