

# *Università degli Studi di Salerno*

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

---

DOTTORATO DI RICERCA IN CHIMICA

VIII CICLO NUOVA SERIE (2006-2009)

DIPARTIMENTO DI CHIMICA

**TESI DI DOTTORATO**

***“Design e sintesi di analoghi delle azumammidi,  
potenti inibitori degli enzimi HDACs”***

Dott. Emiddio Cafaro

Tutor:

Ch.mo Prof.

Francesco De Riccardis

Coordinatore:

Ch.mo Prof.

Gaetano Guerra

# Indice

## Capitolo 1

1.1 Introduzione	1
1.2 Cosa sono i tumori?	3
1.2.1 Le Terapie	6
1.3 L'era post-genomica	6
1.3.1 Cromatina e controllo epigenetico	9
1.4 Gli HDACs	10
1.4.1 HDACs: meccanismo di azione e inibitori	12
1.5 Le azumammidi	15
1.6 Obbiettivi	16

## Capitolo 2

2.1 Studi di interazione azumammide E-enzima	21
2.2 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-azumammide E	22
2.2.1 Schema retrosintetico composto <b>7</b>	23
2.2.2 Sintesi della (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-azumammide E <b>7</b> : preparazione dell'aldeide <b>44</b>	24
2.2.3 Sintesi del β-amminoacido <b>42</b>	25
2.2.4 Sintesi del tripeptide NH <sub>2</sub> -Val-Ala-Phe-OtBu <b>43</b>	26
2.2.5 Sintesi della (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-azumammide E <b>7</b>	27
2.3.1 Sintesi (-)-azumammide E: schema retrosintetico	28
2.3.2 Sintesi della (-)-azumammide E	29
2.4 Studi di docking e saggi di attività	30

## Capitolo 3

3. Analoghi delle azumammidi	36
3.1 Analogo <b>30</b>	36
3.1.1 Schema retrosintetico dell'analogo <b>30</b>	37
3.1.2 Sintesi della β-omoserina <b>64</b>	38
3.2 Secondo schema retro sintetico analogo <b>30</b>	38
3.2.1 Sintesi composto <b>67</b>	39
3.3 Sintesi su fase solida	40
3.4 Schema retro sintetico analogo <b>30</b>	42
3.4.1 Sintesi ciclopeptide <b>71</b> : scelta dei parametri sintetici	43
3.4.2 Sintesi del ciclopeptide <b>30</b>	46
3.5 Variante dello schema retro sintetico 3.4.2	50
3.5.2 Sintesi del derivato aspartico <b>81</b>	51
3.5.3 Sintesi su fase solida dell'analogo <b>30</b>	51

## Capitolo 4

4. Analoghi prolinici delle azumammidi	54
4.1 Analogo <b>29</b>	55
4.1.1 Schema retro sintetico: analogo <b>29</b>	56
4.1.2 Sintesi dell'analogo <b>29</b>	57

4.2 Secondo schema retro sintetico dell'analogo <b>29</b>	58
4.2.1 Sintesi del tetrapeptide <b>89</b>	59
4.2.2 Ciclizzazione del tetrapeptide <b>89</b> e sintesi finale dell'analogo <b>29</b>	60
4.2.3 Sintesi dei derivati del composto <b>29</b> : modificazione del gruppo funzionale	61
4.2.4 Sintesi dei derivati dell'analogo <b>29</b> : modificazione dello scheletro peptidico	62
4.2.5 Sintesi dell'analogo <b>34</b>	63
4.2.6 Sintesi dell'analogo <b>35</b>	66

## Capitolo 5

5.1 Derivato ciclodepsipeptidico <b>9</b>	68
5.2 Schema retrosintetico dell'analogo <b>9</b>	69
5.3 Sintesi dell'analogo <b>9</b> : $\beta$ -idrossiacido <b>97</b>	70
5.3.1 Sintesi dell'analogo <b>9</b> : accoppiamento e ciclizzazione	70
5.3.2 Secondo schema retrosintetico per l'analogo <b>9</b>	72
5.3.3 Sintesi dell'analogo <b>9</b> : formazione del peptide lineare e ciclizzazione	73
5.4 Derivato prolinico dell'analogo <b>9</b>	74
5.4.1 Schema retro sintetico dell'analogo prolinico <b>111</b>	74
5.4.2 Sintesi dell'analogo <b>111</b> : formazione del peptide lineare e ciclizzazione	75

## Capitolo 6

6. Discussione dei risultati e Considerazioni conclusive	77
6.1 Studi di interazione del complesso inibitore-enzima	77
6.2 Sintesi di nuovi potenziali inibitori	79

## Capitolo 7

7. Parte sperimentale	81
-----------------------	----

<b>Bibliografia</b>	121
---------------------	-----

## Abbreviazioni

<b>Boc</b>	<i>terz</i> -butossicarbonile
<b>BOP-Cl</b>	Bis-(2-ossa-3-ossazolidinil)fosfinic cloruro
<b>DCM</b>	diclorometano
<b>DIPEA</b>	disopropiletilammina
<b>DMAP</b>	4-dimetilamminopiridinio
<b>DMF</b>	dimetilformammide
<b>DPPA</b>	difenilfosforilazide
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiiimide idrocloruro
<b>FDPP</b>	pentafluorodifenil fosfinato
<b>HOBt</b>	1-idrossibenzotriazolo
<b>KHMDS</b>	potassio esametildisililammide
<b>Ipc</b>	isopinocamfeile
<b>MTPA</b>	acido $\alpha$ -metossi- $\alpha$ -(trifluorometil) fenilacetico
<b>TEMPO</b>	2,2,6,6-tetrametilpiperidina- <i>N</i> -ossido, radicale libero
<b>THF</b>	tetraidrofurano
<b>TFA</b>	acido trifluoroacetico
<b>TPSCI</b>	<i>tezt</i> -butildifenilsilil cloruro

## **CAPITOLO 1**

---

---

### 1.1 Introduzione

Sin dalla sua comparsa sul pianeta l'uomo ha dovuto affrontare numerosi ostacoli, un susseguirsi di problemi dalla cui soluzione è spesso dipesa la sua futura sopravvivenza. La conquista del fuoco (10.000 a.C.), l'invenzione della ruota (4.000 a.C.), la manipolazione del ferro (900 a.C.), la diffusione della pergamena (II sec. a.C.), la teoria copernicana (N. Copernico, *De revolutionibus orbium coelestium*, 1543) sono solo alcune delle più significative vittorie che hanno segnato, di fatto, importanti tappe del processo evolutivo della specie umana.

L'avanzare del tempo ed il progredire della civiltà hanno prodotto sfide sempre più ardue e complesse sino a giungere alle rilevanti conquiste scientifiche dell'età contemporanea che vanno: dalla scoperta della radioattività (M. e P. Curie, H. Becquerel, Nobel per la fisica 1903) alla formulazione del modello atomico (E. Schroedinger, Nobel per la fisica 1933), dalla delucidazione della struttura del DNA (J. Watson, F. Crick, M. Wilkins Nobel per la medicina 1962), sino allo sviluppo dell'ingegneria genetica ed alla clonazione di organismi pluricellulari.

Molte però sono le battaglie ancora in atto e tra queste la lotta ai tumori si può certamente inserire tra le più dure che la scienza abbia mai intrapreso.

La scoperta, la gravità ed il crescente numero di diagnosi nell'ultimo cinquantennio ha fortemente sensibilizzato l'opinione pubblica verso quello che potrebbe essere giustamente definito il male del secolo.

Sebbene tanto si stia facendo per combattere questa terribile malattia, il cancro rappresenta una tra le prime cause di morte dell'intero pianeta. Il tasso di sopravvivenza nei paesi più industrializzati, infatti, supera di poco il 50% ed è quasi totalmente riferibile ai casi di patologia diagnosticata precocemente, ovvero in stadi iniziali.

Lo stesso presidente statunitense Richard Nixon ne comprese presto la gravità e nel 1971 dichiarò, con il *National Cancer Act*, guerra a questa terribile piaga, invitando il *Public Service Health Act* ed il *National Cancer Institute* ad intensificare i propri sforzi nella direzione di “collezionare, analizzare e diffondere informazioni utili alla prevenzione, diagnosi e trattamento del cancro”, inclusa la creazione di una banca dati internazionale che potesse essere messa a disposizione di chiunque fosse coinvolto nella ricerca sul cancro (Figura 1.1).

---

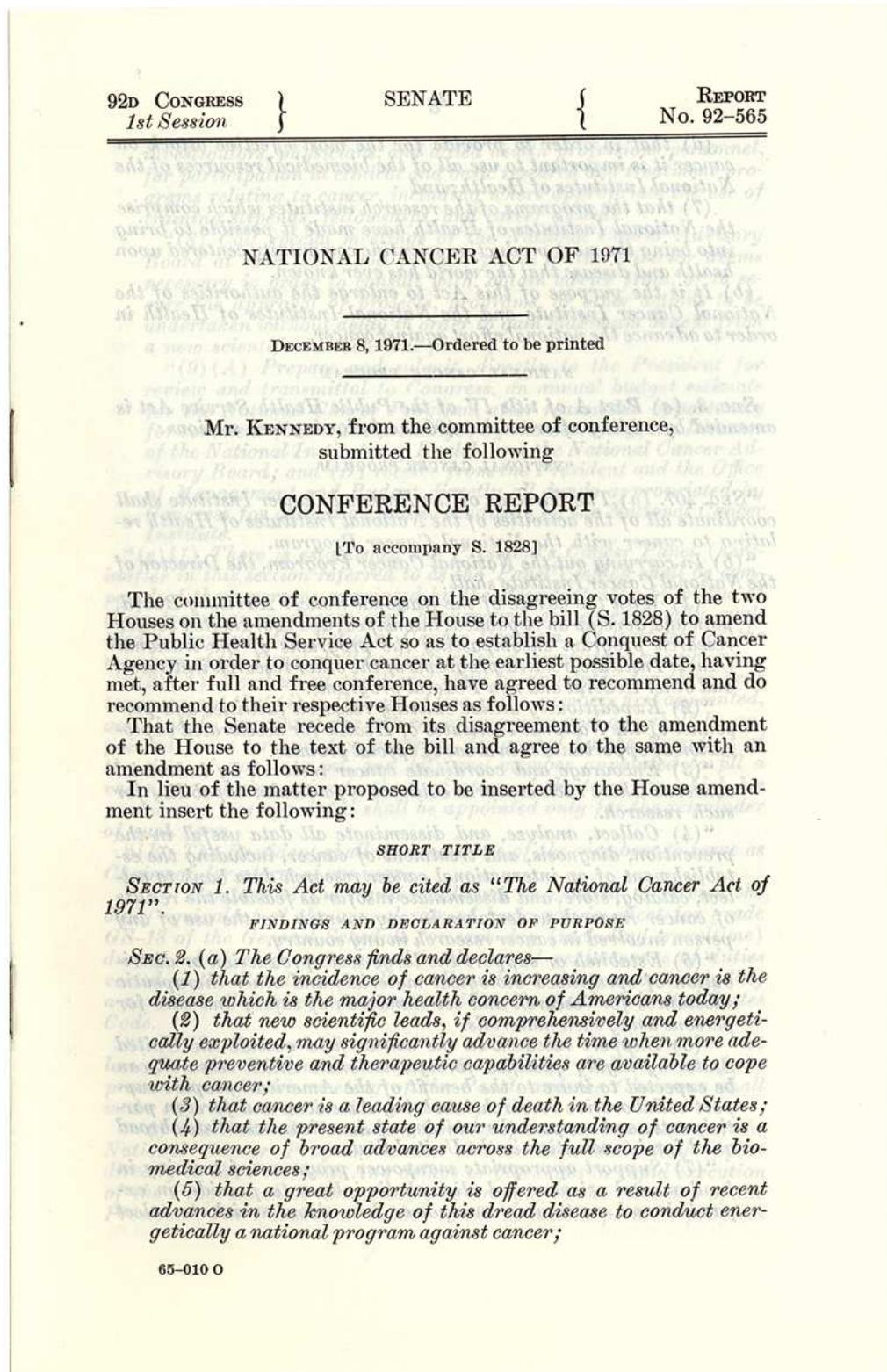
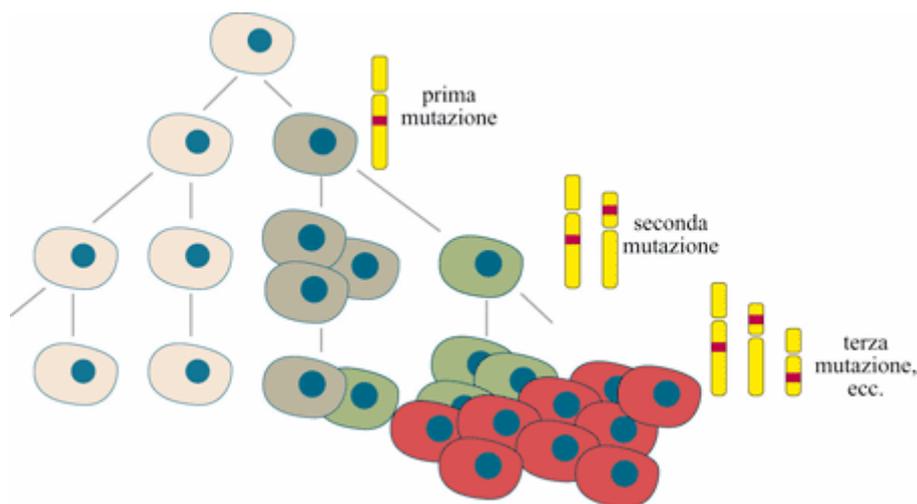


Figura 1.1 -Estratto del verbale del National Cancer Act del 1971.

Questo monito sembra essere stato accolto dalla comunità scientifica tutta, che, a partire dagli anni '60, ha prodotto un'enorme mole di lavoro accrescendo le conoscenze sui tumori, sulle cause che li originano e sul loro meccanismo d'azione e propagazione, nonché sviluppando terapie farmacologiche e chirurgiche atte a contrastarli.

### 1.2 Cosa sono i tumori?

Con il termine tumore (dal latino *tumor*, rigonfiamento) si definisce un'intera classe di malattie caratterizzate da un'incontrollata proliferazione di alcune cellule dell'organismo che smettono di rispondere ai meccanismi fisiologici di controllo cellulare a seguito di danni al loro patrimonio genetico<sup>1</sup> (Figura 1.2).

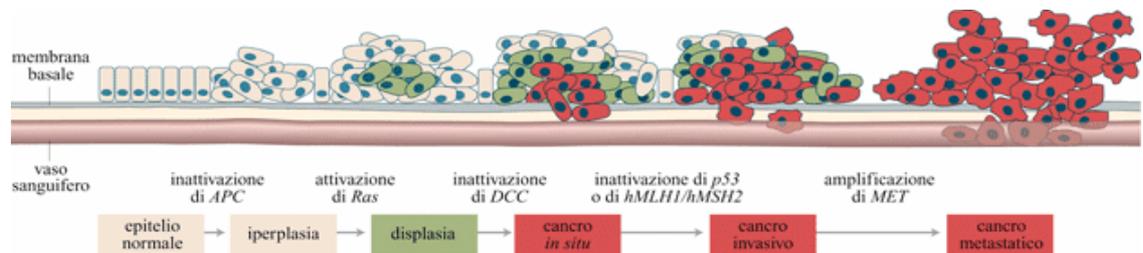


**Figura 1.2** - Rappresentazione schematica della selezione clonale delle cellule neoplastiche. La trasformazione maligna avviene attraverso l'accumulo di mutazioni trasmesse dalla cellula madre alla cellula figlia. Ciascuna mutazione, rappresentata come un rettangolo rosso all'interno di un cromosoma (in giallo), conferisce un vantaggio selettivo. La cellula mutata espande la propria progenie a scapito delle altre e il clone assume caratteri sempre più maligni, fino a dar luogo al cancro (cellule rosse).

In base all'entità del danno esibito dal DNA delle cellule che li costituiscono e quindi al loro comportamento biologico, i tumori sono suddivisi in benigni e maligni. Laddove le cellule delle forme benigne, pur esibendo autonomia moltiplicativa, mantengono in parte le proprie caratteristiche morfologiche e funzionali, le cellule maligne appaiono

morfologicamente e fisiologicamente diverse dalle corrispondenti normali, e tanto più risultano indifferenziate maggiormente sarà spiccata l'atipia.

Dal punto di vista patologico, laddove i tumori benigni sono caratterizzati da uno sviluppo di tipo espansivo, costituiti cioè da masse che si accrescono comprimendo i tessuti vicini senza, però, invaderli; i tessuti prossimi ai tumori maligni (detti cancro) vengono invariabilmente infiltrati e distrutti dalle cellule cancerose che si sostituiscono a quelle sane. Questo fenomeno detto di invasività neoplastica, caratteristico della malignità del tumore, non si arresta neanche in prossimità delle pareti dei vasi sanguigni e linfatici, al contrario, la malattia sfrutta queste autostrade del corpo umano per invaderlo totalmente dando il via alla formazione delle metastasi<sup>2</sup> (figura 1.3).



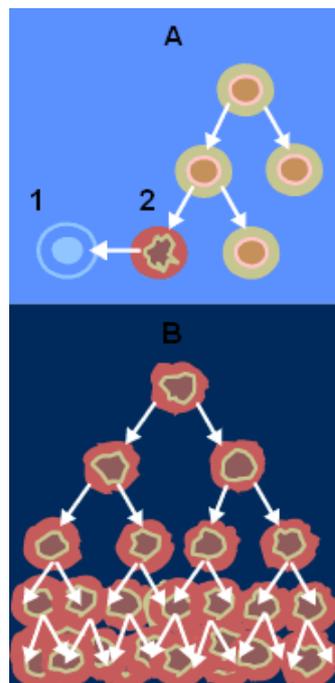
**Figura 1.3** - Stadi evolutivi di un tumore di origine epiteliale. Le cellule dell'epitelio normale aumentano di numero e vanno incontro a progressive alterazioni morfologiche e comportamentali (indicate con il cambiamento di colore della popolazione cellulare predominante). Il passaggio da displasia a cancro comporta l'assunzione della capacità di attraversare la membrana basale (indicata in grigio) e di superare i confini tissutali. Le cellule cancerose invadono i vasi sanguiferi e ne escono per formare tumori secondari a distanza (metastasi).

In ogni caso tutte le cellule delle masse cancerose originano da una singola cellula madre mutata e condividono con questa l'esatta forma di danno genetico sia che esso coinvolga i geni proto-oncogeni, gli oncosoppressori o quelli deputati alla riparazione del DNA.

Sebbene i tumori possano colpire i diversi tessuti dell'organismo umano dando origine ad una grande varietà di patologie con caratteristiche proprie (differente evoluzione, sintomatologia, ecc.), i dati sperimentali sinora acquisiti hanno permesso di identificare alcuni aspetti generali comuni a tutte le forme tumorali conosciute:

- acquisizione dell'autonomia moltiplicativa per sopravvenuta incapacità a sottostare ai meccanismi regolatori della proliferazione cellulare (i danni presenti nel DNA delle cellule cancerose le rendono inabili a rispondere ai normali stimoli fisiologici, dando il via a processi riproduttivi aberranti);

- assenza di inibizione dipendente dalla densità (le cellule normali si moltiplicano sino ad una definita densità cellulare, raggiunta la quale divengono quiescenti);
- riduzione o perdita della capacità differenziativa (le cellule posseggono un determinato patrimonio genetico (genoma) che ne definisce l'identità (genotipo) e che può essere espresso o meno. La capacità differenziativa è quel meccanismo evolutivo che consente alle cellule di rendere evidente il proprio genotipo (ovvero manifestare il proprio fenotipo);
- angiogenesi (la diffusione della malattia è agevolata da processi di formazione di nuovi vasi sanguigni che forniscono ossigeno e fattori nutritivi alle cellule tumorali);
- Riduzione o perdita della capacità di andare incontro a morte cellulare programmata (inibizione dei meccanismi di apoptosi)<sup>3,4,5</sup> (Figura 1.4).



**Figura 1.4**-a) funzionamento normale: le cellule alterate vanno incontro ad apoptosi. B) apoptosi inibita: riproduzione incontrollata.

Conseguenza delle succitate anomalie è il costante aumento del numero di cellule cancerose, a causa dell'incrementata velocità di riproduzione, che crea uno squilibrio del ciclo cellulare: le cellule cancerose si riproducono più velocemente di quanto non muoiano.

Quando le normali cellule sono danneggiate, esse vengono eliminate mediante apoptosi. Le cellule cancerose evitano l'apoptosi e continuano a riprodursi in maniera irregolare.

In generale la crescita dei tumori segue una legge geometrica: si accrescono molto lentamente all'inizio, per poi accelerare con l'aumentare della massa. Solo al raggiungimento della dimensione critica di un centimetro cubo compaiono, statisticamente, i primi sintomi e solo se questi ultimi non vengono sottovalutati è

possibile, attraverso visite ed analisi mediche specifiche (es: ricerca dei *markers* tumorali), giungere ad una diagnosi precoce e cominciare le terapie del caso.

### 1.2.1 Le terapie

La ragione principale che rende il cancro una malattia così ostica è dovuta all'incapacità del sistema immunitario di distinguere le cellule tumorali da quelle sane e di reagire di conseguenza alla loro presenza.

Nello sviluppo di un'adeguata terapia, quindi, sarebbe necessario ricercare una qualsiasi caratteristica che consenta di discriminare tra le cellule sane e quelle malate al fine di elaborare una cura che agisca selettivamente su queste ultime.

A parte la soluzione chirurgica (attualmente la più efficace, ma non sempre applicabile), consistente nell'asportazione fisica delle neoplasie, le terapie maggiormente adoperate sono la radioterapia e la chemioterapia.

La radioterapia sfrutta la grande velocità di riproduzione delle cellule tumorali che le rende maggiormente vulnerabili, rispetto ai tessuti sani, al bombardamento con raggi gamma.

La chemioterapia consiste, invece, nella somministrazione di sostanze antimitotiche per ostacolare la proliferazione cellulare e di conseguenza l'estendersi del cancro.

Queste terapie, spesso adoperate in combinazione tra di loro, hanno lo scopo comune di eliminare il maggior numero di cellule maligne possibile e, sebbene in diversi casi facciano registrare risposte positive (guarigione/rallentamento della malattia), risultano tutte altamente debilitanti per l'organismo che spesso è già fortemente provato dalla stessa malattia.

Un approccio più recente, ed al contempo più interessante e promettente è quello di agire sui meccanismi di controllo epigenetico.

### 1.3 L'era post-genomica

Il secolo scorso ha rappresentato un periodo di intensa ed estremamente florida ricerca nel campo delle scienze biologiche che ha toccato il proprio culmine con il

sequenziamento, praticamente completo, del genoma di alcuni procarioti ed eucarioti e la convinzione che le caratteristiche di un determinato organismo fossero totalmente ed unicamente dettate dal proprio DNA.

Ben presto, però, è risultato evidente che la sola conoscenza della sequenza genica di un determinato organismo non fosse sufficiente a spiegarne le caratteristiche e la complessità.

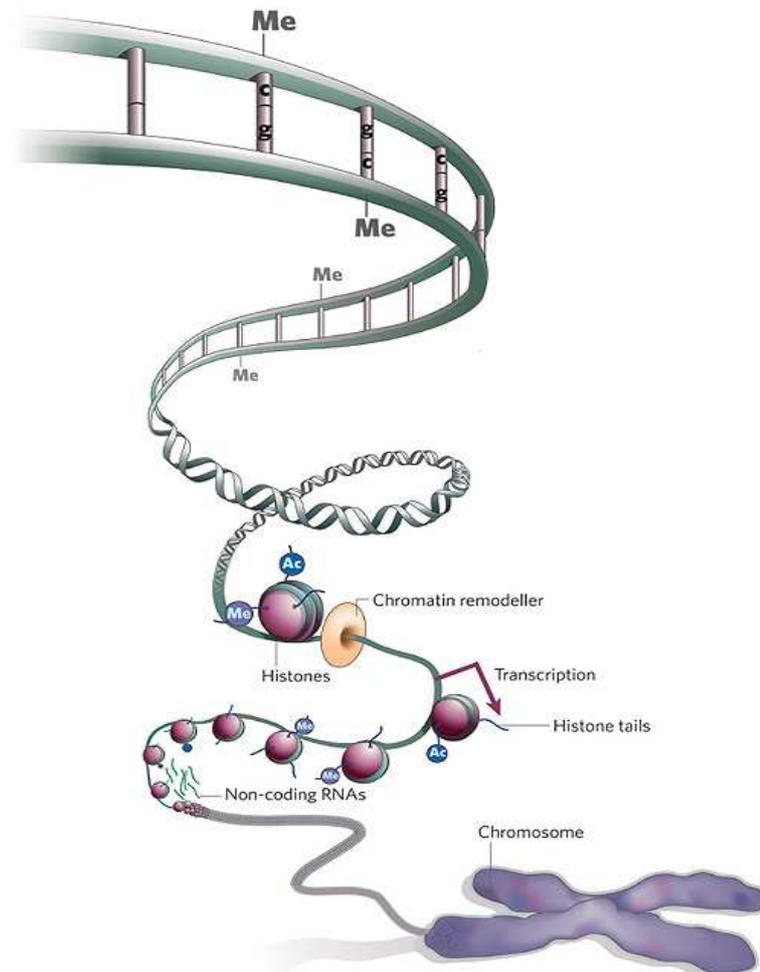
Il confronto, infatti, tra i genomi sequenziati del lievito *Saccharomyces*, del nematode *Caenorhabditis elegans* e del moscerino *Drosophila melanogaster*, per i quali sono state distinte rispettivamente 4383, 9453 e 8065 proteine codificate (geni), pone bene in evidenza come un organismo complesso quale il moscerino *Drosophila* abbia un DNA meno complesso del verme *Caenorhabditis* ed un numero di geni appena doppio rispetto a quelli del lievito<sup>6</sup> (Figura 1.5).



**Figura 1.5**-a) lievito *Saccharomyces*. b) verme *Caenorhabditis elegans*. c) moscerino *Drosophila melanogaster*.

Il successivo esame delle proteine prodotte ha evidenziato il maggior numero di proteine multidominio contenute nella *Drosophila* rispetto a quelle presenti nel verme, portando alla conclusione che le caratteristiche di un organismo non dipendono solo dal suo numero di geni, ma anche dal tipo di proteine espresse e dalle interazioni proteina-proteina e proteina-DNA che in esso si instaurano.

Alla luce di quanto detto, appare chiaro, che la mera conoscenza delle sequenze geniche non costituisce un'informazione sufficiente per l'elaborazione di terapie efficaci per la cura di patologie di carattere genetico quale i tumori, occorre, invece, conoscere il modo tramite i quali il genoma opera. Sebbene le semplicistiche visioni che identificano un gene con l'espressione di una proteina siano state accantonate, il complesso sistema che regola il *modus operandi* del DNA non è ancora ben chiaro ed è tutt'ora oggetto di studio (Figura 1.6).



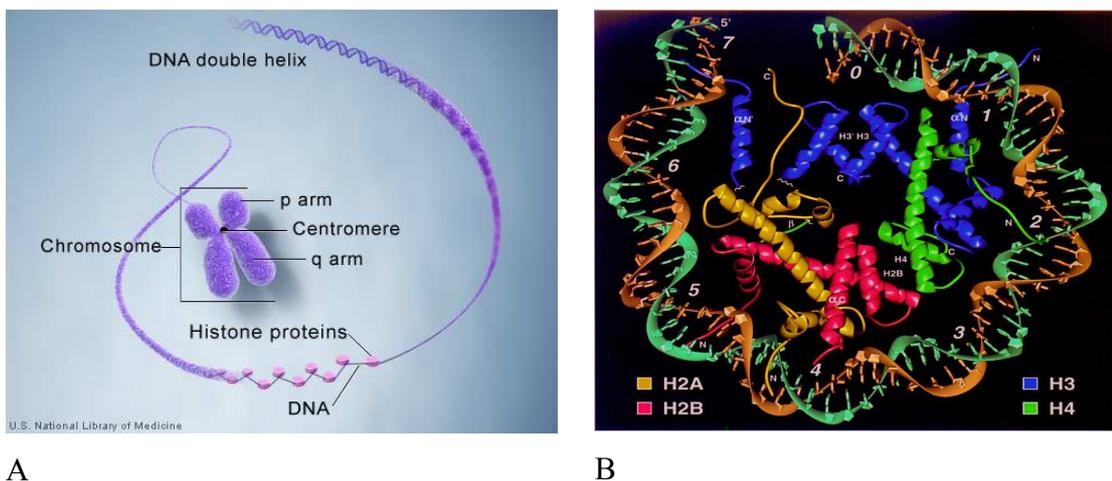
**Figura 1.6-** Illustrazione del meccanismo di controllo epigenetico a livello istonico.

Certo è che per esplicitare le proprie funzioni il DNA deve sottostare ad una complessa serie di meccanismi che vedono interazioni tra proteine, proteine e doppia elica e piccole modifiche del materiale genetico che, non alterando la sequenza nucleotidica (metilazioni, acetilazioni, fosforilazioni), di fatto modulano l'attività dei genomi, riducendo o aumentando l'accessibilità degli organi di trascrizione ai loro *targets*<sup>7</sup>. In parole povere non è sufficiente che il DNA contenga determinate informazioni, è necessario che tali informazioni siano rese disponibili. Il complesso sistema che regola l'accessibilità o meno ad una determinata informazione contenuta nel genoma è detto controllo epigenetico.

### 1.3.1 Cromatina e controllo epigenetico

Sono stati, ormai, riconosciuti diversi meccanismi epigenetici e tra questi probabilmente il più importante e tutt'ora indagato è rappresentato dalla condensazione della cromatina all'interno della cellula.

Il DNA degli eucarioti è, infatti, condensato in strutture compatte dette nucleosomi che, consistenti in piccoli filamenti di DNA (146 coppie di basi) raggomitolati intorno ad un nucleo proteico formato da otto proteine (istoni), impediscono agli attivatori trascrizionali l'accesso al genoma<sup>8</sup> (figura 1.7).

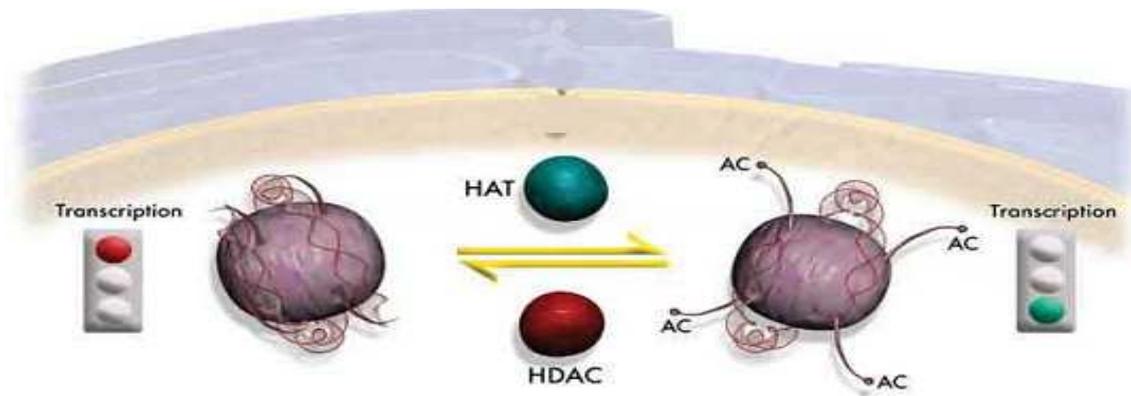


**Figura 1.7-**a) Rappresentazione del compattamento del DNA nella cromatina. b) Nucleosoma: avvolgimenti di DNA intorno al nucleo istonico

Recenti studi hanno mostrato che le modificazioni reversibili (acetilazione, metilazione, etc.) dei residui lisina delle catene *N*-terminali degli istoni, giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi di trascrizione genica. Il meccanismo di controllo epigenetico più studiato in questo senso e, forse, meglio compreso è quello di acetilazione/deacetilazione degli istoni operato dagli enzimi istone acetil-transferasi (Histone Acetyl-Transferase HATs) e gli istoni de-acetilasi (Histone De-Acetylase HDACs)<sup>9</sup>.

L'acetilazione di queste proteine, infatti, per via della destabilizzazione sia delle interazioni inter-nucleosomali che delle interazioni elettrostatiche tra i residui istonici

lisina e i gruppi fosfato della doppia elica del DNA, facilita l'accesso degli attivatori trascrizionali e attiva l'espressione genica (Figura 1.8).



**Figura 1.8-** Meccanismo di attivazione dei processi di trascrizione ad opera degli HATs e degli HDACs.

Sebbene un'evidenza diretta del legame tra il malfunzionamento di questi enzimi ed il processo di patogenesi di disturbi di origine genetica non sia stato ancora dimostrato, livelli anomali degli HDACs sono spesso associati a numerosi tipi di cancro. È un dato di fatto, inoltre, che l'inibizione dell'attività degli HDACs, per mezzo di piccole molecole, induca arresto della crescita<sup>10,11</sup>, differenziazione<sup>12</sup> e/o apoptosi<sup>13</sup> delle cellule cancerose sia *in vivo* che *in vitro*, aspetto, questo, che li rende interessanti *targets* terapeutici<sup>14</sup>.

### 1.4 HDACs

Gli HDACs sono una famiglia di enzimi presenti in batteri, funghi, piante ed animali che influenzano profondamente le funzioni cellulari catalizzando la rimozione di gruppi acetile da residui lisina  $\epsilon$ -N-acetilati di diversi substrati proteici compresi istoni, fattori di trascrizione,  $\alpha$ -tubulina e regolatori di ingresso nucleare.

Nell'organismo umano sono stati individuati 18 diversi HDACs e sebbene il ruolo specifico (di ognuno di essi) dei diversi isoformi non sia stato ancora completamente chiarito, la varietà dei substrati, la diversa collocazione all'interno dell'organismo e le

differenze strutturali suggeriscono l'espletamento di funzioni non ridondanti tra di loro<sup>15</sup>. È possibile dividerli per omologia in quattro diverse classi, di cui tre (classi I, II e IV) Zn-dipendenti ed una (classe III) NAD-dipendente:

- La classe I include Gli HDACs 1,2,3 e 8 che sono localizzati all'interno del nucleo cellulare;
- La classe II (suddivisa a sua volta in IIA e IIB) comprende gli HDACs 4,5,7,9,6 e 10 che si trovano principalmente nel citoplasma, ma possono muoversi tra citoplasma e nucleo;
- La classe III comprende le sirtuine 1-7, che necessitano di una molecola di NAD per esplicitare le proprie funzioni e non sono generalmente inibite dalle molecole che inibiscono le deacetilasi Zn-dipendenti;
- La classe IV è composta, invece, dal solo HDAC 11 omologicamente diverso dagli altri conosciuti.

Essi hanno il compito di regolare insieme agli HATs l'equilibrio tra la forma acetilata e deacetilata degli istoni e di conseguenza di attivare o meno l'espressione genica. A dispetto, però, dell'iniziale convinzione che vedeva l'attività degli tali enzimi limitata ai residui lisina istonici, un numero sempre crescente di evidenze sperimentali dimostrano che gli istoni de-acetilasi esplicano la propria funzione su numerosi altri substrati proteici: fattori di trascrizione, regolatori di trascrizione, enzimi di riparazione del DNA, regolatori di ingresso nucleare, proteine chaperon, proteine strutturali, mediatori di infiammazione ecc. L'acetilazione di queste proteine, alterandone la stabilità, modifica la loro capacità di interazione con le altre proteine attivando o meno, di conseguenza, importanti meccanismi cellulari. Tutti questi aspetti lasciano intravedere nella modulazione dell'attività di questi enzimi un importante e promettente approccio per il controllo di quei processi epigenetici aberranti associati al cancro ed altri disturbi cronici.

Infatti, l'inibizione dell'attività degli HDACs per mezzo di piccole molecole in grado di sostituirsi ai substrati naturali di questi enzimi bloccandone il sito attivo, ha fatto registrare, come conseguenza dell'accumulo di istoni e proteine non-istoni acetilati, importanti effetti biologici.

Saggi effettuati sia in vivo che in vitro su estratti delle cellule HELA, infatti, hanno dimostrato che gli inibitori degli HDACs (HDACi) possono promuovere in maniera diretta ed indiretta diversi meccanismi biologici:

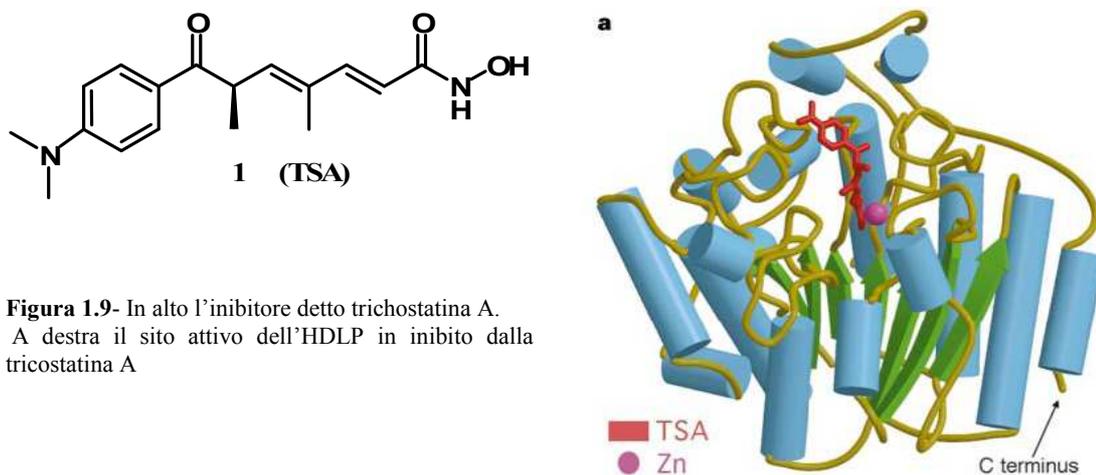
- inducono la morte delle cellule mutate sia nella fase proliferativa che in quella quiescente;
- inducono arresto della crescita del ciclo cellulare sia nelle cellule mutate che in quelle normali;
- attivano i meccanismi di morte programmata (apoptosi) nelle cellule mutate, ma non in quelle sane, regolando sia l'espressione degli attivatori apoptotici che la repressione dei loro antagonisti;
- causano la morte delle cellule cancerose promuovendo meccanismi mitotici difettosi; promuovono la morte per autofagia cellulare;
- inibiscono la migrazione cellulare per mezzo dell'accumulo di tubulina e cortactina acetilate;
- bloccano l'angiogenesi tumorale riducendo l'espressione dei fattori pro-angiogenici.

Per i motivi appena esposti, non sorprende che un gran numero di HDACi strutturalmente diversi siano tuttora oggetto di trials clinici come monoterapia o in combinazione con altri agenti anti-cancro, fornendo, tra l'altro, incoraggianti riscontri nella cura di neoplasie sia solide che ematologiche (leucemia linfatica cronica, linfoma di Hodgkin, disordini mielo-proliferativi, linfoma con cellule di tipo B, linfoma cutaneo con cellule di tipo T, leucemia mieloide acuta, mieloma multiplo, cancro al collo ed alla testa, tumori cerebrali, melanomi, carcinoma polmonare, cancro epatico, carcinoma mammario, cancro ovarico, carcinoma renale, e adenocarcinoma pancreatico)<sup>16</sup>.

### 1.4.1 HDACs: meccanismo di azione e inibitori

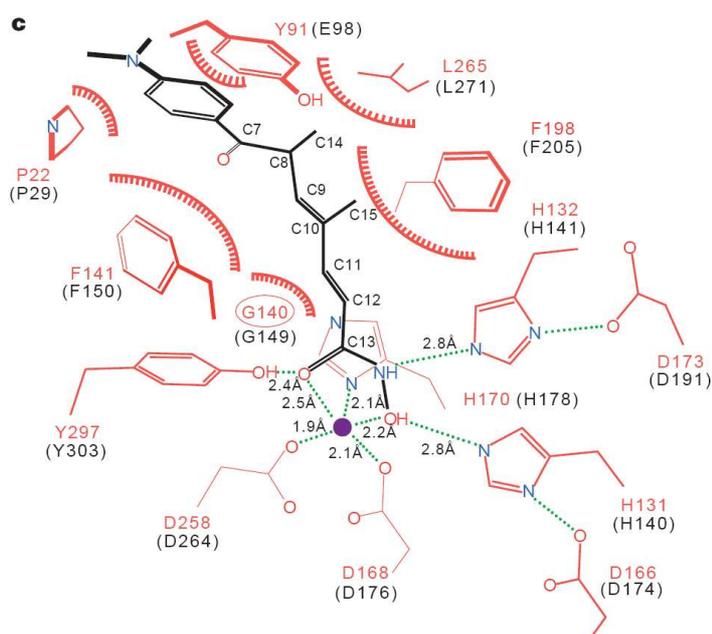
Attraverso l'analisi spettroscopica ai raggi X della struttura cristallina del complesso formato dall'HDLP (*histone-deacetylase-like protein*), omologo batterico degli HDACs, inibito dalla trichostatina A (TSA, **1**), si sono potute evidenziare le interazioni

intercorrenti tra inibitore e sito attivo dell'enzima e si è riuscito ad ipotizzarne il meccanismo d'azione<sup>17</sup> (figura 1.9).



**Figura 1.9-** In alto l'inibitore detto trichostatina A. A destra il sito attivo dell'HDLP in inibito dalla trichostatina A

Gli HDACs presentano tutti un dominio catalitico omologo, strutturalmente composto da una porzione proteica responsabile delle interazioni specifiche con il substrato ed una profonda tasca idrofobica nella quale penetra la catena laterale acetilata della lisina e in cui trova alloggio un atomo di Zn legato ad alcuni residui istidina ed un aspartato (Figura 1.10).



**Figura 1.10** - Modello delle interazioni del complesso HDLP-trichostatina A.

Questi svolgono la loro attività in maniera simile ad altri enzimi Zn-dipendenti. Lo ione zinco bivalente si comporta come un acido di Lewis coordinando l'ossigeno carbonilico del legame *N*-acetil-ammide dei residui di lisina acetilati (accentuandone il carattere elettrofilo) e favorendo l'attacco da parte di una molecola d'acqua coordinata per mezzo di legami idrogeno ad una coppia istidina-aspartato<sup>18</sup>.

Dallo studio di questo modello è stato possibile, inoltre, delineare le caratteristiche strutturali generali, che devono essere possedute dagli HDACi, per esercitare la desiderata attività inibitrice.

La maggior parte degli inibitori degli istoni-deacetilasi ha generalmente in comune tre caratteristiche strutturali<sup>19</sup> (Figura 1.11):

- una porzione idrofobica e/o proteica, detto *capping group*, responsabile delle interazioni con la porzione proteica dell'enzima prossimale all'ingresso che porta al sito attivo;
- un gruppo funzionale in grado di chelare lo zinco e capace di legare il metallo dell'enzima bloccandone l'attività;
- e una catena alifatica (*linker*), costituita da un numero di cinque o sei unità metileniche che lega i due gruppi funzionali e capace di attraversare il tunnel che conduce al sito attivo.

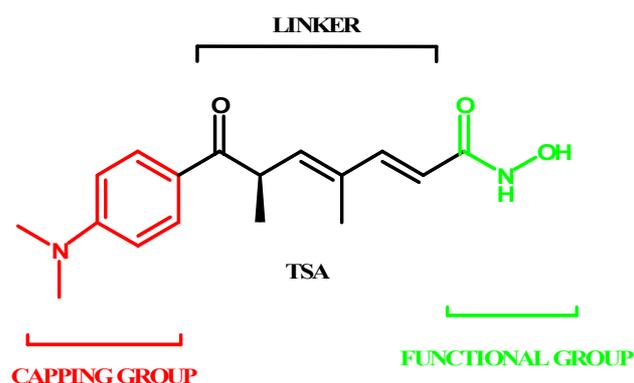


Figura 1.11-Caratteristiche strutturali degli inibitori degli HDACs.

Gli inibitori degli HDACs Zn-dipendenti sono convenzionalmente raggruppati a seconda delle loro differenze strutturali in diverse classi comprendenti: acidi idrossammici,

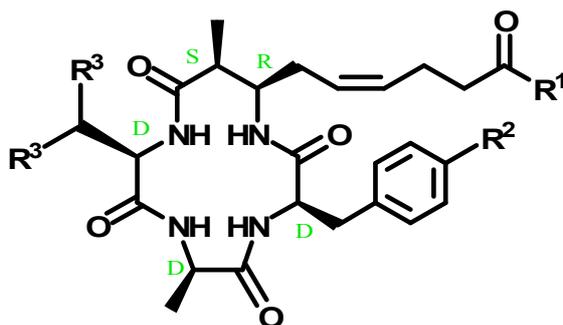
peptidi ciclici, acidi carbossilici, chetoni elettrofilici, brevi catene di acidi grassi e benzammidi<sup>20</sup>.

Laddove gli acidi idrossammici, che meglio bloccano lo ione bivalente  $Zn^{2+}$ , mostrano l'attività più spiccata, i peptidi ciclici, con l'ampia porzione idrofobica che può instaurare estese interazioni con la parte dell'enzima deputata al riconoscimento molecolare, sembrano essere i più promettenti nello sviluppo di HDACi selettivi.

### 1.5 Azumammidi

Negli anni più recenti gli invertebrati marini si sono rivelati la più interessante risorsa di metaboliti secondari biologicamente attivi. Tra le affascinanti strutture riconducibili a questa classe animale i peptidi ciclici hanno evidenziato le più spiccate e selettive capacità antimitotiche per lo sviluppo di nuovi agenti anticancro.

Non sorprende, quindi, che proprio una ricerca svolta da Fusetani e collaboratori su un campione di 167 invertebrati dei mari del Giappone abbia condotto all'isolamento dalla spugna *Mycale izuensis*, dei cinque ciclopeptidi battezzati azumammidi<sup>21</sup> (2-6) (Figura 1.12).



		R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)*
azumammide	A (2)	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	0.045
	B (3)	NH <sub>2</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	0.11
	C (4)	OH	OH	CH <sub>3</sub>	0.11
	D (5)	NH <sub>2</sub>	H	H	1.3
	E (6)	OH	H	CH <sub>3</sub>	0.064

Figura 1.12-Azumammidi: strutture e attività \*(Concentrazione necessaria a dimezzare l'attività enzimatica)

Le azumammidi appartengono al gruppo di inibitori degli HDACs caratterizzati da un nucleo ciclotrapeptidico. Esse sono strutturalmente costituite da quattro residui amminoacidici non ribosomiali, tre dei quali sono  $\alpha$ -*D*-amminoacidi (*D*-Phe, *D*-Tyr, *D*-Ala, *D*-Val) ed il quarto è un inusuale  $\beta$ -amminoacido assegnato come (*Z*,*2S*,*3R*)-3-ammino-2-metil-5-nonenedioic-9-ammide nelle azumammidi A **2**, B **3** e D **5** e come acido (*Z*,*2S*,*3R*)-3-ammino-2metil-5-nonenedioioico nelle azumammidi C **4** ed E **5**.

La loro ampia porzione idrofobica garantisce estese interazioni con la parte proteica prossimale all'ingresso che conduce al sito attivo dell'enzima (responsabile del riconoscimento molecolare) lasciando intravedere la possibilità di un'elevata selettività<sup>22</sup>. Inoltre i test effettuati su enzimi istone-deacetilasi estratti da cellule HELA ne hanno evidenziato la potente attività, registrata già a concentrazioni micromolari.

Valide strategie sintetiche, improntate su un approccio di tipo convergente con la preventiva sintesi del  $\beta$ -amminoacido inusuale accoppiato poi con il tripeptide preformato, sono state recentemente descritte in letteratura ed hanno condotto alle due forme più attive delle azumammidi: le azumammidi A **2** ed E **6**<sup>23,24</sup>. Benché vincenti queste strade sintetiche sono state fortemente limitate dalla lunga e laboriosa sintesi del  $\beta$ -amminoacido che ha inevitabilmente fornito rese molto basse. Da qui l'idea di elaborare degli analoghi di questi metaboliti naturali che potessero risultare più facilmente accessibili.

### 1.6 Obiettivi

Lo scopo di questo lavoro è l'elaborazione e la sintesi di analoghi delle azumammidi che possano essere sinteticamente più accessibili dei corrispettivi naturali e che al contempo ne conservino la preziosa attività biologica.

All'atto della progettazione di nuovi inibitori degli HDACs, benché derivati dai succitati metaboliti secondari, è necessario rifarsi a tutte le informazioni disponibili a riguardo e stabilire quali siano i requisiti strutturali indispensabili alla molecola per esibire la desiderata attività e quali, invece, possano essere modificati al fine di ridurre gli stadi sintetici occorrenti al suo ottenimento.

Sebbene come descritto in precedenza sia ormai acclarata l'indispensabile presenza di un gruppo chelante per lo zinco e ci siano forti evidenze del ruolo giocato dall'orientazione tridimensionale dello scheletro tetrapeptidico per il riconoscimento molecolare, la conoscenza delle interazioni legante-enzima si limitano a piccole molecole inibitrici<sup>25</sup>. Le scarse informazioni relative alle interazioni tra l'enzima e il nucleo ciclotetrapeptidico hanno reso necessario, quindi, uno studio preventivo volto a chiarire i dettagli molecolari della formazione del complesso azumammide-enzima.

A tal fine sono state elaborate due varianti stereochimiche dell'azumammide E **6**: la (2*S*,3*R*)-azumammide E **7** e la (-)-azumammide E **8** adoperate per studi di interazione con l'enzima e sottoposte a saggi di attività biologica (Figura 1.13).

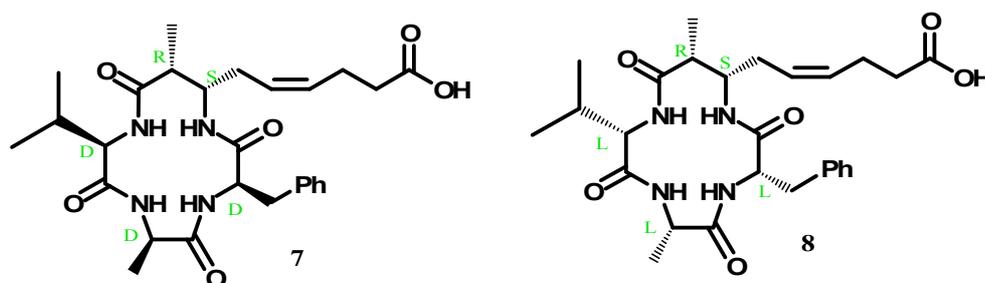
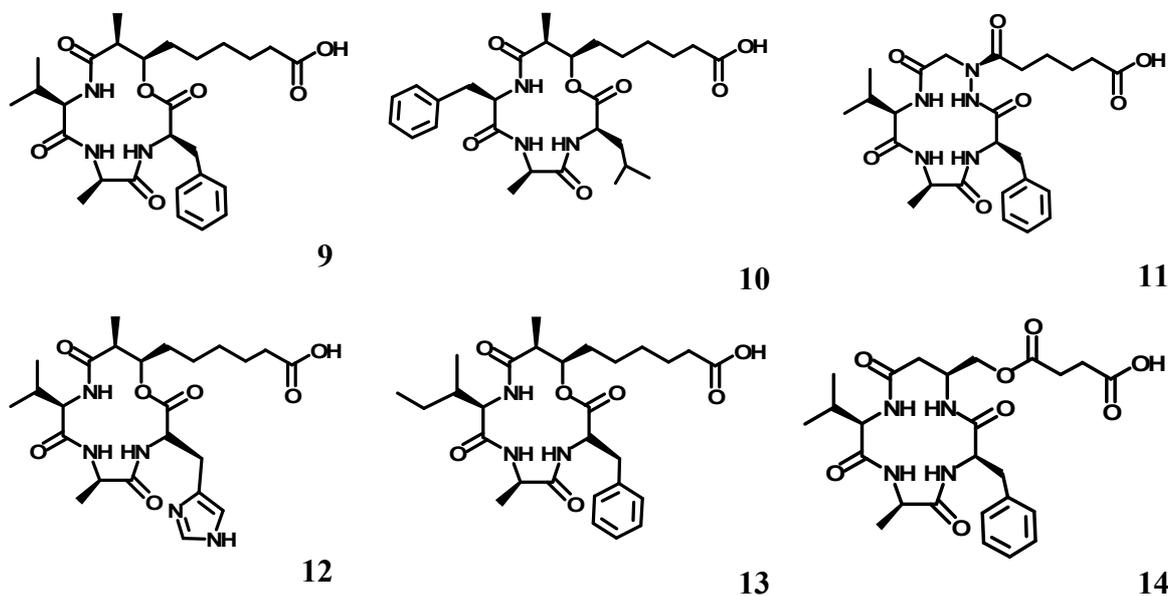
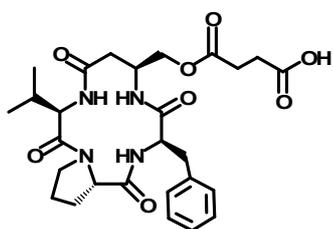


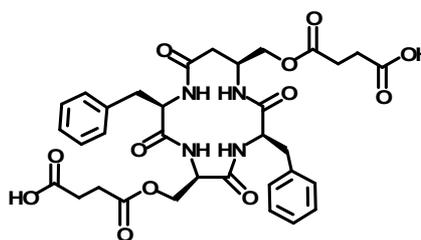
Figura 1.13-Varianti stereochimiche della (+)-azumammide E.

Conoscendo, quindi, le richieste strutturali delle azumammidi si è proceduto alla formulazione di una piccola libreria di molecole strutturalmente derivate dai ciclotetrapeptidi di origine naturale (figura 1.14).

