



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

*Analoghi del Neuropeptide S modificati in  
posizione 5*

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

**Dottorando**

*Dott.ssa Del Zoppo Luisa*

**Tutore**

*Dott. Guerrini Remo*

---

*Anni 2010/2012*



## *Abstract of the thesis*

Neuropeptide S (NPS) is the last neuropeptide identified via *Reverse Pharmacology* techniques. NPS selectively binds and activates a previously orphan GPCR 154, now named NPSR, producing intracellular calcium mobilization and cAMP levels. Biological functions modulated by the NPS/NPSR system include anxiety, arousal, locomotion, food intake, memory, and drug addiction. The primary sequence of NPS (in humans SFRNGVGTGMKKTSFQRAKS) is highly conserved among vertebrates especially at the N-terminus. Ala- and D-scan together with truncation studies demonstrated that the N-terminal sequence of the molecule is crucial for biological activity. Focused structure–activity investigations performed on Phe<sup>2</sup>, Arg<sup>3</sup>, and Asn<sup>4</sup> confirmed this indication and revealed the chemical requirements of these positions for NPSR binding and activation. The sequence Gly<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup> seems to be important for shaping the bioactive conformation of the peptide. Structure–activity studies on Gly<sup>5</sup> enabled identification of the first generation of peptidergic NPSR pure antagonists including [D-Cys(<sup>t</sup>Bu)<sup>5</sup>]NPS and [D-Val<sup>5</sup>]NPS whose antagonist properties were confirmed *in vivo*.

This PhD thesis is focused on the structure activity relationship study of NPS position 5. In particular, in order to identify new potent and selective antagonists of the NPSR receptor, we have designed, synthesized and inserted in position 5 of NPS the following non natural amino acids: **i**) the chimeric Valine/Leucine amino acid, *Ipv*, 2-amino-3,3,4-trimethylpentanoic acid as racemate; **ii**) the R and S form of the amino acid, *Ddb*, 2,4-diamino-3,3-dimethylbutyric acid characterized by a branched aliphatic side chain functionalized with a primary amino group; **iii**) some penicillamine S-alkylate analogs.

This work has allowed to investigate and apply different chemical strategies for the synthesis of alpha-amino acids characterized by branched aliphatic side chains. In addition

the original synthetic scheme adopted for the synthesis of 2-amino-3,3,4-trimethylpentanoic acid in which the key step is the copper (I) chloride-catalyzed conjugated addition of *i*-propyl magnesium bromide to 2-isopropylidene-malonic acid diethyl ester together with the commercial variety of Grignard reagents available make this route suitable for further synthetic applications, including the synthesis of novel non natural valine derivatives. The pharmacological data obtained further corroborate the proposal that chirality and steric hindrance of position 5 of NPS are crucial chemical requirements for modulating peptide efficacy and potency.

It has been also found that NPSR antagonists can be generated by replacing NPS position 5 with D-amino acids characterized by basic side chain. Finally, the use of S-alkyl penicillamine showed that the increase in steric hindrance of position 5 is better tolerated if generated by an aromatic substituent compared to aliphatic groups suggesting that planarity is a chemical feature useful for the identification of novel NPSR antagonists.

## ***Riassunto della tesi***

Il Neuropeptide S (NPS) è l'ultimo neuropeptide identificato utilizzando tecniche di *Reverse Pharmacology*. Il Neuropeptide S lega selettivamente e attiva il recettore precedentemente orfano GPCR 154, successivamente denominato NPSR, causando un aumento sia dei livelli di cAMP sia della concentrazione intracellulare di calcio. Le funzioni biologiche controllate dal sistema NPS/NPSR includono ansia, stato di veglia, attività locomotoria, assunzione di cibo, memoria e assunzione di farmaci. La sequenza primaria di NPS (nell'uomo SFRNGVGTGMKKTSFQRAKS) è altamente conservata nelle specie analizzate, soprattutto all'N-terminale. Studi di Ala- e D-scan e di N- e C-terminal truncation hanno dimostrato che la porzione N-terminale del peptide è fondamentale per l'attività biologica. Studi struttura-attività sulle posizioni 2, 3 e 4 hanno confermato questo dato e hanno dato indicazioni importanti riguardo alle caratteristiche chimico-fisiche degli amminoacidi in queste posizioni per il legame e l'attivazione di NPSR. La sequenza Gly<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup> sembra esser importante per l'induzione della conformazione bioattiva del peptide. Studi struttura-attività sulla Gly<sup>5</sup> hanno permesso di identificare la prima generazione di antagonisti peptidici puri di NPSR tra cui [D-Cys(<sup>t</sup>Bu)<sup>5</sup>]NPS e [D-Val<sup>5</sup>]NPS, la cui attività farmacologica è stata confermata in vivo.

Nel mio lavoro di dottorato mi sono occupata dello studio SAR della posizione 5 di NPS. In particolare con lo scopo di identificare nuovi antagonisti puri e selettivi di NPSR, abbiamo progettato, sintetizzato e inserito in posizione 5 di NPS i seguenti amminoacidi non naturali: **i)** l'amminoacido chimerico Valina/Leucina, *Ipv*, acido 2-ammino-3,3,4-trimetil-pentanoico come miscela racemica; **ii)** gli enantiomeri R e S dell'amminoacido *Ddb*, acido 3,3-dimetil-2,4-diamminobutirrico, caratterizzato da una catena laterale alifatica ramificata e funzionalizzata con un gruppo amminico primario; **iii)** alcuni analoghi della Penicilamina S-alchilata.

Questo lavoro ha permesso di studiare e applicare diverse strategie chimiche per la sintesi di  $\alpha$ -amminoacidi in particolare caratterizzati da catena laterale alifatica ramificata. Inoltre l'originale schema sintetico adottato per la sintesi dell'acido 2-ammino-3,3,4-trimetilpentanoico, in cui lo step chiave è l'addizione di Michael catalizzata da sali di rame (I) di *i*-sopropil-magnesio bromuro all'estere dietilico dell'acido 2-isopropiliden-malonico, insieme alla grande disponibilità in commercio di differenti reattivi di Grignard apre la strada a nuove applicazioni sintetiche, soprattutto per la sintesi di nuovi derivati amminoacidici non naturali della Valina. I dati farmacologici ottenuti avvalorano l'ipotesi che la chiralità e l'ingombro sterico della posizione 5 di NPS sono requisiti chimici molto importanti per modulare l'efficacia e la potenza del peptide.

E' stato inoltre evidenziato che antagonisti NPSR possono esser generati introducendo in posizione 5 di NPS D-amminoacidi caratterizzati da catena laterale basica. Infine, l'utilizzo di Penicillamine S-alchilate ha indicato che l'incremento dell'ingombro sterico in posizione 5 è meglio tollerato se generato da un sostituito aromatico rispetto a raggruppamenti alifatici suggerendo la planarità un requisito utile per l'identificazione di nuovi antagonisti NPSR.

# *Indice*

<b>Introduzione</b> _____	<b>1</b>
<b>Scopo della tesi</b> _____	<b>13</b>
<b>Risultati e Discussione</b> _____	<b>25</b>
<i>Parte Prima</i> .....	<b>25</b>
<i>Parte Seconda</i> .....	<b>42</b>
<i>Parte Terza</i> .....	<b>57</b>
<i>Parte Quarta</i> .....	<b>63</b>
<b>Conclusioni</b> _____	<b>70</b>
<b>Parte Sperimentale</b> _____	<b>71</b>
<i>Sintesi dei composti</i> .....	<b>71</b>
<i>Analisi HPLC chirale</i> .....	<b>117</b>
<i>Sintesi peptidica in fase solida</i> .....	<b>119</b>
<i>Purificazione e controllo analitico</i> .....	<b>122</b>
<i>Saggi farmacologici</i> .....	<b>125</b>

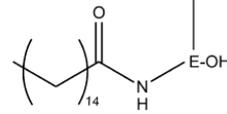


# ***INTRODUZIONE***

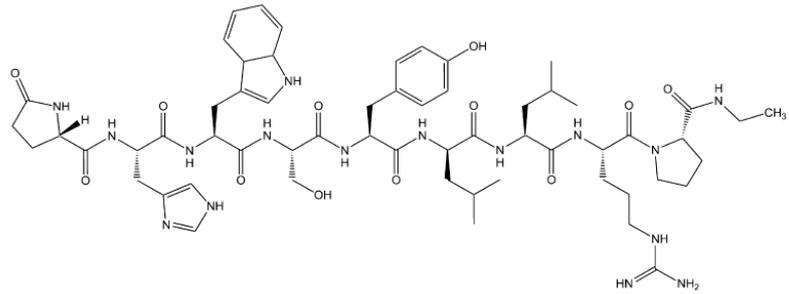
Negli ultimi anni abbiamo osservato una costante crescita del numero di farmaci peptidici introdotti in terapia (Figura 1). Questo aumento, poco prevedibile sino a qualche decennio fa, è stato reso possibile dal fatto che la maggior parte dei farmaci attualmente in commercio svolge la propria azione attraverso l'interazione con recettori accoppiati a proteine G (GPCR) e molti GPCR hanno come ligando fisiologico un peptide o una piccola proteina. Molti peptidi endogeni agiscono quindi come ormoni o neurotrasmettitori e questo ha fatto aumentare l'interesse per lo sviluppo di nuove molecole a struttura peptidica in grado di mimare l'azione dei composti naturali. Parallelamente abbiamo assistito anche ad un incremento delle conoscenze necessarie alla progettazione e sintesi di farmaci peptidici, come ad esempio lo sviluppo di tecniche di *molecular modeling* sempre più raffinate, l'automazione della sintesi peptidica in fase solida e la scoperta di metodi chimici per la formazione del legame peptidico sempre più efficienti. I peptidi per loro natura sono segnali biologici molto potenti, selettivi e in genere di breve durata. La durata d'azione di un peptide naturale è regolata da processi catabolici che portano alla digestione del peptide. Uno dei problemi principali che i chimici farmaceutici devono affrontare per permettere ad un peptide di diventare farmaco è quello di migliorarne le caratteristiche farmacocinetiche, in particolare la stabilità metabolica e la biodisponibilità.

Exenatide  
Liraglutide  
Trattamento diabete  
mellito di tipo II

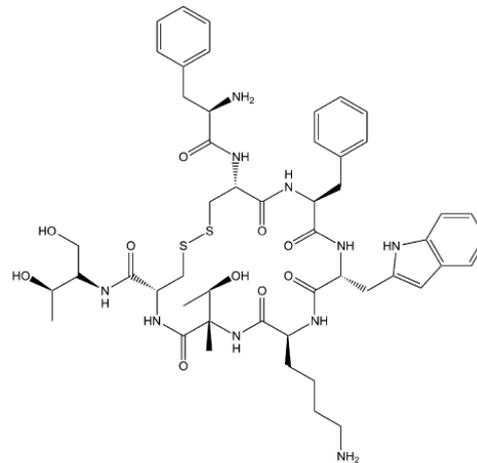
H-HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNKGGPSSGAPPS-NH<sub>2</sub>  
H-HAEGTFTSDVSSYLEFQAAKEFIAWLVRGRG-OH



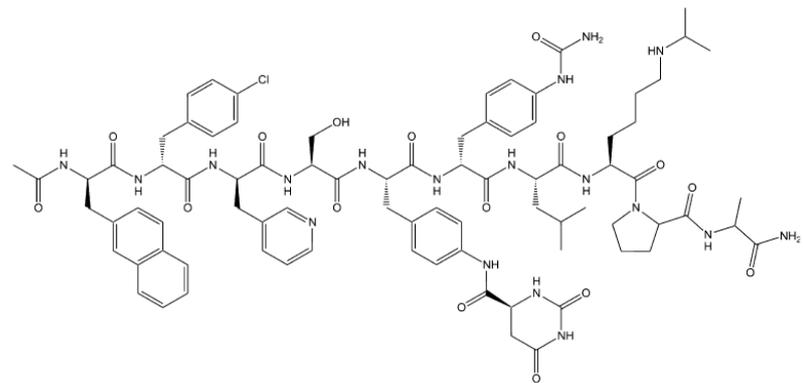
Leuprolide  
Trattamento cancro alla  
prostata, al seno e cura  
la pubertà precoce



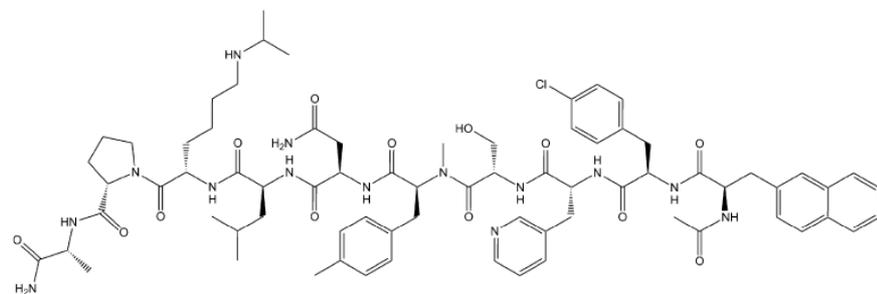
Octreotide  
Trattamento sintomatico  
del cancro



Degarelix  
Trattamento cancro  
alla prostata



Abarelix  
Trattamento cancro  
alla prostata



**Figura 1.** Esempi di farmaci peptidici attualmente in terapia.

I GPCR regolano diverse funzioni biologiche sia a livello centrale che periferico e rappresentano, attualmente, il target d'azione della maggior parte dei farmaci presenti sul mercato.

I GPCRs sono costituiti da una singola catena polipeptidica organizzata in 7  $\alpha$ -eliche transmembrana, con un dominio extracellulare N-terminale di lunghezza variabile ed un dominio intracellulare C-terminale. I GPCRs condividono la stessa struttura eptaelicale transmembrana, ma differiscono per vari aspetti: la composizione amminoacidica, la lunghezza della sequenza N-terminale, l'organizzazione del binding pocket. Il terzo lungo *loop* citoplasmatico di questi recettori corrisponde alla regione della molecola che si accoppia alla proteina G. Modifiche di questa porzione della proteina determinano la formazione di recettori ancora in grado di legare i propri ligandi, ma incapaci di accoppiarsi alle proteine G e di determinare i conseguenti effetti biologici.

Attualmente sono stati identificati nel genoma umano più di 800 geni codificanti per GPCRs, di cui, solo per una minima frazione, circa 240, si conoscono i corrispondenti ligandi endogeni.

Quei recettori per cui non è ancora noto il ligando endogeno sono detti *recettori orfani*.

Durante gli ultimi vent'anni le tecniche di *Reverse Pharmacology*, cioè l'uso di recettori orfani ricombinanti per identificare i rispettivi ligandi endogeni, sono state validate quale approccio di successo per identificare nuovi neurotrasmettitori<sup>1</sup>.

Diversi sistemi peptidergici identificati con questo approccio, come il sistema Nocicettina/orfanina FQ, l'Urotensina II, si sono rivelati importanti nel regolare una serie di funzioni biologiche quali l'assunzione di cibo, la trasmissione del dolore, l'omeostasi cardiovascolare, il sonno, le risposte allo stress, l'abuso di farmaci e altre sostanze<sup>2</sup>.

Una delle scoperte più recenti ottenute utilizzando tecniche di *Reverse Pharmacology* è quella del **Neuropeptide S (NPS)**<sup>3</sup>.

Il Neuropeptide S lega selettivamente e attiva il recettore precedentemente orfano GPCR 154, successivamente denominato recettore per NPS: NPSR<sup>4</sup>.

NPS è un peptide di 20 amminoacidi, la cui sequenza primaria nell'uomo è SFRNGVGTGMKKTSFQRAKS.

---

<sup>1</sup> Civelli O. *et al.*, Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol Ther* **2006**; 110: 525-532.

<sup>2</sup> a) Lambert D.G. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential *Nat Rev Drug Discov.* **2008**;7(8):694-710; b) Douglas S.A., Dhanak D., Johns DG. From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function". *Trends Pharmacol. Sci.* **2004** 25 (2): 76-85.

<sup>3</sup> Sato S. *Et al.*, Novel G-protein coupled receptor protein and DNA thereof. WO 02/31145 A1, **2002**.

<sup>4</sup> Xu YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, Brucher FA, Zeng J, Ly NK, Henriksen SJ, de Lecea L, Civelli O. *Neuron* **2004**;43:487-497.

La porzione N-terminale Ser<sup>1</sup>-Phe<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Asn<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup> è altamente conservata nelle specie analizzate<sup>5</sup> (Figura 2), mentre piccole variazioni amminoacidiche sono presenti nella porzione centrale e carbossi-terminale del peptide.

Il fatto che il residuo amminoacidico N-terminale sia una Serina in tutte le specie animali è stata la ragione che ha portato a denominarlo “Neuropeptide S”.

SFRNGVGTGMKKT SFQRAKS	Homo sapiens (human)	
SFRNGVGTGMKKT SFRRRAKS	Pan troglodytes (chimpanzee)	
SFRNGVGTGMKKT SFRRRAKS	Pongo pygmaeus (orang-utan)	
SFRNGVGTGMKKT SFRRRAKS	Callithrix jacchus (marmoset)	<i>Primates</i>
SFRNGVGTG GKKT SFQRAKS	Otolemur garnettii (galago)	
SFRNGVGTGMKN TSFRRRAKS	Macaca mulatta (macaque)	
SFRNGVGTGMKKT SFPRRAKP	Cavia porcellus (guinea pig)	
SFRNGVGS GAKKT SFRRRAKQ	Mus musculus (mouse)	<i>Rodents</i>
SFRNGVGS GVKKT SFRRRAKQ	Rattus norvegicus (rat)	
SFRNGVGTGMKKT SFRRRAKS	Bos taurus (cattle)	
SFRNGVGTGMKKT SFRRRAKS	Canis familiaris (dog)	
SFRNGVGTGMKKT SFQRAKS	Equus caballus (horse)	
SFRNGVGTGMKKT SFRRRAKS	Echinops telfairi (small Madagascar hedgehog)	
SFRNGVGA GTIKKT SFRRRAKS	Erinaceus europaeus (western European hedgehog)	
SFRNGVGTGMKKT SFQRAKS	Loxodonta africana (African elephant)	
SFRNGVGTGL KKT PFRRAKS	Myotis lucifugus (little brown bat)	
SFRNGVGTGMKKT SFRRRAKL	Oryctolagus cuniculus (rabbit)	<i>Other Mammals</i>
SFRNGVGTGMKKT SFQRAKS	Procavia capensis (rock hyrax)	
SFRNGVGMKKT SFQRAKS	Sorex araneus (European shrew)	
SFRNGVGTGMKKT SFRRRAKP	Sus scrofa (pig)	
SFRNGVGTGMKKT SFRRRAKS	Tupaia belangeri (northern tree shrew)	
SFRNGVGTGM RN TSFQRAKS	Tursiops truncatus (bottlenose dolphin)	
SFRNGVGG IKT SFRRRAKS	Ornithorhynchus anatinus (platypus)	<i>Egg-laying Mammals</i>
SFRNGVGTGL KKT SFRRRAKS	Macropus eugenii (wallaby)	<i>Marsupials</i>
SFRNGVGS GMKKT SFRRRAKS	Monodelphis domestica (opossum)	
SFRNGVGS GIKT SFRRRAKS	Gallus gallus (chicken)	<i>Birds</i>
SFRNGVGA GTIKKT SFRRRAKP	Taeniopygia guttata (zebra finch)	
SFRNGVGS GMKKT SFRRARL	Anolis carolinensis (green anole)	<i>Reptiles</i>
SFRNGVGS GIKN SFRRRAKL	Xenopus tropicalis (western clawed frog)	<i>Amphibia</i>

**Figura 2.** Struttura primaria del Neuropeptide S in diverse specie animali; i primi 7 residui amminoacidici sono conservati in tutte le specie indicate.

<sup>5</sup> Reinscheid RK. Phylogenetic appearance of neuropeptide S precursor proteins in tetrapods. *Peptides* 2007;28:830–837.

Come molti altri neuropeptidi, anche NPS deriva da una proteina precursore (ppNPS) dalla quale viene liberato ad opera di una endopeptidasi che riconosce un segnale idrofobico all'inizio della sequenza e residui basici di processazione (Lys-Arg)<sup>6</sup> (Figura 3).

MISSVKLNLI LVLSTMHVFWCYPVPSSKVSGKSDYFLILLNSCPTRLDRSKE  
LAFLKPILEKMFV**KR**SFRNGVGTGMKKTSEFORAKS

**Figura 3.** Struttura primaria di ppNPS. Il segnale idrofobico è la sequenza sottolineata e colorata in azzurro; le endoproteasi agiscono all'altezza dei due residui di Lys e Arg (KR) rilasciando il peptide maturo colorato in rosso.

Diversi studi hanno dimostrato che NPSR è ampiamente presente in tutto il sistema nervoso centrale, mentre NPS è principalmente espresso in alcune aree del tronco encefalico, quali locus coeruleus, nucleo sensoriale del trigemino e nucleo laterale parabrachiale<sup>7</sup>.

Cellule che esprimono hNPSR rispondono a concentrazioni nanomolari di NPS, che provoca un aumento sia dei livelli di cAMP sia della concentrazione intracellulare di calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), suggerendo un ruolo funzionale eccitatorio per questo sistema recettoriale.

L'attivazione di NPSR da parte di NPS provoca una serie di effetti assolutamente peculiari: la stimolazione dello stato di veglia e la riduzione dei livelli di ansia<sup>8</sup>. La somministrazione *i.c.v.* di NPS nel topo stimola l'attività locomotoria e, contemporaneamente, produce robusti effetti ansiolitici. Nel ratto, NPS sopprime tutti gli stadi del sonno, suggerendo un coinvolgimento di questo sistema nell'induzione e mantenimento dello stato di veglia.

Inoltre è stato riportato come la somministrazione *i.c.v.* di NPS nell'animale da esperimento sia in grado di inibire l'assunzione di cibo, migliorare la memoria ed interferire con il complesso fenomeno della tossicodipendenza.

E' stato, infatti, dimostrato che la somministrazione di antagonisti NPSR in ratti dipendenti da cocaina è in grado di prevenire gli effetti comportamentali dell'animale volti alla ricerca

<sup>6</sup> Reinscheid RK, Xu YL. Neuropeptide S and its receptor: A newly orphanized G protein-coupled receptor system. *Neuroscientist* **2005**;11:532–538.

<sup>7</sup> Xu YL, Gall CM, Jackson VR, Civelli O, Reinscheid RK. Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* **2007**;500:84–102.

<sup>8</sup> Guerrini R, Salvadori S, Rizzi A, Regoli D, Calò G. Neurobiology, Pharmacology and Medicinal Chemistry of Neuropeptide S and Its Receptor *Medicinal Research Reviews* **2009**; 1-27.

della sostanza d'abuso; questo risultato evidenzia le potenzialità terapeutiche degli antagonisti NPSR quali farmaci innovativi per il controllo delle tossicodipendenze<sup>9</sup>.

Il profilo comportamentale evocato dalla somministrazione centrale di NPS nell'animale da esperimento appare unico nel suo genere: NPS si comporta come ansiolitico-stimolante<sup>4,10</sup>.

Questo singolare profilo biologico lo rende particolarmente interessante in quanto i più comuni ansiolitici (ad esempio le benzodiazepine) sono anche sedativi e gli stimolanti (ad esempio la cocaina, la caffeina e le amfetamine) sono anche ansiogenici. L'unica sostanza con un profilo d'azione simile ad NPS è la nicotina che, almeno nei fumatori, aumenta l'eccitazione e lo stato di veglia e produce effetti ansiolitici e antistress<sup>10</sup>.

In sintesi, il sistema NPS/NPSR sembra giocare un ruolo importante nella regolazione di fondamentali funzioni biologiche e lo sviluppo di ligandi selettivi per NPSR è di cruciale importanza per lo studio di questo nuovo sistema e per determinare il potenziale terapeutico di nuovi farmaci in grado di interagire con questo sistema recettoriale. Allo stato attuale delle conoscenze è possibile prevedere che ligandi selettivi del recettore NPSR potrebbero trovare applicazione clinica per trattare gli stati di ansia, i disturbi del ciclo sonno-veglia, i disturbi del comportamento alimentare, la dipendenza da alcool e farmaci, i disturbi dell'umore, della memoria e dell'apprendimento: in particolare, gli agonisti NPSR potrebbero trovare applicazioni nel trattamento della narcolessia e in quello dell'ansia, senza provocare effetti collaterali come la sedazione; mentre la ricerca e lo sviluppo di antagonisti per NPSR potrebbe portare alla luce una nuova classe di farmaci ipnoinducenti e quindi potrebbero essere usati nel trattamento dell'insonnia.

---

<sup>9</sup> Kallupi M, Cannella N, Economidou D, Ubaldi M, Ruggeri B, Weiss F, Massi M, Marugan J, Heilig M, Bonnavion P, de Lecea L, Ciccocioppo R. Neuropeptide S facilitates cue-induced relapse to cocaine seeking through activation of the hypothalamic hypocretin system *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2010** 9;107(45):19567-72.

<sup>10</sup> Koob GF, Greenwell TN. Neuropeptide S: A novel activating anxiolytic? *Neuron* **2004**;43:441-442.

La scoperta del sistema NPS/NPSR ha suscitato l'interesse di diversi gruppi di ricerca i quali hanno iniziato programmi di *medicinal chemistry* con lo scopo di identificare la sequenza ed i residui amminoacidici cruciali per l'attività biologica. Il primo studio struttura-attività (*SAR*) sulla sequenza umana di NPS è stato pubblicato dal gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio dottorato di ricerca<sup>11</sup>.

Inizialmente, sono stati svolti studi di Ala- e D-Scan (Tabelle 1 e 2) e di *N*- e *C*-terminal truncation sulla sequenza di *h*NPS (Tabella 3).

La sistematica sostituzione nella sequenza primaria con un residuo di Alanina (Ala-Scan) permette di avere informazioni riguardo l'importanza delle singole catene laterali per l'interazione recettoriale; mentre studi di D-Scan, dove gli amminoacidi naturali costituenti il peptide sono sostituiti con i rispettivi enantiomeri D, forniscono indicazioni sull'importanza della chiralità e su eventuali variazioni conformazionali locali.

Gli esperimenti di *N*- e *C*-terminal truncation permettono invece di raccogliere informazioni sugli amminoacidi indispensabili per l'attività biologica del peptide.

In particolare, gli studi di Ala-Scan hanno dimostrato che la sostituzione di Ser<sup>1</sup> con Ala non comporta sostanziali modifiche, mentre la sostituzione di Phe<sup>2</sup>/Ala genera un analogo di NPS completamente inattivo. Inoltre [Ala<sup>4</sup>]NPS e [Ala<sup>7</sup>]NPS si comportano da agonisti poco potenti. Interessante è il dato di [Ala<sup>3</sup>]NPS che lega NPSR con una potenza 10 volte minore rispetto al ligando endogeno, comportandosi da agonista parziale. Inoltre, la Ala-sostituzione dei residui amminoacidici dalla posizione 8 alla 20 è pienamente tollerata, non avendo nessun effetto né sulla potenza né sull'efficacia (Tabella 1).

Questi studi hanno fornito un primo dato importante: la sequenza Phe<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Asn<sup>4</sup> è fondamentale per l'attività biologica di NPS.

Gli studi di D-Scan hanno portato alla medesima conclusione: infatti, la sostituzione dei residui 2, 3, 4 di NPS con i rispettivi D-isomeri porta ad un'importante perdita di potenza, mentre in tutte le altre posizioni, ad esclusione della 6, questa sostituzione appare ben tollerata (Tabella 2).

---

<sup>11</sup> Roth AL, Marzola E, Rizzi A, Arduin M, Trapella C, Corti C, Vergura R, Martinelli P, Salvadori S, Regoli D, Corsi M, Cavanni P, Calo G, Guerrini R. Structure-activity studies on neuropeptide S: Identification of the amino acid residues crucial for receptor activation. *J Biol Chem* **2006**;281:20809–20816.

compound	Peptide sequence																				Agonist effect	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)
hNPS	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S	7.94 ± 0.03	100
[Ala <sup>1</sup> ]hNPS	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.79 ± 0.09	85 ± 4
[Ala <sup>2</sup> ]hNPS	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	inactive	
[Ala <sup>3</sup> ]hNPS	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.86 ± 0.09*	49 ± 5*
[Ala <sup>4</sup> ]hNPS	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	crc incomplete: at 1 μM	25 ± 5
[Ala <sup>5</sup> ]hNPS	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.51 ± 0.13	89 ± 9
[Ala <sup>6</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.76 ± 0.15	98 ± 5
[Ala <sup>7</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	crc incomplete: at 1 μM	31 ± 7
[Ala <sup>8</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.02 ± 0.13	93 ± 11
[Ala <sup>9</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.11 ± 0.12	96 ± 7
[Ala <sup>10</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.09 ± 0.10	97 ± 5
[Ala <sup>11</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.78 ± 0.10	96 ± 5
[Ala <sup>12</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	7.95 ± 0.16	97 ± 5
[Ala <sup>13</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	8.01 ± 0.13	95 ± 9
[Ala <sup>14</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	7.92 ± 0.12	105 ± 12
[Ala <sup>15</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	7.97 ± 0.15	103 ± 18
[Ala <sup>16</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	7.99 ± 0.19	92 ± 4
[Ala <sup>17</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	7.90 ± 0.19	87 ± 4
[Ala <sup>19</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	8.03 ± 0.09	95 ± 5
[Ala <sup>20</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	7.98 ± 0.07	94 ± 9

**Tabella 1.** Ala scan di human NPS: i 19 analoghi di hNPS sono stati sintetizzati e testati per la mobilizzazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup> in cellule HEK293/hNPSR.

compound	Peptide sequence																				Agonist effect	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)
hNPS	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S	8.10 ± 0.24	100
[DSer <sup>1</sup> ]hNPS	<b>s</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.81 ± 0.12	90 ± 17
[DPhe <sup>2</sup> ]hNPS	-	<b>f</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.51 ± 0.30*	109 ± 10
[DArg <sup>3</sup> ]hNPS	-	-	<b>r</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.03 ± 0.14*	106 ± 4
[DAsn <sup>4</sup> ]hNPS	-	-	-	<b>n</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.12 ± 0.26*	101 ± 5
[DVal <sup>6</sup> ]hNPS	-	-	-	-	<b>v</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	crc incomplete: at 1 μM	40 ± 3
[DThr <sup>8</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	<b>t</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.92 ± 0.07	112 ± 7
[DMet <sup>10</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>m</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.80 ± 0.09	100 ± 6
[DLys <sup>11</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>k</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.66 ± 0.14	105 ± 3
[DLys <sup>12</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>k</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.85 ± 0.12	97 ± 8
[DThr <sup>13</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>t</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	7.75 ± 0.17	105 ± 3
[DSer <sup>14</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>s</b>	-	-	-	-	-	-	7.90 ± 0.07	101 ± 6
[DPhe <sup>15</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>f</b>	-	-	-	-	-	7.87 ± 0.13	99 ± 8
[DGI <sup>16</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>q</b>	-	-	-	-	7.80 ± 0.20	102 ± 8
[DArg <sup>17</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>r</b>	-	-	-	7.79 ± 0.16	93 ± 4
[DAIa <sup>18</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>a</b>	-	-	7.83 ± 0.28	105 ± 7
[DLys <sup>19</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>k</b>	-	7.78 ± 0.14	97 ± 6
[DSer <sup>20</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>s</b>	7.89 ± 0.15	104 ± 11

**Tabella 2.** D-scan di human NPS: i 17 analoghi di hNPS sono stati sintetizzati e testati per la mobilizzazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup> in cellule HEK293/hNPSR.

Gli studi di *N*- e *C*-terminal truncation hanno permesso di identificare nel frammento 1-10 di *hNPS* la sequenza minima attiva.

In particolare, la delezione della Ser<sup>1</sup> produce una moderata diminuzione di potenza e la delezione della Phe<sup>2</sup> genera un analogo di NPS inattivo; invece la sistematica e progressiva delezione dei singoli amminoacidi a partire dal carbossi-terminale dalla Ser<sup>20</sup> fino alla Lys<sup>11</sup> non modifica l'attività del peptide. Il frammento *hNPS*-(1-10) mostra un effetto massimo e potenza simili al peptide di riferimento *hNPS*-(1-20) (Tabella 3).

Il frammento 1-10 di NPS è stato ulteriormente investigato in vivo sul topo nel saggio dell'attività locomotoria e si è visto che, mentre NPS produce un effetto stimolatorio dose dipendente in un intervallo di 0.01-1 nmol, il frammento NPS(1-10) è inattivo fino alla concentrazione di 10nmol<sup>11</sup>. Questi risultati indicano che la sequenza 11-20 di *hNPS* sembra esser non necessaria per l'attività in vitro, ma è essenziale per gli effetti biologici in vivo.

compound	Peptide sequence																				Agonist effect	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)
<i>hNPS</i>	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S	8.54 ± 0.03	100
<i>hNPS</i> (2-20)		F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S	7.80 ± 0.11*	107 ± 4
<i>hNPS</i> (3-20)			R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
<i>hNPS</i> (4-20)				N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
<i>hNPS</i> (5-20)					G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
<i>hNPS</i> (6-20)						V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
<i>hNPS</i> (7-20)							G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
<i>hNPS</i> (8-20)								T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
<i>hNPS</i> (9-20)									G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
<i>hNPS</i> (10-20)										M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
<i>hNPS</i> (11-20)											K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
<i>hNPS</i> (1-19)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K		8.52 ± 0.06	102 ± 3
<i>hNPS</i> (1-18)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A			8.52 ± 0.34	103 ± 4
<i>hNPS</i> (1-17)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R				8.30 ± 0.31	105 ± 5
<i>hNPS</i> (1-16)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q					8.64 ± 0.11	98 ± 2
<i>hNPS</i> (1-15)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F						8.29 ± 0.15	102 ± 2
<i>hNPS</i> (1-14)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S							8.59 ± 0.03	110 ± 5
<i>hNPS</i> (1-13)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T								8.45 ± 0.07	109 ± 5
<i>hNPS</i> (1-12)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K									8.39 ± 0.25	103 ± 7
<i>hNPS</i> (1-11)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K										8.31 ± 0.41	92 ± 3
<i>hNPS</i> (1-10)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M											8.32 ± 0.06	106 ± 2

**Tabella 3.** *N*- e *C*- terminal truncation di human NPS: gli analoghi di *hNPS* sono stati sintetizzati e testati per la mobilizzazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup> in cellule HEK293/*hNPSR*.

I risultati di questo primo studio *SAR* sono stati successivamente confermati da altri autori<sup>12</sup>.

<sup>12</sup> a) Reinscheid RK, Xu YL, Okamura N, Zeng J, Chung S, Pai R, Wang Z, Civelli O. Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide S receptor variants. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**;315:1338–1345; b) Bernier V, Stocco R, Bogusky MJ, Joyce JG, Parachoniak C, Grenier K, Arget M, Mathieu MC, O'Neill GP, Slipetz D, Crackower MA, Tan CM, Therien AG. Structure-function relationships

In aggiunta agli studi SAR ulteriori importanti informazioni per il disegno di nuove molecole si possono ottenere dallo studio conformazionale di un peptide con diverse tecniche spettroscopiche. Indagini conformazionali su NPS eseguite attraverso esperimenti di NMR in soluzione indicano che il peptide in acqua non presenta conformeri particolarmente stabili<sup>13</sup>. Tuttavia, altri autori<sup>12b</sup> hanno osservato effetti NOE (nuclear overhauser effect) nella regione spettrale NMR tipica degli NH ammidici ed imputabili agli NH della sequenza 5-13 di NPS. Questa osservazione ha portato ad ipotizzare la presenza di un' $\alpha$ -elica nascente nella sequenza NPS(5-13), la quale, durante il processo di binding al recettore, potrebbe favorire la formazione di una struttura ad elica stabile<sup>12b</sup>. La scarsa propensione di NPS ad adottare conformazioni stabili è stata imputata, almeno in parte, alla presenza in posizione 5, 7 e 9 del residuo amminoacidico Gly non chirale in grado di conferire estrema flessibilità al peptide. Al fine di forzare NPS ad adottare una struttura ad  $\alpha$ -elica stabile, i residui 7, 9 e 13 sono stati sostituiti con Ala. Analisi NMR hanno dimostrato che [Ala<sup>7,9,13</sup>]NPS presenta un'elica molto stabile che si estende lungo tutta la sequenza peptidica e che questo peptide non è in grado di legarsi al recettore NPSR risultando completamente inattivo<sup>13</sup>. Singole sostituzioni amminoacidiche hanno mostrato che solamente la sostituzione della Gly<sup>7</sup> con Ala o Aib (acido 2-ammino-2-metilpropionico) è in grado di indurre una significativa struttura ad  $\alpha$ -elica, mentre gli analoghi [Ala<sup>9</sup>]NPS e [Ala<sup>13</sup>]NPS mostrano una scarsa propensione a tale organizzazione<sup>13</sup>. Un dato interessante è che [Ala<sup>9</sup>]NPS e [Ala<sup>13</sup>]NPS sono attivi quasi quanto il peptide naturale, mentre [Ala<sup>7</sup>]NPS e [Aib<sup>7</sup>]NPS si sono dimostrati inattivi. Questi risultati indicano che una conformazione ad elica incentrata sulla posizione 7 non è compatibile con l'attività biologica del peptide<sup>13</sup>.

Risultati differenti sono stati ottenuti con la sostituzione di Gly<sup>5</sup> con L- e D-Ala. La sostituzione con L-Ala favorisce la formazione dell' $\alpha$ -elica, al contrario del suo isomero D ma entrambe le sostituzioni hanno generato analoghi di NPS che hanno mostrato solo una leggera riduzione di potenza rispetto al peptide naturale<sup>13</sup>. Questo suggerisce che una conformazione ad  $\alpha$ -elica non sia importante per il legame ad NPSR, almeno in questa porzione della sequenza peptidica.

Degno di nota è il fatto che [D-Ala<sup>5</sup>]NPS si comporta come un agonista parziale nei confronti del recettore NPSR di efficacia corrispondente alla metà di quella di NPS.

---

in the neuropeptide S receptor: molecular consequences of the asthma-associated mutation N107I. *J Biol Chem* **2006**;281:24704–24712.

<sup>13</sup> Tancredi T, Guerrini R, Marzola E, Trapella C, Calo G, Regoli D, Reinscheid RK, Camarda V, Salvadori S, Temussi PA. *J Med Chem* **2007**;50:4501–4508.

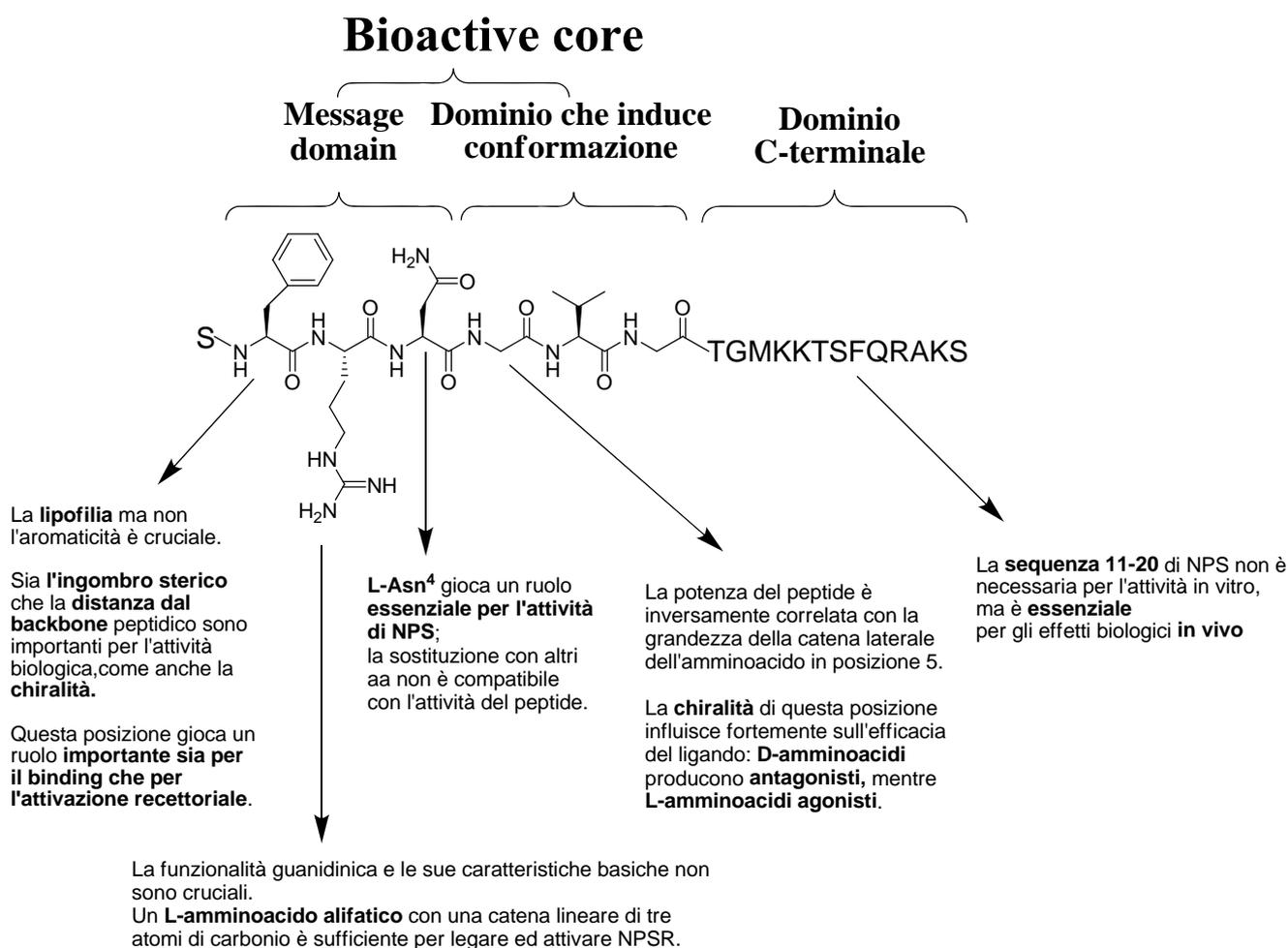
Inoltre, la sostituzione di Gly<sup>5</sup> con Aib, residuo achirale noto in letteratura per la capacità di indurre e stabilizzare strutture ad  $\alpha$ -elica, ha portato all'analogo [Aib<sup>5</sup>]NPS, nel quale invece non è stata osservata una maggior tendenza all'organizzazione ad  $\alpha$ -elica e che dal punto di vista biologico si comporta come un agonista parziale poco potente del recettore NPSR<sup>13</sup>.

Da questi risultati si può concludere che l'introduzione di un gruppo metilico (L- e D-Ala) o di due gruppi metilici (Aib) sul carbonio  $\alpha$  della posizione 5 limita la flessibilità del peptide causando una riduzione di potenza. Inoltre, questa riduzione della libertà conformazionale può favorire agonismo parziale ([D-Ala<sup>5</sup>]NPS, [Aib<sup>5</sup>]NPS) o agonismo pieno ([L-Ala<sup>5</sup>]NPS).

Riassumendo, questi studi di conformazione-attività insieme agli studi struttura-attività hanno dimostrato che:

- ✓ in vitro, il frammento minimo in grado di attivare il recettore per NPS con la stessa potenza del peptide naturale è la sequenza [1-10]hNPS;
- ✓ la sequenza Phe<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Asn<sup>4</sup> è determinante sia per l'affinità sia per l'attività biologica del peptide;
- ✓ la sequenza Gly<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup> rappresenta una regione flessibile del peptide importante per l'induzione e/o stabilizzazione della conformazione bioattiva di NPS;
- ✓ una conformazione ad  $\alpha$ -elica attorno alla posizione 7 non è compatibile con l'attività biologica di NPS;
- ✓ modifiche di Gly<sup>5</sup> possono essere critiche per la progettazione di ligandi NPSR che presentano ridotta efficacia.

Sulla base dei risultati ottenuti dagli studi conformazionali e di struttura-attività, è stata successivamente investigata in dettaglio<sup>8</sup> la porzione Phe<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Asn<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>, cruciale per l'attività biologica, e i risultati ottenuti sono riassunti nella Figura 5.

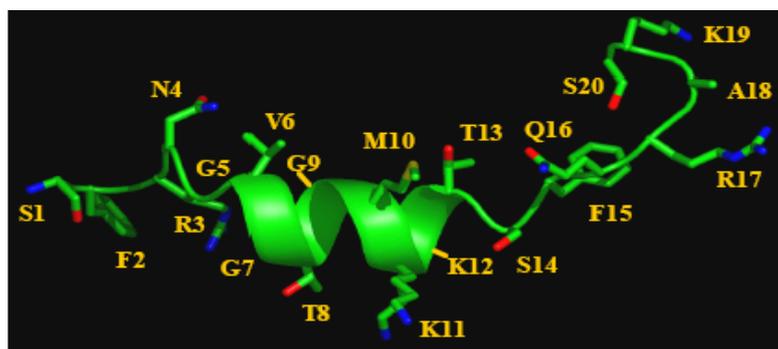


*Figura 5. Principali informazioni SAR emerse dallo studio di NPS*

## SCOPO DELLA TESI

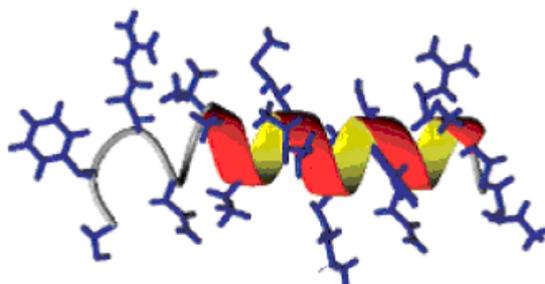
Nel mio lavoro di dottorato mi sono occupata dello studio SAR della posizione 5 di NPS e in particolare dello sviluppo di nuovi antagonisti puri e selettivi di NPSR.

Come accennato in precedenza, dati ottenuti tramite indagini NMR e di modellistica molecolare hanno portato i ricercatori Merck a formulare l'ipotesi di una probabile elica nascente nella porzione 5-13 di NPS <sup>12b</sup> (Figura 6).



*Figura 6. Ipotesi conformazionale di hNPS.*

Indagini spettroscopiche NMR condotte sul peptide *hNPS* dal gruppo del Prof. Temussi di Napoli, pur non escludendo l'ipotesi proposta dai ricercatori Merck, non hanno evidenziato per *hNPS* conformeri particolarmente stabili. In più l'inattività biologica ottenuta con l'analogo  $[Ala^{7,9,13}]hNPS$ , strutturato (nella medesima porzione della molecola) in un' $\alpha$ -elica particolarmente stabile suggerisce che l' $\alpha$ -elica non sia compatibile con l'attività biologica del peptide (Figura 7).



*Figura 7. Conformazione osservata in  $[Ala^{7,9,13}]hNPS$ .*

Al contrario la sostituzione nelle posizioni 5, 7 e 9 con un residuo di D-Ala (amminoacido che sfavorisce la struttura ad  $\alpha$ -elica) è in grado di generare analoghi di NPS con attività leggermente inferiore al peptide di riferimento confermando come l'occupazione e l'attivazione di NPSR possa avvenire con il peptide NPS organizzato in conformazione non necessariamente ad  $\alpha$ -elica (Tabella 4).

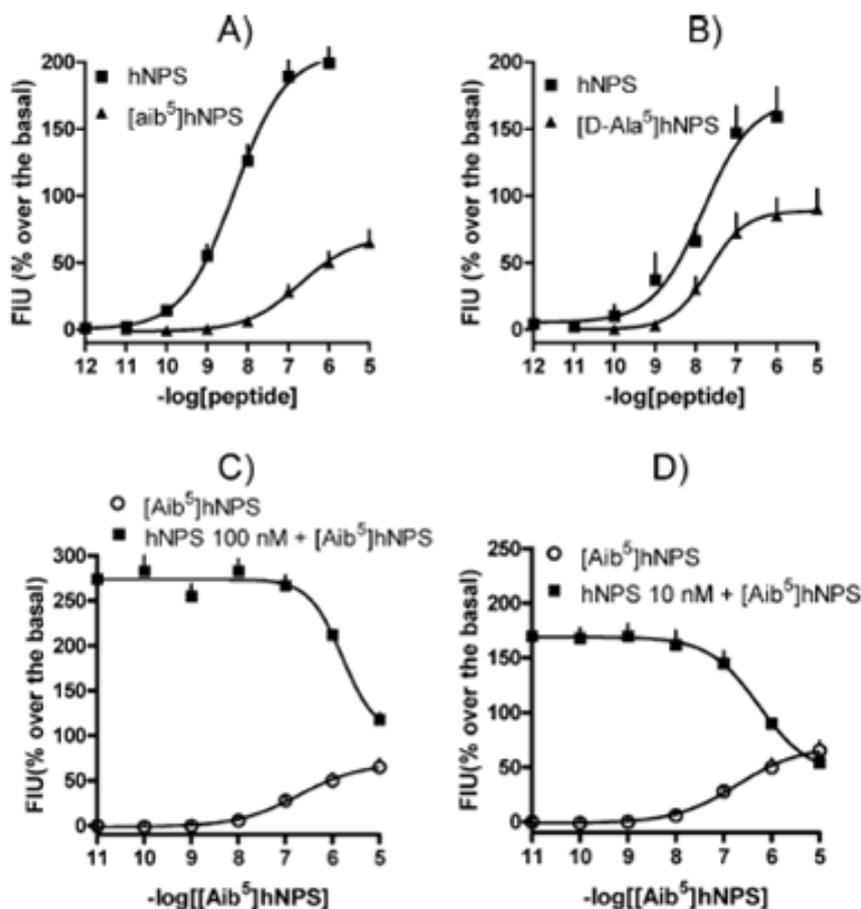
<b>Composto</b>	<b>pEC<sub>50</sub> (CL<sub>95%</sub>)</b>	<b>E<sub>max</sub> ± SEM</b>
hNPS	8.04 (7.76-8.32)	175 ± 18%
[Ala <sup>1</sup> ]NPS	7.58 (7.27-7.89)	182 ± 24%
[Ala <sup>5</sup> ]NPS	7.61 (7.31-7.91)	178 ± 16%
[Ala <sup>7</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 129 ± 15%	
[Ala <sup>9</sup> ]NPS	7.63 (7.06-8.20)	164 ± 14%
[Ala <sup>13</sup> ]NPS	7.72 (7.21-8.23)	172 ± 13%
[Ala <sup>9,13</sup> ]NPS	7.82 (7.32-8.32)	191 ± 22%
[Ala <sup>7,9,13</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 69 ± 24%	
<b>[D-Ala<sup>5</sup>]NPS</b>	<b>7.55 (7.03-8.07)</b>	<b>90 ± 15%*</b>
<b>[D-Ala<sup>7</sup>]NPS</b>	<b>7.63 (7.08-8.19)</b>	<b>164 ± 24%</b>
<b>[D-Ala<sup>9</sup>]NPS</b>	<b>7.67 (7.14-8.20)</b>	<b>172 ± 26%</b>
[His <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 147 ± 38%	
[Pro <sup>4</sup> ]NPS	6.80 (6.48-7.12)	167 ± 19%
[D-Pro <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 66 ± 48%	
[Aib <sup>1</sup> ]NPS	8.17 (7.67-8.67)	184 ± 32%
[Aib <sup>5</sup> ]NPS	6.72 (6.43-7.00)	65 ± 9%*
[Aib <sup>7</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 14 ± 4%	
[Aib <sup>9</sup> ]NPS	7.99 (7.58-8.40)	190 ± 19%

**Tabella 4.** Profilo farmacologico di hNPS e di analoghi di hNPS testati su cellule di topo HEK 293 esprimenti il recettore mNPSR.

\*: significativamente diverso da E<sub>max</sub> di hNPS in accordo ad ANOVA seguita dal test di Dunnet . I dati sono media ± SEM di almeno 5 esperimenti separati.

