

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIMICHE
XVI CICLO**

**SINTESI STEREOSELETTIVA
DI NUOVI ISOSTERI DI DIPEPTIDI
BASATI SULLA PROLINA**

Dottoranda:

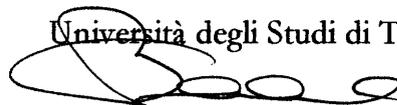
Dott.ssa Francesca Dinon 174

CN

Coordinatore:

Prof. Gian Maria Bonora

Università degli Studi di Trieste



Relatore:

Prof. Fabio Benedetti

Università degli Studi di Trieste



Abstract

La proteasi aspartica del virus HIV-1, agente responsabile dell'AIDS, è sicuramente uno tra gli enzimi attualmente più studiati e conosciuti in termini di struttura e attività. Permettendo la maturazione di nuove particelle infette e quindi il progredire dell'infezione essa svolge un ruolo cruciale nel ciclo replicativo del virus, la sua inibizione rappresenta, quindi, un importante obiettivo farmacologico, che coinvolge diverse discipline.

Nel campo della chimica organica la ricerca di efficaci inibitori peptidomimetici ha dato impulso allo sviluppo di nuove metodologie per la sintesi stereoselettiva di composti contenenti più centri chirali in forma enantiomericamente pura, da usarsi come isosteri dipeptidici per la sintesi di inibitori reversibili.

L'HIV proteasi, a differenza delle altre proteasi aspartiche eucariote, è in grado di idrolizzare legami ammidici aventi la prolina come residuo N-terminale; sulla base di questa specificità in questa tesi di dottorato è stato sviluppato un protocollo per la sintesi stereoselettiva di un nuovo tipo di isosteri diidrossietilenici contenenti un anello pirrolidinico, mediante ciclizzazione altamente regio- e stereoselettiva di un'epossiammina, che a sua volta deriva da un amminoacido. L'anello eterociclico si forma mediante deprotezione selettiva (idrogenolisi di un gruppo Cbz) di un gruppo amminico primario in posizione ω , introdotto mediante il *Riarrangiamento di Curtius* di un'acil azide.

I diamminodioli ottenuti contengono quattro centri chirali adiacenti, il primo dei quali deriva dall'amminoacido di partenza, mentre la configurazione assoluta degli altri tre è controllata dall'induzione asimmetrica. Seguendo questo nuovo protocollo sono stati sintetizzati isosteri Val-Pro e Phe-Pro a configurazione (S,S,S,S) e isosteri Phe-Pro (S,R,R,S) e (S,R,R,R).

L'isostere Phe-Pro (S,S,S,S) è stato utilizzato per la sintesi di un piccolo set di inibitori peptidomimetici le cui catene peptidiche laterali sono state scelte mediante uno studio di molecular modeling e sintetizzate secondo i protocolli standard della sintesi peptidica. L'attività biologica degli inibitori valutata seguendo l'idrolisi di substrati fluorogenici, è a livello nanomolare e subnanomolare per i migliori inibitori sintetizzati.

Indice

Parte Prima: Introduzione

1. La sindrome da immunodeficienza acquisita	5
1.1 La scoperta del virus HIV	5
1.2 La struttura del virus HIV	7
1.3 Ciclo replicativo del virus HIV	8
1.4 Strategie terapeutiche	11
1.4.1 <i>Inibitori della trascrittasi inversa (RTI)</i>	12
1.4.2 <i>Inibitori della proteasi (PI)</i>	14
1.5 La terapia HAART	15
1.5.1 <i>Effetti collaterali</i>	17
1.5.2 <i>Resistenza ai farmaci</i>	17
1.5.3 <i>Compliance</i>	19
2. La proteasi aspartica del virus HIV-1	20
2.1 Le proteasi ed il loro ruolo biologico	20
2.2 Le proteasi aspartiche	21
2.3 La proteasi da HIV (HIV-PR)	22
2.3.1 <i>Struttura tridimensionale</i>	23
2.3.2 <i>Subsiti del sito catalitico</i>	26
2.3.3 <i>Meccanismo di idrolisi</i>	27
2.3.4 <i>Specificità dell'enzima</i>	29
2.4 Strategie di inibizione	30
2.4.1 <i>Inibitori dell'HIV-proteasi</i>	31
2.5 Drug Design e Inibitori della HIV-PR	33
2.5.1 <i>Il Saquinavir</i>	34
3. Sintesi di isosteri dipeptidici	39
3.1 Isosteri diidrossietilenici	39
3.1.1 <i>Reazioni di condensazione di α-amminoaldeidi</i>	40
3.1.2 <i>Sintesi a partire da zuccheri</i>	42
3.1.3 <i>Sintesi a partire dall'acido tartarico</i>	44

3.1.4 <i>Diamminodioli da amminocidi naturali</i>	45
3.2 Isosteri basati sulla prolina	47
Parte seconda: Risultati e discussione	
4. Sintesi di diamminodioli basati sulla prolina	56
4.1 introduzione	56
4.2 Sintesi di isosteri Val-Pro e Phe-Pro a stereochimica (S,S,S,S)	58
4.2.1 <i>Analisi retrosintetica</i>	58
4.2.2 <i>Sintesi da 4-amminobutirraldeide</i>	60
4.2.3 <i>Sintesi dal δ-valerolattone</i>	62
4.3 Sintesi di isosteri Phe-Pro a stereochimica (S,R,R,R) e (S,R,R,S)	71
4.3.1 <i>Sintesi dell'epossiammina (S,R,R,R)</i>	73
4.3.2 <i>Approccio alternativo alla sintesi dell'isostere Phe-Pro (S,R,R,R)</i>	78
4.3.3 <i>Sintesi dell'isostere Phe-Pro (S,R,R,S)</i>	82
4.4 Verso la sintesi di un isostere del dipeptide Pro-Pro	84
5. Progettazione sintesi e valutazione dell'attività biologica di nuovi inibitori peptidomimetici della HIV-proteasi	88
5.1 <i>Structure-Based Drug Design</i> e progettazione di inibitori della HIV-PR	90
5.1.1 <i>Energie di complessazione stimate</i>	91
5.1.2 <i>Calcolo diretto dell'energia libera di complessazione</i>	97
5.1.3 <i>Il metodo FEP</i>	98
5.1.4 <i>Il metodo LIE</i>	99
5.2 Costruzione del modello e primo screening	102
5.3 Sintesi di nuovi inibitori basati sull'isostere Phe-Pro (S,S,S,S)	109
5.4 Valutazione dell'attività biologica	111
6. Parte Sperimentale	116

PARTE PRIMA: INTRODUZIONE

1. La sindrome da immunodeficienza acquisita

1.1 La scoperta del virus HIV

Quaranta milioni di contagiati nel mondo e più di ventidue milioni di morti negli ultimi vent'anni (dati UNIAIDS 2003): questi numeri da soli bastano a spiegare come l'AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita) possa essere considerata una delle più grandi pandemie nella storia della medicina moderna.¹

Nel 1981 venne descritta clinicamente una nuova sindrome dal decorso maligno, non ascrivibile ad alcuna malattia nota fino ad allora.² Il decesso dei soggetti colpiti era causato dall'insorgenza di rare neoplasie (come il *sarcoma di Kaposi*, forma tumorale a carico dei vasi sanguigni) e di infezioni opportunistiche causate, ad esempio, da protozoi comuni ma generalmente innocui (come il *Pneumocystis carinii* o la *Candida albicans*).³

La drastica diminuzione dei linfociti T4 osservata nel sangue dei pazienti fece subito pensare che la causa della malattia fosse una grave compromissione del sistema immunitario. La sindrome venne individuata in diverse categorie di persone, principalmente giovani maschi omosessuali, tossicodipendenti, emofiliaci, neonati e individui soggetti a trasfusioni di sangue. Fu quindi chiaro che l'agente patogeno era presente nel sangue, nel plasma e nel liquido seminale e che la trasmissione aveva luogo mediante contatto sessuale o per contaminazione con sangue infetto. Nel 1982 la nuova malattia venne ufficialmente definita *sindrome da immunodeficienza acquisita* (AIDS).

La modalità di trasmissione della sindrome ed il suo effetto sul sistema immunitario dei malati erano molto simili a quelli osservati nei casi di infezione da retrovirus umani HTLV-1 e HTLV-2 responsabili della leucemia e isolati per la prima volta dal gruppo di Robert Gallo tra la fine degli anni Settanta e l'inizio degli anni Ottanta.⁴ Nel 1983 i gruppi di Luc Montagnier in Francia e di Robert Gallo

¹ Gallo, R.C. ; Montagnier, L. *Science* **2002**, *298*, 1730.

² Gottlieb M. S.; Schroff R.; Schanker H. M.; Weisman J. D.; Fan P. T.; Wolf R. A.; Saxon A N. *Engl. J. Med.* **1981**, *305*, 1425.

³ Prusiner, S.B. *Science* **2002**, *298*, 1726.

⁴ Gallo, R.C. *Science* **2002**, *298*, 1728.

negli Stati Uniti individuarono nel sangue dei pazienti colpiti da AIDS la presenza di un nuovo retrovirus diverso da quelli conosciuti;⁵ tale retrovirus, oggi noto come HIV-1, venne isolato e riconosciuto come causa della malattia nel 1984.⁶ Ciò permise il rapido sviluppo di un test per la sua individuazione nel sangue, una riduzione dei rischi di contagio mediante trasfusione ed il monitoraggio dei pazienti infetti. Nel 1986 venne isolato anche un secondo tipo di virus HIV, detto HIV-2.⁷

In breve tempo l'AIDS raggiunse proporzioni epidemiche in tutto il mondo e negli anni successivi si intensificarono sia gli studi sulla struttura e sul meccanismo di azione del virus sia quelli volti alla messa a punto di un'efficace terapia antiretrovirale.⁸ La U.S. Food and Drug Administration (FDA) approvò nel 1986 il primo farmaco anti-HIV, l'AZT, capace di prolungare di qualche anno la vita dei malati e che è ancora oggi alla base della terapia anti-AIDS.

Una più approfondita conoscenza della struttura molecolare del virus e del suo ciclo replicativo portò, nel 1995, all'approvazione dei primi inibitori della proteasi (PI) e degli inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI), il cui impiego in combinazione con l'AZT ha determinato un'effettiva riduzione tanto nella mortalità dei pazienti quanto nell'insorgenza di infezioni opportunistiche e neoplasie.⁹ Tuttavia, nonostante i numerosi progressi compiuti negli ultimi dieci anni, non esiste ancora una cura definitiva per questa malattia, la cui incidenza, contrariamente a quanto accade in Europa e Nord America, è in costante e rapido aumento soprattutto nei paesi in via di sviluppo (Asia, Africa Sub-Sahariana e Sud America) minacciando di diventare anche un concreto fattore di destabilizzazione politica e sociale. In questi paesi l'elevato costo della terapia (circa 10000\$ all'anno) e la mancanza di infrastrutture per la cura dei malati fa sì che solo una ridottissima parte della popolazione infetta possa avere accesso alle cure. Lo sviluppo di farmaci

⁵ (a) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. *Science* **1983**, *220*, 868. (b) Gallo, R.C.; Sarin, P. S.; Gelmann, E. P.; Robert-Guroff, M.; Richardson, E.; Kalyanaraman, V. S.; Mann, D.; Sidhu, G. D.; Stahl, R. E.; Zolla-Pazner, S.; Leibowitch, J.; Popovic, M. *Science* **1983**, *220*, 865. (c) Gallo, R.C.; Montaigner, L. *Sci. Am.* **1988**, *259*, 40.

⁶ R. Kulstad Ed., *AIDS: Papers from science 1982-1985 (AAAS, Washington, DC) 1986*.

⁷ Clavel, F.; Guetard, D.; Brun-Vezinet, F.; Chamaret, S.; Rey, M. A.; Santos-Ferreira, O. *Science* **1986**, *233*, 343.

⁸ Gallo, R.C. *Immunol. Rev.* **2002**, *185*, 236.

⁹ Rubbert, A.; Ostrowski, M. In *HIV Medicine 2003*; Hoffmann, C.; Kamps, B.S., Ed.; Flying Publisher, 15-45.

più efficaci e la possibilità di ottenere al più presto un vaccino costituiscono al momento gli obiettivi primari della ricerca per contrastare il dilagare dell'infezione.

1.2 Struttura del virus HIV

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

Il virus HIV ha una struttura sferica del diametro di 100 nm ed è costituito da un involucro lipo-proteico, simile alla membrana citoplasmatica delle cellule umane, e da un nucleo. Ciascuna particella virale contiene 72 complessi glicoproteici integrati nella membrana lipidica composti da trimeri di una glicoproteina esterna (gp120), da una proteina transmembrana (gp41) ed una proteina della matrice (p17) ancorata nella parte interna della membrana. Il nucleo è un capsido proteico costituito da un polipeptide (p24) contenente due filamenti identici di RNA ciascuno dei quali associato alla nucleoproteina p7 ed alla trascrittasi inversa p66. All'interno del capsido proteico sono contenuti anche i tre enzimi necessari alla replicazione del virus: la trascrittasi inversa (RT) p66, l'integrasi (IN) p32 e la proteasi (PR) p11¹⁰ (fig 1.1).

¹⁰ (a) Volker, E.J. *J. Chem. Ed.* **1993**, *70*, 3. (b) Gelderblom, H.R.; Gentile, M.; Scheidler, A.; Ozel, M.; Pauli, G. *Zur Struktur und Funktion bei HIV*, *AIFO* **1993**, *5*, 231. (c) Hoffmann, C.; Kamps, B.S., Ed.; *HIV Medicine 2003*, Flying Publisher.

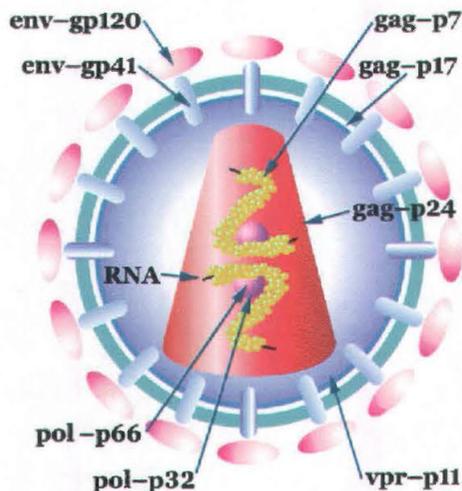


Figura 1.1: rappresentazione schematica del virus HIV-1

1.3 Ciclo replicativo del virus HIV

Il bersaglio favorito del virus è il linfocita T4, la cui diminuzione e compromissione all'interno del sistema immunitario causa la distruzione delle difese immunitarie riscontrabile nei malati di AIDS. L'HIV riconosce specificamente la proteina CD4, presente sulla superficie di circa il 60% dei linfociti T; l'interazione fra la proteina CD4 e la proteina gp120 del virus permette alla proteina gp41 di perforare il doppio strato lipidico della cellula. In questo modo le membrane virali e cellulari possono fondersi e il capsidico proteico può penetrare all'interno del citoplasma¹¹ dove la trascrittasi inversa, enzima presente unicamente nei retrovirus, sintetizza una copia di DNA sullo stampo dell'RNA. L'integrasi virale inserisce nel genoma della cellula ospite il doppio filamento di DNA che si replicherà ogni volta che la cellula andrà incontro a divisione.¹²

La maggior parte dell'informazione genetica dell'HIV è contenuta nei geni *gag*, *pol*, *env*, organizzazione tipica questa, riscontrabile in tutti i retrovirus. I geni *gag* ed *env* codificano per le glicoproteine della membrana virale e per quelle del capsidico nucleare, mentre il gene *pol* codifica per la trascrittasi inversa e gli altri due enzimi. Il virus HIV-1 contiene altri sei geni (*vif*, *vpr*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef*) che hanno una funzione regolativa del ciclo di replicazione e sono responsabili della varietà di

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

comportamenti che può assumere l'HIV integrato. Il virus può rimanere silente con formazione di poche particelle e distruzione di poche cellule oppure manifestarsi come infezione persistente: è infatti la stimolazione immunologica subita dal linfocita a seguito dell'incontro con l'antigene a determinare la velocità di replicazione e di produzione di nuovi virioni.¹³

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

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

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

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

1.4 Strategie terapeutiche

In linea generale, una terapia anti-infettiva efficiente deve eliminare l'agente patogeno o impedirne la proliferazione senza interferire con i meccanismi fisiologici dell'organismo ospite. Poiché non esiste ancora una cura definitiva per l'AIDS lo scopo principale della terapia antivirale è quello di prolungare la vita del paziente garantendo, per quanto possibile, un'alta qualità della sua vita, riducendo al minimo sia l'insorgenza di infezioni opportunistiche che gli effetti collaterali dei farmaci.¹⁴ Nel caso dell'HIV la ricerca di sostanze in grado di inibire selettivamente il ciclo di replicazione senza danneggiare la cellula ospite è resa particolarmente difficoltosa dal fatto che il virus viene integrato nel genoma dell'ospite sfruttandone anche l'apparato sintetico ed enzimatico.

Ogni passaggio del ciclo replicativo potrebbe, almeno in teoria, costituire il bersaglio per una cura efficiente.¹⁵ Al momento in commercio sono disponibili tre classi di farmaci per il trattamento dell'infezione da HIV: inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI), inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI) e inibitori della proteasi (PI), disponibili sia in formulazioni individuali che in combinazione con altri agenti retrovirali.¹⁶

L'integrasi, l'enzima che permette l'inserimento del DNA virale nel genoma della cellula ospite, rappresenta un altro ottimo bersaglio per una terapia mirata,¹⁷ non essendoci prove dell'esistenza di enzimi con funzione analoga all'interno delle cellule umane. Tuttavia i dati riguardanti la struttura di questo enzima sono tuttora frammentari e i progressi nella messa a punto di inibitori sono molto limitati;¹⁸ per questa ragione tutti i farmaci di questo tipo apparsi sul mercato negli ultimi anni sono stati rapidamente ritirati.¹⁹

Studi preliminari hanno recentemente mostrato risultati molto incoraggianti per quanto riguarda una nuova classe di farmaci, detti "inibitori dell'entrata" (EI), la cui

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

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

¹⁶ Hoffmann, C. In *HIV Medicine 2003*; Hoffmann, C.; Kamps, B.S. Ed.; Flying Publisher, 53.

¹⁷ Nair, V. *Rev. Med. Virol.* **2002**, *12*, 179.

¹⁸ (a) Bujacz, G.; Alexandratos, J.; Zhou-Liu, Q. *FEBS Lett.* **1996**, *398*, 175. (b) Chen, J.C.; Krucinski, J.; Miercke, L.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 8233.

¹⁹ Debyser, Z.; Cherepanov, P.; Van Maele, B. *Antivir. Chem. Chemother.* **2002**, *13*, 1.

funzione è appunto quella di impedire l'entrata del virus nei linfociti T e quindi la sua replicazione. L'ingresso dell'HIV nella cellula può essere bloccato sia a livello del legame tra il recettore CD4 e la proteina di membrana gp120, sia a livello delle interazioni che permettono la fusione tra le membrane.²⁰

1.4.1 Inibitori della trascrittasi inversa (RTI)

I primi farmaci ad essere approvati per il trattamento clinico dell'AIDS furono gli inibitori nucleosidici (NRTIs) della trascrittasi inversa che vennero scoperti ed utilizzati ancora prima che fosse nota la struttura cristallografica completa dell'enzima, basandosi solo sulla conoscenza del suo meccanismo di azione e saggiando l'attività anti-HIV di composti già noti.²¹ La struttura di queste molecole differisce da quella dei nucleosidi per la mancanza di un ossidrile nelle posizioni 2' o 3', oppure per la sostituzione di questo con un diverso gruppo funzionale (un'azide nel caso dell'AZT). Il loro inserimento nel filamento di DNA virale in crescita impedisce la formazione di un legame 3'-5' fosfodiesterico e quindi un ulteriore allungamento della catena. Questa classe di composti comprende analoghi della timidina quali la zidovudina (ZDV o AZT) e la stavudina (d4T), la didanosina (ddi), un analogo dell'inosina che viene convertito nella dideossiadenosina e analoghi della citidina quali la zalcitabina (ddc) e la lamivudina (3TC) (fig. 1.2).

²⁰ (a) LaBranche, C. C.; Galasso, G.; Moore J. P.; Bolognesi, D. P.; Hirsch, M. S.; Hammer, S. M. *Antivir. Res.* **2001**, *50*, 95. (b) Palani, A.; Shapiro, S.; Josien, H.; Bara, T.; Clader, J. W.; Greenlee, W. J.; Cox, K.; Strizki, J. M.; Baroudy, B. M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3143. (c) Clotet, B.; Lazzarin, A.; Cooper, D. *Abstract LbOr19A*, XIV International AIDS Conference **2002**, Barcellona Spain. (d) Lin, P.F. *Abstract 9 e 10*, 9th CROI **2002**, Seattle, USA.

²¹ Kohlstaedt, L. A.; Wang, J.; Friedman, J. M.; Rice, P. A.; Steitz, T. A. *Science* **1992**, *256*, 1783.

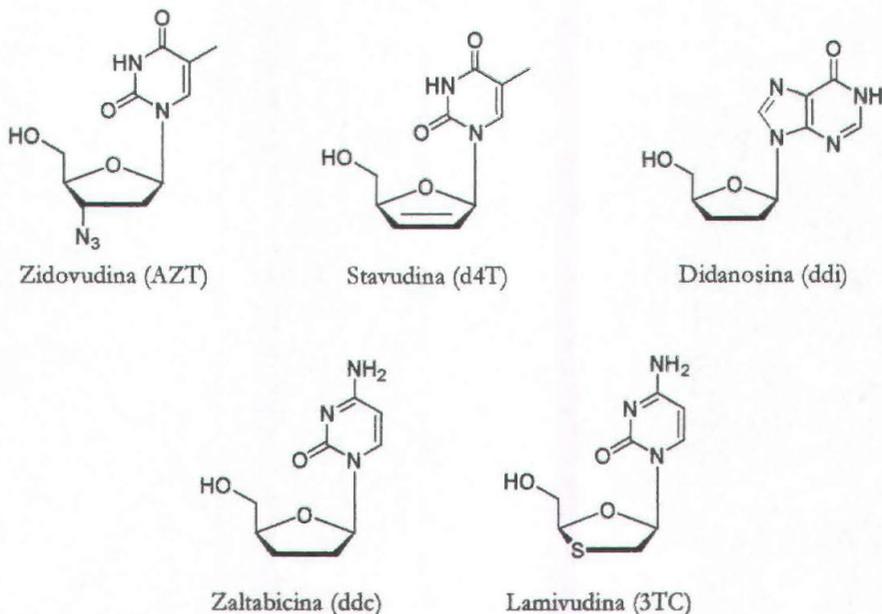


Figura 1.2: Principali inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI)

Gli analoghi nucleosidici si legano nel sito attivo rendendolo inaccessibile al substrato; sono caratterizzati da un'elevata biodisponibilità ed il loro impiego è alla base di qualsiasi terapia anti-AIDS anche in combinazione con altri antiretrovirali. L'elevata attività antivirale ha dimostrato il ruolo cruciale svolto dalla trascrittasi inversa nel ciclo replicativo ed ha portato allo sviluppo e all'impiego clinico di una nuova serie di inibitori non-nucleosidici (NNRTI). Questi composti, tra cui Efavirenz, Nevirapin, Delavirdin (fig. 1.3), si legano all'enzima in modo non competitivo, in una posizione adiacente al sito in cui ha luogo la polimerizzazione dei nucleosidi. Nel complesso risultante la forma del sito attivo viene modificata ed il processo di trascrizione dell'RNA virale risulta significativamente rallentato.²²

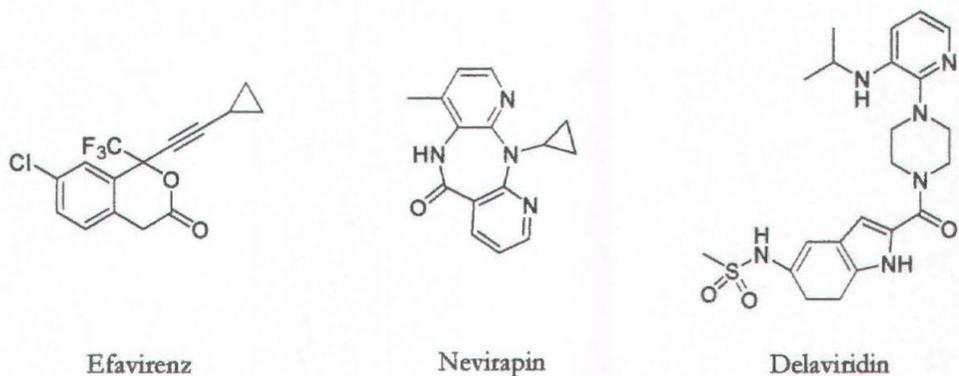


Figura 1.3: Principali inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI)

²² Tomasselli, A. G.; Heinrikson, R. L. *Biochim. Biophys Acta* 2000, 1477, 189.

Gli NNRTI si sono dimostrati particolarmente efficaci soprattutto nei trattamenti combinati: si è osservato, infatti, che il loro impiego come agente monoterapico determina un rapido sviluppo di resistenza.²³

1.4.2 Inibitori della proteasi

L'idrolisi delle poliproteine da parte della proteasi virale è un passaggio necessario per la formazione di nuove particelle infette; è stato dimostrato che virioni contenenti proteasi cataliticamente inattive non possono giungere a maturazione.²⁴ Il ruolo cruciale svolto da questo enzima nel ciclo replicativo lo rende uno dei bersagli migliori nella terapia anti-HIV.²⁵ L'introduzione degli inibitori della HIV proteasi (PI), nella seconda metà degli anni Novanta, può infatti essere considerato un punto di svolta nello sviluppo di un'efficace terapia anti-AIDS.

Gli inibitori di questa classe si collocano tra i primi esempi efficienti di farmaci la cui struttura è stata progettata razionalmente in base alle caratteristiche del recettore bersaglio. Partendo dalla struttura cristallografica della HIV-PR e dalle conoscenze sugli inibitori di altre proteasi aspartiche e della renina in particolare,²⁶ si sono ottenuti degli inibitori peptidomimetici fortemente complementari con la struttura del sito attivo. Caratteristica peculiare di questi composti è la presenza di un isostere dipeptidico, in grado di mimare lo stato di transizione dell'idrolisi di un legame ammidico, incorporato in una sequenza peptidica troncata, che riproduce, in prossimità del legame scissile, le caratteristiche del substrato originario. L'inibitore viene così riconosciuto all'interno del sito attivo dell'enzima con un'affinità maggiore rispetto al substrato originale, ma l'attività catalitica è impedita dalla presenza dell'isostere non-idrolizzabile.²⁷ Una discussione più approfondita delle caratteristiche strutturali di questi inibitori e delle strategie seguite per la loro progettazione verrà affrontata nel capitolo dedicato alla proteasi aspartica del virus

²³ Staszewski S.; Morales-Ramirez, J.; Tashima, K T. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 1865.

²⁴ Kohl, N. E.; Emini, W. A.; Schleif, L. J.; Davis, L. J.; Davis, J. C.; Heimbach, J. C.; Dixon, R. A. F.; Scolnick, E. M.; Sigal, I. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4686.

²⁵(a)Kramer, R. A.; Schaber, M. D.; Skalka, A. M.; Ganguly, K.; Wong-Staal, F.; Reddy, E. P. *Science* **1986**, *231*, 1580. (b) Huff, J.R. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2305.

²⁶ (a)Vacca, J. P.; Condra, J. H. *Drug. Discov. Today* **1997**, *2*, 261. (b) Wlodawer, A.; Vondrasek, J. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 249. (c) Gago, F. *Drugs* **1999**, *1*, 309.

²⁷ Eron, J. R. *Clin. Infect. Dis.* **2000** **2001**, *30 Suppl 2*, S160.

HIV-1. In figura 1.4 sono riportati i sei farmaci approvati dall'FDA ed attualmente disponibili in commercio.

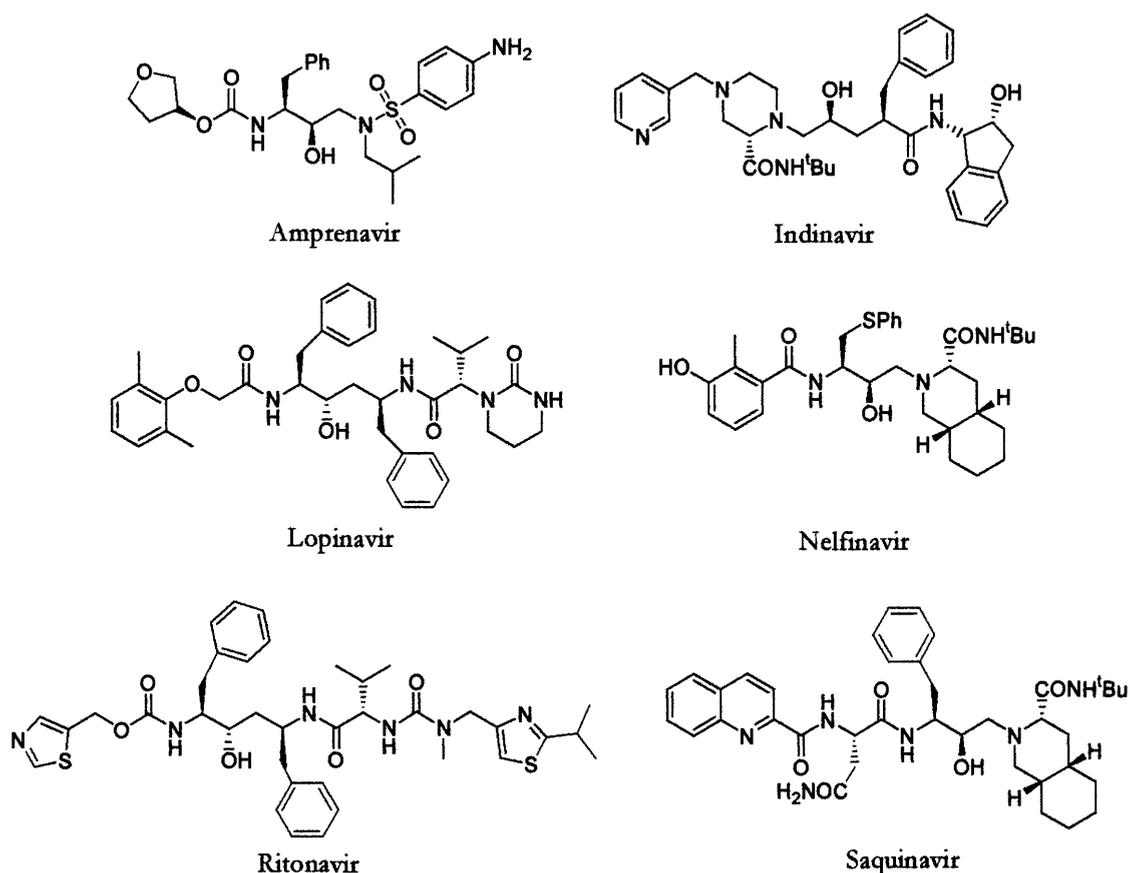


Figura 1.4: Inibitori dell'HIV-proteasi approvati dall'FDA (PI)

1.5 La terapia HAART

La rapidità con cui l'infezione da HIV evolve verso la malattia vera e propria varia molto da soggetto a soggetto: le statistiche riportano che circa il 5% dei sieropositivi si ammala di AIDS nel giro di tre anni, mentre il 12% sviluppa la malattia dopo vent'anni dall'infezione.²⁸ È stato dimostrato che esiste una correlazione diretta tra la quantità di RNA virale, il numero di cellule CD4⁺ (linfociti T4 che presentano la proteina CD4 sulla membrana cellulare esterna) presenti nel plasma e la velocità di progressione della malattia; in particolare, un aumento nel livello di RNA virale ed un calo nel numero di cellule CD4⁺ indicano un rapido

²⁸ (a) Munoz, A.; Xu, J.; *Stat. Med.* **1996**, *15*, 2459. (b) Phair, J.; Jacobson, L.; Detels, R.; Rinaldo, C.; Saah, A.; Schragar, L. J. *Acquired Immune Def. Syndr.* **1992**, *5*, 490. (c) Sheppard, H. W.; Lang, W.; Ascher, M. S.; Vittinghoff, E.; Winkelstein, W. *AIDS* **1993**, *7*, 1159.

progresso dell'AIDS.²⁹ Quale sia il momento migliore per iniziare la terapia antiretrovirale è da sempre materia di un controverso dibattito: il tempestivo ricorso al trattamento farmacologico se da un lato riduce il rischio di sviluppare l'AIDS conclamato e prolunga le aspettative di vita del paziente, dall'altro pone il problema della tossicità a lungo termine dei farmaci e aumenta il rischio di sviluppo di ceppi virali resistenti. Considerati i pesanti effetti collaterali dei trattamenti ed il fatto che una cura definitiva non è disponibile nell'immediato futuro, le linee guida pubblicate, negli Stati Uniti³⁰ e in Gran Bretagna³¹ suggeriscono di non iniziare il trattamento fino a quando la conta delle cellule CD4⁺ nel plasma è superiore a 200/μL.

L'acronimo inglese HAART (*highly active antiretroviral therapy*), coniato al "World AIDS Conference" di Vancouver nel 1996, indica il protocollo terapeutico comunemente adottato per il trattamento dell'infezione da HIV, consistente nella somministrazione di una combinazione di inibitori della proteasi e della trascrittasi inversa;³² tale approccio si è dimostrato capace di mantenere l'RNA virale nel plasma al di sotto del limite di rilevabilità (50 copie/μL) e di elevare la conta dei CD4⁺ ad un valore compreso tra 200/μL e 500/μL. La prova più evidente del rafforzamento del sistema immunitario e quindi del successo della terapia è data dalla drastica diminuzione nell'insorgenza di infezioni opportunistiche, e della mortalità ad esse associata, osservata nei pazienti a partire dal 1995, anno di introduzione del trattamento combinato.³³ Accanto agli indiscutibili miglioramenti apportati alla qualità della vita dei malati vanno comunque considerati anche i pesanti effetti collaterali della terapia antivirale: la tossicità degli inibitori della proteasi, l'insorgenza di resistenze e la *compliance* dei pazienti.

²⁹ (a) Mellors, J. W.; Munoz, A.; Giorgi, J. V.; Margolick, J. B.; Tassoni, C. J.; Gupta, P.; Kingsley, L. A.; Todd, J. A.; Phair, J.; Detels, R.; Rinaldo, C.; Saah, A. *Ann. Intern. Med.* **1997**, *126*, 946. (b) Lyles, R.H.; Munoz, A.; Yamashita, T. E. *J. Infect. Dis.* **2000**, *181*, 872.

³⁰ Yeni, P. G.; Hammer, S. M.; Carpenter, C. C. *JAMA* **2002**, *288*, 222.

³¹ British HIV Association (<http://www.bhiva.org>), *HIV Med* **2001**, *2*, 276.

³² Ho, D. D. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *333*, 450.

³³ (a) Palella, F. J.; Delaney, K. M.; Moorman, A. C.; Loveless, M. O.; Fuhrer, J.; Satten, G. A.; Aschman, D. J.; Holmberg, S. D. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 853. (b) Jacobson, M. A.; French, M. *AIDS* **1998**, *12 (Suppl. A)*, S157. (c) Powderly, W. G.; Landay, A.; Lederman, M. M. *J. Am. Med. Assoc.* **1998**, *280*, 72.

1.5.1 Effetti collaterali

Disfunzioni nel metabolismo di lipidi e carboidrati sono gli effetti più evidenti del massiccio ricorso ad inibitori della proteasi.³⁴ La maggior parte dei pazienti in trattamento sviluppa una sindrome detta “lipodistrofia” che si manifesta con un elevato accumulo di grasso corporeo; sono molto frequenti anche casi di aumento ingiustificato dei livelli di colesterolo e trigliceridi nel sangue, molto dannosi per il sistema cardiovascolare, così come quelli di iperglicemia, iperinsulinemia e diabete mellito. La causa di queste anomalie metaboliche non è ancora completamente nota, ma è opinione generale che sia imputabile all’interferenza degli inibitori con proteasi aspartiche cellulari o altre proteine cruciali nel metabolismo di zuccheri e lipidi.³⁵

1.5.2 Resistenza ai farmaci

La maggior parte degli insuccessi nel trattamento HAART sono dovuti allo sviluppo di ceppi virali resistenti ai farmaci. La replicazione dell’HIV è molto rapida (in un individuo non soggetto a trattamento con inibitori vengono generati circa 10^9 virioni al giorno) e gli errori di trascrizione durante la replicazione del DNA sono molto frequenti visto che la trascrittasi non ha una funzione di “editing”; pertanto ragioni in un individuo infetto sono presenti una miriade di particelle virali geneticamente diverse. Il trattamento farmacologico costituisce un potente fattore di selezione e stimola la produzione di specie resistenti a questi composti, la cui costante replicazione amplifica il fenomeno. Spesso il paziente, già dopo poche settimane dall’inizio del trattamento, mostra un aumento dei livelli di RNA plasmatici e non risponde più alla combinazione di farmaci, che deve quindi essere modificata. Il fatto che nella maggior parte dei casi le specie mutate siano insensibili ad un’intera classe di composti (ad esempio inibitori della HIV-PR) riduce di molto le opzioni terapeutiche a disposizione ed è di ostacolo allo sviluppo di nuovi inibitori.³⁶

Sebbene gli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa siano in uso da più di quindici anni, il meccanismo con cui si sviluppa resistenza nei loro confronti è stato

³⁴ (a) Kaufmann, G. R.; Cooper, D. A. *Curr. Opin. Anti-Infect. Invest. Drugs* **1999**, *1*, 166. (b) Martinez, E.; Gatell, J. M. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **1999**, *12*, 13.

³⁵ Carr, A.; Cooper, D. A. *Lancet* **2000**, *356*, 1423.

³⁶ Wlodawer, A. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 595.

chiarito solo di recente studiando la struttura cristallografica del complesso catalitico tra la RT ed un generico deossinucleoside trifosfato. I risultati sono stati quindi estesi agli inibitori nucleosidici ed hanno evidenziato come nell'enzima resistente i residui mutati siano tipicamente localizzati in prossimità del sito attivo.³⁷ L'analisi delle caratteristiche steriche di queste mutazioni può inoltre spiegare perché la resistenza ad una classe di inibitori è in grado di sensibilizzare l'enzima anche verso una classe diversa, fornendo le basi per una terapia sequenziale.

Per gli inibitori non-nucleosidici l'emergere di ceppi mutati è particolarmente rapido poiché, in questo caso, il sito di legame non è parte del sito attivo dell'enzima mentre in genere le mutazioni coinvolgono residui affacciati nella parte interna dello stesso sito di legame.³⁸ Non è chiaro perciò, quale sia il modo migliore per minimizzare la resistenza: se combinare gli NNRTI con altri inibitori oppure iniziare il trattamento con elevati dosaggi. Normalmente gli NNRTI vengono somministrati in combinazione con inibitori della proteasi.³⁹

Uno studio sulle mutazioni derivanti dall'impiego di inibitori della proteasi ha evidenziato come l'impiego di farmaci differenti sia causa della mutazione di circa un terzo dei residui della HIV-PR. Sebbene la maggior parte di queste mutazioni sia localizzata nelle vicinanze del sito di riconoscimento, molte altre sono presenti lungo tutta la proteina; la comparsa delle mutazioni è generalmente sequenziale: quelle più remote sono originate da quelle primarie, in prossimità, cioè, del sito di legame.⁴⁰

Al momento esistono due tipi di test per valutare la resistenza ai farmaci.⁴¹ Il primo è un saggio di tipo genotipico che esamina le sequenze proteiche di trascrittasi e proteasi per individuare quali residui amminoacidici siano mutati rispetto al virus wild-type. I risultati così ottenuti sono spesso di difficile interpretazione a causa della limitata disponibilità di dati in grado di correlare gli effetti della sostituzione degli amminoacidi con la sensibilità agli inibitori disponibili. Il secondo è un test fenotipico: coltivando *in vitro* il virus presente in alcuni pazienti è possibile stabilire la concentrazione ottimale di una specifica combinazione di farmaci necessaria per l'inibizione. Questi test sono molto validi da un punto di vista

³⁷ Huang, H.; Chopra, R.; Verdine, G. L.; Harrison, S. C. *Science* **1998**, *282*, 1669.

³⁸ De Clercq, E. *Antiviral Res.* **1998**, *38*, 153.

³⁹ Peiperl, L. *HIV InSite knowledge base* **2001**, <http://hivinsite.ucsf.edu>

⁴⁰ Schinazi, R. F.; Larder, B. A.; Mellors, J. W. *Int. Antiviral News* **1997**, *5*, 129.

biochimico: avere infatti a disposizione un quadro aggiornato delle mutazioni nelle sequenze peptidiche degli enzimi dovute all'utilizzo degli inibitori (della proteasi e della trascrittasi) costituisce il principale punto di partenza per lo sviluppo razionale di nuovi farmaci.

1.5.3 Compliance

L'elevata velocità di replicazione del virus e la sua propensione a mutare, combinate al problema della resistenza ai farmaci, obbligano i pazienti ad assumere dosi elevate di inibitori ad intervalli di tempo ristretti e rigidamente fissati nell'arco di una giornata. Il mancato rispetto delle prescrizioni (compliance del paziente) è molto pericoloso perché può portare a recrudescenze dell'infezione e all'incremento delle varianti resistenti; per queste ragioni la scelta di iniziare la terapia è critica anche per il malato: una volta cominciata, questa non può più essere interrotta.

La terapia HAART è in grado di ridurre i livelli di RNA virale sotto i limiti di rilevabilità, ma la possibilità di una cura definitiva è preclusa dal fatto che il virus è in grado di nascondersi e proliferare, creando delle riserve cellulari di infezione latenti.⁴² La principale riserva è costituita da linfociti T4 contenenti una copia integrata di DNA virale: queste cellule non possono essere eliminate dal sistema immunitario perché non presentano antigeni virali sulla loro superficie esterna e le attuali terapie non sono in grado di attaccare e distruggere il materiale genetico in esse contenuto. Particelle virali sono state isolate anche da cellule dei linfonodi, nel sistema nervoso centrale e nei macrofagi; questi ultimi, in particolare, non vengono uccisi dal virus e sono in grado di produrre continuamente nuovi virioni.⁴³

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

⁴¹ Wolf, E. In *HIV Medicine 2003*; Hoffmann, C.; Kamps, B. S., Ed.; Flying Publisher, 285.

⁴² Blankson, J.; Persaud, D.; Siciliano, R. F. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **1999**, *1*, 25.

⁴³ Saag, M. S.; Kilby, J. M. *Nat. Med* **1999**, *5*, 609.

2. La proteasi aspartica del virus HIV-1

2.1 Le proteasi ed il loro ruolo biologico

Gli enzimi proteolitici possono essere classificati in quattro classi principali: proteasi aspartiche, cisteiniche, seriniche e metallo proteasi¹. Catalizzando l'idrolisi dei legami peptidici con elevata efficienza e selettività, le proteasi regolano numerosi processi fisiologici quali digestione, crescita, differenziazione dei tessuti, migrazione cellulare, meccanismi di difesa immunitaria e apoptosi; svolgono inoltre un ruolo essenziale in numerose patologie (ipertensione,² cancro, malaria, morbo di Alzheimer,³ epatite, infezioni da *Candida*⁴ ed AIDS), rappresentando quindi un importante obiettivo farmacologico.⁵ Le proteasi possono essere suddivise, in base al meccanismo con cui si esplica l'attività catalitica, in due grandi gruppi. Il primo comprende gli enzimi che effettuano una catalisi di tipo nucleofilo utilizzando l'ossidrile in posizione β di un residuo di serina (proteasi seriniche) oppure il gruppo tiolico della cisteina (proteasi cisteiniche); il meccanismo prevede l'attacco del nucleofilo al gruppo carbonilico del legame ammidico formando un estere, oppure un tioestere, che viene successivamente idrolizzato da una molecola d'acqua. Gli enzimi della seconda classe utilizzano una molecola d'acqua attivata per attaccare il carbonile ammidico del legame scissile; la molecola d'acqua può essere attivata da un catione metallico (metalloproteasi) o dal gruppo carbossilico in posizione β di due residui di acido aspartico presenti nel sito attivo (proteasi aspartiche).¹

¹ Barret, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. Ed *Handbook of proteolytic enzymes*, Acad. Press **1998**.

² Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D.P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305-341.

³ (a) Rochefort, H.; Liaudet-Coopman, E. *APMIS* **1999**, *107*, 86. (b) Papassotiropoulos, A.; Bagli, M.; Feder, O.; Jessen, F.; Maier, W.; Rao, M. L.; Ludwig, M.; Schwab, S. G.; Heun, R. *Neurosci. Lett.* **1999**, *262*, 171.

⁴ Sanglard, D.; Hube, B.; Monod, M.; Odds, F. O.; Gow, N. A. *Infect. Immun* **1997**, *65*, 3539.

⁵ Seife, C. *Science* **1997**, *277*, 1602.

2.2 Le proteasi aspartiche

Gli enzimi di questo tipo si ritrovano nei vertebrati, nei funghi, nelle piante; una nuova forma di proteasi aspartiche è stata isolata nei retrovirus.¹

Come in tutte le altre famiglie, i singoli enzimi presiedono a diverse funzioni. I più noti enzimi gastrici (pepsina, gastrina e chimosina) regolano i processi digestivi; la catepsina D, un enzima lisosomiale, presiede alla degradazione di proteine intracellulari; la renina idrolizza in modo specifico una singola proteina, producendo un decapeptide precursore della angiostatina II, un octapeptide che è il maggiore fattore di controllo della pressione arteriosa. Nel regno dei funghi, le proteasi aspartiche controllano principalmente la sporulazione. Nei retrovirus, infine, la maggior parte delle proteine virali viene sintetizzata in forma di poliproteine idrolizzate dalle proteasi retrovirali durante l'attivazione del virus.

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

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

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

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

⁶ Davies, R. D. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1990**, *19*, 189.

⁷ Wlodawer, A.; Gustchina, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 16.

⁸ Cairns, J.; Overbaugh, J. *Nature* **1988**, *142*, 335.

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

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

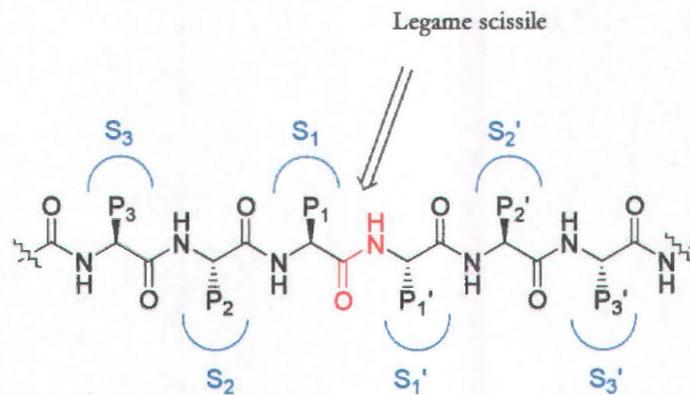


Figura 2.1: Rappresentazione schematica dei subsiti del sito attivo

2.3 La Proteasi da HIV (HIV-PR)

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

⁹ James, M. N. G.; Sielecki, A. R. *Biological Macromolecules and assemblies: Active Sites of Enzymes* JohnWiley & Sons: New York, 1987, vol 3, p 413.

¹⁰ Schechter, I.; Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967, 27, 157.

inibitori. Numerose indagini hanno fornito prove sostanziali dell'appartenenza di questo enzima alla famiglia delle proteasi aspartiche e studi di omologia hanno rivelato la presenza della triade conservata Asp-Thr-Gly¹¹.

La mutazione del residuo di aspartato in posizione 25 (Asp₂₅) con vari residui, tra cui Asn,¹² Thr¹³ e Ala,¹⁴ ha fornito proteine prive di attività catalitica. L'HIV-PR viene inibita *in vitro* dalla pepstatina, inibitore di origine naturale selettivo per le proteasi aspartiche¹⁵ e la sua struttura cristallografica mostra un sito attivo riconducibile a quello degli altri enzimi di questa classe.¹⁶

2.3.1 Struttura tridimensionale

La proteasi del virus HIV-1 nella sua forma attiva è un omodimero a simmetria C₂, in cui ciascun monomero è costituito da 99 amminoacidi e contribuisce alla formazione dell'unico sito attivo; la stabilità del dimero dipende in massima parte da una rete di legami idrogeno intermolecolari tra le strutture β dei segmenti N- e C-terminali dei due monomeri.¹⁷

Il sito attivo è costituito dai residui 8, 23, 25, 27-30, 32, 47-50, 53, 80-82 e 84 di ciascun monomero (fig. 2.2); le triadi catalitiche Asp₂₅-Thr₂₆-Gly₂₇ e Asp_{25'}-Thr_{26'}-Gly_{27'} sono situate sul fondo della cavità, all'interno di un loop stabilizzato da una rete di legami idrogeno. I loop di ciascun monomero, inoltre, sono interconnessi da quattro legami idrogeno nella cosiddetta configurazione "fireman's grip".¹⁸

I residui catalitici Asp₂₅ e Asp_{25'} hanno un'orientazione quasi coplanare e la vicinanza (2.8-3 Å) tra i due atomi di ossigeno di ciascun carbossile indica la presenza di un idrogeno acido condiviso tra i due residui di aspartato. I gruppi carbossilici sono inoltre connessi mediante una molecola d'acqua disposta a ponte tra i due, alla distanza di un legame idrogeno.⁷

¹¹ Stahl, F.W. *Nature* **1988**, *142*, 112.

¹² Darke, P.L.; Leu, C. T.; Davis, L. J.; Heimbach, J. C.; Diehl, R. E.; Hill, W. S.; Dixon, R. A.; Sigal, I. S. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 2307.

¹³ Seelmeir, S.; Schmidt, H.; Turk, V.; Von der Helm, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6612.

¹⁴ Mous, J.; Heimer, E. P.; Le Grice, S. J. *J. Virol.* **1988**, *62*, 1433.

¹⁵ Hansen, J.; Billich, S.; Schulze, T.; Sukrow, S.; Moelling, K. *EMBO J.* **1988**, *7*, 1785.

¹⁶ Wlodawer, A.; Miller, M.; Jaskolski, M.; Sathyanarayana, B. K.; Baldwin, E.; Weber, I. T.; Selk, L. K.; Clawson, L.; Schneider, J.; Kent, S. B. H. *Science* **1989**, *245*, 616.

¹⁷ Weber, I.T. *J. Biol. Chem.* **1990**, *256*, 10492.

¹⁸ Pearl, L.; Blundell, T. L. *FEBS Lett.* **1984**, *174*, 96.

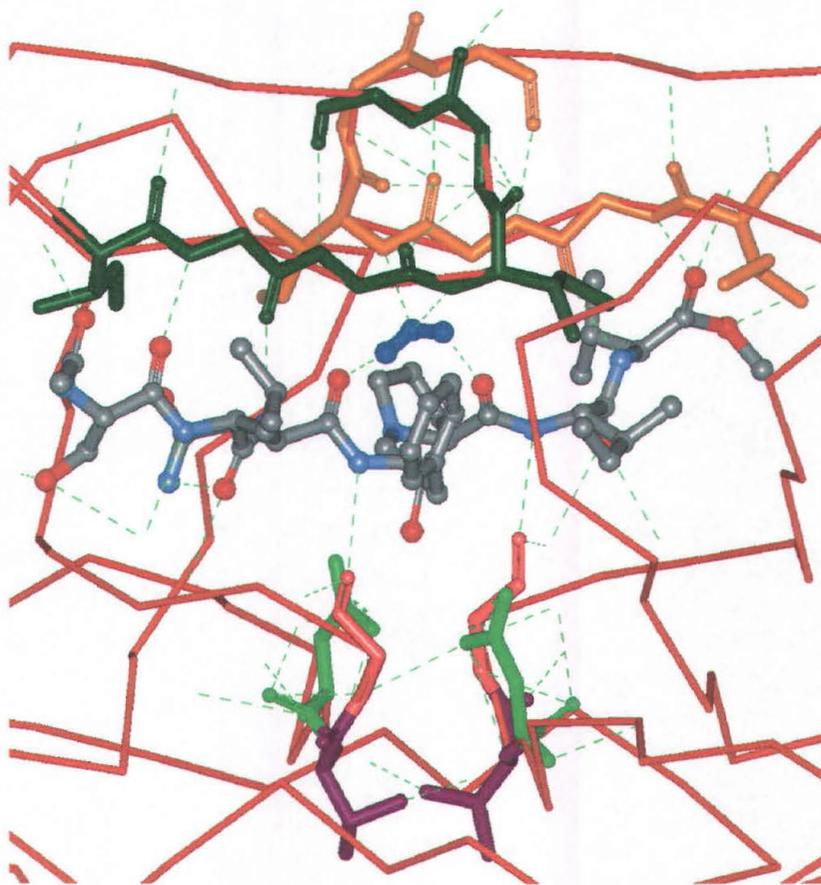
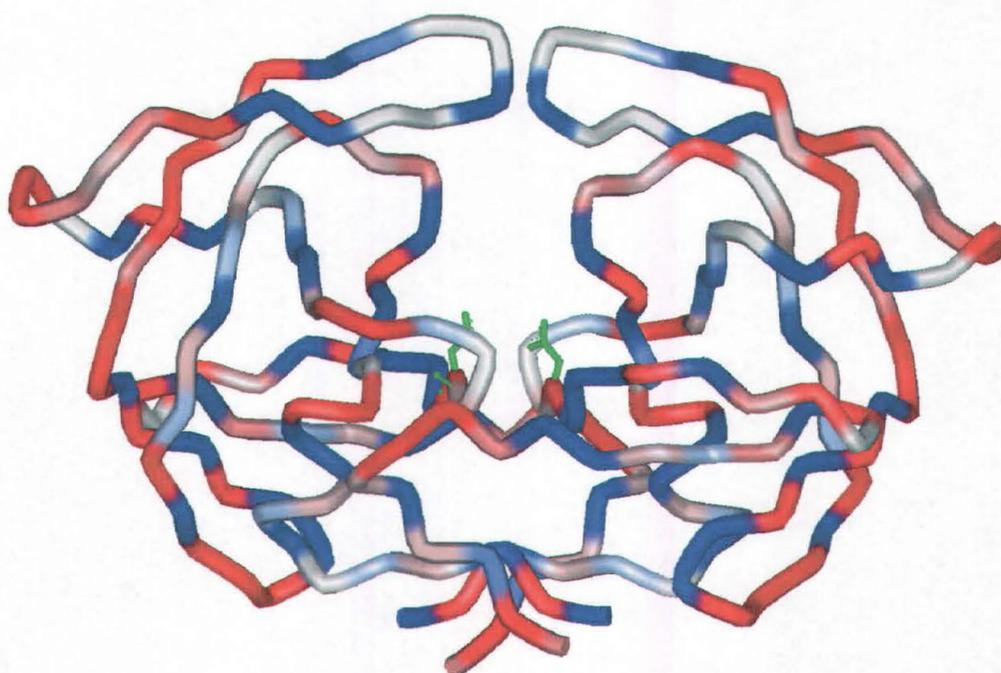
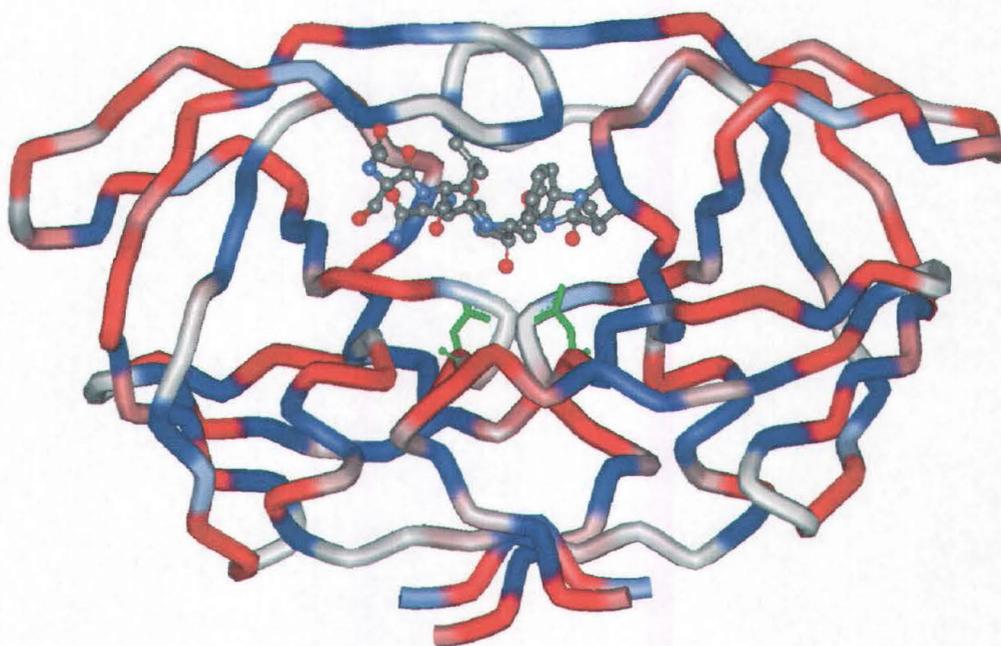


Figura 2.2: Struttura cristallografica del sito attivo del complesso tra l'HIV-PR e l'inibitore JG-365 ("ball&stick"). In verde sono riportati i residui di aspartato catalitici e la rete di legami idrogeno che stabilizza il complesso nella configurazione detta "fireman's grip". (PDB file: 7HVP)



A



B

Figura 2.3: Struttura cristallografica dell'apoenzima dell'HIV-PR **A** (PDB file 1HSI), in cui i flap hanno una conformazione aperta, e del complesso con l'inibitore JG-365 **B** (PDB file: 7HVP), in cui i flap sono chiusi sopra il ligando. In verde sono evidenziati i residui catalitici di acido aspartico Asp25 e Asp25'.