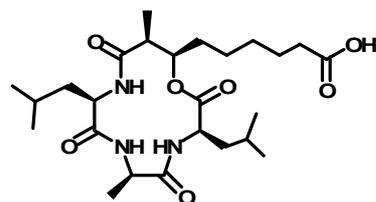




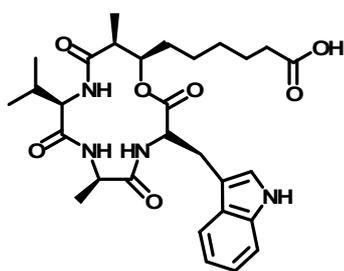
15



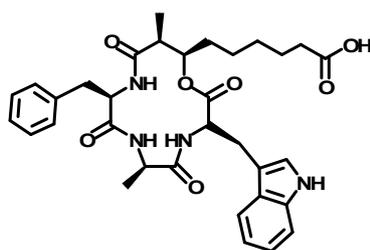
16



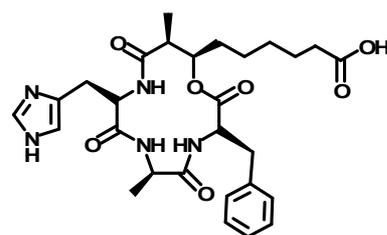
17



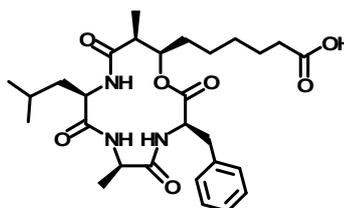
18



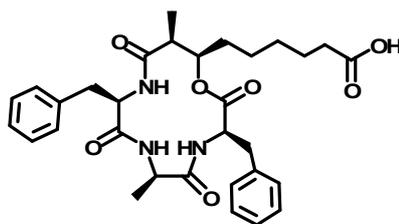
19



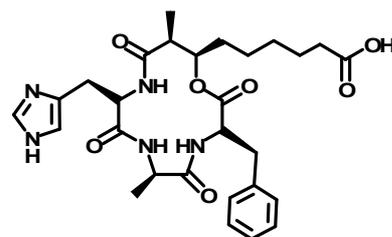
20



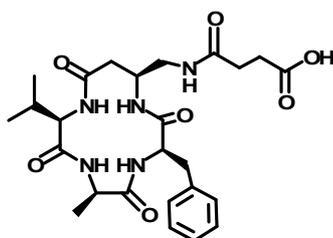
21



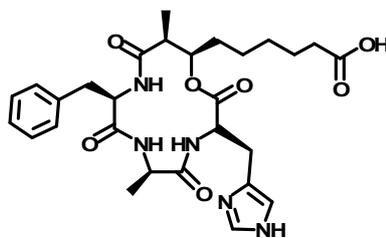
22



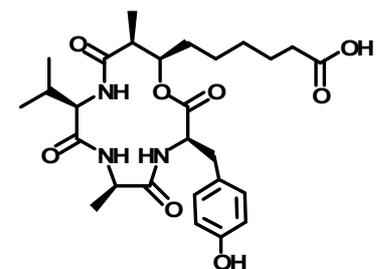
23



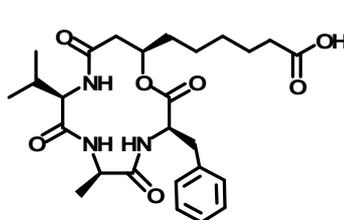
24



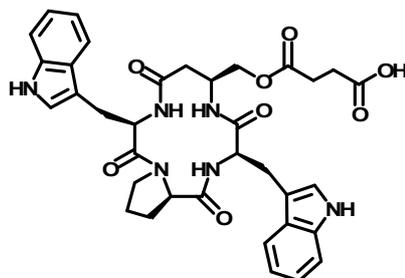
25



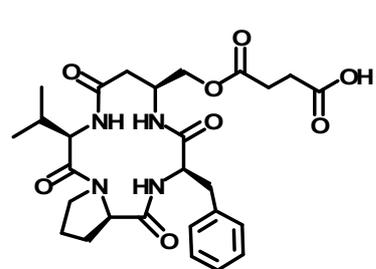
26



27



28



29

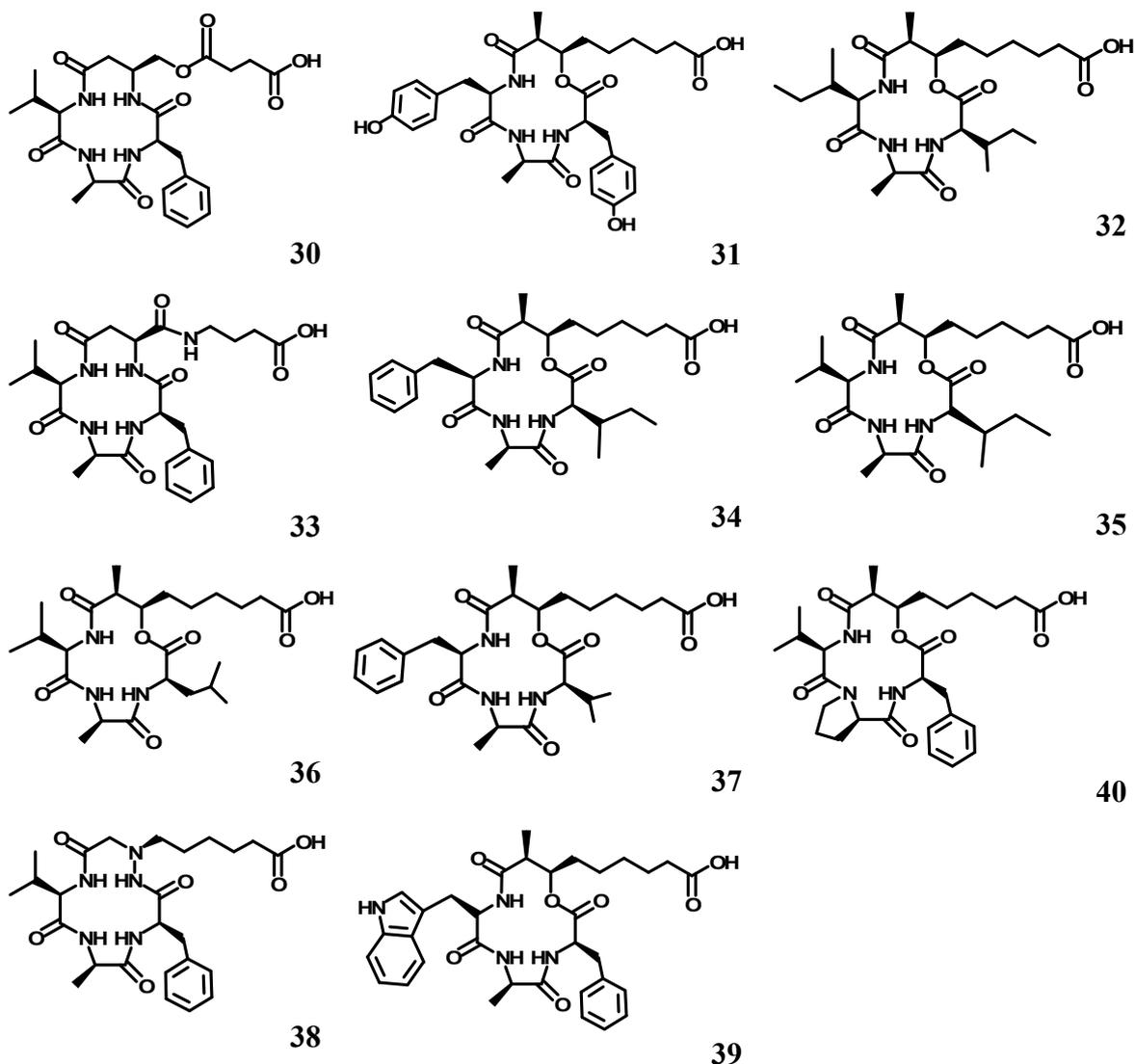
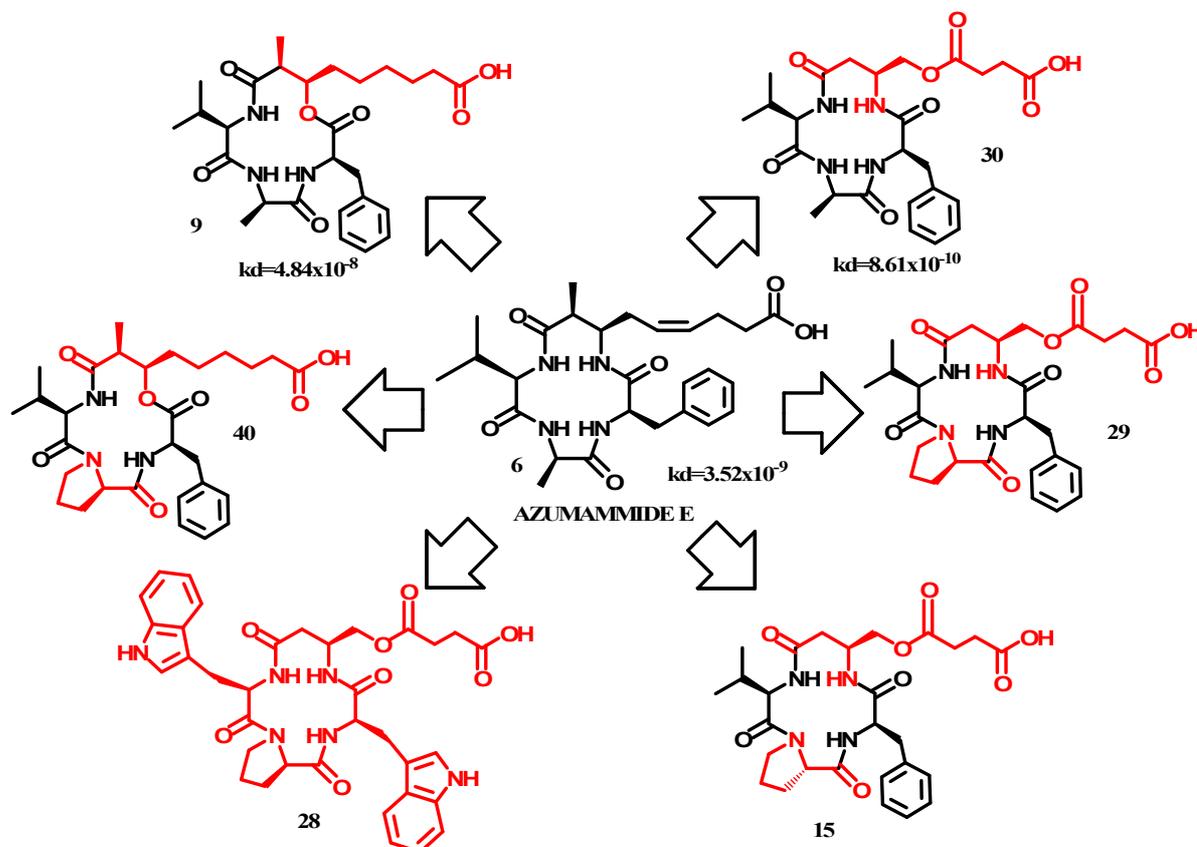


Figura 1.14-Libreria di analoghi delle azumammidi progettati.

Studi di docking effettuati dal prof. Bifulco, afferente al dipartimento di Scienze Farmaceutiche della facoltà di Farmacia dell'Università di Salerno, hanno fornito, in termini di costanti di dissociazione dei complessi formati dalle molecole concepite ed il sito attivo dell'HDLP (già adoperato con successo per l'interpretazione dell'attività di diversi inibitori degli HDACs) una previsione teorica dell'attività inibitoria delle strutture disegnate permettendo di scegliere tra queste le più promettenti. Dall'analisi delle costanti di dissociazione calcolate si è ritenuto opportuno concentrare l'interesse sugli analoghi sotto riportati (schema 1.1).



**Schema 1.1**-Strutture per le quali si sono registrati i migliori valori di  $k_d$  teorici. In rosso si evidenziano le modifiche strutturali rispetto al metabolita d'origine.

Oggetto della presente tesi di dottorato è stata, quindi, la sintesi delle molecole presentate, al fine di ricercare delle strutture alternative ai metaboliti naturali che, sinteticamente più accessibili, ne conservino l'interessante attività e consentano di collezionare ulteriori informazioni per lo sviluppo futuro di inibitori selettivi.

## **CAPITOLO 2**

---

---

## 2.1 Studi di interazione azumammide E-enzima

I ciclopeptidi come tutte le altre molecole isolate da fonti naturali rappresentano il risultato ultimo di un continuo e costante processo di ottimizzazione genetica<sup>26</sup>. Risulta, quindi, evidente che anche le più piccole alterazioni di frammenti della loro struttura o della loro stereochimica, possano, in linea di principio, fortemente influire sull'attività biologica mostrata.

Osservando, però, le strutture delle azumammidi e ponendole a confronto con altri inibitori ciclopeptidici naturali (es. trapoxina A<sup>27</sup>(**41**), apidicina D<sub>1</sub><sup>28</sup>, FR-235222<sup>29</sup>, FR-225497<sup>30</sup>, chlamydocina<sup>31</sup>, HC tossina<sup>32</sup>, WF-3161<sup>33</sup>, Cyl-2<sup>34</sup>) degli HDACs emerge un'insolita relazione. Le azumammidi mostrano un arrangiamento retro-enantio rispetto alle altre molecole in esame, ovvero sono caratterizzate da una direzione contraria dei legami peptidici e dalla contemporanea inversione della configurazione assoluta del centro stereogenico recante la catena laterale<sup>35,36,37</sup> (Figura.2.1).

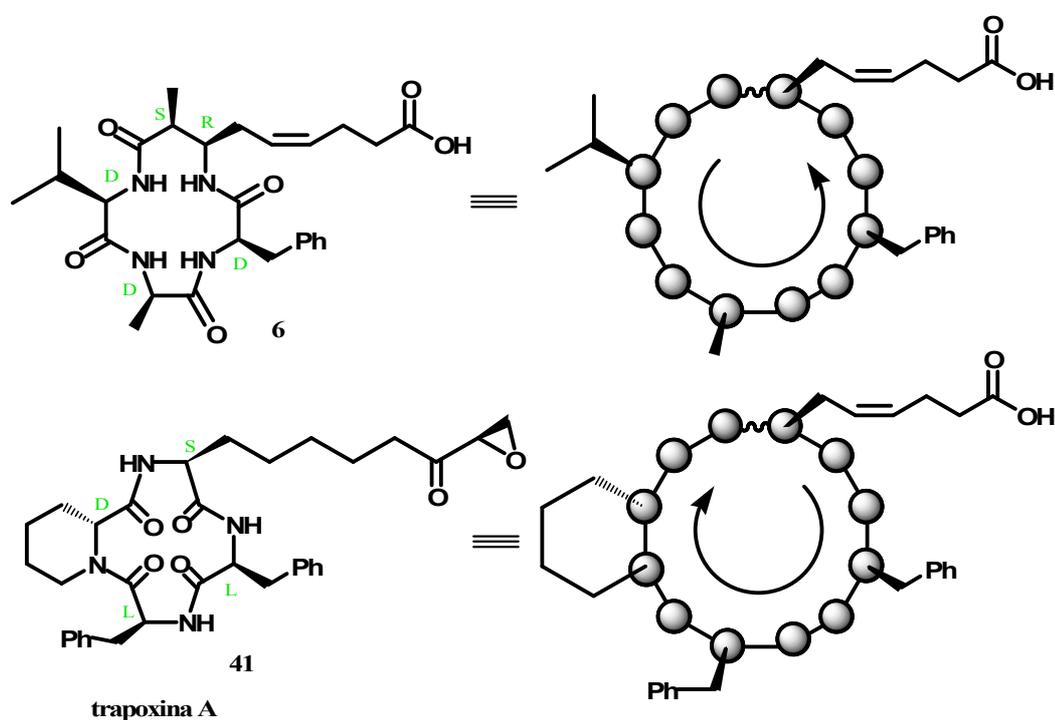


Figura 2.1-Confronto tra le strutture della (+)-azumammide E e la trapoxina A.

Questa inconsueta casualità ha fornito, allora, lo spunto per un'indagine sull'effetto dell'orientazione relativa della catena laterale e sul ruolo della direzione del legame ammidico del nucleo peptidico sull'attività inibitoria delle azumammidi.

Per far luce su questi aspetti si è pensato, allora, di sintetizzare due varianti stereochimiche, opportunamente scelte, della (+)-azumammide E (**6**) naturale:

il diastereoisomero **7** e l'enantiomero **8** da sottoporre a studi di docking e soprattutto a saggi di attività per verificarne l'eventuale perdita di efficienza.

## 2.2 (2*R*,3*S*)-azumammide E

Dall'attenta analisi della struttura del composto **7** emerge che questo conserva, all'interno del ciclo, la stereochimica del metabolita naturale, ma si discosta da quest'ultimo per l'inversione della configurazione assoluta del  $\beta$ -amminoacido inusuale, che risulta pertanto, fuori registro. In altre parole comparando la struttura del nostro *target* sintetico con quella della (+)-azumammide E si nota che la direzione dei legami ammidici del nucleo ciclopeptidico viene conservata, ma che l'orientazione spaziale della catena laterale recante il gruppo funzionale è opposta a quella delle catene degli altri residui amminoacidici che compongono la molecola (Figura 2.2).

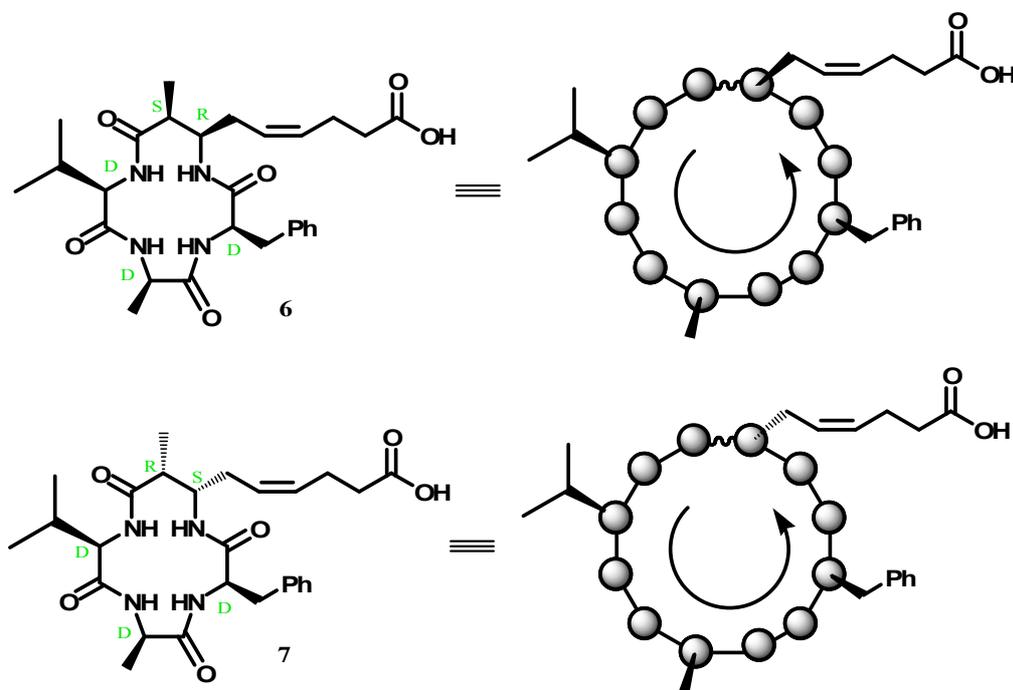


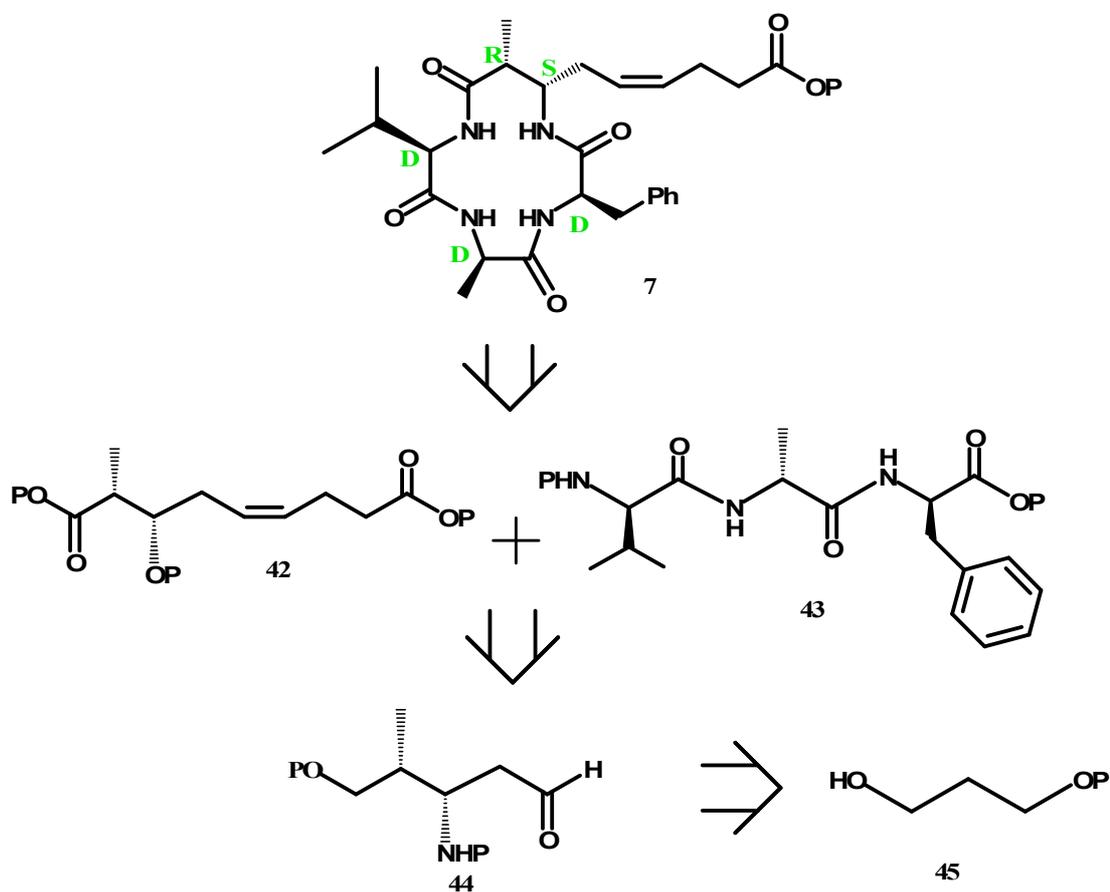
Figura 2.2-Confronto tra la (2*S*,3*R*)-azumammide E e la (+)-azumammide E.

È proprio attraverso questa semplice variazione a permetterci di valutare l'effetto dell'orientazione relativa della catena laterale del  $\beta$ -amminoacido sull'attività dell'inibitore.

### 2.2.1 Schema retrosintetico composto 7

La strategia sintetica per l'ottenimento della (2*R*,3*S*)-azummamide **7** ripercorre la strada sintetica, già riportata in letteratura, che ha condotto alla (+)-azummamide **E**<sup>23</sup>.

Pertanto si è pensato di ottenere il target desiderato seguendo un approccio di tipo convergente per mezzo dell'accoppiamento di due sintoni chiave: il β-amminoacido **42** ed il tripeptide lineare **43**. Il β-amminoacido **42** può essere ottenuto dall'aldeide **44**, a sua volta riconducibile al propandiolo commerciale **45** riportato nello Schema 2.1.

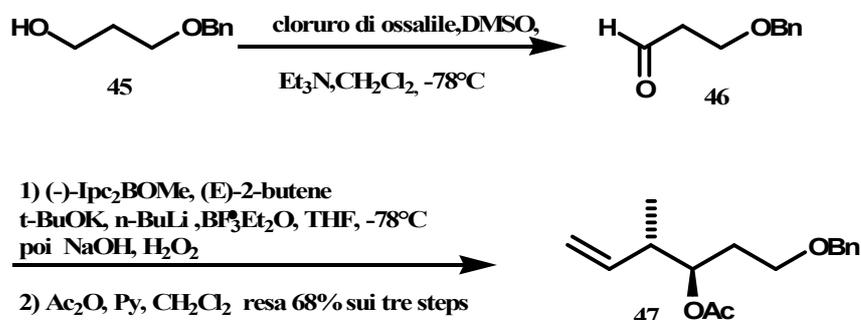


Schema 2.1-Approccio retrosintetico per la sintesi della (2*R*,3*S*)-azummamide **E** 7.

### 2.2.2 Sintesi della (2*R*,3*S*)-azummamide **E** 7: preparazione dell'aldeide **44**

Il 3-benzilossi-propanolo **45**, commercialmente disponibile, viene ossidato in condizioni di Swern<sup>38</sup> a dare l'aldeide **46**. L'acetato omoalilico **47** è stato, quindi

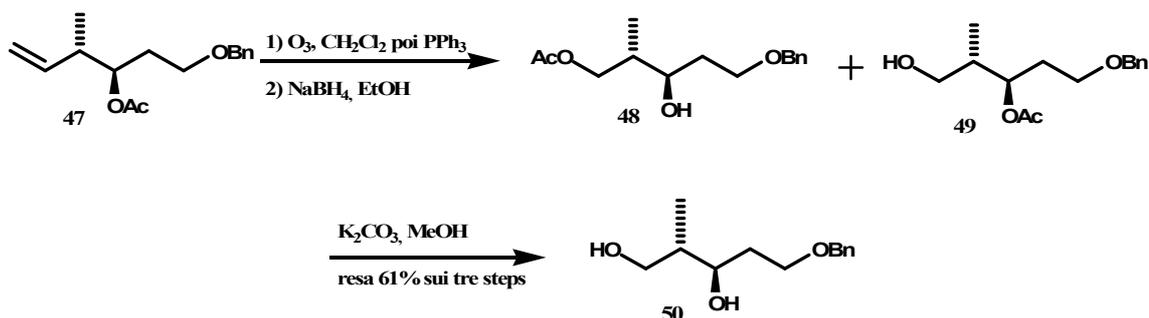
ottenuto attraverso una crotilazione altamente enantio e diastereoselettiva<sup>39</sup> per azione del reagente chirale (-)-(*E*)-crotil-diisopino-camfeilborano sul 3-benzilossi-propanale **46** (Schema 2.2).



Schema 2.2-Sintesi dell'alcol omoallilico **47**

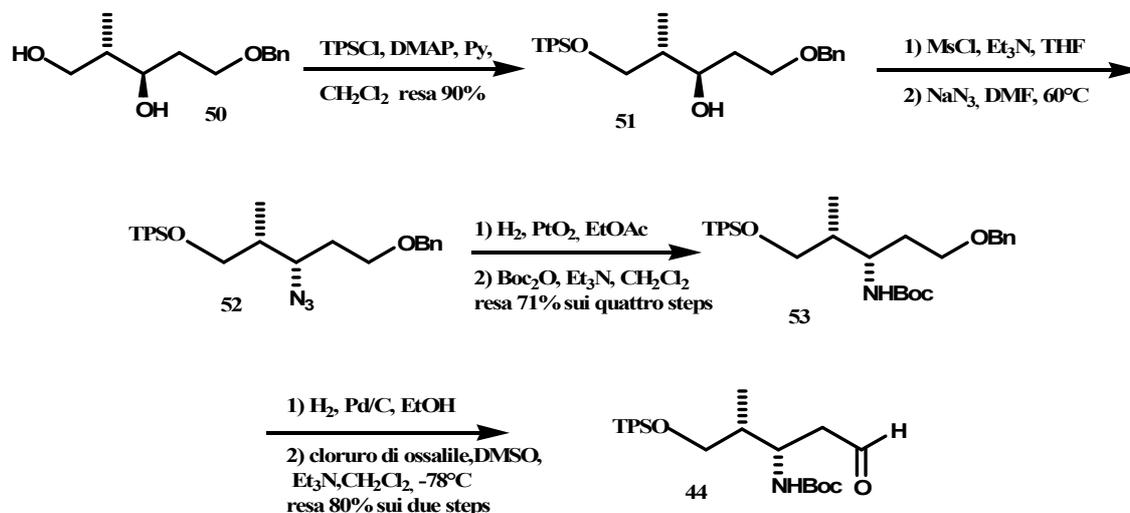
La validità di questa metodica è da ricondursi all'opportunità di ottenere tutti e quattro i possibili diastereoisomeri derivanti dall'introduzione dei due centri stereogenici, in maniera altamente diastereo ed enantioselettiva, grazie alle correlazioni esistenti tra l'enantiomero del diisopinocampfeilborano adoperato e la configurazione dei centri stereogenici dell'alcool prodotto.

L'addotto **47** è stato, poi, sottoposto ad un'ozonolisi riduttiva<sup>41</sup> che ha prodotto la miscela di acetati regioisomerici **48** e **49**, che sono stati, quindi, idrolizzati con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a dare il diolo **50** (Schema 2.3).



Schema 2.3-Sintesi del diolo **50**

L'alcol **51** è stato, quindi, ottenuto con una sililazione regioselettiva e sottoposto, attraverso gli steps di mesilazione, sostituzione nucleofila ad opera del gruppo azide e successiva riduzione, all'amminazione stereospecifica, che seguita dalla protezione col gruppo Boc, ha fornito l'amminodiolo **53** triprotetto in maniera ortogonale (Schema 2.4).



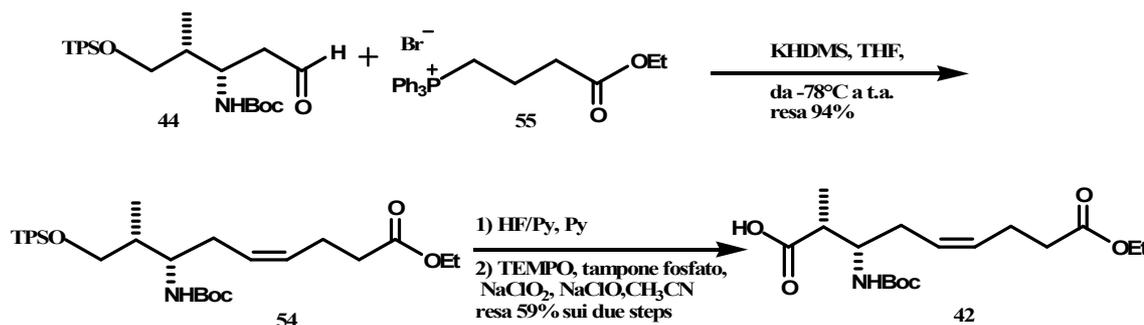
Schema 2.6-Sintesi dell'aldeide 44

L'idrogenolisi del gruppo benzilico mediata da Palladio e la successiva ossidazione di Swern hanno, infine, prodotto in buona resa l'aldeide 44.

### 2.2.3 Sintesi del $\beta$ -amminoacido 42

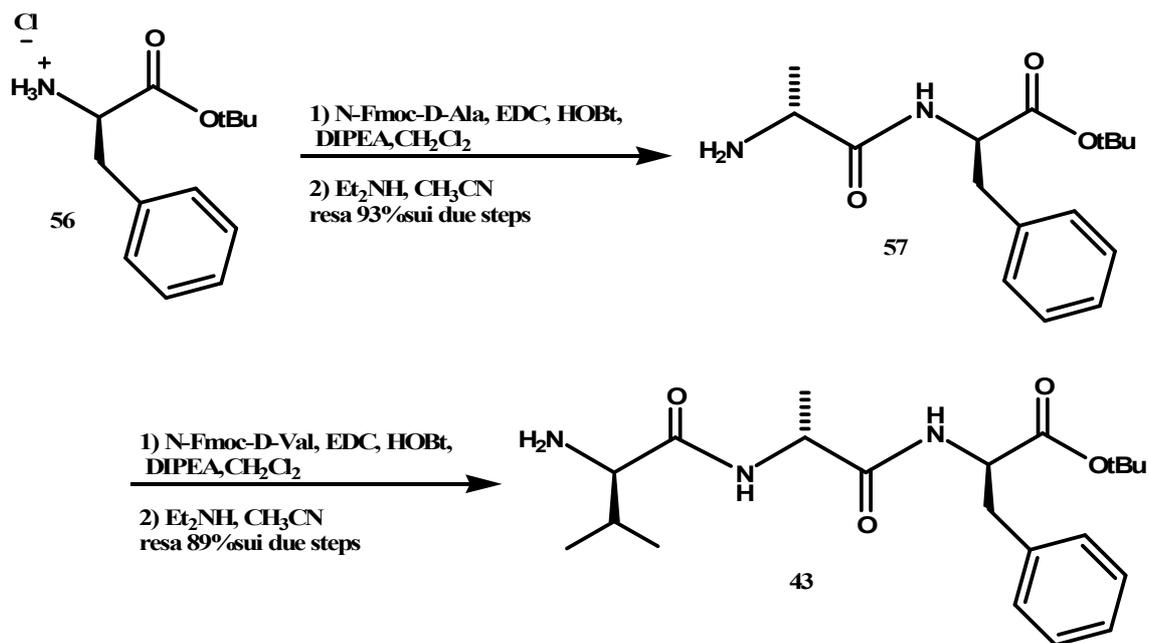
Ottenuta l'aldeide 44 si è finalmente pronti a completare la sintesi del sintone principale: l'estere etilico dell'acido (*Z*,*2S*,*3R*)-3-((*tert*-butilossicarbonil)ammino)-2-metil-5-nonenedioico 42 (Schema 2.7).

L'alchene 54 è stato ricavato dall'introduzione del doppio legame C-C per mezzo di una reazione di Wittig<sup>42</sup> altamente stereo selettiva tra l'aldeide diprotetta 44 e l'iluro formata dal sale di fosfonio 55. L'addotto 54, così ottenuto, è stato desililato ed ossidato<sup>43</sup> a fornire il  $\beta$ -amminoacido 42 buona resa.

Schema 2.7-Sintesi del  $\beta$ -amminoacido 42.

2.2.4 Sintesi del tripeptide NH<sub>2</sub>-Val-Ala-Phe-OtBu 43

Il dipeptide NH<sub>2</sub>-D-Ala-D-Phe-OtBu 57 è stato ricavato, in soluzione, per accoppiamento (e successiva deprotezione chemospecifica) della fenilalanina *terz*-butilprotetta 56 con l'alanina Fmoc-protetta (Schema 2.8).



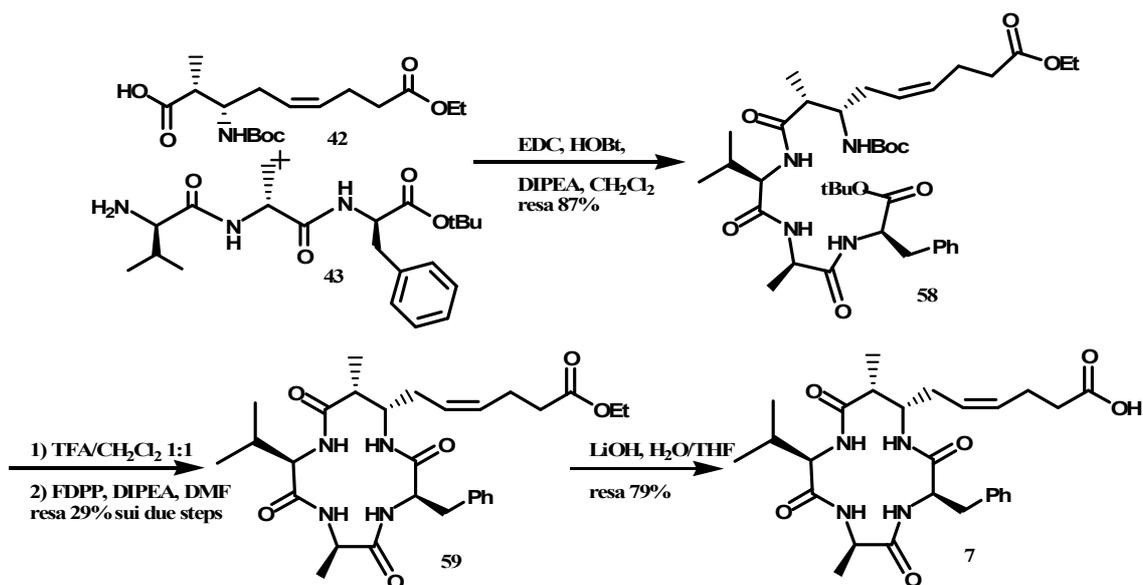
Schema 2.8-Sintesi del tripeptide 43

Il tripeptide 43 desiderato, è stato, quindi, ottenuto similmente per prolungamento della catena con il residuo valina e successiva deprotezione della funzione amminica.

2.2.5 Sintesi della (2*R*,3*S*)-azummamide E 7

Una volta ottenuti i due sintoni 42 e 43 si è sintetizzato il diastereoisomero 7.

Il β-amminoacido 42 è stato accoppiato con il tripeptide 43 a dare il tetrapeptide 58 (Schema 2.9). Le due teste polari sono state liberate in un unico step per trattamento con acido trifluoroacetico e lo zwitterione ottenuto è stato sottoposto a condizioni di macrolattamizzazione<sup>44</sup> per fornire il ciclopeptide C-9 protetto 59. Una semplice idrolisi dell'estere etilico 59 ci ha, quindi, condotto al target prefissato 7.



Schema 2.9-Sintesi del diastereoisomero 7

### 2.3 (-)- azumamide E 8

Essendo la (-)-azumamide E (**8**) l'enantiomero del prodotto naturale **6**, questa mostra tutti i centri stereogenici invertiti. Da una più attenta analisi, però, si può notare che, ruotando il nostro *target* **8** di 180° e confrontandolo col metabolita di origine marina **6**, la catena laterale del suo β-amminoacido mostra un'orientazione spaziale comparabile a quella dell'azumamide E naturale (Figura 2.3). Inoltre, valutando la direzione del legame ammidico all'interno del ciclo si evince un'orientazione simile a quella della trapoxina A **41**, ma opposta rispetto a quella mostrata dal prodotto naturale.

Sarebbe possibile, con questo enantiomero, valutare, in linea teorica, l'influenza dell'orientazione del legame ammidico sull'attività biologica.

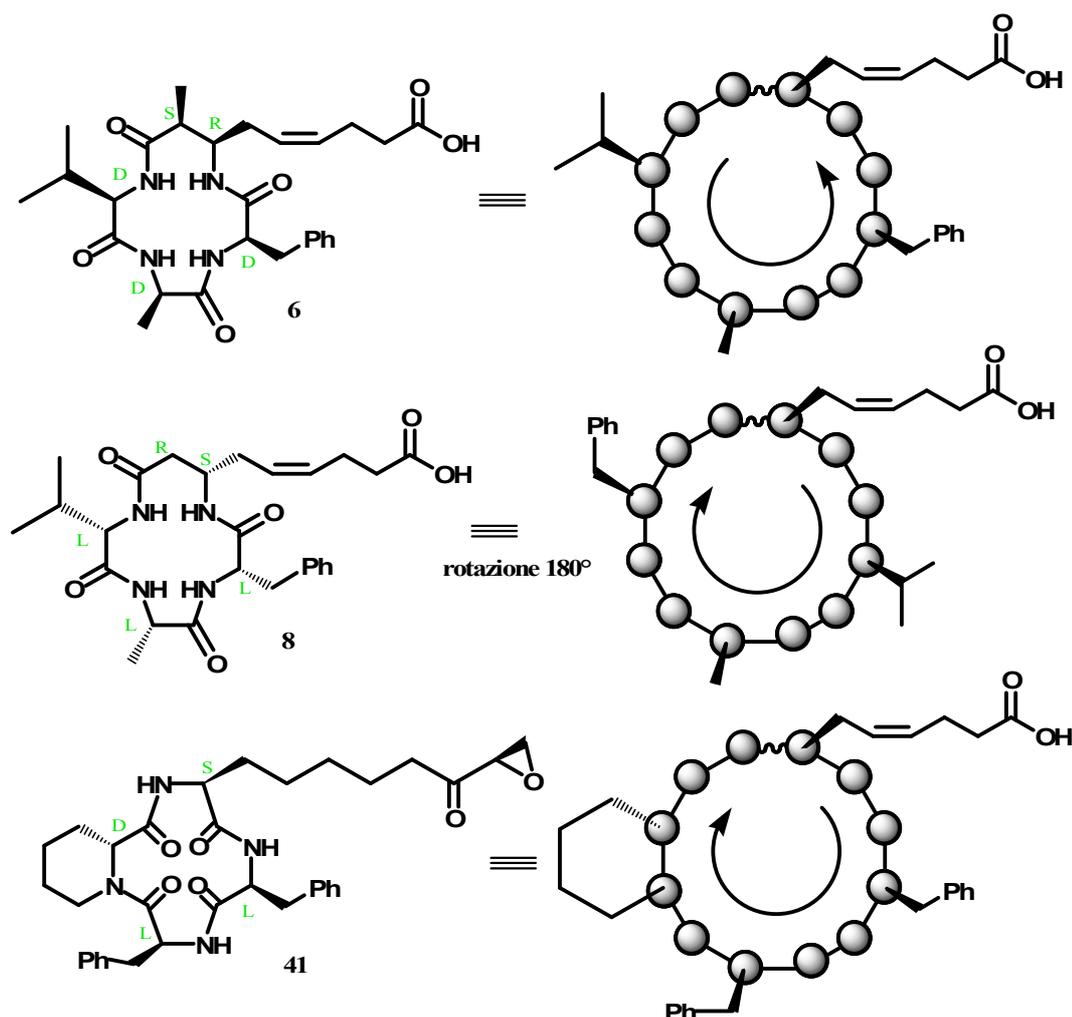
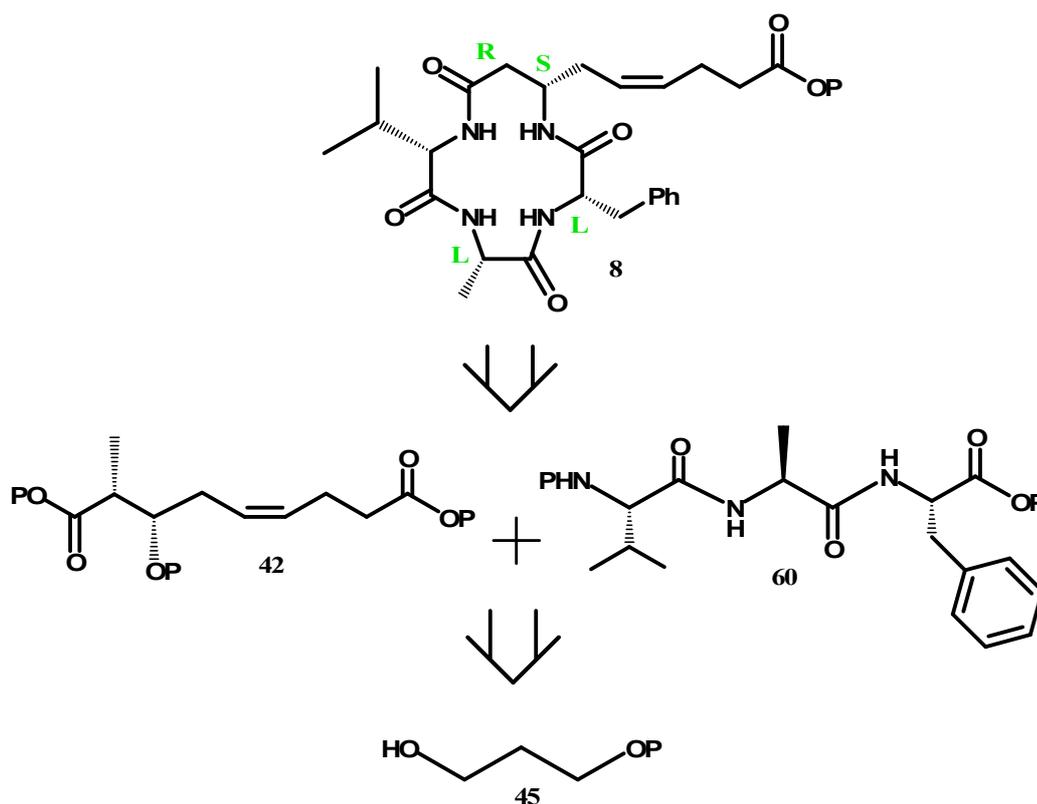


Figura 2.3-Confronto tra la (-)-azumamide E, la (+)-azumamide E e la trapoxina A.

### 2.3.1 Sintesi (-)-azumamide E: schema retrosintetico

La strategia sintetica elaborata per la (-)-azumamide E (8), è del tutto simile a quella mostrata per il diastereoisomero 7. Il target finale è ottenibile dall'accoppiamento e ciclizzazione dei due composti 42 e 60, e il prodotto di partenza è di nuovo il diolo monobenzil-protetto 45 commerciale (Schema 2.10).

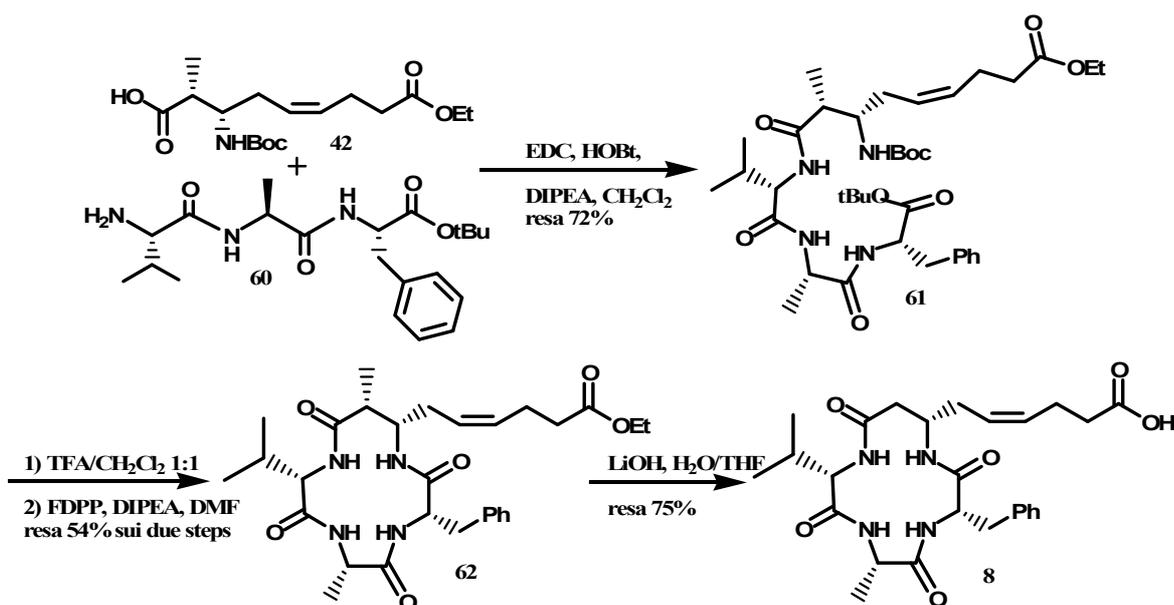


Schema 2.10-Elaborazione retrosintetica dell'enantiomero **8**

### 2.3.2 Sintesi della (-)-azumamide E

La sintesi della (-)-azumamide E **8** è stata effettuata in maniera del tutto simile al cammino che ha prodotto la non naturale (2*R*,3*S*)-azumamide E **7** (Schema 2.11).

Il  $\beta$ -amminoacido **42**, ottenuto come sopra descritto, è stato accoppiato al tripeptide **60** preformato, fornendo il tetrapeptide lineare **61** che per successivi stadi produce il composto **8**.

Schema 2.11-Sintesi dell'enantiomero **8**

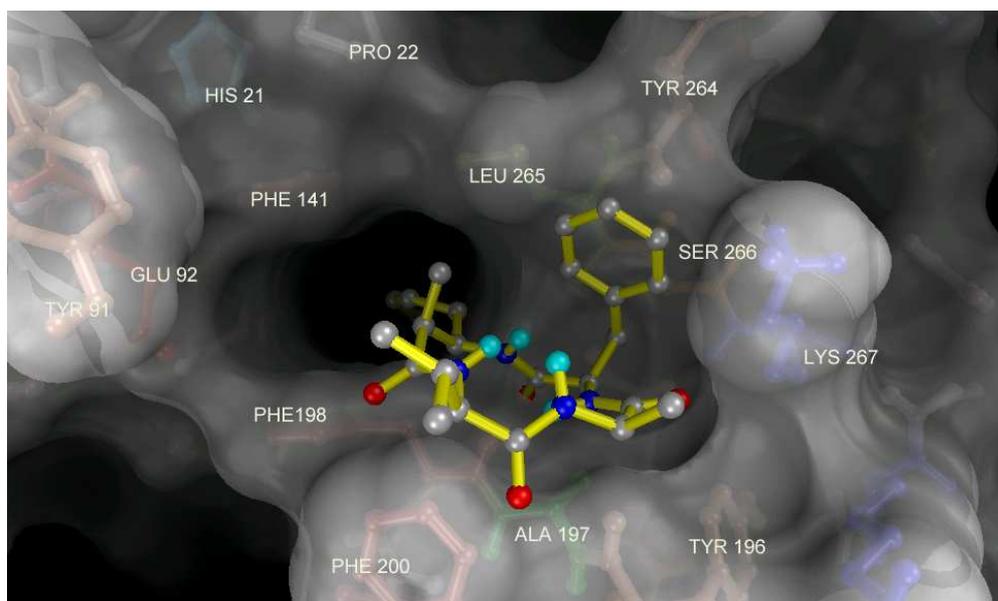
## 2.4 Studi di docking e saggi di attività

Studi di docking sono stati effettuati, dal prof. Bifulco e collaboratori afferenti al dipartimento di Scienze farmaceutiche della facoltà di Farmacia dell'Università di Salerno, per cercare di chiarire e razionalizzare le interazioni che si instaurano tra azumammide E ed enzima nella formazione del complesso inattivo.

In questo caso sono state prese in esame la (+)-azumammide E naturale (**6**) e i due suoi isomeri sintetici **7** e **8**. La ricerca è stata condotta utilizzando come modello gli eventuali complessi formati da queste molecole con il sito attivo dell'HDLP<sup>45</sup>, adoperando il software Auto Dock 3.0.5<sup>46</sup>, che ha già fornito con successo l'interpretazione dell'efficienza di diversi altri inibitori degli HDACs<sup>47</sup>. Questo lavoro ha messo in luce come la (+)-azumammide E potrebbe alloggiare all'interno del sito attivo dell'enzima (Figura 2.4):

- i due atomi di ossigeno della porzione carbossilica possono chelare l'atomo di Zn e formare diversi legami idrogeno con residui prossimi spazialmente;
- l'atomo di carbonio olefinico C 3 potrebbe stabilizzare il complesso per mezzo di interazioni idrofobiche con residui presenti nel canale che porta al sito attivo;
- l'anello benzenico della Phe potrebbe trovare alloggio all'interno di una tasca

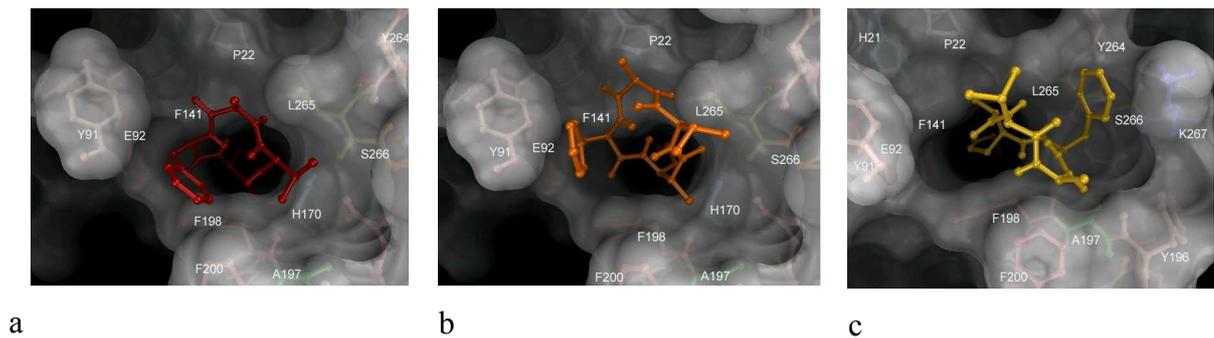
idrofobica prossima al canale stabilendo diversi legami di tipo van der Waals, mentre l'isopropile della valina punterebbe verso l'esterno senza produrre significativi effetti.



**Figura 2.4**-Possibile alloggiamento della (+)-azumammide E nel sito attivo dell'HDLP: l'isopropile della Val si estende verso l'esterno; l'anello della Phe si colloca nella tasca idrofobica delimitata dai residui S266, T264 e L265; lo scheletro macrolattamico si dispone in un incavo stabilendo interazioni di van der Waals e legami idrogeno con i residui H170, Y196, A197, F198 e F200; la porzione carbossilica coordina lo Zn e stabilisce legami idrogeno con H131, H132 e Y297

Tutte queste interazioni si tradurrebbero in un complesso inibitore-enzima particolarmente stabile e di conseguenza in un'efficace capacità della (+)-azumammide E di bloccare l'azione degli HDACs.

Passando in rassegna l'eventuale complesso formato dal diastereoisomero **7** con l'enzima, si scopre che a dispetto di quanto accade per la (+)-azumammide E ed il suo enantiometro **8**, si configurano tre diverse possibilità di alloggiamento (Figura 2.5).