Degno di nota è l'osservazione secondo la quale la posizione 5 oltre ad essere importante per l'occupazione di NPSR è implicata anche nella sua attivazione: infatti il composto [D-Ala<sup>5</sup>]NPS presenta un effetto massimo che è circa la metà di quello evocato dal ligando naturale (Figura 8).

Inoltre assieme ad [Aib<sup>5</sup>]NPS promuove un'inibizione dose-dipendente della mobilizzazione del calcio indotta da NPS (Panel C e D). [D-Ala<sup>5</sup>]NPS e [Aib<sup>5</sup>]NPS si comportano da agonisti parziali di NPSR.



**Figura 8.** Profilo farmacologico di [Aib<sup>5</sup>]hNPS e [D-Ala<sup>5</sup>]hNPS. Per il saggio sono state utilizzate cellule HEK 293 di topo esprimenti stabilmente il recettore mNPSR ed i dati ottenuti sono espressi come variazione della fluorescenza in percentuale del basale.

(A) hNPS vs [Aib<sup>5</sup>]hNPS; (B) hNPS vs [D-Ala<sup>5</sup>]hNPS; [Aib<sup>5</sup>]hNPS quando è testato contro una concentrazione di 100 (C) oppure 10 (D) nM per hNPS è in grado di inibire, all'aumentare della sua concentrazione, gli effetti stimolatori dati da hNPS.

L'attività agonista parziale di [D-Ala<sup>5</sup>]hNPS e di [Aib<sup>5</sup>]hNPS suggerisce che la posizione 5 possa essere implicata nell'occupazione e attivazione del recettore NPSR.

Sulla base di questa indicazione in un primo lavoro sono stati sintetizzati analoghi di *h*NPS sostituiti in posizione 5 con amminoacidi di configurazione L o D caratterizzati da catena laterale lipofila alifatica o aromatica (Leu, Val, Met, Cys, Phe e Trp)<sup>14</sup> (Tabella 5).

La sostituzione di Gly<sup>5</sup> con amminoacidi naturali con catena laterale aromatica idrofobica (Phe e Trp) porta ad una riduzione drastica della potenza (circa 300 volte), associata anche, nel caso della [Phe<sup>5</sup>]*h*NPS, ad un'importante perdita di efficacia.

Invece, la sostituzione con amminoacidi naturali caratterizzati da catena laterale alifatica (Leu, Val, Met e Cys) genera agonisti pieni, meno potenti rispetto a *h*NPS e con valori di pEC<sub>50</sub> compresi tra 6.64 e 7.86. In particolare [Cys<sup>5</sup>]*h*NPS risulta essere soltanto sei volte meno potente del peptide naturale, mentre, aumentando l'ingombro sterico della catena laterale, si produce un progressivo decremento in potenza sino ad arrivare a [Leu<sup>5</sup>]*h*NPS che ha una potenza 100 volte inferiore rispetto a *h*NPS.

La configurazione relativa L dell'amminoacido introdotto in posizione 5 al posto del residuo non chirale Gly non influenza (ad eccezione di [Phe<sup>5</sup>]*h*NPS) l'efficacia del peptide. Al fine di investigare in modo dettagliato l'influenza della chiralità della posizione 5 di NPS gli stessi amminoacidi utilizzati precedentemente sono stati inseriti in posizione 5 con configurazione relativa D. La sostituzione della Gly<sup>5</sup> con D amminoacidi caratterizzati da catena laterale idrofobica aromatica ([D-Phe<sup>5</sup>]*NPS* e [D-Trp<sup>5</sup>]*NPS*) ha prodotto antagonisti puri del recettore NPSR poco potenti (riduzione di 100 volte della potenza come osservato coi rispettivi L isomeri), con completa eliminazione di efficacia. La sostituzione, invece, con D amminoacidi caratterizzati da catena laterale idrofobica alifatica ha portato ad agonisti parziali ([D-Leu<sup>5</sup>]*h*NPS e [D-Cys<sup>5</sup>]*h*NPS) o antagonisti puri con potenza moderata ([D-Val<sup>5</sup>]*h*NPS e [D-Met<sup>5</sup>]*h*NPS) per il recettore NPSR.

L'inserimento in posizione 5 di amminoacidi con configurazione relativa D ha prodotto una importante riduzione o totale perdita di efficacia nei confronti del recettore NPSR.

Questi dati suggeriscono che l'ingombro sterico della catena laterale dell'amminoacido in 5 è molto importante per il binding al recettore ed inversamente legato alla potenza del peptide. Inoltre la chiralità della posizione 5 è importante per l'attività: [L-Xaa<sup>5</sup>]*NPS* sono agonisti pieni o parziali, mentre [D-Xaa<sup>5</sup>]*NPS* sono agonisti parziali con bassa efficacia o antagonisti puri.

Tra i derivati [D-Xaa<sup>5</sup>]*NPS* l'agonista parziale [D-Cys<sup>5</sup>]*NPS* è il derivato più potente. In base a questo dato e avendo l'obiettivo di aumentare la potenza del peptide con la

---

<sup>14</sup> Guerrini R, Camarda V, Trapella C, Calo G, Rizzi A, Ruzza C, Fiorini S, Marzola E, Reinscheid R, Regoli D, Salvadori S. Synthesis and biological activity of human neuropeptide S analogues modified in position 5: Identification of potent and pure NPS receptor antagonists. *J Med Chem* **2009**;52:524–529.

contemporanea riduzione di efficacia, è stata sostituita la Gly<sup>5</sup> con derivati della D-Cys che presentano in catena laterale la funzione tiolica diversamente sostituita: [D-Cys(Acm)<sup>5</sup>]NPS, [D-Cys(Bzl)<sup>5</sup>]NPS [D-Cys(<sup>t</sup>Bu)<sup>5</sup>]NPS. Anche questi ultimi derivati si comportano da antagonisti puri (Tabella 5).

Composto	Agonista		Antagonista
	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± sem	pK <sub>B</sub> (CL <sub>95%</sub> )
NPS	8.65 (8.55-8.75)	295 ± 22%	ND
[Phe <sup>5</sup> ]NPS	6.11 (5.35-6.90)	69 ± 8%*	< 6
[Trp <sup>5</sup> ]NPS	cnc incomplete at 10 μM: 30 ± 9%		< 6
[Leu <sup>5</sup> ]NPS	6.64 (6.47-6.81)	214 ± 26%	ND
[Val <sup>5</sup> ]NPS	7.18 (6.57-7.79)	231 ± 68%	ND
[Met <sup>5</sup> ]NPS	7.06 (6.69-7.43)	240 ± 19%	ND
[Cys <sup>5</sup> ]NPS	7.86 (7.25-8.47)	280 ± 37%	ND
[D-Phe <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		6.27 (5.88-6.66)
[D-Trp <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		6.79 (6.21-7.37)
[D-Leu <sup>5</sup> ]NPS	7.05 (6.53-7.57)	118 ± 33%*	7.44 (6.96 -7.94)
[D-Val <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		7.56 (7.12-8.00)
[D-Met <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		7.09 (6.31-7.87)
[D-Cys <sup>5</sup> ]NPS	7.15 (6.39-7.91)	59 ± 13%*	7.84 (7.52-8.16)
[D-Cys(Acm) <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		6.47 (5.27-7.67)
[D-Cys(Bzl) <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		7.22 (7.01-7.43)
[D-Cys( <sup>t</sup> Bu) <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		6.62 (6.40-6.84)

**Tabella 5.** Effetti di hNPS e degli analoghi di hNPS modificati in posizione 5 testati su cellule HEK293 esprimenti il recettore NPSR di topo.

\*: significativamente diverso da E<sub>max</sub> di hNPS in accordo ad ANOVA seguita dal test di Dunnet . I dati sono media ± SEM di almeno 5 esperimenti separati.

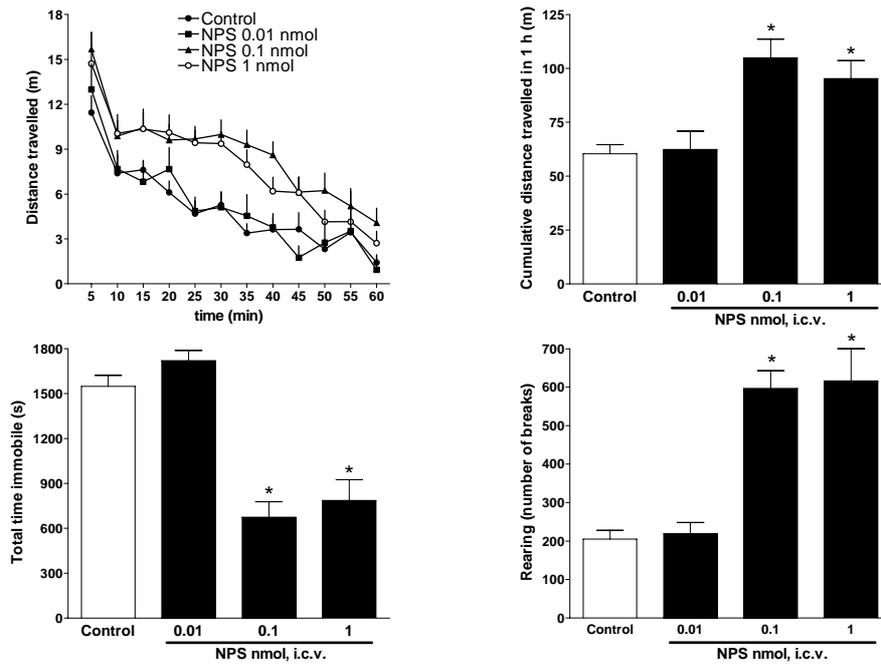
Questo studio ha portato all'identificazione della prima generazione di derivati antagonisti di NPSR. Il carattere antagonista di [D-Cys(<sup>t</sup>Bu)<sup>5</sup>]NPS e di [D-Val<sup>5</sup>]NPS è stato confermato anche da studi farmacologici in vivo<sup>14,15</sup>.

Uno dei derivati peptidici più interessante identificato fino ad ora, [D-Val<sup>5</sup>]NPS, è stato valutato, nei laboratori di Farmacologia del Dott. G. Calò, per la sua capacità di antagonizzare gli effetti di *h*NPS nel saggio dell'attività locomotoria nel topo<sup>14</sup>. L'iniezione *i.c.v.* di *h*NPS nel topo nel range di dose 0,01-1 nM è in grado di aumentare l'attività locomotoria, ridurre il tempo di immobilità e di incrementare il numero di episodi di raddrizzamento sulle zampe posteriori dell'animale (Figura 9).

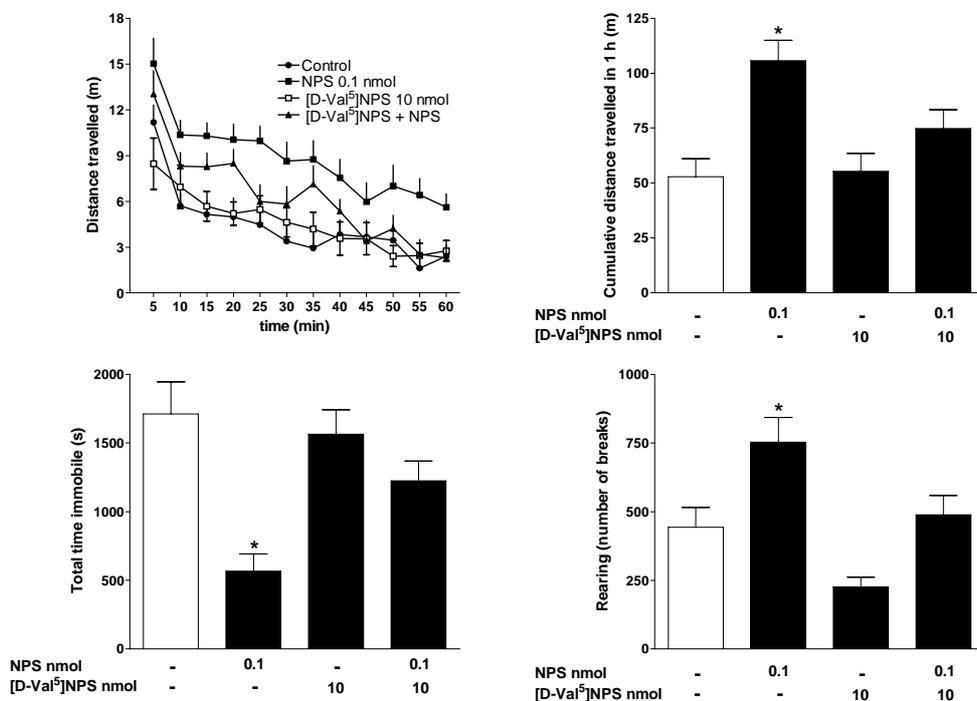
Essendo la dose di *h*NPS in grado di manifestare in modo significativo l'azione biologica la 0,1 nM ed avendo in vitro *h*NPS e [D-Val<sup>5</sup>]NPS un rapporto di potenza di circa 1 a 30 (pEC<sub>50</sub> *h*NPS: 8,65; pK<sub>b</sub> [D-Val<sup>5</sup>]NPS: 7,56), per la valutazione in vivo degli effetti di [D-Val<sup>5</sup>]NPS è stata scelta la dose 10 nM (rapporto 100 a 1 nei confronti di NPS). Dai dati riportati in Figura 10 si può notare come [D-Val<sup>5</sup>]NPS di per sé non modifichi i parametri comportamentali precedentemente riportati, mentre è in grado di revertire gli effetti indotti dalla somministrazione *i.c.v.* di NPS. Questo dato conferma anche in vivo l'attività antagonista di [D-Val<sup>5</sup>]NPS nei confronti del recettore NPSR.

---

<sup>15</sup> a) Camarda V, Rizzi A, Ruzza C, Zucchini S, Marzola G, Marzola E, Guerrini R, Salvadori S, Reinscheid RK, Regoli D, Calò G. In vitro and in vivo pharmacological characterization of the neuropeptides S receptor antagonist [D-Cys(<sup>t</sup>Bu)<sup>5</sup>]NPS. *J Pharmacol Exp Ther* **2009**;328:549–555; b) Han RW, Chang M, Pheng YL, Qiao LY, Yin XQ, Li W, Wang R. Central neuropeptide s inhibits distal colonic transit through activation of central neuropeptide s receptor in mice. *Peptides* **2009**;30:1313–1317.



**Figura 9.** Comportamento dell'animale in seguito a somministrazioni di 0.01, 0.1, 1nM di hNPS. In particolare sono state valutate: distanza percorsa dal topo, tempo di immobilità totale, numero di raddrizzamenti sulle zampe posteriori.



**Figura 10.** Variazioni dell'attività locomotoria di topo in seguito a somministrazione di hNPS (0,1nM), di [D-Val<sup>5</sup>]hNPS (10 nM) e loro cosomministrazione. In particolare sono state valutate: distanza percorsa dal topo, tempo di immobilità totale, numero di raddrizzamenti sulle zampe posteriori.

Proseguendo lo studio SAR della posizione 5 con l'intento di identificare le caratteristiche chimico-fisiche in grado di generare ligandi antagonisti puri e potenti di NSPR, in un secondo lavoro sono stati sintetizzati e caratterizzati 11 nuovi derivati peptidici di NPS<sup>16</sup> (Tabella 6).

La sostituzione del gruppo isopropilico della catena laterale della Val e D-Val, con un gruppo *sec*-butilico (D-Ile e D-allo-Ile) ha prodotto una leggera diminuzione della potenza che però risulta indipendente dalla configurazione del centro chirale presente in catena laterale. Risultati simili sono stati ottenuti sostituendo un metile del gruppo isopropilico di D-Val con un ossidrilico (D-Thr e D-allo-Thr). In questo caso però la configurazione del centro chirale della catena laterale sembra essere importante per l'efficacia del peptide in quanto [D-allo-Thr<sup>5</sup>]NPS è un antagonista puro per NPSR, mentre [D-Thr<sup>5</sup>]NPS si comporta da parziale agonista.

Inoltre, una catena laterale di tipo alifatico lineare costituita dai tre atomi di carbonio (D-Nva) genera un composto con attività agonista parziale 10 volte meno potente di [D-Val<sup>5</sup>]NPS.

Questi risultati suggeriscono che il gruppo isopropilico di D-Val<sup>5</sup> sia molto importante per ottenere un composto con attività antagonista, in quanto tutti i composti testati sono risultati meno potenti rispetto a [D-Val<sup>5</sup>]NPS.

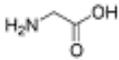
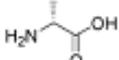
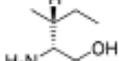
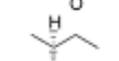
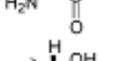
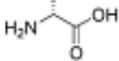
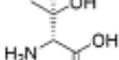
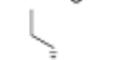
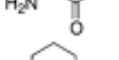
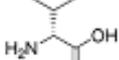
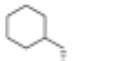
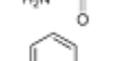
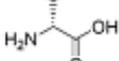
E' stato anche valutata l'introduzione di un altro sostituente R sul C $\beta$  della D-Val<sup>5</sup>: D-Gly(<sup>t</sup>Bu) [R=CH<sub>3</sub>] e D-Pen [R=SH] che ha generato composti antagonisti puri con potenza almeno 3 volte superiore a [D-Val<sup>5</sup>]NPS.

[<sup>t</sup>Bu-D-Gly<sup>5</sup>]NPS e [D-Pen<sup>5</sup>]NPS sono gli antagonisti puri di NPSR più potenti fin'ora identificati.

Infine, l'aumento della distanza del gruppo *tert*-butilico dal backbone peptidico ottenuto inserendo un gruppo metilenico (<sup>t</sup>Bu-D-Ala) determina una diminuzione di potenza associata ad un incremento di efficacia del peptide<sup>16</sup>.

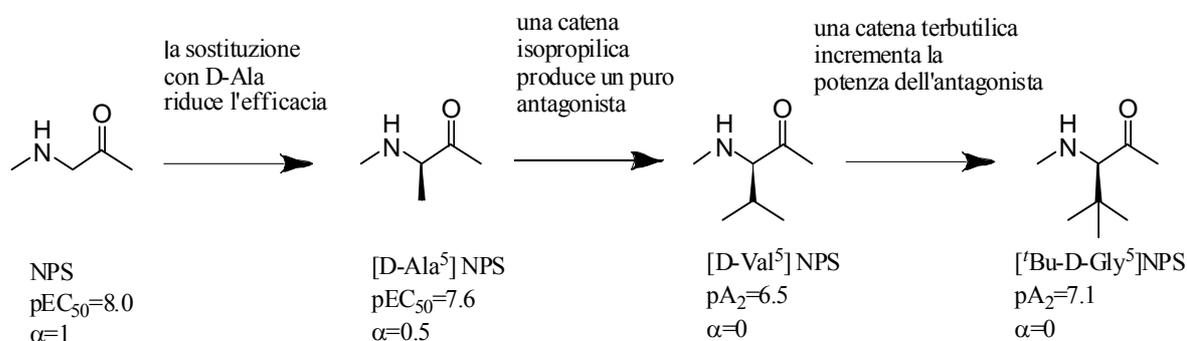
---

<sup>16</sup> Guerrini R, Camarda V, Trapella C, Calo' G, Rizzi A, Ruzza C, Fiorini S, Marzola E, Reinscheid RK, Regoli D, Salvadori S. Further studies at neuropeptide S position 5: Discovery of novel neuropeptide S receptor antagonists. *J Med Chem* **2009**;52:4068–4071.

Xaa <sup>5</sup>		Agonist		Antagonist
Chemical formula	Name	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± sem	pK <sub>B</sub> (CL <sub>95%</sub> )
	Gly	8.32 (8.00 - 8.64)	295 ± 22%	-
	D-Val	inactive		6.54 (5.99 - 6.99)
	D-Ile	inactive		5.72 (5.10 - 6.34)
	D-allo-Ile	inactive		6.04 (5.52 - 6.56)
	D-Thr	6.10 (5.79 - 6.41)	25 ± 5%*	6.09 (5.79 - 6.39)
	D-allo-Thr	inactive		6.04 (5.51 - 6.57)
	D-Nva	5.57 (5.02 - 6.12)	24 ± 7%*	5.68 (5.38 - 5.98)
	cyclohexyl-D-Gly	inactive		< 5
	D-Cha	inactive		< 5
	D-Phg	6.18 (5.81 - 6.55)	15 ± 2%*	6.12 (5.81 - 6.43)
	<sup>t</sup> Bu-D-Gly	inactive		7.06 (6.48 - 7.64)
	D-Pen	inactive		7.08 (6.46 - 7.70)
	<sup>t</sup> Bu-D-Ala	5.78 (5.06 - 6.50)	104 ± 2%*	6.32 (5.63 - 7.01)

**Tabella 6.** Effetti di hNPS e degli analoghi di hNPS modificati in posizione 5 testati su cellule HEK293 esprimenti il recettore NPSR di topo.

In conclusione la presenza in posizione 5 di NPS di una catena laterale di natura alifatica ramificata direttamente legata al C $\alpha$  dell'amminoacido in configurazione D favorisce l'attività antagonista pura (Figura 11).



**Figura 11.** Strategia chimica applicata per il design di antagonisti NPSR.

Nell'ambito di questi studi SAR è stato anche evidenziato come la sostituzione in posizione 5 con una D-Leu generi un agonista parziale di NPSR con potenza paragonabile a quello ottenuto con D-Val<sup>5</sup>. L'introduzione di un atomo di carbonio tra il gruppo isopropilico e il carbonio  $\alpha$  del D-amminoacido (D-Val verso D-Leu) non incide sull'affinità del composto per NPSR ma sulla sua efficacia. [D-Leu<sup>5</sup>]NPS è in grado di legare NPSR con potenza paragonabile a [D-Val<sup>5</sup>]NPS, ma allo stesso tempo attiva anche il recettore NPSR (Tabella 5).

Sulla base dei risultati sinora riportati, nel mio lavoro di dottorato mi sono occupata della sintesi di amminoacidi non naturali con l'intento di identificare nuovi antagonisti di NPSR puri e potenti e di investigare le caratteristiche chimico-fisiche che la catena laterale dell'amminoacido in posizione 5 deve possedere per legare con elevata affinità ma allo stesso tempo senza efficacia il recettore NPSR.

A questo scopo sono stati sintetizzati e introdotti in posizione 5 di NPS due amminoacidi non naturali e una serie di derivati della D-Penicilammina che costituiscono i tre blocchi principali del mio lavoro:

❖ **Parte prima:** sintesi dell'amminoacido **Ipv** (acido 2-ammino-3,3,4-trimetilpentanoico) (Figura 12):

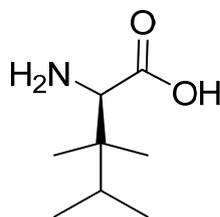


Figura 12. Ipv

❖ **Parte seconda:** sintesi dell'amminoacido **Ddb** (acido 2,4-diammino-3,3-dimetilbutirrico) (Figura 13):

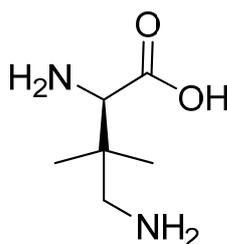


Figura 13. Ddb

❖ **Parte terza:** sintesi di S-alchil Penicillamine (Figura 14):

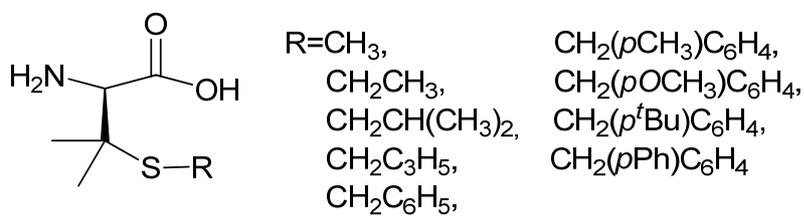
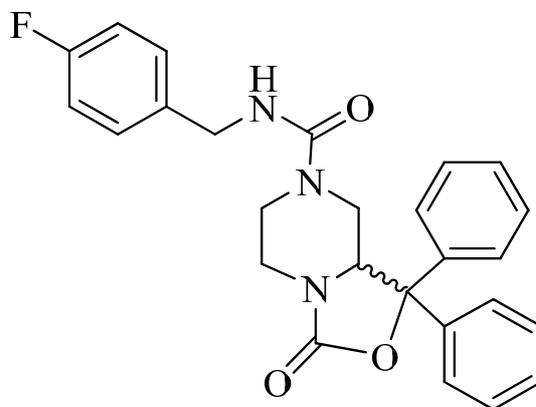


Figura 14. Derivati della Pen S-alchilati

Inoltre mi sono anche occupata della sintesi dell'antagonista NPSR non peptidico **SHA 68** (*Parte quarta*) (Figura 15).



*Figura 15. SHA 68*

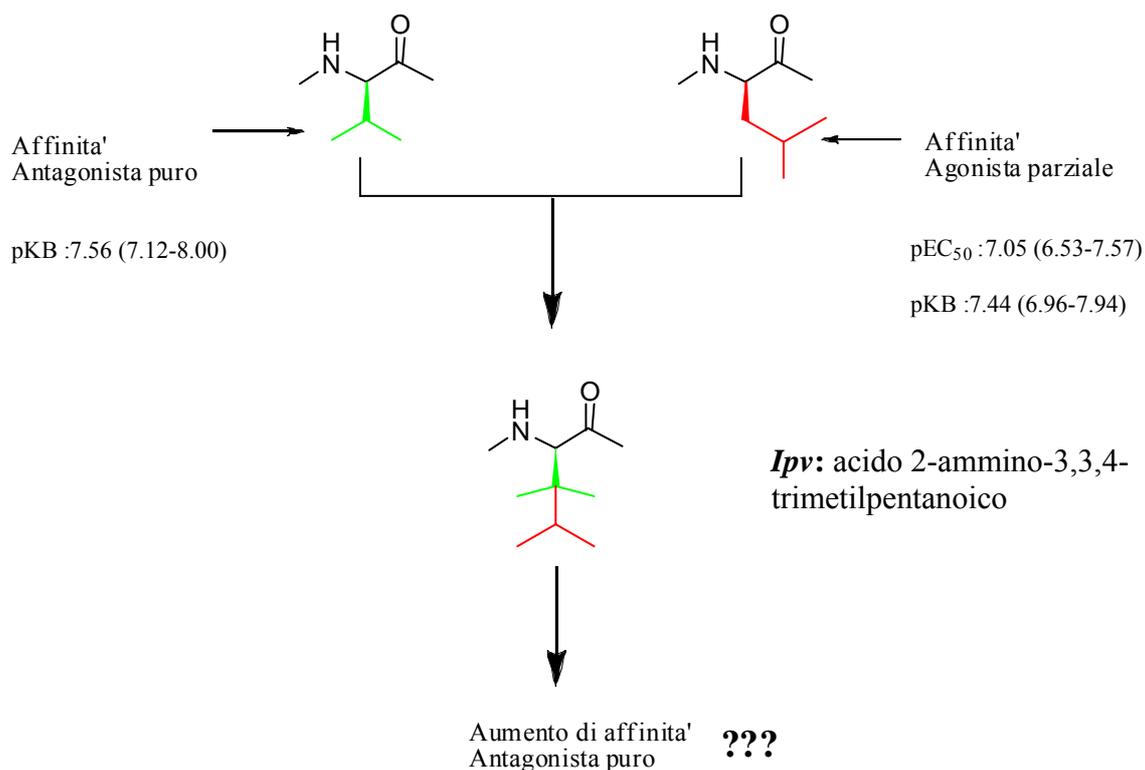
Il design, la sintesi e i principali risultati ottenuti sono di seguito riportati.

# ***RISULTATI E DISCUSSIONE***

## ***Parte prima***

L'amminoacido ***Ipv*** (acido 2-ammino-3,3,4-trimetilpentanoico che può essere considerato una *IsoPropilValina*) (Figura 12) è stato progettato fondendo le catene laterali della Valina e della Leucina. Studi precedenti avevano dimostrato come [D-Val<sup>5</sup>]NPS si comportasse da antagonista puro di NPSR, mentre [D-Leu<sup>5</sup>]NPS da agonista parziale potente. Abbiamo voluto investigare se la fusione delle funzioni chimiche delle due catene laterali potesse generare un nuovo antagonista puro più potente di quelli attualmente disponibili. La catena laterale del nuovo amminoacido è infatti caratterizzata da una ramificazione direttamente legata al C $\alpha$ , caratteristica che sembra essere essenziale per generare antagonismo puro, associata ad un'ulteriore ramificazione sul C $\beta$  che sembra essere utile per aumentare l'affinità per il recettore NPSR.

Sulla base di questi risultati abbiamo progettato la sintesi di un amminoacido chimerico Val/Leu (Figura 16) caratterizzato da una catena laterale lipofila alifatica ramificata e siglato come *Ipv*. Lo scopo è stato di fondere gruppi chimici in grado di conferire affinità ed antagonismo puro per ottenere una nuova generazione di antagonisti puri NPSR più potenti di quelli attualmente disponibili. Il nostro primo obiettivo è stato quello di sintetizzare *Ipv* in configurazione relativa D.



**Figura 16.** Strategia adottata per il design dell'amminoacido **Ipv**

Dei diversi metodi sintetici presenti in letteratura per ottenere amminoacidi non naturali abbiamo preso in considerazione quelli utili ad ottenere  $\alpha$ -amminoacidi.

Analizzando la letteratura recente che descrive la sintesi di amminoacidi chirali si può vedere come questa può essere suddivisa in tre grandi filoni principali:

1. catalizzatori chirali<sup>17</sup>
2. ausiliari chirali<sup>18</sup>
3. organocatalisi<sup>19</sup>

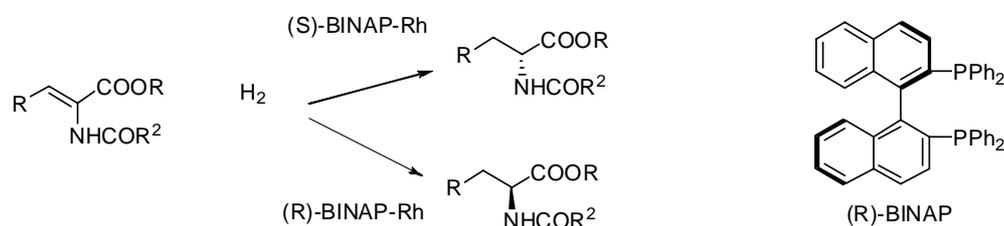
<sup>17</sup> Dygos, J. H. et al. A Convenient Asymmetric Synthesis of the Unnatural Amino Acid 2,6-Dimethyl-L-tyrosine *Synthesis*, **1992**; 08: 741-743.

<sup>18</sup> a) Williams, R.M.; Im, M-N. Asymmetric synthesis of monosubstituted and  $\alpha,\alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids via diastereoselective glycine enolate alkylations *JACS*, **1991**, 113, 9276-9286. b) Evans, D.A.; Britton, T.C. Electrophilic azide transfer to chiral enolates. A general approach to the asymmetric synthesis of  $\alpha$ -amino acids *JACS*, **1987**, 109, 6881-6883. c) Porzi, G. et al. Diastereoselective alkylation of (3S)- and (3R)-3-methylpiperazine-2,5-dione derivatives. A convenient approach to both (S)- and (R)-alanine *JOC*, **1992**, 57, 6532-6536.

<sup>19</sup> Bøgevig A., Jørgensen K.A. et al. Direct Organo-Catalytic Asymmetric  $\alpha$ -Amination of Aldehydes—A Simple Approach to Optically Active  $\alpha$ -Amino Aldehydes,  $\alpha$ -Amino Alcohols, and  $\alpha$ -Amino Acids; *Angewandte Chemie*, **2002**, 41, 10, 1790-1793.

### Catalizzatori chirali

L'utilizzo di sistemi catalitici a base di rodio chirale può essere applicato alla sintesi di una svariata pletora di composti otticamente attivi inclusi  $\alpha$ -amminoacidi. Prendendo in considerazione solo quest'ultima classe di composti è possibile sintetizzare amminoacidi aromatici<sup>20</sup>, eteroaromatici<sup>21</sup> e alifatici<sup>22</sup>; i prodotti di partenza sono solitamente deidroamminoacidi che subiscono idrogenazione catalitica in catalisi omogenea utilizzando come metallo il rodio e come ausiliari chirali, solitamente, il BINAP o il DIPAMP come illustrato nella Figura 17. L'utilizzo di questa metodologia richiede condizioni di reazione molto controllate, ad esempio la presenza di soli 5 ppm di ossigeno vanifica l'induzione asimmetrica.



**Figura 17.** Sintesi enantioselettiva di amminoacidi con l'ausilio dei catalizzatori chirali a base di Rh.

### Ausiliari chirali

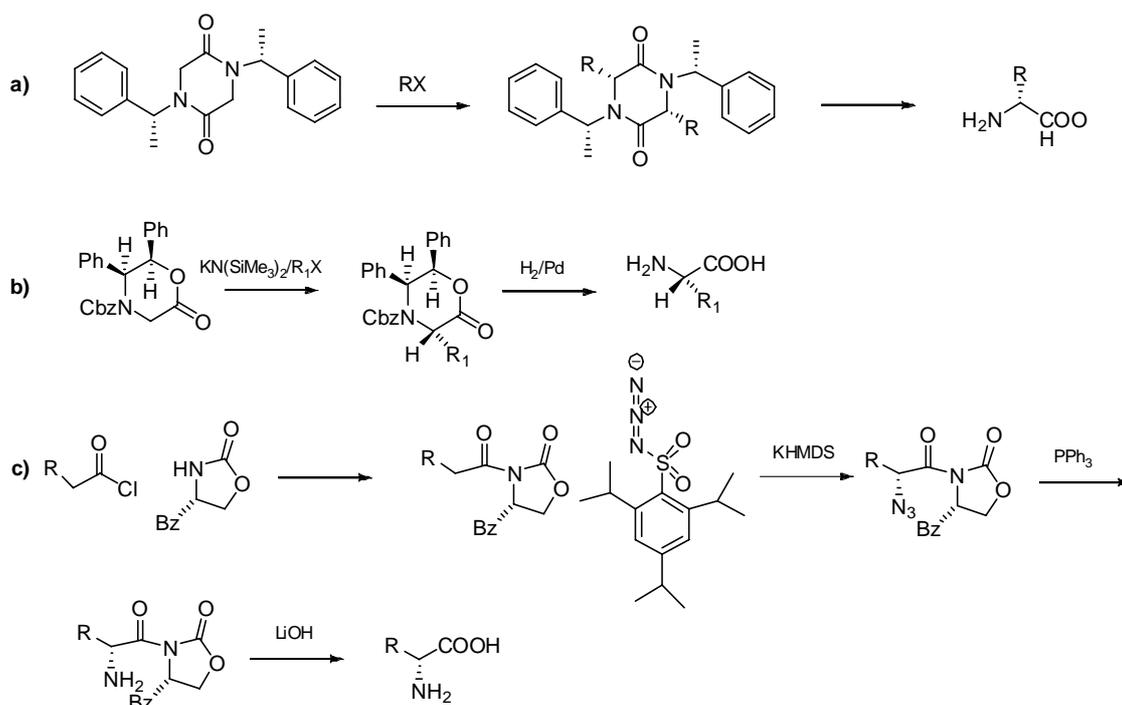
L'utilizzo di ausiliari chirali nella sintesi enantioselettiva copre un vastissimo range di reazioni, compresa la sintesi di amminoacidi chirali<sup>23</sup>. Tra le varie metodiche, quelle più generali prevedono l'utilizzo delle dichetopiperazine<sup>18c</sup> (a), dei difenilossiazinoni<sup>18a</sup> (b) e degli ossazolinoni chirali<sup>18b</sup> (c). Nella Figura 18 è riportato un esempio per ogni classe precedentemente elencata.

<sup>20</sup> Ojima, I.; *Catalytic asymmetric synthesis*, Second edition, **2000**.

<sup>21</sup> Sudo, A. et al. An efficient phosphorous-containing oxazoline ligand derived from cis-2-amino-3,3-dimethyl-1-indanol: application to the rhodium-catalyzed enantioselective hydrosilylation of ketones *Tetrahedron Asymmetry*, **1997**, 8, 3205.

<sup>22</sup> Bergens, S. H. et al. Asymmetric catalysis. Production of chiral diols by enantioselective catalytic intramolecular hydrosilation of olefins *JACS*, **1992**, 114,6, 2121-2128.

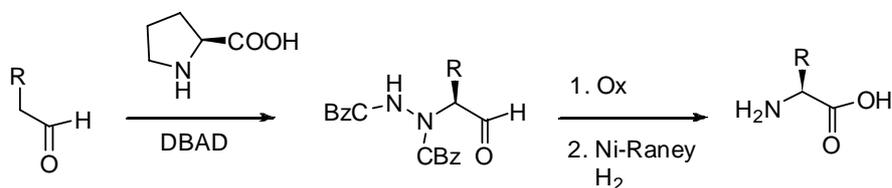
<sup>23</sup> a) Wan Ying Chung C, H Toy P Chiral auxiliaries in polymer-supported organic synthesis *Tetrahedron Asymmetry* **2004**:15 (3) 387-399; b) Blaser H. U. The chiral pool as a source of enantioselective catalysts and auxiliaries *Chemical Reviews* **1992**, 92 (5); 935-952.



**Figura 18.** Sintesi enantioselettiva di aminoacidi con ausiliari chirali.

### Organocatalisi

Il primo esempio dell'utilizzo di organocatalizzatori nella sintesi organica risale al 1910 ad opera di Dakin che utilizzò come catalizzatore un aminoacido naturale<sup>24</sup>. In anni più recenti lo studio di catalizzatori organici, soprattutto a base di Prolina, ne ha permesso l'impiego e la messa a punto in reazioni aldoliche<sup>25</sup>, reazioni di Mannich<sup>26</sup> e reazioni di Michael<sup>27</sup>. Recentemente questo tipo di approccio ha permesso la sintesi di aminoacidi otticamente attivi secondo la strategia riportata in Figura 19.



**Figura 19.** Sintesi enantioselettiva di aminoacidi con catalisi di Prolina.

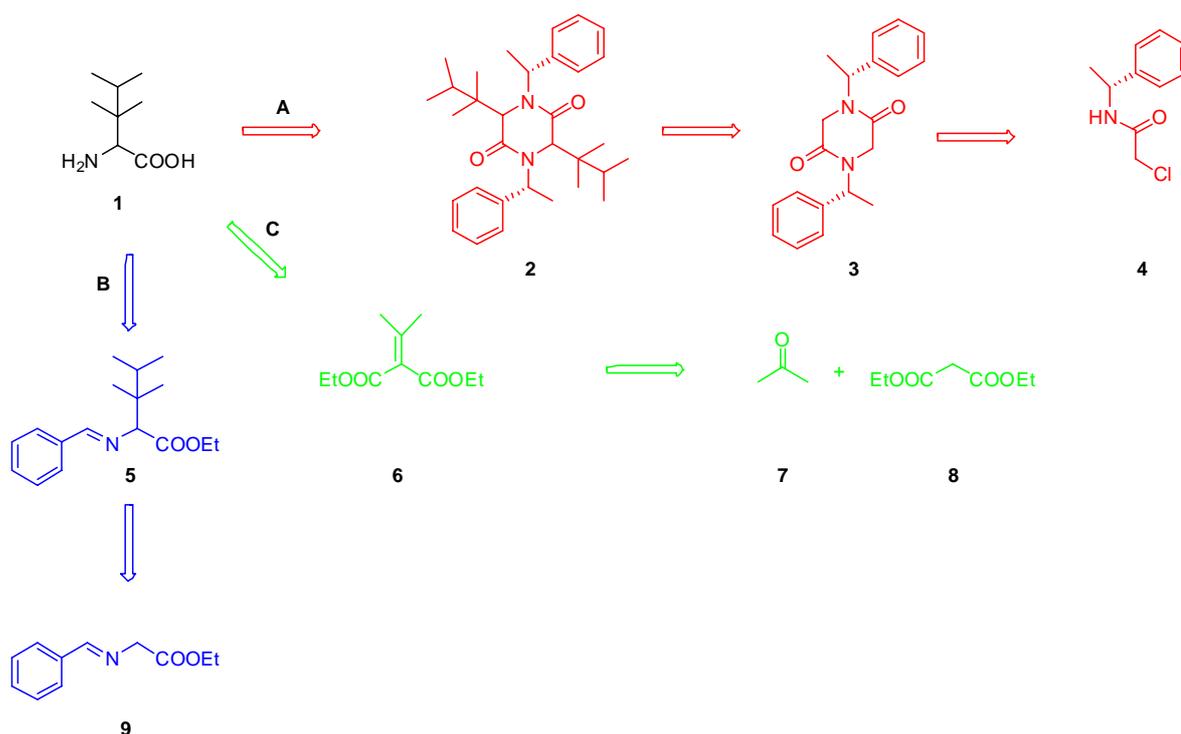
<sup>24</sup> Dakin, H. D.; *J. Biol. Chem.*, **1910**, 7, 49.

<sup>25</sup> List, B., Lerner R. A., Barbas III, C. F.; Enantioselective Aldol Cyclodehydrations Catalyzed by Antibody 38C2 *Organic Letters*, **1999**, 1, 59-62.

<sup>26</sup> Hayashi, T., Senda, T., Ogasawara, M. Rhodium-Catalyzed Asymmetric Conjugate Addition of Organoboronic Acids to Nitroalkenes; *JACS*, **2000**, 122, 10716-17.

<sup>27</sup> List, B. The Direct Catalytic Asymmetric Three-Component Mannich Reaction; *JACS*, **2000**, 122, 9336-37.

La sintesi di amminoacidi chirali non naturali a catena ramificata, come ad esempio Ipv, rappresenta un target sintetico di elevata complessità. Da un'analisi della letteratura, abbiamo individuato diverse strategie sintetiche che potrebbero portare alla sintesi di questo tipo di amminoacidi. L'amminoacido Ipv (**1**), che rappresenta il nostro target sintetico, formalmente è una chimera tra gli amminoacidi naturali Valina e Leucina portante come catena laterale una funzionalità 2,2,3-trimetil-butanica. Come illustrato nello Schema 1 si possono ipotizzare tre vie retrosintetiche che portano alla formazione del derivato desiderato.



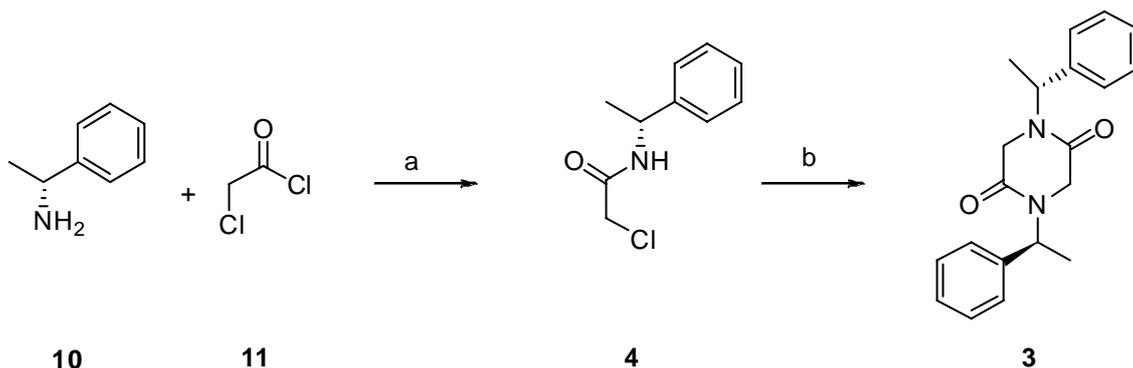
*Schema 1. Principali vie retrosintetiche per la formazione di Ipv.*

Nella prima via, l'utilizzo della chimica delle dichetopiperazine<sup>18c</sup> potrebbe rivelarsi vincente per la sintesi del derivato amminoacidico otticamente puro. Infatti, l'amminoacido **1** verrebbe sintetizzato come dimero presente nella dichetopiperazina alchilata (**2**), la quale a sua volta potrebbe essere sintetizzata semplicemente a partire dalla cloroammide **4** portante l'ausiliario chirale (R)-fenil-etilammina.

Per la sintesi dell'amminoacido racemo si possono invece prevedere due vie retro sintetiche complementari, quella della glicina benzilidene (via B) e quella del malonato (via C). La sintesi del racemo potrebbe essere utile per avere un riferimento da utilizzare

quale controllo della purezza ottica del derivato chirale e anche, visto il più semplice approccio chimico, per avere comunque l'amminoacido da utilizzare per la sintesi di un derivato peptidico diastereomerico.

Nel dettaglio la sintesi del derivato **1** è stata affrontata come segue: nello Schema 2 è illustrata la sintesi della dichetopiperazina<sup>18c</sup> **3** partendo dall'ausiliario chirale (R)-fenil-etilammina (**10**); la sintesi del derivato con la (S)-fenil-etilammina è stata effettuata in parallelo e non è riportata.



**Condizioni:** a) TEA, DCM, 0°C to r.t., 2h, Y=33%; b) THF anidro, LHMDS, -10°C to r.t to Rfx, 15h, Y=26.4%.

*Schema 2. Sintesi della dichetopiperazina.*

La reazione tra la fenil-etilammina (**10**) ed il cloroacetilcloruro (**11**) è stata condotta in diclorometano in presenza di trietilammina stechiometrica; la corrispondente cloroammide **4** è stata cristallizzata da etere etilico. L'intermedio **4** è stato dimerizzato in THF anidro in presenza di litioesametildisilazide (LHMDS) a -10° C.

Al fine di aumentare la resa finale in prodotto **3**, la reazione è stata condotta con un alto grado di diluizione ed effettuando aggiunte scalari di base per minimizzare il prodotto non desiderato di polimerizzazione della cloroammide. Nonostante tutte le accortezze, una percentuale di circa il 20% di **4** polimerizza.

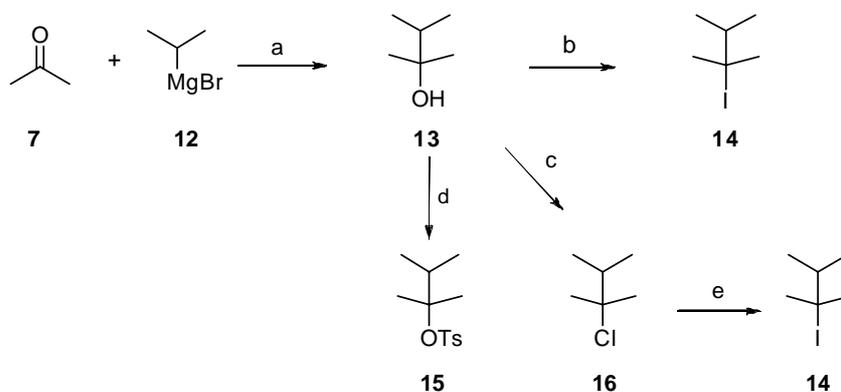
Il prodotto finale **3** è stato purificato con colonna cromatografica di gel di silice in gradiente di acetato di etile/cicloesano. Questa metodica ha permesso di ottenere il prodotto **3** con una resa del 30% e parallelamente il recupero dell'intermedio **4** con una resa del 40%.

La dichetopiperazina **3** è stato sintetizzato su media scala, circa 7 grammi di entrambi gli enantiomeri. Nello Schema 3 è illustrata la sintesi dei derivati alchilici utilizzati per la

costruzione della catena laterale del composto **1**. La sintesi dell'alcol **13** è stata ottenuta facendo reagire l'isopropil-magnesio bromuro sull'acetone. Il derivato **13** ha mostrato svariati problemi di purificazione in quanto non è controllabile su TLC, in colonna cromatografica si degrada velocemente ed anche la distillazione bolla a bolla non ha portato ad un miglioramento del profilo NMR rispetto al grezzo di reazione. Per questa serie di motivi l'alcol **13** è stato utilizzato tal quale per la preparazione degli agenti alchilanti (**14**) e (**15**). Per la sintesi dello iodo derivato **14** abbiamo utilizzato la procedura descritta in letteratura<sup>28</sup> che prevede l'utilizzo di iodio molecolare in etere di petrolio a riflusso: purtroppo questa metodica non ha dato buon esito.

Per questo motivo si è pensato di attivare l'alcol come tosil derivato **15**. Pure in questo caso i risultati non sono stati soddisfacenti in quanto, probabilmente, il derivato alcolico si degrada nelle condizioni di reazione.

Un ultimo tentativo di ottenere l'agente alchilante di interesse è stato effettuato trasformando il derivato alcolico **13** in cloro-derivato<sup>29</sup> **16** utilizzando come reagenti una miscela di trifenilfosfina e tetracloruro di carbonio. Anche in questo caso il derivato alchilico presenta tutte le difficoltà di purificazione descritte precedentemente e il tentativo di trasformare il cloro-derivato in iodo-derivato attraverso lo scambio cloro/iodio con sodio ioduro in acetone non ha portato ai risultati attesi.



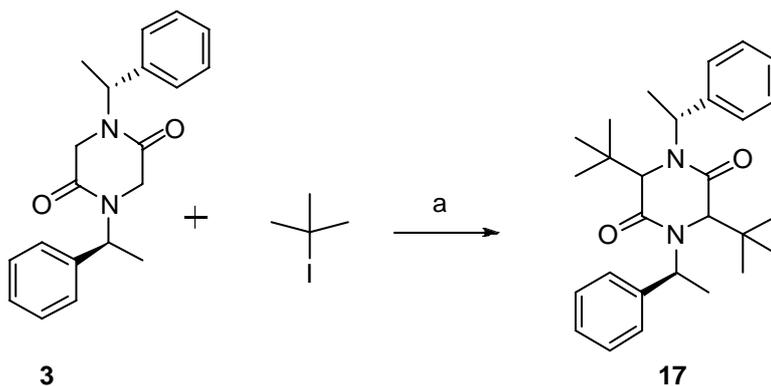
**Condizioni:** a) THF anidro, Iodio bisublimato, fiamma diretta to r.t., overnight, Y= 74%; b) I<sub>2</sub>, EtPt, Rfx, 1h, Y= 39% ; c) CCl<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, 0°C, overnight, Y= 10 %; d) DCM, TEA, 0°C to r.t., overnight, Y= 4% e) NaI, acetone, Et<sub>2</sub>O, r.t., 3 giorni, Y= 5% .

*Schema 3. Sintesi dei derivati alchilici utilizzati per la costruzione della catena laterale di Ipv.*

<sup>28</sup> Joseph, R., Pallan, P. S., Sudalai, Ravindranathan, T. Direct conversion of alcohols into the corresponding iodides *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 4, 609-612.

<sup>29</sup> Kende, A. S., Dong, H.-Q., Mazur, A. W., Ebetino, F. H. Preparation of 'carba' dipeptides bearing a basic side-chain at the C-terminus: synthesis of enantiopure Boc-D-Phe-Ψ[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]-L-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH and Boc-D-Phe-Ψ[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]-D-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 6015-6018.

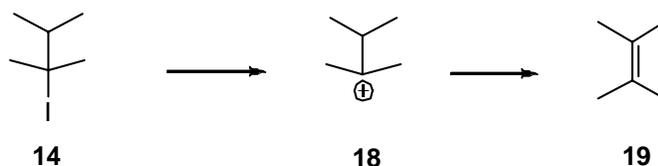
A questo punto, prima di procedere con metodi chimici alternativi per la sintesi di **14** (o analoghi) abbiamo verificato la reattività dell'alchilante commerciale *tert*-butil-ioduro nei confronti della dichetopiperazina (**3**). La reazione (Schema 4) è stata effettuata in atmosfera di argon e THF anidro alla temperatura di  $-78^{\circ}\text{C}$  ed utilizzando come base la LHMDS. Purtroppo anche in questo caso la sintesi del derivato dichetopiperazinico **17** non ha portato ai risultati attesi.