Il segmento Ile₄₇-Gly-Gly-Ile-Gly-Gly₅₂ ed il corrispondente 47'-52' formano i cosiddetti "flap", strutture flessibili che coprono il sito attivo e svolgono un ruolo importante nel riconoscimento e nel legame di substrati e inibitori.¹⁹ La HIV proteasi, in presenza di un ligando nel sito attivo, subisce un cambiamento conformazionale: i due monomeri ruotano intorno all'asse del dimero di circa due gradi, determinando un leggero restringimento della cavità ed un avvicinamento dei flap di circa 7Å. Nell'apoenzima i "flap" hanno una conformazione aperta (fig 2.3), ma in presenza di un ligando si chiudono sopra di esso determinando le interazioni responsabili della selettività nella catalisi.

La maggior parte delle strutture cristallografiche di complessi dell'HIV-proteasi con inibitori rivela la presenza di una seconda molecola d'acqua (detta anche "flap water"), non riscontrabile nelle altre proteasi aspartiche eucariote, coordinata tetraedricamente tra i gruppi carbonilici in P₁ e P₁' ed i gruppi ammidici dei residui Ile₅₀ e Ile₅₀' dei "flap" (fig 2.4) e completamente inaccessibile al solvente.²⁰

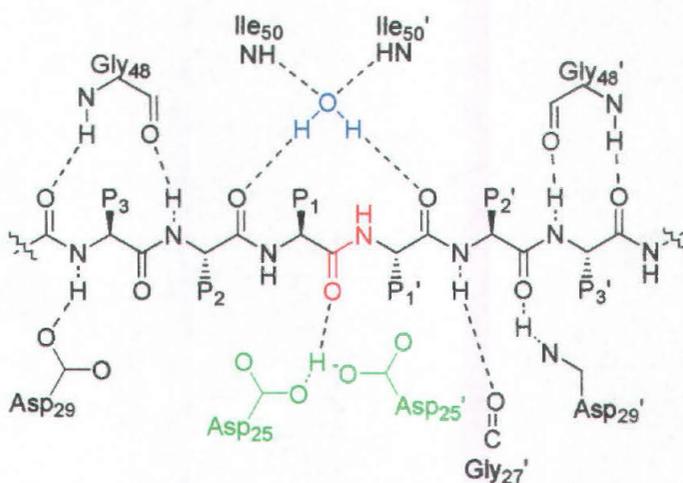


Figura 2.4: Rappresentazione schematica dei legami idrogeno tra la prolipoproteina ed il sito attivo

2.3.2 Subsiti del sito catalitico

Le catene laterali del substrato poliproteico, o degli inibitori, vengono ospitate in subsiti del sito attivo, descritti secondo la nomenclatura di Schechter e Berger (cfr. Par. 2.2). La simmetria dell'HIV proteasi fa sì che i subsiti S₁..S_n e S₁'..S_n' siano identici. I subsiti S₁ e S₁' interagiscono con i residui in posizione P₁ e P₁' e sono costituiti principalmente da amminoacidi idrofobici (ad esempio Arg₈, Leu₂₃, Gly₂₇,

¹⁹ Gustchina, A.; Weber, I. T. *FEBS Lett.*, **1990**, *269*, 269.

Gly₄₈, Gly₄₉, Ile₅₀, Pro₈₁ e Val₈₂) ad eccezione dei residui catalitici di aspartato. I subsiti S₂ e S_{2'} sono delle tasche interne ed hanno dimensioni ridotte rispetto a S₁/S_{1'} e S₃/S_{3'}; sono inoltre più specifici e questo limita la scelta dei residui in P₂/P_{2'} tanto nei substrati quanto negli inibitori. Sebbene questi subsiti siano parzialmente idrofobici (ad esempio Ala₂₈, Asp₂₉, Asp₃₀, Val₃₂, Ile₄₇, Gly₄₉, Ile₅₀ e Ile₈₄) possono essere occupati anche da catene laterali idrofile.⁷

I subsiti S₃ ed S_{3'} (costituiti da Arg₈, Leu₂₃, Asp₂₉, Gly₄₈, Gly₄₉, Pro₈₁ e Val₈₂) hanno invece un'ampia specificità e sono in grado di ospitare residui di natura e dimensioni diverse; ciò dipende dalla capacità di instaurare interazioni polari, alifatiche e ioniche con ligandi diversi. Questi subsiti sono inoltre piuttosto grandi e largamente esposti al solvente.²¹

I subsiti S₄/S_{4'} e S₅/S_{5'} non sono stati finora descritti nel dettaglio perché non è disponibile un gran numero di strutture della proteasi complessata con ligandi aventi residui anche in P₄/P_{4'} e P₅/P_{5'}.²²

2.3.3 Meccanismo di idrolisi

L'attività catalitica delle proteasi aspartiche è stata ampiamente studiata e numerose ipotesi sono state avanzate circa il suo meccanismo d'azione.²³ Nella maggioranza dei casi, i risultati ottenuti sono consistenti con una catalisi acido-base di tipo generale da parte dei due residui di acido aspartico presenti nel sito attivo ed escludono, per questa classe di enzimi, tanto l'attivazione della molecola d'acqua con acidi di Lewis (come Zn²⁺ nel caso delle metalloproteasi) quanto la formazione di intermedi covalenti (come nel caso di proteasi seriniche e cisteiniche).²⁴

Tra i vari meccanismi proposti, quello comunemente accettato è stato descritto da Suguna sulla base della struttura cristallografica del complesso tra la proteasi aspartica del *Rhizopys chinensis* ed un inibitore peptidico.²⁵ La dipendenza della

²⁰ Tomasselli, A. G.; Thaisrivongs, S.; Henrikson, R. *Adv. Drug Des.* **1996**, *2*, 173.

²¹ Wlodawer, A.; Herickson, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 543.

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

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

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

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

velocità di idrolisi dal pH indica che, a pH fisiologico, solo uno dei due residui catalitici di acido aspartico è deprotonato;²⁶ secondo il meccanismo proposto, tale residuo di aspartato attiva l'attacco nucleofilo di una molecola d'acqua, localizzata tra i due gruppi carbossilici, al carbonile del legame ammidico scissile, generando un intermedio tetraedrico carico negativamente. La protonazione dell'azoto amidico da parte del secondo acido origina un intermedio zwitterionico che si decompone nello stadio lento dell'idrolisi (fig. 2.5).²⁷

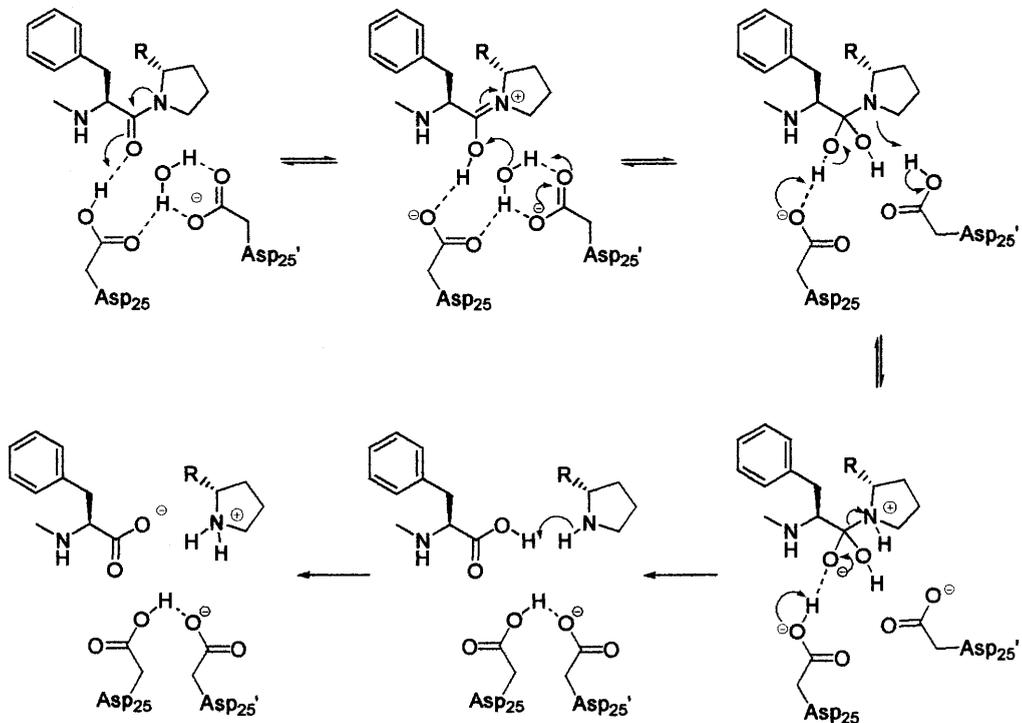


Figura 2.5: Meccanismo di idrolisi dell'HIV-PR

La struttura del sito attivo dell'HIV-proteasi e la presenza dei due "flap" inducono il substrato ad assumere una conformazione che ne facilita l'idrolisi. In particolare la formazione di una fitta rete di legami idrogeno e la coordinazione tetraedrica della molecola d'acqua tra i carbonili in P₁ e P₁' ed i gruppi amminici dei residui Ile₅₀ e Ile₅₀' (fig 2.4) distorce il ligando dalla conformazione planare attivando il legame scissile all'idrolisi. La parziale perdita di risonanza amidica dovuta alla

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

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

distorsione dalla planarità rende il carbonile più elettrofilo nei confronti della molecola d'acqua.²⁸

2.3.4 Specificità dell'enzima

L'idrolisi del legame ammidico ed il meccanismo con cui si esplica la catalisi da parte dei residui di acido aspartico e della molecola d'acqua rappresentano l'evento conclusivo di un più vasto processo chimico che prevede il riconoscimento ed il legame di una sequenza peptidica.²⁹ La determinazione delle sequenze riconosciute all'interno del sito attivo è fondamentale per un approccio razionale alla progettazione di inibitori efficienti.

Quando vennero individuati gli otto siti di idrolisi delle poliproteine *gag* e *gag/pol* (fig 2.6)³⁰ fu subito chiaro che la proteasi da HIV è molto versatile in termini di riconoscimento del substrato, sebbene si possa individuare un'alternanza di residui idrofobici ed idrofilici negli otto amminoacidi adiacenti il legame scissile. A differenza della maggior parte degli enzimi proteolitici, che mostrano una spiccata preferenza per un particolare amminoacido in posizione P₁ e/o P_{1'}, l'HIV proteasi è in grado di idrolizzare diversi tipi di legami ammidici, compresi quelli aventi la prolina in P_{1'} (fig 2.6).

Ser-Gly-Asn-TyrPro-Ile-Val-Gln
Ala-Arg-Val-LeuAla-Glu-Ala-Met
Ala-Thr-Ile-MetMet-Gln-Arg-Gly
Arg-Gln-Ala-AsnPhe-Leu-Gly-Lys
Pro-Gly-Asn-PheLeu-Gln-Ser-Arg
Ser-Phe-Asn-PhePro-Ile-Ser-Pro
Ala-Glu-Thr-PheTyr-Val-Asp-Gly
Thr-Leu-Asn-PhePro-Ile-Ser-Pro
Arg-Lys-Ile-LeuPhe-Leu-Asp-Gly

Figura 2.6: Siti di idrolisi delle poliproteine *gag* e *gag/pol*

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

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

³⁰ Pearl, L.; Taylor, W. *Nature* **1987**, *328*, 482.

L'idrolisi di legami ammidici aventi la prolina come residuo N-terminale è piuttosto rara e costituisce una peculiarità delle proteasi retrovirali;³¹ nei mammiferi, in particolare, non sono note endo-proteasi cellulari aventi la medesima specificità.³²

2.4 Strategie di inibizione

Il sito attivo delle proteasi aspartiche non contiene gruppi sufficientemente nucleofili da poter essere chimicamente modificati da inibitori irreversibili; i residui catalitici di acido aspartico possono essere alchilati solamente da elettrofili molto forti, come gli epossidi, che però, in genere, sono potenzialmente citotossici.³³

La gran parte degli inibitori finora messi a punto si lega all'enzima mediante delle interazioni di tipo non-covalente (legami idrogeno, interazioni ioniche o di Van der Waal) e sono quindi di tipo reversibile. I risultati migliori, in termini di inibizione, si ottengono quando l'enzima ha un'affinità maggiore per l'inibitore rispetto al substrato naturale. In accordo con il principio di Pauling, per il quale in una reazione enzimatica lo stato di transizione è legato al sito attivo con maggiore affinità rispetto a substrato e prodotti,³⁴ l'incorporazione di un analogo dello stato di transizione all'interno di una struttura pseudopeptidica si è rivelata uno degli approcci migliori per la progettazione di inibitori efficienti. Si definisce "isostere dello stato di transizione" un gruppo funzionale stabile ed in grado di mimare le caratteristiche stereo-elettroniche dello stato di transizione dell'idrolisi di un legame ammidico, ma che non può essere idrolizzato dalla proteasi. Studi condotti sulla pepstatina, inibitore naturale contenente la statina (fig 2.7) rivelano che l'elevata affinità dipende anche dal fatto che l'inibitore nel sito attivo impedisce la formazione di legami idrogeno tra i residui di aspartato e la molecola d'acqua.³⁵

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

³² (a) Kräusslich, H.-G.; Ingraham, R. H.; Skoog, M. T.; Wimmer, E.; Pallai, P.V.; Carter, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 807. (b) Graves, M. C.; Meidel, M. C.; Pan, Y.-C. E.; Manneber, M.; Lahm, H.-W.; Grüniger-Leicht, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *168*, 30.

³³ (a) Meek, T. D.; Dayton, B. D.; Metcalf, B. W.; Dreyer, G. B.; Strickler, J. E.; Gorniak, J. G.; Rosenberg, M.; Moore, M. L.; Magaard, V. W.; Debouck, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1841. (b) Said, B.; Matsumoto, D. C.; Hamada, A. K.; Shank, R. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261*, 844.

³⁴ Pauling, L. *Chem. Eng. News*. **1946**, *24*, 1375.

³⁵ Rich, D. H. *J. Med. Chem.*, **1985**, *28*, 263.

Alcuni isosteri frequentemente utilizzati per la sintesi di inibitori dell'HIV-proteasi sono riportati in figura 2.7.³⁶

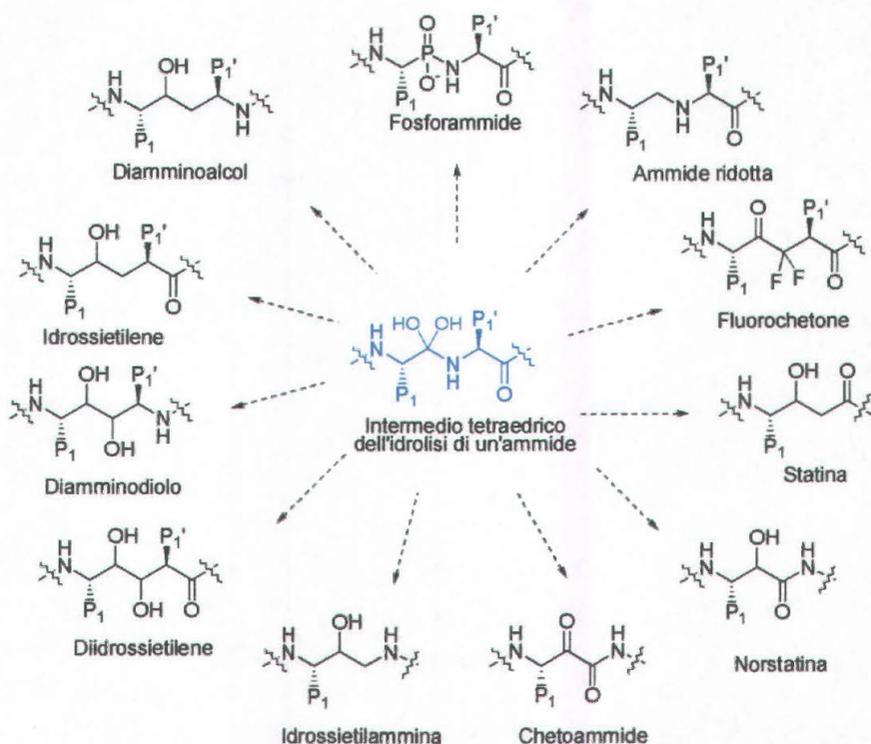


Figura 2.7: Principali tipi di isosteri dipeptidici

2.4.1 Inibitori dell'HIV-proteasi

La messa a punto dei primi inibitori dell'HIV proteasi ha avuto origine dalle ricerche condotte sull'inibizione della renina, per una possibile cura per l'ipertensione (cfr. Par. 2.2), utilizzando inibitori peptidomimetici contenenti un isostere non idrolizzabile (fig 2.7).³⁷

L'introduzione di un ossidrilico in corrispondenza del legame scissile, all'interno di una struttura che riproduce il substrato originario, si è rivelata finora l'approccio più efficiente nello sviluppo di inibitori della HIV proteasi. Il gruppo ossidrilico, infatti, rimpiazza la molecola d'acqua posizionata tra gli aspartati catalitici, creando con questi delle interazioni simili a quelle dello stato di transizione. Tutti gli inibitori approvati dall'FDA contengono isosteri di questo tipo (Fig. 1.2). Per ottenere un'inibizione specifica, comunque, vanno prese in considerazione le caratteristiche strutturali dell'intera proteina.

³⁶ (a) Wlodawer, A.; Erickson, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 543. (b) Martin, J. A.; Redshaw, S.; Thomas, G. J. *Progress in Medicinal Chemistry* **1995**, *32*, 239. (c) Chen, C. A.; Sieburth, S. M.; Glekas, A.; Hewitt, G. W.; Trainor, G. L.; Vitanen, S. E.; Garber, S. S.; Cordova, B.; Jeffry, S.; Klabe, R. M. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1161.

³⁷ Tomasselli, A. G.; Heinrikson, R. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 189.

I substrati polipeptidici naturali rappresentano un'ampia varietà di sequenze (fig. 2.6) ed un'idrolisi efficiente si ottiene con catene peptidiche contenenti almeno sette residui.³⁸ L'elevata eterogeneità dei siti di idrolisi implica che l'HIV-PR è in grado di interagire con il ligando in modi diversi, a seconda delle caratteristiche strutturali, ma anche che esistono diverse combinazioni di possibili interazioni. Il fatto che non tutti i siti vengano idrolizzati con uguale efficienza indica che alcune sequenze non hanno un'affinità ottimale con il sito attivo e che esiste, quindi, un meccanismo di regolazione che stabilisce l'ordine di priorità nell'idrolisi.³⁹

Tutte le sequenze riconosciute nel sito attivo presentano due residui idrofobici in corrispondenza del legame scissile; questa preferenza è comune a tutti i tipi di proteasi aspartiche e guida la scelta dei residui in posizione P₁ e P₁' nella maggior parte degli inibitori peptidomimetici.⁴⁰ L'analisi delle strutture cristallografiche dei complessi dell'HIV-PR rivela che gli inibitori all'interno del sito attivo assumono una conformazione estesa di tipo β . Le catene laterali dell'inibitore vanno ad occupare i subsiti enzimatici generando delle interazioni non-covalenti (legami idrogeno e interazioni idrofobiche) che sono il principale contributo all'energia di complessazione.²¹ Sono le dimensioni dei subsiti e la natura dei residui presenti ad indirizzare la scelta delle possibili catene laterali (peptidiche o meno) degli inibitori.

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

³⁸ Moore, M. L.; Bryan, W. M.; Fakhoury, S. A.; Magaard, V. W.; Huffman, W. F.; Dayton, B. D.; Meek, T. D.; Hyland, L.; Dreyer, G. B.; Metcalf, B. W.; Strickler, J. E.; Gorniak, J. G.; Debouck, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *159*, 420.

³⁹ Krausslich, H. -G.; Scheneider, H.; Zybarth, G.; Carter, C. A.; Wimmer, E. *J. Virol.* **1988**, *62*, 4393.

⁴⁰ Pettit, S. C.; Simsic, J.; Loeb, D. D.; Everitt, L.; Hutchinson, C. A. III; Swanstrom, R. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14539.

Per essere efficaci gli inibitori della proteasi da HIV devono, quindi, possedere un ridotto carattere peptidico, essere stabili alla degradazione da parte di enzimi proteolitici non selettivi, avere una buona permeabilità di membrana, elevati tempi di vita plasmatici e cellulari, ed, infine, una buona biodisponibilità orale. I risultati migliori si ottengono con molecole di ridotto peso molecolare (≤ 1000 Da) e contenenti dei gruppi che ne aumentano la solubilità.⁴¹

2.5 Drug Design ed Inibitori della HIV-PR

La scoperta di nuovi farmaci è generalmente un processo lungo e difficoltoso che coinvolge diverse discipline. Un approccio frequentemente utilizzato, detto “high throughput screening”, consiste nel saggiare un gran numero di sostanze (sintetiche o naturali), per verificare se alcune di queste abbiano un effetto sulla patologia in esame. Nel caso dell’AIDS, ad esempio, si cercano principi attivi in grado di bloccare la replicazione virale in colture cellulari infette. In questo modo si ottengono delle molecole attive, la cui struttura viene successivamente modificata in modo da ottimizzarne le proprietà farmacologiche e farmacocinetiche. Processi di questo tipo sono comunque lenti, costosi e potenzialmente pericolosi, richiedendo la manipolazione di terreni di coltura infetti.

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

Negli ultimi anni il “drug discovery” ha fortemente beneficiato dell’avanzamento tecnologico nel campo della chimica computazionale e del gran numero di strutture tridimensionali ad alta risoluzione di proteine ed enzimi attualmente disponibili. Le strutture cristallografiche dell’HIV-PR e di suoi complessi con inibitori sono un

⁴¹ Swanstrom, R.; Eron, J. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *86*, 145.

eccellente punto di partenza per i cosiddetti “structure-based drug design” e “de novo design”. Nota la struttura del sito attivo di un enzima, o di un recettore proteico, e la natura dei residui che lo costituiscono, è possibile progettare *ex-novo* dei ligandi ad esso complementari o modificare strutture già note. I programmi di molecular modeling, infatti, permettono di individuare dettagliatamente le interazioni tra enzima e ligando e la struttura di quest’ultimo può essere progettata in modo da massimizzare queste interazioni all’interno del sito attivo. Le strutture ottimizzate vengono a questo punto sintetizzate e saggiate *in vitro* ed *in vivo*; non sempre l’attività biologica dei composti così ottenuti rispecchia, però, la previsione teorica e per questa ragione i cicli di modeling, sintesi e valutazione dell’attività biologica vengono ripetuti più volte.³⁶ L’approccio computazionale è affetto da numerose limitazioni ed in particolare non è facile considerare l’effetto del solvente sull’energia totale del sistema, ma costituisce comunque un valido strumento per indirizzare la scelta preliminare delle strutture.

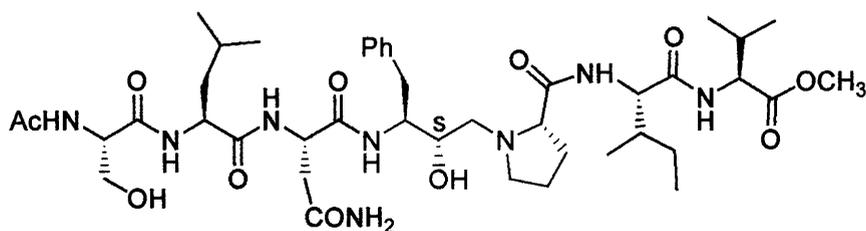
Gli inibitori della HIV-PR attualmente disponibili sul mercato sono stati messi a punto mediante una combinazione degli approcci sopra descritti e possono essere visti come il risultato dello sforzo congiunto di varie discipline: cristallografia a raggi X, molecular modeling, chimica farmaceutica, biologia molecolare, biochimica, farmacologia, medicina applicata e, non ultima vista la complessità delle strutture, sintesi organica. La scoperta del Saquinavir può essere portata come esempio di questo approccio.

2.5.1 Il Saquinavir

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

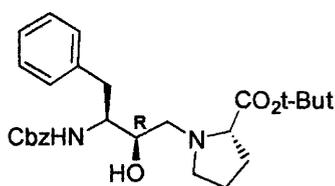
Vista la specificità dell’enzima verso legami ammidici di tipo Tyr-Pro e Phe-Pro (cfr. Par. 2.3.4) il gruppo di ricerca della Roche scelse di utilizzare, come isostere, l’idrossietilammina contenente l’anello della prolina, già impiegata per la sintesi

dell'inibitore eptapeptidico JG-365 il cui diastereoisomero S (configurazione assoluta del carbonio ossidrilico) ha una costante di inibizione (K_i) pari a 0.24 nM.⁴²

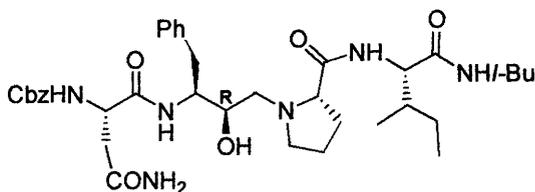


JG-365

Gli inibitori peptidomimetici contengono numerosi centri chirali: mentre quelli presenti in catena laterale generalmente derivano da amminoacidi naturali, la configurazione assoluta dei carboni asimmetrici presenti nell'isostere può essere scelta di volta in volta adottando un opportuno protocollo sintetico stereoselettivo ed i dati sperimentali rivelano che questa ha una marcata influenza sull'attività dell'inibitore. I vari diastereoisomeri, infatti, creando interazioni differenti con i residui, si legano al sito attivo con affinità diversa. Nel caso del Saquinavir, i primi test vennero condotti su entrambi i diastereoisomeri del pseudo-dipeptide **1**, il quale mostrò un ridotto ma incoraggiante IC_{50} (concentrazione di inibitore necessaria ad inibire del 50% l'attività dell'enzima) pari a 6.5 μ M, nel caso del diastereoisomero R. L'aggiunta di un residuo di asparagina in posizione P₂ e di un isoleucil-*iso*-butilammide in P_{2'} **2**, ridusse di un'ordine di grandezza l' IC_{50} portandolo al valore di 130 nM.



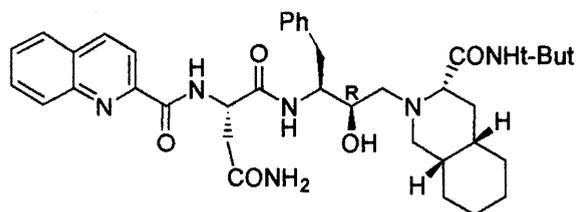
1
 $IC_{50}=6.5 \mu$ M



2
 $IC_{50}=130$ nM

A differenza di quanto osservato in inibitori più lunghi, ad esempio il JG-365, in cui il diastereoisomero S si è rivelato più potente, nel caso di questi pseudo-tripeptidi

⁴² Swain, A. L.; Miller, M. M.; Green, J.; Rich, D. H.; Schneider, J.; Kent, S. B. H.; Wlodawer, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8805.



6

$IC_{50}=0.4$ nM

Inibitore Ro 31-8959

La struttura cristallografica del complesso dell'HIV-proteasi con il Saquinavir (fig. 2.8) indica che l'inibitore si lega, come previsto, in conformazione estesa e che l'ossidrile dell'isostere è situato tra i residui catalitici di aspartato. La stereochimica S,S,S dell'anello di decaidroisochinolina è ottimale per l'attività in quanto occupa quasi completamente il subsito S_1 , mentre i metili del gruppo *tert*-butilico si sistemano nel subsito S_2 . Rispetto ad altri inibitori dell'HIV proteasi, l'ammide terminale è spostata di circa 1.8 Å, il che preclude la sua estensione in S_3 .⁴⁴

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

⁴⁴ Krohn, A.; Redshaw, S.; Ritchie, J. C.; Graves, B. J.; Hatada, M. H. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3340.

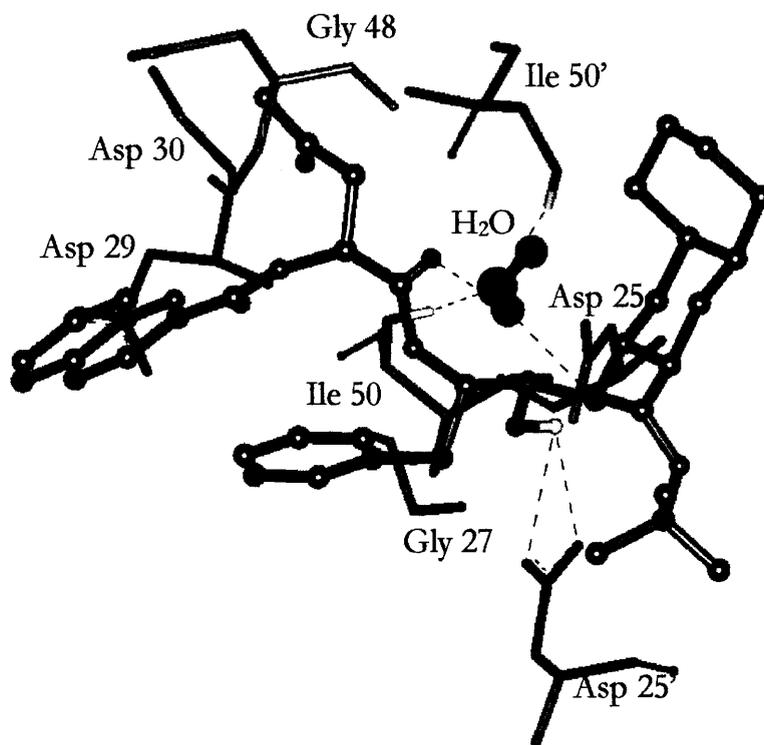


Figura 2.8: Struttura cristallografica del complesso tra HIV-PR e Saquinavir. Le linee tratteggiate rappresentano i legami idrogeno tra l'inibitore, la molecola d'acqua ed i residui Asp₂₅, Asp_{25'}, Ile₅₀ e Ile_{50'}. Per il Saquinavir è stata utilizzata la rappresentazione "ball&stick".

3. Sintesi di isosteri dipeptidici

Nell'ultimo decennio sono stati prodotti numerosi inibitori dell'HIV proteasi, utilizzando differenti tipi di isosteri dipeptidici (fig. 2.7). L'esame dell'attività biologica rivela che i risultati migliori, in termini di efficacia e selettività, si ottengono con inibitori peptidomimetici basati su isosteri idrossietilenici che mimano la prolina, i quali possiedono non solo un'elevata affinità per il sito attivo dell'enzima, ma anche delle buone proprietà farmacocinetiche.

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

Di seguito verranno descritti alcuni dei protocolli sintetici più comuni ed efficienti per la sintesi di diamminodioli e isosteri basati sulla prolina.

3.1 Isosteri diidrossietilenici

Un possibile approccio alla progettazione di inibitori dell'HIV proteasi si basa sulla simmetria C_2 dell'enzima nella sua forma attiva. Un ipotetico asse di simmetria, che riproduce l'asse C_2 della proteasi, viene tracciato attraverso il legame C-N dello stato di transizione dell'idrolisi del legame ammidico (fig. 3.1). Cancellando la porzione P' del peptide ed eseguendo un'operazione di simmetria C_2 sulla porzione P si ottengono i tre possibili diamminodioli diastereoisomeri; se i residui R ed R' sono diversi si ottengono analoghi asimmetrici. Legando entrambe le estremità amminiche di un diamminodiolo ad una catena peptidica si ottengono inibitori peptidomimetici in cui la normale alternanza di legami ammidici risulta invertita. Uno dei vantaggi legati all'utilizzo di diamminodioli come nuclei centrali consiste nella possibilità di funzionalizzare le due estremità amminiche terminali con catene peptidiche uguali o diverse e, quindi, di produrre anche inibitori non simmetrici di struttura generale $P_n--P_2-P_1-P_1'-P_2'--P_n'$.

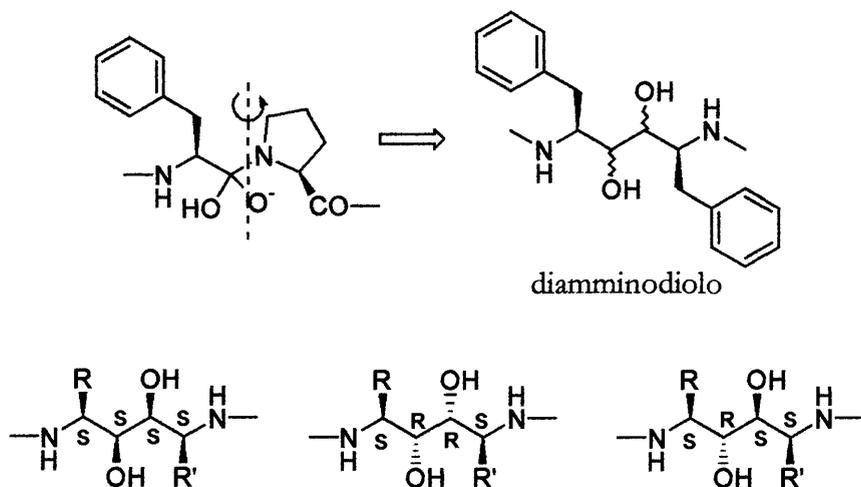


Figura 3.1: rappresentazione schematica dell'operazione di simmetria C_2 da cui si ottengono le strutture degli isosteri idrossietilenici. Strutture dei tre possibili diamminodioli diastereoisomeri

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

- 1- condensazione pinacolica di α -amminoaldeidi.
- 2- modificazione di molecole chirali di origine naturale tra cui zuccheri ed amminoacidi.

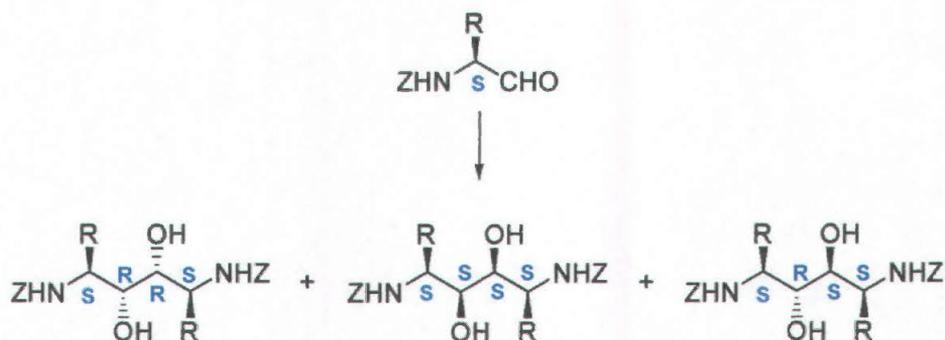
3.1.1 Reazioni di condensazione di α -amminoaldeidi

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

Il primo esempio di dimerizzazione riduttiva condotta su amminoaldeidi è la condensazione del N-Boc-fenilalaninale nelle condizioni proposte da McMurry ($TiCl_3(DME)_2$ in presenza della coppia Zn-Cu).¹ Questa reazione fornisce una miscela 2:1:1 dei tre diamminodioli diastereoisomeri: (*S,R,R,S*), (*S,S,S,S*) e (*S,R,S,S*)

¹ McMurry, J. E. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1513.

(schema 3.1).² Sebbene la separazione dei prodotti sia piuttosto difficoltosa, la formazione di una miscela ha il vantaggio pratico di fornire tutti i possibili stereoisomeri in quantità sufficiente per la sintesi e la valutazione dell'attività biologica di inibitori basati su questi nuclei centrali.



Schema 3.1: diastereoisomeri ottenibili per condensazione pinacolica di α -amminoaldeidi in presenza di metalli di transizione. Z=Boc, Cbz; R=Bn, ⁱBu, ⁱPr, (CH₂)₄NHCbz, (CH₂)₂SCH₃, CH₂-(3-indolil)

Utilizzando il complesso di vanadio(III) [V₂Cl₃(THF)₆]₂[Zn₂Cl₆] ed un'aldeide chelante, tipicamente N-Cbz- α -amminoaldeidi, si può ottenere, a seconda della natura del residuo R e dell'ingombro sterico del gruppo proteggente, il diastereoisomero (*S,R,R,S*) con una selettività superiore all'80%.³ Il prodotto principale viene facilmente isolato mediante conversione della miscela nei corrispondenti acetonidi e successiva cristallizzazione. Altri complessi di metalli di transizione possono essere utilizzati per la condensazione di α -amminoaldeidi: i risultati migliori si ottengono con lo ioduro di samario(II),⁴ ed il complesso NbCl₃(DME).⁵ L'applicabilità di questo approccio, tuttavia, è limitata solamente alla sintesi di diamminodioli simmetrici, aventi cioè, residui R ed R' identici: utilizzando, infatti, due differenti aldeidi si ottengono miscele di tutti i possibili prodotti di condensazione. Inoltre, la metodologia fornisce con buona resa, solamente il diamminodiolo (*S,R,R,S*).

² Kempf, D. J.; Norbeck, D. W.; Codavoci, L.; Wang, X. C.; Kohlbrenner, W. E.; Wideburg, N. E.; Paul, D. A.; Knigge, M. F.; Vasavanonda, S.; Craig-Kennard, A.; Saldivar, A.; Rosenbrook, W.; Clement, J. J.; Plattner, J. J.; Erickson, J. J. *Med. Chem* **1990**, *33*, 2687.

³ Konradi, A. W.; Pedersen, S. F. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 28.

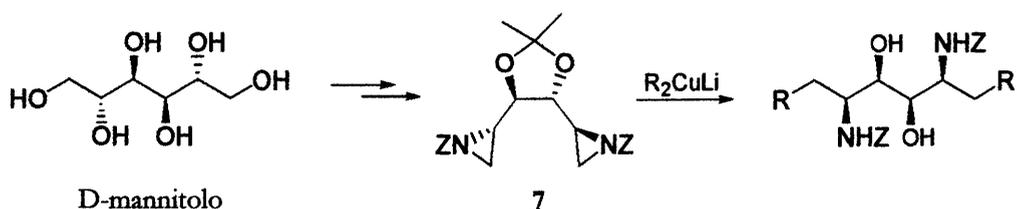
⁴ Budt, K. H.; Peyman, A.; Hansen, J.; Knolle, J.; Meichsner, C.; Paessens, A.; Ruppert, D.; Stowasser, B. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 559.

⁵ Kammermeier, B.; Beck, G.; Holla, W.; Jacobi, D.; Napiersky, B.; Jendralla, H. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 307.

3.1.2 Sintesi a partire da zuccheri

I polialcoli derivanti dalla riduzione di zuccheri, esosi in particolare, sono validi precursori chirali nella sintesi di isosteri diidrossietilenici. Un substrato contenente centri asimmetrici a configurazione nota e fissata consente di ottenere il prodotto voluto, evitando procedure sintetiche stereoselettive, spesso risultanti in miscele di diastereoisomeri difficilmente separabili. La maggior parte delle sintesi proposte in letteratura riguarda gli isomeri (*S,R,R,S*); infatti, inibitori simmetrici e pseudosimmetrici basati su questi nuclei presentano una buona biodisponibilità ed attività *in vivo*.²⁻⁶

Una delle possibili strategie sintetiche si basa sull'addizione stereoselettiva di organocuprati ad una bis-aziridina **7** (schema 3.2), derivante dal D-mannitolo⁷ oppure dal D-treitolo.⁸



Schema 3.2: sintesi di diamminodioli diastereoisomeri a partire da D-mannitolo e D-treitolo via bis-aziridina. R=CH₃, ⁿBu; Z=Boc, Ts.

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

Molto più comuni sono, quindi, le metodologie basate su epossidi derivanti da zuccheri. Numerosi autori⁹ hanno impiegato questo tipo di approccio ottenendo, a

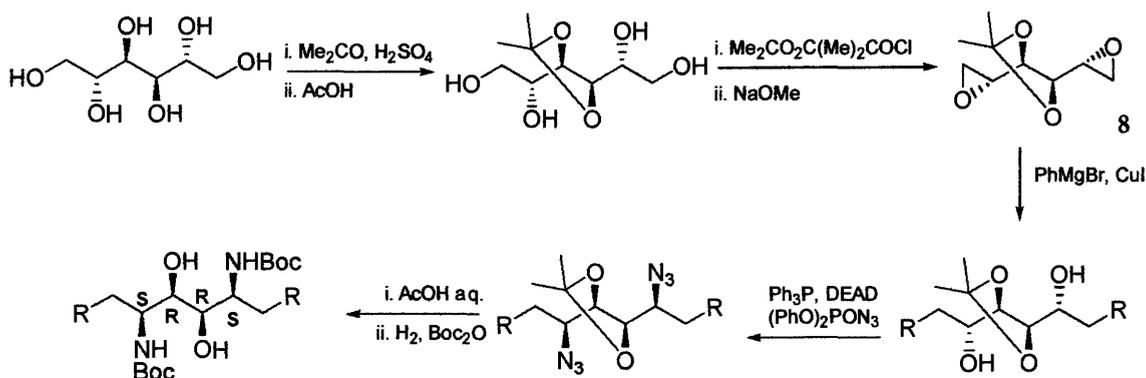
⁶ Hosur, M. V.; Bhat, T. N.; Kempf, D. J.; Baldwin, E. T.; Liu, B.; Gulnik, S.; Wideburg, N. E.; Norbeck, D. W.; Appelt, K.; Erickson, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 847.

⁷ (a) Dureault, A.; Tranchepain, I.; Depezay, J. C. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5324. (b) Dureault, A.; Greck, C.; Depezay, J. C. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4157.

⁸ Kang, S. H.; Ryu, D. H. *Chem. Commun.* **1996**, 355.

⁹ (a) Chenera, B.; Bohem, J. C.; Dreyer, G. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 219. (b) Dreyer, G. B.; Bohem, J. C.; Chenera, B.; Desjarlais, R. C.; Hassell, A. M.; Meek, T. D.; Tomaszek, T. A. *Biochemistry* **1993**, *32*, 937. (c) Gosh, A. K.; McKee, S. P.; Thompson, W. J. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6500.

partire dal medesimo di-epossido **8**, derivante dal D-mannitolo, diamminodioli a simmetria C_2 del tipo (*S,R,R,S*) **9**, come riportato nello schema 3.3.



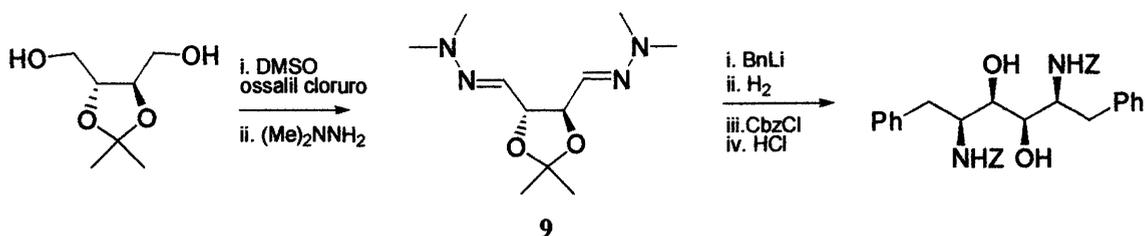
Schema 3.3: Sintesi di diamminodioli a partire da un di-epossido derivante dal D-mannitolo

I residui R vengono introdotti utilizzando reattivi di Grignard ($R = \text{Ph}, \text{Bn}$) in presenza di sali di rame (CuI), condizioni, queste che garantiscono la completa stereoselettività nell'apertura dell'anello epossidico. I gruppi amminici terminali derivano dalla riduzione delle corrispondenti azidi, introdotte mediante sostituzione degli ossidrili attivati come mesitato, oppure mediante reazione di Mitsunobu. Lo stesso approccio può essere utilizzato per ottenere diamminodioli asimmetrici con differenti residui R ed R' .¹⁰ Rispetto al precedente richiede la conversione di due gruppi ossidrilici nelle corrispondenti ammine, presenta, però, il vantaggio di poter introdurre non solo funzioni amminiche libere, ma anche protette con gruppi facilmente rimovibili come Boc e/o Cbz.

I tetrosi ridotti rappresentano un'altra classe di substrati chirali utilizzata per questo tipo di sintesi; in questo caso, però, è necessario introdurre due nuovi centri chirali nella molecola. Ne è un esempio la sintesi di diamminodioli simmetrici (*S,R,R,S*) a partire dal D-treitolo (schema 3.4).¹¹ I due nuovi centri chirali vengono introdotti sfruttando la completa stereoselettività dell'addizione di BnLi al bis-idrazone intermedio **9**, ottenuto dall'aldeide derivante dall'ossidazione degli ossidrili terminali del D-treitolo protetto.

¹⁰ Zuccarello, G.; Bouzide, A.; Kuarnstrom, I.; Niklasson, J.; Svensson, S. C. T.; Brisander, M.; Danielsson, H.; Nillroth, U.; Karlen, A.; Classon, B.; Samuelsson, B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4898.

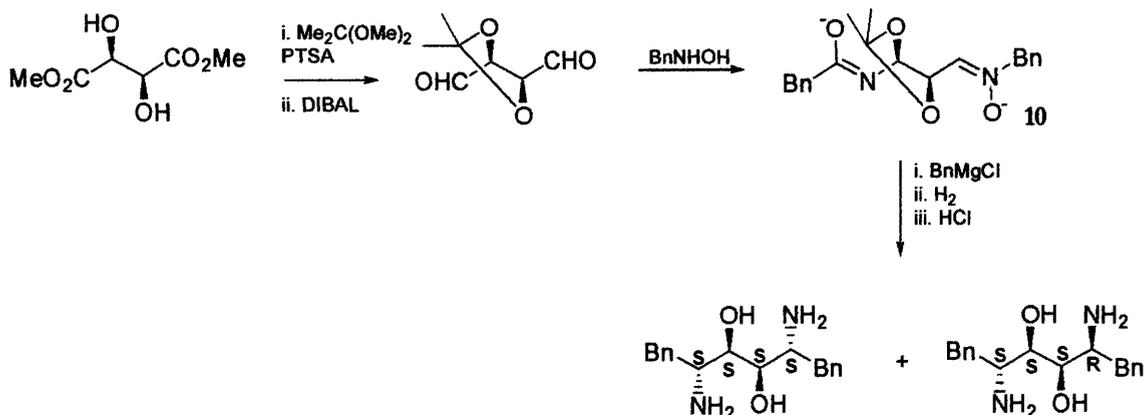
¹¹ Baker, W. R.; Condon, S. L. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3277.



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

3.1.3 Sintesi a partire dall'acido tartarico

L'acido tartarico, oltre che come precursore del treitolo,¹² è stato utilizzato in altre sintesi di diamminodioli, un esempio è riportato nello schema 3.5. L'approccio sfrutta la chimica dei nitroni **10**, facilmente ottenibili dal di-metilestere dell'acido tartarico per trattamento con benzil-idrossilammina (schema 3.6). L'addizione stereoselettiva di un reattivo di Grignard introduce i due nuovi centri chirali con una selettività superiore all'85%.¹³



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

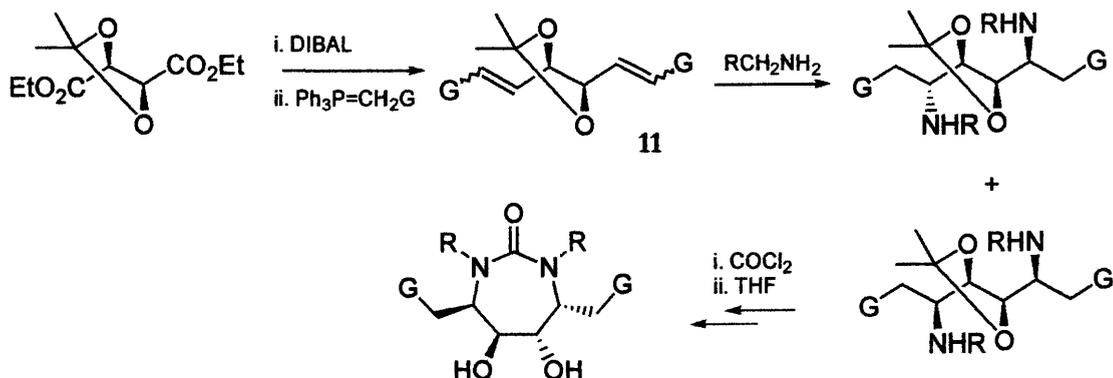
Un secondo esempio è rappresentato dalla reazione di Michael del bis-enone **11** del dietil L-tartrato con un'ammina primaria (schema 3.6).¹⁴ L'applicabilità di questa procedura è, tuttavia, limitata dalla necessità di avere un gruppo attivante (G), estere o nitrile, direttamente legato all'alchene che rende difficile l'introduzione di gruppi alchilici in quelle posizioni. La stereoselettività dipende comunque dalla geometria

¹² Rossano, L. T.; Lo, Y. S.; Anzalone, L.; Lee, Y. C.; Meloni, D. J.; Moore, J. R.; Gale, T. M.; Arnett, J. F. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4967.

¹³ (a) Dondoni, A.; Franco, S.; Junquera, S.; Merchan, F. L.; Merino, P.; Tejero, T.; Bertolasi, V. *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 505. (b) Dondoni, A.; Perrone, D.; Rinaldi, M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9252.

¹⁴ Schreiner, E. P.; Pruckner, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5380.

degli alcheni e va da 11:1, nel caso dell'enone (Z,Z), a 5:1, nel caso dell'enone (E,E). La possibilità di impiegare solamente alchil ammine nella reazione di addizione limita la sintesi unicamente alla produzione di derivati alchilati all'azoto.



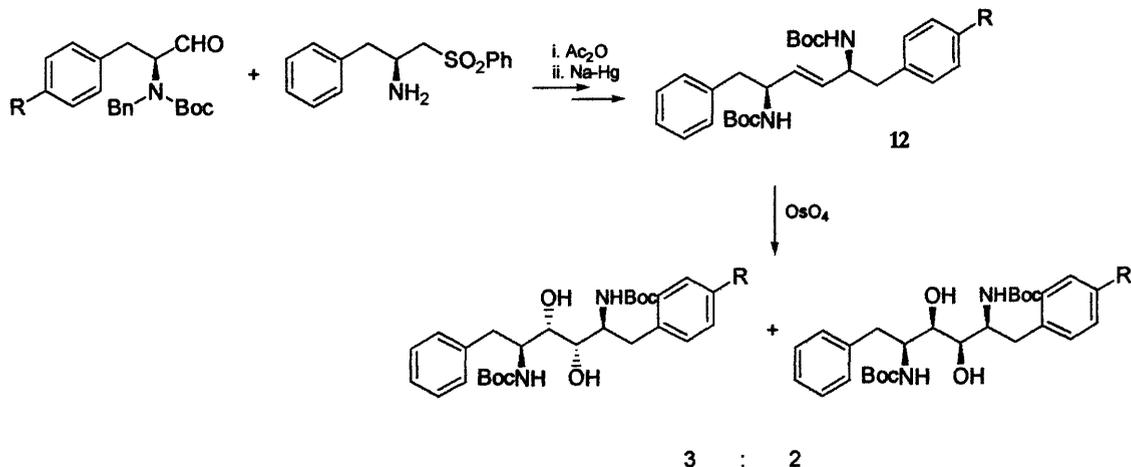
Schema 3.6: Sintesi di diamminodioli a partire da un bis-enone derivante dal dietil L-tartrato

3.1.4 Diamminodioli da amminoacidi naturali

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

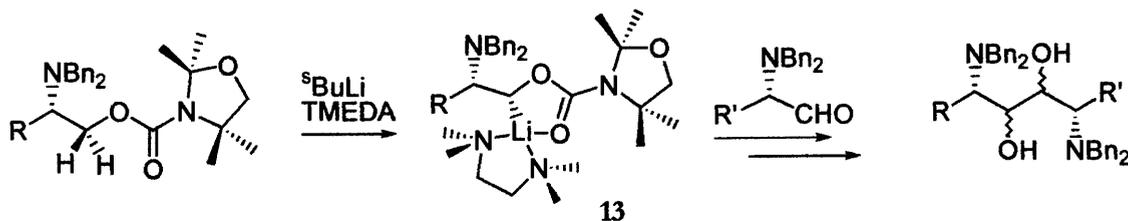
Un primo esempio¹⁵ è rappresentato dalla diidrossilazione con OsO_4 (schema 3.7) di un alchene trans **12**, ottenuto nelle condizioni di olefinazione di Julia. Questo approccio di tipo convergente consente la differenziazione dei residui laterali dell'isostere e, quindi, la sintesi di diamminodioli non simmetrici. La reazione di diidrossilazione ha, però, una bassa stereoselettività e fornisce una miscela 3:2 dei due dioli diastereoisomeri.

¹⁵ Gurjar, M. K.; Pal, S.; Rama Rao, A. V. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4769.



Schema 3.7: Sintesi di diamminodioli mediante diidrossilazione di un alchene

Una selettività molto maggiore si ottiene, invece, nella reazione di condensazione di una *N,N*-dibenzil- α -amminoaldehyde con il sale di litio del tetrametil-ossazolidin-carbammato di un *N,N*-dibenzil- α -amminoalcol **13** (schema 3.8).¹⁶ Il carbammato viene litiato con una selettività di 9:1 all'idrogeno *pro-R*, mentre la condensazione dell'aldeide è completamente stereoselettiva e fornisce il diastereoisomero (*S,S,S,S*), quale prodotto principale.



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

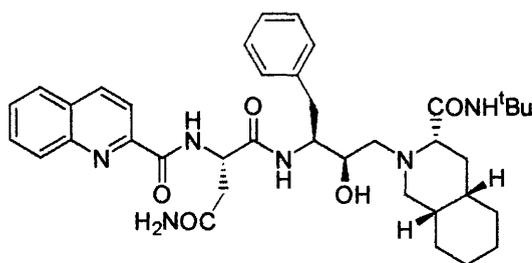
¹⁶ Weber, B.; Kolczewski, S.; Frölich, R.; Hoppe, D. *Synthesis* **1999**, 1593.

3.2 Isosteri basati sulla prolina

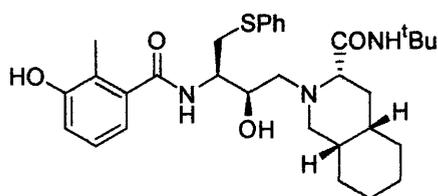
La prolina, tra gli amminoacidi naturali, è l'unico a contenere un gruppo amminico secondario; la sua particolare struttura conferisce caratteristiche strutturali e funzionali peculiari alle proteine ed ai peptidi che la contengono.

Tra gli enzimi specifici per substrati contenenti la prolina, oltre alla HIV-PR ed altre proteasi retrovirali,¹⁷ vanno ricordate le peptidil-prolil *cis/trans* isomerasi che assistono il "folding" proteico catalizzando l'isomerizzazione di legami peptidici Xaa-Pro e sono recettori di farmaci immunosoppressori.¹⁸ L'importante ruolo biologico svolto da queste specie ha stimolato la sintesi di analoghi della prolina e peptidomimetici basati su isosteri di tipo Xaa-Pro.

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



Saquinavir



Nelfinavir

In letteratura sono riportati anche esempi di nuclei centrali contenenti l'anello pirrolidinico, in particolare idrossietilammine, derivati dell'acido fosfinico, α -chetoammidi, pirrolidinoni e peptidi modificati. Tuttavia, il fatto che la prolina contenga un gruppo amminico secondario limita, in qualche modo l'approccio alla progettazione e alla sintesi di suoi analoghi; infatti, in letteratura non sono descritti

¹⁷ DeClercq, E. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *1*, 13.

¹⁸ Dugave, C.; Demange, L.; *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475.

corrispettivi degli isosteri idrossietilenici visti in precedenza, contenenti la pirrolidina. Tutti gli isosteri del tipo Xaa-Pro riportati, vengono sintetizzati a partire dalla prolina stessa, alchilando l'azoto secondario che viene quindi incorporato nella struttura dell'isostere. In questo modo si ottengono isosteri con un'estremità amminica ed una carbossilica, come un normale dipeptide, a differenza di quanto accade con isosteri diamminodiolici i quali, avendo due estremità amminiche, introducono un'inversione nella sequenza peptidica. Alcuni degli approcci sintetici sono descritti di seguito.