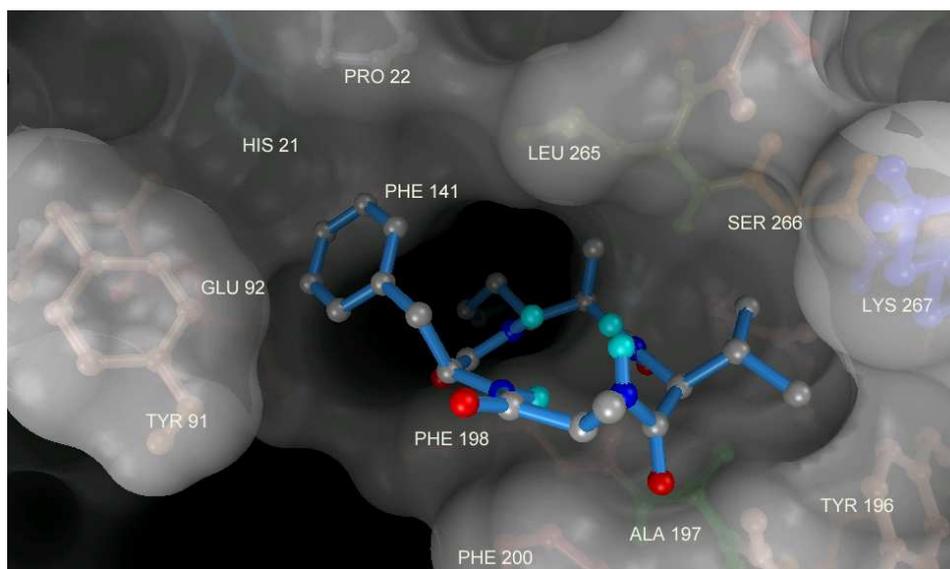


**Figura 2.5**-Possibili alloggiamenti della (2*S*,3*R*)-azumamide E:

- è la conformazione che presenta la migliore energia di legame tra le tre: lo scheletro ciclopeptidico riesce ad instaurare interazioni con i residui E192, H170, F141, F198, G140, L265 e H132 della tasca idrofobica che porta allo zinco; la Val sviluppa interazioni di van der Waals con H170, F198 e L265; la Phe stabilisce interazioni idrofobiche con F198 e F200; il carbossilato, però, non riesce a coordinare efficientemente lo ione Zn divalente troppo distante.
- In questa conformazione lo zinco viene coordinato in maniera efficiente, ma si registra una destabilizzazione dovuta alla perdita dei contatti sviluppati da Val e Phe.
- In questa terza conformazione la Phe trova alloggio nella tasca delimitata dai residui Y264, L265 e S266, ma stabilisce interazioni meno efficaci e solo un ossigeno riesce a coordinare lo zinco.

Nessuna di queste, però, garantirebbe un complesso stabile. Infatti, o a causa di una minore capacità di chelare l'atomo di zinco, o per una ridotta interazione della Phe con i residui della tasca idrofobica o per una concomitanza dei due precedenti fattori, tutte e tre le configurazioni prese in esame lasciano prevedere una scarsa efficienza come inibitore.

Valutando, infine, ciò che accade con la (-)-azumamide E si nota che, nonostante la completa inversione di configurazione rispetto al prodotto naturale, la conservazione del posizionamento relativo della catena laterale del  $\beta$ -amminoacido conduce alla formazione di un complesso enzima-legante simile a quello visto in precedenza per la (+)-azumamide E (Figura 2.6).



**Figura 2.6-** Possibile alloggiamento della (-)-azumamide E nel sito attivo dell'HDLP: l'isopropile della Val prende il posto occupato dalla Phe del prodotto naturale, collocandosi nella tasca idrofobica delimitata dai residui S266, T264 e L265; lo scheletro macrolattamico si dispone in un'incavo stabilendo interazioni di van der Waals e legami idrogeno con i residui H170, Y196, A197, L265, F198 e F200; la porzione carbossilica coordina lo Zn e stabilisce legami idrogeno con H131, H132 e Y297; la Phe si colloca in un'altra tasca idrofobica, delimitata dai residui P22, Y91, E92 ed F141; ciò nonostante l'enantiomero sintetico non riesce ad interagire efficientemente tanto quanto l'azumamide naturale.

In altre parole, in maniera del tutto inaspettata, l'enantiomero sintetico alloggierebbe all'interno dell'enzima in maniera del tutto simile a quanto non faccia il composto naturale, occupando gli stessi spazi e stabilendo lo stesso gruppo di interazioni. Essendo, però, le posizioni di Val e Phe invertite, l'isopropile della Val non riuscirebbe a garantire lo stesso numero di interazioni dell'anello benzilico della Phe, causandone una leggera perdita in efficienza.

Quanto detto finora, se confermato dai saggi di attività biologica fornirebbe interessanti ed inaspettate informazioni sull'attività delle azumamidi. Prima di tutto ci troveremmo di fronte ad uno dei rari casi in cui un enzima chiroselettivo possa essere inibito da entrambi gli enantiomeri di una determinata molecola<sup>48,49,50,51,52</sup>. Inoltre l'attività di queste molecole risulterebbe indipendente dalla direzione dei legami ammidici del proprio nucleo ciclopeptidico e, incredibilmente, dalla configurazione assoluta dei propri centri stereogenici, ma, piuttosto, legata alla topologia<sup>53</sup> della catena laterale del  $\beta$ -amminoacido ossia alla sua orientazione tridimensionale relativa.

## 2.5 Saggi di attività

Ottenuti i due isomeri **7** e **8** come sopra descritto, la (+)-azumammide E (**6**), la (2*R*,3*S*)-azumammide **7** e l'enantiomero **8** sono stati testati, per verificarne l'attività, su estratti nucleari delle cellule HeLa.

Come previsto dagli studi di docking, i saggi, effettuati da Gallinari e collaboratori presso i laboratori Merch, hanno confermato la non apprezzabile attività inibitoria mostrata dalla (2*S*,3*R*)-azumammide E (**7**) se non a concentrazioni al di sopra di 50  $\mu\text{M}$ . Al contrario, invece, sebbene con una significativa perdita di potenza da parte della (-)-azumammide E (**8**), sia la (+)- azumammide E che il suo enantiomero **8** hanno fatto registrare una spiccata attività inibitoria, avvalorando l'ipotesi che la topologia della catena laterale sia un aspetto determinante per l'attività biologica di questi ciclopeptidi (Tabella 2.1).

Composto	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	0.134 ( $\pm 0.024$ )	/ a 50 $\mu\text{M}$	26.0 ( $\pm 4.4$ )

**Tabella 2.1**-Attività dell'(+)-azumammide E, del diastereoisomero **7** e dell'enantiomero **8**

I risultati dei saggi rivelano, inoltre una più efficace inibizione degli HDAC 1-3 ed un sensibile calo in potenza rispetto agli HDAC 4-7 e 9 suggerendo la possibilità di un'inibizione selettiva (Tabella 2.2).

HDAC	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	0.050 ( $\pm 0.001$ )	0.100 ( $\pm 0.033$ )	0.080 ( $\pm 0.007$ )	30% a 50 $\mu\text{M}$	10.0 ( $\pm 0.7$ )	12.0 ( $\pm 2.7$ )	9.7 ( $\pm 1.2$ )	3.7 ( $\pm 0.7$ )	28.0 ( $\pm 4.9$ )

**Tabella 2.2**-Attività della (+)-azumammide E rispetto agli HDACs di I<sup>a</sup> e II<sup>a</sup> classe

Questi importanti aspetti, uniti al sempre crescente numero di dati sperimentali che evidenziano per ogni sottotipo degli HDACs un ruolo diverso all'interno dell'organismo, accresce l'interesse per questi prodotti naturali lasciando intravedere la possibilità di una modulazione e inibizione specifica attraverso variazioni configurazionali e strutturali dello scheletro ciclopeptidico. In linea di principio sarebbe possibile progettare e

sintetizzare delle strutture analoghe delle azumammidi che, auspicabilmente, possano bloccare selettivamente l'attività del singolo individuo o del piccolo gruppo di HDACs responsabili di una determinata patologia genetica.

## **CAPITOLO 3**

---

---

### 3. Analoghi delle azumammidi

Come già riportato, la peculiare attività delle azumammidi rende questi metaboliti secondari estremamente interessanti dal punto di vista farmacologico<sup>54,55</sup>. Purtroppo, però, le quantità di tali composti, provenienti dalle fonti naturali oppure dalle sintesi totali, sono limitate.

Risulta conveniente, quindi, progettare delle strutture analoghe alle azumammidi, auspicabilmente dotate di pari se non maggiore attività, e di elaborare delle relative strategie sintetiche idonee al loro ottenimento in quantità elevata.

#### 3.1 Analogo 30

Per quanto detto è facile intuire che le direttive che hanno guidato al concepimento di molecole analoghe siano state: rispetto dei requisiti necessari alla desiderata attività, facilità di sintesi, versatilità delle strutture elaborate.

In tale ottica, il primo analogo **30**, che conserva del prodotto naturale lo scheletro ciclico ad eccezione del  $\beta$ -amminoacido inusuale sostituito da una omoserina funzionalizzata, risulta essere un'adeguata sintesi delle tre linee guida succitate (Figura. 3.1).

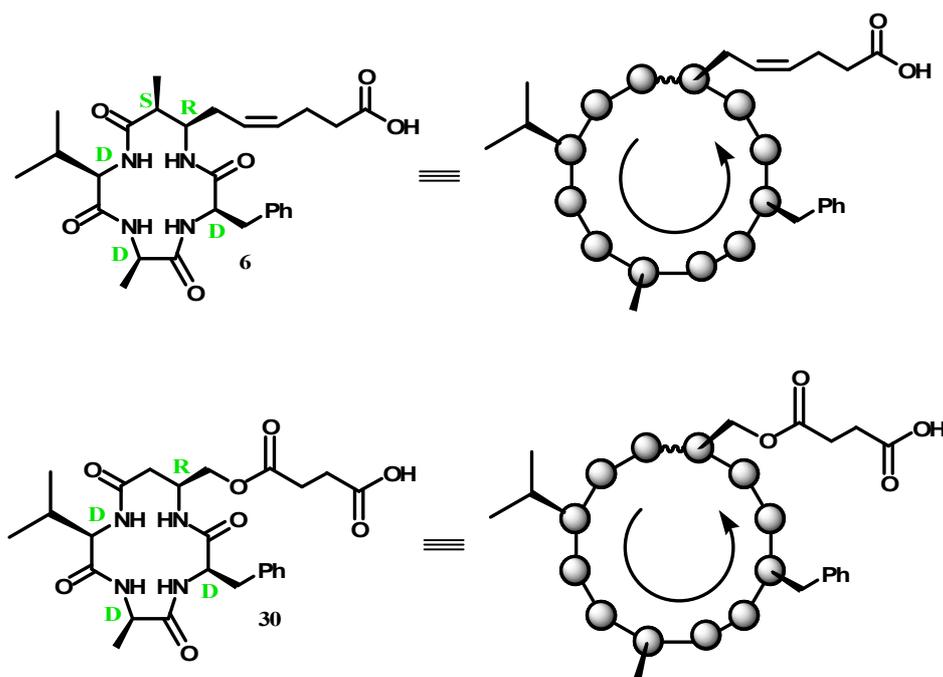


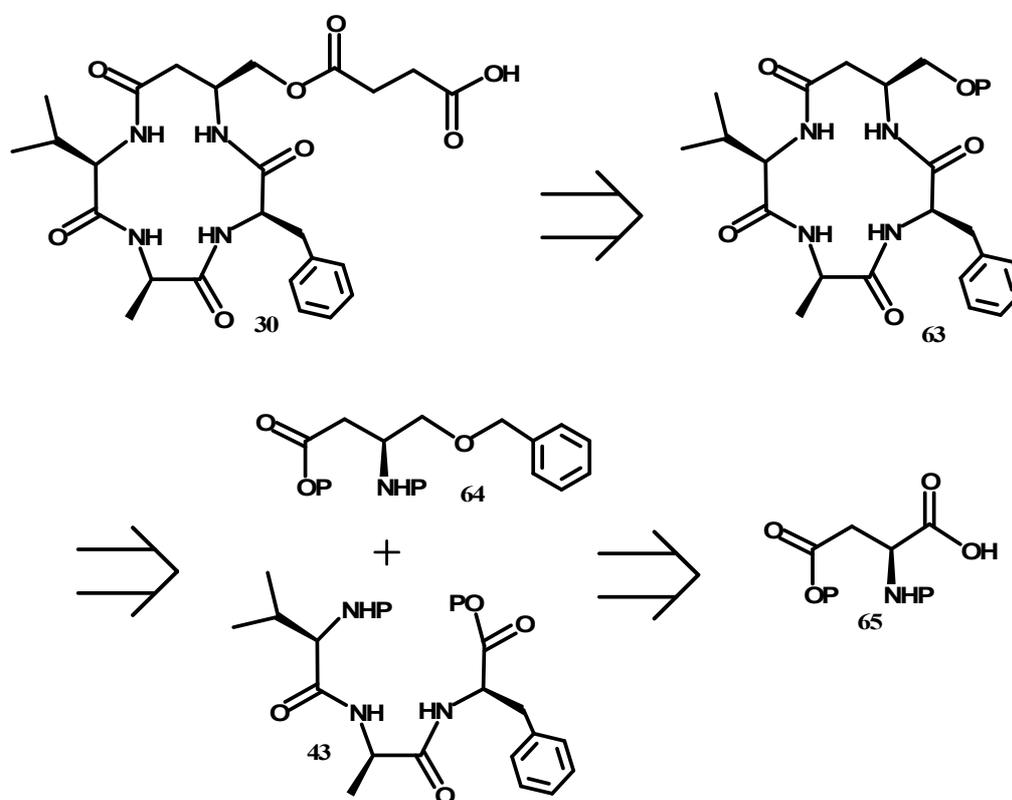
Figura 3.1-Confronto tra l'analogo **30** e la (+)-azumammide E (**6**).

Dal confronto dell'analogo **30** con l'azumammide E, naturale, risultano evidenti le similitudini tra le due strutture: il ciclopeptide **30** conserva, del prodotto naturale **6**, sia la direzione dei legami ammidici, sia la configurazione assoluta dei centri stereogenici, sia, e soprattutto, la topologia delle catene laterali. Inoltre, entrambi i composti sono ciclopeptidi omodetici, ossia caratterizzati all'interno dello scheletro ciclico da soli legami ammidici.

Infine, la presenza di una funzione alcolica sul telaio ciclopeptidico rende, in linea di principio, questa struttura particolarmente incline a variazioni della funzionalità chelante, attraverso la semplice sostituzione della catena laterale.

### 3.1.1 Schema retrosintetico dell'analogo **30**

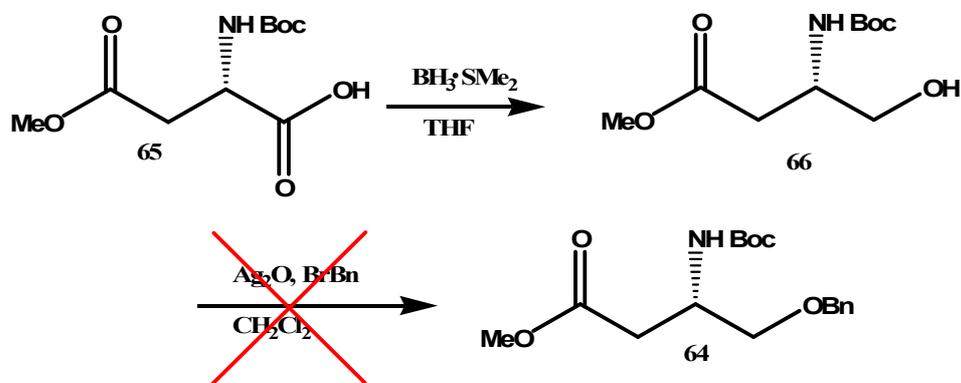
Dal punto di vista sintetico, il ciclopeptide **63**, che può fornire l'analogo **30** desiderato, può essere ottenuto per accoppiamento dei due sintoni **64** e **43**. Il composto **64** può essere ricondotto ad un acido aspartico commercialmente disponibile (Schema 3.1).



Schema 3.1-Schema retrosintetico analogo 3

### 3.1.2 Sintesi della $\beta$ -omoserina **64**

Questo percorso sintetico prende il via dalla riduzione dell'acido aspartico (**65**), operata dal triidruro di boro, a fornire l'alcol **66**. Il prodotto **66** ottenuto si è dimostrato particolarmente instabile in condizioni acide (la sola acidità residua del cloroformio deuterato, utilizzato per l'acquisizione degli spettri NMR, si è dimostrata sufficiente a catalizzarne la reazione di lattamizzazione) e pertanto si è deciso di non sottoporlo a procedure di purificazione, ma di adoperarlo tal quale nel successivo *step* di benzilazione<sup>56</sup> (Schema 3.2). Purtroppo, probabilmente a causa dell'instabilità descritta sopra, questa reazione di protezione è sfociata in un insuccesso.



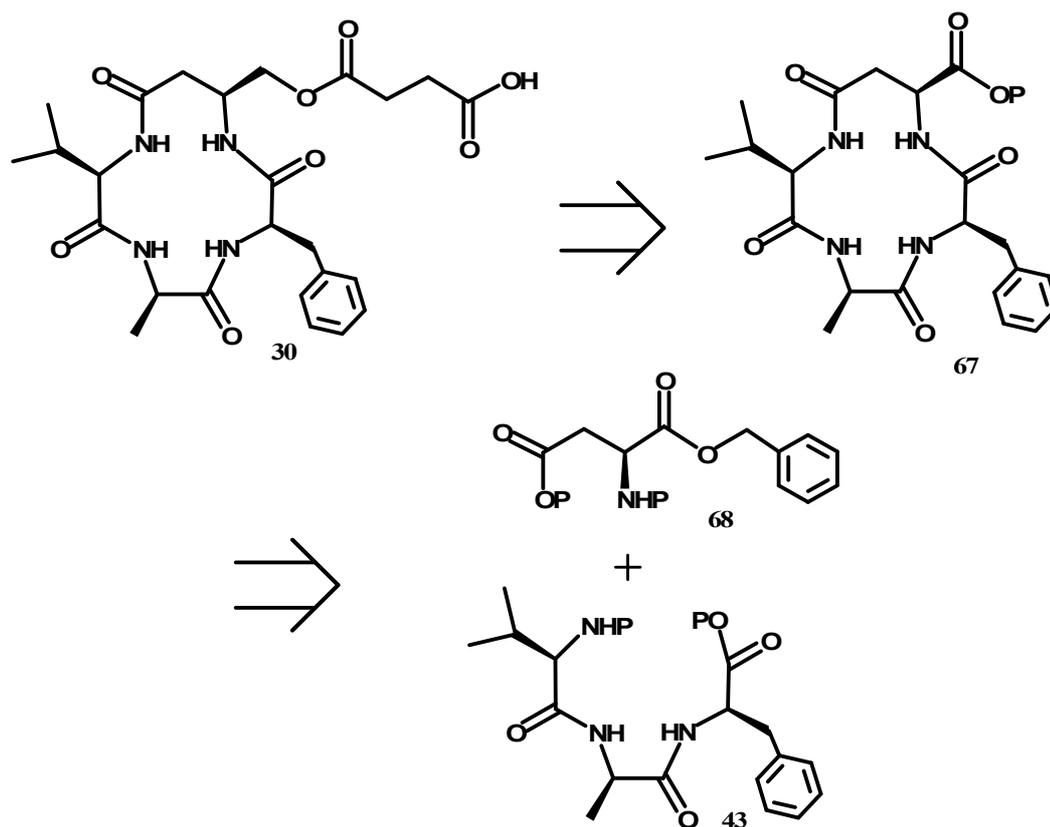
Schema 3.2-Sintesi del composto **64**

### 3.2 Secondo schema retrosintetico analogo **30**

Non riuscendo a manipolare agevolmente la  $\beta$ -omoserina **66** necessaria per la sintesi del target prescelto, si è deciso di aggirare l'ostacolo ritardando la sua formazione ad uno step successivo.

In altre parole, appurata l'instabilità del composto **66**, è apparso più semplice posticipare la reazione di riduzione della funzione  $\alpha$ -carbossilica dell'acido aspartico **65** operando con un intermedio di sintesi più stabile.

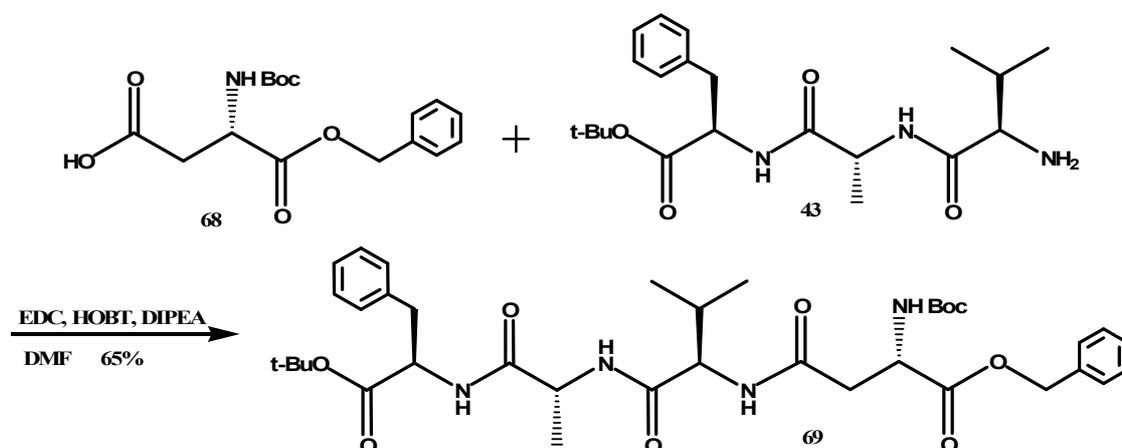
In questa nuova elaborazione retrosintetica, si è pensato, quindi, di ottenere il *target* desiderato dal ciclopeptide **67**, a sua volta riconducibile al tripeptide **43** e all'acido aspartico **68** sotto riportato (Schema 3.3)



Schema 3.3-Secondo schema retrosintetico analogo 30

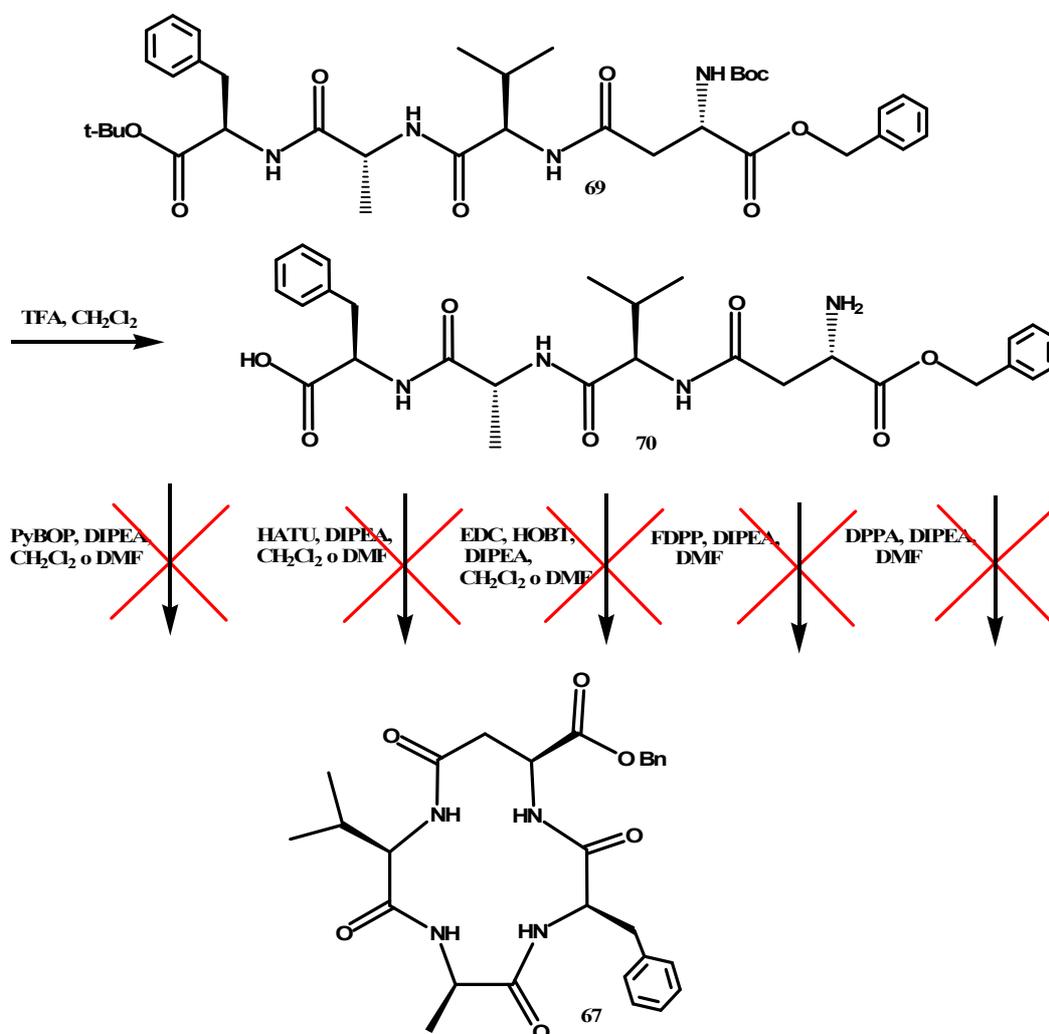
### 3.2.1 Sintesi composto 67

Questo nuovo approccio sintetico inizia con l'accoppiamento del derivato dell'acido aspartico commercialmente disponibile (**68**) con il tripeptide **43**, già descritto in precedenza (Schema 3.4).



Schema 3.4-Sintesi del tetrapeptide lineare 69

Il tetrapeptide **69** ottenuto, è stato quindi deprotetto *one-pot* nelle sue due teste polari, a liberare la funzione amminica ed il gruppo carbossilico coinvolti nella formazione del legame ammidico più importante dell'intero costruito sintetico: la reazione di ciclizzazione (Schema 3.5). La reazione di macrolattamizzazione, infatti, come evidenziato dalle sintesi degli isomeri precedentemente descritti, rappresenta, per sistemi come quello in esame, lo stadio limitante dell'intera sintesi<sup>57</sup>. Difficilmente una semplice reazione in soluzione, mediata pur anche dai più validi agenti di accoppiamento disponibili, riesce ad avvicinare in efficienza il meccanismo enzimatico che la natura ha ottimizzato nel corso di miliardi di anni. Difatti, nonostante l'utilizzo delle migliori metodiche di ciclizzazione conosciute<sup>58,59</sup>, questo stadio sintetico ha visto naufragare il cammino sintetico proposto (Schema 3.5).



Schema 3.5-Reazione di ciclizzazione non riuscita.

Il susseguirsi dei tentativi fallimentari sopra descritti e più in generale gli insuccessi, non sono, però, sufficienti a stroncare le velleità né l'entusiasmo che animano un chimico

nell'affrontare una sfida sintetica, piuttosto forniscono uno stimolo ulteriore alla ricerca di una soluzione vincente.

È con questa voglia di riscatto che si è deciso di abbandonare la più familiare chimica in soluzione per tentare un approccio su fase solida. L'ancoraggio della molecola su un supporto solido e la possibilità di lavorare in condizioni di pseudo-diluizione, ovvero con minori quantità di solventi ed un maggiore eccesso di agenti di accoppiamento, potrebbero, infatti, incentivare la reazione di ciclizzazione limitando i rischi di reazioni intermolecolari.

### 3.3 Sintesi su fase solida

La sintesi peptidica in fase solida (SPPS) ha rappresentato una vera e propria rivoluzione nel campo della chimica dei peptidi, rendendo accessibili prodotti naturali il cui ottenimento, non più di cinquanta anni fa, sarebbe stato considerato impossibile.

La geniale intuizione di R. Bruce Merrifield (Nobel per la chimica nel 1984) si basa sull'ancoraggio del primo amminoacido su un supporto polimerico insolubile e sull'accrescimento della catena peptidica a partire da questo primo residuo<sup>60</sup>. Anche se gli ultimi anni hanno visto la comparsa di diversi supporti solidi, le resine maggiormente adoperate sono le classiche matrici copolimeriche di stirene e divinilbenzene all'1-2%. Queste mostrano la capacità di rigonfiarsi a contatto con opportuni solventi (*swelling*) dando vita a sistemi-gel che assicurano un'adeguata diffusione dei reagenti.

La SPPS prende il via con l'ancoraggio, attraverso un legame estereo o amidico, del primo amminoacido sulla resina funzionalizzata con un opportuno *linker*-spaziatore. Il *linker* reca un adeguato gruppo funzionale scelto in modo che la sintesi della catena in allungamento avvenga lungo la direzione C→N, ovvero con strategia opposta a quella seguita dalla natura (N→C). Questa particolare scelta ha una ragione meramente sintetica, dovuta alla maggiore semplicità di rimozione del gruppo protettore dalla funzione amminica.

I residui adoperati in questa tecnica devono essere opportunamente protetti sia sulla funzione α-amminica che sull'eventuale catena laterale nel pieno rispetto del principio di ortogonalità, permettendo in tal modo la rimozione selettiva dei gruppi protettori ed evitando, quindi, reazioni secondarie indesiderate.

La sintesi del peptide procede, poi, attraverso cicli ripetitivi di deprotezione della funzione  $\alpha$ -amminica del peptide-resina e di accoppiamento del successivo amminoacido protetto sino all'ottenimento del prodotto desiderato. Il peptide viene, in fine, distaccato dalla resina (*cleavage*) mediante l'esposizione a determinati solventi (es. acidolisi blanda) che in taluni casi promuovono la contemporanea rimozione di tutti i gruppi protettori dalle catene laterali dei singoli residui.

Sebbene la SPPS presenti, rispetto alle tecniche di sintesi in soluzione, lo svantaggio di dover condurre tutti gli stadi sintetici necessari al buio, ovvero senza la possibilità di isolare e caratterizzare intermedi per controllare il corretto procedere della sintesi stessa, essendo la catena in accrescimento permanentemente legata al supporto insolubile, è possibile lavorare con larghi eccessi di amminoacidi e reagenti garantendosi rese di accoppiamento quasi quantitative.

La facilità, inoltre, di allontanamento dei prodotti collaterali e dell'eccesso di reagenti mediante lavaggi con opportuni solventi, e la possibilità di ovviare al problema della scarsa solubilità degli intermedi sintetici, che spesso si ripropone in soluzione, rendono questa tecnica estremamente veloce e unicamente efficiente.

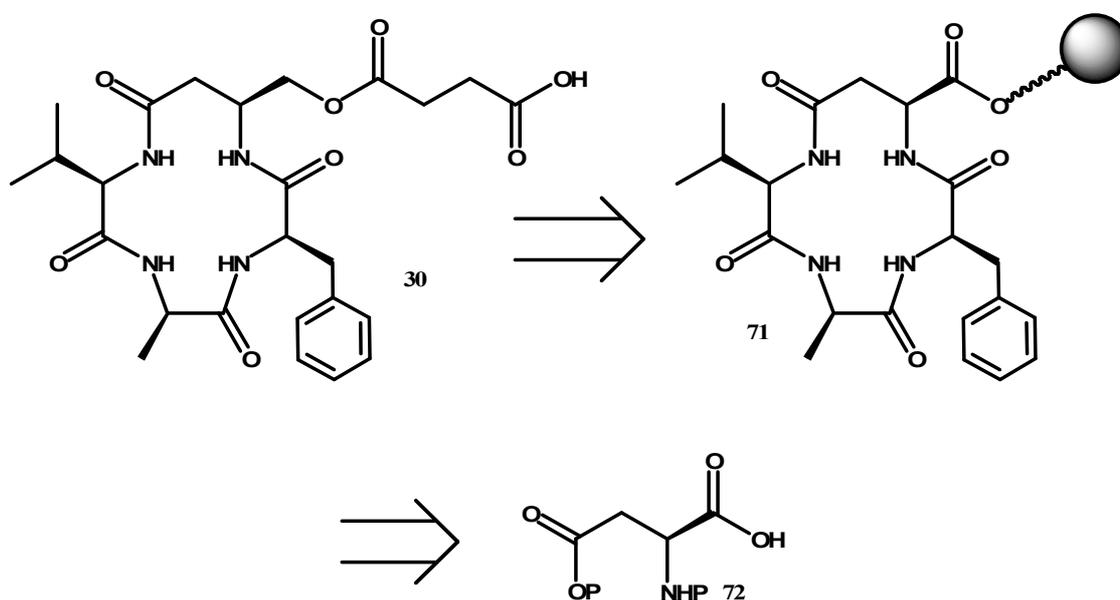
#### 3.4 Schema retro sintetico analogo 30

L'elaborazione di una strategia sintetica per l'ottenimento di un peptide ciclico implica, sin dalle fasi iniziali del suo concepimento, la necessità di operare una scelta riguardo alla metodica da adottare per condurre la reazione di ciclizzazione nella maniera più efficace.

Al vaglio vi sono due possibilità:

- sintetizzare il tetrapeptide **69** su fase solida per poi realizzare la ciclizzazione in soluzione, con gli annessi rischi che si verifichino reazioni collaterali di ciclodimerizzazione e/o oligomerizzazione. Soluzione, questa, che benché vedesse il tetrapeptide ottenuto classicamente in soluzione, si è già dimostrata inefficiente.
- Sfruttare il fenomeno detto di *pseudodiluizione*<sup>61</sup>, che favorisce le reazioni intramolecolari a discapito di quelle intermolecolari, conducendo la ciclizzazione su fase solida, ovvero con il peptide ancora ancorato al supporto polimerico.

Nel caso in esame, la scelta obbligata della seconda delle opzioni descritte, ha portato a pensare all'analogo **30** derivato dal ciclopeptide **71** sintetizzato su resina, a sua volta riconducibile all'acido aspartico protetto **72**, come riportato nello Schema 3.6.



Schema 3.6-Elaborazione retrosintetica per l'ottenimento dell'analogo **30**

### 3.4.1 Sintesi ciclopeptide **71**: scelta dei parametri sintetici

Prima di passare alla sintesi vera e propria è necessario esaminare con attenzione la strada sintetica proposta per valutare con cura tutte quelle variabili da cui può dipendere il buon esito della stessa. Dalla valutazione dell'elaborazione retrosintetica su riportata, appare, subito, evidente la necessità della presenza, all'interno dello scheletro peptidico ciclico, di almeno un residuo recante un gruppo funzionale sulla catena laterale che possa consentirne l'ancoraggio alla resina<sup>62,63</sup>. Nel caso in esame l'acido aspartico con le due funzionalità carbossiliche in  $\alpha$  ed in  $\beta$  sembra essere il giusto garante per l'utilizzo della procedura di ciclizzazione testa-coda (*head-to-tail*) proposta.

Altro fattore fondamentale per la buona riuscita di una SPPS è la scelta della resina più adeguata, o più in particolare del *linker* a cui ancorare il primo residuo. Questo aspetto è di primaria importanza in quanto, determinando le condizioni di distacco dalla resina (es.: acido-labile o base-labile), è il *linker* a dettare l'intera strategia di protezioni ortogonali da adottare. La scelta accurata dell'opportuno supporto polimerico, inoltre, può risultare determinante nell'evitare quelle reazioni collaterali che spesso si

accompagnano alla SPPS. Specificatamente legate alla presenza di un particolare aminoacido e/o di una definita sequenza aminoacidica o indipendenti dal peptide da sintetizzare, diverse sono, infatti, le reazioni collaterali che possono portare ad un insuccesso. Tra queste particolarmente dannosa è la reazione di formazione delle dichetopiperazine (DKPs)<sup>64</sup>, che, definita proprio come reazione sequenza-specifica, determina l'abbattimento, se non il fallimento, della sintesi peptidica. Infatti, in determinate condizioni il gruppo  $\alpha$ -amminico libero del dipeptide ancorato al supporto può attaccare intramolecolarmente il gruppo carbossilico C-terminale, dando origine ai dipeptidi ciclici noti come DKPs. In particolare la presenza di  $\alpha$ -imminoacidi come la prolina, che adottano facilmente la geometria *cis* nel legame ammidico con il primo residuo, accentuano fortemente il problema<sup>65</sup> (Figura 3.2).

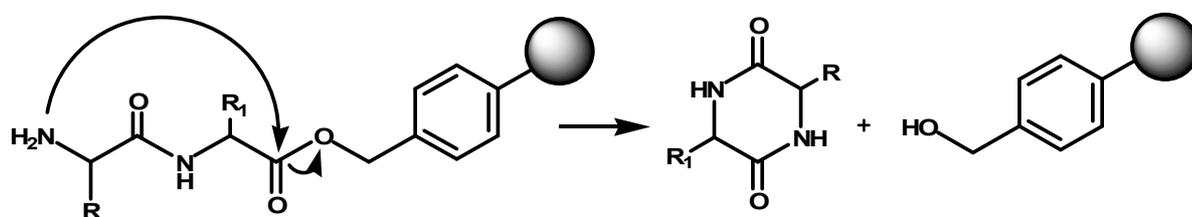


Figura 3.2- Formazione delle dichetopiperazine.

Altra reazione collaterale che potrebbe verificarsi nella particolare sintesi in esame è l'attacco dell' $\alpha$ -ammina libera del secondo residuo al gruppo  $\beta$ -carbossilico dell'acido aspartico a dare il ciclo a sette termini responsabile dell'arresto della sintesi (Figura 3.3).

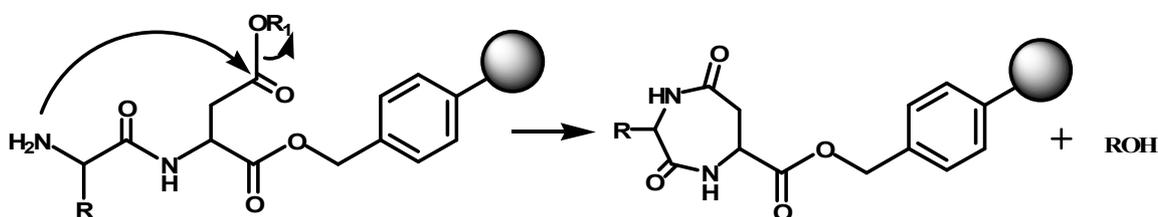


Figura 3.3-Reazioni collaterali del residuo aspartico.

Queste reazioni, favorite cineticamente, in quanto intramolecolari, possono essere sensibilmente ridotte, se non del tutto inibite, dall'utilizzo di una resina particolarmente ingombrata stericamente. Per i motivi appena descritti la scelta del supporto solido su cui ancorare il peptide in accrescimento è ricaduta sulla resina 2-cloro-tritilica, che, con i suoi tre anelli aromatici, garantisce un'adeguata "protezione sterica" (Figura 3.4).

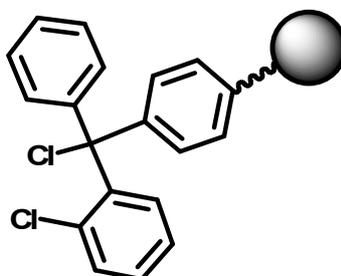


Figura 3.4-Resina 2-clorotritilica

L'ultimo aspetto di cui tener conto prima di passare alla parte operativa, è l'elaborazione dell'opportuna strategia di protezioni ortogonali da utilizzare.

Essendo la resina tritilica prescelta caratterizzata da condizioni di distacco di acidolisi blanda, si è pensato di proteggere gli azoti  $\alpha$ -amminici con il gruppo 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc), rimovibile selettivamente in condizioni blandamente basiche con una soluzione di piperidina (Figura 3.5).

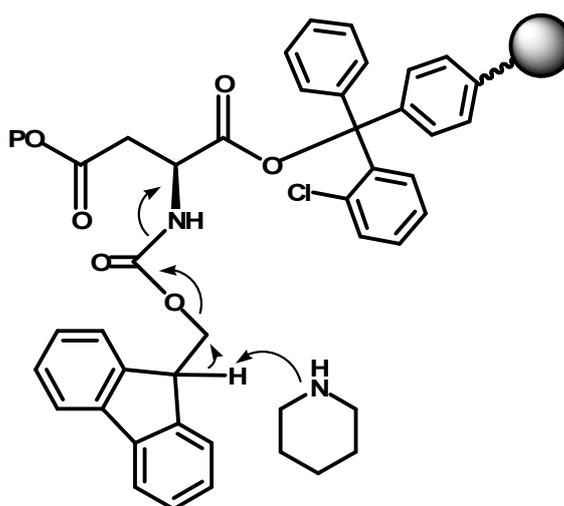


Figura 3.5-Meccanismo di deprotezione delle funzioni  $\alpha$ -amminiche.

Infine, la funzione  $\beta$ -carbossilica dell'acido aspartico, che dovrà essere resa disponibile solo al momento della reazione di macrolattamizzazione, può venire efficientemente

protetta come estere allilico, la cui rimozione è specificamente catalizzata dal tetrakis(trifenilil)fosfina di palladio<sup>66,67</sup>.

In questa reazione il Pd<sup>0</sup> coordina il doppio legame formando un complesso, si ossida a Pd<sup>2+</sup> cedendo un doppietto elettronico ai carboni allilici e promuovendo la rottura del legame all'ossigeno carbonilico. La seguente formazione del complesso cationico  $\pi$ -allile, con la carica positiva delocalizzata su tutti e tre gli atomi di carbonio grazie all'effetto stabilizzante del palladio, e l'attacco di un nucleofilo al carbocatione rende un composto allilico alchilato, il complesso di Pd<sup>0</sup> di partenza e la funzione carbossilica libera (Figura 3.6).

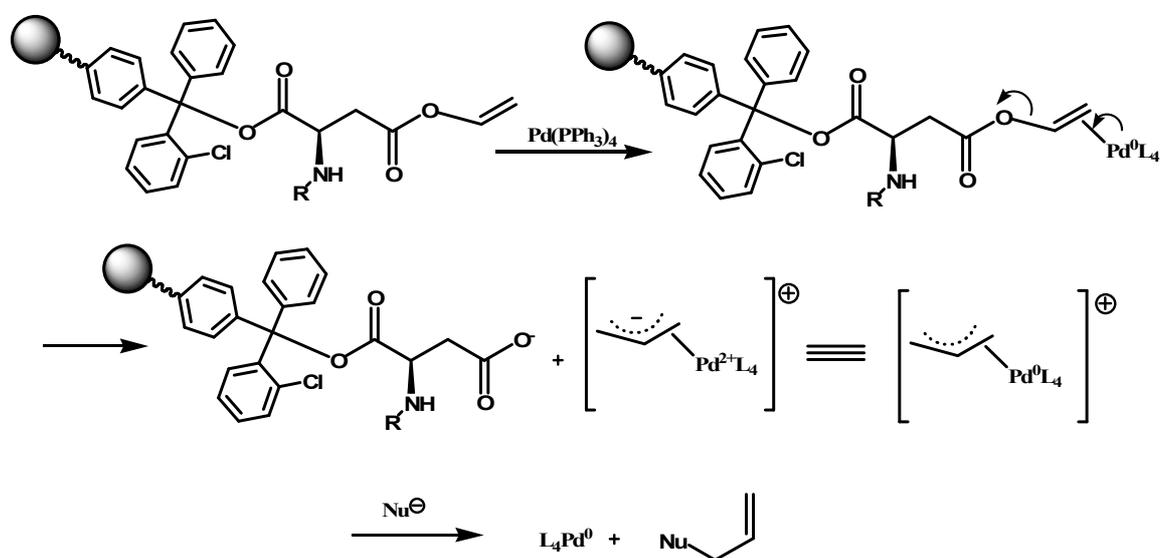
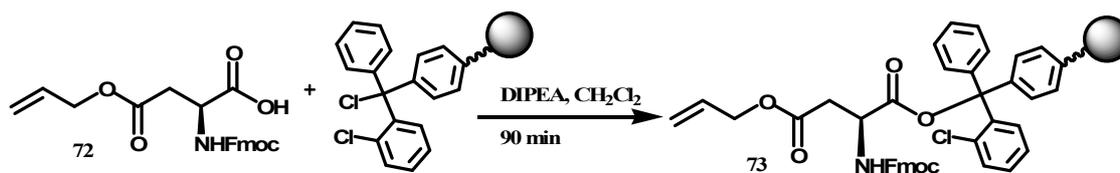


Figura 3.6-Meccanismo di deallilazione mediato da palladio.

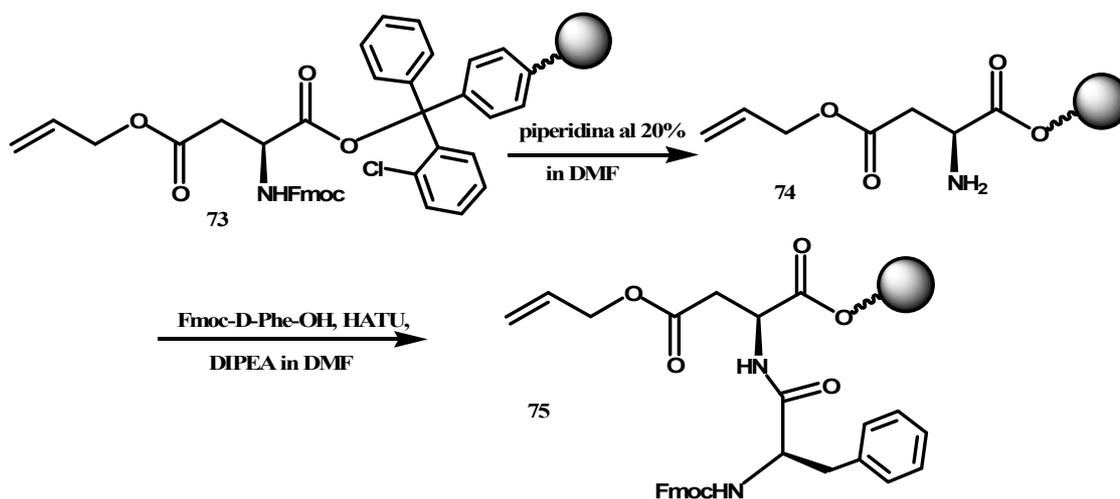
### 3.4.2 Sintesi del ciclopeptide 30

Stabiliti i parametri operativi del percorso sintetico elaborato per l'ottenimento dell'analogo **30**, si è, finalmente, proceduto all'ancoraggio del primo residuo **72** alla resina (Schema 3.7).



Schema 3.7- Ancoraggio primo residuo

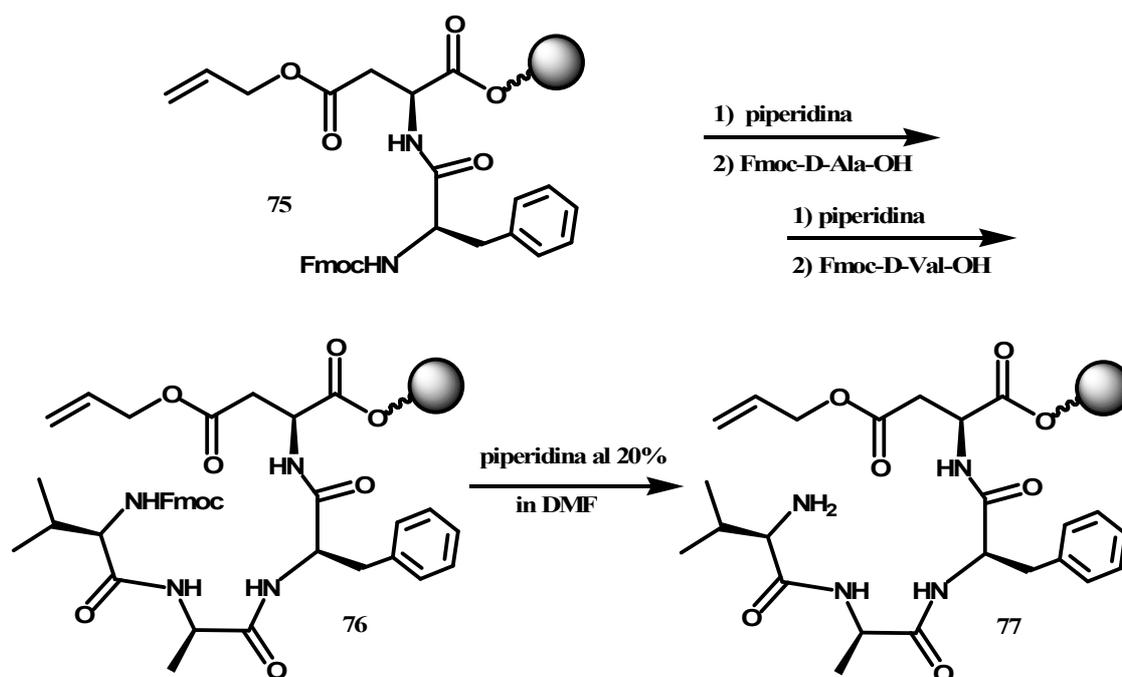
Sebbene il livello di funzionalizzazione della resina 2-clorotritilica adoperata potesse raggiungere valori ben più elevati (caricamento massimo 1.0-1.6 mmol/g) si è deciso di sottocaricarla (0.2-0.3 mmol/g) così da minimizzare, nel corso della reazione di ciclizzazione, eventuali reazioni intercatena (principio della *pseudodiluizione*). Naturale conseguenza di questa scelta è stata la necessità di bloccare (*capping*) i siti funzionali della resina rimasti disponibili per evitare che reagissero con il secondo residuo ingenerando catene peptidiche alternative. Per far ciò si è proceduto ad un trattamento con metanolo in diclorometano in presenza della base diisopropilettilammina. Dopo la deprotezione del gruppo  $\alpha$ -amminico si è quindi passati all'accoppiamento con la Fmoc-D-fenilalanina (Schema 3.8).



Schema 3.8-Sequenza di reazioni primo accoppiamento

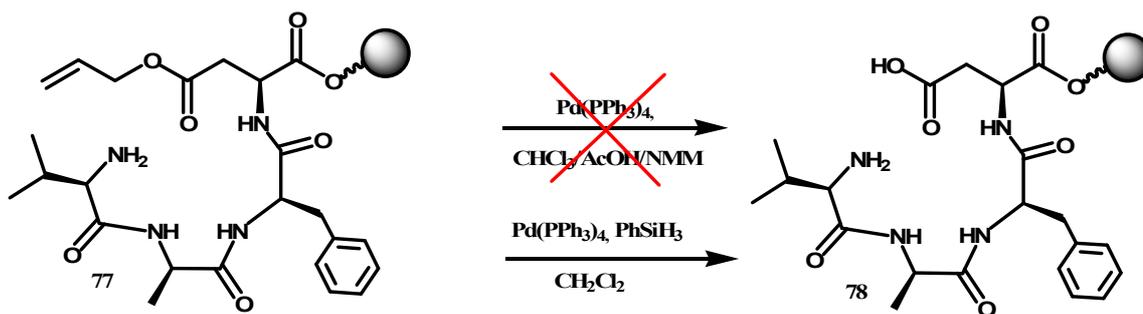
Questa reazione di accoppiamento è stata condotta con l'aiuto di un agente di *coupling* (HATU), che viene addizionato alla fenilalanina per preformare la specie estere attivato, bersaglio dell'attacco nucleofilo dell'azoto amminico, evitando, così, il verificarsi di

reazioni secondarie (tetrametilguanidinazione). I successivi accoppiamenti con Fmoc-*D*-alanina e Fmoc-*D*-valina hanno prodotto il tetrapeptide lineare **76** che deprotezionato dal gruppo Fmoc fornisce il composto **77**, substrato della successiva reazione di deallilazione (Schema 3.9).



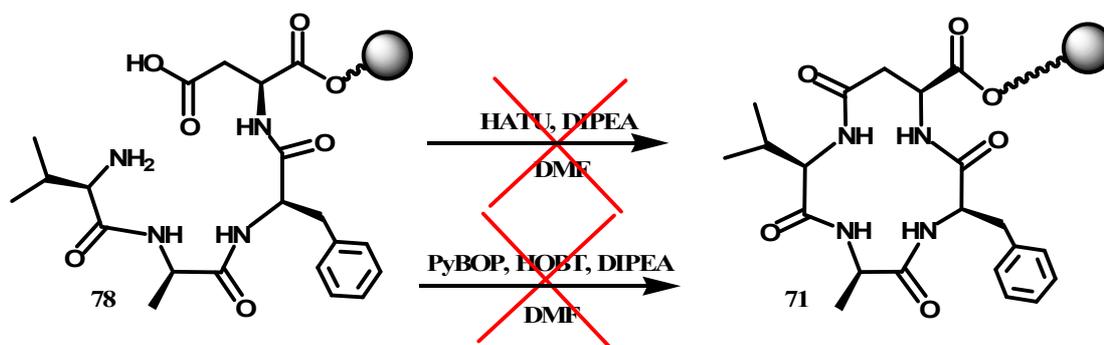
Schema 3.9-Accrescimento catena peptidica.

Al contrario di ciò che ci si possa aspettare la deprotezione della funzione carbossilica non si è rivelata, poi, così banale, richiedendo, di fatto, un adeguato lavoro di ricerca delle migliori condizioni di reazione. Il trattamento, infatti, con la miscela di cloroformio/acido acetico/*N*-metilmorfolina in presenza del palladio-tetrakis(trifenilfosfina) si è dimostrato troppo drastico, determinando il distacco del tetrapeptide **77** dal supporto solido. A valle, però, di una serie di prove di deprotezione, effettuate sul solo residuo aspartico ancorato alla resina, la deprotezione del tetrapeptide **77** è stata efficacemente condotta con l'uso del palladio-tetrakis(trifenilfosfina) in presenza di fenilsilano<sup>68</sup> (Schema 3.10).