**Condizioni:** a) LHMDS, THF anidro,  $-78^{\circ}\text{C}$ , overnight.

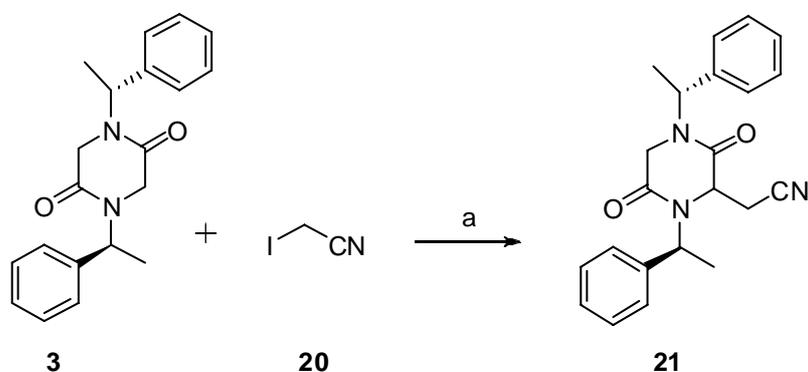
*Schema 4. Reazione tra dichetopiperazina (3) e un alogenuro alchilico commerciale.*

Visti gli insuccessi ottenuti con derivati alchilici terziari anche commerciali come il *tert*-butil-ioduro abbiamo ipotizzato che sia durante le reazioni di trasformazione della funzione alcolica di **13** che nelle reazioni di alchilazione della dichetopiperazina che dovrebbero procedere via  $\text{S}_{\text{N}}1$ , la reazione di eliminazione ( $\text{E}_1$ ) competitiva porti alla formazione dell'alchene più sostituito in modo praticamente esclusivo. Essendo tale alchene estremamente basso bollente il prodotto di eliminazione non può essere confermato via NMR in quanto viene perso durante i processi di evaporazione (Schema 5).



*Schema 5. Reazione di  $\text{E}_1$  competitiva dei derivati alchilici di nostro interesse.*

Per confermare l'ipotesi che l'alchilante da noi preparato presenti questi problemi di reattività, abbiamo deciso di tentare l'alchilazione della dichetopiperazina utilizzando come agente alchilante lo iodo-acetonitrile (Schema 6).



**Condizioni:** a) LDA, THF anidro, -78°C, overnight, Y= 41.5 %.

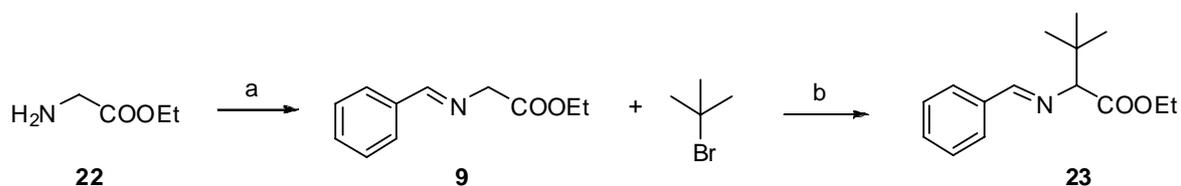
*Schema 6. Prova di reazione di alchilazione della dichetopiperazina con iodo-acetonitrile.*

Come illustrato nello Schema 6, la dichetopiperazina (**3**) e lo iodoacetonitrile (**20**) sono fatti reagire a -78°C in THF ed atmosfera di argon, utilizzando come base la litiodiisopropilammide (LDA) preparata di fresco da diisopropilammmina e *n*-butil-litio. La reazione procede con l'alchilazione della posizione 2 della dichetopiperazina a dare in buona resa il derivato **21**, composto non di interesse. Questo dato ci permette di confermare, anche se indirettamente, che la mancata alchilazione della dichetopiperazina con l'alchilante di nostro interesse è da imputare alle caratteristiche chimico-fisiche dell'alchilante e non della dichetopiperazina.

Viste le difficoltà sintetiche associate alla sintesi enantioselettiva dell'amminoacido **1** via dichetopiperazina, abbiamo esplorato altre metodiche.

Come riportato nello Schema 7, la via della glicina-benzilidene<sup>30</sup> (**9**) che prevede l'utilizzo di alogenuri alchilici terziari come agenti alchilanti, in analogia alle problematiche incontrate nello Schema 4, non ci ha permesso di arrivare al prodotto desiderato.

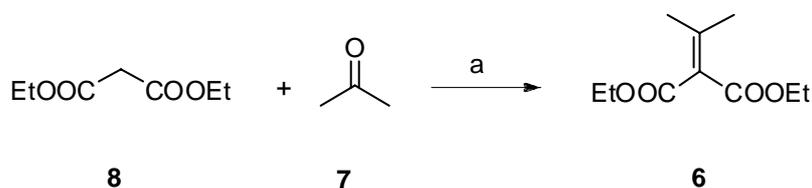
<sup>30</sup> Stork, G., Leong, A. Y.W., Touzin, A. M. Alkylation and Michael additions of glycine ethyl ester. Use in alpha-amino acid synthesis and as acyl carbanion equivalent *JOC*, **1976**, 41, 3491-3493.



**Condizioni:** a) DCM, MgSO<sub>4</sub>, TEA, r.t., 12h, Y= 97 %; b) THF anidro, LDA, -78°C to r.t., 5h, Y= 66 %.

*Schema 7. Sintesi di Ipv secondo la via della glicina-benzilidene.*

Visti i risultati negativi di tutte le prove di alchilazione su derivati alogenurici terziari, abbiamo proceduto in accordo con l'ultima via retrosintetica illustrata precedentemente (Schema 1). Come illustrato nello Schema 8, la preparazione del derivato malonico  $\alpha$ - $\beta$  insaturo **6** è stata ottenuta in buona resa e in grande scala attraverso una reazione di Knoevenagel tra il dietilmalonato e l'acetone come descritto da Eliel et al.<sup>31</sup>.



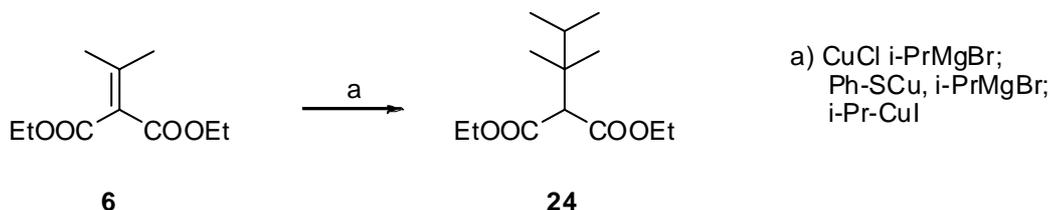
**Condizioni:** a) ZnCl<sub>2</sub>, Ac<sub>2</sub>O, 20-24h, Rfx, Y= 6.4 %.

*Schema 8. Preparazione del derivato 6 attraverso la reazione di Knoevenagel.*

La buona disponibilità del composto **6** ci ha permesso di valutare la costruzione della catena laterale di **1** attraverso reazioni di Michael di derivati organometallici (tipo reattivi di Grignard) su substrati esterei insaturi. Il derivato **6** si presta ad addizione sia 1,4 sia 1,2. Questa scarsa chemoselettività è stata migliorata utilizzando sali di rame catalitici per favorire la reazione di Michael 1,4 (desiderata) rispetto alla 1,2 (collaterale) (Schema 9). L'utilizzo di reattivi di Grignard, in particolare l'isopropilmagnesio bromuro, in presenza di diversi sali di rame come catalizzatori (CuCl, Ph-SCu, *i*-PrCuI), ha portato al prodotto

<sup>31</sup> Eliel, E. L., Hutchins, R. O., Knoeber, Sr. M.; *Organic Synthesis, Coll.*, a) **1970**, 50, 38; b) **1988**, 6, 442.

**24** solo in presenza di CuCl. La resa finale della reazione è stata comunque bassa (dell'ordine del 10%) ed inoltre non è stato possibile effettuare uno scale up.



**Condizioni:** a) Et<sub>2</sub>O anidro, -5°C to r.t., 4h, Y= 11 %.

*Schema 9. Reazione di addizione di Michael sull'intermedio 6 catalizzata da diversi sali di rame.*

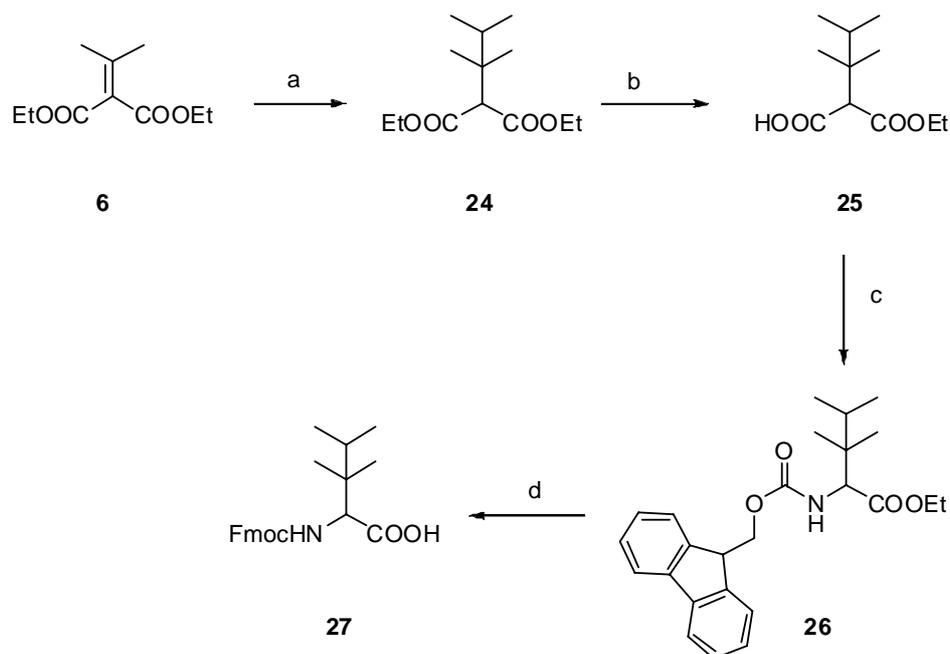
In letteratura, questo tipo di reazioni sono riportate procedere con buone rese<sup>22,32</sup>. La bassa resa da noi ottenuta può essere attribuita a problemi di ingombro sterico in quanto sia l'accettore di Michael (malonato) che il donatore di Michael (isopropilmagnesiobromuro) presentano due gruppi metilici che impediscono l'avvicinamento dell'organocuprato agli elettroni pi-greco dell'olefina. Nello Schema 10 è riportata la procedura che ha permesso di ottenere *Ipv* opportunamente protetto (**27**) per esser impiegato nella sintesi in fase solida del corrispondente [Xaa<sup>5</sup>]NPS analogo.

Nonostante le difficoltà sintetiche e la bassa resa della reazione di addizione 1,4, è stato possibile ottenere una quantità sufficiente di malonato derivatizzato (**24**) per poter proseguire la sintesi dell'amminoacido *Ipv* in forma racema.

L'intermedio **24** è stato monosaponificato in presenza di 1 equivalente di soda a 0°C. Il composto **25** è stato sottoposto a trasposizione di Curtius<sup>33</sup> utilizzando la difenilfosforilazide (DPPA) ed il fluorenilmetanolo come nucleofilo per ottenere direttamente lo Fmoc-amminoestere (**26**) che per idrolisi acida ha fornito il prodotto desiderato **27**.

<sup>32</sup>Posner, G. H., Brunelle, D. J., Sinoway, L Direct and Convenient Preparation of Lithium Phenylthio(alkyl)cuprate Reagents *Synthesis*, **1974**, 09, 662-663.

<sup>33</sup> a) Weinstock J Notes- A Modified Curtius Reaction.; *JOC*, 24: 9, **1961**, 26, 3511. b) Shioiri T., Ninomiya K., Yamada S Diphenylphosphoryl azide. New convenient reagent for a modified Curtius reaction and for peptide synthesis *JACS*, **1972**, 94, 6203-6205. c) Nagumo, S., Nishida, A., Yamazaki, C., Matoba, A., Murashige, K., Kawahara, N Total synthesis of antimuscarinic alkaloid, (±)-TAN1251A *Tetrahedron*, **2002**, 58, 4917-4924.



**Condizioni:** a) Et<sub>2</sub>O anidro, CuCl, i-PrMgBr, -5°C, 4h, Y=11%; b) etanolo, NaOH, R.t., 2 giorni, Y= 80%; c) FmocOH, DPPA, toluene, Rfx, 2h, Y= 37%; d) AcOH glaciale, HCl 37 %, Rfx, 2h, Y=95%.

**Schema 10.** Steps finali sintetici per ottenere Ipv protetto come Fmoc pronto per la fase solida.

La strategia chimica adottata ci ha permesso di ottenere l'amminoacido desiderato (**27**) con una resa bassa, ma sufficiente per poterlo utilizzare in fase solida per la sintesi di un analogo del Neuropeptide S modificato in posizione 5.

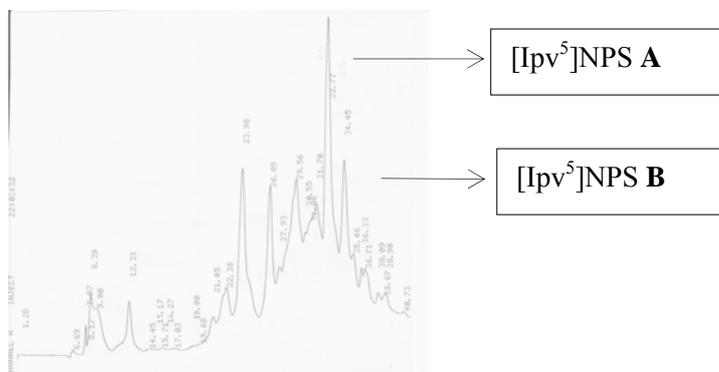
La miscela racemica di **27** ha fornito l'analogo NPS come miscela diastereoisomerica, [D/L-Ipv<sup>5</sup>]NPS, che è stato possibile separare tramite HPLC preparativo: i due prodotti sono stati siglati [Ipv<sup>5</sup>]NPS **A** e [Ipv<sup>5</sup>]NPS **B**.

La configurazione assoluta della posizione 5 dei due peptidi finali di [Ipv<sup>5</sup>]NPS non è stata assegnata.

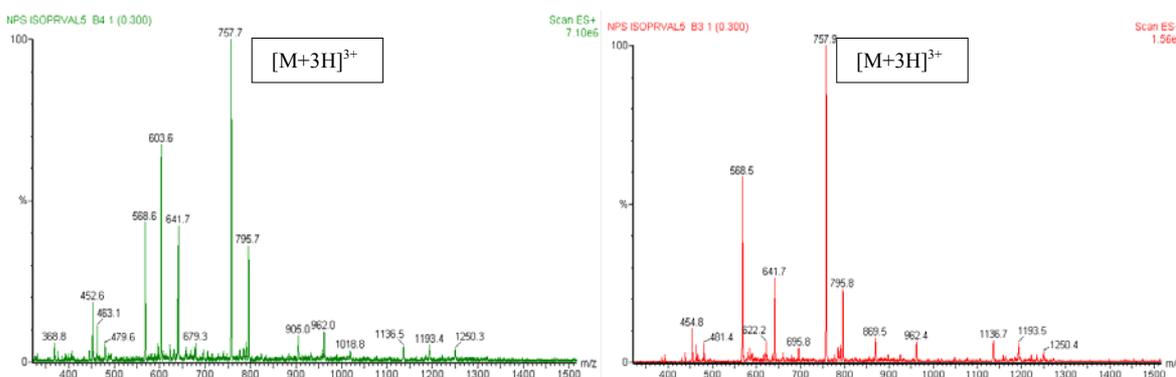
Nella Figura 20 sono riportati il cromatogramma HPLC analitico e lo spettro di massa ESI del grezzo di reazione.



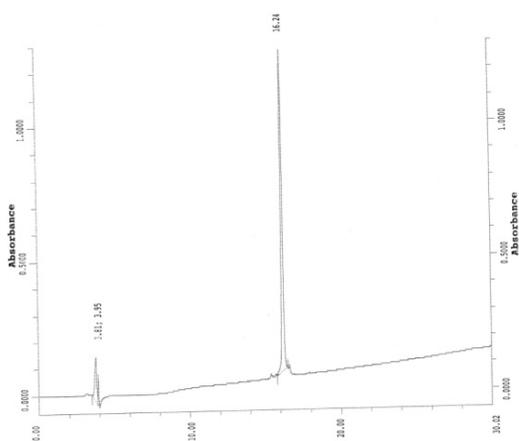
Il grezzo di reazione contenente i due diastereoisomeri, [L-Ipv<sup>5</sup>]NPS e [D-Ipv<sup>5</sup>]NPS, è stato purificato mediante HPLC preparativo ed è stato possibile separare due prodotti con lo stesso peso molecolare corrispondente al prodotto desiderato (Figura 21).



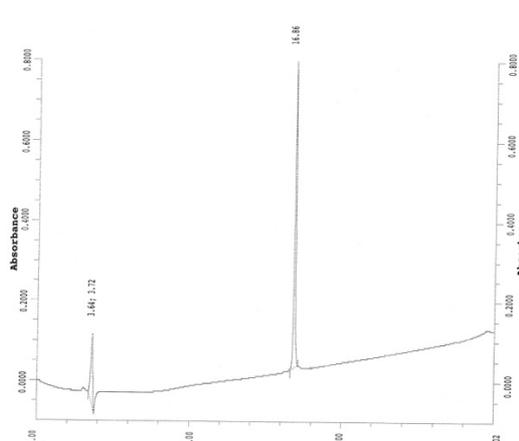
profilo HPLC Preparativo



Spettri di massa ESI dei due diastereomeri



[Ipv<sup>5</sup>]NPS A

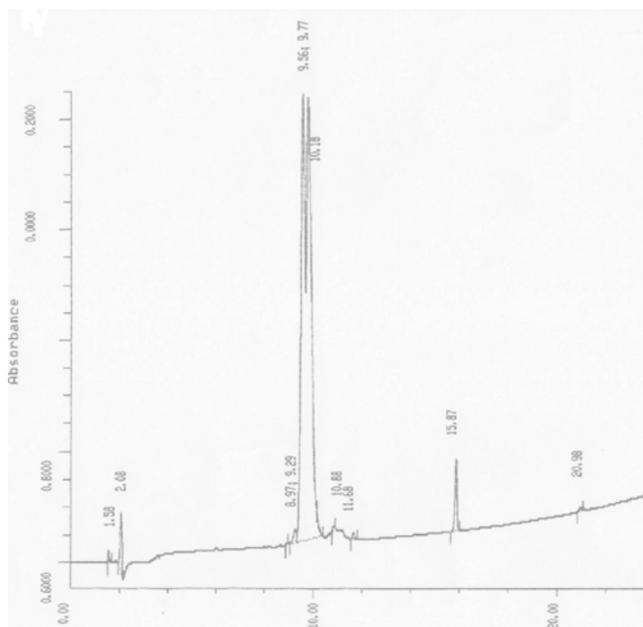


[Ipv<sup>5</sup>]NPS B

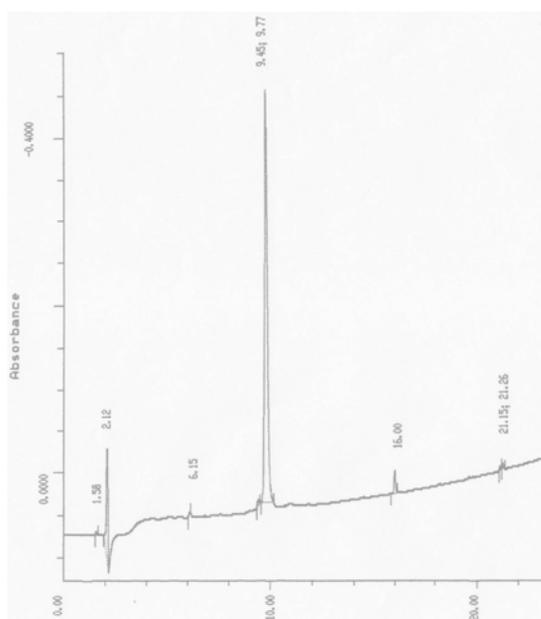
Cromatogrammi dei due diastereomeri separati [D-Ipv<sup>5</sup>]NPS e [L-Ipv<sup>5</sup>]NPS

Figura 21.

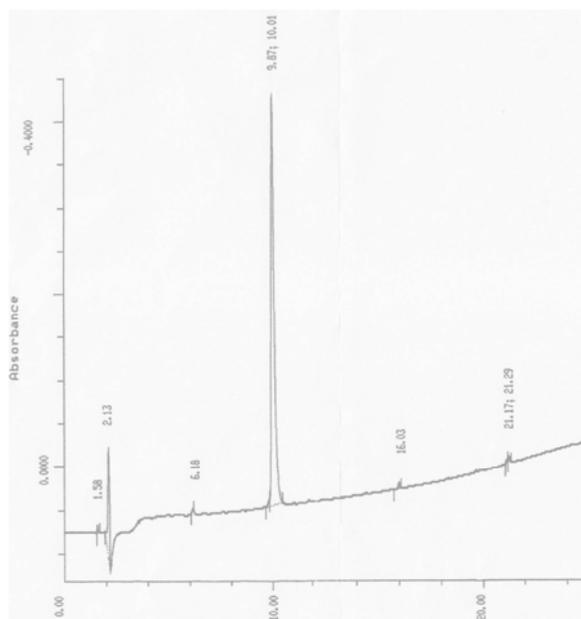
Sulla base del confronto cromatografico tra coppie diastereomeriche di NPS analoghi precedentemente sintetizzati tipo [L-Val<sup>5</sup>]NPS e [D-Val<sup>5</sup>]NPS (Figura 22), si può ipotizzare che il diastereomero [I<sub>p</sub>v<sup>5</sup>]NPS con il tempo di eluizione inferiore, [I<sub>p</sub>v<sup>5</sup>]NPS **A**, corrisponda al [L-I<sub>p</sub>v<sup>5</sup>]NPS, mentre quello con il tempo di eluizione superiore, [I<sub>p</sub>v<sup>5</sup>]NPS **B**, a [D-I<sub>p</sub>v<sup>5</sup>]NPS.



Miscela [D/L-Val<sup>5</sup>]NPS



[L-Val<sup>5</sup>]NPS



[D-Val<sup>5</sup>]NPS

**Figura 22.** Profilo analitico di [L-Val<sup>5</sup>]NPS e [D-Val<sup>5</sup>]NPS usati come confronto per [D/L-I<sub>p</sub>v<sup>5</sup>]NPS.

I due diastereomeri di [I<sub>pv</sub><sup>5</sup>]NPS e il ligando naturale sono stati valutati biologicamente in vitro nel saggio di mobilizzazione del calcio intracellulare presso i laboratori della Sezione di Farmacologia del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale con un protocollo sperimentale riportato nella Parte Sperimentale del presente elaborato.

L'antagonismo è stato valutato costruendo una curva concentrazione-risposta (10 pM-10 µM) del peptide in oggetto contro una concentrazione fissa di NPS (10 nM), corrispondente approssimativamente alla sua EC<sub>80</sub>.

Questi saggi hanno dimostrato che l'isomero [I<sub>pv</sub><sup>5</sup>]NPS **A** si comporta da agonista parziale a bassa efficacia, mentre l'isomero [I<sub>pv</sub><sup>5</sup>]NPS **B** si comporta da antagonista puro poco potente (Tabella 7).

	Agonista		Antagonista
	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± sem	pK <sub>B</sub> (CL <sub>95%</sub> )
hNPS	8.87 (8.72-9.14)	397 ± 34%	
[ <sup>t</sup> Bu-D-Gly <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 µM		6.49 (6.30-6.68)
[D-Val <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 µM		7.56 (7.12-8.00)
[I <sub>pv</sub> <sup>5</sup> ]NPS <b>A</b>	6.22 (5.90-6.54)	165 ± 20%	7.49 (6.22-8.76)
[I <sub>pv</sub> <sup>5</sup> ]NPS <b>B</b>	Inattivo fino a 10 µM		~ 6

**Tabella 7.** Attività di NPS ed nuovi analoghi modificati in posizione 5, [L-I<sub>pv</sub><sup>5</sup>]NPS e [D-I<sub>pv</sub><sup>5</sup>]NPS, in cellule HEK293 che esprimono il recettore NPSR ricombinante di topo.

L'introduzione di I<sub>pv</sub> in posizione 5 non ha dato i risultati attesi. Questo lavoro ci ha comunque permesso di avere informazioni sulla natura chimica della catena laterale tollerata in posizione 5. In particolare possiamo ipotizzare che catene lipofile ramificate e stericamente più ingombrate rispetto a <sup>t</sup>Bu-D-Gly siano poco tollerate nella posizione 5. Inoltre abbiamo osservato che anche l'isomero ipotizzato [L-I<sub>pv</sub><sup>5</sup>]NPS è in grado di incidere in modo sostanziale sull'efficacia e di portare ad una sostanziale diminuzione di potenza come agonista (circa 100 volte) rispetto al peptide naturale.

L'isomero [D-I<sub>pv</sub><sup>5</sup>]NPS ha generato un antagonista puro poco potente, confermando anche in questo caso l'importanza dell'ingombro sterico nella posizione 5 di NPS.

Le variazioni conformazionali di NPS promosse dalla modulazione di chiralità e dall'ingombro sterico della posizione 5 incidono sia sull'efficacia che sulla potenza del peptide.

Inoltre questo lavoro di sintesi mi ha permesso di ottenere l'amminoacido non naturale *Ipv* non noto in letteratura.

Il passaggio sintetico chiave è l'addizione di Michael catalizzata da sali di rame di derivati organometallici (tipo reattivi di Grignard) su substrati esterei insaturi (intermedio **6**). A dispetto della bassa resa di questa reazione, la sintesi facile economica e in grande scala dell'intermedio **6** insieme alla grande disponibilità di differenti reattivi di Grignard apre la strada a nuove applicazioni sintetiche per la sintesi di derivati della Valina e più in generale di amminoacidi non naturali con catena laterale alifatica e/o aromatica ramificata.

## *Parte seconda*

Le informazioni SAR sulla posizione 5 di NPS sinora disponibili sono state ottenute utilizzando amminoacidi naturali e non naturali caratterizzati da catena laterale lipofila alifatica o aromatica.

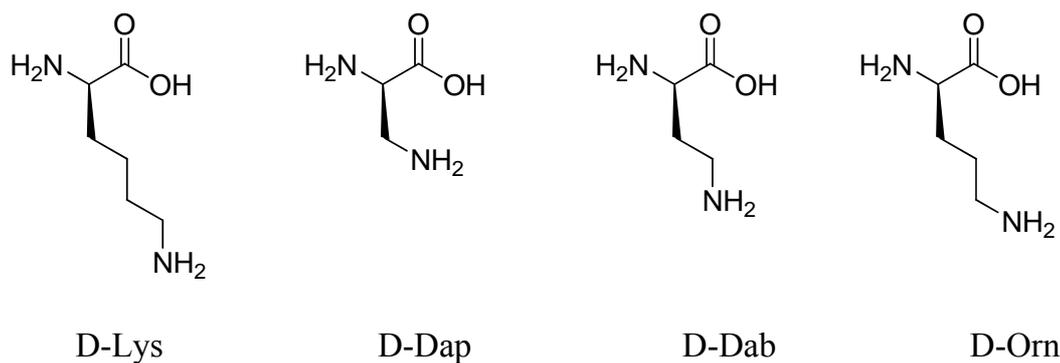
Studi struttura-attività<sup>8</sup> sul Neuropeptide S hanno dimostrato che la sostituzione della Glicina in 5 con amminoacidi di chiralità relativa D caratterizzati da catena laterale alifatica porta ad analoghi di NPS che si comportano da agonisti parziali o antagonisti del recettore NPSR.

Abbiamo visto come la sostituzione in posizione 5 con una D-Leu generi un agonista parziale di NPSR con potenza paragonabile a quello ottenuto con D-Val<sup>5</sup>. L'introduzione di un atomo di carbonio tra il gruppo isopropilico e il carbonio  $\alpha$  del D-amminoacido (D-Val verso D-Leu) non incide sull'affinità del composto per NPSR ma sulla sua efficacia.

Inoltre l'aumento dell'ingombro sterico ottenuto con [Ipr<sup>5</sup>]NPS ha prodotto un agonista parziale e un antagonista puro poco potente.

In un'indagine preliminare abbiamo sostituito la Gly in posizione 5 di NPS con Lys e Asp entrambi sia in configurazione L che D (Tabella 8). Da questa indagine è emerso che [D-Lys<sup>5</sup>]NPS si comporta da antagonista puro poco potente e si è dimostrato per la prima volta che l'attività antagonista si può ottenere anche con amminoacidi in 5 con catene laterali basiche ma non acide. [D-Lys<sup>5</sup>]NPS è stato ulteriormente studiato modulando la lunghezza della catena laterale (Figura 23 e Tabella 8).

La modulazione della distanza tra la funzione amminica primaria in catena laterale e il backbone peptidico ha portato al composto [D-Dab<sup>5</sup>]NPS (Dab, acido 2,4-diamminobutirrico) che si comporta da agonista parziale di NPSR con un valore di  $pK_b$  di 8.32 (il composto peptidico più potente sinora disponibile).



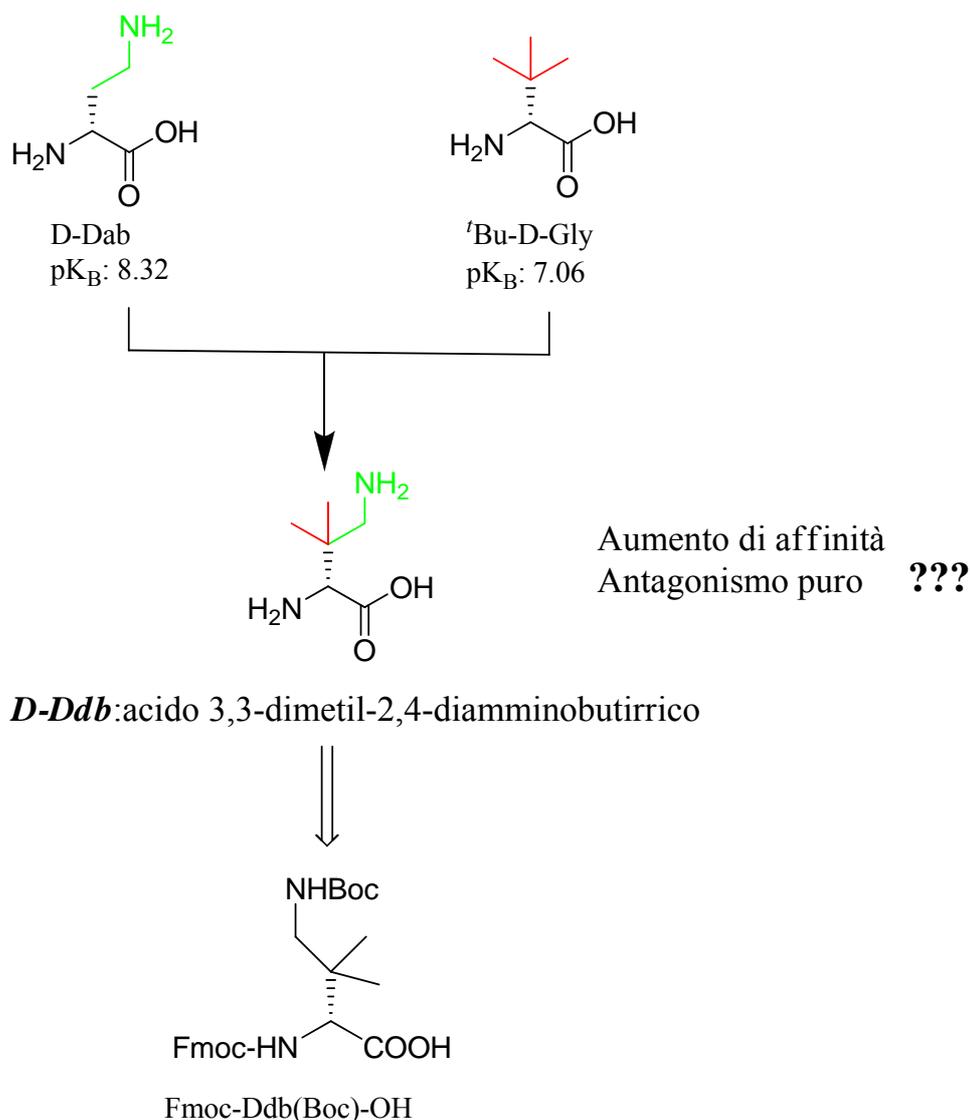
*Figura 23. Amminoacidi basici inseriti in posizione 5 di NPS.*

composto	Agonista		Antagonista
	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± sem	pK <sub>B</sub> (CL <sub>95%</sub> )
NPS	8.32 (8.00-8.64)	295 ± 22%	
[L-Lys <sup>5</sup> ]NPS	6.20	35 ± 1%*	< 6
[L-Asp <sup>5</sup> ]NPS	Crc incompleto 10 μM: 54 ± 11 %		< 6
[D-Lys <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		6.54 (6.16-6.92)
[D-Asp <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		< 6
[D-Dap <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		6.07
[D-Orn <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		< 6
<b>[D-Dab<sup>5</sup>]NPS</b>	<b>Crc incomplete 10 μM: 51 ± 21 %</b>		<b>8.32</b>

*Tabella 8. Attività di NPS ed analoghi modificati in posizione 5 con amminoacidi acidi e basici in cellule HEK293 che esprimono NPSR di topo.*

Su queste basi, abbiamo progettato e sintetizzato un amminoacido non naturale caratterizzato da una catena laterale basica di opportuna lunghezza in grado di mimare la catena laterale di D-Dab e C<sub>β,β</sub>-dimetilato che è stato siglato come *Ddb* (acido 2,4-diammino-3,3-dimetilbutirrico). *Ddb* si presenta come amminoacido chimerico <sup>t</sup>Bu-Gly/Dab (Figura 24).

Lo scopo è stato quello di fondere funzioni chimiche potenzialmente in grado di conferire alta affinità e scarsa o nulla efficacia per il recettore NPSR per ottenere un antagonista puro più potente di quelli attualmente disponibili. L'approccio sintetico adottato ha tenuto conto del fatto che l'amminoacido *Ddb* doveva essere inserito in posizione 5 di NPS per cui doveva essere sintetizzato ortogonalmente protetto in modo da essere compatibile con la sintesi peptidica in fase solida. L'amminogruppo in α deve essere protetto come Fmoc mentre quello in γ come Boc.

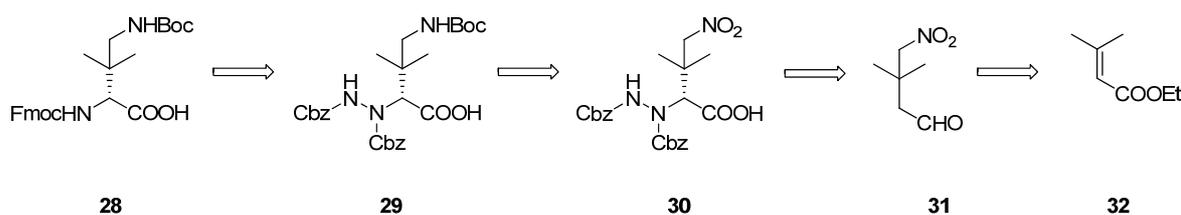


**Figura 24.** Strategia adottata per il design e la sintesi dell'amminoacido *Ddb*.

Visto il nostro obiettivo di ottenere l'amminoacido *Ddb* in configurazione relativa *D* opportunamente protetto per esser impiegato con successo nella sintesi in fase solida del derivato [D-*Ddb*<sup>5</sup>]NPS, tra le metodiche sintetiche disponibili per l'ottenimento di  $\alpha$ -amminoacidi chirali precedentemente illustrate, l'organocatalisi<sup>19</sup> via *Prolina* si è dimostrata una metodologia vincente, affidabile e poco costosa rispetto all'utilizzo di catalizzatori metallici<sup>20</sup> e ausiliari chirali<sup>18</sup>.

Per questo motivo si è pensato di utilizzare la catalisi di *Prolina* per la sintesi enantioselettiva di entrambi gli enantiomeri dell'amminoacido *Ddb*, come illustrato nello Schema retrosintetico 11.

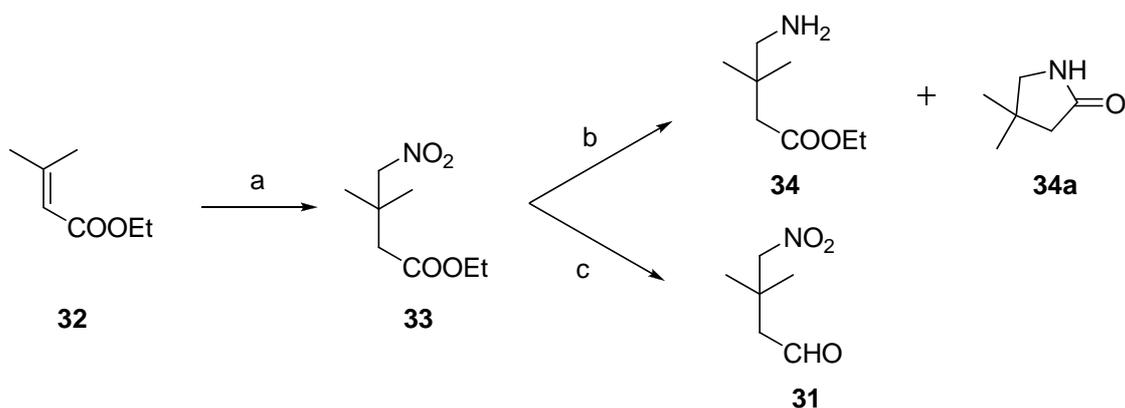
La sintesi enantioselettiva dell'amminoacido ortogonalmente protetto *Ddb* (**28**) potrebbe essere effettuata a partire dal derivato idrazinico **29**, che a sua volta potrebbe essere preparato dal nitroderivato **30**, il quale si può ottenere dalla nitroaldeide **31** facilmente sintetizzabile dal dimetilacrilato commerciale (**32**).



*Schema 11. Strategia retrosintetica adottata per ottenere l'amminoacido D-Ddb.*

In linea con quanto illustrato nell'approccio retrosintetico (Schema 11), il composto **32** è stato fatto reagire con nitrometano in presenza di tetrametil-guanidina stechiometrica a dare il nitroestere **33** (Schema 12) con resa bassa (19%) ma con la possibilità di effettuare la reazione su grande scala.

Il nitrogruppo rappresenta il precursore del gamma amminogruppo dell'amminoacido finale che, per poter essere impiegato nella sintesi in fase solida, deve essere protetto come Boc. In questa fase della sintesi abbiamo esplorato la possibilità di ridurlo (intermedio **34**) e proteggerlo come Boc oppure di mantenere la funzione nitro e ridurre l'estere ad aldeide **31** come illustrato nello Schema 12.

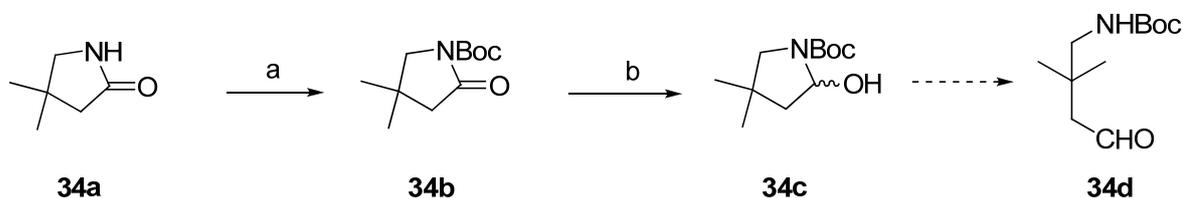


**Condizioni:** a) TMG, CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, r.t., 3gg, Y=19%; b) EtOH, H<sub>2</sub>, C/Pd, r.t., 3h; c) THF, DIBAL-H, -78°C, 4h.

*Schema 12. Primi steps sintetici per la sintesi di Ddb.*

Sfortunatamente, la riduzione del gruppo nitro ad ammina porta alla formazione anche del derivato lattamico **34a**, prodotto non desiderato, mentre la riduzione dell'estere di **33** porta ad una miscela di alcol, aldeide **31** e prodotto di partenza **33**.

La formazione del lattame **34a**, come prodotto prioritario della riduzione del nitrogruppo, ci ha permesso di effettuare alcune prove di protezione e riduzione al fine di ottenere il lattolo Boc-protetto **34c** (Schema 13) attraverso il derivato **34b**. Il lattolo **34c** rappresenta la forma ciclica protetta dell'aldeide **34d** che poteva essere potenzialmente impiegata nella reazione di  $\alpha$ -amminazione catalizzata dalla Prolina come realizzato nella Schema 15. Questo tentativo sintetico non è andato a buon fine in quanto la trasformazione da **34b** a **34c** non ha dato il prodotto desiderato.

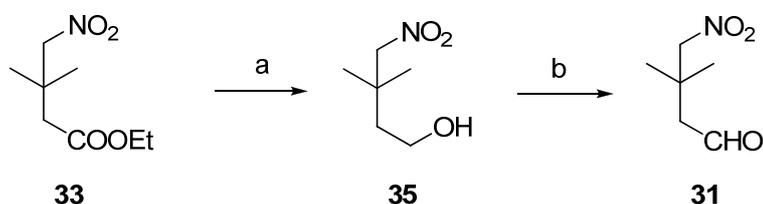


**Condizioni:** a) Boc<sub>2</sub>O, DCM, TEA, DMAP, r.t., 24h; b) THF, DIBAL-H, -78°C, 1h.

*Schema 13. Una possibile via per ottenere l'aldeide opportuna per la reazione successiva di  $\alpha$ -amminazione.*

La reazione di riduzione del lattame **34b** sia con DIBAL-H sia con LiAlH<sub>4</sub> porta alla formazione di miscele di prodotti complessi tali per cui si è abbandonata questa via sintetica.

Osservato che la riduzione del gruppo estereo del derivato **33** con DIBAL-H a -78°C porta ad una miscela complessa di prodotti, abbiamo condotto la reazione a 0°C per ottenere esclusivamente l'alcol **35** in miscela con lo starting material **33**. La facile separazione cromatografica dei due prodotti ci ha permesso di avere quantità elevate di alcol **35** il quale è stato ossidato ad aldeide **31** nelle note condizioni di Swern<sup>34</sup> come illustrato nello Schema 14.



**Condizioni:** a) THF, DIBAL-H, 0°C, o.n., Y=96%; b) DCM, DMSO, ossalilcloruro, TEA, -60°C to r.t.; o.n., Y=100%.

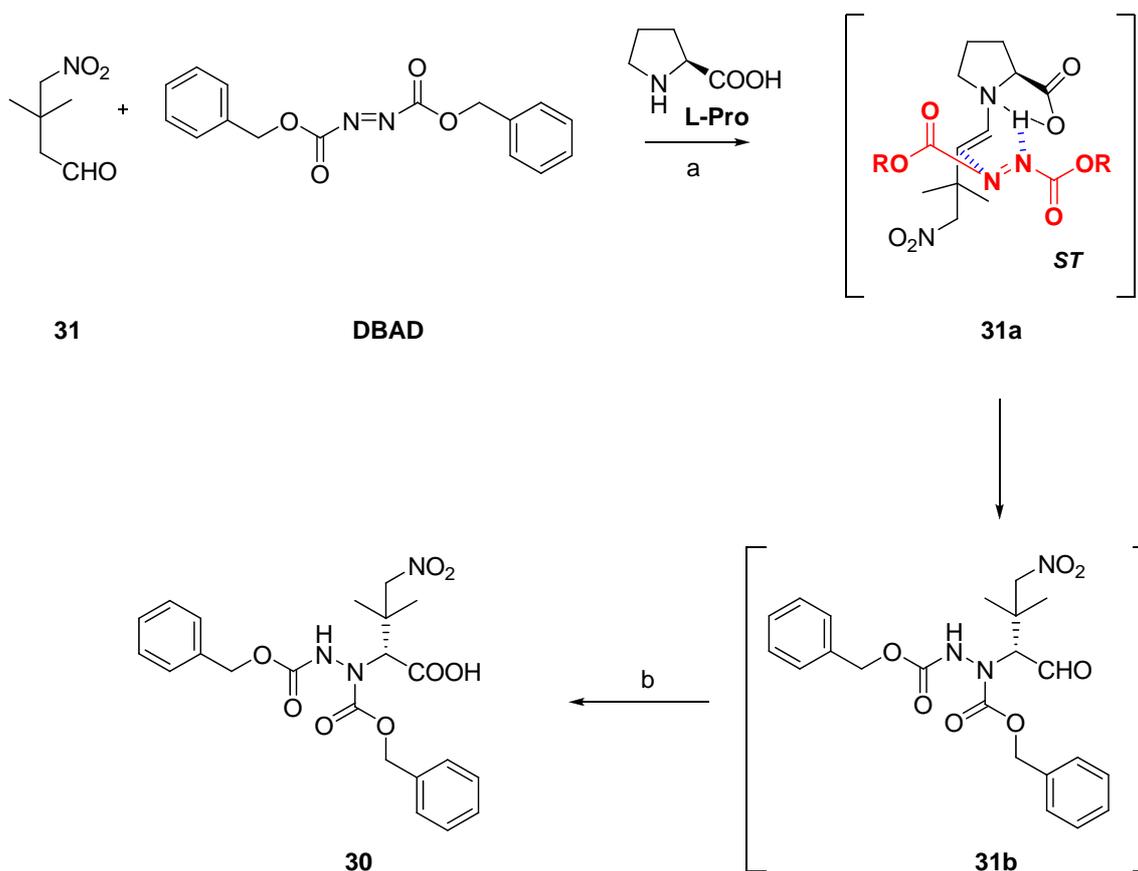
*Schema 14. Dettaglio della sintesi della nitroaldeide 31.*

L'ottenimento dell'aldeide **31** in ottima resa e con un elevato grado di purezza ne ha permesso l'utilizzo come tale nella reazione successiva di  $\alpha$ -amminazione in presenza di dibenzil-aza-dicarbossilato (DBAD) come agente alchilante e di Prolina come catalizzatore (Schema 15).

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di ottenere l'amminoacido non naturale *Ddb* in configurazione relativa D e con elevata purezza ottica. In letteratura sono riportati molti esempi di induzione di chiralità D utilizzando la L-Prolina come catalizzatore<sup>35</sup>. Tuttavia, le caratteristiche chimico-fisiche del gruppo chimico legato all'aldeide **31** possono influenzare la stereoselezione con cui si forma l'intermedio **31a**. Per tale ragione, sia per confermare la purezza ottica del nostro derivato, sia per escludere fenomeni di inversione di stereoselezione, si è deciso di effettuare l' $\alpha$ -amminazione con entrambi gli enantiomeri della Prolina.

<sup>34</sup> Mancuso AJ, Swern D. Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide "activated" by oxalyl chloride *JOC* **1978**; 43, 12: 2480-2482.

<sup>35</sup> List B. Direct Catalytic Asymmetric  $\alpha$ -Amination of Aldehydes *JACS* **2002** 124, 20: 5656-57



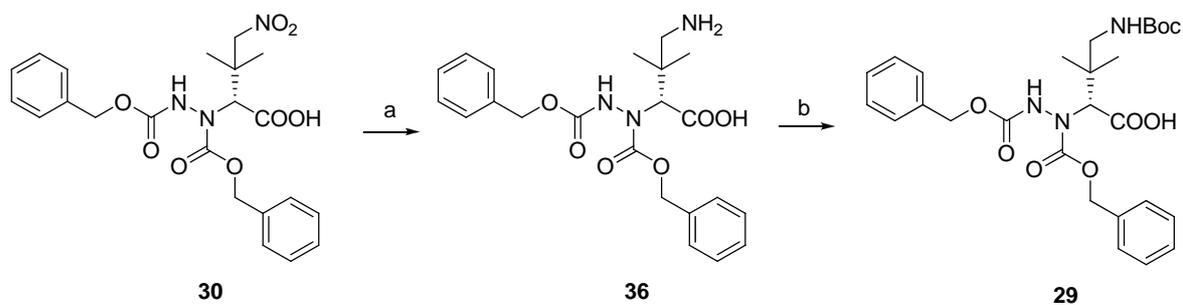
**Condizioni:** a) CH<sub>3</sub>CN, 0°C, 3h, Y=84%; b) 1) *in situ*, reattivo di Jones (33.5g di CrO<sub>3</sub> in 30 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc., diluito in 250 ml di H<sub>2</sub>O), 2) *i*-PrOH, Y=100%.

*Schema 15. Reazione di  $\alpha$ -amminazione in catalisi di Pro.*

Come illustrato nello Schema 15, l'intermedio **31b** non è stato isolato, in quanto subisce velocemente racemizzazione, ma è stata ossidata *in situ* al corrispondente acido **30** con il reattivo di Jones<sup>36</sup>.

Successivamente la riduzione del nitrogruppo del derivato **30** in presenza di zinco in acido acetico ci ha fornito il composto **36** con ottima resa che è stato successivamente protetto come Boc a dare l'intermedio **29** (Schema 16).

<sup>36</sup>Luzzio F. 1,3-Oxidative transpositions of allylic alcohols in organic synthesis *Tetrahedron* **2012**, 1-17.



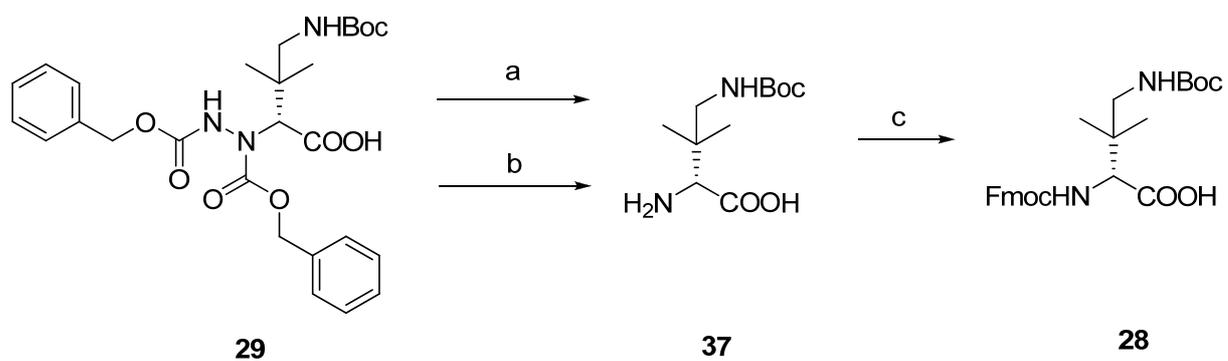
**Condizioni:** a) AcOH, Zn, r.t., 10 min., Y=100%; b) H<sub>2</sub>O/BuOH, BOC<sub>2</sub>O, NaOH 1N, DMAP, r.t., o.n., Y=55%.

*Schema 16. Formazione del gruppo amminico in catena laterale e sua opportuna protezione.*

La fase successiva di rimozione del DBAD per idrogenolisi (Schema 17) è stata inizialmente condotta utilizzando le condizioni di reazione standard presenti in letteratura<sup>19</sup>. Tale reazione viene effettuata in EtOH/AcOH utilizzando H<sub>2</sub> e Ni-Raney come catalizzatore. In queste condizioni, il composto **29** si idrolizza completamente fornendo il derivato **37** che non è stato possibile isolare in forma pura. Il problema maggiore è l'eliminazione delle tracce di nichel. La purificazione del composto **37** è stata tentata, senza successo, utilizzando colonna cromatografica di gel di silice, colonna a scambio ionico e abbiamo anche tentato di precipitare il nichel come carbonato. Il tentativo di proteggere **37** come Fmoc in presenza di tracce di nichel non ha portato al prodotto desiderato **28**. Probabilmente le tracce di nichel portano alla formazione di sali complessi tra l' $\alpha$ -amminogruppo e la funzione carbossilica di **37** che rendono non nucleofilo l'azoto amminico. Successivamente, abbiamo idrolizzato l'intermedio **29** sostituendo il Ni-Raney con il platino (IV) ossido<sup>37</sup>. In queste condizioni di reazione, è stato sufficiente eliminare per filtrazione il catalizzatore e in seguito ad evaporazione del solvente abbiamo ottenuto il composto **37** sufficientemente puro per essere utilizzato nella reazione successiva senza purificazione. L'intermedio **37**, trattato con Fmoc-Cl nelle condizioni di reazione classiche proposte per la protezione come Fmoc<sup>38</sup>, ha fornito il prodotto desiderato **28** ortogonalmente protetto e idoneo ad essere utilizzato per la sintesi peptidica in fase solida.

