



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZE FARMACEUTICHE"

CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

SINTESI E ATTIVITA' BIOLOGICA DI
LIGANDI DEL RECETTORE OPIOIDE DOP

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

Dottoranda

Dott. Lazzari Ilaria

Tutore

Prof. Tomatis Roberto

Anni 2006/2008

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 3
I recettori oppioidi: struttura e funzione.	pag. 3
Ligandi endogeni dei recettori oppioidi.	pag. 4
Ligandi peptidici e non peptidici ad attività DOP agonista ed antagonista.	pag. 6
Interesse terapeutico di composti che interagiscono con i recettori MOP e DOP.	pag. 9
SAR di peptidi oppioidi contenenti il “ <i>Message Domain</i> ” Dmt-Tic ed aventi attività DOP antagonista/MOP agonista o DOP agonista.	pag. 11
SCOPO DELLA TESI	pag. 18
RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 24
Sintesi dell’amminoacido L-Dmt.	pag. 24
Sintesi dei composti olefinici.	pag. 28
Wittig e Wittig-Corey.	pag. 30
Cross Metatesi delle olefine.	pag. 36
Olefinazione di Julia.	pag. 38
Sintesi dei composti anilidici <i>orto</i> -sostituiti.	pag. 46
Risultati farmacologici dei composti olefinici.	pag. 51
Risultati farmacologici dei derivati anilidici <i>orto</i> -sostituiti.	pag. 60
CONCLUSIONI	pag. 65
PARTE SPERIMENTALE	pag. 70
Caratterizzazione dei composti di cui non e’ descritta la procedura sintetica.	pag. 132
BIBLIOGRAFIA	pag. 178

INTRODUZIONE

I recettori oppioidi: struttura e funzione.

I recettori oppioidi sono recettori metabotropici strutturalmente correlabili alla rodopsina, caratterizzati da 7 domini transmembrana (TM) i cui loops intracellulari sono accoppiati a proteine appartenenti alla famiglia delle G-protein. Esistono quattro differenti tipologie di recettori oppioidi: μ , δ , κ e ORL-1, recentemente denominati MOP, DOP, KOP e NOP. I recettori oppioidi umani sono stati clonati agli inizi degli anni novanta ed estensivamente caratterizzati¹. La loro sequenza amminoacidica presenta un 30% di omologia con gli altri recettori metabotropici GPCRs (adrenergici, muscarinici, ecc.), mentre la comparazione tra MOP, DOP e KOP rivela un'omologia di sequenza pari al 65-70% a livello dei domini TM, dei loops intracellulari e della piccola porzione C-terminale vicino al settimo dominio TM. La minore omologia si riscontra invece nel secondo e terzo loop extracellulare e nelle porzioni N- e C-terminali, rispettivamente extra- ed intracellulare.

Studiando l'espressione di mRNAs che codificano per i recettori oppioidi è stato possibile individuare la localizzazione dei vari recettori. Essi sono espressi a livello del sistema nervoso centrale (SNC) nelle regioni del mesencefalo, telencefalo e diencefalo e nel midollo spinale. I recettori MOP e KOP sono situati anche nella parete del tratto gastrointestinale, in misura maggiore nello stomaco e nel tratto prossimale del colon. Il recettore DOP è localizzato anche nei neuroni e nei gangli mienterici e sottomucosi.

La struttura molecolare dei recettori oppioidi è costituita da sette domini TM le cui eliche terminano con dei loops intracellulari associati a proteine G_i/G_o , eterotrimeri costituiti dalle tre diverse subunità G_α , G_β e G_γ . Quando il ligando agonista si lega al proprio sito evoca una modificazione conformazionale del recettore e la subunità G_α , che prima legava GDP, passa allo stato attivato come G_α -GTP dissociandosi dal dimero $G_{\beta\gamma}$.

Il legame tra GTP e $G_{\alpha i}$ provoca l'inibizione dell'adenilato ciclasi con una conseguente diminuzione dei livelli di cAMP (II messaggero); ciò produce nella cellula una riduzione della corrente voltaggio dipendente, che raggiunge valori negativi, incrementando la soglia di eccitabilità neuronale. La riduzione di cAMP provoca inoltre

¹ Masagatsu Eguchi; *Medicinal Research Reviews* **2004**; 24 (2): 182-212.

una ipofunzionalità della PKA (protein-chinasi AMP ciclico dipendente) con una depressione del rilascio del neurotrasmettitore (Figura 1).

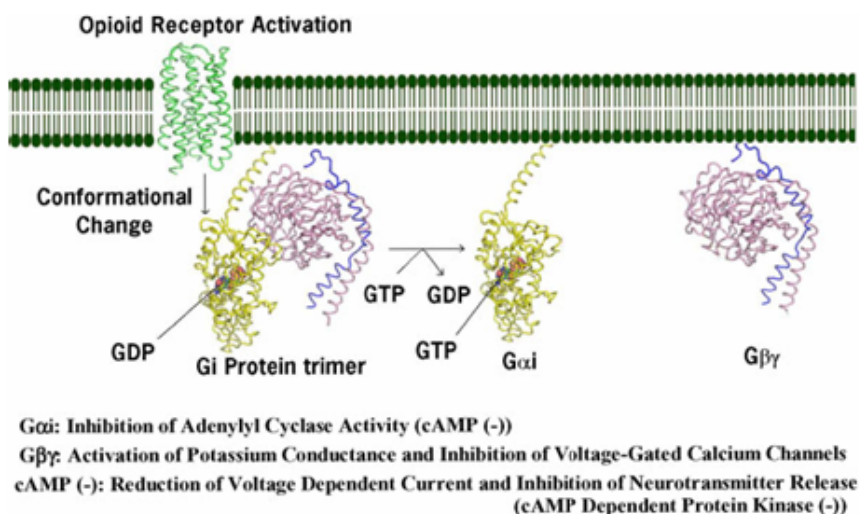


Figura 1

L'iperpolarizzazione cellulare è dovuta anche all'azione delle subunità $G_{\beta\gamma}$. Sembra infatti che queste siano alla base del meccanismo che porta alla modulazione delle proteine canale del Ca^{2+} e del K^+ . Il legame del recettore con l'agonista media l'apertura dei canali potassio inducendo una iperpolarizzazione delle membrane e l'inibizione della conduttanza al calcio con conseguente riduzione del rilascio di neurotrasmettitore a livello sinaptico².

Questo stato recettoriale è di solito reversibile: una volta esplicita l'azione biologica G_{α} -GTP viene idrolizzato a G_{α} -GDP e si riassocia alle altre subunità riformando il trimero iniziale.

Ligandi Endogeni dei recettori oppioidi.

I ligandi endogeni dei recettori oppioidi, isolati dal cervello di topo nel 1975³, sono molecole di natura peptidica che presentano un'elevata omologia nella sequenza primaria. Essi sono generati dai precursori proteici Proencefalina, Prodinorfina e Proopiomelancortina tramite l'azione di specifiche proteasi che operano una proteolisi riconoscendo sul peptide sequenze basiche specifiche.

² Svoboda K.R. *et al*; *J. Neurosci* **1998**; 18: 7084-7098.

³ Huges J. *et al*; *Nature* **1975**; 258: 577-580.

Di seguito si riportano le sequenze amminoacidiche dei ligandi endogeni più importanti:

β-Endorfina: H-**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu-OH

Met-Encefalina: H-**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Met-OH

Leu-Encefalina: H-**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Leu-OH

Dinorfina A: H-**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH

Nocicettina N/OFQ: H-**Phe-Gly-Gly-Phe**-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln-OH

In rosso sono evidenziate le sequenze amminoacidiche comuni definite *Message Domain*, situate nella porzione N-terminale del peptide e coinvolte nell'attivazione del recettore. La porzione C-terminale invece è variabile ed è definita *Address Domain*. Essa contiene le informazioni strutturali in grado di conferire al peptide la selettività per i vari recettori. In particolare, la β-Endorfina possiede un'elevata affinità per i recettori MOP e DOP, le Encefaline per i DOP e in misura minore per i MOP, la Dinorfina per i recettori KOP mentre la Nocicettina, nonostante presenti un'elevata omologia di sequenza con la Dinorfina A, non mostra considerevole affinità per i recettori oppioidi classici ma per il recettore NOP.

Nel 1997 sono stati inoltre scoperti due nuovi peptidi molto selettivi nei confronti del recettore MOP: Endomorfina I (H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) ed Endomorfina II (H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂), il cui precursore non è stato ancora identificato.

Studi farmacologici eseguiti con tali ligandi hanno permesso di ipotizzare la presenza di ulteriori sottotipi recettoriali, in particolare per il K (KOP 1, KOP 2, KOP 3), per il δ (DOP 1, DOP 2) e per il μ (MOP 1, MOP 2, MOP 3)⁴. Tuttavia, attualmente sono stati

⁴ Traynor J., Elliot J.; *Trends. Pharmacol. Sci.* **1993**; 14: 84-85.

clonati solamente tre differenti cDNAs corrispondenti alle sequenze proteiche dei recettori MOP, DOP e KOP e non ai loro sottotipi.

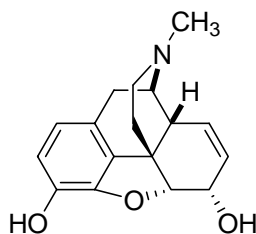
Sulla base di tali osservazioni, così come per altri sistemi recettoriali, è stata proposta la teoria della omo- ed eterodimerizzazione⁵, secondo la quale l'associazione MOP-DOP rappresenta un sottotipo del recettore DOP e l'interazione KOP-DOP costituisce invece uno dei sottotipi del recettore KOP.

A supporto di questa teoria è stato inoltre dimostrato che ligandi dimerici (come ad esempio analoghi dimerici della morfina o dell'encefalina) hanno un'affinità maggiore per i recettori DOP e MOP rispetto ai monomeri e mostrano anche una potenza maggiore in saggi *in vitro* quali mVD (mouse Vas Deferens) e gpI (guinea pig Ileum)⁶, due preparati farmacologici di elezione per la valutazione biologica di molecole oppioidi.

Ligandi peptidici e non peptidici ad attività DOP agonista ed antagonista.

Oltre ai ligandi endogeni precedentemente riportati, nel corso degli anni sono state sviluppate numerose molecole in grado di legare i recettori oppioidi. Tali molecole sono state inizialmente ottenute modificando i ligandi naturali disponibili per poi arrivare a nuovi ligandi per sintesi chimica totale.

Il capostipite dei ligandi oppioidi naturali è la morfina, un alcaloide isolato dall'oppio e tuttora utilizzato come analgesico nel trattamento del dolore importante (Figura 2).



Morfina

Figura 2

Oltre a presentare numerosi effetti collaterali, la morfina è un ligando non selettivo che attiva di preferenza i recettori MOP ma che è in grado di interagire con buona affinità anche con i recettori DOP e KOP.

⁵ Berque-Bestel *et al.*; *Curr. Drug Discov. Technol.* **2008**; 5(4): 312-318.

⁶ Shimohigashi Y. *et al.*; *Nature* 297; **1982**; 333-335.

La morfina è stata la prima molecola naturale ad essere utilizzata quale prototipo per lo sviluppo di ligandi in grado di interagire con i recettori oppioidi. Data la sua complessità chimica e strutturale sono stati condotti numerosi studi nel tentativo di identificare il minimo “messaggio molecolare” in grado di legare i recettori oppioidi.

Sono state sintetizzate numerose serie di prodotti derivanti da semplificazioni molecolari dello scheletro della morfina (Figura 3).

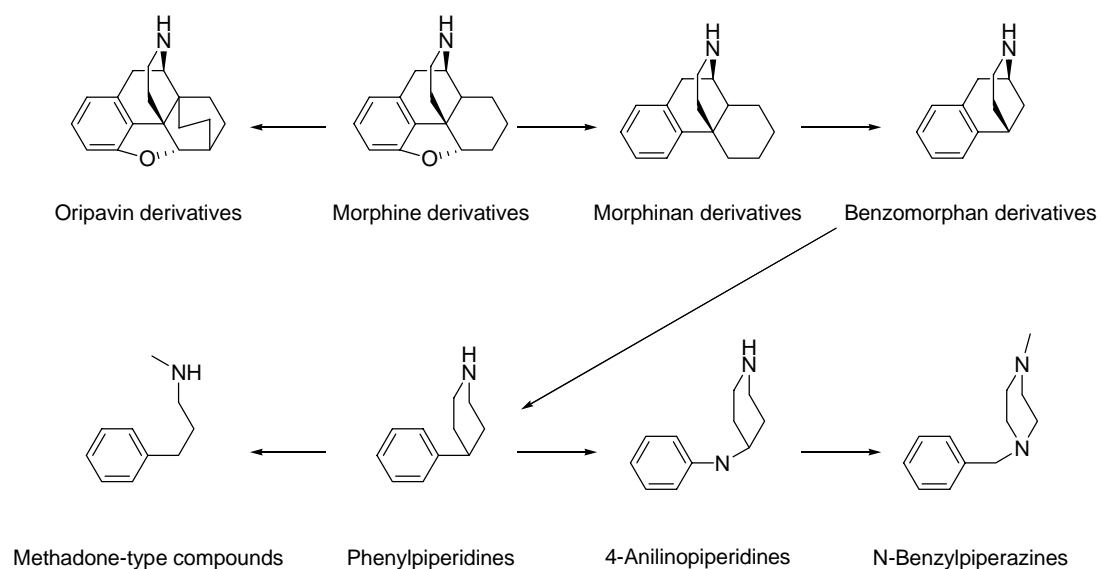
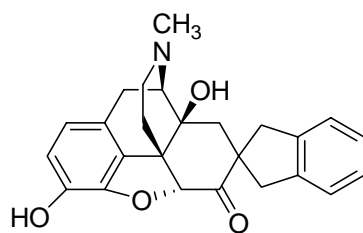


Figura 3

Le molecole prodotte con questa strategia sintetica presentano generalmente una maggiore attività nei confronti del recettore MOP rispetto al DOP.

Molecole in grado di legare il recettore DOP sono invece state ottenute per “complicazione molecolare” dello scheletro della morfina. Un esempio di tali molecole è rappresentato dal composto SIOM (7-spiroindanil-ossimorfone), costruito modulando un gruppo spiroindanico in posizione ortogonale all’anello C del morfinano (Figura 4). Gli studi *in vitro* condotti su mVD, preparato farmacologico utilizzato per la valutazione di composti ad attività DOP, indicano che SIOM si comporta da agonista DOP con elevata selettività.



7-Spiroindanil-ossimorfone (SIOM)

Figura 4

Tale selettività sembra proprio essere impartita dalla disposizione spaziale del nucleo indanico, ortogonale al morfinano⁷.

Altre molecole ad attività DOP agonista selettiva sono TAN-67⁸, SNC-80 ed SNC-80 A⁹, BW373U86¹⁰ ed SB219825¹¹ (Figura 5).

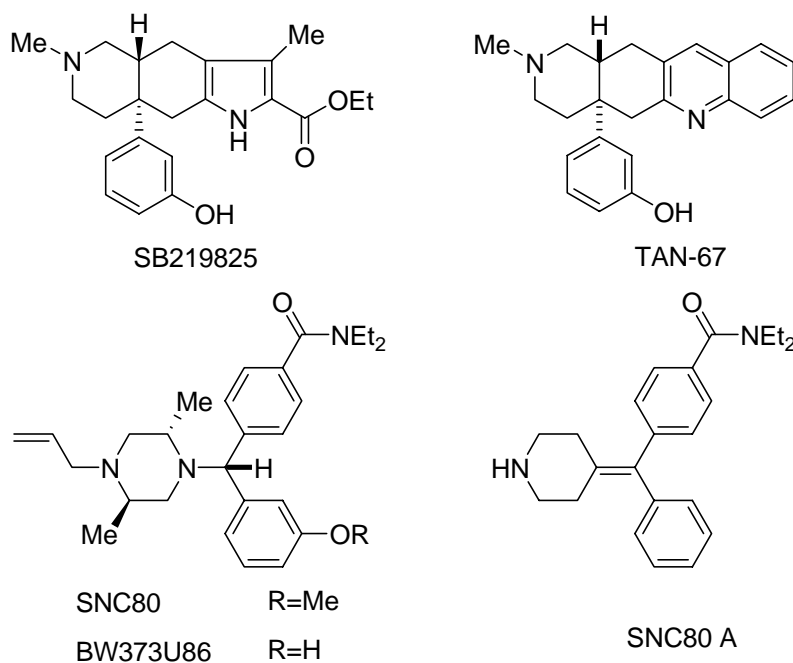


Figura 5

Per quanto riguarda i composti ad attività DOP antagonista il riferimento è rappresentato dal Naltrindolo (NTI) ed analoghi (Figura 6), caratterizzati da un nucleo indolico fuso con l'anello C del morfinano e dalla sostituzione dell'azoto piperidinico

⁷ Portoghese P.S. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1993**; 36: 2572-2574.

⁸ Suzuki T. *et al.*; *Life Sci.* **1995**; 57: 155-168.

⁹ Calderon SN. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1994**; 37, 2125-2128

¹⁰ Chang K.J. *et al.*; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**; 267: 852-857.

¹¹ Dondio R. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1997**; 40: 3192-3198.

con un gruppo stericamente ingombrante quale il ciclopropilmetile (sostituzione ricorrente anche per quanto riguarda gli antagonisti MOP).

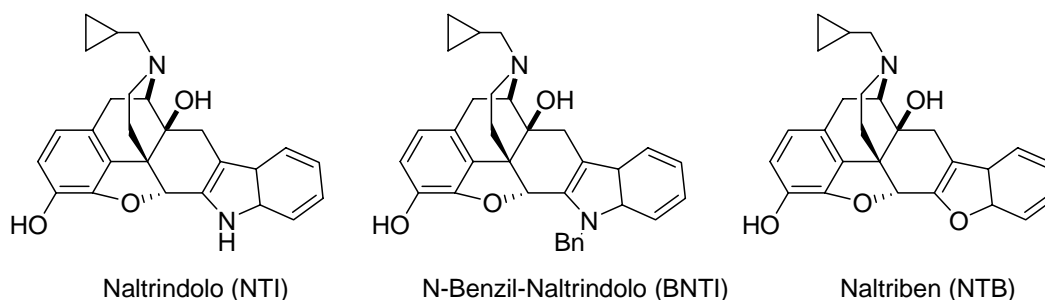
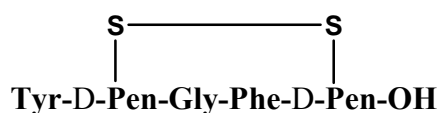


Figura 6

Lo studio struttura-attività (SAR) dell'Encefalina (isolata a metà degli anni settanta), ligando peptidico preferenziale DOP, ha portato al composto DPDPE ([D-Pen², D-Pen⁵] Enk), che si comporta da agonista DOP potente e selettivo¹² (Figura 7).



DPDPE

Figura 7

La presenza di un amminoacido di configurazione (*D*) in posizione due rallenta la degradazione enzimatica operata dalle aminopeptidasi e la presenza del ciclo contribuisce ad aumentare la stabilità metabolica di questa molecola.

Interesse terapeutico di composti che interagiscono con i recettori MOP e DOP.

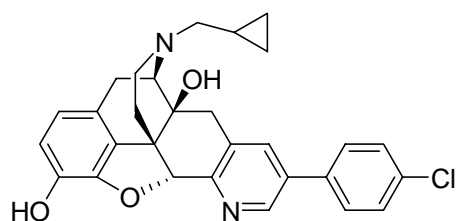
Gli analgesici oppioidi, il cui prototipo per eccellenza è la morfina, sono una classe di farmaci impiegati in terapia per la cura del dolore "importante" derivante da stati patologici quali le neoplasie o a seguito di interventi chirurgici. È noto che questi farmaci presentano una serie di effetti collaterali rilevanti quali depressione del centro del respiro e del centro cardio-circolatorio, stipsi, tendenza all'abuso e riduzione degli

¹² Amiche M. *et al*; *Mol. Pharmacol.* **1989**; 35: 774-779.

effetti analgesici per trattamento protratto (tolleranza). Quest'ultimo fenomeno limita l'efficacia di questa classe di molecole per il trattamento cronico del dolore.

Le basi biologiche della tolleranza agli oppioidi non sono completamente conosciute (forse sono implicati il disaccoppiamento della proteina G e l'internalizzazione del recettore stesso)¹³, ma studi recenti attribuiscono un ruolo importante nello sviluppo di questo fenomeno all'attivazione del recettore DOP. Infatti, il blocco del segnale endogeno Encefaline-DOP prodotto con diversi approcci (antagonisti recettoriali, oligonucleotidi antisenso, knock out dei geni che codificano per il recettore o per il prepropeptide) determina un significativo rallentamento nell'insorgere della tolleranza all'azione analgesica della morfina¹⁴. Questi dati sembrano suggerire un'associazione tra DOP antagonisti e MOP agonisti per una migliore terapia antidolorifica e quindi lo sviluppo di nuovi farmaci in grado di esercitare contemporaneamente l'attivazione dei recettori MOP e la sola occupazione dei recettori DOP (MOP agonisti / DOP antagonisti). Questo profilo farmacologico dovrebbe essere l'obiettivo di una nuova classe di farmaci analgesici per la terapia del dolore cronico.

Le prime osservazioni che il Naltrindolo, un DOP antagonista non peptidico, rallenta lo sviluppo della tolleranza e della dipendenza da morfina sono state riportate da Abdelhamid et al¹⁵. Alcuni composti non peptidici dotati di attività MOP agonista / DOP antagonista sono infatti analoghi del Naloxone/Naltrexone¹⁶, come per esempio SoRI 9409 (Figura 8).



SoRI 9409

Figura 8

Successivamente queste osservazioni sono state confermate con il tetrapeptide DOP antagonista, Tyr-Tic-Phe-Phe (TIPP) e con alcuni suoi analoghi in cui la Tyr in posizione N-terminale è stata sostituita dalla Dmt (2',6'-dimetil-Tyr) e la funzione

¹³ Williams J.T. et al.; *Physiol. Rev.* **2001**; 81: 299-343.

¹⁴ Kieffer & Gaveriaux-Ruff; *Prog. Neurobiol.* **2002**; 66: 285-306.

¹⁵ Abdelhamid et al.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**; 258: 299-303.

¹⁶ Welles J.L. et al.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**; 297: 597-605.

carbossilica al C-terminale è stata amidata (H-Dmt-Tic-Phe-Phe-NH₂)¹⁷. Il tetrapeptide così modificato è un DOP antagonista / MOP agonista, che riassume nella stessa molecola un profilo di attività in grado di supportare le osservazioni farmacologiche fatte singolarmente con DOP antagonisti e MOP agonisti.

Recentemente è stato inoltre proposto che agonisti selettivi del recettore DOP potrebbero essere impiegati quali potenziali farmaci ad azione ansiolitica e antidepressiva con meccanismo d'azione completamente diverso dalle molecole attualmente impiegate per la terapia di tali patologie¹⁸. Questo profilo farmacologico potrebbe essere l'obiettivo di una nuova classe di farmaci per il trattamento della depressione.

SAR di peptidi oppioidi contenenti il “*Message Domain*” Dmt-Tic ed aventi attività DOP antagonista / MOP agonista o DOP agonista.

La sostituzione dell'amminoacido in posizione 2 di una sequenza peptidica ad attività oppioide (encefaline, dermorphine, deltorfine, dinorfine) con il Tic (acido 1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico) determina una preferenza di affinità recettoriale δ e una generale capacità di sola occupazione recettoriale (attività antagonista)¹⁹.

Successivamente è stato dimostrato che il messaggio DOP antagonista è contenuto nella porzione Tyr-Tic-OH²⁰. Infatti, l'introduzione del dipeptide Tyr-Tic nel *Message Domain* di ligandi peptidici a diversa selettività ha portato, in tutti i casi studiati, ad analoghi DOP antagonisti, evidenziando l'estrema potenza e selettività DOP di tale dipeptide²¹.

La successiva sostituzione della Tyr con la Dmt, oltre ad incrementare l'attività di tipo DOP antagonista, determina un aumento sia nell'affinità che nella selettività DOP.

Nei nostri laboratori di ricerca è stato studiato in particolare il dipeptide Dmt-Tic (Figura 9), antagonista selettivo e potente del recettore DOP (mVD pA₂ = 8.32).

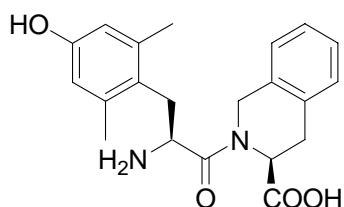
¹⁷ Shiller P.W. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1999**; 42 (18): 3520-3526.

¹⁸ Vergura R. *et al.*; *Peptides* **2008**; 29: 93-103.

¹⁹ Tancredi T. *et al.*; *Eur. J. Biochem.* **1994**; 224: 241-247.

²⁰ Salvadori S. *et al.*; *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1994**; 198: 933-939.

²¹ Guerrini R. *et al.*; *Bioorg. & Med. Chem.* **1998**; 6: 57-62.

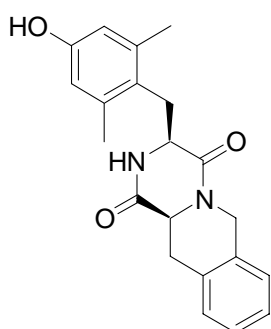


H-Dmt-Tic-OH

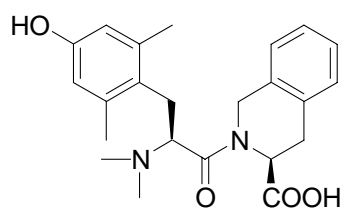
Figura 9

L'amminoacido L-Dmt è un requisito importante del dipeptide per l'interazione con il recettore oppioide DOP e per una potente attività farmacologica.

La funzione amminica del dipeptide è stata presa in considerazione per evitare la formazione del derivato dichetopiperazinico (Figura 10): la N-alcilazione con radicali metilici impedisce infatti la formazione del derivato ciclico inattivo preservando l'attività biologica²². Il composto dialchilato all'N-terminale è un DOP antagonista selettivo ed è circa dieci volte più potente del Dmt-Tic.



Dichetopiperazina



N(CH₃)₂-Dmt-Tic-OH (UFP 501)
 mVD pA₂=9.4
 Miglior DOP antagonista

Figura 10

E' stata poi studiata la funzionalizzazione al C-terminale del dipeptide con diversi residui amminoacidici. Generalmente da questo studio non sono state osservate sostanziali variazioni di selettività recettoriale e di attività farmacologica^{23,24} ad eccezione del derivato Dmt-Tic-Glu-NH₂ che si comporta da debole agonista (Figura 11).

²² Salvadori S. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1997**; 40: 3100-3108.

²³ Salvadori S. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1999**; 42: 5010-5019.

²⁴ Balboni G. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2004**; 47: 4066-4071.

Table 1. Receptor Binding and Functional Bioactivity of H-Dmt-Tic-Xaa Peptides

compd	Xaa-R'	receptor binding ^a			MVD		GPI		ref
		$K_1(\delta)$ (nM)	$K_1(\mu)$ (nM)	μ/δ	pA_2^b	IC_{50}^c	pA_2^b	IC_{50}^c	
					deltorphin	(nM)	dermorphin	(μ M)	
	Ala-OH	0.29 ± 0.03 (6)	5820 ± 675 (4)	20400	8.40		>10	11	
	Ala-NH ₂	0.24 ± 0.02 (5)	47.1 ± 3.4 (4)	195	8.00		4.74 ± 0.9	11	
	D-Ala-NH ₂	0.30 ± 0.02 (4)	47.5 ± 4.6 (3)	158	7.60		>10	20	
1	Asp-NH ₂	0.29 ± 0.02 (3)	2565 ± 290 (3)	8875	8.12		>10	20	
1'	D-Asp-NH ₂	0.44 ± 0.02 (3)	367 ± 59 (5)	834	8.14		>10		
2	Asn-OH	1.10 ± 0.26 (5)	80.3 ± 8.2 (4)	73	8.23		>10	20	
2'	D-Asn-OH	0.74 ± 0.1 (4)	3996 ± 318 (4)	5400	8.23		>10		
3	Glu-NH ₂	0.06 ± 0.008 (4)	1357 ± 268 (4)	22617		2.5 ± 0.8	>10		
3'	D-Glu-NH ₂	0.053 ± 0.003 (3)	920 ± 159 (5)	17358	8.64		5.1		
4	Gln-OH	0.325 ± 0.052 (4)	465 ± 103 (5)	1431	8.98		>10		
4'	D-Gln-OH	0.45 ± 0.13 (5)	562 ± 80 (5)	1252	8.91		>10		
5	Lys(Ac)-OH	0.047 ± 0.013(4)	1051 ± 80 (5)	22361	10.07		>10		
5'	D-Lys(Ac)-OH	0.083 ± 0.01 (4)	86.8 ± 4 (3)	1046	9.29		1.5 ± 0.1		
6	Lys-NH ₂	0.71 ± 0.13 (5)	17.0 ± 2.0 (4)	24	7.87		7.87 ± 0.6		
7	Arg-NH ₂	0.73 ± 0.15 (4)	15.1 ± 2.3 (6)	21	6.90		6.6 ± 0.5		
8	Gly-NH ₂	0.25 ± 0.05 (5)	140 ± 14 (5)	559	7.65		>10		
9	Ser-OH	0.27 ± 0.06 (4)	2830 ± 130 (3)	10481	8.88		>10		
10	Ser-NH ₂	0.13 ± 0.02 (5)	140 ± 7 (3)	1120	8.07		>10		
11	Trp-OH	0.034 ± 0.002 (3)	15.7 ± 7.3 (5)	462	9.57		1.5		
12	His-OH	0.12 ± 0.04 (3)	174 ± 26 (3)	1403	8.72		>10		

Figura 11

Se al C-terminale del dipeptide Dmt-Tic viene addizionato un gruppo portante una funzionalità aromatica di diversa natura chimica si ottengono derivati DOP agonisti oppure molecole in grado di agire come DOP antagonisti / MOP agonisti di elevata potenza²⁵. Il differente comportamento biologico può essere messo in relazione con la diversa distanza tra il dipeptide Dmt-Tic e l'ulteriore funzione aromatica, la cui natura chimica sembra essere meno vincolante per l'attività biologica (Figura 12).