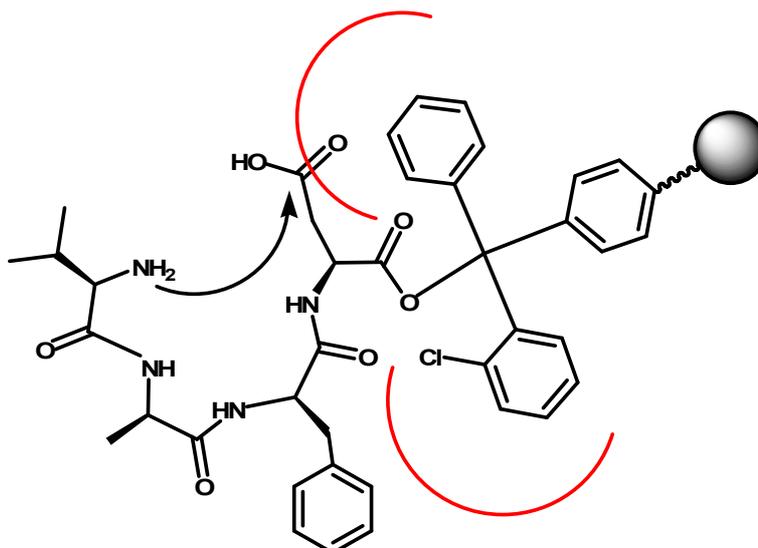
Schema 3.10-Deprotezione della funzione carbossilica

La reazione di ciclizzazione operata, infine, sul peptide lineare **78** così ottenuto ha fatto registrare, purtroppo, una nuova battuta d'arresto (Schema 3.11).



Schema 3.11-Reazione di macrolattamizzazione

La disamina delle possibili cause dell'insuccesso ha individuato, quale più probabile imputato, l'effetto di impedimento sterico esercitato dagli anelli aromatici del *linker* tritilico (Figura 3.7), che inibirebbe l'attacco nucleofilo da parte della funzione amminica.

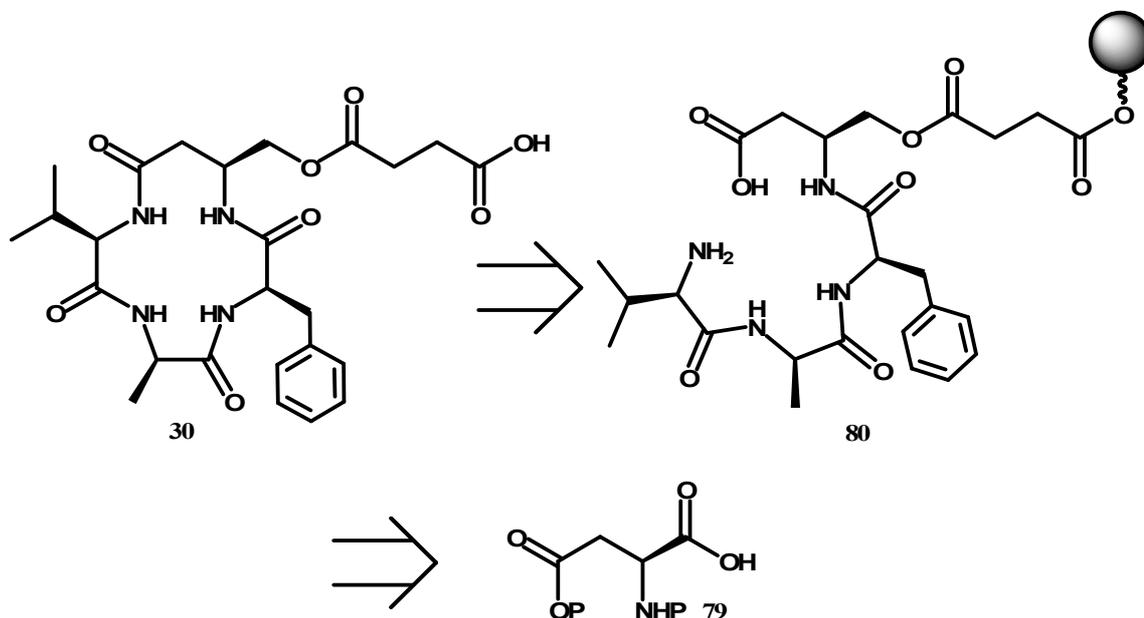


**Figura 3.7-**L'ingombro sterico impedisce all'azoto amminico di portare l'attacco alla funzione carbossilica prossima al punto di ancoraggio alla resina.

### 3.5 Variante dello schema retro sintetico 3.4.2

Assumendo sia vera l'ipotesi sopra descritta, si pone l'esigenza di elaborare una possibile soluzione per aggirare il problema. Dall'esame delle strade percorribili sono state individuate due possibili vie d'uscita. Al vaglio v'è la possibilità di sostituire il supporto solido su cui è condotta la sintesi con uno meno ingombro stericamente, o di cercare un modo per modulare l'effetto sterico dei fenili tritilici consentendo alle due teste polari del tetrapeptide di incontrarsi e di pervenire alla formazione del legame ammidico. Avendo, però, già motivato nel corso di questo stesso capitolo l'importanza della scelta della resina adoperata, frutto di una valutazione ponderata dell'ampio ventaglio di opportunità disponibili, si è deciso, allora, di imboccare la seconda delle strade proposte. Una possibile soluzione per ridurre l'effetto "schermante", operato dal *linker* tritilico, potrebbe essere l'allontanamento del sito di ciclizzazione dal punto di ancoraggio alla resina. Anche in questo caso, però, ci si trova dinanzi ad un bivio: cambiare il punto di ancoraggio al supporto solido, fissando alla resina un residuo diverso dall'acido aspartico, o inserire una catena (uno spaziatore), che distanziando la funzione  $\beta$ -carbossilica dell'acido aspartico la renda disponibile all'attacco dell' $\alpha$ -amminogruppo della valina? Scartata la prima delle ipotesi al vaglio, a causa dell'assenza di un secondo residuo amminoacidico recante una catena laterale ancorabile alla resina,

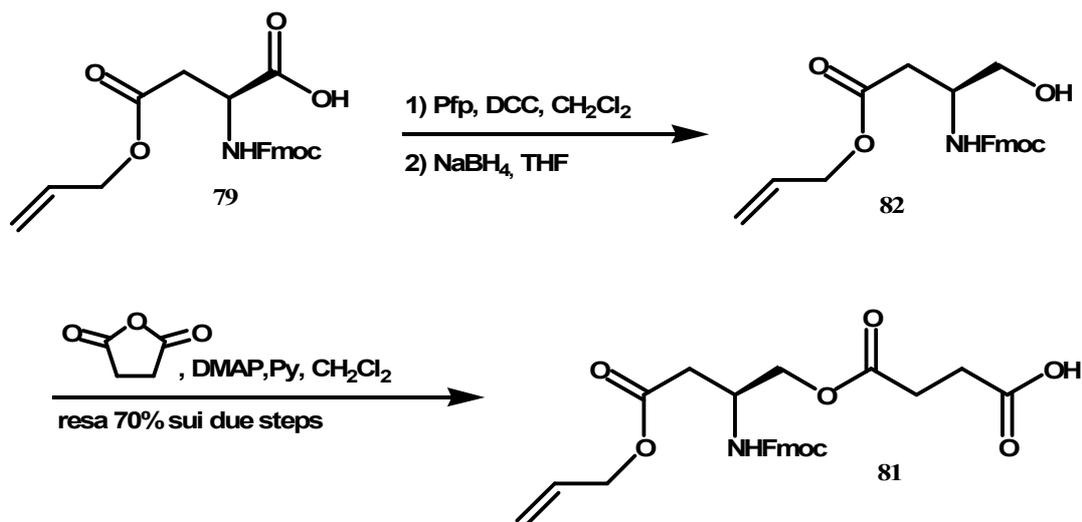
che precluderebbe la possibilità di effettuare la ciclizzazione *on resin*, si è pensato di manipolare opportunamente il residuo aspartico per renderlo funzionale alla sintesi dell'analogo **30**. Pertanto si è pensato di ottenere il ciclopeptide **30** completamente su resina, a partire dall'acido aspartico **79** commercialmente disponibile (Schema 3.12).



Schema 3.12-Schema retrosintetico per l'ottenimento del composto **30**

### 3.5.2 Sintesi del derivato aspartico **81**

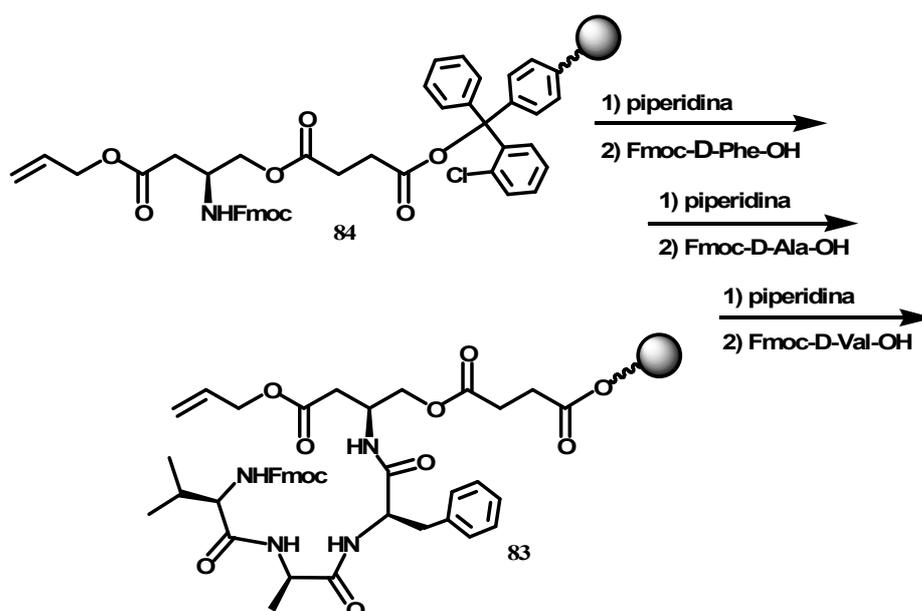
La sintesi ha preso il via dall'ottenimento dell'alcol **82** attraverso la formazione di un estere attivato dell'acido aspartico **79** e successiva esposizione a condizioni riducenti<sup>69</sup>. Il grezzo così ottenuto è stato accoppiato con l'anidride dell'acido succinico per fornire, in buona resa, il  $\beta$ -amminoacido **78** (Schema 3.13) che verrà fissato alla resina per i successivi stadi sintetici.



Schema 3.13-Sintesi del derivato aspartico **81**.

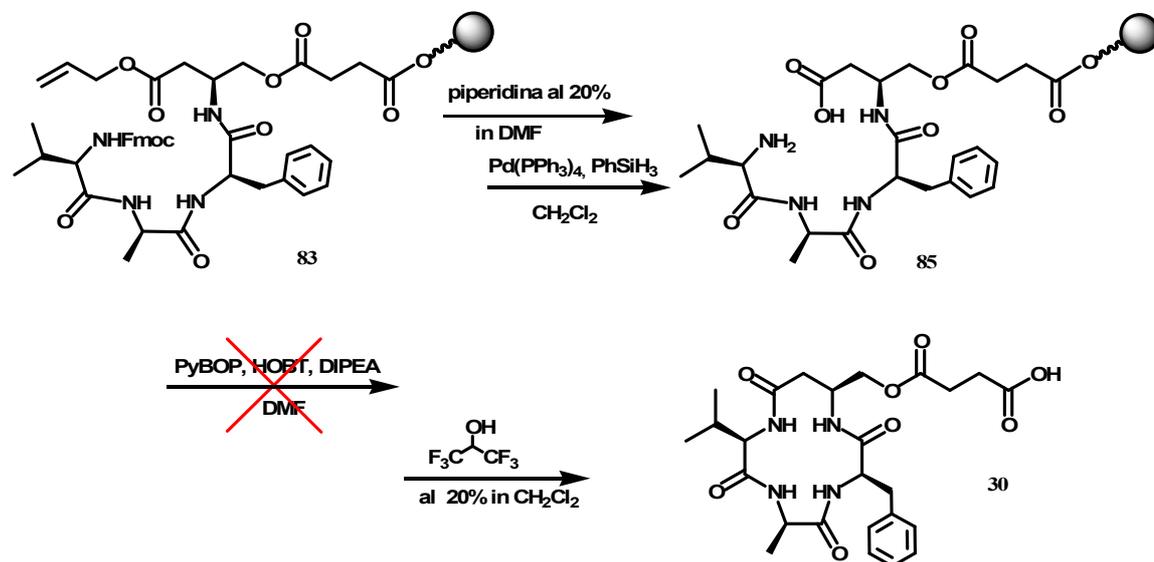
### 3.5.3 Sintesi su fase solida dell'analogo **30**

Dopo aver ottenuto il composto **81** si è potuto procedere alla sintesi del ciclopeptide **30** totalmente su fase solida. Il composto **81** è stato, quindi, ancorato alla resina 2-clorotritilica e sottoposto alla sequenza di reazioni di deprotezione e successivo accoppiamento (le condizioni di reazione sono già state ampiamente descritte in precedenza) per fornire il tetrapeptide diprotetto **83** (Schema 3.14).



Schema 3.14-Sintesi su fase solida: accresci manto della catena peptidica.

Il tetrapeptide lineare **83** è stato quindi deprotezionato e sottoposto a condizioni di ciclizzazione (Schema 3.15):



Schema 3.15-Reazione di ciclizzazione su resina

Anche in questo caso la reazione di macrolattamizzazione è risultata, però, fallimentare.

Questo ulteriore insuccesso ha reso necessarie delle considerazioni:

se il primo approccio tentato, di sintesi in soluzione, ha condotto facilmente all'ottenimento del tetrapeptide lineare **70**, ma si è arenato sulla reazione di ciclizzazione; se il secondo percorso sintetico, operato su resina, ha fornito un rapido accesso al peptide lineare **78**, ma ha subito un brusco arresto nello stadio di chiusura dell'anello peptidico; e se quest'ultima sintesi, che avrebbe dovuto condurre in maniera rapida e diretta al ciclopeptide **30**, si è spenta sullo stesso stadio di macrolattamizzazione; è allora possibile che il problema sia insito nella natura della molecola stessa.

È, infatti, possibile che il tetrapeptide assuma una conformazione particolarmente stabile, rendendo improbabile l'avvicinamento delle due teste polari e determinando di conseguenza la mancata ciclizzazione.

Alla luce di quanto emerso, si è creduto più opportuno abbandonare questa struttura per dirottare i propri interessi su sistemi che potessero avere maggiori possibilità di successo.

## **CAPITOLO 4**

---

---

#### **4. Analoghi prolinici delle azumammidi**

Il lavoro presentato sinora e soprattutto la lunga serie di insuccessi collezionati hanno messo bene in evidenza l'importanza, nell'elaborazione di strategie sintetiche per l'ottenimento di strutture particolarmente tensionate, quali quelle ciclotetrapeptidiche, della reazione di ciclizzazione. Questo delicato *step* di reazione, ha, infatti, dimostrato di poter essere, non solo, responsabile di rese non esaltanti, ma di poter rappresentare, anche, la causa del fallimento dell'intera sintesi. È necessario, quindi, valutare accuratamente tutte le variabili che, incidendo sullo stadio sintetico limitante, possano discriminare tra un percorso vincente ed uno fallimentare.

Innanzitutto, è opportuno ricordare che la reazione di lattamizzazione non è altro che una reazione di formazione di un legame peptidico con un gruppo amminico che attacca una funzione carbossilica a dare il legame ammidico. Come tale, quindi, necessita di adeguati agenti di accoppiamento per poter essere condotta a buon fine. La maggior parte degli agenti di *coupling* reagisce con la funzione carbossilica rendendola più incline a subire l'attacco nucleofilo da parte della funzione amminica, ma non garantisce che quest'ultimo avvenga. Infatti, non è sufficiente che una delle due specie coinvolte nella formazione del nuovo legame venga attivata, ma è, anche, necessario che le due funzionalità si incontrino. È, inoltre, indispensabile controllare un rischio insito nella natura stessa della reazione: la competizione tra la reazione intermolecolare e quella intramolecolare. Avendo, già in precedenza testato l'utilizzo di diversi agenti di accoppiamento, di condizioni di elevata diluizione quale incentivo all'attacco intramolecolare a dispetto di quella intermolecolare e di ancoraggio ad un supporto che limitasse maggiormente la mobilità delle molecole azzerando i rischi di dimerizzazione/oligomerizzazione, non resta altra opportunità se non l'introduzione di una variante strutturale, che determinando una diversa conformazione del tetrapeptide lineare, incrementi la probabilità di incontro tra le due funzionalità succitate. È su queste basi, allora, che si origina l'idea di sostituire uno dei quattro amminoacidi dell'analogo **30** con un residuo prolina.

La prolina, infatti, per via delle proprie caratteristiche strutturali (è un imminoacido), fornisce facilmente legami peptidici di tipo *cis*<sup>70</sup>. La sua introduzione, quindi, potrebbe determinare una "angolazione" della molecola e, conseguentemente, l'avvicinamento delle due teste polari del tetrapeptide.

Non resta altro che individuare, prima di passare alla parte operativa, quale sia la sostituzione più opportuna da effettuare. Scartata a priori l'eventualità di inserire la prolina in luogo dell'acido aspartico, di fatto l'unico residuo facilmente funzionalizzabile con il gruppo zinco-chelante, la scelta è ristretta ai residui fenilalanina, alanina e valina.

Da una prima valutazione potrebbe risultare complicata persino l'individuazione dei criteri di scelta da applicare. Riesaminando, però, gli studi di interazione del complesso inibitore-enzima, discussi nei capitoli precedenti, appare chiaro che, laddove l'anello benzilico della fenilalanina e l'isopropile della valina contribuiscano alla stabilizzazione del complesso attraverso la formazione di legami idrogeno e di tipo van der Waals, l'alanina non giochi alcun ruolo di rilievo. È alla luce di queste considerazioni che si è deciso di operare la sostituzione, nella molecola **30**, dell'amminoacido alanina con un residuo prolina.

### 4.1 Analogo 29

L'analogo **29**, strutturalmente derivato dal composto **30** per sostituzione della *D*-alanina con una *D*-prolina, conserva della naturale azumammide E solo due dei quattro amminoacidi costituenti (la *D*-fenilalanina e la *D*-valina). Mantiene, inoltre, la direzione dei legami ammidici interni al ciclo e l'orientazione relativa delle catene laterali (Figura 4.1).

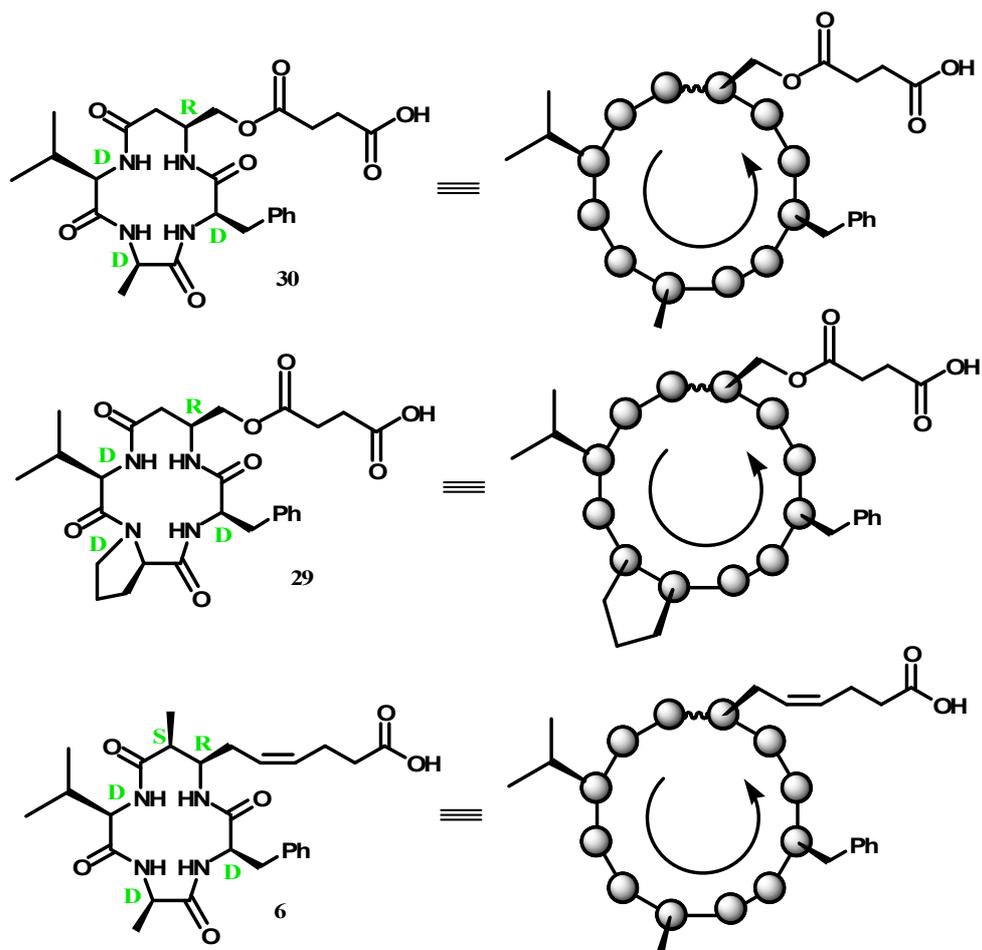
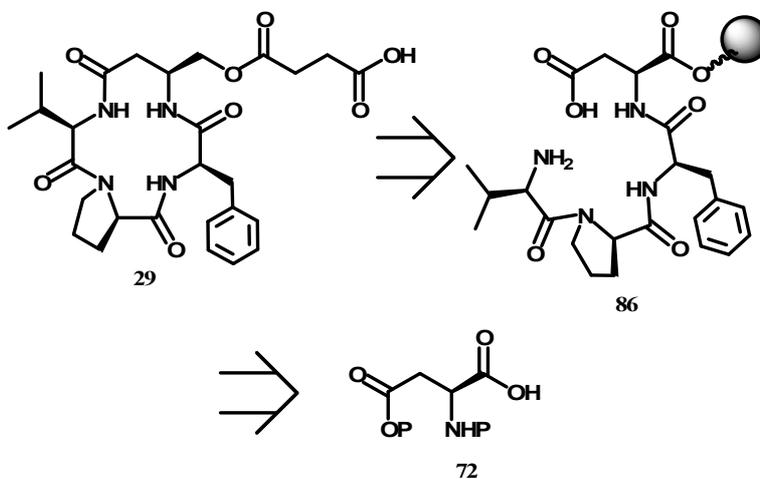


Figura 4.1-Confronto delle caratteristiche strutturali dei composti 6, 29 e 30.

#### 4.1.1 Schema retro sintetico: analogo 29

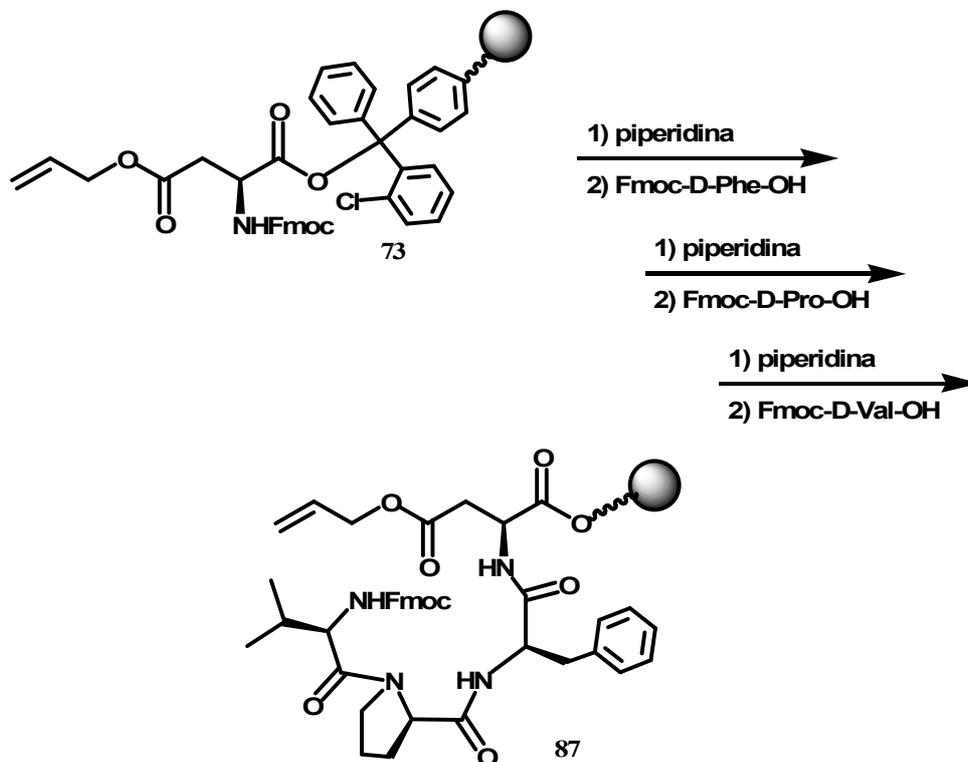
Il composto **29** potrebbe essere ottenuto per ciclizzazione su resina del tetrapeptide **86**, a sua volta riconducibile all'acido aspartico **72** (Schema 4.1).



Schema 4.1-Elaborazione retrosintetica per l'ottenimento dell'analogo 29.

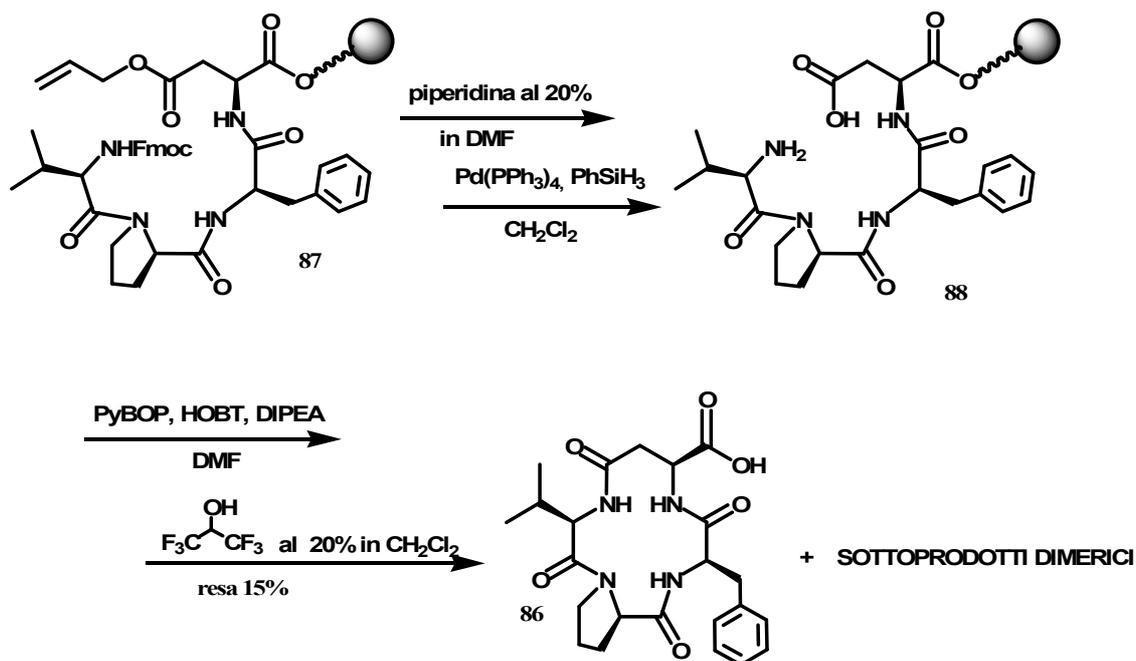
## 4.1.2 Sintesi dell'analogo 29

L'acido aspartico **72** è stato ancorato alla resina 2-cloro tritilica e attraverso le successive reazioni di inserzione rispettivamente della *D*-fenilalanina, *D*-prolina e *D*-valina ha fornito il tetrapeptide **87** (Schema 4.2).



Schema 4.2-Sintesi tetrapeptide **87**

Il composto **87** è stato quindi deproteetto e sottoposto a condizioni di ciclizzazione. Il successivo distacco dal supporto solido, operato con esafluoroisopropanolo in diclorometano, ha fornito il prodotto **29** in miscela con non bene indagati prodotti di reazione intercatena dimerici, evidenziati dalle analisi di spettrometria di massa (Schema 4.3).

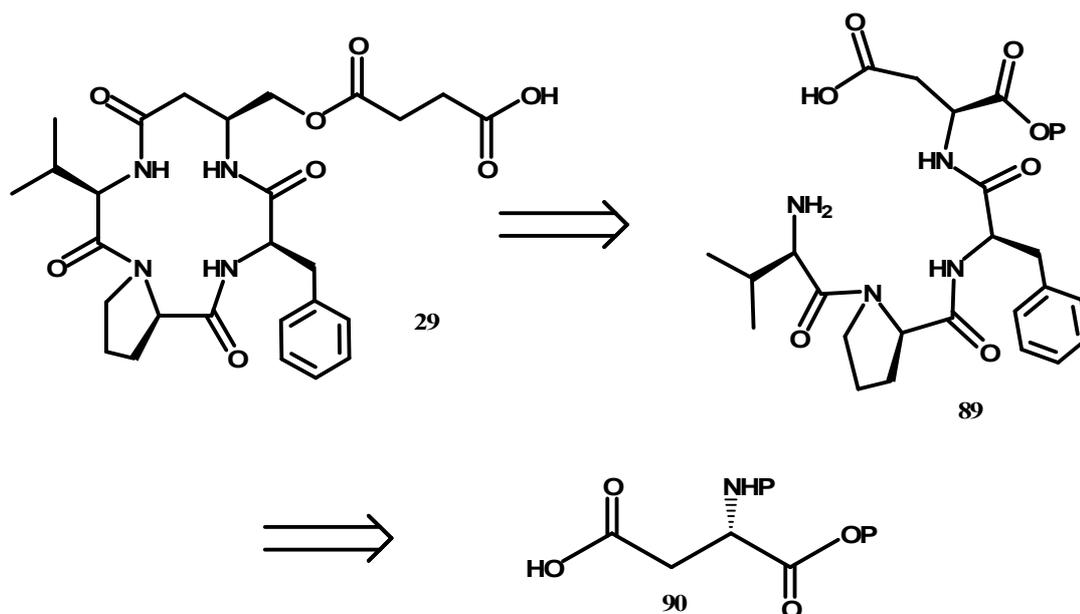
Schema 4.3- Sintesi del ciclo **86**

La successiva purificazione via HPLC ha fornito il composto **29** puro ed una stima della composizione della miscela, purtroppo in rapporto 1:3 a favore dei sottoprodotti indesiderati.

Scartata a priori l'opzione di sottocaricare ulteriormente la resina, si è pensato di ovviare a questo problema cambiando tipo di approccio sintetico. È stato deciso, infatti, di sintetizzare il tetrapeptide lineare su fase solida, per, poi, effettuare la reazione di ciclizzazione in soluzione per seguirne meglio il decorso.

## 4.2 Secondo schema retro sintetico dell'analogo **29**

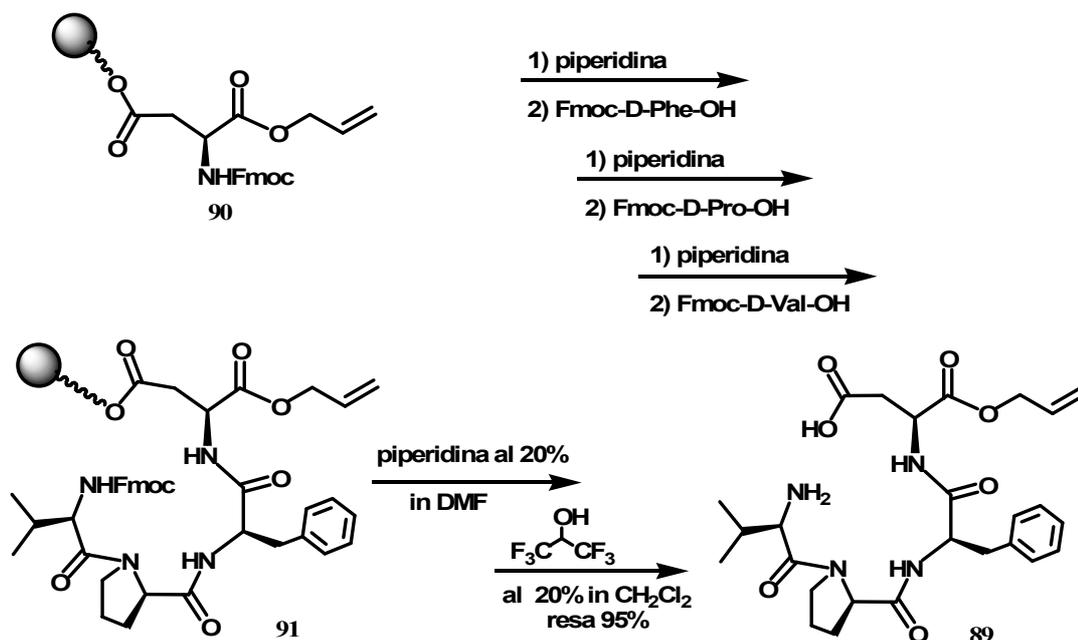
Come preannunciato, in questa elaborazione retrosintetica, si è pensato di ottenere l'analogo **29** per ciclizzazione in soluzione del tetrapeptide **89** sintetizzato su fase solida, a sua volta riconducibile all'acido aspartico **90** protetto, in questo caso, sulla funzione  $\alpha$ -carbossilica (Schema 4.4).



Schema 4.4-Seconda elaborazione retrosintetica per l'ottenimento dell'analogo 29

#### 4.2.1 Sintesi del tetrapeptide 89

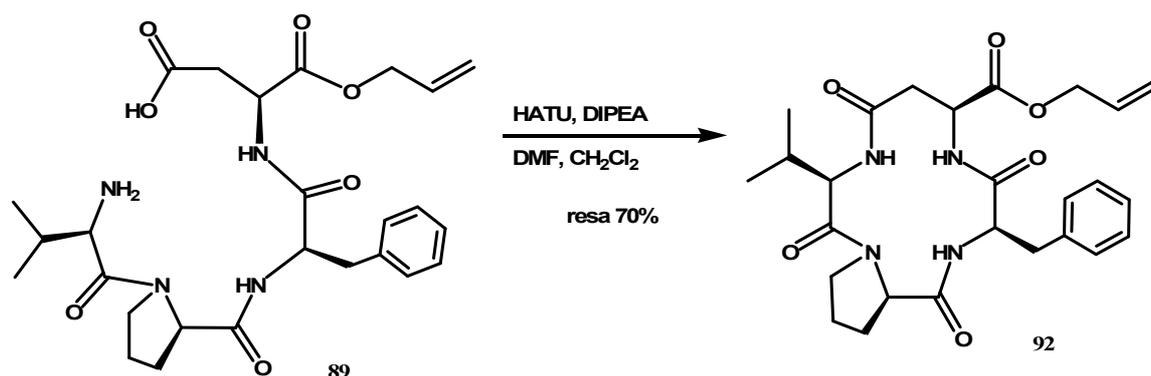
L'acido aspartico **90** è stato ancorato alla resina 2-clorotritilica e operando i soliti cicli di deprotezione/accoppiamento ha fornito il tetrapeptide **91**. Il composto **89** è stato quindi ottenuto, in buona resa, per deprotezione della funzione amminica e distacco dalla resina con la soluzione di esafluoroisopropanolo (Schema 4.5).



Schema 4.5-Sintesi tetrapeptide 89

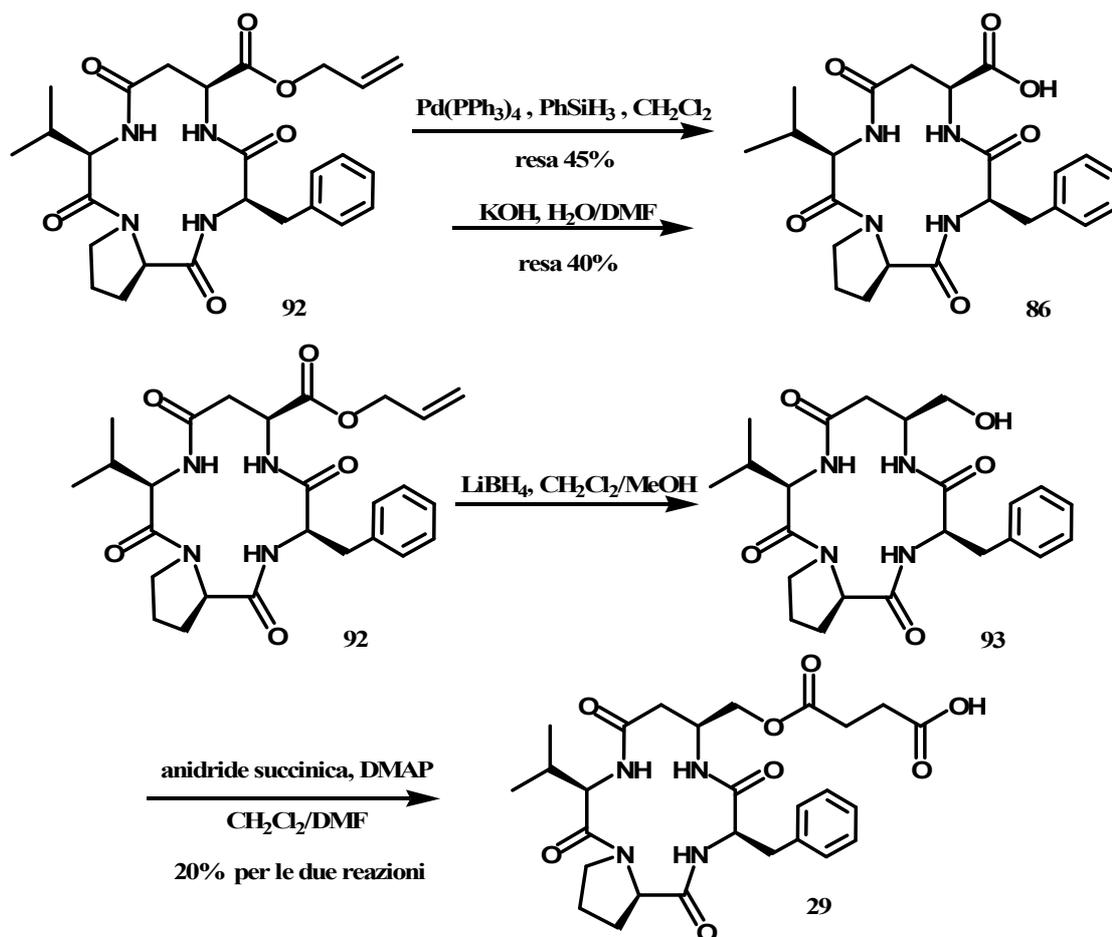
4.2.2 Ciclizzazione del tetrapeptide **89** e sintesi finale dell'analogo **29**

Operata l'operazione di *cleavage* che ha fornito il composto **89** si è potuto procedere alla reazione di ciclizzazione in soluzione. Questa reazione, condotta con l'utilizzo dell'agente di coupling HATU in condizioni di elevata diluizione ( $0.002\text{ M}$ )<sup>24</sup>, per sfavorire la formazione di prodotti di dimerizzazione/oligomerizzazione, ha, finalmente, fornito il ciclopeptide **89** (Schema 4.6).



Schema 4.6-Reazione di ciclizzazione del tetrapeptide **89**

Non avendo, a questo punto, né la reazione di deallilazione mediata da palladio-tetrakis(trifenilfosfina) fatto registrare gli attesi buoni risultati ottenuti in precedenza su supporto solido, né ottenuto in quantità congrue il prodotto deprotezionato per idrolisi catalizzata da idrossido di potassio, si è deciso di tentare una reazione di riduzione della funzione carbossilica che possa fornire in un unico stadio l'alcol **91**<sup>71,72,73</sup> (Schema 4.7).



Schema 4.7-Sintesi dell'analogo 29

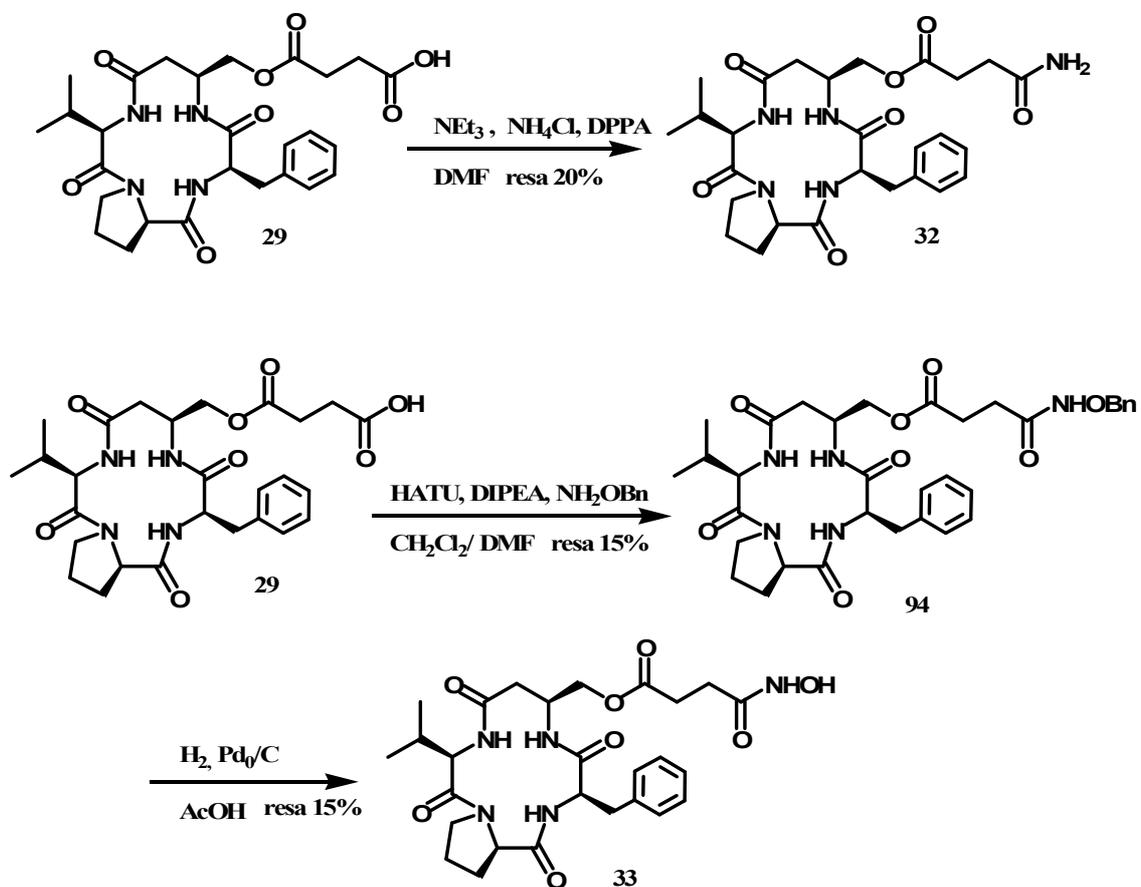
Il ciclopeptide **93**, così ottenuto, è stato, infine, “funzionalizzato” con l’inserimento di una molecola di acido succinico a dare l’analogo **29**, con una resa totale del 15% a valle delle operazioni di purificazione cromatografiche effettuate via HPLC.

#### 4.2.3 Sintesi dei derivati del composto 29: modificazione del gruppo funzionale

Allo scopo di valutare gli eventuali effetti sulla prevista attività della molecola **29**, correlati alla modificazione del gruppo funzionale zinco-chelante, si è deciso di sintetizzare dei derivati di quest’ultima per trasformazione della funzione carbossilica rispettivamente in un gruppo ammidico ed un gruppo idrossammico.

Le reazioni quindi: con trietilammina e cloruro di ammonio mediata da difenilfosforilazide<sup>74</sup>; e con n-benzilossiammina e diisopropilammina mediata da HATU,

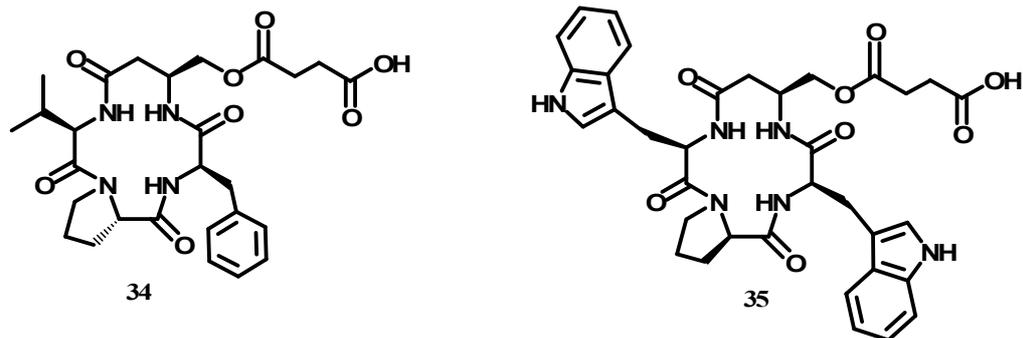
seguita da debenzilazione; hanno prodotto rispettivamente gli analoghi **32** e **33** (Schema 4.8).



Schema 4.8-Sintesi degli analoghi **32** e **33**

#### 4.2.4 Sintesi dei derivati dell'analogo **29**: modificazione dello scheletro peptidico

Tracciata una rapida ed efficiente strada sintetica per l'ottenimento del composto **29** si è reso, poi, possibile l'accesso a strutture analoghe. L'idea è quella di modulare l'azione di questi potenziali inibitori attraverso variazioni del telaio ciclopeptidico, responsabile del riconoscimento molecolare da parte dell'enzima. Le varianti prese in considerazione sono due: gli analoghi **34** e **35** (Schema 4.9).



Schema 4.9-Varianti strutturali dell'analogo 29

La scelta di questi due derivati non è, affatto, casuale, ma dettate da specifiche esigenze conformazionali e strutturali. L'introduzione del residuo prolinico nel sistema ciclopeptidico, infatti, ha sì permesso l'ottenimento degli analoghi sopra descritti, ma potrebbe aver indotto un riassetto conformazionale della molecola influenzando la sua capacità inibitrice. La sintesi dell'analogo **34**, recante la *L*-prolina, potrebbe, quindi, permettere una valutazione degli effetti delle eventuali modifiche conformazionali sull'attività di questi potenziali inibitori. Inoltre, l'opposta stereochimica dell'amminoacido prolina, potrebbe, per mezzo di una diversa conformazione del tetrapeptide lineare, giocare un importante ruolo nello stadio di ciclizzazione modificandone la resa.

L'inserimento nel sistema ciclico del composto **35** dei residui indolici (presenti nell'amminoacido triptofano) invece, comporterebbero, come noto dalla letteratura<sup>75</sup>, un incremento dell'affinità della molecola nei confronti degli HDACs e conseguentemente un aumentata capacità inibitrice.

#### 4.2.5 Sintesi dell'analogo 34

La prima delle strutture prese in esame è del tutto sovrapponibile all'analogo **29** da cui deriva, ad eccezione dell'opposta configurazione assoluta del residuo prolinico presente nell'anello. Questa semplice sostituzione, che implica, ovviamente, rilevanti conseguenze nell'assetto topologico delle catene laterali dei residui amminoacidici (Figura 4.2), potrebbe suffragare quanto postulato in precedenza: il residuo presente in questa posizione, a meno di particolari effetti specifici (es: sterici) che possano influire

sull'assetto conformazionale assunto dalla molecola, non dovrebbe influenzare significativamente la potenziale attività inibitrice.

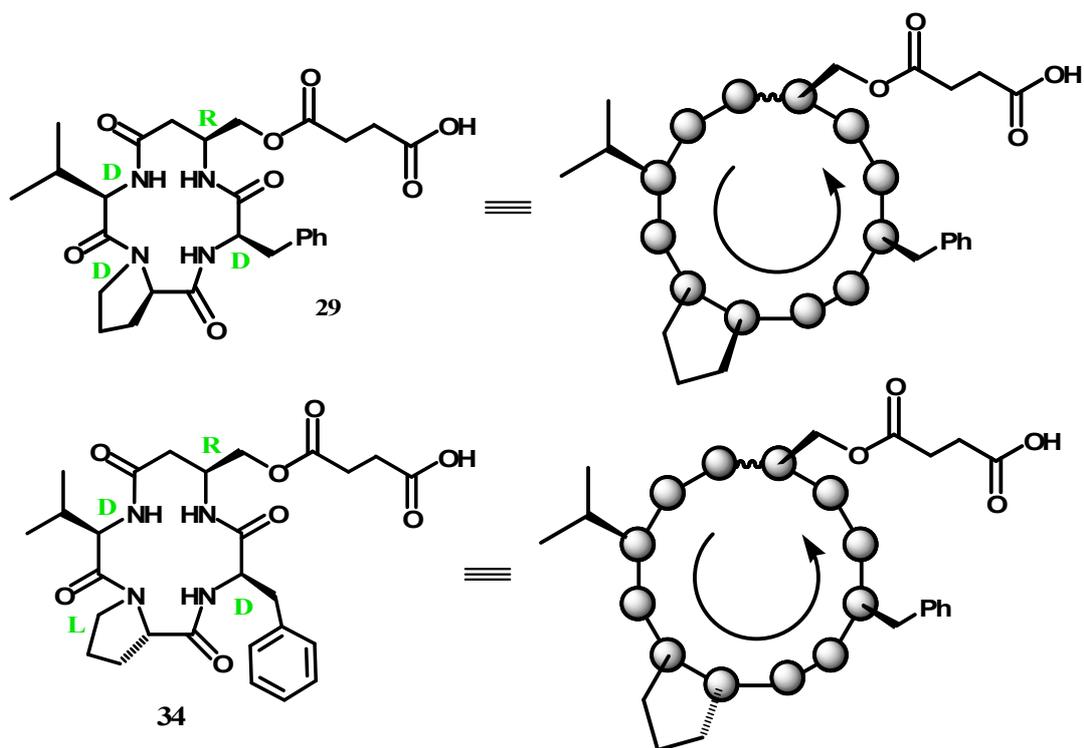
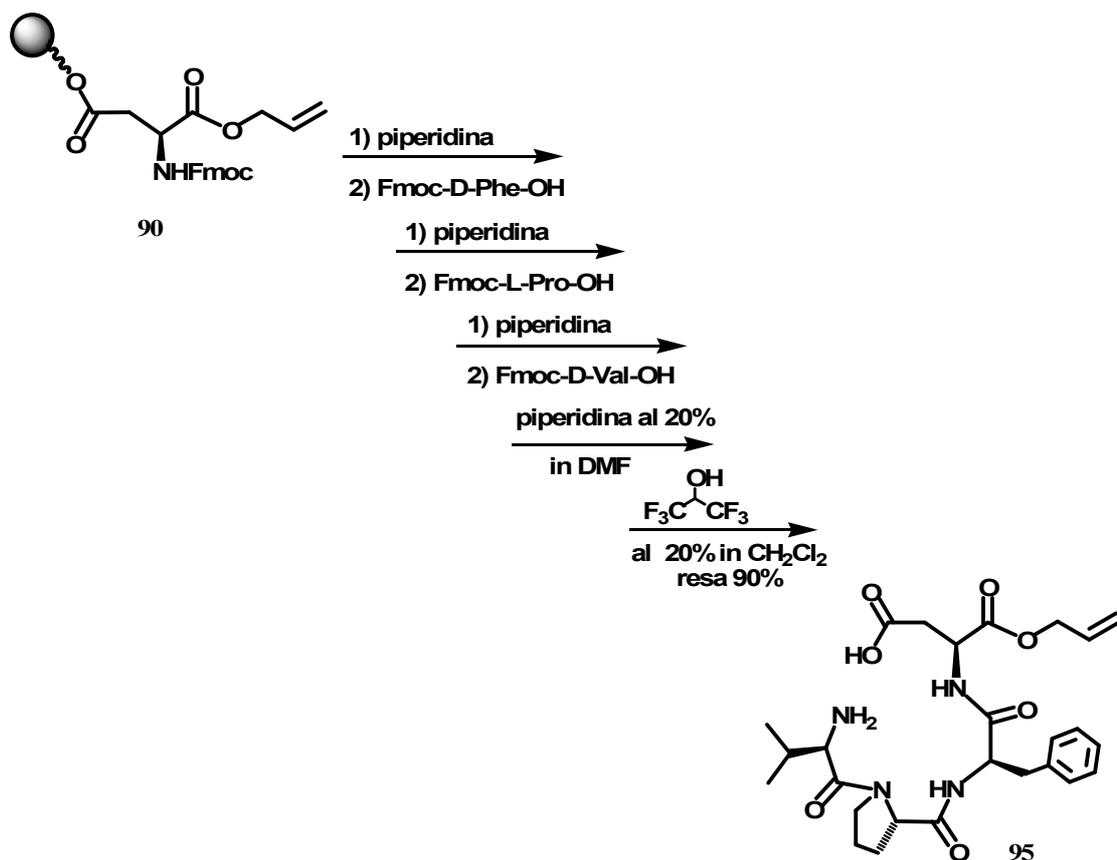


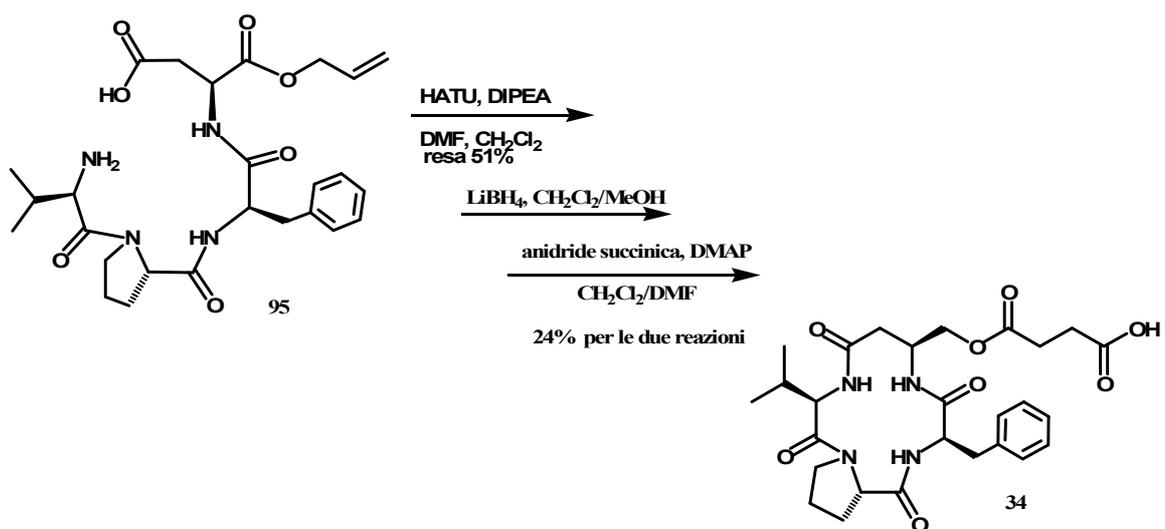
Figura 4.10-Confronto delle strutture degli analoghi 29 e 34.