<sup>37</sup> Poupardin O, Greck C, Genet JP. Rapid Asymmetric Synthesis of Highly Functionalized C5 Chiral Synthons. Practical Preparation of trans-3-Hydroxy-D-Proline *Synlett* **1998**;11: 1279-1281

<sup>38</sup> Carpino L., G.Y. Han 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group *JOC* **1972**; 37: 3404-3409.



**Condizioni:** a) EtOH ass., AcOH, H<sub>2</sub> 900psi, Ni-Raney, o.n.; b) EtOH/H<sub>2</sub>O, AcOH, H<sub>2</sub> 1atm, PtO<sub>2</sub>, 2gg, Y=90%; c) Fmoc-Cl, H<sub>2</sub>O/diossano, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0°C, 30min., Y=41%.

*Schema 17. Steps sintetici finali che portano alla formazione di Fmoc-Ddb(Boc)-OH.*

In Figura 25 sono riportati gli spettri NMR <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT a conferma della struttura del composto **28**.

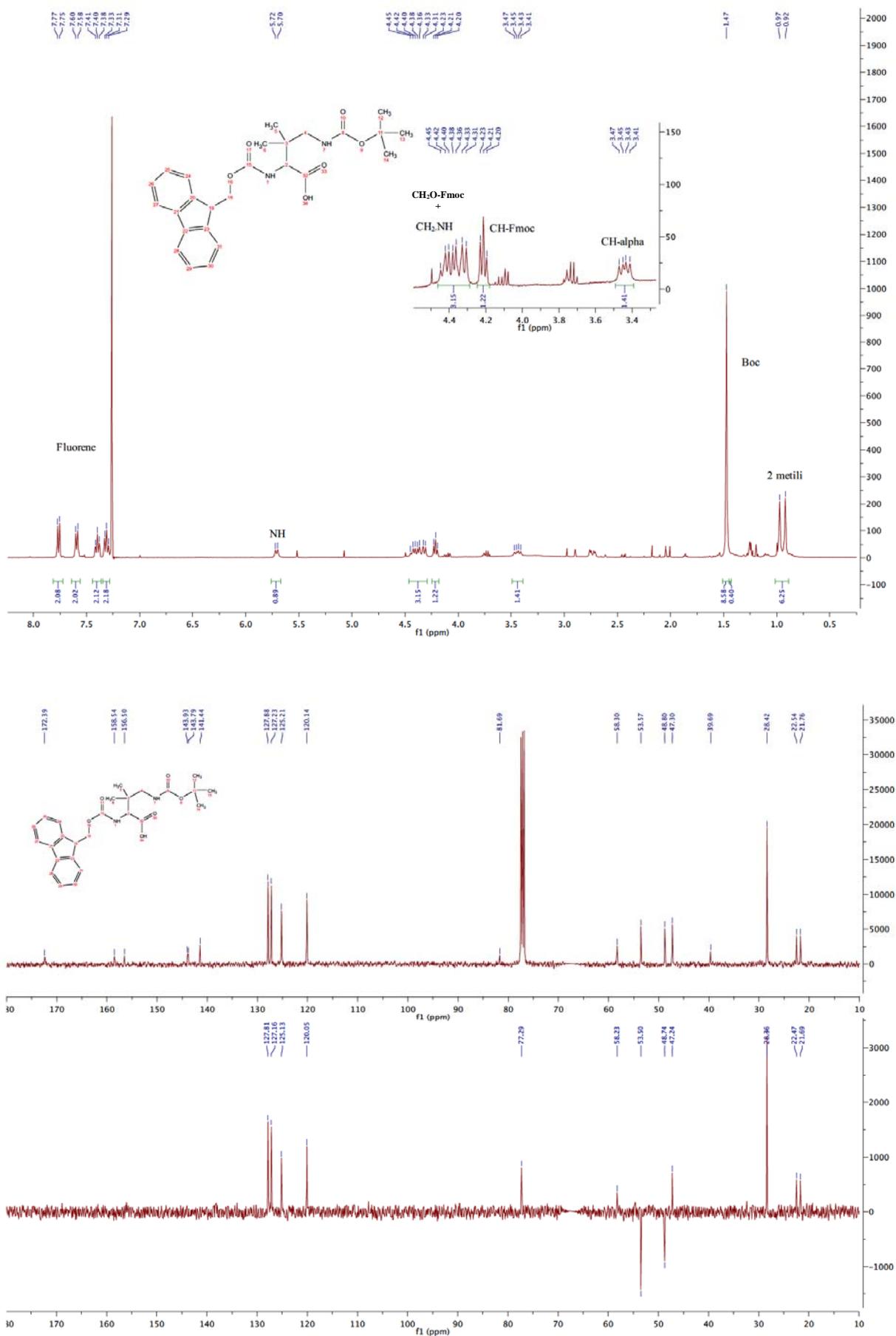
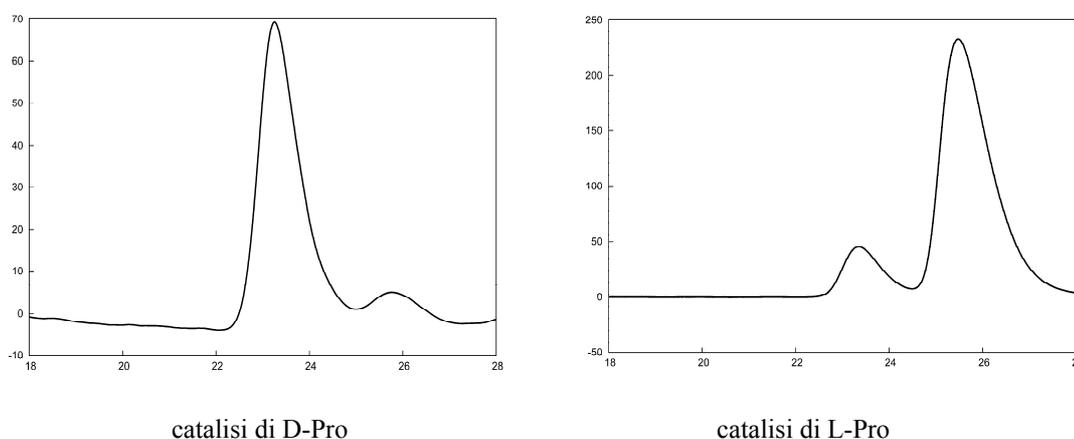


Figura 25. <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR e DEPT del composto 28.

La strategia sintetica adottata ha portato al composto **28** con una buona resa e in entrambe le forme enantiomeriche usando D-Pro e L-Pro come catalizzatore nella reazione di  $\alpha$ -amminazione.

La purezza ottica di Fmoc-L-Ddb(Boc)-OH e Fmoc-D-Ddb(Boc)-OH è stata valutata tramite cromatografia HPLC su colonna chirale (colonna Lux 1). Questo studio è stato svolto in collaborazione con il Dott. Alberto Cavazzini del Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche.

In Figura 26 sono riportati i profili HPLC dei due enantiomeri: Fmoc-D-Ddb(Boc)-OH, ottenuto con L-Pro, e Fmoc-L-Ddb(Boc)-OH, ottenuto con D-Pro.



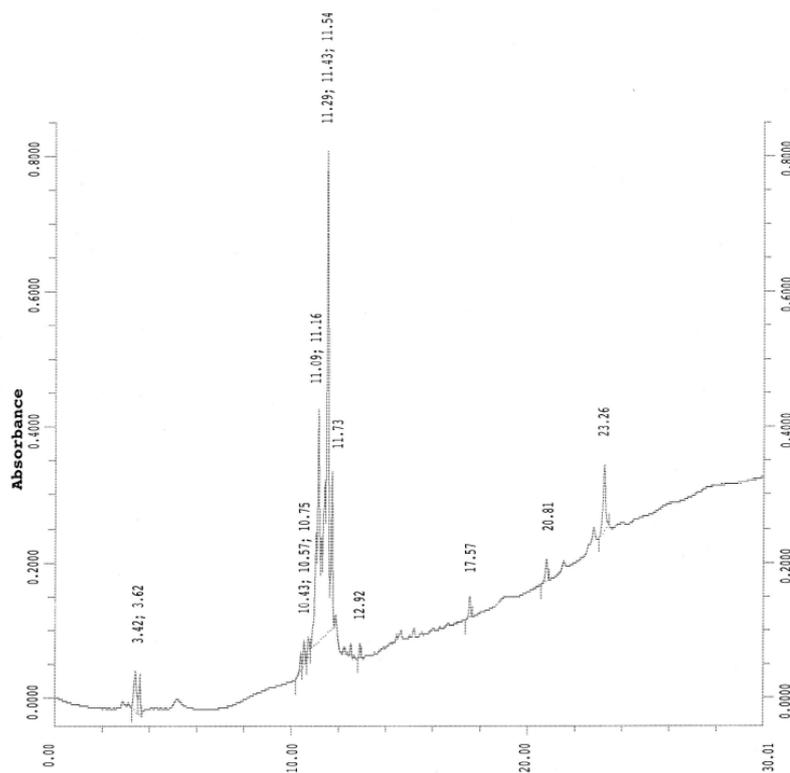
*Figura 26. Profili HPLC dei due enantiomeri di Fmoc-Ddb(Boc)-OH ottenuti da cromatografia su colonna chirale.*

Come si può notare dalla Figura 26, la purezza ottica dell'amminoacido ortogonalmente protetto sintetizzato è circa 80%, leggermente migliore nel caso della catalisi con D-Pro.

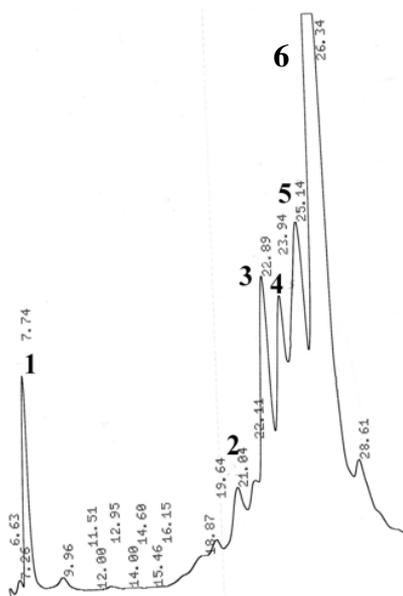
Sebbene non siano state condotte indagini cristallografiche che avrebbero accertato la chiralità assoluta dei due enantiomeri, sulla base dei dati presenti in letteratura si può ragionevolmente assumere che il prodotto sintetizzato con catalisi di L-Pro corrisponda allo Fmoc-D-Ddb(Boc)-OH.

Il prodotto Fmoc-D-Ddb(Boc)-OH ottenuto è stato utilizzato per la sintesi in fase solida del corrispondente analogo NPS modificato in posizione 5.

La sintesi del peptide target  $[D\text{-Ddb}^5]\text{NPS}$  è stata fatta utilizzando metodiche precedentemente riportate per la sintesi di analoghi di NPS<sup>14</sup>. In particolare è stata valutata la reattività di Fmoc-D-Ddb(Boc)-OH come agente acilante del frammento NPS(6-20)-resina e la reattività del gruppo amminico di  $[D\text{-Ddb}^5]\text{NPS}(5\text{-}20)\text{-resina}$  nella reazione di acilazione successiva con Fmoc-Asn(Trt)-OH. Infatti, la catena laterale dell'amminoacido *Ddb* rappresenta un importante ingombro sterico sia per la funzione carbossilica che per quella amminica e potrebbe limitare la reattività del composto. Per ovviare, almeno in parte, a questo inconveniente si è deciso di operare un doppio ciclo di acilazione del frammento  $[Ddb^5]\text{NPS}(5\text{-}20)\text{-resina}$  con Fmoc-Asn(Trt)-OH. Gli ultimi tre amminoacidi Arg<sup>3</sup>, Phe<sup>2</sup> e Ser<sup>1</sup> sono stati introdotti seguendo il protocollo di sintesi riportato<sup>14</sup> che prevede un singolo ciclo di coupling seguito da un ciclo di capping con anidride acetica. Il profilo analitico del peptide finale  $[D\text{-Ddb}^5]\text{NPS}$  come grezzo di reazione e il relativo profilo HPLC preparativo sono riportati in Figura 27 e 28 rispettivamente.

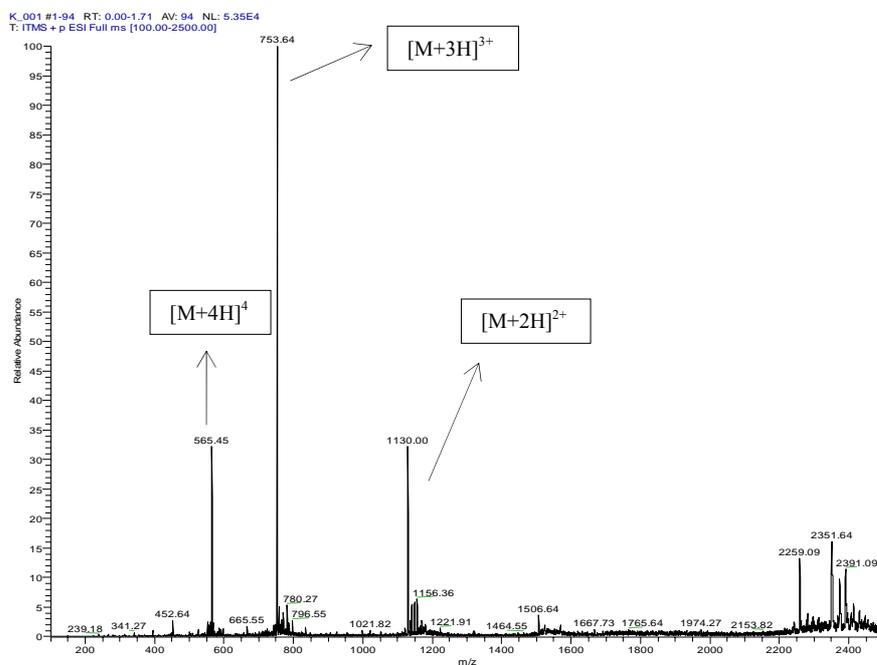


**Figura 27.** Profilo HPLC analitico del grezzo di reazione di  $[D\text{-Ddb}^5]\text{NPS}$ .

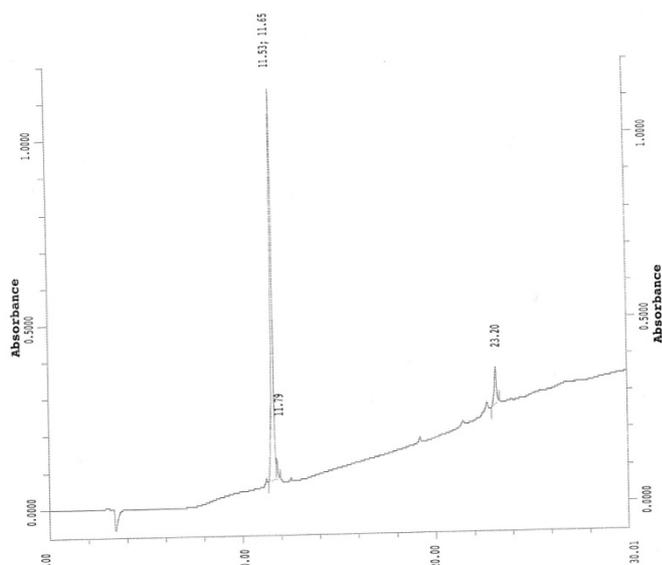


**Figura 28.** Profilo HPLC preparativo del grezzo di reazione di  $[D\text{-Ddb}^5]\text{NPS}$ .

L'analisi mediante spettrometria di massa delle frazioni eluite tramite HPLC preparativo ci ha permesso di individuare nella frazione 6 (quella più abbondante) il prodotto con il peso molecolare desiderato (Figura 29) il cui grado di purezza è stato verificato tramite HPLC analitico (Figura 30).

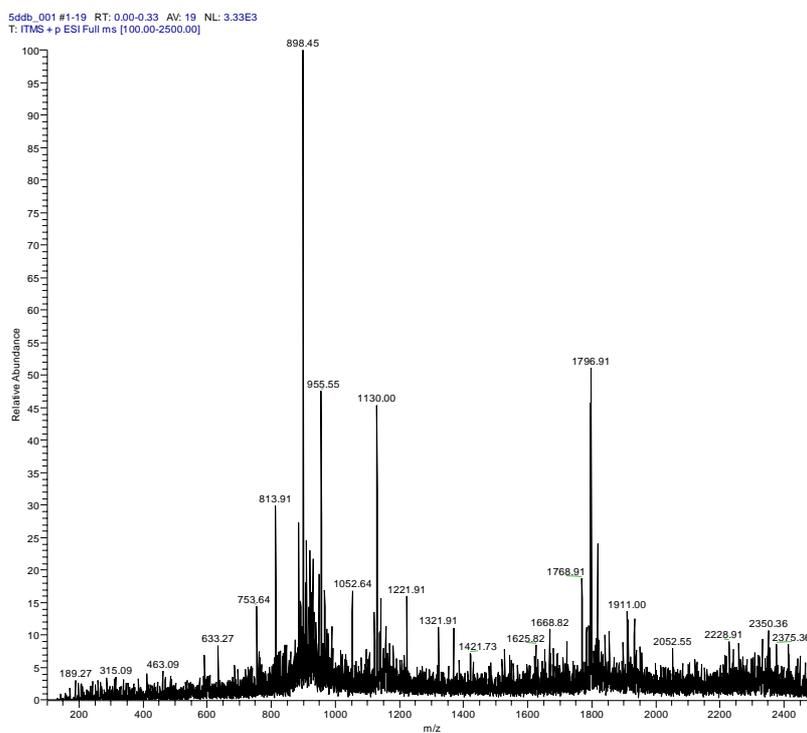


**Figura 29.** Spettro di massa ESI della frazione 6,  $[D\text{-Ddb}^5]\text{NPS}$  (MW 2258,6).



**Figura 30.** Profilo HPLC analitico della frazione 6, [D-Ddb<sup>5</sup>]NPS.

L'analisi di massa della frazione 5 isolata tramite HPLC preparativo (Figura 28) ha fornito un peso molecolare corrispondente al frammento Ac-[Ddb<sup>5</sup>]NPS(5-20) (Figura 31). Questo dato evidenzia la difficoltà di acilazione del gruppo amminico di Ddb con Fmoc-Asn(Trt)-OH.



**Figura 31.** Spettro di massa ESI della frazione 5 Ac-[Ddb<sup>5</sup>], NPS(5-20) (MW 1796,1).

Inoltre, l'analisi di massa delle altre frazioni eluite in HPLC preparativo non ci ha permesso di identificare un composto con peso molecolare corrispondente al prodotto desiderato e che poteva esser attribuito al diastereoisomero [L-Ddb<sup>5</sup>]NPS. Questo dato, unitamente al fatto che Fmoc-D-Ddb(Boc)-OH (**28**) utilizzato in fase solida presenti un grado di purezza di circa l'80%, suggerisce che il prodotto finale isolato [D-Ddb<sup>5</sup>]NPS possa coeluire col suo corrispondente diastereoisomero.

Il prodotto [D-Ddb<sup>5</sup>]NPS è stato valutato biologicamente in vitro nel saggio di mobilizzazione del calcio intracellulare ed è stato valutato sia come agonista che antagonista secondo un protocollo sperimentale riportato nella Parte Sperimentale del presente elaborato.

Sfortunatamente [D-Ddb<sup>5</sup>]NPS è risultato inattivo sia come agonista sia come antagonista. Il semplice inserimento di una funzione amminica primaria sulla catena laterale *tert*-butilica della <sup>t</sup>Bu-D-Gly sembra non esser compatibile con l'attività biologica. Al contrario la funzione amminica primaria presente su una catena laterale lineare di opportuna lunghezza, come in D-Dab inserito in posizione 5 di NPS, genera un agonista parziale molto potente.

In analogia con quanto osservato con [Ipv<sup>5</sup>]NPS, l'aumento dell'ingombro sterico della catena laterale dell'amminoacido in 5 di NPS ( D-Val e D-Leu verso D-Ipv e D-Dab verso D-Ddb) si conferma un elemento importante e critico per l'attività di [D-Xaa<sup>5</sup>]NPS analoghi specialmente per quanto riguarda l'attività antagonista per il recettore NPSR.

## *Parte terza*

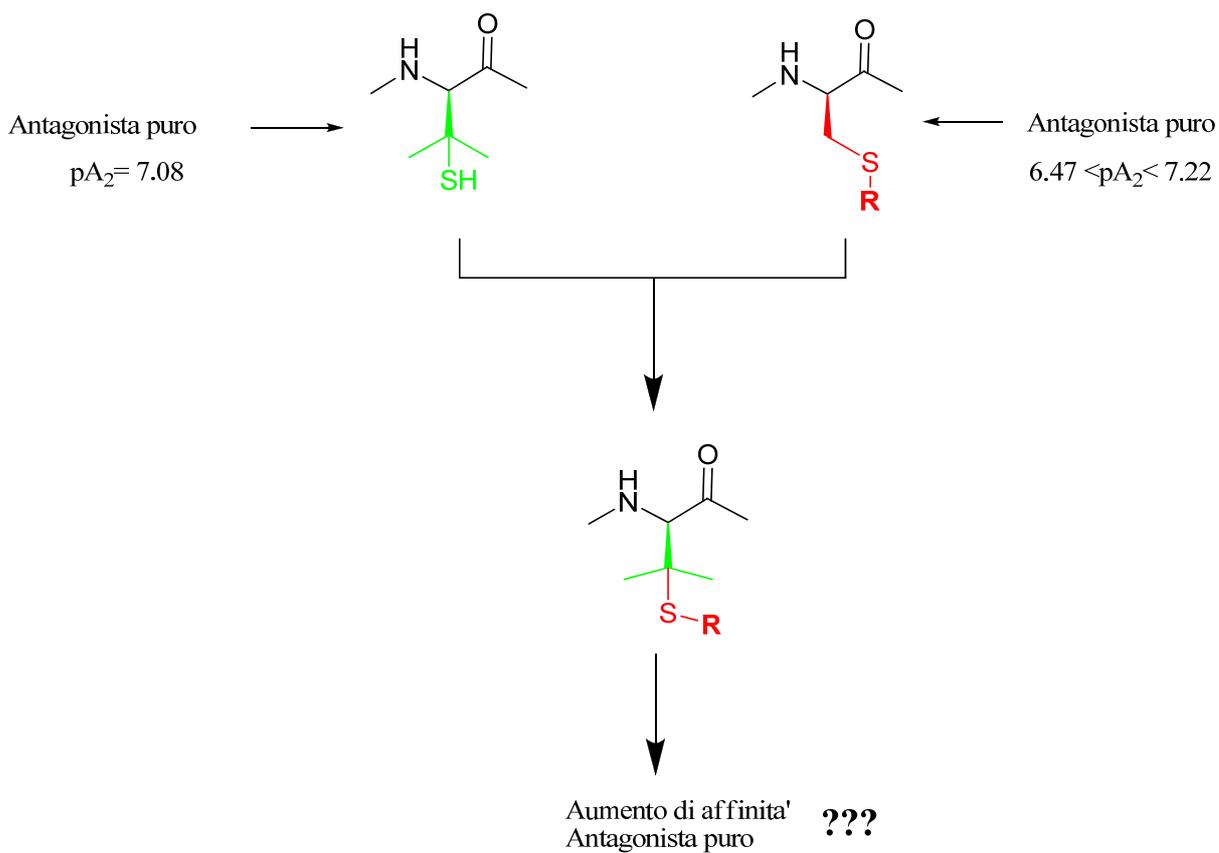
Gli studi *SAR* condotti fin'ora ci hanno permesso di capire che il radicale <sup>t</sup>But direttamente legato al C $\alpha$  del D-amminoacido in posizione 5 di NPS sembra esser il gruppo pi $\ddot{u}$  idoneo a generare antagonismo puro. La sua ulteriore sostituzione con sistemi alifatici ramificati (Ipv) o con una funzionalit $\grave{a}$  basica (Ddb) determina perdita di attivit $\grave{a}$ .

La sostituzione di un radicale metilico [<sup>t</sup>Bu-D-Gly<sup>5</sup>]NPS con un gruppo tiolico [D-Pen<sup>5</sup>]NPS  $\grave{e}$ , invece, perfettamente tollerata sia in termini di potenza sia di antagonismo puro (Tabella 6).

Inoltre l'impiego di derivati della D-Cys alchilati sulla funzione tiolica con diversi gruppi funzionali, [D-Cys(Acm)<sup>5</sup>]NPS [D-Cys(Bzl)<sup>5</sup>]NPS [D-Cys(<sup>t</sup>Bu)<sup>5</sup>]NPS (Tabella 5), ha portato ad antagonisti puri del recettore NPSR; in particolare la sostituzione con un S-benzile ha generato un derivato potente.

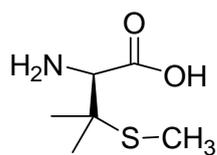
Su queste basi e con lo scopo di approfondire ulteriormente gli studi *SAR* sulla posizione 5 di NPS, abbiamo sintetizzato analoghi della D-Penicilamina (H-D-Pen-OH) S-alchilati con residui lipofili sia alifatici che aromatici e li abbiamo inseriti in posizione 5 del Neuropeptide S (Schema 18).

La contemporanea C- $\beta$ , $\beta$ -dimetilazione associata alla S-alchilazione in posizione 5 potrebbe aumentare l'affinit $\grave{a}$  per NPSR preservando l'attivit $\grave{a}$  di antagonista puro.

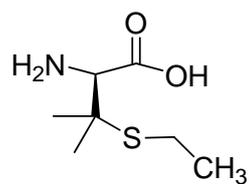


*Schema18. Strategia adottata per il design dei nuovi aminoacidi da inserire in posizione 5 di NPS.*

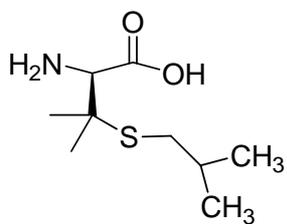
La struttura dei nuovi aminoacidi sintetizzati derivati dell'alchilazione sullo zolfo della D-Pen è riportata in Figura 32.



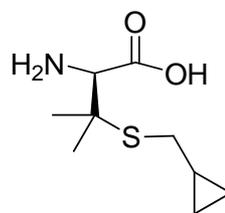
D-Pen(S-metil)-OH



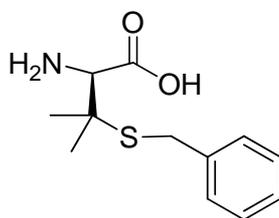
D-Pen(S-etil)-OH



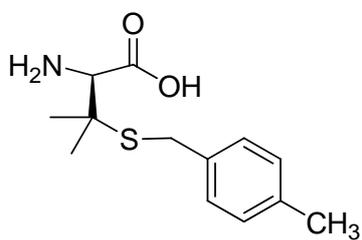
D-Pen(S-isopropil)-OH



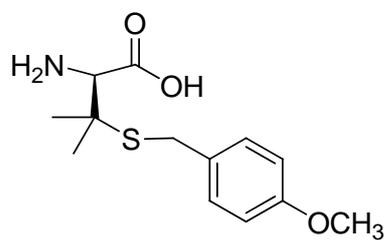
D-Pen(S-ciclopropilmetil)-OH



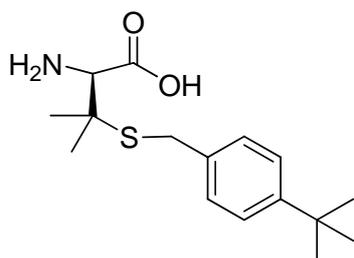
D-Pen(S-benzil)-OH



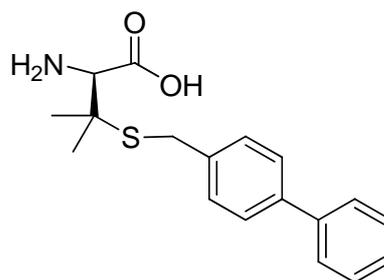
D-Pen(S-p(CH<sub>3</sub>)benzil)-OH



D-Pen(S-p(OCH<sub>3</sub>)benzil)-OH



D-Pen(S-p(<sup>t</sup>Bu)benzil)-OH

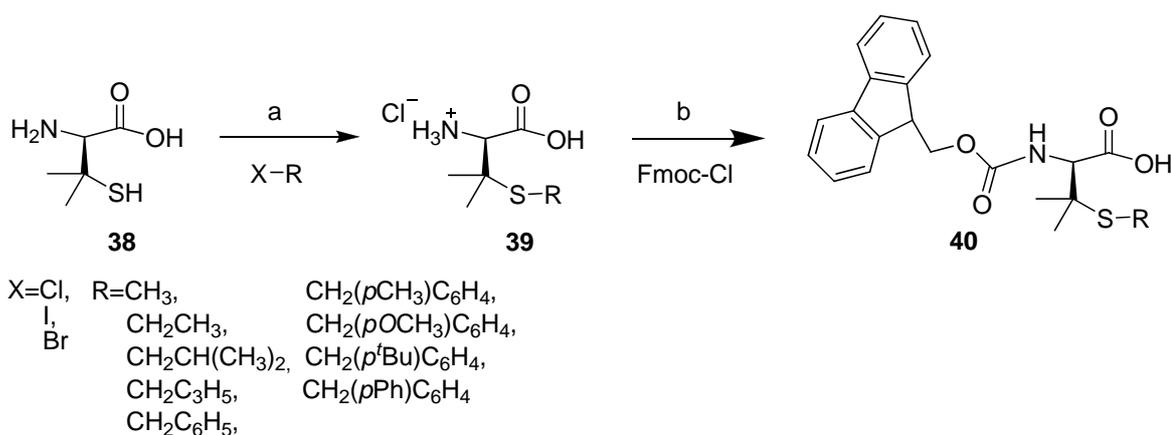


D-Pen(S-p(Ph)benzil)-OH

**Figura 32.** Nuovi derivati della D-penicilammina sintetizzati.

In letteratura sono riportati numerosi metodi per la sintesi di tioeteri. Tra questi, il più comune prevede la reazione tra un tiolato e un alogenuro alchilico in presenza di una base forte<sup>39</sup>. Nessuno dei derivati della H-D-Pen-OH da noi progettati era noto in letteratura. Era invece riportata la metodica per la sintesi di H-L-Cys(S-metil)-OH<sup>40</sup>. Tale metodica prevede la S-alchilazione utilizzando sodio metallico in etanolo assoluto in presenza dell'alogenuro opportuno. Pertanto, abbiamo applicato le stesse condizioni di reazione per ottenere i derivati della H-D-Pen-OH desiderati (Schema 19). Gli intermedi sono stati successivamente protetti sulla funzione amminica come fluorenilmetilenoossicarbonile (Fmoc) e utilizzati in fase solida per la sintesi degli analoghi NPS modificati in posizione 5 seguendo metodiche riportate in precedenza<sup>14</sup>.

Come per gli aminoacidi non naturali *Ipv* e *Ddb* precedentemente sintetizzati e utilizzati in posizione 5 di NPS, anche in questo caso l'alchilazione della funzione tiolica di D-Pen genera un aumento di ingombro sterico che potrebbe rendere difficoltosa la sintesi di prodotti finali [Xaa<sup>5</sup>]NPS. Pertanto abbiamo utilizzato il protocollo di sintesi in fase solida precedentemente ottimizzato per ottenere [D-Ddb<sup>5</sup>]NPS.



**Condizioni:** a. 1) Na<sup>0</sup>, EtOH assoluto, r.t., Argon, 1h, 2) HCl 2N; Y=100%; b. 1) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O/Diossano, 0°C to r.t., 2h; 2) HCl 2N; Y=70%.

*Schema 19. Sintesi di D-Pen S-alchilati.*

<sup>39</sup>a) Patai, S.; *The Chemistry of the Functional Groups—The Chemistry of the Thiol Group*, **1974**, 669; b) Parham, W. E.; Wynberg, H.; *Org. Synth. Coll.*, **1963**, 4, 295; c) Boscato, J. F.; Catala, J. M.; Franta, E.; Brossas, J. Action of elementary sulfur onto carbanions : a new route to dialkylpolysulfides *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 1519-20; d) Hundscheid, F. J. A.; Tandon, V. K.; Rouwette, P. H. A. M.; van Leusen, A. M. Synthesis of chiral sulfonylmethyl isocyanides, and comparison of their propensities in asymmetric induction reactions with acetophenones *Tetrahedron*, **1987**, 43, 5073-88; e) Malmstrom, J.; Gupta, V.; Engman, L.; *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 3318; f) Blanchard, P.; Jouselme, B.; Frere, P.; Roncali, J. 3- and 3,4-Bis(2-cyanoethylsulfanyl)thiophenes as Building Blocks for Functionalized Thiophene-Based  $\pi$ -Conjugated Systems *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3961-64.

<sup>40</sup> Hwang, D.; Helquist, P.; Shekhani, M.S. Total synthesis of (+)-Sparsomycin. Approaches using cysteine and serine inversion *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 1264-1271.

Tutti i prodotti sintetizzati e il ligando naturale sono stati valutati biologicamente in vitro nel saggio di mobilizzazione del calcio intracellulare secondo un protocollo sperimentale riportato nella Parte Sperimentale del presente elaborato e i dati farmacologici ottenuti sono riportati nella Tabella 9.

In questi esperimenti [D-Pen<sup>5</sup>]NPS ha mostrato un valore di pK<sub>B</sub> di 7.39, sostanzialmente in linea con i valori precedentemente riportati in letteratura<sup>14</sup>.

Tutti i nuovi derivati, testati alla dose di 10 μM, sono risultati inattivi come agonisti. Testati come antagonisti hanno mostrato potenze variabili in un range di pK<sub>B</sub> da 6.76 a 7.61 (Tabella 9).

	Agonista		Antagonista
	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± sem	pK <sub>B</sub> (CL <sub>95%</sub> )
hNPS	8.87 (8.72-9.14)	397 ± 34%	
[D-Pen <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		7.39 (6.47-8.31)
[D-Pen(S-metil) <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		6.76 (6.24-7.28)
[D-Pen(S-etil) <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		6.90 (6.39-7.41)
[D-Pen(S-isopropilmetil) <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		6.96 (6.53-7.39)
[D-Pen(S-ciclopropilmetil) <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		7.13 (6.56-7.70)
[D-Pen(S-benzil) <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		7.05 (6.53-7.57)
[D-Pen(S- <i>p</i> -CH <sub>3</sub> Bzl) <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		7.61 (6.93-8.29)
[D-Pen(S- <i>p</i> -OCH <sub>3</sub> Bzl) <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		7.12 (6.77-7.47)
[D-Pen(S- <i>p</i> - <sup>t</sup> BuBzl) <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		7.51 (6.93-8.09)
[D-Pen(S- <i>p</i> -PhBzl) <sup>5</sup> ]NPS	Inattivo fino a 10 μM		6.93 (6.00-7.86)

**Tabella 9.** Attività di hNPS ed nuovi analoghi modificati in posizione 5, [D-Pen(S-R)<sup>5</sup>]NPS, in cellule HEK293 che esprimono il recettore NPSR ricombinante di topo (HEK293<sub>mNPSR</sub>).

In particolare, la sostituzione con radicali alifatici porta a una diminuzione di potenza più sensibile per il metile rispetto a etile, isopropile e ciclopropilmetile. Al contrario la sostituzione con radicali aromatici sembra essere meglio tollerata e il  $p(\text{CH}_3)\text{Bzl}$  e  $p(\text{tBu})\text{Bzl}$  hanno generato composti più potenti del ligando di riferimento  $[\text{D-Pen}^5]\text{NPS}$ . Anche se non esiste una netta correlazione tra ingombro sterico del radicale introdotto sulla funzione tiolica e potenza del derivato, in analogia a quanto osservato con Ipv, i gruppi alifatici introdotti sulla catena laterale della D-Pen generano composti meno potenti del peptide di riferimento.

Anche se i dati sono del tutto preliminari, la sensibile perdita di potenza ottenuta con  $[\text{D-Pen}(\text{S-metil})^5]\text{NPS}$ , più importante rispetto agli altri gruppi anche se più voluminosi, potrebbe essere spiegata con la eliminazione della capacità del gruppo SH di comportarsi da donatore di legame idrogeno. Un potenziale effetto negativo generato dal solo ingombro del radicale metilico sembra poco probabile in quanto l'introduzione sul gruppo SH di gruppi alifatici più ingombranti (etile, isopropile e ciclopropilmetile) ha prodotto un sensibile recupero di potenza rispetto a  $[\text{D-Pen}(\text{S-metil})^5]\text{NPS}$ . Degno di nota il fatto che radicali aromatici di tipo benzilico anche para sostituiti sono ben tollerati, suggerendo ancora una volta come l'ingombro sterico possa essere un parametro molto importante per il design di antagonisti NPSR ottenuti modificando la posizione 5. Un radicale benzilico caratterizzato da aromaticità e quindi planarità sembra essere meglio tollerato di un radicale alifatico. La S-alkilazione con gruppi aromatici è in grado di generare composti con potenza paragonabile se non leggermente superiori al peptide di riferimento.

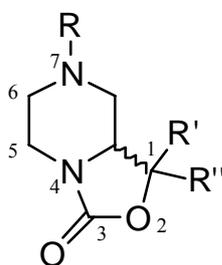
Al momento non abbiamo dati conformazionali dei composti  $[\text{tBu-D-Gly}^5]\text{NPS}$ ,  $[\text{D-Ipv}^5]\text{NPS}$ ,  $[\text{D-Ddb}^5]\text{NPS}$ ,  $[\text{D-Pen}^5]\text{NPS}$ ,  $[\text{D-Pen}(\text{S-}p\text{-tBuBzl})^5]\text{NPS}$ , che ci permettono di capire se esistono profonde variazioni conformazionali in funzione del sostituente sulla catena laterale dell'amminoacido in posizione 5 di NPS. Sulla base di questi ultimi dati non possiamo tuttavia escludere che la catena laterale dell'amminoacido in 5 possa anche interagire con una tasca del recettore NPSR in grado di alloggiare preferenzialmente sistemi aromatici planari.

## Parte quarta

### Ligandi non peptidici di NPSR

Per studiare in dettaglio un sistema peptide/recettore è necessario avere a disposizione anche composti non peptidici.

I primi esempi di molecole non peptidiche capaci di interagire col recettore NPSR sono stati riportati dai ricercatori Takeda<sup>41,42,43</sup>. Questi composti sono caratterizzati da uno scaffold 3-osso-tetraidro-ossazolo[3,4-*a*]pirazina sostituita in 1 e 7 (Figura 33).



**Figura 33.** Scaffold di ligandi non peptidici di NPSR.

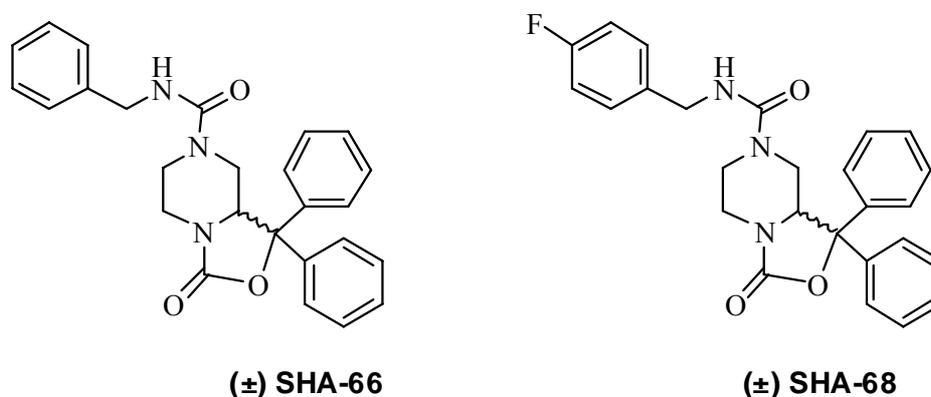
Due di questi composti siglati **SHA 66** e **SHA 68**, che differiscono solo per la presenza o meno di un fluoro in para sul gruppo benzilico in 7, (Figura 34), sono stati valutati farmacologicamente (in vivo e in vitro) da Okamura<sup>42</sup>. In cellule che esprimono il recettore *h*NPSR SHA 68 è di per sé inattivo mentre antagonizza in maniera dose-dipendente gli effetti stimolatori di NPS. Indagini farmacocinetiche hanno dimostrato che SHA 68 raggiunge alti livelli nel plasma e nel cervello dopo somministrazione intraperitoneale, inoltre SHA 68 somministrato perifericamente nel topo antagonizza la stimolazione dell'attività locomotoria indotta da NPS.

<sup>41</sup> Fukatzu K, Nakayama Y, Tarui N, Mori M, Matsumoto H, Kurasawa O, Banno H.; Takeda *Pharmaceuticals* **2004**, PCT/JP04/12683.

<sup>42</sup> Okamura N, Habay SA, Zeng J, Chamberlin AR, Reinscheid RK. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo profile of 3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-*a*]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68), a selective antagonist of the neuropeptide S receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **2008**;325:893–901.

Un approfondito studio struttura-attività sulla posizione 7 di SHA 68 pubblicato da Zhang<sup>43</sup> indica che è necessaria ai fini dell'attività antagonista sul recettore di NPS la funzionalità ureica libera. Infatti l' $\alpha$ -metilazione o l'allungamento della catena alifatica in 7 produce una riduzione della potenza del composto, indicando una limitata tollerabilità alle sostituzioni in posizione 7. L'unica modificazione chimica tollerata in questa posizione è l'eliminazione dell'atomo di fluoro in para sul nucleo benzilico, generando un composto di potenza simile a quella di SHA 68 (SHA-66).

Sia SHA-66 che SHA 68 sono stati risintetizzati e testati come miscela racemica.



**Figura 34.** Antagonisti non peptidici di NPSR.

L'importanza della chiralità nel generare ligandi del recettore NPSR è stata recentemente supportata dall'identificazione di due nuove classi di antagonisti non peptidici: composti di natura chinolinica<sup>44</sup> e tricycloimidazolica<sup>45</sup>. In entrambi i casi i singoli enantiomeri sono stati ottenuti mediante cromatografia su colonna chirale a partire dalla corrispondente miscela racemica.

<sup>43</sup> Y. Zhang, B. P. Gilmour, H. A. Navarro, S. P. Runyon Identifying structural features on 1,1-diphenyl-hexahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazin-3-ones critical for Neuropeptide S antagonist activity *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 4064–4067.

<sup>44</sup> Melamed, J. Y. et al. Synthesis and evaluation of a new series of Neuropeptide S receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 4700–4703.

<sup>45</sup> Trotter, B. W. et al. Tricyclic imidazole antagonists of the Neuropeptide S Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 4704–4708.

Oltre allo studio *SAR* della posizione 5 di NPS, nel mio lavoro di dottorato mi sono anche occupata della sintesi dell'antagonista NPSR **SHA-68**, 4-fluoro-benzilammide dell'acido (9*R/S*)-3-osso-1,1-difenil-tetraidro-ossazolo[3,4-*a*]pirazin-7-carbossilico, in forma otticamente pura<sup>46</sup>, al fine di poter valutare separatamente l'attività in vitro e in vivo dei suoi due enantiomeri.

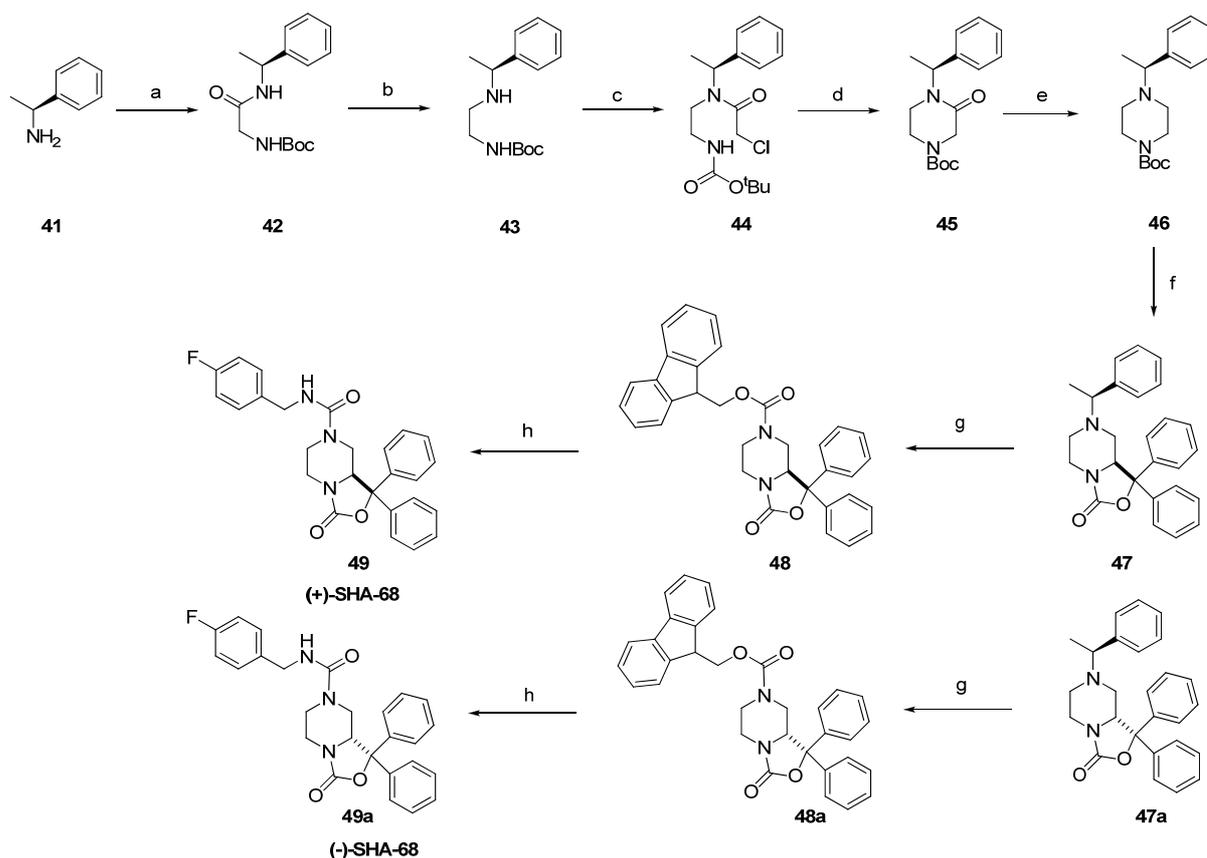
Nello Schema 20 è descritta la strategia sintetica adottata a partire dalla *S*-fenilettilammina. Come riportato in letteratura<sup>47</sup>, l'utilizzo della fenilettilammina chirale è volta a indurre la stereochimica del C9 del nucleo tetraidro-ossazol-[3,4-*a*]pirazinico. Sfortunatamente sia con *R*-fenilettilammina che con la *S*-fenilettilammina abbiamo ottenuto un eccesso diastereoisomerico enantiomerico basso (60/40%) determinato tramite spettroscopia NMR. La sintesi riportata descrive la via sintetica eseguita partendo dalla *S*-fenilettilammina, gli stessi risultati sono stati ottenuti con il suo enantiomero.

Il primo step consiste nella semplice condensazione della Boc-Gly-OH con l'ausiliario chirale (**41**); il legame ammidico che si forma è successivamente ridotto con LiAlH<sub>4</sub> in THF a 0°C a dare il composto **43**. L'acilazione seguente viene condotta in presenza di cloro-acetilcloruro e la chiusura del ciclo a sei è ottenuta con NaH. Il nucleo piperazinico, che rappresenta il cuore del nostro composto, è stato ottenuto mediante riduzione con LiAlH<sub>4</sub>. Trattando il nucleo piperazinico con *sec*-BuLi/TMEDA a -78°C, seguito dall'aggiunta di benzofenone si ottengono i due diastereoisomeri **47** e **47a** con buona resa. Mediante cromatografia flash su colonna è stato possibile isolare i due isomeri e caratterizzarli mediante spettroscopia NMR e spettrometria di massa e determinarne il potere ottico. In situ è stata poi effettuata la contemporanea rimozione dell'ausiliario chirale all'N7 e la sua protezione con il gruppo Fmoc per ottenere gli analoghi **48** e **48a**. L'ultimo step di sintesi per ottenere gli enantiomeri *R* e *S* dell'SHA 68 consiste nella facile rimozione del gruppo protettore base-labile e conseguente acilazione all'N7 con 4-fluoro-benzilisocianato.

---

<sup>46</sup> Trapella C., Pela' M., Del Zoppo L., Calo' G., Camarda V., Ruzza C., Cavazzini A., Costa V., Bertolasi, Reinscheid R.K., Salvadori e Guerrini R. Synthesis and separation of the enantiomers of the Neuropeptide S receptor antagonist (9*R/S*)-3-Oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-*a*]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68) *J. Med. Chem* **2011** 54 (8), 2738–2744.

<sup>47</sup> a) Juaristi, E. et al. Recent applications of alpha-phenylethylamine (alpha-PEA) in the preparation of enantiopure compounds. Part 3: alpha-PEA as chiral auxiliary. Part 4: alpha-PEA as chiral reagent in the stereodifferentiation of prochiral substrates. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 2441–2495; b) Guizzetti, S.; Benaglia, M.; Rossi, S. Highly stereoselective metal-free catalytic reduction of imines: an easy entry to enantiomerically pure amines and natural and unnatural alpha-amino esters. *Org. Lett.* **2009**, 11, 2928–2931.



**Condizioni:** a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , WSC, Boc-Gly-OH, r.t., 12h, Y=60%; b)  $\text{LiAlH}_4$ , THF,  $0^\circ\text{C}$ , 1h, Y=90%; c) Cloroacetil-cloruro, AcOEt,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $0^\circ\text{C}$  to r.t., 24h, Y=100%; d) THF/DMF 1/1, NaH,  $0^\circ\text{C}$  to r.t., 24h, Y=45%; e) THF,  $\text{LiAlH}_4$ , r.t., 4h, Y=84%; f) Benzofenone, sec-BuLi, TMEDA,  $-78^\circ\text{C}$  to  $-30^\circ\text{C}$  to r.t., 24h, Y=45%; g)  $\text{CH}_3\text{CN}$ , Fmoc-Cl, reflux, 12h, Y=67%; h) THF, DBU, p-fluoro-benzilisocianato, r.t., 12h, Y=83%.

*Schema 20. Sintesi di (+) e (-) SHA-68.*

I composti (+)-SHA 68 e (-)-SHA 68 sono stati caratterizzati in dettaglio tramite spettroscopia NMR mono e bidimensionale, spettrometria di massa ESI ed è stata valutata la purezza ottica tramite HPLC analitico su colonna chirale (Figura 35).

Dai rispettivi profili analitici si può affermare che i due enantiomeri hanno una purezza ottica del 100%.

Nella Figura 36 abbiamo confrontato il profilo analitico della miscela racemica di SHA 68 coi profili dei suoi due enantiomeri.