²⁵ Balboni G. *et al.*; *J.Med.Chem.* **2002**; 45: 713-720.

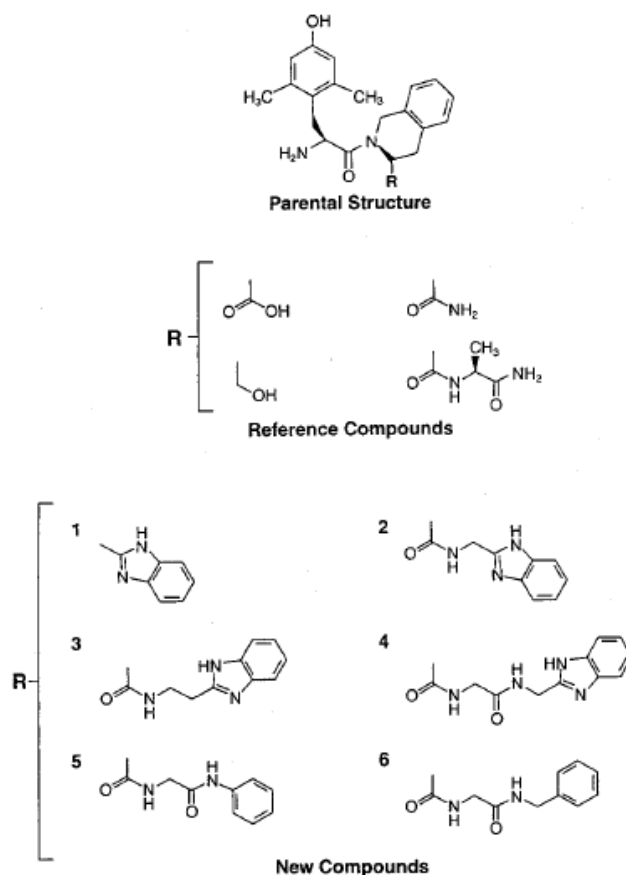


Table 1. In Vitro Opioid Activity of Dmt-Tic Analogues^a

compd	receptor affinity (nM)			functional bioactivity		
	K_i	K_{μ}	μ/δ	MVD (pEC ₅₀)	MVD (pA ₂)	GPI (pEC ₅₀)
Ref Comps						
H-Dmt-Tic-OH	0.022	3320	150 780		-8.2	<i>b</i>
H-Dmt-Tic-NH ₂	1.22	277	227		-7.2	<i>b</i>
H-Dmt-Tic-ol	0.44	151	344		-7.0	<i>b</i>
H-Dmt-Tic-Ala-NH ₂	0.22	47	195		-8.0	<i>b</i>
deltorphan C	0.21	387	1840 ^c	9.56 (0.30)		
dermorphin	82.5	0.28	0.0034 ^d			9.15 (0.10)
New Comps						
1	0.13 ± 0.04 (4)	7.22 ± 0.96 (4)	56 ^e	7.28 (0.45)	7.90 (0.30)	
2	0.035 ± 0.006 (3)	0.50 ± 0.054 (3)	14	9.90 (0.32)		7.57 (0.14)
3	0.067 ± 0.015 (4)	5.49 ± 0.93 (3)	82		8.32 (0.25)	6.97 (0.18)
4	0.058 ± 0.005 (3)	20.5 ± 2.4 (3)	353		9.00 (0.29)	6.45 (0.20)
5	0.042 ± 0.007 (3)	0.16 ± 0.003 (3)	3.6	8.52 (0.99)		8.59 (0.48)
6	0.031 ± 0.002 (3)	0.16 ± 0.018 (3)	5.3		9.25 (0.3)	8.57 (0.14)

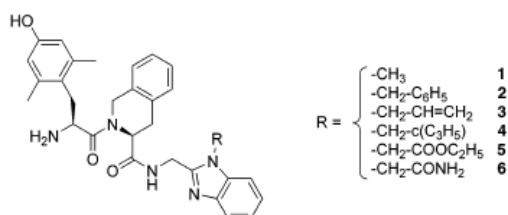
Figura 12

I composti Dmt-Tic-NH-CH₂-benzoimidazolo e Dmt-Tic-Gly-anilide (composti 2 e 5 in figura 12), pur avendo funzioni aromatiche C-terminali differenti, rappresentano molecole DOP agoniste di elevata potenza ma scarsa selettività, in quanto interagiscono anche con il recettore MOP.

Rispetto ai derivati precedenti, è sufficiente aumentare la distanza tra il dipeptide Dmt-Tic ed il nucleo aromatico al C-terminale (benzoimidazolo o fenile) per ottenere composti ad attività DOP antagonista / MOP agonista (composti 3 e 6).

Recentemente sono stati sintetizzati analoghi del composto Dmt-Tic-NH-CH₂-benzoimidazolo nei quali l'idrogeno dell'NH in posizione 1 del nucleo benzoimidazolico è stato sostituito con radicali diversi²⁶. Queste modificazioni hanno portato a molecole DOP antagoniste potenti che in alcuni casi hanno mostrato anche una discreta attività MOP agonista (Figura 13).

Table 1. Receptor Affinity and Functional Bioactivity of 1–6



compd no.	receptor affinity (nM)		functional bioactivity			
	$K_i(\delta)$	$K_i(\mu)$	MVD			GPI
			μ/δ	IC ₅₀ (nM)	pA ₂	IC ₅₀ (nM)
<i>a</i>	0.035 ± 0.006 (3)	0.50 ± 0.054 (3)	14	0.035 ± 0.003	-	40.7 ± 5
<i>b</i>	0.021 ± 0.0025 (4)	6.92 ± 0.25 (4)	330	- ^e	9.57	3193 ± 402
1	0.16 ± 0.03 (3)	0.83 ± 0.07 (5)	5	-	10.14	450 ± 51
2	0.20 ± 0.06 (4)	1.02 ± 0.19 (4)	5	-	8.52	245 ± 35
3	0.13 ± 0.02 (4)	0.44 ± 0.04 (3)	3	-	9.34	72 ± 6
4	0.36 ± 0.05 (4)	0.52 ± 0.08 (4)	1	-	9.47	64 ± 5
5	0.12 ± 0.02 (3)	1.42 ± 0.08 (3)	12	-	9.77	30 ± 4
6	0.16 ± 0.03 (4)	0.49 ± 0.02 (3)	3	-	9.26	77 ± 5
DEL ^f	0.24 ± 0.06 (6)	272 ± 50 (11)	1133	0.17 ± 0.02	-	1300 ± 150
DER ^d	178.6 ± 18 (15)	1.22 ± 0.13 (22)	0.0068	15.2 ± 2	-	1.9 ± 0.3

Figura 13

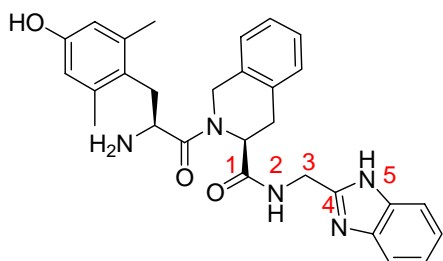
L'alchilazione dell'NH in posizione 1 del nucleo benzoimidazolico produce lo stesso effetto biologico generato con l'aumento della distanza tra il farmacoforo Dmt-Tic e l'ulteriore sistema aromatico introdotto al C-terminale, perlomeno nel modello molecolare Dmt-Tic-NH-CH₂-benzoimidazolo.

A questo punto appare evidente che l'attività DOP agonista del composto Dmt-Tic-NH-CH₂-benzoimidazolo potrebbe essere attribuita alla corretta distanza e disposizione spaziale del sistema benzoimidazolico (in grado di attivare il recettore DOP) rispetto al dipeptide Dmt-Tic (che porta il messaggio molecolare di elevata affinità e selettività DOP).

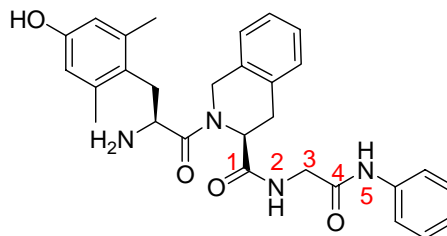
L'attivazione del recettore DOP può essere dovuta al sistema aromatico con il contributo, quale potenziale donatore di legame idrogeno, del gruppo NH di tipo anilidico. È da sottolineare, infatti, che solo i composti Dmt-Tic-NH-CH₂-

²⁶ Balboni G. *et al.*; *J.Med.Chem.* **2005**; 48: 8112-8114.

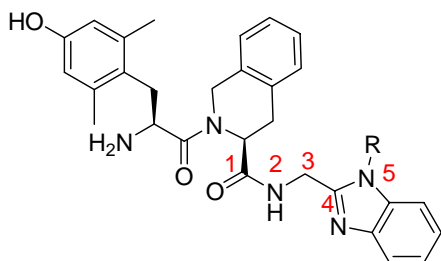
benzoimidazolo e Dmt-Tic-Gly-anilide (che rappresenta il derivato con il nucleo benzoimidazolico aperto) si comportano da agonisti, mentre il composto Dmt-Tic-Gly-benzilamide (composto 6, figura 12), il quale conserva invariata la posizione del gruppo NH (in questo caso di tipo benzilamidico), si comporta da DOP antagonista (Figura 14).



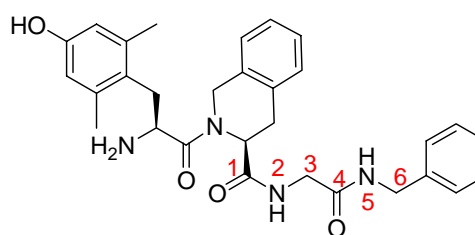
H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid (UFP 502)
 DOP/MOP agonista
 mVD pEC₅₀=9.90
 gpl pEC₅₀=7.57



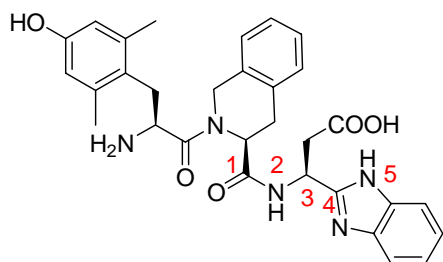
H-Dmt-Tic-Gly-anilide
 DOP/MOP agonista
 mVD pEC₅₀=8.52
 gpl pEC₅₀=8.59



H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid-R
 DOP antagonista



H-Dmt-Tic-Gly-NH-Bzl (UFP 505)
 DOP antagonista / MOP agonista
 mVD pA₂=9.25
 gpl pEC₅₀=8.57



H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)Bid (UFP 512)
 DOP agonista
 mVD pEC₅₀=11.53
 gpl pEC₅₀=5.76

Figura 14

In figura 14 sono riportate le strutture e le attività di alcuni ligandi DOP/MOP con diversa attività farmacologica. In particolare sono riportati due DOP/MOP agonisti (H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid e H-Dmt-Tic-Gly-anilide), un DOP antagonista (H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid-R), un DOP antagonista / MOP agonista (H-Dmt-Tic-Gly-NH-Bzl) e un agonista DOP con elevata selettività recettoriale (H-Dmt-Tic-Asp-Bid).

Dall'analisi di queste molecole si può osservare che per avere attività **DOP agonista** è necessaria una funzione aromatica distanziata da uno spacer di 5 atomi dal farmacoforo Dmt-Tic, inoltre l'azoto dello spacer in posizione 5 deve essere di tipo anilidico e non alchilato (è ipotizzabile che la sua funzione sia quella di formare legami idrogeno all'interno della tasca recettoriale). Lo spacer utilizzato non garantisce comunque la selettività DOP, infatti questi composti (H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid e H-Dmt-Tic-Gly-anilide) sono in grado di attivare anche il recettore MOP con un'attività 100 volte inferiore o in modo equipotente DOP/MOP. La presenza di una carica negativa in catena laterale dell'amminoacido, come nel caso del composto Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)Bid, determina un'elevata selettività per il recettore DOP ed un moderato agonismo per il recettore MOP²⁷.

Per avere attività **DOP antagonista** lo spaziatore deve essere maggiore di 5 atomi (ad es. 6 atomi nel composto H-Dmt-Tic-Gly-NH-Bzl, in cui l'azoto presente nello spacer è nella giusta posizione ma non è di tipo anilidico), oppure l'ammina in posizione 5 deve essere terziaria (es. H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid-R).

²⁷ Balboni G. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2002**; 45: 5556-5563.

SCOPO DELLA TESI

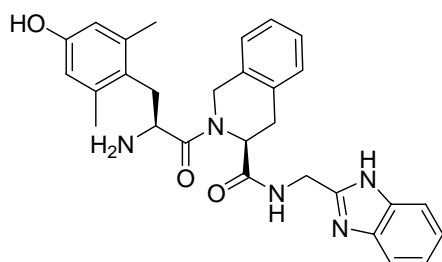
Come riportato precedentemente, il composto H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid, ad attività DOP agonista, può essere considerato il prototipo molecolare di una nuova classe di farmaci a potenziale attività antidepressiva, mentre la molecola H-Dmt-Tic-Gly-NH-Bzl, ad attività DOP antagonista / MOP agonista, rappresenta il prototipo molecolare di una nuova classe di farmaci a potenziale attività analgesica. Il composto H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid, oltre ad essere molto attivo in saggi *in vitro*, ha dimostrato un'attività antidepressivo-simile per somministrazione i.c.v. nel topo²⁸. Al contrario, questo composto non è risultato attivo per somministrazione i.p. o e.v. (dati non pubblicati). Comportamento biologico analogo ha presentato anche la molecola H-Dmt-Tic-Gly-NH-Bzl (dati non pubblicati).

Al fine di valutare in dettaglio il potenziale terapeutico dei composti H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid e H-Dmt-Tic-Gly-NH-Bzl e di identificare in un agonista DOP un nuovo farmaco ad attività antidepressiva e in un antagonista DOP / agonista MOP un nuovo potenziale farmaco analgesico, è necessario effettuare studi cronici sull'animale da esperimento. A tale scopo è indispensabile disporre di molecole che possano raggiungere il SNC dopo somministrazione periferica e che siano dotate di una sufficiente durata d'azione.

Scopo di questa tesi è stato quello di sintetizzare nuove molecole ad attività oppioide che fossero ugualmente potenti e selettive *in vitro* rispetto ai composti di riferimento e, possibilmente, meno idrofile e più resistenti al metabolismo, in modo da poter essere utilizzate per somministrazione periferica in studi cronici sull'animale.

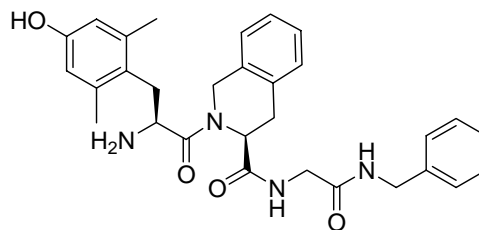
Partendo dalle molecole prototipo (figura 15), è stato mantenuto il dipeptide Dmt-Tic, messaggio molecolare essenziale per il binding del recettore DOP ed è stato considerato uno spacer di lunghezza variabile contenente una funzione olefinica portante un ulteriore anello aromatico.

²⁸ Vergura *et al.*; *Peptides* **2006**; 12 :3322-3330.



H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid (UFP 502)

DOP/MOP agonista
 mVD pEC₅₀=9.90
 gpl pEC₅₀=7.57



H-Dmt-Tic-Gly-NH-Bzl (UFP 505)

DOP antagonista / MOP agonista
 mVD pA₂=9.25
 gpl pEC₅₀=8.57

Figura 15

La presenza del farmacoforo Dmt-Tic e di un secondo sistema aromatico distanziati da uno spacer di lunghezza variabile è stata progettata per investigare la possibilità di ottenere DOP agonisti e DOP antagonisti / MOP agonisti, senza precludere la possibilità di ottenere DOP antagonisti puri.

La presenza di una funzionalità olefinica nello spacer può essere suggerita da diverse motivazioni:

1. dal punto di vista strutturale il legame olefinico mima la tautomeria enolica del legame ammidico;
2. la sostituzione del legame peptidico adiacente al Tic evita la formazione della dichetopiperaziona *in vivo*, che porta a completa inattività del composto;
3. la sostituzione del legame ammidico aumenta la stabilità metabolica del composto, che non risulta essere più substrato delle peptidasi endogene;
4. l'introduzione di un funzionalità olefinica al posto del legame peptidico diminuisce la polarità della molecola, favorendone il passaggio attraverso la barriera emato-encefalica (BEE).

La funzionalità carbossilica al C-terminale di questi nuovi composti è stata inserita in quanto intermedio nella preparazione delle ammidi e del benzoimidazolo (Bid) e può inoltre rappresentare un requisito di selettività per il recettore oppioide DOP. Il secondo farmacoforo C-terminale delle nuove molecole è stato progettato in modo da mantenere le caratteristiche chimico-fisiche dei composti precedentemente identificati (anilide, benzilammide e benzoimidazolo) oppure è stato utilizzato un semplice fenile o carbossile.

Di seguito (figura 16) sono mostrati i 20 composti sintetizzati. Essi presentano, oltre al collaudato sistema Dmt-Tic, uno spacer olefinico di lunghezza variabile ($n=0-3$) ed un secondo farmacoforo di natura fenilica, anilidica, carbossilica, benzilammidica e benzoimidazolica.

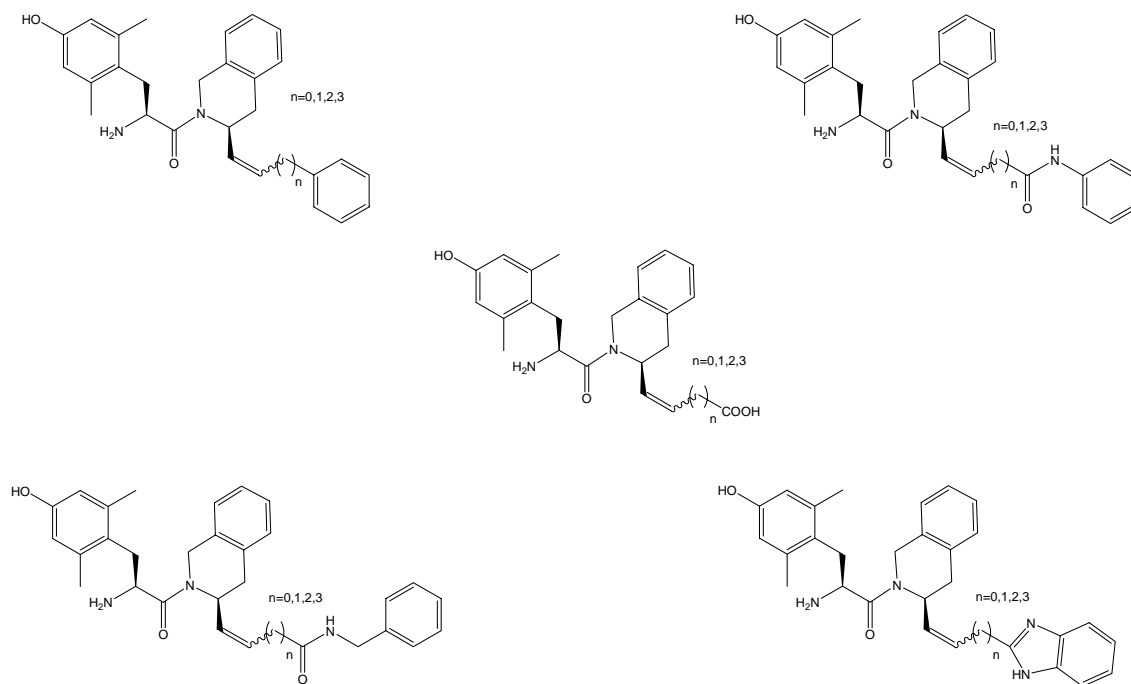


Figura 16

Di alcune di queste molecole, selezionate in base ai dati biologici preliminari, è stato ottenuto anche il corrispondente derivato ridotto a livello del doppio legame (figura 17).

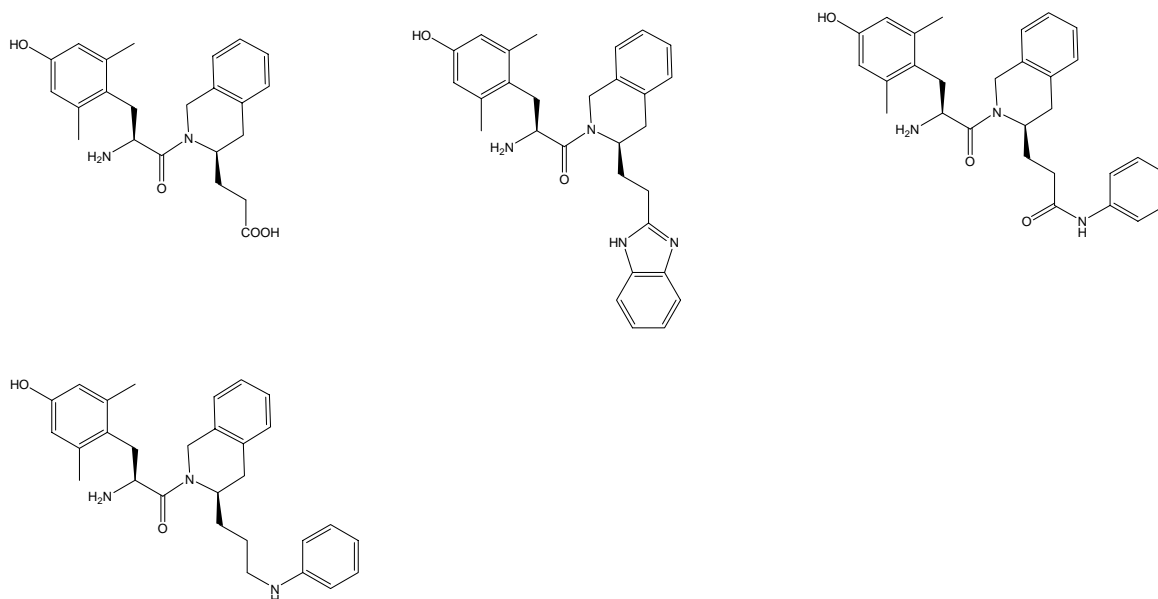


Figura 17

Inoltre, su alcune molecole prototipo sono state introdotte ulteriori modificazioni note per a) aumentare la potenza e la stabilità metabolica, come la metilazione all'N-terminale²¹, b) shiftare l'attività da agonista ad antagonista, come la metilazione all'azoto del nucleo benzoimidazolico²⁵, oppure c) incrementare la selettività DOP, come l'introduzione di una funzionalità carbossilica²⁹.

Come secondo obiettivo della mia tesi di dottorato, al fine di indagare la possibilità di ottenere nuove molecole DOP agoniste, sono stati sintetizzati composti strutturalmente correlabili al Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid nei quali il nucleo benzoimidazolico è stato aperto a dare anilidi diversamente *orto*-sostituite. In posizione *orto* del nucleo anilidico sono stati introdotti gruppi con caratteristiche chimico-fisiche diverse in termini di basicità/acidità, capacità di formare legami idrogeno, idrofilia/lipofilia ed effetto elettron attrattore/donatore nei confronti dell'anello aromatico. I derivati sintetizzati sono riportati in figura 18.

²¹ Salvadori S. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1997**; 40: 3100-3108.

²⁵ Balboni G. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2005**; 48: 8112-8114.

²⁹ Schwyzer R. *et al.*; *Biochemistry* **1986**; 25: 6335-6341.

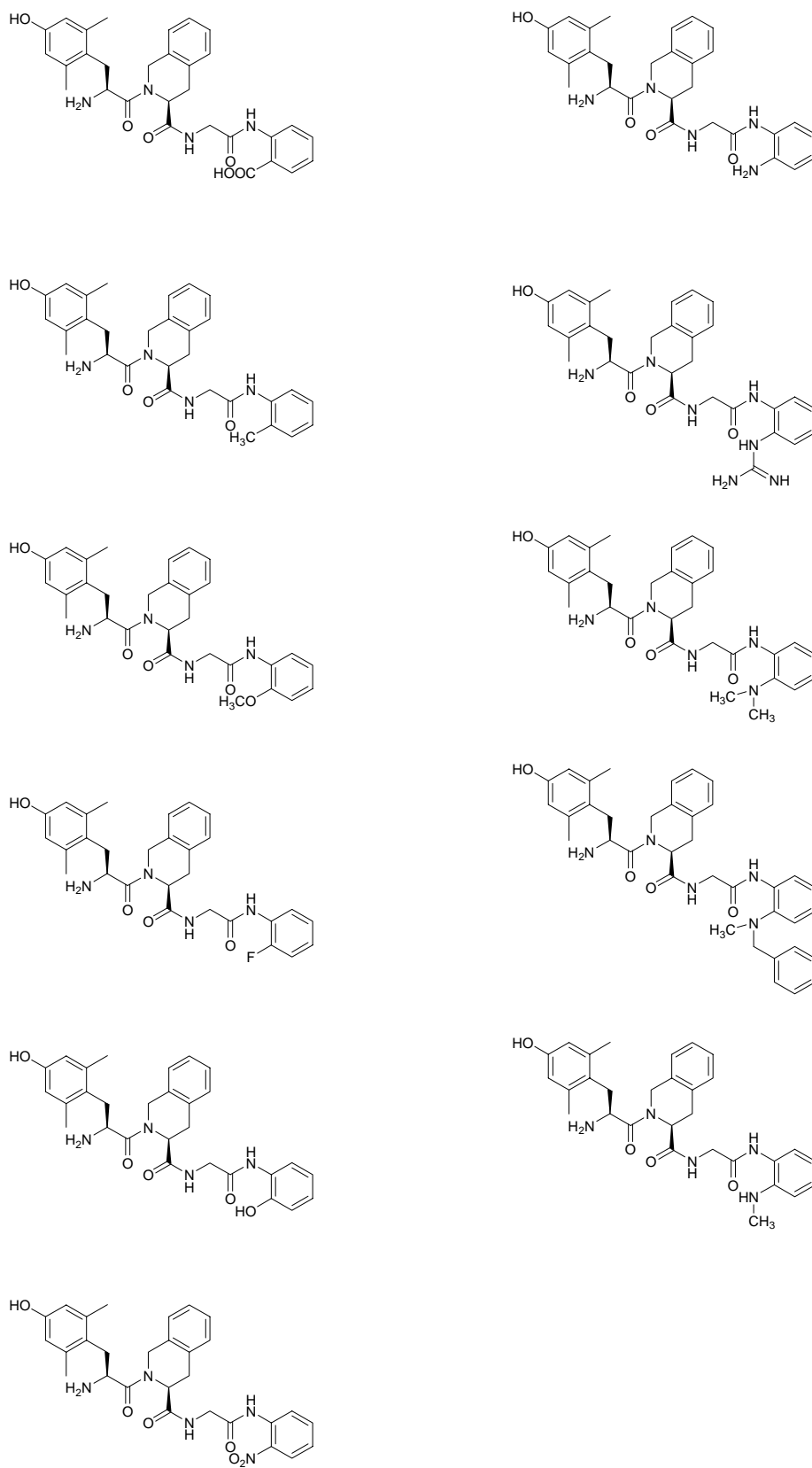


Figura 18

Infine, considerata la cruciale importanza della presenza dell'amminoacido Dmt per l'attività biologica di questa classe di composti e considerati l'elevato costo e la scarsa disponibilità commerciale di tale amminoacido, ho studiato nuove vie sintetiche per ottenere la Dmt otticamente attiva con alte rese e a basso costo.

Questo aspetto sintetico è stato sviluppato in collaborazione con il gruppo del Prof. Gianni Porzi del Dipartimento di Chimica Organica "G. Ciamician" dell'Università di Bologna. La sintesi adottata, rivelatasi particolarmente economica e pratica, prevede l'utilizzo, come induttore chirale, della (S)-1-feniletilammina. Il passaggio chiave è la dialchilazione dell'intermedio dichetopiperazinico chirale con l'alogenuro rappresentante la catena laterale dell'amminoacido (figura 19). La diastereoselettività di tale reazione è superiore al 98%, ciò è dovuto sia alla presenza dell'induttore chirale che all'elevato ingombro sterico dell'elettrofilo, che aumenta di circa un 20-30% l'eccesso diastereoisomerico dell'alchilazione.