La sintesi del composto 34 è stata realizzata in maniera del tutto analoga a quella descritta per il ciclo peptide 29. Questa ha preso origine dell'acido aspartico 90, che è stato ancorato alla resina permettendo, attraverso gli opportuni cicli di deprotezione/accoppiamento e il successivo distacco dal supporto solido di giungere al ciclo peptide 95 (Schema 4.11).



Schema 4.11- Sintesi dell'intermedio 95

I successivi *steps* di ciclizzazione, riduzione ed acilazione hanno, infine prodotto l'analogo 34 (Schema 4.12).



Schema 4.12-Sintesi dell'analogo 34

## 4.2.6 Sintesi dell'analogo 35

La seconda molecola concepita, il composto **35**, conserva del ciclopeptide **29** la direzione dei legami ammidici interni all'anello e l'orientamento relativo delle catene laterali, ma registra la sostituzione degli amminoacidi *D*-fenilalanina e *D*-valina con due residui *D*-triptofano (Figura 4.13).

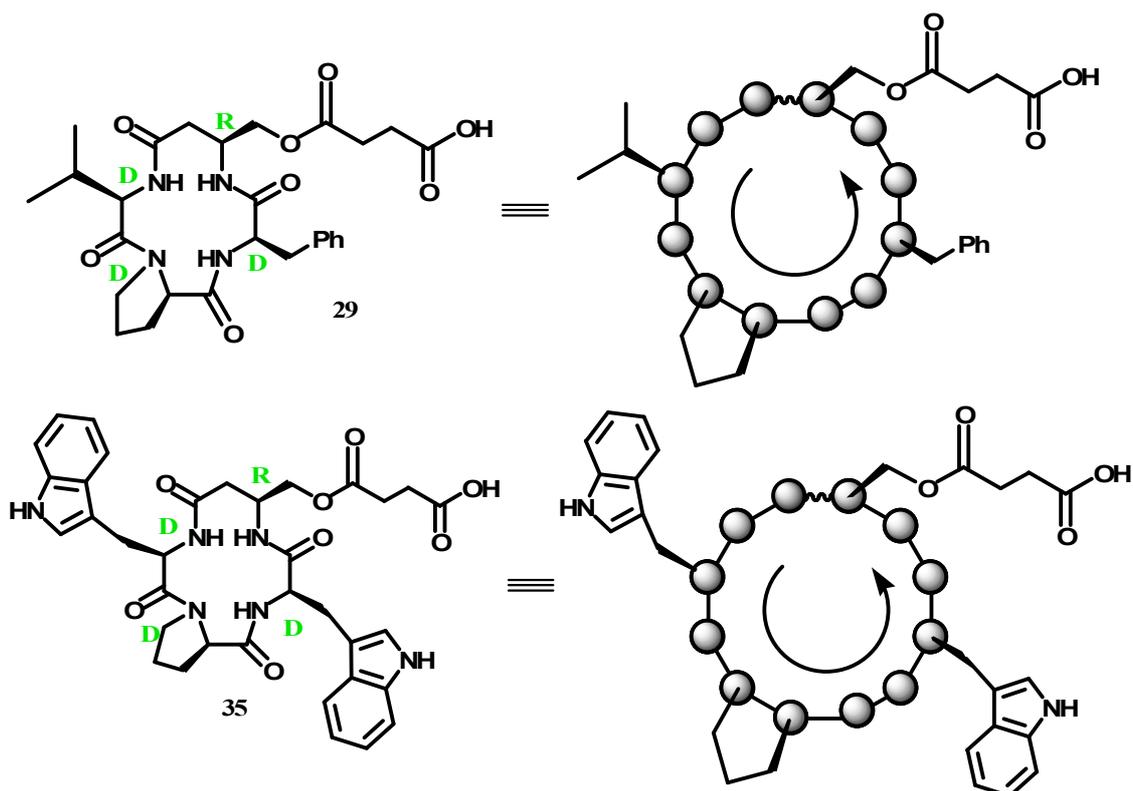
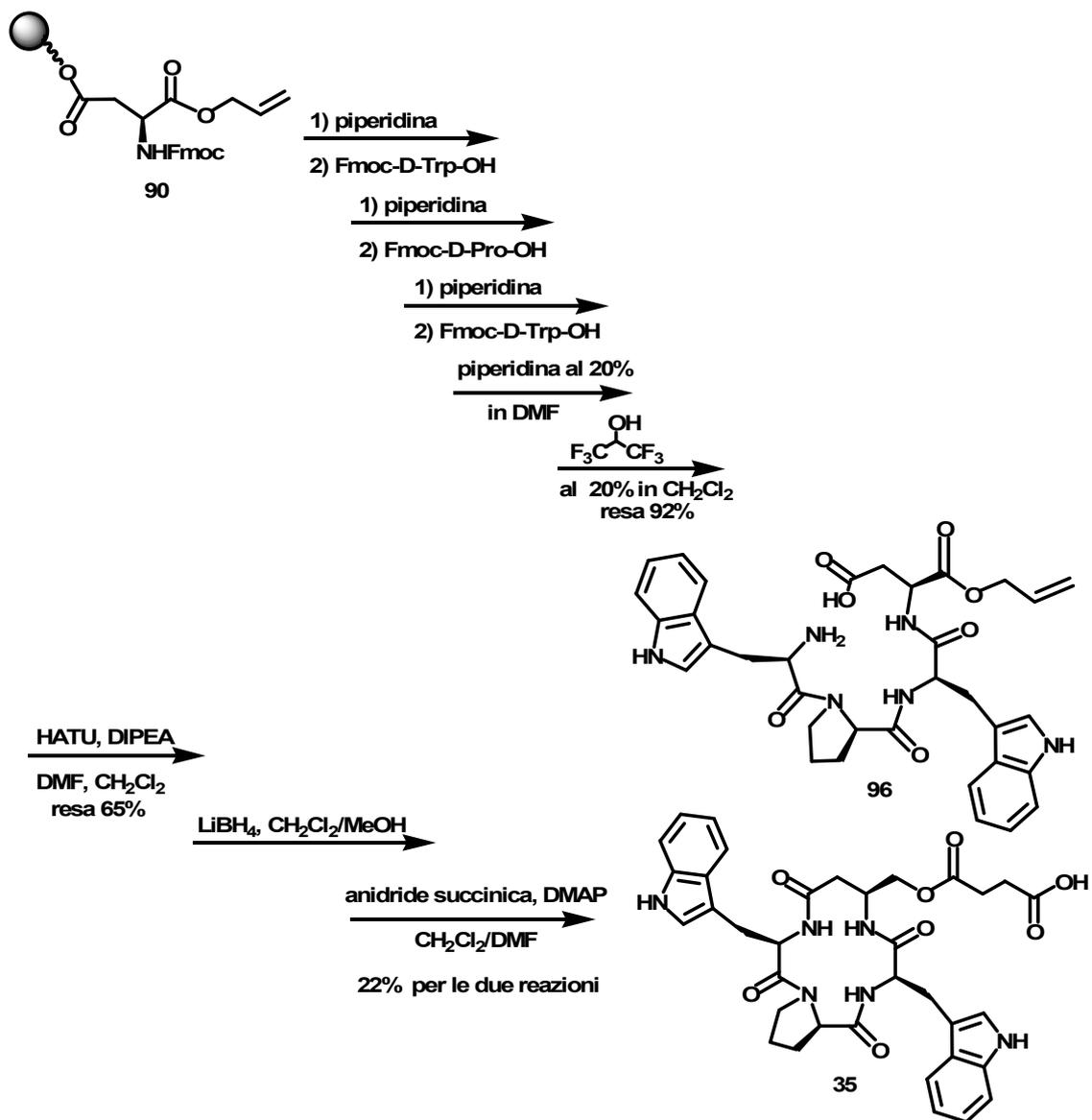


Figura 4.13-Confronto strutturale degli analoghi **29** e **34**.

Scopo di queste variazioni è quello di stabilizzare il complesso inibitore-enzima per via delle più estese interazioni che i sistemi indolici dei residui triptofano potrebbero garantire<sup>76</sup>.

Il percorso sintetico che conduce al composto **35** ripercorre fedelmente le tappe sintetiche che hanno fornito il ciclo peptide di origine **29**. L'ancoraggio dell'acido aspartico **90** alla resina 2-clorotritilica ha permesso l'accrescimento del peptide lineare **96** che distaccato dal supporto solido attraverso gli stadi di ciclizzazione, riduzione ed accoppiamento con l'anidride dell'acido succinico ha fornito l'analogo **35** (Schema 4.12).



Schema 4.14-Sintesi totale dell'analogo 35.

## **CAPITOLO 5**

---

---

## 5.1 Derivato ciclopeptidico 9

L'ultima parte di questo lavoro è stata dedicata, infine, alla sintesi dell'analogo 9 (Figura 5.1).

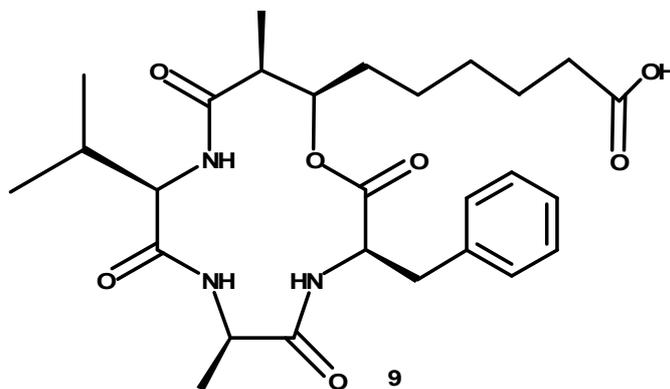


Figura 5.1-Struttura della analogo 9

Lo scopo è quello che ha animato l'intero lavoro: elaborare delle valide strategie sintetiche che forniscano nuovi analoghi delle azumammidi e conseguentemente, attraverso opportune variazioni strutturali, conducano a nuove famiglie di potenziali inibitori.

L'analogo 9 esibisce all'interno dell'anello un legame di tipo estereo, che lo classifica di fatto, come ciclopeptide eterodetico, e, più precisamente, lo pone nella famiglia dei ciclopeptidici. Dal confronto strutturale con le molecole marine d'origine, si nota la permanenza di ben tre dei quattro amminoacidi costituenti (la *D*-fenilalanina, la *D*-alanina, e la *D*-valina) e la sostituzione del  $\beta$ -amminoacido naturale, la cui sintesi si è dimostrata estremamente lunga e laboriosa, con un  $\beta$ -idrossiacido, più facilmente ottenibile. Inoltre, nel rispetto dei requisiti topologici in precedenza discussi, il composto 9 conserva, in relazione all'azumammide 6, l'orientazione relativa delle catene laterali (Figura 5.2).

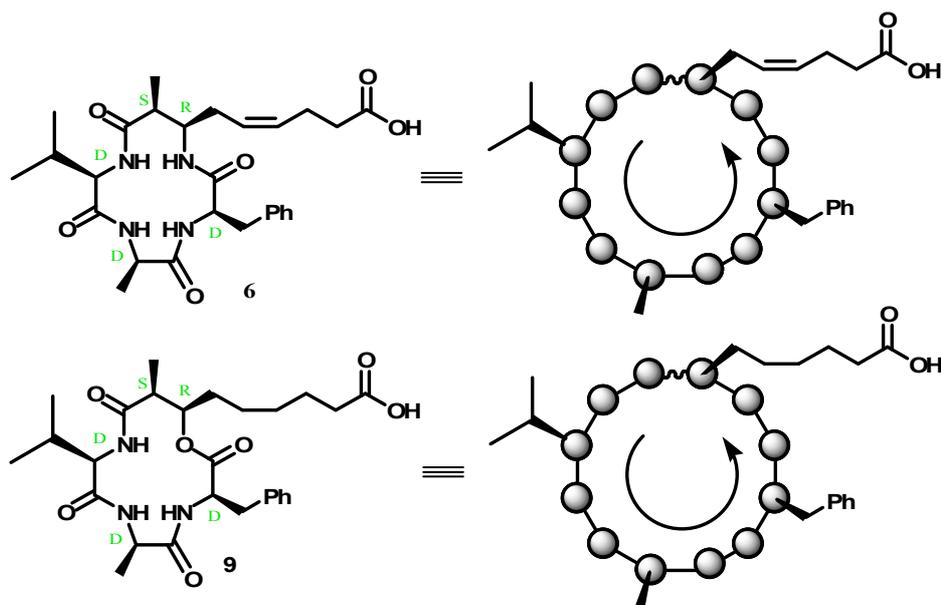
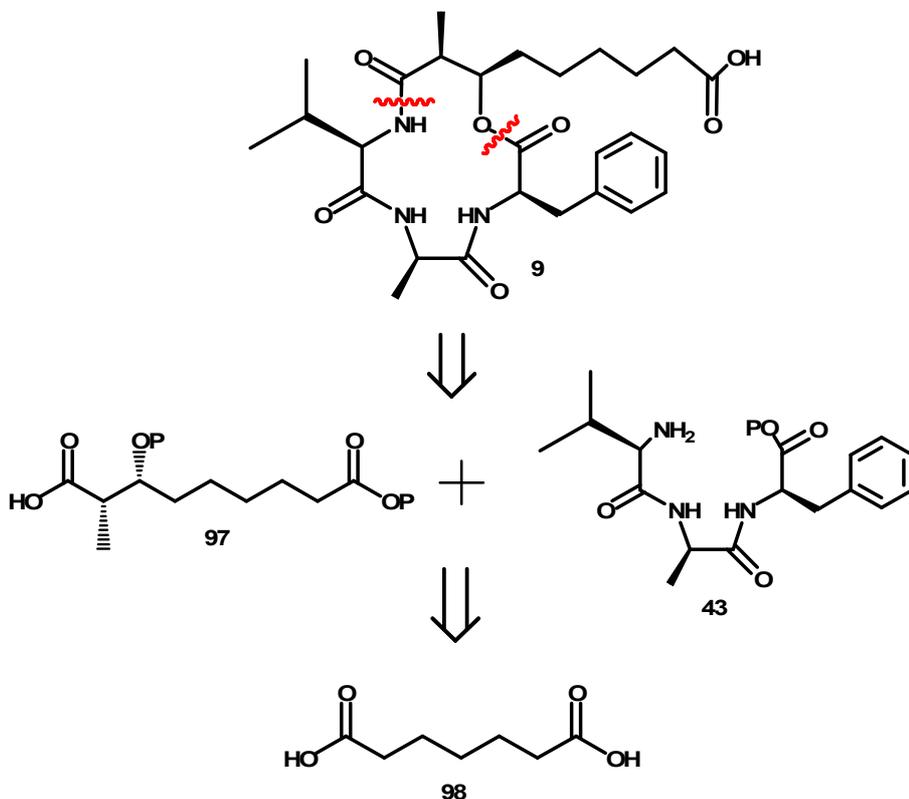


Figura 5.2-Confronto delle strutture 6 e 9.

## 5.2 Schema retrosintetico dell'analogo 9

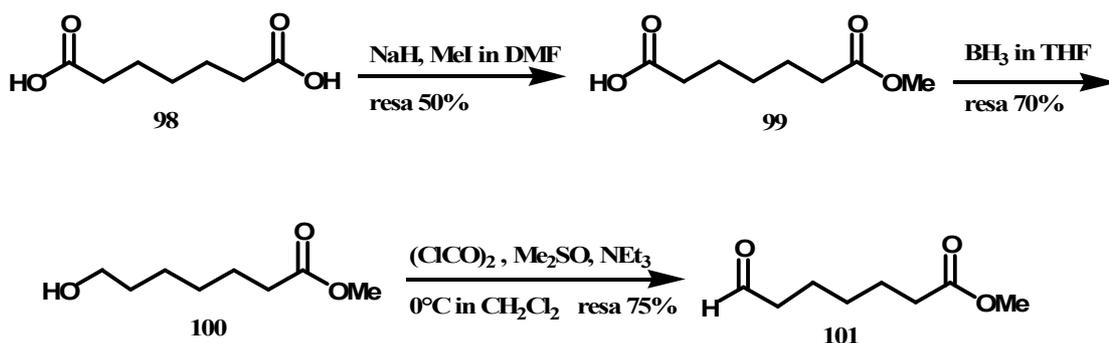
L'elaborazione retro sintetica concepita si basa su un approccio di tipo convergente con il ciclopeptide 9 ottenibile dall'accoppiamento del tripeptide 43 con il  $\beta$ -idrossiacido 97, a sua volta riconducibile all'acido pimelico (98) (Schema 5.1).



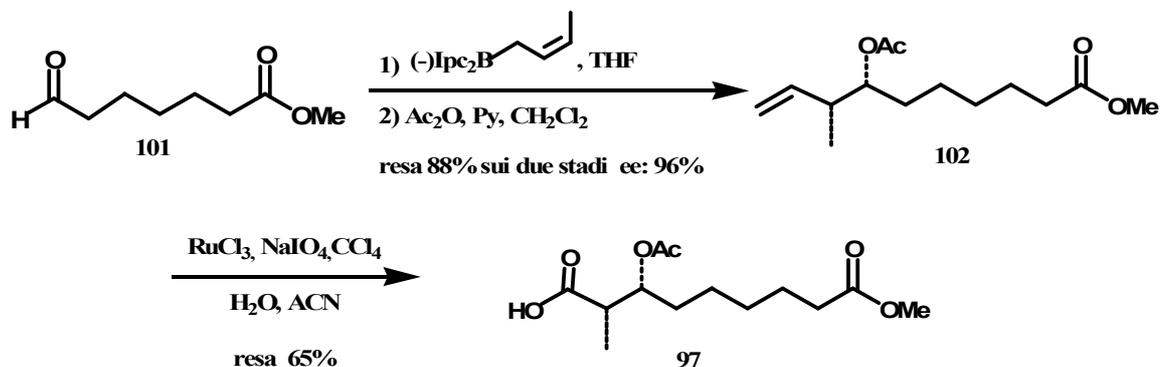
Schema 5.1-Elaborazione retro sintetica per l'ottenimento dell'analogo 9

5.3 Sintesi dell'analogo 9:  $\beta$ -idrossiacido 97

La sintesi prende inizio dalla monoesterificazione dell'acido pimelico **98** a fornire l'estere metilico **99**. La successiva riduzione chemoselettiva operata con borano fornisce l'alcol **100**, che viene quindi ossidato in condizioni di Swern a dare l'aldeide **101** (Schema 5.2).

Schema 5.2-Sintesi dell'aldeide **101**

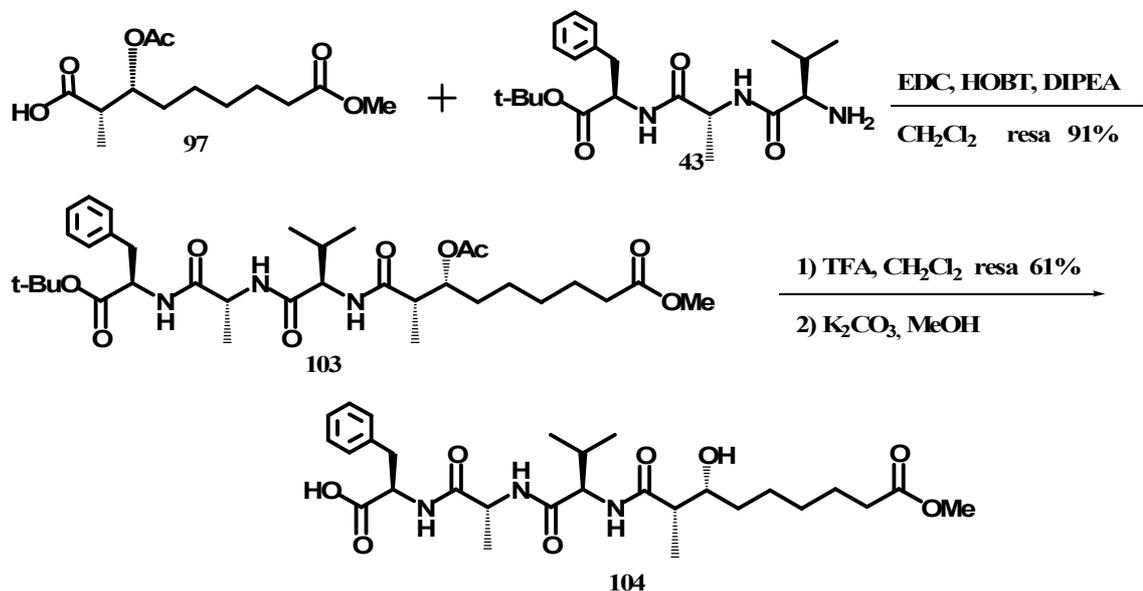
La scissione ossidativa con periodato di sodio dell'alchene **102**, ottenuto dalla crotilazione altamente stereoselettiva dell'aldeide **101**, fornisce, infine, il  $\beta$ -idrossiacido **97** (Schema 5.3).

Schema 5.3-Sintesi del  $\beta$ -idrossiacido **97**

## 5.3.1 Sintesi dell'analogo 9: accoppiamento e ciclizzazione

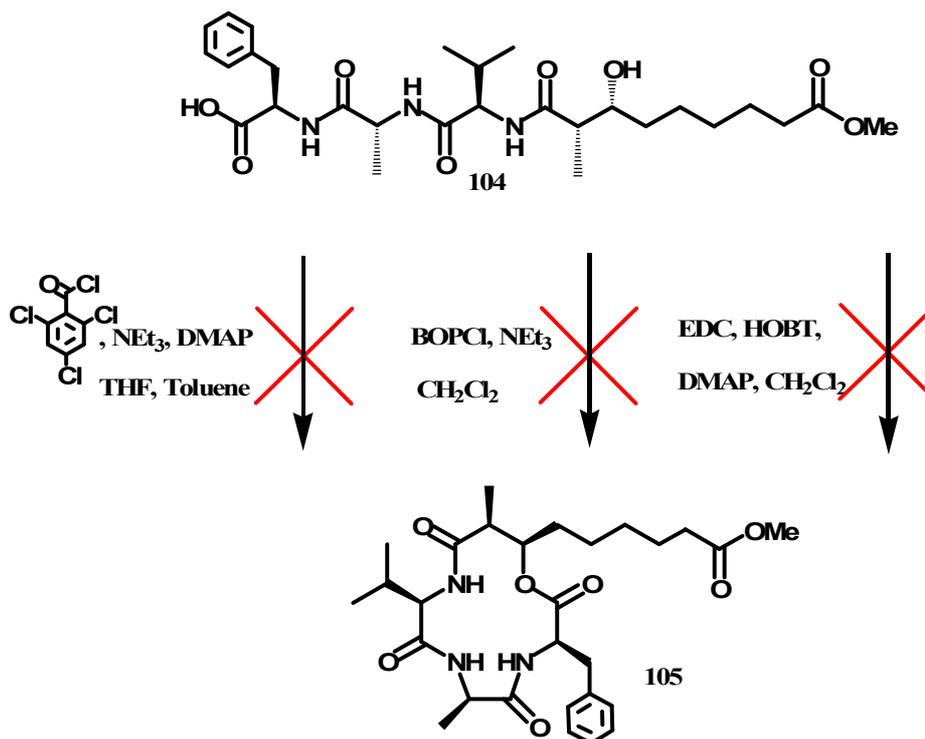
L'accoppiamento del  $\beta$ -idrossiacido **97** con il tripeptide **43** operato con l'ausilio dell'1-etil-3-(3'-dimetilamminopropil)-carbodiimmide ha condotto al tetrapeptide **103**, che per

successivi stadi di deprotezione ha fornito il peptide lineare **104**, substrato della successiva reazione di ciclizzazione (Schema 5.4).



Schema 5.4-Sintesi del tetrapeptide **104**

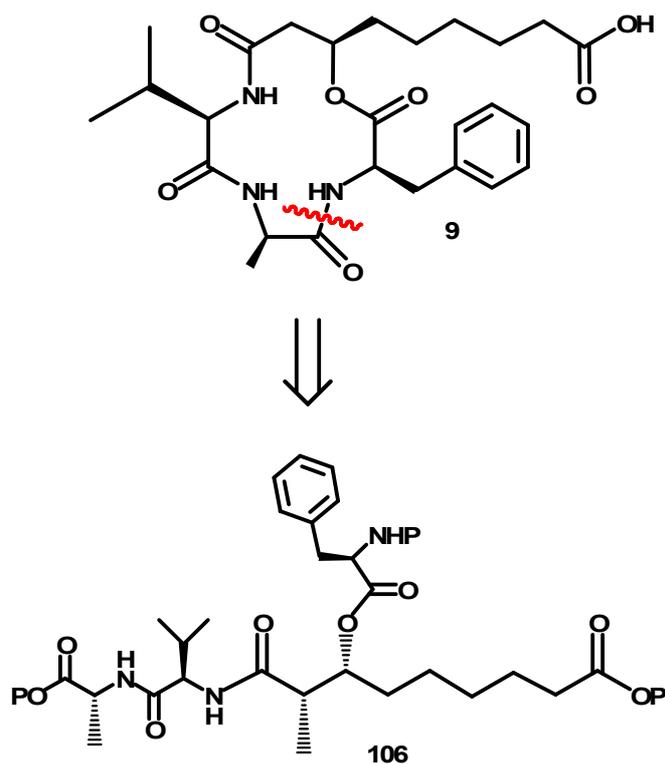
Come per le sintesi precedentemente descritte, lo stadio di ciclizzazione rappresenta la tappa fondamentale, da cui dipende il buon esito dell'intero progetto sintetico. A differenza di quanto visto sinora, la chiusura dell'anello è condotta, però, attraverso la formazione di un legame estereo (macrolattonizzazione) e non più per mezzo di un legame peptidico (macrolattamizzazione). La molecola lineare **104** è stata quindi sottoposta a condizioni di lattonizzazione, ma nonostante l'utilizzo di agenti condensanti quali BOPCl, trichlorobenzoilcloruro o EDC (che fanno registrare le maggiori probabilità di successo in sistemi simili) si è riuscito ad ottenere la chiusura dell'anello (Schema 5.5).



Schema 5.5-Reazioni di ciclizzazione

### 5.3.2 Secondo schema retrosintetico per l'analogo 9

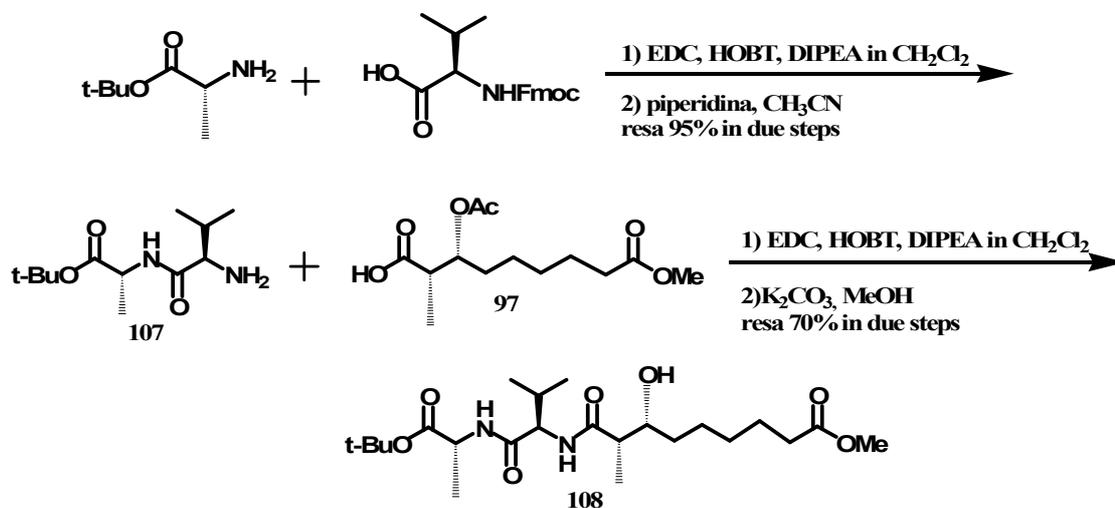
Avendo, ormai, già descritto la difficoltà di ciclizzazione dei sistemi tetrapeptidici in esame, a cui va ad sommarsi la più scarsa probabilità di successo legata alla reazione di lattonizzazione, si è deciso di variare il sito di chiusura dell'anello per sfruttare la maggiore nucleofilicità del gruppo amminico in ragione di quello alcolico. Si è pensato, allora di ottenere l'analogo **9** per ciclizzazione del depsipeptide lineare **106**, attraverso l'attacco dell'amminogruppo della *D*-fenilalanina al carbossile della meno ingombrata *D*-alanina (Schema 5.6).



Schema 5.6-Seconda elaborazione retro sintetica per l'ottenimento dell'analogo 9

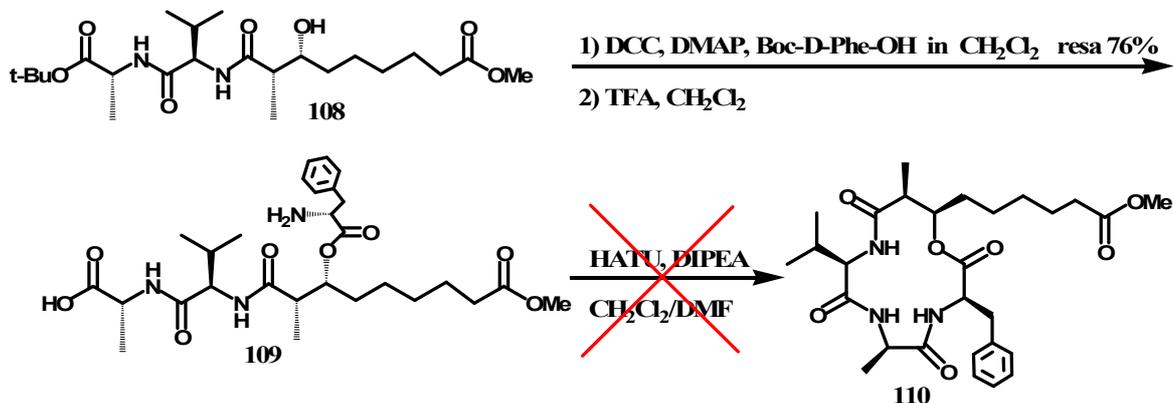
### 5.3.3 Sintesi dell'analogo 9: formazione del peptide lineare e ciclizzazione

Il dipeptide **107**, ottenuto per condensazione della *D*-valina-*O*-*t*Bu con la Fmoc-*D*-alanina, è stato accoppiato al  $\beta$ -idrossiacido **97** a fornire il tripeptide **108** (Schema 5.7).



Schema 5.7-Sintesi del tripeptide 108

Il tetrapeptide **109**, quindi, ottenuto dall'accoppiamento (e successiva deprotezione) di **108** alla Boc-*D*-fenilalanina, è stato sottoposto a reazione di ciclizzazione, senza, però fornire il ciclopeptide **110** (Schema 5.8).



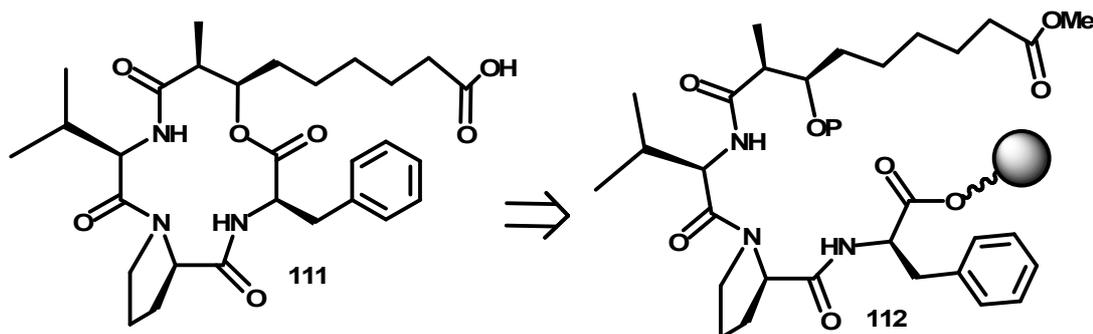
Schema 5.8-Sintesi del ciclopeptide **110**

#### 5.4 Derivato prolinico dell'analogo **9**

Supponendo che la causa della mancata ciclizzazione sia dovuta esclusivamente ad una, probabile, conformazione lineare particolarmente stabile, rimane un'ultima carta da giocare: la sostituzione del residuo *D*-alanina con una *D*-prolina, potrebbe rappresentare, come per i casi trattati nei capitoli precedenti, una possibile soluzione.

##### 5.4.1 Schema retrosintetico dell'analogo prolinico **111**

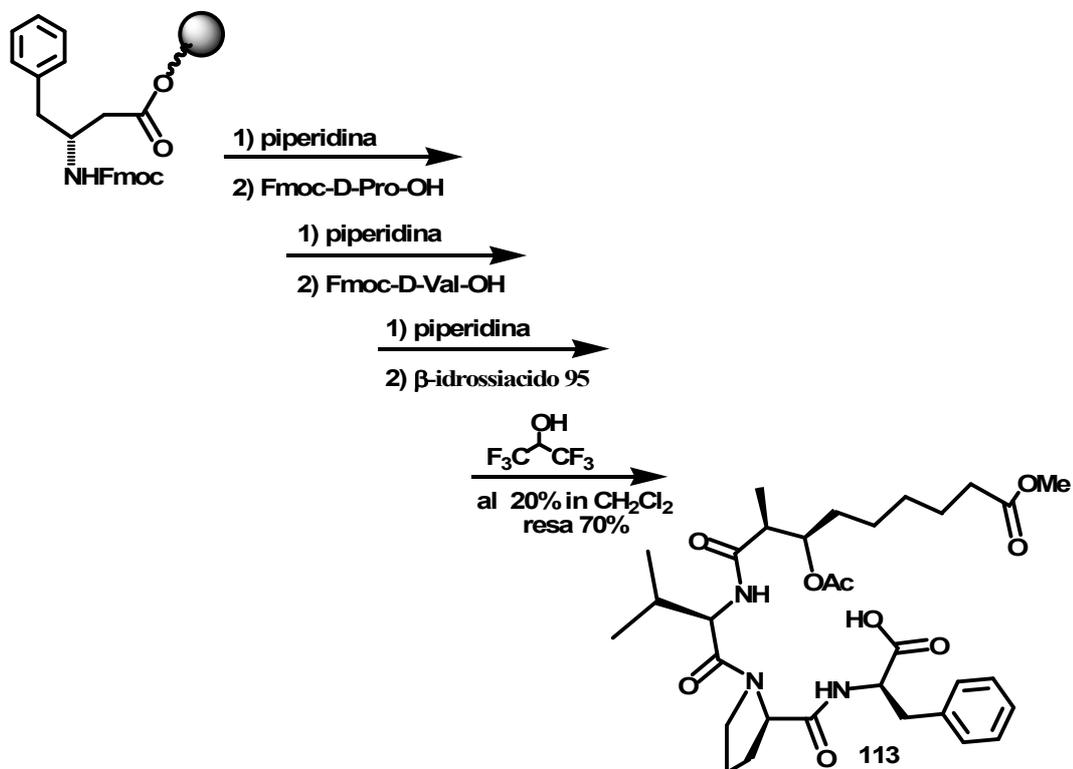
Nell'elaborazione retrosintetica per l'ottenimento dell'analogo prolinico **111** si è deciso di avvalersi delle vantaggiose tecniche di sintesi su fase solida. Si è, quindi immaginato, di poter ottenere il ciclopeptide **111** dalla ciclizzazione del tetrapeptide lineare **112**, ottenuto su supporto solido (Schema 5.9).



Schema 5.9-Elaborazione retrosintetica per l'ottenimento dell'analogo 111

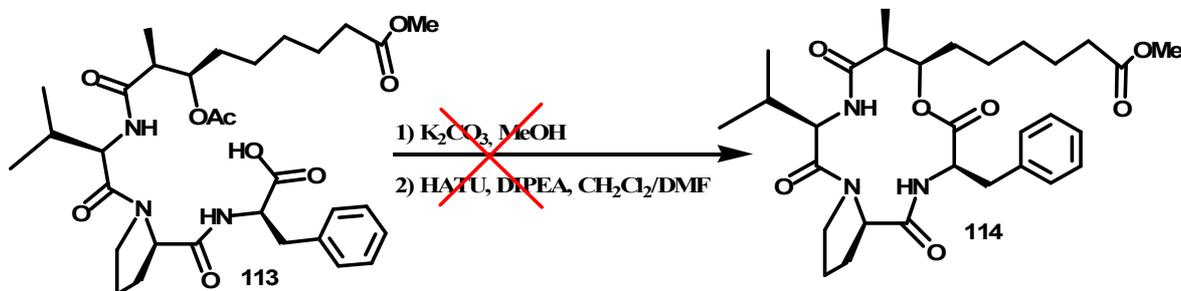
### 5.4.2 Sintesi dell'analogo 113: formazione del peptide lineare e ciclizzazione

La Fmoc-D-fenilalanina è stata ancorata alla resina 2-clorotritilica e sottoposta agli opportuni stadi di deprotezione/accoppiamento per fornire, per distacco dalla resina, il peptide lineare **113** (Schema 5.10).



Schema 5.10-Sintesi del peptide lineare 113.

I successivi stadi di deacetilazione e ciclizzazione con HATU, che ha fornito i buoni risultati per i sistemi descritti in precedenza, non hanno, però, condotto al prodotto ciclico **110** (Schema 5.11).



Schema 5.11-Reazione di ciclizzazione

Di fronte alle difficoltà palesatesi nella sintesi di telai ciclotetrapeptidici, si è deciso, allora, di abbandonare questi percorsi sintetici.

## **CAPITOLO 6**

---

---

## 6. Discussione dei risultati e Considerazioni conclusive

Prima di apporre a questo elaborato la parola fine è opportuno ripercorrere velocemente quanto descritto nei precedenti capitoli allo scopo di effettuare una valutazione critica dei dati acquisiti e trarne le opportune conclusioni.

### 6.1 Studi di interazione del complesso inibitore-enzima

Nella prima parte di questo lavoro sono state sintetizzate due varianti stereochimiche della naturale (+)-azumammide E: i composti **7** e **8** (figura 6.1).

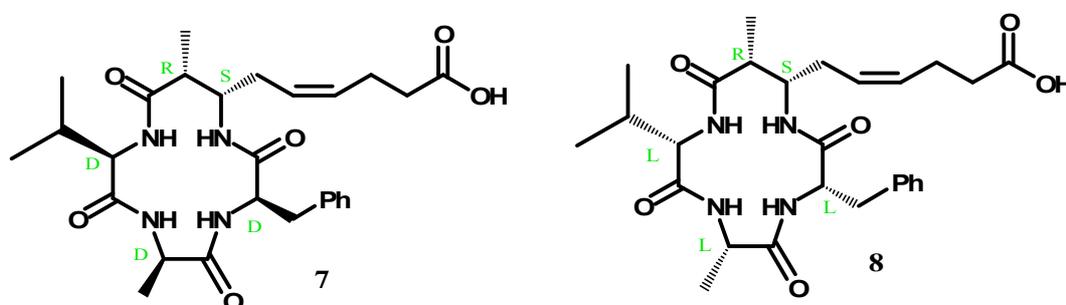


Figura 6.1-Stereoisomeri sintetici della (+)-azumammide E.

I due derivati differiscono dai metaboliti di origine rispettivamente per la stereochimica del  $\beta$ -amminoacido recante la funzione zinco-chelante (diastereoisomero **7**), e per la configurazione di tutti i centri stereogenici (enantiometro **8**). L'ottenimento di queste strutture ha permesso di svolgere, ad opera del gruppo del prof. Bifulco, degli studi di interazione del complesso inibitore-HDAC ed ha messo in luce degli interessanti aspetti strutturali degli inibitori ciclotetrapeptidici. L'utilizzo di software come AutoDock 3.0.5 e di un modello del sito attivo degli enzimi istone-deacetilasi (ricavato dalla struttura ai raggi X di un complesso dell'HDLP, omologo batterico degli HDACs), infatti, hanno evidenziato il modo in cui questi potenti inibitori possono alloggiare all'interno dell'enzima e l'insieme di interazioni puntuali che potrebbero stabilizzare il complesso inattivo. L'attenta analisi dei risultati ottenuti, confortati da saggi di attività svolti dalla dott.ssa Gallinari, ha posto in evidenza un sorprendente aspetto strutturale di questi inibitori:

L'attività di queste molecole è correlata non alla configurazione assoluta dei propri centri stereogenici, ma piuttosto alla loro stereochimica relativa. In altre parole non è la configurazione assoluta di ogni singolo centro chirale a determinare la capacità dei ciclotetrapeptidi di inibire gli istone-deacetilasi, ma, piuttosto, la stereochimica dell'insieme dei centri stereogenici, ovvero la topologia delle catene laterali dei singoli amminoacidi (figura 6.2).

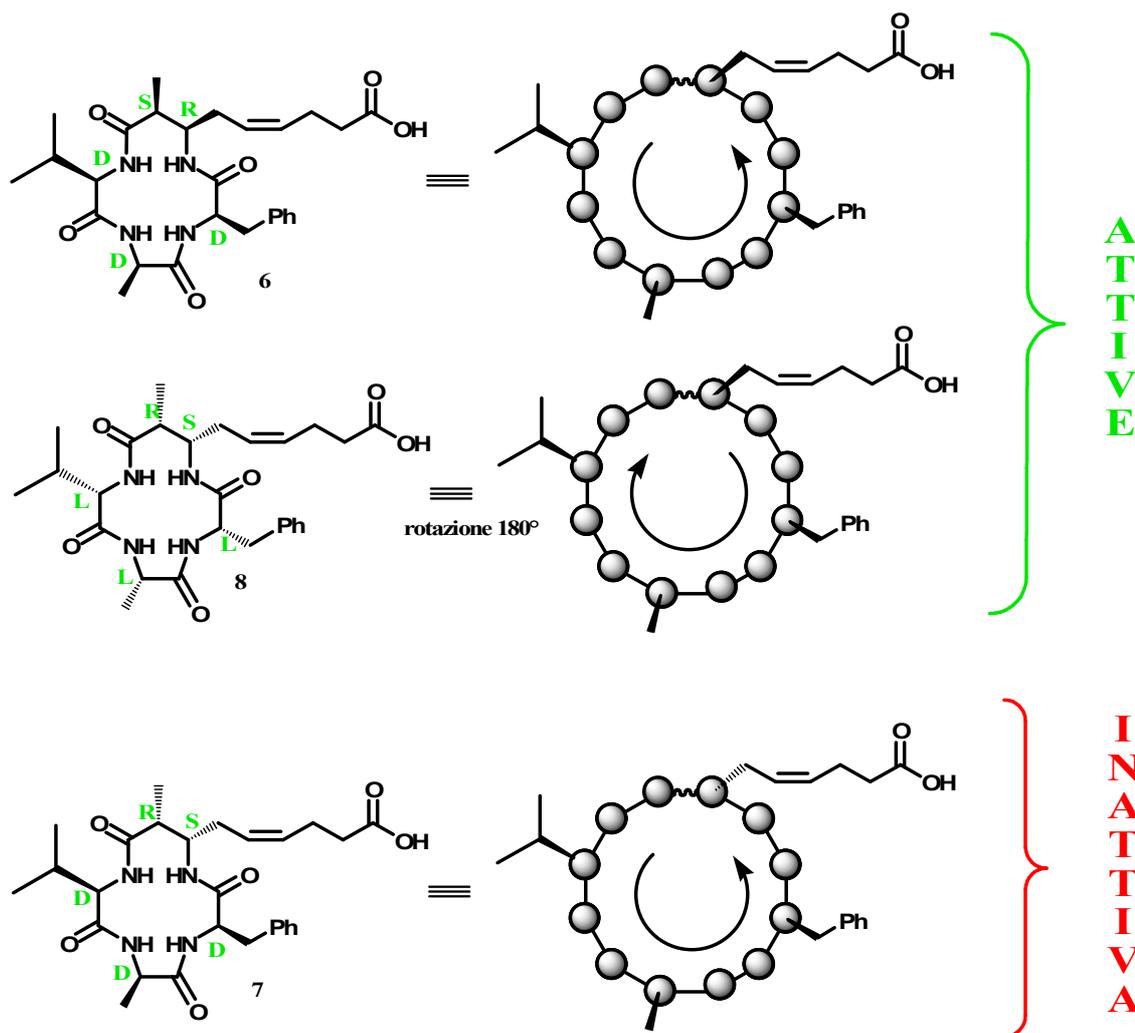


Figura 6.2-Relazione tra le caratteristiche topologiche delle catene laterali e attività biologica delle molecole.

Questo peculiare aspetto della natura degli inibitori ciclotetrapeptidici degli HDACs, mai evidenziato in precedenza, costituisce un'importante indicazione nello sviluppo di nuovi agenti farmacologici antimitotici per la cura di patologie genetiche croniche.

### 6.2 Sintesi di nuovi potenziali inibitori

La seconda parte di questo lavoro è stata, quindi, incentrata sulla progettazione e relativa sintesi di molecole analoghe delle naturali azumammidi, al fine di ottenere nuovi inibitori sintetici degli HDACs. L'importanza dei processi epigenetici a cui prendono parte questi enzimi, le interessanti implicazioni farmacologiche che si originano dalla loro inibizione e le peculiari caratteristiche degli inibitori ciclopeptidici rendono molto alta la soglia di attenzione per questo argomento. La sintesi di nuove molecole capaci di inattivare questa famiglia di enzimi, infatti, è un tema di elevata rilevanza per diversi importanti aspetti.

In prima istanza, lo sviluppo di adeguate strategie sintetiche per l'ottenimento di inibitori analoghi delle azumammidi rende indipendenti dalle scarse fonti naturali e aggira l'ostacolo delle basse rese registrate a valle delle sintesi dei metaboliti di origine marina. In secondo luogo, solo attraverso l'elaborazione di nuove strutture sintetiche in grado di inibirli è possibile collezionare nuove informazioni per la comprensione, sempre più approfondita, del *modus operandi* di questi enzimi e del ruolo specifico giocato da ogni singolo individuo all'interno degli organismi viventi. In fine, solo attraverso il lavoro di sintesi è possibile realizzare inibitori sempre più potenti e, soprattutto, selettivi per lo sviluppo di moderne e sempre più efficienti terapie per la cura di disordini di carattere genetico.

Sulla base delle informazioni reperibili in letteratura e dei risultati ottenuti in precedenza si è resa possibile l'elaborazione di tre nuove strutture ciclotetrapeptidiche (figura 6.3) e lo sviluppo di veloci vie sintetiche per il loro ottenimento.

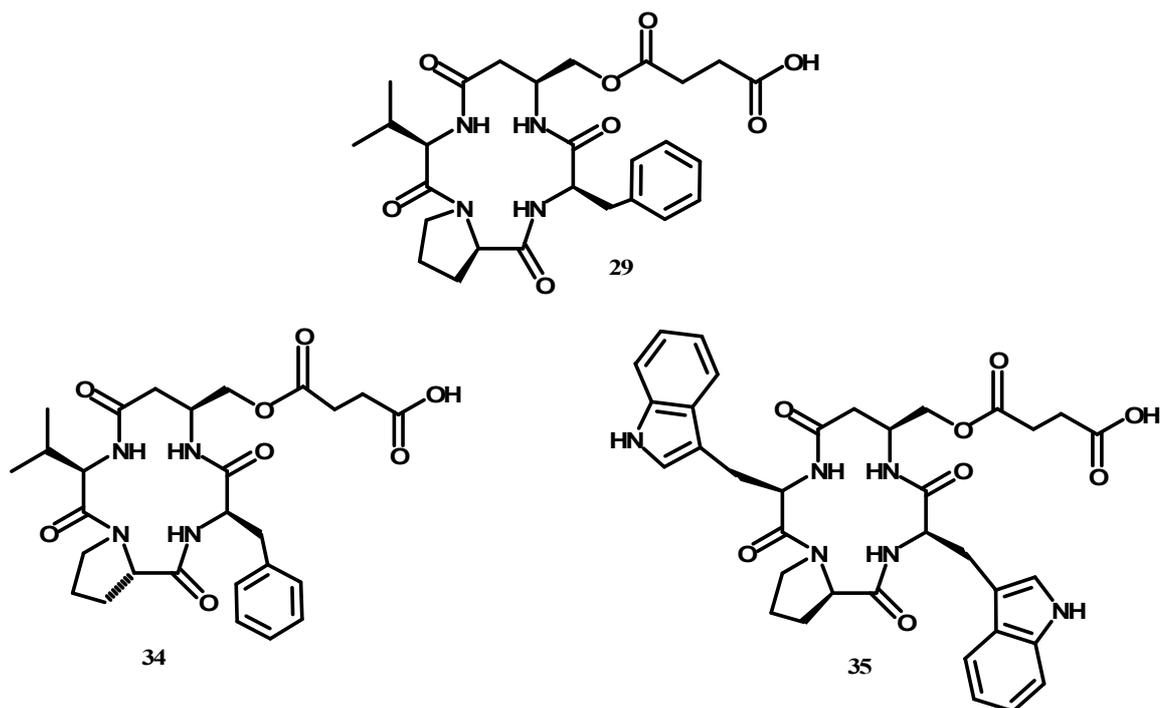


Figura 6.3-Analoghi delle azumammidi ottenuti per via sintetica.

Le peculiarità strutturali delle molecole presentate, che le rendono facilmente derivatizzabili attraverso semplici modificazioni della funzionalità zinco-chelante o per mezzo dell'introduzione di catene di diversa natura sul gruppo alcolico presente sul ciclo, potrebbe, inoltre, consentire di modularne la potenziale attività (figura 6.4).

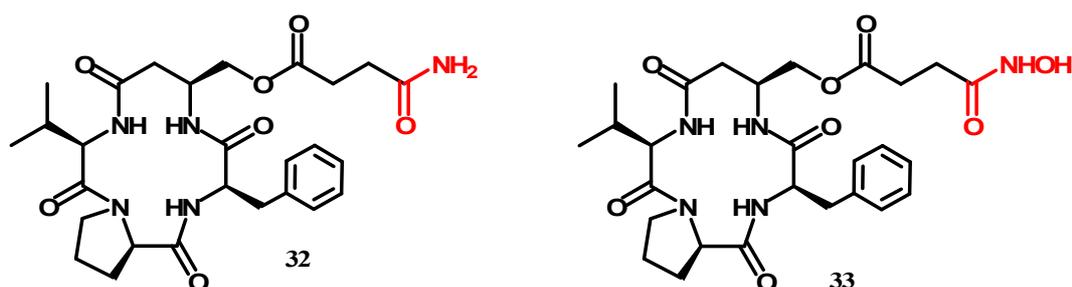


Figura 6.4-Derivati dell'analogo 29 ottenuti per sostituzione del gruppo funzionale zinco-chelante.

La versatilità, infine, della strategia sintetica elaborata potrebbe permettere, attraverso l'opportuna sostituzione dei residui coinvolti nelle interazioni con la parte proteica dell'enzima, responsabile del riconoscimento molecolare, di sviluppare la ricercata classe di inibitori selettivi per i singoli individui o piccoli gruppi di HDACs.