La struttura dell'idrossietilammina **14**, descritta da Rich all'inizio degli anni '90,¹⁹ ed utilizzata per produrre l'inibitore JG-365 (cfr. Par. 2.5.1), è stata progettata sulla base della sua stretta somiglianza con l'intermedio tetraedrico derivante dall'idrolisi del legame ammidico Phe-Pro (fig. 3.2) nella sequenza p17/p24 (Ser-Leu-Asn-Phe-Pro-Ile-Val) **15** della poliproteina substrato naturale dell'HIV-PR.

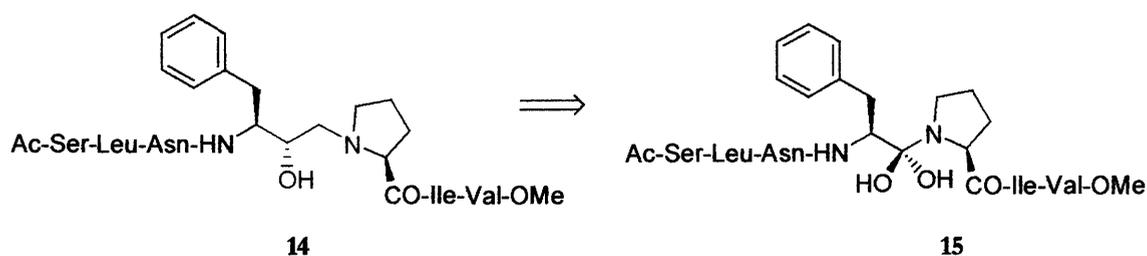
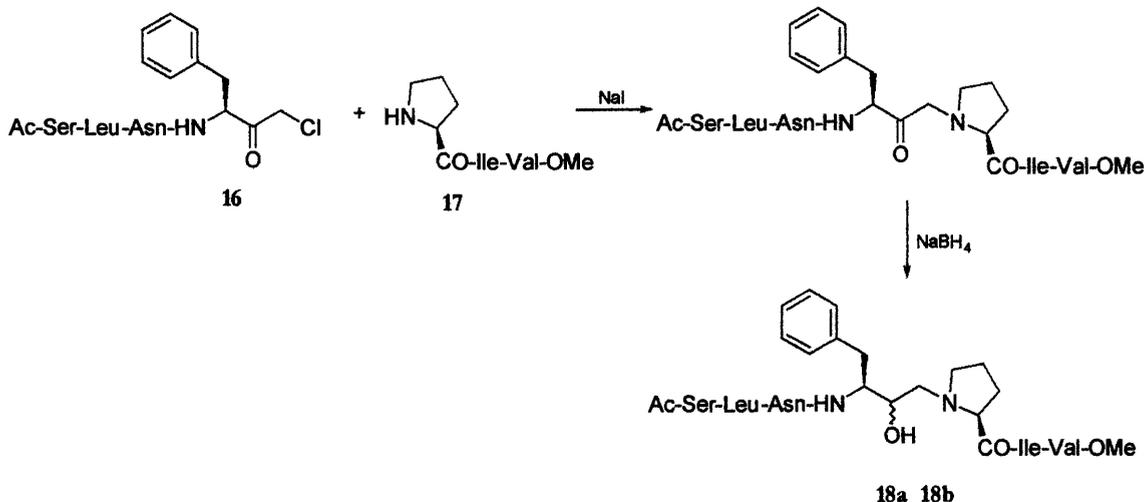


Figura 3.2: Idrossietilammina Phe-Pro e intermedio tetraedrico dell'idrolisi della sequenza p17/p24

L'isostere Phe-Pro idrossietilamminico viene inserito all'interno della catena peptidica dell'inibitore alchilando l'azoto pirrolidinico del tripeptide HN-Pro-Ile-Val-OMe **16** (schema 3.9) con il cloro-metil-chetone **17** derivante dal tetrapeptide Ac-Ser-Leu-Asn-Phe, in presenza di NaI.²⁰ La riduzione con NaBH₄ del gruppo carbonilico fornisce una miscela equimolare dei due alcoli diastereoisomeri **18a** e **18b**.

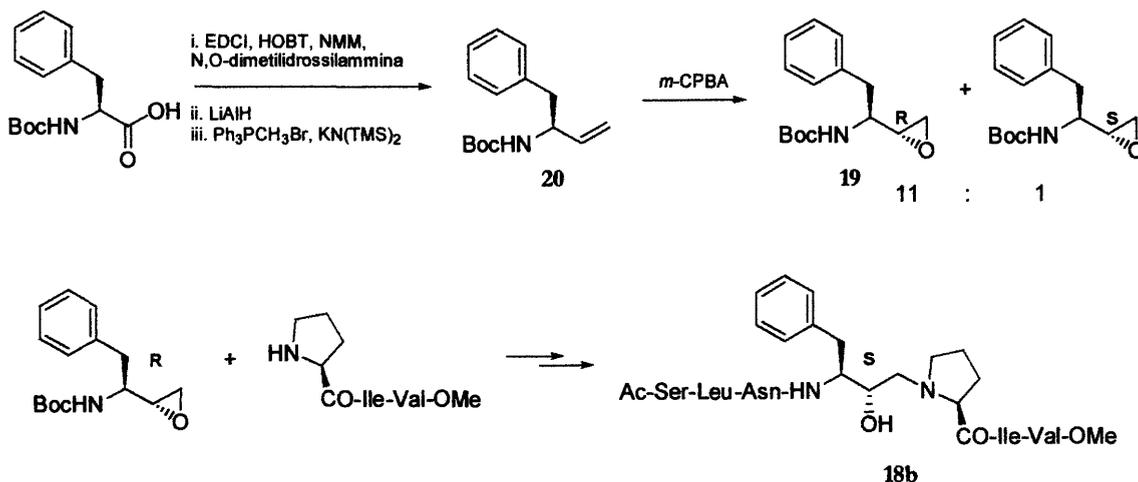
¹⁹ (a) Rich, D. H.; Green, J.; Toth, M. V.; Marshall, G. R.; Kent, S. B. H. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1285. (b) Rich, D.H.; Prasad, J. V. N. V.; Sun, C-Q.; Green, J.; Mueller, R.; Houseman, K.; MacKenzie, D.; Malkovsky, M. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3803.

²⁰ Godfrey, J. D.; Gordon, E. M.; Von Langen, D.; Engebrecht, J.; Pluscec, J. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3073.



Schema 3.9: Sintesi dell'idrossietilammina Phe-Pro per alchilazione con un peptidil cloro-metilchetone

La procedura è stata, in seguito, adattata all'ottenimento del diastereoisomero **18b** (*S,S,S*), che presenta un'attività maggiore nei confronti della proteasi (schema 3.10), alchilando la prolina con l'epossido **19**, ottenuto dall'allilammina **20** derivante dalla *N*-Boc-fenilalanina.²¹



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

Un secondo esempio di analogo dello stato di transizione dell'idrolisi del legame ammidico Phe-Pro è costituito dal derivato dell'acido fosfinico **21**.²² Questa struttura deriva dalla modificazione di un fosfonamidato **22**, analogo largamente utilizzato

²¹ Luly, J. R.; Dellaria, J.F.; Plattner, J. J.; Soderquist, J.L.; Yi, N. *J.Org. Chem.* **1987**, *52*, 1487.

²² Ikeda, S.; Ashley, J. A.; Wirsching, P.; Janda, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7604.

per l'inibizione di proteasi;²³ l'introduzione di un metilene tra fosforo ed azoto fornisce un isostere non idrolizzabile, che a pH fisiologico è presente in forma zwitterionica (fig. 3.3).

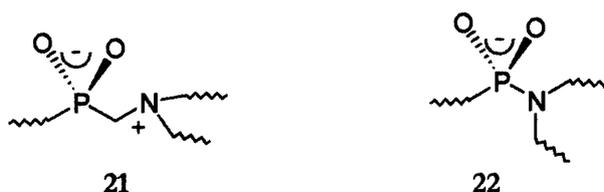
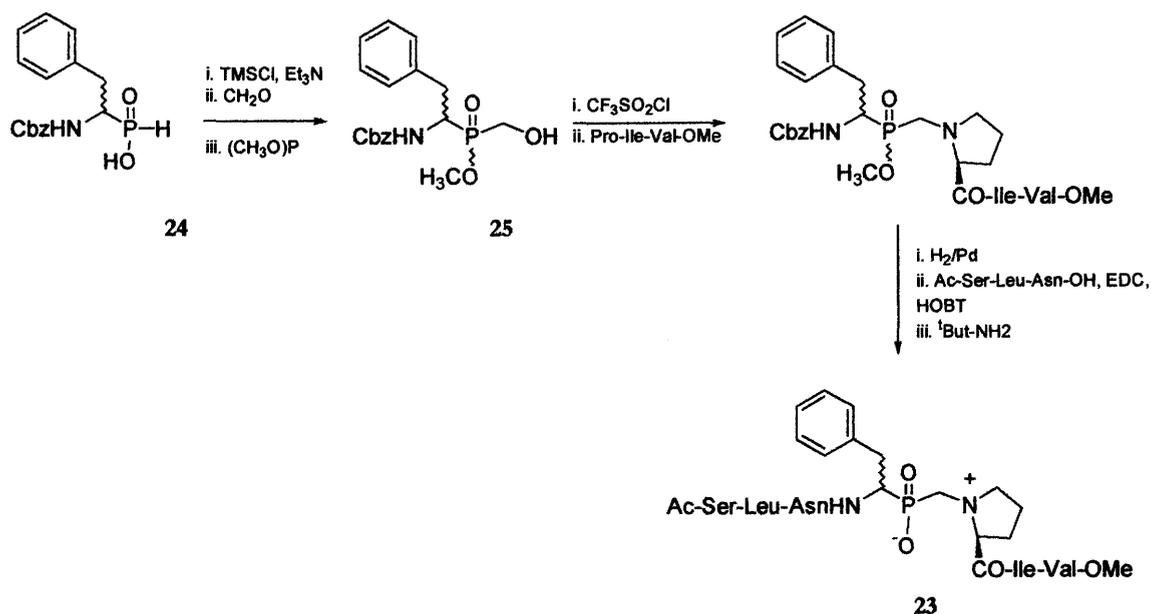


Figura 3.3: Analoghi dello stato di transizione basati sul fosforo

L'inibitore **23** (schema 3.11) si ottiene dall'*N*-Cbz-1-ammino-2-feniletil fosfito **24** che viene convertito nel corrispondente fosfinato **25** per trattamento con formaldeide e trimetilfosfito. Il gruppo alcolico primario viene attivato con $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ ed utilizzato per l'alchilazione del tripeptide *HN*-Pro-Ile-Val-OMe **17** (schema 3.12).



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

²³ (a) Bartlett, P. A.; Marlowe, C. K. *Science* **1987**, *235*, 569. (b) Bartlett, P. A.; Marlowe, C. K. *Biochemistry* **1983**, *22*, 4618. (c) Thorset, E. D.; Harris, E. E.; Peterson, E. R.; Greenlee, W. J.; Patchett, A. A.; Ulm, E. H.; Vassil, T. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 2176. (d) Jacobsen, N. E.; Bartlett, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 654.

Migliori risultati, in termini di inibizione, si ottengono utilizzando pseudodipeptidi basati su un' α -chetoammide **26** (fig. 3.4).²⁴ La struttura cristallografica del complesso con l'HIV-PR rivela che questi inibitori si legano al sito attivo nella loro forma idrata mediante una serie di legami idrogeno che blocca l'attività catalitica dei residui di aspartato 25 e 25' (fig. 3.4).^{8b}

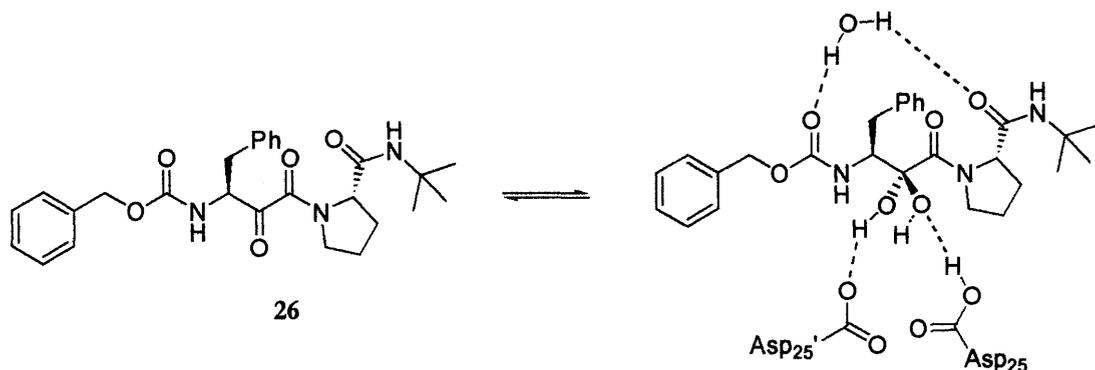


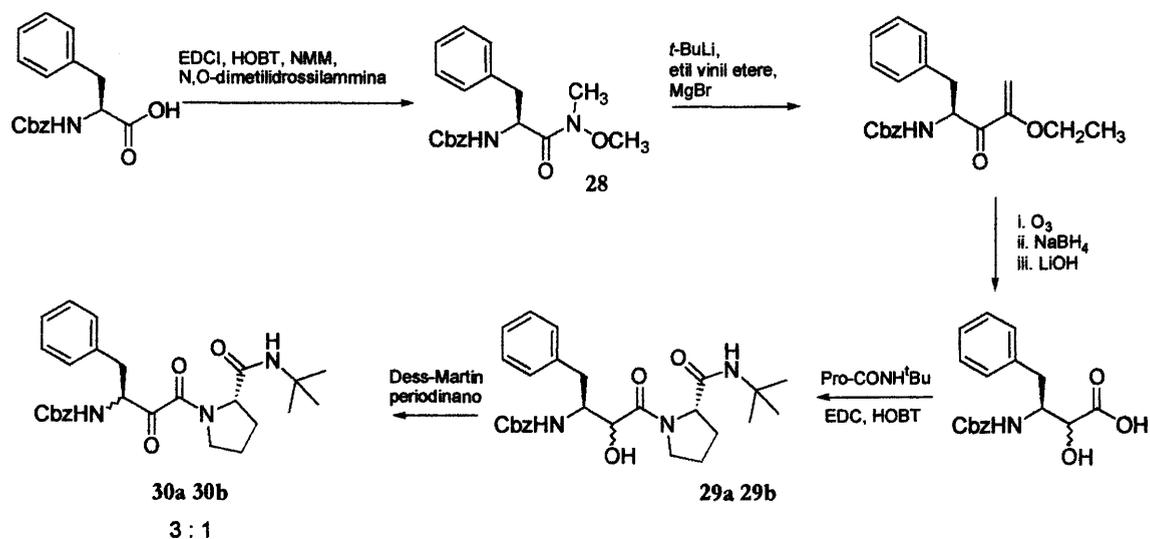
Figura 3.4: Rappresentazione schematica delle interazioni di un' α -chetoammide con i residui catalitici di aspartato 25 e 25' nel sito attivo dell'HIV-PR

La sintesi si realizza a partire dalla N-Cbz-fenilalanina (schema 3.12), la cui N-metossi-N-metilammide **28**,²⁵ viene alchilata con α -etossi-vinilmagnesio bromuro. Ozonolisi, riduzione con NaBH₄, idrolisi del gruppo estereo e coupling con la *tert*-butilammide della prolina fornisce una miscela di α -idrossi ammidi isomere **29a** e **29b** che viene ossidata con periodinano per dare una miscela 3:1 delle corrispondenti α -chetoammidi **30a** e **30b**. L'epimerizzazione del carbonio α della fenilalanina è dovuta all'elevata acidità del protone adiacente al carbonio carbonilico ed è tipica per questa classe di composti.²⁶

²⁴ (a) Munoz, B.; Giam, C.-Z.; Wong, C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* 1994, 2, 1085. (b) Slee, D. H.; Laslo, K. L.; Elder, J. H.; Ollmann, I. R.; Gustchina, A.; Kervinen, J.; Zdanov, A.; Wlodawer, A.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 11867.

²⁵ Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* 1981, 22, 3815.

²⁶ Harbeson, S. L.; Abelleria, S. M.; Akiyama, A.; *J. Med. Chem.* 1994, 37, 451.



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

La specificità dell'HIV-PR per l'idrolisi di legami Phe-Pro e Tyr-Pro è stata sfruttata anche per la messa a punto di inibitori non basati su analoghi dello stato di transizione.²⁷ In questo caso gli inibitori sono degli pseudodipeptidi nei quali la prolina è stata sostituita da un 2-benzil-pirrolidin-3-olo **31** oppure da un 2-benzil-pirrolidin-3-one **32**, (fig. 3.4). Queste strutture, mediante interazioni non covalenti, si legano con elevata affinità al sito attivo rendendolo inaccessibile al substrato. L'anello pirrolidinico sostituito interagisce con il subsito S_{1'} (Ile_{50'}, Ile_{84'}, Leu_{23'}) attraverso i metileni dell'anello, e con il subsito S_{2'} (Ile_{47'}, Val_{32'}) attraverso il residuo benzilico in posizione 2. L'anello aromatico della fenilalanina, o della tirosina, occupa il subsito S₁ (Ile₅₀, Ile₈₄, Leu₂₃), mentre il gruppo *tert*-butilico si sistema nel subsito S₂ (Ile₄₇, Val₃₂). I dipeptidi interagiscono anche con i residui di aspartato catalitici attraverso il legame con una molecola d'acqua (fig. 3.4).

²⁷ (a) Bouygues, M.; Medou, Quelever, G.; Chermann, J.-C.; Camplo, M.; Kraus, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 277. (b) Bouygues, M.; Medou, M.; Chermann, J.-C.; Camplo, M.; Kraus, J.-L. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 445. (c) Courcambeck, J.; Bihel, F.; De Michelis, C.; Quelever, G.; Kraus, J.-L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 1421.

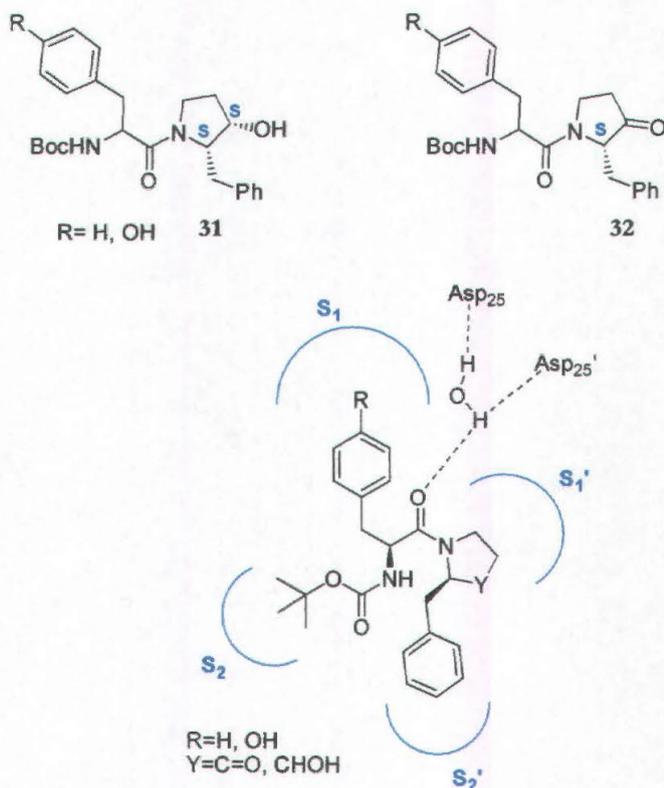
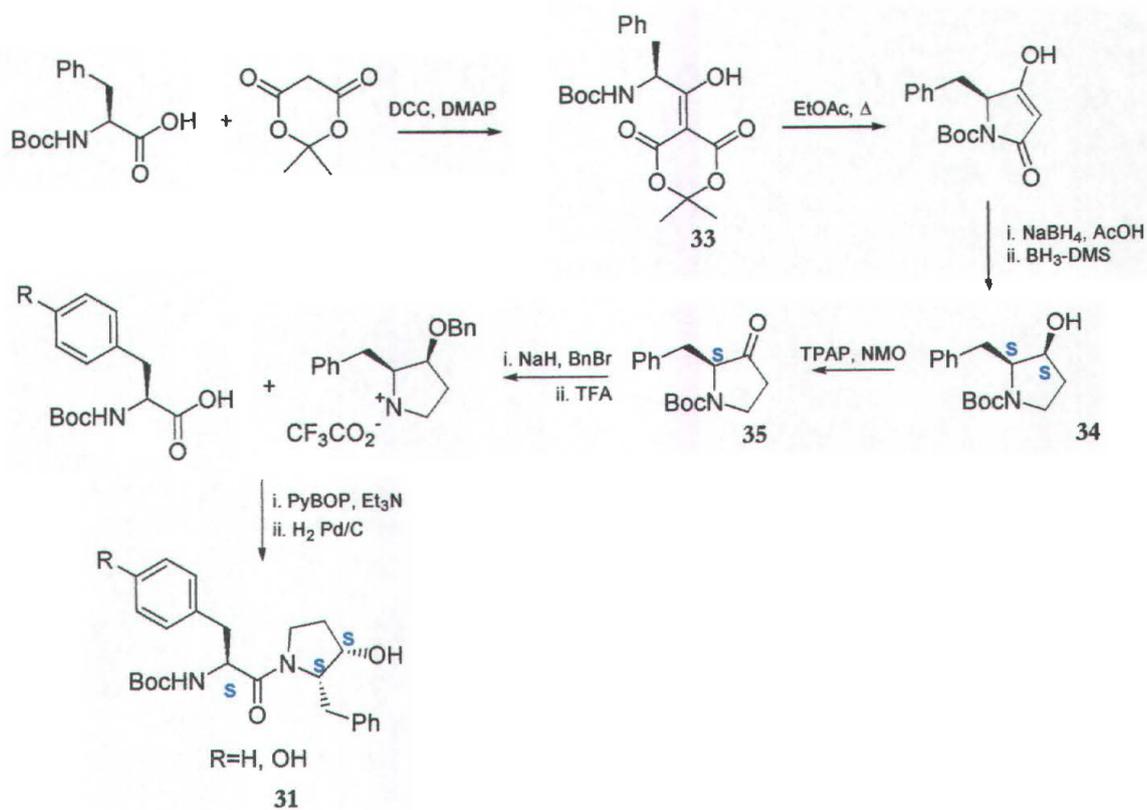


Figura 3.4: Struttura degli pseudodipeptidi contenenti l'anello pirrolidinico funzionalizzato e rappresentazione schematica delle loro interazioni con il sito attivo dell'HIV-PR

L'approccio sintetico è di tipo enantioconvergente e permette di ottenere il (2*S*,3*S*)-benzil-pirrolidin-3-olo **34** ed il corrispondente (2*S*)-2-benzil-pirrolidin-3-one **35** in forma enantiomericamente pura a partire dalla N-Boc-L-fenilalanina, come riportato nello schema 3.13. L'aggiunta dell'acido di Meldrum's all'amminoacido attivato fornisce l'acido tetramico N-sostituito **33**.²⁸ Dalla riduzione del gruppo carbonilico e del lattame si ottiene il (2*S*,3*S*)-2-benzil-pirrolidin-3-olo **34**, che viene ossidato al corrispondente (2*S*)-2-benzil-pirrolidin-3-one **35**. I derivati pirrolidinici vengono quindi condensati con L-fenilalanina o L-(OBz)-L-tirosina a dare i corrispondenti pseudodipeptidi (schema 3.13).

²⁸ (a) Jouin, P.; Castro, B.; Nisato, D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1177. (b) Galeotti, N.; Poncet, J.; Chinche, L.; Jouin, P. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5370.



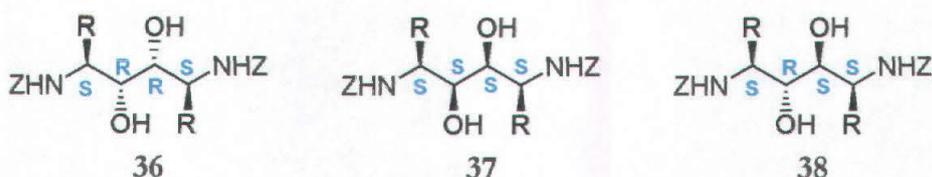
Schema 3.13: Sintesi di (2*S*,3*S*)-2-benzil-pirrolidin-3-olo e (2*S*)-2-benzil-pirrolidin-3-one

PARTE SECONDA: RISULTATI E DISCUSSIONE

4. Sintesi di diamminodioli basati sulla prolina

4.1 Introduzione

Fino alla prima metà degli anni Novanta, la maggior parte delle sintesi di diamminodioli apparse in letteratura riguardava i diastereoisomeri (*S,R,R,S*) **36**, ottenuti principalmente mediante reazioni di condensazione pinacolica o modificazione di zuccheri (cfr. Par. 3.1.2). Nonostante i dati di attività biologica indicassero un'elevata efficacia anche per gli inibitori basati su diamminodioli (*S,S,S,S*) **37** ed (*S,S,R,S*) **38**,¹ era possibile ottenere questi nuclei centrali solamente come sottoprodotti delle reazioni di condensazione pinacolica oppure mediante inversione di configurazione del prodotto principale (*S,R,R,S*) **36**.



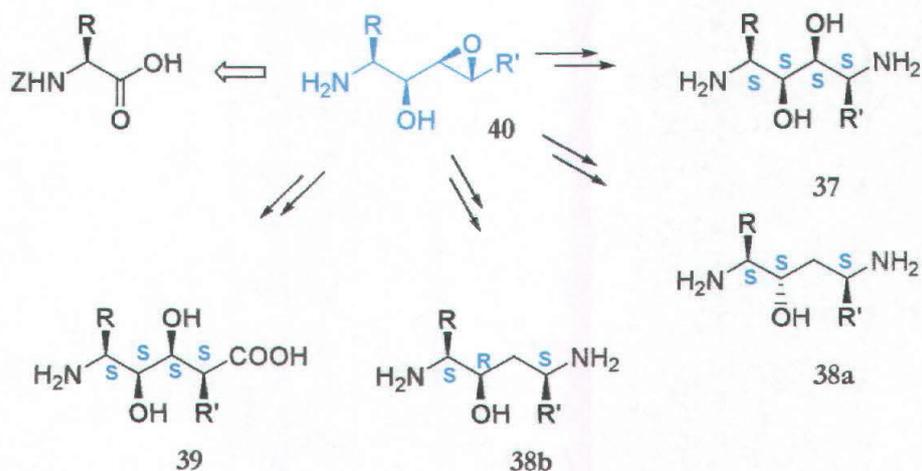
La possibilità di disporre di un approccio stereoselettivo per la sintesi dei differenti diastereoisomeri avrebbe, quindi, permesso di studiare nel dettaglio l'influenza della stereochimica non solo sull'attività degli inibitori, ma anche sulle proprietà farmacocinetiche, la biodisponibilità e la solubilità. Recentemente è stata messa a punto una metodologia generale (schema 4.1) per la sintesi stereoselettiva di diamminodioli di tipo (*S,S,S,S*) **37**,² diamminoalcoli epimeri al C₂ **38a-38b**³ e diidrossi- δ -amminoacidi **39**⁴ basata sull'apertura regio- e stereoselettiva con differenti nucleofili del medesimo epossialcol **40** derivante da un amminoacido naturale.

¹ Kempf, D. J.; Codavoci, L.; Wang, X. C.; Kohlbrenner, W. E.; Wideburg, N. E.; Saldivar, A.; Vasavanonda, S.; Marsh, K.; Bryant, P.; Sham, H. L.; Green, B. G.; Betebenner, D.; Erickson, J.; Norbeck, D. W. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 320.

² Benedetti, F.; Miertus, S.; Norbedo, S.; Tossi, A.; Zlatoidsky, P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9348.

³ (a) Benedetti, F.; Norbedo, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10071. (b) Benedetti, F.; Berti, F.; Norbedo, S. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8635.

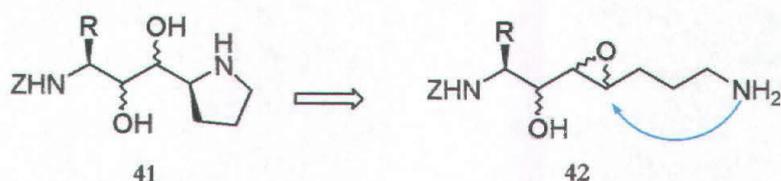
⁴ Benedetti, F.; Magnan, M.; Miertus, S.; Norbedo, S.; Parat, D.; Tossi, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3027.



Scheme 4.1

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

In questa tesi di dottorato, inserita nell'ambito di un progetto riguardante la sintesi e la valutazione dell'attività biologica di inibitori peptidomimetici dell'HIV-PR,⁵ si è voluto estendere questa metodologia alla sintesi di un nuovo tipo di isosteri di dipeptidi contenenti l'anello della prolina **41**. Il nuovo approccio (schema 4.2) è basato sull'apertura intramolecolare, anziché intermolecolare come nello schema 4.1, dell'anello epossidico da parte di un ammino gruppo opportunamente posizionato all'estremità della catena dell'intermedio **42**, generando così l'anello pentatomico desiderato.



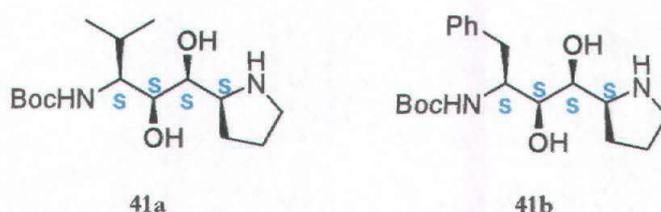
Scheme 4.2

⁵ (a) Tossi, A.; Bonin, I.; Antcheva, N.; Norbedo, S.; Benedetti, F.; Miertus, S.; Nair, A. C.; Maliar, T.; Dal Bello, F.; Palu, G.; Romeo, D. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1715. (b) Tossi, A.; Benedetti, F.; Norbedo, S.; Skrbec, D.; Berti, F.; Romeo, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4719.

L'interesse per le strutture **41** nasce dalla specificità mostrata dall'HIV-PR nei confronti di legami ammidici aventi la prolina come residuo N-terminale (cfr. Par. 2.3.4) e dal fatto che isosteri diidrossietilenici contenenti la prolina non sono stati precedentemente descritti.

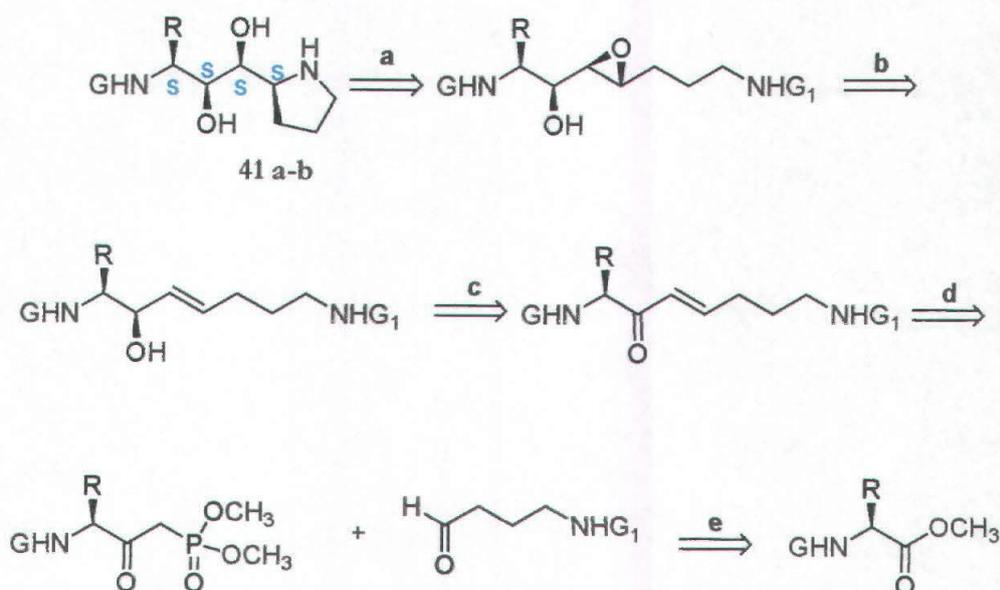
4.2 Sintesi di isosteri Val-Pro e Phe-Pro a stereochimica (*S,S,S,S*)

Il primo obiettivo del progetto di tesi è stato la sintesi dei diastereoisomeri (*S,S,S,S*) degli isosteri Val-Pro **41a** e Phe-Pro **41b**.



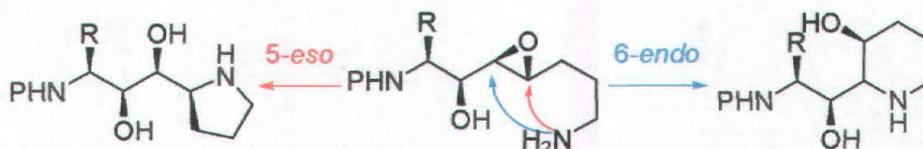
4.2.1 Analisi retrosintetica

La sintesi di **41a,b** è stata pianificata a partire dagli amminoacidi valina e fenilalanina, sulla base dell'analisi retrosintetica riportata nello schema 4.3.



Schema 4.3: Analisi retrosintetica. **a:** R=*i*-Pr; **b:** R=Bn

La prima disconnessione (passaggio a) corrisponde all'apertura S_N2 intramolecolare dell'anello di un epossialcol da parte di un gruppo amminico primario in posizione ω , derivante dalla rimozione del gruppo protettivo G_1 . Per quanto riguarda la selettività nell'apertura dell'eossido, ci si attendeva che la ciclizzazione 5-*eso* risultasse favorita rispetto ad una di tipo 6-*endo*, che fornirebbe un ciclo a sei termini (schema 4.4).⁶



Schema 4.4: Regioselettività nella reazione di apertura intramolecolare dell'eossido

La corretta configurazione (S,S,S,S) del prodotto finale deriva da una serie di passaggi prevedibilmente stereoselettivi.

- 1- L'olefinazione di Horner-Emmons (passaggio d) di un β -chetofosfonato con un'aldeide, in questo caso opportunamente protetta all'azoto, fornisce di preferenza l'enone *E*:⁷ la configurazione *trans* del doppio legame è necessaria per ottenere l'eossialcol con la stereochimica voluta.
- 2- La riduzione del gruppo carbonilico (passaggio c) e la successiva epossidazione dell'alchene (passaggio b) sono controllate per induzione asimmetrica dallo stereocentro adiacente al centro di reazione.
- 3- L'apertura dell'eossido avviene con un meccanismo S_N2 e quindi con inversione della configurazione del centro di reazione.

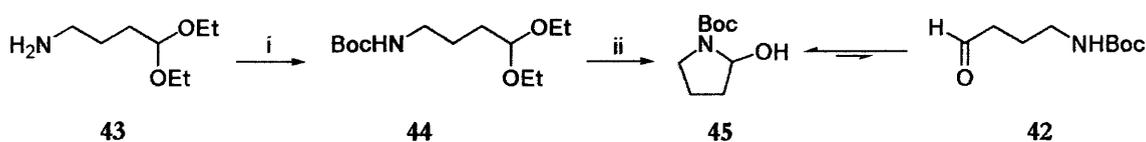
La configurazione dei tre nuovi carboni asimmetrici risulta, quindi, definita da quella dell'amminoacido di partenza.

⁶ Esempi recenti di apertura intramolecolare di epossidi con nucleofili dell'azoto: (a) Ayad, T.; Genisson, Y.; Baltas, M.; Gorrichon, L. *Chem. Commun.* **2003**, 582. (b) Lee, J.; Hoang, T.; Lewis, S.; Weissman, S. A.; Askin, D.; Volante, R. P.; Reider, P. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6223. (c) Pearson, W. H.; Hembre, E. J. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5546.

⁷ (a) Horner, L.; Hoffmann, H.; Wippel, H. G. *Chem. Ber.* **1958**, 91, 61. (b) Wadsworth, Jr., W. S.; Emmons, W. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 1733.

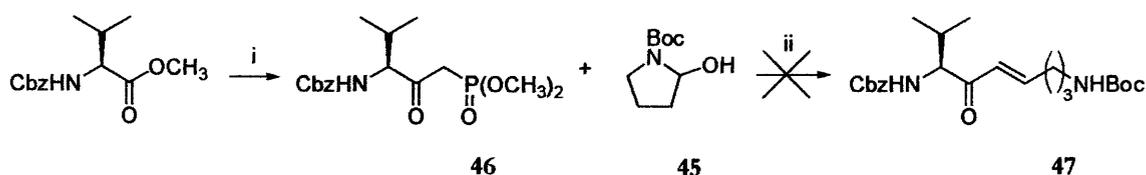
4.2.2 Sintesi da 4-amminobutirraldeide

La via seguita inizia con la sintesi della N-Boc-4-amminobutirraldeide **42** a partire dal dietil acetale della 4-ammino-butirraldeide **43**, commercialmente disponibile. La strategia (schema 4.5) prevede la protezione del gruppo amminico primario come *tert*-butilcarbammato **44** seguita dall'idrolisi acida dell'acetale. In queste condizioni, però, la deprotezione del gruppo aldeidico è seguita da una spontanea ciclizzazione a dare N-Boc-2-idrossi-pirrolidina **45**.



Schema 4.5: *i:* (Boc)₂O, CH₂Cl₂, 0 °C; *ii:* AcOH/H₂O

È noto che in sistemi di questo tipo la forma carbinolica, termodinamicamente più stabile, è in equilibrio con la corrispondente aldeide (schema 4.5) e ne può, quindi, rappresentare un equivalente sintetico.⁸ La N-Boc-2-idrossi-pirrolidina **45** è stata quindi fatta reagire con il fosfonato **46** derivante dalla reazione della N-Cbz-L-valina con il sale di litio del metil-dimetilfosfonato (schema 4.6). Conducendo, tuttavia, la reazione nelle condizioni abitualmente utilizzate per l'olefinazione di Horner-Emmons⁹ non si è ottenuto il chetone α,β -insaturo **47** voluto.



Schema 4.6: *i:* LiCH₂PO(OCH₃)₂, THF, -78 °C; *ii:* K₂CO₃, EtOH, 25 °C

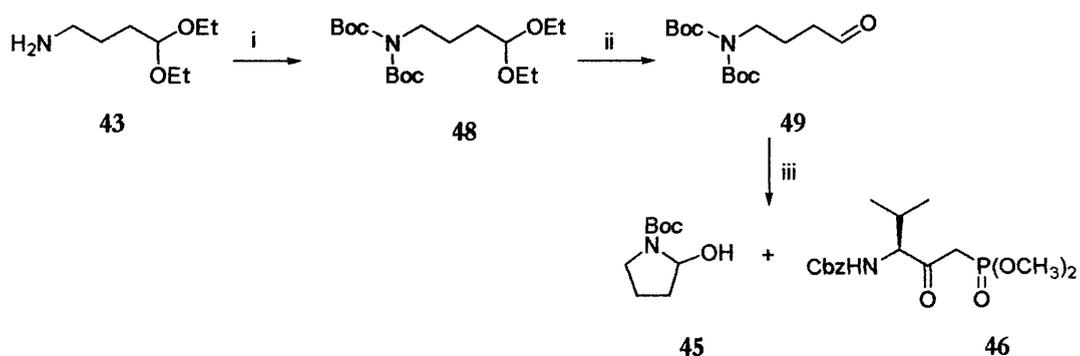
Per evitare la formazione della 2-idrossi-pirrolidina il gruppo amminico primario dell'aldeide protetta **43** è stato convertito nel corrispondente di-Boc derivato **48**, che è stato quindi deprotetto a dare l'aldeide **49** (schema 4.7).¹⁰ La doppia protezione diminuisce, però, la stabilità in ambiente basico del gruppo *tert*-butossicarbonilico e

⁸ (a) Johnson, T.; Quibell, M.; Turnell, W. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 2843. (b) Ihara, M.; Kirihara, T.; Kawaguchi, A.; Tsuruta, M.; Fukumoto, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1719.

⁹ Mikolajczyk, M.; Balczewski, P. *Synthesis* **1987**, 659.

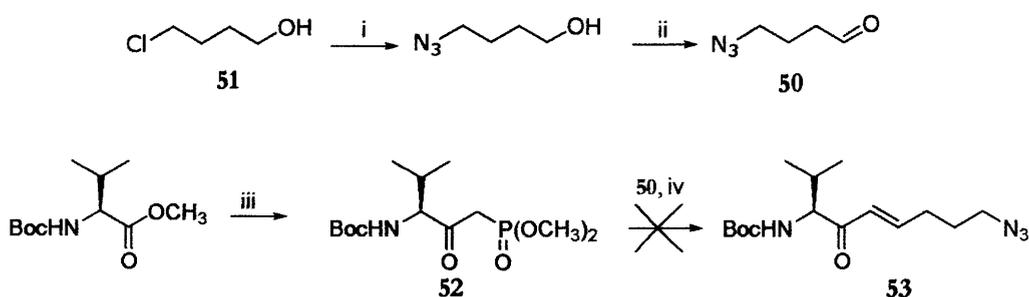
¹⁰ Carretero, J. C.; Arrayas, R. G. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2993.

le condizioni della successiva olefinazione causano il distacco di un Boc e la conseguente formazione di **45**, impedendo, ancora una volta, di ottenere l'enone **47** cercato.



Schema 4.7: *i.* (Boc)₂O, CH₂Cl₂, 0 °C; *ii.* AcOH/H₂O, 25 °C; *iii.* K₂CO₃, EtOH, 25 °C

Non essendo riusciti a risolvere il problema della protezione del gruppo amminico, si è deciso di modificare la strategia e di utilizzare, invece della 4-amminobutirraldeide, il 4-azido-butanale **50** (schema 4.8), ottenuto per addizione di sodio azide al 4-cloro-butanolo **51**,¹¹ seguita dall'ossidazione dell'ossidrilico con piridinio clorocromato (PCC). Introducendo l'azide sulla catena si eliminano i problemi relativi alla protezione del gruppo amminico primario, che può essere comunque generato in uno stadio successivo riducendo l'azide. In questo caso l'aldeide **50** è stata fatta reagire con il fosfonato N-Boc protetto **52**, in modo da evitare la rimozione del Cbz durante l'idrogenazione dell'azide. La reazione tra **50** e **52** non ha, tuttavia, fornito l'enone **53** (schema 4.8); la tendenza del substrato **50** ad eliminare l'azide in ambiente basico ne causa, infatti, la decomposizione.

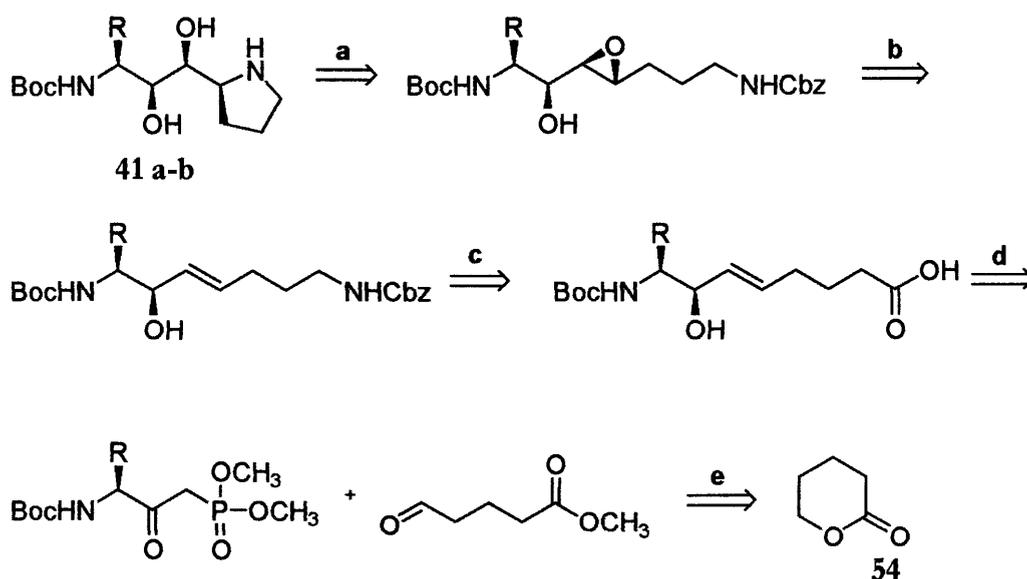


Schema 4.8: *i.* NaN₃, DMF, 70 °C; *ii.* PCC, CH₂Cl₂, 25 °C; *iii.* LiCH₂PO(OCH₃)₂, THF, -78 °C; *iv.* K₂CO₃, EtOH, 25 °C.

¹¹ Carboni, B.; Benalil, A.; Vaultier, M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3736.

4.2.3 Sintesi dal δ -valerolattone

Alla luce di questi insuccessi, la strategia sintetica è stata radicalmente modificata in modo da evitare l'impiego di una γ -amminoaldeide. La nuova analisi retrosintetica proposta è riportata nello schema 4.9.



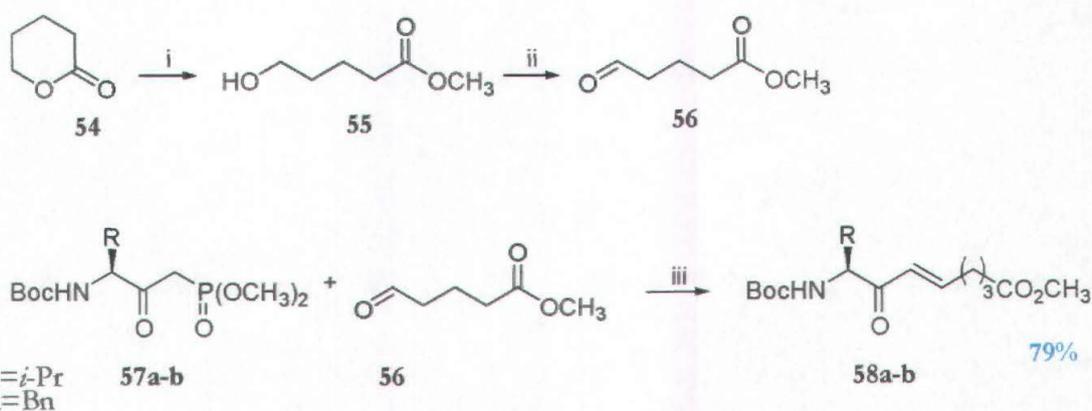
Schema 4.9: Analisi retrosintetica

Le due prime disconnessioni (passaggi **a** e **b**) rimangono invariate. Il gruppo amminico terminale, protetto come carbammato, deriva, in questo caso, dal *Riarrangiamento di Curtius* dell'acido carbossilico corrispondente (passaggio **c**), la cui sintesi è riconducibile al δ -valerolattone **54** (passaggi **d** ed **e**).

L'aldeide **56** si ottiene in due passaggi dal δ -valerolattone **54**, secondo la procedura riportata da Huckstep (schema 4.10):¹² il δ -valerolattone viene convertito nel 5-idrossi-valerato di metile **55** mediante trans-esterificazione con metanolo in presenza di acido solforico concentrato a refluxo; l'alcol **55** viene quindi ossidato utilizzando piridinio clorocromato (PCC) in diclorometano, condizioni comunemente impiegate per la conversione selettiva di alcoli in aldeidi.¹³ La successiva olefinazione del N-Boc-fosfonato **57** fornisce come unico prodotto l'enone **58** a configurazione *E*, la cui stereochimica è confermata da una costante di accoppiamento tra i due protoni vinilici pari a 15.6 Hz.

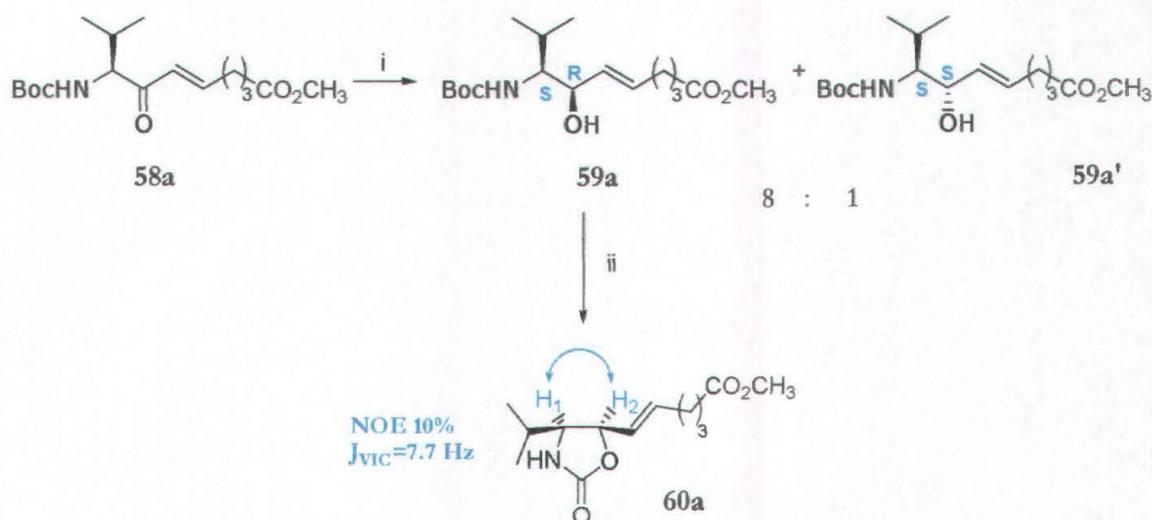
¹² Huckstep, M.; Taylor, R. J. K.; Canton, M. P. L. *Synthesis* **1982**, 881.

¹³ Piancatelli, G.; Scettri, A.; D'Auria, M. *Synthesis* **1982**, 245.



Schema 4.10: Reagenti e condizioni: *i.* MeOH, H₂SO₄, refluxo; *ii.* PCC, CH₂Cl₂, 25 °C; *iii.* LiCH₂P(O)(OCH₃), THF, -78 °C.

Il passaggio successivo è la riduzione del chetone α,β -insaturo con NaBH₄ a dare i corrispondenti alcoli allilici **59a,b**. In particolare, la riduzione dell'enone **58a** derivante dalla valina fornisce una miscela 8:1 dei due alcoli **59a** e **59a'**. Il prodotto principale **59a** viene facilmente isolato per via cromatografica e quindi convertito nel corrispondente ossazolidinone **60a** per determinarne la stereochimica. Il valore della costante di accoppiamento, pari a 7.7 Hz, tra i due protoni vicinali H₁ ed H₂ dell'anello ed un valore di *Nuclear Overhauser Effect* (NOE) pari a 10%, sono consistenti con una disposizione *cis* dei sostituenti in **60a** e, quindi, con una configurazione (*S,R*) dell'alcol **59a** (schema 4.11).¹⁴



Schema 4.11: *i.* NaBH₄, MeOH, 0 °C; *ii.* NaH, THF, 25 °C.

La stereoselettività nella riduzione e, più in generale, nell'addizione di nucleofili ad α -amminochetoni è controllata dall'induzione asimmetrica e può essere spiegata utilizzando i modelli di Cram chelato¹⁵ e di Felkin-Ahn.¹⁶ Secondo il modello di Cram chelato (fig. 4.1.A), la presenza di uno ione metallico favorisce la chelazione tra il gruppo carbonilico ed il gruppo amminico protetto, bloccando il substrato in una conformazione in cui NHR'' ed il gruppo carbonilico sono eclissati, mentre l'idrogeno ed R' sono disposti sui lati opposti del carbonile. L'attacco dell'idruro, quindi, avviene preferenzialmente dal lato del sostituito meno ingombrato portando all'alcol *anti*. Secondo il modello di Felkin-Ahn (fig 4.1.B), invece, il substrato adotta la conformazione nella quale il gruppo NHR'' si dispone ortogonalmente al carbonile, massimizzando, così, le interazioni stereoelettroniche nello stato di transizione.¹⁷ L'attacco del nucleofilo dal lato del sostituito meno ingombrato fornisce, in questo caso, il prodotto *sin*.

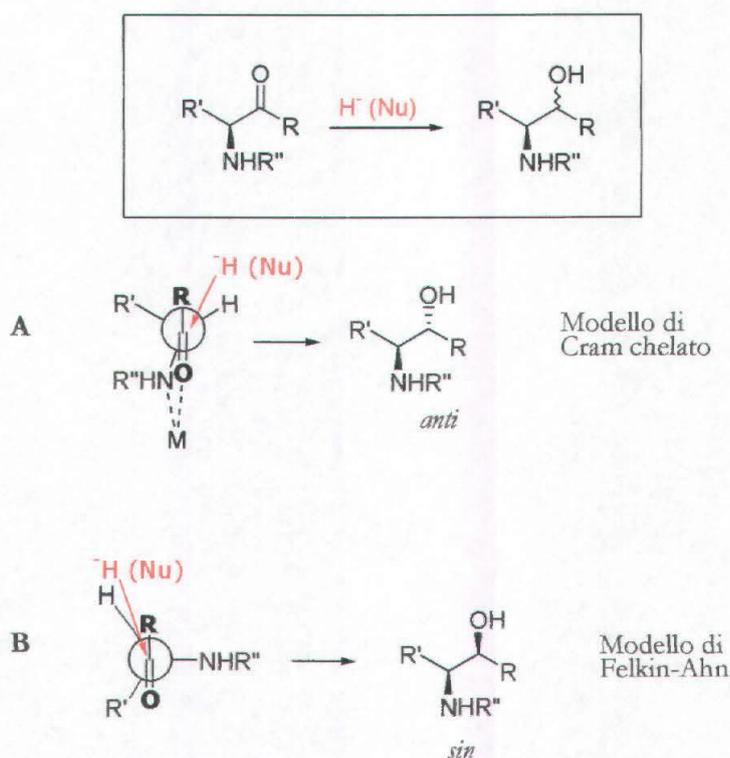


Figura 4.1: Rappresentazione schematica dei modelli di Cram e Felkin-Ahn per la riduzione di α -amminochetoni.

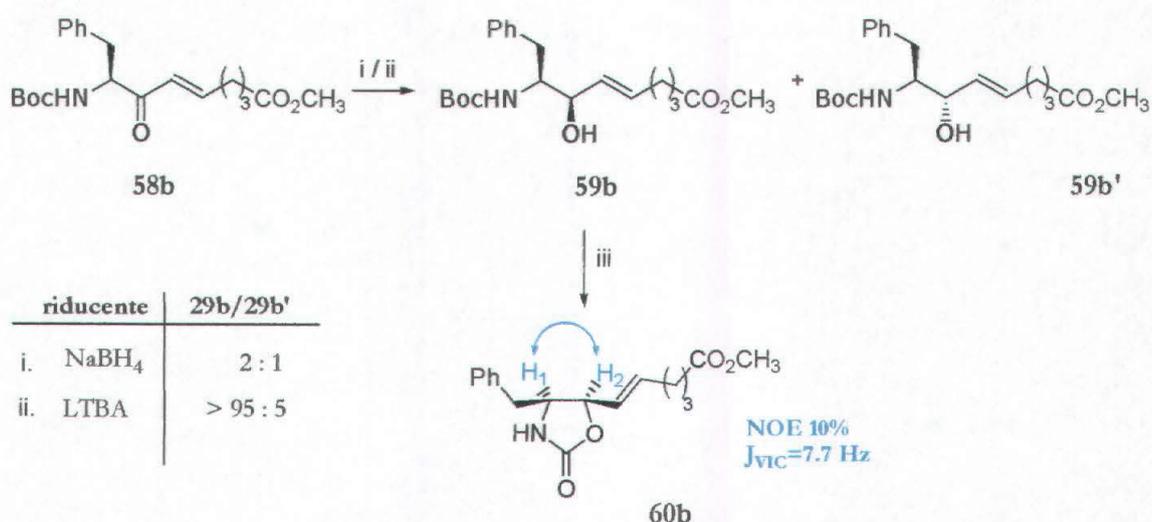
¹⁴ Dondoni, A.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Pedrini, P. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1439.

¹⁵ (a) Cram, D. J.; Abd Elhafez, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 5828. (b) Reetz, M. T. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 462. (c) Mengel, A.; Reiser, O. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1191.

¹⁶ (a) Felkin, H.; Chérest, M.; Prudent, N. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 2199. (b) Ahn, N. T.; Einsenstein, O. *Nouv. J. Chim.* **1977**, *1*, 61-70.

¹⁷ Einsenstein, O.; Hoffmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6184.

In accordo con questo modello, nel caso della fenilalanina, essendo la catena laterale benzilica meno ingombrata rispetto a quella isopropilica della valina, la riduzione del chetone α,β -insaturo **58b** (schema 4.12) con NaBH_4 in metanolo è meno selettiva e fornisce una miscela 2:1 dei due alcoli diastereoisomeri, comunque essere separabili per cristallizzazione frazionata. Anche in queste condizioni il prodotto principale è l'alcol (*S,R*) **59b**, la cui stereochimica è stata confermata, come fatto in precedenza, mediante analisi NMR del corrispondente ossazolidinone **60b** (schema 4.12).