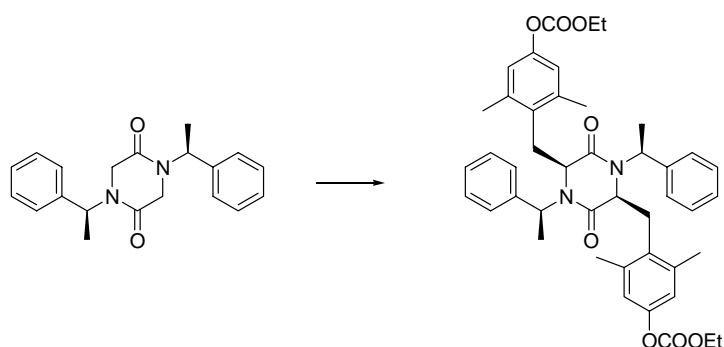


Figura 19

Per ottenere l'amminoacido finale basta sottoporre l'intermedio dialchilato a idrolisi acida (HI 57%) a riflusso.

RISULTATI E DISCUSSIONE

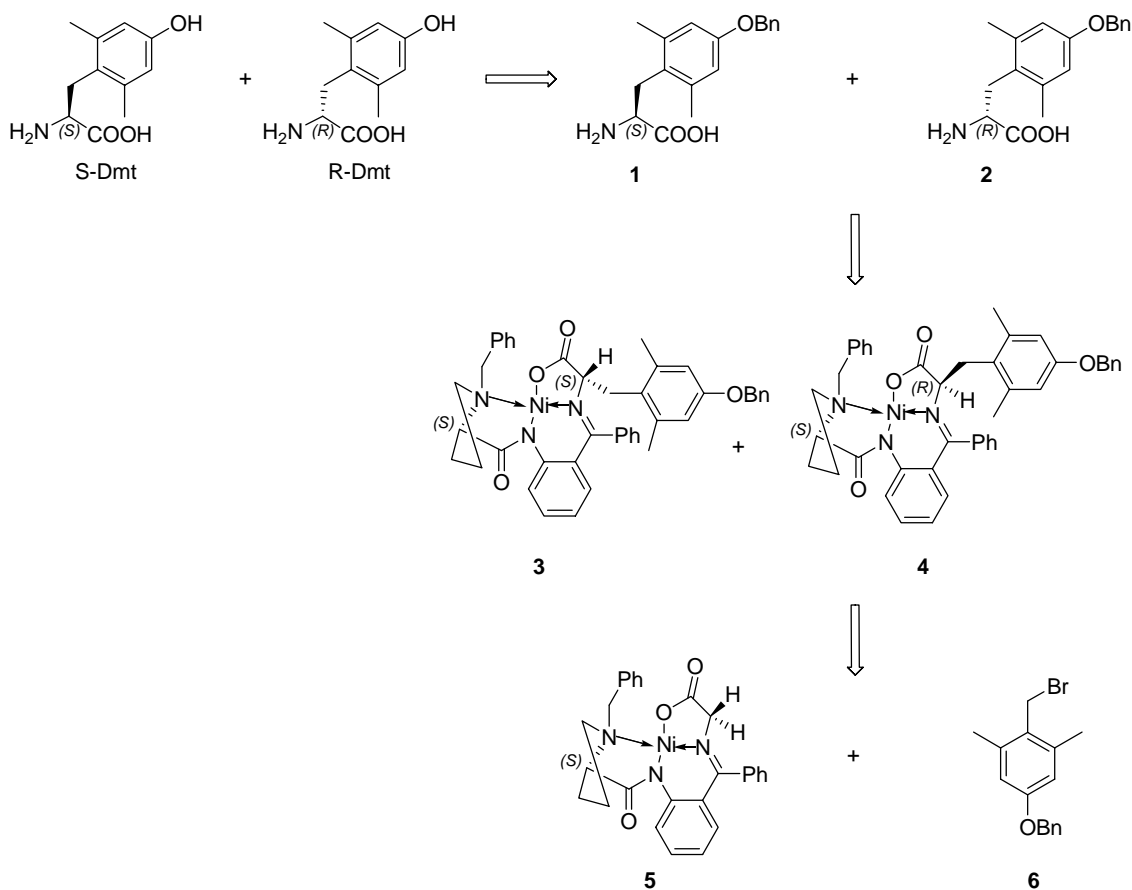
Sintesi dell'amminoacido L-Dmt

Un problema connesso al mio progetto di dottorato è stato quello di ottenere in quantità considerevoli l'amminoacido Dmt, indispensabile come farmacoforo sia nei composti pseudo-peptidici ad attività oppioide (DOP agonisti, MOP agonisti / DOP antagonisti, DOP agonisti), presi come riferimento per le loro elevate potenza, selettività ed affinità recettoriali, che negli analoghi modificati a livello dello spacer e del secondo farmacoforo, di nuova progettazione e sintesi.

La Dmt è un amminoacido non naturale, difficilmente reperibile in commercio e particolarmente costoso. Da qui deriva la necessità di sintetizzarlo nei nostri laboratori, in modo da poterne disporre in grosse quantità e con spesa relativamente modesta.

Solamente due sintesi enantioselettive sono riportate in letteratura. Un primo metodo prevede l'alchilazione di un complesso di Ni(II) di una base di Schiff chirale (**5**) ottenuto dalla Glicina e da (S)-*o*-[N-(N-benzilpropil)amino]-benzofenone³⁰ (Schema 1). Lo step limitante della sintesi è l'utilizzo del complesso di Nichel (**5**) che, oltre ad essere molto difficile da sintetizzare e particolarmente costoso in commercio, quando viene alchilato con l'alogenuro (**6**) genera i due corrispondenti diastereoisomeri (**3** e **4**) in rapporto 1:1. Nonostante questi siano facilmente separabili mediante colonna cromatografica, il 50% del reagente chirale utilizzato viene impiegato nell'inutile sintesi dell'enantiomero D-Dmt, noto portare ad un drastico calo di attività nei corrispondenti derivati.

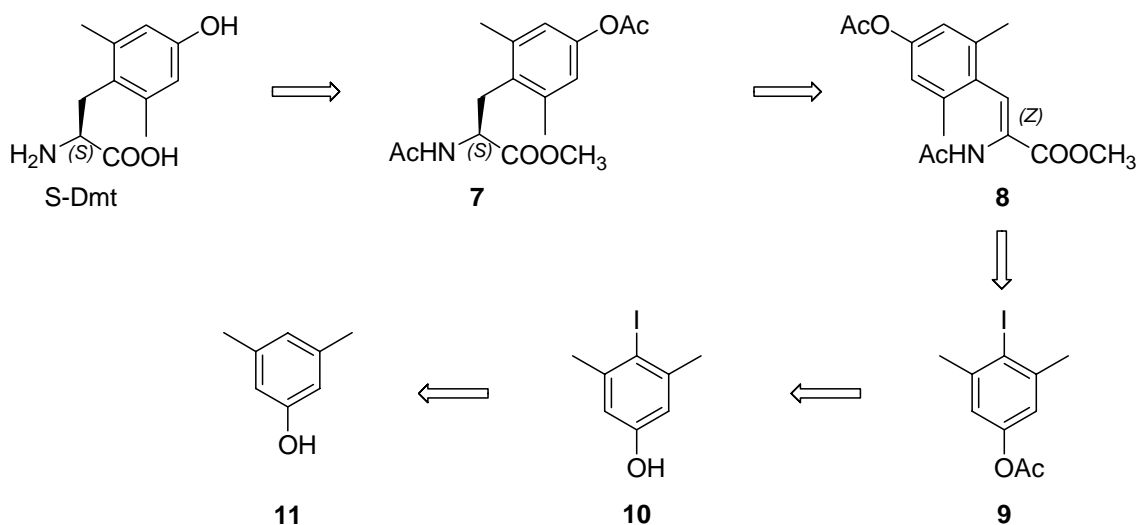
³⁰ Victor J. Hruby *et al.*; *Tetrahedron Asymmetry* **2000**; 11: 2917-2925.



Scheme 1

Un altro approccio si basa sull'idrogenazione asimmetrica dell'intermedio (Z)-metil 2-acetamido-3-(4-acetossi-2,6-dimetilfenil)acrilato (**8**) in presenza di $[\text{Rh}(1,5\text{-COD})(\text{R,R-DIPAMP})]\text{BF}_4^{31}$, un catalizzatore chirale particolarmente costoso. La reazione chiave dello schema sintetico (Schema 2), che è l'idrogenazione, porta ad ottimi eccessi enantiomerici dell'amminoacido solamente se la concentrazione di O_2 presente nell'ambiente di reazione non supera 5 ppm. Per questo motivo non ci è stato possibile operare tale riduzione nei nostri laboratori a causa dell'assenza di un'adeguata attrezzatura. Sono state però messe a punto le condizioni della reazione di Heck per ottimizzare le rese dell'intermedio olefinico (**8**) (accumulandone circa 100 gr) che è stato poi sottoposto ad idrogenazione catalitica presso i laboratori della Prof.ssa Carmen Claver presso l'Università di Tarragona (Spagna).

³¹ John H. Dygos *et al.*; *Synthesys* **1992**; 741-743.



Schema 2

Lo schema sintetico per l'ottenimento dell'intermedio olefinico (**8**) parte dal 3,5-dimetil-fenolo (**11**), che viene fatto reagire con una soluzione acquosa di KI e KIO₃ e con HCl 37% in metanolo. Il prodotto della reazione è il composto (**10**), il 4-iodo-3,5-dimetil-fenolo, che viene poi acetilato con anidride acetica in piridina a 50°C per dare il fenil-acetato corrispondente (**9**). Quest'ultimo viene condensato al metil-2-acetamido acrilato attraverso la reazione di Heck, le cui condizioni prevedono la presenza di TEA, tri-*o*-tolil-fosfina, Pd(OAc)₂ e acetonitrile a riflusso, per dare il deidroamminoacido precursore della S-Dmt, opportunamente protetto e con isomeria Z (**8**). La corretta interpretazione dell'isomeria del doppio legame, attraverso esperimenti di NMR bidimensionale quali COSY, HMBC, HMQC e NOESY, ci ha permesso di scegliere l'opportuno enantiomero del catalizzatore da utilizzare nella successiva reazione di idrogenazione al fine di ottenere solamente lo stereoisomero dell'amminoacido desiderato.

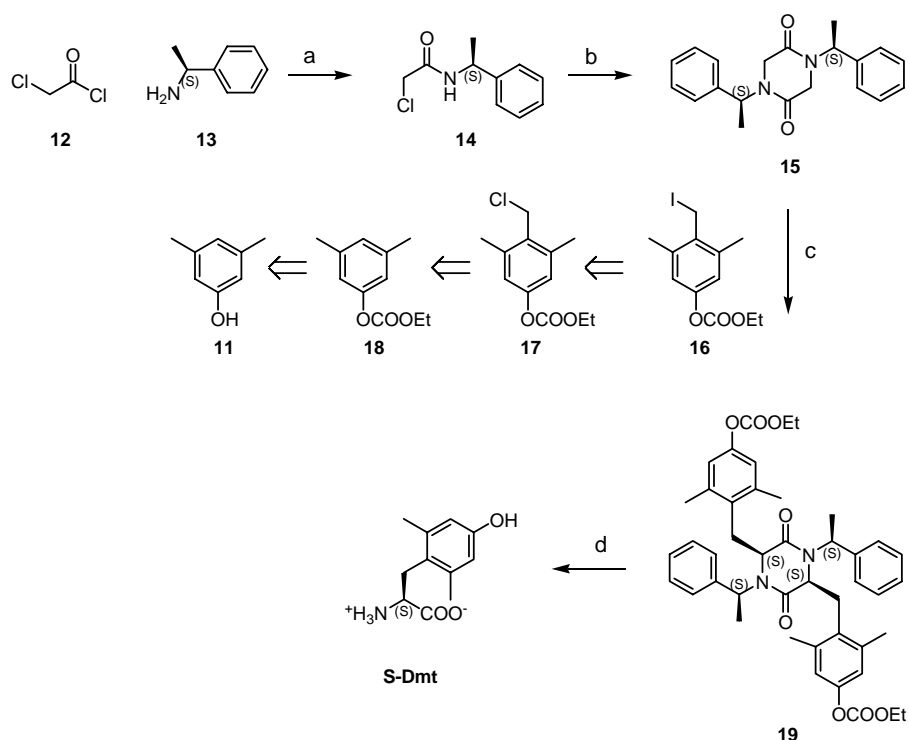
Tale approccio sintetico, anche se non totalmente praticabile nei nostri laboratori, ci ha permesso di ottenere grosse quantità di L-Dmt, con un eccesso enantiomerico del 97%.

Allo scopo di mettere a punto una nuova via sintetica per la preparazione della L-Dmt di facile realizzazione ed economicamente vantaggiosa, è stata attuata una collaborazione

con il Prof. Gianni Porzi del Dipartimento di Chimica Organica “G.Ciamician” dell’Università di Bologna. La sintesi asimmetrica studiata è più conveniente ed economica rispetto a quelle riportate in letteratura, in quanto prevede l’utilizzo come sintone chirale dell’intermedio 2,5-dichetopiperazinico (**15**)³², facilmente ottenibile in due steps dal cloro-acetilcloruro (**12**) e dalla (S)-1-feniletilammina (**13**)³³. Inoltre, tale metodologia sintetica, applicabile per la sintesi di svariati amminoacidi, sia in configurazione assoluta S che R, non richiede condizioni operative particolarmente stringenti, soprattutto per quanto riguarda la presenza di ossigeno. Il successo del metodo sintetico è rappresentato dall’alchilazione del sintone (**15**), che avviene con una pressochè totale diastereoselettività portando al *cis*-derivato (3S,6S)-(**19**). La sintesi (Schema 3) prevede come step iniziale la preparazione dell’intermedio dichetopiperazinico (**15**), facendo reagire il cloro-acetilcloruro (**12**) con la (S)-1-feniletilammina (**13**) in presenza di trietilammina e dimerizzando/ciclizzando l’ammide così ottenuta (**14**) con LHMDs. L’intermedio (**15**) viene poi dialchilato con l’alogenuro (**16**) a dare il composto (**19**) con buone rese chimiche (70%) ed un’ottima diastereoselettività (l’enantiomero S è presente in percentuale maggiore al 98%, l’enantiomero R non è rilevabile all’NMR). L’intermedio (**19**) viene successivamente idrolizzato con HI al 57% a riflusso per ottenere l’amminoacido desiderato come iodidrato. Il corrispondente zwitterione si ottiene adsorbendo la soluzione acquosa dello iodidrato su di una resina acida a scambio ionico Dowex 50 WX 8 (20-50 mesh), eluendolo mediante lavaggi con ammoniaca acquosa ed evaporando a secchezza il solvente. È importante sottolineare che la scelta dello ioduro (**16**) come elettrofilo è stata fatta dopo aver notato la totale assenza di reattività con il corrispondente cloruro (**17**). La sintesi dell’opportuno alogenuro si effettua dal 3,5-dimetil-fenolo commerciale (**11**), che viene protetto all’ossidrilico come carbonato (**18**) e funzionalizzato in posizione 4 come cloro-metile (**17**) in presenza di formaldeide acquosa, HCl concentrato e HCl gassoso. L’intermedio (**17**) viene poi sottoposto allo scambio Cl/I utilizzando NaI per ottenere l’elettrofilo (**16**) da utilizzare nella reazione di bis-alchilazione.

³² Orena M.; Porzi G.; Sandri S., *J. Org. Chem.* **1992**, 57: 6532.

³³ Su-Dong Cho *et al.*, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, 25: 415.



Schema 3

Condizioni di reazione: a) DCM, TEA, R.T., 2h. b) LHMDS, THF anidro, $-10^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{rfx} \rightarrow \text{R.T.}$ overnight. c) LHMDS, THF anidro, -78°C , alogenuro (**16**). d) HI 57%, rfx, 3h; Trattamento con resina a scambio ionico Dowex 50 WX 8 (20-50 mesh).

La configurazione assoluta dell'intermedio (**19**) è stata confermata con l'analisi ai raggi X dei cristalli (Figura 20) e con il potere ottico rotatorio specifico dell'amminoacido S-Dmt ottenuto, risultato in accordo con quello pubblicato in letteratura. Inoltre, negli spettri ^1H e ^{13}C NMR della dichetopiperazina (**19**) appaiono la metà dei segnali, mostrando l'esistenza di un'asse di simmetria C_2 , dimostrazione del fatto che i due nuovi centri stereogenici generati hanno la stessa configurazione assoluta.

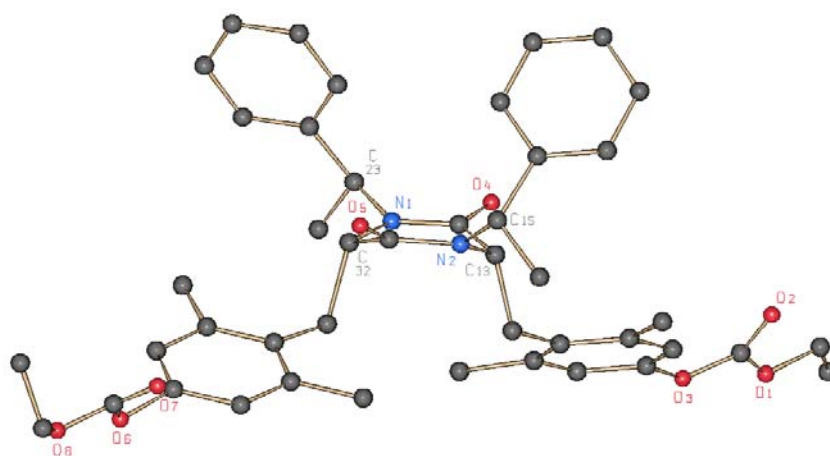
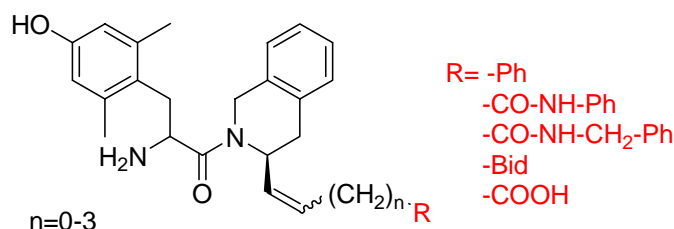


Figura 20

Dalla figura si nota come l'anello dichetopiperazinico adotti una struttura a barca, in cui la disposizione dei due sostituenti introdotti mediante bis-alchilazione rispetto a quelli fenilettilamminici, di configurazione assoluta S, mostra chiaramente come anche i due nuovi centri stereogenici creati siano in configurazione assoluta S.

Sintesi dei composti olefinici

La sintesi su larga scala dell'amminoacido Dmt a basso costo e con alte rese ci ha permesso di affrontare la preparazione delle molecole progettate. In particolare sono state ideate molecole in cui il legame ammidico tra il farmacoforo Dmt-Tic ed un secondo sistema aromatico è stato sostituito con un legame olefinico (Schema 4). Tale modificazione ha lo scopo di aumentare la stabilità metabolica del composto e, allo stesso tempo, ridurre la polarità della molecola per facilitarne il passaggio attraverso la barriera emato-encefalica.



Dmt-Tic-SPACER OLEFINICO-farmacoforo

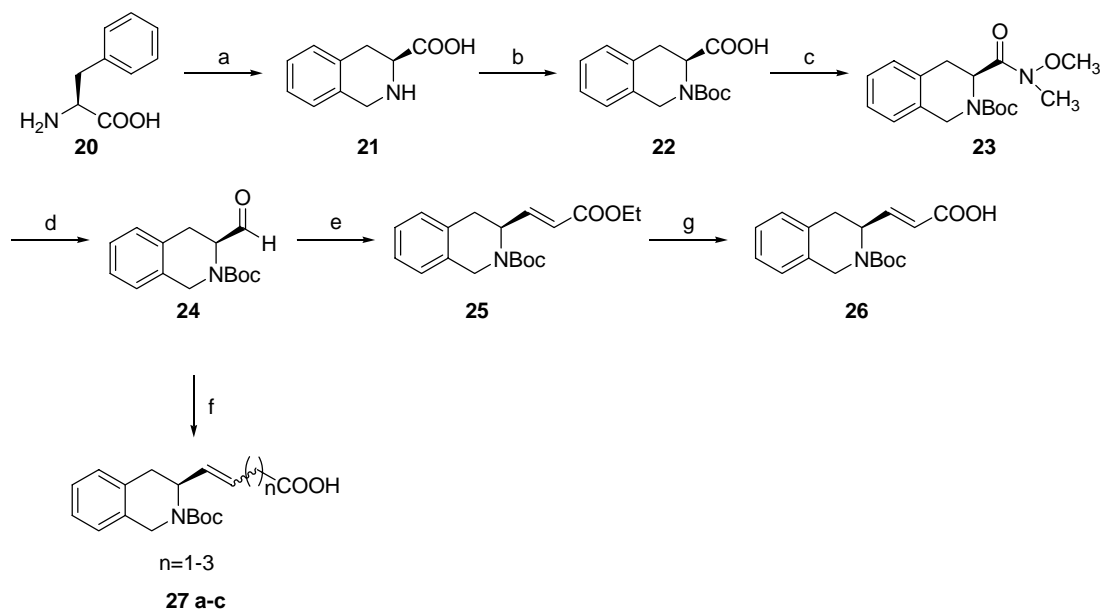
Schema 4

In linea con lo schema 4 sono state ottenute 20 molecole.

La sintesi della maggior parte dei composti ha come passaggio chiave la reazione di Wittig tra l'aldeide dell'acido tetraidroisochinolinico (Boc-Tic-CHO) (**24**) e i vari fosforani, di lunghezza variabile e opportunamente funzionalizzati ($\text{Br}^- \text{PPh}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-Ph}$ o $\text{Br}^- \text{PPh}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$, con $n=0-3$). Di seguito sono presi in considerazione i vari schemi sintetici per la sintesi dei composti olefinici.

WITTIG E WITTIG-COREY

Le molecole presentanti la funzionalità carbossi-olefinica rappresentano i composti di partenza per la sintesi delle olefine funzionalizzate come anilidi, benzilammidi e benzoimidazoli (Schemi 5 e 6).



Scheme 5

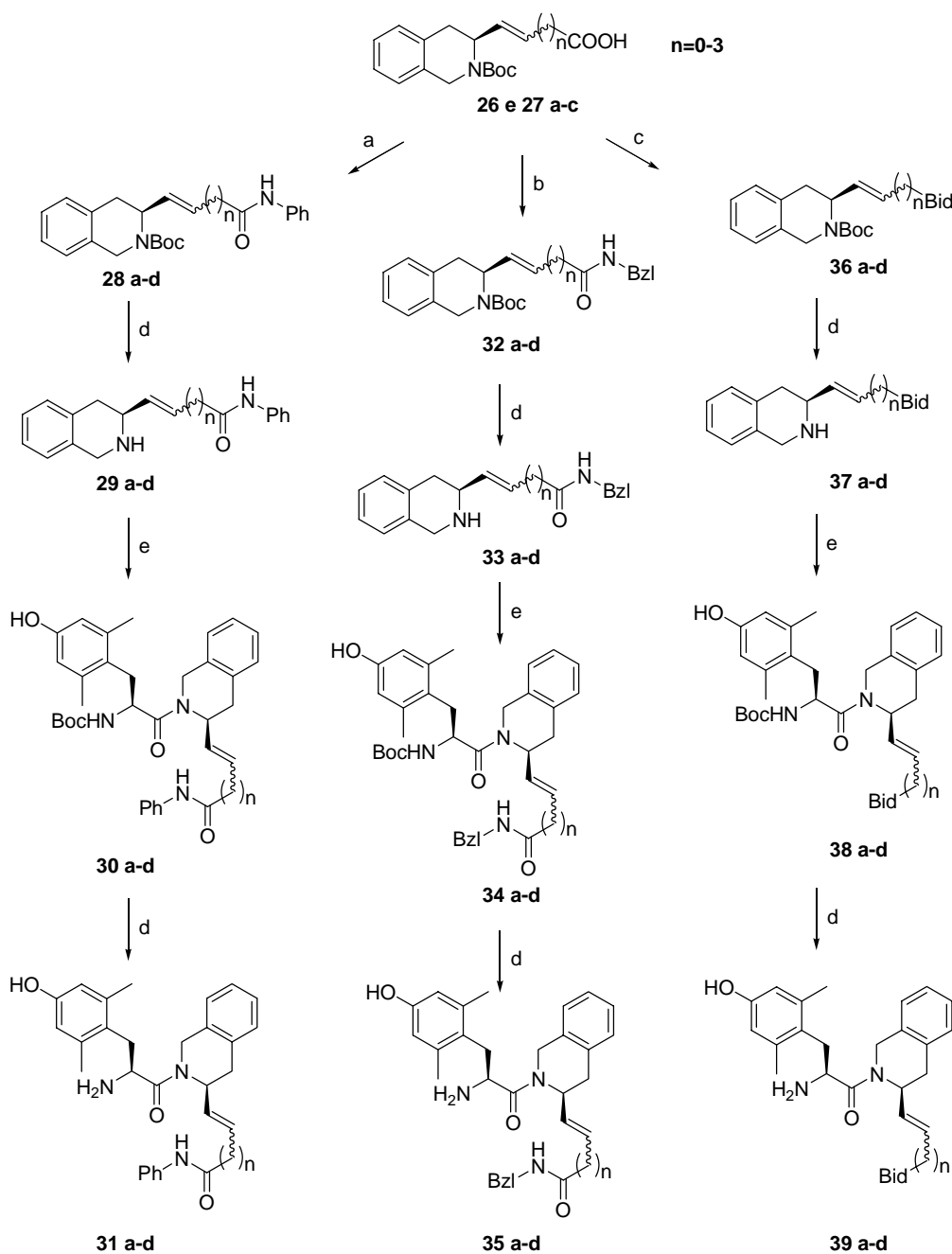
Condizioni di reazione: a) HCHO aq, HCl conc, H₂SO₄ conc, rfx, 2h. b) NaOH 1N, Boc₂O, *t*BuOH/H₂O 2:1, R.T., o.n. c) HCl*HN(OCH₃)CH₃, WSC, HOBt, NMM, DMF anidra, 0°C → R.T., o.n. d) LiAlH₄, THF anidro, 0°C, 1h. e) Ph₃P=CH-COOEt, THF anidro, R.T., 2h. f) Br⁻ PPh₃-CH₂-(CH₂)_n-COOH (n=1-3), NaH 60%, DMSO anidro, *n*pentano anidro, 75°C → 0°C → R.T. o.n. g) NaOH 1N, EtOH 95%, R.T., o.n.

Facendo reagire la L-Fenilalanina (**20**) con formaldeide acquosa in acido cloridrico concentrato e qualche goccia di acido solforico concentrato a riflusso per un paio d'ore, si ottiene l'acido tetraidroisochinolinico (H-Tic-OH) (**21**), che viene sciolto in una soluzione di *t*BuOH, H₂O e NaOH 1N e fatto reagire con un eccesso di Boc₂O a temperatura ambiente per una notte. In questo modo si protegge il gruppo amminico come *tert*butossicarbonile (**22**). Quindi si condensa l'intermedio (**22**) con la N,O-dimetil-idrossilammina cloridrata in presenza di WSC, HOBt e NMM per ottenere il composto (**23**). Questo viene poi ridotto ad aldeide (**24**) con LiAlH₄ in THF anidro a 0°C. Applicando la reazione di Wittig, l'aldeide (**24**) viene fatta reagire con l'ilide di fosfonio stabilizzata Ph₃P=CH-COOEt in THF anidro a temperatura ambiente per due ore, ottenendo così l'olefina (**25**), che viene successivamente saponificata a dare il composto (**26**). Per la sintesi delle olefine (**27a**, **27b** e **27c**) non è stato possibile applicare direttamente la reazione di Wittig, che consiste nel preparare in un primo

momento l'ilide dal sale di fosfonio³⁴. Con questa via si ottengono solo tracce del prodotto desiderato, in quanto le ilidi considerate non sono stabilizzate per risonanza e, anche utilizzando 2.2 equivalenti (1.1 eq per salificare la funzionalità acida e 1.1 eq per generare l'ilide) di basi diverse (*n*BuLi, *t*BuOK e NaH 60%), non si ottiene la colorazione rossa tipica della formazione dell'anione. L'alternativa di esterificare preventivamente la funzionalità carbossilica è stata scartata in quanto l'estere ottenuto non sarebbe stato un buon substrato per la successiva reazione di Wittig. Pertanto siamo dovuti ricorrere alla reazione di Wittig secondo la metodologia di Corey³⁵, che prevede l'utilizzo come base del dimetil sulfinil carbanione, preparato in situ da NaH secco e DMSO anidro a 75°C. Ottenuta la base in tali condizioni (colorazione verde), si aggiunge poi il sale di fosfonio Br⁻ ⁺PPh₃-CH₂-(CH₂)_n-COOH (n=1-3) e la soluzione assume una colorazione rossa intensa, indice della formazione dell'ilide. La successiva addizione della Boc-Tic-aldeide (**24**) a 0°C porta alla scomparsa della colorazione rossa nel giro di poche ore. La reazione viene comunque lasciata in agitazione a temperatura ambiente tutta la notte. I composti (**27 a-c**) sono stati ottenuti con rese del 50% circa.

³⁴ Greenwald R. *et al.*; *JOC* **1963**; 28: 1128-1129.

³⁵ Corey E.J. *et al.*; *JACS* **1962**; 84: 866-867.