## **CAPITOLO 7**

---

---

## 7. Parte Sperimentale

Tutte le reazioni che coinvolgono miscele di reagenti sensibili all'aria sono state condotte in atmosfera di argon o di azoto, adoperando solventi anidrificati per distillazione. Il tetraidrofurano (THF) è stato distillato su  $\text{LiAlH}_4$  in atmosfera di argon. Toluene, diclorometano e cloroformio sono stati distillati su  $\text{CaH}_2$ . Dimetilformammide e acetonitrile sono stati acquistati ed usati senza ricorrere ad ulteriori distillazioni. La vetreria è stata fiammeggiata prima dell'uso. Quando si è reso necessario i reagenti sono stati anidrificati su  $\text{P}_2\text{O}_5$  sotto vuoto o per formazione dell'azeotropo acqua/toluene a pressione ridotta. A meno di diverse indicazioni i materiali di partenza ed i reagenti acquistati sono stati utilizzati tal quali, senza ulteriori procedure di purificazione. Le temperature di reazione sono state misurate esternamente; le reazioni sono state monitorate con TLC su lastre di gel di silice Merck (0.25 mm) e controllate con luce UV,  $\text{I}_2$ , o attraverso l'utilizzo di rivelatori quali  $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-Ce}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{KMnO}_4$ , *p*-anisaldeide, acido fosfomolibdico o ninidrina. Le purificazioni sono state eseguite con cromatografia Flash su gel di silice 60 Merck (grandezza delle particelle: 0.040-0.063 mm) e i solventi adoperati hanno un grado di purezza analitico. Le rese si riferiscono a materiali cromatograficamente e spettroscopicamente ( $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR) puri. Gli spettri NMR sono stati generalmente registrati, in mancanza di altro avviso, a temperatura ambiente su spettrometri Bruker DRX 600 ( $^1\text{H}$  at 600.13 MHz,  $^{13}\text{C}$  at 150.90 MHz), Bruker DRX 400 ( $^1\text{H}$  at 400.13 MHz,  $^{13}\text{C}$  at 100.03 MHz), Bruker DRX 300 ( $^1\text{H}$  at 300.1 MHz,  $^{13}\text{C}$  at 75.5 MHz) and Bruker DRX 250 ( $^1\text{H}$  at 250.13 MHz,  $^{13}\text{C}$  at 62.89 MHz). I chemical shifts ( $\delta$ ) sono stati riportati in ppm in relazione al picco residuo del solvente ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\delta$ : 7.26,  $^{13}\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ : 77.0;  $\text{CD}_2\text{HOD}$ ,  $\delta$ : 3.35,  $^{13}\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ : 49.0;  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\delta$ : 4.79, 1,4-diossano (standard esterno per  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ : 67.19;  $\text{C}_6\text{HD}_5$ ,  $\delta$ : 7.16,  $^{13}\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\delta$ : 128.06;  $^1\text{H}$ -DMSO,  $\delta$ : 2.50,  $^{13}\text{C}$ -DMSO,  $\delta$ : 39.52;  $\text{C}_2\text{HDCl}_4$ ,  $\delta$ : 5.80,  $^{13}\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$ ,  $\delta$ : 72.16) e la molteplicità di ogni segnale è stata descritta utilizzando le seguenti abbreviazioni: s, singoletto; d, doppietto; t, tripletto; q, quartetto; m, multipletto; br, diffuso; app, apparente. Le costanti di accoppiamento ( $J$ ) sono state quotate in Hz. Gli esperimenti di disaccoppiamento omonucleare e DEPT hanno permesso l'assegnazione di ogni segnale. Gli spettri ESI-MS ad alta risoluzione sono stati ottenuti con uno spettrometro di massa Q-Star Applied Biosystem.

I gradi di rotazione ottica sono stati ottenuti attraverso l'utilizzo di un polarimetro JASCO DIP-1000 e misurati con solventi con grado di purezza spettroscopica. I valori degli  $[\alpha]_D$  sono stati registrati in unità di  $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$ .

### Procedura generale A: accoppiamento mediato da EDC

L'amminoacido *N*-protetto (1 mmol) viene disciolto in DCM anidro (10 ml) e la soluzione risultante raffreddata a 0 °C. Si aggiungono DIPEA (1.1 mmol), HOBt (1.1 mmol) ed EDC (1.1 mmol) e la miscela viene agitata a 0 °C per 20 minuti, quindi si aggiunge l'ammino-estere (1 mmol) seguito da DIPEA (1.1 mmol). La miscela viene lasciata in agitazione per 16h e riscaldata gradualmente a t.a., quindi, trattata con HCl 1N. La fase acquosa viene separata ed estratta per tre volte con DCM, quindi, le fasi organiche riunite vengono lavate con una sol. sat. acqu. di  $\text{NaHCO}_3$  ed una di NaCl, anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Si ottiene in questo modo il peptide che viene generalmente purificato.

**Procedura generale B: deprotezione del gruppo Fmoc con dietilammina**

Il peptide (1 mmol) viene disciolto in una miscela 1:1 di CH<sub>3</sub>CN e Et<sub>2</sub>NH (8 ml) e la soluzione viene lasciata in agitazione per 1h. I solventi vengono allontanati a pressione ridotta ed il grezzo viene purificato con cromatografia flash per fornire l'ammina pura.

**Procedura generale C: ciclizzazione con FDPP**

Ad una soluzione del peptide lineare (1 mmol) in DMF anidra (300 ml) vengono aggiunte la DIPEA (3 mmol) e la FDPP (1.5 mmol) e la miscela viene agitata per 72 h a t.a. Il solvente viene, quindi, rimosso a pressione ridotta ed il residuo è ripartito tra DCM e HCl 1N. La fase acquosa viene estratta per tre volte con DCM e le fasi organiche riunite vengono lavate con una sol. sat. acqu. di NaHCO<sub>3</sub>, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto viene purificato con cromatografia flash a fornire il ciclopeptide come un solido amorfo.

**Procedura generale D: ciclizzazione con sistema di aggiunta automatizzata**

L'agente di accoppiamento (2.5 mmol) e la DIPEA (5.5 mmol) vengono sciolti in DCM anidro (15.3 ml) e posti in agitazione. Alla miscela viene addizionata goccia a goccia, nell'arco di 3.5h e per mezzo di un sistema di aggiunta automatico, una soluzione del tetrapeptide (1.0 mmol) in una miscela 1:10 di DMF/DCM anidri (38 ml). Alla miscela di reazione vengono addizionati ulteriori quantità di agente di accoppiamento (1.25 mmol) e di DIPEA (2.75 mmol) ed il tutto viene lasciato in agitazione per l'intera notte. A 0 °C, viene aggiunta goccia a goccia, HCl 1N e la miscela viene, quindi estratta per tre volte con DCM. Le fasi organiche riunite vengono lavate con una sol. sat. acqu. di NaHCO<sub>3</sub>, con una sol. sat. acqu. di NaCl, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto viene purificato con cromatografia flash a fornire il ciclopeptide come un solido amorfo.

**Procedura generale E: accrescimento del peptide lineare e ciclizzazione su fase solida**

La resina 2-clorotritilica (300 mg) (Fluka; 2,α-diclorobenzidril-polistirene reticolato con 1% DVB; 100-200 mesh; 1.55 mmol/g), viene rigonfiata in DMF (3ml) per 45 minuti e lavata per 2 volte con DCM anidro (3 ml). Il primo N-Fmoc-amminoacido (0.075 mmol) in DCM anidro (3 ml) e la DIPEA (0.3 mmol) vengono aggiunti nel reattore che viene agitato su di una piattaforma oscillante per 1.5 h t.a. la resina viene, quindi, lavata con DCM anidro (3 ml), fatta reagire con la miscela DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) ed, in fine, rilavata con DMF (3 × 3 ml). L'Fmoc-amminoacido ancorato alla resina viene deprotezionato per trattamento, per 2 volte, con una soluzione di piperidina in DMF al 20% (%in vol., 3 ml), rispettivamente per 3 e 7 minuti e la resina, quindi, è abbondantemente lavata con DMF (3 × 3 ml), DCM (3 × 3 ml) and DMF (3 × 3 ml). Da

notare è che per evitare la formazione di dichetopiperazine, la deprotezione del secondo amminoacido viene condotta con trattamenti con la sol. di piperidina in DMF al 20% (%in vol., 3 ml) entrambi della durata di 3 minuti. Le rese dell'ancoraggio del primo residuo e dei successivi stadi di accoppiamento vengono valutate per interpolazione attraverso misure di assorbimento dell'addotto piperidina-dibenzofulvene ( $\lambda_{\max} = 301$ ,  $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), sottoprodotto della reazione di deprotezione del gruppo amminico (resa media calcolata >96%). Dopo l'ancoraggio del primo amminoacido tutte le successive reazioni di accoppiamento e Fmoc-deprotezione necessarie per la formazione del tetrapeptide lineare vengono condotte come di seguito descritto. Al reattore viene addizionata una soluzione dell'Fmoc-amminoacido (0.3 mmol), DIPEA (0.6 mmol), HATU (o PyBOP) (0.292 mmol) in DMF anidra (3 ml) ed il tutto viene lasciato in agitazione per 1h e poi abbondantemente lavato con DMF (3 × 3 ml), DCM (3 × 3 ml) e DMF (3 × 3 ml). La bontà della reazione di accoppiamento è valutata con il test al cloranile e la successiva Fmoc-deprotezione condotta con la soluzione di piperidina al 20% come sopra descritto.

Una volta ottenuto il tetrapeptide lineare N-deprotetto, si procede con la de-Alilazione della funzione carbossilica con Pd<sup>0</sup> (0.075 mmol), DIPEA (0.3 mmol), PhSiH<sub>4</sub> (1.8 mmol) in DCM (2 ml) per 1h per due volte e la resina viene rilavata con DCM (3 × 3 ml). Il lineare viene quindi sottoposto a condizioni di ciclizzazione con HATU (o PyBOP) (0.3 mmol), DIPEA (0.75 mmol), HOBt (0.3 mmol) per una notte. Il ciclo peptide viene, quindi, distaccato dal supporto solido per trattamento (2 volte) con una sol. di HIPF al 20% in DCM (% in vol., 4 ml) per 30 min. a t.a. e la resina viene rilavata per due volte con DCM (3 ml). Le frazioni filtrate, contenenti il prodotto ciclico, vengono riunite, concentrate a pressione ridotta ed il residuo disciolto in una sol. di ACN al 50% in H<sub>2</sub>O (grado di purezza HPLC) è, in fine, analizzato via HPLC e spettrometria di massa ESI.

### Procedura generale F: accrescimento del peptide lineare su fase solida

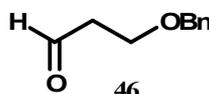
La resina 2-clorotritilica (300 mg) (Fluka; 2,α-diclorobenzidril-polistirene reticolato con 1% DVB; 100-200 mesh; 1.55 mmol/g), viene rigonfiata in DMF (3ml) per 45 minuti e lavata per 2 volte con DCM anidro (3 ml). Il primo N-Fmoc-amminoacido (0.360 mmol) in DCM anidro (3 ml) e la DIPEA (1.44 mmol) vengono aggiunti nel reattore che viene agitato su di una piattaforma oscillante per 1.5 h t.a. la resina viene, quindi, lavata con DCM anidro (3 ml), fatta reagire con la miscela DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) ed, in fine, rilavata con DMF (3 × 3 ml). L'Fmoc-amminoacido ancorato alla resina viene deprotetto per trattamento, per 2 volte, con una soluzione di piperidina in DMF al 20% (%in vol., 3 ml), rispettivamente per 3 e 7 minuti e la resina, quindi, è abbondantemente lavata con DMF (3 × 3 ml), DCM (3 × 3 ml) and DMF (3 × 3 ml). Da notare è che per evitare la formazione di dichetopiperazine, la deprotezione del secondo amminoacido viene condotta con trattamenti con la sol. di piperidina in DMF al 20% (%in vol., 3 ml) entrambi della durata di 3 minuti. Le rese dell'ancoraggio del primo residuo e dei successivi stadi di accoppiamento vengono valutate per interpolazione attraverso misure di assorbimento dell'addotto piperidina-dibenzofulvene ( $\lambda_{\max} = 301$ ,  $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), sottoprodotto della reazione di deprotezione del gruppo amminico (resa media calcolata >96%). Dopo l'ancoraggio del primo amminoacido tutte le successive reazioni di accoppiamento e Fmoc-deprotezione necessarie per la formazione del tetrapeptide lineare vengono condotte come di seguito descritto. Al reattore viene

aggiunta una soluzione dell'Fmoc-amminoacido (1.44 mmol), DIPEA (2.88 mmol), HATU (o PyBOP) (1.04 mmol) in DMF anidra (3 ml) ed il tutto viene lasciato in agitazione per 1h e poi abbondantemente lavato con DMF (3 × 3 ml), DCM (3 × 3 ml) e DMF (3 × 3 ml). La bontà della reazione di accoppiamento è valutata con il test al cloranile e la successiva Fmoc-deprotezione condotta con la soluzione di piperidina al 20% come sopra descritto.

Il lineare viene, quindi, distaccato dal supporto solido per trattamento (2 volte) con una sol. di HIPF al 20% in DCM (% in vol., 4 ml) per 30 min. a t.a. e la resina viene rilavata per due volte con DCM (3 ml). Le frazioni filtrate, il tetrapeptide, vengono riunite, concentrate a pressione ridotta ed il residuo ottenuto viene sottoposto tal quale, senza ulteriori procedure di purificazione, alle successive operazioni di sintesi.

### Composto 46

Ad una soluzione di cloruro di ossalile (5.84 g, 46 mmol) in DCM anidro (100 ml), a -78 °C in atmosfera di azoto, è stato aggiunto il metilsolfossido (6.53 ml, 92 mmol). Dopo 15 minuti è stato aggiunto il 3-benzilossi-1-propanolo (5.74 g, 38.3 mmol) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a -78 °C per 45 minuti. Dopo l'aggiunta della trietilammina (32 ml, 230 mmol), la soluzione è stata agitata per 20 minuti a -78 °C e per ulteriori 20 minuti a t.a.. la miscela di reazione è stata trattata con una soluzione acquosa satura di NaHCO<sub>3</sub> e le fasi acquose sono state estratte per tre volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (25 - 35% acetato di etile in etere di petrolio) a dare **43** puro (5.55 g, 98%) come un olio viscoso.



**46:** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.71 (2H, t, *J* 6.1 Hz, CH<sub>2</sub>CHO), 3.82 (2H, t, *J* 6.1 Hz, CH<sub>2</sub>OBn), 4.54 (2H, br s, CH<sub>2</sub>Ar), 7.37 (5H, m, Ar), 9.80 (1H, s, CHO).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 43.9, 63.9, 73.2, 127.7, 127.8 (x2), 128.5 (x2), 137.9, 201.2.

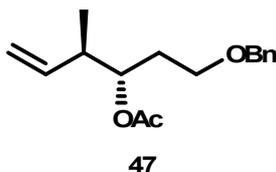
HRMS: [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 187.0742 (calcolato per C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>Na 187.0735)

### Composto 47

L'*n*-BuLi (5.39 ml, 8.62 mmol) è stato lentamente aggiunto, a -78°C, ad una soluzione in THF anidro (2.5 ml), di *tert*-BuOK (8.62 ml, 1M in THF, 8.62 mmol) e *trans*-2-butene (0.622 g, 11.1 mmol). La soluzione gialla risultante è stata agitata a -45 °C per 20 minuti e quindi raffreddata nuovamente a -78 °C. è stato poi aggiunto il (+)-Ipc<sub>2</sub>BOMe (3.53 g, 11.1 mmol), precedentemente disciolto in THF anidro (2.5 ml) e la miscela risultante è stata sottoposta a vigorosa agitazione per 35 minuti. Alla soluzione è stato aggiunto il BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (1.57 g, 11.1 mmol) seguito da una soluzione dell'aldeide **46**(0.83 g, 5.07 mmol) in THF. Si è lasciato il tutto sotto agitazione a -78 °C per 5 h e quindi la reazione è stata trattata con 30 ml di una soluzione acquosa 3N di NaOH e 30 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. La miscela in agitazione per tutta la notte è stata portata gradualmente a t.a. diluita con acetato di etile e lavata con una sol. sat. acqu. Di NaCl. Le fasi acquose sono state

estratte per tre volte con acetato di etile e le fasi organiche riunite sono state anidrificate su  $\text{MgSO}_4$ , filtrate e portate a secco.

Il residuo ottenuto è stato disciolto in DCM anidro (13 ml) e trattato con piridina (16.5 ml, 200 mmol) ed anidride acetica (12.8 ml, 136 mmol). La soluzione, lasciata sotto agitazione per la notte, è stata concentrata a pressione ridotta ed acidificata con HCl 1N. Le fasi acquose sono state estratte per tre volte con DCM e le fasi organiche riunite sono state anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (5 - 20% etere etilico in etere di petrolio) a dare **47** puro (1.07 g, 80%) come un olio viscoso.



**47**:  $[\alpha]_D^{25}$ : -28.8 (*c* 1,  $\text{CHCl}_3$ )

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.01 (3H, d, *J* 6.7 Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1.85 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$ ), 2.00 (3H, s,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ), 2.40 (1H, m,  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}-$ ), 3.46 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OBn}$ ), 4.47 (2H, br s,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 5.02-5.06 (3H, m,  $\text{CH}_2=\text{CH}-$  and  $\text{HC}-\text{OAc}$  sovrapposti), 5.74 (1H, m,  $\text{CH}_2=\text{CH}-$ ), 7.27-7.34 (5H, m, *Ar*).

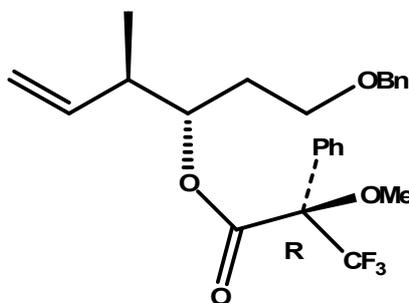
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 15.7, 21.1, 31.6, 41.8, 66.9, 73.1, 74.0, 115.6, 127.5, 127.7 (x2), 128.3 (x2), 138.3, 139.3, 170.7;

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  *m/z* 263.1642 (calcd per  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_3$  263.1647).

### (*R*)- estere di Mosher di **47** deacetilato

A **47** (0.027 g, 0.103 mmol) disciolto in MeOH (1 ml), è stata aggiunta una quantità catalitica di  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e la miscela è stata agitata a t.a. per 38 h, quindi trattata con  $\text{CHCl}_3$  (1 ml). I solventi sono stati ridotti alla metà del loro volume a pressione ridotta e la procedura è stata ripetuta diverse volte al fine di precipitare il carbonato. La sospensione è stata filtrata attraverso un piccolo tappo di Celite<sup>®</sup>.

L'alcol, disciolto in piridina anidra (0.5 ml), è stato trattato con DMAP (0.021 g, 0.17 mmol) e (*S*)-MTPACl (0.032 g, 0.127 mmol). La soluzione è stata agitata per 2 h, quindi, il solvente è stato rimosso sotto un flusso di azoto a fornire come residuo l' MTPA-estere.

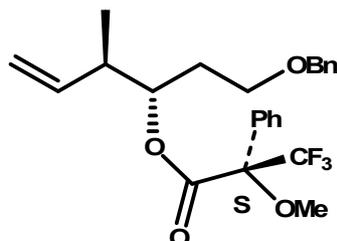


(*R*)- estere di Mosher:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.86 (3H, d, *J* 6.8 Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1.84 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$ ), 2.41 (1H, m,  $-\text{CH}_2=\text{CHCH}-$ ), 3.21 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.22 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{OBn}$ ), 4.35 (1H, d, *J* 11.7 Hz,  $-\text{OCHHAr}$ ), 4.38 (1H, d, *J* 11.7 Hz, -

OCHHAr), 4.95 (1H, d,  $J$  17.3 Hz, -CHH=CH), 4.96 (1H, d,  $J$  10.1 -CHH=CH), 5.48 (1H, m, -CHO-), 5.79 (1H, m, -CH<sub>2</sub>=CH-), 7.14-7.68 (10H, m, *Ar*, -OCH<sub>2</sub>Ar sovrapposti).  
ESI MS: [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  437

### (S)- estere di Mosher di 47 deacetilato

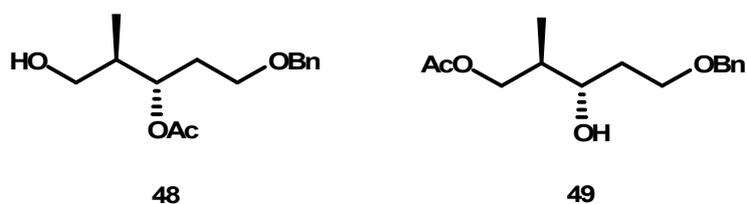
L'(*S*)-MTPA-estere è stato ottenuto usando la stessa procedura che ha fornito l'(*R*)-MTPACI.



(*S*)- estere di Mosher: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.97 (3H, d,  $J$  6.8 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1.76 (2H, m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OBn), 2.43 (1H, m, -CH<sub>2</sub>=CHCH-), 3.21 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.22 (2H, m, -CH<sub>2</sub>OBn), 4.28 (1H, d,  $J$  11.7 Hz, -OCHHAr), 4.35 (1H, d,  $J$  11.7 Hz, -OCHHAr), 4.98 (1H, d,  $J$  17.3 Hz, -CHH=CH), 5.00 (1H, d,  $J$  10.1 -CHH=CH), 5.51 (1H, m, CHO-), 5.79 (1H, m, -CH<sub>2</sub>=CH-), 7.14-7.68 (10H, m, *Ar*, -OCH<sub>2</sub>Ar sovrapposti).  
ESI MS: [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  437

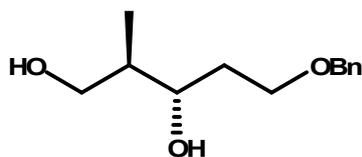
### Composto 50

Un flusso di O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> è stato fatto gorgogliare attraverso una soluzione di **47** (736 mg, 2.81 mmol) in DCM anidro (40 ml) a -78 °C fino alla comparsa di una colorazione blu persistente. Un flusso di argon è stato fatto gorgogliare, poi, attraverso la soluzione fino a che non divenisse incolore. La trifenilfosfina (810 g, 3.09 mmol) è stata aggiunta e la miscela è stata riscaldata a t.a. e lasciata in agitazione per la notte. Dopo la rimozione dei solventi a pressione ridotta, al residuo recuperato in etanolo (8 ml) è stato aggiunto l'NaBH<sub>4</sub> (212 mg, 5.61 mmol) e la miscela è stata agitata per 30 minuti e quindi trattata con acqua. L'etanolo è stato concentrato a pressione ridotta e le fasi acquose sono state estratte per tre volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state lavate con sol. sat. acqu. di NaHCO<sub>3</sub>, una di NaCl e successivamente anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco a dare una miscela degli alcoli **48** e **49**.



Alla miscela grezza degli alcoli disciolta in MeOH (7 ml), è stata aggiunta una quantità catalitica di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e la miscela è stata agitata a t.a. per 24 h, quindi trattata con CHCl<sub>3</sub> (5 ml). I solventi sono stati ridotti alla metà del loro volume a pressione ridotta e la procedura è stata ripetuta diverse volte al fine di precipitare il carbonato. La sospensione è stata filtrata attraverso un piccolo tappo di Celite<sup>®</sup>. I solventi sono stati evaporati a

pressione ridotta ed il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (0 - 10% acetato di etile in etere etilico) a dare **50** puro (382 mg, 61%) come un olio viscoso.

**50**

**50**:  $[\alpha]_D^{25}$ : 5.6 (*c* 1, CHCl<sub>3</sub>)

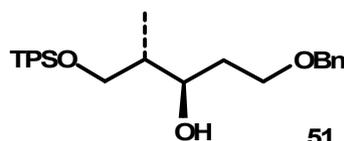
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.86 (3H, d, *J* 7.0 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1.74 (1H, m, -CHCH<sub>3</sub>), 1.83 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OBn), 3.64-3.79 (5H, m, CH<sub>2</sub>OBn, -CHOH and CH<sub>2</sub>OH sovrapposti), 4.53 (2H, br s, CH<sub>2</sub>Ar), 7.34 (5H, m, Ar).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 13.9, 34.3, 40.1, 67.7, 69.6, 73.5, 78.0, 127.7, 127.9 (x2), 128.5 (x2), 137.6.

HRMS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 225.1486 (calcd per C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub> 225.1491).

### Composto 51

Ad una soluzione di **50** (0.791 g, 3.53 mmol) in DCM anidro (21 ml) a 0° C sono stati aggiunti piridina (0.029 ml, 0.353 mmol), DMAP (0.431 g, 3.53 mmol) e TPSCI (1.163 g, 4.24 mmol) e la miscela di reazione, riscaldata gradualmente a t.a. è stata lasciata in agitazione per la notte. È stata, quindi, aggiunta una sol. sat. acqu. di NH<sub>4</sub>Cl (11 ml) e le fasi acquose sono state estratte per tre volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (10 - 40% etere etilico in etere di petrolio) a dare **51** puro (1.484 g, 93%) come un olio viscoso.

**51**

**51**: *Rf*: 0.40 (etere di petrolio / etere etilico 7:3);

$[\alpha]_D^{25}$ : 5.2 (*c* 2, CHCl<sub>3</sub>);

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.87 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1.06 (9H, s, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.72-1.85 (3H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OBn e -CHCH<sub>3</sub> sovrapposti), 3.63-3.85 (5H, m, CH<sub>2</sub>OBn, -CHOH and CH<sub>2</sub>OTPS sovrapposti), 4.54 (2H, br s, CH<sub>2</sub>Ar), 7.34 (5H, m, CH<sub>2</sub>Ar), 7.41 (6H, m, -SiAr<sub>2</sub>), 7.69 (4H, m, -SiAr<sub>2</sub>);

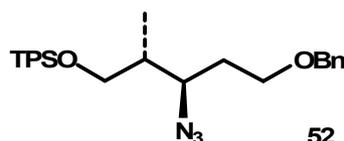
<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 13.3, 19.1, 26.8 (x3), 34.2, 40.4, 68.0, 68.5, 73.2, 74.0, 127.7 (x7), 128.4 (x2), 129.7 (x2), 133.0 (x2), 135.6 (x4), 137.6;

HRMS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 463.2663 (calc. per C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>O<sub>3</sub>Si 463.2668).

### Composto 52

Ad una soluzione dell'alcol **51** (1.05 g, 2.27 mmol) in THF anidro (18 ml) è stata aggiunta a t.a. la trietilammina (1.25 ml, 9.1 mmol) ed il metansolfonil-cloruro (0.520 g, 4.55 mmol) e la miscela è stata lasciata in agitazione per la notte. È stata, quindi, aggiunta una sol. sat. acqu. di NH<sub>4</sub>Cl (10 ml) ed i solventi organici sono stati concentrati a pressione ridotta. La miscela è stata estratta per tre volte con Et<sub>2</sub>O e le fasi organiche

riunite sono state anidrificate su  $\text{MgSO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato disciolto in DMF anidra (15 ml) ed alla soluzione è stata aggiunta la  $\text{NaN}_3$  (0.740 g, 11.4 mmol). La miscela di reazione è stata riscaldata a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  e lasciata in agitazione per 5h, quindi, è stata raffreddata e trattata con una sol. sat. acqu. di  $\text{NaCl}$ . La fase acquosa è stata estratta per tre volte con una miscela al 50% di etere etilico ed etere di petrolio. Le fasi organiche riunite sono state anidrificate su  $\text{MgSO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (0 - 10% etere etilico in etere di petrolio) a fornire **49** puro (0.929 g, 84%) come un olio viscoso.



**52**: *Rf*: 0.75 (etere di petrolio/etere etilico 7:3);

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -19.8 (*c* 1,  $\text{CHCl}_3$ );

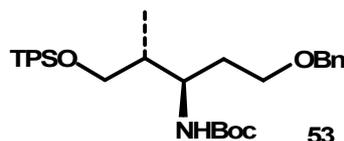
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.82 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1.06 (9H, s,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.84 (3H, m,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$  e  $-\text{CHCH}_3$  sovrapposti), 3.54 (1H, dd,  $J = 10.3, 5.8$  Hz,  $-\text{CHHOTPS}$ ), 3.63 (3H, m,  $-\text{CH}_2\text{OBn}$  e  $-\text{CHHOTPS}$  sovrapposti), 4.06 (1H, m,  $-\text{CHN}_3$ ), 4.55 (2H, br s,  $-\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 7.34-7.48 (11H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ar}$  e  $-\text{SiAr}_2$ ), 7.67 (4H, m,  $-\text{SiAr}_2$ );

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 10.8, 19.2, 26.8 (x3), 32.7, 40.0, 60.5, 65.9, 67.2, 73.1, 127.7 (x7), 128.4 (x2), 129.6 (x2), 133.4, 133.5, 135.6 (x4), 138.2;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  510.2558 (calc. per  $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{NaO}_2\text{Si}$  510.2553).

### Composto 53

Ad una soluzione dell'azide **52** (2.0 g, 4.12 mmol) in acetato di etile (32 ml) è stata addizionata una quantità catalitica di  $\text{PtO}_2$ . Il pallone di reazione è stato condizionato per tre volte con idrogeno gassoso e la miscela è stata sottoposta a vigorosa agitazione per l'intera notte. La miscela è stata quindi filtrata attraverso un piccolo tappo di Celite<sup>®</sup> e concentrata. Al grezzo disciolto in DCM (60 ml) anidro sono state aggiunte la trietilammina (0.750 ml, 5.36 mmol) e la  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1.17 g, 5.36 mmol) e la miscela risultante è stata lasciata in agitazione per la notte. I solventi sono stati rimossi a pressione ridotta ed il grezzo purificato su cromatografia flash (10 - 30% etere etilico in etere di petrolio) a fornire **53** puro (0.929 g, 84%) come un olio viscoso.



**53**: *Rf*: 0.50 (etere di petrolio/etere etilico 7:3)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -1.2 (*c* 2,  $\text{CHCl}_3$ );

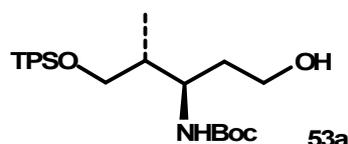
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.84 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1.09 (9H, s,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.45 (9H, s,  $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.72 (1H, m,  $-\text{CHHCH}_2\text{OBn}$ ), 1.86 (1H, m,  $-\text{CHHCH}_2\text{OBn}$ ), 2.06 (1H, m,  $-\text{CHCH}_3$ ), 3.52 (1H, dd,  $J = 10.4, 5.4$  Hz,  $-\text{CHHOTPS}$ ), 3.63 (3H, m,  $-\text{CH}_2\text{OBn}$  e  $-\text{CHHOTPS}$  sovrapposti), 3.82 (1H, m,  $-\text{CHNHBoc}$ ), 4.51 (1H, d,  $J = 11.8$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 4.55 (1H, d,  $J = 11.8$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 5.40 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz,  $-\text{NHBoc}$ ), 7.34-7.46 (11H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ar}$  e  $-\text{SiAr}_2$ ), 7.70 (4H, m,  $-\text{SiAr}_2$ );

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.4, 19.1, 26.8 (x3), 28.4 (x3), 31.5, 39.3, 50.8, 66.6, 68.4, 73.2, 78.6, 127.5, 127.7 (x6), 128.3 (x2), 129.7 (x2), 133.2 (x2), 135.6 (x4), 138.5, 155.8;

HRMS:  $[M+H]^+$   $m/z$  561.3279 (calc. per  $C_{34}H_{47}NO_4Si$  561.3274).

### Composto 44

Ad una soluzione di **53** (184 mg, 0.328 mmol) in etanolo (12 ml) è stato addizionato il 10% in peso di Pd/C (18.4 mg). Il pallone di reazione è stato condizionato per tre volte con idrogeno gassoso e la miscela è stata sottoposta a vigorosa agitazione per l'intera notte. La miscela è stata quindi filtrata attraverso un piccolo tappo di Celite® e concentrata. Il grezzo è stato purificato su cromatografia flash (50% etere etilico in etere di petrolio) a fornire **53a** puro (149 mg, 97%) come un olio viscoso.



**53a**: *Rf*: 0.25 (etere di petrolio/ etere etilico 1:1);

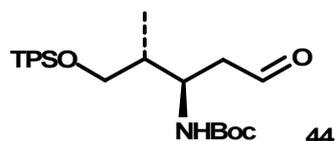
$[\alpha]_D^{25}$ : -1.3 (*c* 2,  $CHCl_3$ );

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.78 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz,  $-CH_3$ ), 1.07 (9H, s,  $-SiC(CH_3)_3$ ), 1.45 (9H, s,  $-OC(CH_3)_3$ ), 1.74 (2H, m,  $-CH_2CH_2OH$ ), 2.16 (1H, m,  $-CHCH_3$ ), 3.55 (1H, dd,  $J = 11.2, 4.9$  Hz,  $-CHHOTPS$ ), 3.60 (1H, dd,  $J = 11.2, 9.8$  Hz,  $-CHHOTPS$ ), 3.69 (2H, m,  $-CH_2CH_2OH$ ), 3.89 (1H, m,  $-CHNHBoc$ ), 5.98 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz,  $-NHBoc$ ), 7.41 (6H, m,  $-SiAr_2$ ), 7.67 (4H, m,  $-SiAr_2$ );

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 13.8, 19.0, 26.8 (x3), 28.3 (x3), 32.7, 38.5, 49.8, 58.6, 66.6, 79.4, 127.8 (x4), 129.9 (x2), 132.8 (x2), 135.5 (x4), 157.3;

HRMS:  $[M+Na]^+$   $m/z$  494.2707 (calc. Per  $C_{27}H_{41}NNaO_4Si$  494.2703).

Ad una soluzione di cloruro di ossalile (355 mg, 2.79 mmol) in DCM anidro (13 ml), a  $-78$  °C in atmosfera di azoto, è stato aggiunto il metilsolfossido (0.395 ml, 5.57 mmol). Dopo 15 minuti è stato aggiunto l'alcol **53a** (451 mg, 0.93 mmol) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a  $-78$  °C per 45 minuti. Dopo l'aggiunzione della trietilammina (1.8 ml, 13.0 mmol), la soluzione è stata agitata per 20 minuti a  $-78$  °C e per ulteriori 20 minuti a t.a.. La miscela di reazione è stata trattata con una soluzione acquosa satura di  $NaHCO_3$  e le fasi acquose sono state estratte per tre volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state anidrificate su  $Na_2SO_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (30 - 40% etere etilico in etere di petrolio) a dare **44** puro (358 mg, 82%) come un olio viscoso.



**44**: *Rf*: 0.65 (etere di petrolio/ etere etilico 1:1);

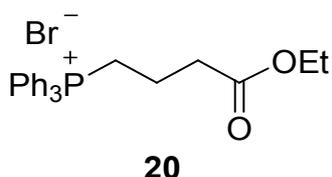
$[\alpha]_D^{25}$ : -18.3 (*c* 2,  $CHCl_3$ );

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.84 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $-CH_3$ ), 1.07 (9H, s,  $-SiC(CH_3)_3$ ), 1.42 (9H, s,  $-OC(CH_3)_3$ ), 2.08 (1H, m,  $-CHCH_3$ ), 2.54 (2H, br d,  $J = 6.9$  Hz,  $-CH_2CHO$ ), 3.55 (1H, br d,  $J = 6.5$  Hz,  $-CH_2OTPS$ ), 4.22 (1H, m,  $-CHNHBoc$ ), 5.60 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz,  $-NHBoc$ ), 7.40 (6H, m,  $-SiAr_2$ ), 7.65 (4H, m,  $-SiAr_2$ ), 9.77 (1H, s,  $-CHO$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13.5, 19.0, 26.8 (x3), 28.8 (x3), 38.7, 45.8, 49.3, 66.4, 79.3, 127.8 (x4), 129.9 (x2), 132.8 (x2), 135.5 (x4), 155.5, 201.6;  
 HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  492.2553 (calc. per  $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{NNaO}_4\text{Si}$  492.2546).

### Sale di fosfonio 55

Al 4-bromobutirrato di etile (500 mg, 2.56 mmol) sciolto in  $\text{CH}_3\text{CN}$  anidro (10 ml), è stata aggiunta la trifenilfosfina (773 mg, 2.95 mmol) e la miscela di reazione è stata riscaldata a refluxo per 24h. I solventi sono stati concentrate a pressione ridotta ed il grezzo purificato su cromatografia flash (5 - 10% metanolo in DCM) a fornire il sale di fosfonio **52** (626 mg, 53%) come una schiuma incolore.



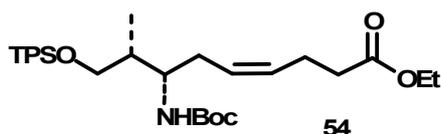
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.13 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.85 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.75 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{COOEt}$ ), 3.79 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{P}$ ), 4.00 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.62-7.69 (15H, m,  $-\text{PAr}_3$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 13.9, 17.6, 21.5 (d,  $J = 51.2$  Hz), 33.0 (d,  $J = 18.0$  Hz), 60.4, 117.7 (x3, d,  $J = 85.6$  Hz), 130.2 (x6, d,  $J = 12.4$  Hz), 133.4 (x6, d,  $J = 9.8$  Hz), 134.8 (x3), 172.7;

HRMS:  $[\text{M}]^+$   $m/z$  377.1671 (calc. Per  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{P}$  377.1665).

### Composto 54

Una soluzione del sale di fosfonio **55** (2.47 g, 5.4 mmol) in THF anidro (35 ml), a  $-78^\circ\text{C}$  ed in atmosfera d'azoto, è stata trattata con KHMDS (9.6 ml, 4.8 mmol) e lasciata in agitazione per 1h. Alla miscela risultante è stata addizionata una soluzione dell'aldeide **44** (0.894 g, 1.8 mmol) in THF anidro (35 ml) ed il tutto è stato lasciato in agitazione per la notte e portato gradualmente a t.a. Alla miscela di reazione è stato quindi aggiunto acetone (25 ml) seguito dall'aggiunta di acqua goccia a goccia. I solventi organici sono stati allontanati a pressione ridotta e la fase acquosa è stata estratta per tre volte con etere etilico. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una sol. sat. acqu. di NaCl, anidificate su  $\text{MgSO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (10 - 30% etere etilico in etere di petrolio) a dare **54** puro (2.88 g, 94%) come un olio viscoso.



**54**:  $R_f$ : 0.65 (etere di petrolio/ etere etilico 1:1);

$[\alpha]_D^{25}$ : 9.4 ( $c$  2,  $\text{CHCl}_3$ ):

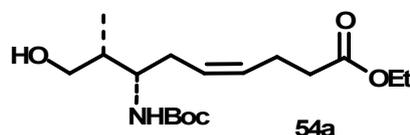
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.85 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1.06 (9H, s,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.24 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.42 (9H, s,  $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.96 (1H, m,  $-\text{CHCH}_3$ ), 2.24 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{CHNH-Boc}$ ), 2.34 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  sovrapposti), 3.51

(1H, dd,  $J = 10.2, 5.4$  Hz, -CHHOTPS), 3.62 (1H, dd,  $J = 10.2, 8.2$  Hz, -CHHOTPS), 3.76 (1H, m, -CHNHBoc), 4.12 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.16 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, -NHBoc), 5.44 (2H, m, -CH=CH- overlapped), 7.41 (6H, m, -SiAr<sub>2</sub>), 7.67 (4H, m, -SiAr<sub>2</sub>);  
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 13.0, 14.2, 19.1, 22.8, 26.7 (x3), 28.4 (x3), 29.3, 34.1, 38.8, 52.8, 60.3, 66.5, 78.6, 127.6 (x5), 129.4, 129.6 (x2), 133.4 (x2), 135.5 (x4), 155.7, 173.1;

HRMS: [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  590.3276 (calc. per C<sub>33</sub>H<sub>49</sub>NNaO<sub>5</sub>Si 590.3278);

### Composto 42

Una soluzione dell'estere **54** (360 mg, 0.636 mmol) in piridina anidra (1.8 ml) è stata portata a 0 °C e trattata con HF (70% in piridina, 0.180 ml). La miscela è stata lasciata in agitazione per 3h e quindi concentrata sotto flusso di azoto. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (20 - 70% etere etilico in etere di petrolio) a fornire **54a** (172 mg, 82%) come un olio viscoso.



**54a**:  $R_f$ : 0.45 (etere di petrolio/ etere etilico 3:7);

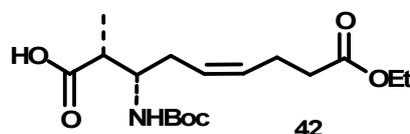
$[\alpha]_D^{25}$ : 27.5 ( $c$  1, CHCl<sub>3</sub>);

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.70 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, -CH<sub>3</sub>), 1.24 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.42 (9H, s, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.84 (1H, m, -CHCH<sub>3</sub>), 2.03-2.49 (6H, m, -CH<sub>2</sub>CHNHBoc e CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et sovrapposti), 3.21 (1H, app. t,  $J = 11.1$  Hz, -CHHOTPS), 3.41 (1H, dd,  $J = 11.8, 4.9$  Hz, -CHHOTPS), 3.92 (1H, m, -CHNHBoc), 4.12 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.64 (1H, br d,  $J = 7.9$  Hz, -NHBoc), 5.39 (2H, m, -CH=CH- sovrapposti);

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.5, 14.1, 22.7, 28.3 (x3), 30.4, 33.8, 39.2, 49.6, 60.4, 64.8, 79.8, 127.6, 129.7, 157.4, 173.3;

HRMS: [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  352.2102 (calc. per C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>NNaO<sub>5</sub> 352.2100).

Ad una miscela dell'alcol **54a** (52 mg, 0.172 mmol), TEMPO (2 mg, 0.012 mmol), acetonitrile (2.0 ml) e tampone fosfato (0.648 ml, 0.67 M, pH 6.85) riscaldata a 35°C sono stati aggiunti in maniera simultanea, ma separatamente, nell'arco di 2h, NaClO<sub>2</sub> (34 mg, 80%, 0.346 mmol in 0.170 ml d'acqua) e NaClO (0.0048 ml in 0.086 d'acqua). La miscela è stata lasciata in agitazione per l'intera notte a 35 °C e quindi riportata a t.a. E' stata poi aggiunta acqua (2.0 ml) seguita da una soluzione acquosa di Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 10% (2.0 ml) ed una di HCl al 5% fino a pH 2-3. E' stata, in fine, aggiunta altra soluzione di Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> e la miscela è stata estratta con acetate di tile e DCM. Le fasi organiche riunite sono state anidrificate su MgSO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (2 - 30% metanolo in DCM) a fornire **39** (42 mg, 72%) come un olio viscoso.



**42**:  $R_f$ : 0.55 (etere di petrolio/ etere etilico 2:8);

$[\alpha]_D^{25}$ : 10.1 ( $c$  1, CHCl<sub>3</sub>);

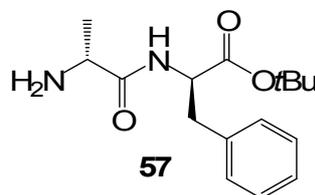
$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.20 (3H, d,  $J = 7.6$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1.24 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.42 (9H, s,  $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.19-2.44 (6H, m,  $-\text{CH}_2\text{CHNHBoc}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  sovrapposti), 2.66 (1H, m,  $-\text{CHCH}_3$ ), 3.88 (1H, m,  $-\text{CHNHBoc}$ ), 4.12 (2H, q,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.91 (1H, br d,  $J = 7.9$  Hz,  $-\text{NHBoc}$ ), 5.42 (2H, m,  $-\text{CH}=\text{CH}$ - sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13.3, 14.2, 22.7, 28.3 (x3), 29.6, 33.9, 43.5, 52.5, 60.4, 79.3, 126.6, 130.4, 155.8, 173.3, 179.4;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  366.1897 (calc. per  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NNaO}_6$  366.1893).

### Composto 57

La *N*-Fmoc-D-alanina (189 mg, 0.607 mmol) e la D-fenilalanina *tert*-butil estere idrocloruro (156 mg, 0.607 mmol) vengono fatte reagire in accordo con la procedura generale A. Il dipeptide grezzo ottenuto è stato deprotezionato in accordo con la procedura generale B per fornire l'ammina pura **57** (165 mg, 93%) come un olio viscoso.



**57**:  $[\alpha]_D^{25}$ : -40.0 ( $c$  1,  $\text{CHCl}_3$ );

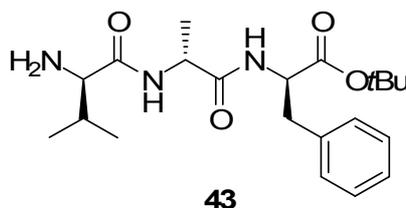
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.31 (3H, d,  $J$  6.9 Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1.41 (9H, s,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.75 (2H, br s,  $-\text{NH}_2$ ), 3.06 (1H, dd,  $J$  13.6, 6.7 Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.12 (1H, dd,  $J$  13.6, 6.2 Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.48 (1H, app q,  $J$  6.9 Hz,  $-\text{CHNH}_2$ ), 4.71 (1H, app q,  $J$  7.7 Hz,  $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$ ), 7.16-7.29 (5H, m, *Ar*);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21.5, 27.9 (x3), 38.1, 50.6, 53.2, 82.1, 126.9, 128.3 (x2), 129.4 (x2), 136.4, 170.7, 175.1;

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  293.1869 (calc. per  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3$  293.1865).

### Composto 43

Il dipeptide **57** (165 mg, 0.565 mmol) e la *N*-Fmoc-D-valina (191 mg, 0.565 mmol) vengono fatte reagire in accordo con la procedura generale A. Il tripeptide grezzo ottenuto è stato deprotezionato in accordo con la procedura generale B per fornire l'ammina pura **43** (197 mg, 89%) come un olio viscoso.



**43**:  $[\alpha]_D^{25}$ : 22.1 ( $c$  1,  $\text{CHCl}_3$ );

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.72 (3H, d,  $J$  6.9 Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.88 (3H, d,  $J$  6.9 Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.22 (3H, d,  $J$  7.0 Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)$ ), 1.31 (9H, s,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.41 (2H, br s,  $-\text{NH}_2$ ), 2.12 (1H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 2.96 (1H, dd,  $J$  13.8, 6.6 Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.04 (1H, dd,  $J$  13.8, 6.2 Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.09 (1H, d,  $J$  4.3 Hz,  $-\text{CHNH}_2$ ), 4.50 (1H, m, -

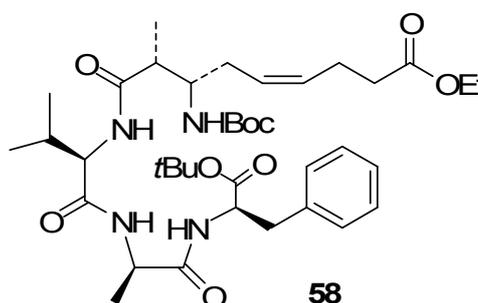
$CHCH_3$ ), 4.63 (1H, app q,  $J$  7.6 Hz,  $-CHCH_2Ar$ ), 7.09-7.20 (6H, m,  $-C(O)NH$  e  $Ar$  sovrapposti), 7.63 (1H, d,  $J$  7.8 Hz,  $-C(O)NH$ );

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 16.1, 18.0, 19.4, 27.6 (x3), 30.8, 37.8, 48.1, 53.5, 60.0, 81.8, 126.6, 128.0 (x2), 129.3 (x2), 136.1, 170.1, 171.7, 174.4;

HRMS:  $[M+H]^+$   $m/z$  392.2541 (calc. per  $C_{21}H_{34}N_3O_4$  392.2549).

### Composto 55

Il  $\beta$ -aminoacido **42** (72 mg, 0.20 mmol) ed il tripeptide **43** (78 mg, 0.20 mmol) sono stati fatti reagire secondo la procedura generale A. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (2 - 5% metanolo in DCM) a fornire **58** (125 mg, 87%) come un solido amorfo.



**58**:  $R_f$ : 0.55 (DCM/MeOH 9:1);

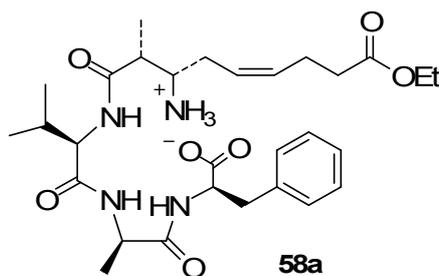
$^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 1.01 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz,  $-CH(CH_3)(CH_3)$ ), 1.03 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz,  $-CH(CH_3)(CH_3)$ ), 1.17 (3H, d,  $J$  = 6.7 Hz,  $-CH_3$  ( $\beta$ -AA)), 1.28 (3H, t,  $J$  = 7.1 Hz,  $-CH_2CH_3$ ), 1.30 (3H, d,  $J$  = 7.1 Hz,  $-CH_3$  (Ala)), 1.40 (9H, s,  $-CO_2C(CH_3)_3$ ), 1.45 (9H, s,  $-NHCO_2C(CH_3)_3$ ), 2.10 (1H, m,  $-CH(CH_3)(CH_3)$ ), 2.20-2.40 (6H, m,  $-CH_2CHNHBOc$  e  $CH_2CH_2CO_2Et$  sovrapposti), 2.55 (1H, m,  $-CHCH_3$  ( $\beta$ -AA)), 3.07 (1H, dd,  $J$  = 13.9, 7.2 Hz,  $-CHHAr$ ), 3.13 (1H, dd,  $J$  = 13.9, 6.9 Hz,  $-CHHAr$ ), 3.75 (1H, m,  $-CHNHBOc$ ), 4.14 (2H, q,  $J$  = 7.1 Hz,  $-CH_2CH_3$ ), 4.17 (1H, d,  $J$  = 7.1 Hz,  $-CH-iPr$ ), 4.41 (1H, q,  $J$  = 7.1 Hz,  $-CHCH_3$  (Ala)), 4.53 (1H, app. t,  $J$  = 7.0 Hz,  $-CHCH_2Ar$ ), 4.75 (1H, br s,  $-NHBOc$ ), 5.40 (2H, m,  $-CH=CH-$  sovrapposti), 7.29 (5H, m,  $Ar$ );

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 14.6, 15.5, 18.4, 19.0, 19.7, 23.8, 28.2 (x3), 28.8 (x3), 30.8, 31.5, 35.0, 38.8, 46.6, 50.0, 54.6, 56.0, 60.8, 61.5, 79.8, 82.9, 127.8, 128.4, 129.4 (x2), 130.6 (x2), 131.1, 138.3, 158.3, 172.0, 173.5, 174.4, 175.0, 177.7;

HRMS:  $[M+Na]^+$   $m/z$  739.4254 (calc. per  $C_{38}H_{60}N_4NaO_9$  739.4258).

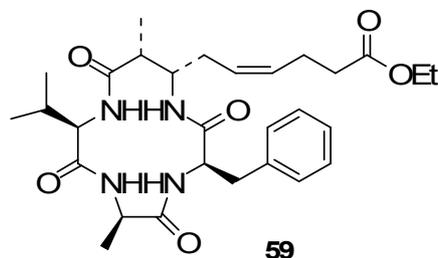
### Composto 59

Il tetrapeptide protetto **58** (46.0 mg, 0.065 mmol) è stato disciolto in una miscela 1:1 di TFA e DCM (1.0 ml) e la miscela è stata agitata per 5 h. I solventi sono stati rimossi a pressione ridotta ed il residuo oleoso così ottenuto è stato lavato in etere etilico. Il precipitato bianco è stato rilavato con etere etilico ed anidrificato (vuoto spinto, t.a., per la notte) ed adoperato senza ulteriori purificazioni **58a** (43.8 mg, quant.).



**58a:**  $R_f$ : 0.15 (DCM/MeOH/AcOH 90:10/1);  
 $[\alpha]_D^{25}$ : -17.8 ( $c$  0.33, MeOH);  
 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0.98 (3H, d,  $J = 7.5$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.00 (3H, d,  $J = 7.5$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.22 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}_3$  (Ala)) 1.27 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.28 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_3$  ( $\beta$ -AA)), 2.08 (1H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 2.30-2.50 (6H, m,  $-\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  sovrapposti), 2.84 (1H, m,  $-\text{CHCH}_3$  ( $\beta$ -AA)), 3.0 (1H, dd,  $J = 13.7, 8.6$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.24 (1H, dd,  $J = 13.7, 3.6$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.41 (1H, m,  $-\text{CHNH}_3^+$ ), 4.10 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz,  $-\text{CH-iPr}$ ), 4.14 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.40 (1H, br q,  $J = 6.9$  Hz,  $-\text{CHCH}_3$  (Ala)), 4.70 (1H, m,  $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$ ), 5.40 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 5.63 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 7.27 (5H, m,  $Ar$ );  
 $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 12.6, 14.5, 18.3, 18.9, 19.6, 23.7, 29.5, 31.3, 34.4, 38.6, 40.5, 49.9, 54.0, 55.2, 60.6, 61.6, 124.8, 127.8, 129.4 (x2), 130.4 (x2), 134.1, 138.4, 173.2, 174.2, 174.5, 174.9, 176.8;  
 HRMS:  $[\text{M}]^+$   $m/z$  561.3281 (calc. per  $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_7$  561.3288).

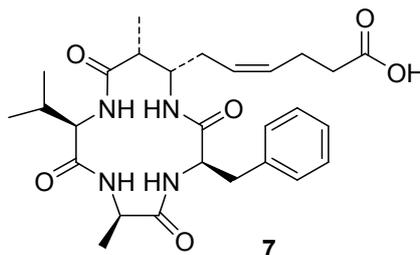
Il tetrapeptide lineare **58a** (30 mg, 0.045 mmol) è stato fatto ciclizzare seguendo la procedura generale C. Il grezzo ottenuto è stato purificato su cromatografia flash (0 – 5% metanolo in DCM) per fornire **59** (7.0 mg, 29%) come un solido amorfo.



**59:**  $R_f$ : 0.35 (DCM/MeOH 95:5);  
 $[\alpha]_D^{25}$ : 35.3 ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ );  
 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.93 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.95 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.17 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_3$  ( $\beta$ -AA)), 1.25 (6H, m,  $-\text{CH}_3$  (Ala) e  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$  sovrapposti); 2.10 (1H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.27-2.44 (5H, m,  $-\text{CHHCH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  sovrapposti), 2.64 (1H, m,  $-\text{CHHCH}=\text{CHCH}_2-$ ), 2.85 (1H, dd,  $J = 14.4, 8.4$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 2.97 (1H, m,  $-\text{CHCH}_3$  ( $\beta$ -AA)), 3.23 (1H, dd,  $J = 14.4, 6.5$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.90 (2H, m,  $-\text{CHNH}-$  ( $\beta$ -AA) e  $-\text{CH-iPr}$  sovrapposti), 4.13 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.48 (1H, m,  $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$ ), 4.68 (1H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CHCH}_3$  (Ala)), 5.25 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 5.43 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 6.19 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ), 6.37 (1H, d,  $J = 6.4$  Hz,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ), 6.91 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ), 6.97 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ), 7.26 (5H, m,  $Ar$ );  
 $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13.4, 14.1, 14.2, 18.4, 19.5, 22.8, 26.7, 27.5, 33.9, 35.5, 42.1, 47.5, 51.9, 53.2, 59.1, 60.4, 126.6 (x2), 128.5 (x2), 129.2 (x2), 131.1, 137.0, 171.2, 171.9, 172.5, 173.5, 174.8;  
 HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  543.3174 (calc. per  $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_6$  543.3183).