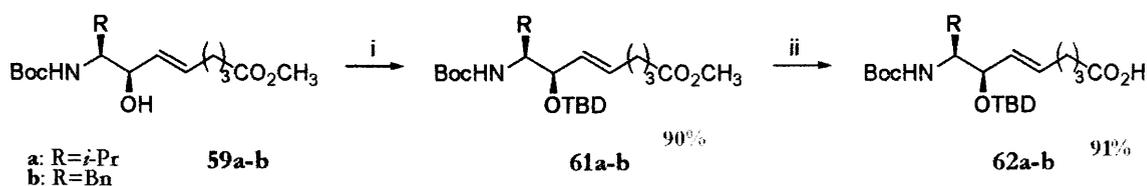
Schema 4.12: Reagenti e condizioni: *i.* NaBH_4 , MeOH, 0 °C; *ii.* LTBA, EtOH, -78 °C; *iii.* NaH, THF, 25 °C

La separazione dei due alcoli per cristallizzazione frazionata riduce notevolmente, però, la resa del prodotto desiderato **59b**, che non supera mai il 30%. Alla luce di questo risultato si è cercato di ottimizzare la stereoselettività della riduzione utilizzando un riducente diverso. Nel 2002 Hoffman¹⁸ ha descritto la sintesi stereoselettiva di *anti* amminoalcoli a partire da N-Cbz- α -amminochetoni utilizzando come riducente litio tri-*tert*-butossialluminio idruro (LTBA) in etanolo. Utilizzando tali condizioni, la riduzione dell'enone **58b** fornisce esclusivamente l'alcol allilico **59b** (schema 4.12). L'elevata selettività viene spiegata ipotizzando la formazione di un complesso stabile tra l'alluminio del riducente e l'ammino chetone,

¹⁸ Hoffman, R. V.; Maslouh, N.; Cervantes-Lee, F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1045.

che subisce attacco da parte dell'idruro sulla faccia meno ingombra secondo il modello di Cram chelato (fig. 4.1.A). La chelazione è facilitata dalla tendenza dell'alluminio, in un solvente alcolico, a scambiare rapidamente leganti alcossidici¹⁹ attraverso un meccanismo dissociativo;²⁰ se si conduce, infatti, la stessa reazione in un solvente non-alcolico, ad esempio THF, non si osserva alcuna diastereoselettività.²¹

Ottenuti gli alcoli allilici **59a-b** si procede alla temporanea protezione dell'ossidrilica come *tert*-butil-dimetilsilil etere **61a-b** ed alla successiva idrolisi del gruppo estereo terminale, che porta agli acidi carbossilici **62a-b** (schema 4.13).



Schema 4.13: Reagenti e condizioni: *i.* TBDSCl, imidazolo, DMF, 25 °C, 16h; *ii.* LiOH, H₂O/THF, 25 °C, 16h

Il secondo gruppo amminico viene introdotto a questo punto della sintesi mediante *Riarrangiamento di Curtius*,²² per trattamento dell'acido **62** con difenil-fosforilazide, trietilammina ed alcol benzilico secondo il meccanismo generale riportato nello schema 4.14. La difenil-fosforilazide (DPPA) (**ii**) in presenza di trietilammina reagisce con l'acido carbossilico (**i**) a dare la corrispondente acil-azide (**iv**) attraverso la formazione di un'anidride mista carbossil-fosforica intermedia (**iii**). Il riscaldamento della miscela determina il riarrangiamento dell'acil azide²³ a dare un isocianato (**v**) che, in presenza di un alcol, viene rapidamente convertito nel corrispondente carbammato (**vi**).

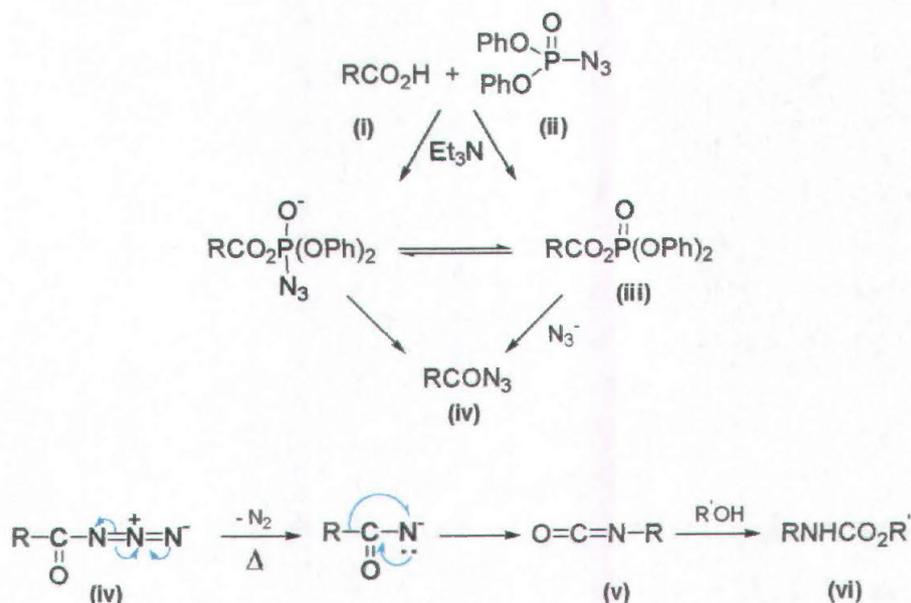
¹⁹ (a) Haubenstock, H.; Eliel, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2363. (b) Brown, H. C.; Shoaf, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1079.

²⁰ Brown, A. J.; Howarth, O. W.; Moore, P.; Parr, W. J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1978**, 1776.

²¹ Norbedo, S. Tesi di laurea in Chimica, **1997**.

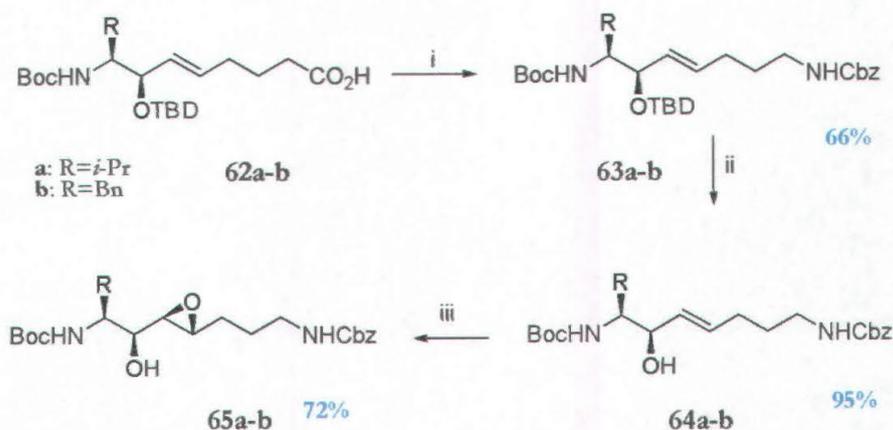
²² Ninomiya, K.; Shioiri, T.; Yamada, S. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2151.

²³ Banthorpe, D. V. In Patai *The Chemistry of the Azido Group*, Wiley: New York, **1971**, p. 397.



Schema 4.14: Meccanismo della Reazione di Riarrangiamento di Curtius.

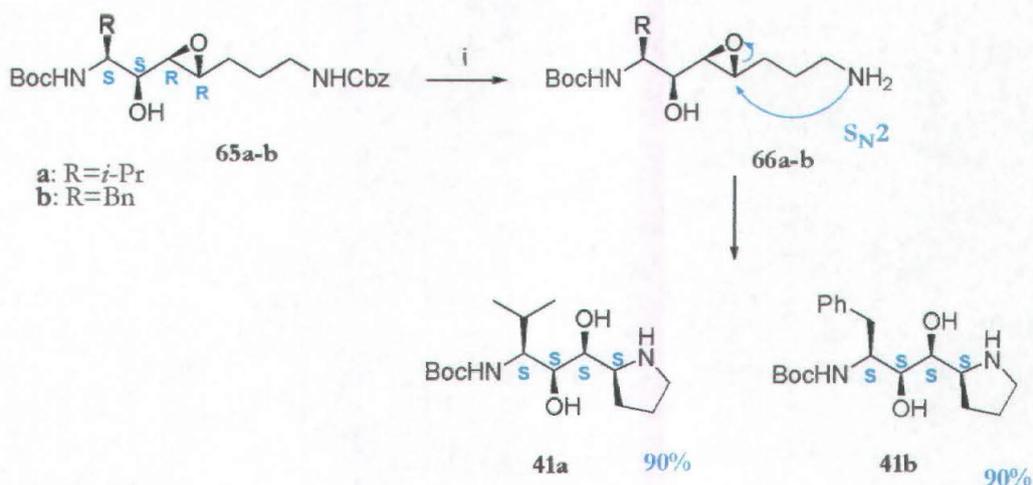
Nel nostro caso (schema 4.15), conducendo il riarrangiamento in presenza di alcol benzilico, è stato ottenuto in un unico passaggio il derivato **63**, che presenta rispetto all'acido di partenza **62**, un atomo di carbonio in meno ed un gruppo amminico in posizione ω ortogonalmente protetto come Cbz, con una resa del 66%. Il passaggio successivo è la deprotezione, con tetrabutylammonio fluoruro (TBAF) dell'ossidrilc allilico; l'ossidrilc libero controlla la selettività della successiva epossidazione del diamminoalcol **64** con acido *m*-cloroperbenzoico,²⁴ ottenendo così, come unico prodotto, il *sin* epossialcol **65** con una resa del 70% (schema 4.15).



Schema 4.15: *i.* $(\text{PhO})_2\text{PON}_3$, Et_3N , BnOH , toluene; *ii.* TBAF, THF, 25 °C; *iii.* *m*-CPBA, CH_2Cl_2 .

²⁴ (a) Henbest, H. B.; Nicholls, B. *J. Chem. Soc.* **1959**, 221. (b) Hoveyda, A. H.; Evans, D. A.; Fu, G. C. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1307.

Il passaggio finale consiste nella rimozione del gruppo Cbz mediante idrogenazione catalitica che libera il gruppo amminico (schema 4.16). Come previsto, l'epossiammina **66** ciclizza spontaneamente, in modo *5-eso* con un meccanismo S_N2 a dare il diamminodiolo (*S,S,S,S*) **41**.



Schema 4.17: Reagenti e condizioni: *i*. MeOH, H₂, Pd/C 10%, 25 °C.

L'analisi ai raggi X della struttura cristallina di **41a** (fig. 4.2) conferma la stereochimica (*S,S,S,S*) del diamminodiolo e, quindi, le previsioni fatte in merito alla regioselettività ed al meccanismo della ciclizzazione.

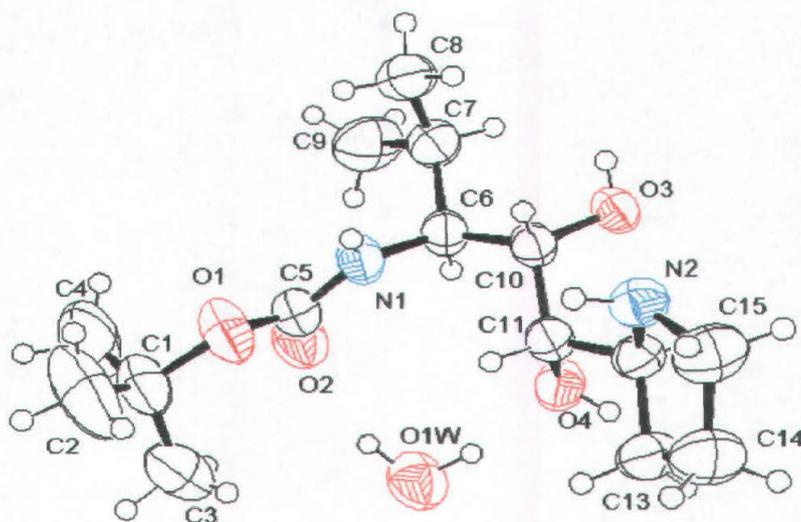


Figura 4.2: Struttura cristallina dell'isostere Val-Pro **41a**. È presente una molecola d'acqua di cristallizzazione O1W.

La figura 4.2 indica che allo stato solido il diamminodiolo **41a** adotta una conformazione nella quale i residui pirrolidinico ed α -amminoisobutilico sono disposti in modo antiperiplanare rispetto al legame centrale C10-C11. La struttura rivela la presenza di una molecola d'acqua disposta a ponte, alla distanza di legame idrogeno, tra il carbonile del Boc (O2-O1W: 2.871Å) ed uno degli ossidrilici (O4-O1W: 2.781Å). Una ricerca conformazionale condotta sulla molecola isolata **41a** con un algoritmo genetico, utilizzando la versione Cornell del campo di forze AMBER,²⁵ individua due minimi (figura 4.3) separati da meno di 1 Kcal/mol, corrispondenti alla conformazione *gauche* (analoga a quella in figura 4.2) ed *anti* dei gruppi ossidrilici del diolo (O3 e O4). Conducendo la medesima analisi conformazionale in presenza di una molecola d'acqua si ottiene, invece, un unico minimo corrispondente alla conformazione *gauche* osservata allo stato solido. La molecola d'acqua presente nella struttura cristallina appare quindi essenziale per stabilizzare questa conformazione.

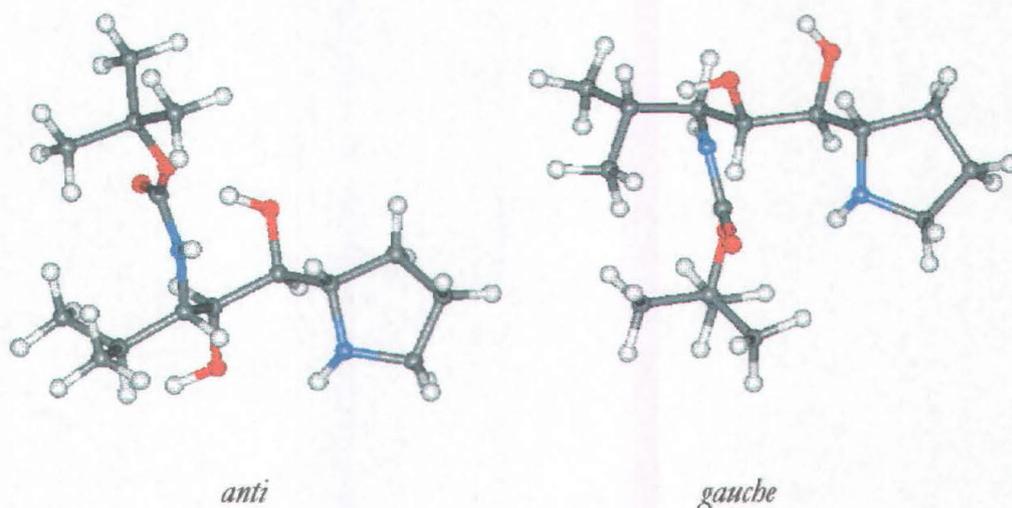
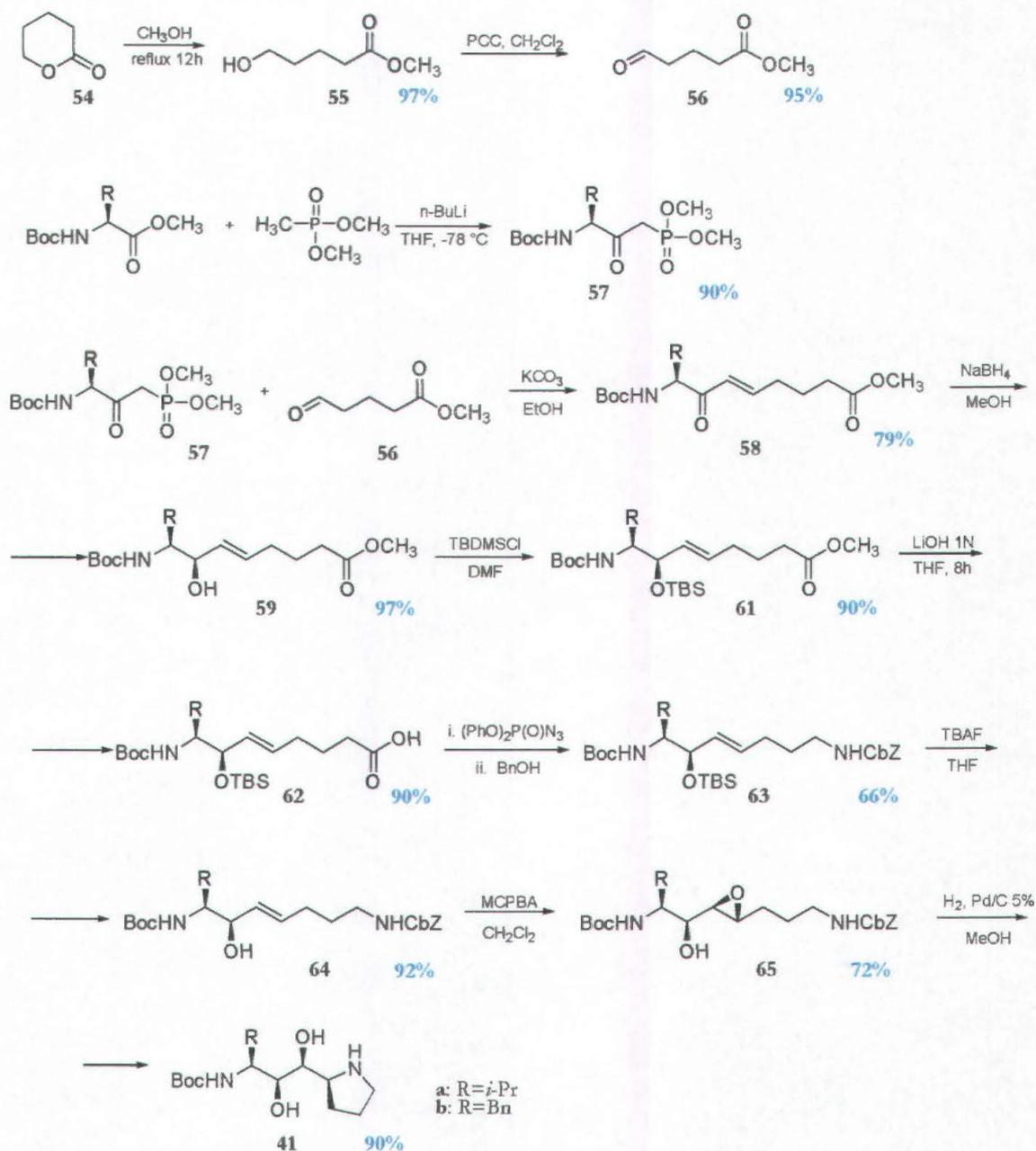


Figura 4.3: Conformazioni *anti* e *gauche* del diamminodiolo **41a** ottenute mediante ricerca conformazionale con algoritmo genetico.

²⁵(a) Judson, R. S.; Rabitz, H, *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *68*, 1500. (b) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Merz, K. M. jr; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. D.; Kollmann, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179.

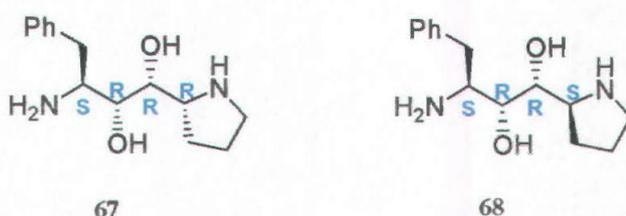
La sintesi completa dei diamminodioli **41a** e **41b**, a partire dal δ -valerolattone, è riportata nello schema 4.17. I diamminodioli **41a** e **41b** si ottengono con una resa complessiva del 20% a partire dal fosfonato **57**, il che rappresenta un buon risultato considerando il gran numero di passaggi previsti dalla sintesi.



Schema 4.17: Sintesi degli isosteri Val-Pro **41a** e Phe-Pro **41b**

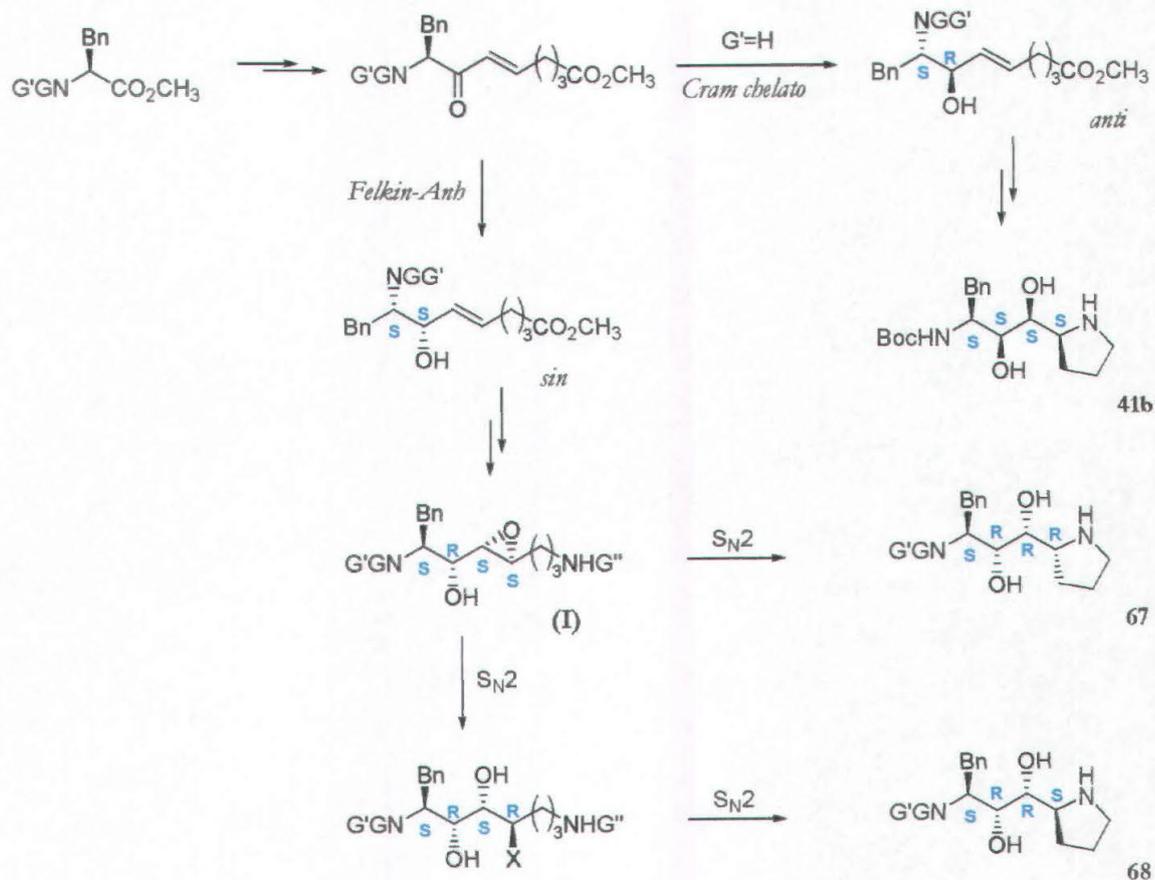
4.3 Sintesi di isosteri Phe-Pro a stereochimica (*S,R,R,R*) e (*S,R,R,S*)

L'attività biologica di inibitori basati su isosteri diamminodiolici è influenzata dalla stereochimica del nucleo centrale: la diversa orientazione spaziale degli ossidrili condiziona le interazioni che il diolo instaura con i residui catalitici di aspartato e con gli altri gruppi presenti all'interno del sito attivo.²⁶ La metodologia sintetica descritta per i diamminodioli (*S,S,S,S*) **41** (schema 4.17), è caratterizzata da una certa flessibilità per quanto riguarda il controllo stereochimico ed è stata quindi estesa anche alla sintesi dei diastereoisomeri (*S,R,R,R*) **67** e (*S,R,R,S*) **68** dell'isostere Phe-Pro.



L'approccio generale seguito per la sintesi degli isosteri diastereoisomeri **67** e **68** è riportato nello schema 4.18.

²⁶ Hosur, M. V.; Bhat, T. N.; Kempf, D. J.; Baldwin, E. T.; Liu, B.; Gulnik, S.; Wideburg, N. E.; Norbeck, D. W.; Appelt, K.; Erickson, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 847.



Schema 4.18: Approccio generale alla sintesi di **67** e **68**.

Una strategia comunemente utilizzata per invertire la selettività nella riduzione di α -amminochetoni a dare 1,2 amminoalcol *sin*, secondo il *Modello di Felkin-Abn*, consiste nella doppia protezione del gruppo amminico come N,N -dibenzile²⁷ oppure N -Boc- N -benzile;²⁸ in questo modo si previene la possibilità di chelazione tra l'azoto ed il gruppo carbonilico aumentando, allo stesso tempo, l'ingombro sterico del sostituente (fig. 4.4).

²⁷ Reetz, M. T. *Chem. Rev.* **1999**, 1121.

²⁸ Dondoni, A.; Perrone, D. *Synthesis* **1993**, 1162.

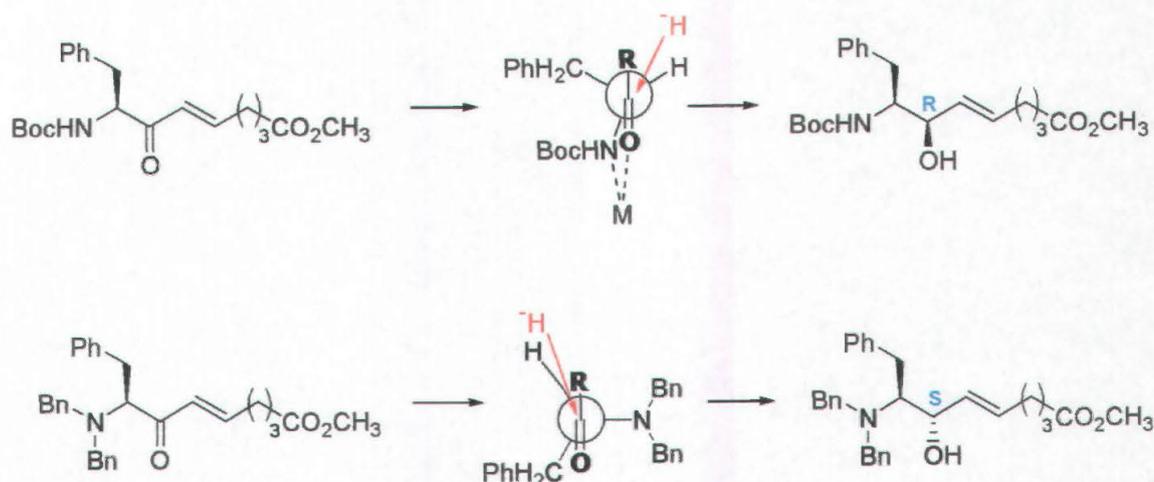


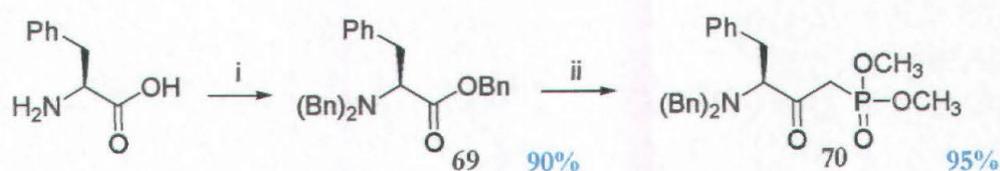
Figura 4.4: Inversione della selettività della riduzione mediante doppia protezione del gruppo amminico.

La stereochimica del nuovo centro chirale (schema 4.18) determina la configurazione *S,S* dell'epossido (**I**) ottenuto per *sin*-epossidazione.

A questo punto, semplice ciclizzazione S_N2 dell'epossiammina, in analogia con quanto visto per la sintesi del diastereoisomero **41b**, porta all'isostere (*S,R,R,R*) **67**. apertura dell'epossido da parte di un alogeno X (S_N2 intermolecolare) seguita da ciclizzazione dell'alogenoammina (S_N2 intramolecolare) porta invece all'isostere (*S,R,R,S*) **68** (schema 4.18).

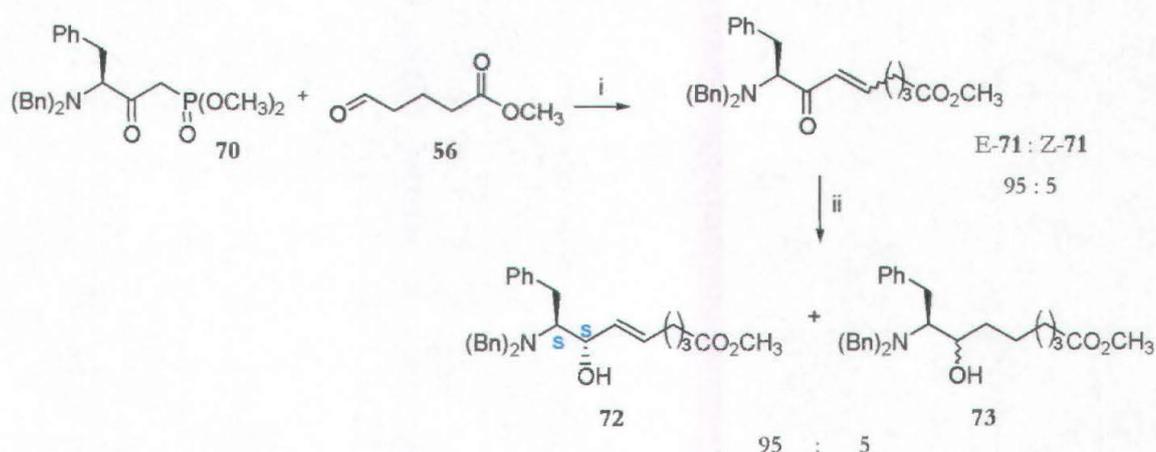
4.3.1 Sintesi dell'epossiammina (*S,R,R,R*)

Il primo tentativo di sintetizzare l'epossiammina (*S,R,R,R*) è stato condotto a partire dal benzil estere della *N,N*-dibenzil-*L*-fenilalanina **69**, ottenuto dalla *L*-fenilalanina per trattamento con benzil cloruro in presenza di K_2CO_3 acquoso, seguendo la procedura proposta da Stuk,²⁹ e quindi convertita nel corrispondente fosfonato **70**, come riportato nello schema 4.19.



Schema 4.19: *i.* BnCl, K_2CO_3 , H_2O , riflusso 16h. *ii.* $LiCH_2P(O)(OCH_3)_2$, THF, $-78\text{ }^\circ C$

L'olefinazione di **70** con l'aldeide **56** fornisce una miscela 95:5 dei due enoni *E*-**71a** e *Z*-**71** che vengono facilmente separati per via cromatografica. Nella corrispondente olefinazione dello stesso fosfonato protetto come N-Boc (**57b**, schema 4.10) non si osservava traccia dell'alchene *Z*; evidentemente, l'elevato ingombro sterico del gruppo N,N-dibenzile influenza in qualche modo la selettività della reazione di formazione dell'alchene. Come previsto, la riduzione del gruppo carbonilico dell'enone *E* **71a** con NaBH₄ fornisce l'alcol allilico (*S,S*) **72** ed una piccola percentuale (5%) dell'alcol saturo **73**, derivante dall'addizione 1,4 che in questo caso compete con l'addizione 1,2, sfavorita dall'elevato ingombro del gruppo N,N-dibenzile (schema 4.20).



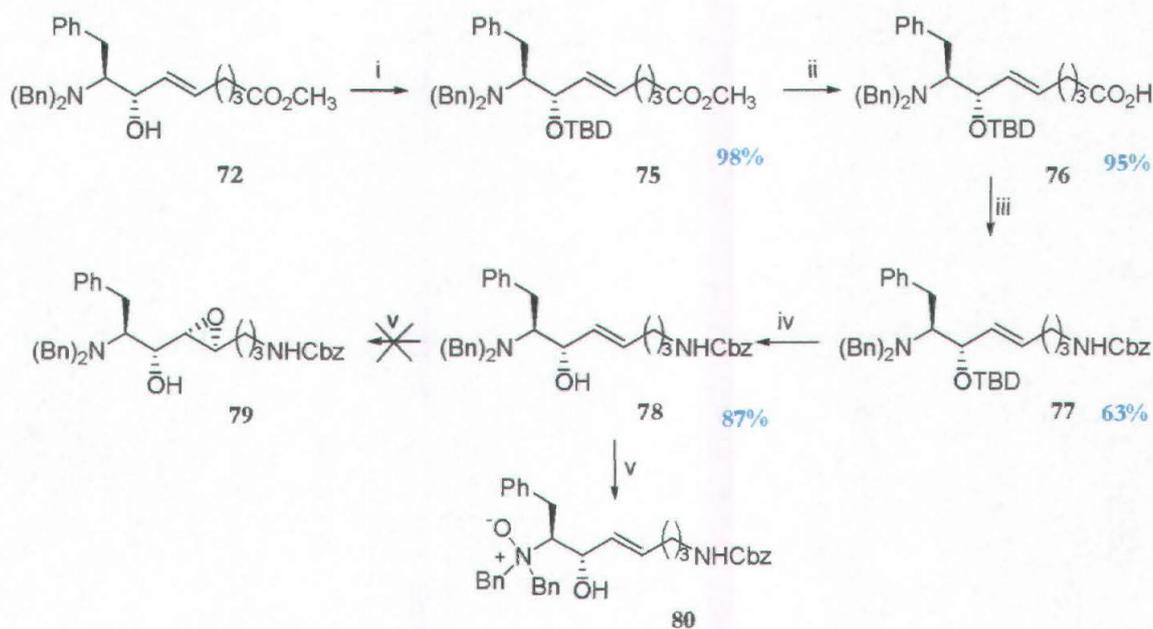
Schema 4.20: *i.* K₂CO₃, EtOH; *ii.* NaBH₄, MeOH.

L'alcol allilico **72** viene purificato agevolmente mediante cromatografia e la sua conversione nel corrispondente estere di Mosher **74** (Fig 4.4) conferma l'assenza di epimerizzazione al C1. Al prodotto principale **72** è stata assegnata una configurazione (*S,S*) sulla base dei dati riportati in letteratura riguardo la selettività nella riduzione di N,N-dibenzil- α -amminochetoni.²⁷

In quattro passaggi (schema 4.21), dall'alcol **72** si ottiene la diammina **78** via protezione come TBD-etere **75**, idrolisi ad acido **76**, Riarrangiamento di Curtius dell'acido **77** e deprotezione del gruppo alcolico, analogamente a quanto già visto per la sintesi di **41b**. L'ossidazione di **78** con acido *m*-cloroperbenzoico non fornisce,

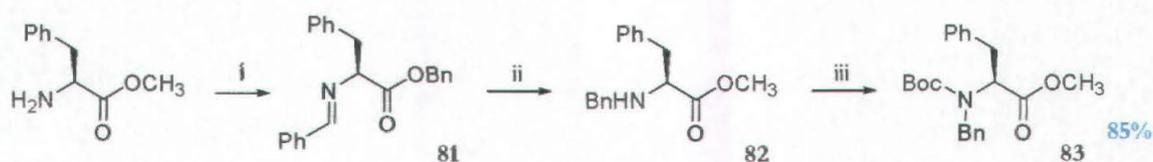
²⁹ Stuk, T. L.; Haight, A. R.; Scarpetti, D.; Allen, M. S.; Mensia, J. A.; Robbins, T. A.; Parekh, S. I.; Langridge, D. C.; Tien, J. H. J.; Pariza, R. J.; Kerdesky, F. A. J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4040.

però, l'eossiammina **79** cercata; il peracido, infatti, ossida esclusivamente il gruppo amminico terziario con conseguente formazione del corrispondente N-ossido **80**, che rapidamente decompone a dare una miscela di prodotti non caratterizzabili.



Schema 4.21: *i.* TBDSCl, imidazolo, DMF; *ii.* LiOH, H₂O/THF; *iii.* (PhO)₂PON₃, Et₃N, BnOH; *iv.* TBAF, THF; *v.* *m*-CPBA, CH₂Cl₂.

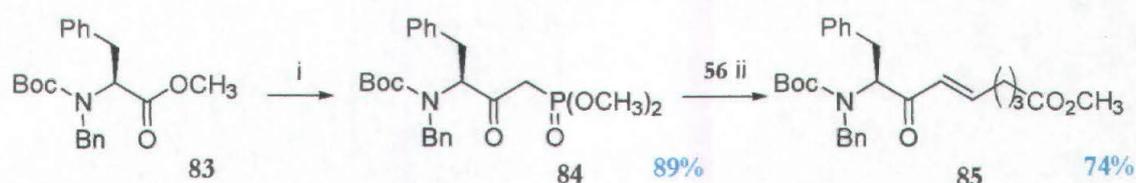
Data l'incompatibilità della protezione dibenzilica con l'eossidazione da parte di un peracido, il gruppo amminico della L-fenilalanina è stato protetto come N-Boc-N-benzile secondo la procedura proposta da Dondoni (schema 4.22).²⁸ Il metil estere della L-fenilalanina, per trattamento con benzaldeide e trietilammina in presenza di MgSO₄, viene convertito nella corrispondente immina **81** la cui riduzione con NaBH₄ fornisce il benzil derivato **82**. Il secondo gruppo proteggente viene introdotto per reazione di **82** con di-*tert*-butil dicarbonato in diossano **83**.



Schema 4.22: *i.* PhCHO, Et₃N, MgSO₄; *ii.* NaBH₄, MeOH, 0 °C; *iii.* (Boc)₂O, diossano.

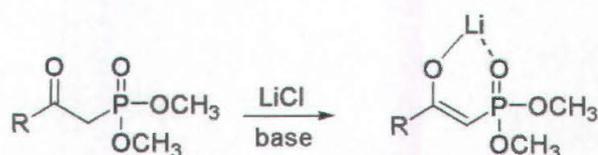
La presenza del carbammato previene l'ossidazione dell'azoto amminico da parte del peracido, mentre la doppia protezione, impedendo la chelazione tra l'azoto ed il

gruppo carbonilico, consente di invertire la selettività della riduzione in modo da fornire l'alcol (*S,S*) secondo il modello di Felkin-Ahn. L'amminostere **83** è stato convertito nel corrispondente fosfonato **84** nelle condizioni già descritte (schema 4.23) e l'enone **85** è stato ottenuto dalla reazione di Horner-Emmons tra il fosfonato **84** e l'aldeide **56** con una resa del 66%. La struttura *E* dell'alchene è confermata da una costante di accoppiamento tra gli idrogeni vinilici pari a 14.9 Hz. La reazione di Horner-Emmons non è stata condotta nelle condizioni solitamente impiegate (K₂CO₃ in etanolo) ma impiegando di-azabicciclo undecene (DBU) in presenza di LiCl.³⁰



Schema 4.23: *i.* LiCH₂PO(OCH₃)₂, THF, -78 °C; *ii.* LiCl, DBU, CH₃CN.

Queste condizioni vengono normalmente utilizzate per attivare il fosfonato in presenza di substrati sensibili alle basi; il catione Li⁺, infatti, formando un complesso con il fosfonato aumenta l'acidità del metilene adiacente al fosforo (schema 4.24) che può quindi essere facilmente deprotonato utilizzando una base organica, come il diaza-bicciclo undecene (DBU) oppure la di-*iso*-propilettilammina (DIPEA).



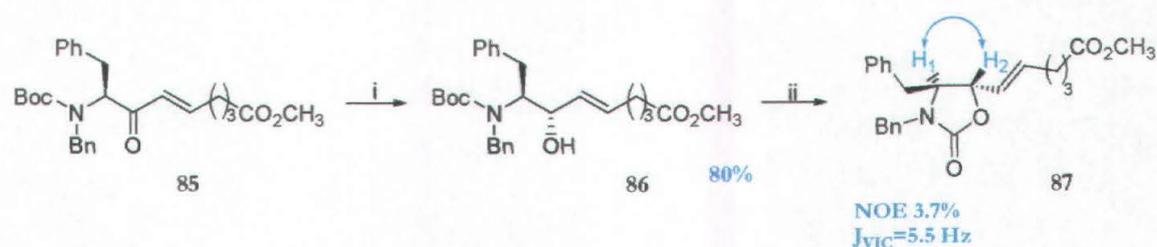
Schema 4.24

In questo caso sono state utilizzate condizioni più blande per l'olefinazione poiché, in generale, la doppia protezione del gruppo amminico rende α -amminochetoni e loro derivati maggiormente suscettibili all'epimerizzazione del C1 rispetto ai derivati monoprotetti come carbammato. In particolare, in questi ultimi l'idrogeno legato all'azoto è più acido rispetto al protone legato al C α e in ambiente

³⁰ Blanchette, M. A.; Choy, W.; Davis, J. T.; Essenfeld, A. P.; Masamune, S.; Roush, W. R. Sakai, T. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2183.

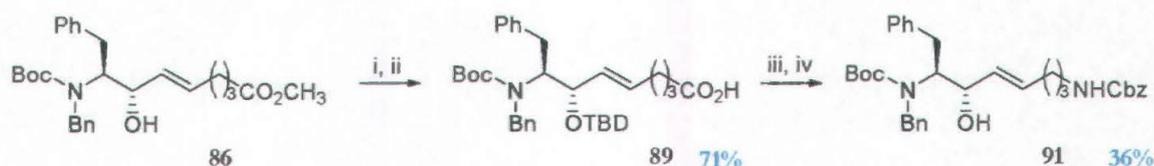
fortemente basico la deprotonazione dell'NH previene quella del CH adiacente e, quindi l'epimerizzazione del centro chirale; in presenza, invece, di un gruppo amminico doppiamente protetto aumenta la possibilità che il C α venga deprotonato dalla base e quindi il rischio di epimerizzazione.

L'enone **85** è stato quindi ridotto con NaBH₄ in metanolo a dare l'alcol allilico **86**, la cui stereochimica è stata confermata dall'analisi NMR del corrispondente ossazolidinone **87** (schema 4.25).



Schema 4.25: *i.* NaBH₄, MeOH, 0 °C; *ii.* NaH, THF, 25 °C

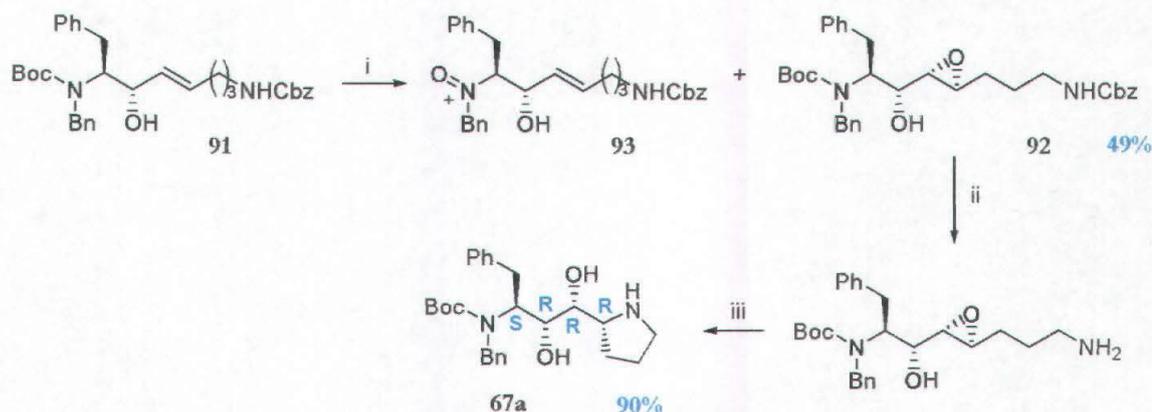
La protezione del gruppo idrossilico dell'alcol allilico **86** seguita dall'idrolisi del gruppo estereo, il *Riarrangiamento di Curtius* dell'acido **88** così ottenuto ed, infine, la deprotezione dell'ossidrilie forniscono la diammina **90**, analogamente a quanto visto in precedenza per la sintesi dell'isostere **41b** (schema 4.26).



Schema 4.26: *i.* TBDSCl, imidazolo, DMF; *ii.* LiOH, H₂O/THF; *iii.* (PhO)₂PON₃, Et₃N, BnOH; *iv.* TBAF, THF.

La doppia protezione del gruppo amminico rende labile il gruppo *tert*-butossicarbonilico nei confronti tanto del tetra-butilammonio fluoruro, utilizzato per la deprotezione del gruppo alcolico, quanto dell'acido *m*-cloroperbenzoico; la successiva epossidazione dell'alchene **91** fornisce, infatti, una miscela dell'epossiammina desiderata **92** (schema 4.27) e dell'N-ossido **93** che possono comunque essere separati per cromatografia su gel di silice. L'idrogenolisi del

gruppo Cbz terminale seguita dalla ciclizzazione S_N2 del gruppo amminico sull'anello epossidico fornisce, infine, l'isostere (*S,R,R,R*) **67a**.



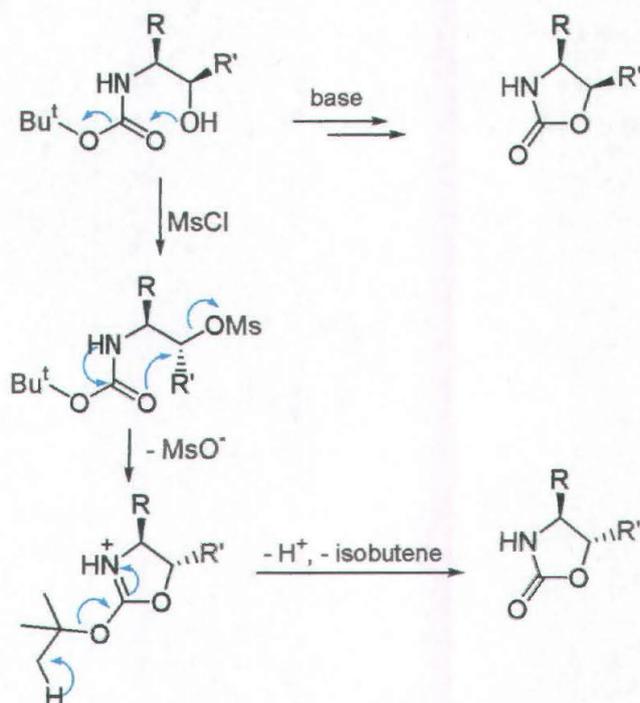
Schema 4.27: *i.* *m*-CPBA, CH₂Cl₂; *ii.* H₂, Pd/C 10%, MeOH

4.3.2 Approccio alternativo alla sintesi della isostere Phe-Pro (*S,R,R,R*) **67**

Nell'approccio appena descritto, la doppia protezione all'azoto rende il gruppo *tert*-butossicarbonilico labile nei confronti di alcuni reagenti impiegati nel corso della sintesi, determinando un notevole abbassamento della resa complessiva, inconveniente non trascurabile vista la complessità della sintesi. Per evitare cali di resa ed eventuali possibili epimerizzazioni è stato messo a punto un approccio alternativo alla sintesi del diamminodiolo **67** che sfrutta la semplice monoprotezione del gruppo amminico come Boc. Questo approccio è stato quindi esteso alla sintesi dell'ultimo stereoisomero **68**. La nuova sintesi parte dall'alcol allilico N-Boc protetto **59b** (schema 4.12) già utilizzato per la sintesi dell'isostere **41b**.

È noto che N-Boc-β-amminoalcoli in presenza di una base ciclizzano a dare i corrispondenti ossazolidinoni mediante una reazione di trasferimento di acile intramolecolare,³¹ che non modifica la configurazione assoluta del carbonio carbinolico (schema 4.28); infatti, la conversione di alcoli chirali in ossazolidinoni è una procedura normalmente utilizzata per la determinazione della stereochimica del carbonio legato all'ossidrilico

³¹ Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 835.



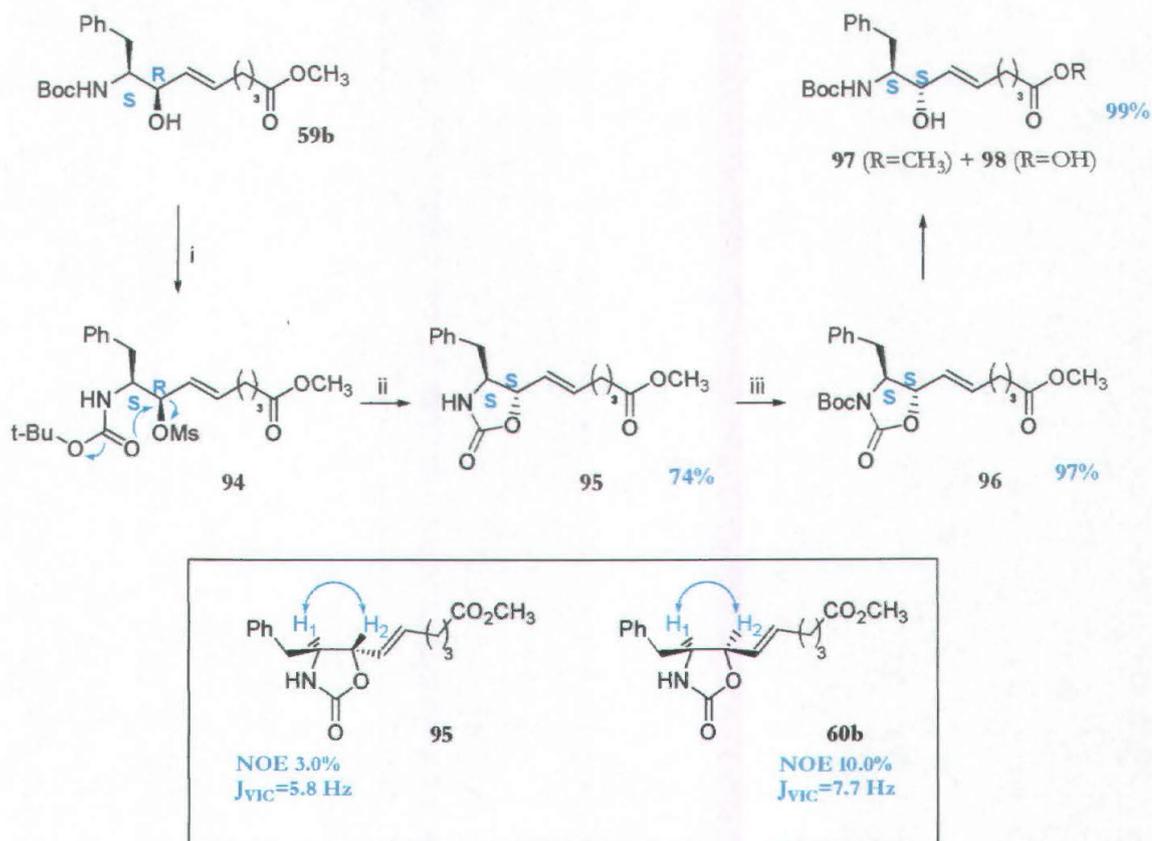
Schema 4.28

Se, invece, il gruppo alcolico viene prima convertito in un buon gruppo uscente, come il mesilato, si ottiene l'ossazolidinone con stereochimica invertita al carbonio carbinolico, che deriva da una ciclizzazione di tipo S_N2, in cui l'attacco nucleofilo dell'ossigeno carbonilico sul mesilato è seguito dalla perdita di isobutene (schema 4.28).³² Questo meccanismo, meno comune rispetto alla normale ciclizzazione con trasferimento di acile, è stato osservato anche da altri autori quando l'ossidrile viene sostituito da un migliore gruppo uscente, come il tosilato³³ oppure il cloruro.³⁴ Questa reazione è stata quindi sfruttata per invertire la configurazione del gruppo alcolico dell'amminoalcol **59b**, come indicato nello schema 4.29.

³² Benedetti, F.; Norbedo, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *39*, 10071.

³³ Curran, T.; Pollastri, M. P.; Abelleira, S. M.; Messier, R. J.; McCollum, T. A.; Rowe, C. G. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5409.

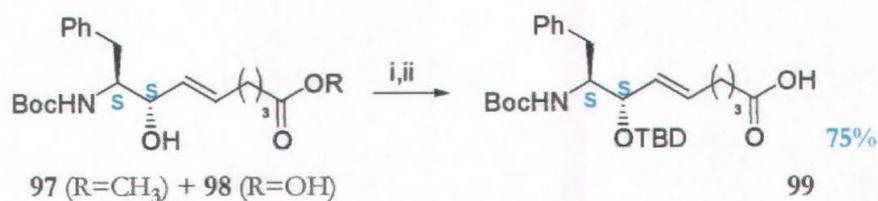
³⁴ Gosh, A. K.; Shin, D.; Mathiavanan, P. *Chem. Commun.* **1999**, 1025.



Schema 4.29: Inversione di configurazione al C2 mediante formazione di un ossazolidinone

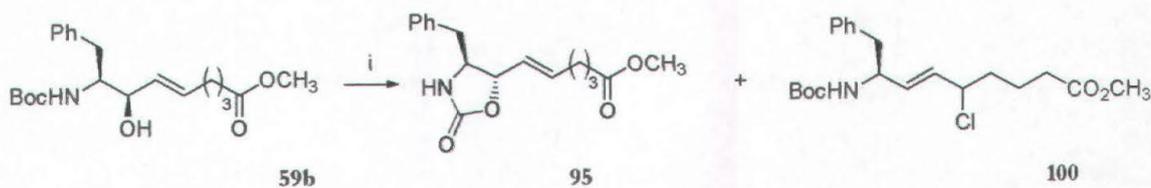
L'alcol allilico **59b** è stato quindi trattato con metansolfonil cloruro in dicloroetano a 0 °C, in presenza di di-*iso*-propilettilammina oppure trietilammina. La reazione viene monitorata mediante cromatografia su strato sottile (TLC) e quando la conversione dell'alcol nel mesilato **94** è completa, la miscela viene portata a temperatura ambiente e mantenuta in agitazione fino alla completa scomparsa del mesilato. In questo modo si ottiene con una resa del 74%, l'ossazolidinone **95** in cui la stereochimica *trans* dei due protoni vicinali H₁ ed H₂ (schema 4.29) è confermata dal valore di *Nuclear Overhauser Effect* pari a 3%, rispetto al 10% osservato per l'isomero *cis* **60b** e dalla costante di accoppiamento vicinale pari a 5.8 Hz. L'ossazolidinone **95**, viene quindi riprotetto all'azoto con di-*tert*-butil dicarbonato, in presenza di NaH, a dare l'N-Boc ossazolidinone **96**. Il passaggio successivo è l'idrolisi di **96** in condizioni controllate (due equivalenti di K₂CO₃, oppure Cs₂CO₃) in metanolo acquoso. Le condizioni in cui viene effettuata l'idrolisi dell'ossazolidinone sono cruciali: utilizzando un maggior numero di equivalenti di base, oppure una base più forte come KOH, l'idrolisi dell'ossazolidinone è seguita

dalla ciclizzazione dell'alcol sul gruppo *tert*-butossicarbonilico che fornisce nuovamente l'ossazolidinone **95**. In ambiente basico si verifica anche una parziale idrolisi del gruppo estereo terminale e si ottiene quindi una miscela di estere **97** e acido **98**, la quale, senza ulteriori purificazioni, viene trattata con *tert*-butildimetilsilil cloruro e imidazolo e quindi idrolizzata con LiOH 0.5N in THF a dare l'acido carbossilico **99** (schema 4.30).



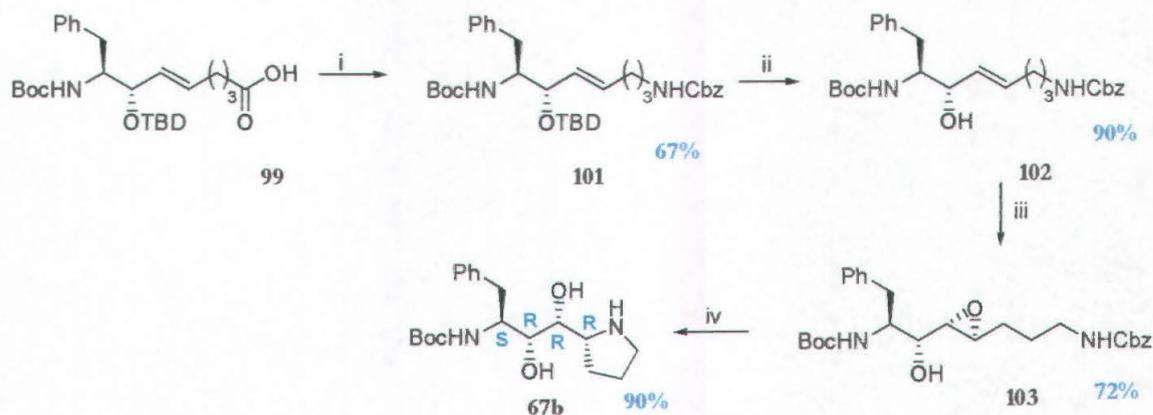
Schema 4.30: *i.* TBDSCL, imidazolo, DMF; *ii.* LiOH 0.5N, THF.