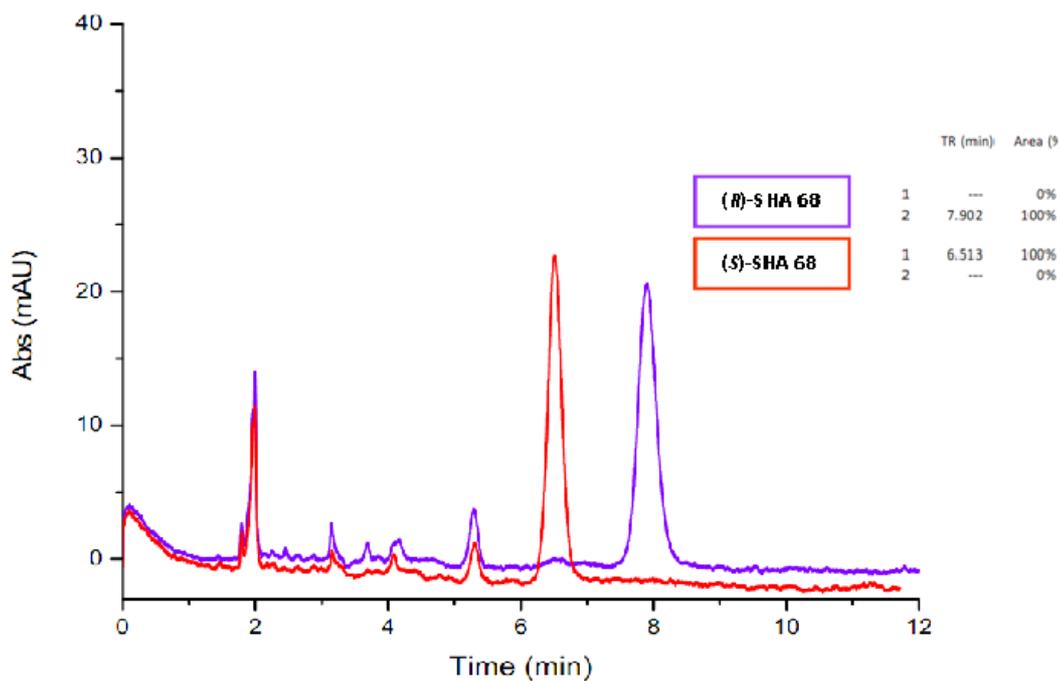


Figura 35. Cromatogramma dei due enantiomeri di SHA 68.

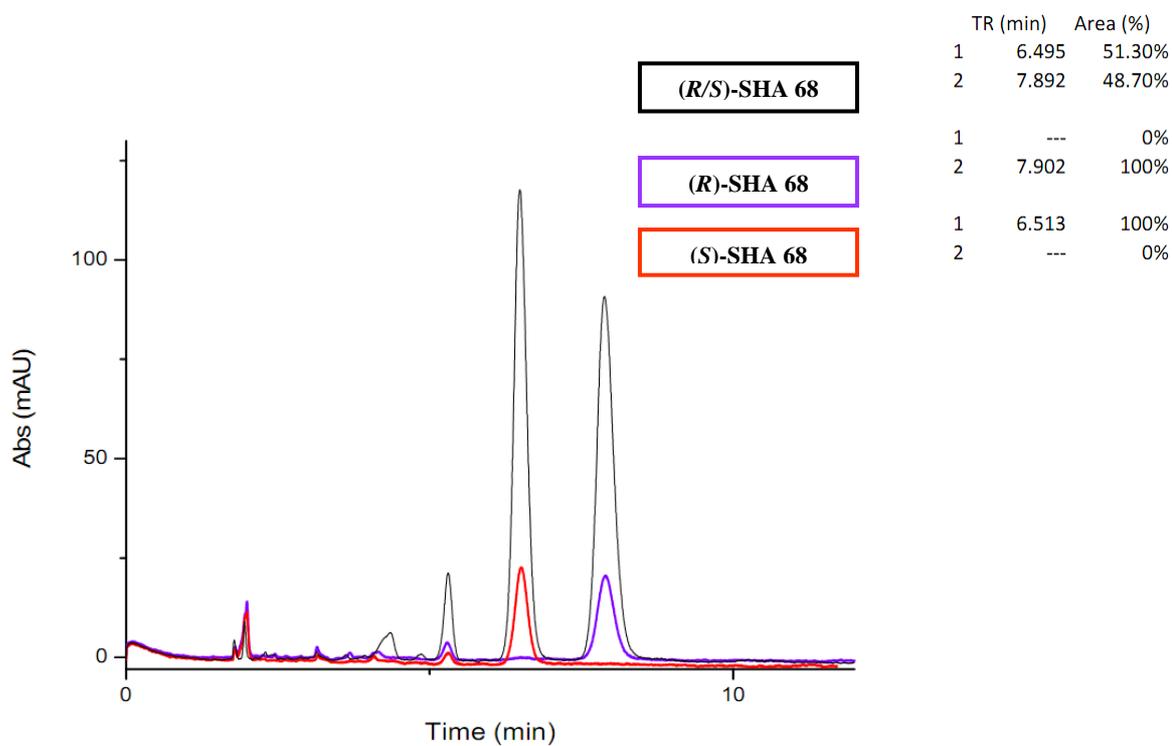
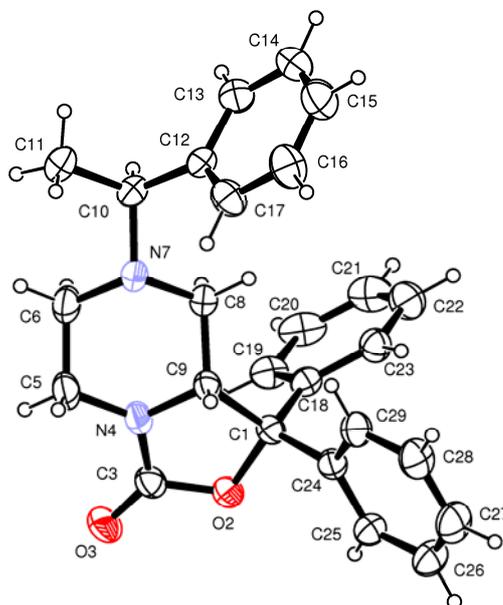


Figura 36. Cromatogramma della miscela racemica di SHA 68 confrontato coi profili dei suoi due enantiomeri.

L'analisi ai raggi X dell'intermedio distereoisomerico **47a** ci ha permesso di assegnare con precisione la chiralità del C9. Su questi basi è stata assegnata la chiralità degli altri intermedi e prodotti finali (figura 37).



**Figura 37.** ORTEP del composto **47a**. i dati sono stati ottenuti a r.y. utilizzando a Nonius Kappa CCD diffractometer with graphite monochromated Mo-KR radiation.

In seguito è stata valutata e comparata l'attività biologica in vitro di miscela racemica di SHA 68 e dei suoi enantiomeri (Tabella 10).

La miscela racemica (*R/S*)-SHA **68** inibisce in maniera dose-dipendente l'effetto stimolatorio di NPS mostrando valori di potenza ( $pK_B \approx 8$ ) confrontabili con quelli precedentemente pubblicati<sup>43,48</sup>.

(*R*)-SHA **68** antagonizza in maniera dose-dipendente l'effetto stimolatorio di NPS con valori di potenza simili se non maggiori rispetto a quelli della miscela racemica; mentre (*S*)-SHA **68** mostra un effetto inibitorio trascurabile solo a concentrazioni micromolari.

<sup>48</sup> C. Ruzza, A. Rizzi, C. Trapella, M. Pelà, V. Camarda, V. Ruggieri, M. Filaferro, C. Cifani, R. K. Reinscheid, G. Vitale, R. Ciccocioppo, S. Salvadori, R. Guerrini, G. Calò Further studies on the pharmacological profile of the neuropeptide S receptor antagonist SHA 68. *Peptides*, **2010**, 31, 915-925.

	<b>mNPSR</b>	<b>hNPSR Ile107</b>	<b>hNPSR Asn107</b>
	<i>pK<sub>B</sub></i>	<i>pK<sub>B</sub></i>	<i>pK<sub>B</sub></i>
<b>(R/S)-SHA 68</b>	8.16 (7.79-8.53)	8.03 (7.77-8.37)	7.99 (7.73-8.25)
<b>(R)-SHA 68</b>	<b>8.29</b> (7.93-8.65)	<b>8.18</b> (7.90-8.46)	<b>8.28</b> (7.72-8.84)
<b>(S)-SHA 68</b>	<6	<6	<6

**Tabella 10.** Valori di potenza ( $pK_B$ ) di (R/S)-SHA 68 e dei due enantiomeri separati testati su cellule HEK293 esprimenti il recettore NPSR di topo e le due isoforme di hNPSR.

Questi risultati dimostrano che **(R)-SHA 68** è l'enantiomero attivo, mentre il contributo dell'**(S)-SHA 68** all'attività biologica nella miscela racemica è del tutto trascurabile.

Queste informazioni sono estremamente utili per definire meglio il modello molecolare del recettore NPSR e il suo sito di binding<sup>49</sup> e sono anche di aiuto per il design di nuove molecole in grado di interagire con NPSR.

A tutt'oggi questa molecola rappresenta lo standard non peptidico antagonista NPSR usato per studiare le funzioni biologiche regolate dal sistema NPS/NPSR e per valutare il potenziale terapeutico di farmaci innovativi che agiscono come ligandi selettivi di NPSR.

<sup>49</sup> Dal Ben, D.; Antonini, I.; Buccioni, M.; Lambertucci, C.; Marucci, G.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G. Molecular modeling studies on the human neuropeptide S receptor and its antagonists. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 371–383.

# CONCLUSIONI

Nel mio lavoro di dottorato mi sono occupata dello studio struttura-attività del Neuropeptide S ed in particolare della posizione 5. Lavori precedenti avevano dimostrato come questa posizione fosse importante per modulare potenza ed efficacia della molecola. Al fine di identificare nuovi antagonisti potenti e selettivi del recettore NPSR, abbiamo progettato, sintetizzato e inserito in posizione 5 di NPS alcuni amminoacidi non naturali. In particolare **i**) è stato sintetizzato in forma racema l'amminoacido *Ipv* (acido 2-ammino-3,3,4-trimetilpentanoico) caratterizzato da una catena laterale che può essere considerata la chimera tra le catene laterali di Valina e Leucina; **ii**) è stato sintetizzato in forma otticamente attiva l'amminoacido *Ddb* (acido 3,3-dimetil-2,4-diamminobutirrico) caratterizzato da una catena laterale alifatica ramificata funzionalizzata con un gruppo amminico primario; **iii**) sono stati sintetizzati alcuni analoghi della D-Penicilammina S-alchilata.

Questo lavoro mi ha permesso di studiare e applicare diverse strategie chimiche per la sintesi di  $\alpha$ -amminoacidi in particolare caratterizzati da catena laterale alifatica ramificata. Nel caso dell'amminoacido 2-ammino-3,3,4-trimetilpentanoico lo schema sintetico applicato si presta anche per la sintesi di un'ampia gamma di nuovi amminoacidi non naturali caratterizzata da catena laterale ramificata. Inoltre ho potuto applicare tecniche di sintesi peptidica in fase solida, metodiche di controllo analitico e purificazione HPLC e di spettrometria di massa. I dati farmacologici ottenuti hanno confermato la chiralità e l'ingombro sterico requisiti chimici molto importanti per la posizione 5 di NPS in grado di modulare efficacia e potenza del peptide.

Inoltre è stato scoperto che antagonisti NPSR possono essere generati anche sostituendo la posizione 5 con D-amminoacidi caratterizzati da catena laterale basica.

L'utilizzo di S-alchil Penicilammine ha evidenziato come l'aumento dell'ingombro sterico della posizione 5 sia meglio tollerato se generato da un sostituito aromatico rispetto a raggruppamenti alifatici suggerendo la planarità un requisito utile per l'identificazione di nuovi antagonisti NPSR.

# ***PARTE SPERIMENTALE***

## ***Sintesi dei composti***

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Buchi-Tottoli e non sono stati corretti.

Le reazioni e le miscele di prodotti sono state controllate mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su lastre di gel di silice Macherey-Nagel poligram SIL/UV 254 da 0,25 mm, usando come sistemi di rivelazione una lampada UV a 254 nm e come reagenti di sviluppo ninidrina 1% in MeOH, ipoclorito di sodio 50% in acqua, KI in salda d'amido 5% in acqua, permanganato di potassio in soluzione acquosa al 2%.

I sistemi cromatografici utilizzati sono i seguenti:

Bagno 1 (B1): But-OH/CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O (3:1:1);

Bagno 3 (B3): CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/toluene (17:2:1).

I prodotti sono stati anidrificati con sodio solfato anidro Carlo Erba/Sigma-Aldrich.

Le purificazioni cromatografiche su colonna sono state eseguite con gel di silice Merck 60-200 mesh.

I poteri ottici rotatori sono stati ottenuti con uno strumento Perkin-Elmer 241 Polarimeter utilizzando come riga spettrale la riga del sodio ad una temperatura di 20°C.

Gli spettri <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR e DEPT sono stati registrati con uno strumento Varian 200MHz e 400MHz e i campioni sono stati solubilizzati in CDCl<sub>3</sub> se non specificato in modo diverso. Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in parte per milione (ppm) utilizzando come standard interno il picco 7.256 ppm del cloroformio deuterato, mentre le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hertz (Hz). Per le molteplicità valgono le seguenti abbreviazioni: s = singoletto; d = doppietto; t = tripletto; q = quartetto; m = multipletto; bs = segnale allargato; dd = doppio doppietto; dt = doppio tripletto; td = triplo doppietto.

I pesi molecolari degli intermedi e dei prodotti finali sono stati determinati mediante uno spettrometro di massa electrospray ESI MICROMASS ZMD 2000.

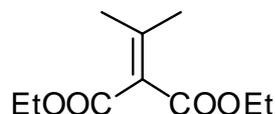
Il controllo analitico sia degli intermedi che dei prodotti finali è stato fatto mediante HPLC Beckman System Gold 125 con rivelatore UV Beckman Coulter Sistem 168 a lunghezza d'onda variabile fissata a 220 nm utilizzando una Colonna Jupiter C<sub>18</sub> (100 x 4.6 mm, 5 µm), se non diversamente specificato. I composti sono stati analizzati utilizzando un sistema eluente binario composto da H<sub>2</sub>O e CH<sub>3</sub>CN entrambi acidificati con lo 0.1% v/v di TFA (A e B rispettivamente), ad un flusso di 1 ml/min. I tempi di ritenzione sono stati ottenuti utilizzando gradiente lineare da 0 al 100 % di CH<sub>3</sub>CN in 25 minuti.

I solventi ed i reagenti utilizzati per le TLC, le purificazioni cromatografiche, le cristallizzazioni e per le reazioni sono indicati come segue:

- Etere o Et<sub>2</sub>O per l'etere etilico;
- THF per il tetraidrofurano;
- EtPt per l'etere di petrolio;
- AcOEt o EtOAc per l'acetato di etile;
- DCM per il cloruro di metilene;
- EtOH per etanolo;
- <sup>t</sup>Bu-OH per tert-butanolo;
- H<sub>2</sub>O per acqua distillata;
- AcOH per acido acetico;
- DMSO per dimetilsolfossido;
- DMF per dimetilformammide;
- LHMDS per la litioesametildisilazide;
- TEA per la trietilammina;
- TMG per tetrametilguanidina;
- DIPA per diisopropilammina;
- LDA per litio diisopropilammide;
- DMAP per dimetilamminopiridina;
- NMM per N-metilmorfolina;
- DPPA per difenilfosforil azide;
- DBAD per dibenzil-aza-dicarbossilato;

- Tos-Cl per 4-Metil-benzensulfonil cloruro;
- DIBAL-H per diisobutilalluminio idruro;
- $\text{LiAlH}_4$  per litioalluminioidraro;
- $(\text{Boc})_2\text{O}$  per anidride del Boc;
- Boc per terbutilossicarbonile;
- Fmoc per 9-fluorenilmetilossicarbonile;
- Fmoc-Cl per (9H-Fluoren-9-il)metossi-carbonilcloruro;
- Rfx per riflusso;
- o.n. per overnight;
- r.t. per la temperatura ambiente;
- TBAI per tetrabuttilammonio ioduro;
- TFA per acido trifluoroacetico.

Preparazione di: **2-isopropiliden-malonico acido dietile estere (6)**



$C_{10}H_{16}O_4$   
Mol. Wt.: 200,23

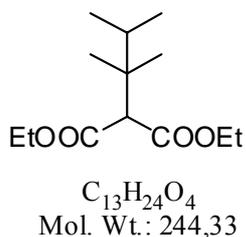
In un pallone si scioglie il dietilmalonato distillato di fresco (**8**) (131.87 mmol, 20 ml) in acetone anidro (**7**) (197.81mmol, 14.5 ml) e anidride acetica (164.84 mmol, 15.57 ml), quindi si aggiunge  $ZnCl_2$  (19.78 mmol, 2.68 g). Si porta a riflusso per 20-24 ore con valvola a cloruro di calcio. La reazione viene seguita su TLC (eluente AcOEt/EtPt 0.5:9.5). Raggiunta la completezza si raffredda a temperatura ambiente si aggiunge toluene e si effettuano 4 estrazioni con  $H_2O$ . Le fasi acquose vengono riunite e riestratte 2 volte con toluene. Riunite le fasi organiche, si anidrificano e si tirano a secco. Il prodotto viene purificato mediante colonna cromatografica con eluente AcOEt/EtPt 0.5:9.5 ( resa= 48% ).

Caratteristiche del composto (**6**):

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 201$

**$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  4.22 (q, 4H, 2  $-OCH_2CH_3$ ,  $J= 7$  Hz), 2.05 (s, 6H, 2- $CH_3$ ), 1.27 (t, 6H, 2- $OCH_2CH_3$ ,  $J= 7$  Hz).

Preparazione di: **2-(1,1,2-trimetil-propil)-malonico acido dietil estere (24)**



In un pallone a 2 colli, fiammato e sotto atmosfera di argon, si introducono etere etilico anidro (20 ml), Mg (3.4 mmol, 82.4 mg) ed isopropilbromuro (4.06 mmol, 381  $\mu$ l). Quando il Mg è consumato, si raffredda a  $-5^{\circ}C$  e si aggiunge CuCl in quantità catalitica (0.045 mmol, 4.5 mg). Dopo 15 minuti si introduce gocciolando l'isopropilidene (**6**) (2.26 mmol, 451.5 mg) sciolto in etere etilico anidro. Si lascia in agitazione a r.t. per 4 ore. La reazione viene seguita su TLC (eluente AcOEt/EtPt 0.5:9.5). Dopo circa 3-4 ore la si spegne con acido solforico 10%, si separa la fase organica in imbuto separatore e si riestrae dalle acque 3 volte con etere etilico. Le fasi organiche vengono riunite, anidificate ed evaporate a secchezza. Il grezzo di reazione viene poi purificato tramite cromatografia flash con eluente AcOEt/EtPt 0.5:9.5 per dare il composto **24** (resa=11%).

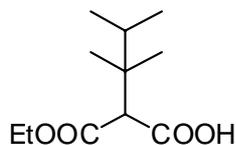
Caratteristiche del composto (**24**):

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 245$ .

**$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  4.15 (q, 4H, 2 -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, J= 7.2 Hz), 3.50 (s, 1H, -CH(COOEt)<sub>2</sub>), 1.85-1.79 (m, 1H, -CH), 1.24 (t, 6H, 2 -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, J= 7.2 Hz), 1.04 (s, 6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.85 (d, 6H, 2-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, J=6.8 Hz).

**$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  168.7 (2C); 60.8 (2C); 58.6; 39.1; 34.5; 20.9 (2C); 17.4 (2C); 14.2 (2C).

Preparazione di: **2-(1,1,2-Trimetil-propil)-malonico acido monoetil estere (25)**



$C_{11}H_{20}O_4$   
Mol. Wt.: 216,27

In un pallone da 100 ml si scioglie il diestere (**24**) (2.135 mmol, 521 mg) in etanolo (15 ml) e NaOH 1N (7.9 mmol, 5.5 ml) e si lascia in agitazione a temperatura ambiente. La reazione viene monitorata mediante TLC (eluente AcOEt/EtPt/AcOH 1:5:0.3) e spettrometria di massa, che ci permette di vedere il picco corrispondente alla massa del monoacido. La reazione procede molto lentamente, occorrono circa 3 equivalenti di NaOH, aggiunti in piccole aliquote, affinché tutto il diestere venga consumato. A reazione completata, si evapora l'etanolo, si estrae con AcOEt (10 ml) dalle acque basiche il diestere e dalle acque acide, acidificate con HCl 1N, si estrae 3 volte con AcOEt (20 ml) il monoacido di interesse (**25**). Il prodotto così ottenuto viene utilizzato nello step successivo senza ulteriore purificazione (resa= 80 %).

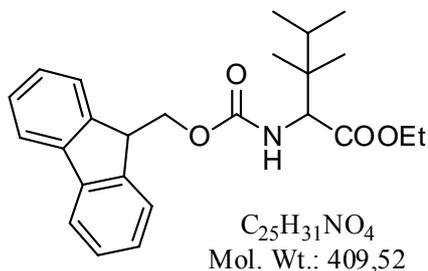
Caratteristiche del composto (**25**):

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 217$ .

**$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  4.21 (q, 2H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, J=7.2 Hz), 3.56 (s, 1H, EtOOC-CH-COOH), 1.85-1.78 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.29 (t, 3H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, J= 7.2 Hz), 1.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.91 (d, 3H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, J=3.6 Hz), 0.88 (d, 3H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, J=3.6 Hz).

**$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  171.7; 170.8; 61.7; 58.1; 40.1; 34.5; 21.2; 20.9; 17.4; 17.4; 14.1.

Preparazione di: **2-(9H-fluoren-9-il-metossicarbonilamino)-3,3,4-trimetil-pentanoico acido etil estere (26)**



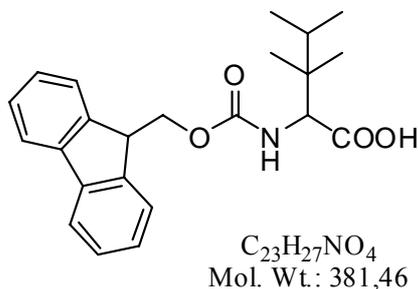
In un pallone da 100 ml si scioglie il monoacido (**25**) (0.52 mmol, 113 mg) in toluene anidro (15 ml), si aggiunge TEA (1.3 mmol, 183  $\mu$ l) e DPPA (0.78 mmol, 170  $\mu$ l) e si lascia a riflusso per 2 ore. La miscela di reazione viene raffreddata e si aggiunge il fluorenilmetano (1.04 mmol, 204.09 mg) e si lascia reagire a riflusso overnight. La reazione viene seguita su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:7), una volta giunta a termine si porta a secco il solvente e successivamente il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografica flash con eluente AcOEt/EtPt 0.5:9.5 per dare il prodotto voluto (resa= 37%).

Caratteristiche del composto (**26**):

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 410$ .

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  7.76 (d, 2H, J=8 Hz  $H_{Ar}$  Fmoc), 7.59 (d, 2H,  $H_{Ar}$  Fmoc J=8 Hz), 5.34 (d, 2H, J=8 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>-O), 4.41, (s, 1H, EtOOC-CH-NH), 4.20, (q, 2H, J=7.6 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.17, (d, 1H, J=8 Hz, Fmoc-CH-CH<sub>2</sub>-O), 1.58, (m, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 1.28, (t, 3H, J=7.6 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 0.93, (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C), 0.89-0.80 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH).

Preparazione di: **2-(9H-fluoren-9-il-metossicarbonilamino)-3,3,4-trimetil-pentanoico acido (27)**



In un pallone da 10 ml viene trasferito l'amminoestere protetto (**26**) (0.183 mmol, 75 mg) sciolto in AcOH glaciale (2 ml) e HCl 37% (2 ml). Il tutto viene collegato ad una Vigreux e si lascia a riflusso (125°C) per 2h per tutta la notte. La reazione viene seguita su TLC (eluente AcOEt/EtPt/AcOH 1:1:0.3). Quando il prodotto desiderato si è formato, si raffredda la reazione e si tira a secco il solvente. Per separare l'amminoacido deprotetto da quello protetto con Fmoc si riprende il grezzo portato a secco con H<sub>2</sub>O (5 ml) e si controlla che questa sia acida, si aggiunge AcOEt (15 ml) in modo da far passare l'amminoacido sbloccato salificato in H<sub>2</sub>O, lasciando quello protetto con Fmoc in fase organica. La fase acquosa acida viene ri-estratta 2 volte con AcOEt. Le fasi organiche riunite sono anidificate e portate a secco per dare il composto **27** pulito (resa=95%).

Caratteristiche del composto (**27**):

**MS (ESI):** [MH]<sup>+</sup> = 382.

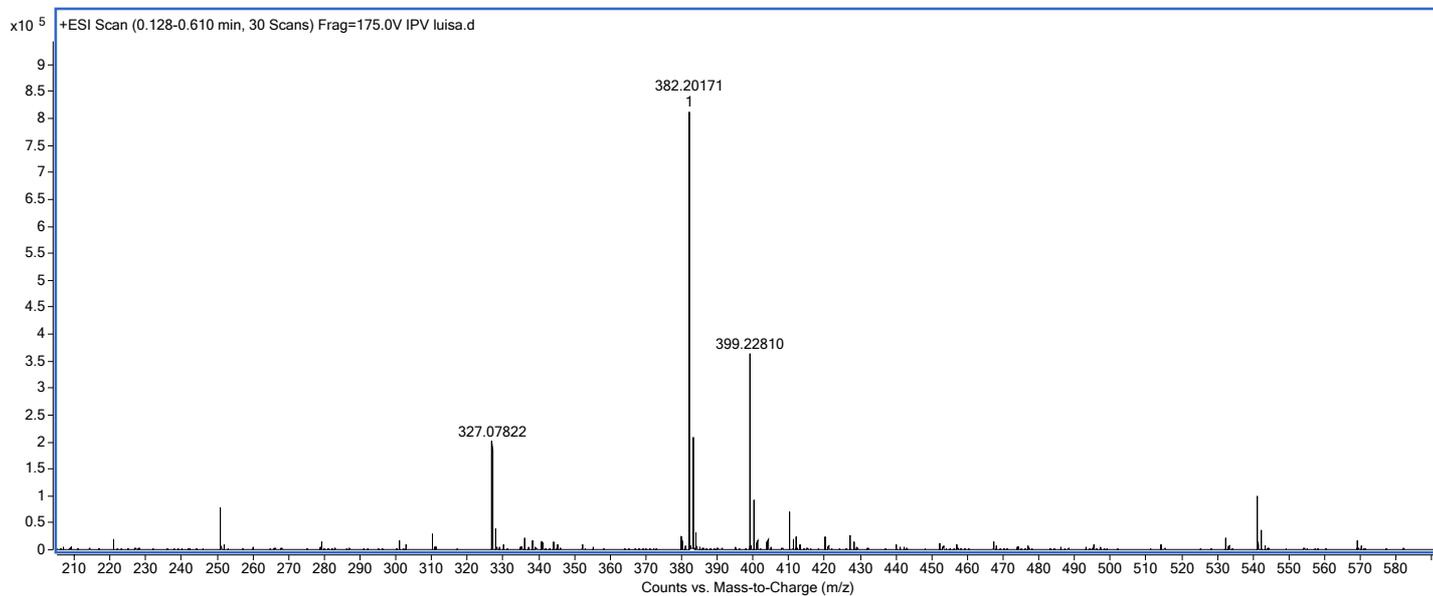
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 7.78-7.74 (d, 2H, J=8 Hz *H<sub>Ar</sub>* Fmoc), 7.61-7.57 (d, 2H, *H<sub>Ar</sub>* Fmoc J=8 Hz), 5.34 (d, 2H, J=8 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>-O), 4.41, (s, 1H, HOOC-CH-NH), 4.17, (d, 1H, J=8 Hz, Fmoc-CH-CH<sub>2</sub>-O), 1.58, (m, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0.93, (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C), 0.89, (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 174.1; 155.9; 142.6 (2C); 126.7 (6C); 120.5 (2C); 67.3; 65.0; 47.9; 40.4; 30.0; 19.1 (2C); 17.9 (2C).

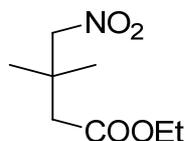
**HPLC analitico t<sub>R</sub>:** 16.22 min.

**Massa esatta** (strumento utilizzato: Agilent accurate mass ESI-Q-TOF 6520)

MW calcolato= 381.19401    MW trovato= 382.20171



Preparazione di: **acido 3,3-dimetil-4-nitro-butirrico etil estere (33)**



$C_8H_{15}NO_4$   
Mol. Wt.: 189,21

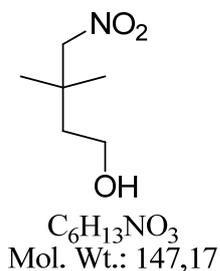
In un pallone si aggiungono nitrometano (390 mmol, 21.12 ml), l'acrilato **32** (15.6 mmol, 2 g) e TMG (15.6 mmol, 1.96 ml) e si lascia agitare a temperatura ambiente per 3 giorni. La reazione viene monitorata mediante TLC (eluente AcOEt/EtPt 0.5: 9.5). Successivamente si evapora il solvente, si ridiscioglie tutto in AcOEt e si fa un lavaggio con HCl 1N per togliere i residui di TMG non reagita. La fase acquosa acida viene riestratta 2 volte con 50 ml di AcOEt ciascuna. Le fasi organiche riunificate vengono anidificate e portate a secco. Il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografia flash con eluente AcOEt/EtPt 0.5: 9.5 a dare il composto **33** (resa=19%).

Caratteristiche del composto (**33**):

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 190$ .

**$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  4.52 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>), 4.12 (q, 2H, J=7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.42 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-COOEt), 1.24 (t, 3H, J=7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.14 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>).

Preparazione di: **3,3-dimetil-4-nitro-butan-1-olo (35)**



In un pallone a 2 colli fiammato, si aggiunge il nitroestere **33** (11.5 mmol, 2.17 g) sciolto in THF anidro (20 ml) in atmosfera di Argon. Si raffredda a 0°C e si gocciola il DIBAL-H 1M in THF (25.3 mmol, 25.3 ml). Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight. La reazione è seguita mediante TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:5). Il giorno seguente si procede con il quencing con NH<sub>4</sub>Cl saturo per distruggere l'eccesso di DIBAL-H. Si evapora poi il THF e si estrae la fase acquosa rimasta con AcOEt. La fase acquosa è riestratta 2 volte con AcOEt. Si uniscono le fasi organiche, si anidrifica, si filtra e si tira a secco. Il grezzo di reazione è purificato mediante cromatografia flash con miscela eluente AcOEt/EtPt 1:3 a dare il prodotto voluto (**35**) (resa=96%).

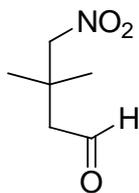
Caratteristiche del composto (**35**):

**MS (ESI):** [MH]<sup>+</sup> = 148.

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 4.35 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>); 3.77 (t, 2H, J= 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>-OH); 1.92 (bs, 1H, OH); 1.66 (t, 2H, J= 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); 1.10 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 85.6, 59.1, 41.7, 34.7, 25.7.

Preparazione di: **3,3-dimetil-4-nitro-butirraldeide (31)**



$C_6H_{11}NO_3$   
Mol. Wt.: 145,16

In un pallone fiammato a 3 colli e in atmosfera di Argon, ad una soluzione di ossalilcloruro (10.33 mmol, 0.9 ml) in DCM anidro (23.5 ml) si aggiunge goccia a goccia il DMSO a -50°C/-60°C. Si lascia agitare per 2 minuti e si aggiunge l'alcol **35** (9.39 mmol, 1.38 g) in 5 minuti disciolto in DCM anidro (10 ml). Dopo 15 minuti si aggiunge la TEA (46.95 mmol, 6.5 ml) e la miscela di reazione è lasciata sotto agitazione magnetica per 5 minuti e dopo viene lasciata, sempre in agitazione magnetica ed atmosfera di Argon, a temperatura ambiente. La reazione procede per tutta la notte e viene controllata per TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:2). Il trattamento consiste nel diluire con H<sub>2</sub>O (30 ml) e la fase acquosa viene estratta con 30 ml di DCM. Le fasi organiche unificate sono lavate con Brine (15 ml), HCl 1N (30 ml), H<sub>2</sub>O (15 ml) e una soluzione di NaHCO<sub>3</sub> al 5% (30 ml). La fase organica viene anidrificata e portata a secco.

Il prodotto ottenuto è sufficientemente puro per essere utilizzato nelle reazioni successive senza ulteriore purificazione (resa=100%).

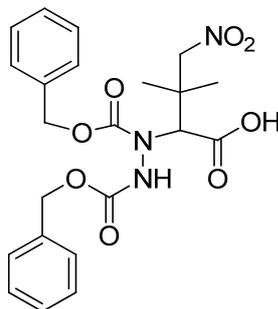
Caratteristiche del composto (**31**):

**MS (ESI):** [MH]<sup>+</sup> = 146.

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 9.76 (t, 1H, J= 1.2 Hz, CHO), 4.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>), 2.57 (d, 2H, J=1.6 Hz CH<sub>2</sub>-CHO), 1.15 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 200.2, 83.9, 51.5, 34.2, 25.7.

Preparazione di: **acido 2- (N,N-dibenzil-ossicarbonil)-3,3-dimetil-4-nitro-butanoico (30)**



$C_{22}H_{25}N_3O_8$   
Mol. Wt.: 459,45

In un pallone ad una sospensione di Prolina (2.11 mmol, 243 mg) in  $CH_3CN$  (30 ml) si aggiungono a  $0^\circ C$  DBAD (21.1 mmol, 6.29 g) e l'aldeide **31** (10.55 mmol, 1.53 g). La reazione va lasciata in agitazione per 3 ore e monitorata su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:4) e via MS (ESI), l'aldeide intermedia **31b** ha  $[MH]^+ = 444$ . Alla scomparsa della macchia in TLC corrispondente all'aldeide start **31** e alla comparsa del picco 444 nello spettro di massa, si procede direttamente *in situ* all'ossidazione dell'aldeide intermedia **31b** utilizzando il reattivo di Jones (33.5g di  $CrO_3$  in 30 ml  $H_2SO_4$  conc., diluito in 250 ml di  $H_2O$ ), sapendo che 1 equivalente di questo reattivo ossida 3 equivalenti di aldeide e quindi in questa reazione sono necessari 2.63 ml di Jones. Si aggiungono circa 15 equivalenti di reattivo di Jones e si controlla l'ossidazione via MS (ESI). Alla scomparsa del picco relativo all'aldeide **31b** e alla comparsa di quello relativo all'acido **30**, la reazione viene spenta con isopropanolo. Si procede poi filtrando i sali di Cromo su filtro di Gooch con strato di celite e tirando a secco il solvente. Il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografia flash con eluente AcOEt/EtPt 1:3 AcOH 0,3% a dare il prodotto desiderato **30** (resa=100%).

Caratteristiche del composto (**30**) ottenuto con la L-Pro:

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 460$ .

**$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$  a 120°C, 400 MHz):**  $\delta$  7.33 (s, 10H,  $H_{Ar}$ ), 5.14-5.11 (m, 4H,  $CH_2$ -Ar), 4.89 (d, 1H,  $J=11.6$  Hz,  $CH_2$ -NO $_2$ ), 4.83 (s, 1H, NH-CH-C=O), 4.63 (d, 1H,  $J=11.6$  Hz,  $CH_2$ -NO $_2$ ), 1.22 (s, 6H,  $CH_3$ ).

**$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):**  $\delta$  171.9, 155.6, 136.2, 135.8, 128.2, 127.8, 127.5, 127.3, 68.1, 67.6, 66.1, 37.9, 24.9, 21.8, 20.9.

$[\alpha]_D^{20} = +14.02^\circ$  (c=0.1 g/100 ml, Cloroformio).

Caratteristiche del composto (**30**) ottenuto con la D-Pro:

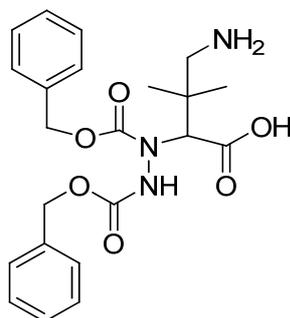
**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 460$ .

**$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$  a 120°C, 400 MHz):**  $\delta$  7.33 (s, 10H,  $H_{Ar}$ ), 5.14-5.11 (m, 4H,  $CH_2$ -Ar), 4.89 (d, 1H,  $J=11.6$  Hz,  $CH_2$ -NO $_2$ ), 4.83 (s, 1H, NH-CH-C=O), 4.63 (d, 1H,  $J=11.6$  Hz,  $CH_2$ -NO $_2$ ), 1.22 (s, 6H,  $CH_3$ ).

**$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):**  $\delta$  171.9, 155.6, 136.2, 135.8, 128.2, 127.8, 127.5, 127.3, 68.1, 67.6, 66.1, 37.9, 24.9, 21.8, 20.9.

$[\alpha]_D^{20} = -14.95^\circ$  (c=0.1 g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: acido-2- (N,N-dibenzil-ossicarbonil)-4- ammino-3,3-dimetil-butirrico  
(36)



$C_{22}H_{27}N_3O_6$   
Mol. Wt.: 429,47

In un pallone si scioglie il composto **30** (2.1 mmol, 964 mg) in AcOH glaciale (30 ml) e si aggiunge Zn (42 mmol, 2.75 g) in piccole porzioni. La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica per circa 15 minuti e viene controllata via TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:1 AcOH 0,3%) e MS (ESI). Alla comparsa del picco  $[MH]^+ = 430$ , corrispondente al composto voluto, la reazione viene fermata filtrando lo zinco su filtro Gooch e strato di celite, successivamente si evapora l'acido acetico. Il prodotto ottenuto come sale di acetato non viene sottoposto ad ulteriori purificazioni e viene usato tal quale nella reazione successiva (resa=100%).

Caratteristiche del composto (**36**) ottenuto con la L-Pro:

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 430$ .

**$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  7.34-7.30 (m, 10H,  $H_{Ar}$ ); 5.08 (s, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 4.52-4.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 2.64 (s, 1H, CH $\alpha$ ); 1.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COOH); 0.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 0.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  174.3, 143.2, 142.5, 136.5, 128.3, 128.0, 127.8, 127.5, 126.9, 126.6, 126.4, 66.9, 65.8, 62.8, 48.6 (CH<sub>3</sub>-COO<sup>-</sup>), 31.0, 25.5, 23.9 (2C).

$[\alpha]_D^{20} = -3.08^\circ$  (c=0.1 g/100 ml, Metanolo).

Caratteristiche del composto (**36**) ottenuto con la D-Pro:

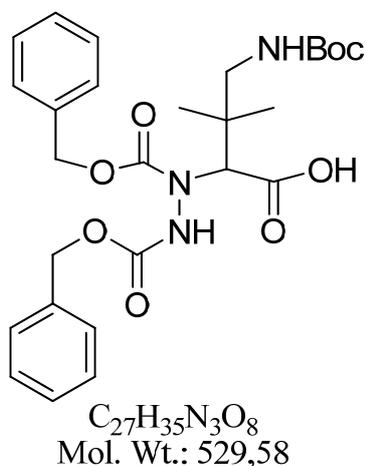
**MS (ESI):**  $[\text{MH}]^+ = 430$ .

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  7.34-7.30 (m, 10H,  $H_{Ar}$ ); 5.08 (s, 4H, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$ ); 4.52-4.40 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ); 2.64 (s, 1H,  $\text{CH}\alpha$ ); 1.76 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ); 0.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 0.95 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  174.3, 143.2, 142.5, 136.5, 128.3, 128.0, 127.8, 127.5, 126.9, 126.6, 126.4, 66.9, 65.8, 62.8, 48.6 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-COO}^-$ ), 31.0, 25.5, 23.9 (2C).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2.58^\circ$  (c=0.1 g/100 ml, Metanolo).

Preparazione di: acido-2- (N,N-dibenzil-ossicarbonil)-4-tert-butossicarbonilammino-3,3-dimetil-butirrico (29)



In un pallone si scioglie l'ammina **36** (2.04 mmol, 875.5 mg) in una miscela di H<sub>2</sub>O e <sup>t</sup>Bu-OH 1:1 (20 ml-20 ml), si aggiungono NaOH 1N fino pH 9, (Boc)<sub>2</sub>O (10.2 mmol, 2.23 g) e DMAP catalitica. La reazione viene lasciata agitare a r.t. overnight. Il giorno dopo si controlla via MS (ESI) e via TLC (eluente butanolo/AcOH/H<sub>2</sub>O 3:1:1) e si procede con il trattamento: si evapora il <sup>t</sup>Bu-OH e si estrae la fase acquosa rimasta con AcOEt per 3 volte. Le fasi organiche riunificate vengono anidrificate e portate a secchezza. Il composto protetto **29** viene ottenuto pulito per cromatografia flash con eluente AcOEt/EtPt 1:2 AcOH 0,3% (resa=55%).

Caratteristiche del composto (**29**) ottenuto con la L-Pro:

MS (ESI): [MH]<sup>+</sup> = 530.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub> a 120°C, 400 MHz): δ 7.34-7.32 (m, 10H, H<sub>Ar</sub>), 6.05 (bs, 1H, NH), 5.12-5.09 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Ar), 4.57 (s, 1H, NH-CH-COOH), 3.16-3.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 1.39 (s, 9H, t-Bu), 1.01-0.98 (m, 6H, 2CH<sub>3</sub>).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +3.96° (c=0.1 g/100 ml, Cloroformio).

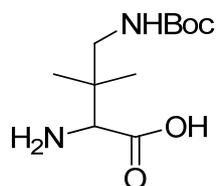
Caratteristiche del composto (**29**) ottenuto con la D-Pro:

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 530$ .

**$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$  a  $120^\circ C$ , 400 MHz):**  $\delta$  7.34-7.32 (m, 10H,  $H_{Ar}$ ), 6.05 (bs, 1H, NH), 5.12-5.09 (m, 4H,  $CH_2$ -Ar), 4.57 (s, 1H, NH-CH-COOH), 3.16-3.03 (m, 2H,  $CH_2$ NHBoc), 1.39 (s, 9H, t-Bu), 1.01-0.98 (m, 6H,  $2CH_3$ ).

$[\alpha]_D^{20} = -3.16^\circ$  (c=0.1 g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: **acido 2-ammino-4-tert-butossicarbonilammino-3,3-dimetil-butirrico**  
**(37)**



$C_{11}H_{22}N_2O_4$   
Mol. Wt.: 246,30

In un pallone si scioglie il composto **29** (1.65 mmol, 761.8 mg) in una miscela di EtOH/H<sub>2</sub>O 2:1 e si aggiungono 1.5 ml di acido acetico glaciale. Si trasferisce la miscela di reazione in una beuta e si aggiunge una quantità catalitica di platino ossido (PtO<sub>2</sub>). La miscela di reazione viene posta in atmosfera di H<sub>2</sub> e il tutto viene lasciato sotto agitazione magnetica per 2 giorni. La reazione viene seguita tramite TLC (eluente butanolo/AcOH/H<sub>2</sub>O 3:1:1) e MS (ESI); quando si nota la scomparsa del reagente iniziale **29** e la comparsa dell'ammina libera **37**, si filtra su filtro di carta ed etanolo e si evapora il solvente.

Il prodotto, ottenuto come sale di acetato, viene utilizzato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni (resa=90%).

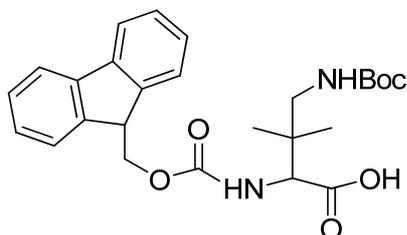
Caratteristiche del composto (**37**):

**MS (ESI):** [MH]<sup>+</sup> = 246.8.

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):** δ 6.05 (bs, 1H, NH), 4.37 (s, 1H, H $\alpha$ ), 3.10-2.95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 1,38 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 1.01-0.98 (m, 6H, 2CH<sub>3</sub>).

**HPLC analitico t<sub>R</sub>:** 16.76 min.

Preparazione di: acido 4-tert-butossicarbonilamino-2-(9H-fluoren-9-il-metossicarbonilamino)-3,3-dimetil-butirrico (28)



$C_{26}H_{32}N_2O_6$   
Mol. Wt.: 468,54

In un pallone si scioglie il prodotto **37** (1 mmol, 246.3 mg) in H<sub>2</sub>O (20 ml) e si aggiunge Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 mmol, 318 mg) controllando che il pH della soluzione sia basico. Si scioglie lo Fmoc-Cl (1 mmol, 258.7 mg) in diossano (20 ml) e lo si aggiunge lentamente alla miscela di reazione a 0°C. Dopo circa mezz'ora la reazione viene controllata su TLC (eluente butanolo/AcOH/H<sub>2</sub>O 3:1:1) e per MS (ESI). Alla scomparsa del prodotto iniziale si procede con il trattamento: si diluisce il tutto con AcOEt (50 ml). Si prepara una soluzione di H<sub>2</sub>O/HCl 1N 10:1 (50 ml-5 ml) e la si utilizza per estrarre la miscela di reazione diluita con AcOEt controllando che la fase acquosa sia acida. Le acque vengono poi estratte 2 volte con AcOEt ed infine la fasi organiche riunificate vengono lavate con Brine, anidificate e portate a secchezza. Il prodotto **28** viene cristallizzato da etere etilico-etere di petrolio 1/9 (resa=41%).

Caratteristiche del composto (**28**) ottenuto con la L-Pro:

**MS (ESI):** [MH]<sup>+</sup> = 469.

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 7.76 (d, 2H, J= 7.6 Hz, *H<sub>Ar</sub>*), 7.58 (d, 2H, J= 7.6 Hz, *H<sub>Ar</sub>*), 7.39-7.31 (m, 4H, *Ar*), 5.72 (d, 1H, J= 8.8 Hz, *NH*), 5.31, (bs, 1H, *NH*), 4.45-4.40 (m, 2H, *CH<sub>2</sub>-NHBoc*), 4.38-4.30 (m, 2H, *CH<sub>2</sub>-Fmoc*), 4.21 (t, 1H, J= 6.8 Hz, *CH-Fmoc*), 3.46-3.40 (dd, 1H, J= 8.4 Hz, J= 14.8 Hz, *NH-CH-COOH*), 1.47 (s, 9H, *tBu*), 0.97 (s, 3H, *CH<sub>3</sub>*), 0.92 (s, 3H, *CH<sub>3</sub>*).

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  172.3, 158.4, 156.4, 143.8, 143.7, 141.4, 127.8, 127.1, 125.1, 120.1, 81.6, 67.2, 58.2, 53.5, 48.7, 47.2, 39.6, 28.3, 22.5, 21.7.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.6^\circ$  (c=0.1 g/100 ml, Cloroformio)

**HPLC analitico  $t_{\text{R}}$ :** 15.30 min.

Caratteristiche del composto (**28**) ottenuto con la D-Pro:

**MS (ESI):**  $[\text{MH}]^+ = 469$ .

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  7.76 (d, 2H,  $J = 7.6$  Hz,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.58 (d, 2H,  $J = 7.6$  Hz,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.39-7.31 (m, 4H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 5.72 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, NH), 5.31, (bs, 1H, NH), 4.45-4.40 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NHBoc}$ ), 4.38-4.30 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 4.21 (t, 1H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH-Fmoc}$ ), 3.46-3.40 (dd, 1H,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 14.8$  Hz,  $\text{NH-CH}\alpha\text{-COOH}$ ), 1.47 (s, 9H,  $t\text{Bu}$ ), 0.97 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.92 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

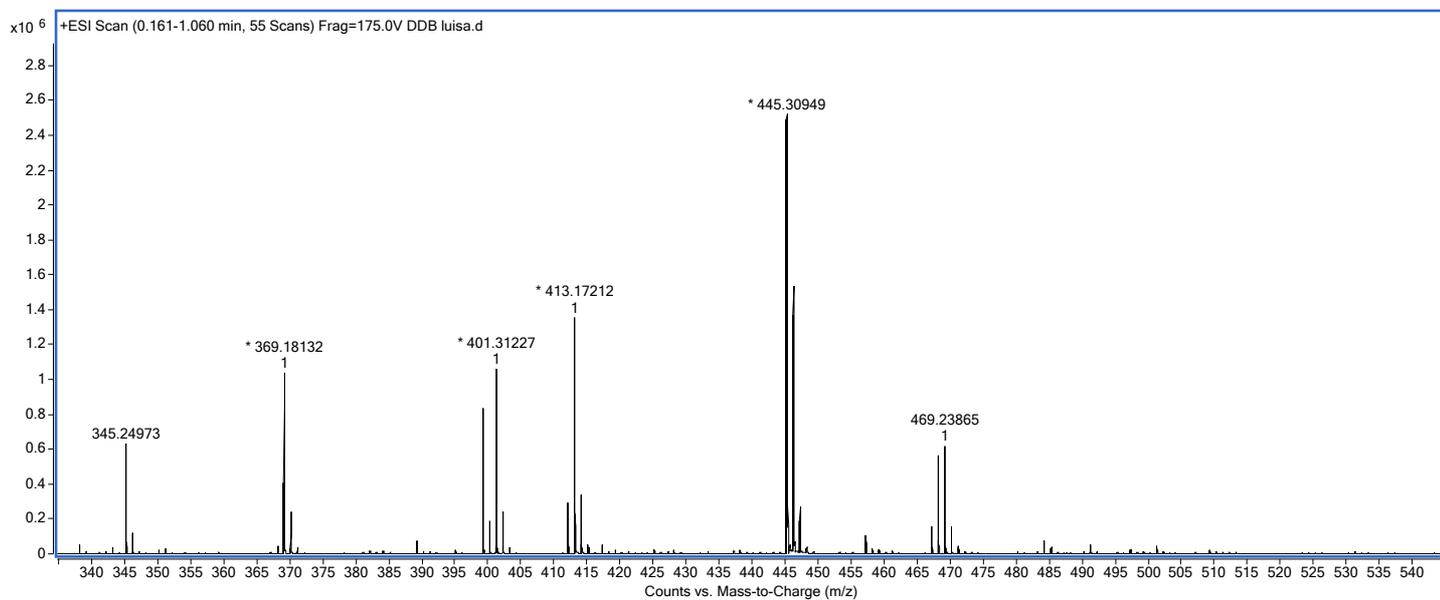
**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  172.3, 158.4, 156.4, 143.8, 143.7, 141.4, 127.8, 127.1, 125.1, 120.1, 81.6, 67.2, 58.2, 53.5, 48.7, 47.2, 39.6, 28.3, 22.5, 21.7.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4.6^\circ$  (c=0.1 g/100 ml, Cloroformio)

**HPLC analitico  $t_{\text{R}}$ :** 16.87 min (colonna Knauer 250x4.6 mm; 3  $\mu\text{m}$ ; gradiente lineare da 0 al 100 % di  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 25 min.).

**Massa esatta** (strumento utilizzato: Agilent accurate mass ESI-Q-TOF 6520)

MW calcolato= 468.22604    MW trovato= 469.23865

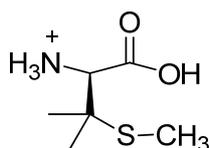


## Metodo generale di sintesi di H-D-Pen(S-alcile)-OH (39) (Schema 19).

In un pallone fiammato in atmosfera di Argon, in etanolo assoluto (20 mL) è addizionato sotto agitazione Na metallico (10.05 mmol; 231 mg) in piccole quantità ad intervalli di 5 min.. Quando tutto il Na<sup>0</sup> si è consumato, si aggiunge H-D-Pen-OH (**38**) (3.35 mmol; 0.5 g) e subito dopo l'alogenuro alchilico (ICH<sub>3</sub>; BrCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; BrCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; BrCH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>; BrCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; BrCH<sub>2</sub>(*p*CH<sub>3</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; ClCH<sub>2</sub>(*p*OCH<sub>3</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; BrCH<sub>2</sub>(*p*<sup>t</sup>Bu)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; ClCH<sub>2</sub>(*p*Ph)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) (3.35 mmol) e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 1 ora. La reazione viene controllata su TLC (eluente B1) e per MS (ESI). Alla scomparsa del prodotto iniziale la reazione è stata spenta per aggiunta di HCl 2N sino a pH 2 ed evaporata a secchezza. Il prodotto così ottenuto (**39**) è stato utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione. Con questa procedura otteniamo i corrispondenti cloridrati dei derivati **39**.