## Composto 7

Alla soluzione del ciclopeptide **59** (11.0 mg, 0.019 mmol) in THF (0.4 ml) a 0 °C è stata aggiunta una soluzione di LiOH (1.5 mg, 0.036 mmol) in acqua (0.25 ml) e la miscela è stata agitata per 30 minuti a 0 °C e per altre 3h a t.a. E' stata quindi aggiunta un'ulteriore quantità di LiOH (0.4 mg in 0.125 ml d'acqua) e dopo 1 h in agitazione è stata addizionata acqua (0.5 ml). Dopo aver rimosso il THF a pressione ridotta la miscela è stata acidificata a pH 2 con HCl 1N e estratta per 5 volte con acetato di etile. Le fasi organiche riunite sono state anidricate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato su cromatografia flash (0 – 4% metanolo in DCM) per fornire **7** (7.7 mg, 79%) come un solido amorfo.



**7**: *R*<sub>f</sub>: 0.40 (DCM/MeOH 9:1);

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : 13.5 (*c* 0.25, MeOH);

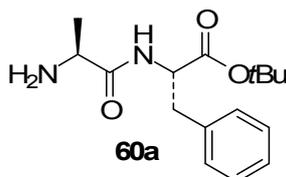
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 0.95 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 0.98 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 1.16 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, -CH<sub>3</sub> ( $\beta$ -AA)), 1.26 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, -CH<sub>3</sub> (Ala)), 2.11 (1H, m, -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 2.28-2.42 (5H, m, -CHHCH=CH- e -CH=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et sovrapposti), 2.53 (1H, m, -CHHCH=CH-), 2.83 (1H, dd, *J* = 13.9, 7.8 Hz, -CHHAr), 2.84 (1H, m, CHCH<sub>3</sub> ( $\beta$ -AA)), 3.25 (1H, dd, *J* = 13.9, 7.1 Hz -CHHAr), 3.95 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, -CH-*i*Pr), 4.05 (1H, m, -CHNH- ( $\beta$ -AA)), 4.52 (1H, q, *J* = 7.0 Hz, -CHCH<sub>3</sub> (Ala)), 4.67 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, -CHCH<sub>2</sub>Ar), 5.28 (1H, m, -CH=CH-), 5.43 (1H, m, -CH=CH-), 7.22-7.32 (5H, m, Ar);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 13.1, 14.5, 19.0, 19.6, 23.9, 28.2, 28.8, 34.7, 37.4, 43.6, 48.8, 53.2, 55.3, 61.2, 127.6, 128.4, 129.4 (x2), 130.3 (x2), 131.2, 138.8, 172.5, 173.7, 174.2, 176.2, 177.9;

HRMS:  $[M+H]^+$  *m/z* 515.6211 (calc. per C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 515.6218).

## Composto 60

La *N*-Fmoc-L-alanina e (1.0 g, 3.21 mmol) e la L-fenilalanina *tert*-butil estere idrocloruro (910 mg, 3.53 mmol) vengono fatte reagire in accordo con la procedura generale A. Il dipeptide grezzo ottenuto è stato deprotezionato in accordo con la procedura generale B per fornire l'ammina pura **60a** (755 mg, 80%) come un olio viscoso.



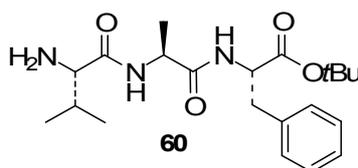
**60a**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : 40.6 (*c* 1, CHCl<sub>3</sub>);

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.31 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1.41 (9H, s, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.75 (2H, br s, -NH<sub>2</sub>), 3.06 (1H, dd, *J* = 13.6, 6.7 Hz, -CHHAr), 3.12 (1H, dd, *J* = 13.6, 6.2 Hz, -CHHAr), 3.48 (1H, q, *J* = 6.9 Hz, -CHNH<sub>2</sub>), 4.71 (1H, q, *J* = 7.7 Hz, -CHCH<sub>2</sub>Ar), 7.16-7.29 (5H, m, Ar);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21.5, 27.9 (x3), 38.1, 50.6, 53.2, 82.1, 126.9, 128.3 (x2), 129.4 (x2), 136.4, 170.7, 175.1;

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  293.1871 (calc. Per  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3$  293.1865).

Il dipeptide **60a** (737 mg, 2.52 mmol) e la *N*-Fmoc-L-valine (778 mg, 2.29 mmol) vengono fatte reagire in accordo con la procedura generale A. Il tripeptide grezzo ottenuto è stato deprotezionato in accordo con la procedura generale B per fornire l'ammina pura **60** (770 mg, 86%) come un olio viscoso.



**60**:  $[\alpha]_D^{25}$ : -22.4 ( $c$  1,  $\text{CHCl}_3$ );

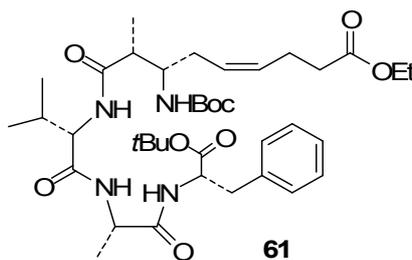
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.72 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.88 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.22 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)$ ), 1.31 (9H, s,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.41 (2H, br s,  $-\text{NH}_2$ ), 2.12 (1H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 2.96 (1H, dd,  $J = 13.8$ , 6.6 Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.04 (1H, dd,  $J = 13.8$ , 6.2 Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.09 (1H, d,  $J = 4.3$  Hz,  $-\text{CHNH}_2$ ), 4.50 (1H, m,  $-\text{CHCH}_3$ ), 4.63 (1H, q app.,  $J = 7.6$  Hz,  $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$ ), 7.09-7.20 (6H, m,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}$  e *Ar* sovrapposti), 7.63 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 16.1, 18.0, 19.4, 27.6 (x3), 30.8, 37.8, 48.1, 53.5, 60.0, 81.8, 126.6, 128.0 (x2), 129.3 (x2), 136.1, 170.1, 171.7, 174.4;

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  392.2551 (calc. per  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4$  392.2549).

### Composto 61

Il  $\beta$ -aminoacido **42** (17.5 mg, 0.051 mmol) ed il tripeptide **60** (20.0 mg, 0.051 mmol) sono stati fatti reagire secondo la procedura generale A. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (2 - 5% metanolo in DCM) a fornire **61** (26.3 mg, 72%) come un solido amorfo.



**61**:  $R_f$ : 0.55 (DCM/MeOH 95:5);

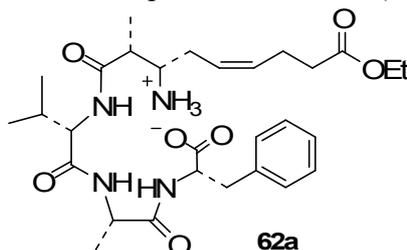
$[\alpha]_D^{25}$ : -23.4 ( $c=1$ , MeOH);

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0.97 (6H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$  overlapped), 1.16 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz,  $-\text{CH}_3$  ( $\beta$ -AA)), 1.28 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.37 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_3$  (Ala)), 1.41 (9H, s,  $-\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.46 (9H, s,  $-\text{NHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.09 (1H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 2.13-2.41 (6H, m,  $-\text{CH}_2\text{CHNHoc}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  sovrapposti), 2.55 (1H, m,  $-\text{CHCH}_3$  ( $\beta$ -AA)), 3.05 (1H, dd,  $J = 13.9$ , 7.2 Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.10 (1H, dd,  $J = 13.9$ , 6.9 Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.75 (1H, m,  $-\text{CHNHoc}$ ), 4.15 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.21 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}-i\text{Pr}$ ), 4.43 (1H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CHCH}_3$  (Ala)), 4.56 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$ ), 4.67 (1H, br s,  $-\text{NHoc}$ ), 5.47 (2H, m,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  sovrapposti), 7.28 (5H, m, *Ar*);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 14.6, 15.4, 18.4, 18.9, 20.0, 23.8, 28.2 (x3), 28.8 (x3), 31.8, 32.1, 35.0, 38.5, 46.6, 50.0, 54.3, 55.8, 60.0, 61.5, 79.9, 83.0, 127.8, 128.1, 129.4 (x2), 130.4 (x2), 131.1, 138.1, 158.3, 171.9, 173.3, 174.4, 174.9, 177.6;  
HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  739.4264 (calc. per  $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{NaO}_9$  739.4258).

### Composto 62

Il tetrapeptide protetto **62** (26.3 mg, 0.038 mmol) è stato disciolto in una miscela 1:1 di TFA e DCM (1.0 ml) e la miscela è stata agitata per 5 h. I solventi sono stati rimossi a pressione ridotta ed il residuo oleoso così ottenuto è stato lavato in etere etilico. Il precipitato bianco è stato rilavato con etere etilico ed anidrificato (vuoto spinto, t.a., per la notte) ed adoperato senza ulteriori purificazioni **62a** (21.7 mg, quant.).



**62a**:  $R_f$ : 0.25 (DCM/MeOH/AcOH 90:10/1);

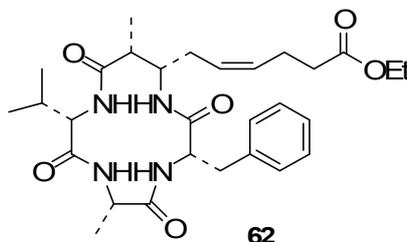
$[\alpha]_D^{25}$ : -22.9 ( $c$  1, MeOH);

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0.96 (6H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$  sovrapposti), 1.27 (6H, m,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_3$  ( $\beta$ -AA) sovrapposti), 1.36 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}_3$  (Ala)), 2.08 (1H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 2.45 (6H, m,  $-\text{CH}_2\text{CHN}^+\text{H}_3$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  sovrapposti), 2.88 (1H, m,  $-\text{CHCH}_3$  ( $\beta$ -AA)), 3.06 (1H, dd,  $J = 13.8, 7.7$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.22 (1H, dd,  $J = 13.8, 5.2$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.49 (1H, m,  $-\text{CHN}^+\text{H}_3$ ), 4.15 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.24 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH-iPr}$ ), 4.45 (1H, br q,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CHCH}_3$  (Ala)), 4.65 (1H, br t,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$ ), 5.47 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 5.68 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 7.27 (5H, m,  $Ar$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 12.8, 14.5, 18.5, 18.8, 19.9, 23.7, 29.8, 31.8, 34.3, 38.4, 40.9, 50.1, 54.2, 55.4, 60.0, 61.6, 124.7, 127.7, 129.4 (x2), 130.4 (x2), 134.3, 138.3, 173.0, 174.3, 174.8 (x2), 176.8;

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  561.3279 (calc. per  $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_7$  561.3288).

Il tetrapeptide lineare **62a** (42.0 mg, 0.062 mmol) è stato fatto ciclizzare seguendo la procedura generale C. Il grezzo ottenuto è stato purificato su cromatografia flash (0 – 8% metanolo in DCM) per fornire **62** (18.2 mg, 54%) come un solido amorfo.



**62**:  $R_f$ : 0.35 (DCM/MeOH 9:1);

$[\alpha]_D^{25}$ : -91.8 ( $c$  0.5, MeOH);

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.00 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.02 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.28 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 1.35 (6H, m,  $-\text{CH}_3$  (Ala) e  $-\text{CH}_3$  ( $\beta$ -AA) sovrapposti), 2.07 (1H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 2.28-2.50 (6H, m, -

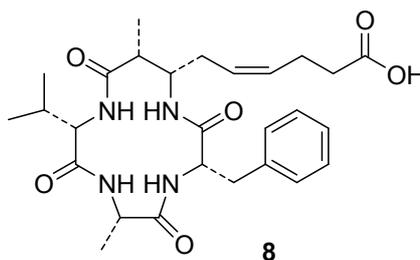
$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  sovrapposti), 2.78 (1H, m,  $-\text{CHCH}_3$  ( $\beta$ -AA)), 3.16 (1H, dd,  $J = 13.6, 6.0$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.28 (1H, dd,  $J = 13.6, 3.4$  Hz,  $-\text{CHHAr}$ ), 3.70 (1H, m,  $-\text{CH-iPr}$ ), 4.24 (2H, m,  $-\text{CHNH-}$  ( $\beta$ -AA) e  $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$  sovrapposti), 4.35 (1H, br q,  $J = 6.7$  Hz,  $-\text{CHCH}_3$  (Ala)), 5.44 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH-}$ ), 5.53 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH-}$ ), 7.29 (5H, m, *Ar*);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 10.8, 14.6, 16.5, 19.7, 20.0, 24.0, 29.8, 30.3, 35.0, 37.8, 43.8, 51.7, 53.2, 60.2, 61.5, 65.1, 127.8 (x2), 129.4 (x2), 130.3 (x2), 131.6, 138.6, 174.2, 174.4, 174.9 (x2), 176.6;

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  543.3178 (calc. per  $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_6$  543.3183).

### Composto 8

Alla soluzione del ciclopeptide **62** (10.3 mg, 0.019 mmol) in THF (0.5 ml) a 0 °C è stata aggiunta una soluzione di LiOH (1.1 mg, 0.025 mmol) in acqua (0.5 ml) e la miscela è stata agitata per 30 minuti a 0 °C e per altre 3h a t.a. E' stata quindi aggiunta un'ulteriore quantità di LiOH (0.5 mg in 0.125 ml d'acqua) e dopo 1 h in agitazione è stata addizionata acqua (0.5 ml). Dopo aver rimosso il THF a pressione ridotta la miscela è stata acidificata a pH 2 con HCl 1N e estratta per 5 volte con acetato di etile. Le fasi organiche riunite sono state anidricate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato su cromatografia flash (0 – 4% metanolo in DCM) per fornire **8** (5.0 mg, 75%) come un solido amorfo



**8**:  $R_f$ : 0.25 (DCM/MeOH 9:1);

$[\alpha]_D^{25}$ : -54.9 ( $c$  0.06, MeOH);

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.00 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.04 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.33 (3H, d,  $J = 7.6$  Hz,  $-\text{CH}_3$  (Ala)), 1.35 (3H, d,  $J = 7.6$  Hz,  $-\text{CH}_3$  ( $\beta$ -AA)), 2.25-2.50 (5H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$  e  $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  sovrapposti), 2.63 (1H, m,  $-\text{CHHCH}=\text{CH}$ ), 2.83 (2H, m,  $-\text{CHCH}_3$  ( $\beta$ -AA) e  $-\text{CHHCH}=\text{CH}$  sovrapposti), 3.15 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 3.82 (1H, d,  $J = 11.1$  Hz,  $-\text{CH-iPr}$ ), 4.26 (1H, m,  $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$ ), 4.37 (2H, m,  $-\text{CHCH}_3$  (Ala) e  $-\text{CHNH-}$  ( $\beta$ -AA) sovrapposti), 5.38 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH-}$ ), 5.57 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CH-}$ ), 7.20-7.33 (5H, m, *Ar*);

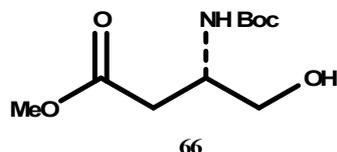
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 11.8, 16.1, 19.4, 20.0, 24.6, 29.0, 29.7, 36.5, 37.7, 44.4, 51.9, 52.3, 59.2, 65.1, 127.4, 127.6, 129.2 (x2), 130.1 (x2), 132.1, 138.5, 174.0, 174.5, 174.7, 176.5 (x2);

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  515.6221 (calc. per  $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_6$  515.6218).

### Composto 66

Ad una soluzione dell'acido aspartico **65** (200 mg, 0.809 mmol) in THF anidro (5 ml), a 0 °C, è stata aggiunta il  $\text{BH}_3(\text{SMe}_2)$  (2.42 ml, 2M in THF, 4.85 mmol) e la miscela risultante è stata lasciata in agitazione per la notte. La miscela di reazione è stata trattata con l'aggiunta di acqua goccia a goccia ed i solventi organici sono stati concentrati a pressione ridotta. La fase acquosa è stata estratta per tre volte con DCM e le fasi

organiche riunite sono state lavate con HCl 0.1N, con una sol. sat. acqu. di NaCl, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco. Il grezzo **66** (93 mg) così ottenuto è stato utilizzato tal quale per la reazione successiva, senza ricorrere all'utilizzo di tecniche di purificazione.



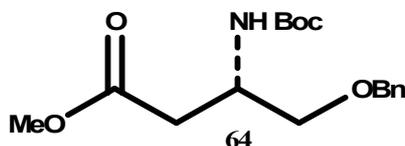
**66:** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ: 1.47 (9H, s, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.53 (2H, m, CH<sub>2</sub>OH), 3.56 (2H, m, CH<sub>2</sub>COOMe), 3.63 (3H, s, -CH<sub>3</sub>O), 3.91 (1H, m, -CHNH<sub>2</sub>Boc), 5.30 (1H, m, NH<sub>2</sub>Boc).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ: 28.6 (x3), 36.4, 50.0, 52.2, 64.0, 80.1, 156.3, 172.7.

HRMS: [M+Na]<sup>+</sup> m/z 256.07 (calc. per C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>5</sub>+ 256.12).

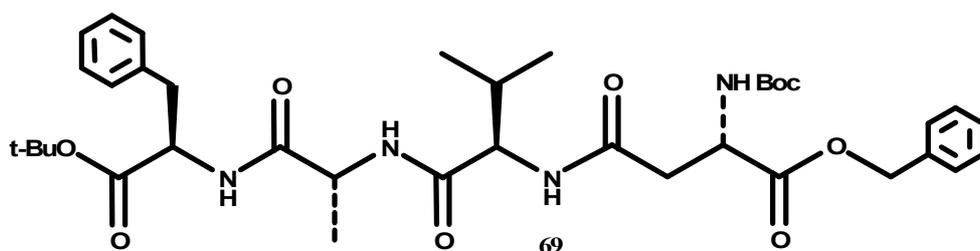
### Composto 64: tentativo di protezione dell'alcol primario con gruppo benzile

Ad una soluzione di **66** (93.0 mg, 0.399 mmol) in DCM anidro (5 ml) sono stati aggiunti l'Ag<sub>2</sub>O (277.4 mg, 1.197 mmol) e il BnBr (341.1 mg, 1.99 mmol) e la miscela ottenuta è stata lasciata in agitazione per la notte. La miscela è stata filtrata su un piccolo tappo di silice non flash e concentrata a pressione ridotta fornendo una miscela di prodotti senza alcuna traccia dell'alcol desiderato.



### Composto 69

L'acido aspartico **68** (100.0 mg, 0.309 mmol) ed il tripeptide **43** (157.2 mg, 0.402 mmol) sono stati fatti reagire secondo la procedura generale A. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (1 - 5% metanolo in DCM) a fornire **69** (139.0 mg, 64%) come un solido amorfo.



**69:** R<sub>f</sub>: 0.2 (DCM/MeOH 98:2);

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.86 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 0.89 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 1.23 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, -CH<sub>3</sub> (Ala)), 1.37 (9H, s, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.39 (9H, s, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.03 (1H, m, -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 2.78 (1H, dd, *J* = 15.2

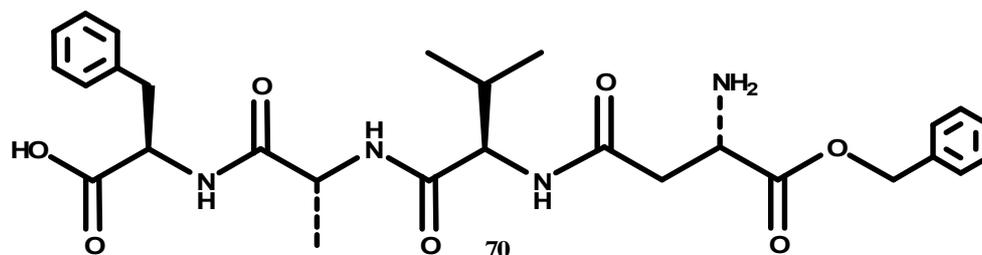
Hz  $J = 4.4$  Hz  $-CHH$  Asp), 2.97 (1H, m,  $-CHH$  Asp), 3.01 (1H, dd,  $J = 13.9$  Hz  $J = 6.6$  Hz  $-CHHAr$ ), 3.10 (1H, dd,  $J = 13.9$  Hz  $J = 6.1$  Hz  $-CHHAr$ ), 4.27 (1H, m,  $-CH-iPr$ ), 4.54 (1H, m,  $-CH$  (Asp)), 4.61 (1H, m,  $-CH$  (Ala)), 4.74 (1H, m,  $-CH$  (Phe)) 5.10 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz  $-CHHAr$ ), 5.18 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz  $-CHHAr$ ), 7.12-7.35 (10H, m,  $Ar$  sovrapposti);

$^{13}C$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 17.9, 18.7, 19.0, 27.8 (x3), 28.2 (x3), 31.0, 37.7, 38.0, 48.5, 50.5, 53.4, 58.1, 67.2, 80.0, 82.5, 126.0-129.0 (x10), 135.0, 136.0, 158.3, 169.0-171.4 (x4), 173.2;

HRMS:  $[M+H]^+$  m/z 697.49 (calc. per  $C_{37}H_{53}N_4O_9$  697.38).

### Composto 70

Il tetrapeptide protetto **69** (89.0 mg, 0.128 mmol) è stato disciolto in una miscela 1:1 di TFA e DCM (3.0 ml) e la miscela è stata agitata per 6 h. I solventi sono stati rimossi a pressione ridotta ed il residuo così ottenuto è stato anidrificato (vuoto spinto, t.a., per la notte) ed adoperato senza ulteriori purificazioni **70** (69.0 mg, quant.).



**70**:  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 0.95 (3H, d,  $J = 1.7$  Hz,  $-CH(CH_3)(CH_3)$ ), 0.97 (3H, d,  $J = 1.7$  Hz,  $-CH(CH_3)(CH_3)$ ), 1.19 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz,  $-CH_3$  (Ala)), 2.05 (1H, m,  $-CH(CH_3)(CH_3)$ ), 2.90-3.09 (3H,  $-CH_2$  Asp e  $CHHAr$  sovrapposti), 3.23 (1H, dd,  $J = 13.8$  Hz  $J = 5.3$  Hz  $-CHHAr$ ), 4.11 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz  $-CH$  (Val)), 4.38-4.45 (2H, m,  $-CH$  (Asp) e  $-CH$  (Ala) sovrapposti), 4.69 (1H, dd,  $J = 8.8$  Hz  $J = 5.3$  Hz,  $-CH$  (Phe)), 5.27 (2H, m,  $-CH_2Ar$ ), 7.20-7.41 (10H, m,  $Ar$  sovrapposti);

$^{13}C$  NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 17.9, 18.8, 19.0, 31.1, 37.7, 38.1, 48.5, 51.5, 53.7, 58.1, 67.2, 126.0-129.0 (x10), 135.1, 136.1, 169.7, 170.0, 170.8, 171.4, 173.0;

HRMS:  $[M+H]^+$  m/z 563.43 (calc. per  $C_{28}H_{36}NaN_4O_7$  563.25).

### Prova di ciclizzazione di 70 con PyBOP

Il tetrapeptide **70** (58.0 mg, 0.107 mmol) è stato sottoposto a condizioni di macrolattamizzazione con PyBOP seguendo la procedura generale D, fornendo una complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **67** (spettrometria di massa).

### Prova di ciclizzazione di 70 con HATU

Il tetrapeptide **70** (50.0 mg, 0.092 mmol) è stato sottoposto a condizioni di macrolattamizzazione con HATU seguendo la procedura generale D, fornendo una

complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **67** (spettrometria di massa).

### **Prova di ciclizzazione di 70 con EDC**

Il tetrapeptide **70** (43.0 mg, 0.079 mmol) è stato sottoposto a condizioni di macrolattamizzazione con EDC seguendo la procedura generale D, fornendo una complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **67** (spettrometria di massa).

### **Prova di ciclizzazione di 70 con FDPP**

Il tetrapeptide **70** (58.0 mg, 0.107 mmol) è stato sottoposto a condizioni di macrolattamizzazione con FDPP seguendo la procedura generale D, fornendo una complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **67** (spettrometria di massa).

### **Prova di ciclizzazione di 70 con DPPA**

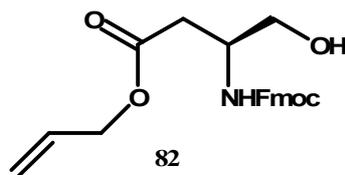
Il tetrapeptide **70** (50.0 mg, 0.092 mmol) è stato sottoposto a condizioni di macrolattamizzazione con DPPA seguendo la procedura generale D, fornendo una complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **67** (spettrometria di massa).

### **Prova sintesi del ciclopeptide 68**

L'acido aspartico **72** (48.0 mg, 0.121 mmol) è stato ancorato alla resina 2-clorotritilica e si è proceduto, attraverso l'inserimento rispettivamente di Fmoc-*D*-PheOH, Fmoc-*D*-Alal-OH e Fmoc-*D*-Val-OH, all'accrescimento del peptide su resina seguendo la procedura generale E. Gli stadi di ciclizzazione e distacco dal supporto solido hanno, però, fornito una complessa miscela di prodotti non contenente alcuna traccia del prodotto ciclico **71** (spettrometria di massa).

### **Composto 82**

Ad una soluzione dell'acido aspartico **77** (500.3 mg, 1.265 mmol) in DCM anidro (4 ml) sono stati aggiunti il pentafluorofenolo (279.4 mg, 1.518 mmol) e la DCC (313.2 mg, 1.518 mmol) e la miscela è stata lasciata in agitazione per 3 h a t.a. La miscela di reazione è stata anidrificata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e concentrata a pressione ridotta. Il residuo è stato sciolto in THF (3 ml) alla soluzione risultante è stato addizionato il NaBH<sub>4</sub> (71.8 mg, 1.898 mmol) e la miscela è stata lasciata in agitazione per 30 min. A 0 °C è stata aggiunta acqua, goccia a goccia, i solventi organici sono stati allontanati a pressione ridotta e la fase acquosa estratta per 3 volte con AcOEt. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una sol. sat. acqu. di NaCl, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco per fornire **82** che è stato utilizzato tal quale nel successivo stadio sintetico.

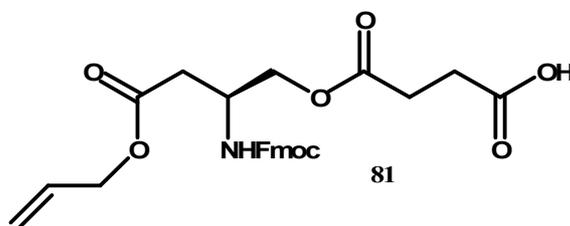


**82:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 2.53 (1H, dd,  $J=15.5$  Hz  $J=8.4$  Hz  $\text{CHHCOOAl}$ ), 2.68 (1H, dd,  $J=15.5$  Hz  $J=5.4$  Hz  $\text{CHHCOOAl}$ ), 3.53 (1H, dd,  $J=11.0$  Hz  $J=6.1$  Hz  $-\text{CHHOH}$ ), 3.60 (1H, dd,  $J=11.0$  Hz  $J=5.4$  Hz  $-\text{CHHOH}$ ), 4.19 (1H, t,  $J=6.8$  Hz  $-\text{CH}$  (Fmoc)), 4.27-4.31 (3H, m,  $\text{CHNH}$ Fmoc e  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$  sovrapposti), 4.58 (2H, m,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 5.18 (1H, dd,  $J=10.4$  Hz  $J=1.1$  Hz  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.30 (1H, dd,  $J=17.2$  Hz  $J=1.5$  Hz  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.92 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 7.29-7.80 (8H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 37.1, 48.5, 51.5, 64.5, 67.8, 67.9, 118.4, 120.9 (x2), 126.2 (x2), 128.2 (x2), 128.8 (x2), 133.6, 142.6 (x2), 145.3 (x2), 158.3, 172.7.

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  404.47 (calc. per  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NNaO}_5$  404.15).

L'alcol **82** è stato sciolto in DCM anidro (3 ml), alla soluzione ottenuta sono state aggiunte la piridina (1.0006 g, 0.01265 mol) e l'anidride succinica (1.2660, 0.01265 mol) e la miscela è stata lasciata in agitazione per la notte. Alla miscela di reazione è stato aggiunto HCl 0.5N ed i solventi organici sono stati concentrati a pressione ridotta. La fase acquosa è stata estratta per 3 volte con DCM e le fasi organiche riunite sono state anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato su cromatografia flash (1 – 5% metanolo in DCM) per fornire **81** puro (0.4260g, 70%) come un olio viscoso.



**81:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 2.50-2.60 (6H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  e  $\text{CH}_2\text{COOAl}$  sovrapposti), 4.00-4.20 (3H, m,  $\text{CH}_2\text{CHNH}$  e  $\text{CH}$  (Fmoc) sovrapposti), 4.20-4.30 (3H, m,  $\text{CHNH}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$  sovrapposti), 4.54 (2H, d,  $J=5.6$  Hz  $-\text{CH}_2$  (Fmoc)), 5.10 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHH}$ ) 5.2 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.88 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 7.00-7.70 (8H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 29.0, 30.1, 37.3, 45.1, 48.0, 67.2, 67.4, 67.7, 117.1, 121.0 (x2), 128.3 (x2), 128.9 (x2), 129.1 (x2), 133.7, 142.7 (x2), 146.0 (x2), 158.4, 172.7, 173.1, 178.0

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  504.28 (calc. per  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NNaO}_8$  504.16).

### Prova sintesi del ciclopeptide 30

L'acido **81** (48.0 mg, 0.121 mmol) è stato ancorato alla resina 2-clorotritilica e si è proceduto, attraverso l'inserimento rispettivamente di Fmoc-*D*-PheOH, Fmoc-*D*-Ala-OH e Fmoc-*D*-Val-OH, all'accrescimento del peptide su resina seguendo la procedura

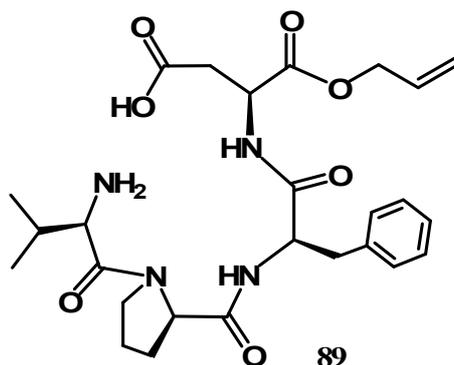
generale E. Gli stadi di ciclizzazione e distacco dal supporto solido hanno, però, fornito una complessa miscela di prodotti non contenente alcuna traccia del prodotto ciclico **30** (spettrometria di massa).

### Prova sintesi del ciclopeptide **29**

L'acido aspartico **72** (48.0 mg, 0.121 mmol) è stato ancorato alla resina 2-clorotritilica e si è proceduto, attraverso l'inserimento rispettivamente di Fmoc-*D*-Phe-OH, Fmoc-*D*-Pro-OH e Fmoc-*D*-Val-OH, all'accrescimento del peptide su resina seguendo la procedura generale E. Gli stadi di ciclizzazione e distacco dal supporto solido hanno, però, fornito una complessa miscela di prodotti contenente il prodotto ciclico **86** ed il prodotto di dimerizzazione in rapporto 1:3 valutato a mezzo analisi HPLC (ACN/H<sub>2</sub>O 10-100% in 30 min.) e di spettrometria di massa.

### Composto **89**

L'acido **90** (48.0 mg, 0.121 mmol) è stato ancorato alla resina 2-clorotritilica e si è proceduto, attraverso l'inserimento rispettivamente di Fmoc-*D*-PheOH, Fmoc-*D*-Pro-OH e Fmoc-*D*-Val-OH, all'accrescimento del peptide su resina seguendo la procedura generale F, fornendo il peptide lineare **89**.

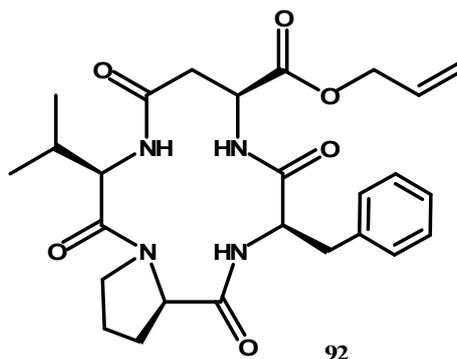


**89**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.90-1.06 (6H, m, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.60-2.20 (5H, m, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH (Pro) e CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH (Pro) sovrapposti), 2.50-3.80 (7H, m, -CH(Val), CH<sub>2</sub> (Asp), CH<sub>2</sub>N (Pro) e CH<sub>2</sub> Ar sovrapposti), 4.20-4.90 (5H, m, -CH (Pro), CH (Phe), CH (Asp) e CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub> sovrapposti), 5.16 (1H, d app, *J* = 10.1 Hz - CH=CHH), 5.27 (1H, dd, *J* = 17.1 Hz *J* = 9.5 Hz - CH=CHH), 5.83 (1H, m, CH=CHH), 6.90-7.30 (5H, m, Ar sovrapposti);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 17.6, 17.7, 22.1, 29.0, 35.0, 38.1, 38.5, 45.7, 48.1, 54.2, 57.7, 61.0, 67.8, 118.1, 126.0, 127.2 (x2), 128.1 (x2), 133.0, 139.8, 170.8, 171.4 (x2), 172.6, 176.7;

HRMS: [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 539.49 (calc. per C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>7</sub> 539.25).

Il tetrapeptide **89** è stato quindi sottoposto al successivo stadio di ciclizzazione con HATU secondo la procedura generale D per fornire il ciclopeptide **92** (42.2 mg, 70%) come un solido amorfo.



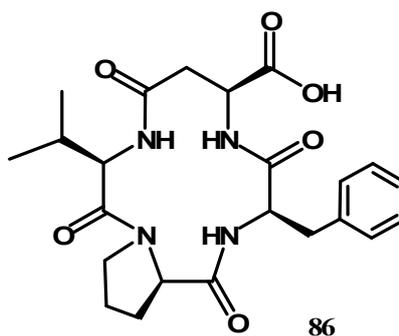
**92:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 1.30 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz -  $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.33 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz -  $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.60 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 2.01 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 2.74 (1H, m,  $\text{CHH}$  (Asp)), 3.01-3.10 (4H, m,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Ar}$  e  $\text{CHH}$  (Asp) sovrapposti), 3.44 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 4.32 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz -  $\text{CH}$  (Val)), 4.43 (1H, m, - $\text{CH}$  (Asp)), 4.53 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 4.55 (1H, m,  $\text{CH}$  (Pro)), 4.70 (1H, dd,  $J = 10.0$  Hz  $J = 6.4$  Hz  $\text{CH}$  (Phe)), 5.13 (1H, dd,  $J = 10.4$  Hz  $J = 1.1$  Hz -  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.22 (1H, dd,  $J = 17.2$  Hz  $J = 1.3$  Hz -  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.78 (1H, m,  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 7.0-7.2 (5H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 17.9, 18.6, 21.2, 31.5, 34.4, 35.3, 42.7, 46.4, 49.7, 53.2, 54.6, 55.7, 60.8, 65.9, 118.1, 126.4, 128.1 (x2), 128.8 (x2), 131.4, 136.5, 170.0, 170.6, 171.0, 171.9;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  521.69 (calc. per  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{NaO}_6$  521.24).

### Composto 86 deprotezione con $\text{Pd}^\circ$

Ad una soluzione di **92** (16 mg, 0.032 mmol) in DCM anidro (1.5 ml) vengono aggiunti il  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (3.70 mg, 0.003 mmol) ed il  $\text{PhSiH}_4$  (10.43 mg, 0.096 mmol) e la miscela viene lasciata in agitazione per 3 h. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta ed il grezzo purificato con cromatografia flash (MeOH/DCM/AcOH 4:95:1 a 8:91:1) per fornire l'acido **86** (6.5 mg, 44%) come un solido amorfo.



**86:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 1.10 (6H, m, - $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.36 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 1.76 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 2.5-3.3 (7H, m,  $\text{CH}_2$  (Asp),  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Ar}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) sovrapposti), 4.30-4.6 (4H, m,  $\text{CH}$  (Val), - $\text{CH}$  (Pro),  $\text{CH}_2$  (Asp) e  $\text{CH}$  (Phe) sovrapposti), 6.8-7.5 (5H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 17.8, 17.9, 21.3, 31.7, 34.3, 35.2, 42.3, 46.5, 53.2, 54.5, 55.8, 60.6, 126.4, 128.1 (x2), 128.7 (x2), 136.4, 170.1, 170.7, 171.0, 171.8, 174.1;

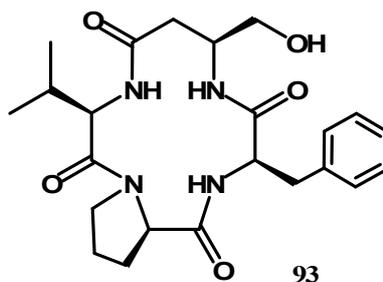
HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  481.62 (calc. per  $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{NaO}_6$  481.21).

### Prova di deprotezione del composto **92** con KOH

Ad una soluzione di **92** (10 mg, 0.020 mmol) in DMF (0.5 ml) a 0 °C vengono aggiunti il KOH (1.35 mg, 0.024 mmol) e l'acqua (0.5ml) e la miscela viene lasciata in agitazione per la notte. La miscela di reazione viene acidificata a pH 1-2 con HCl 1N ed estratta per tre volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state anidricate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco a pressione ridotta ma il residuo ottenuto non contiene il prodotto desiderato.

### Composto **29**

Ad una soluzione di **92** (17.0 mg, 0.034 mmol) in una miscela 1:10 di MeOH/DCM anidri (0.75 ml) a 0 °C viene aggiunto il LiBH<sub>4</sub> (2.22 mg, 0.102 mmol) e la miscela viene lasciata in agitazione per 3 h. Alla miscela viene aggiunta una ulteriore quantità di LiBH<sub>4</sub> (2.22 mg, 0.102 mmol) e dopo altre 3 h viene addizionata acqua goccia a goccia. La miscela viene concentrata a pressione ridotta a fornire **93** che viene sottoposto tal quale alle condizioni di esterificazione.

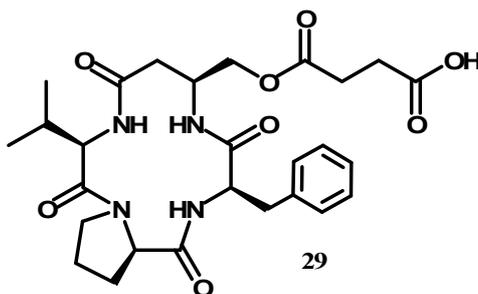


**93**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 9:1) δ: 0.80 (6H, m, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.64 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH (Pro)), 1.99 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH (Pro)), 2.4-2.8 (3H, m, CH<sub>2</sub> (Asp) e CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> sovrapposti), 2.9-3.2 (2H, m, CH<sub>2</sub>Ar), 3.2- 3.49 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH (Pro)), 4.1-4.3 (4H, m, CH (Val), -CH (Asp) e CH<sub>2</sub>OH sovrapposti), 4.45 (1H, m, CH (Pro)), 4.60 (1H, m, e CH (Phe)), 7.0-7.3 (5H, m, Ar sovrapposti);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 9:1) δ: 17.8, 17.9, 21.2, 31.5, 34.3, 35.2, 42.7, 46.4, 49.7, 53.2, 54.5, 55.7, 62.1, 126.0, 128.1 (x2), 128.7 (x2), 132.0, 170.0, 170.5, 171.1, 171.7;

HRMS: [M+Li]<sup>+</sup> m/z 451.61 (calc. per C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>LiN<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 451.25).

L'alcol **93** è stato sciolto in DMF al 20% in DCM anidri (1.2 ml), alla soluzione ottenuta sono state aggiunte l'anidride succinica (16.01 mg, 0.160 mmol) e DMAP (12.3 mg, 0.102 mmol) e la miscela è stata lasciata in agitazione per la notte. La miscela di reazione è stata acidificata con HCl 1N a pH 2-3 e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto è stato disciolto in ACN al 50% in H<sub>2</sub>O e purificato via HPLC (ACN/H<sub>2</sub>O 10-100% in 30 min.) per fornire **29** puro (4.1 mg, 22%) come un solido amorfo.



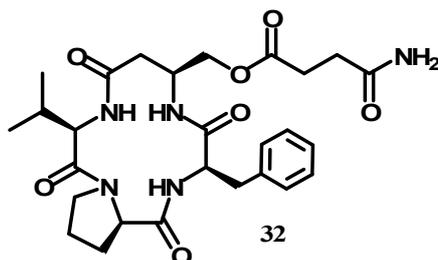
**29:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 0.75 (3H, d,  $J=6.4$  Hz - $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.80 (3H, d,  $J=6.6$  Hz - $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.60 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 1.96 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 2.4-2.8 (7H, m,  $\text{CH}_2$  (Asp),  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  (Succ.),  $\text{CH}_2\text{COOH}$  (Succ.), e  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  sovrapposti), 2.9-3.1 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 3.3- 3.6 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 4.1-4.3 (4H, m,  $\text{CH}$  (Val), - $\text{CH}$  (Asp) e  $\text{CH}_2\text{OH}$  sovrapposti), 4.48 (1H, m,  $\text{CH}$  (Pro)), 4.57 (1H, m, e  $\text{CH}$  (Phe)), 7.0-7.3 (5H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 17.9, 18.0, 21.3, 29.0, 31.0, 31.3, 34.2, 35.0, 43.0, 46.3, 49.8, 53.2, 54.6, 55.7, 63.7, 126.1, 128.2 (x2), 128.8 (x2), 133.2, 170.0, 170.5, 171.2, 171.6, 174.1, 176.8;

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  545.40 (calc. per  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_8$  545.26).

### Composto 32

Ad una soluzione di **29** (15.0 mg, 0.027 mmol) in DMF anidra (1.5 ml), a 0 °C, sono stati aggiunti la  $\text{NEt}_3$  (33.5 mg, 0.331 mmol), la DPPA (17.9 mg, 0.065 mmol) e l' $\text{NH}_4\text{Cl}$  (3.5 mg, 0.065 mmol) e la miscela, raffreddata a -16 °C, è stata lasciata in agitazione per la notte. È stata, quindi, aggiunta una sol. sat. acqu. di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e la miscela è stata estratta per 3 volte con AcOEt. Le fasi organiche riunite sono state lavate con sol. sat. acqu. di  $\text{NaHCO}_3$ , una di  $\text{NaCl}$  e successivamente anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato disciolto in ACN al 50% in  $\text{H}_2\text{O}$  e purificato via HPLC (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  10-100% in 30 min.) per fornire **32** puro (3.0 mg, 20%) come un solido amorfo.



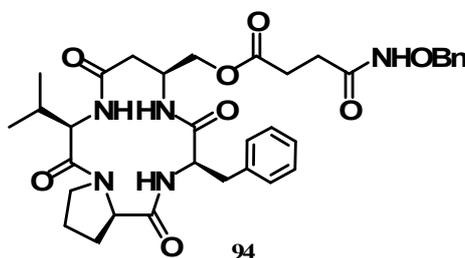
**32:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 0.73 (3H, d,  $J=6.6$  Hz - $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.80 (3H, d,  $J=6.8$  Hz - $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.56 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 1.92 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 2.4-2.6 (6H, m,  $\text{CHH}$  (Asp),  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  (Succ.),  $\text{CH}_2\text{COOH}$  (Succ.), e  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  sovrapposti), 2.8-2.9 (2H, m,  $\text{CHHAr}$  e  $\text{CHH}$  (Asp)sovrapposti), 3.07 (1H, dd,  $J=13.8$  Hz  $J=4.7$  Hz  $\text{CHHAr}$ ), 3.40 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 4.14 (2H, d,  $J=9.1$  Hz  $\text{CH}$ (Val)), 4.31 (1H, m, - $\text{CH}$  (Asp)), 4.38 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 4.54 (1H, m,  $\text{CH}$  (Pro)), 4.61 (1H, m, e  $\text{CH}$  (Phe)), 7.0-7.2 (5H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 17.9, 18.0, 21.3, 29.1, 29.9, 31.0, 32.2, 35.1, 43.2, 46.3, 49.7, 53.2, 54.5, 55.7, 63.7, 126.0, 128.2 (x2), 128.8 (x2), 133.0, 170.2, 170.5, 171.4, 171.6, 174.2, 174.5;

HRMS:  $[M+H]^+$  m/z 544.73 (calc. per  $C_{27}H_{38}N_5O_7$  544.28).

### Composto 33

Ad una soluzione di **29** (35.0 mg, 0.064 mmol) in DMF al 30% in DCM anidri (1.5 ml) sono stati addizionati l'HATU (48.9 mg, 0.128 mmol) e la DIPEA (16.6 mg, 0.128 mmol) e la miscela è stata agitata per 15 min. E' stata, quindi, aggiunta l' $NH_2OBn$  (40.8 mg, 0.256 mmol) ed il tutto è stato posto in agitazione per la notte. La miscela è stata trattata con HCl 1N ed estratta per 3 volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state lavate con sol. sat. acqu. di NaCl e successivamente anidificate su  $Na_2SO_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato disciolto in ACN al 50% in  $H_2O$  e purificato via HPLC (ACN/ $H_2O$  10-100% in 30 min.) per fornire **94** puro (6.5 mg, 15%) come un solido amorfo.

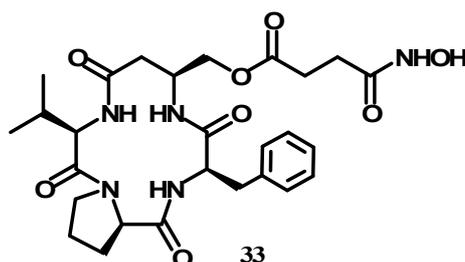


**94**:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3CN$ )  $\delta$ : 0.81 (3H, d,  $J=6.0$  Hz  $-CH(CH_3)(CH_3)$ ), 0.87 (3H, d,  $J=6.7$  Hz  $-CH(CH_3)(CH_3)$ ), 1.61 (2H, m,  $CH_2CH_2CH$  (Pro)), 1.94 (2H, m,  $CH_2CH$  (Pro)), 2.3-2.7 (7H, m,  $CH_2$  (Asp),  $CH_2CH_2COOH$  (Succ.),  $CH_2COOH$  (Succ.), e  $CH(CH_3)_2$  sovrapposti), 3.05 (1H, m,  $CHHAr$ ), 3.48 (2H, m,  $CH_2CH_2CH_2CH$  (Pro)), 4.0-4.6 (6H, m,  $CH$ (Val),  $CH$  (Asp)  $CH_2OCO$ ),  $CH$  (Pro) e  $CH$  (Phe)), 4.83 (2H, s,  $-CH_2$  (Ar)), 4.38 (2H, m,  $CH_2OCO$ ), 4.54 (1H, m,  $CH$  (Pro)), 4.61 (1H, m, e  $CH$  (Phe)), 7.0-7.5 (10H, m,  $Ar$  sovrapposti);

$^{13}C$  NMR (400 MHz,  $CD_3CN$ )  $\delta$ : 18.9, 19.1, 21.2, 28.9, 29.9, 31.2, 32.4, 35.0, 43.0, 46.2, 49.7, 53.1, 54.4, 55.8, 63.5, 77.2, 126.1, 127.5(x2), 127.9, 128.2 (x2), 128.7 (x2), 129.1 (x2), 133.1 139.3, 170.2, 170.5, 171.4, 171.6, 174.2, 174.5;

HRMS:  $[M+H]^+$  m/z 650.64 (calc. per  $C_{34}H_{44}N_5O_8$  650.32).

Ad una soluzione di **94** (6.5 mg, 0.010 mmol) in etanolo (1 ml) è stato addizionato il 20% in peso di Pd/C (1.3 mg). Il pallone di reazione è stato condizionato per tre volte con idrogeno gassoso e la miscela è stata sottoposta a vigorosa agitazione per l'intera notte. La miscela è stata quindi filtrata attraverso un piccolo tappo di Celite<sup>®</sup> e concentrata. Il grezzo ottenuto (una miscela di **32** e **33**) è stato disciolto in ACN al 50% in  $H_2O$  e purificato via HPLC (ACN/ $H_2O$  10-100% in 30 min.) per fornire **32** puro (0.93 mg, 16%) e di **33** puro (mg 0.83, 15 %) come un solidi amorfi.



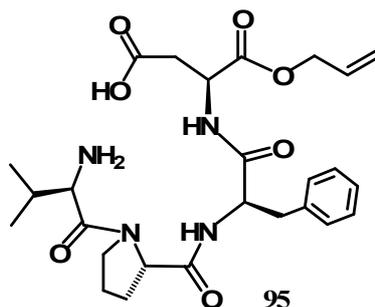
**33:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 0.77 (3H, d,  $J=6.5$  Hz - $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.81 (3H, d,  $J=6.7$  Hz - $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.58 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 1.99 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 2.4-2.6 (6H, m,  $\text{CHH}$  (Asp),  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  (Succ.),  $\text{CH}_2\text{COOH}$  (Succ.), e  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  sovrapposti), 2.9-3.0 (2H, m,  $\text{CHHAr}$  e  $\text{CHH}$  (Asp)sovrapposti), 3.12 (1H, dd,  $J=13.4$  Hz  $J=4.8$  Hz  $\text{CHHAr}$ ), 3.49 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 4.18 (2H, m,  $\text{CH}(\text{Val})$ ), 4.31 (1H, m, - $\text{CH}$  (Asp)), 4.41 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 4.53 (1H, m,  $\text{CH}$  (Pro)), 4.60 (1H, m, e  $\text{CH}$  (Phe)), 7.0-7.2 (5H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 17.9, 18.0, 21.2, 28.8, 29.8, 31.0, 32.2, 35.3, 43.1, 46.4, 49.9, 53.4, 54.6, 55.8, 63.3, 126.0, 128.1(x2), 128.8 (x2), 133.2, 170.1, 170.6, 171.3, 171.8, 172.3, 174.0;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z 582.74 (calc. per  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{NaN}_5\text{O}_8$  582.25).

### Composto 34

L'acido **90** (48.0 mg, 0.121 mmol) è stato ancorato alla resina 2-clorotritilica e si è proceduto, attraverso l'inserimento rispettivamente di Fmoc-*D*-PheOH, Fmoc-*L*-Pro-OH e Fmoc-*D*-Val-OH, all'accrescimento del peptide su resina seguendo la procedura generale F, fornendo il peptide lineare **95**.

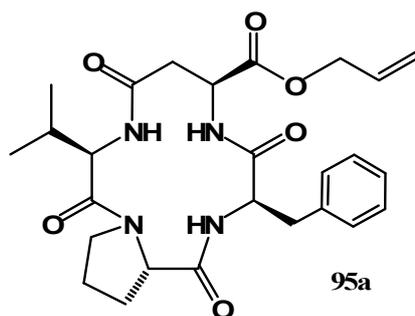


**95:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.89-1.05 (6H, m, - $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.60-2.20 (5H, m,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) sovrapposti), 2.50-3.80 (7H, m, - $\text{CH}(\text{Val})$ ,  $\text{CH}_2$  (Asp),  $\text{CH}_2\text{N}$  (Pro) e  $\text{CH}_2$  *Ar* sovrapposti), 4.20-4.90 (5H, m, - $\text{CH}$  (Pro),  $\text{CH}$  (Phe),  $\text{CH}$  (Asp) e  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$  sovrapposti), 5.18 (1H, m, - $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.28 (1H, dd,  $J = 17.0$  Hz  $J = 9.2$  Hz -  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.85 (1H, m,  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 7.0-7.3 (5H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 17.8, 17.9, 22.1, 31.0, 34.7, 35.4, 43.0, 45.8, 50.1, 54.6, 57.0, 61.1, 67.8, 118.1, 126.1, 127.5 (x2), 128.3 (x2), 133.1, 139.8, 170.8, 171.2 (x2), 172.0, 176.7;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z 539.49 (calc. per  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{NaO}_7$  539.25).

Il tetrapeptide **95** è stato quindi ciclizzato con HATU seguendo la procedura generale D per fornire il ciclopeptide **95a** (30.7 mg, 51%) come un solido amorfo.

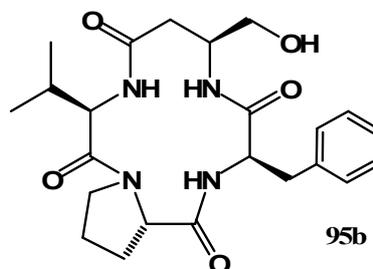


**95a:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 1.33 (6H, m,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.70 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 1.90-2.10 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 2.7-3.2 (5H, m,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Ar}$  e  $\text{CH}_2$  (Asp) sovrapposti), 3.51 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 4.07 (1H, m,  $\text{CH}$  (Val)), 4.28 (1H, m,  $-\text{CH}$  (Asp)), 4.40 (1H, m,  $\text{CH}$  (Pro)), 4.54 (1H, m,  $\text{CH}$  (Phe)), 4.64 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.16 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.18 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.79 (1H, m,  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 7.1-7.3 (5H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 18.0, 18.4, 21.4, 32.0, 34.3, 35.5, 43.0, 46.7, 50.1, 54.1, 54.8, 56.0, 61.4, 65.9, 118.3, 126.0, 127.7 (x2), 128.5 (x2), 131.2, 136.6, 170.0, 170.5, 171.0, 171.9;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  521.65 (calc. per  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{NaO}_6$  521.24).