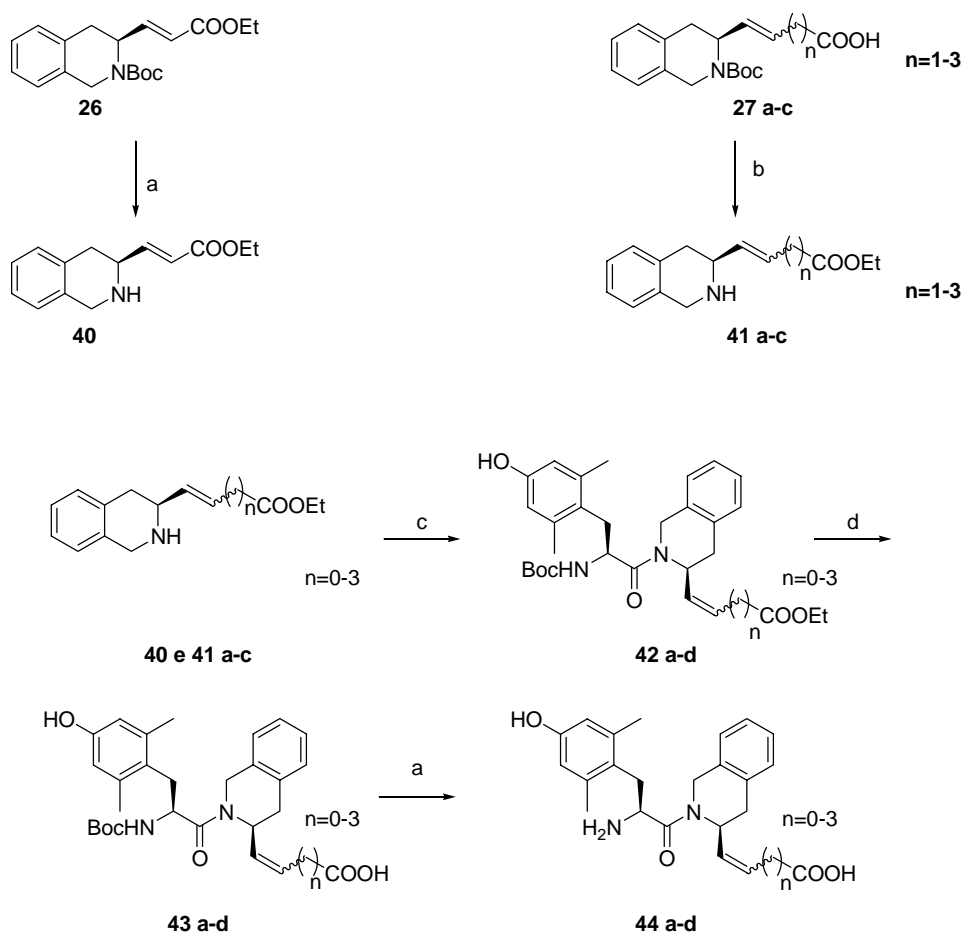
Scheme 6

Condizioni di reazione: a) Anilina, IBCF, NMM, DMF anidra, $-20^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n. b) Benzilammina, WSC, HOBt, DMF anidra, $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n. c) 1. *O*-fenilendiammina, IBCF, NMM, DMF anidra, $-20^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n. 2. AcOH, 60°C , 1h. d) TFA. e) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBt, DMF anidra $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$ o.n.

Per ottenere i prodotti olefinici aventi come secondo farmacoforo l'anilide, la benzilammide o il benzimidazolo (**31 a-d**, **35 a-d** e **39 a-d**), gli opportuni intermedi

(26 e 27 a-c) vengono condensati con l'anilina, la benzilammina e la *o*-fenilendiammina (in quest'ultimo caso segue la chiusura a benzoimidazolo con AcOH a caldo) a dare i composti (28 a-d, 32 a-d e 36 a-d). Questi ultimi, dopo deprotezione in TFA, portano alle corrispondenti ammine (29 a-d, 33 a-d e 37 a-d), le quali vengono condensate con la Boc-Dmt-OH in presenza di WSC e HOBt (30 a-d, 34 a-d e 38 a-d) e successivamente sbloccate in TFA per dare i composti finali (31 a-d, 35 a-d e 39 a-d).

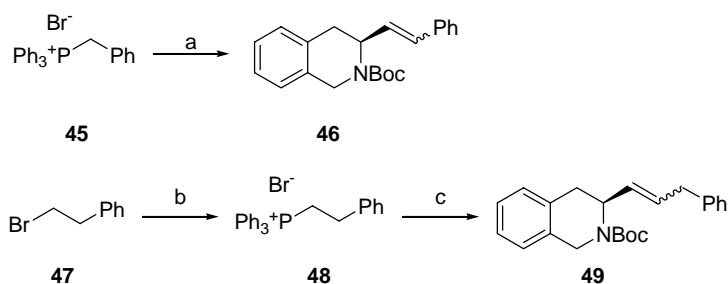
I derivati (26, e 27 a-c) sono gli intermedi comuni anche per la sintesi dei prodotti aventi come secondo farmacoforo il carbossile libero (Schema 7).



Condizioni di reazione: a) TFA b) EtOH assoluto, H₂SO₄ conc, rfx, 2h. c) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBt, DMF anidra 0°C → R.T. o.n. d) EtOH 95%, NaOH 1N, R.T., o.n.

Il composto (**26**) subisce dapprima una deprotezione in TFA (**40**) mentre gli intermedi (**27 a-c**) vengono esterificati in etanolo assoluto e qualche goccia di acido solforico concentrato a refluxo per un paio d'ore (l'ambiente acido permette inoltre la deprotezione del gruppo amminico a dare i composti (**41 a-c**). Gli intermedi (**40** e **41 a-c**) sono condensati alla Boc-Dmt-OH in presenza di WSC e HOBt (**42 a-d**), la cui successiva saponificazione porta ai composti (**43 a-d**). I prodotti finali (**44 a-d**) si ottengono in seguito a sblocco della funzionalità uretanica dei corrispondenti (**43 a-d**) in TFA.

Anche per la sintesi delle fenil-olefine con $n = 0$ e 1 (schema 8) abbiamo utilizzato la reazione di Wittig (per la sintesi della Boc-Tic-aldeide (**24**) vedere schema 5).



Schema 8

Condizioni di reazione: a) *t*BuOK, Boc-Tic-CHO (**24**), THF anidro, R.T., o.n. b) Ph_3P , toluene anidro, rfx, o.n. c) *n*BuLi, THF anidro e Et_2O anidro, Boc-Tic-CHO (**24**), $-60^\circ\text{C} \rightarrow -40^\circ\text{C} \rightarrow -60^\circ\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n.

Il sale di fosfonio (**45**) è stato trattato con *t*BuOK in THF anidro per 15 minuti per ottenere la corrispondente ilide. Quindi, applicando la reazione di Wittig, è stata fatta reagire con l'aldeide (**24**) in THF anidro a temperatura ambiente, ottenendo così il composto (**46**). Il Bromo derivato (**47**), invece, è stato fatto reagire con trifenilfosfina in toluene a refluxo per ottenere il sale di fosfonio (**48**), il quale è stato deprotonato a dare la corrispondente ilide con *n*BuLi in una miscela di THF ed Et_2O anidri a -60°C . Analogamente, l'ilide così ottenuta è stata fatta reagire con l'aldeide (**24**) a dare il composto desiderato (**49**).

Alcuni inconvenienti sono stati riscontrati nella preparazione delle fenil-olefine con $n = 2$ e 3 . Abbiamo provato ripetutamente la reazione di Wittig secondo lo schema utilizzato

per la sintesi delle fenil-olefine con $n = 0$ e 1 (Schema 8) ed utilizzando basi diverse (*t*BuOK e *n*BuLi) senza ottenere però i risultati desiderati. Con l'utilizzo del *n*BuLi si erano in realtà ottenute tracce del composto desiderato, che si è però degradato nel successivo passaggio di deprotezione del Boc, molto probabilmente a causa dell'ambiente fortemente acido di reazione. Abbiamo quindi provato ad utilizzare un metodo di deprotezione alternativo: un equivalente di cerio ammonio nitrato in acetonitrile a riflusso³⁶. Purtroppo anche in questo caso è stato replicato l'insuccesso. In alternativa, ipotizzando che il problema fosse rappresentato dal gruppo protettore all'azoto della Boc-Tic-aldeide (**24**) piuttosto che dalla scarsa reattività del fosforano, abbiamo provato ad utilizzare gruppi protettori alternativi:

1. **Acetile (Ac)**. Si introduce utilizzando l'anidride acetica in piridina a caldo e si rimuove in NaOH a riflusso. La sintesi del composto Ac-Tic-CHO non ha dato particolari problemi, mentre la successiva reazione di Wittig non ha portato al composto desiderato.
2. **Terbutil-silil-etossi-carbonil (Teoc)**. Si introduce utilizzando il Teoc-OSu e si rimuove utilizzando 3 equivalenti di TBAF in THF anidro. Anche in questo caso la reazione fallimentare è stata la Wittig.
3. **α -Cloro-etil-ossi-carbonil (ACE)**. Si introduce utilizzando l'ACE-Cl e si rimuove in metanolo a riflusso. In questo caso lo step limitante è la formazione della N-metil, N-metossi ammid.

A questo punto, non avendo ottenuto i risultati attesi con le vie di olefinazioni descritte, abbiamo considerato metodi di olefinazione alternativi.

Dapprima abbiamo pensato di utilizzare la cross metatesi delle olefine.

CROSS METATESI DELLE OLEFINE

La cross metatesi (CM) delle olefine poteva essere un'utile alternativa per sintetizzare le fenil-olefine con $n = 2$ e 3 , partendo dai due alcheni precursori più semplici (olefine terminali). Quando due diverse olefine sono usate in una CM, il grado di omodimerizzazione è simile e la reattività degli omodimeri e dei prodotti di CM nei confronti di eventi di metatesi secondaria sono elevate. In queste reazioni il prodotto di cross metatesi desiderato sarà equilibrato con i vari omodimeri attraverso reazioni di

³⁶ Jih Ru Hwu *et al.*; *Tetrahedron Letters* **1996**; 37 (12): 2035-2038.

metatesi secondaria che porterà ad una miscela di prodotti statisticamente prevedibili. Per queste reazioni si devono usare circa 10 equivalenti di una delle due olefine per ottenere il 90% di prodotto di cross-metatesi³⁷, il catalizzatore utilizzato è un complesso di rutenio (Figura 21).

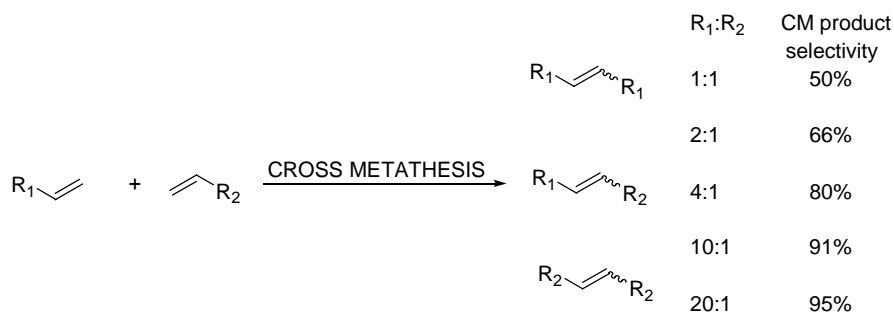
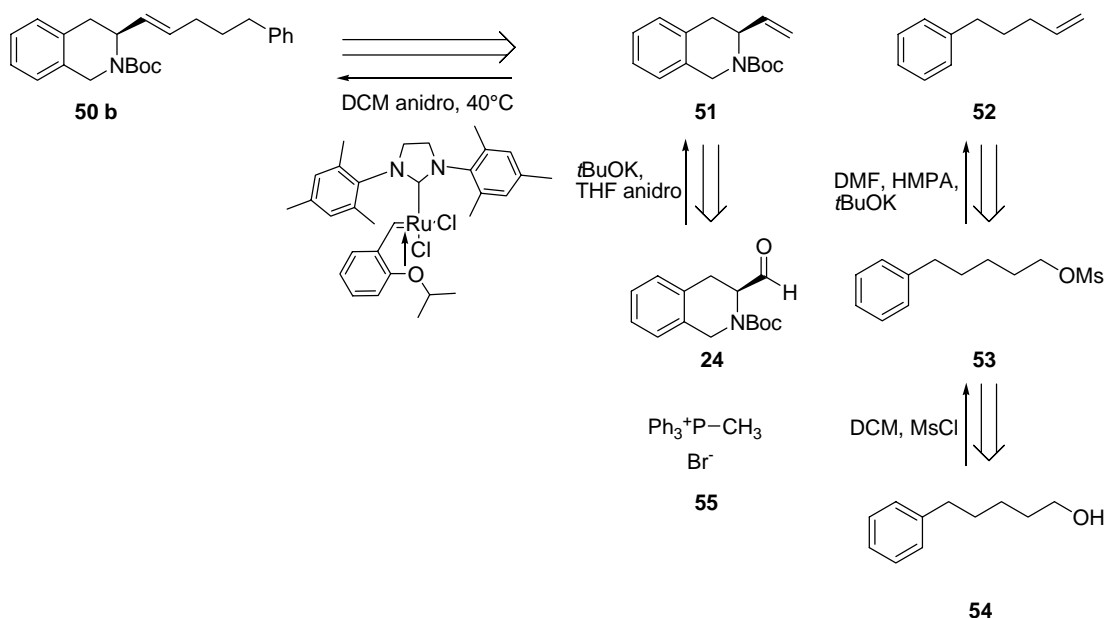


Figura 21

Una possibile retrosintesi (schema 9) della fenil-olefina con $n = 3$ (**50b**) prevede una disconnessione a livello del doppio legame a dare le due olefine terminali (**51** e **52**). Il composto (**51**) può essere ottenuto attraverso una semplice reazione di Wittig tra la Boc-Tic-CHO (**24**) e il trifetil metilen fosfonio bromuro (**55**) in THF anidro a temperatura ambiente per una notte. L'olefina (**52**) invece si potrebbe far derivare dal corrispondente alcol (**54**) e successiva disidratazione via mesilazione (**53**).



Schema 9

³⁷ Arnab K. Chatterjee *et al.*; *JACS* **2003**; 125: 11360-11370.

La reazione di cross metatesi per ottenere il composto (**50b**) partendo dalle due olefine terminali non ha portato ai risultati sperati. Abbiamo sciolto i composti (**51**) e (**52**) in DCM anidro e abbiamo aggiunto il catalizzatore di Grubbs di seconda generazione, noto favorire l'eterodimerizzazione (Schema 9). Quindi abbiamo scaldato e lasciato reagire a 40°C per una notte. Per l'elevato costo del catalizzatore di Grubbs e l'insuccesso della reazione, abbiamo scelto di abbandonare temporaneamente questa via e di affrontare un altro metodo di olefinazione (Julia olefination). Non escludiamo però di fare nuove prove di cross metatesi in futuro utilizzando catalizzatori diversi (Rh e Mo).

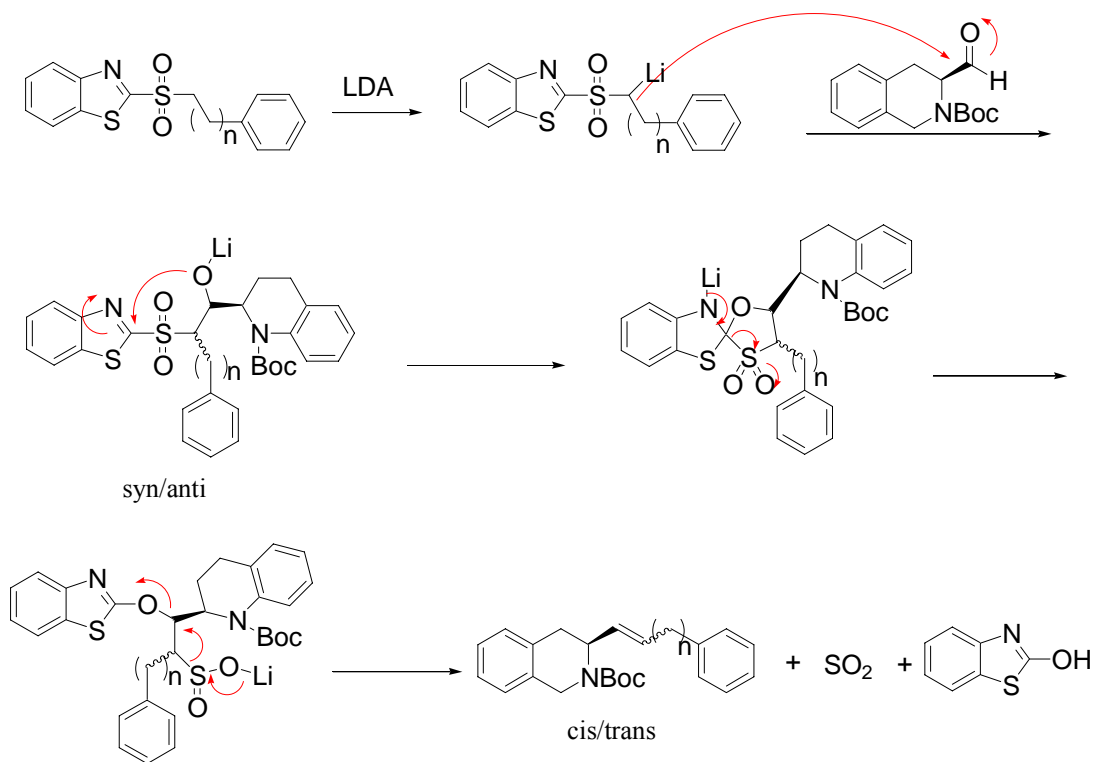
OLEFINAZIONE DI JULIA

La classica olefinazione di Julia³⁸, nota anche come olefinazione di **Julia-Lythgoe**, richiede quattro steps sintetici: a) la metallazione di un fenilsolfone, b) l'addizione di questo ad un'aldeide, c) l'acilazione del risultante β -alcossisolfone e infine d) l'eliminazione riduttiva del β -acilossisolfone con un donatore di elettroni (generalmente un'amalgama di sodio e mercurio) per ottenere l'alchene desiderato. Questa procedura è abbastanza stereoselettiva e favorisce la formazione dell'alchene *trans*. Tale stereoselettività aumenta più la catena di atomi dopo il doppio legame è complessa.

Sostituendo i fenilsolfoni, di solito usati nella classica Julia, con eteroarilsolfoni si ha un diverso meccanismo che ne cambia la reattività. L'aggiunta di un "metallated" benzotiazol-2-il solfone (BT-solfone) ad un'aldeide segue il primo step della classica Julia; il risultante β -alcossisolfone è instabile e riarrangia facilmente attraverso un intermedio spirociclico per giungere al trasferimento di un eterociclo dal solfone all'ossigeno aldeidico per ottenere il sale di solfonio. L'eliminazione spontanea di anidride solforosa e del litio-benzotiazolone porta direttamente al prodotto desiderato. La metodica descritta è nota come Julia modificata, one-pot Julia o **Julia-Kocienski**³⁹ (Schema 10).

³⁸ Julia M *et al.*; *Tetrahedron Letters* **1973**; 4833-4836.

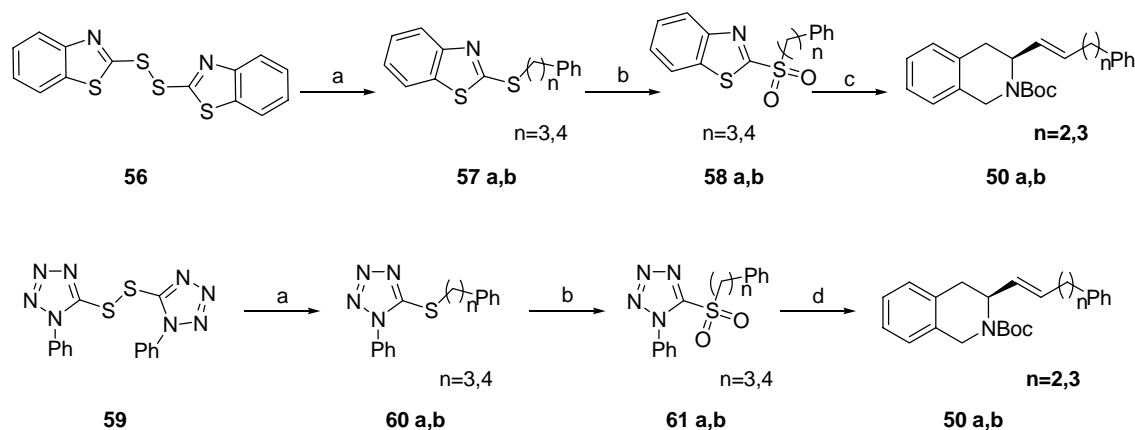
³⁹ *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2002**; 2563-2585.



Schema 10

I solfoni eterociclici da noi presi in considerazione sono il benzotiazol-2-il solfone (BT) e l'1-fenil-1H-tetrazol-5-il solfone (PT). In letteratura è riportato che l'utilizzo dei BT-solfoni porta ad una miscela di prodotti *cis/trans*; i PT-solfoni favoriscono invece la formazione dell'alchene *trans*. Inoltre la stereoselettività può essere favorita dall'utilizzo di dimetossietano (DME) come solvente e della potassio esametildisilazide (KHMDS) come base per la formazione dell'anione in posizione alfa al solfone.

La preparazione dei benzotiazol-solfoni (**58 a,b**) e degli 1-fenil-tetrazol-solfoni (**61 a,b**) segue gli stessi steps sintetici, l'unica differenza è che nel primo caso il prodotto commerciale di partenza è il 2,2'-ditio-bis-(benzotiazolo) (**56**), mentre nel secondo caso è il 5,5'-ditio-bis-(1-fenil-1H-tetrazolo) (**59**) (Schema 11).



Schema 11

Condizioni di reazione: a) Ph-(CH₂)_n-OH (n = 3 e 4), Ph₃P, toluene anidro, R.T., o.n. b) H₂O₂ 30%, AcOH, H₂SO₄ conc., 80°C, 1h. c) Boc-Tic-CHO (**24**), LDA, HMPA, THF anidro, -78°C → R.T., o.n. d) Boc-Tic-CHO (**24**), DME, KHMDS, -60°C → R.T., o.n.

I disolfuri (**56**) e (**59**) vengono fatti reagire con gli alcoli appropriati (n=3,4) e trifenilfosfina in toluene anidro per ottenere così i solfuri corrispondenti⁴⁰ (**57 a,b**) e (**60 a,b**). L'ossidazione dei solfuri con acqua ossigenata al 30% in acido acetico e acido solforico concentrato catalitico, a 80°C per un'ora⁴¹, porta alla formazione dei corrispondenti solfoni (**58 a,b**) e (**61 a,b**).

I benzotiazol-solfoni (**58 a,b**) vengono fatti reagire con la Boc-Tic-CHO (**24**) utilizzando come base la LDA (preparata in situ facendo reagire la DIPA con 1,1 equivalenti di *n*BuLi in THF anidro a -78°C) e HMPA, in THF anidro a -78°C e lasciando poi reagire a temperatura ambiente per una notte. La reazione non ha portato alla miscela di prodotti *cis/trans* desiderati pertanto dopo alcune prove in cui abbiamo variato la temperatura e il tempo di reazione, abbiamo provato ad utilizzare l'eterociclo tetrazolico anziché benzotiazolico.

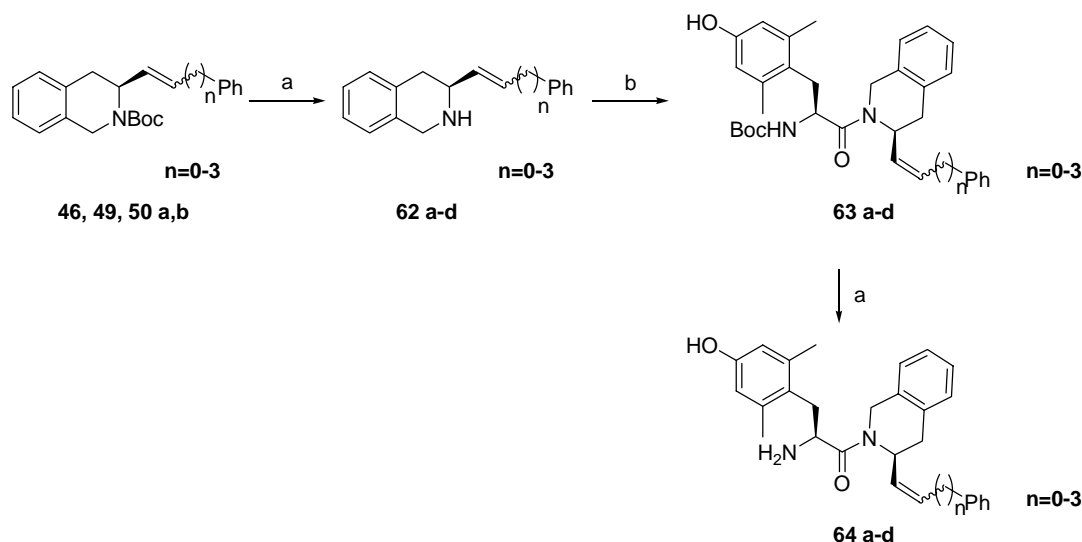
Gli 1-fenil-tetrazol-solfoni (**61 a,b**) vengono fatti reagire con la Boc-Tic-CHO (**24**) a -60°C con la KHMDS in DME. La reazione procede poi a temperatura ambiente per una notte. Abbiamo ottenuto i due prodotti desiderati (**50 a,b**) dopo purificazione cromatografica. Da studi ¹H-NMR si evince che la configurazione del doppio legame neoformato è esclusivamente E per il composto (**50 a**), in quanto le costanti di

⁴⁰ Vincenzo Calò *et al.*; *Tetrahedron* **1992**; 29: 6051-6058.

⁴¹ Peter T. Gallagher *et al.*; *J. C. S. Perkin Transaction I* **1980**; 2362-2370.

accoppiamento calcolate per i protoni olefinici sono di 16 Hz (caratteristica tipica delle E olefine) mentre il composto (**50 b**) è stato ottenuto come miscela E/Z.

Tutte le fenil olefine ottenute (**46**, **49** e **50 a,b**) vengono successivamente deprotette in TFA (**62 a-d**), condensate con la Boc-Dmt-OH a dare i derivati (**63 a-d**), che per trattamento con TFA danno le quattro olefine finali (**64 a-d**) (Schema 12).



Schema 12

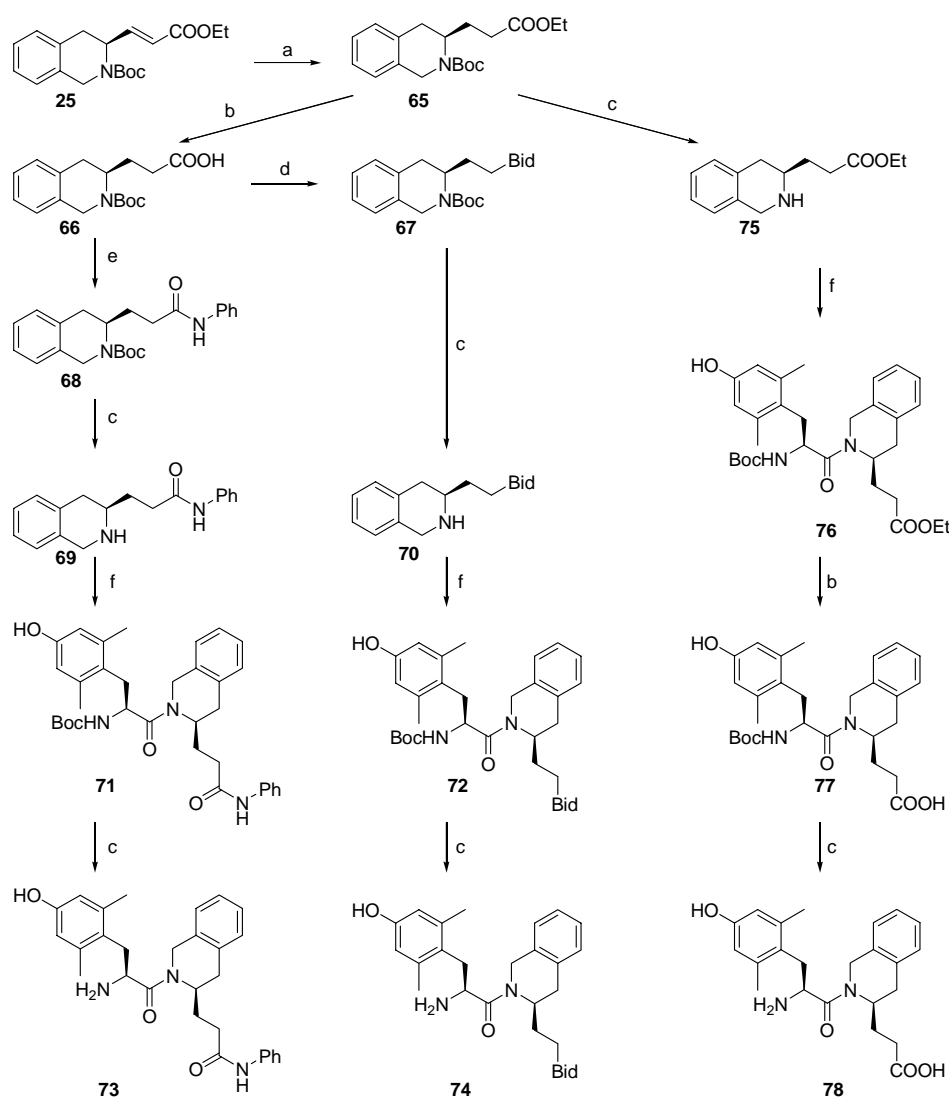
CONDIZIONI DI REAZIONE: a) TFA; b) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBt, DMF, 0°C → R.T., o.n.