## Caratteristiche di H-D-Pen(S-alcile)-OH (39)

### Acido (S)-2-ammino-3-metil-3-(tio-metil)butirrico



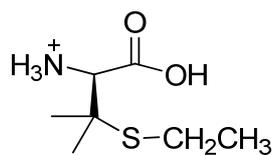
C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>S<sup>+</sup>  
Mol. W.t: 164,24

Resa=100%.

MS (ESI): [MH]<sup>+</sup>= 164.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 8.45 (s, 1H, COOH); 3.60 (bs, 3H, +NH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 1H, H<sub>α</sub>), 2,04 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 1.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>), 1.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>).

**Acido (S)-2-ammino-3-(tio-etil)-3-metilbutirrico**



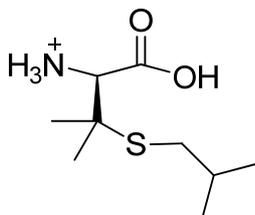
$C_7H_{16}NO_2S^+$   
Mol. Wt.: 178,26

Resa=100%.

MS (ESI):  $[MH]^+ = 178$ .

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.40 (s, 1H, COOH); 3.60 (bs, 3H, +NH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 1H, H $\alpha$ ); 2.36 (q, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>), 1.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>); 1.13 (t, 3H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**Acido (S)-2-ammino-3-(tio-isobutil)-3-metilbutirrico**



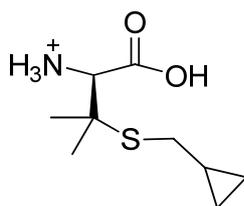
$C_9H_{20}NO_2S^+$   
Mol. Wt.: 206,32

Resa=100%.

MS (ESI):  $[MH]^+ = 206$ .

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.40 (s, 1H, COOH); 3.60 (bs, 3H, +NH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 1H, H $\alpha$ ); 2.33 (d, 2H, SCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.79-1.73 (m, 1H, SCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>), 1.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>); 0.89 (d, 6H, J=8 Hz, SCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**Acido (S)-2-ammino-3-(tio-ciclopropilmetil)-3-metilbutirrico**



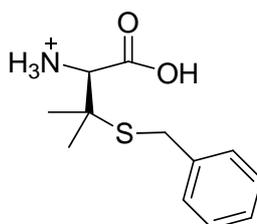
$C_9H_{18}NO_2S^+$   
Mol. Wt.: 204,30

**Resa=98%.**

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 204$ .

**$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):**  $\delta$  8.40 (s, 1H, COOH); 3.60 (bs, 3H,  $+NH_3$ ); 3.80 (s, 1H,  $H\alpha$ ); 2.50-2.40 (m, 2H,  $SCH_2C_3H_5$ ); 1.41 (s, 3H,  $CH_3-Cq-CH_3$ ), 1.30 (s, 3H,  $CH_3-Cq-CH_3$ ); 0.85-0.81 (m, 1H,  $CH_2-CH-(CH_2)_2$ ); 0.51-0.44 (m, 2H,  $CH-(CH_2)_2$ ); 0.17-0.16 (m, 2H,  $CH-(CH_2)_2$ ).

**Acido (S)-2-ammino-3-(tio-benzil)-3-metilbutirrico**



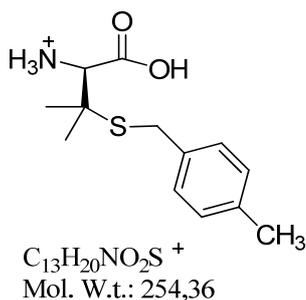
$C_{11}H_{17}NO_2S^+$   
Mol. W.t.: 227,32

**Resa=99%.**

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 227$ .

**$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):**  $\delta$  8.46 (s, 1H, COOH); 7.26 (d, 2H,  $J=16$  Hz,  $H_{ar}$ ); 7.10 (d, 2H,  $J=16$  Hz,  $H_{ar}$ ); 7.08 (s, 1H,  $H_{ar}$ ); 3.60 (bs, 3H,  $+NH_3$ ); 3.70 (s, 1H,  $H\alpha$ ); 3.61-3.50 (m, 2H,  $S-CH_2-Bn$ ); 1.41 (s, 3H,  $CH_3-Cq-CH_3$ ), 1.30 (s, 3H,  $CH_3-Cq-CH_3$ ).

**Acido (S)-2-ammino-3-metil-3-(tio-4-metilbenzil)butirrico**

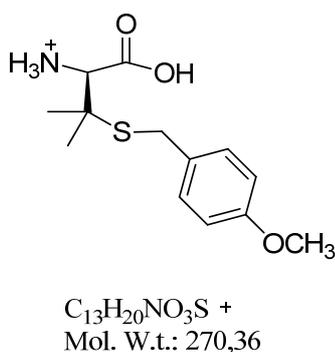


**Resa=100%.**

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 254$ .

**$^1H$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):**  $\delta$  7.28 (d, 2H, J=4 Hz,  $H_{ar}$ ); 7.13 (d, 2H, J=4 Hz,  $H_{ar}$ ); 3.91 (s, 1H,  $H_{\alpha}$ ); 3.89-3.80 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>-Bn); 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Bn); 1.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>), 1.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>).

**Acido (S)-2-ammino-3-(tio-4-metossibenzil)-3-metilbutirrico**



**Resa=100%.**

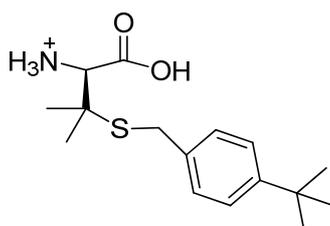
**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 270$ .

**$^1H$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):**  $\delta$  8.40 (bs, 1H, COOH); 7.32 (d, 2H, J=8 Hz,  $H_{ar}$ ); 6.83 (d, 2H, J=8 Hz,  $H_{ar}$ ); 3.93 (s, 1H,  $H_{\alpha}$ ); 3.91-3.80 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>-Bn); 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>Bn); 3.60 (bs, 3H, +NH<sub>3</sub>); 1.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>), 1.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  168.7; 158.2; 130.3 (2C); 128.6; 113.8 (2C); 59.0; 55.1; 45.9; 31.5; 26.6; 24.6.

HPLC analitico  $t_R$ : 14.15 min.

**Acido (S)-2-ammino-3-(tio-4-tert-butilbenzil)-3-metilbutirrico**



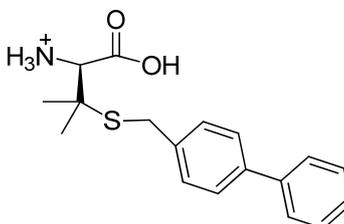
$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_2\text{S}^+$   
Mol. W.t.: 296,44759

Resa=97%.

MS (ESI):  $[\text{MH}]^+ = 296$ .

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  7.59-7.40 (dd, 2H,  $H_{ar}$ ); 7.22-7.15 (dd, 2H,  $H_{ar}$ ); 3.96 (s, 1H,  $H_\alpha$ ); 3.83-3.80 (m, 2H, S- $\text{CH}_2$ -Bn); 3.78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3\text{Bn}$ ); 1.63 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Cq-CH}_3$ ), 1.40 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Cq-CH}_3$ ); 1.02 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ).

**Acido (S)-2-ammino-3-(tio-4-bifenil-metil)-3-metilbutirrico**



$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_2\text{S}^+$   
Mol. W.t.:316,44

Resa=100%.

MS (ESI):  $[\text{MH}]^+ = 316$ .

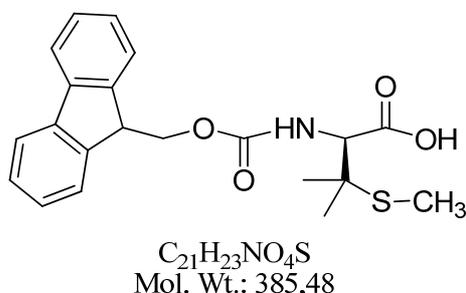
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  7.60-7.33 (m, 9H,  $H_{ar}$ ); 3.99 (s, 1H,  $H_\alpha$ ); 3.97 (s, 2H, S- $\text{CH}_2$ -Bzl); 3.60 (bs, 3H,  $+\text{NH}_3$ ); 1.66 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Cq-CH}_3$ ), 1.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Cq-CH}_3$ ).

## Metodo generale di sintesi di Fmoc-D-Pen(S-alcile)-OH (40) (Schema 19)

Al derivato della D-Penicillamina alchilata sullo zolfo (**39**) (1 mmol) sciolto in H<sub>2</sub>O/diossano 1:1 (30 mL) è aggiunto Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 mmol, 318 mg), controllando il pH della miscela che deve esser basico. La reazione, posta a 0°C, è addizionata sotto agitazione di Fmoc-Cl (0.95 mmol, 245.7 mg) sciolto in diossano (5 mL). Si lascia in agitazione a temperatura ambiente ricontrrollando che il pH si mantenga all'incirca 9 (eventualmente si aggiunge Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) per 2 ore. La reazione viene controllata su TLC (eluente B1 e B3) e per MS (ESI). Quando la reazione è giunta a completezza, si aggiungono altri 50 mL di H<sub>2</sub>O, 30 mL di HCl 1N e si estrae con AcOEt (3x30 mL). La fase organica è lavata con brine (3x15 mL) e evaporata a secchezza. Tutti gli amminoacidi ottenuti sono stati purificati su colonna di gel di silice Merck 60-200 mesh utilizzando come miscela eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (9:1).

### Caratteristiche di Fmoc-D-Pen(S-R)-OH (40)

#### Acido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonilammino)-3-metil-3-(tio-metil)butirrico



Resa=24.3%.

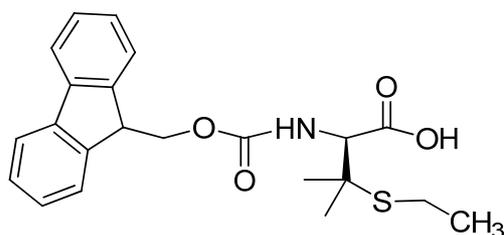
MS (ESI):  $[MH]^+ = 386$ .

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  7.76 (d, 2H, J=7 Hz, *H<sub>ar</sub>Fmoc*); 7.59 (d, 2H, J=7.2 Hz, *H<sub>ar</sub>Fmoc*); 7.43-7.31 (m, 4H, *H<sub>ar</sub>Fmoc*); 5.68 (d, 1H, J=8.2 Hz, NH); 4.43-4.42 (m, 3H, CH-CH<sub>2</sub>-O e NH-CH-COOH); 4.24 (t, 1H, J=7.8, CH-CH<sub>2</sub>-O); 2.07 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 1.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>); 1.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  174.1; 156.3; 143.7; 141.4; 127.8; 127.2; 125.1; 120.1; 67.4; 60.4; 47.2; 46.8; 26.2; 25.1.

HPLC analitico  $t_R$ : 10.75 min.

**Acido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonilammino)-3-(tioetil)-3-metilbutirrico**



$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{S}$   
Mol. Wt.: 399,5

Resa=25.3%.

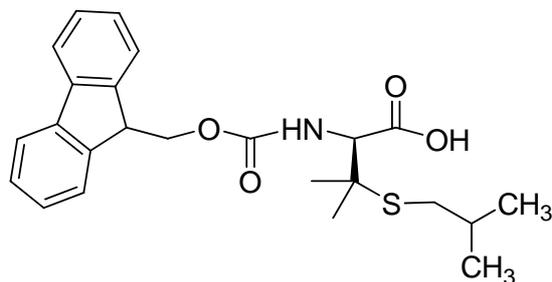
MS (ESI)  $[\text{MH}]^+ = 400$ .

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.75 (d, 2H,  $J=7.2$  Hz,  $H_{ar}Fmoc$ ); 7.59 (d, 2H,  $J=7.2$  Hz,  $H_{ar}Fmoc$ ); 7.42-7.29 (m, 4H,  $H_{ar}Fmoc$ ); 5.78 (d, 1H,  $J=8.2$  Hz, NH); 4.45-4.32 (m, 3H, CH- $\text{CH}_2$ -O e NH- $\text{CH}\alpha$ -COOH); 4.22 (t, 1H,  $J=6$  Hz, CH- $\text{CH}_2$ -O); 2.61-2.56 (m, 2H, S- $\text{CH}_2$ ); 1.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -Cq- $\text{CH}_3$ ); 1.39 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -Cq- $\text{CH}_3$ ); 1.18 (t, 3H,  $J=6.6$  Hz, S- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  174.3; 156.2; 143.6; 141.3; 127.7; 127.1; 125.09; 120.0; 67.3; 60.7; 47.1; 46.9; 36.8; 25.7; 22.2.

HPLC analitico  $t_R$ : 11.35 min.

**Acido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonilammino)-3-(tio-isobutil)-3-metil-butirrico**



C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>S  
Mol. Wt.: 427,56

Resa=22.7%.

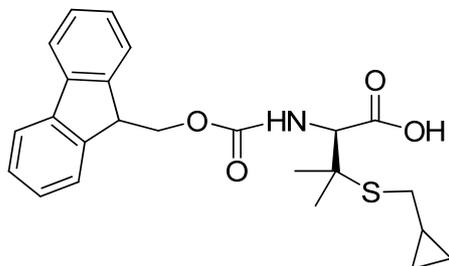
MS (ESI) [MH]<sup>+</sup> = 428.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, J=7.6 Hz, *H<sub>ar</sub>Fmoc*); 7.59 (d, 2H, J=6.8 Hz, *H<sub>ar</sub>Fmoc*); 7.39-7.30 (m, 4H, *H<sub>ar</sub>Fmoc*); 5.71 (d, 1H, J=8.4 Hz, NH); 4.43-4.36 (m, 3H, CH-CH<sub>2</sub>-O e NH-CH<sub>α</sub>-COOH); 4.24 (t, 1H, J=7.2 Hz, CH-CH<sub>2</sub>-O); 2.48-2.43 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 1.80-1.74 (m, 1H, S-CH<sub>2</sub>-CH); 1.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>); 1.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>); 0.98 (d, 6H, J=6.4 Hz, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 174.4; 156.3; 143.7; 141.3; 127.8; 127.1; 125.1; 120.0; 67.4; 60.8; 47.2; 46.7; 36.9; 28.7; 25.8; 22.3.

HPLC analitico t<sub>R</sub>: 11.46 min.

**Acido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonilammino)-3-(tio-ciclopropilmetil)-3-metilbutirrico**



$C_{24}H_{27}NO_4S$   
Mol. Wt.: 425,54

Resa=18.0% .

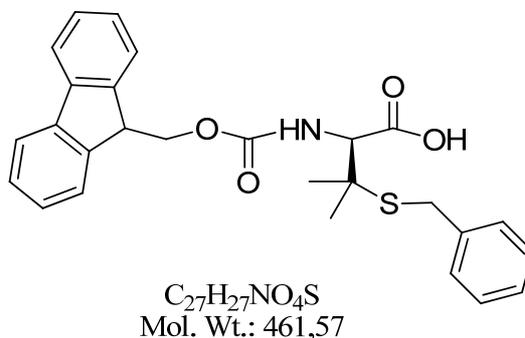
MS (ESI)  $[MH]^+ = 426$ .

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.76 (d, 2H,  $J=7.4$  Hz,  $H_{ar}Fmoc$ ); 7.59 (d, 2H,  $J=6.8$  Hz,  $H_{ar}Fmoc$ ); 7.43-7.26 (m, 4H,  $H_{ar}Fmoc$ ); 5.72 (d, 1H,  $J=8.4$  Hz, NH); 4.49-4.38 (m, 3H, CH- $CH_2$ -O e NH- $CH\alpha$ -COOH); 4.23 (t, 1H,  $J=6$  Hz, CH- $CH_2$ -O); 2.54-2.47 (m, 2H, S- $CH_2$ -CH); 1.42 (s, 3H,  $CH_3$ -Cq- $CH_3$ ); 1.38 (s, 3H,  $CH_3$ -Cq- $CH_3$ ); 0.95-0.91 (m, 1H,  $CH_2$ -CH-( $CH_2$ ) $_2$ ); 0.61-0.54 (m, 2H, CH-( $CH_2$ ) $_2$ ); 0.27-0.19 (m, 2H, CH-( $CH_2$ ) $_2$ ).

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  173.7; 156.3; 143.7; 141.3; 127.8; 127.1; 125.1; 120.0; 67.3; 60.9; 47.2; 46.7; 34.2, 26.7; 25.9; 10.4; 5.8.

HPLC analitico  $t_R$ : 11.64 min.

**Acido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonilammino)-3-(tiobenzil)-3-metilbutirrico**



**Resa=15.4%.**

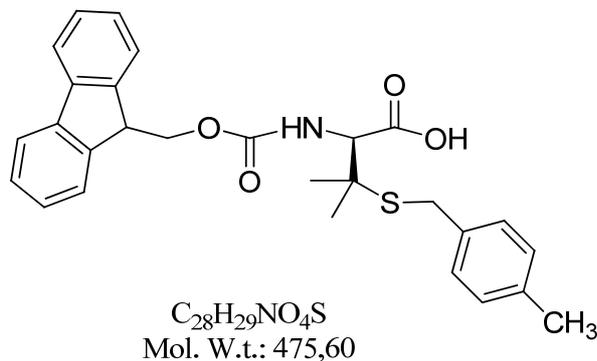
**MS (ESI)  $[MH]^+$  = 462.**

**$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  7.75 (d, 2H, J=6 Hz,  $H_{ar}$ ); 7.59 (d, 2H, J=6.8 Hz,  $H_{ar}$ ); 7.39-7.20 (m, 9H,  $H_{ar}Fmoc$  e  $H_{Ar}$ ); 5.72 (d, 1H, J=8.4 Hz, NH); 4.48-4.38 (m, 3H, CH-CH<sub>2</sub>-O e NH-CH $\alpha$ -COOH); 4.23 (t, 1H, J=6.4 Hz, CH-CH<sub>2</sub>-O); 3.81-3.78 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>-Bn); 1.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>); 1.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>).

**$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  173.2; 156.3; 143.7; 141.3; 137.0; 129.1; 128.6; 127.8; 127.1; 125.1; 120.0; 67.3; 60.8; 47.2; 46.7; 33.3; 25.7.

**HPLC analitico  $t_R$ : 11.87 min.**

**Acido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonilammino)-3-metil-3-(tio-4-metilbenzil)butirrico**



**Resa=49.5%.**

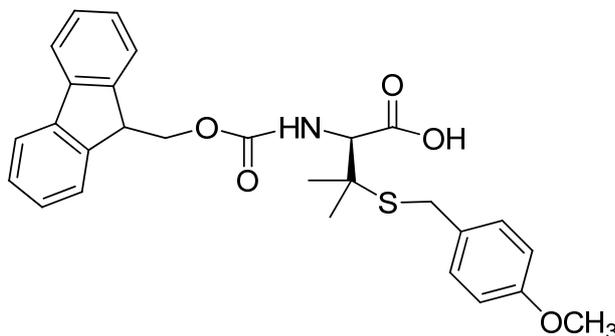
**MS (ESI)  $[MH]^+ = 476$ .**

**$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  7.75 (d, 2H,  $J=6$  Hz,  $H_{ar}$ ); 7.60 (d, 2H,  $J=6$  Hz,  $H_{ar}$ ); 7.42-7.10 (m, 8H,  $H_{ar}$  Fmoc); 5.72 (d, 1H,  $J=8$  Hz, NH); 4.50-4.39 (m, 3H, CH- $CH_2$ -O e NH-CH-COOH); 4.23 (t, 1H,  $J=6.4$  Hz, CH- $CH_2$ -O); 3.81-3.79 (m, 2H, S- $CH_2$ -Bn); 2.09 (s, 3H,  $pCH_3$ Bn); 1.47 (s, 3H,  $CH_3$ -Cq- $CH_3$ ); 1.42 (s, 3H,  $CH_3$ -Cq- $CH_3$ ).

**$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  174.3; 156.2; 143.7; 143.6; 141.3; 136.9; 133.7; 129 (2C); 128.9 (2C); 127 (2C); 126.7(2C); 125; 119; 67.3; 60.8; 47.8; 47.1; 32.9; 26.8; 25.7; 21.1.

**HPLC analitico  $t_R$ :** 23.99 min (Colonna Luna  $C_{18}$  100 x 4.6 mm, 5  $\mu m$ ; gradiente lineare da 0 al 100 % di  $CH_3CN$  in 25 minuti).

**Acido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonilammino)-3-(tio-4-metossibenzil)-3-metilbutirrico**



C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>S  
Mol. W.t.: 491,60

Resa=50.8%.

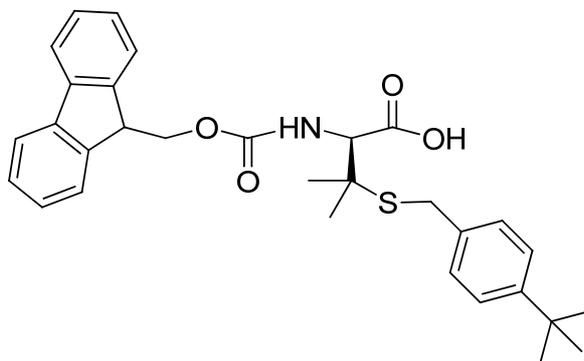
MS (ESI) [MH]<sup>+</sup> = 492.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.75 (d, 2H, J=6 Hz, H<sub>ar</sub>); 7.60 (d, 2H, J=6 Hz, H<sub>ar</sub>); 7.42-7.10 (m, 6H, H<sub>ar</sub> Fmoc); 6.80 (d, 2H, H<sub>ar</sub> Fmoc); 5.72 (d, 1H, J=8 Hz, NH); 4.50-4.37 (m, 3H, CH-CH<sub>2</sub>-O e NH-CH<sub>α</sub>-COOH); 4.22 (t, 1H, J=6.4 Hz, CH-CH<sub>2</sub>-O); 3.79-3.70 (m, 5H, S-CH<sub>2</sub>-Bn e pOCH<sub>3</sub>Bn); 1.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>); 1.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 158.6; 156.4; 147.3; 143.6; 141.2; 130.1 (4C); 128.8 (2C); 127.6 (2C); 127 (2C); 125.1; 120.7; 119.9; 113.9; 110.0; 67.3; 61.3; 55.1; 47.9; 47.0; 32.5; 26.9; 25.4.

HPLC analitico t<sub>R</sub>: 22.80 min (Colonna Luna C<sub>18</sub> 100 x 4.6 mm, 5 μm; gradiente lineare da 0 al 100 % di CH<sub>3</sub>CN in 25 minuti).

**Acido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonilammino)-3-(tio-4-tert-butilbenzil)-3-metilbutirrico**



C<sub>31</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub>S  
Mol. W.t.: 517,68

**Resa=66.3%.**

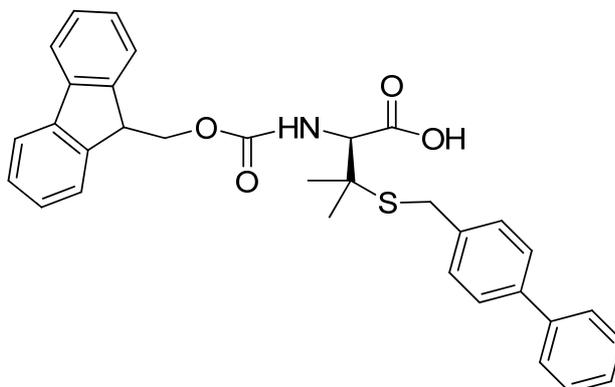
**MS (ESI) [MH]<sup>+</sup> = 518.**

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 7.77 (d, 2H, J=6 Hz, *H<sub>ar</sub>*); 7.60 (d, 2H, J=6 Hz, *H<sub>ar</sub>*); 7.42-7.10 (m, 8H, *H<sub>ar</sub>* *Fmoc*); 5.76 (d, 1H, J=7 Hz, NH); 4.45-4.38 (m, 3H, CH-CH<sub>2</sub>-O e NH-CH-COOH); 4.23 (t, 1H, J=16 Hz, CH-CH<sub>2</sub>-O); 3.80-3.74 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>-Bn); 1.44 (d, 6H, J=8.4 Hz, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>); 1.26 (s, 9H, *p*<sup>t</sup>BuBn).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 174.5; 150.2; 143.7; 141.3; 133.6; 128.8(4C); 127.8 (4C); 127.2 (2C); 125.6 (2C); 125.1; 120.0; 67.4; 61.0; 47.9; 47.2; 34.5; 32.8; 31.3; 26.9; 25.7; 20.6.

**HPLC analitico t<sub>R</sub>:** 25.58 min (Colonna Luna C<sub>18</sub> 100 x 4.6 mm, 5 μm; gradiente lineare da 0 al 100 % di CH<sub>3</sub>CN in 25 minuti).

**Acido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonilammino)-3-(tio-4-bifenilmetil)-3-metilbutirrico**



C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub>S  
Mol. W.t.: 537,67

**Resa=70%.**

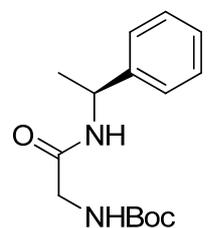
**MS (ESI) [MH]<sup>+</sup> = 538.**

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 7.72-7.25 (m, 17H, J=6 Hz, *H<sub>ar</sub>* e *H<sub>ar</sub>* Fmoc); 5.95 (d, 1H, J=8 Hz, NH); 4.45-4.38 (m, 3H, CH-CH<sub>2</sub>-O e NH-CH-COOH); 4.20 (t, 1H, J=16 Hz, CH-CH<sub>2</sub>-O); 3.80-3.74 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>-Bn); 1.47 (d, 6H, J=16 Hz, CH<sub>3</sub>-Cq-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 174.5; 156.5; 143.8; 143.6; 141.2; 140.6; 139.9; 136.1; 129.5 (3C); 128.7(2C); 127.7 (4C); 127.2 (2C); 127.1 (2C); 127.0 (2C); 125.1 (2C); 120.0; 67.4; 61.4; 48.2; 47.0; 32.8; 27.1; 25.4.

**HPLC analitico t<sub>R</sub>:** 25.03 min (Colonna Luna C<sub>18</sub> 100 x 4.6 mm, 5 μm; gradiente lineare da 0 al 100 % di CH<sub>3</sub>CN in 25 minuti).

Preparazione di: estere tertbutilico dell'acido-[(1-fenil-etilcarbamoil)-metil]-carbammico (42)



$C_{15}H_{22}N_2O_3$   
Mol. W.t.: 278,35

In un pallone si scioglie Boc-Gly-OH (5 g, 28.5 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (50 mL) e successivamente si aggiungono WSC (3.64 g, 19 mmol) and (S)-feniletilammina (3.45 g, 28.5 mmol). La reazione è lasciata sotto agitazione magnetica per 24 ore e viene monitorata tramite TLC (AcOEt/EtPt 2:1). Quando la reazione è giunta a completezza, si effettuano dei lavaggi con acido citrico 10% (20 mL), 5%  $NaHCO_3$  (20 mL), e brine (20 mL). La fase organica è anidrificata e portata a secchezza; il grezzo di reazione ottenuto è poi purificato tramite cromatografia flash con eluente AcOEt/EtPt 2:1 a dare l'intermedio **42** (resa=60%).

Caratteristiche del composto (**42**):

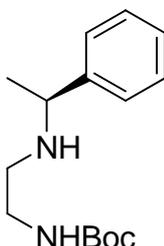
**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 279$ .

**$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  7.31-7.24 (m, 5H,  $H_{Ar}$ ); 6.62 (bs, 1H, NH-CO); 5.31 (bs, 1H, NH-Boc); 5.11 (m, 1H, CH-CH<sub>3</sub>); 3.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH-Boc); 1.47 (d, 3H, J=6.8 Hz, CH<sub>3</sub> CHAr); 1.42 (s, 9H, *t*Bu).

**$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):**  $\delta$  168.6, 156.2, 143.0, 128.7, 127.4, 126.1, 80.2, 48.7, 44.6, 28.3, 21.9.

$[\alpha]_D^{20} = -41^\circ$  (c = 0.121 g/100 mL, Cloroformio).

Preparazione di: estere tertbutilico dell'acido[2-(1-fenil-etilammino)-etil]-carbammico  
(43)



$C_{15}H_{24}N_2O_2$   
Mol. W.t.:264,36

Sotto agitazione magnetica a 0°C ad una sospensione di  $LiAlH_4$  (0.85 g, 22.38 mmol) in THF anidro è aggiunta goccia a goccia una soluzione di **42** (3.11 g, 11.19 mmol). Si lascia reagire per 24 ore. La reazione è monitorata tramite TLC (AcOEt/EtPt 3:1). L'eccesso di idruro è quenciato con acqua e i sali vengono filtrati su gooch con uno starto di celite sotto vuoto. Si evapora il solvente e si ottiene il composto **43** pronto per esser utilizzato tal quale nella reazione successiva (resa=90%).

Caratteristiche del composto (**43**):

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 265$ .

**$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  7.32-7.27 (m, 5H,  $H_{Ar}$ ); 4.96 (bs, 1H,  $NHBoc$ ); 3.75 (q, 1H,  $CH_3-CH-Ar$ ,  $J=6.6$  Hz); 3.16-3.13 (m, 2H,  $NH-CH_2-CH_2$ ); 2.59-2.51 (m, 2H,  $NH-CH_2-CH_2$ ); 1.75 (bs, 1H,  $NH$ ); 1.42 (s, 9H,  $tBu$ ); 1.34 (d, 3H,  $CH_3-CH-Ar$ ,  $J=6.6$  Hz).

$[\alpha]_D^{20} = -29^\circ$  (c = 0.11 g/100 mL, Cloroformio).

Preparazione di: estere tertbutilico dell'acido{2-[ (2-Cloro-acetil)-(1-fenilettil)-ammino]-etil}-carbammico (44)



$C_{17}H_{25}ClN_2O_3$   
Mol.W.t.: 340,84

In un pallone ad una soluzione di **43** (1.94 g, 7.34 mmol) in AcOEt (50 mL) at 0°C, è aggiunta una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> (5 mL). Dopo 10 min, è aggiunto goccia a goccia il cloroacetilcloruro (1.17 mL, 14.68 mmol) e si lascia in agitazione a r.t.. La reazione è monitorata tramite TLC (AcOEt/EtPt 3:1) e dopo 24 ore a r.t. si aggiunge NaHCO<sub>3</sub> (2 mL) alla miscela di reazione. La fase organica viene quindi separata e la fase acquosa è estratta 2 volte con AcOEt (50 mL). Le fasi organiche riunite sono anidrificate e portate a secchezza in vacuo per dare il composto **44** con resa quantitativa.

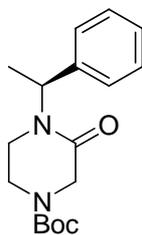
Caratteristiche del composto (**44**):

**MS (ESI):** [MH]<sup>+</sup> = 341.

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 7.22-6.98 (m, 5H, Ar), 5.59-5.43 (q, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-Ar, J=8 Hz), 4.85 (bs, 1H, NH-Boc), 4.10-3.97 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.76 (s, 2H, C=O-CH<sub>2</sub>-Cl), 3.18-3.15 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.32 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-Ar, J=8 Hz), 1.06 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):** δ 170.1, 155.8, 139.4, 128.4, 128.2, 128.0, 80.6, 59.4, 42.8, 41.14, 38.2, 27.4, 19.9.

Preparazione di: estere tertbutilico dell'acido-3-oxo-4-(1-feniletil)-piperazin-1-carbossilico (45)



C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
Mol. W.t.:304,38

Ad una sospensione di NaH al 60% (1.14 g, 28.61 mmol) in THF/DMF 1/1 (20 mL) a 0°C si addiziona il composto **44** (3.25 g, 9.54 mmol) sciolto in THF/DMF 1/1 (10 mL). Dopo 24 ore, si quencia la reazione aggiungendo NH<sub>4</sub>Cl saturo (15 mL) e si evapora in vacuo il solvente. Il residuo così ottenuto è sciolto in AcOEt (50 mL) e si lava la fase organica due volte con acqua (20 mL) e poi si anidri fica e si porta a secchezza in vacuo e il grezzo di reazione è purificato tramite cromatografia flash con eluente AcOEt/EtPt 1:1) per avere il composto **45** ( resa=45%).

Caratteristiche del composto (**45**):

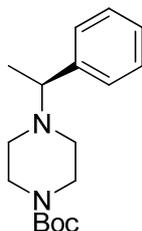
**MS (ESI):** [MH]<sup>+</sup> = 305.

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 7.36-7.28 (m, 5H, *Ar*), 6.08 (q, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-*Ar*, J=8 Hz), 4.23-4.18 (d, 1H, N-CH<sub>e</sub>Ha-C=O, J=20 Hz), 4.10 (d, 1H, N-CH<sub>e</sub>Ha-C=O, J=20 Hz), 3.62 (bs, 1H, CH<sub>2</sub> piperazina), 3.27 (bs, 1H, CH<sub>2</sub> piperazina), 3.19 (bs, 1H, CH<sub>2</sub> piperazina), 2.83 (bs, 1H, CH<sub>2</sub> piperazina), 1.52 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-*Ar*, J=8 Hz), 1.45 (s, 9H, *t*Bu).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):** δ 165.4, 153.7, 139.4, 128.6, 127.6, 127.3, 80.6, 50.0, 47.9, 40.2, 28.3, 15.3.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -116.0° (c=0.318 g/100 mL, Cloroformio).

Preperazione di: estere tertbutilico dell'acido 4-(1-feniletil)-piperazin-carbossilico (46)



C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Mol. W.t.: 290,40

Ad una sospensione di LiAlH<sub>4</sub> (453 mg, 18.9 mmol) in THF anidro (20 mL) a r.t. si aggiunge una soluzione di **45** (1.15 g, 3.78 mmol) in THF (10 mL). Dopo 30 min. la reazione è giunta a completezza come mostrato dalla TLC (AcOEt/EtPt 1:2). Quindi la reazione è quenziata con NaOH 15% (1 mL) e Et<sub>2</sub>O (20 mL). Il precipitato che si forma è filtrato su gooch con celite e il solvente è evaporato. Il grezzo di reazione è purificato con cromatografia flash con eluente AcOEt/EtPt 1:2 a dare il composto **46** (resa=84%).

Caratteristiche del composto (**46**):

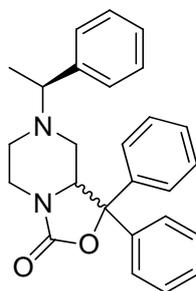
**MS (ESI):** [MH]<sup>+</sup> = 291.

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 7.31-7.25 (m, 5H, *Ar*), 3.41-3.35 (m, 5H, CH<sub>2</sub>-N-Boc, CH-CH<sub>3</sub>), 2.41-2.33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-N), 1.43 (s, 9H, *tBu*), 1.36 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-*Ar*).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):** δ 146.8, 134.1, 128.3, 127.7, 127.1, 85.2, 50.3, 29.7, 28.4, 27.4.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -32° (c=0.0104 g/100 mL, Cloroformio).

Preparazione di: **1,1-difenil-7-(1-fenilettil)-esaidro-ossazolo[3,4-a]pirazin-3-one (47 e 47a).**



$C_{26}H_{26}N_2O_2$   
Mol. W.t.: 398,50

Ad una soluzione di **46** (380 mg, 1.31 mmol) in THF anidro (5 mL) è aggiunta TMEDA (0.53 mL, 3.54 mmol). La reazione viene portata a  $-78^{\circ}\text{C}$  e si aggiunge *sec*-BuLi 1.4 M in esano (2.53 mL, 3.54 mmol). La miscela di reazione è portata a  $-35^{\circ}\text{C}$  e dopo 2 ore è aggiunta gocciolando una soluzione di benzofenone (480 mg, 2.62 mmol) in THF anidro (7 mL). Si nota un cambiamento della miscela di reazione che diventa verde e si lascia sotto agitazione magnetica a r.t. 24 h. La reazione viene monitorata con TLC (AcOEt/EtPt 1:2) e una volta che è giunta a completezza è quenziata con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturo (20 mL). Il solvente viene rimosso per evaporazione in vacuo e la fase acquosa è estratta tre volte con AcOEt (30 mL). Le fasi organiche riunite sono anidificate e portate a secchezza. Il grezzo di reazione che contiene i due dia stereoisomeri è purificata con cromatografia flash con eluente AcOEt/EtPt 1:2 per dare **47** (resa=40%) e **47a** (resa=45%).

Caratteristiche del composto (**47**):

**MS (ESI):**  $[\text{MH}]^+ = 399$ .

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  7.55-7.49 (m, 2H), 7.41-7.21 (m, 11H), 7.19-7.14 (m, 2H), 4.51 (dd, 1H,  $J=10.9, 3.6$  Hz), 3.74 (ddd, 1H,  $J=13.2, 3.5, 1.3$  Hz), 3.34 (q, 1H,  $J=6.7$  Hz), 3.04 (ddd, 1H,  $J=13.0, 12.1, 3.6$  Hz), 2.70-2.61 (m, 2H), 1.86 (td, 1H,  $J=11.9, 3.6$  Hz), 1.50-1.41 (m, 1H), 1.22 (d, 3H,  $J=6.7$  Hz).

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):**  $\delta$  156.1, 142.8, 142.5, 138.9, 128.6, 128.5, 128.5, 128.3, 128.0, 127.5, 127.3, 126.1, 125.9, 85.5, 64.5, 61.5, 52.6, 49.3, 42.0, 19.3.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +216^{\circ}$  (c=0.108 g/100 mL, Cloroformio).

Caratteristiche del composto (**47a**):

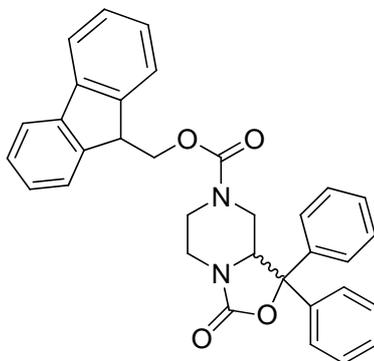
**MS (ESI):**  $[\text{MH}]^+ = 399$ .

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  7.50-7.45 (m, 2H), 7.39-7.20 (m, 11H), 7.18-7.14 (m, 2H), 4.44 (dd, 1H,  $J = 3.56, 10.93$  Hz), 3.86-3.79 (m, 1H), 3.48 (q, 1H,  $J = 6.8$  Hz), 3.11 (ddd, 1H,  $J = 13.0, 12.0, 3.81$  Hz), 2.80-2.73 (m, 1H), 2.44 (ddd, 1H,  $J = 11.5, 3.5, 1.6$  Hz), 2.07-1.97 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.27 (d, 3H,  $J = 6.8$  Hz).

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):**  $\delta$  156.2, 142.4, 142.2, 138.8, 128.6, 128.5, 128.3, 127.9, 127.5, 127.2, 126.1, 125.9, 125.8, 85.3, 63.8, 61.6, 53.2, 47.5, 42.1, 17.1.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -132^\circ$  ( $c=0.11$  g/100 mL, Cloroformio).

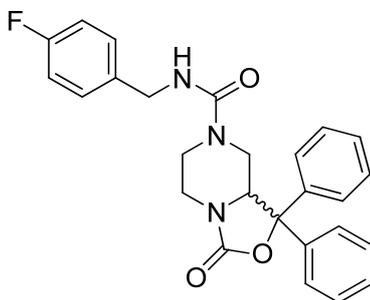
Preparazione di: estere 9H-fluorenilmetil dell'acido 3-oxo-1,1-difenil-tetraidro-ossazolo[3,4-a]pirazin-7-carbossilico (48 e 48a)



$C_{33}H_{28}N_2O_4$   
Mol. W.t.: 516,59

Alla soluzione di **47** e **47a** (200 mg, 0.52 mmol) in acetonitrile (10 mL) messa a riflusso si aggiunge Fmoc-Cl (148 mg, 0.57 mmol) sciolto in acetonitrile (7 mL). La reazione, monitorata con TLC (AcOEt/EtPt 1:2), va a completezza in 12 h. Il precipitato che è il composto desiderato (**48** e **48a**) è ottenuto per filtrazione (resa=67%) e viene usato tale quale nella reazione successiva.

Preparazione di: **4-fluoro-benzilammide dell'acido 3-oxo-1,1-difenil-tetraidrossazolo[3,4-a]pirazin-7-carbossilico (49 e 49a)**



$C_{26}H_{24}FN_3O_3$   
Mol. W.t.: 445,49

Alla soluzione di **48/48a** (59 mg, 0.11 mmol) sciolto in THF anidro (15 mL) si aggiungono p-fluoro-benzilisocianato (34.4 mg, 0.228 mmol) eDBU (19.2 mg, 0.126 mmol). La reazione viene monitorata tramite TLC (AcOEt/EtPt 1:2) e MS (ESI). dopo 24 h, la reazione viene trattata come per **47** e **47a**. la fase organica è portata a secchezza a dare **49** e con resa del 83% e **49a** con resa del 76% dopo cromatografia flash (eluente AcOEt/EtPt 1/1).

Caratteristiche del composto (**49a**):

**MS (ESI):**  $[MH]^+ = 455.9$ .

**$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  7.51-7.47 (m, 2H), 7.41-7.18 (m, 10H), 7.03-6.94 (m, 2H), 4.95 (t, 1H, J=5.5 Hz), 4.45-4.27 (m, 3H), 4.03 (ddd, 1H, J=13.5, 3.5, 1.2 Hz), 3.81 (dd, 1H, J=13.1, 2.7 Hz), 3.69-3.60 (m, 1H), 3.05 (td, 1H, J=12.7, 3.7 Hz), 2.93-2.82 (m, 1H), 2.14 (dd, 1H, J=13.3, 11.3 Hz).

**$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):**  $\delta$  157.2, 156.1, 141.8, 138.3, 134.9, 129.4, 129.4, 129.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.3, 125.9, 125.8, 115.7, 115.4, 85.9, 60.5, 46.5, 44.4, 43.7, 41.3.

$[\alpha]_D^{20} = +92^\circ$  (c=0.1 g/100 mL, Metanolo).

Caratteristiche del composto (**49**):

**MS (ESI):**  $[\text{MH}]^+ = 455.9$ .

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  7.51-7.47 (m, 2H), 7.41-7.18 (m, 10H), 7.03-6.94 (m, 2H), 4.95 (t, 1H,  $J=5.5$  Hz), 4.45-4.27 (m, 3H), 4.03 (ddd, 1H,  $J=13.5, 3.5, 1.2$  Hz), 3.81 (dd, 1H,  $J=13.1, 2.7$  Hz), 3.69-3.60 (m, 1H), 3.05 (td, 1H,  $J=12.7, 3.7$  Hz), 2.93-2.82 (m, 1H), 2.14 (dd, 1H,  $J = 13.3, 11.3$  Hz).

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):**  $\delta$  157.2, 156.1, 141.8, 138.3, 134.9, 129.4, 129.4, 129.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.3, 125.9, 125.8, 115.7, 115.4, 85.9, 60.5, 46.5, 44.4, 43.7, 41.3.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -91^\circ$  ( $c=0.12$  g/100 mL, Metanolo).

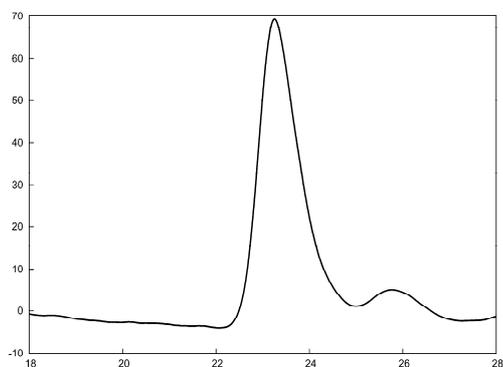
## *Analisi HPLC chirale*

Le analisi HPLC chirali sono state condotte in collaborazione col Dott. A. Cavazzini del Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche.

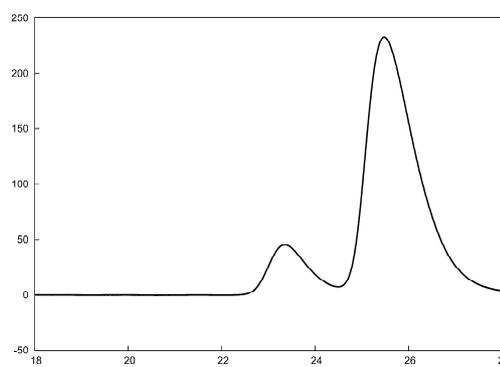
Per le analisi è stato utilizzato un micro HPLC (Agilent 1100 micro series, Agilent Technologies) dotato di micro diode array detector (Agilent). Per tutte le analisi è stata impiegata un colonna 150 mm x 2 mm; 3 µm contenente come fase stazionaria Lux Cellulose-1 (cellulosa tris 3,5-dimetilfenilcarbammato; Phenomenex). La fase mobile è un sistema binario composto da esano/isopropanolo (80/20 v/v); il flusso è di 200 µl/min; il volume iniettato è di 3 µl. Le soluzioni da analizzare prima di esser iniettate sono state filtrate con filtri PFTE (0.45 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Tutti i cromatogrammi sono stati registrati a 230 nm.

### ❖ Analisi cromatografica di **Fmoc-D-Ddb(Boc)-OH** e **Fmoc-L-Ddb(Boc)-OH**

	Tempo di ritenzione (min)		Area (%)
<i>Catalisi D-Pro</i>	1	23.2	90%
	2	25.7	10%
<i>Catalisi L-Pro</i>	1	23.6	80%
	2	25.7	20%



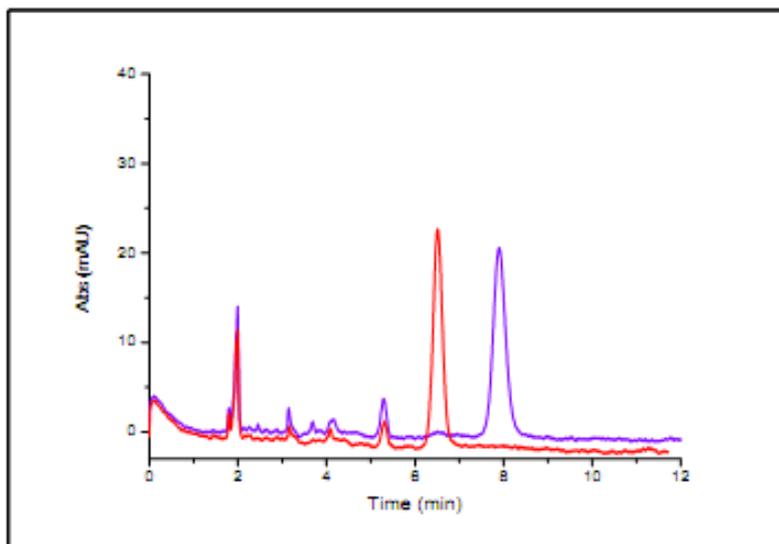
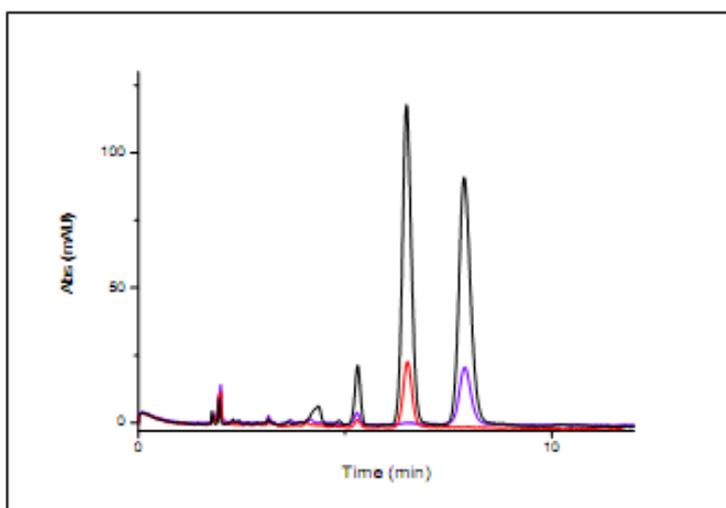
catalisi di D-Pro



catalisi di L-Pro

❖ Analisi cromatografica di (+)-SHA 68 e (-)-SHA 68

	Tempo di ritenzione (min)		Area (%)
<b>(R/S)-SHA 68</b>	1	6.495	51.30%
	2	7.892	48.70%
<b>(R)-SHA 68</b>	1	-----	0%
	2	7.902	100%
<b>(S)-SHA 68</b>	1	6.513	100%
	2	-----	0%

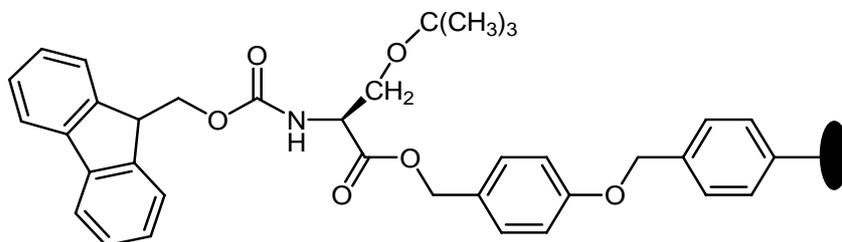


## *Sintesi peptidica in fase solida*

Il Neuropeptide S e gli analoghi sono stati sintetizzati in fase solida secondo la chimica Fmoc/<sup>t</sup>Bu<sup>50</sup>, utilizzando un sintetizzatore automatico Syro XP.

Questa metodica sintetica prevede la sintesi del peptide a partire dal residuo C-terminale ancorato ad un supporto solido, attraverso successive reazioni di deprotezione dell' $\alpha$ -ammino gruppo dell'amminoacido legato alla catena peptidica, seguite da acilazione dell'ammino gruppo neoformato con la componente carbossilica, opportunamente attivata, dell'amminoacido che segue.

Per gli analoghi peptidici è stata utilizzata una resina di Wang, (un supporto solido di stirene-divinilbenzene funzionalizzato con un linker di tipo p-benzilossibenzilalcolico), esterificata con la serina (Figura 38), amminoacido C-terminale nella sequenza di NPS, protetta sul gruppo amminico con il gruppo protettore Fmoc e sul gruppo ossidrilico con <sup>t</sup>Bu<sup>51</sup>. Questo tipo di linker permette la rimozione del peptide dalla resina mediante trattamento con acido trifluoroacetico (TFA) in modo da ottenere l'estremità C-terminale libera.



**Figura 38.** Resina di tipo Wang funzionalizzata con Fmoc-Serina(<sup>t</sup>Bu).

Gli amminoacidi impiegati per la sintesi sono protetti sulla funzione  $\alpha$ -amminica con il gruppo protettore Fmoc che è rimosso, all'inizio di ogni singolo ciclo sintetico, utilizzando una soluzione di piperidina al 40% in DMF.

La funzionalità  $\alpha$ -carbossilica di ogni singolo aminoacido è stata attivata con DIC in presenza di HOBt. La stechiometria della reazione prevede un eccesso molare del

<sup>50</sup> Benoiton, N. L. Chemistry of peptide Synthesis Taylor&Francis, London **2005**, 125-154.

<sup>51</sup> Wang, S.S., p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzylolhydroxycarbonylhydrazide Resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *JACS*, **1973**, 95, 1328- 1333.

componente acilante di tre volte rispetto alla componente amminica legata alla resina e tempi di reazione di 1h.