Ad una soluzione di **95a** (25.0 mg, 0.050 mmol) in una miscela 1:10 di MeOH/DCM anidri (0.75 ml) a 0 °C viene aggiunto il  $\text{LiBH}_4$  (3.3 mg, 0.150 mmol) e la miscela viene lasciata in agitazione per 3 h. Alla miscela viene aggiunta una ulteriore quantità di  $\text{LiBH}_4$  (3.3 mg, 0.150 mmol) e dopo altre 3 h viene addizionata acqua goccia a goccia. La miscela viene concentrata a pressione ridotta a fornire **95b** che viene sottoposto tal quale alle condizioni di esterificazione.



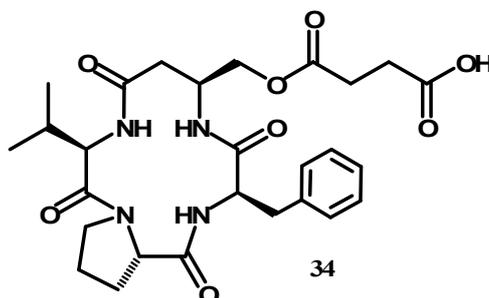
**95b:**  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 0.85 (3H, d,  $J=6.6$  Hz - $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.93 (3H, d,  $J=6.5$  Hz - $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.6-2.3 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) e  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) sovrapposti), 2.46 (1H, m,  $\text{CHH}$  (Asp)), 2.6-3.1 (4H, m,  $\text{CHH}$  (Asp),  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  e  $\text{CH}_2\text{Ar}$  sovrapposti), 3.43 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 3.8-4.5 (5H, m,  $\text{CH}$  (Val),  $-\text{CH}$  (Asp),  $\text{CH}$  (Pro) e  $\text{CH}_2\text{OH}$  sovrapposti), 4.62 (1H, m,  $\text{CH}$  (Phe)), 7.0-7.3 (5H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 17.9, 18.2, 22.2, 31.3, 34.5, 35.4, 42.6, 46.8, 49.9, 53.1, 54.4, 55.8, 62.3, 126.1, 127.6 (x2), 128.4 (x2), 132.1, 170.1, 170.6, 171.2, 171.9;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Li}]^+$   $m/z$  451.63 (calc. per  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{LiN}_4\text{O}_5$  451.25).

L'alcol **95b** è stato sciolto in DMF al 20% in DCM anidri (1.2 ml), alla soluzione ottenuta sono state aggiunte l'anidride succinica (26.0 mg, 0.260 mmol) e DMAP (19 mg, 0.156 mmol) e la miscela è stata lasciata in agitazione per la notte. La miscela di

reazione è stata acidificata con HCl 1N a pH 2-3 e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto è stato disciolto in ACN al 50% in H<sub>2</sub>O e purificato via HPLC (ACN/H<sub>2</sub>O 10-100% in 30 min.) per fornire **34** puro (7.0 mg, 24%) come un solido amorfo.



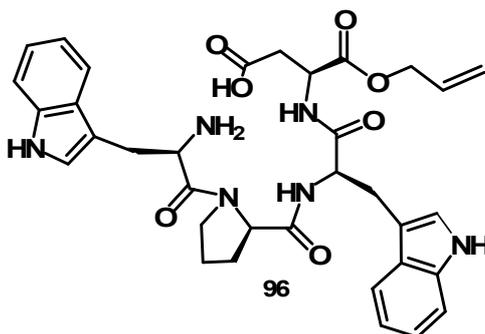
**34:** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 9:1) δ: 0.75 (3H, d, *J*=6.4 Hz -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 0.80 (3H, d, *J*=6.6 Hz -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 1.60-2.20 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH (Pro) e CH<sub>2</sub>CH (Pro) sovrapposti), 2.2-2.8 (7H, m, CH<sub>2</sub> (Asp), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (Succ.), CH<sub>2</sub>COOH (Succ.), CHHAr e CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> sovrapposti), 2.98 (1H, dd, *J*=14.0 Hz *J*=7.3 Hz CHHAr), 3.40 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH (Pro)), 3.9-4.2 (3H, m, -CH (Asp) e CH<sub>2</sub>OH sovrapposti), 4.21 (1H, d, *J*=10.6 Hz CH (Val)), 4.47 (1H, m, CH (Pro)), 4.61 (1H, d, *J*=7.4 Hz CH (Phe)), 7.0-7.2 (5H, m, Ar sovrapposti);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 9:1) δ: 17.9, 18.0, 21.3, 29.0, 31.0, 31.3, 34.2, 35.0, 43.0, 46.3, 49.8, 53.2, 54.6, 55.7, 63.7, 126.1, 128.2 (x2), 128.8 (x2), 133.2, 170.0, 170.5, 171.2, 171.6, 174.1, 176.8;

HRMS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 545.70 (calc. per C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> 545.26).

### Composto 35

L'acido **90** (195.0 mg, 0.493 mmol) è stato ancorato alla resina 2-clorotritilica e si è proceduto, attraverso l'inserimento rispettivamente di Fmoc-*D*-Trp-OH, Fmoc-*D*-Pro-OH e Fmoc-*D*-Trp-OH, all'accrescimento del peptide su resina seguendo la procedura generale F, fornendo il peptide lineare **96**.

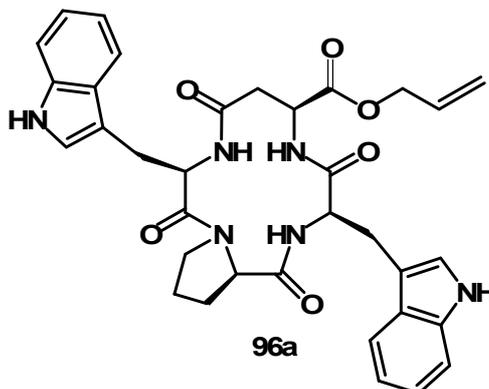


**96:** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 9:1) δ: 1.50-2.20 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH (Pro) e CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH (Pro) sovrapposti), 2.3-3.2 (6H, m, CH<sub>2</sub> (Asp), e CH<sub>2</sub> Ar sovrapposti), 3.3-3.5 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH (Pro)), 4.05 (1H, m, CH (Trp)), 4.3-4.6 (4H, m, -CH (Pro), CH (Asp), e CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub> sovrapposti), 4.65 (1H, m, CH (Trp)), 5.10 (1H, m, -CH=CHH), 5.18 (1H, m, CH=CHH), 5.77 (1H, m, CH=CHH), 6.9-7.3 (10H, m, Ar sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 22.1, 31.0, 32.0, 34.2, 38.7, 43.0, 46.5, 51.1, 53.8, 61.0, 67.6, 110.7, 110.9, 111.3(x2), 118.0, 119.2, 119.4, 121.2(x2), 122.3(x2), 123.0, 123.6, 127.2, 127.3, 128.1, 137.5(x2), 170.8, 171.2, 171.5, 173.0, 176.7;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  665.49 (calc. per  $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{NaO}_7$  665.27).

Il tetrapeptide **96** (154.0 mg, 0.240 mmol) è stato, quindi, ciclizzato con HATU seguendo la procedura generale D per fornire il ciclo peptide **96a** (93 mg, 63%) come un solido amorfo.

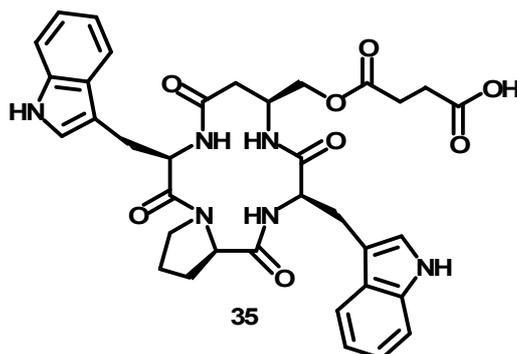


**96a**:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 1.60-2.20 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) sovrapposti), 2.4-3.3 (6H, m,  $\text{CH}_2$  (Asp), e  $\text{CH}_2$  Ar sovrapposti), 3.3-3.5 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro)), 4.37 (1H, m,  $\text{CH}$  (Trp)), 4.4-4.6 (4H, m,  $-\text{CH}$  (Pro),  $\text{CH}$  (Asp), e  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$  sovrapposti), 4.69 (1H, m,  $\text{CH}$  (Trp)), 5.14 (1H, m,  $-\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.22 (1H, m,  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.80 (1H, m,  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 6.9-7.2 (10H, m, Ar sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 22.1, 30.7, 32.2, 34.0, 38.9, 43.1, 46.8, 51.0, 54.2, 61.8, 67.2, 110.7, 110.9, 111.4(x2), 118.2, 119.1, 119.2, 121.3(x2), 122.3(x2), 123.2, 123.4, 127.4(x2), 128.0, 137.3(x2), 170.4, 171.2, 171.5, 171.7, 173.1;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  625.88 (calc. per  $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_6$  625.28).

Ad una soluzione di **96a** (93.0 mg, 0.149 mmol) in una miscela 1:10 di MeOH/DCM anidri (2 ml) a 0 °C viene aggiunto il  $\text{LiBH}_4$  (9.9 mg, 0.456 mmol) e la miscela viene lasciata in agitazione per 3 h. Alla miscela viene aggiunta una ulteriore quantità di  $\text{LiBH}_4$  (3.3 mg, 0.150 mmol) e dopo una notte viene addizionata acqua goccia a goccia. La miscela viene concentrata a pressione ridotta a fornire l'alcol che è stato sciolto in DMF al 20% in DCM anidri (3 ml). Alla soluzione ottenuta sono state aggiunte l'anidride succinica (180.2 mg, 1.787 mmol) e DMAP (127.5 mg, 1.043 mmol) e la miscela è stata lasciata in agitazione per la notte. La miscela di reazione è stata acidificata con HCl 1N a pH 2-3 e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto è stato disciolto in ACN al 50% in  $\text{H}_2\text{O}$  e purificato via HPLC (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  10-100% in 30 min.) per fornire **35** puro (21.5 mg, 22%) come un solido amorfo.



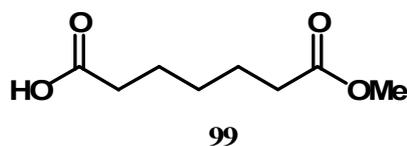
**33:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 1.90-2.20 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) e  $\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) sovrapposti), 2.3-3.5 (12H, m,  $\text{CH}_2$  (Asp),  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  (Succ.),  $\text{CH}_2\text{COOH}$  (Succ.),  $\text{CH}_2\text{Ar}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$  (Pro) sovrapposti), 3.9-4.2 (3H, m,  $-\text{CH}$  (Asp) e  $\text{CH}_2\text{OH}$  sovrapposti), 4.2-4.7 (3H, m,  $\text{CH}$  (Trp) e  $\text{CH}$  (Pro) sovrapposti), 6.8-7.3 (10H, m, *Ar* sovrapposti);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  9:1)  $\delta$ : 22.2, 29.3, 31.1, 31.6, 31.7, 32.1, 41.2, 43.3, 44.7, 55.4, 59.7, 61.8, 66.6, 110.6, 110.8, 111.2(x2), 119.0, 119.1, 120.7(x2), 121.9(x2), 122.6, 122.9, 127.3, 127.4, 137.0(x2), 170.2, 171.1, 171.4, 171.5, 173.0, 177.8;

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  671.87 (calc. per  $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_8$  671.28).

### Composto 97

Ad una soluzione dell'acido pimelico **98** (100.0 mg, 0.624 mmol) in DMF (6 ml) viene aggiunto, a 0 °C, l'NaH (29.9 mg, 1.248 mmol) e la miscela viene posta in agitazione per 30 min. Viene aggiunto l'MeI (885.7 mg, 26.240 mmol) e la miscela di reazione è lasciata in agitazione per la notte. La reazione è trattata con l'aggiunta di acqua e concentrata a pressione ridotta. È stata aggiunta, poi, una sol. sat. acqu. di  $\text{NaHSO}_4$  e la miscela è stata estratta per 3 volte con AcOEt. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una sol. sat. acqu. di NaCl e successivamente anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato su cromatografia flash (1-3% MeOH in DCM) per fornire **99** puro (54.3 mg, 50%) come un olio viscoso.



**99:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.38 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 1.65 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  sovrapposti), 2.34 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{COOMe}$  e  $\text{CH}_2\text{COOH}$  sovrapposti), 3.68 (3H, s,  $\text{CH}_2\text{O}$ );

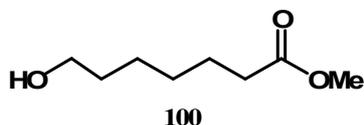
$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21.6, 24.5, 28.5, 33.7, 43.6, 51.4, 173.9, 202.4.

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  197.60 (calc. per  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NaO}_4$  197.08).

### Composto 100

Ad una soluzione dell'acido **99** (1.306 g, 7.50 mmol) in THF anidro (42 ml), a 0 °C, è stata aggiunta il  $\text{BH}_3(\text{SMe}_2)$  (22.5 ml, 2M in THF, 45.00 mmol) e la miscela risultante è stata lasciata in agitazione per la notte. La miscela di reazione è stata trattata con

l'aggiunta di acqua goccia a goccia ed i solventi organici sono stati concentrati a pressione ridotta. La fase acquosa è stata estratta per tre volte con DCM e le fasi organiche riunite sono state lavate con una sol. sat. acqu. di  $\text{NaHSO}_4$ , con una sol. sat. acqu. di  $\text{NaCl}$ , anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo così ottenuto è stato purificato su cromatografia flash (0.5-3% MeOH in DCM) per fornire **98** puro (841.3 mg, 70%) come un olio viscoso.



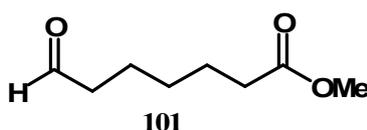
**100**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.33-1.40 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  sovrapposti), 1.52-1.69 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  sovrapposti), 2.31 (2H, t,  $J=7.5$  Hz  $-\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 3.63 (2H, m, t,  $J=6.5$  Hz  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.66 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 24.1, 24.6, 29.0, 32.1, 33.8, 51.5, 63.2, 173.2

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z 183.27 (calc. per  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NaO}_3$  183.11).

### Composto 101

Ad una soluzione di cloruro di ossalile (3.89 ml, 2M in DCM, 7.789 mmol) in DCM anidro (30 ml), a  $-78$  °C in atmosfera di azoto, è stato aggiunto il dimetilsolfossido (1.217 g, 15.579 mmol). Dopo 15 minuti è stato aggiunto l'alcol **100** (1.04 g, 6.491 mmol) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a  $-78$  °C per 15 minuti. Dopo l'aggiunta della trietilammina (32 ml, 230 mmol), la soluzione è stata agitata per 20 minuti a  $-78$  °C e per ulteriori 90 minuti a t.a.. la miscela di reazione è stata trattata con una soluzione acquosa satura di  $\text{NaHCO}_3$  e le fasi acquose sono state estratte per tre volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (0 - 2% MeOH in DCM) a dare **101** puro (0.780 g, 75%) come un olio viscoso.



**101**:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.35 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 1.63 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  sovrapposti), 2.25 (2H, t,  $J=7.5$  Hz  $-\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 2.43 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 3.65 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 9.75 (1H, s,  $\text{CHO}$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21.7, 25.0, 28.4, 33.8, 44.0, 52.1, 172.9, 202.3

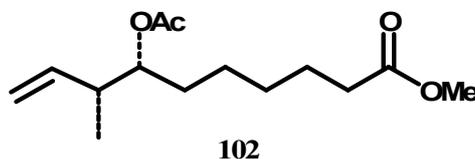
HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z 181.25 (calc. per  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NaO}_3$  181.08).

### Composto 102

L' $n$ -BuLi (1.990 ml, 1.6M in THF, 3.184 mmol) è stato lentamente aggiunto, a  $-78$ °C, ad una soluzione in THF anidro (1.5 ml), di *tert*-BuOK (3.184 ml, 1M in THF, 3.184 mmol) e *cis*-2-butene (0.2312 g, 4.12 mmol). La soluzione gialla risultante è stata agitata a  $-45$  °C per 20 minuti e quindi raffreddata nuovamente a  $-78$  °C. è stato poi aggiunto il (-)-Ipc<sub>2</sub>BOMe (1.3033 g, 4.12 mmol), precedentemente disciolto in THF anidro (1.5 ml)

e la miscela risultante è stata sottoposta a vigorosa agitazione per 35 minuti. Alla soluzione è stato aggiunto il  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.5847 g, 4.12 mmol) seguito da una soluzione dell'aldeide **101** (0.300 g, 1.87 mmol) in THF. Si è lasciato il tutto sotto agitazione a  $-78^\circ\text{C}$  per 5 h e quindi la reazione è stata trattata con 11 ml di una soluzione acquosa 3N di NaOH e 30 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%. La miscela in agitazione per tutta la notte è stata portata gradualmente a t.a. diluita con acetato di etile e lavata con una sol. sat. acqu. di NaCl. Le fasi acquose sono state estratte per tre volte con acetato di etile e le fasi organiche riunite sono state anidrificate su  $\text{MgSO}_4$ , filtrate e portate a secco.

Il residuo ottenuto è stato disciolto in DCM anidro (8.5 ml) e trattato con piridina (6.133 ml, 75.85 mmol) ed anidride acetica (4.766 ml, 50.56 mmol). La soluzione, lasciata sotto agitazione per la notte, è stata concentrata a pressione ridotta ed acidificata con HCl 1N. Le fasi acquose sono state estratte per tre volte con DCM e le fasi organiche riunite sono state anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (20 - 60% etere etilico in etere di petrolio) a dare **102** puro (0.430 g, 89%) come un olio viscoso.



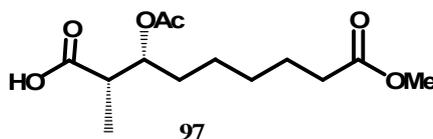
**102**:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.98 (3H, d,  $J=6.8$  Hz  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 1.20-1.31 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 1.48-1.60 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  sovrapposti), 2.04 (3H, s,  $\text{CH}_3$  (Ac)), 2.28 (2H, t,  $J=7.5$  Hz  $-\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 2.37 (1H, m,  $\text{CHCH}=\text{CH}_2$ ), 3.65 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.80 (1H, m,  $\text{CHOAc}$ ), 5.00-5.05 (3H, m,  $\text{CHCH}=\text{CHH}$  e  $\text{CHCH}=\text{CHH}$  sovrapposti), 5.71 (1H, m,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 15.2, 21.0, 24.6, 25.0, 28.8, 31.5, 33.0, 41.3, 51.4, 76.6, 115.1, 139.7, 170.8, 174.1

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  257.33 (calc. per  $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_4$  257.17).

### Composto 97

L'alchene **102** (54 mg, 0.197 mmol) è stato sciolto in una miscela 1:1:1.5 di  $\text{CCl}_4/\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  (0.9 ml). Alla soluzione sono stati aggiunti l' $\text{NaIO}_4$  (166.8 mg, 0.788 mmol) ed una quantità catalitica di  $\text{RuCl}_3$  e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per la notte. Alla miscela è stata aggiunta una sol. sat. acqu. di NaCl ed è stata estratta per 3 volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (MeOH/DCM/AcOH 1:98:1 a 3:96:1) a dare **95** puro (39.2 mg, 67%) come un olio viscoso.

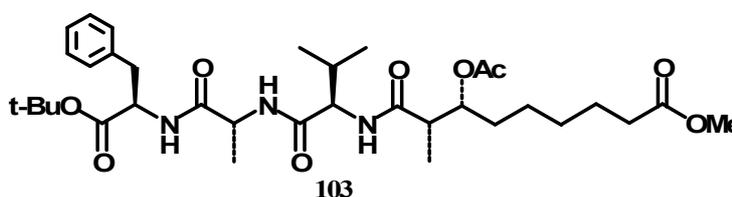


**97**:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.1 (3H, d,  $J=7.1$  Hz  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 1.22-1.31 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COAc}$  sovrapposti), 1.52-1.60 (4H, m,

$CH_2CH_2COOMe$  e  $CH_2COAc$  sovrapposti), 2.02 (3H, s,  $CH_3$  (Ac)), 2.27 (2H, t,  $J=7.6$  Hz  $-CH_2COOMe$ ), 2.65 (1H, m,  $CHCOOH$ ), 3.62 (3H, s,  $CH_3O$ ), 5.13 (1H, m,  $CHOAc$ );  
 $^{13}C$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 11.7, 20.9, 24.6, 25.1, 28.7, 31.6, 33.8, 42.8, 51.5, 73.7, 170.2, 174.2, 179.5  
 HRMS:  $[M+Na]^+$  m/z 297.37 (calc. per  $C_{13}H_{22}O_6$  297.13).

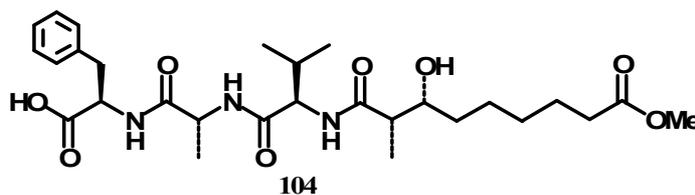
### Composto 104

Il  $\beta$ -idrossiacido **97** (39.0 mg, 0.133 mmol) ed il tripeptide **43** (156.6 mg, 0.400 mmol) sono stati fatti reagire secondo la procedura generale A a dare **103** che è stato utilizzato tal quale nei successivi stadi sintetici.



**103**:  $^1H$  NMR (250 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.91 (3H, d,  $J=2.8$  Hz  $CH(CH_3)(CH_3)$ ), 0.94 (3H, d,  $J=2.9$  Hz  $CH(CH_3)(CH_3)$ ), 1.09 (3H, d,  $J=6.9$  Hz  $-CH_3$  ( $\beta$ -idrossiacido)), 1.25 (3H, d,  $J=6.6$  Hz  $CH_3$  (Ala)), 1.27-1.35 (3H, m,  $CHHCH_2CH_2CH_2COOMe$  e  $CH_2CH_2CH_2COOMe$  sovrapposti), 1.39 (9H, s,  $C(CH_3)_3$ ), 1.50-1.70 (3H, m,  $CHHCH_2CH_2CH_2COOMe$  e  $CH_2COAc$  sovrapposti), 1.97-2.08 (4H, m,  $CH_3$  (Ac) e  $CH(CH_3)_2$  sovrapposti), 2.27 (2H, t,  $J=7.5$  Hz  $-CH_2COOMe$ ), 2.54 (1H, m,  $CHCOAc$ ), 3.06 (2H, m,  $CH_2Ar$ ), 3.64 (3H, s,  $CH_3O$ ), 4.27 (1H, m,  $CH$  (Val)), 4.54 (1H, m,  $CH$  (Ala)), 4.73 (1H, m,  $CH$  (Phe)), 5.03 (1H, m,  $CHOAc$ ), 7.12-7.29 (5H, m, *Ar*);  
 $^{13}C$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 13.5, 18.2, 18.7, 19.0, 20.9, 24.6, 25.2, 27.8 (x3), 28.8, 31.2, 33.8, 38.1, 44.6, 48.6, 51.3, 53.5, 58.0, 75.1, 76.5, 82.2, 126.8, 128.2 (x2), 129.4 (x2), 136.1, 170.4, 170.6 (x2), 171.2, 173.1 (x2)  
 HRMS:  $[M+H]^+$  m/z 648.77 (calc. per  $C_{34}H_{54}N_3O_9$  648.39).

Il grezzo **103** è stato disciolto in una miscela 1:1 di TFA e DCM (7.0 ml) e la miscela è stata lasciata in agitazione per la notte. I solventi sono stati rimossi a pressione ridotta e il residuo ottenuto è stato disciolto in MeOH (3 ml) e alla soluzione ottenuta è stata aggiunta una quantità catalitica di  $K_2CO_3$ . La miscela è stata agitata a t.a. per la notte, quindi trattata con HCl 1N ed estratta per 3 volte con AcOEt. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una sol. sat. acqu. di NaCl, anidificate su  $Na_2SO_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (MeOH/DCM/AcOH 2:97:1 a 5:94:1) a dare **104** puro (40.9 mg, 52% sui tre steps) come un olio viscoso.



**104:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0.98 (3H, d,  $J=6.7$  Hz  $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.01 (3H, d,  $J=6.7$  Hz  $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.16 (3H, d,  $J=6.9$  Hz  $-\text{CH}_3$  ( $\beta$ -idrossiacido)), 1.24 (3H, d,  $J=7.1$  Hz  $\text{CH}_3(\text{Ala})$ ), 1.26-1.63 (6H, m,  $\text{CH}$  ( $\beta$ -idrossiacido),  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$  sovrapposti), 2.03 (1H, m,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.33 (2H, t,  $J=7.5$  Hz  $-\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 2.44 (1H, m,  $\text{CH}$  ( $\beta$ -idrossiacido)), 3.03 (1H, dd,  $J=13.8$  Hz  $J=9.1$  Hz  $\text{CHHAr}$ ), 3.24 (1H, dd,  $J=13.8$  Hz  $J=5.0$  Hz  $\text{CHHAr}$ ), 3.55-3.70 (4H, m,  $\text{CH}_3\text{O}$  e  $\text{CHOH}$  sovrapposti), 4.06 (1H, d,  $J=7.6$  Hz  $-\text{CH}(\text{Val})$ ), 4.39 (1H, q,  $J=7.1$  Hz  $\text{CH}$  ( $\text{Ala}$ )), 4.66 (1H, dd,  $J=9.0$  Hz  $J=5.0$  Hz  $-\text{CH}$  ( $\text{Phe}$ )), 7.20-7.29 (5H, m,  $\text{Ar}$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 14.0, 18.2, 19.3, 19.7, 23.8, 26.0, 27.5, 31.4, 34.8, 35.7, 38.6, 45.0, 48.9, 52.0, 52.2, 55.2, 73.7, 127.8, 129.4 (x2), 130.4 (x2), 138.6, 171.0, 173.7, 175.3, 176.0, 178.4

HRMS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  572.63 (calc. per  $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{NaN}_3\text{O}_8$  572.29).

### Prova di ciclizzazione del composto 102 con il tricolorobenzoilcloruro

Ad una soluzione di **104** (16.0 mg, 0.029 mmol) in THF anidro (0.3 ml) a 0 °C sono stati aggiunti la  $\text{NEt}_3$  (6.45 mg, 0.064 mmol) e il 2,4,6-tricloro-benzoilcloruro (9.19 mg, 0.037 mmol) e la miscela è stata agitata per 1 h. La miscela di reazione è stata aggiunta ad una soluzione di DMAP (7.8 mg, 0.064 mmol) in toluene anidro (5.5 ml) a 75 °C ed il tutto è stato lasciato in agitazione per 1.5h. I solventi sono stati concentrati a pressione ridotta ed è stata aggiunto HCl 1N. La miscela è stata estratta per 3 volte con DCM e le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di  $\text{NaHCO}_3$ , una di NaCl, anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è risultato essere una complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **105** (spettrometria di massa).

### Prova di ciclizzazione del composto 104 con BOP-Cl

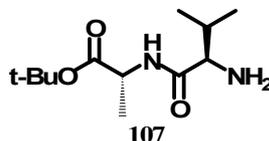
Ad una soluzione di **104** (15.0 mg, 0.027 mmol) in DCM anidro (5.4 ml) sono stati aggiunti la  $\text{NEt}_3$  (16.5 mg, 0.163 mmol) e il BOP-Cl (20.7 mg, 0.081 mmol) e la miscela è stata agitata per 80 h. Alla miscela di reazione è stata aggiunto HCl 1N ed è stata estratta per 3 volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl, anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è risultato essere una complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **105** (spettrometria di massa).

### Prova di ciclizzazione del composto 104 con EDC

Ad una soluzione di **104** (59.0 mg, 0.027 mmol) in DCM anidro (3.8 ml) sono stati aggiunti, a 0 °C, la DIPEA (28.6 mg, 0.038 mmol), l'HOBt (29.9 mg, 0.222 mmol) e l'EDC (42.6 mg, 0.222 mmol) e la miscela è stata agitata per la notte. Alla miscela di reazione è stata aggiunto HCl 1N ed è stata estratta per 3 volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di  $\text{NaHCO}_3$ , una di NaCl, anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è risultato essere una complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **105** (spettrometria di massa).

### Composto 107

La *N*-Fmoc-D-Valina (339.4 mg, 1.000 mmol) e la D-alanina *tert*-butil estere idrocloruro (199.8 mg, 1.100 mmol) vengono fatte reagire in accordo con la procedura generale A. Il didpeptide grezzo ottenuto è stato deprotetto in accordo con la procedura generale B per fornire l'ammina pura **107** (234.0 mg, 95%) come un olio viscoso.



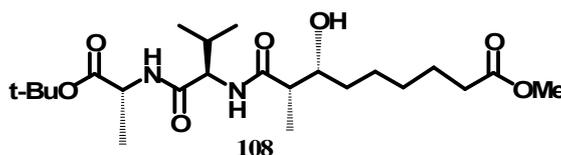
**107**:  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0.67 (3H, d,  $J=6.8$  Hz  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.83 (3H, d,  $J=6.9$  Hz  $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.21 (3H, d,  $J=7.1$  Hz  $-\text{CH}_3$  (Ala)), 1.30 (9H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.09 (1H, m,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.08 (3H, d,  $J=3.9$  Hz  $-\text{CH}$  (Val)), 4.29 (1H, m,  $-\text{CH}$  (Ala));

$^{13}\text{C}$  NMR (250 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 15.7, 18.2, 19.2, 27.5(x3), 30.6, 47.8, 59.6, 81.2, 171.9, 173.7;

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  245.44 (calc. per  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3$  245.19).

### Composto 108

L'acido **97** (70.0 mg, 0.273 mmol) e l'ammina **107** (74.0 mg, 0.303 mmol) vengono fatte reagire in accordo con la procedura generale A. Il peptide grezzo ottenuto è stato sciolto in MeOH (4 ml) e alla soluzione ottenuta è stata aggiunta una quantità catalitica di  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . La miscela è stata agitata a t.a. per la notte, quindi concentrata a pressione ridotta, trattata con HCl 1N ed estratta per 3 volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl, anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (MeOH/DCM/AcOH 2:97:1 a 6:93:1) a dare **108** puro (88.0 mg, 70% sui due steps) come un olio viscoso.



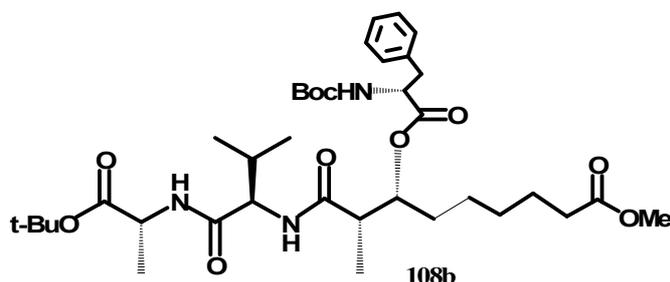
**108**:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.90 (3H, d,  $J=6.8$  Hz  $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.95 (3H, d,  $J=6.7$  Hz  $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.11 (3H, d,  $J=7.1$  Hz  $-\text{CH}_3$  ( $\beta$ -idrossiacido)), 1.3-1.4 (7H, m,  $\text{CH}_3(\text{Ala})$   $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  sovrapposti), 1.42 (9H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.44 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CHOH}$ ), 1.59 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 2.11 (1H, m,  $\text{CH}(\text{CH}_3)$ ), 2.27 (2H, t,  $J=7.4$  Hz  $-\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 2.38 (1H, m,  $\text{CHCHOH}$ ), 3.63 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.82 (1H, m,  $\text{CHOH}$ ), 4.30 (1H, m,  $\text{CH}$  (Val)), 4.39 (1H, m,  $\text{CH}$  (Ala));

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 10.6, 17.9, 18.2, 19.2, 24.7, 25.6, 27.8 (x3), 28.9, 30.8, 33.5, 33.8, 45.2, 48.7, 51.4, 58.0, 71.8, 81.9, 170.7, 171.9, 174.1, 176.4

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  459.66 (calc. per  $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_7$  459.31).

## Composto 109

Ad una soluzione di Boc-D-fenilalanina (60.4 mg, 0.228 mmol) in DCM anidro (3 ml) sono stati aggiunti, a 0 °C, il DMAP (38.4 mg, 0.315 mmol), la DCC (64.9 mg, 0.315 mmol) e la miscela è stata agitata per 20 min. Alla miscela di reazione è stata aggiunto l'alcol **108** (58.0 mg, 0.126 mmol) ed il tutto è stato lasciato in agitazione per la notte. È stata, poi, aggiunta una sol. sat. acqu. di NH<sub>4</sub>Cl e la miscela è stata estratta per 3 volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di NaHCO<sub>3</sub>, una di NaCl, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e portate a secco. Il grezzo ottenuto è stato purificato con cromatografia flash (0%-3% MeOH in DCM) a dare **108a** (84mg) che è stato ulteriormente purificato sciogliendolo in etere etilico e separando il precipitato bianco (dicicloesilurea) dalla soluzione che concentrata a pressione ridotta ha fornito **108b** puro (68 mg, 76%).

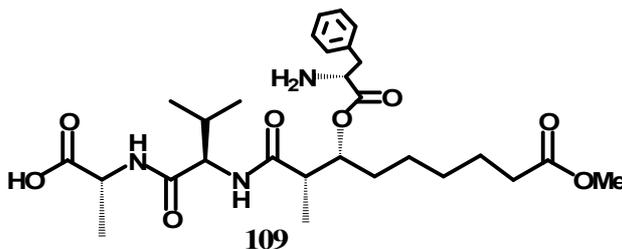


**108b**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.93 (6H, m, CH(CH<sub>3</sub>)), 1.0-1.3 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe e CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe sovrapposti), 1.3-1.7 (28H, m, CH<sub>3</sub> (β-idrossiacido), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(Boc), C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(t-Bu e CH<sub>3</sub>(Ala) sovrapposti), 2.22 (2H, m, -CH<sub>2</sub>COOMe), 2.61 (1H, m, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.9-3.2 (3H, m, CH<sub>2</sub>Ar e CH CH<sub>3</sub>(β-idrossiacido) sovrapposti), 3.61 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 4.32-4.6 (3H, m, CH (Val), CH (Ala) e CHCHCH<sub>3</sub>(β-idrossiacido) sovrapposti), 4.85 (1H, m, CH (Phe)), 7.1-7.3 (5H, m, Ar);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.7, 17.9, 18.2, 19.1, 24.2, 25.5, 27.8 (x3), 28.0 (x3), 28.9, 30.8, 33.5, 33.8, 37.0, 45.2, 48.7, 51.4, 56.1, 58.0, 73.8, 80.8, 81.9, 126.0, 127.4 (x2), 128.0 (x2), 138.8, 158.0, 170.7, 171.9, 172.2, 174.1, 176.4

HRMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z 706.29 (calc. per C<sub>37</sub>H<sub>60</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> 706.43).

Il tetrapeptide protetto **108b** (68.0 mg, 0.096 mmol) è stato disciolto in una miscela 1:1 di TFA e DCM (4.0 ml) e la miscela è stata in agitazione per la notte. I solventi sono stati rimossi a pressione ridotta ed il residuo così ottenuto è stato anidrificato (vuoto spinto, t.a., per la notte) ed adoperato senza ulteriori purificazioni **109** (62.6 mg, quant.).



**109**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.99 (3H, d, J=6.7 Hz CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 1.03 (3H, d, J=6.7 Hz CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 1.13 (3H, m, CH<sub>3</sub> (β-idrossiacido), 1.2-1.5 (7H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe e CH<sub>3</sub>(Ala) sovrapposti), 1.5-1.7 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe e CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe sovrapposti), 2.33 (2H, m,-

$\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 2.74 (1H, m,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.0-3.5 (3H, m,  $\text{CH}_2\text{Ar}$  e  $\text{CH CH}_3$ ( $\beta$ -idrossiacido)sovrapposti), 3.67 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.72 (1H, m,  $\text{CH}$  (Phe)), 4.21 (1H, m,  $\text{CHCHCH}_3$ ( $\beta$ -idrossiacido)), 4.43 (2H, m,  $\text{CH}$  (Val),  $\text{CH}$  (Ala) sovrapposti) 7.2-7.5 (5H, m, *Ar*);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 10.7, 17.9, 18.2, 19.1, 24.2, 25.5, 28.9, 30.8, 33.5, 33.8, 37.0, 45.2, 48.7, 51.4, 56.1, 58.0, 73.8, 126.0, 127.4 (x2), 128.0 (x2), 138.8, 170.7, 171.9, 172.2, 174.1, 177.4

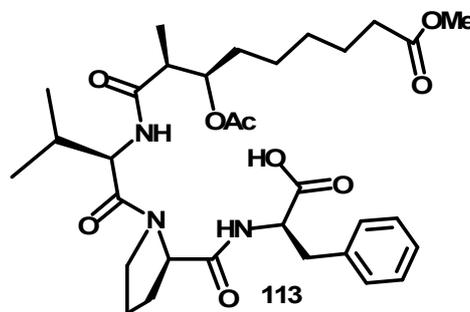
HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z 550.67 (calc. per  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_8$  550.31).

### Prova di ciclizzazione del composto 107

Il peptide lineare **109** (62.6 mg, 0.096 mmol) è stato sottoposto a condizioni di ciclizzazione con HATU secondo la procedura generale D, fornendo una complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **110** (spettrometria di massa).

### Composto 113

La Fmoc-*D*-fenilalanina (186.0 mg, 0.48 mmol) è stato ancorato alla resina 2-clorotritilica e si è proceduto, attraverso l'inserimento rispettivamente di Fmoc-*D*-Pro-OH, Fmoc-*D*-Val-OH ed il  $\beta$ -idrossiacido **97**, all'accrescimento del peptide su resina seguendo la procedura generale F, fornendo il peptide lineare che è stato purificato con cromatografia flash (MeOH/DCM/AcOH 2:97:1 a 5:94:1) a dare **113** (207.3 mg, 0.336 mmol).



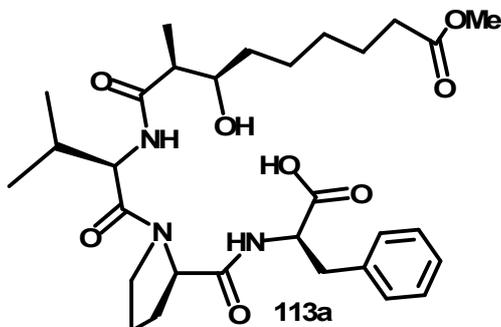
**113**:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.84 (3H, d,  $J=6.7$  Hz  $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 0.87 (3H, d,  $J=6.6$  Hz  $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ ), 1.04 (3H, d,  $J=7.0$  Hz  $\text{CH}_3$  ( $\beta$ -idrossiacido)), 1.1-1.3 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  sovrapposti), 1.3-1.6 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$  sovrapposti), 1.8-2.2 (7H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{Pro})$  e  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{Pro})$  sovrapposti), 2.23 (2H, t,  $J=7.4$  Hz  $-\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 2.50 (1H, m,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.0-3.2 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 3.5-3.7 (5H, m,  $\text{CH}_3\text{O}$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{Pro})$  sovrapposti), 3.88 (1H, m,  $\text{CH CH}_3$ ( $\beta$ -idrossiacido)), 4.46 (1H, m,  $\text{CHOAc}$ ( $\beta$ -idrossiacido)), 4.54 (2H, m,  $\text{CH}$  (Pro)), 4.78 (1H, m,  $\text{CH}$  (Val)), 4.96 (1H, m,  $\text{CH}$  (Phe)), 7.1-7.3 (5H, m, *Ar*);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 10.9, 17.7, 18.0, 21.0, 22.3, 24.1, 25.2, 28.9, 29.2, 30.8, 31.4, 33.3, 36.7, 43.2, 46.3, 51.4, 55.7, 57.1, 62.2, 73.9, 126.1, 127.6 (x2), 128.2 (x2), 138.9, 170.9, 171.7, 172.4, 172.6, 173.8, 177.7;

HRMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z 618.44 (calc. per  $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_9$  618.34).

### Prova di ciclizzazione del composto 113

Il tetrapeptide protetto **113** (80.0 mg, 0.129 mmol) è stato disciolto in MeOH (2 ml) e alla soluzione ottenuta è stata aggiunta una quantità catalitica di  $K_2CO_3$ . La miscela è stata agitata a t.a. per la notte, quindi concentrata a pressione ridotta, trattata con HCl 1N ed estratta per 3 volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl, anidificate su  $Na_2SO_4$ , filtrate e portate a secco per fornire **113a**



**113**:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.81 (6H, m,  $CH(CH_3)_2$ ), 1.09 (3H, d,  $J=7.0$  Hz  $CH_3$  ( $\beta$ -idrossiacido)), 1.20-1.35 (6H, m,  $CH_2CH_2CH_2CH_2COOMe$ ,  $CH_2CH_2CH_2COOMe$  e  $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOMe$  sovrapposti), 1.59 (2H, m,  $CH_2CH_2COOMe$ ), 1.7-2.2 (4H, m,  $CH_2CH_2CH(Pro)$  e  $CH_2CH(Pro)$  sovrapposti), 2.26 (2H, t,  $J=7.4$  Hz -  $CH_2COOMe$ ), 2.41 (1H, m,  $CH(CH_3)_2$ ), 3.16 (2H, m,  $CH_2Ar$ ), 3.52 (1H, m,  $CHHCH_2CH_2CH(Pro)$ ), 3.7-3.8 (2H, m,  $CH$   $CH_3$ ( $\beta$ -idrossiacido) e  $CHHCH_2CH_2CH(Pro)$  sovrapposti), 4.08 (1H, m,  $CHOH$ ( $\beta$ -idrossiacido)), 4.50-4.55 (2H, m,  $CH$  (Pro) e  $CH$  (Val) sovrapposti), 4.69 (1H, dd,  $J=12.8$  Hz  $J=6.0$  Hz  $CH$  (Phe)), 7.0-7.3 (5H, m, *Ar*);

$^{13}C$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 10.7, 17.8, 18.1, 22.2, 24.0, 25.3, 28.7, 29.1, 31.3, 33.3, 33.9, 36.8, 43.0, 46.5, 51.5, 55.8, 57.2, 62.1, 73.8, 126.1, 127.5 (x2), 128.1 (x2), 138.8, 171.6, 172.3, 172.7, 173.9, 178.7;

HRMS:  $[M+H]^+$  m/z 576.40 (calc. per  $C_{30}H_{46}N_3O_8$  576.33).

che è stato sottoposto tal quale, senza ulteriori purificazioni, a condizioni ciclizzanti con HATU seguendo la procedura generale D. Il grezzo ottenuto è risultato essere, però, una complessa miscela di prodotti senza alcuna traccia del prodotto ciclico **114** (spettrometria di massa).

## **BIBLIOGRAFIA**

---

---

---

---

**Bibliografia**

1. Vogelstein B., Kinzler W.K.W. *Trends Genet.*, **1993**, 9, 138-141
2. Fearon E.R., Vogelstein B *Cell*, **1990**, 61, 759-767.
3. Cross M., Dexter, T.M. *Cell*, **1991**, 64, 271-280.
4. Bishop J.M. *Cell*, **1991**, 64, 235-248.
5. Bernstein L.R., Liotta L.A. *Curr. Opin. Oncol.*, **1994**, 6, 106-113.
6. Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Miklos, G.L.G., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J.M., Henikoff, S., Skupski, M.P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M.S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S.E., Chervitz, S.A., Coates, D., Cravchick, A., Gabrielian, A., Galle, R.F., Gelbart, W.M., George, R. A., Goldstein, L.S.B., Gong, F., Guan, P., Harris, N.L., Hay, B.A., Hoskins, R.A., Li, J., Li, Z., Hynes, R.O., Jones, S.J.M., Kuehl, P.M., Lemaitre, B., Littleton, J.T., Morrison, D.K., Mungall, C., O'Farrell, P.K., Pickeral, O.K., Shue, C., Vossall, L.B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X.H., Zhong, F., Zhong, F., Gibbs, R., Venter, J.C., Adams, M.D., Lewis, S., *Science*, **2000**, 287, 2204-2215.
7. Hsieh J.; Gage F. H.; *Current Opinion in Genetics & Development*, **2004**, 14, 461-469
8. Marks P. A.; Miller T.; Richon V. M. *Current Opinion in Pharmacology*, **2003**, 3, 344-351
9. Biel M.; Wascholowski, V.; Giannis, A. *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3248 – 3280
10. Sambucetti, L.; Fischer, D. D.; Zabludoff, S.; Kwon, P. O.; Chamberlin, H.; Trogani, N.; Xu, H.; Cohen, D. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 34940 – 34947.
11. Sato, N.; Ohta, T.; Kitagawa, H.; Kayahara, M.; Ninomiya, I.; Fushida, S.; Fujimura, T.; Nishimura, G.; Shimizu, K.; Miwa, K. *Int. J. Oncol.* **2004**, 24, 679 – 685.
12. Munster, P. N.; Troso-Sandoval, T.; Rosen, N.; Rifkind, R.; Marks, P. A.; Richon, V. M. *Cancer Res.* **2001**, 61, 8492 – 8497
13. Guo, F.; Sigua, C.; Tao, J.; Bali, P.; Gorge, P.; Li, Y.; Wittmann, S.; Moscinski, L.; Atadja, P.; Bhalla, K. *Cancer Res.* **2004**, 64, 2580 – 2589
14. Minucci, S.; Pelicci, P. G. *Nature Rev. Cancer* **2006**, 6, 38 – 51
15. Shukla K. P.; Tikoo K. B. *CRIPS*, **2004**, 5, 9-17
16. Marks P. A.; Xu W.-S. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2009**, 107, 600-608
17. Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P. *Nature* **1999**, 401, 188 – 193.

- 
18. Grozinger C. M.; Schreiber S. L. *Chemistry & Biology*, **2002**, *9*, 3-16
  19. Miller T.; Bitter D. J.; Belvedere S. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2003**, *46*, 5097-5116
  20. Milin R. A.; Sparreboom A.; Venitz J.; Figg W. D. *Molecular Pharmacology*, **2005**, *68*, 917-932
  21. Y. Nakao, S. Yoshida, S. Matsunaga, N. Shindoh, Y. Terada, K. Nagai, J. K. Yamashita, A. Ganesan, R. W. M. van Soest, N. Fusetani, *Angew. Chem.* **2006**, *118*
  22. Furumay R.; Komatsu Y.; Nishini N.; Khochbin S.; Yoshida M. *P.N.A.S.*, **2001**, *98*, 87-92
  23. Izzo, I.; Maulucci, N.; Bifulco, G.; De Riccardis, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7557 – 7560
  24. Wen S.; Carey K. L.; Nakao Y.; Fusetani N.; Packham G.; Ganesan A. *Organic Letters*, **2007**, *6*, 1105-1108
  25. Vannini, A.; Volpari, C.; Filocamo, G.; Casavola, E. C.; Brunetti, M.; Renzoni, D.; Chakravarty, P.; Paolini, C.; De Francesco, R.; Gallinari, P.; Steinkühler, C.; Di Marco, S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15064 – 15069.
  26. Grüenewald, J. Marahiel, M. A. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 121–146
  27. Itazaki, H.; Nagashima, K.; Sugita, K.; Yoshida, H.; Kawamura, Y.; Yasuda, Y.; Matsumoto, K.; Ishii, K.; Uotani, N.; Nakai, H.; Terui, A.; Yoshimatsu, S.; Ikenishi, Y.; Nakagawa, Y. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1524 – 1532.
  28. Singh, S. B.; Zink, D. L.; Polishook, J. D.; Dombrowski, A. W.; Darkin-Rattray, S. J.; Schmatz, D. M.; Goetz, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8077 – 8080
  29. Mori, H.; Urano, Y.; Abe, F.; Furukawa, S.; Tsurumi, Y.; Sakamoto, K.; Hashimoto, M.; Takase, S.; Hino, M.; Fujii, T. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 72 – 79
  30. Mori, H.; Fumie, A.; Seiji, Y.; Shigehiro, T.; Motohiro, H. PCT Application WO 00/08048, **2000**
  31. Closse, A.; Huguenin, R. *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 533 – 545
  32. Pringle, R. B. *Plant Physiol.* **1970**, *46*, 45 – 49
  33. Umehara, K.; Nakahara, K.; Kiyoto, S.; Iwami, M.; Okamoto, M.; Tanaka, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 478 – 483
  34. Hirota, A.; Suzuki, A.; Suzuki, H.; Tamura, S. *Agric. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 643 – 647
  35. Shemyakin, M. M.; Ovchinnikov, Yu. A.; Ivanov, V. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1969**, *8*, 492 – 499
  36. Prelog, V.; Gerlach, H. *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 2288 – 2294
  37. Goodman, M.; Chorev, M. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 1 – 7
  38. Mancuso, A. J.; Huang, S. L.; Swern, D. *J. Org. Chem.* **1978**, *12*, 2480

- 
39. H. C. Brown, K.S. Bhat, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5919-5923
40. Procter, G.; *Sintesi Asimmetrica*, EdiSES, Napoli, **1996**
41. A. B. Benowitz, S. Fidanze, P. L. C. Small, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5128-5129
42. D. R. Williams, K. Shamim, J. P. Reddy, G. S. Amato, S. M. Shaw, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3361-3364
43. M. Zhao, J. Li, E. Mano, Z. Song, D. M. Tschaen, E. J. J. Grabowski, P. J. Reider, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2564-2566
44. S. Chen, J. Xu, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6711-6714
45. Wang, D-F.; Wiest, O.; Helquist, P.; Lan-Hargest, H-Y.; Wiech, N. L. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3409 – 3417
46. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comp. Chem.* **1998**, *19*, 1639 – 1662
47. Wang, D-F.; Helquist, P.; Wiech, N. L.; Wiest, O. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6936-6947
48. Juvvadi, P.; Vunnam, S.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8989 – 8997
49. Vunnam, S.; Juvvadi, P.; Rotondi, K. S.; Merrifield, R. B. *J. Pept. Res.* **1998**, *51*, 38 – 44;
50. Shemyakin, M. M.; Ovchinnikov, Y. A.; Ivanov, V. T.; Evstratov, A. V. *Nature* **1967**, *213*, 412 – 413
51. Bednarek, M. A.; Silva, M. V.; Arison, B.; MacNeil, T.; Kalyani, R. N.; Huang, R.-R. C.; Weinberg, D. H. *Peptides* **1999**, *20*, 401
52. Guichard, G.; Benkirane, N.; Zeder-Lutz, G.; Van Regenmortel, M. H. V.; Briand, J.-P.; Muller, S.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9765 – 9769
53. Maulucci N.; Chini M.G.; Di Micco S.; Izzo I.; Cafaro E.; Russo A.; Gallinari P.; Paolini C.; Nardi M.C.; Casapullo A.; Riccio R.; Bifulco G.; De Riccardis F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,
54. Moradei O.; Maroun C.R.; Pasquin I.; Vaisburg A. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *5*, 539-560
55. Bolden J.; Peart M. J.; Johnstone R.W. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2006**, *5*, 679-784
56. Bouzide A.; Sauvè G. *Tetrahedron Letters*, **1997**, *38*, 5945-5948
57. M. P. Glenn, M. J. Kelso, J. T. A. Tyndall, D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 640-641
58. J. W. Davies, *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 471-501
59. Han S.-Y.; Kim Y.-A. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2447-2467
60. Mc Murry J. *Chimica Organica*, Zanichelli, **1995**
61. Rovero P.; Kates S.; Albericio F. *Solid-Phase: A Practical Guide*, Marcel Dekker Inc., **2000**

62. Cabrele C.; Langer M.; Beck-Sickinger G. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 4353-4361
63. Berthelot T.; Gonçalves M.; Lain G.; Estieu-Gionnet K.; Dèlèris G. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 1124-1130
64. Gisin B.F.; Merrifield R.B. *J. Am. Chem. Society*, **1972**, *94*, 3102-3106
65. Rovero P.; Viganò S.; Pegoraro L.; Quartara L. *Letters in Peptide Science*, **1995**, *2*, 319-323
66. Dangles O.; Guibè F.; Balavoine G. *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 4984-4993
67. Rigby J. H.; Moore T. L.; Rege S. *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 2400-2402
68. Yan L. Z.; Edwards P.; Flora D.; Mayer J. P. *Tetrahedron Letters*, **2004**, *45*, 923-925
69. Papavassilopoulou E.; Christofis P.; Terzoglou D.; Moutevelis-Minakakis P. *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 8323-8325
70. P. Li, P.P. Roller, J. Xu, *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 411-440
71. Webb II R. R.; Venuti M.C.; Eigenbrot C.; *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 4706-4713
72. Marshall J.A.; Grote J.; Audia J.E.; *J. Am. Chem. Society*, **1987**, *109*, 1186-1194
73. Kalivretenos A.G.; Nakanishi K. *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 6596-6608
74. K. Uwai K.; Ohashi Y.; Takaya T.; Ohta T.; Tadano K.; Kisara K.; Shibusawa R.; Sakakibara Y.; Oshima J.; *Med. Chem.* **2000**, *43*, 4508-4515
75. Terracciano S.; Di Micco S.; Bifulco G.; Gallinari P.; Riccio R.; Bruno I. *Bioorg. & Med. Chem.*, **2010**, *18*, 3252-3260
76. Di Micco S.; Terracciano S.; Bruno I.; Rodriguez M.; Riccio R.; Taddei M.; Bifulco G. *Bioorg. & Med. Chem.*, **2008**, *16*, 8635-8642