Tutti i composti olefinici sintetizzati sono stati successivamente testati in saggi funzionali di $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ per valutarne la capacità di attivare o meno il recettore DOP. I derivati più interessanti sono risultati essere quelli con lo spacer più corto ($n=0$) e sono stati perciò sottoposti ad ulteriori modificazioni chimiche:

- 1) riduzione dei legami olefinici dei composti (**31 a**), (**39 a**) e (**44 a**);
- 2) metilazione dell'NH del nucleo benzoimidazolico del composto (**39 a**);
- 3) dimetilazione dell'ammina primaria del composto (**44 a**);
- 4) riduzione contemporanea dei legami anilidico e olefinico nel derivato (**31 a**);
- 5) sintesi dell'analogo Dmt-Tic-CH=CH-*o*-(COOH)anilide (**89**).

La preparazione dei composti presentanti la riduzione dello spacer olefinico ad alcano è riportata nello schema 13. L'intermedio comune è il derivato (**65**), il quale deriva dall'idrogenazione catalitica al Parr del vinilestere (**25**). Tale intermedio (**65**) viene

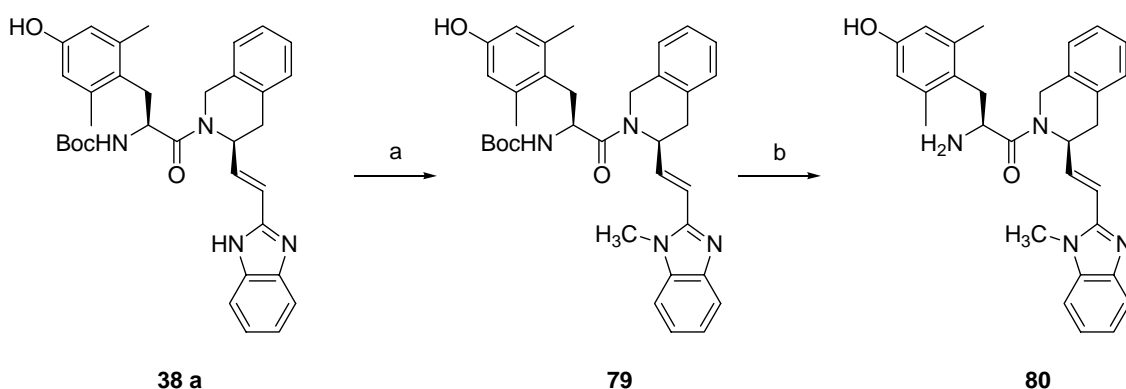
saponificato a livello della funzionalità esterea in presenza di NaOH 1M ed etanolo per ottenere il derivato (**66**), il cui carbossile viene funzionalizzato da un lato come benzoimidazolo (**67**) e dall'altro come anilide (**68**). Questi ultimi subiscono successiva deprotezione in ambiente acido e condensazione con la Boc-Dmt-OH a dare gli intermedi (**71** e **72**), che vengono poi sbloccati alla funzionalità uretanica per ottenere in composti finali (**73** e **74**). L'intermedio estereo (**65**) è utile anche per la preparazione del composto presentante la funzionalità carbossilica libera (**78**), in quanto, dopo essere stato deprotetto alla funzionalità amminica, viene condensato con la Boc-Dmt-OH e infine deprotetto alla funzionalità esterea mediante saponificazione e alla funzionalità uretanica tramite trattamento con TFA.



Schema 13

CONDIZIONI DI REAZIONE: a) H₂, 50 psi, MeOH. b) NaOH 1M, EtOH. c) TFA. d) 1. *O*-fenilendiammina, IBCF, NMM, DMF anidra, -20°C → R.T., o.n. 2. AcOH. 60°C, 1h. e) Anilina, IBCF, NMM, DMF anidra, -20°C → R.T., o.n. f) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBt, DMF, 0°C → R.T., o.n.

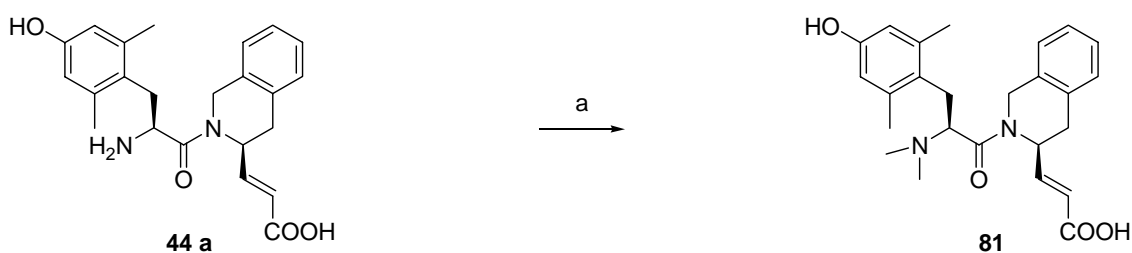
L'altro analogo sintetizzato è il composto (**80**), in cui l'NH del nucleo benzimidazolico dell'intermedio (**38 a**) è stato alchilato con metilioduro e successivamente deprotetto alla funzionalità uretanica con TFA (Schema 14).



Schema 14

CONDIZIONI DI REAZIONE: a) CH₃I, K₂CO₃, DMF anidra. b) TFA.

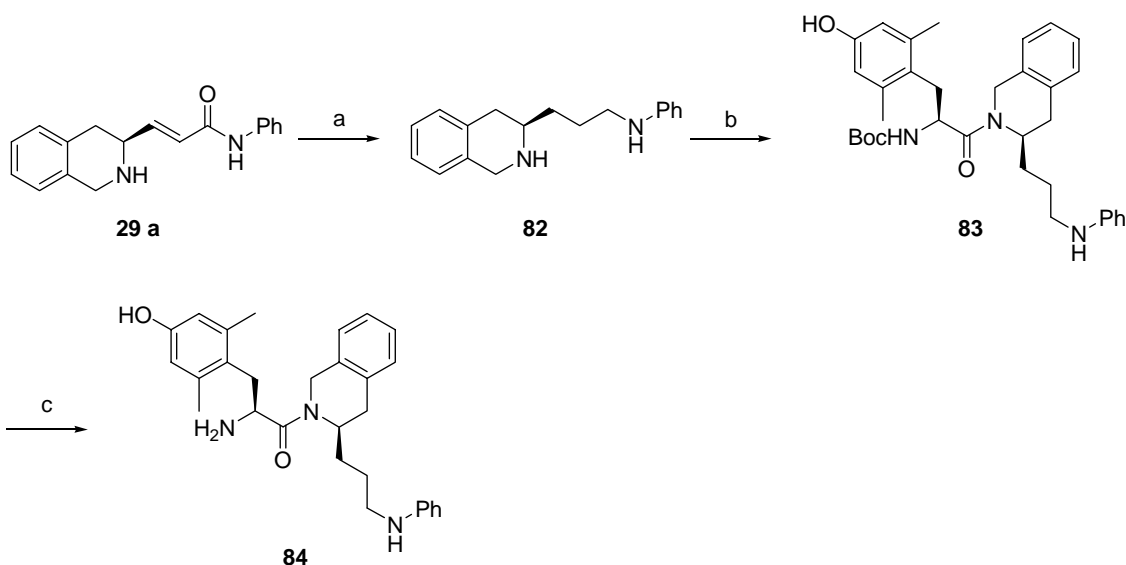
Il composto (**81**) è stato sintetizzato per semplice dimetilazione del derivato (**44 a**) mediante amminazione riduttiva con HCHO acquosa, NaCNBH₃ e acido acetico glaciale (Schema 15).



Schema 15

Condizioni di reazione: a) HCHO 37%, AcOH glaciale, NaCNBH₃, CH₃CN, R.T., 2h.

Il composto (**84**) corrisponde al derivato (**31 a**) in cui sono stati ridotti sia il legame olefinico che quello anilidico. La sintesi è mostrata nello schema 16.

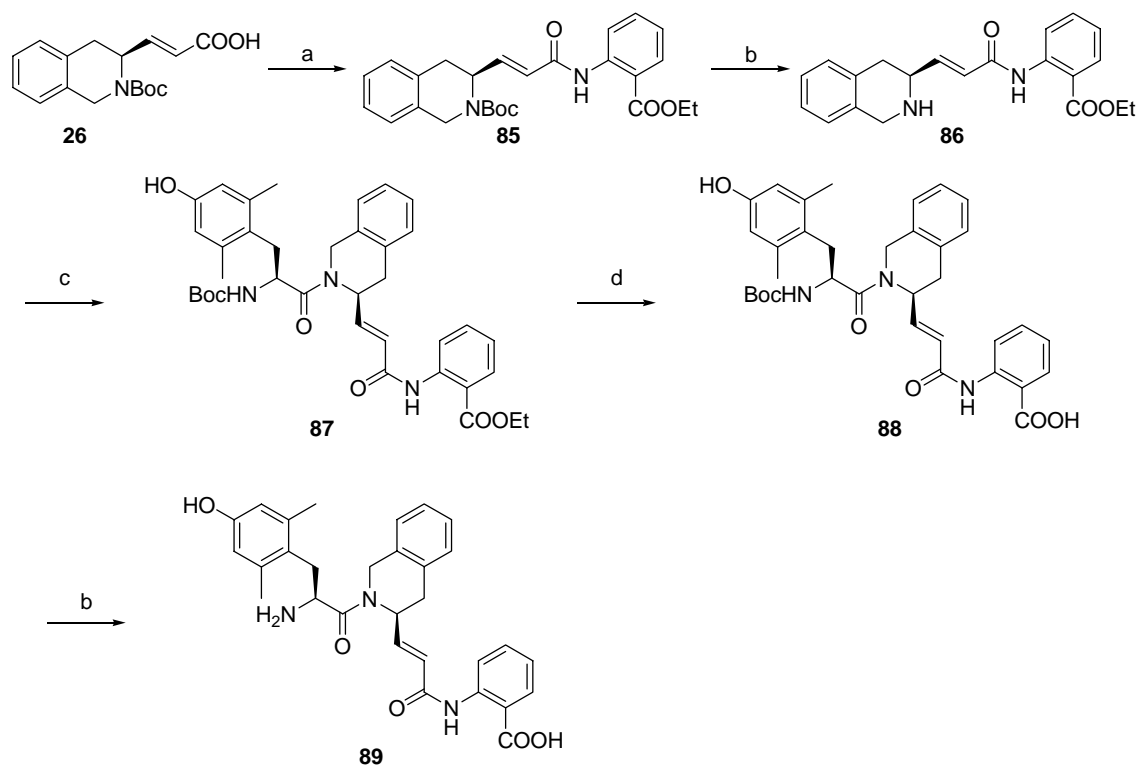


Schema 16

CONDIZIONI DI REAZIONE: a) $\text{BH}_3 \cdot (\text{CH}_3)_2\text{S}$, THF anidro, rfx. b) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBT, DMF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n. c) TFA.

L'intermedio (**29 a**) viene ridotto in presenza di borano dimetilsolfuro in THF anidro a refluxo e successivamente condensato con la Boc-Dmt-OH a dare il composto (**83**). Quest'ultimo, per semplice deprotezione della funzionalità amminica in ambiente acido, permette l'ottenimento del composto desiderato (**84**).

L'ultimo analogo sintetizzato della serie è (**89**), preparato seguendo lo schema sintetico 17. L'intermedio (**27 a**) viene condensato con l'estere etilico dell'acido antranilico, previa attivazione del carbossile come anidride mista via IBCF e NMM, a dare il composto (**85**). Questo subisce lo sblocco della funzionalità uretanica in ambiente acido e la successiva condensazione con la Boc-Dmt-OH per ottenere il derivato (**87**), il quale, in seguito a sblocco delle funzionalità carbossilica e amminica, permette l'ottenimento del composto desiderato (**89**).



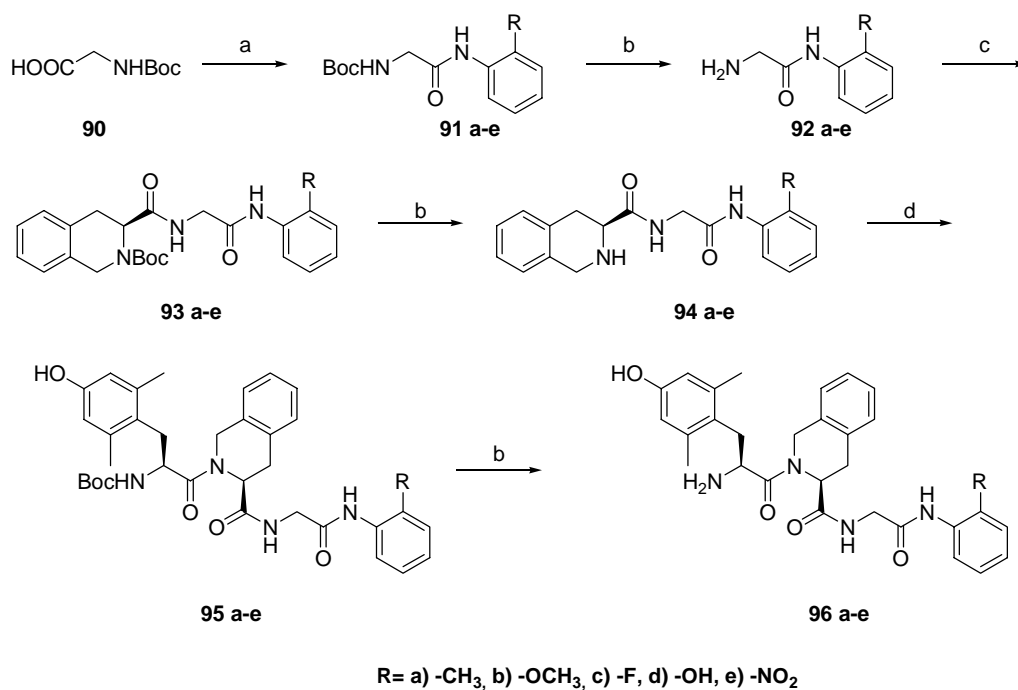
Schema 17

CONDIZIONI DI REAZIONE: a) Acido antranilico etilestere, IBCF, NMM, DMF anidra, $-20^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n. b) TFA. c) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBt, DMF, $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n. d) NaOH 1N, EtOH, R.T.

Sintesi dei composti anilidici *orto*-sostituiti

Come ultimo aspetto del mio progetto di dottorato, mi sono occupata della sintesi di analoghi del composto Dmt-Tic-Gly-anilide (DOP/MOP agonista estremamente affine e potente ma non selettivo, vedi figura 14) modificati a livello del secondo farmacoforo con anilidi diversamente *orto*-sostituite. Sono stati considerati come sostituenti gruppi con diverse caratteristiche chimico-fisiche (effetto elettrone attrattore/donatore, capacità di formare legami idrogeno, idrofilia/lipofilia ed acidità/basicità) allo scopo di identificare ligandi più selettivi nei confronti del sottotipo recettoriale DOP e possibilmente ad attività agonista.

La sintesi dei composti anilidici *orto*-sostituiti (con R = metile, metossile, fluoro, idrossile e nitro gruppo) è riportata nello schema 18.



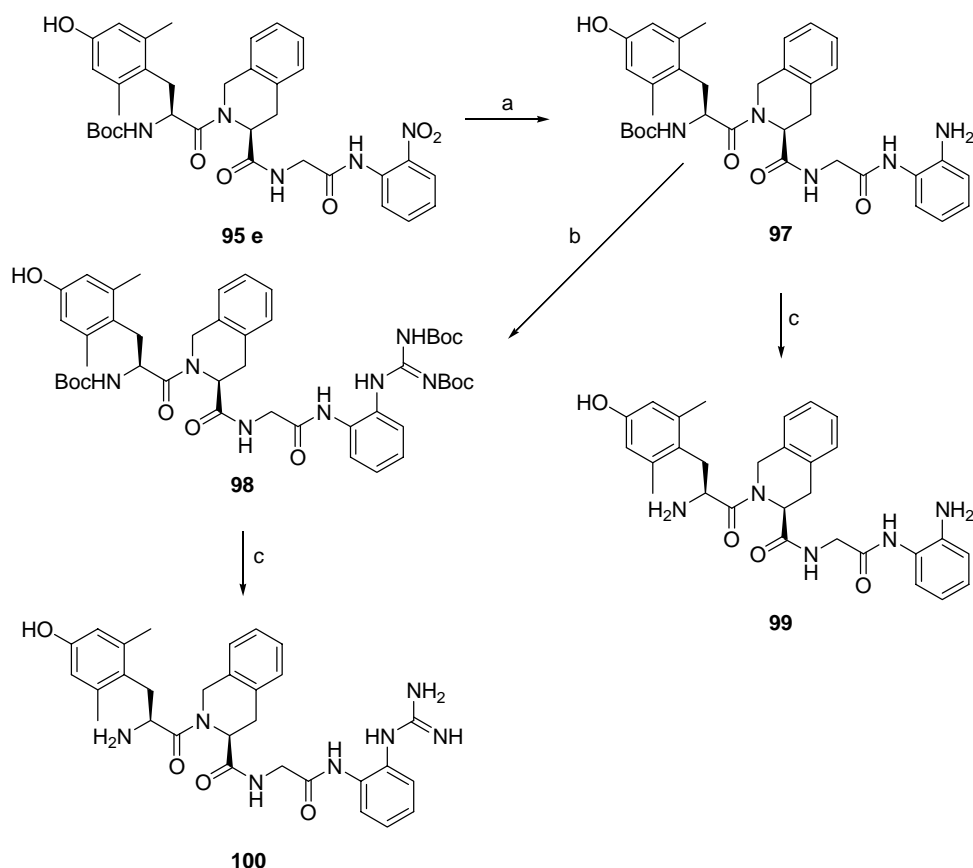
Schema 18

Condizioni di reazione: a) Aniline *orto*-sostituite, IBCF, NMM, DMF anidra, -20°C → R.T., o.n. b) TFA. c) Boc-Tic-OH, WSC, HOBT, DMF anidra, 0°C → R.T., o.n. d) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBT, DMF anidra, 0°C → R.T., o.n.

Il reagente comune è la Boc-Gly-OH (**90**), la cui funzionalità carbossilica viene attivata come anidride mista utilizzando IBCF e NMM per essere condensata con aniline variamente *orto*-sostituite. I composti così ottenuti (**91 a-e**) vengono deprotetti sull'azoto con TFA (**92 a-e**), quindi condensati con il Boc-Tic-OH, previa attivazione

del carbossile come estere attivo mediante WSC e HOBt, per ottenere gli intermedi (**93 a-e**). La successiva deprotezione e condensazione con la Boc-Dmt-OH ha fornito gli intermedi (**95 a-e**), che possono essere convertiti nei prodotti finali (**96 a-e**) per semplice sblocco del gruppo protettore Boc in TFA.

Nello schema 19 sono riportate le sintesi delle anilidi *orto*-sostituite con un gruppo amminico (**99**) e guanidinico (**100**).



Schema 19

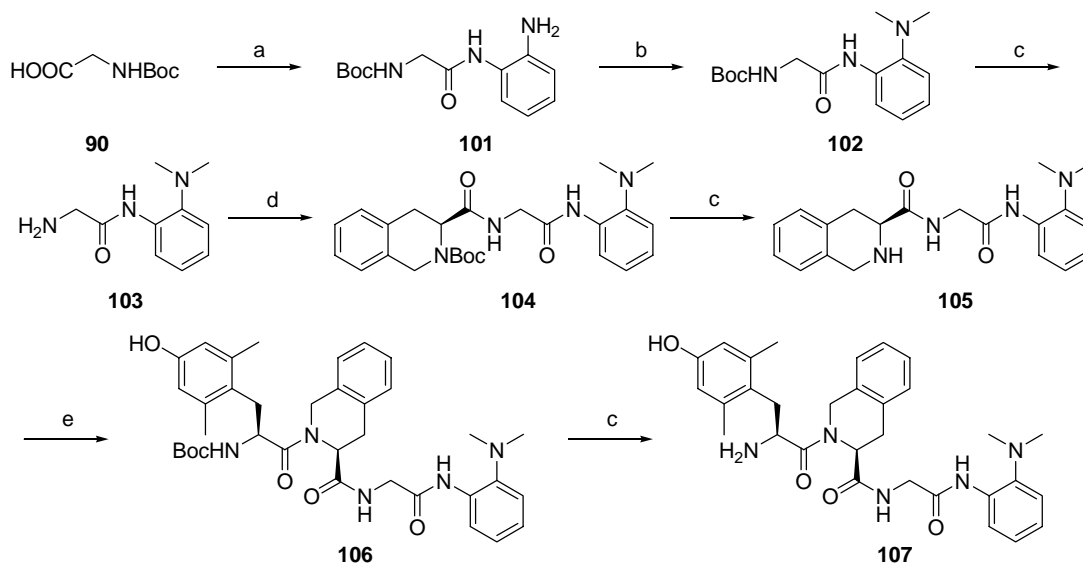
Condizioni di reazione: a) C/Pd 10%, HCOONH₄, Etanolo assoluto, R.T. b) N¹,N²-bis(*ter*butossicarbonil)-S-metilisotiourea, HgCl₂, DMF anidra, R.T., 4h. c) TFA.

L'intermedio **95 e**, che presenta in posizione C-terminale un'anilide *orto*-sostituita con un nitro gruppo, è stato ridotto con C/Pd 10% ed ammonio formiato⁴². L'intermedio (**97**) ottenuto è stato deprotezionato alla funzione N-terminale a dare il composto finale (**99**) oppure sottoposto a trasformazione della funzionalità amminica in guanidinica secondo

⁴² Legrand Y.M. *et al.*; *JACS* **2003**; 125: 15789-15795.

la metodica descritta in letteratura⁴³. La successiva deprotezione del gruppo amminico N-terminale ha fornito il composto finale (**100**).

La sintesi del prodotto (**107**), presentante in posizione *orto* dell'anello aromatico un'ammina dimetilata, è riportata nello schema 20.



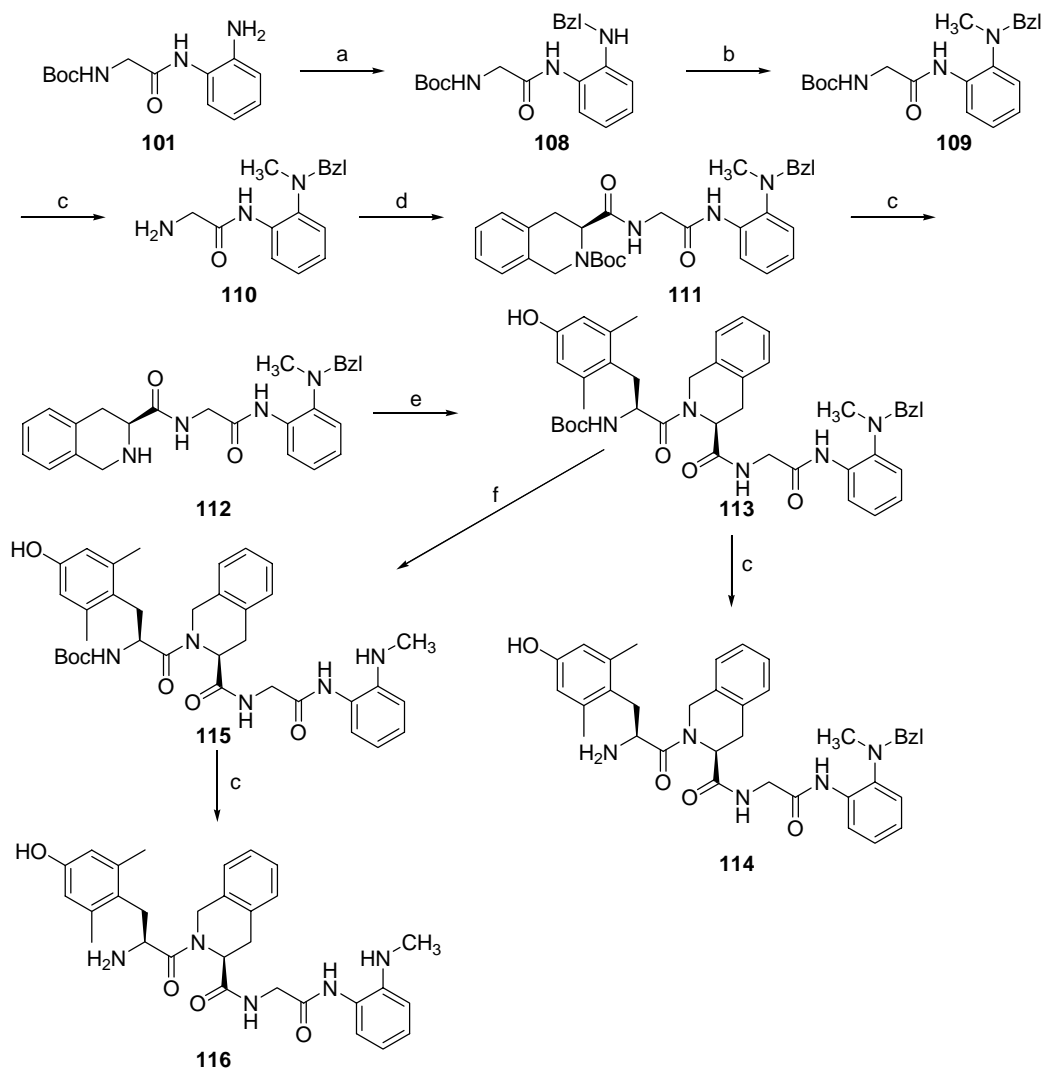
Schema 20

Condizioni di reazione: a) *O*-fenilendiammina, IBCF, NMM, DMF anidra, -20°C → R.T., o.n. b) HCHO 37%, NaCNBH₃, CH₃CN/H₂O 1:1, AcOH. c) TFA. d) Boc-Tic-OH, WSC, HOBT, DMF anidra, 0°C → R.T., o.n. e) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBT, DMF anidra, 0°C → R.T., o.n.

L'intermedio (**101**), ottenuto in seguito a condensazione della Boc-Gly-OH con la *o*-fenilendiammina, è stato dimetilato sulla funzionalità amminica aromatica attraverso una reazione di amminazione riduttiva con formaldeide acquosa, NaCNBH₃ e acido acetico glaciale (**102**). Le successive reazioni di deprotezione e condensazione con gli aminoacidi Boc-Tic-OH e Boc-Dmt-OH hanno fornito il prodotto finale desiderato (**107**).

Nello schema 21 è riportata la sintesi dei composti (**114**) e (**116**), recanti come gruppo in *orto* all'anello aromatico la benzilammina o la metil-benzilammina.

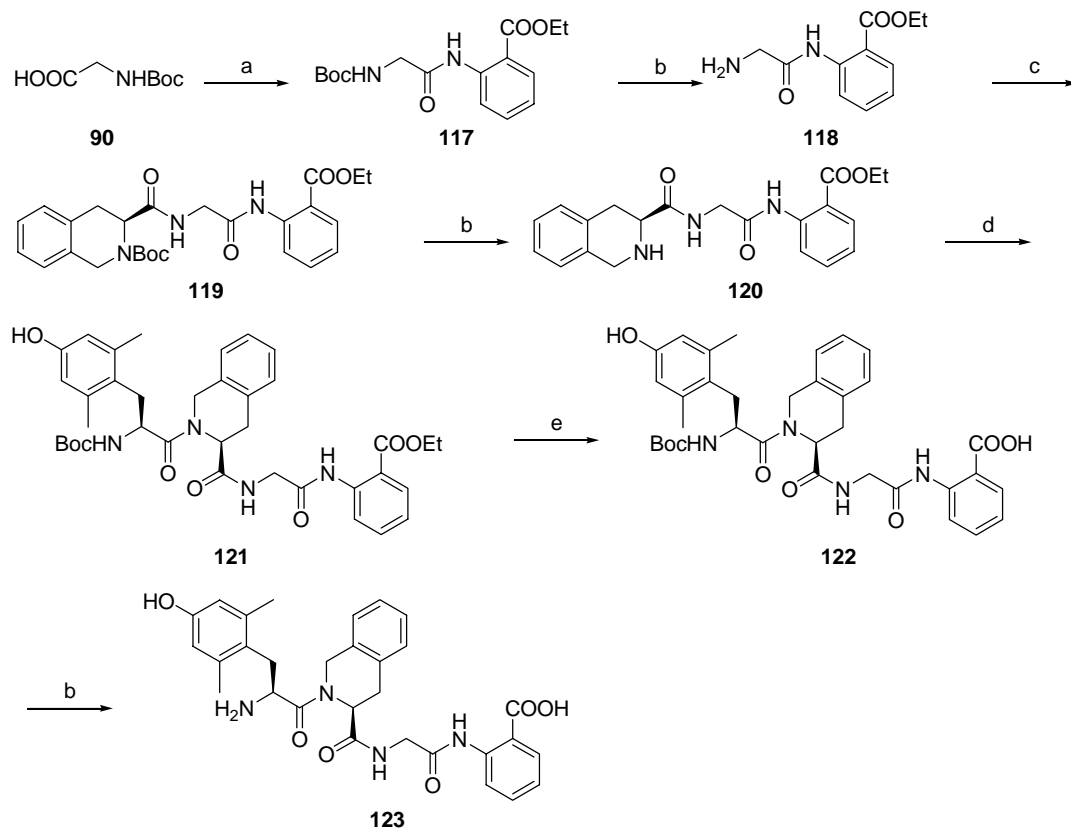
⁴³ Powell D.A. *et al.*; *JOC* **2003**; Vol.68; No.6.