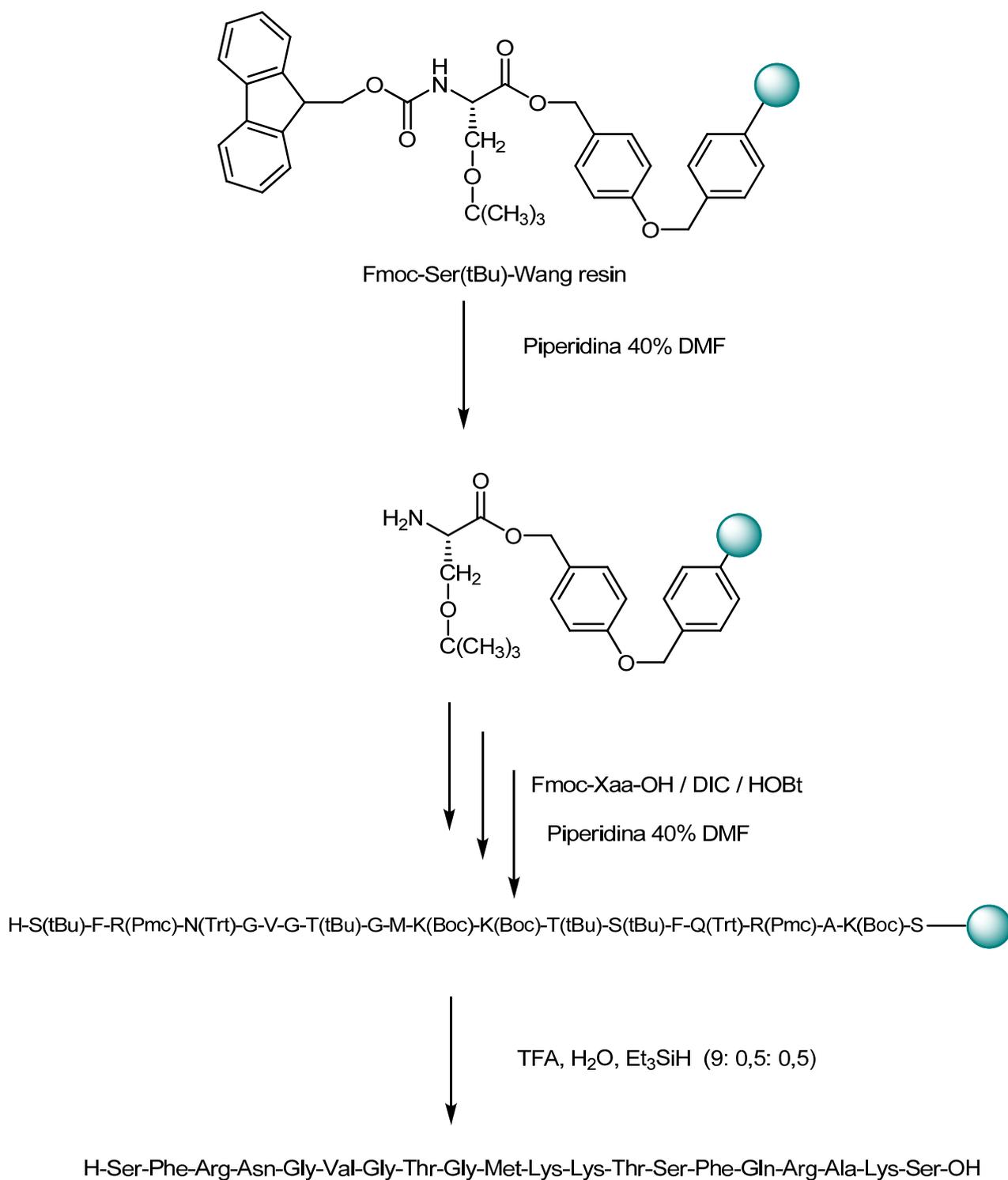
Le catene laterali degli amminoacidi sono state protette, quando necessario, con gruppi protettori acido labili come Boc per Lys, Trp e amminoacidi non naturali come Orn, Dab, Dap; Trt per Asn, Gln e Cys; Pmc per Arg; OtBu per Glu e Asp; tBu per Thr, Tyr e Ser.

Gli aminoacidi e gli intermedi non disponibili commercialmente sono stati sintetizzati secondo le procedure riportate precedentemente (si veda *Sintesi dei composti*) e inseriti tramite iniezioni manuali durante la sintesi del peptide.

Al termine del processo di sintesi, il peptide è stato rimosso dalla resina e contemporaneamente privato dei gruppi protettori in catena laterale, mediante trattamento per 1,5 h con una soluzione di TFA, H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>SiH (9:0.5:0.5); la resina residua è stata eliminata per filtrazione e la miscela di solventi evaporata.

Il peptide grezzo è stato cristallizzato con etere etilico e il solido ottenuto purificato mediante HPLC preparativo.

Nello Schema 21 è riportata la sintesi di *h*NPS. Gli altri composti peptidici sono stati sintetizzati in modo analogo.



*Schema 21. Schema di sintesi in fase solida di hNPS.*

## ***Purificazione e controllo analitico***

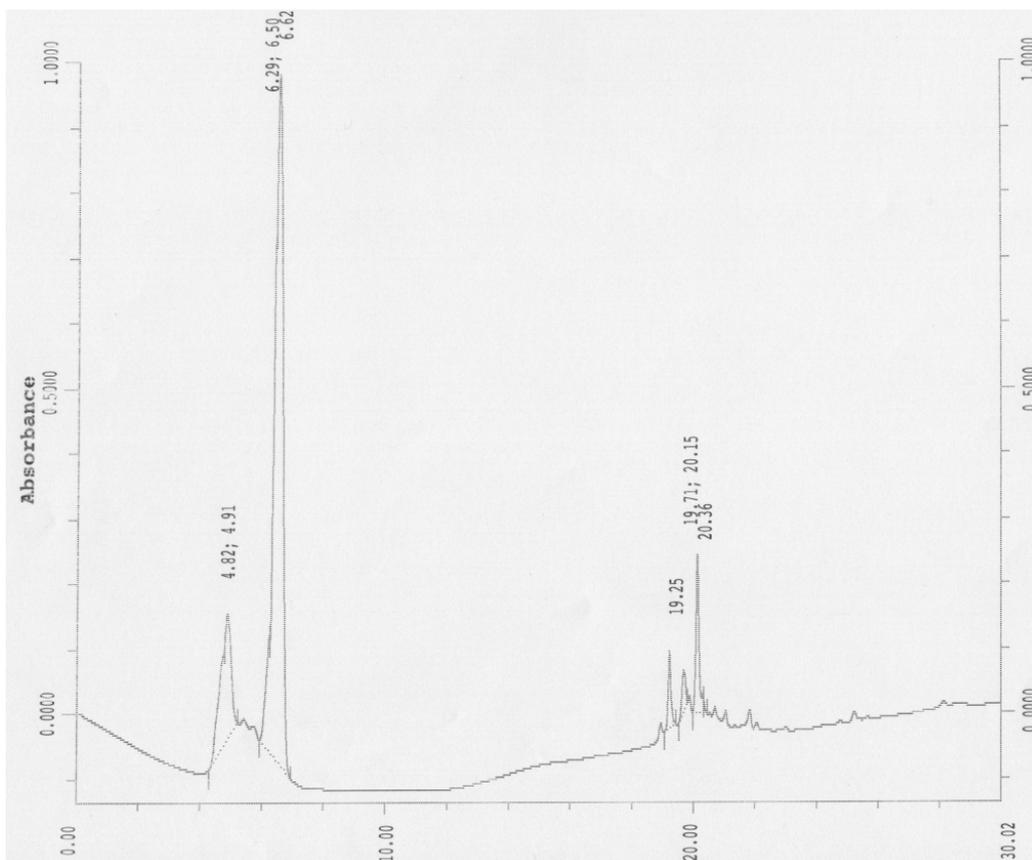
Il controllo analitico dei grezzi di reazione e dei prodotti finali peptidici è stato eseguito mediante HPLC analitico Beckman System Gold 168 utilizzando una colonna Luna C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm, 3 μm, 100 Å) e un rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile fissata a 220 nm. Le analisi sono state condotte con un sistema eluente binario costituito da CH<sub>3</sub>CN e H<sub>2</sub>O entrambi contenenti lo 0.1% v/v di TFA, ad un flusso di 1 ml/min.

Nella Tabella 11 sono riportati i tempi di ritenzione ottenuti utilizzando un gradiente lineare da 0 a 50% di CH<sub>3</sub>CN in 25 minuti ( $t_R$ ).

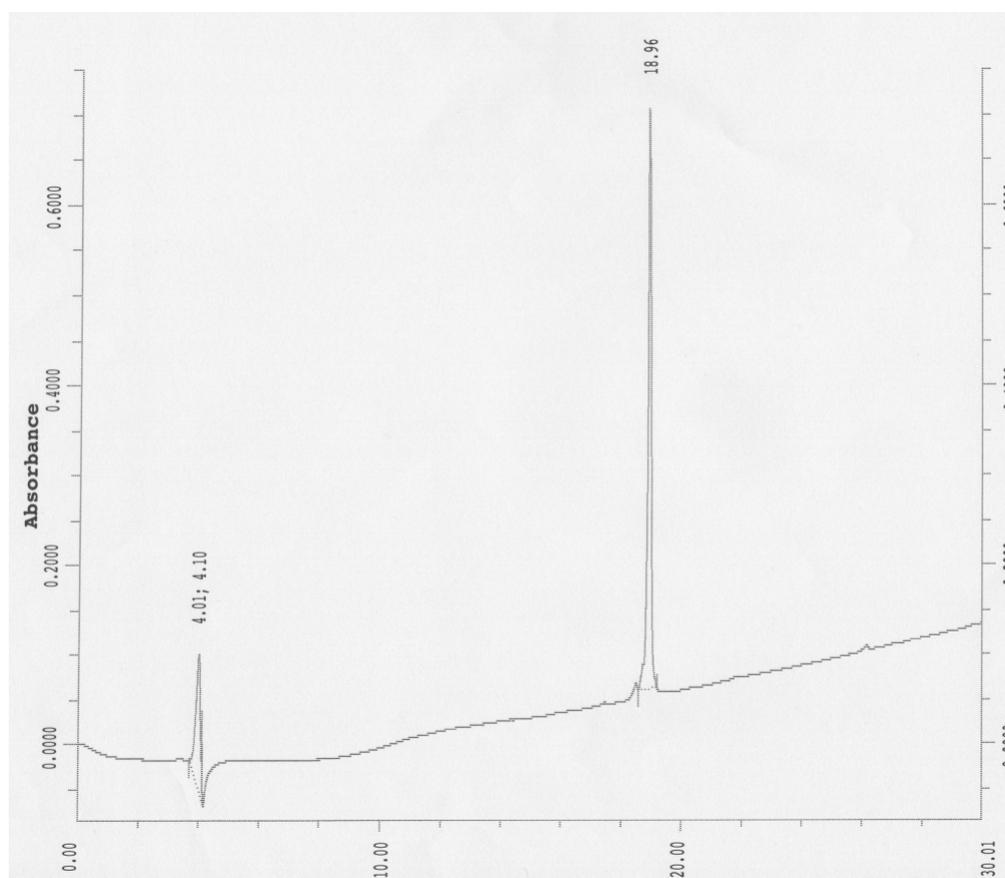
I peptidi grezzi sono stati purificati mediante HPLC preparativo Waters Delta Prep 3000 utilizzando una colonna Jupiter C<sub>18</sub> (250 x 30 mm, 15 μm, 300 Å), utilizzando come fase mobile la stessa fase utilizzata per l'HPLC analitico e con gradienti programmati di volta in volta a seconda del profilo analitico del grezzo di reazione.

Il peso molecolare dei composti è stato determinato mediante spettrometria di massa electrospray utilizzando uno strumento Micromass ZMD2000; i valori ottenuti sono riportati in Tabella 11.

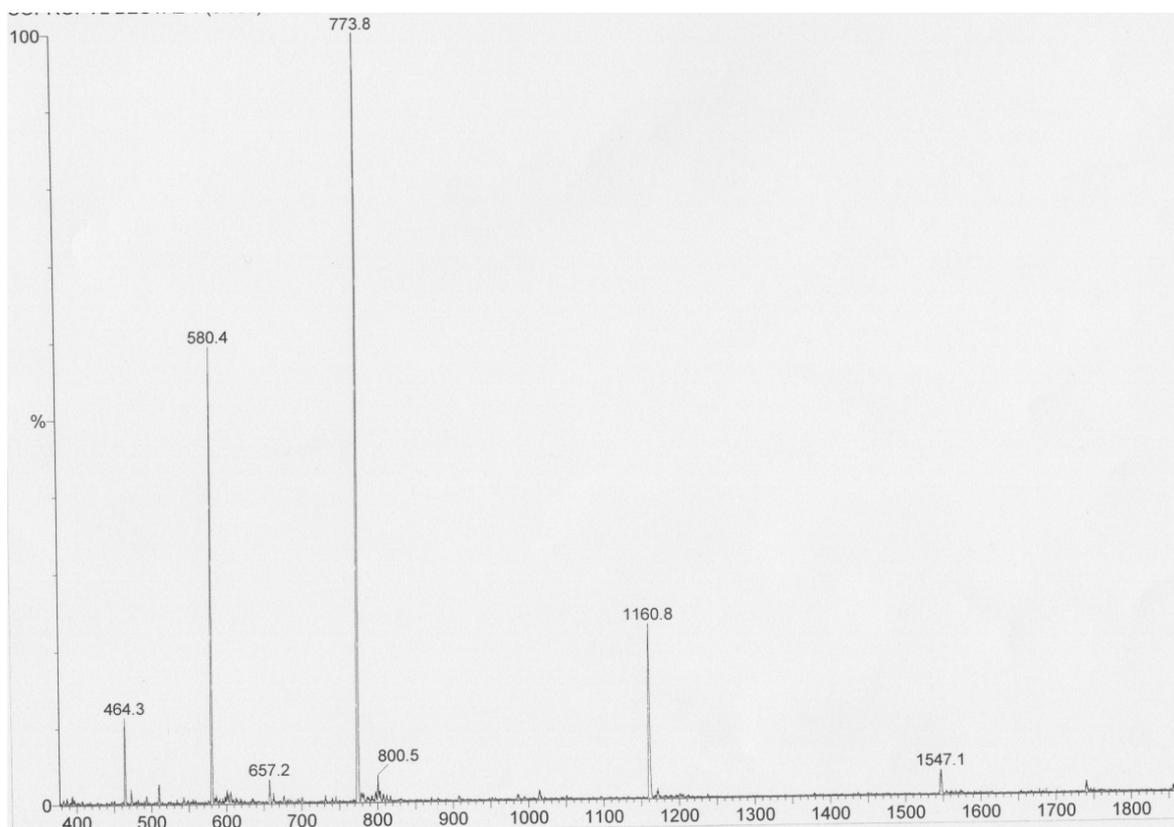
Nelle Figure 39, 40, 41 a titolo d'esempio è riportato il cromatogramma del grezzo di reazione, del prodotto purificato e lo spettro di massa relativo al composto [D-Pen(S- isopropilmetile)<sup>5</sup>]NPS.



**Figura 39.** Profilo analitico del grezzo di reazione di  $[D\text{-Pen}(S\text{-isopropilmetil})^5]NPS$ .



**Figura 40.** Profilo analitico del composto  $[D\text{-Pen}(S\text{-isopropilmetil})^5]NPS$  purificato



**Figura 41.** Spettro di massa ESI di  $[D\text{-Pen}(S\text{-isopropilmetil})^5]\text{NPS}$  purificato (MW calcolato 2318.7; MW trovato 2319).

COMPOSTO	$t_R$	$[M+H]^+$ calcolato	$[M+H]^+$ misurato
<i>h</i> NPS	14.02	2188.5	2189.2
$[D\text{-Pen}(S\text{-metile})^5]\text{NPS}$	17.01	2276.7	2276
$[D\text{-Pen}(S\text{-etile})^5]\text{NPS}$	17.41	2290.7	2290
$[D\text{-Pen}(S\text{-isopropilmetil})^5]\text{NPS}$	18.96	2318.7	2319
$[D\text{-Pen}(S\text{-ciclopropilmetil})^5]\text{NPS}$	18.97	2316.7	2316
$[D\text{-Pen}(S\text{-benzile})^5]\text{NPS}$	19.29	2352.8	2352
$[D\text{-Pen}(S\text{-}p\text{-CH}_3\text{Bzl})^5]\text{NPS}$	20.36	2365.5	2366.2
$[D\text{-Pen}(S\text{-}p\text{-OCH}_3\text{Bzl})^5]\text{NPS}$	19.60	2381.5	2382.2
$[D\text{-Pen}(S\text{-}p\text{-}^t\text{BuBzl})^5]\text{NPS}$	22.31	2407.5	2407.4
$[D\text{-Pen}(S\text{-}p\text{-PhBzl})^5]\text{NPS}$	22.29	2427.9	2428.8

**Tabella 11.** Tempi di ritenzione di ritenzione e pesi molecolari degli analoghi di *h*NPS modificati in posizione 5 con i derivati penicillamminici.

## *Saggi farmacologici*

Tutti i composti ottenuti e il ligando naturale sono stati valutati biologicamente nei laboratori del Dott. Girolamo Calò presso la sezione di Farmacologia del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi di Ferrara.

I composti sono stati valutati nel saggio di mobilizzazione del calcio in cellule HEK-293 trasfettate stabilmente con il recettore NPSR murino, utilizzando il sistema automatizzato multicanale FlexStation II.

Come controllo sono state utilizzate anche cellule wild-type, ovvero cellule che non esprimono il recettore del mNPS.

Lo strumento utilizzato, FlexStation II, è in pratica un fluorimetro multicanale. Dal punto di vista ottico, una sorgente di luce emette un'onda elettromagnetica che, grazie ad una serie di specchi e collimatori, viene fatta convergere sui singoli pozzetti di cellule caricate con il fluoroforo Fluo-4-acetoxymethyl estere (Fluo 4-AM). La lunghezza d'onda di eccitazione è di 488 nm, mentre la radiazione emessa dal campione irradiato ha una diversa lunghezza d'onda (525 nm) che viene registrata e amplificata dallo strumento.

Il test prevede l'incubazione delle cellule esprimenti il recettore d'interesse 30 minuti prima dell'esperimento con un fluoroforo calcio-dipendente, Fluo-4-AM.

Il fluoroforo una volta internalizzato nelle cellule viene processato da enzimi denominati esterasi che idrolizzano i legami esterei della molecola liberando così le funzionalità carbossiliche; il fluoroforo è così in grado di chelare il  $\text{Ca}^{2+}$ . Il complesso  $\text{Ca}^{2+}$ -fluoroforo eccitato dalla radiazione elettromagnetica incidente è in grado di emettere una radiazione la cui intensità sarà proporzionale alla quantità del complesso formatosi.

Conoscendo la fluorescenza basale, che viene determinata dallo strumento prima dell'inizio dell'esperimento, è possibile valutare l'incremento della fluorescenza che misura il  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare.

I dati farmacologici riportati rappresentano la media di almeno 3 esperimenti eseguiti in duplicato. La potenza degli agonisti è espressa come  $\text{pEC}_{50}$  (logaritmo negativo in base 10 della concentrazione molare di agonista che produce il 50% dell'effetto massimo possibile).

Le proprietà antagoniste dei nuovi peptidi sono state valutate in esperimenti di inibizione e la potenza, espressa come  $\text{pK}_B$ , calcolata con la seguente equazione:  $K_B = \text{IC}_{50} / ((2 + ([A]/\text{EC}_{50})^n)^{1/n} - 1)$ , dove  $\text{IC}_{50}$  è la concentrazione di antagonista che produce il 50% di inibizione della risposta dell'agonista,  $[A]$  è la concentrazione di agonista,  $\text{EC}_{50}$  è la

concentrazione di agonista che produce il 50% della risposta massima e  $n$  è il coefficiente di Hill della curva concentrazione-risposta di hNPS.

Nel saggio di mobilizzazione del calcio eseguito con il fluorimetro FlexStation II, NPS incrementa i livelli di calcio intracellulare in maniera concentrazione-dipendente con una  $pEC_{50}$  di 9.14 e un  $E_{max}$  del 403% sopra il livello basale (Figura 42).

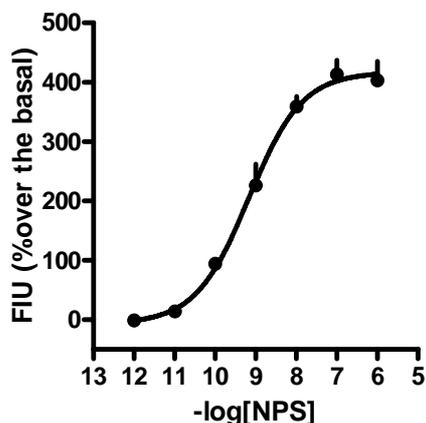


Figura 42. Curva concentrazione-risposta di hNPS.

L'antagonismo è stato valutato costruendo delle curve concentrazione-risposta (10 pM-10  $\mu$ M) del peptide in oggetto contro una concentrazione fissa di NPS (30 nM) corrispondente approssimativamente alla sua  $EC_{80}$ .

A titolo di esempio, nelle condizioni sperimentali adottate  $[D-Pen^5]NPS$  non è in grado di per sé di modificare i livelli di calcio ma inibisce in maniera concentrazione-dipendente l'effetto stimolatorio indotto da NPS (Figura 43).

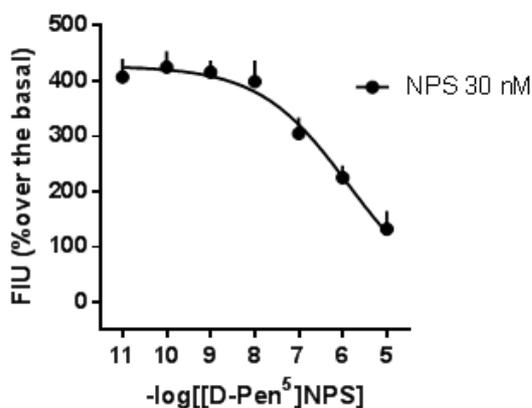


Figura 43. Curva di concentrazione-risposta di  $[D-Pen^5]NPS$ .

## ***Abbreviazioni***

Ac	acetil
Aib	acido 2-ammino-2-metilpropionico
Bzl	benzile
Dap	acido diamminopropionico
Ddb	acido 3,3-dimetil-2,4-diamminobutirrico
E <sub>1</sub>	eliminazione con meccasimo E <sub>1</sub>
GPCR	recettori accoppiati alle proteine G
HEK	Human Embryonic Kidney
HPLC	high-performance liquid chromatography
<i>i.c.v.</i>	intracerebroventricolare
<i>i</i> Pr	isopropil
Ipv	Isopropilvalina
NMR	risonanza magnetica nucleare
NPS	Neuropeptide S
<i>h</i> NPSR	recettore di NPS umano
<i>m</i> NPSR	recettore di NPS murino
Orn	Ornitina
Ph	fenil
SN <sub>1</sub>	sostituzione nucleofila con meccanismo SN <sub>1</sub>
<sup>t</sup> Bu	terbutile
TLC	thin-layer chromatography
Y	resa (yield)
SHA-68	4-fluoro-benzilammide dell'acido (9R/S)-3-osso-1,1-difenil-tetraidro ossazolo[3,4- <i>a</i> ] pirazin-7-carbossilico

# Synthesis and Separation of the Enantiomers of the Neuropeptide S Receptor Antagonist (9*R/S*)-3-Oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-*a*]pyrazine-7-carboxylic Acid 4-Fluoro-benzylamide (SHA 68)

Claudio Trapella,<sup>†,‡</sup> Michela Pela,<sup>†,‡</sup> Luisa Del Zoppo,<sup>†</sup> Girolamo Calo,<sup>‡</sup> Valeria Camarda,<sup>‡</sup> Chiara Ruzza,<sup>‡</sup> Alberto Cavazzini,<sup>§</sup> Valentina Costa,<sup>§</sup> Valerio Bertolasi,<sup>§,||</sup> Rainer K. Reinscheid,<sup>⊥</sup> Severo Salvadori,<sup>†</sup> and Remo Guerrini<sup>\*,†</sup>

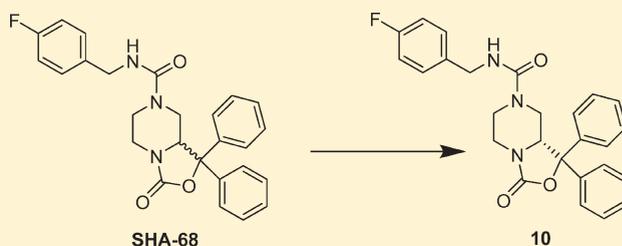
<sup>†</sup>Department of Pharmaceutical Sciences and Biotechnology Center and <sup>‡</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, Section of Pharmacology and Neuroscience Center, and National Institute of Neuroscience, University of Ferrara, via Fossato di Mortara 19, 44100 Ferrara, Italy

<sup>§</sup>Department of Chemistry and <sup>||</sup>Centre for Structural Diffraction, University of Ferrara, via L. Borsari 46, 44100 Ferrara, Italy

<sup>⊥</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of California Irvine, 2214 Natural Sciences I, Irvine, California 92697, United States

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** This study reports the synthesis, chromatographic separation, and pharmacological evaluation of the two enantiomers of the neuropeptide S receptor (NPSR) antagonist (9*R/S*)-3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-*a*]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68). The (9*R*)-3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-*a*]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (compound **10**) and (9*S*)-3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-*a*]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (compound **10a**) were synthesized and their purity assessed by chiral chromatography. The absolute configuration of the enantiomer **10** has been assigned from the crystal structure of the corresponding (*S*)-phenyl ethyl amine derivative **8**. Calcium mobilization studies performed on cells expressing the recombinant NPSR demonstrated that compound **10** is the active enantiomer while the contribution of **10a** to the NPSR antagonist properties of the racemic mixture is negligible.



Compound **10** is the bioactive enantiomer

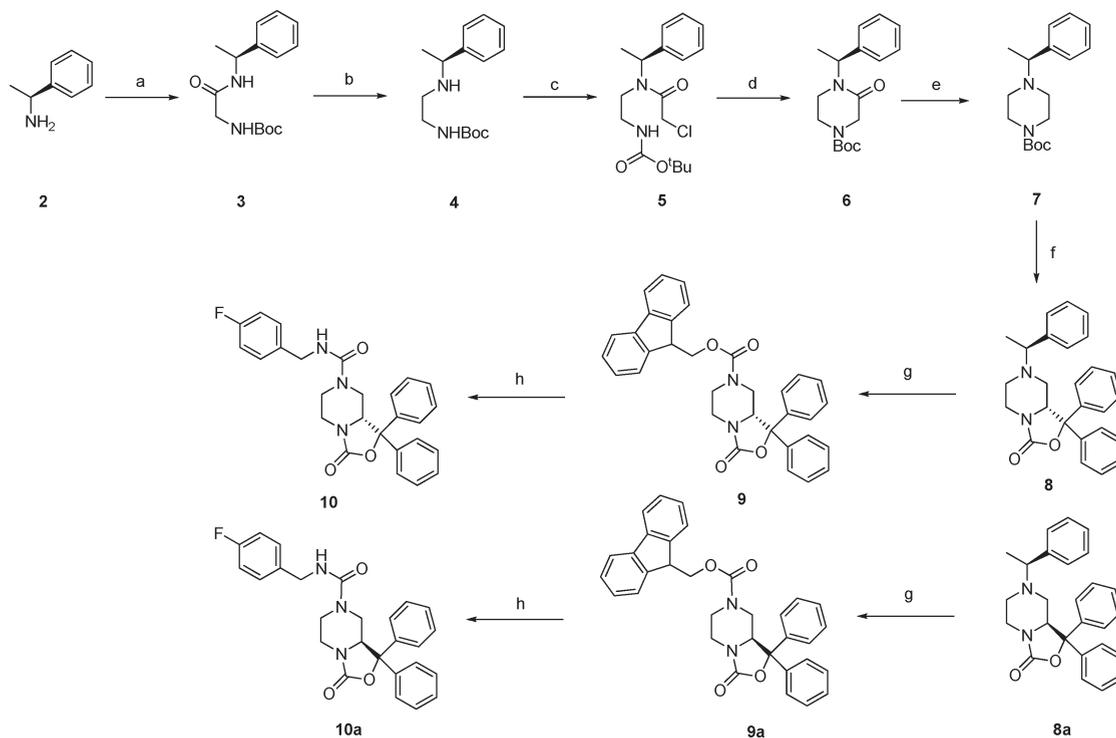
## INTRODUCTION

Neuropeptide S (NPS) is the last neuropeptide identified via the reverse pharmacology approach.<sup>1</sup> NPS selectively binds and activates a previously orphan GPCR receptor now referred to as NPSR.<sup>1</sup> NPSR is widely distributed in the brain, while the expression of the NPS peptide precursor is limited to few discrete brain areas.<sup>1,2</sup> The supraspinal administration of NPS in rodents produces a rather unique pattern of actions: stimulation of wakefulness associated with anxiolytic-like effects.<sup>1</sup> In addition, NPS has been reported to inhibit food intake, facilitate memory, elicit antinociceptive effects, and recent evidence suggests an involvement of the NPS/NPSR system in drug addiction (see for a review<sup>3</sup>).

Potent and NPSR selective antagonists are now required for understanding the biological functions controlled by the NPS/NPSR system. As far as peptide antagonists are concerned, these molecules were recently discovered by replacing Gly<sup>5</sup> in the natural peptide sequence with a D-amino acid. Examples of such compounds are [D-Cys(<sup>t</sup>Bu)<sup>5</sup>]NPS,<sup>4</sup> [D-Val<sup>5</sup>]NPS,<sup>5</sup> and more recently [<sup>t</sup>Bu-D-Gly<sup>5</sup>]NPS.<sup>6</sup> The first example of nonpeptide

molecules able to interact with the NPSR was reported in the patent literature by Takeda researchers.<sup>7</sup> Among the different molecules described in the patent, the compound (9*R/S*)-3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-*a*]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68; compound **1**) has been pharmacologically characterized. In vitro, compound **1** behaves as a selective, potent ( $pA_2 \cong 8$ ), and competitive antagonist at human<sup>8</sup> and murine<sup>9</sup> NPSR. In vivo, compound **1** has been reported to prevent the arousal promoting and anxiolytic-like effects elicited by NPS in mice and rats.<sup>8,9</sup> In addition, compound **1** reversed the protective effect of NPS on the NMDA receptor antagonist MK-801-induced neurotoxicity in rats.<sup>10</sup> Finally, recent findings indicate that in the rat intracerebroventricular injection of NPS increased conditioned reinstatement of cocaine seeking, whereas peripheral administration of compound **1** reduced it.<sup>11</sup> These pharmacological investigations were performed using the racemic compound **1**. Molecular modeling

**Received:** December 7, 2010

Scheme 1. Synthesis of Compounds 10 and 10a<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Reagents and conditions: (a) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, WSC, Boc-Gly-OH, room temp, 12 h; (b) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 0 °C, 1 h; (c) chloroacetyl-chloride, EtOAc, NaHCO<sub>3</sub>, 0 °C to room temp, 24 h; (d) THF/DMF 1/1, NaH, 0 °C to room temp, 24 h; (e) THF, LiAlH<sub>4</sub>, room temp, 4 h; (f) THF, benzophenone, *sec*-BuLi, TMEDA, -78 °C to -30 °C to room temp, 24 h; (g) CH<sub>3</sub>CN, Fmoc-Cl, reflux, 12 h; (h) THF, DBU, *p*-fluoro-benzylisocyanate, room temp, 12 h.

studies investigated nonpeptide ligand binding to NPSR.<sup>12</sup> In the frame of these studies, docking analyses were performed and a defined NPSR binding pocket was proposed; of note, only the (*S*) enantiomer of compound 1 was used in such simulations. The importance of ligand chirality for NPSR interaction has been recently supported by the identification of two novel classes of nonpeptide NPSR antagonists: the quinoline<sup>13</sup> and the tricyclic imidazole<sup>14</sup> based compounds. In both cases, a single bioactive enantiomer was obtained by chiral chromatography separation from the corresponding racemic mixture.

In the present study, we report the synthesis, chiral HPLC analysis, X-ray crystallographic assignment, and *in vitro* pharmacological evaluation of the two compound 1 enantiomers.

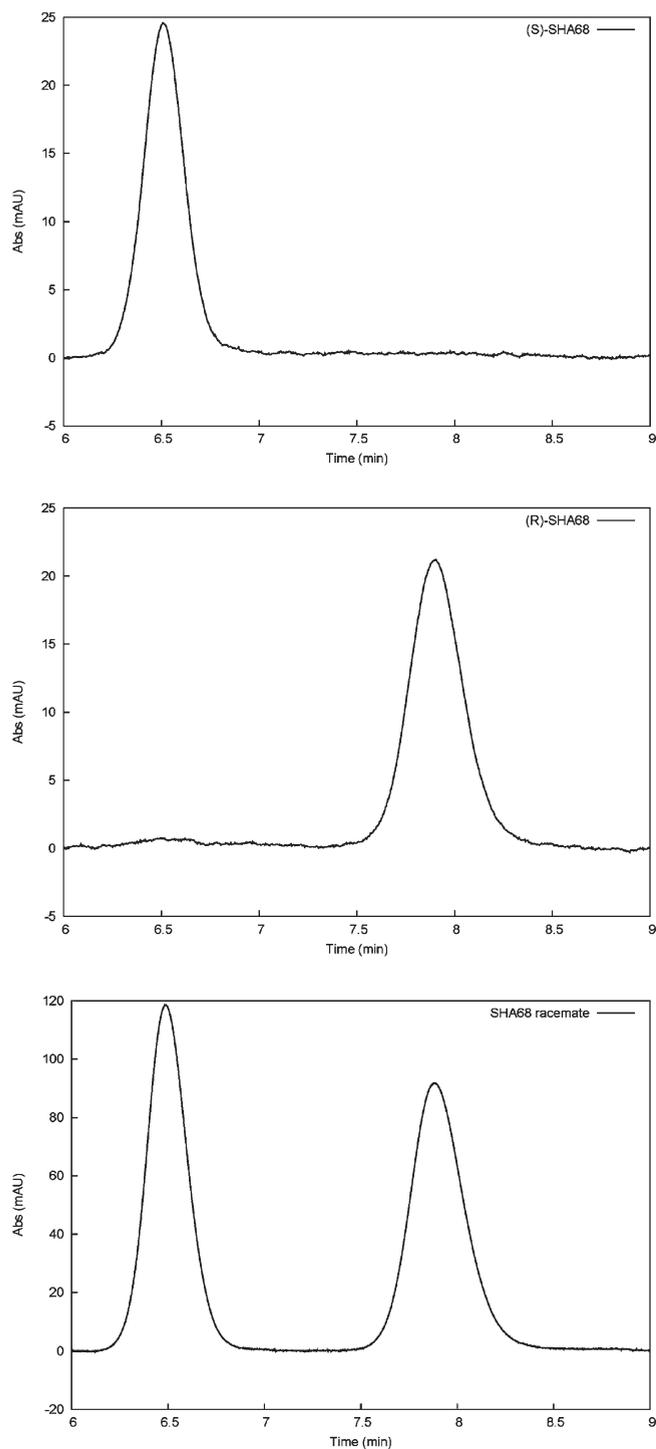
## RESULTS AND DISCUSSION

The reference compound 1 was synthesized following the procedures reported by Okamura et al.<sup>8</sup> In Scheme 1 is described the synthetic approach adopted for the synthesis of 10 and 10a starting from (*S*)-phenylethyl amine. As reported in literature,<sup>15,16</sup> the use of phenylethyl amine was expected to induce the stereochemistry of C9 of the tetrahydro-oxazolo-[3,4-*a*]pyrazine nucleus. Unfortunately, we obtained only a slight chiral induction corresponding approximately to a 60/40% ratio determined by NMR spectroscopy. Similar results were obtained using (*R*)-phenylethyl amine as chiral auxiliary. Nevertheless, diastereomers 8 and 8a were successfully separated in good yield by flash chromatography. The removal of the chiral auxiliary to obtain 9 and 9a and the acylation of N7 with *p*-fluoro-benzylisocyanate to obtain final compounds 10 and 10a were achieved using the

procedure reported by Okamura et al.<sup>8</sup> The purity grade and enantiomeric excess of 10 and 10a were determined by chiral HPLC analysis. The top panel of Figure 1 shows the chromatogram for the single enantiomer 10a (first eluted component), and the middle panel that of 10 (second eluted species) and the bottom panel of the figure displays the chromatogram for the racemate. As is evident from this figure, there is no trace of 10 in the chromatogram corresponding to the elution of 10a, nor of 10a in that of 10. To define the absolute configuration of the C9 chiral center, we explored different crystallization conditions for compounds 8, 8a, 9, 9a, and for the final products. Only with compound 8 were we able to obtain crystals suitable for further X-ray investigation. In particular, compound 8 was crystallized from ethanol/ethyl acetate, and its X-ray analysis demonstrated the absolute configuration *R* at the chiral center C9. The absolute C9 configuration of compound 8 has been assigned by reference to the unchanged chiral center C10 in configuration *S* (Figure 2). On the basis of the absolute configuration of 8, we were able to assign the absolute C9 configuration to compounds 8a, 9, 9a, and to the final products 10 and 10a.

In parallel, we performed a series of NMR experiments. In Figure 3, the enlarged [<sup>1</sup>H]NMR spectra of the C9 proton region of the 10a and 10 isomers are depicted. The coupling constant analysis between H<sub>x</sub> and H<sub>a</sub>/H<sub>b</sub> C8 protons are very similar (11.3/3.7 Hz for 10a, Figure 3A and 11.2/3.7 Hz for 10, Figure 3B) in both compounds. This result, together with X-ray data of 8 (see Figure 2), confirms the axial position of C9 proton in both enantiomers.

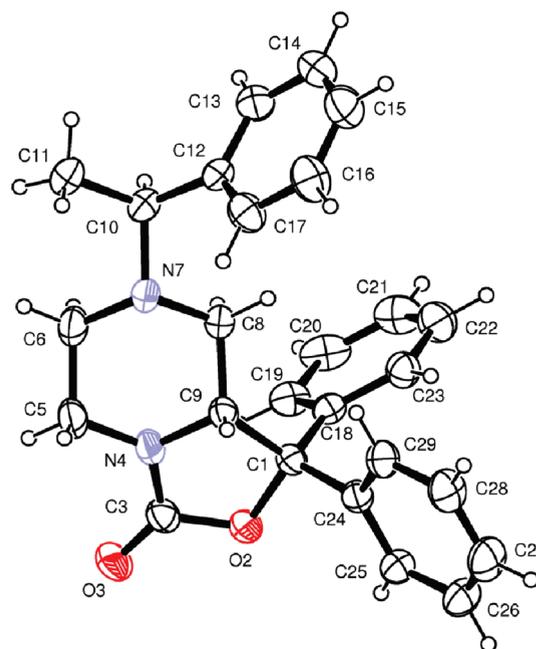
Next, we evaluated and compared the *in vitro* NPSR antagonist properties of compounds 1, 10, and . The three samples were



**Figure 1.** Chromatograms of compound **10a** (top panel) and **10** (middle panel) in comparison with the racemate (bottom panel).

tested in calcium mobilization studies performed on HEK293 cells expressing the murine NPSR or the two isoforms of the human receptor (hNPSRAsn107 and hNPSRIle107).<sup>17</sup>

The natural peptide NPS was able to induce calcium mobilization in a concentration dependent manner in HEK 293 mNPSR ( $pEC_{50}$   $8.97 \pm 0.11$ ;  $E_{max}$   $250 \pm 11\%$ ), hNPSRAsn107 ( $pEC_{50}$ :  $9.07 \pm 0.11$ ;  $E_{max}$   $316 \pm 13\%$ ), and hNPSRIle107 ( $pEC_{50}$ :  $9.17 \pm 0.15$ ;  $E_{max}$   $333 \pm 17\%$ ). The three samples were



**Figure 2.** ORTEP view of compound **8**. The thermal ellipsoids are drawn at 30% probability level.

challenged against the stimulatory effect of 10 nM NPS in inhibition response curves (Figure 4). Compounds **1**, **10**, and **10a** did not stimulate per se calcium mobilization up to 10  $\mu$ M. Compound **1** inhibited in a concentration dependent manner the stimulatory effect of NPS showing similar high values of potency ( $pK_B \approx 8$ ). These values of potency are superimposable to those previously published.<sup>8,9</sup> Compound **10** was also able to antagonize in a concentration dependent manner the stimulatory effect of NPS displaying values of potency similar or slightly higher than the racemic mixture. By contrast, compound **10a** showed a slight inhibitory effect only at micromolar concentrations. The values of potency of the three compounds in the three cells lines are summarized in Table 1. Collectively, these results demonstrated that compound **10** is the active enantiomer while the contribution of compound **10a** to the biological activity of the racemic mixture is negligible. This information can be extremely useful for the refinement of the recently proposed molecular models of NPSR and its binding pocket.<sup>12</sup> As already mentioned in the Introduction, the relevance of ligand chirality for NPSR binding is also corroborated by the fact that the biological activity of chemically different molecules, such as the quinoline<sup>13</sup> and the tricyclic imidazole<sup>14</sup> compounds, could be attributed to a single bioactive enantiomer.

## CONCLUSION

In conclusion, the present study described the synthesis and separation of the two compound **1** enantiomers. The synthetic scheme we used can be easily scaled up to multigrams. Compound **10** was demonstrated to be the bioactive enantiomer. Nowadays, this molecule represents the standard nonpeptide NPSR antagonist that has been, and surely will be, used to investigate the biological functions controlled by the NPS/NPSR system and to evaluate the therapeutic potential of innovative drugs acting as NPSR selective ligands.

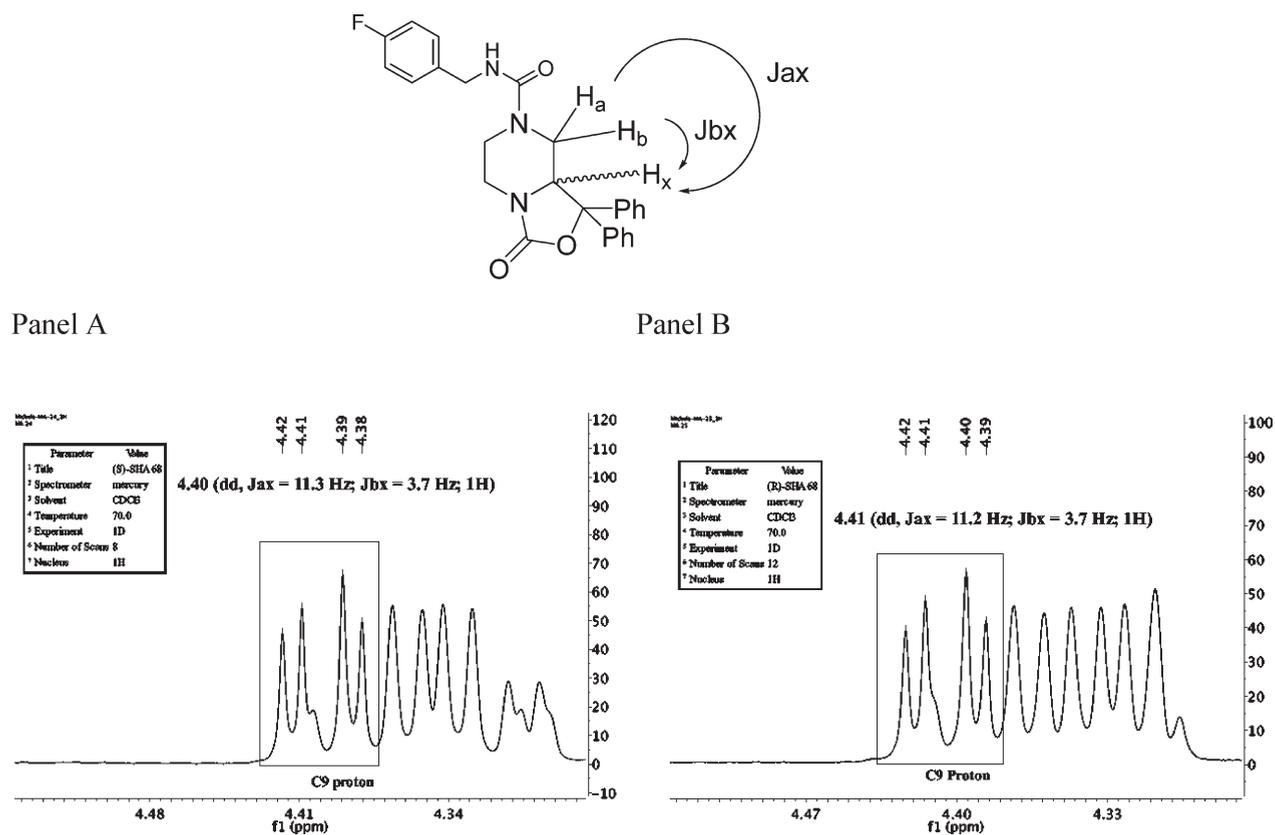


Figure 3. Enlarged  $^1\text{H}$  NMR spectra of the C9 proton region of the **10a** (A) and **10** (B) isomers.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** HPLC grade solvent were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). The purity of the tested compounds **1**, **10**, and **10a** has been assessed by RP-HPLC. All compounds showed >95% purity. One-dimensional and two-dimensional NMR spectra were recorded on a VARIAN 400 MHz instrument. Chemical shifts are given in ppm ( $\delta$ ) relative to TMS, and coupling constants are in Hz. MS analyses were performed on a ESI-Micromass ZMD 2000. Optical rotation data were recorded on a Perkin-Elmer polarimeter 241. Flash chromatography was carried out on a silica gel (Merck, 230–400 Mesh). Silica gel (Polygram SIL G/UV254) was used for thin layer chromatography.

### Typical Procedures for the Synthesis of **10** and **10a**.

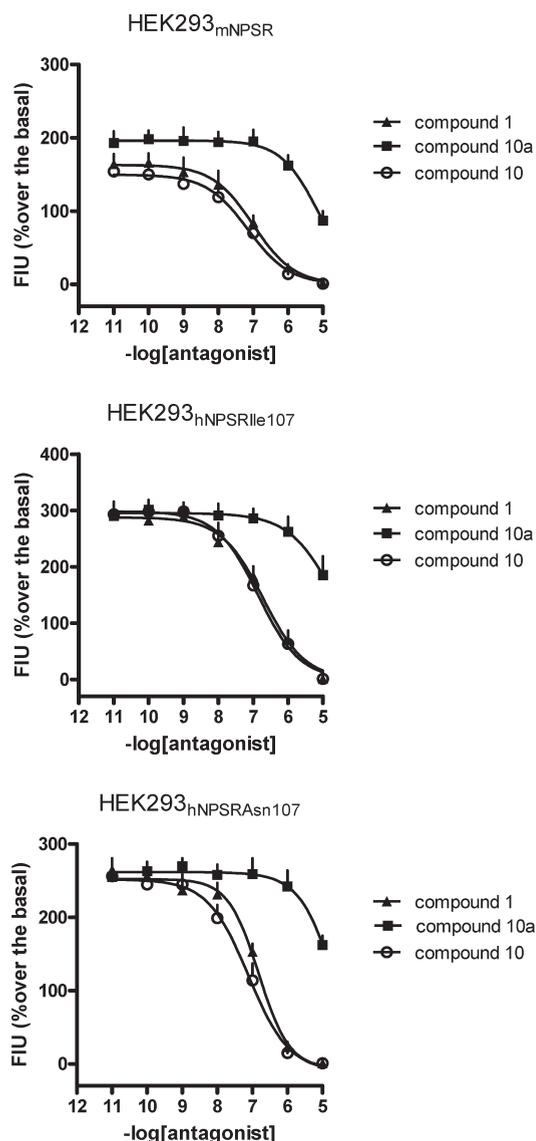
**[(1-Phenyl-ethylcarbamoyl)-methyl]-carbamic Acid tert-Butyl Ester (3).** To a stirred solution of Boc-Gly-OH (5 g, 28.5 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL), WSC (3.64 g, 19 mmol) and (S)-phenylethyl amine (3.45 g, 28.5 mmol) were added. After 24 h at room temperature, the reaction was monitored by TLC (EtOAc/light petroleum 2:1). The organic layer was washed with 10% citric acid (20 mL), 5%  $\text{NaHCO}_3$  (20 mL), and brine (20 mL). The organic phase was dried, concentrated in vacuo, and purified by flash chromatography (EtOAc/light petroleum 2:1) to obtain **3** in 60% yield.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.31–7.24 (m, 5H, Ar), 6.62 (bs, 1H, NH-CO), 5.31 (bs, 1H, NH-Boc), 5.11 (m, 1H, CH- $\text{CH}_3$ ), 3.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -NH-Boc), 1.47 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -CH-Ar,  $J = 6.8$  Hz), 1.42 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ -).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  168.6, 156.2, 143.0, 128.7, 127.4, 126.1, 80.2, 48.7, 44.6, 28.3, 21.9. MS (ESI):  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 279$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -41$  ( $c = 0.121$  g/100 mL, chloroform).

**[2-(1-Phenyl-ethylamino)-ethyl]-carbamic Acid tert-Butyl Ester (4).** To a stirred suspension of  $\text{LiAlH}_4$  (0.85 g, 22.38 mmol) at  $0^\circ\text{C}$  in

anhydrous THF, a solution of **3** (3.11 g, 11.19 mmol) was added dropwise. The reaction was monitored by TLC (EtOAc/light petroleum 3:1), and after 24 h, the excess of hydride was quenched with water and the salts were filtered through a Celite pad. The solvent was evaporated in vacuo to yield **4** (2.66 g, 10.07 mmol) in 90% yield.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.32–7.27 (m, 5H, Ar); 4.96 (bs, 1H, NH-Boc), 3.77–3.73 (q, 1H,  $\text{CH}_3$ -CH-Ar,  $J = 6.6$  Hz), 3.16–3.13 (m, 2H, NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 2.59–2.51 (m, 2H, NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.75 (bs, 1H, -NH), 1.42 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ -), 1.36–1.33 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -CH-Ar,  $J = 6.6$  Hz). MS (ESI):  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 265$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -29^\circ$  ( $c = 0.11$  g/100 mL, chloroform).

**{2-[(2-Chloro-acetyl)-(1-phenyl-ethyl)-amino]-ethyl}-carbamic Acid tert-Butyl Ester (5).** To a stirred solution of **4** (1.94 g, 7.34 mmol) in EtOAc (50 mL) at  $0^\circ\text{C}$ , saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  (5 mL) was added. After 10 min, chloroacetyl chloride (1.17 mL, 14.68 mmol) was added dropwise. The reaction was monitored by TLC (EtOAc/light petroleum 3:1), and after 24 h at room temperature,  $\text{NaHCO}_3$  (2 mL) was added to the organic phase. The organic layer was separated, and the aqueous phase was extracted twice with EtOAc (50 mL). The combined organic phases were concentrate to dryness to obtain **5** in quantitative yield.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.22–6.98 (m, 5H, Ar), 5.59–5.43 (q, 1H,  $\text{CH}_3$ -CH-Ar,  $J = 8$  Hz), 4.85 (bs, 1H, NH-Boc), 4.10–3.97 (m, 2H, NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 3.76 (s, 2H, C=O- $\text{CH}_2$ -Cl), 3.18–3.15 (m, 2H, NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.40–1.25 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -CH-Ar,  $J = 8$  Hz), 1.06 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ -).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.12, 155.85, 139.47, 128.45, 128.20, 128.03, 80.69, 59.44, 42.86, 41.14, 38.24, 27.48, 19.98. MS (ESI):  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 341$ .