L'inversione di configurazione dell'alcol **29b** è stata provata anche con il metodo proposto da Gosh, che prevede la conversione del gruppo alcolico nel corrispondente cloruro per trattamento con SOCl₂ in THF.³⁴ In queste condizioni si ottiene una miscela dell'ossazolidinone **95** e del cloruro **100** derivante da una reazione di sostituzione in posizione allilica (schema 4.31).



Schema 4.31: *i.* SOCl₂, THF

L'acido carbossilico **99** viene sottoposto al *Riarrangiamento di Curtius* nelle condizioni viste in precedenza e fornisce la diammina **101** (schema 4.32) ortogonalmente protetta. Il gruppo *tert*-butildimetilsilil viene rimosso con TBAF e l'alcol allilico **102** viene epossidato con *m*-CPBA a dare l'epossiammina **103** (*S,R,S,S*). Infine, la rimozione del gruppo Cbz per idrogenazione catalitica fornisce il diamminodiolo (*S,R,R,R*) **67b**.

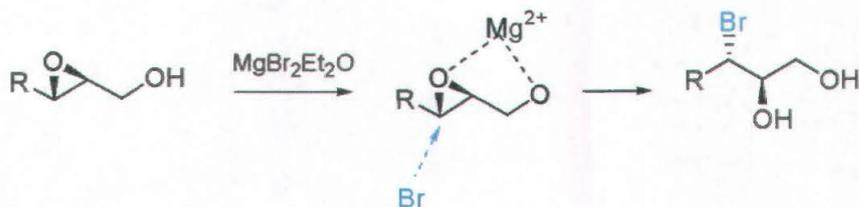


Scheme 4.32: *i.* $(\text{PhO})_2\text{PON}_3$, Et_3N , BnOH ; *ii.* TBAF, THF, *iii.* *m*-CPBA, CH_2Cl_2 ; *iv.* H_2 Pd/C 10%, MeOH.

4.3.3 Sintesi dell'isostere Phe-Pro (*S,R,R,S*) **68**

L'eossiammina **103** (schema 4.32) può essere utilizzata come intermedio per ottenere l'isomero (*S,R,R,S*) dell'isostere **67b**. In questo caso è necessario effettuare due inversioni di configurazione successive al carbonio epossidico, l'apertura regio-selettiva dell'eossido deve introdurre un buon gruppo uscente, per permettere la successiva ciclizzazione del gruppo amminico derivante dalla rimozione del Cbz.

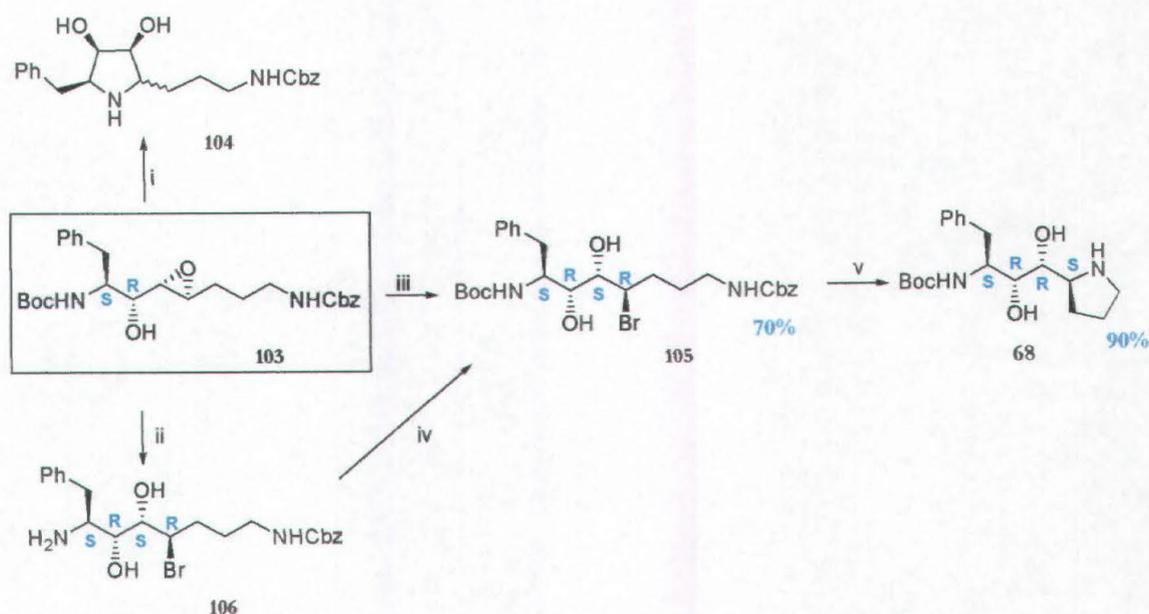
La reazione di apertura dell'eossido **103** è stata condotta inizialmente con $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, nelle condizioni proposte da Bonini³⁵ per l'apertura regio- e stereoselettiva di 2,3-eossialcoli a dare *anti* 3-bromo-1,2-dioli (schema 4.33). La selettività osservata viene spiegata ipotizzando la formazione di un complesso chelato tra lo ione Mg^{2+} , l'ossidrile e l'ossigeno dell'eossido che attiva il ciclo a tre termini e dirige l'attacco del nucleofilo al C3.



Scheme 4.33: Apertura regio- e stereo-selettiva di eossialcoli con $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$

³⁵ (a) Righi, G.; Pescatore, G.; Bonadies, F.; Bonini, C. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 5649. (b) Righi, G.; Ronconi, S.; Bonini, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *39*, 10071.

Nel nostro caso (schema 4.34), l'impiego di $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in etere, a temperatura ambiente, non ha fornito il prodotto voluto; la presenza di un acido di Lewis come il Mg^{2+} determina il distacco del Boc e la conseguente ciclizzazione dell'amminogruppo sull'anello epossidico, oppure su un bromo derivato intermedio per dare la diidrossipirrolidina **104** la cui stereochimica al C2 non è stata determinata. La medesima reazione è stata provata, senza successo, anche utilizzando Et_2AlCl ; ancora una volta la presenza di un forte acido di Lewis promuove la perdita del gruppo protettivo e la conseguente ciclizzazione a dare **104** (schema 4.34).



Schema 4.34: *i.* $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, Et_2O , 25 °C; oppure Et_2AlCl , toluene, 0 °C; *i.* LiBr, Amberlist 15, CH_3CN , 25 °C; *iii.* LiBr, Amberlist 15, CH_3CN , -20 °C; *iv.* $(\text{Boc})_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 25 °C; H_2 , Pd/C 5%, DIPEA, MeOH.

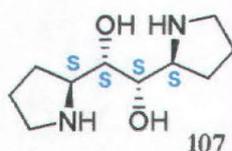
Il bromo-diolo **105** è stato quindi ottenuto con una resa del 50%, per trattamento dell'eossido **103** con LiBr e Amberlist 15 in acetonitrile a -20 °C (schema 4.34);³⁶ l'Amberlist 15 funge da catalizzatore acido per l'attivazione dell'anello epossidico, mentre regio- e stereo-selettività osservate sono imputabili alla formazione di un complesso tra il Li^+ ed i due ossigeni dell'eossialco **103**. Mantenendo la temperatura a -20 °C si evita la perdita del gruppo *tert*-butossicarbonilico, che viene, invece,

³⁶ (a) Bonini, C.; Giuliano, C.; Righi, G.; Rossi, L. *Synth. Commun.* **1992**, *22*, 1863. (b) Bonini, C.; Righi, G. *Synthesis* **1994**, 225.

completamente rimosso se la reazione è condotta a temperatura ambiente. L'eventuale perdita del Boc non costituisce, comunque, un grosso ostacolo dato che il gruppo amminico libero in queste condizioni non ciclizza sul bromo diolo **106** e può essere facilmente riprotetto con di-*tert*-butil dicarbonato per dare **105**. L'ultimo passaggio della sintesi è la rimozione mediante idrogenolisi del gruppo Cbz terminale, cui segue la ciclizzazione dell'epossiammina intermedia, in presenza di DIPEA, che porta al diamminodiolo (*S,R,R,S*) **68** (schema 4.34).

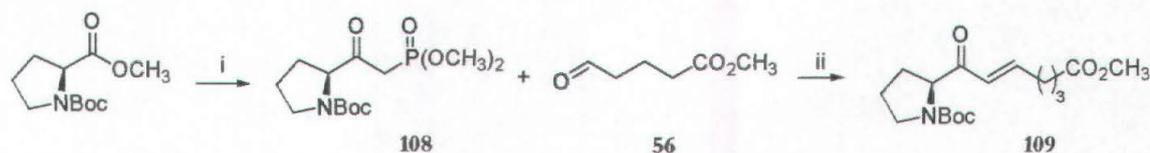
4.4 Verso la sintesi di un isostere del dipeptide Pro-Pro

La proteasi del virus HIV nella sua forma attiva, è un omo-dimero con asse di simmetria C_2 ; quindi, considerando anche la specificità mostrata dall'enzima per legami ammidici contenenti la prolina, la possibilità di ottenere un diamminodiolo a simmetria C_2 contenente due anelli pirrolidinici direttamente legati **107** risulta particolarmente interessante. Una struttura come **107** potrebbe peraltro trovare applicazione non solo nell'ambito dell'inibizione dell'HIV-PR, ma anche per le possibili caratteristiche strutturali che la presenza di un isostere Pro-Pro potrebbe indurre, una volta inserito in una catena peptidica.



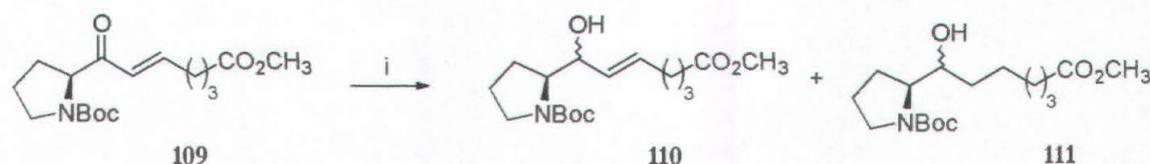
La strategia sin qui messa a punto per la sintesi di diamminodioli isosteri Xaa-Pro è stata quindi estesa a questo obiettivo. La sintesi di **107** parte dal metil estere della N-Boc-L-Prolina, che viene convertito nel corrispondente fosfonato **108**. Quest'ultimo per reazione con l'aldeide **56** fornisce il *trans* enone **109** (schema 4.35). Per ottimizzare la resa della reazione di Horner-Emmons sono state utilizzate diverse condizioni: K_2CO_3 in etanolo (Horner-Emmons), DBU in presenza di $LiCl^{27}$ ed,

infine, K_2CO_3 in acetonitrile.³⁷ Queste ultime condizioni forniscono il 65% di enone **108**, mentre negli altri casi la resa finale non supera mai il 55%.



Schema 4.35: *i.* $LiCH_2P(O)(OCH_3)_2$, THF, $-78\text{ }^\circ C$; *ii.* K_2CO_3 , MeOH; LiCl, DBU, CH_3CN ; K_2CO_3 , CH_3CN

La successiva riduzione del chetone α,β -insaturo **109** a dare l'alcol allilico **110** (schema 4.36) si è rivelata piuttosto difficoltosa data la scarsa reattività del gruppo carbonilico imputabile all'ingombro sterico dell'anello a cinque termini ad esso adiacente. Utilizzando $NaBH_4$ in metanolo l'addizione 1,4 compete con quella 1,2 fornendo una miscela 1:1 di alcol allilico **110** ed alcol saturo **111**, che non possono essere separati per via cromatografica (schema 4.36).



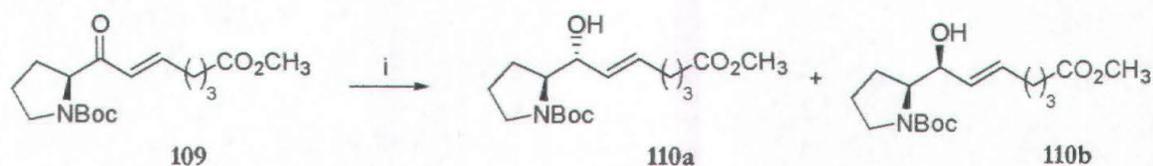
Schema 4.36: *i.* $NaBH_4$, MeOH, $0\text{ }^\circ C$.

La formazione del prodotto derivante dall'addizione 1,4 è piuttosto comune nella riduzione di enoni in cui il carbonile è adiacente ad anelli a cinque o sei termini a causa dell'ingombro sterico del ciclo.³⁸ Il problema della chemoselettività può essere risolto effettuando la riduzione con $NaBH_4$ in presenza di una quantità stechiometrica di $CeCl_3$.³⁹ Il catione metallico attiva il carbonile rendendolo più elettrofilo e sfavorendo la riduzione dell'alchene. Utilizzando queste condizioni è stato effettivamente risolto il problema della chemoselettività ma non quello della stereoselettività: poichè la riduzione di **109** fornisce una miscela 1:1 dei due alcoli allilici **110a** e **110b** (schema 4.37).

³⁷ Koskinen, A. M. P.; Kallatsa, O. A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6947.

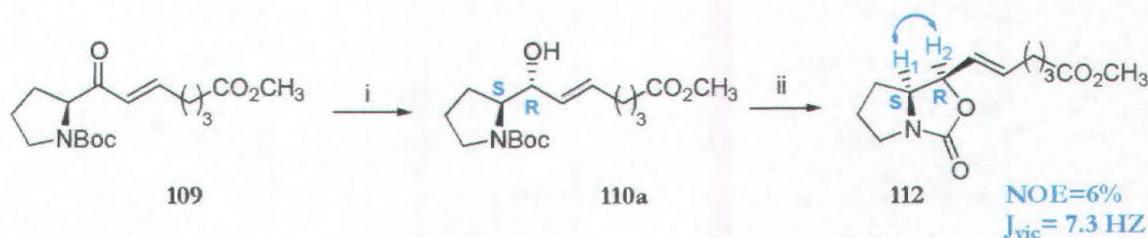
³⁸ Seyden-Penne, J. In *Reductions by Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis* John Wiley & Sons: New York **1997**.

³⁹ Gemal, A. L.; Luche, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5454.



Schema 4.37: *i.* NaBH₄, MeOH, 0 °C.

Visti i risultati ottenuti con il NaBH₄ sono stati utilizzati dei riducenti diversi, in particolare litio tri-*tert*-butossialluminio idruro (LTBA) e di-isobutil alluminioidruro (DIBAL). Con il litio tri-*tert*-butossialluminio idruro in etanolo non si osserva alcuna reattività tra -78 e -50 °C, limite massimo oltre il quale l'etanoli di alluminio compete con la riduzione. La stessa reazione è stata ripetuta utilizzando tetraidrofurano al posto dell'etanolo: a -20 °C non si osserva reazione mentre a temperatura ambiente si ottiene ancora una volta l'alcol saturo **111**. La riduzione con DIBAL è quella che ha dato i risultati più incoraggianti fornendo un unico alcol allylico **110a** (schema 4.38), successivamente convertito nel corrispondente ossazolidinone **112** per poter assegnare la stereochimica del gruppo alcolico. Il valore di *Nuclear Overhauser Effect* pari a 6% e soprattutto la costante di accoppiamento di 7.3 Hz fra i protoni vicinali H₁ ed H₂ è in accordo con i dati riportati in letteratura per sistemi biciclici analoghi a questo ed è consistente con una disposizione *syn*-planare dei due idrogeni,⁴⁰ corrispondente ad una configurazione assoluta R per il secondo centro chirale.



Schema 4.38: *i.* DIBAL, toluene, -78 °C; *ii.* NAH, THF, 25 °C.

⁴⁰ Ibuka, T.; Taga, T.; Habashita, H.; Nakai, K.; Tamamura, H.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1207.

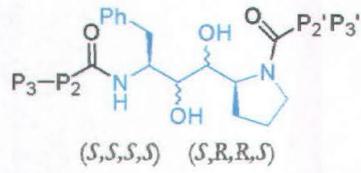
La riduzione efficiente e stereoselettiva dell'enone **109** rimane tuttavia un problema irrisolto. La reazione con DIBAL è soddisfacente, infatti, solamente se condotta in piccola scala (≤ 500 mg). Con maggiori quantità di substrato la conversione non è completa, mentre utilizzando un eccesso di riducente si osserva anche riduzione del doppio legame C=C. Queste difficoltà hanno sinora bloccato il progresso nella sintesi dell'isostere Pro-Pro **107**.

5. Progettazione sintesi e valutazione dell'attività di nuovi inibitori peptidomimetici dell'HIV proteasi

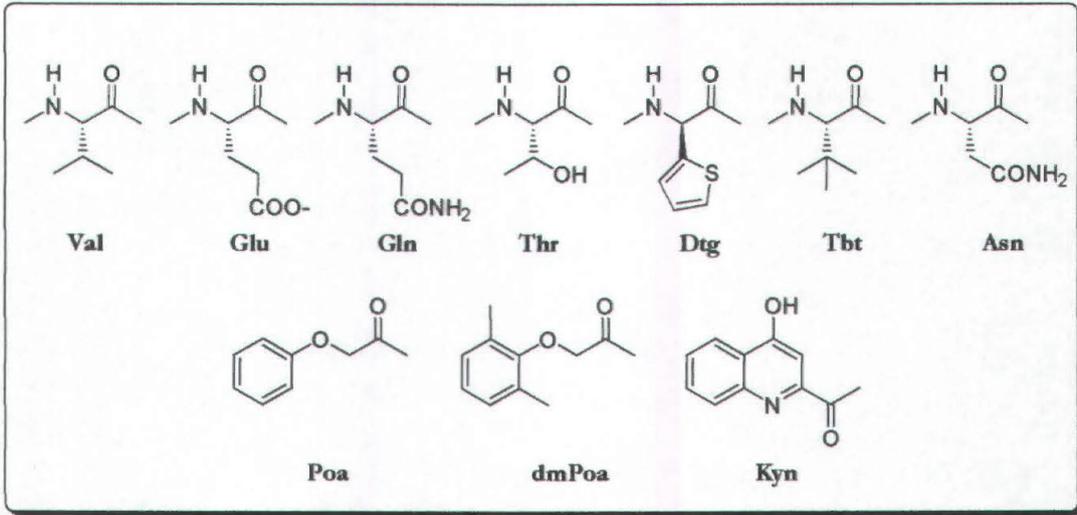
Dopo aver messo a punto la sintesi dell'isostere Phe Ψ Pro (Ψ =CH₂OHCH₂OH) **41b**, si è passati alla fase di progettazione, sintesi e valutazione dell'attività biologica di un primo set di inibitori basati su questo nucleo centrale, da utilizzare quali "lead compound" per il futuro sviluppo di nuove molecole più attive. La progettazione degli inibitori è stata effettuata attraverso uno studio di "modeling" finalizzato ad identificare i residui da inserire alle posizioni P₂, P_{2'} ed anche P₃ e P_{3'}, all'interno di un insieme di amminoacidi ed acidi carbossilici (fig. 5.1), selezionato in base alle esperienze precedenti nel campo di inibitori mono- e diidrossietilenici¹ ed ai migliori risultati descritti in letteratura. Per quanto riguarda la stereochimica del nucleo centrale sono stati scelti i diastereoisomeri (*S,S,S,S*) **41b** e (*S,R,R,S*) **68**, mentre per le posizioni P₂/P_{2'} e P₃/P_{3'} sono stati considerati rispettivamente 10 e 6 possibili residui (fig 5.1). Tenendo conto che alcuni dei residui identificati per la posizione P₂ e P_{2'} non consentono di estendere ulteriormente la molecola (Poa, dmPoa, Kyn), e che alcune sequenze P₃P₂ sono state considerate collegate, questi due set di residui generano un insieme iniziale di circa 2400 possibili inibitori.

Di seguito verranno brevemente descritti i principi generali su cui si basano questo tipo di studi, con particolare riguardo alle tecniche applicate al caso della HIV-PR, e che devono essere considerate come termine di confronto per una validazione della procedura seguita in questa tesi di dottorato. Assieme all'approccio computazionale seguito verranno, inoltre, descritti e discussi i risultati ottenuti.

¹ (a) Tossi, A.; Bonin, I.; Antcheva, N.; Norbedo, S.; Benedetti, F.; Miertus, S.; Nair, A. C.; Maliar, T.; Dal Bello, F.; Palu, G.; Romeo, D. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 1715. (b) Tossi, A.; Benedetti, F.; Norbedo, S.; Skrbec, D.; Berti, F.; Romeo, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 4719.



P_2, P_2'



P_{3s}, P_3'

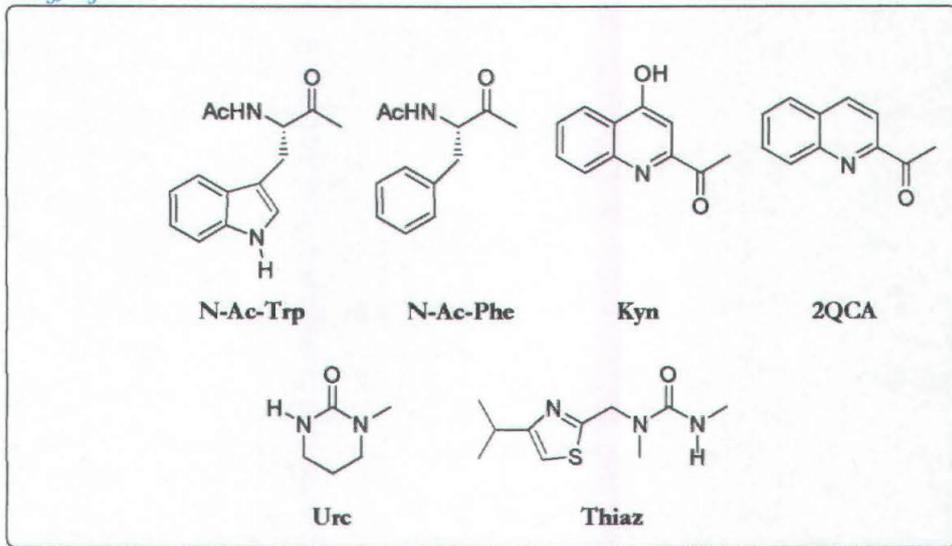


Figura 5.1

5.1 *Structure-Based Drug Design* e progettazione di inibitori della HIV-PR

La struttura di complessi dell'HIV-PR, la cui disponibilità è eccezionalmente ampia (cfr. Par. 2.3),² determinata per cristallografia ai raggi X, o anche da esperimenti NMR, o infine ottenuta come modello di omologia, rappresenta l'ovvio punto di partenza per questo tipo di studi di "modelling". Identificato il sito di legame del ligando, substrato o inibitore "lead", esistono fondamentalmente tre possibili approcci per arrivare all'identificazione di un nuovo ligando con migliori proprietà: ispezione, screening virtuale, *de novo* design. Nel primo caso, che è quello seguito in questo lavoro di tesi, si parte da una molecola nota per la sua capacità di legarsi al sito attivo, e attraverso modificazioni successive si modifica la struttura mirando a massimizzare le interazioni tra sito e ligando. Tutta l'informazione strutturale ottenibile dal modello iniziale viene utilizzata: per il corretto posizionamento dei nuovi ligandi all'interno del sito, infatti, ci si basa su di una sovrapposizione tra questi e il ligando di riferimento. Nel caso dello screening virtuale, invece, molecole disponibili in un opportuno database di ligandi, e non necessariamente correlate strutturalmente a ligandi noti o allo stesso ligando di riferimento, vengono valutate attraverso una procedura di docking all'interno del sito di legame, utilizzando solo l'informazione strutturale relativa a quest'ultimo. Infine, nel caso del *de novo* design, si utilizza ancora una procedura di docking, ma applicata a frammenti di molecole e non a molecole intere, che vengono costruite unendo i frammenti che hanno fornito il miglior risultato a livello dei vari subsiti del sito di legame.

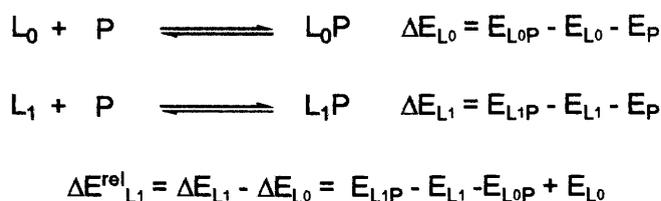
Indipendentemente dal tipo di approccio scelto, tutte le procedure implicano la valutazione, esplicita o trasformata in un punteggio (score), di un'energia di legame, o meglio di interazione tra ligando e recettore proteico. Questa energia può essere calcolata in base a diversi modelli più o meno approssimati, ed all'interno di questi, a differenti livelli di teoria, risultando più o meno correlata all'energia libera di formazione del complesso misurabile sperimentalmente. L'accuratezza della correlazione può essere differente in quanto i possibili modelli possono considerare

² (a) Wlodawer, A.; Vondrasek, J. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 249. (b) Anderson, A. C. *Chem. & Biol.* **2003**, *10*, 787. (c) Kuhn, P.; Wilson, K.; Patch, M. G.; Stevens, R. C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 704.

esclusivamente fattori entalpici, stimare anche un contributo entropico, o valutare direttamente un'energia libera, e in tutti i casi includere o non includere fattori quali la mobilità conformazionale della proteina e l'effetto del solvente. Normalmente la selezione viene di fatto effettuata sulla base di modelli altamente approssimati che permettono di distinguere solamente tra ordini di grandezza di energia di interazione. Metodi più rigorosi vengono considerati solo come riferimento, dato che necessitano di risorse e tempi di calcolo troppo elevati per essere usati in uno screening di questo tipo.

5.1.1 Energie di complessazione stimate

La stima dell'energia di complessazione tra la proteina ed il ligando costituisce l'approccio più semplice a questo tipo di studi, ed è stato recentemente utilizzato anche dal nostro gruppo di ricerca per la progettazione di inibitori della HIV-PR basati su isosteri idrossietilenici.¹ Il valore di energia di complessazione si ottiene semplicemente dalla differenza tra l'energia del complesso proteina – ligando e quelle di ligando libero e proteina libera e viene, di solito, espressa in termini relativi rispetto a quella di un ligando di riferimento, così da poter eliminare il termine relativo all'energia della proteina libera (schema 5.1).



Schema 5.1

Si tratta di energie potenziali conformazionali empiriche ottenute dall'ottimizzazione della geometria dei ligandi e dei complessi proteina – ligando effettuata con un'opportuna funzione di energia potenziale, o campo di forze. Per questo studio è stato utilizzato il campo di forze AMBER nella cosiddetta versione

Cornell, che ha la forma riportata nell'equazione 5.1.³

$$E = \sum_{\text{bond}} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{angle}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{\text{dihedral}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

Equazione 5.1

Questo è il campo di forze più utilizzato per questo tipo di procedure, e come si vede ha una forma minimale, dato che energie di legame e di bending sono rappresentate da semplici espressioni armoniche diagonali, quelle torsionali sono rappresentate da un set di parametri, molto spesso riferiti ai soli atomi centrali, le interazioni di Van Der Waals sono rappresentate da un potenziale 6-12 e quelle elettrostatiche da un potenziale coulombiano tra cariche puntiformi. Nonostante la semplicità dell'equazione, nella quale mancano, ad esempio, termini espliciti per il legame idrogeno, l'ottima parametrizzazione di AMBER per le biomolecole garantisce risultati tra i più accurati fra quelli ottenibili da un calcolo di meccanica molecolare applicato a questi sistemi. Di norma, comunque, la semplice stima dell'energia di complessazione per questa via porta a risultati non ottimamente correlati ai dati sperimentali, e questo perché, a parte la qualità della funzione di energia potenziale utilizzata, si considera solo la componente entalpica dell'interazione, e inoltre l'effetto del solvente è considerato solo a livello della costante dielettrica utilizzata nell'equazione 5.1 (sebbene questa possa essere scalata e adattata a ciascuna interazione del sistema da modellare, dipendentemente dall'intorno). Per quanto riguarda la componente entropica dell'interazione, vengono spesso tentate correzioni all'energia trovata, introducendo termini entropici derivanti da analisi effettuate sul solo ligando libero, nell'ipotesi, non del tutto giustificata, che la variazione di entropia che accompagna la formazione dei complessi si possa considerare costante all'interno di una serie. Viene così utilizzato il valore di entropia standard ricavato dalla diagonalizzazione della matrice hessiana del ligando, attraverso un calcolo *ab initio* a livelli relativamente bassi di teoria.

³ Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M. jr.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollmann, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179.

Il solvente invece può essere trattato con l'introduzione di un modello discreto o continuo. Nel primo caso si aggiunge semplicemente un box di molecole di solvente, che vengono trattate dal campo di forze allo stesso modo di ligando e proteina, e l'energia di complessazione viene calcolata per le molecole così solvate. Questo metodo consente di ottenere, almeno in linea di principio, i risultati più realistici, ma dato che il numero di molecole d'acqua necessario per arrivare a un risultato attendibile nel caso di una proteina è nell'ordine delle decine di migliaia, i tempi di calcolo risultano spesso proibitivi. Per questa ragione sono stati introdotti anche modelli continui, nei quali le molecole vengono considerate immerse in un continuo polarizzabile, nel quale la distribuzione di carica della molecola induce una risposta di polarizzazione, e a ciò consegue una stabilizzazione esprimibile in termini di energia libera di solvatazione.⁴ In alcuni casi ulteriori parametri di origine empirica (superficie molecolare del ligando, coefficiente di partizione, volume del ligando) sono stati utilizzati assieme all'energia di complessazione ed all'entropia dei ligandi per la costruzione di correlazioni con l'affinità osservata con tecniche QSAR di analisi multivariata.⁵ Questo approccio presenta molte analogie con quello delle cosiddette "funzioni di score". In questi metodi le interazioni ligando-recettore vengono valutate attraverso un punteggio calcolato con una serie di funzioni empiriche (principalmente basate su una mappatura dei gruppi funzionali presenti sul ligando e nel sito) sempre contenenti un campo di forze, nel quale, però, i parametri sono stati calibrati su un set di dati sperimentali appropriati al recettore in esame. In questo modo termine entropico ed effetto del solvente sono trattati in modo implicito. Metodi di questo tipo sono stati largamente applicati al caso della proteasi HIV 1 e dei suoi mutanti⁶ e consentono di ottenere molto rapidamente il risultato, in quanto non si devono calcolare valori di energia derivanti da ottimizzazioni e/o dinamiche molecolari dei complessi ligando-recettore; normalmente vengono effettuate semplici scansioni di una griglia tridimensionale associata al sito di legame con una serie di probes molecolari, come nel problema del

⁴ (a) Frecer, V.; Kalebac, M.; De Nardi, P.; Pricl, S.; Miertus S. *J. Mol. Graph. Modell.* **2004**, *22*, 209. (b) Miertus, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2105. (c) Frecer, V.; Miertus, S. *Int. J. Quant. Chem.* **1992**, *42*, 1449.

⁵ Frecer, V.; Miertus, S. *Macromol. Chem. Phys.*, **2002**, *203*, 1650.

⁶ (a) Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425. (b) Murray C. W.; Auton, T. R.; Eldridge, M. D. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 503. (c) Head, R.

docking. Nel nostro caso la valutazione iniziale degli inibitori è stata effettuata attraverso un semplice calcolo di energia di complessazione, ricorrendo, in alcuni casi, a un modello discreto del solvente. Lo schema generale della procedura seguita è il seguente:

-Il Protein Data Bank fornisce la struttura di riferimento su cui viene effettuato un controllo generale, vengono aggiunti gli idrogeni ed eliminate le molecole di acqua di cristallizzazione. Nel caso della HIV-PR vengono aggiunti tutti gli idrogeni, compresi quelli dei gruppi ionizzabili, simulando il loro stato di ionizzazione a pH neutro, ma uno solo dei due residui di aspartato catalitici viene protonato, dato che evidenze sperimentali e studi teorici indicano che lo stato attivo dell'enzima è quello con un solo protone condiviso tra i due gruppi catalitici.⁷ Per quanto riguarda l'acqua di cristallizzazione, vengono rimosse tutte le molecole con l'eccezione di quella sempre presente nel sito catalitico dei complessi HIV-PR – inibitori (non ureidici). Questa molecola d'acqua è sempre coinvolta nel riconoscimento, accettando legame idrogeno da parte degli NH di *backbone* dei residui Ile₅₀ e Ile_{50'}, e donando a sua volta legame idrogeno ai gruppi carbonilici dell'inibitore in posizione P₁ e P_{1'} (fig.2.4).

-Ad ogni atomo del complesso vengono assegnati gli appropriati parametri AMBER: per la proteina si utilizzano quelli originalmente descritti da Kollman;³ se non sono disponibili i parametri necessari per il ligando, questi vengono calcolati secondo la procedura descritta da Geremia e Calligaris.⁸ Vengono quindi assegnate le cariche: per gli atomi della proteina sono quelle tabulate da Gasteiger e Marsili,⁹ mentre per il ligando sono quelle ottenute da un calcolo *ab initio* al livello RHF/6.31G(d,p), secondo quanto previsto dalla procedura AMBER originale.

D.; Smythe, M. L.; Oprea, T. I.; Waller, C. L.; Greene, S.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3959.
(d) Takamatsu, Y.; Itai, A. *Proteins* **1998**, *33*, 62. (e) Jain, A. N. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1993**, *7*, 305.

⁷ (a) Carloni, P.; Rothlisberger, U.; Parrinello, M. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 455. (b) Piana, S.; Sebastiani, D.; Carloni, P.; Parrinello, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8730.

⁸ Geremia, S.; Calligaris, M. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 1541.

-La struttura così preparata viene gradualmente rilassata fino a raggiungere un minimo di energia secondo il campo di forze AMBER, seguendo la ben nota procedura multistage descritta originalmente da Levit e Lifson,¹⁰ la quale prevede che vengano prima rilassati gli idrogeni, poi le catene laterali ed infine l'intera proteina con il suo ligando. Si ottiene così una struttura iniziale per il modello del complesso di riferimento, che viene ulteriormente affinata attraverso un ciclo di dinamica molecolare a temperatura ambiente, della durata di 100 ps, seguita da una nuova ottimizzazione finale.

-Le strutture dei complessi degli altri ligandi vengono ottenute dalla struttura iniziale del complesso di riferimento: le molecole dei ligandi vengono costruite a parte, e sovrapposte a quella del ligando di riferimento ricorrendo alla procedura DOCK del package Sybyl6.9 (Tripos). Anche queste strutture vengono sottoposte a ottimizzazione, dinamica e quindi riottimizzate.

-Le conformazioni di minima energia dei ligandi liberi si ottengono da una ricerca conformazionale effettuata applicando l'algoritmo genetico di Judson – Rabitz a tutti i legami liberi di ruotare delle molecole.¹¹ L'energia di complessazione viene calcolata come differenza tra l'energia dei complessi ottimizzati e quella della conformazione di minima energia dei corrispondenti ligandi liberi.

-L'effetto del solvente viene, eventualmente, valutato ripetendo l'intera procedura dopo aver immerso tanto i complessi quanto i ligandi liberi in un box periodico di molecole d'acqua. In questo caso un valore di energia di solvatazione viene ricavato dalla componente di non legame dell'espressione dell'energia (ultimo termine dell'equazione 5.1), calcolata per le molecole non solvate, quelle solvate e per il solvente.

L'affidabilità di questo metodo è stata valutata su diversi insiemi di inibitori della HIV-PR (fig. 5.2).

⁹ Gasteiger, M.; Marsili, M.; Hutchings, M. G.; Saller, H.; Low, P.; Rose, P.; Rafeiner, K. *J. Chem. Inform. Comp. Sci.* **1990**, *30*, 467.

¹⁰ Levit, M.; Lifson, S. *J. Mol. Biol.* **1969**, 269.

¹¹ Judson, R. S.; Rabitz, H. *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *68*, 1500.

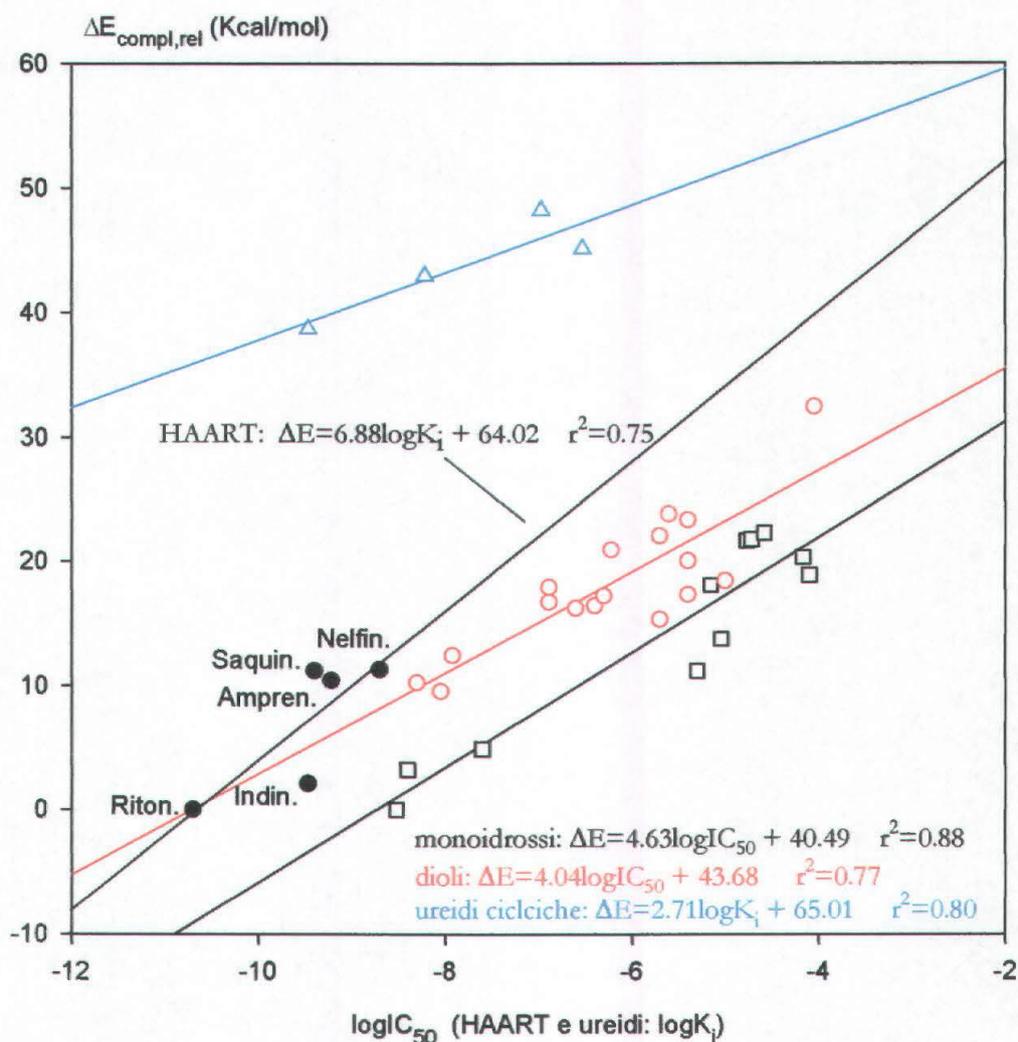


Figura 5.2

In figura 5.2 l'energia di complessazione calcolata viene correlata a un valore sperimentale di affinità degli inibitori per la HIV-PR. Sono state considerate quattro differenti serie di composti: Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir e Saquinavir, farmaci utilizzati nella terapia HAART, alcune ureidi cicliche, e alcuni inibitori mono- e diidrossietilenici recentemente preparati dal nostro gruppo di ricerca. Per i primi due gruppi di composti la correlazione è riferita alla costante di equilibrio K_i , relativa alla dissociazione del complesso enzima-inibitore; mentre per gli inibitori idrossietilenici la correlazione è riferita al valore di IC_{50} , cioè a quel valore di concentrazione di inibitore che, nelle condizioni sperimentali, provoca il dimezzamento dell'attività enzimatica. Questo valore è a sua volta correlabile a quello di K_i ; in particolare, la dipendenza risulta lineare utilizzando identiche

condizioni sperimentali. Per le due serie di inibitori mono- e diidrossietilenici sono stati considerati solamente composti con un valore di IC_{50} superiore a 5 nM, dato che questo è il limite inferiore di misurabilità di questo parametro nelle condizioni sperimentali utilizzate nel saggio a nostra disposizione. Come si vede la correlazione, per i motivi sopraesposti, non è ottimale, ma in linea con i risultati normalmente ottenuti in questo tipo di studi. Inoltre la correlazione ottenuta è simile nelle quattro serie considerate, e questo sia a valori molto elevati di affinità, come quelli delle molecole del gruppo HAART, sia per inibitori scarsamente efficaci, come i meno attivi di quelli delle serie idrossietileniche. Ciò garantisce la possibilità di discriminare tra inibitori attivi al limite inferiore rilevabile dal test sperimentale a nostra disposizione, ed inibitori di scarso interesse attivi a valori di IC_{50} superiori a 10-100 μ M.

5.1.2 *Calcolo diretto dell'energia libera di complessazione*

Le simulazioni basate sulla dinamica molecolare possono essere utilizzate per campionare la regione termicamente accessibile dello spazio conformazionale di un modello microscopico di un sistema molecolare o supramolecolare. Dall'insieme di strutture campionate, e dalle energie potenziali associate a ciascuna di queste (ottenute anche in questo caso da un opportuno campo di forze, o funzione meccanica di energia potenziale), è possibile, in principio, calcolare un valore di energia libera. Quantità come l'energia libera di legame, l'energia libera di solvatazione, e anche l'energia libera di attivazione di una reazione, possono essere calcolate con un approccio di questo tipo.

Sono stati sviluppati in particolare due metodi per il calcolo dell'energia libera di un sistema a partire dalle componenti dell'energia potenziale media di un insieme di stati: quello delle perturbazioni di energia libera, FEP, che è un metodo esatto,¹² e quello approssimato dell'interazione lineare di energia libera, LIE.¹³

¹² Kollmann, P. A. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2593.

¹³ (a) Åqvist, J.; Medina, C.; Samuelsson, J. E. *Prot. Eng.* **1994**, *7*, 385. (b) Jones-Hertzog, D. K.; Jorgensen, W. L. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1539. (c) Hansson, T.; Marelius, J.; Åqvist, J. *J. Comput.-Aided Mol.Des.* **1998**, *12*, 27.

5.1.3 Il metodo FEP

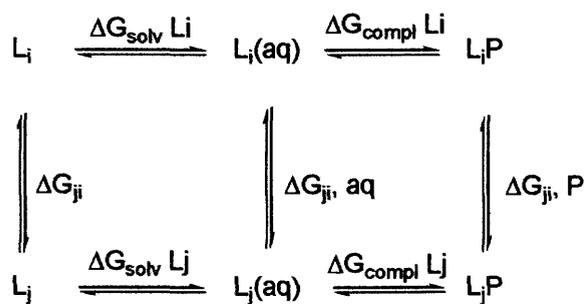
L'energia libera associata alla trasformazione di un sistema molecolare da uno stato i a un altro stato j , associati a valori di energia potenziale V_i e V_j , può essere calcolato ricorrendo all'equazione perturbativa (eq. 5.2):

$$\Delta G_{i \rightarrow j} = -RT \ln \left\langle \exp \left[-\frac{(V_j - V_i)}{RT} \right] \right\rangle_i$$

Equazione 5.2

Dove $\langle . \rangle$ rappresenta il valor medio delle energie associate all'insieme delle conformazioni accessibili agli stati i -esimo e j -esimo, valori questi calcolati attraverso un campionamento ottenuto da una traiettoria simulata all'equilibrio termico ed alla temperatura ambiente. L'equazione 5.2 è esatta, e può essere ad esempio applicata al caso in cui si voglia calcolare l'energia libera di legame di un ligando J , essendo nota l'energia libera di legame di un ligando I , strutturalmente correlato a J . In questo caso la trasformazione dallo stato i allo stato j corrisponde alla trasformazione della molecola I nella molecola J all'interno o all'esterno del sito di legame della proteina. Questo approccio è molto utile quando gli stati i e j sono sufficientemente simili, così che il campionamento conformazionale dello stato i , ripetuto sullo stato j , porti a un campione di conformazioni altrettanto rilevanti (cioè a bassa energia). Ciò equivale a dire che la trasformazione operata deve essere piccola, ad esempio la sostituzione di un idrogeno con un metile. Anche per una semplice trasformazione di questo tipo, sarà tuttavia necessario operare la trasformazione per gradi, definendo un insieme di stati intermedi tra i e j , sufficientemente vicini sia dal punto di vista energetico sia dal punto di vista strutturale. Nel nostro esempio ciò può essere ottenuto definendo una serie di stati nei quali l'atomo di idrogeno che deve essere sostituito viene gradualmente portato al volume di un atomo di carbonio, e i parametri del campo di forze utilizzato per il calcolo dell'energia sono gradualmente variati da quelli corrispondenti a un atomo di idrogeno a quelli propri di un atomo di carbonio, e da una successiva serie di stati nei quali atomi di idrogeno vengono gradualmente fatti crescere sul nuovo atomo di carbonio. La variazione di energia

libera tra gli stati i e j verrà quindi ottenuta dalla sommatoria delle variazioni calcolate per i singoli stati intermedi. Applicando questa procedura ad un opportuno ciclo termodinamico, come, ad esempio, lo schema 5.2:



Schema 5.2

è possibile ottenere un valore di energia libera di solvatazione e di legame per la molecola J espresse relativamente alla molecola I . Tali valori saranno indipendenti dalla natura del campo di forze utilizzato per il calcolo, e tanto più esatti quanto più grande è il numero di stati intermedi considerati. A causa della grande richiesta di risorse e tempi di calcolo imposte da questo approccio, il metodo FEP è più indicato per lo studio, ad esempio, della selettività di substrato di un enzima e alle sue implicazioni meccanicistiche, che non allo screening su vasta scala di ligandi. Tuttavia esso è stato applicato anche allo studio delle interazioni della proteasi HIV-PR con i suoi inibitori, e viene qui considerato come metodo di riferimento.¹⁴

5.1.4 Il metodo LIE

Il metodo dell'energia di interazione lineare è di tipo "semiempirico" ed ha il vantaggio di richiedere solamente la simulazione dinamica dei due stati fisici (ligando libero e ligando legato).¹⁵ Il contributo delle interazioni polari e non polari all'energia di interazione viene qui considerato separatamente. La parte polare viene trattata utilizzando l'approssimazione della risposta lineare, mentre il contributo non polare viene calcolato con una formula empirica calibrata su un opportuno set di dati sperimentali. (eq. 5.3).

¹⁴ (a) Wang, L.; Duan, Y.; Stouten, P.; De Lucca, G. V.; Klabe, R. M.; Kollmann, P. A. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2001**, *15*, 145. (b) Sham, Y. Y.; Chu, Z. T.; Tao, H.; Warshel, A. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2000**, *39*, 393.

¹⁵ (a) Hannson, T.; Marelius, J.; Åqvist, J. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 27. (b) Åqvist, J.; Mowbray, S. L. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9978. (c) Åqvist, J. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 1587.

$$\Delta G_{bind} = \alpha \left(\langle V_{i-s}^{LJ} \rangle_{bound} - \langle V_{i-s}^{LJ} \rangle_{free} \right) + \beta \left(\langle V_{i-s}^{el} \rangle_{bound} - \langle V_{i-s}^{el} \rangle_{free} \right)$$

Equazione 5.3

Nell'equazione 5.3, α è un fattore di correzione empirico per le interazioni non polari, mentre il termine $\langle V_{i-s}^{LJ} \rangle$ rappresenta il valor medio delle energie derivanti dalle interazioni di tipo Lennard – Jones tra il ligando e ciò che lo circonda (acqua e proteina nel caso del ligando “legato”, solo acqua nel caso del ligando “libero”). Il secondo termine dell'equazione tratta in modo analogo le interazioni elettrostatiche, e β è il fattore di correzione per queste ultime. Secondo l'approssimazione delle risposte lineari, β vale 0.5 nel caso dell'interazione fra ioni, mentre è minore di 0.5 nel caso di interazioni tra molecole dipolari neutre.¹⁶ Questo metodo consente di ottenere un valore di energia libera di interazione in tempi di calcolo relativamente brevi, ed è stato utilizzato con successo nel caso della HIV-PR. In figura 5.3 sono confrontate le correlazioni con i valori sperimentali di energia libera di dissociazione dei complessi tra HIV-PR ed alcune ureidi cicliche:

- dei valori calcolati con il metodo FEP
- di quelli calcolati con il metodo LIE dagli autori del metodo stesso, che hanno utilizzato dati derivanti da dinamiche molecolari simulate con il campo di forze GROMOS¹⁷
- di quelli calcolati con il metodo LIE da noi utilizzando invece il campo di forze AMBER per le dinamiche molecolari, e la metodica LIE come implementata nel package “Q” (il cui codice sorgente è stato gentilmente concesso da Johann Åqvist, Università di Uppsala).

¹⁶ Åqvist, J.; Hansson, T.; *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 9512.

¹⁷ (a) Sham, Y. Y.; Chu, Z. T.; Tao, H.; Warshel, A. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2000**, *39*, 393. (b) Åqvist, J.; Hansson, T. *Prot. Eng.* **1995**, *8*, 1137.

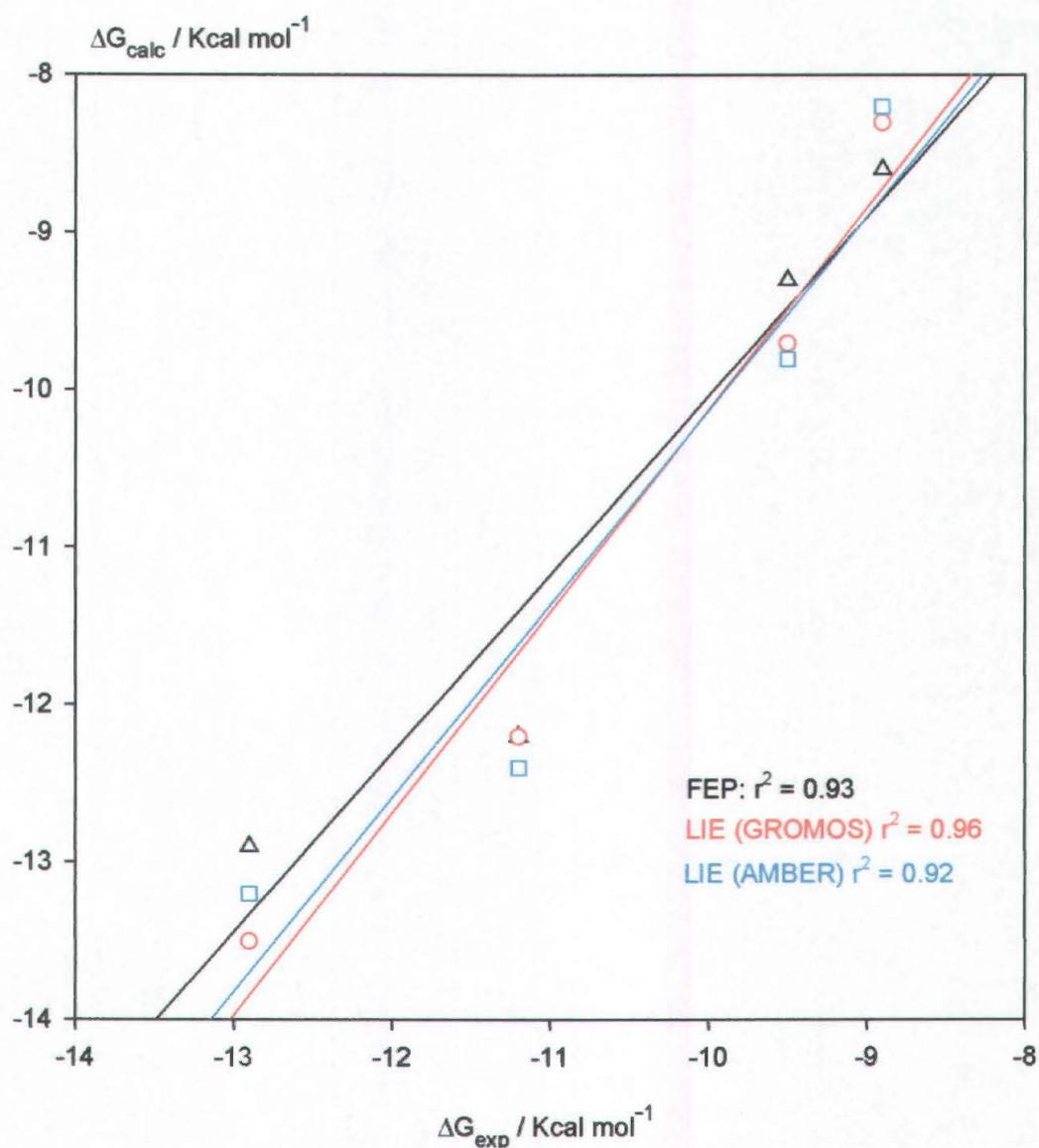
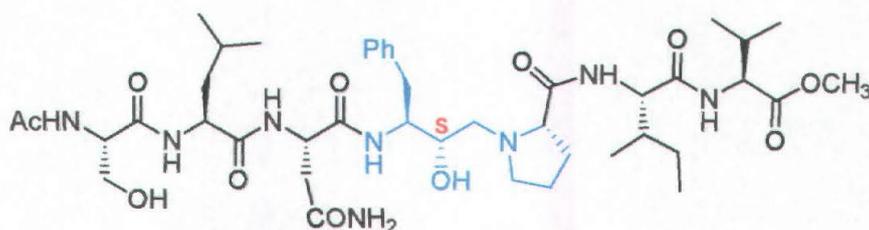


Figura 5.3

La figura 5.3 riporta le migliori correlazioni ottenibili con il metodo LIE, che si hanno per $\alpha=0.5$ e $\beta=0.16$ con il campo di forze GROMOS, e per $\alpha=0.5$ e $\beta=0.17$ con il campo di forze AMBER. Questi sono i valori che abbiamo utilizzato anche nel corso dello screening, nei casi in cui il valore di energia di complessazione è stato confrontato con quello di energia libera di dissociazione LIE.

5.2 Costruzione del modello e primo screening

Per effettuare lo screening del nostro primo set di inibitori contenenti il nucleo centrale Phe Ψ Pro **41b**, si è scelto di partire dalla struttura del complesso tra HIV-PR e l'inibitore pseudo-eptapeptidico JG-365.¹⁸ Questo è infatti l'inibitore più simile a quelli di nostro interesse per il quale sia stata determinata la struttura del complesso con la HIV-PR. Si tratta comunque di una molecola strutturalmente molto distante dalle nostre: il nucleo pseudopeptidico è di tipo monoidrossietilenico, e non si ha inversione della sequenza a livello del nucleo centrale.



JG-365: N-Ac-Ser-Leu-Asn-[Phe- Ψ (CHOHCH₂)-Pro]-Ile-Val-OMe

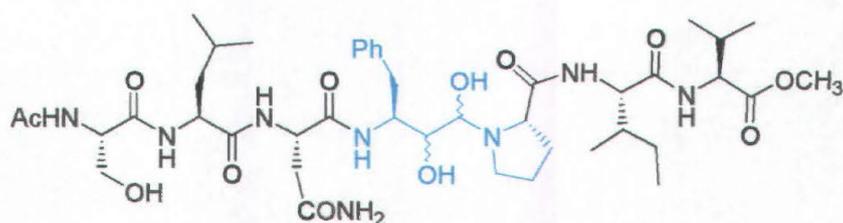
La struttura del complesso HIV-PR-JG365 (PDB: 7HPV, risoluzione 2.4Å) è stata dunque trattata nel modo descritto, e l'energia di complessazione ricavata dalla differenza tra l'energia del complesso ottimizzato e quella di JG-365 libero, è stata presa come riferimento per tutti i valori di energia di complessazione successivamente calcolati (tabelle 5.1 e 5.2); lo stesso è stato fatto per il valore di energia di complessazione ottenuto dall'ottimizzazione della struttura in un box periodico di 9600 molecole d'acqua. In tabella 5.1, riga 1, è riportato anche il valore di energia libera di dissociazione del complesso HIV-PR-JG365 calcolato con il metodo LIE: il valore di $-12.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$ è in discreto accordo con il valore sperimentale della costante di equilibrio di dissociazione del complesso, K_i , che è 0.24 nM .

¹⁸ Swain, A. L.; Miller, M. M.; Green, J.; Rich, D. H.; Schneider, J.; Kent, S. B. H.; Wlodawer, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8805.