Schema 21

Condizioni di reazione: a) Benzilbromuro, TEA, THF anidro, R.T., o.n. b) Metilioduro, THF anidro, R.T., o.n. c) TFA. d) Boc-Tic-OH, WSC, HOBT, DMF anidra, 0°C → R.T., o.n. e) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBT, DMF anidra, 0°C → R.T., o.n. f) H₂, C/Pd 10%, Metanolo, R.T., o.n.

L'intermedio (**101**) è stato protetto sulla funzionalità amminica aromatica come benzile e successivamente metilato (**109**). Secondo le reazioni descritte precedentemente è stato ottenuto l'intermedio (**113**), il quale è stato poi deprotetto all'N-terminale a dare il composto finale (**114**), oppure sottoposto a idrogenazione catalitica per rimuovere la protezione benzilica e successivamente trattato con TFA a dare il prodotto finale (**116**). L'ultimo composto progettato corrisponde all'analogo presentante come sostituente in *orto* all'anello aromatico un gruppo carbossilico. La sintesi è riportata nello schema 22.



Schema 22

Condizioni di reazione: a) Etil-2-amminobenzoato, IBCF, NMM, DMF anidra, $-20^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n. b) TFA. c) Boc-Tic-OH, WSC, HOBT, DMF anidra, $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n. d) Boc-Dmt-OH, WSC, HOBT, DMF anidra, $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{R.T.}$, o.n. e) NaOH 1N, Etanolo assoluto, R.T., o.n.

Le sintesi del composto (**123**) prevede la condensazione della Boc-Gly-OH con l'estere etilico dell'acido *orto*-ammino-benzoico (**90**). Secondo le reazioni di sblocco in TFA e condensazione con gli amminoacidi Boc-Tic-OH e Boc-Dmt-OH descritti precedentemente si ottiene l'intermedio (**121**), che viene saponificato nel corrispondente acido e sbloccato in TFA a dare il prodotto desiderato (**123**).

Risultati farmacologici dei composti olefinici

I 20 composti olefinici sintetizzati durante il mio progetto di dottorato sono stati valutati nel saggio del $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$, utilizzando come preparato farmacologico membrane di cellule CHO transfettate con il recettore DOP umano, presso i laboratori di Farmacologia del Professor Dave Lambert dell'Università di Leicester (UK). Tale test farmacologico permette di valutare sia la potenza che l'efficacia di un ligando DOP. Come molecola di riferimento DOP agonista è stato scelto il DPDPE ($[\text{DPen}^2, \text{DPen}^5]\text{Enkefalina}$). In figura 22 è riportata la curva dose-risposta del DPDPE nel saggio del $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$.

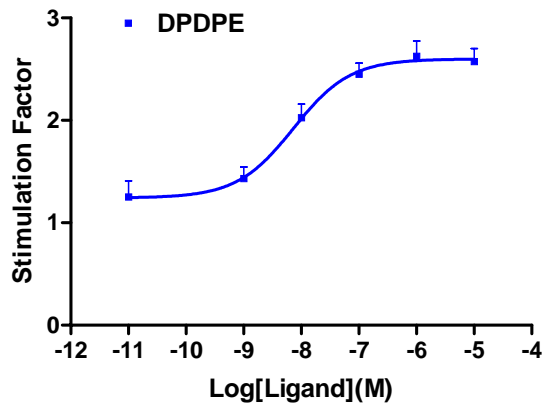


Figura 22

Utilizzando concentrazioni crescenti di ligando, viene valutato lo “stimulating factor”, ossia la percentuale di attivazione della proteina G rispetto ad un massimo di attivazione, posto come 100%, determinato dall'agonista di riferimento DPDPE. Ponendo in un grafico la percentuale di “stimulating factor” rispetto a “log_{CM}” (logaritmo della concentrazione molare di ligando utilizzato) si otterrà una curva di tipo sigmoide in caso di un'attività di tipo agonista, che raggiungerà l'Emax (effetto massimo, ovvero 100% di “stimulating factor” rispetto al DPDPE) in caso di agonismo pieno, mentre mostrerà un Emax ridotto in caso di agonismo parziale. Se il ligando testato è invece un antagonista, la curva risulterà una retta parallela all'asse delle ascisse, indice del fatto che, anche aumentando all'infinito la concentrazione del composto, la proteina G non viene attivata. Esiste poi il caso di agonismo inverso, in cui il composto, oltre a legare il recettore e non attivarlo, inibisce anche l'attività costitutiva che il recettore possiede in assenza del legame con l'agonista. Questo comportamento

viene identificato da una curva sigmoide opposta a quella generata da un'attività di tipo agonista.

La pEC_{50} è il valore che esprime la potenza dell'agonista ed è definita come il logaritmo negativo in base 10 della concentrazione molare di agonista necessaria per raggiungere il 50% dell'effetto massimo (E_{max}).

La potenza dell'antagonista è espressa invece in termini di pA_2 , ossia il logaritmo negativo in base 10 della concentrazione molare di antagonista in presenza del quale è necessario raddoppiare la concentrazione di agonista per raggiungere la risposta evocata in origine. Tale valore viene ricavato da esperimenti in cui vengono incubate una concentrazione fissa di antagonista e concentrazioni crescenti dell'agonista di riferimento (DPDPE) e in cui si valuta il grado di spostamento della curva sigmoide dell'agonista in assenza e in presenza di antagonista (più lo spostamento della curva verso destra è grande, maggiore è la potenza dell'antagonista).

I dati farmacologici ottenuti con i composti originali generati in questo lavoro di tesi sono stati suddivisi in base al secondo farmacoforo: carbossile (tabella 1), anilide (tabella 2), benzilammide (tabella 3), benzoimidazolo (tabella 4) e fenile (tabella 5). Come agonista DOP di riferimento è stato utilizzato il DPDPE, mentre come antagonista il derivato $(CH_3)_2N$ -Dmt-Tic-OH, uno dei composti DOP antagonisti più potente e selettivo noto in letteratura²².

²² Salvadori S. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1997**; 40: 3100-3108.

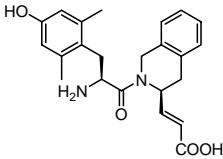
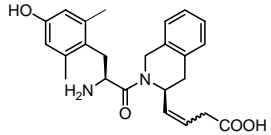
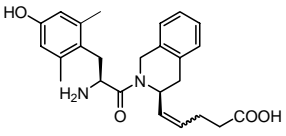
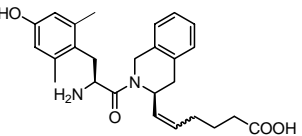
Composto	E _{max}	pEC ₅₀	pA ₂
DPDPE	2.38 ± 0.07	8.16 ± 0.04	-
(CH ₃) ₂ N-Dmt-Tic-OH	-	-	9.40
(44 a) 	-	-	9.68
(44 b) 	-	-	7.89
(44 c) 	-	-	7.27
(44 d) 	-	-	7.49

Tabella 1

Come si può notare dalla tabella 1, la funzionalizzazione del messaggio DOP antagonista Dmt-Tic con uno spacer olefinico di lunghezza variabile portante una funzione carbossilica ha generato in tutti i casi indagati composti DOP antagonisti. Tra questi solo il composto (44 a), in cui la funzione acida è stata allontanata dal Dmt-Tic con due atomi di carbonio, ha mostrato valori di potenza paragonabili al riferimento. L'incremento della distanza tra il Dmt-Tic e la funzione acida (composti 44 b-d) ha generato molecole circa cento volte meno potenti del riferimento. Questi dati suggeriscono che la distanza della funzione acida dal farmacoforo Dmt-Tic entro certi limiti può essere tollerata e comunque il suo incremento riduce la potenza senza variazione di efficacia.

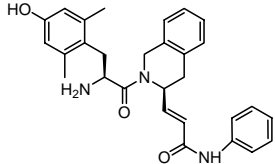
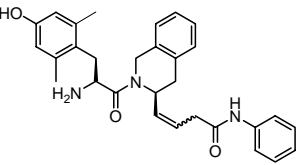
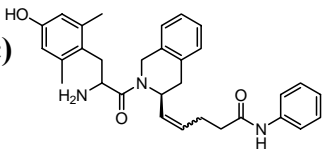
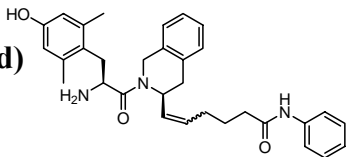
Composto	E _{max}	pEC ₅₀	pA ₂
DPDPE	2.38 ± 0.07	8.16 ± 0.04	-
(CH ₃) ₂ N-Dmt-Tic-OH	-	-	9.40
(31 a) 	2.35 ± 0.07	8.83 ± 0.41	-
(31 b) 	1.52 ± 0.07	8.45 ± 0.41	-
(31 c) 	1.52 ± 0.07	7.09 ± 0.04	-
(31 d) 	1.21 ± 0.07	7.27 ± 0.17	-

Tabella 2

In tabella 2 sono riassunti i risultati ottenuti utilizzando come secondo farmacoforo un'anilide. In tutti i casi investigati si ha un importante aumento di efficacia rispetto agli analoghi col carbossile libero. In particolare, il composto (31 a) è risultato essere un agonista pieno più potente rispetto al DPDPE in grado però di evocare un effetto massimo paragonabile. L'incremento della distanza tra il farmacoforo Dmt-Tic e l'anilide produce un sostanziale calo di efficacia abbinato ad una progressiva perdita di potenza.

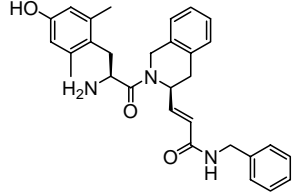
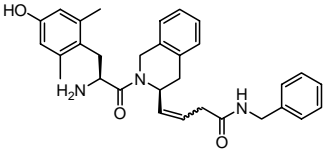
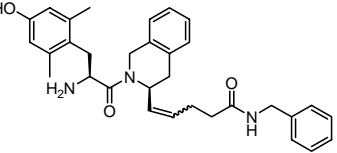
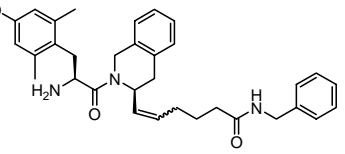
Composto	E _{max}	pEC ₅₀	pA ₂
DPDPE	2.38 ± 0.07	8.16 ± 0.04	-
(CH ₃) ₂ N-Dmt-Tic-OH	-	-	9.40
(35 a) 	1.50 ± 0.18	9.18 ± 0.08	-
(35 b) 	1.24 ± 0.04	8.18 ± 0.12	8.61
(35 c) 	1.34 ± 0.04	7.69 ± 0.46	-
(35 d) 	1.37 ± 0.11	7.56 ± 0.34	-

Tabella 3

In tabella 3 sono riassunti i dati farmacologici ottenuti utilizzando come secondo farmacoforo la benzilammide. In questo caso tutti i composti sono risultati degli agonisti parziali. In particolare il composto (35 a) ha mostrato una potenza circa dieci volte superiore rispetto a quella del DPDPE. L'inserimento di un atomo di carbonio nello spacer (35 b) ha prodotto un DOP agonista parziale con una pEC₅₀ paragonabile al DPDPE e un valore di pA₂ di 8.61. L'ulteriore incremento di lunghezza dello spacer (35 c-d) ha prodotto una sostanziale riduzione di potenza.

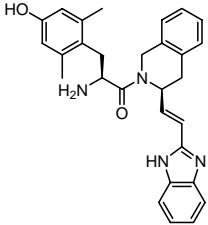
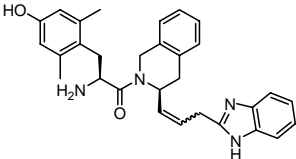
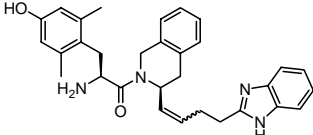
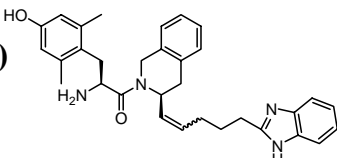
Composto	E _{max}	pEC ₅₀	pA ₂
DPDPE	2.38 ± 0.07	8.16 ± 0.04	-
(CH ₃) ₂ N-Dmt-Tic-OH	-	-	9.40
(39 a) 	2.24 ± 0.05	9.30 ± 0.01	-
(39 b) 	1.76 ± 0.01	8.19 ± 0.12	-
(39 c) 	1.60 ± 0.09	6.80 ± 0.05	-
(39 d) 	1.50 ± 0.02	7.96 ± 0.03	-

Tabella 4

I dati ottenuti utilizzando come secondo farmacoforo un nucleo benzoimidazolico sono riassunti in tabella 4. In questo caso lo spacer più corto (n=0, composto **39 a**) ha prodotto un DOP agonista pieno dieci volte più potente rispetto al DPDPE. L'aumento della lunghezza dello spacer ha generato composti DOP agonisti parziali abbinato ad una riduzione di potenza rispetto al composto (**39 a**).

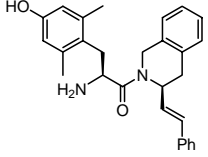
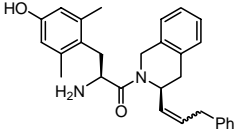
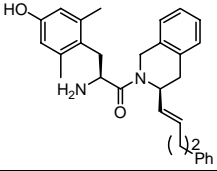
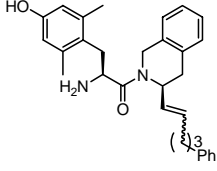
Composto	E _{max}	pEC ₅₀	pA ₂
DPDPE	2.38 ± 0.07	8.16 ± 0.04	-
(CH ₃) ₂ N-Dmt-Tic-OH	-	-	9.40
(64 a) 	1.86 ± 0.18	8.20 ± 0.31	-
(64 b) 	1.50 ± 0.34	8.33 ± 0.17	-
(64 c) 	1.78 ± 0.10	8.98 ± 0.05	-
(64 d) 	1.35 ± 0.05 1.38 ± 0.03	8.69 ± 0.03 8.65 ± 0.03	8.74 9.07

Tabella 5

In tabella 5 sono riportati i dati farmacologici ottenuti utilizzando come secondo farmacoforo un fenile. In tutti i casi investigati si sono ottenuti dei DOP agonisti parziali con potenza paragonabile (**64 a-b**) o leggermente superiore (**64 c-d**) rispetto al DPDPE. Per il composto (**64 d**) è stato possibile separare mediante HPLC preparativo i due isomeri E/Z, che, testati singolarmente, non hanno mostrato sostanziali differenze di potenza nè come agonisti nè come DOP antagonisti, suggerendo che l'isomeria geometrica non incide in modo apprezzabile sull'attività biologica di questi analoghi, quantomeno con uno spacer in cui n=3.

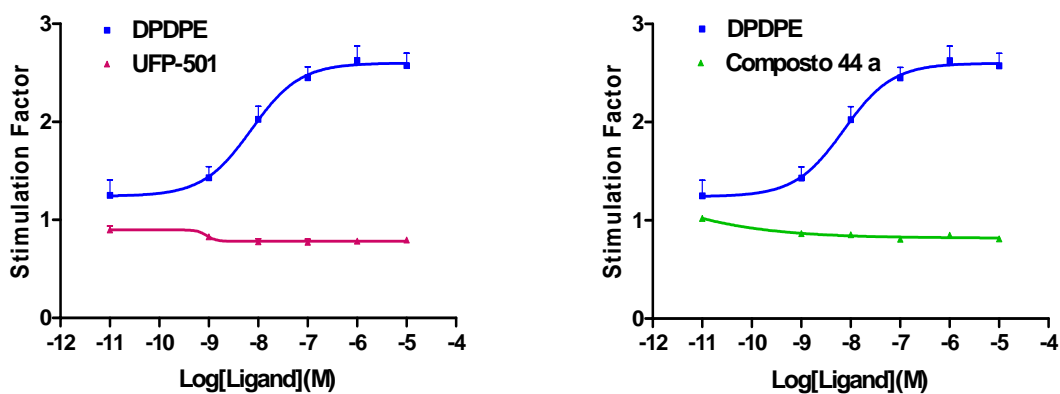
Al momento non sono disponibili valori di affinità e potenza per i recettori MOP e KOP, pertanto non siamo in grado di valutare la selettività di questa nuova classe di composti. Questa serie di dati sarà però generata a breve.

Dall'analisi dei dati farmacologici ottenuti sul recettore DOP si può comunque osservare che utilizzando come secondo farmacoforo un carbossile si ottengono

solamente composti antagonisti. Composti agonisti potenti si ottengono utilizzando come secondo farmacoforo l'anilide (composto **31 a**) o il benzoimidazolo (composto **39 a**), in cui la distanza in termini di atomi tra il Dmt-Tic ed il secondo aromatico è identica (4 atomi). Nel caso delle benzilammidi, in cui questa distanza è superiore, si sono ottenuti solo agonisti parziali. Anche nel caso in cui il secondo farmacoforo sia un fenile e a parità di distanza tra il Dmt-Tic e l'aromatico (4 atomi, composto **64 c**) si è generato un DOP agonista parziale potente.

La presenza nel secondo farmacoforo di un NH anilidico o inserito in un sistema benzoimidazolico, posto ad un'opportuna distanza dal farmacoforo Dmt-Tic, potrebbe essere importante per la piena attivazione del recettore DOP. Degno di nota il fatto che i composti (**31 a** e **35 a**) conservano invariata la posizione del gruppo ammidico dello spacer, però il composto (**35 a**) è caratterizzato da un NH "non aromatico". Questa caratteristica, oltre all'incremento della distanza tra il Dmt-Tic e il secondo farmacoforo di un atomo rispetto a (**31 a**), potrebbe essere responsabile della parziale attivazione del recettore DOP.

È importante sottolineare che il composto Dmt-Tic-CH=CH-COOH (**44 a**), valutato nel saggio del $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$, è risultato essere un agonista inverso (figura 23), in grado di antagonizzare il 20% dell'attività costitutiva del recettore DOP con una potenza quasi 3 volte maggiore rispetto al riferimento $(\text{CH}_3)_2\text{N-Dmt-Tic-OH}$ (UFP 501).

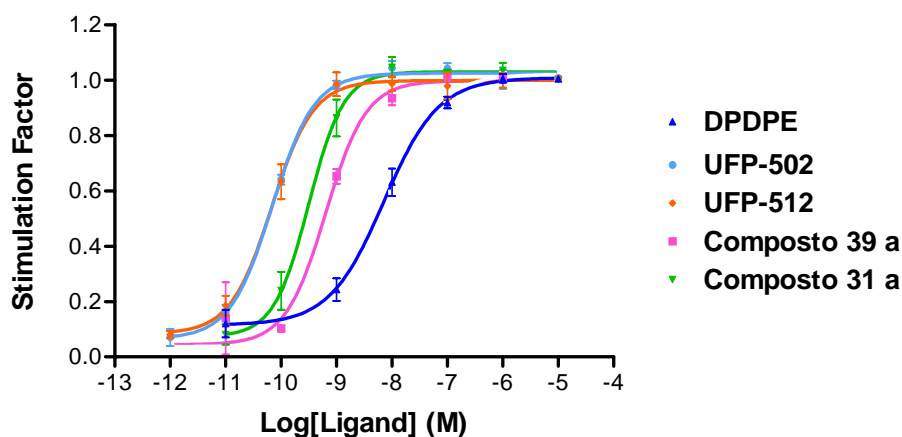


	Bottom	Top	% inhibition
UFP-501	0.78	0.90	-14%
Composto 44 a	0.81	1.02	-20%

Figura 23

Risultati analoghi erano stati ottenuti per i composti Dmt-Tic-OH, che si comporta da agonista inverso parziale, e (CH₃)₂N-Dmt-Tic-NH₂, che si comporta invece da agonista inverso⁴⁴.

I risultati ottenuti per i due agonisti pieni identificati in questo studio (composti **31 a** e **39 a**) sono stati confrontati con quelli relativi a due composti precedentemente identificati: **UFP 502** (Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid) e **UFP 512** (Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid) (Figura 24).



	DPDPE	UFP-502	UFP-512	Composto 39 a	Composto 31 a
pEC₅₀	8.14	10.16	10.17	9.19	9.49

Figura 24

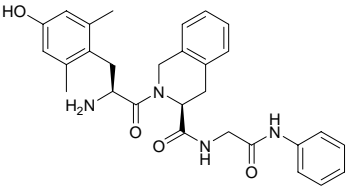
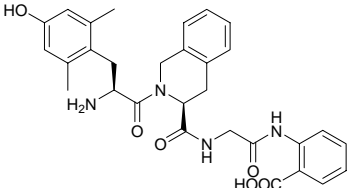
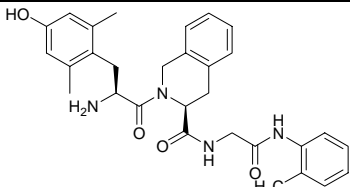
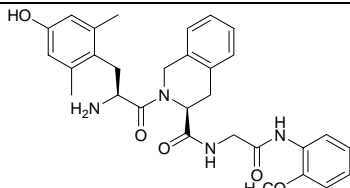
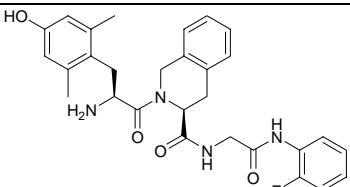
Anche se i risultati sono stati ottenuti in due set di esperimenti separati (sarà quindi necessario ripetere questi esperimenti in un unico set in modo d'avere un confronto di potenza preciso tra i vari composti), la figura mostra come i derivati olefinici riescano ad attivare il recettore DOP dando lo stesso effetto massimo dei composti di riferimento, comportandosi da agonisti pieni. Anche se la loro potenza risulta essere inferiore rispetto a UFP-502 e UFP-512 (dato da verificare in esperimenti paralleli), la presenza del legame olefinico potrebbe incrementare la loro stabilità metabolica ed il loro passaggio attraverso la barriera emato-encefalica. I composti (**31 a**) e (**39 a**) rappresentano pertanto nuove molecole DOP agoniste utilizzabili per esperimenti *in vivo* sull'animale.

⁴⁴ M. Labarre *et al.*; *European Journal of Pharmacology* **2000**; R1-R3.

Risultati farmacologici dei derivati anilidici *orto*-sostituiti

Tutti i composti sono stati valutati in saggi di binding recettoriale nei laboratori del Dottor Lawrence Lazarus presso il National Institute of Environmental Health Science Research (Triangle Park, North Carolina 27709, USA) al fine di valutarne l'affinità e la selettività nei confronti dei recettori oppioidi MOP e DOP. Come preparato farmacologico è stata utilizzata la frazione sinaptosomale P₂ di cervello di ratto. [³H] deltorfina II è stata impiegata come radioligando per il recettore DOP mentre [³H] DAMGO è stato utilizzato come radioligando per il recettore MOP.

I dati sono riportati come costante di affinità K_i (nM) e riassunti in Tabella 6.

Struttura	K _i DOP (nM)	K _i MOP (nM)	MOP/DOP
	0.042	0.16	3.6
 (123)	0.065	118.6	1,825
 (96 a)	0.067	0.378	6
 (96 b)	0.059	0.570	10
 (96 c)	0.067	0.478	7

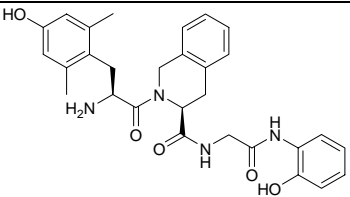
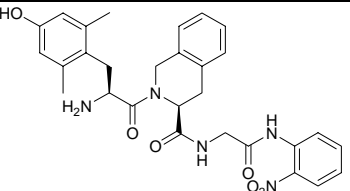
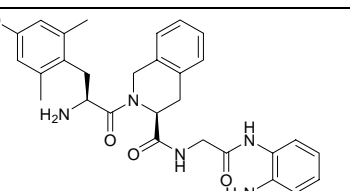
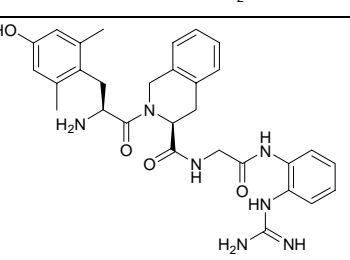
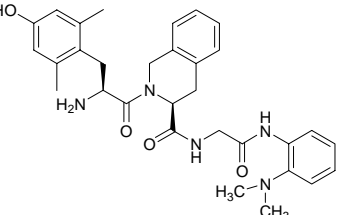
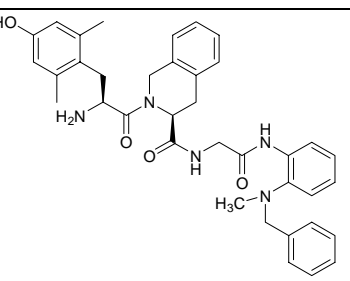
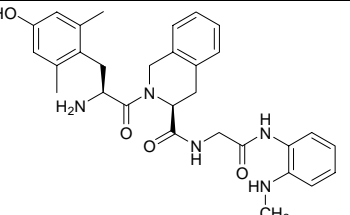
Struttura	<i>K_i</i> DOP (nM)	<i>K_i</i> MOP (nM)	MOP/DOP
 <p>(96 d)</p>	0.415	5.36	13
 <p>(96 e)</p>	0.058	0.502	9
 <p>(99)</p>	0.063	0.492	8
 <p>(100)</p>	2.353	2.86	1
 <p>(107)</p>	0.202	0.965	5
 <p>(114)</p>	0.539	3.08	6
 <p>(116)</p>	0.157	1.72	11

Tabella 6

Come composto di riferimento è stato utilizzato Dmt-Tic-Gly-anilide, caratterizzato dalla presenza al C-terminale di un'anilide non sostituita, che presenta un valore di affinità di 0,042 nM per il recettore DOP e di 0,16 nM per il recettore MOP, con una selettività DOP/MOP pari a 3,6. La molecola che abbiamo scelto come riferimento è pertanto un ligando DOP non selettivo con elevata affinità.

L'introduzione sulla posizione *orto* dell'anilide al C-terminale di vari gruppi funzionali con diverse caratteristiche chimico-fisiche non modifica in modo sostanziale l'affinità DOP, generando una serie di composti con K_{iDOP} compresa nel range 0,06-3 nM.

Lo stesso comportamento può essere osservato nei confronti del recettore MOP, per il quale si sono determinati valori di K_{iMOP} nel range 0,3-5 nM, ad eccezione del composto Dmt-Tic-Gly-*o*(COOH)anilide (**123**), caratterizzato da una funzione carbossilica in posizione *orto* dell'anilide, che ha manifestato una K_{iMOP} di 118 nM.

Questa importante riduzione dell'affinità MOP rispetto al composto di riferimento (circa 500 volte), associata ad una quasi invariata affinità DOP, ha permesso di ottenere un composto di elevata selettività MOP/DOP (K_{iMOP}/K_{iDOP} 1825).

Il fatto che la sostituzione nella posizione *orto* dell'anilide al C-terminale del composto H-Dmt-Tic-Gly-anilide con diversi gruppi funzionali, caratterizzati da differenti proprietà chimico-fisiche, abbia generato molecole con attività DOP/MOP sostanzialmente paragonabile a quella della molecola di riferimento, suggerisce che questa posizione non è coinvolta in un'interazione specifica con i recettori menzionati. Inoltre, l'aver utilizzato gruppi con effetto elettron-donatore o elettron-attrattore nei confronti del fenile senza aver ottenuto sostanziali variazioni di attività DOP e MOP, suggerisce che l'assetto elettronico dell'anello benzenico dell'anilide non è di cruciale importanza per l'interazione recettoriale.

Quanto detto potrebbe non essere completamente corretto per il composto Dmt-Tic-Gly-*o*(COOH)anilide (**123**), caratterizzato dalla funzione carbossilica acida in posizione *orto* dell'anilide. L'importante calo di affinità MOP potrebbe essere dovuto all'incapacità del recettore stesso di alloggiare la carica negativa ed anche al fatto che secondo la teoria di preselezione di membrana proposta da Schwyzer, l'incremento della carica negativa in ligandi oppioidi favorisce l'interazione DOP e sfavorisce l'interazione MOP⁴⁵.

⁴⁵ Schwyzer R. *et al.*; *Biochemistry* **1986**; 25: 6335-6341.

A questo riguardo, l'introduzione di una funzionalità carbossilica acida nel DOP agonista non selettivo Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid (Figura 25) ha portato al composto Dmt-Tic-NH-CH-(CH₂-COOH)-Bid, che si comporta da DOP agonista con un incremento di selettività DOP di circa 10 volte rispetto alla molecola da cui deriva²⁷.