**3-Oxo-4-(1-phenyl-ethyl)-piperazine-1-carboxylic Acid tert-Butyl ester (6).** To a stirred suspension of 60% NaH (1.14 g, 28.61 mmol) in a mixture of THF/DMF 1/1 (20 mL) at  $0^\circ\text{C}$ , a solution of **5** (3.25 g, 9.54 mmol) in THF/DMF 1/1 (10 mL) was added. After 24 h, the



**Figure 4.** Inhibition response curves to compounds **1** (SHA 68), **10**, and **10a** in HEK293 cells expressing the murine NPSR and the human NPSR isoforms. Data are mean  $\pm$  SEM of four separate experiments made in duplicate.

**Table 1.** Potencies ( $pK_B$ ) of Compounds **1** (SHA 68), **10**, and **10a** in HEK293 Cells Expressing the Murine NPSR and the Human NPSR Isoforms

compd	mNPSR	hNPSR Ile107	hNPSR Asn107
	$pK_B$	$pK_B$	$pK_B$
<b>1</b>	8.16 (7.79–8.53)	8.03 (7.77–8.37)	7.99 (7.73–8.25)
<b>10</b>	8.29 (7.93–8.65)	8.18 (7.90–8.46)	8.28 (7.72–8.84)
<b>10a</b>	<6	<6	<6

reaction was quenched by adding  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturated solution (15 mL), and the solvent was removed in vacuo. The residue was dissolved in EtOAc (50 mL) and washed twice with water (20 mL). The organic layer was dried, evaporated under reduced pressure, and the crude product purified by flash chromatography (eluent: EtOAc/light petroleum 1:1) to obtain **6** in 45% yield.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  7.36–7.28 (m, 5H, Ar), 6.08 (q, 1H,  $\text{CH}_3\text{-CH-Ar}$ ,  $J = 8$  Hz), 4.23–4.18 (d, 1H,  $\text{N-CHeHa-C=O}$ ,  $J = 20$  Hz), 4.10 (d, 1H,  $\text{N-CHeHa-C=O}$ ,  $J = 20$  Hz), 3.62 (bs, 1H,  $\text{CH}_2$  piperazine), 3.27 (bs, 1H,  $\text{CH}_2$  piperazine), 3.19 (bs, 1H,  $\text{CH}_2$  piperazine), 2.83 (bs, 1H,  $\text{CH}_2$  piperazine), 1.53–1.51 (d, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH-Ar}$ ,  $J = 8$  Hz), 1.45 (s, 9H,  $^t\text{Bu-}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.44, 153.78, 139.41, 128.63, 127.68, 127.36, 80.69, 50.08, 47.98, 40.24, 28.32, 15.34. MS (ESI):  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 305$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -116.0^\circ$  ( $c = 0.318$  g/100 mL, chloroform).

*4-(1-Phenyl-ethyl)-piperazine-carboxylic Acid tert-Butyl Ester (7)*. To a stirred suspension of  $\text{LiAlH}_4$  (453 mg, 18.9 mmol) in anhydrous THF (20 mL) at room temperature, a solution of **6** (1.15 g, 3.78 mmol) in THF (10 mL) was added. After 30 min, the reaction was completed as showed by TLC analysis (EtOAc/light petroleum 1:2). The reaction was quenched by adding 15% NaOH (1 mL) and  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 mL). The resulting precipitate was filtered through a Celite pad, and the solvent was concentrate to dryness. The crude product was purified by flash chromatography (eluent: EtOAc/light petroleum 1:2) to give **7** (920 mg, 3.17 mmol) in 84% yield.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.31–7.25 (m, 5H, Ar), 3.41–3.35 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{-N-Boc}$ ,  $\text{CH-CH}_3$ ), 2.41–2.33 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 1.43 (s, 9H,  $^t\text{Bu-}$ ), 1.36 (d, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH-Ar}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  146.80, 134.13, 128.38, 127.74, 127.10, 85.27, 50.36, 29.78, 28.49, 27.48. MS (ESI):  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 291$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -32^\circ$  ( $c = 0.0104$  g/100 mL, chloroform).

*1,1-Diphenyl-7-(1-phenyl-ethyl)-hexahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazin-3-one (8 and 8a)*. To a stirred solution of **7** (380 mg, 1.31 mmol) in anhydrous THF (5 mL), TMEDA (0.53 mL, 3.54 mmol) was added. The reaction was cooled at  $-78^\circ\text{C}$ , and *sec*-BuLi 1.4 M in hexane (2.53 mL, 3.54 mmol) was added. The reaction was heated at  $-35^\circ\text{C}$ , and after 2 h, a solution of benzophenone (480 mg, 2.62 mmol) in anhydrous THF (7 mL) was added dropwise. The reaction became green and was stirred at room temperature for 24 h. After this time, the reaction was monitored by TLC (EtOAc/light petroleum 1:2) and quenched by adding  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturated solution (20 mL). The solvent was removed in vacuo and the aqueous phase extracted three times with EtOAc (30 mL). The combined organic layer was dried and evaporated to dryness. The crude diastereomers mixture was purified by flash chromatography using EtOAc/light petroleum 1:2 as eluent to obtain the fast running diastereomer **8a** in 40% yield and the low running diastereomer **8** in 45% yield.

**8a**:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.55–7.49 (m, 2H), 7.41–7.21 (m, 11H), 7.19–7.14 (m, 2H), 4.51 (dd, 1H,  $J = 10.9$ , 3.6 Hz), 3.74 (ddd, 1H,  $J = 13.2$ , 3.5, 1.3 Hz), 3.34 (q, 1H,  $J = 6.7$  Hz), 3.04 (ddd, 1H,  $J = 13.0$ , 12.1, 3.6 Hz), 2.70–2.61 (m, 2H), 1.86 (td, 1H,  $J = 11.9$ , 3.6 Hz), 1.50–1.41 (m, 1H), 1.22 (d, 3H,  $J = 6.7$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  156.17, 142.85, 142.52, 138.91, 128.69, 128.58, 128.50, 128.35, 128.01, 127.51, 127.37, 126.19, 125.95, 85.50, 64.52, 61.56, 52.66, 49.30, 42.07, 19.34. MS ESI  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 399$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +216$  ( $c = 0.108$  g/100 mL, chloroform).

**8**:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.50–7.45 (m, 2H), 7.39–7.20 (m, 11H), 7.18–7.14 (m, 2H), 4.44 (dd, 1H,  $J = 3.56$ , 10.93 Hz), 3.86–3.79 (m, 1H), 3.48 (q, 1H,  $J = 6.8$  Hz), 3.11 (ddd, 1H,  $J = 13.0$ , 12.0, 3.81 Hz), 2.80–2.73 (m, 1H), 2.44 (ddd, 1H,  $J = 11.5$ , 3.5, 1.6 Hz), 2.07–1.97 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.27 (d, 3H,  $J = 6.8$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  156.20, 142.48, 142.28, 138.81, 128.65, 128.51, 128.32, 127.98, 127.59, 127.28, 126.11, 125.92, 125.84, 85.39, 63.86, 61.67, 53.24, 47.58, 42.11, 17.16; MS ESI  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 399$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -132^\circ$  ( $c = 0.11$  g/100 mL, chloroform).

*3-Oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazine-7-carboxylic Acid 9H-fluoren-9-ylmethyl Ester (9 and 9a)*. To a stirred solution of **8** or **8a** (200 mg, 0.52 mmol) in acetonitrile (10 mL) at reflux, Fmoc-Cl (148 mg, 0.57 mmol) dissolved in acetonitrile (7 mL) was added. The reaction, monitored by TLC (EtOAc/light petroleum 1:2), was completed in 12 h. The desired precipitate was filtered off to obtain **9** or **9a** in about 67% yield and pure enough to be used in the next reaction.

3-Oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazine-7-carboxylic Acid 4-fluoro-benzylamide (**10** and **10a**). To a stirred solution of **9** (59 mg, 0.11 mmol) in anhydrous THF (15 mL), *p*-fluoro-benzylisocyanate (34.4 mg, 0.228 mmol) and DBU (19.2 mg, 0.126 mmol) were added. The reaction was monitored by TLC (EtOAc/light petroleum 1:2) and by mass spectrometry. After 24 h, the reaction was treated as for **8** and **8a**. The organic phase was dried and evaporate to dryness to give **10** in 76% yield after column chromatography using EtOAc/light petroleum 1/1 as eluent. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.51–7.47 (m, 2H), 7.41–7.18 (m, 10H), 7.03–6.94 (m, 2H), 4.95 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.45–4.27 (m, 3H), 4.03 (ddd, 1H, *J* = 13.5, 3.5, 1.2 Hz), 3.81 (dd, 1H, *J* = 13.1, 2.7 Hz), 3.69–3.60 (m, 1H), 3.05 (td, 1H, *J* = 12.7, 3.7 Hz), 2.93–2.82 (m, 1H), 2.14 (dd, 1H, *J* = 13.3, 11.3 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.20, 156.11, 141.81, 138.30, 134.91, 129.48, 129.41, 129.17, 129.09, 128.82, 128.72, 128.37, 125.99, 125.85, 115.70, 115.48, 85.90, 60.55, 46.58, 44.47, 43.76, 41.37. MS ESI [*M* + *H*<sup>+</sup>] = 445.9; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +92 (*c* = 0.1 g/100 mL, MeOH).

Compound **10a** was obtained in the same manner, starting from **9a**. Analytical data: yield 83%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.51–7.47 (m, 2H), 7.41–7.18 (m, 10H), 7.03–6.94 (m, 2H), 4.95 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.45–4.27 (m, 3H), 4.03 (ddd, 1H, *J* = 13.3, 3.6, 1.3 Hz), 3.81 (dd, 1H, *J* = 13.1, 2.7 Hz), 3.69–3.60 (m, 1H), 3.05 (td, 1H, *J* = 12.7, 3.7 Hz), 2.93–2.82 (m, 1H), 2.14 (dd, 1H, *J* = 13.3, 11.3 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.20, 156.11, 141.81, 138.30, 134.91, 129.48, 129.41, 129.17, 129.09, 128.82, 128.72, 128.37, 125.99, 125.85, 115.70, 115.48, 85.90, 60.55, 46.58, 44.47, 43.76, 41.37. MS ESI [*M* + *H*<sup>+</sup>] = 445.9; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = −91 (*c* = 0.12 g/100 mL, MeOH).

**Chiral Chromatography Analysis.** A micro HPLC (Agilent 1100 micro series, Agilent Technologies) equipped with a micro diode array detector was employed. A 150 mm × 2 mm stainless steel column packed with Lux Cellulose-1 (cellulose tris 3,5-dimethylphenylcarbamate from Phenomenex) was used for all the measurements. The average size of the packing material was 3 μm. The mobile phase was a binary mixture of hexane/isopropyl alcohol (80/20 v/v). Flow rate was 200 μL/min. Injection volume was 3 μL. Analyte solutions were filtered with PTFE filters (0.45 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) before injection. All chromatograms were recorded at 230 nm. The retention times for the first (**10a**) and second (**10**) eluted enantiomers were 6.5 and 7.9 min, respectively.

**Crystal Structure Determination of Compound 8.** The crystal data of compound **8** were collected at room temperature using a Nonius Kappa CCD diffractometer with graphite monochromated Mo Kα radiation. The data sets were corrected for Lorentz and polarization effects. The structure was solved by direct methods<sup>18</sup> and refined using full-matrix least-squares with all non-hydrogen atoms anisotropically and hydrogens included on calculated positions riding on their carrier atoms. All calculations were performed using SHELXL-97<sup>19</sup> and PARST<sup>20</sup> implemented in WINGX<sup>21</sup> system of programs.

Crystal Data: C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, orthorhombic, space group P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, *a* = 11.2339(2), *b* = 11.6808(3), *c* = 16.4783(5) Å, *V* = 2162.30(9) Å<sup>3</sup>, *Z* = 4, *D*<sub>c</sub> = 1.224 g cm<sup>−3</sup>, intensity data collected with θ ≤ 26°, 4215 independent reflections measured, 3460 observed reflections [*I* > 2σ(*I*)], final *R* index = 0.0365 (observed reflections), *R*<sub>w</sub> = 0.0904 (all reflections), *S* = 1.048. The absolute configuration has not been established by anomalous dispersion effects in diffraction measurements on the crystal. The enantiomer has been assigned by reference to an unchanging chiral center in the synthetic procedure. ORTEP<sup>22</sup> view of compound **8** is shown in Figure 2.

CCDC deposition number: 810351.

**Calcium Mobilization Experiments.** HEK293 cells stably expressing the murine NPSR or the human receptor isoforms NPSRIle107 and NPSRAsn107 were generated as previously described.<sup>17</sup> HEK293<sub>mNPSR</sub> and HEK293<sub>hNPSRIle107</sub> cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and

hygromycin B (100 mg/L). HEK293<sub>hNPSRAsn107</sub> cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, and zeocin (100 mg/L). Cells were cultured at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> humidified air. Cells were seeded at a density of 50000 cells/well into poly-D-lysine coated 96-well black, clear-bottom plates. The following day, the cells were incubated with medium supplemented with 2.5 mM probenecid, 3 μM of the calcium sensitive fluorescent dye Fluo-4 AM, and 0.01% pluronic acid for 30 min at 37 °C. After that time, the loading solution was aspirated and 100 μL/well of assay buffer (Hank's Balanced Salt Solution; HBSS) supplemented with 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 2.5 mM probenecid, and 500 μM Brilliant Black (Aldrich) was added. Concentrated solutions (1 mM) of NPS were made in bidistilled water and kept at −20 °C. Compounds **1**, **10**, and **10a** were dissolved DMSO at a final concentration of 10 mM, and stock solutions were kept at −20 °C until use. The successive dilutions were carried out in HBSS/HEPES (20 mM) buffer (containing 0.02% bovine serum albumin fraction V). After placing both plates (cell culture and master plate) into the fluorometric imaging plate reader FlexStation II (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), fluorescence changes were measured. Online additions were carried out in a volume of 50 μL/well. To facilitate drug diffusion into the wells in antagonist type experiments, the present studies were performed at 37 °C and three cycles of mixing (25 μL from each well moved up and down 3 times) were performed immediately after antagonist injection to the wells. Inhibition response curves were determined against the stimulatory effect of 10 nM NPS. Compounds **1**, **10**, and **10a** were injected into the wells 24 min before adding NPS.

**Data Analysis and Terminology.** The pharmacological terminology adopted in this paper is consistent with IUPHAR recommendations. Data were expressed as mean ± SEM of at least four independent experiments made in duplicate. Maximum change in fluorescence, expressed in percent of baseline fluorescence, was used to determine agonist response. Nonlinear regression analysis using GraphPad Prism software (version 4.0) allowed logistic iterative fitting of the resultant responses and the calculation of agonist potencies and maximal effects. Agonist potencies are given as pEC<sub>50</sub> (the negative logarithm to base 10 of the molar concentration of an agonist that produces 50% of the maximal possible effect). Compounds **1**, **10**, and compound **10a** antagonist properties were evaluated in inhibition response curve experiments; the antagonist potency, expressed as pK<sub>B</sub>, was derived from the following equation:

$$K_B = IC_{50} / ([2 + ([A]/EC_{50})^n]^{1/n} - 1)$$

where IC<sub>50</sub> is the concentration of antagonist that produces 50% inhibition of the agonist response, [A] is the concentration of agonist, EC<sub>50</sub> is the concentration of agonist producing a 50% maximal response, and *n* is the Hill coefficient of the concentration response curve to the agonist.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Monodimensional and bidimensional NMR spectra of compounds **8**, **8a**, and final products and crystal data of compound **8** (CIF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +39-0532-455-988. Fax: +39-0532-455953. E-mail: r.guerrini@unife.it.

### Author Contributions

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

## ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr. Alberto Casolari and Dr. Elisa Durini for the NMR analysis and Professor Vinicio Zanirato for the helpful discussion about NMR spectra of compound **8**. This work was supported by funds from the University of Ferrara (FAR grants to G.C. and S.S.), the Italian Ministry of the University (PRIN grant to G.C. and S.S. and CHEM-PROFARMA-NET grant to A.C.), the Compagnia di S. Paolo Foundation (NPSNP grant to G.C.), and the National Institute of Mental Health (MH-71313 grant to R.K.R.).

## ABBREVIATIONS USED

DBU, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMF, *N,N*-dimethylformamide; Fmoc-Cl, 9-fluorenylmethyl chloroformate; HBSS, Hank's Balanced Salt Solution; HEK, human embryonic kidney; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; MS-ESI, electron spray ionization mass spectrometry; NMDA, *N*-methyl-D-aspartic acid; PFTE, polytetrafluoroethylene; RP-HPLC, reversed-phase high-performance liquid chromatography; THF, tetrahydrofuran; TMEDA, tetramethylethylenediamine; WSC, 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide

## REFERENCES

- (1) Xu, Y. L.; Reinscheid, R. K.; Huitron-Resendiz, S.; Clark, S. D.; Wang, Z.; Lin, S. H.; Brucher, F. A.; Zeng, J.; Ly, N. K.; Henriksen, S. J.; de Lecea, L.; Civelli, O. Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* **2004**, *43*, 487–497.
- (2) Xu, Y. L.; Gall, C. M.; Jackson, V. R.; Civelli, O.; Reinscheid, R. K. Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **2007**, *500*, 84–102.
- (3) Guerrini, R.; Salvadori, S.; Rizzi, A.; Regoli, D.; Calo, G. Neurobiology, pharmacology, and medicinal chemistry of neuropeptide S and its receptor. *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 751–777.
- (4) Camarda, V.; Rizzi, A.; Ruzza, C.; Zucchini, S.; Marzola, G.; Marzola, E.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Reinscheid, R. K.; Regoli, D.; Calo, G. In vitro and in vivo pharmacological characterization of the neuropeptide s receptor antagonist [D-Cys(tBu)S]neuropeptide S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *328*, 549–555.
- (5) Guerrini, R.; Camarda, V.; Trapella, C.; Calo, G.; Rizzi, A.; Ruzza, C.; Fiorini, S.; Marzola, E.; Reinscheid, R. K.; Regoli, D.; Salvadori, S. Synthesis and biological activity of human neuropeptide S analogues modified in position 5: identification of potent and pure neuropeptide S receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 524–529.
- (6) Guerrini, R.; Camarda, V.; Trapella, C.; Calo, G.; Rizzi, A.; Ruzza, C.; Fiorini, S.; Marzola, E.; Reinscheid, R. K.; Regoli, D.; Salvadori, S. Further studies at neuropeptide s position 5: discovery of novel neuropeptide S receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4068–4071.
- (7) Fukatsu, K.; Nakayama, Y.; Tarui, N.; Mori, M.; Matsumoto, H.; Kurasawa, O.; Banno, H. Bicyclic piperazine compound and use thereof. PCT Int. Appl. WO2005021555, 2005.
- (8) Okamura, N.; Habay, S. A.; Zeng, J.; Chamberlin, A. R.; Reinscheid, R. K. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo profile of 3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-*a*]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68), a selective antagonist of the neuropeptide S receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325*, 893–901.
- (9) Ruzza, C.; Rizzi, A.; Trapella, C.; Pela, M.; Camarda, V.; Ruggieri, V.; Filafarro, M.; Cifani, C.; Reinscheid, R. K.; Vitale, G.; Ciccocioppo, R.; Salvadori, S.; Guerrini, R.; Calo, G. Further studies on the pharmacological profile of the neuropeptide S receptor antagonist SHA 68. *Peptides* **2010**, *31*, 915–925.

- (10) Okamura, N.; Reinscheid, R. K.; Ohgake, S.; Iyo, M.; Hashimoto, K. Neuropeptide S attenuates neuropathological, neurochemical and behavioral changes induced by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neuropharmacology* **2010**, *58*, 166–172.

- (11) Kallupi, M.; Cannella, N.; Economidou, D.; Ubaldi, M.; Ruggeri, B.; Weiss, F.; Massi, M.; Marugan, J.; Heilig, M.; Bonnavion, P.; de Lecea, L.; Ciccocioppo, R. Neuropeptide S facilitates cue-induced relapse to cocaine seeking through activation of the hypothalamic hypocretin system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 19567–19572.

- (12) Dal Ben, D.; Antonini, I.; Buccioni, M.; Lambertucci, C.; Marucci, G.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G. Molecular modeling studies on the human neuropeptide S receptor and its antagonists. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 371–383.

- (13) Melamed, J. Y.; Zartman, A. E.; Kett, N. R.; Gotter, A. L.; Uebele, V. N.; Reiss, D. R.; Condra, C. L.; Fandozzi, C.; Lubbers, L. S.; Rowe, B. A.; McGaughey, G. B.; Henault, M.; Stocco, R.; Renger, J. J.; Hartman, G. D.; Bilodeau, M. T.; Trotter, B. W. Synthesis and evaluation of a new series of Neuropeptide S receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4700–4703.

- (14) Trotter, B. W.; Nanda, K. K.; Manley, P. J.; Uebele, V. N.; Condra, C. L.; Gotter, A. L.; Menzel, K.; Henault, M.; Stocco, R.; Renger, J. J.; Hartman, G. D.; Bilodeau, M. T. Tricyclic imidazole antagonists of the Neuropeptide S Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4704–4708.

- (15) Juaristi, E.; Leon-Romo, J. L.; Reyes, A.; Escalante, J. Recent applications of alpha-phenylethylamine (alpha-PEA) in the preparation of enantiopure compounds. Part 3: alpha-PEA as chiral auxiliary. Part 4: alpha-PEA as chiral reagent in the stereodifferentiation of prochiral substrates. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2441–2495.

- (16) Guizzetti, S.; Benaglia, M.; Rossi, S. Highly stereoselective metal-free catalytic reduction of imines: an easy entry to enantiomerically pure amines and natural and unnatural alpha-amino esters. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2928–2931.

- (17) Reinscheid, R. K.; Xu, Y. L.; Okamura, N.; Zeng, J.; Chung, S.; Pai, R.; Wang, Z.; Civelli, O. Pharmacological Characterization of Human and Murine Neuropeptide S Receptor Variants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1338–1345.

- (18) Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G.; Polidori, G.; Spagna, R. SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 115–119.

- (19) Sheldrich, G. M. Program for the crystal structure refinement. University of Gottingen: Gottingen, Germany, 1997; <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/>.

- (20) Nardelli, M. PARST95—an update to PARST: a system of Fortran routines for calculating molecular structure parameters from the results of crystal structure analyses. *J. Appl. Crystallogr.* **1995**, *28*, 659.

- (21) Farrugia, L. J. WinGX suite for small-molecule single crystal crystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837–838.

- (22) Farrugia, L. J. ORTEP-3 for Windows—a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.



## Toward the optimization of continuous-flow aldol and $\alpha$ -amination reactions by means of proline-functionalized silicon packed-bed microreactors

Alessandro Massi<sup>a,\*</sup>, Alberto Cavazzini<sup>a,\*</sup>, Luisa Del Zoppo<sup>a</sup>, Omar Pandoli<sup>b</sup>, Valentina Costa<sup>a</sup>, Luisa Pasti<sup>a</sup>, Pier Paolo Giovannini<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Chimica, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, I-44121 Ferrara, Italy

<sup>b</sup> National Key Laboratory of Micro/Nano Fabrication Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, PR China

<sup>c</sup> Dipartimento di Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara, Corso Ercole I D'Este 32, I-44121 Ferrara, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 October 2010

Revised 24 November 2010

Accepted 30 November 2010

Available online 5 December 2010

#### Keywords:

Asymmetric catalysis

Continuous-flow processes

Microreactors

Organocatalysis

### ABSTRACT

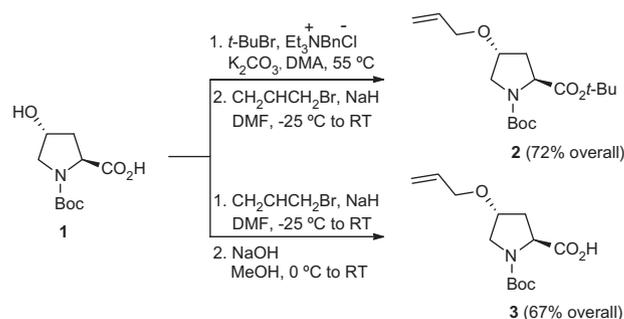
The activity and stability under flow conditions of covalently and non-covalently silica supported proline and proline-like organocatalysts is herein described. The slow aldol reaction of cyclohexanone with *p*-nitro benzaldehyde and the fast  $\alpha$ -amination of isovaleraldehyde with dibenzyl azodicarboxylate have been selected as model reactions for this study. Prospects and limitations of the disclosed continuous-flow organocatalytic approach are widely discussed.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Today, the combination of efficient synthetic methodologies such as organocatalysis<sup>1</sup> with high-throughput techniques such as microreactor technology<sup>2</sup> is actively pursued to create new synthetic platforms for the sustainable, safe, and intensified production of fine chemicals and pharmaceuticals.<sup>3</sup> In light of this new paradigm, Odedra and Seeberger recently reported the first homogeneous organocatalytic asymmetric aldol and Mannich reactions performed in microfluidic devices.<sup>4</sup> Pericàs and co-workers later described the implementation of heterogeneous continuous-flow Mannich reactions by using packed-bed microreactors filled with a proline-functionalized polystyrene resin.<sup>5</sup> For a broad range of microreactor applications it would be desirable, however, that the proline-functionalized packing material be compatible with a wide array of reaction solvents. In general, lightly cross-linked polystyrene resins appear inappropriate for microchannel packing as they may cause high pressure drop along the microreactor and lead to irreproducible flow when swollen with different solvents.<sup>6</sup> Herein, we report on the preparation of proline-functionalized silicas by a covalent immobilization strategy based on the photoinduced thiol-ene coupling (TEC).<sup>7</sup> The synthesis of an ionic counterpart is also described and the nature of immobilization on catalyst activity and stability under batch and flow conditions duly evaluated by using model aldol and  $\alpha$ -amination reactions.

The hitherto unreported 4-*O*-allyl-hydroxyproline derivatives **2** and **3** were readily synthesized in two steps from commercially

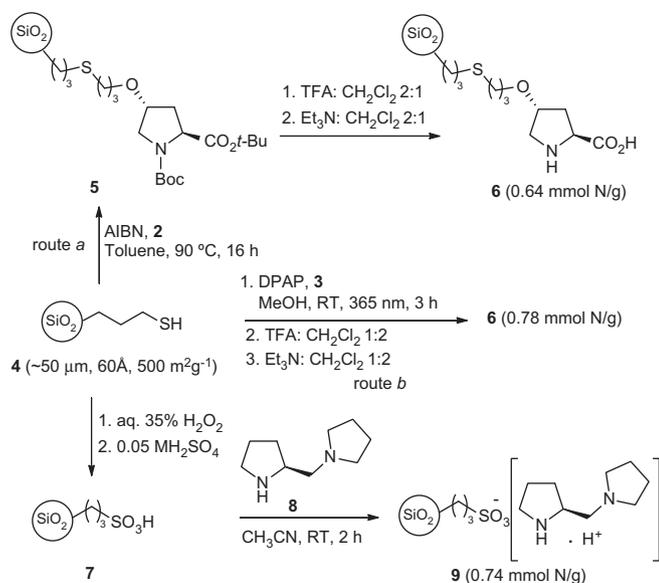
available (2*S*,4*R*)-*N*-Boc-4-hydroxyproline **1** (Scheme 1).<sup>8</sup> The thermally induced TEC of **2** (3 equiv) with commercial 3-mercaptopropyl silica **4** was next performed by using 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN, 1 equiv) as the radical initiator and toluene as the solvent (Scheme 2, route a).<sup>9</sup> Full conversion into the adduct **5** was achieved under vigorous magnetic stirring at 90 °C in 20 h as established by FT-IR analysis (disappearance of the SH stretching band at 2577 cm<sup>-1</sup>). The corresponding photochemically initiated TEC was also investigated with the aim to set up a milder procedure for proline immobilization. Indeed, the photoinduced (365 nm) TEC of **4** with **3** (3 equiv) proceeded smoothly (25 °C, 3 h) in MeOH in the presence of 2,2-dimethoxy-2-phenyl-acetophenone (DMPAP) as the sensitizer (Scheme 2, route b).<sup>10</sup>



Scheme 1. Synthesis of 4-*O*-allyl-hydroxyproline derivatives **2** and **3**.

\* Corresponding authors.

E-mail address: msslsn@unife.it (A. Massi).



**Scheme 2.** Thermally and photochemically induced TEC of thiol-silicas **4a** with 4-*O*-allyl-hydroxyproline derivatives **2** and **3**.

Considering the final deprotection step, it should be noted that the harsher acid conditions required for simultaneous Boc and *t*-butyl ester removal (route *a*) resulted in the partial loss (elemental analysis) of supported proline, thus confirming route *b* as the optimal synthetic strategy toward the covalently proline-functionalized silica **6**. In a divergent approach, the non-covalently supported chiral amine catalyst **9** was readily prepared from commercial thiol-silica **4** and (*S*)-(+)-1-(2-pyrroldinylmethyl)-pyrrolidine **8** by adapting a two-step procedure already reported for chiral amine catalysts supported on polystyrene resins.<sup>11</sup>

Activity and stability of covalently and non-covalently anchored organocatalysts **6** and **9** were first evaluated under batch conditions in different solvents by using the aldol condensation of cyclohexanone with *p*-nitro benzaldehyde as a benchmark (Table 1). To our delight, we found that catalyst **6** efficiently

**Table 1**  
Optimization of catalysts **6** and **9** performance under batch conditions<sup>a</sup>

Entry	Cat.	Solvent	Yield <sup>b</sup> (%)	dr <i>anti/syn</i> <sup>c</sup>	ee <sub>anti</sub> <sup>d</sup> (%)
1	<b>6</b>	DMSO	25	2:1	46
2	<b>6</b>	CH <sub>3</sub> CN	52(31) <sup>e</sup>	3:1(3:1) <sup>e</sup>	42(42) <sup>e</sup>
3	<b>6</b>	DMF	11	1:1	32
4	<b>6</b>	H <sub>2</sub> O	32	2:1	40
5	<b>6</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	16	3:1	55
6	<b>6</b>	Toluene	67(65) <sup>e</sup>	4:1(4:1) <sup>e</sup>	78(78) <sup>e</sup>
7	<b>10</b> <sup>f</sup>	Toluene	<5	—	—
8	<b>9</b>	DMSO	92	1.5:1	52
9	<b>9</b>	CH <sub>3</sub> CN	52	2.5:1	5
10	<b>9</b>	DMF	95	2:1	45
11	<b>9</b>	H <sub>2</sub> O	78	2:1	38
12	<b>9</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	44	3:1	47
13	<b>9</b>	Toluene	>95(92) <sup>e</sup>	2:1(2:1) <sup>e</sup>	55(52) <sup>e</sup>
14	<b>7</b>	Toluene	60	4:1	—

<sup>a</sup> Reactions performed in the stated solvent with 0.25 mmol of aldehyde (0.25 M) and 0.75 mmol of ketone.

<sup>b</sup> Isolated yield.

<sup>c</sup> Estimated by <sup>1</sup>H NMR analysis of crude reaction mixtures.

<sup>d</sup> Determined by chiral HPLC analysis.

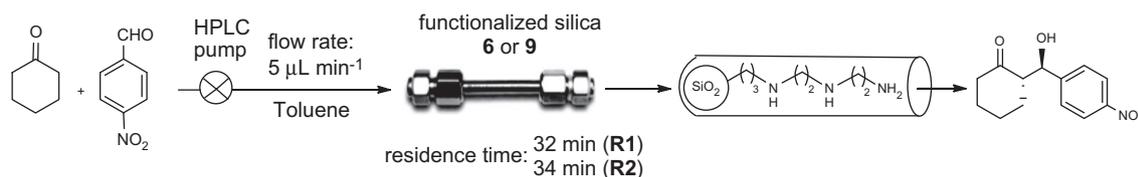
<sup>e</sup> Reactions performed with recycled catalysts.

<sup>f</sup> Catalyst **10** (0.8 mmol/g) prepared by capping the thiol-silica **4** with 1-hexene under the photochemical conditions described in Scheme 2.

promoted the model reaction in the apolar solvent toluene (entry 6), showing levels of activity (67% yield) and stereoselectivity (*anti/syn* = 4:1; 78% ee<sub>anti</sub>) comparable to those observed for homogeneous proline catalysis.<sup>12a,13</sup>

Bearing in mind the execution of a continuous-flow process as the ultimate goal of this study, stability (recyclability) of catalyst **6** was also investigated. A progressive loss of activity was observed with recycled **6** in the polar solvent acetonitrile (entry 2; only data

**Table 2**  
Optimization of continuous-flow aldol reaction in packed-bed microreactors **R1** and **R2**<sup>a</sup>



Entry	Reactor (Cat.)	Aldehyde (c [M])	Ketone (c [M])	Temperature <sup>b</sup> (°C)	Conversion <sup>c</sup> (%)	Productivity <sup>d</sup> (mmol h <sup>-1</sup> mmol <sub>cat</sub> <sup>-1</sup> )	dr <i>anti/syn</i> <sup>e</sup>	ee <sub>anti</sub> <sup>f</sup> (%)
1	<b>R1</b> ( <b>6</b> )	0.22	0.66	25	60	0.43	4:1	78
2	<b>R1</b> ( <b>6</b> )	0.44	0.22	25	18	0.13	3:1	77
3	<b>R1</b> ( <b>6</b> )	0.22	4.8	25	88	0.64	5:1	76
4	<b>R1</b> ( <b>6</b> )	0.22	0.66	0 <sup>g</sup>	38	0.27	5:1	82
5	<b>R1</b> ( <b>6</b> )	0.22	0.66	50	82	0.59	4:1	78
6	<b>R1</b> ( <b>6</b> ) <sup>h</sup>	0.22	0.66	70	>95	—	2:1	72
7	<b>R2</b> ( <b>9</b> )	0.22	0.66	25	50	—	2:1	40

<sup>a</sup> See note 15 for a description of the experimental setup.

<sup>b</sup> All temperatures were measured by a thermometer placed inside the thermostated unit containing the microreactor.

<sup>c</sup> Instant conversion as established by <sup>1</sup>H NMR analysis of the eluate after 2 h reaction time.

<sup>d</sup> Productivities are measured in mmolproduct h<sup>-1</sup> mmolcatalyst<sup>-1</sup>.

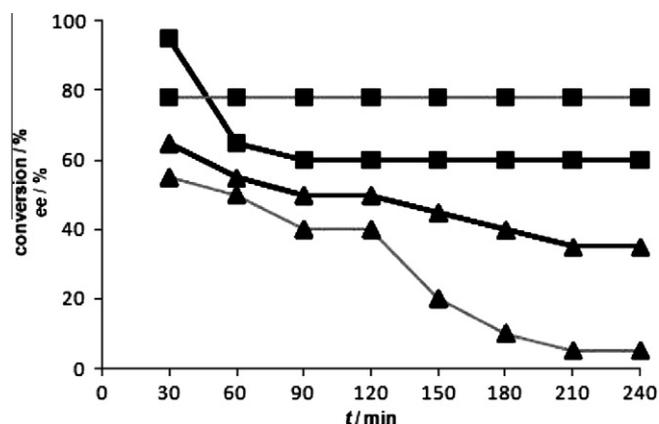
<sup>e</sup> Estimated by <sup>1</sup>H NMR analysis of crude reaction mixtures.

<sup>f</sup> Determined by chiral HPLC analysis.

<sup>g</sup> Microreactor placed in a ice-bath.

<sup>h</sup> Temperature determined a partial degradation of supported catalyst (see main text for discussion).

of the second run are shown), whereas a substantial maintenance of efficiency (yield and stereoselectivity) was detected in toluene (entry 6). This evidence agrees with previous observations by Armstrong, Blackmond and their co-workers on the solvent/additive effect in the irreversible deactivation via decarboxylation of proline or proline-like catalysts in the presence of electron-deficient aromatic aldehydes.<sup>14</sup> Indeed, when the integrity of recycled **6** (entry 2, second run) was checked by FT-IR analysis, a much lower intensity of the carbonyl band ( $1641\text{ cm}^{-1}$ ) was observed. In a parallel solvent screening, toluene resulted to be the best performing for the ionic catalyst **9** as well (entry 13), activity and recyclability of **9** being comparable to those previously detected for polystyrene-supported analogs.<sup>11</sup> Control reactions were also carried out in toluene in the presence of the 1-hexene-capped thiol-silica **10** (entry 7) and sulfonic acid silica **7** (entry 14). These experiments demonstrated the absence of background conversion in the reaction catalyzed by the covalently proline-functionalized silica **6** and highlighted the detrimental effect on stereoselectivity in case of incidental amine leaching from ionic catalyst **9**.



**Figure 1.** Conversion of the model aldol reaction as a function of time (black lines) in microreactors **R1** (■) and **R2** (▲). Enantioselectivity of the *anti*-aldol as a function of time (gray lines) in microreactors **R1** (■) and **R2** (▲).

Continuous-flow experiments were then performed by means of a micro-HPLC suitably adapted for this study with minimized extra-column volumes. Reactors **R1** and **R2** were prepared by filling (packing by gravity) stainless steel columns (50 mm length, 2.1 mm diameter) with silicas **6** and **9**, respectively (Table 2).<sup>15</sup> The hold-up (dead) volumes ( $V_0$ ) of reactors **R1** and **R2** were determined by pycnometry. Residence times were calculated by dividing  $V_0$  by the flow rate. A packed cartridge of commercially available triamine-functionalized silica gel was placed downstream the reactors to selectively remove unreacted *p*-nitro benzaldehyde and thus facilitate isolation of the aldol product. The study on continuous-flow model aldol reaction by using reactor **R1** started with the optimization of flow rate and aldehyde concentration. After some experimentations, the optimal compromise between aldehyde solubility in toluene and conversion efficiency was found by pumping a solution of aldehyde (0.22 M) and cyclohexanone (0.66 M) at  $5\ \mu\text{L min}^{-1}$  (residence time: 32 min). Gratifyingly, the stereoselectivity of the batch process (Table 1, entry 6) was replicated (dr 4:1; 78% ee<sub>anti</sub>, Table 2, entry 1) and maintained constant during the entire flow process (overall time 4 h; Fig. 1).

The working concentrations were chosen by considering the retention behavior of cyclohexanone and *p*-nitro benzaldehyde in **R1**. Under steady-state conditions, the greater affinity of *p*-nitro benzaldehyde for silica **6** (chromatographic retention factor  $k' = 1$  vs  $k' = 0.45$  for the ketone) causes the preferential occupancy of the packing material by this component, thus limiting the formation of the reactive enamine intermediate and lowering the conversion efficiency. This hypothesis seemed to be supported by experiments conducted at different ketone/aldehyde ratios (entries 2 and 3) and by an in depth analysis of the conversion versus process time profile (Fig. 1).

This shows a higher conversion (>95%) for the fraction eluted immediately after the hold-up time (32 min) compared to the steady-state conversion (60%),<sup>16</sup> thus confirming that enamine formation happens at maximum level when the less retained cyclohexanone reacts with the bare immobilized proline (first eluted fraction).<sup>17</sup> The effect of temperature on process efficiency was next investigated. A slight improvement of stereoselectivity (dr 5:1; 82% ee<sub>anti</sub>, entry 4) accompanied by a marked decrease of conversion was observed at 0 °C. Warming the reactor **R1** in

**Table 3**

Optimization of continuous-flow  $\alpha$ -amination reaction in packed-bed microreactors **R1**<sup>a</sup>

Entry	Solvent	Flow rate ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	Temperature <sup>b</sup> (°C)	Productivity <sup>c</sup>	ee <sup>d</sup> (%)
1 <sup>e</sup>	Toluene	25	0	3.60	58
2 <sup>e</sup>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	25	0	3.60	42
3 <sup>f</sup>	CH <sub>3</sub> CN	25	0	1.80	38
4 <sup>e</sup>	DMF	25	0	3.60	52
5 <sup>e</sup>	Toluene	25	25	3.60	55
6 <sup>e</sup>	Toluene	50	25	7.20	55
7 <sup>e</sup>	Toluene	75	25	10.8	55
8 <sup>g</sup>	Toluene	100	25	13.2	55
9 <sup>h</sup>	Toluene	Batch	0	3.33	52

<sup>a</sup> See note 15 for a description of the experimental setup. **R1** fed with 0.22 M DBAD and 0.66 M aldehyde solution in the stated solvent.

<sup>b</sup> Microreactor placed in a ice-bath for processes conducted at 0 °C.

<sup>c</sup> Productivities are measured in  $\text{mmol product h}^{-1} \text{mmol catalyst}^{-1}$ .

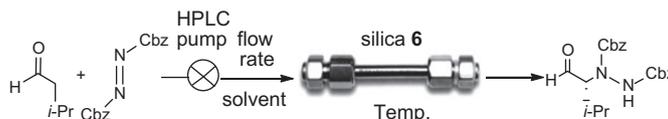
<sup>d</sup> Determined by chiral HPLC analysis.

<sup>e</sup> Instant conversion: >95% (<sup>1</sup>H NMR analysis).

<sup>f</sup> Instant conversion: 50% (<sup>1</sup>H NMR analysis).

<sup>g</sup> Instant conversion: 92% (<sup>1</sup>H NMR analysis).

<sup>h</sup> Reaction performed with 0.25 mmol of DBAD (0.25 M), 0.75 mmol of aldehyde, and 10 mol % of **6**. Full conversion after 3 h.



the HPLC column oven set at 50 °C produced an improvement of conversion from 60% to 82% without altering the stereoselectivity of the process (entry 5). Unfortunately, a further increase of temperature (70 °C; entry 6) resulted in a fast (ca. 2.5 h) degradation of packed-bed material, which occurred very likely through decarboxylation of supported proline as indicated by FT-IR analysis of the recovered packing silica. In a parallel investigation, the long-term stability of the covalent packed-bed **6** was also considered, this issue being a key point for the development of effective continuous-flow processes. Gratifyingly, silica **6** did not show any deactivation in terms of productivity and selectivity at ambient temperature for at least 24 h, whereas a progressive decreasing yield with maintenance of stereoselectivity was observed after that time (catalyst fully deactivated after 72 h on stream). Next we focused our attention on microreactor **R2** filled with the ionic silica **9** (entry 7). Degradation of packed-bed catalytic activity took place under flow conditions within 2 h owing to gradual amine **8** leaching as confirmed by MS analysis of eluate samples. The racemic background conversion, in fact, became predominant after that time, thus determining a progressive loss of enantioselectivity of the process (Fig. 1).

To broaden the scope of the methodology and reach higher levels of productivity, the implementation of the fast proline-catalyzed  $\alpha$ -amination reaction<sup>12b,c</sup> of isovaleraldehyde with dibenzyl azodicarboxylate (DBAD) in microreactor **R1** was also investigated.<sup>15</sup> After a fast (non exhaustive) solvent screening carried out under flow conditions (Table 3, entries 1–4), toluene was again selected as the optimal solvent (entry 1). Full conversion was achieved at 0 °C with a 5-fold faster flow rate (25  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) than previous aldol reaction (entry 1). Quite surprisingly, the enantioselectivity of the flow process (58% ee of the  $\alpha$ -hydrazino alcohol generated in situ by  $\text{NaBH}_4$  reduction of the product aldehyde) was noticeably lower compared to that of similar proline-catalyzed homogeneous reactions.<sup>12b,c</sup> Fortunately, conducting the model  $\alpha$ -amination at ambient temperature left the stereoselectivity of the process almost unchanged (entry 5). On the other hand, complete conversions could be also achieved at 25 °C with higher flow rates (up to 75  $\mu\text{L min}^{-1}$ , entries 6 and 7), thus further increasing the productivity of the flow process (10.8  $\text{mmol h}^{-1} \text{mol}_{\text{cat}}^{-1}$ ; ca. three times greater than the batch process, entry 9).

In conclusion, we have demonstrated here the potential of packed-bed microreactors filled with covalently silica supported proline to produce chiral targets under flow regime in a stereoselective manner and with a facilitated post reaction phase (workup and purification). Actually, these features along with direct scalability are important prerequisites of a synthetic process for its industrial applications. The proof-of-principle results reported herein are currently being extended to proline-like organocatalysts with extended lifecycle and to other organocatalytic processes.

## Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Italian Ministry of University and Scientific Research (Progetto FIRB Chem-Profarma-Net Grant RBPR05NWWC 008) for financial supports. Thanks are also given to Professor F. Dondi for useful discussion and support, to Mr. P. Formaglio for NMR experiments and to Professor A. Marchi and Mr. M. Fratta for elemental analyses. We also acknowledge Eka Chemicals for the kind donation of Kromasil silica gel.

## References and notes

- (a) *Enantioselective Organocatalysis*; Dalko, P. I., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2007; (b) *Chem. Rev. (List, B. Guest Ed.)* **2007**, *107*, 5413; (c) Dondoni, A.; Massi, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 4638–4670.
- (a) Baxendale, I. R.; Hayward, J. J.; Lanners, S.; Ley, S. V.; Smith, C. D. In *Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis*; Wirth, T., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008; pp 84–122. Chapter 4.2; (b) Mason, B. P.; Price, K. E.; Steinbacher, J. L.; Bogdan, A. R.; McQuade, D. T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2300–2318; (c) Geyer, K.; Gustafsson, T.; Seeberger, P. H. *Synlett* **2009**, *15*, 2382–2391.
- (a) Kirschning, A.; Solodenko, W.; Mennecke, K. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 5972–5990; (b) El Kadib, A.; Chimenton, R.; Sachse, A.; Fajula, F.; Galarneau, A.; Coq, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4969–4972; (c) Valera, F. E.; Quaranta, M.; Moran, A.; Blacker, J.; Armstrong, A.; Cabral, J. T.; Blackmond, D. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 2478–2485.
- Odedra, A.; Seeberger, P. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 2699–2702. For a critical analysis of this study, see Ref. 3c.
- Alza, E.; Rodríguez-Escrich, C.; Sayalero, S.; Bastero, A.; Pericàs, M. A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10167–10172.
- (a) Nikbin, N.; Watts, P. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 942–944; (b) Phan, N. T. S.; Brown, D. H.; Styring, P. *Green Chem.* **2004**, *6*, 526–532.
- (a) Lowe, A. B. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17–36; (b) Jonkheijm, P.; Weinrich, D.; Köhn, M.; Engelkamp, H.; Christianen, P. C. M.; Kuhlmann, J.; Maan, J. C.; Nüsse, D.; Schroeder, H.; Wacker, R.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 4421–4424.
- Compound **2**:  $[\alpha]_{\text{D}} = -26.6$  (c 0.6,  $\text{CHCl}_3$ ). Compound **3**:  $[\alpha]_{\text{D}} = -66.3$  (c 0.9,  $\text{CHCl}_3$ ).
- In a similar approach, a styrene functionalized proline derivative was thermally coupled with a mercaptomethyl polystyrene resin: Gruttadauria, M.; Giacalone, F.; Mossuto Marculescu, A.; Riela, S.; Noto, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 4688–4698.
- Massi, A.; Pandoli, O.; Cavazzini, A.; Del Zoppo, L.; Giovannini, P. P.; Bendazzoli, C. Italian Patent, Deposit 01. 03. 2010, No. BO2010A000119.
- Luo, S.; Li, J.; Zhang, L.; Xu, H.; Cheng, J.-P. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1273–1281.
- (a) Notz, W.; Tanaka, F.; Barbas, C. F., III *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 580–591; (b) List, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5656–5657; (c) Bøgevig, A.; Juhl, K.; Kumaragurubaran, N.; Zhuang, W.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1790–1793.
- Under optimized conditions (Table 1, entry 6), the aldol reaction of cyclohexanone with the electron-rich *p*-methoxy benzaldehyde gave the corresponding adduct in lower yield (15%). Hence, the optimization study was continued with the more reactive *p*-nitro benzaldehyde acceptor.
- Zotova, N.; Franzke, A.; Armstrong, A.; Blackmond, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15100–15101.
- Description of the experimental setup for the continuous-flow processes.* The system used for continuous-flow reactions was composed of an HPLC pump (Agilent 1100 micro series), an in-line pressure transducer, a thermostated microreactor holder (Peltier unit), and either reactor **R1** or **R2** (containing 117 mg and 70 mg of packing material, respectively). In case of aldol reactions, a glass Omnifit<sup>®</sup> column containing triamine-functionalized silica gel (500 mg,  $\sim 1.3 \text{ mmol g}^{-1}$ ) was placed downstream the reactor. *Continuous-flow model aldol reaction* (Table 2, entry 1). Microreactor **R1** was fed with a 0.22 M aldehyde and 0.66 M ketone solution in toluene and operated for 8 h (under steady state conditions) at 5  $\mu\text{L/min}$ . The collected solution was concentrated to give the pure adduct (78 mg, 60%) as a 4:1 mixture of *anti* and *syn* diastereoisomers ( $\text{ee}_{\text{anti}} = 78\%$ ). Chiral HPLC analysis: Lux-1 Cellulose (hexanes/*i*-PrOH 90:10 v/v, 200  $\mu\text{L min}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ );  $t_{\text{R}}$  (major) = 10.9 min;  $t_{\text{R}}$  (minor) = 14.6. *Continuous-flow model  $\alpha$ -amination reaction* (Table 3, entry 7). Microreactor **R1** was fed with a 0.22 M DBAD and 0.66 M aldehyde solution in toluene and operated for 8 h (under steady state conditions) at 75  $\mu\text{L/min}$  (25 °C). The collected solution was kept at 0 °C and then diluted with EtOH (40 mL). To the resulting stirred, cooled (0 °C) mixture was then added  $\text{NaBH}_4$  (629 mg, 16.6 mmol) in one portion. The mixture was stirred at 0 °C for an additional 30 min, then diluted with saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (25 mL), filtered over a pad of Celite, and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $2 \times 125 \text{ mL}$ ). The combined organic phases were dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), concentrated, and eluted from a column of silica gel with 4:1 cyclohexane–AcOEt to give the target  $\alpha$ -hydrazino alcohol (2.75 g, 90%,  $\text{ee} = 55\%$ ). Chiral HPLC analysis: Lux-1 Cellulose (hexanes/*i*-PrOH 90:10 v/v, 200  $\mu\text{L min}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$ );  $t_{\text{R}}$  (major) = 9.9 min;  $t_{\text{R}}$  (minor) = 10.9.
- For all packed-bed microreactors prepared the steady-state was reached within 60 min process time.
- The prior coverage of silica surface by flowing a 0.66 M solution of cyclohexanone before feeding **R1** under optimized conditions (see note 15) produced, in steady state regime, the same results of entry 1 (Table 2).

*“Non è facile citare e ringraziare, in poche righe, tutte le persone che mi hanno accolto in questa bellissima città e mi hanno accompagnato in questo cammino di crescita scientifica e soprattutto personale: chi con una collaborazione costante, chi con un supporto morale e/o materiale, chi con consigli e suggerimenti o solo con parole di incoraggiamento, sono stati in tanti a dare un contributo fondamentale.*

*Desidero innanzitutto ringraziare il Dottor Remo Guerrini per avermi dato la possibilità di lavorare nel suo affiatato e solido gruppo di ricerca, per i preziosi insegnamenti, che mi ha dato durante questi tre anni di lavoro svolto insieme, per le ore dedicate alla mia tesi e per la stima e fiducia mostratemi; ringrazio sentitamente il Dottor Claudio Trapella, sempre presente e disponibile a dirimere dubbi di qualsiasi natura, da quelli prettamente scientifici a quelli di vita.*

*Ringrazio di cuore tutti miei colleghi che più che colleghi fantastici sono stati compagni di avventura e veri amici, che mi hanno supportato costantemente: la Dott.ssa Erika Marzola, neomamma; la Dott.ssa Michela Pelà; la Dott.ssa Anna Baldisserotto; il Dott. Christian Franceschini; la Dott.ssa Alessandra Scotti; la Dott.ssa Chiara Massarenti.*

*Ho desiderio di ringraziare con affetto il Dott. Alessandro Massi e il Dott. Alberto Cavazzini che mi hanno accolto a Ferrara e sono stati i miei primi “padri scientifici”.*

*Ringrazio sentitamente il Prof. Antonio Gentile, mio “padre di spirito”.*

*Infine ringrazio la mia famiglia e le persone a me più care per il loro amore, che è per me spinta, forza e sostegno costanti”.*