	$\Delta E_{\text{compl,rel}}$ Kcal/mol	$\Delta E_{\text{compl,rel}}$ (aq) Kcal/mol	ΔG_{diss} LIE Kcal/mol	Affinità nM
JG-365	0	0	-12.4	0.25 (Ki)
(SSSS)-JG-365-diolo 113a	-22.6	-4.3		
(SRRS)-JG-365-diolo 113b	-19.4	-1.5		
(SSSS)-JG-365-urea 114a	-22.6	-4.2		
(SRRS)-JG-365-urea 114b	-18.8	-0.3		
(SSSS)-Lead 115a	+0.9	+0.7	-10.3	<2.5 (IC ₅₀)
(SRRS)-Lead 115b	+4.0	+3.2		

Tabella 5.1

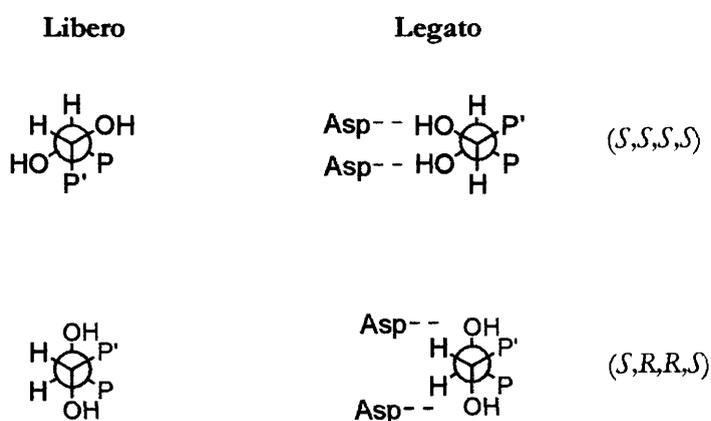
Dalla struttura dell'inibitore JG365 si è passati, attraverso una serie di modificazioni successive, ad una struttura che contiene il nostro nucleo centrale e le catene peptidiche originali di JG365, ma con un'inversione a livello della prolina. La modificazione è stata effettuata per gradi, allo scopo di ridurre al minimo lo strain indotto nel modello nel corso della variazione. La prima modificazione consiste nell'introduzione del secondo gruppo ossidrilico a livello del nucleo centrale (JG365-diolo **113a-b**).



JG-365-diolo: N-Ac-Ser-Leu-Asn-[Phe-Ψ(CHOHCHOH)-Pro]-Ile-Val-OMe

Si pone qui un problema stereochimico, in quanto, a causa delle priorità indicate dalla convenzione sulla nomenclatura R/S, la configurazione S del carbonio carbinolico presente nell'inibitore originale, diviene strutturalmente equivalente alla configurazione R che va assegnata allo stesso carbonio quando viene introdotto il nuovo gruppo idrossilico sul carbonio adiacente. Noi abbiamo considerato comunque, sia per questo caso che per tutti i successivi, tanto lo stereoisomero (S,S,S,S) quanto quello (S,R,R,S), con i due carboni carbinolici invertiti, ed abbiamo

riscontrato in tutti i casi esaminati, una costante preferenza per gli stereoisomeri (*S,S,S,S*) (tabella 5.1). In effetti, e questo vale per tutte le molecole considerate nello studio, entrambi gli stereoisomeri riescono a stabilire i contatti fondamentali con i residui di aspartato catalitici (schema 5.3). I ligandi (*S,S,S,S*) assumono, nel sito, una conformazione caratterizzata da due interazioni *gauche*, una delle quali tra i due gruppi ossidrilici. Gli stessi ligandi, liberi, assumono di norma una conformazione di minima energia con gli ossidrili in *anti*, ma con una interazione *gauche* in più. Viceversa i ligandi (*S,R,R,S*) si trovano nel sito con gli ossidrili in *anti*, ma questa conformazione è sostanzialmente uguale a quella che essi hanno anche liberi, e non si hanno quindi diminuzioni del numero di interazioni *gauche* nella formazione dei complessi.

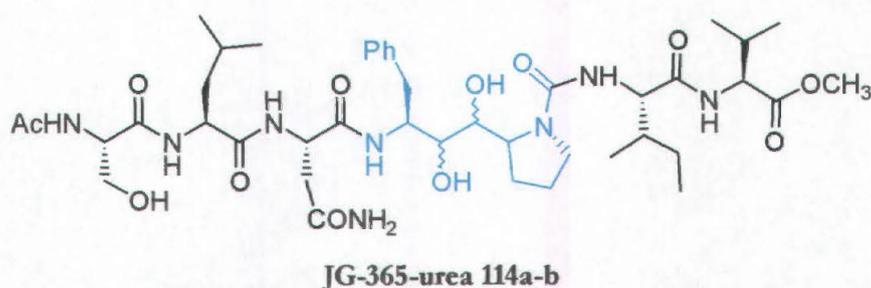


Schema 5.3

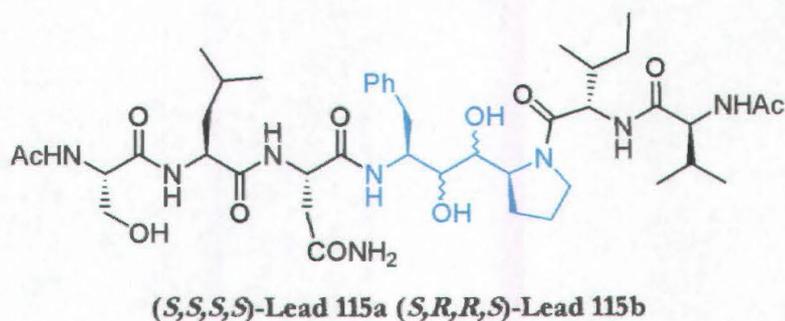
L'introduzione del secondo ossidrile evidenzia anche un secondo problema, legato al metodo di calcolo: come si osserva, infatti, nella tabella 5.1 il semplice valore di energia di complessazione calcolata prevede che i complessi dei dioli siano molto più stabili di quello del monoidrossiderivato originale. Questo è sicuramente da attribuire a una sovrastima dell'affinità verso i dioli, dovuta al fatto che l'equilibrio di formazione dei complessi è considerato "nel vuoto". Così l'introduzione di un secondo gruppo ossidrilico, capace di dare legame idrogeno, viene considerata dal modello come un fattore altamente stabilizzante, dato che il gruppo instaurerà il legame idrogeno solo nel sito della proteasi e non nel vuoto. Di fatto però, l'equilibrio avviene in acqua, e le interazioni instaurate dai due gruppi ossidrilici con il solvente compensano largamente l'interazione degli stessi con i residui di aspartato del sito catalitico. L'utilizzo del modello discreto del solvente (tabella 5.1) porta in

questo caso a risultati evidentemente più realistici. Fortunatamente, in questo studio abbiamo considerato, da questo punto in poi, esclusivamente dioli, e quindi non si è reso necessario calcolare l'energia di complessazione corretta con il modello discreto del solvente in tutti i casi, nell'ipotesi che in tutti i dioli l'interazione con l'acqua contribuisca in modo simile all'energia totale del sistema.

Dopo aver ottenuto i modelli dei due dioli, si è passati ad invertire la sequenza a livello della prolina. In questa fase però non si è voluto invertire direttamente tutta la sequenza amminoacidica che precede la prolina, e questa è stata legata all'azoto della prolina attraverso un legame ureidico. Sono stati così costruiti i modelli dei due stereoisomeri JG-365-urea **114a-b** (tabella 5.1)



Da questi si è infine passati ai modelli finali delle molecole "lead" **115a** e **115b** per il successivo screening, attraverso l'inversione della catena peptidica legata alla prolina (tabella 5.1).



I due inibitori a questo punto contengono effettivamente il nucleo centrale **41b**, e tutti i modelli indicano un'affinità di poco inferiore a quella di JG-365 per queste due molecole. In effetti, come si vedrà meglio più avanti, la molecola pseudoeptapeptidica (*S,S,S,S*)-Lead **115a** è stata sintetizzata e testata sulla HIV-PR, dimostrando di essere altamente attiva, con un valore di IC_{50} pari a 0.61 nM. Questa molecola presenta dunque un'attività del tutto paragonabile a quella di JG-365. Con

il conforto di questo feedback sperimentale, si è passati ad effettuare lo screening vero e proprio, che per il momento, dati i risultati di questa prima serie di ottimizzazioni, è stato ristretto alla serie di inibitori contenenti il nucleo centrale (S,S,S,S) **41b**, ed è stato effettuato secondo lo schema di figura 5.4.

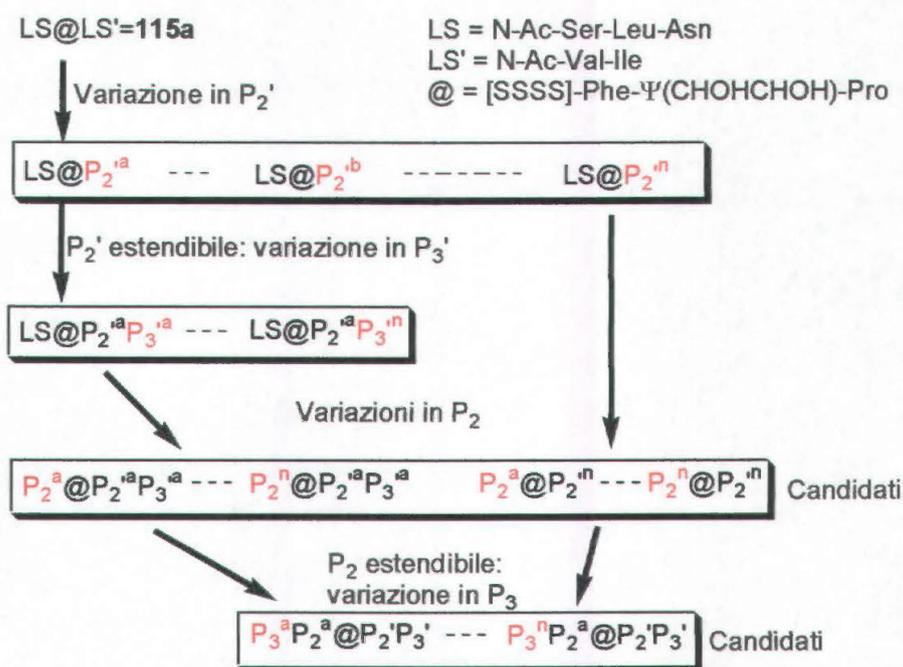


Figura 5.4

Partendo dalla struttura del composto "lead" **115a** sono state dapprima considerate tutte le variazioni alla posizione P_2' (consideriamo P la sequenza peptidica legata alla fenilalanina e P' quella legata alla prolina del nucleo centrale, dato che nel substrato originale questa è la direzione della sequenza partendo dall'amminotermine), lasciando invariata l'intera sequenza lead P . In questo primo ciclo possono essere selezionati sia residui estendibili alla posizione P_3' , sia residui che non consentono questa estensione. Nel primo caso si procede a un secondo ciclo di selezione per la posizione P_3' . Successivamente si effettua un terzo ciclo per la posizione P_2 , partendo dai composti, estendibili o no, che portano i migliori residui in P_2' (eventualmente in $P_3'P_2'$). Si ottiene così un set di molecole all'interno delle quali possono essere identificati candidati alla sintesi. Se tra questi risultano molecole estendibili anche alla posizione P_2 , si procede a un ultimo ciclo di selezione per la posizione P_3 . La tabella 5.2 riassume i risultati della selezione.

		$\Delta E_{\text{compl,rel}}$ Kcal/mol	$\Delta E_{\text{compl,rel (aq)}}$ Kcal/mol	$\Delta G_{\text{diss LIE}}$ Kcal/mol	IC_{50} nM
P ₂ '	LS@Ile	5.2			
	LS@Val	-4.5	-3.2	-11.3	
	LS@Glu	5.4			
	LS@Gln	5.1			
	LS@Thr	12.4			
	LS@Dtg	-2.2	-0.4		
	LS@Tbt	10.6			
	LS@Asn	7.3			
	LS@Poa	-7.8	-2.2	-10.38	
	LS@DmPoa	-13.7	-9.4	-10.41	
	LS@Kyn	1.1			
P ₃ '	LS@ValTrp	-7.2			
	LS@ValKyn	-0.2			
	LS@ValPhe	0.1			
	LS@Val2QCA	14.3			
	LS@ValUrc	2.0			
	LS@ValThiaz	6.7			
P ₂	Val@ValTrp	-1.3			
	Glu@ValTrp	5.1			
	Gln@ValTrp	5.8			
	Thr@ValTrp	5.4			
	Dtg@ValTrp	3.3			
	Tbt@ValTrp	8.4			
	Asn@ValTrp	6.4			
	Poa@ValTrp	-2.13		-8.71	
	DmPoa@ValTrp 119	-2.27		-8.96	75.3
	Kyn@ValTrp	0.2			
	Glu@Poa	4.5			
	Gln@Poa	4.2			
	Thr@Poa	4.8			
	Tbt@Poa	3.5			
	Asn@Poa	6.3			
	Poa@Poa	-5.1		-8.23	
	DmPoa@Poa 120	-13.2		-8.12	84.7
	Glu@DmPoa	1.6			
	Tbt@DmPoa	3.4			
	Poa@DmPoa	-7.2			
DmPoa@DmPoa 118	-5.7		-8.03	9.6	
P ₃	TrpVal@ValTrp 117	-7.4		-12.3	0.06
	KynVal@ValTrp	0.1			
	PheVal@ValTrp	-7.5			
	UrcVal@ValTrp	1.3			

LS=NH-Ac-Ser-Leu-Asn-

Tabella 5.2

Il primo ciclo della selezione porta ad identificare i residui di acido fenossiacetico (Poa) e dimetilfenossiacetico (DmPoa) come quelli che danno il risultato migliore, seguiti dalla N-acetil valina (blu in tabella 5.2). Non vi sono sostanziali differenze tra i trend di energia di complessazione calcolati con e senza modello discreto del solvente. Il valore di energia libera di dissociazione LIE indica però affinità confrontabili per i tre residui, che sono stati di conseguenza selezionati tutti. Poiché il residuo di valina consente l'estensione alla posizione P₃' , è stato effettuato un round di selezione anche per questa, che identifica nettamente la sequenza Val-Trp come migliore (blu inn tabella 5.2). Questo risultato non è sorprendente ed è in linea con quanto già verificato sperimentalmente in serie di inibitori con differenti nuclei centrali.²

La selezione a livello del residuo P₂ porta ad identificare ancora i residui di Poa e DmPoa come i migliori, in tutte le loro combinazioni con i residui in P₂'(P₃') (vedi tabella 5.2). Per questi composti il valore calcolato di energia libera di dissociazione LIE non è eccezionalmente favorevole, ma essi sono da considerarsi tutti buoni candidati per la sintesi. Anche l'inibitore Val@ValTrp **116** mostra un valore relativamente buono di energia di complessazione, e dato che, ancora in base alla nostra esperienza precedente, ci era noto il buon comportamento di inibitori pseudosimmetrici contententi la sequenza TrpVal a entrambi i lati, è stata effettuata anche una selezione per la posizione P₃, che effettivamente porta a selezionare i residui di triptofano e fenilalanina. Il calcolo di energia libera LIE, effettuato solo sull'inibitore di più facile sintesi TrpVal@ValTrp **117**, porta a un valore molto promettente di $-12.3 \text{ Kcal mol}^{-1}$, confrontabile a quello dell'inibitore originale JG-365. In base al risultato della selezione abbiamo, quindi, scelto di selezionare un rappresentante per ciascuno dei quattro insiemi di composti identificati (in rosso nella tabella 5.2).

5.3 Sintesi di nuovi inibitori basati sull'iosostere Phe-Pro 41b

In base ai risultati ottenuti dallo studio di molecular modeling sono stati sintetizzati 5 nuovi inibitori peptidomimetici, basati sul nucleo centrale **41b** le cui strutture sono riportate in figura 5.6.

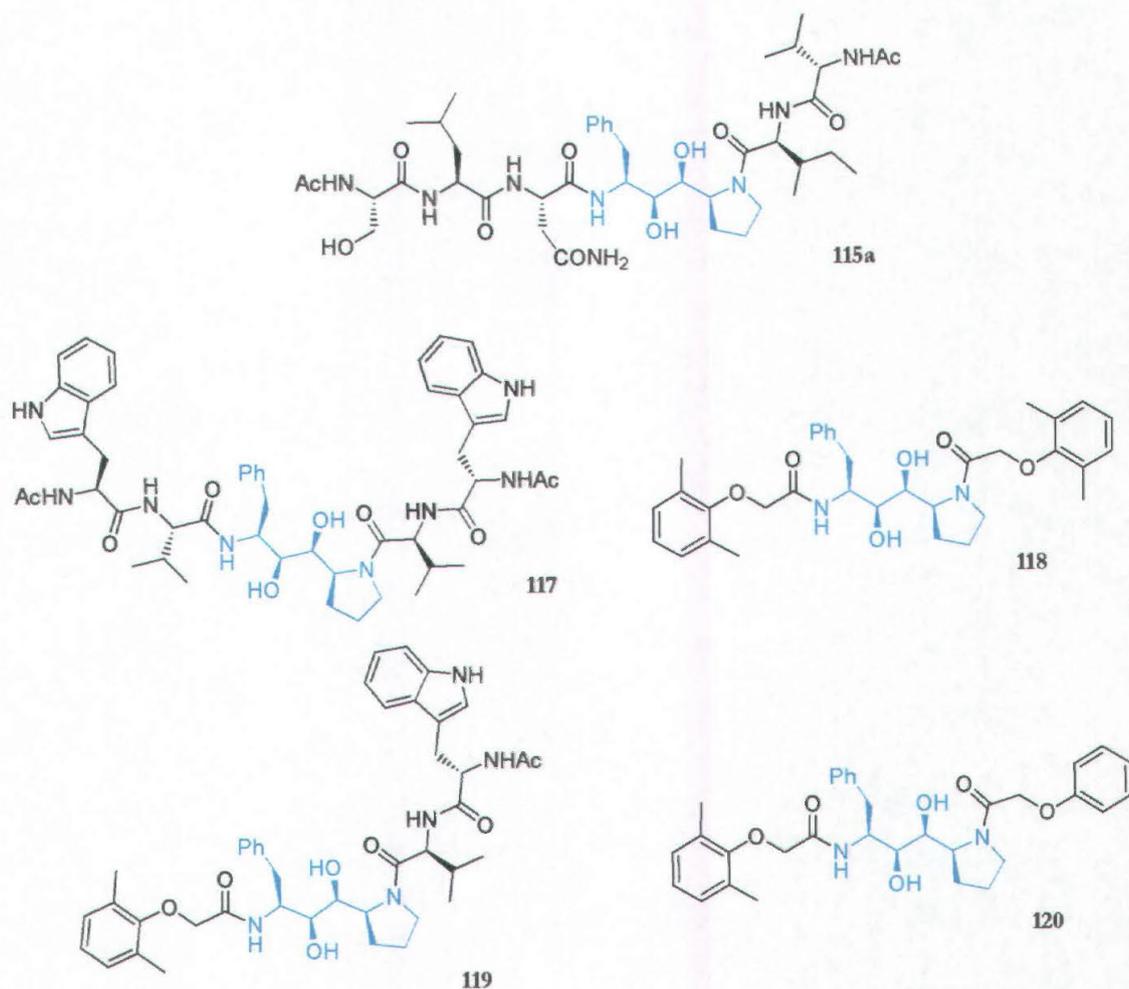


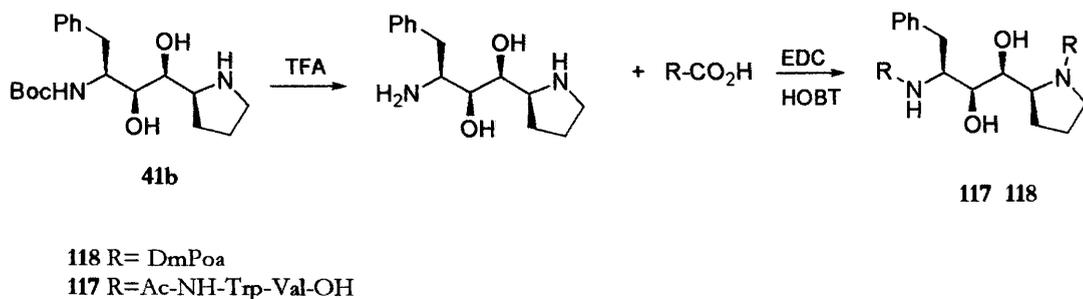
Figura 5.5

Tutti gli inibitori **115a-120** (fig. 5.5) sono stati sintetizzati seguendo la procedura standard per la sintesi peptidica in fase liquida attivando il gruppo carbossilico con N-etilcarbodimide (EDC) e 1H-idrossibenzotriazolo (HOBT),¹⁹ oppure con PYBOP e HOBT per evitare problemi di racemizzazione nel corso della sintesi.²⁰

Nel caso degli inibitori pseudo-simmetrici **117** e **118**, il nucleo centrale **41b** viene prima deproteggato per trattamento con acido trifluoroacetico (TFA), quindi fatto

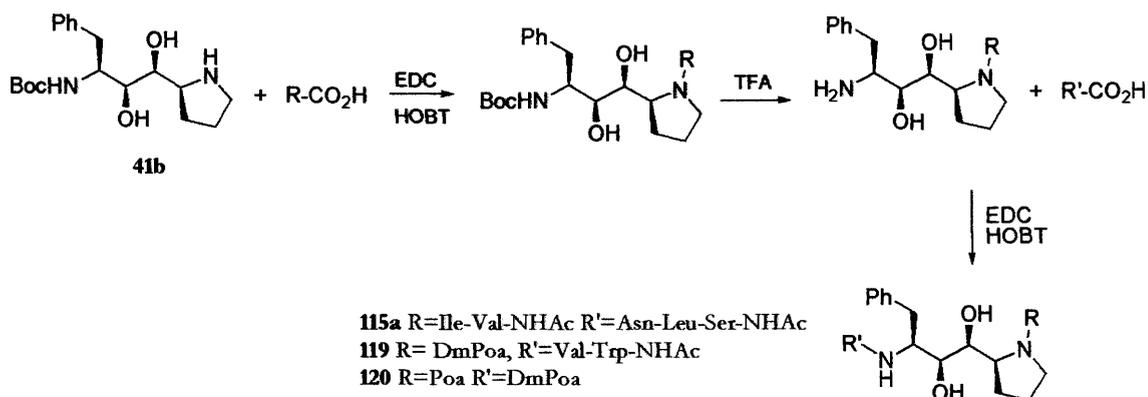
¹⁹ (a) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397. (b) König, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.

reagire con 2 equivalenti di acido-2,6-dimetil-fenossiacetico (DmPoa), nel caso di **118**, e con 2 equivalenti del dipeptide precedentemente sintetizzato Ac-NH-Trp-Val-OH **121**, nel caso di **117** (schema 5.5).



Schema 5.5

Nel caso degli inibitori **115a**, **119**, **120** viene prima introdotta la catena laterale legata all'anello pirrolidinico, si procede quindi alla rimozione del Boc con TFA e si passa, infine, all'introduzione della seconda catena laterale (schema 5.6).



Schema 5.6

Nonostante la sintesi degli inibitori **117** e **115a** sia stata effettuata utilizzando PYBOP, HOBT e collidina per evitare la racemizzazione, l'analisi mediante HPLC del prodotto ottenuto evidenzia la formazione di una miscela di diastereoisomeri.

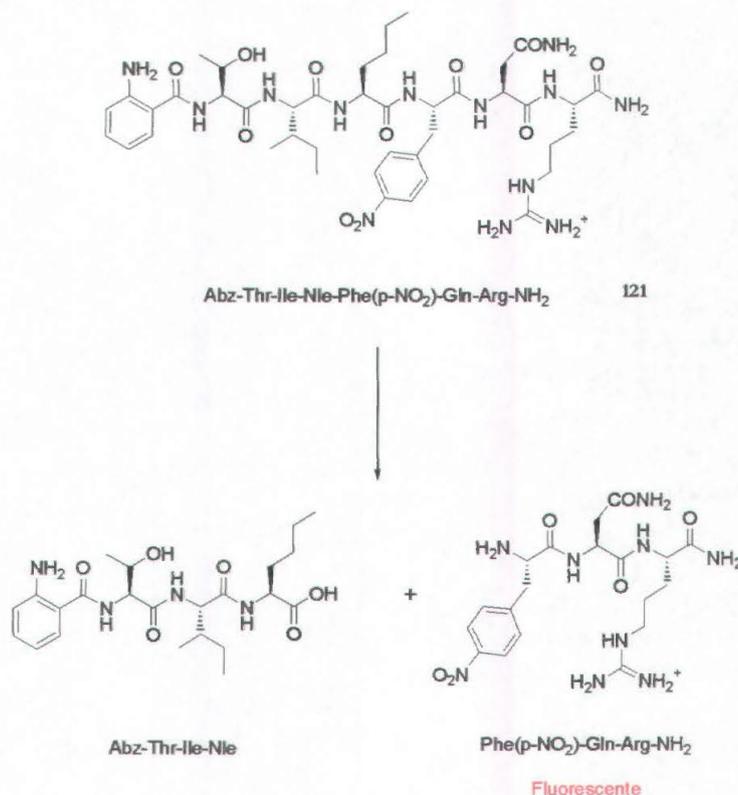
Il problema può essere evitato introducendo sul nucleo centrale un amminoacido alla volta a partire dall'azoto pirrolidinico e questa è la strategia utilizzata per la sintesi dell'inibitore **119**.

²⁰ Frerot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M.-N.; Jouin, P. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259.

5.4 Valutazione dell'attività inibitoria

La valutazione della attività biologica, e quindi della effettiva capacità di inibire la HIV-proteasi, è fondamentale non solo per saggiare gli inibitori sintetizzati, ma anche per disporre di un riferimento per la progettazione di molecole di maggiore efficacia.

Il saggio si basa sull'utilizzo di substrati fluorogenici largamente impiegati in biochimica grazie alla loro elevata sensibilità. La tecnica, definita "intramolecular fluorescence resonance energy transfer" (RET)²¹ prevede l'introduzione, in un opportuno substrato che sia riconosciuto dall'enzima, di un gruppo fluorescente ("fluorescent donor") e un gruppo ("quenching acceptor") caratterizzato da un cromoforo che assorbe alla stessa lunghezza d'onda di emissione del gruppo fluorescente. Il substrato utilizzato è l'esapeptide Abz-Thr-Ile-Nle-Phe(*p*-NO₂)-Gln-Arg-NH₂ **121**,²² dove la *p*-NO₂-fenilalanina costituisce il gruppo donatore, mentre l'acido 2-ammino-benzoico (Abz) quello accettore (schema 5.7).



Schema 5.7

²¹ Matayusi, E. D.; Wang, G. T.; Kraft, G. A.; Erickson, J. *Science* **1990**, *247*, 954.

²² Toth, M.; Marshall, G. R. *Int. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 544.

Per il saggio è stata utilizzata HIV-1 proteasi ricombinante disponibile commercialmente. L'intrinseca fluorescenza della p-NO₂-fenilalanina a 420 nm (assorbimento a 325 nm) risulta drasticamente diminuita dalla presenza del residuo di acido 2-amminobenzoico che esercita un effetto di quenching. Questo effetto diventa insignificante a distanze superiori ai 100 Å e, quindi, dopo l'idrolisi del substrato da parte della proteasi, si ha emissione di fluorescenza.

In questo modo l'attività idrolitica della HIV-1 proteasi può essere seguita in continuo semplicemente misurando l'incremento di intensità di fluorescenza contro il tempo. Se alla soluzione contenente il substrato e la proteasi si aggiunge un composto in grado di inibire la proteasi stessa si osserva una decisa diminuzione nell'incremento dell'intensità di fluorescenza, diminuzione proporzionale alla capacità inibitoria.

Il grado di inibizione viene valutato confrontando le velocità iniziali della reazione catalizzata in presenza di quantità variabili di inibitore, ricavate dalla parte lineare delle corrispondenti curve di variazione di fluorescenza contro il tempo (fig. 5.6). Il valore di IC₅₀ si ottiene riportando in grafico le pendenze in funzione delle diverse concentrazioni (espresse in termini logaritmici) alle quali si osserva l'inibizione ed interpolando il valore corrispondente al 50% di inibizione (fig.5.7).

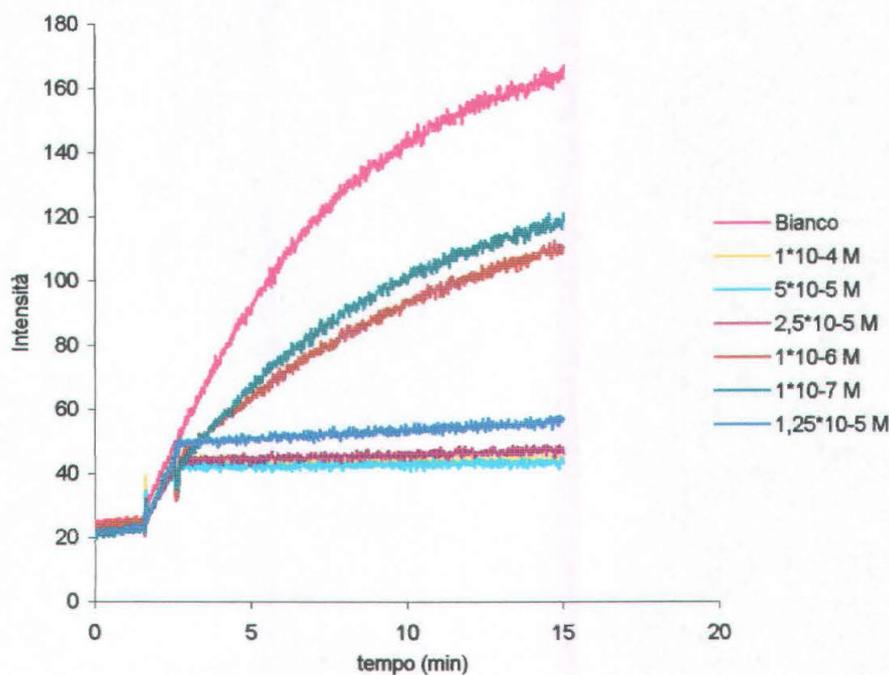


Figura 5.6: variazione di fluorescenza osservata in assenza ed in presenza di concentrazioni variabili dell'inibitore **115a**.

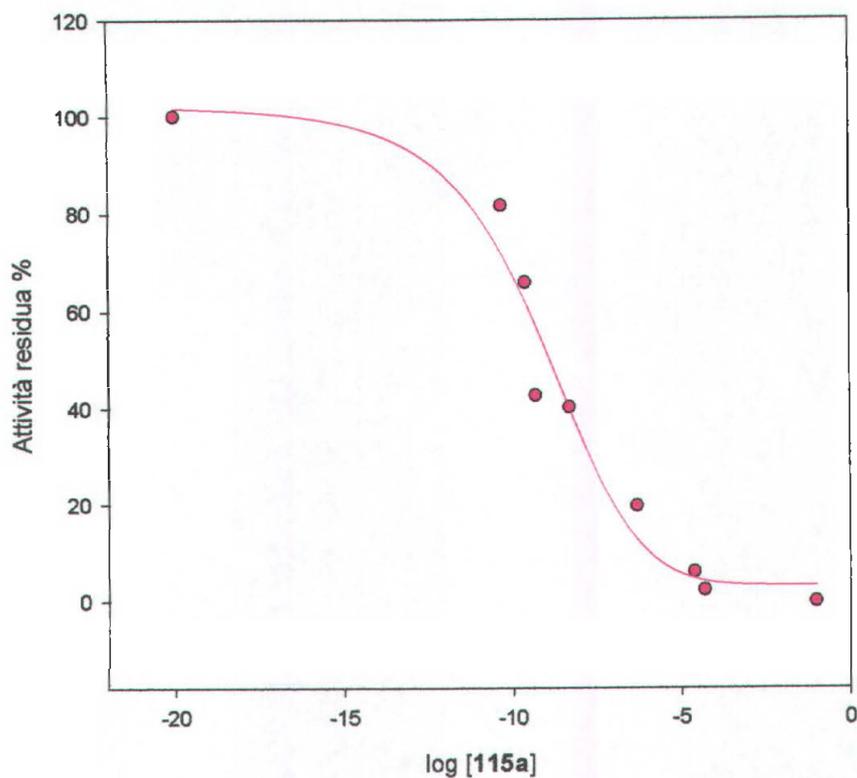


Figura 5.2: Inibizione dell'attività proteasica da parte dell'inibitore **115a**

I valori di IC₅₀ ottenuti per gli inibitori **115a-120** sono riassunti nella tabella 5.3, e riportati per un confronto con le predizioni teoriche anche nelle precedenti tabelle 5.1 e 5.2.

Inibitore	IC ₅₀ nM	$\Delta G_{\text{diss}}^{\text{LIE}}$ Kcal/mol	Ki nM	PM
115a AcSerLeuAsnPheProIleValAc	0.61	-	-	860
117 AcTrpValPheProValTrpAc	0.06	-12.3	-	905
118 DmPoaPheProDmPoa	9.6	-8.03	-	574
119 DmPoaPheProValTrpAc	75.3	-8.96	-	739
120 DmPoaPheProPoa	84.7	-8.12	-	545
Ritonavir	3.0		0.02	721
Indinavir	1.3		0.34	614
Saquinavir	-		0.40	671
Amprenavir	-		0.60	505
Nelfinavir	1.9		2.0	568

Tabella 5.3

Tutti gli inibitori sintetizzati mostrano eccellenti valori di attività nel range nanomolare. In particolare l'eptapeptide **115a** mostra, come si è già detto, attività confrontabile con quella dell'inibitore originale utilizzato in questo studio, JG-365. Lo pseudo -esapeptide **117** si dimostra ancora più attivo di un ordine di grandezza: la sequenza Triptofano-Valina appare effettivamente particolarmente importante per l'attività, e la sostituzione di una o di entrambe le catene Trp-Val con un residuo capace di occupare la sola posizione P₂, come nel caso dei composti **119** e **120** porta a una diminuzione di affinità di circa due ordini di grandezza. Il residuo di DmPoa è però in grado di consentire un recupero di attività di circa 10 volte rispetto a quello di Poa, e così il derivato **118** risulta ancora molto attivo.

Si osserva in primo luogo che questo andamento è in sufficiente accordo con i valori di energia predetti, ed in particolare con quelli di energia libera di dissociazione LIE. Questo riscontro suggerisce un uso estensivo, in futuro, di questo tipo di approccio al problema dello screening di nuovi inibitori, dati anche i tempi di calcolo richiesti da questa metodica, che sono assolutamente confrontabili con quelli richiesti dal calcolo dell'energia di complessazione tradizionale. Nessuna delle metodiche utilizzate è però stata in grado di consentire la predizione accurata

dell'effetto della variazione Poa / DmPoa in favore di quest'ultimo.

In tabella 5.3 sono riportati anche, per confronto, i valori di affinità degli inibitori attualmente in uso nella pratica clinica, e come si vede le nostre molecole reggono il paragone, in particolare quando almeno una delle due posizioni P₃ risulta occupata. Il semplice valore di affinità non è naturalmente l'unico parametro di cui si debba tener conto per la valutazione di queste molecole come potenziali farmaci, o almeno come potenziali lead per lo sviluppo di ulteriori serie di ligandi. Un altro parametro molto importante è il peso molecolare, che deve essere il più contenuto possibile per aumentare la biodisponibilità e limitare il problema degli elevati dosaggi richiesti da questi farmaci. Ancora dalla tabella 5.3 si può osservare che i pesi molecolari dei composti **118**, **119**, **120** rientrano già in un intervallo accettabile. Questi derivati possono quindi già essere presi in considerazione almeno per una ulteriore valutazione dell'attività *in vivo* da effettuare su linee cellulari umane infette, ed in ogni caso senz'altro come "lead compound" per ulteriori selezioni.

Considerando il fatto che fino a questo momento è stato possibile sintetizzare e valutare solo alcuni dei composti che il nostro screening preliminare aveva identificato, e che altri composti appaiono particolarmente promettenti, è possibile concludere che il nucleo centrale PhePro **41b** oggetto della presente tesi, dimostra di possedere caratteristiche estremamente promettenti, tali da farlo ritenere un serio candidato per la preparazione di nuove molecole attive. In questo senso risulta dimostrata l'ipotesi iniziale su cui questa tesi si basa, e lo sforzo richiesto dallo sviluppo della sintesi di questo nuovo nucleo centrale appare pienamente giustificato.

PARTE SPERIMENTALE

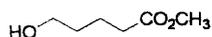
6. Parte Sperimentale

I punti di fusione sono stati determinati con apparecchio Buchi 510 e non sono stati corretti. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ a 400 MHz sono stati registrati con uno strumento Jeol EX400, in soluzione di CDCl_3 (se non diversamente indicato), utilizzando Me_4Si (TMS) come standard interno. Gli spettri di massa ESI (ElectroSpray Ionization) sono stati ottenuti con uno spettrometro API 1 Perkin-Elmer SICIEX. Le misure di attività ottica sono state effettuate con un polarimetro Perkin-Elmer 261, alla lunghezza d'onda della riga D del sodio ($\lambda=581$ nm). Le cromatografie "flash" su colonna di gel di silice sono state eseguite usando come fase stazionaria Silica-Gel 60 (Merck) (230÷400 Mesh). Per la cromatografia su strato sottile sono state usate lastre Merck, ricoperte con Silica-Gel 60F-254, per uno spessore di 0.25 mm, e sviluppate con I_2 oppure con una soluzione acquosa di KMnO_4 e H_2SO_4 . Il tetraidrofurano (THF) è stato distillato, seccato su KOH e ridistillato da sodio-benzofenone. Il dicloroetano (DCE) ed il diclorometano (DCM) sono stati seccati su CaCl_2 e distillati.

Gli amminoacidi naturali N-Cbz protetti utilizzati per la sintesi peptidica sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich oppure dalla Acros. La NH-Ac-(OBz)-L-serina è stata sintetizzata a partire da N-Boc-(OBz)-L-serina secondo la procedura descritta da Calmes.¹ L'acido 2,6-dimetil-fenossiacetico è stato sintetizzato dal 2,6-dimetilfenolo come riportato da Yamansarova.²

¹ Calmes, M.; Daunis, J.; Jacquier, R.; Verducci, J. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2285.

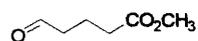
² Yamansarova, E. T.; Kukovinets, A. G.; Kukovinets, O. S.; Zainullin, R. A.; Galin, F. Z.; Kunakova, R. V.; Zorin, V. V.; Tolstikov, G. A. *Russ. J. Org. Chem.* **2001**, *37*, 246.



5-idrossi-valerato di metile (55)

Una soluzione di δ -valerolattone (10 mL, 10.7 mmol) e acido solforico concentrato (0.1 mL) in metanolo anidro (250 mL) viene mantenuta a riflusso per 16 ore, raffreddata a temperatura ambiente e addizionata con NaHCO_3 (1 g, 11.9 mmol). La miscela viene agitata per 20 minuti, filtrata ed il solvente rimosso a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

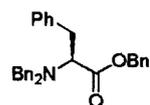
IR (film liquido, cm^{-1}): 3451 (OH), 1735 (C=O). **^1H NMR** (δ - CDCl_3): 1.55 (m, 2H, CH_2), 1.68 (m, 2H, CH_2), 2.32 (t, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 3.61 (m, 5H, CH_2 e OCH_3). **^{13}C NMR** (δ - CDCl_3): 21.15 (CH_2), 32.06 (CH_2), 33.70 (CH_2), 51.58 (CH_3O), 62.19 (CH_2O), 174.26 (COCH_3).



5-formil-valerato di metile (56)

Ad una sospensione di clorocromato di piridinio (PCC) (12.24g, 56.8 mmol) in diclorometano anidro (150 mL) si aggiunge una soluzione di alcol **55** (5.0 g, 37.8 mmol) in diclorometano anidro (50 mL), sotto atmosfera di argon. La miscela viene agitata per due ore, diluita con dietil etere (250 mL) e filtrata su celite. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela 1:1 dietil etere/etere di petrolio. Si ottengono 4.4 g (90%) di liquido incolore.

IR (film liquido, cm^{-1}): 1735 ($2\times\text{C}=\text{O}$). **^1H NMR** (δ - CDCl_3): 1.83 (quint, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.26 (t, 2H, CH_2 , $J=6.9$ Hz), 2.42 (t, 1H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 3.55 (s, 3H, OCH_3), 9.65 (s, 1H, CHO). **^{13}C NMR** (δ - CDCl_3): 17.27 (CH_2), 32.84 (CH_2), 42.84 (CH_2), 51.54 (CH_3O), 173.27 (COCH_3), 201.5 (CHO).

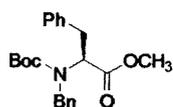


N,N-dibenzil-L-fenilalanina benzil estere (69)

Ad una sospensione di L-fenilalanina (10 g, 60.5 mmol) in acqua (100 mL) si aggiungono K_2CO_3 (26.5 g, 191.8 mmol) e benzil cloruro (29.6 mL, 181.8 mmol). La miscela viene mantenuta a riflusso per 16 ore, dopo aver raffreddato si aggiunge *n*-esano (150 mL). La fase organica viene lavata con una miscela 2:1 acqua/metanolo

(2x100 mL), con una soluzione satura di NaHCO₃, una soluzione satura di NaCl e seccata su Na₂SO₄ anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta, si ottengono 23.7 g di un olio incolore che viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

$[\alpha]_D^{25} = +3.68$ (c=0.21 MeOH). **IR** (film liquido cm⁻¹): 1740 (C=O). **¹H NMR** (δ-CDCl₃): 3.08 (dd, 1H, CH₂Ph β, J₁=8.1 Hz, J₂=13.9 Hz), 3.2 (dd, 1H, CH₂Ph β, J₁=7.4 Hz, J₂=13.9 Hz), 3.61 (d, 2H, CH₂N, J=13.9 Hz), 3.79 (t, 1H, CHN, J=5.5 Hz), 3.90 (d, 2H, CH₂N, J=13.9 Hz), 5.17 (d, 1H, CH₂O, J=12.1 Hz), 5.30 (d, 1H, CH₂O, J=12.1 Hz), 7.06-7.43 (m, 20H, Ar). **¹³C NMR** (δ-CDCl₃): 35.83 (CH₂Ph β), 54.56 (CH₂N), 62.54 (CHN), 66.21 (CH₂O), 126.41, 127.06, 128.29, 128.42, 128.60, 128.70, 128.84, 129.46, 129.59 (CH Ar), 136.13, 138.20, 139.37 (C Ar), 172.28 (CO). **MS** m/z: 458 [MNa]⁺, 436[MH]⁺.



N-benzil-N-*tert*-butossicarbonil-L-fenilalanina metil estere (83)

Ad una sospensione di L-fenilalanina metil estere cloridrato (10 g, 46.6 mmol) e Mg(SO₄)₂ in CH₂Cl₂ (400 mL) si aggiunge trietilammina (7.6 mL, 55.8 mmol). La miscela viene agitata per 16 ore, il solido viene allontanato per filtrazione ed il solvente eliminato mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene ripreso in *n*-pentano (200 mL), il solido che si forma viene allontanato per filtrazione ed il solvente rimosso a pressione ridotta. Il residuo viene sciolto in metanolo (150 mL) e la soluzione raffreddata a 0 °C. Si aggiunge NaBH₄ (3.5 g, 93.2 mmol) e la miscela viene agitata a 0 °C fino a completezza. Si aggiunge acetone (40 mL) e si agita per ulteriori 20 minuti. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il residuo ripreso in acetato d'etile (150 mL), la fase organica viene lavata con acqua (50 mL), una soluzione satura di NaHCO₃, una soluzione satura di NaCl e seccata su Na₂SO₄ anidro. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene sciolto in diossano (60 mL) e si aggiunge di-*tert*-butil dicarbonato (10.4 g, 47.6 mmol). Dopo aver agitato la miscela per 16 ore, il solvente viene rimosso per distillazione a pressione ridotta ed il prodotto grezzo purificato mediante

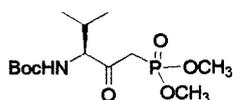
cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela 1:1 dietil etere/etere di petrolio. Si ottengono 9.1 g (85%) di olio incolore.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -110$ ($c=1.5$ CHCl_3)³. **IR** (film liquido cm^{-1}): 1745 (C=O), 1699 (C=O), 1605 (C=). **¹H NMR** (δ -DMSO- d_6 , 95 °C): 1.36 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 3.03 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=9.3$ Hz, $J_2=15.2$ Hz), 3.23 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=6.8$ Hz, $J_2=15.2$ Hz), 3.56 (s, 3H, CH_3O), 4.06 (d, 1H, CH_2N , $J=16.1$ Hz), 4.34 (d, 1H, CH_2N , $J=16.1$ Hz), 4.45 (dd, 1H, CHN , $J_1=6.8$ Hz, $J_2=9.3$ Hz), 7.25 (m, 10H, Ar). **¹³C NMR** (δ - CDCl_3): coppia di rotameri [28.21 e 28.42 (CH_3)₃C], [35.71 e 36.63 (CH_2Ph β)], 51.42 (bs, CHN), [51.69 e 51.99 (CH_3O)], [60.89 e 61.12 (CH_2N)], [80.64 e 80.94 (CH_3)₃C], 126.56, 127.34, 127.68, 128.24, 128.59, 129.40 (CH Ar), 137.26, [138.21 e 138.07] (C Ar), [155.36 e 155.25 (CON)], [171.19 e 171.51 (CO)]. **MS** m/z : 408[MK]⁺, 392[MNa]⁺, 370[MH]⁺.

Procedura generale per la sintesi di fosfonati

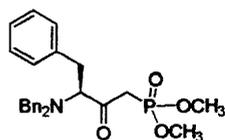
Ad una soluzione di dimetil-metilfosfonato (225 mmol) in THF anidro (200 mL) raffreddata a -78 °C sotto atmosfera di argon, viene aggiunta una soluzione di *n*-BuLi in esano 2.5M (225 mmol) in modo che la temperatura non superi i -60 °C. La miscela viene agitata per 15 minuti, quindi si aggiunge lentamente una soluzione di amminoacido (45 mmol) in THF anidro (100 mL). La soluzione viene agitata per due ore a -78 °C e per un'ora a -30 °C, quindi neutralizzata con una soluzione acquosa di acido citrico al 20%; la fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (3x75 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaHCO_3 , una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela dietil etere/etere di petrolio 1:1 quindi metanolo/dietil etere 1:9, oppure mediante cristallizzazione da etere diisopropilico.

³ Dondoni, A.; Perrone, D. *Synthesis* **1993**, 1162.



(3S)-Acido-(3-*tert*-butossicarbonilammino-4-metil-2-osso-pentil)-fosfonico dimetil estere (57a)

Si ottengono 13.1 g di olio giallo (93%) secondo la metodologia generale, partendo da L-valina metil estere (10.0g. 43.2 mmol), metil-dimetil fosfonato (23.2 mL, 216 mmol) e *n*-BuLi (86.4 mL, 216 mmol). $[\alpha]_D^{25} = -25$ (c=0.4, MeOH). **IR** (film liquido cm^{-1}): 3450 (NH), 1711 (C=O), 1250 (P=O). **$^1\text{H NMR}$** (δ - CDCl_3): 0.77 (d, 3H, CH_3 , $J=6.6$ Hz), 0.97 (d, 3H, CH_3 , $J=6.6$ Hz), 1.44 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 2.26 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.06 (dd, 1H, CH_2PO , $J_1=14.6$ Hz, $J_2=22.1$ Hz), 3.26 (dd, 1H, CH_2PO , $J_1=14.6$ Hz, $J_2=22.1$ Hz), 3.74 (m, 6H, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}$), 4.28 (m, 1H, CHNH), 5.29 (d, 1H, NH , $J=8.8$ Hz). **$^{13}\text{C NMR}$** (δ - CDCl_3): 16.52 (CH_3CH), 19.74 (CH_3CH), 29.12 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 38.65 (d, CH_2P , $J=131.4$ Hz), 52.03 (CH_3O), 62.75 (CHNH), 79.84 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 155.93 (CONH), 201.45 (d, CO , $J=7.3$ Hz). **MS** m/z : 362[MK] $^+$, 346[MNa] $^+$, 324[MH] $^+$.

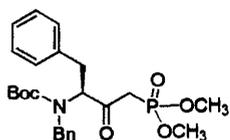


(3S)-Acido-(3-Dibenzilammino-2-osso-4-fenil-butil)-fosfonico dimetil estere (70)

Si ottengono 12.8 g di olio incolore (95%) secondo la metodologia generale, partendo da N_2N -dibenzil-L-fenilalanina benzil estere **69** (13.0 g, 30 mmol), metil-dimetil fosfonato (9.7 mL, 90 mmol) e *n*-BuLi (36 mL, 90 mmol).

$[\alpha]_D^{25} = +86.4$ (c=0.22, MeOH). **IR** (film liquido cm^{-1}): 1717 (C=O), 1602 (C=C), 1262 (P=O). **$^1\text{H NMR}$** (δ - CDCl_3): 2.96 (m, 3H, CH_2Ph e CH_2PO), 3.17 (m, 1H, CH_2PO), [3.23 (d, 3H, CH_3O , $J_{\text{H-P}}=11.5$ Hz) e 3.42 (d, 3H, CH_3O , $J_{\text{H-P}}=11.5$ Hz)], [3.51 (d, 2H, CH_2N , $J=13.6$ Hz) e 3.80 (d, 2H, CH_2N , $J=13.6$ Hz)], 3.72 (m, 1H, CHN), 7.20-7.35 (m, 15H, CH Ar). **$^{13}\text{C NMR}$** (δ - CDCl_3): 28.23 (CH_2Ph), 38.90 (d, CH_2PO , $J=130$ Hz), 52.60 (d, CH_3O , $J=6.9$ Hz), 54.79 (CH_2N), 68.58 (CHN), 126.07, 126.99, 127.50, 127.54, 128.31, 128.62, 129.13, 129.65 (CH Ar), 138.80,

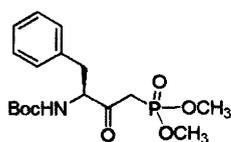
139.15, 141.42 (\underline{C} Ar), 200.42 (d, $\underline{C=O}$, $J=6.9$ Hz). **MS** m/z : 490[MK]⁺, 474[MNa]⁺, 452[MH]⁺.



(3S)-Acido-[3-(benzil-*tert*-butossicarbonil-ammino)-2-osso-4-fenil-butil]-fosfonico dimetil estere (84)

Si ottengono 8.1 g di olio incolore (89%) secondo la metodologia generale, partendo da N-Boc-N-benzil-L-fenilalanina metil estere **83** (7.29g, 19.7 mmol), metil-dimetil fosfonato (6.4 mL, 59.2 mmol) e *n*-BuLi (23.7 mL, 59.2 mmol).

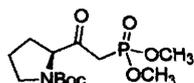
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -93.4$ ($c=0.3$, MeOH). **IR** (film liquido cm^{-1}): 1724, 1698 (C=O), 1252 (P=O). **¹H NMR** (DMSO- d_6 90 °C): 1.41 (bs, 9H, (CH₃)₃C), 2.89 (m, 3H, CH₂P e CH₂Ph β), 3.10 (t, 1H, CH₂P, $J=15.7$ Hz), 3.26 (dd, 1H, CH₂Ph β , $J_1=8.4$ Hz, $J_2=13.9$ Hz), 3.57 (m, 6H, (CH₃)₂O), 3.67 (d, 1H, CH₂N, $J=12.8$ Hz), 3.90 (d, 1H, CH₂N, $J=12.8$ Hz), 4.39 (m, 1H, CHN), 7.23 (m, 10H, CH Ar). **¹³C NMR** (DMSO- d_6 90 °C): 28.42 ((CH₃)₃C), 34.68 (CH₂Ph β), 36.61 (d, CH₂P, $J_{\text{H-P}}=129.9$ Hz), 53.0 ((CH₃)₂O), 61.63 (CHN), 68.16 (CH₂N), 81.66 ((CH₃)₃C), 126.67, 127.75, 128.39, 128.65, 128.80, 129.64 (CH Ar), 138.35, 138.78 (C Ar), 155.14 (CON), 198.70 (d, $\underline{C=O}$, $J=6.9$ Hz). **MS** m/z : 484[MNa]⁺, 479[MNH₄]⁺, 462[MH]⁺.



(3S)-Acido-(3-*tert*-butossicarbonilammino-2-osso-4-fenil-butil)-fosfonico dimetil estere (57b)

Si ottengono 12.4 g di solido bianco (89%) secondo la metodologia generale, partendo da N-Boc-L-fenilalanina metil estere (10 g, 35.8 mmol), metil-dimetil fosfonato (23.0 mL, 214 mmol) e *n*-BuLi (86 mL, 214 mmol). **P.f.**=65-67 °C (etere diisopropilico). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -52$ ($c=0.4$, MeOH). **IR** (KBR cm^{-1}): 3280 (NH), 1723, 1713 (C=O), 1225 (P=O). **¹H NMR** (δ -CDCl₃): 1.39 (s, 9H, (CH₃)₃C), 2.93 (dd, 1H, CH₂Ph, $J_1=8.3$ Hz, $J_2=14.2$ Hz), 3.18 (dd, 1H, CH₂Ph, $J_1=6.1$ Hz, $J_2=14.2$ Hz), 3.10 (dd, 1H, CH₂PO, $J_1=14.2$ Hz, $J_2=22.0$ Hz), 3.26 (dd, 1H, CH₂PO, $J_1=14.2$ Hz, $J_2=22.0$ Hz), 3.75 (d, 3H, OCH₃, $J_{\text{H-P}}=11.5$ Hz), 3.77 (d, 3H, OCH₃, $J_{\text{H-P}}=11.5$ Hz),

4.55 (m, 1H, $\underline{\text{CHNH}}$), 5.43 (d, 1H, $\underline{\text{NH}}$, $J=7.8$ Hz), 7.24 (m, 5H, $\underline{\text{CH}}$, Ar). ^{13}C NMR ($\delta\text{-CDCl}_3$): 28.31 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 36.97 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 38.31 (d, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{P}$, $J=130$ Hz), 53.15 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3\text{O})$), 61.27 ($\underline{\text{C}}\text{HNH}$), 80.14 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 126.95, 128.65, 129.38 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar), 136.56 ($\underline{\text{C}}$ Ar), 155.34 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$), 201.03 (d, $\underline{\text{C}}\text{O}$, $J=5.5$ Hz). MS m/z : 410[MK]⁺, 394[MNa]⁺, 372[MH]⁺.



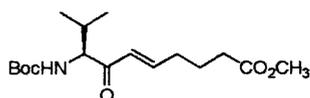
(2S)-Acido-2-[2-(Dimetossi-fosforil)-acetil]-pirrolidin-1-carbossilico *tert*-butilestere (108)

Si ottengono 6.85 g (70%) di un olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da N-Boc-L-prolina metil estere (7.0 g, 30.5 mmol), metil dimetilfosfonato (9.8 mL, 91.7 mmol) e *n*-BuLi (36.6 mL, 91.7 mmol). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -54.2$ ($c=0.5$, MeOH). IR (film liquido cm^{-1}): 1693 (C=O), 1255 (P=O). ^1H NMR ($\delta\text{-DMSO-d}_6$ 90 °C): 1.39 (s, 9H, $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C}$), 1.78 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.98 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.13 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), [3.24 e 3.29 (dd, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{PO}$, $J_1=3.5$ Hz, $J_{\text{H-P}}=21.2$ Hz)], 3.36 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 3.69 (d, 6H, $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{OP}$, $J_{\text{H-P}}=10.6$ Hz), 4.36 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{HN}$, $J_1=4.8$ Hz, $J_2=8.8$ Hz). ^{13}C NMR ($\delta\text{-DMSO-d}_6$ 90 °C): 23.79 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 28.59 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C}$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 36.63 (d, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{P}$, $J=132.7$ Hz), 47.08 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 52.97 ($\underline{\text{C}}\text{HN}$), 66.14 (d, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$, $J=3.8$ Hz), 79.64 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C}$), 201.61 (d, $\underline{\text{C}}\text{O}$, $J=6.9$ Hz). MS m/z : 359 [MK]⁺, 343 [MNa]⁺, 322 [MH]⁺.

Procedura generale per la sintesi degli enoni (58a-b, 71-Z)

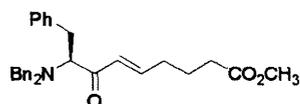
Una soluzione di aldeide **56** (23.0 mmol) in etanolo assoluto (100 mL) viene aggiunta, sotto agitazione, ad una soluzione di fosfonato (23.0 mmol) e K_2CO_3 (23.0 mmol), seccato a 75°C per 12 ore, in etanolo assoluto (200 mL). La miscela viene agitata a temperatura ambiente per 16 ore, il residuo solido viene filtrato e la soluzione neutralizzata con acido acetico glaciale. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo distribuito tra acetato d'etile ed una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (2x50 mL) e le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato mediante cromatografia flash su colonna

di gel di silice utilizzando come eluente una miscela 1:1 di etere etilico ed etere di petrolio.