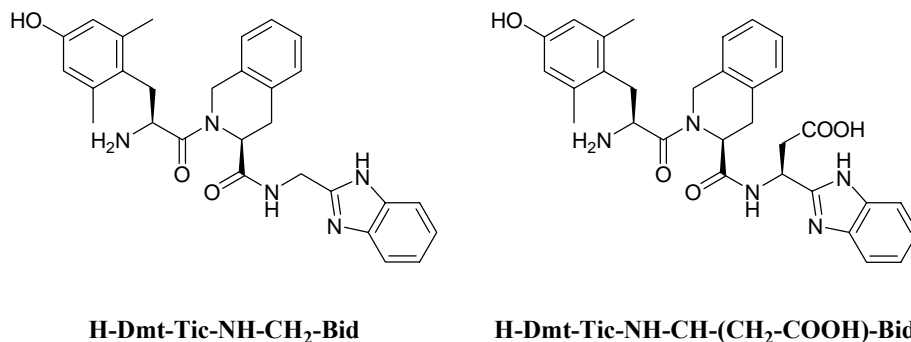


Figura 25

La molecola Dmt-Tic-Gly-*o*(COOH)anilide (**123**) mostra una selettività MOP/DOP di 1800 e rappresenta pertanto un ligando DOP tra i più selettivi attualmente disponibili. Il composto Dmt-Tic-Gly-*o*(NH₂)anilide (**99**), che rappresenta l'analogo aperto di Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid, è caratterizzato da valori di affinità recettoriale DOP/MOP e selettività assolutamente paragonabili a quest'ultimo, suggerendo che il sistema benzoimidazolico non è cruciale per l'attività biologica di Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid.

Il prodotto Dmt-Tic-Gly-*o*(N(CH₃)Bzl)anilide (**114**), in cui l'anilide presenta in posizione *orto* un gruppo benzilico, suggerisce che la tasca dei recettori DOP e MOP, in grado di alloggiare questa porzione del ligando, non presenta dimensioni particolarmente stringenti.

Al momento non sono disponibili dati circa l'efficacia di questi nuovi analoghi, non è possibile pertanto valutare se le modifiche introdotte in posizione C-terminale del dipeptide Dmt-Tic possano contribuire in modo sostanziale all'attivazione dei recettori MOP e DOP. L'unico dato a riguardo è relativo al composto Dmt-Tic-Gly-*o*(CH₃)anilide (**96 a**), particolarmente affine per i recettori MOP e DOP e non selettivo.

²⁷ Balboni G. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2002**; 45: 5556-5563.

Tale derivato è stato valutato in saggi *in vivo* di “Hot Plate” (HP) e “Tail Flick” (TF) (Figure 26 e 27).

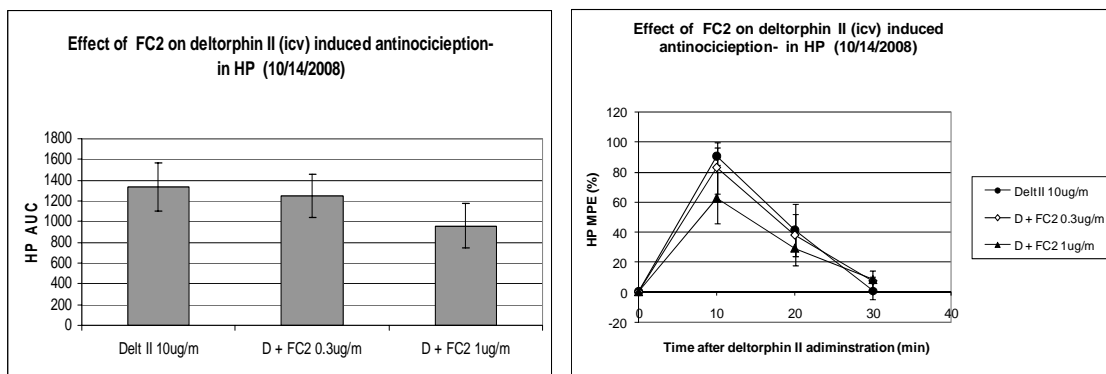


Figura 26

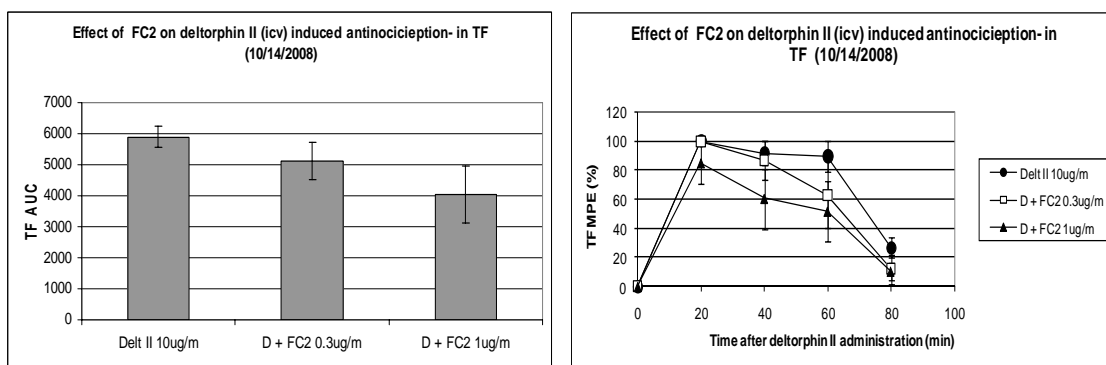


Figura 27

Dall’osservazione dei risultati ottenuti e mostrati in figura 26 e 27 è possibile affermare che il composto testato (**96 a**), presentante un sostituito metilico in posizione *orto* dell’anilide, è in grado di antagonizzare, anche se con potenza modesta, l’effetto analgesico ottenuto in seguito alla somministrazione i.c.v. di deltorfina II (DOP agonista selettivo) sia in saggi di “Hot Plate” che di “Tail Flick”. Tale composto è risultato essere perciò un DOP antagonista. Lo stesso tipo di saggio verrà effettuato su tutti i composti sintetizzati in modo da poterne definire l’attività (agonista o antagonista) sia verso il recettore DOP che verso il MOP.

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata investigata la possibilità di individuare nuovi ligandi dei recettori oppioidi utilizzando come “*Message Domain*” il dipeptide Dmt-Tic, in grado di determinare un’elevata selettività DOP e la sola capacità di occupazione recettoriale.

Ho dedicato parte del periodo di dottorato alla sintesi dell’amminoacido non naturale S-Dmt, essendo questo indispensabile in numerosi ligandi oppioidi ad attività sia agonista che antagonista. In un primo approccio ho cercato di riprodurre gli schemi sintetici riportati in letteratura, in particolare ho focalizzato la mia attenzione sulla sintesi del deidroamminoacido³¹ (**8**) applicando la reazione di Heck tra il 4-iodo-3,5-dimetil-fenolo e il metil-2-acetamido acrilato. Tale via sintetica mi ha permesso di accumulare 100 gr di intermedio (**8**), che è stato successivamente sottoposto a idrogenazione enantioselettiva nei laboratori della Prof.ssa Carmen Claver presso l’Università di Tarragona (Spagna). In secondo luogo, attraverso una collaborazione con il Prof. Gianni Porzi del Dipartimento di Chimica Organica “G. Ciamician” dell’Università di Bologna, ho messo a punto una nuova via sintetica per la sintesi dell’amminoacido Dmt. Tale metodologia prevede come reazione chiave la dialchilazione dell’intermedio dichetopiperazinico chirale (**15**) con l’alogenuro (**16**) a dare il derivato (**19**) con buone rese chimiche e un eccesso diastereoisomerico maggiore al 98% (Figura 28).

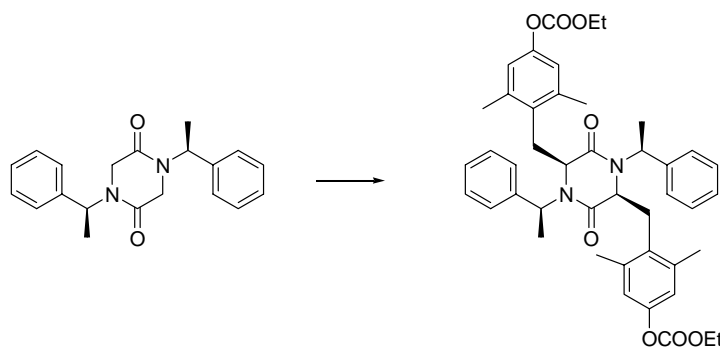


Figura 28

³¹ John H. Dygos *et al.*; *Synthesys* **1992**; 741-743.

In seguito ad idrolisi acida del precursore dichetopiperazinico (**19**) è stato possibile ottenere l'amminoacido desiderato in configurazione assoluta S (potere ottico rotatorio specifico in accordo con quello pubblicato in letteratura).

Tale metodologia chimica risulta particolarmente interessante in quanto permette di sintetizzare numerosissimi amminoacidi sia in configurazione assoluta S che R. La stereochimica dell'amminoacido risultante è indotta dal sostituente chirale sugli azoti del nucleo dichetopiperazinico, quindi può essere facilmente modulata scegliendo di utilizzare la (S)-1-fenilettilammina se si desidera ottenere l'(S)-amminoacido, oppure la (R)-1-fenilettilammina in caso interessi l'enantiomero opposto. Unico limite di questa tecnica è la possibilità di disporre dell'alogenuro (bromuro o ioduro) corrispondente alla catena laterale dell'amminoacido.

Visto l'enorme interesse che potrebbero avere molecole oppioidi ad attività mista DOP antagonista / MOP agonista (utili per il trattamento del dolore cronico) o DOP agonista (potenziali farmaci ad azione antidepressiva) utilizzabili in studi cronici sull'animale, ho preso in considerazione inoltre la progettazione e la sintesi di analoghi dei ligandi oppioidi più selettivi e potenti, precedentemente sintetizzati nel laboratorio in cui ho sviluppato la tesi, che avessero però caratteristiche di maggiori lipofilia e resistenza metabolica. A tale scopo ho sintetizzato una serie di 20 derivati di struttura generale $\text{Dmt-Tic-CH=CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-R}$. Ho sostituito quindi il legame ammidico tra il dipeptide Dmt-Tic ed il secondo farmacoforo con un legame olefinico (non idrolizzabile da parte delle peptidasi e maggiormente lipofilo) di lunghezza variabile ($n=0-3$). Come secondo farmacoforo (R) ho considerato il carbossile, l'anilide, la benzilammide, il benzoimidazolo e il fenile, generando la serie di composti mostrata in figura 29.

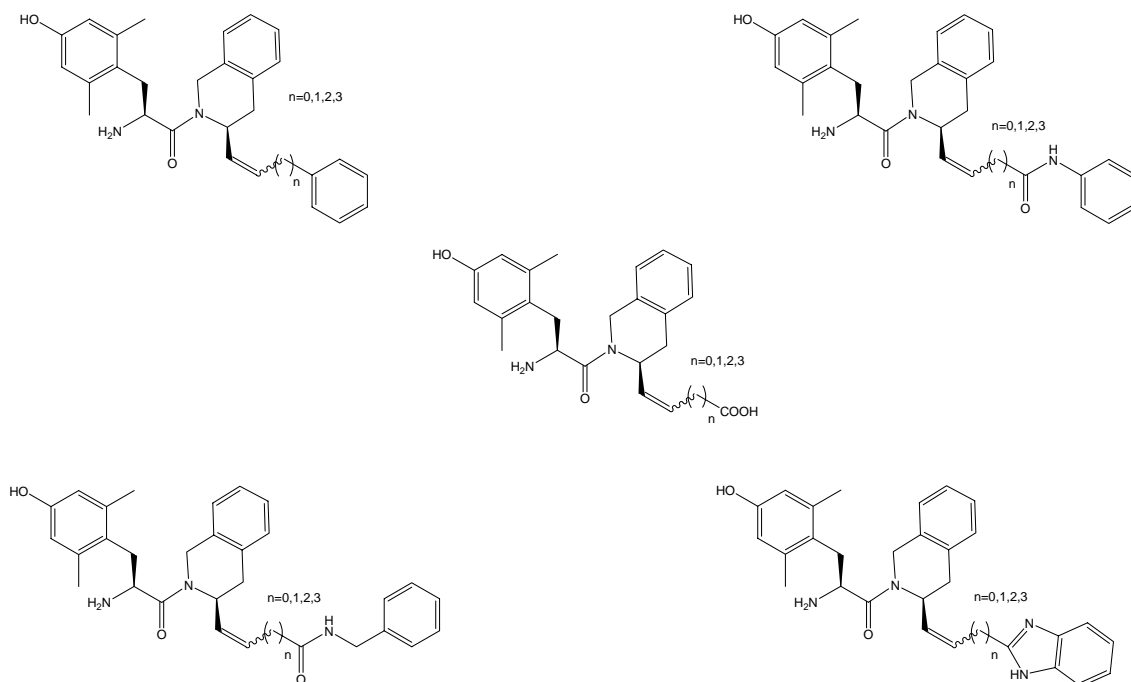
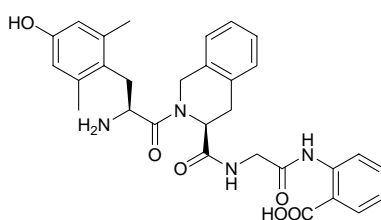


Figura 29

Tali composti sono stati valutati in saggi di $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ su membrane di cellule CHO esprimenti il recettore DOP, che hanno rivelato la presenza di agonisti pieni, agonisti parziali, antagonisti e agonisti inversi del recettore DOP. I più interessanti sono risultati essere quelli con $n=0$ e sono quindi stati ulteriormente modificati, ad esempio riducendo lo spacer olefinico ad alcano.

In attesa di poter disporre di dati farmacologici di binding recettoriale e di poter quindi valutare la loro selettività nei confronti degli altri sottotipi recettoriali, possiamo concludere che dalla serie completa sono stati ottenuti composti con attività farmacologiche molto interessanti e con una potenza paragonabile o leggermente inferiore rispetto ai ligandi di riferimento. È auspicabile che le caratteristiche chimico-fisiche dei nuovi derivati sintetizzati ne facilitino l'attraversamento della barriera emato-encefalica (il legame olefinico/alcanico ha un maggior grado di lipofilia rispetto al legame ammidico) e ne aumentino la stabilità metabolica (le peptidasi endogene idrolizzano facilmente il legame peptidico ma non sono attive nei confronti di quello olefinico/alcanico), rendendone così possibile l'impiego in studi cronici sull'animale, in cui è necessario utilizzare ligandi che, somministrati perifericamente, siano in grado di svolgere la loro azione a livello centrale.

Infine, in questo lavoro di tesi è stata generata una nuova serie di ligandi DOP e MOP partendo dalla molecola DOP selettiva Dmt-Tic. Tale farmacoforo è stato funzionalizzato in posizione C-terminale con un residuo di Glicina ulteriormente derivatizzata con anilidi diversamente *orto*-sostituite. Dall'analisi farmacologica dei composti sintetizzati, valutati in saggi di binding recettoriale per verificarne l'affinità e la selettività nei confronti dei recettori DOP e MOP, si può chiaramente notare come tutti i composti prodotti siano in grado di legare entrambi i sottotipi recettoriali con una elevata affinità ma scarsa selettività, ad eccezione del composto (**123**), che risulta essere DOP selettivo. Da ciò si può dedurre che la modifica chimica considerata permette l'interazione sia con il recettore DOP che con il recettore MOP, a indicare come questa posizione non sia direttamente coinvolta in un'interazione specifica con i recettori menzionati. Inoltre sembra che anche l'assetto elettronico dell'anello benzenico non sia di cruciale importanza per l'interazione recettoriale. Quanto detto sembra non essere completamente corretto per il composto (**123**), caratterizzato dalla presenza di una funzionalità acida in posizione *orto* all'anilide.



Composto (**123**)

Tale composto mostra infatti un'enorme selettività per il recettore DOP (l'affinità per il recettore DOP è paragonabile a quella degli altri analoghi, mentre risulta molto inferiore l'affinità per il recettore MOP). Il suo considerevole calo di affinità nei confronti del recettore MOP potrebbe essere causato dall'incapacità del recettore stesso di alloggiare la carica negativa.

In attesa di valutare i dati farmacologici risultanti da saggi funzionali di $GTP\gamma^{35}S$ sui recettori MOP e DOP e di poter quindi delineare un profilo di attività di tutti i composti sintetizzati, ho preso in considerazione ulteriori modificazioni chimiche del composto (**123**). In particolare, sono state effettuate la dimetilazione dell'ammina primaria, lo spostamento della carica negativa dalla posizione *orto* alle posizioni *meta* e *para* ed infine l'introduzione di due cariche negative in varie posizioni sull'anello aromatico.

Sarebbe auspicabile che i composti ad affinità MOP/DOP non selettivi mostrassero un'attività mista di tipo DOP antagonista / MOP agonista (profilo farmacologico utile in terapia per il trattamento del dolore cronico), mentre i composti DOP selettivi avessero invece un'attività DOP agonista (possibilità di applicazione terapeutica come antidepressivi).

PARTE SPERIMENTALE

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

Le reazioni e le miscele di prodotti sono state controllate mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su lastre di gel di silice Macherey-Nagel poligram SIL/UV 254 da 0.25 mm, usando come sistemi di rilevazione una lampada UV a 254 nm e permanganato di potassio in soluzione acquosa al 2%. Le purificazioni cromatografiche su colonna sono state eseguite con gel di silice Merck 60-200 mesh.

I sistemi cromatografici utilizzati, se non diversamente specificato, sono i seguenti:

Bagno 1: Butanolo/AcOH/H₂O in rapporto 3:1:1;

Bagno 2: DCM/MeOH/Toluene in rapporto 17:2:1.

I prodotti sono stati anidrificati con sodio solfato anidro della Carlo Erba.

Gli spettri IR sono stati ottenuti con apparecchio **Perkin-Elmer FT-IR Paragon 500** o **Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100** utilizzando una cella a diamante di seleniuro di zirconio. Per le intensità valgono le seguenti abbreviazioni: s = forte; m = media; w = debole.

Gli spettri ¹H-NMR, ¹³C-NMR e DEPT sono stati effettuati con uno strumento **VARIAN 400 MHz** in soluzione di CDCl₃ se non specificato diversamente. I chemical shifts (δ) sono espressi in parti per milione (ppm) utilizzando come standard interno il picco a 7.256 ppm del cloroformio deuterato, mentre le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hertz (Hz). Per le molteplicità valgono le seguenti abbreviazioni: s = singoletto; d = doppietto; t = tripletto; q = quartetto; m = multipletto; br = segnale allargato; dd = doppio doppietto; dt = doppio tripletto; td = triplo doppietto.

Il controllo analitico sia degli intermedi che dei prodotti finali viene fatto mediante **HPLC analitico Beckmann Sistem Gold 168** e utilizzando una colonna Alltech C-18 (150 x 4.6 mm, 5 μm). I composti sono stati analizzati impiegando un sistema eluente

binario composto da H₂O e CH₃CN, entrambi acidificati con lo 0.1% v/v di TFA (denominati A e B rispettivamente), e un flusso di 1 ml/min.

I prodotti finali grezzi sono stati purificati con un **HPLC preparativo Water Delta Prep 4000**, utilizzando una colonna Jupiter C-18 (15μ 300Å 250x30.00 mm) e una miscela eluente binaria composta da una soluzione A (90% H₂O, 10% CH₃CN, 0.1% TFA) e da una soluzione B (40% H₂O, 60% CH₃CN, 0.1% TFA). I gradienti vengono variati a seconda del profilo analitico del grezzo di reazione.

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

I solventi e i reagenti utilizzati per le TLC, le purificazioni cromatografiche, le cristallizzazioni e le reazioni sono indicati come riportato di seguito:

- Etere o Et₂O per l'etere etilico;
- THF per il tetraidrofurano;
- DMF per la N,N'-dimetilformamide;
- EtPt per l'etere di petrolio;
- AcOEt per l'acetato d'etile;
- MeOH per il metanolo;
- DCM per il cloruro di metilene;
- *t*BuOH per il *ter*butanolo;
- *n*BuLi per il *normal* butil litio;
- *t*BuOK per il potassio *ter*butossido;
- DMAP per la 4-dimetilamminopiridina;
- Dmt per la 2,6 dimetil-tirosina;
- Tic per l'acido 1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-3-carbossilico;
- Bid per il benzoimidazolo;
- Bn o Bzl per il benzile;
- P.f. per il punto di fusione;
- R.T. per la temperatura ambiente;

- Rfx per il riflusso;
- TFA per l'acido trifluoroacetico;
- Boc₂O per l'anidride del BOC (*ter*butilossicarbonil);
- WSC per l'1-etil-(3-dimetil-ammino-propil)-carbodiimmide cloridrata;
- HOBt per l'1-idrossi-benzotriazolo;
- NMM per la N-metil-morfolina;
- DCC per la dicicloesilcarbodiimmide;
- TEA per la trietilammina;
- HMPA per la esametilfosforamide;
- DIPA per la diisopropilammina;
- LDA per la litio diisopropilammide;
- IBCF per l'isobutilcloroformiato;
- Ac per l'acetile;
- Teoc per il trimetil-silil-etossi-carbonil;
- KHMDS per la potassio esametildisilazide;
- DME per dimetossietano;
- TBAF per tetrabutyl ammonio fluoruro;

PROCEDURE SINTETICHE GENERALI

- a) CONDENSAZIONE MEDIANTE ATTIVAZIONE DELLA COMPONENTE ACIDA COME ESTERE ATTIVO (VIA WSC E HOBt):



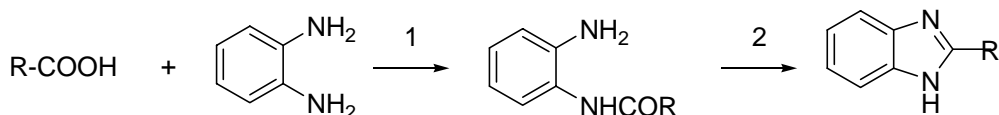
Si scioglie la componente acida (1 eq) nella minima quantità di DMF anidra e si raffredda a 0°C. Quindi si aggiungono contemporaneamente WSC (1.1 eq) e HOBt (1.1 eq), infine la componente amminica (1 eq), preventivamente sciolta nella minima quantità di DMF anidra. Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight. Si controlla l'andamento della reazione mediante TLC in bagno 2 e quando giunge a completezza si evapora la DMF alla pompa meccanica. Successivamente si riprende il residuo con AcOEt, che si lava con acido citrico 10%, NaHCO₃ 5% e brine. Si anidrifca la fase organica e si concentra in vacuo.

- b) CONDENSAZIONE MEDIANTE ATTIVAZIONE DELLA COMPONENTE ACIDA COME ANIDRIDE MISTA (VIA IBCF E NMM):



Si solubilizza la componente acida (1 eq) nella minima quantità di DMF anidra e si raffredda a -20°C. Quindi si aggiungono nell'ordine NMM (1 eq), IBCF (1 eq) e la componente amminica (1 eq), preventivamente sciolta in DMF anidra. Dopo un'ora a -20°C si fa rinvenire la reazione a temperatura ambiente e si lascia reagire overnight. Si controlla l'andamento della reazione mediante TLC in bagno 2 e quando giunge a completezza si evapora la DMF alla pompa meccanica. Successivamente si riprende il residuo con AcOEt, che si lava con acido citrico 10%, NaHCO₃ 5% e brine. Si anidrifca la fase organica e si concentra in vacuo.

- c) SINTESI DELLA FUNZIONALITA' BENZOIMIDAZOLICA



1. Si solubilizza la componente acida (1 eq) nella minima quantità di DMF anidra e si raffredda a -20°C. Quindi si aggiungono nell'ordine NMM (1 eq), IBCF (1 eq) e o-fenilendiammina. Dopo un'ora a -20°C si fa rinvenire la reazione a temperatura

ambiente e si lascia reagire overnight. Si controlla l'andamento della reazione mediante TLC in bagno 2 e quando giunge a completezza si evapora la DMF alla pompa meccanica. Successivamente si riprende il residuo con AcOEt, che si lava con NaHCO₃ 5% e brine. Si anidrifica la fase organica e si concentra in vacuo.

2. Si scioglie l'intermedio in AcOH glaciale e si lascia reagire a 60°C per un'ora. Quindi si evapora il solvente e si riprende il residuo con AcOEt, che si lava con acido citrico 10%, NaHCO₃ 5% e brine. Si anidrifica la fase organica e si concentra in vacuo.

d) SBLOCCO DEL GRUPPO PROTETTORE Boc (*ter*butil-ossi-carbonil)



Si scioglie l'uretano nella minima quantità di TFA e si lascia reagire a temperatura ambiente per un'ora. Quindi si evapora l'acido trifluoroacetico alla pompa meccanica, si riprende il residuo con AcOEt e si effettuano dei lavaggi con NaHCO₃ 5% e brine. Si anidrifica la fase organica e si evapora a secchezza.

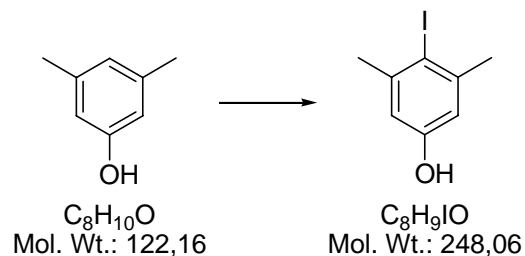
e) SAPONIFICAZIONE DEGLI ESTERI ETILICI



Si scioglie l'estere etilico (1 eq) in EtOH 95% e si aggiunge NaOH 1M (2 eq). Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight. Si evapora l'etanolo e si acidifica il residuo con acido citrico 10%, quindi si estrae 3 volte con AcOEt, che si lava con brine. Si anidrifica la fase organica e si concentra in vacuo.

PREPARAZIONE DI:

4-iodo-3,5-dimetil-fenolo (**10**)



10 g di 3,5-dimetil-fenolo (81.85 mmoli) vengono sciolti in 165 ml di metanolo e 67 ml di HCl 37%. Quindi si aggiunge goccia a goccia una soluzione di KI (9.15 g, 55.12 mmoli) e KIO_3 (5.68 g, 26.56 mmoli) in H_2O (85 ml) e si osserva la precipitazione del prodotto desiderato (**10**), che viene filtrato e lavato con H_2O (12.55 g, 50.83 mmoli, 61.8%).

Caratteristiche del composto (**10**):

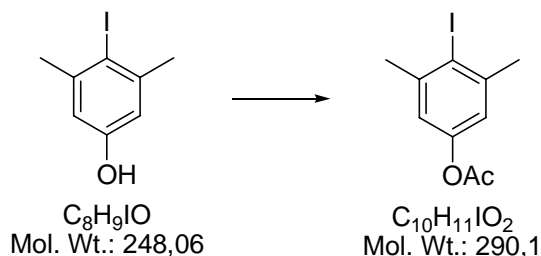
Pf = 129-130°C.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 6.607 (s, 2H aromatici), 4.766 (s, 1H, OH), 2.413 (s, 6H, 2 CH_3).

MS (ESI): $[MH]^+ = 249$.

PREPARAZIONE DI:

4-iodo-3,5-dimetil-fenil acetato (**9**)



Una miscela di 4-iodo-3,5-dimetil-fenolo (**10**) (12.56 g, 50.63 mmoli), anidride acetica (7.17 ml, 75.94 mmoli) e piridina (12.5 ml) viene scaldata a 50°C per 30 minuti. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:9). A reazione completata, si raffredda la soluzione a temperatura ambiente, si riprende il residuo con AcOEt e si estrae con HCl 1N fino a pH nettamente acido della fase acquosa. Quindi la fase organica viene lavata con H₂O, anidrificata ed evaporata in vacuo per ottenere il prodotto desiderato (**9**) come solido giallino (14.39 g, 98%).

Caratteristiche del composto (**9**):

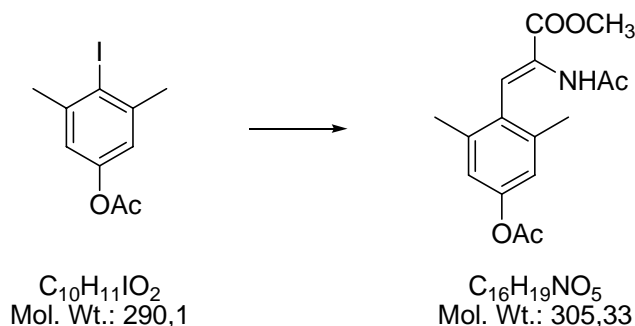
Pf = 50-52°C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 6.82 (s, 2H aromatici), 2.46 (s, 6H, 2CH₃), 2.278 (s, 3H, OCO-CH₃).

MS (ESI): [MH]⁺ = 291.

PREPARAZIONE DI:

Metil 2-acetamido-3-(4-acetossi-2,6-dimetilfenil)acrilato (**8**)



Una miscela di 4-iodo-3,5-dimetil-fenil acetato (**9**) (14.5 g, 50 mmoli), metil-2-acetamidoacrilato (7.51 g, 52.49 mmoli), tri-*o*-tolilfosfina (805.1 mg, 2.65 mmoli), TEA (13.87 ml, 10.07 g, 99.51 mmoli) e Pd(OAc)₂ (208.5 mg, 0.93 mmoli) in acetonitrile (71 ml) viene scaldata a riflusso overnight. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt 0.2:9.8). Dopo 24 h circa, la miscela viene raffreddata a temperatura ambiente e filtrata su celite. Viene rimosso il solvente in vacuo ed il residuo viene diluito con acqua ed estratto 4 volte con AcOEt. Gli estratti organici vengono riuniti e lavati con Brine. Quindi vengono trattati con carbone animale attivato, filtrati ed evaporati a secchezza. Il prodotto viene ricristallizzato con una soluzione AcOEt/Esano 75%:25% (resa 80%).

Caratteristiche del composto (**8**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 306.