(8S)-Acido-8-*tert*-butossicarbonilammino-9-metil-7-osso-dec-5-enoico metil estere (58a)

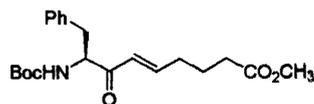
Si ottengono 2.6 g di olio incolore (67%) secondo la metodologia generale, partendo da aldeide **56** (1.5 g, 11.8 mmol), fosfonato **57a** (3.81 g, 11.8 mmol) e K_2CO_3 (1.6 g, 11.8 mmol) secondo la metodologia generale. $[\alpha]_D^{25} = +3.13$ ($c=1.95$, MeOH). IR (KBr cm^{-1}): 3350 (NH), 1730, 1683, 1665 (C=O), 1614 (C=C). 1H NMR (δ - $CDCl_3$): 0.75 (d, 3H, CH_3CH , $J=6.6$ Hz), 0.97 (d, 3H, CH_3CH , $J=6.6$ Hz), 1.41 (s, 9H, $(CH_3)_3C$), 1.79 (quint, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.09 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 2.25 (q, 2H, CH_2 , $J=6.9$ Hz), 2.30 (t, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 3.66 (s, 3H, CH_3O), 4.46 (m, 1H, $CHNH$), 5.23 (d, 1H, NH , $J=8.4$ Hz), 6.20 (d, 1H, $CH=CH$, $J=15.6$ Hz), 6.92 (dt, 1H, $CH=CH$, $J_1=6.9$ Hz, $J_2=15.6$ Hz). ^{13}C NMR (δ - $CDCl_3$): 16.75 (CH_3CH), 19.93 (CH_3CH), 23.19 (CH_2), 28.38 ($(CH_3)_3C$), 30.87 ($CH(CH_3)_2$), 31.83 (CH_2), 33.26 (CH_2), 51.69 (CH_3O), 62.15 ($CHNH$), 79.57 ($(CH_3)_3C$), 128.22 ($CH=CH$), 147.74 ($CH=CH$), 155.98 ($CONH$), 173.48 (CO_2CH_3), 198.29 (CO). MS m/z : 366 $[MK]^+$, 349 $[MNa]^+$, 345 $[MNH_4]^+$, 328 $[MH]^+$



(8S)-Acido-8-dibenzilammino-7-osso-9-fenil-non-5-enoico metil estere (71-Z)

Si ottengono 1.37 g di olio incolore (6%) secondo la metodologia generale, partendo da aldeide **56** (1.31 g, 10.1 mmol), fosfonato **70** (4.56 g, 10.1 mmol) e K_2CO_3 (1.39 g, 10.1 mmol) secondo la metodologia generale. $[\alpha]_D^{25} = -98.8$ ($c=0.68$, MeOH). IR (film liquido cm^{-1}): 1737, 1695 (C=O), 1628 (C=C). 1H NMR (δ - $CDCl_3$): 1.74 (quint, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.17 (q, 2H, CH_2 , $J=6.9$ Hz), 2.31 (t, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.96 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=4.0$ Hz, $J_2=13.5$ Hz), 3.19 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=9.2$ Hz, $J_2=13.5$ Hz), 3.61 (d, 2H, CH_2N , $J=13.5$ Hz), 3.69 (m, 4H, CHN e CH_3O), 3.76 (d, 2H, CH_2N , $J=13.5$ Hz), 6.14 (d, 1H, $CH=CH$, $J=16.8$ Hz), 6.61 (m, 1H, $CH=CH$), 7.28 (m, 15H, CH Ar). ^{13}C NMR (δ - $CDCl_3$): 23.08 (CH_2), 29.43 (CH_2Ph

β), 31.49 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 33.21 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 51.67 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$), 54.51 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 66.49 ($\underline{\text{C}}\text{HN}$), 125.88, 127.18, 128.27, 128.57, 128.99, 129.48 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$), 129.85 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 139.26, 139.53 ($\underline{\text{C Ar}}$), 145.39 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 173.48 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 198.09 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}$). **MS** m/z : 494 $[\text{MK}]^+$, 478 $[\text{MNa}]^+$, 456 $[\text{MH}]^+$.



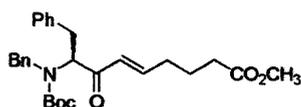
(8S)-Acido-8-*tert*-butossicarbonilamino-7-osso-9-fenil-non-5-enoico metil estere (58b)

Si ottengono 6.8 g (79%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da aldeide **56** (3.0 g, 23.1 mmol), fosfonato **57b** (8.58. 23.1 mmol) e K_2CO_3 (3.2 g, 23.1 mmol). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +0.77$ ($c=0.65$, MeOH). **IR** (KBr cm^{-1}): 3362 (NH), 1733, 1687, 1662 (C=O), 1618 (C=C). **$^1\text{H NMR}$** (δ - CDCl_3): 1.39 (s, 9H, ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_3\text{C}$), 1.73 (quint, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $J=7.3$ Hz), 2.20 (q, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $J=6.9$ Hz), 2.27 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $J=7.32$ Hz), 2.96 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$, $J_1=5.5$ Hz, $J_2=13.7$ Hz), 3.06 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$, $J_1=6.9$, Hz, $J_2=13.7$ Hz), 3.65 (s, 3H, CH_3O), 4.76 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 5.25 (d, 1H, NH , $J=7.7$ Hz), 6.10 (d, 1H, $\underline{\text{C}}\text{HCO}$, $J=15.7$ Hz), 6.83 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{HCH}_2$), 7.08 (d, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H Ar}$, $J=6.9$ Hz), 7.25 (m, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H Ar}$). **$^{13}\text{C NMR}$** (δ - CDCl_3): 23.11 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 28.38 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_3\text{C}$), 31.82 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 33.22 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 38.52 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 51.69 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$), 68.40 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 79.75 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_3\text{C}$), 126.93 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$), 127.91 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 128.49, 129.53 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$), 136.22 ($\underline{\text{C Ar}}$), 148.28 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 155.17 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$), 173.46 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_3$), 197.39 ($\underline{\text{C}}\text{O}$). **MS** m/z : 773 $[\text{2MNa}]^+$, 414 $[\text{MK}]^+$, 398 $[\text{MNa}]^+$, 393 $[\text{MNH}_4]^+$, 376 $[\text{MH}]^+$.

Procedura generale per la sintesi degli enoni (85, 109)

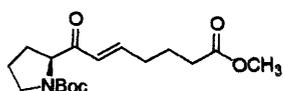
Ad una soluzione di fosfonato (12 mmol) in acetonitrile anidro (120 mL) si aggiungono nell'ordine: LiCl (12 mmol), seccato a 220 °C per 4h, aldeide **56** (10 mmol) e diaza-biciclo-undecene (DBU) (10 mmol). La miscela viene agitata per 16h a temperatura ambiente, neutralizzata con una soluzione acquosa di HCl al 10% e diluita con etile acetato (150 mL). La fase organica viene lavata con una soluzione satura di NaHCO_3 , una soluzione satura di NaCl e seccata su NaSO_4 anidro. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta e il residuo purificato mediante

cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela di dietil etere/etere di petrolio.



(8S)-Acido-8-(benzil-*tert*-butossicarbonil-ammino)-7-osso-9-fenil-non-5-enoico metil estere (85)

Si ottengono 3.29 g (74%) di un olio incolore secondo la metodologia generale partendo da fosfonato **84** (5.5 g, 11.9 mmol), aldeide **56** (1.3 g, 10 mmol), LiCl (500 mg, 11.9 mmol), DBU (1.48 mL, 10 mmol). $[\alpha]_D^{25} = -142.39$ ($c=0.46$, MeOH). IR (film liquido, cm^{-1}): 1737, 1696 (C=O), 1630 (C=C). $^1\text{H NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): coppia di rotameri 1.40 (bs, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.62 (m, 2H, CH_2), 2.03 (m, 2H, CH_2), 2.2 (t, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.95 (m, 1H, CH_2Ph), 3.25 (bs, 1H, CH_2Ph), 3.65 (s, 3H, CH_3O), [3.78 e 4.41 (d, 1H, CH_2N , $J=15$ Hz)], 3.88 (m, 1H, CHN), 4.73 (d, 1H, CH_2N , $J=15$ Hz), [5.75 e 5.92 (d, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J=14.9$ Hz)], 6.75 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.21 (m, 10H, Ar). $^{13}\text{C NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): coppia di rotameri 23.10 (CH_2), 28.32 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), [31.48 e 31.61 (CH_2)], 33.33 (CH_2), [34.24 e 34.92 ($\text{CH}_2\text{Ph } \beta$)], [50.02 e 64.03 (CH_2N)], 66.74 (CHN), [80.80 e 81.46 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$)], 126.19, 126.54, 127.34, 127.85, 128.13 (CH Ar), [128.46 e 128.67 ($\text{CH}=\text{CH}$)], 129.48 (CH Ar), 137.55, 138.92 (C Ar), [145.74 e 146.54 ($\text{CH}=\text{CH}$)], [155.20 e 156.15 (CON)], 173.48 (COCH_3), [195.69 e 196.80 (CO)]. MS m/z : 504 $[\text{MK}]^+$, 488 $[\text{MNa}]^+$, 466 $[\text{MH}]^+$, 410 $[\text{M-C}_4\text{H}_8]^+$, 366 $[\text{M-Boc}]^+$.



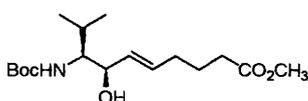
(2S)-Acido-2-(6-Metossicarbonil-es-2-enoil)-pirrolidin-1-carbossilico *tert*-butil estere (109)

Si ottengono 1.85g (55%) di un olio incolore secondo la metodologia generale partendo da fosfonato **108** (4.0 g, 12.49 mmol), aldeide **56** (1.34 g, 10.38 mmol), LiCl (523 mg, 12.46 mmol), DBU (1.55 mL, 10.38 mmol). $[\alpha]_D^{25} = -29.6$ ($c=0.58$, MeOH). IR (film liquido, cm^{-1}): 1737, 1697 (C=O). $^1\text{H NMR}$ ($\delta\text{-DMSO-d}_6$ 90 °C): 1.35 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.71-1.82 (m, 5H, CH_2 , HCHCH , CH_2), 2.19 (m, 1H, HCH), 2.25 (q, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.33 (t, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 3.39 (m, 2H, CH_2N), 3.61

(s, 3H, CH_3O), 4.36 (dd, 1H, CHN , $J_1=4.8$ Hz, $J_2=9.1$ Hz), 6.21 (d, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J=16.1$ Hz), 6.87 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$). ^{13}C NMR (δ -DMSO- d_6 90 °C): 23.55 (3x CH_2), 28.59 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 31.67 (CH_2), 33.26 (CH_2), 47.09 (CH_2N), 51.53 (CH_3O), 63.75 (CHN), 79.21 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 127.60 ($\text{CH}=\text{CH}$), 147.17 ($\text{CH}=\text{CH}$), 152.54 (CON), 173.29 (CO_2CH_3), 198.47 (CO). MS m/z : 364 $[\text{MK}]^+$, 348 $[\text{MNa}]^+$, 343 $[\text{MNH}_4]^+$, 326 $[\text{MH}]^+$.

Procedura generale per la riduzione degli enoni con NaBH_4

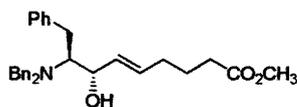
Sodio boroidruro (10 mmol) viene aggiunto, sotto agitazione, ad una soluzione di enone (10 mmol) in metanolo (100 mL) raffreddata a 0 °C. La reazione viene seguita mediante cromatografia su strato sottile (diethyl etere/etere di petrolio 1:1), una volta giunta a completezza la miscela viene neutralizzata con acido acetico glaciale ed il solvente rimosso mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo viene distribuito tra acetato d'etile ed una soluzione satura di NaHCO_3 , la fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (2x70 mL) e le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato mediante ricristallizzazione da di-*iso*-propil etere oppure per cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela etere etilico/etere di petrolio.



(8*S*,7*R*)-Acido-8-*tert*-butossicarbonilammino-7-idrossi-9-metil-dec-5-enoico metil estere (59a)

Si ottengono 2.9 g (90%) di olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da enone **58a** (3.27 g, 10 mmol) e NaBH_4 (378 mg, 10 mmol). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -18.41$ ($c=3.2$, MeOH). IR (KBr cm^{-1}): 3345 (OH e NH), 1738, 1679 (C=O). ^1H NMR (δ - CDCl_3): 0.92 (d, 3H, CH_3CH , $J=7.4$ Hz), 0.94 (d, 3H, CH_3CH , $J=7.4$ Hz), 1.42 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.70 (quint, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 1.75 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.07 (q, 2H, CH_2 , $J=6.6$ Hz), 2.29 (t, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.66 (bs, 1H, OH), 3.47 (m, 1H, CHOH), 3.65 (s, 3H, CH_3O), 4.16 (m, 1H, CHNH), 4.45 (d, 1H, NH, $J=9.5$ Hz),

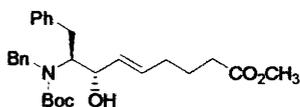
5.46 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$, $J_1=6.9$ Hz, $J_2=15.1$ Hz), 6.92 (dt, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$, $J_1=6.6$ Hz, $J_2=15.1$ Hz). ^{13}C NMR ($\delta\text{-CDCl}_3$): 18.56 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}$), 20.23 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}$), 24.35 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 28.41 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C}$), 29.15 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 31.73 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 33.43 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 51.58 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$), 60.69 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 73.52 ($\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 79.65 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C}$), 129.56 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 132.71 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 155.89 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$), 174.03 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_3$). **MS** m/z : 368 $[\text{MK}]^+$, 352 $[\text{MNa}]^+$, 330 $[\text{MH}]^+$.



(8S)-Acido-8-dibenzilammino-7-idrossi-9-fenil-non-5-enoico metil estere (72)

Si ottengono 2.3 g (82%) di olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da enone **71** (2.8 g, 6.15 mmol) e NaBH_4 (232 mg, 6.15 mmol) secondo la metodologia generale.

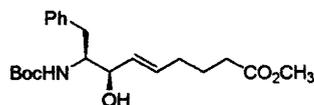
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +19.39$ ($c=0.66$, MeOH). **IR** (film liquido cm^{-1}): 3411 (OH), 1736 (C=O), 1601 (C=C). ^1H NMR ($\delta\text{-CDCl}_3$): 1.60 (quint, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$ $J=6.9$ Hz), 1.94 (q, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}$, $J=6.6$ Hz), 2.23 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$, $J=6.9$ Hz), 2.73 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$, $J_1=5.1$ Hz, $J_2=14.3$ Hz), 2.90 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{HN}$), 3.00 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$, $J_1=7.7$ Hz, $J_2=14.3$ Hz), 3.36 (d, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$, $J=13.2$ Hz), 3.63 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$), 3.87 (d, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$, $J=13.2$ Hz), 3.95 (t, 1H, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$, $J=8.4$ Hz), 4.45 (s, 1H, OH), 5.12 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$ $J_1=8.1$ Hz, $J_2=15.4$ Hz), 5.66 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 7.26 (m, 15H, $\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar). ^{13}C NMR ($\delta\text{-CDCl}_3$): 24.13 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 31.60 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 32.51 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$ β), 33.49 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 51.53 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$), 53.87 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 64.35 ($\underline{\text{C}}\text{HN}$), 72.51 ($\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 126.23, 127.36, 128.55, 129.21, 129.58 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar), 131.53 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 134.13 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 138.80, 140.55 ($\underline{\text{C}}$ Ar), 173.48 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 198.09 ($\underline{\text{C}}\text{O}$). **MS** m/z : 480 $[\text{MNa}]^+$, 458 $[\text{MH}]^+$.



(8S,7S)-Acido-8-(benzil-*tert*-butossicarbonil-ammino)-7-idrossi-9-fenil-non-5-enoico metil estere (86)

Si ottengono 2.16 g (80%) di olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da enone **85** (2.7 g, 5.8 mmol) e NaBH_4 (219 mg, 5.8 mmol) secondo la metodologia generale. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -39.61$ ($c=0.52$, MeOH). **IR**(film liquido cm^{-1}): 3367 (OH), 1737 (C=O), 1666 (C=C). ^1H NMR ($\delta\text{-CDCl}_3$): 1.46 (bs, 9H, $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C}$), 1.65 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.94 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.27 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $J=7.32$ Hz), 2.92 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$ β),

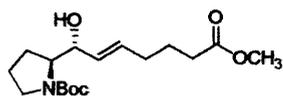
3.15 (m, 1H, CH_2Ph β), 3.66 (s, 3H, CH_3O), 3.86 (m, 1H, CHOH), 4.03 (m, 2H, CH_2N e CHN), 4.17 (d, 1H, CH_2N , $J=15.0$ Hz), 5.12 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.60 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.22 (m, 10H, CH Ar). ^{13}C NMR ($\delta\text{-CDCl}_3$): 24.46 (CH_2), 28.47 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 31.64 (CH_2), 33.50 (CH_2), 35.42 (CH_2Ph β), [51.54 e 51.64 (CH_3O) e (CH_2N)], 62.10 (bs CHN), 72.73 (CHOH), 80.94 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 126.35, 127.50, 128.48, (CH Ar), 129.40 ($\text{CH}=\text{CH}$), 131.87 ($\text{CH}=\text{CH}$), 138.08 e 139.07 (C Ar), 157.18 (CONH), 174.06 (COCH_3). MS m/z : 506 $[\text{MK}]^+$, 490 $[\text{MNa}]^+$, 468 $[\text{MH}]^+$.



(8S,7R)-Acido-8-*tert*-butossicarbonilammino-7-idrossi-9-fenil-non-5-enoico metil estere (59b)

Litio tri-*tert*-butossialuminoidruro (1.37 g, 5.4 mmol) viene sospeso in etanolo assoluto (30 mL) precedentemente raffreddato a -78 °C sotto atmosfera di argon. Una soluzione di enone **58b** (1.0 g, 2.7 mmol) in etanolo assoluto (40 mL) viene aggiunta alla sospensione in modo che la temperatura non superi i -60 °C. La reazione viene seguita mediante cromatografia su strato sottile (diethyl etere/etere 1:1), dopo due ore la miscela viene addizionata con una soluzione acquosa di acido citrico al 10% (16 mL), diluita con acqua (50 mL) ed estratta con acetato d'etile (3x50 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su NaSO_4 anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela 8:2 di etere etilico ed etere di petrolio. Si ottengono 977 mg (96%) di solido bianco. P.f. = $79\text{-}81$ °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -28.8$ ($c=0.5$, MeOH). IR (KBr cm^{-1}): 3355 (OH e NH), 3384 (NH), 1740, 1686 (C=O). ^1H NMR ($\delta\text{-CDCl}_3$): 1.36 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.74 (quint, 3H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.11 (q, 2H, CH_2 , $J=6.9$ Hz), 2.33 (t, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.72 (m, 1H, CH_2Ph), 2.82 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=5.5$ Hz, $J_2=13.9$ Hz), 2.88 (bs, 1H, OH), 3.66 (s, 3H, CH_3O), 3.94 (m, 1H, CHNH), 4.14 (m, 1H, CHOH), 4.57 (bs, 1H, NH), 5.54 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J_1=6.2$ Hz, $J_2=15.4$ Hz), 5.72 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.25 (m, 5H, CH Ar). ^{13}C NMR ($\delta\text{-CDCl}_3$): 24.33 (CH_2), 28.34 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 31.74 (CH_2), 33.43 (CH_2), 36.24 (CH_2Ph), 51.62 (CH_3O), 56.72 (CHNH), 74.53 (CHOH), 79.83 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 126.52, 128.54 (CH

Ar), 129.30 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 129.69 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$), 132.77 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 156.57 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$), 174.03 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_3$). **MS** m/z : 368 $[\text{MK}]^+$, 352 $[\text{MNa}]^+$, 330 $[\text{MH}]^+$.



(2S)-Acido-2-(1-idrossi-6-metossicarbonil-es-2-enil)-pirrolidin-1-carbossilico *tert*-butil estere (110)

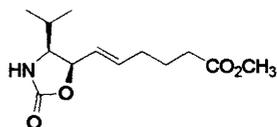
Ad una soluzione di enone **109** (500 mg, 1.53 mmol) in THF anidro (20 mL) raffreddata a $-78\text{ }^\circ\text{C}$, si aggiunge una soluzione di di-*iso*-butilalluminio idruro (DIBAL) 1.2 M in toluene (1.3 mL, 1.53 mmol). La reazione viene monitorata mediante cromatografia su strato sottile (diethyl etere/etere di petrolio 8:2) e mantenuta in agitazione fino a completezza. Si aggiunge una soluzione acquosa di acido L-tartarico al 5% (12 mL), la miscela viene agitata 4h a temperatura ambiente quindi filtrata su celite. La fase acquosa viene estratta con acetto d'etile (2x15 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela 8:2 di diethyl etere/etere di petrolio. Si ottengono 400 mg (80%) di un olio incolore.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -43.8$ ($c=0.5$, MeOH). **$^1\text{H NMR}$** (δ - CDCl_3): coppia di rotameri 1.26-1.38 (s, 9H, $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C}$), 1.58-1.89(m, 5H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 1.96-2.07 (m, 3H, $\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 2.27 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J=7.3$ Hz), 3.16 (bs, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}\underline{\text{H}}$), 3.43 (bs, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{N}$), 3.62 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{O}$), 4.0-4.06 (bs, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{N}}$), 5.38 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$, $J_1=5.8$ Hz, $J_2=15.7$ Hz), 5.63 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$). **$^{13}\text{C NMR}$** (δ - CDCl_3): coppia di rotameri 24.07 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 24.34 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 24.40 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), [28.29 e 28.47 ($(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3\text{C}$)], 31.77 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 33.40 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), [48.11 e 48.14 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{N}$)], 51.53 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{O}$), [62.89 e 64.32 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{N}}$)], 75.71 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}\underline{\text{H}}$), [80.14 e 80.23 ($(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3\text{C}$)], 129.28 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 132.1 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), [156.96 e 156.99 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\underline{\text{N}}$)] 174.03 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}_2\text{CH}_3$). **MS** m/z : 366 $[\text{MK}]^+$, 350 $[\text{MNa}]^+$, 328 $[\text{MH}]^+$.

Procedura generale per la sintesi di ossazolidinoni

NaH (60% sospensione in olio minerale) (1.3 mmol) viene aggiunto ad una soluzione di alcol allilico (0.25) in THF anidro (3 mL/mmol). La miscela viene agitata a temperatura ambiente e sotto atmosfera di argon per 16 ore, addizionata

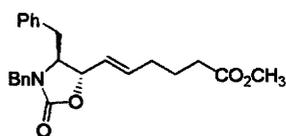
con una soluzione acquosa di NH_4Cl al 10% (3 mL) ed agitata per ulteriori 15 minuti. La fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (3x5 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. L'evaporazione del solvente a pressione ridotta fornisce un prodotto che viene purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando dieteletere come eluente.



(4S,2S)-Acido-6-(4-isopropil-2-osso-ossazolidin-5-il)-es-5-enoico metil estere (60a)

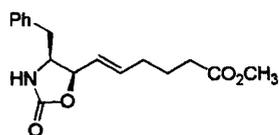
Si ottengono 58 mg (72%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **59a** (100 mg, 0.3 mmol) e NaH (60 mg, 1.5 mmol) secondo la procedura generale.

$^1\text{H NMR}$ (δ - CDCl_3): 0.85 (d, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $J=6.6$ Hz), 0.95 (d, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $J=6.6$ Hz), 1.77 (m, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.14 (q, 2H, CHCH_2 , $J=6.6$ Hz), 2.32 (t, 2H, CH_2CO , $J=7.32$ Hz), 3.55 (t, 1H, CHOH , $J=7.7$ Hz), 3.67 (s, 3H, CH_3O), 4.96 (t, 1H, CHNH , $J=7.7$ Hz), 5.29 (bs, 1H, NH), 5.62 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=15.4$ Hz), 5.84 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$).



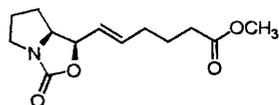
(4S,2R)-Acido-6-(3,4-dibenzil-2-osso-ossazolidin-5-il)-es-5-enoico metil estere (87)

Si ottengono 132 mg (75%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **86** (200 mg, 0.4 mmol) e NaH (48 mg, 2.0 mmol). $^1\text{H NMR}$ (δ - CDCl_3): 1.52 (m, 2H, CH_2), 1.90 (m, 2H, CH_2), 2.18 (t, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.66 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{Ph } \beta$, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=13.7$ Hz), 3.06 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{Ph } \beta$, $J_1=5.1$ Hz, $J_2=13.7$ Hz), 3.43 (m, 1H, CHNH), 4.05 (d, 1H, CH_2N , $J=15.0$ Hz), 4.84 (d, 1H, CH_2N , $J=15.0$ Hz), 4.51 (t, 1H, CHO , $J=6.2$ Hz), 5.12 (dd, 1H, CHCH , $J_1=6.9$ Hz, $J_2=15.4$ Hz), 5.40 (m, 1H, CHCH), 7.02 (d, 2H, CH Ar , $J=6.6$ Hz), 7.25 (m, 8H, CH Ar).



(4S,2R)-Acido-6-(4-benzil-2-osso-ossazolidin-5-il)-es-5-enoico metil estere (60b)

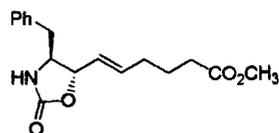
Si ottengono 55 mg (75%) di solido giallo secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **59b** (100 mg, 0.26 mmol) e NaH (32 mg, 1.3 mmol). P.f.= 92-94 °C. ¹H NMR (δ-CDCl₃): 1.78 (quint, 2H, CH₂, J=7.3 Hz); 2.19 (q, 2H, CH₂, J=6.9 Hz); 2.35 (t, 2H, CH₂, J=7.3 Hz); 2.63 (dd, 1H, CH₂Ph, J₁=10.9 Hz, J₂=13.6 Hz); 2.81 (dd, 1H, CH₂Ph, J₁=3.7 Hz, J₂=13.6 Hz), 3.66 (s, 3H, CH₃O), 4.01 (ddd, 1H, CHNH, J₁=3.7 Hz, J₂=7.7 Hz, J₃=10.9 Hz), 5.08 (t, 1H, CHO, J=7.7 Hz), 5.63 (dd, 1H, CH=CH, J₁=7.8 Hz, J₂=15.7 Hz); 5.89 (m, 1H, CH=CH), 7.15 (d, 2H, CH Ar, J=5.8 Hz), 7.26 (m, 3H, CH Ar).



(1S, 2R)-Acido-6-(3-osso-tetraidro-pirrolo[1,2-c]ossazol-1-il)-es-5-enoico metil estere (112)

Si ottengono 57 mg (76%) di un olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **110** (100 mg, 0.30 mmol) e NaH (37 mg, 1.5 mmol).

¹H NMR (δ-CDCl₃): 1.40-1.51 (m, 1H, HCH), 1.68-1.78 (m, 3H, CH₂, HCH), 1.81-1.92 (m, 1H, HCH), 2.01-2.10 (m, 1H, HCH), 2.15 (q, 2H, CH₂, J=6.9 Hz), 2.32 (t, 2H, CH₂, J=7.3 Hz), 3.19 (ddd, 1H, HCHN ring, J₁=6.2 Hz, J₂=9.9 Hz, J₃=15.7 Hz), 3.64 (m, 4H, CH₃O, HCHN), 3.82 (ddd, 1H, CHN, J₁=5.5 Hz, J₂=7.7 Hz, J₃=10.2 Hz), 5.05 (t, 1H, CHO, J=7.3 Hz), 5.47 (dd, 1H, CH=CH, J₁=7.3 Hz, J₂=15.4 Hz), 5.85 (m, 1H, CH=CH).

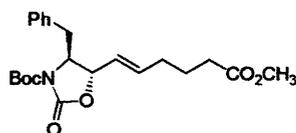


(4S,2S)-Acido-6-(4-benzil-2-osso-ossazolidin-5-il)-es-5-enoico metil estere (95)

Ad una soluzione di alcol allilico **59b** (2.6 g, 6.9 mmol) in 1,2 dicloroetano (50 mL), raffreddata a 0 °C si aggiungono, nell'ordine, trietilammia (2.9 mL, 20.7 mmol) e

metansolfonil cloruro (0.8 mL, 10.3 mmol) e la reazione viene seguita mediante cromatografia su strato sottile (dietil etere). La miscela viene agitata a 0 °C fino alla completa formazione del mesilato, quindi mantenuta a temperatura ambiente fino alla completa formazione del prodotto. La soluzione viene diluita con diclorometano (50 mL) e lavata con acqua fredda, una soluzione acquosa fredda di acido cloridrico al 10%, una soluzione satura di NaHCO₃, una soluzione satura di NaCl e seccata su Na₂SO₄ anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando dietil etere come eluente. Si ottengono 1.54 g (74%) di solido bianco.

P.f. = 115-117 °C. $[\alpha]_D^{25} = -62.8$ (c=0.25 MeOH). **¹H NMR** (δ -CDCl₃): 1.67 (quint, 3H, CH₂, J=7.3 Hz), 2.05 (q, 2H, CH₂, J=6.9 Hz), 2.26 (t, 2H, CH₂, J=7.3 Hz), 2.80 (dd, 1H, CH₂Ph, J₁=8.1 Hz, J₂=13.5 Hz), 2.87 (dd, 1H, CH₂Ph, J₁=5.5 Hz, J₂=13.5 Hz), 3.66 (s, 3H, CH₃O), 3.72 (q, 1H, CHNH, J=6.2 Hz), 4.62 (t, 1H, CHOH, J=6.9 Hz), 5.46 (dd, 1H, CH=CH, J₁=7.7 Hz, J₂=15.4 Hz), 5.51 (bs, 1H, NH) 5.69 (m, 1H, CH=CH), 7.15 (d, 2H, CH Ar, J=7.3 Hz), 7.26 (m, 3H, CH Ar). **¹³C NMR** (δ -CDCl₃): 23.86 (CH₂), 31.41 (CH₂), 33.26 (CH₂), 40.77 (CH₂Ph), 51.62 (CH₃O), 59.83 (CHNH), 82.51 (CHO), 126.35, 126.84, 127.30 (CH Ar), 129.13 (CH=CH), 135.71 (CH=CH), 136.06 (C Ar), 158.47 (CONH), 173.78 (CO₂CH₃).



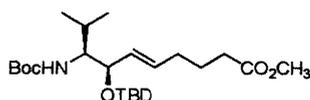
(4S,2S)-Acido-4-benzil-5-(5-metossicarbonil-pent-1-enil)-2-osso-ossazolidin-3-carbossilico *tert*-butil estere (96)

Sodio idruro (60% sospensione in olio minerale) viene aggiunto ad una soluzione di ossazolidinone **95** (1.4g, 4.6 mmol) in THF anidro (50 mL). Si agita per 2 ore a temperatura ambiente e si aggiunge di-*tert*-butil-dicarbonato (1.21 g, 5.5 mmol). La reazione viene seguita mediante cromatografia su strato sottile (dietil etere) ed una volta giunta a completezza si aggiunge un volume di una soluzione di acido citrico al 10%. Si estrae con acetato d'etile (2x50 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaHCO₃, una soluzione satura di NaCl e seccata su Na₂SO₄ anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed

il prodotto utilizzato senza ulteriori purificazioni. $^1\text{H NMR}$ (δ - CDCl_3): 1.51-1.57 (m, 11H, CH_2 e $(\text{CH}_3)\text{C}$), 1.93 (q, 2H, CH_2 , $J=6.9$ Hz), 2.18 (t, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 2.80 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=9.5$ Hz, $J_2=13.5$ Hz), 3.31 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.5$ Hz), 3.63 (s, 3H, CH_3O), 4.11 (m, 1H, CHNH , $J=6.2$ Hz), 4.55 (dd, 1H, CHO , $J_1=2.9$ Hz, $J_2=6.6$ Hz), 5.28 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J_1=7.7$ Hz, $J_2=15.4$ Hz), 5.45 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.15 (d, 2H, CH Ar , $J=7.3$ Hz), 7.26 (m, 3H, CH Ar).

Procedura generale per la protezione di alcoli allilici come TBDS

Ad una soluzione di alcol allilico (6 mmol) in DMF anidra (60 mL) si aggiungono *tert*-butil-di-metilsilil cloruro (15 mmol) e imidazolo (30 mmol). Dopo 16 ore di agitazione a temperatura ambiente si aggiunge metanolo (10 mL) e si agita per ulteriori 20 minuti. La miscela viene diluita con acqua ed estratta con acetato d'etile (3x30 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto ottenuto viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

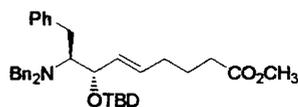


(8S,7R)-Acido-8-*tert*-butossicarbonilammino-7-(*tert*-butil-dimetil-silanilossi)-9-metil-dec-5-enoico metil estere (61a)

Si ottengono 1.33 g (80%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **59a** (1.24g, 3.75 mmol), *tert*-butildimetilsili cloruro (1.41 g, 9.4 mmol) e imidazolo (1.27 g, 18.8 mmol).

IR (film cm^{-1}): 3375 (NH), 1745 (C=O). $^1\text{H NMR}$ (δ - CDCl_3): 0.01 (m, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.87 (m, 15H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ e $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$), 1.41 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.69 (quint, 2H, CH_2 $J_1=7.3$ Hz) 1.91 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.05 (q, 2H, CH_2 , $J_1=6.9$ Hz), 2.31 (t, 2H, CH_2CO , $J=7.3$ Hz), 3.42 (m, 1H, CHNH), 3.65 (s, 3H, CH_3O), 4.09 (t, 1H, CHOSi , $J=6.2$ Hz), 4.45 (d, 1H, NH , $J=10.6$ Hz), 5.42 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J_1=6.6$ Hz, $J_2=15.4$ Hz), 5.58 (dt, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J_1=6.9$ Hz, $J_2=15.4$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (δ - CDCl_3): -5.00 (CH_3Si), -4.09 (CH_3Si), 17.30 (CSi), 18.16 (CH_3CH), 20.88 (CH_3CH), 24.50 (CH_2), 25.88 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 27.86 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 28.47 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 31.63 (CH_2), 33.47

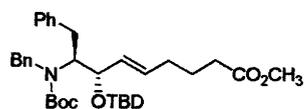
($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 51.58 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{O}$), 59.37 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$), 74.64 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{OSi}$), 78.79 ($(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3\underline{\text{C}}$), 131.35 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 131.30 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 156.09 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$), 174.03 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$). **MS** m/z : 482 $[\text{MK}]^+$, 466 $[\text{MNa}]^+$, 444 $[\text{MH}]^+$.



(7S,8R)-Acido-7-(*tert*-butil-dimetil-silanilossi)-8-dibenzilammino-9-fenil-non-5-enoico metil estere (76)

Si ottengono 2.67 g (98%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **75** (2.18 g, 4.77 mmol), *tert*-butildimetilsili cloruro (2.16 g, 14.3 mmol) e imidazolo (1.94 g, 28.6 mmol).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -36.47$ ($c=0.85$, MeOH). **IR** (film cm^{-1}): 1712 (C=O). **$^1\text{H NMR}$** (δ - CDCl_3): 0.10 (s, 3H, ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) $_2$ Si), 0.88 (s, 9H, ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) $_3$ Si), 1.66 (quint, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J=7.3$ Hz), 2.04 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 2.30 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J=7.3$ Hz), 2.95 (m, 3H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ Ph e $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{OSi}$), 3.55 (d, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ N, $J=13.5$ Hz), 3.67 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{O}$), 4.11 (m, 3H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ N e $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{N}}$), 5.34 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 5.77 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 7.25 (m, 15H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ Ar). **$^{13}\text{C NMR}$** (δ - CDCl_3): -4.78 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ Si), -3.48 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ Si), 18.23 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{S}}\underline{\text{i}}$), 26.10 ($(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3\underline{\text{S}}\underline{\text{i}}$), 24.41 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 25.76 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 31.90 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ Ph β), 33.69 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 51.56 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{O}$), 55.47 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ N), 64.52 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{N}}$), 76.18 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{OSi}$), 125.76, 126.62, 128.03, 128.27, 128.89, 129.54 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ Ar), 130.18 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 133.64 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 140.75, 141.30 ($\underline{\text{C}}$ Ar), 174.05 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$). **MS** m/z : 597 $[\text{MNa}]^+$, 574 $[\text{MH}]^+$.

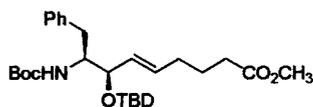


(8S,7S)-Acido-8-(benzil-*tert*-butossicarbonil-ammino)-7-(*tert*-butil-dimetil-silanilossi)-9-fenil-non-5-enoico metil estere (90)

Si ottengono 2.9 g (79%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **86** (3.0 g, 6.4 mmol), *tert*-butildimetilsili cloruro (2.4 g, 16.1 mmol) e imidazolo (2.17 g, 18.8 mmol) secondo la metodologia generale.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -29.61$ ($c=0.52$, MeOH). **IR** (film cm^{-1}): 1741, 1692 (C=O) **$^1\text{H NMR}$** (δ - CDCl_3): 0.02 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ Si), 0.05 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ Si), 0.92 (s, 9H, ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) $_3$ CSi), 1.33 (s, 9H, ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) $_3$ C), 1.69 (quint, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J=7.3$ Hz), 2.04 (q, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J=6.9$ Hz), 2.30 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J=7.3$ Hz), 2.79 (bs, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ Ph), 3.66 (m, 4H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{O}$, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{N}}$), 4.25 (bs,

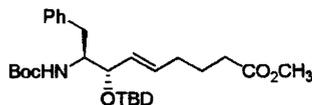
1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{OSi}$), 4.58 (d, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{N}$), 5.42 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 5.62 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 6.80-7.10 (m, 10H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ Ar). ^{13}C NMR (δ -CDCl₃): -4.63, -3.73 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{Si}$), 18.16 ($\underline{\text{C}}\text{Si}$), 24.30 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 26.05 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 28.39($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 31.68 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 33.58 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 35.65 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$ β), [51.55 e 51.58 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{N}$ e $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{O}$)], 56.60 (bs $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{N}$), 75.44 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{OSi}$), 79.40 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 126.21, 126.46, 127.44, 127.75, 127.93, 128.11, 129.09, 129.18, 129.25, 131.92, 132.57 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 139.27, 139.52 ($\underline{\text{C}}$ Ar), 156.70 ($\underline{\text{C}}\text{ON}$), 173.98 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$). MS m/z : 620 [MK]⁺, 604 [MNa]⁺, 582 [MH]⁺.



(8S,7R)-Acido-8-*tert*-butossicarbonilammino-7-(*tert*-butil-dimetil-silanilossi)-9-fenil-non-5-enoico metil estere (61b)

Si ottengono 1.8 g (85%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **59b** (1.66 g, 4.4 mmol), *tert*-butildimetilsili cloruro (1.65 g, 11 mmol) e imidazolo (1.49 g, 22.0 mmol).

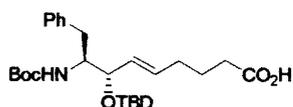
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -30.33$ ($c=1.5$ MeOH). IR (film liquido, cm^{-1}): 3385 (NH), 1740, 1712 (C=O). ^1H NMR (δ -CDCl₃): 0.04 (m, 6H, ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$)₂Si), 0.91 (m, 9H, ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$)₃CSi), 1.34 (s, 9H, ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$)₃C), 1.71 (quint, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ $J_1=7.3$), 2.07 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 2.31 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J=7.3$ Hz), 2.65 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 2.89 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$, $J_1=4.8$ Hz, 14.6 Hz), 3.66 (s, 3H, CH₃O), 3.82 (bs, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{NH}$), 4.27 (bs, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{OSi}$), 4.49 (d, 1H, NH, $J=8.4$ Hz), 5.47 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{CHO}$, $J_1=6.2$ Hz, $J_2=15.4$ Hz), 5.65 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 7.26 (m, 5H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ Ar). ^{13}C NMR (δ -CDCl₃): -4.88 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{Si}$), -4.18 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{Si}$), 18.24 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 24.42 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 25.96 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 28.39 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 31.62 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 33.39 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 35.00 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 51.54 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3\text{O}$), 56.70 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{NH}$), 74.66 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{OSi}$), 79.50 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 126.12, 128.31, 129.24 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ Ar), 131.10 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 131.38 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 138.83 ($\underline{\text{C}}$ Ar), 155.42 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$), 173.96 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_3$). MS m/z : 530[MK]⁺, 514[MNa]⁺, 509[MNH₄]⁺, 492[MH]⁺.



(8S,7S)-Acido-8-*tert*-butossicarbonilammino-7-idrossi-9-fenil-non-5-enoico metil estere

L'ossazolidinone **96** (505 mg, 1.25 mmol) viene sciolto in una miscela 4:1 metanolo e acqua (15 mL), si aggiunge K₂CO₃ (345 mg, 2.5 mmol) e si agita la miscela per 16 ore a temperatura ambiente. Si neutralizza con acido acetico glaciale e si concentra la soluzione ad 1/5 del volume. La soluzione viene estratta con acetato d'etile (2x20 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccata su Na₂SO₄ anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela 1:1 di etere etilico ed etere di petrolio. Si ottengono 380 mg (81%) di solido bianco.

P.f. = 84-85 °C. $[\alpha]_D^{25} = -40.4$ (c=0.5 MeOH). **¹H NMR** (δ-CDCl₃): 1.37 (s, 9H, (CH₃)₃C), 1.68 (quint, 3H, CH₂, J=7.3 Hz), 2.05 (q, 2H, CH₂, J=6.9 Hz), 2.27 (t, 2H, CH₂, J=7.3 Hz), 2.83 (m, 1H, CH₂Ph), 2.89 (dd, 1H, CH₂Ph, J₁=7.3 Hz, J₂= 13.5 Hz), 3.63 (s, 3H, CH₃O), 3.74 (m, 1H, CHNH), 4.04 (m, 1H, CHOH), 4.83 (d, 1H, NH, J=8.4 Hz), 5.51 (dd, 1H, CH=CH, J₁=6.2 Hz, J₂=15.7 Hz), 5.65 (m, 1H, CH=CH), 7.25 (m, 5H, CH Ar). **¹³C NMR** (δ-CDCl₃): 24.27 (CH₂), 28.37 ((CH₃)₃C), 29.76 (CH₂), 33.39 (CH₂), 38.03 (CH₂Ph), 51.56 (CH₃O), 56.27 (CHNH), 72.53 (CHOH), 79.43 ((CH₃)₃C), 126.39, 128.54 (CH Ar), 129.32 (CH=CH), 129.41 (CH Ar), 131.93 (CH=CH), 132.70 (C Ar), 156.17 (CONH), 174.08 (CO₂CH₃). **MS** *m/z*: 368 [MK]⁺, 352 [MNa]⁺, 330 [MH]⁺.



(8S,7R)-Acido-8-*tert*-butossicarbonilammino-7-idrossi-9-fenil-non-5-enoico (99)

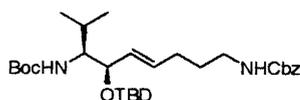
L'ossazolidinone **96** (2.1 g, 5.2 mmol) viene sciolto in una miscela 4:1 metanolo e acqua (50 mL), si aggiunge K₂CO₃ (2.15 g, 15.6 mmol) e si agita la miscela per 16 ore a temperatura ambiente. Si neutralizza con acido acetico glaciale e si concentra la soluzione ad 1/5 del volume. La soluzione viene estratta con acetato d'etile (2x30

mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccata su Na₂SO₄ anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta. Il prodotto grezzo viene sciolto in DMF anidra (20 mL) ed alla soluzione si aggiungono *tert*-butildimetilsilil cloruro (4.15 g, 27.5 mmol) e imidazolo (3.74 g, 55 mmol). La miscela viene agitata per 16h, si aggiunge metanolo (10 mL) e si prosegue l'agitazione per ulteriori 15 minuti. La miscela viene quindi diluita con acqua (30 mL) ed estratta con acetato d'etile (3x25 mL). La fase acquosa viene acidificata a pH=3 con una soluzione acquosa di HCL al 10% ed estratta con etile acetato (2x25 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su NaSO₄ anidro. Dopo aver eliminato il solvente a pressione ridotta il residuo viene sciolto in THF (20 mL) ed alla soluzione così ottenuta si aggiunge una soluzione acquosa di LiOH 0.5N (20 mL). La miscela viene agitata per 16h, acidificata a pH=3 con una soluzione acquosa di HCl al 10% ed estratta con etile acetato (3x25 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su NaSO₄ anidro. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela 8:2 di etere etilico/etere di petrolio. Si ottengono 1.86 g (75%) di olio incolore.

[α]_D²⁵ = -33.84 (c=0.52 MeOH). **¹H NMR** (δ -CD₃CN, 60 °C): -0.09 (s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.11 (s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.94 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 1.31 (s, 9H, (CH₃)₃C), 1.69 (quint, 2H, CH₂ J₁=7.3), 2.09 (q, 2H, CH₂, J=6.6 Hz), 2.29 (t, 2H, CH₂, J=7.3 Hz), 2.55 (t, 1H, CH₂Ph, J=11.4 Hz), 2.93 (dd, 1H, CH₂Ph, J₁=4.4 Hz, J₂=13.9 Hz), 3.75 (m, 1H, CHNH), 4.20 (dd, 1H, CHOSi, J₁=3.7 Hz, J₂=6.6 Hz), 5.02 (d, 1H, NH, J=6.9 Hz), 5.55 (dd, 1H, CH=CH, J₁=6.6 Hz, J₂=15.4 Hz), 5.61 (m, 1H, CH=CH), 7.25 (m, 5H, CH Ar), 7.57 (s, 1H, COOH). **¹³C NMR** (δ -CD₃CN, 60 °C): -5.33, -4.67 ((CH₃)₂Si), 17.92 ((CH₃)₃CSi), 24.19 (CH₂), 25.48 ((CH₃)₃CSi), 27.72 ((CH₃)₃C), 31.26 (CH₂), 32.78 (CH₂), 36.90 (CH₂Ph), 59.36 (CHNH), 74.75 (CHOSi), 78.29 ((CH₃)₃C), 126.01, 128.20, 129.20 (CH Ar), 130.94 (CH=CH), 131.85 (C Ar), 139.66 (CH=CH), 155.62 (CONH), 174.28 (CO₂H). **MS** *m/z*: 516 [MK]⁺, 500 [MNa]⁺, 478 [MH]⁺.

Procedura generale per la reazione di riarrangiamento di Curtius

Ad una soluzione di alcol allilico protetto (4 mmol) in THF (25 mL) si aggiunge una soluzione acquosa di litio idrossido 0.5N (25 mL). Dopo aver agitato la miscela a temperatura ambiente per 16 ore si acidifica fino a pH 4 con una soluzione di acido cloridrico al 10% e si estrae con acetato d'etile (3x25 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con acqua, una soluzione satura di NaCl e seccate su Na₂SO₄ anidro. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo (4 mmol) viene sciolto in toluene anidro (100 mL) e addizionato con difenil fosforilazidato (4.8 mmol) e trietilammina (4.8 mmol). La miscela viene scaldata a riflusso, dopo 2 ore si aggiunge alcol benzilico (8 mmol) e si mantiene il riflusso per 16 ore. Dopo aver raffreddato a temperatura ambiente il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo distribuito tra acetato d'etile ed una soluzione satura di NaHCO₃. La fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (2x30 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na₂SO₄ anidro. Il solvente si allontana a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando una miscela 4:6 di etile acetato/etere di petrolio.

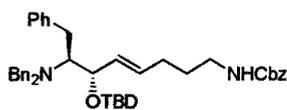


(7S,6R)-Acido-[7-*tert*-butossicarbonilammino-6-(*tert*-butil-dimetil-silanilossi)-8-metil-non-4-enil]-carbammico benzil estere (63a)

Si ottengono 951 mg (66%) di un olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da acido **62a** (1.2 g, 2.7 mmol), difenilfosforazidato (0.61 mL, 2.8 mmol), trietilammina (0.39 mL, 2.8 mmol) e alcol benzilico (0.5 mL, 5.4 mmol).

$[\alpha]_D^{25} = -26.17$ ($c=0.55$, MeOH). IR (film liquido, cm⁻¹): 3341 (NH), 1692 (C=O). ¹H NMR (δ -CDCl₃): -0.03 (s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.01 (s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.86 (m, 15H, (CH₃)₂CH e (CH₃)₃CSi), 1.40 (s, 9H, (CH₃)₃C), 1.57 (m, 2H, CH₂), 1.96 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.03 (m, 2H, CH₂), 3.17 (m, 2H, CH₂NH), 3.41 (m, 1H, CHNH), 4.08 (m, 1H, CHOSi), 4.50 (d, 1H, CHNH, J=9.5 Hz), 4.77 (bs, 1H, CH₂NH), 5.07 (s, 2H, CH₂Ph), 5.41 (dd, 1H, CH=CH, J₁=6.2 Hz, J₂=15.4 Hz), 5.59 (m, 1H, CH=CH), 7.33 (m, 5H, CH Ar). ¹³C NMR (δ -CDCl₃): -4.97, -4.02 (Si(CH₃)₂), 17.19

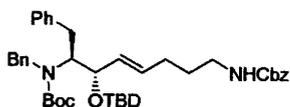
(CSi), 18.16 (CH₃), 20.84 (CH₃) 25.89 (SiC(CH₃)₃), 27.81 (CH(CH₃)₂), 28.49 (C(CH₃)₃), 29.45 (CH₂), 29.51 (CH₂), 40.64 (CH₂Ph β), 59.46 (CHNH), 66.68 (CH₂Ph), 74.61 (CHOSi), 78.82 (C(CH₃)₃), 128.05, 128.17, 128.20 (CH Ar), 128.58, 131.30 (CH=CH), 136.68 (C Ar), 156.11, 156.41 (CONH). MS m/z 573 [MK]⁺, 557 [MNa]⁺, 535 [MH]⁺.



(6R,7S)-Acido-[6-(*tert*-butil-dimetil-silanilossi)-7-dibenzilammino-8-fenil-oct-4-enil]-carbammico benzil estere (77)

Si ottengono 1.71 g (63%) di un olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da acido **76** (2.3 g, 4.11 mmol), difenilfosforazidato (1.06 mL, 4.9 mmol), trietilammina (0.7 mL, 4.9 mmol) e alcol benzilico (0.85 mL, 8.22 mmol).

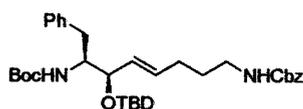
[α]_D²⁵ = -35.20 (c=0.50, MeOH). IR (film cm⁻¹): 3341 (NH), 1692 (C=O). ¹H NMR (δ -CDCl₃): -0.05 (s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.85 (s, 9H, (CH₃)₃Si), 1.49 (m, 2H, CH₂), 2.01 (m, 2H, CH₂), 2.86 (m, 1H, CH₂Ph), 2.95 (m, 1H, CH₂Ph), 3.15 (m, 1H, CHN), 3.52 (d, 2H, CH₂N, J=13.5 Hz), 4.05-4.11 (m, 3H, CHOSi e CH₂N), 4.67 (bs, 1H, NH), 5.1 (s, 2H, CH₂Ph), 5.33 (m, 1H, CH=CH), 5.74 (m, 1H, CH=CH), 7.26 (m, 20H, CH Ar). ¹³C NMR (δ -CDCl₃): -4.80 (CH₃Si), -3.42 (CH₃Si), 18.21 (CSi), 26.08 ((CH₃)₃Si), 29.51 (CH₂), 29.54 (CH₂), 31.87 (CH₂Ph β), 40.84 (CH₂NH), 55.48 (CH₂N), 64.52 (CHN), 66.71 (CH₂Ph), 76.20 (CHOSi), 125.76, 126.62, 128.02, 128.27, 128.19, 128.28, 128.44, 128.60, 128.68, 128.89, 129.51, 130.13 (CH Ar), 133.42 (CH=CH), 136.70 (CH=CH), 140.76, 141.31 (C Ar), 156.40 (CONH). MS m/z 697 [MNa]⁺, 664 [MH]⁺.



(7S,6S)-Acido-[7-(benzil-*tert*-butossicarbonil-ammino)-6-(*tert*-butil-dimetil-silanilossi)-8-fenil-oct-4-enil]-carbammico benzil estere (90)

Si ottengono 1.52 mg (65%) di un olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da estere **89** (2.0 g, 3.5 mmol), difenilfosforazidato (0.9 mL, 4.3 mmol), trietilammina (0.6 mL, 4.3 mmol) e alcol benzilico (0.7 mL, 7.0 mmol).

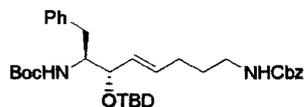
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20.4$ ($c=0.5$, MeOH). IR (film cm^{-1}): 3347 (NH), 1692 (C=O). $^1\text{H NMR}$ (δ -DMSO- d_6 70 °C): -0.01 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.05 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.89 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 1.27 (bs, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CH}$), 1.49 (quint, 2H, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 1.98 (q, 2H, CH_2 , $J=6.9$ Hz), 2.50 (m, 1H, CH_2Ph), 2.80 (m, 1H, CH_2Ph), 3.02 (q, 2H, CH_2NH , $J=7.3$ Hz), 4.12 (bs, 2H, CHNH), 4.41 (bs, 2H, CHOSi e NH), 5.02 (s, 2H, CH_2Ph), 5.42 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.63 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6.98-7.41 (m, 15H, CH Ar). $^{13}\text{C NMR}$ (δ -DMSO- d_6 70 °C): -4.67, -3.67 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 18.17 (CSi), 26.03 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 28.36 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.47 (CH_2), 29.56 (CH_2), 35.71 ($\text{CH}_2\text{Ph } \beta$), 40.68 (CH_2NH), 60.47 (CHN), 66.61 (CH_2Ph), 66.8 (CH_2N), 75.57 (CHOSi), 79.50 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 125.92, 126.21, 126.45, 127.22, 127.94, 128.15, 128.21, 128.57, 129.08 (CH Ar), 129.30, 131.86 ($2 \times \text{CH}=\text{CH}$), 136.79, 139.10, 140.63 (C Ar), 156.47, 156.75 (CONH). MS m/z 711 $[\text{MK}]^+$, 695 $[\text{MNa}]^+$, 690 $[\text{MNH}_4]^+$, 673 $[\text{MH}]^+$.



(7S,6R)-Acido-[7-*tert*-butossicarbonilammino-6-(*tert*-butil-dimetil-silanilossi)-8-fenil-oct-4-enil]-carbammico benzil estere (63b)

Si ottengono 1.5 g (68%) di un olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da acido **62b** (1.8 g, 3.8 mmol), difenilfosforazidato (1.0 mL, 4.5 mmol), trietilammina (0.62 mL, 4.5 mmol) e alcol benzilico (0.8 mL, 0.76 mmol).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -23.0$ ($c=0.5$, MeOH). IR (KBR cm^{-1}): 3342 (NH), 1691 (C=O). $^1\text{H NMR}$ (δ - CDCl_3): -0.01 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), -0.02 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.90 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 1.33 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.57 (m, 2H, CH_2), 2.03 (m, 2H, CH_2), 2.64 (m, 1H, CH_2Ph), 2.88 (dd, 1H, CH_2Ph $J_1=5.1$ Hz, $J_2=14.3$ Hz), 3.18 (m, 2H, CH_2NH), 3.81 (bs, 1H, CHNH), 4.23 (bs, 1H, CHOSi), 4.51 (bs, 1H, CHNH), 4.72 (bs, 1H, CH_2NH), 5.05 (s, 2H, CH_2Ph), 5.44 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J_1=15.0$ Hz, $J_2=5.8$ Hz), 5.63 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.33 (m, 10H, CH Ar). $^{13}\text{C NMR}$ (δ - CDCl_3): -4.86, -4.16 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 18.24 (CSi), 25.96 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 28.40 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.44 (CH_2), 29.61 (CH_2), 35.27 ($\text{CH}_2\text{Ph } \beta$), 40.63 (CH_2NH), 56.79 (CHNH), 66.68 (CH_2Ph), 74.86 (CHOSi), 79.03 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 120.13, 128.13, 128.31, 128.55, 129.28, 129.79 (CH Ar), 130.99 ($\text{CH}=\text{CH}$), 131.04 ($\text{CH}=\text{CH}$), 136.76, 138.91 (C Ar), 155.42, 156.43 (CONH). MS m/z 621 $[\text{MK}]^+$, 605 $[\text{MNa}]^+$, 583 $[\text{MH}]^+$.



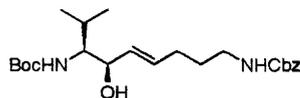
(7S,6S)-Acido-(7-*tert*-butossicarbonilammino-6-idrossi-8-fenil-oct-4-enil)-carbammico benzil estere (101)

Si ottengono 1.57 g (66%) di un olio giallo secondo la metodologia generale, partendo da acido **99** (1.95 g, 4.1 mmol), difenilfosforazidato (1.05 mL, 4.9 mmol), trietilammina (0.68 mL, 4.9 mmol) e alcol benzilico (0.85 mL, 8.2 mmol).

$[\alpha]_D^{25} = -30$ ($c=0.8$ MeOH). IR (KBR cm^{-1}): 3342 (NH), 1691 (C=O). $^1\text{H NMR}$ ($\delta\text{-CD}_3\text{CN}$, 60 °C): -0.03 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.11 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.94 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 1.32 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.58 (m, 2H, CH_2), 2.06 (q, 2H, CH_2 , $J=6.9$ Hz), 2.56 (t, 1H, CH_2Ph , $J=13.9$ Hz), 2.93 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=4.4$ Hz, $J_2=14.3$ Hz), 3.14 (m, 2H, CH_2NH), 3.74 (m, 1H, CHNH), 4.20 (dd, 1H, CHOSi , $J_1=3.7$ Hz, $J_2=6.6$ Hz), 4.59 (d, 1H, NH , $J=5.8$ Hz), 5.08 (s, 2H, CH_2Ph), 5.29 (d, 1H, NH , $J=9.2$ Hz), 5.50 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J_1=6.9$ Hz, $J_2=15.7$ Hz), 5.64 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.25 (m, 5H, CH Ar). $^{13}\text{C NMR}$ ($\delta\text{-CD}_3\text{CN}$, 60 °C): -5.36, -4.70 ($(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 17.90 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 25.46 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 28.98 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 28.98 (CH_2), 29.16 (CH_2), 36.42 (CH_2Ph), 40.13 (CH_2NH), 57.36 (CHNH), 65.85 (CH_2Ph), 74.77 (CHOSi), 79.93 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 120.10, 127.67, 128.19, 128.44, 129.21, 129.96 (CH Ar), 130.73, 131.92 ($\text{CH}=\text{CH}$), 137.72, 139.84 (C Ar), 155.57, 156.51 (CONH). MS m/z : 621 $[\text{MK}]^+$, 605 $[\text{MNa}]^+$, 583 $[\text{MH}]^+$.

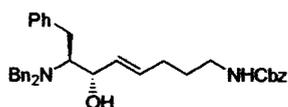
Procedura generale per la deprotezione del TBD alcol

Ad una soluzione di alcol allilico protetto (4 mmol) in THF anidro (30 mL) si aggiunge una soluzione di tetrabutyl ammoniofluoruro (TBAF) 1M in THF (24 mmol). La miscela viene agitata a temperatura ambiente per 16 ore; il solvente viene allontanato a pressione ridotta, il residuo diluito con acqua ed estratto con acetato d'etile (3x40 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su Na_2SO_4 anidro. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il prodotto purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando acetato d'etile ed etere di petrolio (gradiente da 3:7 a 1:1) come eluente.



(7S,6R)-Acido-(7-*tert*-butossicarbonilammino-6-idrossi-8-metil-non-4-enil)-carbammico benzil estere (64a)

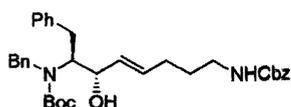
Si ottengono 506 mg (92%) di un solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da alcol protetto **63a** (700 mg, 1.31 mmol) e tetrabutylammonio fluoruro 1M in THF (6 mL, 6.0 mmol). **P.f.**=80-81 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -19.83$ ($c=0.57$, MeOH). **IR** (film cm^{-1}): 3452 (OH), 3383 (NH), 1712 (C=O). **$^1\text{H NMR}$** ($\delta\text{-CDCl}_3$): 0.93 (m, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1.41 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.58 (quint, 2H, CH_2 , $J=6.9$ Hz), 1.74 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.09 (m, 2H, CH_2), 2.84 (bs, 1H, OH), 3.18 (m, 2H, CH_2NH), 3.48 (m, 1H, CHNH), 4.13 (m, 1H, CHOH), 4.80 (bs, 2H, $2\times\text{NHCO}$), 5.08 (s, 2H, CH_2Ph), 5.44 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J_1=6.6$ Hz, $J_2=15.4$ Hz), 5.65 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.34 (m, 5H, CH Ar). **$^{13}\text{C NMR}$** ($\delta\text{-CDCl}_3$): 18.56 (CH_3), 20.14 (CH_3), 28.33 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_3$), 28.84 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 29.08 (CH_2), 29.19 (CH_2), 39.97 (CH_2NH_2), 60.82 (CHNH), 66.58 (CH_2Ph), 73.44 (CHOH), 79.43 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 126.30, 128.05, 128.46, (CH Ar), 129.77 ($\text{CH}=\text{CH}$), 132.07 ($\text{CH}=\text{CH}$), 136.54 (C Ar), 156.34, 157.36 (CONH). **MS** m/z : 459 $[\text{MK}]^+$, 443 $[\text{MNa}]^+$, 421 $[\text{MH}]^+$.



(6R,7S)-Acido-(7-dibenzilammino-6-idrossi-8-fenil-oct-4-enil)-carbammico benzil estere (78)

Si ottengono 1.12 g (87%) di un olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol protetto **77** (1.57 mg, 2.35 mmol) e tetrabutylammonio fluoruro 1M in THF (11 mL, 10.81 mmol).

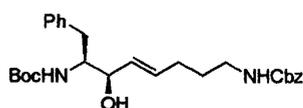
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -66.17$ ($c=0.47$, MeOH). **IR** (film cm^{-1}): 3452 (OH), 3339 (NH), 1713 (C=O). **$^1\text{H NMR}$** ($\delta\text{-CDCl}_3$): 1.45 (m, 2H, CH_2), 1.91 (m, 2H, CH_2), 2.71 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=5.1$ Hz, $J_2=14.3$), 2.9 (m, 1H, CHOH), 3.00 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=7.3$ Hz, $J_2=14.3$), 3.18 (m, 2H, CH_2NH), 3.84 (d, 2H, CH_2N , $J=13.5$ Hz), 3.95 (m, 1H, CHN), 4.46 (bs, 1H, OH), 4.77 (bs, 1H, NH), 5.05 (m, 3H, CH_2Ph e $\text{CH}=\text{CH}$), 5.66 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.30 (m, 20H, CH Ar).



(7S,6S)-Acido-[7-(benzil-*tert*-butossicarbonil-ammino)-6-idrossi-8-fenil-oct-4-enil]-carbammico benzil estere (91)

Si ottengono 715 mg (56%) di un olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol protetto **90** (1.52 g, 2.26 mmol) e tetrabutylammonio fluoruro 1M in THF (10.4 mL, 10.4 mmol).

$[\alpha]_{D}^{25} = -34.7$ ($c=0.51$, MeOH). IR (film cm^{-1}): 3454 (OH), 3343 (NH), 1711 (C=O). $^1\text{H NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): 1.45 (bs, 11H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ e CH_2), 1.92 (bs, 2H, CH_2), 2.94 (m, 1H, CH_2Ph), 3.14 (m, 3H, CH_2NH e CH_2Ph), 3.30-3.43 (bs, 1H, CHNH), 3.87 (bs, 1H, CH_2N), 4.04 (bs, 1H, CHOH), 4.21 (d, 1H, CH_2N , $J=15.4$ Hz), 4.84 (bs, 1H, NH), 5.09 (bs, 3H, CH_2Ph e $\text{CH}=\text{CH}$), 5.60 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.25 (m, 10H, CH Ar). $^{13}\text{C NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): 28.49 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 28.65 (CH_2), 29.49 (CH_2), 35.44 ($\text{CH}_2\text{Ph } \beta$), 40.66 (CH_2NH), 41.75 (CH_2N), 56.75 (CHN), 66.66 (CH_2Ph), 72.71 (CHOH), 80.90 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 126.37, 127.49, 128.17, 128.49, 128.59, 129.41 (CH Ar), 131.72, 136.74, 139.07 (C Ar), 156.46, 157.17 (CONH). MS m/z : 597 $[\text{MK}]^+$, 481 $[\text{MNa}]^+$, 559 $[\text{MH}]^+$.

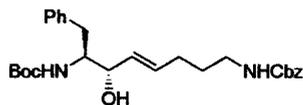


(7S,6R)-Acido-7-*tert*-butossicarbonilammino-6-idrossi-8-fenil-oct-4-enil)-carbammico benzil estere (64b)

Si ottengono 930 mg (85%) di un solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da alcol protetto **63b** (1.36 g, 2.34 mmol) e tetrabutylammonio fluoruro 1M in THF (10.7 mL, 10.7 mmol).

P.f. = 113 °C. $[\alpha]_{D}^{25} = -20.23$ ($c=0.44$, MeOH). IR (film cm^{-1}): 3451 (OH), 3341 (NH), 1713 (C=O). $^1\text{H NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): 1.35 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.60 (m, 2H, CH_2), 2.12 (m, 2H, CH_2), 2.79 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{Ph } \beta$), 3.12 (bs, 1H, OH), 3.22 (m, 2H, CH_2NH), 3.79 (bs, 1H, CHNH), 4.12 (bs, 1H, CHOH), 4.78 e 4.93 (bs, 2H, 2x NHCO), 5.10 (s, 2H, CH_2Ph), 5.51 (dd, 1H, CHCH , $J_1=15.4$ Hz, $J_2=6.6$ Hz), 5.67 (m, 1H, CHCH), 7.34 (m, 10H, CH Ar). $^{13}\text{C NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): 28.39 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_3$), 29.07 (CH_2), 29.17 (CH_2), 36.46 (CH_2CHNH), 40.13 (CH_2NH_2), 56.81 (CHNH),

66.75 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 74.72 ($\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 79.69 ($(\text{CH}_3)_3\underline{\text{C}}$), 126.37, 126.44, 128.21, 128.50, 128.61, 129.38 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$), 129.98 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 132.35 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 136.66, 138.16 ($\underline{\text{C}}\text{Ar}$), 156.53, 156.60 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$). **MS** m/z : 507 $[\text{MK}]^+$, 491 $[\text{MNa}]^+$, 469 $[\text{MH}]^+$.



(7S,6S)-Acido-7-*tert*-butossicarbonilammino-6-idrossi-8-fenil-oct-4-enil)-carbammico benzil estere (102)

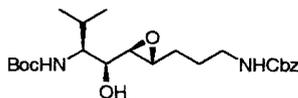
Si ottengono 1.08 mg (90%) di un solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da alcol protetto (1.5 g, 2.6 mmol) e tetrabutylammonio fluoruro 1M in THF (15.4 mL, 15.4 mmol).

P.f. = 87-89 °C. $[\alpha]_D^{25} = -36.8$ ($c=0.5$, MeOH). IR (film cm^{-1}): 3452 (OH), 3341 (NH), 1713 (C=O). **$^1\text{H NMR}$** ($\delta\text{-CD}_3\text{CN}$ 50 °C): 1.32 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\underline{\text{C}}$), 1.56 (quint, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $J=6.9$ Hz), 2.05 (q, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $J=6.9$ Hz), 2.67 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$, $J_1=9.2$ Hz, $J_2=13.7$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$, $J_1=5.8$ Hz, $J_2=13.7$ Hz), 3.12 (q, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}$, $J=6.6$ Hz), 3.70 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 4.01 (s, 1H, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 5.06 (bs, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph} + \text{NHCO}$), 5.39 (s, 1H, NHCO), 5.49 (dd, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$, $J_1=6.2$ Hz, $J_2=15.4$ Hz), 5.63 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 7.34 (m, 10H, $\underline{\text{C}}\text{H Ar}$). **$^{13}\text{C NMR}$** ($\delta\text{-CD}_3\text{CN}$ 50 °C): 27.95 ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 29.04 ($2\times\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 29.19 ($\underline{\text{C}}\text{H}\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 37.41 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 40.16 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}_2$), 56.75 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 65.97 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 72.70 ($\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 78.54 ($(\text{CH}_3)_3\underline{\text{C}}$), 126.08, 127.74, 128.17, 127.87, 128.25, 128.47 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$), 131.14 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 131.48 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 137.50, 139.36 ($\underline{\text{C}}\text{Ar}$), 155.96, 156.50 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$). **MS** m/z : 507 $[\text{MK}]^+$, 491 $[\text{MNa}]^+$, 469 $[\text{MH}]^+$.

Procedura generale per la sintesi degli epossialcoli

Una soluzione di acido *meta*-cloro-perbenzoico (*m*CPBA) (1.8 mmol) in diclorometano (10 mL) viene aggiunta ad una soluzione di alcol allilico (1.5 mmol) in diclorometano (10 mL), raffreddata a 0 °C. La miscela viene agitata a temperatura ambiente per 16 ore, diluita con due volumi di diclorometano, lavata con una soluzione acquosa di sodio metabisolfito al 10% (2x25 mL), una soluzione satura di NaHCO_3 (2x25 mL), una soluzione satura di NaCl e seccata su Na_2SO_4 anidro. Il

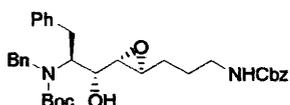
solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela etile acetato/diclorometano (gradiente da 5:5 a 7:3).



(1S,2S)-Acido-1-[(2R,3R)-3-(3-benzilossicarbonilammino-propil)-ossiranil]-idrossi-metil-2-metil-propil-carbammico *tert*-butil estere (65a)

Si ottengono 131 mg (53%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **64a** (240 mg, 0.57 mmol) e acido *meta*-cloroperbenzoico (200 mg, 0.68 mmol).

P.f. = 90-91 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +9.6$ ($c=0.25$ MeOH). **IR** (KBr, cm^{-1}): 3437, 3341 (OH e NH), 1691 (C=O). **$^1\text{H NMR}$** ($\delta\text{-CDCl}_3$): 0.87 (d, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $J=6.7$ Hz), 0.94 (d, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $J=6.6$ Hz), 1.41 (s, 11H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ e CH_2), 1.63 (m, 2H, CH_2), 2.05 (m, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 2.71 (d, 1H, CHOH , $J=6.6$ Hz), 2.86 (bs, 1H, CHO), 2.95 (bs, 1H, CHO), 3.21 (m, 2H, CH_2NH), 3.45 (m, 1H, CHOH), 3.62 (m, 1H, CHNH), 4.62 (d, 1H, CHNH , $J=9.5$ Hz), 5.00 (bs, 1H, CH_2NH), 5.06 (s, 2H, CH_2Ph), 7.32 (m, 5H, CH Ar). **$^{13}\text{C NMR}$** ($\delta\text{-CDCl}_3$): 17.09 (CH_3), 20.09 (CH_3), 26.42 (CH_2), 28.45 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$ e $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 28.74 (CH_2), 40.59 (CH_2NH), 56.27 (CHO), 58.38 (CHNH), 59.55 (CHO), 66.69 (CH_2Ph), 70.98 (CHOH), 79.59 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 128.17, 128.57, 129.30 (CH Ar), 136.64 (C Ar), 156.45 (CONH), 156.52 (CONH). **MS** m/z : 475 $[\text{MK}]^+$, 459 $[\text{MNa}]^+$, 403 $[\text{MNa-C}_4\text{H}_8]^+$, 381 $[\text{MH-C}_4\text{H}_8]^+$, 337 $[\text{MH-Boc}]^+$.

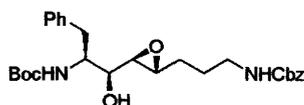


(1S,2R)-Acido-(3-[(2S,3R)-3-[2-(benzil-*tert*-butossicarbonil-ammino)-1-idrossi-3-fenil-propil]-ossiranil]-propil)-carbammico benzil estere (92)

Si ottengono 247 mg (49%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **91** (490 mg, 0.87 mmol) e acido *meta*-cloroperbenzoico (302 mg, 1.75 mmol).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -26.71$ ($c=0.67$ MeOH). **IR** (KBr, cm^{-1}): 3434, 3339 (OH e NH), 1691 (C=O). **$^1\text{H NMR}$** ($\delta\text{-CD}_3\text{CN}$ 70 °C): coppia di rotameri [1.32 e 1.41 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.57 (bs, 2H, CH_2), 2.64 (bs, 1H, CHO), 2.64-2.95 (m, 3H, CH_2Ph β e

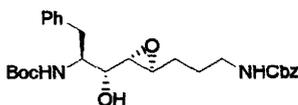
CHO), 3.15 (m, 2H, CH₂NH), 3.47 (bs, CHOH), 4.0 (bs, CHN), 4.34 (bs, 2H, CH₂N), 5.07 (s, 2H, CH₂Ph), 5.43 (bs, 1H, NH). ¹³C NMR (δ-CD₃CN 70 °C): coppia di rotameri 26.29 (CH₂), 27.79 ((CH₃)₃C), 28.77 (CH₂), 35.29 (CH₂Ph β), 40.61 (CH₂NH), 54.15 (CH₂N), 55.89 (CHO), 58.99 (CHO), 59.90 (CHN), 65.93 (CH₂Ph), 71.95 (CHOH), 126.25, 127.69, 127.82, 128.08, 128.16, 128.22, 128.31, 128.44, 129.30 (CH Ar), 137.69, 138.93, 139.01 (C Ar), 156.47, 156.79 (CONH). MS *m/z*: 613 [MK]⁺, 597 [MNa]⁺, 575 [MH]⁺.



(1S,2S)-Acido-{(2R,3R)-3-[3-(2-*tert*-butossicarbonilammينو-1-idrossi-3-fenilpropil)-ossiranil]-propil}-carbammico benzil estere (65b)

Si ottengono 300 mg (68%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **64b** (426 mg, 0.91 mmol) e acido *meta*-cloroperbenzoico (314 mg, 1.1 mmol).

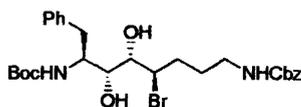
P.f. = 99-101 °C. **[α]_D²⁵** = -8.33 (c=0.30 MeOH). **IR** (KBr, cm⁻¹): 3435, 3340 (OH e NH), 1693 (C=O). **¹H NMR** (δ-CDCl₃): 1.35 (s, 11H, (CH₃)₃C e CH₂), 1.61 (m, 2H, CH₂), 2.63 (d, 1H, CHOH, J=6.2 Hz), 2.86 (bs, 1H, CHO), 2.96 (m, 3H, CHO e CH₂Ph β), 3.23 (m, 2H, CH₂NH), 3.55 (bs, 1H, CHOH), 3.99 (m, 1H, CHNH), 4.71 (m, 1H, CHNH), 4.88 (bs, 1H, CH₂NH) 5.08 (s, 2H, CH₂Ph), 7.32 (m, 10H, CH Ar). **¹³C NMR** (δ-CDCl₃): 26.46 (CH₂), 28.33 ((CH₃)₃C), 28.66 (CH₂), 36.57 (CH₂Ph β) 40.60 (CH₂NH), 55.68 (CHO), 58.43 (CHO), 58.99 (CHNH), 66.75 (CH₂Ph), 71.70 (CHOH), 79.66 ((CH₃)₃C), 126.62, 128.12, 128.21, 128.50, 128.60, 129.45 (CH Ar), 136.62, 137.61 (C Ar), 156.47 (2x CONH). MS *m/z*: 523 [MK]⁺, 507 [MNa]⁺, 485[MH]⁺, 429 [MH-C₄H₈]⁺.



(1S,2R)-Acido-{(2S,3S)-3-[3-(2-*tert*-butossicarbonilammino-1-idrossi-3-fenil-propil)-ossiranil]-propil}-carbammico benzil estere (103)

Si ottengono 571 mg (72%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da alcol allilico **102** (770 mg, 01.64 mmol) e acido *meta*-cloroperbenzoico (567 mg, 1.98 mmol).

$[\alpha]_D^{25} = -14.4$ ($c=0.25$, MeOH). IR (KBr, cm^{-1}): 3435, 3340 (OH e NH), 1693 (C=O). $^1\text{H NMR}$ ($\delta\text{-CD}_3\text{CN}$ 70 °C): coppia di rotameri 1.33 (bs, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.59 (m, 4H, $(2\times\text{CH}_2)$), 2.72-2.91 (m, 4H, CH_2Ph e $2\times\text{CHO}$), 3.14 (m, 2H, CH_2N), 3.25 (bs, 1H, OH), [3.32 e 3.44 (bs, 1H, CHOH)], 3.88 (m, 1H, CHNH), 5.06 (s, 2H, CH_2Ph), 5.15 (bs, 1H, NH), 5.53 (m, 1H, NH), 7.37 (m, 10H, CH Ar). $^{13}\text{C NMR}$ ($\delta\text{-CD}_3\text{CN}$ 70 °C): coppia di rotameri 26.12 (CH_2), 27.74 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 28.62 (CH_2), 37.71 (CH_2Ph), 40.57 (CH_2NH), [55.38 e 55.73 (CHNH)], 58.61 (CHO), 59.92 (CHO), 65.90 (CH_2Ph), [71.05 e 72.63 (CHOH)], 78.67 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 127.69, 127.82, 128.28, 128.45, 129.31, 129.37 (CH Ar), 137.67, 139.06 (C Ar), [155.79 e 156.51 (CONH)]. MS m/z : 523 [MK]⁺, 507 [MNa]⁺, 485[MH]⁺, 429 [MH-C₄H₈]⁺.



(4R,5R,6R,7S)-Acido(4-bromo-7-*tert*-butossicarbonilammino-5,6-diidrossi-8-fenil-octil)-carbammico benzil estere (105)

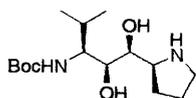
Ad una soluzione di epossialcol **103** (300 mg, 0.41 mmol) in CH₃CN (4 mL) raffreddata a -20 °C si aggiungono Amberlist 15 (134 mg, 0.41 mmol) e LiBr (143 mg, 1.65 mmol) e la reazione viene seguita mediante cromatografia su strato sottile (EtOAc/CH₂Cl₂ 4:6). La miscela viene agitata a -20 °C fino a completa scomparsa del reagente, il solido viene allontanato mediante filtrazione ed il solvente rimosso a pressione ridotta. Il residuo viene ripreso con etile acetato (25 mL) e la fase organica viene lavata con acqua (10 mL), una soluzione satura di NaCl e seccata su NaSO₄ anidro. Il solvente viene allontanato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice

utilizzando come eluente una miscela etile acetato/diclorometano 1:1. Si ottengono 127 mg (55%) di olio.

$[\alpha]_D^{25} = -10$ ($c=0.4$, MeOH). IR (KBr, cm^{-1}): 3380 (OH e NH), 1689 (C=O). $^1\text{H NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): 1.37 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), [1.51 e 1.79 (m, 2H, CH_2), 1.72 (m, 2H, CH_2), 2.86 (m, 2H, CH_2Ph), 3.14 (m, 2H, CH_2NH), 3.80 (m, 3H, CHNH e CHOH), 4.22 (m, 1H, CHBr), 4.86 (d, 1H, NH , $J=8.8$ Hz), 4.92 (bs, 1H, NH), 5.09 (s, 2H, CH_2Ph) 7.34 (m, 10H, CH Ar). $^{13}\text{C NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): 27.87(CH_2), 28.33 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_3$), 29.83 (CH_2), 38.41 (CH_2Ph), 40.23 (CH_2NH), 54.10 (CHNH), 66.77 (CH_2Ph), 71.17 (CHOH), 75.83 (CHOH), 80.30 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 126.63, 128.08, 128.18, 128.47, 128.62, 129.24 (CH Ar), 136.64, 137.64 (C Ar), 156.58 (CONH). MS m/z : 603-605 $[\text{MK}]^+$, 587-589 $[\text{MNa}]^+$, 565-567 $[\text{MH}]^+$.

Procedura generale per la sintesi degli isosteri Xaa-Pro

Una soluzione di epossialcol (0.3 mmol) in metanolo (10 mL) viene agitata per 16 ore sotto atmosfera di idrogeno in presenza di Pd/C 5%. La soluzione viene filtrata ed il solvente allontanato a pressione ridotta. Il residuo viene cristallizzato utilizzando una miscela toluene/esano oppure dietil etere/esano.

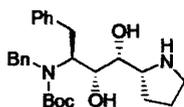


(1S,2S,3S,2'S)-Acido-(2,3-Diidrossi-1-isopropil-3-pirrolidin-2'-il-propil)-carbammico *tert*-butil estere (41a)

Si ottengono 63 mg (91%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **65** (100 mg, 0.23 mmol).

P.f.=129-130 °C (toluene). $[\alpha]_D^{25} = -12.5$ ($c=0.16$, MeOH). $^1\text{H NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): 0.82 (d, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $J=6.6$ Hz), 0.91 (d, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $J=6.6$ Hz), 1.43 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.58 (m, 1H, CH_2), 1.76 (m, 2H, CH_2), 1.90 (m, 1H, CH_2), 2.27 (m, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 2.85 (m, 1H, CH_2NH), 2.92 (m, 1H, CH_2NH), 3.42 (d, 1H, CHOH , $J=4.0$ Hz), 3.58 (m, 3H, $2\times\text{CHNH}$ e CHOH), 4.24 (bs, 2H, $2\times\text{CHOH}$), 4.57 (d, 1H, NHCO , $J=8.4$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ ($\delta\text{-CDCl}_3$): 15.31 ($\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 20.30 ($\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 25.11 (CH_2), 26.10 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 27.63 (CH_2), 28.39 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 45.89 (CH_2NH), 56.14

(CHNH), 61.67 (CHNH), 70.28 (CHOH), 71.64 (CHOH), 80.09 ((CH₃)₃C), 157.83 (CONH).

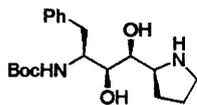


(1S,2R,3R,2'R)-Acido-benzil-(1-benzil-2,3-diidrossi-3-pirrolidin-2-il-propil)-carbamic *tert*-butil estere (67a)

Si ottengono 70 mg (90%) di un olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **92** (100 mg, 0.17 mmol).

¹H NMR (δ -CDCl₃): 1.35 (s, 9H, ((CH₃)₃C), 1.56 (m, 1H, CH₂), 1.85 (m, 2H, CH₂ ring), 2.02 (m, 1H, CH₂), 2.73-3.12 (m, 7H, CH₂Ph β , CH₂NH, 2xCHOH CHNH), 4.17 (d, 1H, CH₂N, J=13.5 Hz), 4.38 (bs, 2H, OH), 4.56 (d, 1H, NH, J=7.9 Hz), 4.61 (d, 1H, CH₂N, J=13.5 Hz), 4.85 (m, 1H, CHN), 7.12-7.27 (m, 10H, CH Ar).

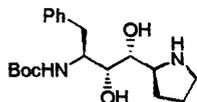
¹³C NMR (δ -CDCl₃): 22.43 (CH₂), 28.25 (CH₂), 28.51 ((CH₃)₃C), 35.37 (CH₂Ph), 47.88 (CH₂NH), 55.19 (CHNH) 62.89 (CHNH), 64.94 (CHOH), 80.93 (CH₂N), 81.17 (CHOH), 82.15 ((CH₃)₃C), 126.40, 126.51, 128.13, 128.44, 128.55, 129.25, (CH Ar), 138.09, 140.13 (C Ar), 158.59 (CONH). **MS** m/z : 441[MH]⁺, 464[MNa]⁺.



(1S,2S,3S,2'S)-Acido-(1-benzil-2,3-diidrossi-3-pirrolidin-2-il-propil)-carbammico *tert*-butil estere (41b)

Si ottengono 69 mg (95%), di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da epossialcol **65b** (100 mg, 0.26 mmol).

P.f. = 167 °C. **[α]_D²⁵** = - 38.8 (c=0.35, MeOH). **¹H NMR** (δ -CDCl₃): 1.33 (s, 9H, (CH₃)₃C), 1.57 (m, 1H, CH₂), 1.76 (m, 2H, CH₂), 1.91 (m, 1H, CH₂), 2.86 (m, 1H, CH₂Ph), 2.92 (m, 1H, CH₂NH), 2.98 (m, 1H, CH₂NH), 3.13 (d, 1H, CH₂Ph, J=13.9 Hz), 3.53-3.66 (m, 3H, 2xCHOH, CHNH), 3.91 (bs, 1H, CHNH), 4.62 (bs, 3H, CHOH, NHCO), 7.34 (m, 5H, CH Ar). **¹³C NMR** (δ -CDCl₃): 25.16 (CH₂), 27.30 (CH₂), 28.32 ((CH₃)₃C), 36.54 (CH₂Ph), 45.87 (CH₂NH), 52.78 (CHNH) 61.90 (CHNH ring), 69.64 (CHOH), 73.05 (CHOH), 80.15 ((CH₃)₃C), 126.45, 128.54, 129.58 (CH Ar), 137.92 (C Ar), 157.11 (CONH). **MS** m/z : 351[MH]⁺, 295[MH-C₄H₈]⁺.



(1S,2R,3R,2'S)-Acido-(1-benzil-2,3-diidrossi-3-pirrolidin-2-il-propil)-carbammico *tert*-butil estere (68)

Si ottengono 59 mg (75%), di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da bromodiolo **105** (127 mg, 0.22 mmol).

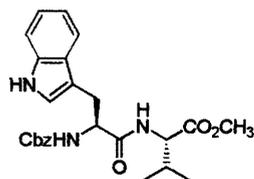
$[\alpha]_D^{25} = -14.3$ ($c=0.28$, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (δ -CD₃OD): 1.33 (s, 9H, (CH₃)₃C), 1.57 (m, 1H, CH₂), 1.78 (m, 2H, CH₂), 1.91 (m, 1H, CH₂), 2.78-2.90 (m, 4H, CH₂Ph e CH₂NH), 3.65-3.82 (m, 3H, 2xCHOH, CHNH), 4.06 (m, 1H, CHNH), 7.34 (m, 5H, CH Ar). $^{13}\text{C NMR}$ (δ -CD₃OD): 24.29 (CH₂ ring), 25.42 (CH₂ ring), 28.39 ((CH₃)₃C), 39.28 (CH₂Ph), 45.56 (CH₂NH), 53.25 (CHNH) 60.63 (CHNH), 74.14 (CHOH), 77.36 (CHOH), 80.20 ((CH₃)₃C), 126.45, 128.54, 129.46 (CH Ar), 137.95 (C Ar), 158.01 (CONH). MS m/z : 351[MH]⁺, 373[MNa]⁺.

Molecular Modeling

I calcoli sono stati effettuati con due workstation SGI Octane 1 R12000 e con un processore Pentium IV 2.53 Ghz / RedHat Linux 9. La costruzione dei modelli ed i calcoli di meccanica molecolare sono stati effettuati con Sybyl6.8 (Tripos inc., 1699 South Hanley rd., St. Louis, MO 63144 USA). Le dinamiche molecolari sono state simulate con il package “Q”, versione 4.20 (John Marelius, Karin Kolmodin, Ellen Kindlund, Johan Åqvist, Dept. Of Cell. And Molecular Biology, Uppsala University, Biomedical Centre, Box 596, SE-751-24 Uppsala, Sweden). I calcoli ab initio sono stati effettuati con Spartan2000 (Wavefunction, Inc. 18401 Von Karman Ave., Suite 370 Irvine, CA 92612 USA). Le coordinate iniziali per la struttura del complesso HIV-PR – JG-365 corrispondono a quelle depositate nel Protein Data Bank nel file 7HVG. Dopo aver aggiunto tutti gli idrogeni compresi quelli ionizzabili, ad un pH pari a 7, e aver rimosso tutte le molecole di acqua di cristallizzazione ad eccezione di quella interna al sito catalitico dell'enzima, tutte le ottimizzazioni e le dinamiche molecolari sono state effettuate con il campo di forze AMBER, così come implementato in Sybyl 6.8. I parametri specifici per l'atomo di zolfo contenuto nei residui di tienilglicina e in quelli tiazolici sono stati ottenuti con la procedura descritta da Geremia e Calligaris, e integrati in quelli già contenuti in Sybyl. In tutte le minimizzazioni è stato inizialmente effettuato uno step di 20 iterazioni con il metodo del semplice, seguite da minimizzazioni guidate dall'algoritmo “Conjugate gradient” fino a che il criterio di convergenza di $0.001 \text{ Kcalmol}^{-1} \text{ \AA}$ non è stato raggiunto su tutti i gradienti dell'energia. Tutti i calcoli effettuati in assenza di molecole discrete di solvente sono stati condotti in un dielettrico continuo di permittività relativa $\epsilon=4\pi j$. Le dinamiche molecolari sono state effettuate sottoponendo i sistemi dapprima a 4 step di riscaldamento (4000 step da 1fs ciascuno, bath coupling const. 1 fs, alle temperature di 1, 50, 150, 300 °K) e quindi a 250 ps di simulazione a 300 °K, suddivisi in 5 periodi da 50 ps (50000 steps da 1 fs ciascuno, bath coupling const. 10 fs).

Procedura generale per la sintesi dei peptidi

L'amminoacido N-Cbz protetto (6 mmol) viene sciolto nella minima quantità di CH₃CN anidro oppure THF anidro, necessaria a solubilizzarlo; si aggiungono 1-idrossibenzotriazolo (HOBT) (6 mmol), di-*iso*-propilettilammina (DIPEA), oppure N-metilmorfolina (NMM) (12 mmol) e il metil estere del secondo amminoacido (6 mmol), la soluzione viene raffreddata a 0 °C e si aggiunge N-etil-carbodiimmide cloridrato (EDC), (7.2 mmol). Dopo aver controllato che il pH sia debolmente basico (pH=8.0-8.5), la miscela viene agitata per 1h a 0 °C, quindi portata a temperatura ambiente e agitata per ulteriori 16h. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il residuo ripartito tra acetato d'etile e acqua, la fase organica viene lavata con una soluzione acquosa di acido citrico al 10% (25 mL), una soluzione satura di NaHCO₃, una soluzione satura di NaCl e seccata su NaSO₄. Il solvente viene rimosso mediante distillazione a pressione ridotta ed il prodotto grezzo purificato mediante cromatografia flash su gel di silice utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1.



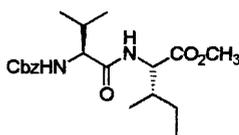
N-Cbz-L-Trp-L-Val-OMe

Si ottengono 1.7 g (63%) di solido giallo secondo la metodologia generale, partendo da N-Cbz-L-triptofano (2.03g, 6 mmol), HOBT (810 mg, 6 mmol), DIPEA (3.1 mL, 18 mmol), L-valina metil estere (1.01g, 6 mmol), EDC (1.38g, 7.2 mmol).

¹H NMR (δ-CDCl₃): 0.73 (d, 3H, (CH₃)₂CH, J=6.6 Hz), 0.77 (d, 3H, (CH₃)₂CH, J=6.6 Hz), 1.99 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 3.18 (dd, 1H, CH₂CH, J₁=7.7 Hz, J₂=14.6 Hz), 3.29 (m, 1H, CH₂CH), 3.61 (s, 3H, CH₃O), 4.39 (dd, 1H, CHNH, J₁=5.1 Hz, J₂=8.4 Hz), 4.56 (m, 1H, CHNH), 5.10 (s, 2H, CH₂Ph), 5.63 (d, 1H, NH, J=6.9 Hz), 6.35 (d, 1H, NH, J=7.3 Hz), 7.02-7.32 (m, 10H, CH Ar), 7.65 (d, 1H, NH, J=7.3 Hz).

¹³C NMR (δ-CDCl₃): 17.84 (CH₃), 18.81 (CH₃), 28.58 (CH₂CH), 31.21 ((CH₃)₂CH), 52.15 (CH₃O), 55.68 (CHNH), 57.47 (CHNH), 67.08 (CH₂Ph), 110.34, 111.34, 118.84, 119.79, 122.25, 123.56, 128.14, 128.26, 128.62 136.35 (CH e C Ar), 156.16

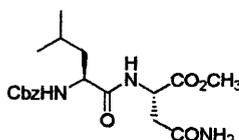
(CONH), 171.47, 171.84 (CONH e CO₂CH₃). **MS** *m/z*: 490 [MK]⁺, 474 [MNa]⁺, 452 [MH]⁺.



N-Cbz-L-Val-L-Ile-OMe

Si ottengono 2.1 g (80%) di olio incolore secondo la metodologia generale, partendo da N-Cbz-L-valina (1.73g, 6.9 mmol), HOBT (932 mg, 6.9 mmol), DIPEA (2.36 mL, 13.8 mmol), L-Isoleucina metil estere (1.0 g, 6.9 mmol), EDC (1.58g, 8.28 mmol).

¹H NMR (δ-CDCl₃): 0.84-0.94 (m, 12H, 4xCH₃), 1.14 (m, 1H, CH₂CH₃), 1.38 (m, 1H, CH₂CH₃), 1.85 (bs, 1H, CH₂CH), 2.07 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 3.69 (s, 3H, CH₃O), 4.1 (m, 1H, CHNH), 4.56 (m, 1H, CHNH), 5.09 (m, 2H, CH₂Ph), 5.58 (d, 1H, NH, J=8.4 Hz), 6.74 (d, 1H, NH, J=7.7 Hz), 7.29 (m, 5H, CH Ar). ¹³C NMR (δ-CDCl₃): 11.59 (CH₃CH), 15.48 (CH₃CH₂), 17.99 ((CH₃)₂CH), 19.19 ((CH₃)₂CH), 25.23 (CH₃CH₂), 31.32 ((CH₃)₂CH), 37.79 (CH₃CH), 52.11 (CH₃O), 56.53 (CHNH), 60.33 (CHNH), 67.02 (CH₂Ph), 127.98, 128.13, 128.54 (CH Ar), 136.41 (C Ar), 156.51 (CONH), 171.42, 172.28 (CONH). **MS** *m/z*: 401 [MNa]⁺, 379 [MH]⁺.

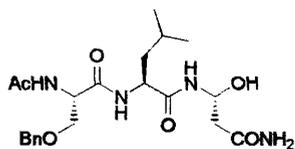


N-Cbz-L-Leu-L-Asn-OMe

Si ottengono 1.1 g (79%) di solido bianco secondo la metodologia generale, partendo da N-Cbz-L-leucina (944 mg, 3.56 mmol), HOBT (481 mg, 3.56 mmol), NMM (0.73 mL, 7.12 mmol), L-asparagina metil estere (520 mg, 3.56 mmol), EDC (716 mg, 3.74 mmol).

¹H NMR (δ-CDCl₃): 0.89 (bs, 6H, (CH₃)₂CH), 1.54 (m, 3H, CH₂, (CH₃)₂CH), 2.67 (dd, 1H, CH₂CO, J₁=4.0 Hz, J₂=15.7 Hz), 2.83 (dd, 1H, CH₂CO, J₁=4.4 Hz, J₂=15.7 Hz), 3.62 (s, 3H, CH₃O), 4.33 (m, 1H, CHNH), 4.77 (m, 1H, CHNH), 5.05 (t, 2H, CH₂Ph, J=12.1 Hz), 5.79 (d, 1H, NH, J=8.1 Hz), 6.31 (bs, 2H, NH₂), 7.28 (m, 5H, CH Ar), 7.76 (d, 1H, NH, J=7.7 Hz). ¹³C NMR (δ-CDCl₃): 21.11 (CH₃), 21.98 (CH₃), 24.69 (CH), 37.08 (CH₂ β), 41.81 (CH₂ β), 48.94 (CHNH), 52.67

($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$), 53.53 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 66.95 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 127.98, 128.17, 128.58 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$), 136.40 ($\underline{\text{C}}\text{Ar}$), 156.41 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$), 171.71, 172.65, 172.99 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$, $\underline{\text{C}}\text{ONH}_2$). **MS** m/z : 416 $[\text{MNa}]^+$, 394 $[\text{MH}]^+$.



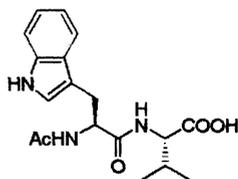
N-Ac-L-Ser-(OBz)-L-Leu-L-Asn-OH

Ad una soluzione del dipeptide NHCbz-Leu-Asn-OMe (533 mg, 1.35 mmol) in metanolo (50 mL) si aggiunge una quantità catalitica di Pd/C 10% e la miscela viene agitata in atmosfera di H₂ fino a completezza (TLC CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1). La miscela viene filtrata su celite, il solvente allontanato mediante distillazione a pressione ridotta. Seguendo la metodologia generale il dipeptide deprotetto (350 mg, 1.35 mmol), così ottenuto, viene fatto reagire con N-Ac-L-(OBz)-serina (320 mg, 1.35 mmol), HOBT (182 mg, 1.35 mmol), NMM (0.3 mL, 2.7 mmol), EDC (272 mg, 1.42 mmol). Si ottengono 170 mg (26%) di un solido bianco, che viene sciolto in una miscela THF/LiOH 0.5 N 1:1, la soluzione viene agitata fino a completezza (TLC CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1) quindi acidificata a pH 4 con HCl 10%. La fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (3x5 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su NaSO₄. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta ed il prodotto viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

¹H NMR (δ CD₃OD): 0.87 (m, 6H, ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂CH), 1.63 (m, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂CH), 1.98 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 2.76 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$), 3.71 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 4.52 (m, 4H, 2x $\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 4.71 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 5.05 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$, $J=12.1$ Hz), 5.79 (d, 1H, $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$, $J=8.1$ Hz), 6.31 (bs, 2H, $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}_2$), 7.37 (m, 5H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{Ar}$). **¹³C NMR** (δ -CDCl₃): 21.15 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22.08 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22.44 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 24.17 ($\underline{\text{C}}\text{H}$), 36.23 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\beta$), 40.27 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\beta$), 48.98 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 50.84 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 53.37 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 65.49 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 74.54 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 127.66, 127.87, 128.44 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$), 137.61 ($\underline{\text{C}}\text{Ar}$), 172.69, 173.80, 174.06, 174.15, 174.63 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$, $\underline{\text{C}}\text{ONH}_2$). **MS** m/z : 459 $[\text{MNa}]^+$, 437 $[\text{MH}]^+$.

Procedura generale per l'acetilazione e deprotezione dei dipeptidi

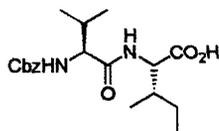
Ad una soluzione del metil estere del dipeptide N-Cbz protetto (1.1 mmol) in metanolo (10 mL) si aggiunge una quantità catalitica di Pd/C 10% e la miscela viene agitata in atmosfera di H₂ fino a completezza (TLC CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1). La miscela viene filtrata su celite, il solvente allontanato mediante distillazione a pressione ridotta. Il prodotto grezzo viene sciolto in una miscela anidride acetica/CH₂Cl₂ 1:1 (5 mL) e agitata fino a completezza (TLC CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1). Il solvente viene rimosso a pressione ridotta. L'eccesso di anidride acetica viene rimosso per co-evaporazione con toluene (4x40 mL). Il residuo viene sciolto in una miscela THF/LiOH 0.5 N 1:1, la soluzione viene agitata fino a completezza (TLC CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1) quindi acidificata a pH 4 con HCl 10%. La fase acquosa viene estratta con acetato d'etile (3x5 mL), le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione satura di NaCl e seccate su NaSO₄. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta ed il prodotto grezzo viene purificato mediante cromatografia flash su gel di silice utilizzando CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1 come miscela eluente.



N-Ac-L-Trp-Val-OH

Si ottengono 310 mg (82%) di solido giallo secondo la metodologia generale, partendo da N-Cbz-L-Trp-L-Val-OMe (0.5 g, 1.1 mmol).

¹H NMR (δ-CD₃OD): 0.91 (m, 6H, (CH₃)₂CH), 1.98 (s, 3H, CH₃CONH), 2.13 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 3.09 (dd, 1H, CH₂CH, J₁=8.42 Hz, J₂=15.0 Hz), 3.26 (dd, 1H, CH₂CH, J₁=6.2 Hz, J₂=15.4 Hz), 4.33 (d, 1H, CHNH, J=5.5 Hz), 4.75 (m, 1H, CHNH), 6.97-7.09 (m, 3H, CH Ar), 7.30 (d, 1H, CH, J=8.1 Hz), 7.58 (d, 1H, CH, J=6.9 Hz). ¹³C NMR (δ-CD₃OD): 16.98 (CH₃), 18.17 (CH₃), 21.15 (CH₃CO), 27.45 (CH₂CH), 30.59 ((CH₃)₂CH), 54.16 (CHNH), 57.66 (CHNH), 109.66, 110.91, 117.98, 118.44, 121.05, 123.16, 127.53, 136.69 (CH e C Ar), 171.84, 172.92, 173.16 (CONH e CO₂CH₃). MS m/z: 384 [MK]⁺, 362 [MNH₄]⁺, 368 [MNa]⁺, 346 [MH]⁺.



N-Ac-L-Val-L-Ile-OH

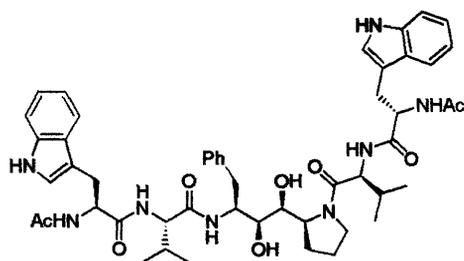
Si ottengono 800 mg (72%) di solido giallo secondo la metodologia generale, partendo da N-Cbz-L-Val-L-Ile-OMe (1.5 g, 3.96 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (δ -CD₃OD): 0.89-0.99 (m, 12H, 4xCH₃), 1.24 (m, 1H, CH₂CH₃), 1.52 (m, 1H, CH₂CH₃), 1.88 (m, 1H, CH₂CH), 1.98 (s, 3H, CH₃CO), 2.02 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 4.21 (d, 1H, CHNH, J=7.7 Hz), 4.35 (d, 1H, CHNH, J=5.8 Hz).

$^{13}\text{C NMR}$ (δ -CD₃OD): 10.51 (CH₃CH), 14.68 (CH₃CH₂), 17.51 ((CH₃)₂CH), 18.36 ((CH₃)₂CH), 21.06 (CH₃CO), 24.87 (CH₃CH₂), 30.49 ((CH₃)₂CH), 36.99 (CH₃CH), 56.78 (CHNH), 58.93 (CHNH), 171.94, 172.57, 173.22 (CONH). **MS** m/z : 311 [MK]⁺, 295 [MNa]⁺, 273 [MH]⁺.

Procedura generale per la rimozione del Boc

Il diamminodiolo **41b** (0.15 mmol) viene sciolto in una soluzione al 40% di acido trifluoroacetico in diclorometano (1 mL/100 mg di diamminodiolo) e la miscela viene agitata per 1h. Il solvente viene allontanato per distillazione a pressione ridotta mentre l'eccesso di TFA viene rimosso per co-evaporazione con dietil etere (5x20 mL). Il residuo viene utilizzato senza ulteriori purificazioni.

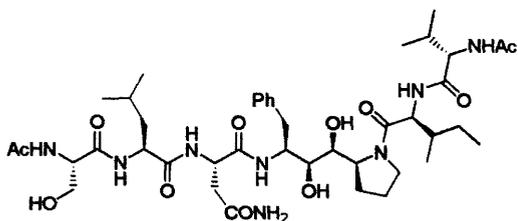


Inibitore NH-Ac-Trp-Val-Phe-[Φ]-Pro-Val-Trp-NH-Ac (117)

Ad una soluzione di dipeptide AcNH-Trp-Val-OH (165 mg, 0.48 mmol) in DMF anidra (1 mL) si aggiungono PYBOP (249 mg, 0.48 mmol), HOBT (65 mg, 0.48 mmol), collidina (0.13 mL, 0.96 mmol) ed il diamminodiolo **41b** deprotetto dal Boc secondo la metodologia generale (30 mg, 0.12 mmol). La reazione viene seguita mediante spettrometria di massa e la miscela viene agitata fino a completezza. Dopo

48h il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il residuo ripartito fra etile acetato (40 mL) ed acqua (15 mL). La fase organica viene lavata con una soluzione acquosa di KHSO_4 al 5% (2x15 mL), acqua (15 mL), una soluzione satura di NaHCO_3 (2x15 mL), una soluzione satura di NaCl e seccata su NaSO_4 anidro. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta ed il prodotto grezzo purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1. Si ottengono 54 mg (50%) di solido bianco.

MS m/z : 464 $[\text{MHNa}]^{2+}$, 472 $[\text{MH}_2\text{ONa}]^{2+}$, 480 $[\text{MH}_2\text{OK}]^{2+}$, 944 $[\text{MK}]^+$, 928 $[\text{MNa}]^+$, 922 $[\text{MH}_2\text{O}]^+$, 906 $[\text{MH}]^+$.

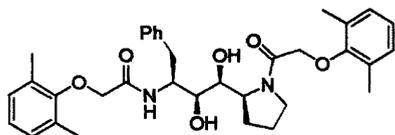


Inibitore NH-Ac-Ser-Leu-Asn-Phe-[Φ]-Pro-Ile-Val-NH-Ac (115a)

Ad una soluzione del dipeptide Ac-NH-Val-Ile-OH (78 mg, 0.28 mmol) in DMF anidra (1 mL) si aggiunge nell'ordine PYBOP (145 mg, 0.28 mmol), HOBT (38 mg, 0.28 mmol), collidina (63 μL , 0.47 mmol) e diamminodiolo **41b** (50 mg, 0.14 mmol). La reazione viene seguita mediante spettrometria di massa e la miscela viene agitata fino a completezza. Dopo 72h il solvente viene allontanato a pressione ridotta ed il residuo ripartito fra etile acetato (50 mL) ed acqua (20 mL). La fase organica viene lavata con una soluzione acquosa di KHSO_4 al 5% (2x20 mL), acqua (20 mL), una soluzione satura di NaHCO_3 (2x20 mL), una soluzione satura di NaCl e seccata su NaSO_4 anidro. Il solvente viene allontanato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo così ottenuto viene deproteetto dal Boc secondo la metodologia generale. Il peptide deproteetto (91 mg, 0.18 mmol) viene sciolto in DMF anidra (0.5 mL) ed aggiunto ad una soluzione del tripeptide Ac-NH-Ser-Leu-Asn-OH (120 mg, 0.27 mmol), PYBOP (140 mg, 0.27 mmol), HOBT (36 mg, 0.26 mmol) e collidina (71 μL , 0.54 mmol). La reazione viene seguita mediante spettrometria di massa e la miscela viene agitata fino a completezza. Dopo 72h il prodotto viene isolato seguendo la procedura descritta in precedenza. Il residuo viene sciolto in metanolo (10 mL), si aggiunge una quantità catalitica di Pd/C 10% e si agita la miscela sotto atmosfera di

H₂ per 48h. La soluzione viene filtrata su celite ed il solvente allontanato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo viene purificato per cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela diclorometano/metanolo 9:1. Si ottengono 26.5 mg (12%) di olio incolore.

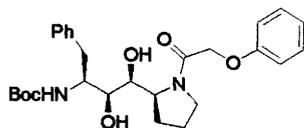
MS m/z : 899 [MK]⁺, 883 [MNa]⁺, 861 [MH]⁺.



Inibitore DmPoa-Phe-[Φ]-Pro-DmPoa (118)

L'inibitore **118** viene sintetizzato seguendo la metodologia generale per la sintesi dei peptidi a partire da acido-2,6-dimetil-fenossiacetico (DmPoa) (50 mg, 0.28 mmol), HOBT (38 mg, 0.28 mmol), NMM (0.92 mL, 0.28 mmol), EDC (56 mg, 0.29 mmol) e diamminodiolo **41b** deprotetto dal Boc secondo la metodologia generale (35 mg, 0.14 mmol). Si ottengono 96 mg (60%) di solido bianco.

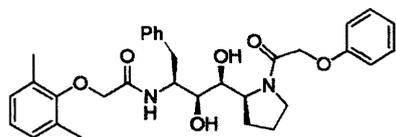
¹³C NMR (δ CD₃CN): 16.25 (C_H3), 16.50 (C_H3), 23.86 (C_H2), 27.66 (C_H2), 37.81 (C_H2Ph), 46.83 (C_H2N), 52.60 (C_HNH), 59.82 (C_HNH), 70.82 (C_HOH), 71.00 (C_H2O), 71.38 (C_HOH), 71.75 (C_H2OH), 125.25, 125.61 (C Ar), 127.21, 129.29, 129.85, 129.90, 130.40, 131.64, 131.82 (C_H Ar), 139.86, 155.24, 156.73 (C Ar), 170.12, 170.46 (C_ONH). **MS** m/z : 597 [MNa]⁺, 575 [MH]⁺.



N-Boc-Phe-[Φ]-Pro-POA

Si ottengono 63 mg (93%) di olio incolore secondo la metodologia generale per la sintesi peptidica, partendo da acido fenossiacetico (POA) (22 mg, 0.14 mmol), HOBT (19 mg, 0.14 mmol), EDC (28 mg, 0.15 mmol), NMM (31 μL, 0.28 mmol) e diamminodiolo **41b** (50 mg, 0.14 mmol).

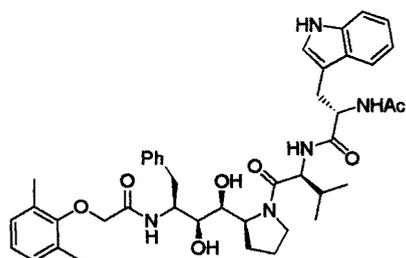
MS m/z : 507 [MNa]⁺, 485 [MH]⁺.



Inibitore DmPoa-Phe-[Φ]-Pro-Poa (120)

Si ottengono 18 mg (24%) di solido bianco secondo la metodologia generale per la sintesi peptidica, partendo da acido-2,6-dimetil-fenossiacetico (DmPoa) (25 mg, 0.14 mmol), HOBT (19 mg, 0.14 mmol), EDC (28 mg, 0.15 mmol), NMM (31 μ L, 0.28 mmol) e diamminodiolo **41b** deprotetto dal Boc secondo la metodologia generale (53 mg, 0.14 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (δ CDCl_3): 1.90 (m, 3H, CH_2 e HCH), 2.06 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.27 (m, 1H, HCH), 2.86 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=8.8$ Hz, $J_2=14.3$ Hz), 3.15 (dd, 1H, CH_2 , $J_1=5.1$ Hz, $J_2=9.1$ Hz), 3.20 (dd, 1H, CH_2 , $J_1=6.9$ Hz, $J_2=9.1$ Hz), 3.32 (dd, 1H, CH_2Ph , $J_1=8.8$ Hz, $J_2=14.3$ Hz), 3.48 (m, 2H, CHOH), 3.93 (d, 1H, OH , $J=6.2$ Hz), 4.11 (dd, 2H, CH_2O , $J_1=15.4$ Hz, $J_2=24.5$ Hz), 4.36 (m, 2H, CHNH), 4.65 (dd, 2H, CH_2O , $J_1=14.6$ Hz, $J_2=19.04$ Hz), 4.83 (d, 1H, OH , $J=4.7$ Hz), 6.72 (d, 1H, NH , $J=9.1$ Hz), 6.97 (m, 7H, CH Ar e NH), 7.25 (m, 7H, CH Ar). $^{13}\text{C NMR}$ (δ CDCl_3): 15.91 (CH_3), 16.06 (CH_3), 23.55 (CH_2), 26.93 (CH_2), 37.14 (CH_2Ph), 46.70 (CH_2NH), 51.01 (CHNH), 59.01 (CHNH), 67.50 (CH_2O), 69.85 (CH_2O), 70.10 (CHOH), 70.93 (CHOH), 121.82, 124.84, (C Ar), 126.62, 128.60, 129.05, 129.12, 129.30, 129.37, 129.62, 129.69, 130.25 (CH Ar), 137.65 (C Ar), 153.92, 157.62 (CO), 169.45, 169.75 (CONH). **MS** m/z : 585 $[\text{MK}]^+$, 569 $[\text{MNa}]^+$, 546 $[\text{MH}]^+$.



Inibitore DmPoa-Phe-[Φ]-Pro-Val-Trp-NH-Ac (119)

Questo inibitore è stato sintetizzato introducendo gli amminoacidi in catena laterale uno dopo l'altro nell'ordine: N-Cbz-valina, NH-Ac-triptofano, DmPoa. Si ottengono 104 mg (78%) di solido bianco secondo la metodologia generale per la sintesi peptidica, partendo da acido-2,6-dimetil-fenossiacetico (DmPoa) (25 mg, 0.14

mmol), N-Cbz-valina (41.6 mg, 0.18 mmol), NH-Ac-triptofano (39 mg, 0.15 mmol), e diamminodiolo **41b** (62 mg, 0.18 mmol).

MS m/z 778 [MK]⁺, 762 [MNa]⁺, 740[MH]⁺.

Desidero ringraziare innanzitutto il Dott. Pietro Campaner per aver contribuito alla sintesi dei peptidi, degli inibitori e per aver effettuato i saggi fluorimetrici; il Dott. Federico Berti per il molecular modeling; il Prof. Giorgio Nardin per la struttura cristallografica dell'isostere Val-Pro; il Prof. Alessandro Tossi per i saggi di inibizione; la Dott.ssa Nina Antcheva e la Dott.ssa Ilaria Adamo per l'uso dell'HPLC; il Dott. Stefano Norbedo per tutti i consigli e le stimolanti discussioni; il Dott. Fabio Hollan per gli spettri di massa.