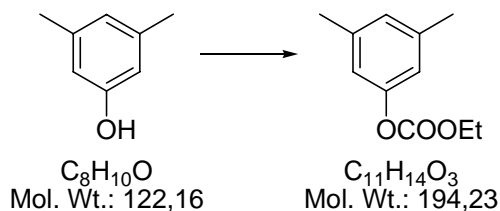
¹H NMR (CDCl₃): δ 7.022 (s, 1H, CH=C), 6.911 (s, 1H, NH), 6.77 (s, 2H aromatici), 3.839 (s, 3H, O-CH₃), 2.258 (s, 3H, OCO-CH₃), 2.173 (s, 6H, 2CH₃), 1.921 (s, 3H, NHCO-CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 169.716; 168.454; 164.858; 150.164; 137.924 (2 carboni); 130.061; 128.972; 127.442; 120.699 (2 carboni); 52.753; 22.980; 21.174; 20.322 (2 carboni).

Pf = 158-159°C.

PREPARAZIONE DI:

Etil 3,5-dimetilfenil carbonato (**18**)



Si scioglie il 3,5-dimetil-fenolo (5 g, 40.93 mmoli) in 40 ml di toluene e 4 ml di piridina (3.88 g, 49.11 mmoli) e a 0°C si gocciola il cloro formiato di etile (11.69 ml, 13.32 g, 122.79 mmoli). La reazione viene lasciata a temperatura ambiente overnight e si segue su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:9). A reazione ultimata si filtrano i sali su Gooch e si concentra in vacuo il filtrato per ottenere il grezzo di reazione come olio giallo, il quale viene successivamente distillato (bp = 169-170°C, P = 6 mmHg) in modo da ottenere il prodotto desiderato (**18**) come olio incolore (6.30 g, 79.3%).

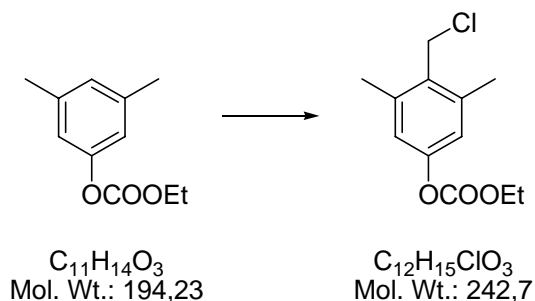
Caratteristiche del composto (**18**):

1H NMR ($CDCl_3$): δ 6.877 (s, 1H aromatico), 6.794 (s, 2H aromatici), 4.317-4.299 (q, 2H, OCH_2CH_3 , $J=7.2$), 2.321 (s, 6H, $2CH_3$), 1.405-1.370 (t, 3H, OCH_2CH_3 , $J=7.2$).

MS (ESI): $[MH]^+ = 195$.

PREPARAZIONE DI:

4-(clorometil)-3,5-dimetilfenil etil carbonato (**17**)



Si scioglie il 3,5-dimetilfenil etil carbonato (**18**) (3 g, 15.46 mmoli) in HCHO 37% (3.2 ml) e HCl 37% (15.2 ml) e si gorgoglia HCl(g) a temperatura ambiente. La reazione si segue su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:9) e giunge a completezza dopo circa 3h. La miscela di reazione viene estratta 3-4 volte con DCM, le fasi organiche vengono riunite e lavate con NaHCO₃ saturo e H₂O, anidificate ed evaporate a secchezza per ottenere il grezzo di reazione come olio giallo-arancio. In seguito a purificazione in colonna cromatografica (eluente Et₂O/EtPt 1:9) e successiva distillazione si ottiene il prodotto desiderato (**17**) come olio giallo.

Caratteristiche del composto (**17**):

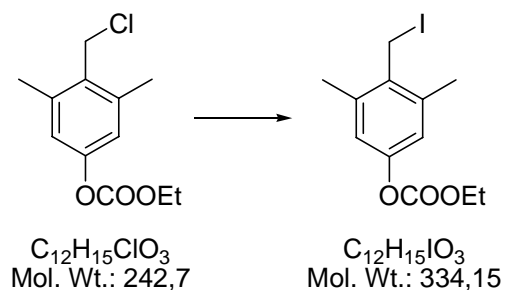
MS (ESI): [MH]⁺ = 243.

¹H NMR (CDCl₃): δ 6.878 (s, 2H aromatici), 4.630 (s, 2H, CH₂Cl), 4.334-4.280 (q, 2H, OCH₂, J=7.2), 2.427 (s, 6H, 2CH₃), 1.402-1.366 (t, 3H, OCH₂CH₃, J=7.2).

¹³C NMR (CDCl₃): 153.671, 150.682, 139.401, 131.965, 129.35, 120.812, 120.511, 64.908, 19.465 (2 carboni), 14.271, 2.145.

PREPARAZIONE DI:

4-(iodometil)-3,5-dimetilfenil etil carbonato (**16**)



L'intermedio 4-(clorometil)-3,5-dimetilfenil etil carbonato (**17**) (5.8 g, 23.9 mmol) viene sciolto in 60 ml di acetone e trattato con NaI (7.2 g, 48 mmol). La miscela di reazione viene mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per circa 50 h. Quindi si evapora il solvente, si riprende il residuo con H₂O e si estrae 3 volte con AcOEt. La fase organica viene anidrificata e concentrata a secchezza per ottenere il prodotto desiderato (**16**) come olio marrone (resa 90%).

Caratteristiche del composto (**16**):

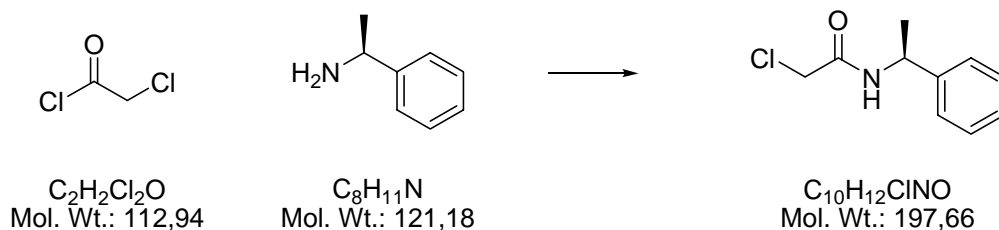
MS (ESI): [MH]⁺ = 335.

¹H NMR (CDCl₃): δ 6.841 (s, 2H aromatici), 4.413 (s, 2H, CH₂I), 4.309-4.317 (q, 2H, OCH₂, J=7), 2.353 (s, 6H, 2CH₃), 1.387-1.396 (t, 3H, OCH₂CH₃, J=7).

¹³C NMR (CDCl₃): 153.545, 150.217, 138.623, 132.756 (2 carboni), 120.917 (2 carboni), 64.832, 19.436 (2 carboni), 14.213, 2.143.

PREPARAZIONE DI:

2-Cloro-N-((S)-1-feniletil)acetammide (**14**)



In un pallone da 500 ml a due colli, con imbuto gocciolatore e tubo di sfiato in vetro, si scioglie la (S)-1-feniletilammina (286 mmol, 36.9 ml) in 150 ml di DCM. Si raffredda la miscela di reazione a 0°C, quindi si aggiunge la TEA (314.6 mmol, 43.85 ml) e si gocciola il cloro-acetil-cloruro (314.6 mmol, 25 ml). La reazione viene mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 2 ore e viene monitorata mediante TLC (eluente AcOEt/Cicloesano 1:1). Giunta a completezza, si evapora il solvente, si riprende il residuo con HCl 1M e si estrae 3 volte con AcOEt. La fase organica viene anidrificata ed evaporata a secchezza a dare un grezzo di reazione che viene successivamente cristallizzato con etere etilico. Il prodotto desiderato (**14**) si presenta come solido bianco.

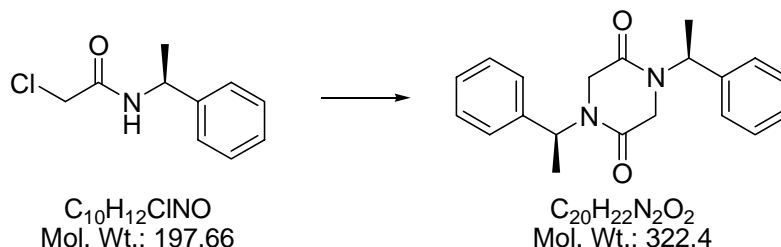
Caratteristiche del composto (**14**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 198$.

1H NMR (CDCl₃): δ 7.387-7.296 (m, 5H aromatici), 6.876-6.854 (m, 1H), 5.224-5.081 (m, 1H), 4.074-4.066 (d, 2H, J=1.6), 1.572-1.537 (d, 3H, J=7).

PREPARAZIONE DI:

1,4-bis((S)-1-feniletil)piperazin-2,5-dione (**15**)



In un pallone da 500 ml a tre colli, fiammato e sotto atmosfera di Argon, viene sciolto l'intermedio ammidico (**14**) (50.76 mmol, 10 gr) in 250 ml THF anidro. A $-10^{\circ}C$ si gocciolano 25 ml di LHMDS (1M in THF) e si scalda a riflusso per 1,5 h. Quindi si riporta la temperatura a $-10^{\circ}C$, si gocciolano altri 20 ml di LHMDS (1M in THF) e si scalda a riflusso per 1,5 h. Infine, dopo aver raffreddato a $-10^{\circ}C$, si aggiungono i rimanenti 5,76 ml di LHMDS (1M in THF) e si lascia in agitazione a temperatura ambiente overnight. La reazione viene seguita tramite TLC (eluente AcOEt/cicloesano 1:1) e, quando la maggior parte del reagente è stata consumata, si aggiunge H_2O e si estrae 3 volte con AcOEt. Le fasi organiche vengono riunite, lavate con Brine, anidificate ed evaporate a secchezza per ottenere il grezzo di reazione come olio arancio scuro. Il prodotto desiderato (**15**) si ottiene come solido giallo-arancio in seguito a purificazione mediante colonna cromatografica con eluente AcOEt/cicloesano 2:3.

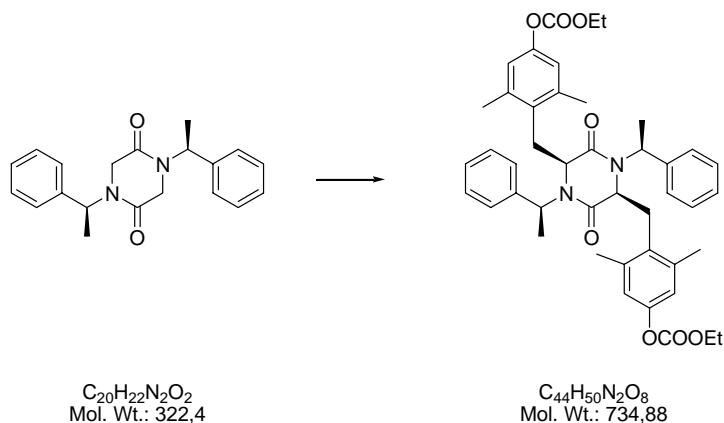
Caratteristiche del composto (**15**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 323$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.456-7.402 (m, 10H aromatici), 6.005-6.958 (m, 2H), 3.932-3.530 (q_{AB} , 4H), 1.756-1.734 (d, 6H, $J=7$).

PREPARAZIONE DI:

1,4-N,N-[(*S*)-feniletil]-3,6-bis[4-O-carbetossi-2,6-dimetil-benzil]-piperazin-2,5-dione
(**19**)



In un pallone da 250 ml a due colli, fiammato e sotto atmosfera di Argon, si scioglie il sintone chirale dichetopiperazinico (**15**) (4.1 g, 12.7 mmol) in 60 ml di THF anidro e si gocciolano 12.7 ml di LHMDS (1M in THF) a -78°C. Dopo un'ora si aggiungono 4.25 gr di iododerivato (**16**) (12.7 mmol) e si tiene monitorato l'andamento della reazione mediante TLC (eluente AcOEt/cicloesano 1:2). Alla scomparsa del reagente (**15**) si gocciola la seconda aliquota di LHMDS (12.7 ml, 1M in THF) e dopo un'ora si aggiungono altri 4.25 gr di iododerivato (**16**) (12.7 mmol). La reazione viene seguita mediante TLC e dopo circa 4 h si spegne con H₂O e si estrae 3 volte con AcOEt. La fase organica viene successivamente anidrificata ed evaporata a secchezza per ottenere un grezzo di reazione oleoso che viene cristallizzato con metanolo per ottenere il prodotto desiderato (**19**) come solido bianco (resa 50%). Le acque madri vengono concentrate in vacuo e purificate mediante colonna cromatografica per ottenere un ulteriore 20% di composto dialchilato (**19**) puro.

Caratteristiche del composto (**19**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 735.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.303 (m, 6H), 7.004 (m, 4H), 6.905 (s, 4H), 5.683 (q, 2H, J=7), 4.321 (q, 4H, J=7), 4.084 (m, 2H), 3.431 (m, 4H), 2.337 (s, 12H), 1.401 (t, 6H, J=7), 1.303 (d, 6H, J=7).

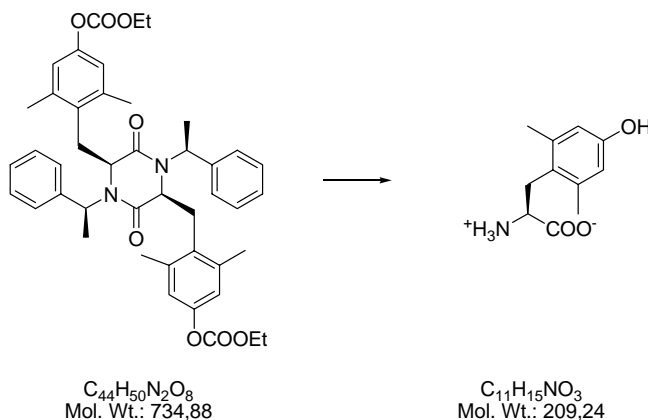
¹³C NMR (CDCl₃): 167.734 (2 carboni), 153.612 (2 carboni), 149.445 (2 carboni), 139.078 (2 carboni), 138.545 (4 carboni), 131.502 (4 carboni), 128.746 (2 carboni), 128.183 (4 carboni), 127.247 (4 carboni), 120.937 (2 carboni), 64.727 (2 carboni), 57.724 (2 carboni), 53.126 (2 carboni), 35.501 (2 carboni), 21.346 (4 carboni), 16.829 (2 carboni), 14.117 (2 carboni).

Pf = 171-173°C.

[α]_D²⁰ = -61.1 (c = 0.9, in CHCl₃).

PREPARAZIONE DI:

2,6-dimetil-tirosina (**S-Dmt**)



L'intermedio dichetopiperazinico dialchilato (**19**) (1.2 g, 1.6 mmol) viene riflussato in HI al 57% (12 ml) per 3 ore. Quindi la soluzione viene concentrata in vacuo, disciolta in H₂O ed estratta con AcOEt. La fase acquosa viene fatta passare più volte attraverso una resina acida a scambio ionico Dowex 50 WX 8 (20-50 mesh). Una volta adsorbito l'amminoacido sulla resina, questa viene lavata con H₂O fino a neutralità dell'eluente e successivamente con NH₄OH 5M per liberare l'amminoacido dalla resina. La soluzione basica viene quindi evaporata a secchezza per ottenere la (**S**)-Dmt come solido bianco.

Caratteristiche del composto (**S-Dmt**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 210.

¹H NMR (D₂O): δ 6.453 (s, 2H), 3.621 (t, 1H, J_{AX}=8), 3.053 (dd, 1H, J_{BX}=8, J_{AB}= 14.5), 2.832 (dd, 1H, J_{AX}=8, J_{AB}=14.5), 2.091 (s, 6H).

¹³C NMR (D₂O-vs.1,4-diossano): 174.713, 154.624, 140.073, 125.129 (2 carboni), 115.783 (2 carboni), 55.157, 30.829, 20.056 (2 carboni).

Pf = 239-240°C.

[α]_D²⁰ = +72.9 (c=0.5, in HCl 0.5N).

L'amminoacido (**S**)-Dmt zwitterione è stato poi disciolto in una soluzione satura di HCl in diossano per ottenere il corrispondente cloridrato come precipitato bianco.

Caratteristiche del composto (**S-Dmt * HCl**):

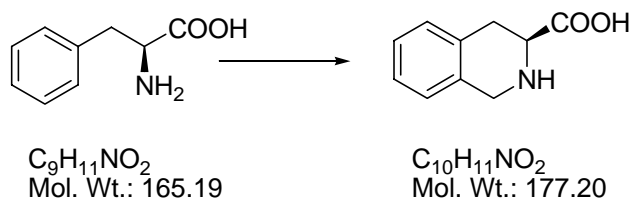
¹H NMR (CD₃OD): δ 6.531 (s, 2H), 4.046 (t, 1H, J=8), 3.303 (dd, 1H, J_{AX}=8, J_{AB}=14.5), 3.143 (dd, 1H, J_{AX}=8, J_{AB}=14.5), 2.294 (s, 6H).

¹³C NMR (CD₃OD): 172.156, 157.076, 139.934, 123.918 (2 carboni), 116.506 (2 carboni), 54.072, 31.403, 20.558 (2 carboni).

[α]_D²⁰ = +39.8 (c=1.1, in CH₃OH).

PREPARAZIONE DI:

(S)-Acido 1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-3-carbossilico (**H-Tic-OH**) (**21**)



25 g (150 mmoli) di L-fenilalanina vengono miscelati a 55 ml di HCHO al 37% in 250 ml di HCl 37% e 5 ml di H₂SO₄ concentrato. La reazione viene scaldata a riflusso per 2 ore. Si ottiene un precipitato che viene filtrato a freddo, lavato con poca H₂O e ridisciolto a caldo con una soluzione di H₂O/EtOH 10:1. Quando è completamente in soluzione, si neutralizza il pH con NH₄OH concentrato. Il prodotto, che cristallizza come sale interno, viene isolato per filtrazione e lavato con poca H₂O per ottenere il composto (**21**) come solido bianco (Resa = 70%).

Caratteristiche del composto (**21**):

pf = 315°C.

[α]_D²⁰ = -177° (c = 0.9, in NaOH).

MS (ESI): [**MH**]⁺ = 178.

¹H NMR (D₂O): δ : 7.122-7.052 (m, 4H aromatici), 3.961-3.773 (dd, 2H, CH₂-N, J=21.4, J=16.4), 3.369-3.294 (dd, 1H, J=10.5, J=4.6), 3.012-2.659 (m, 2H).

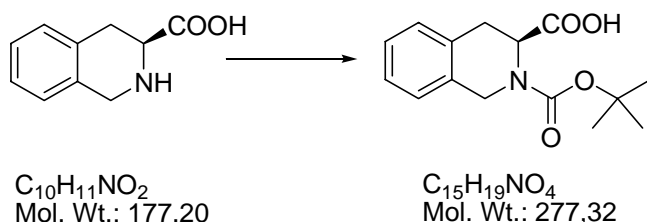
IR: 3440, 2933, 2667, 2527, 2360, 1633, 1604, 1496, 1458, 1402, 1317, 1276, 743.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 7.53, con picco di iniezione = 2.15 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

PREPARAZIONE DI:

(S)-Acido-2-(*ter*butossicarbonil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico

(Boc-Tic-OH) (22)



L'amminoacido H-Tic-OH (**21**) (4.95 g, 27.97 mmoli) viene sciolto in una soluzione 1:2 H₂O/*t*BuOH (30 ml); quindi si aggiungono NaOH 1N (28 ml) e l'anidride Boc₂O (6.71 g, 30.77 mmoli) e si lascia reagire a temperatura ambiente per una notte. Si basifica con NaHCO₃ 5% e si elimina l'eccesso di Boc₂O estraendo con *n*-pentano; si acidifica la fase acquosa con acido citrico solido e si estrae 3 volte con AcOEt, che si lava con brine. Si anidrifca e si evapora il solvente. Il prodotto (**22**) cristallizza da una miscela 1:9 di Et₂O ed EtPt come solido bianco (Resa = 99%).

Caratteristiche del composto (**22**):

pf = 130°C.

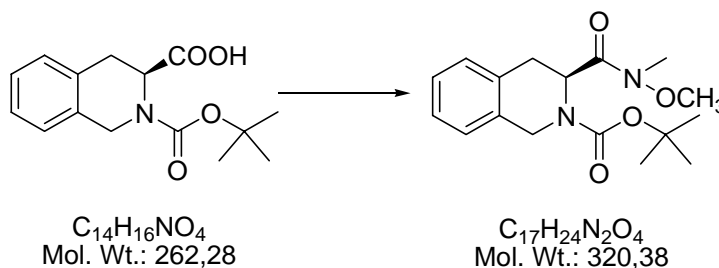
$[\alpha]_D^{20} = +26.8^\circ$ (c = 0.9, in NaOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 278$.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.132-7.056 (m, 4H aromatici), 4.856 (m, 1H); 4.223 (s, 2H); 3.041 (m, 2H); 1.403 (s, 9H).

PREPARAZIONE DI:

(S)-Acido-3-(N-metossi-N-metil-carbamoil)-3,4-diidro-1H-isochinolin-2-carbossilico *ter*butil estere (**Boc-Tic-N(metil),N(metossi)-ammide**) (**23**)



Il Boc-Tic-OH (**22**) (5 g, 18.05mmoli) viene sciolto in circa 20 ml di DMF anidra e si raffredda a 0°C; quindi si aggiungono HOBt (3.04 g, 19.86 mmoli), WSC (3.81 g, 19.86 mmoli), N,O-dimetil-idrossilamina (2.47 g, 25.27 mmoli) e NMM (43.32 mmoli, 4.72 ml) e si lascia reagire a temperatura ambiente tutta la notte. Si controlla la reazione mediante TLC in bagno 2 e quando giunge a completezza si evapora il solvente, si aggiunge AcOEt e si fanno dei lavaggi con acido citrico 10%, NaHCO₃ 5% e brine. Si anidrifca la fase organica e si evapora il solvente per ottenere il composto (**23**) come solido ceroso giallo (Resa = 97%).

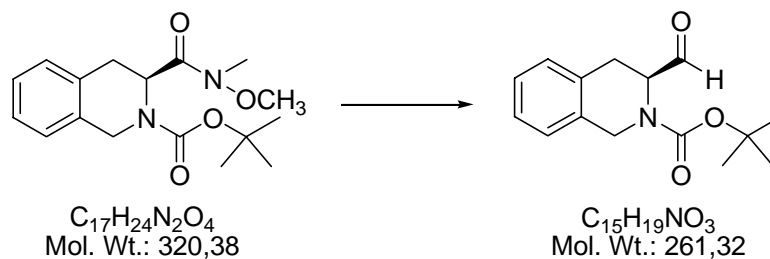
Caratteristiche del composto (**23**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 321.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.001-6.693 (m, 4H aromatici); 4.921 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 4.270-4.175 (m, 2H, Ar-CH₂-N-); 3.394 (s, 3H, -OCH₃); 3.177-2.925 (m, 2H, Ar-CH₂-CH-); 2.719 (s, 3H, -N-CH₃); 1.406 (s, 9H *ter*butile).

PREPARAZIONE DI:

(S)-Terbutil 3-formil-3,4-diidroisochinolin-2(1H)-carbossilato (**Boc-Tic-CHO**) (**24**)



In un pallone a due colli con valvola a $CaCl_2$ e imbuto gocciolatore si raffreddano a $0^\circ C$ 20 ml circa di THF anidro. Si aggiunge il $LiAlH_4$ (209 mg, 5.5 mmoli) e si gocciola la Boc-Tic-N(metil),N(metossi)-ammide (**23**) sciolta in THF anidro (1.76 g, 5.5 mmoli). Si lascia reagire a $0^\circ C$ per un'ora. Si segue la reazione mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:1. Si precipitano i sali con una soluzione di $KHSO_4$ al 10% ed Et_2O , quindi si filtrano su celite e si concentra il filtrato in vacuo. Si riprende il residuo con H_2O e si estrae 3 volte con Et_2O , che viene lavato con HCl 1N e $NaHCO_3$ 5%. La fase organica viene anidrificata ed evaporata per ottenere il composto desiderato (**24**) come olio giallo (Resa = 85%).

Caratteristiche del composto (**24**):

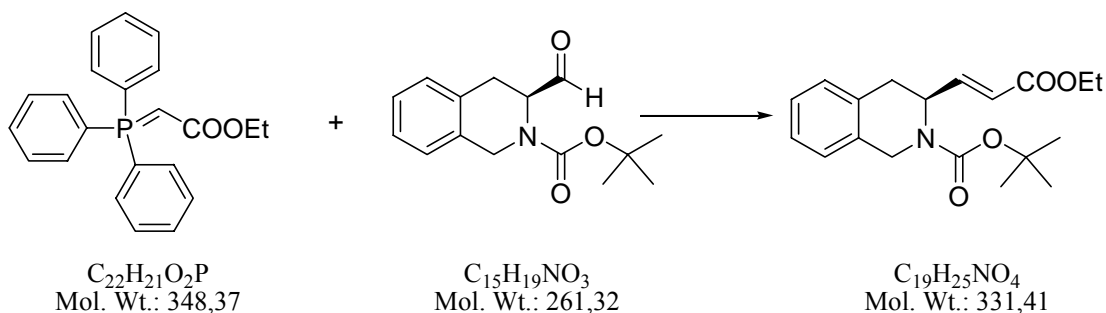
MS (ESI): $[MH]^+ = 262$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ : 9.724 (d, 1H, -CHO); 7.159-6.969 (m, 4H aromatici); 4.221-4.185 (m, 2H); 4.848 (m, 1H); 3.221-2.973 (m, 2H); 1.405 (s, 9H *terbutile*).

PREPARAZIONE DI:

Terbutil-3-(2-(etossicarbonil)vinil)-3,4-diidroisochinolin-2(1H)-carbossilato

(Boc-Tic-CH=CH-COOEt) (**25**)



In un pallone a due colli con valvola a $CaCl_2$ e imbuto gocciolatore si scioglie l'ilide (821 mg, 2.36 mmoli) in THF anidro, quindi si gocciola l'aldeide (**24**) (308 mg, 1.18 mmoli), anch'essa sciolta in THF anidro, e si lascia reagire a temperatura ambiente per circa due ore. Trascorso il tempo necessario, si evapora il solvente, si riprende il residuo con AcOEt e si fanno 2 lavaggi con brine. Si purifica il grezzo di reazione in colonna cromatografica con eluente AcOEt/EtPt 1:5 per ottenere il composto (**25**) come olio giallo (Resa = 88%).

Caratteristiche del composto (**25**):

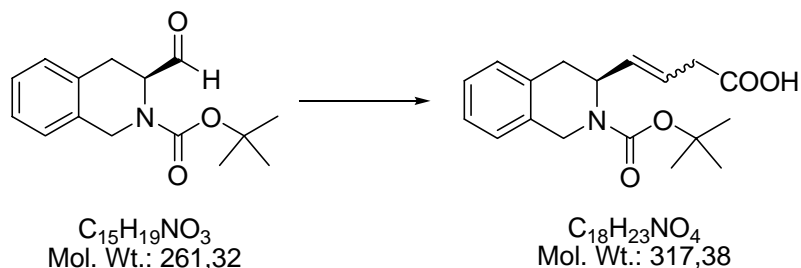
MS (ESI): $[MH]^+ = 332$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ : 7.260-7.112 (m, 4H aromatici); 6.768-6.716 (dd, 1H olefinico, $J=5.2$; $J=15.8$); 5.810-5.766 (dd, 1H olefinico, $J=1.6$; $J=15.8$); 5.003 (m, 1H); 4.744-4.702 (d, 1H); 4.376-4.334 (d, 1H); 4.138-4.085 (q, 2H, $-CH_2-CH_3$, $J=7.2$); 3.229-3.185 (dd, 1H); 2.947-2.891 (m, 1H); 1.490 (s, 9H *terbutile*); 1.272-1.211 (t, 3H, $-CH_2-CH_3$, $J=7.2$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ : 166.215; 154.884; 146.884; 132.229; 128.639; 126.898; 126.723; 126.289 (2C); 122.091; 80.553; 60.498; 49.813; 43.729; 33.196; 28.512 (3C); 14.237.

PREPARAZIONE DI:

Acido 4-(2-(*ter*butossicarbonil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-il)but-3-enoico
(**Boc-Tic-CH=CH-CH₂-COOH**) (**27 a**)



In un pallone a tre colli fiammato e in atmosfera di Argon, con tappi suba-seals nei colli laterali, si mette il NaH al 60% (1.38 g, 34.43 mmoli), che viene lavato dagli oli minerali con *n*-pentano anidro (su setacci molecolari 4Å). Il solvente viene aggiunto con una siringa, accuratamente avvinata con Argon, e dopo circa 10 minuti in agitazione viene tolto via canula. In totale si effettuano 5 lavaggi da 15 ml ciascuno. Il NaH viene poi seccato con Argon, quindi si aggiunge il DMSO anidro (20 ml). La reazione viene scaldata a 75° C per circa 40 minuti, fino ad ottenere una soluzione di colore verde (indice della formazione del dimetil sulfinil carbanione). Quindi si raffredda a 0° C e si gocciola lentamente il sale di fosfonio (acido propionico 3-trifenilfosfonio bromuro, 6.5 g, 15.65 mmoli) sciolto in DMSO anidro (la reazione assume una colorazione rosso intenso, indice della formazione dell'anione). In seguito si gocciola l'aldeide (**24**) (817 mg, 3.13 mmoli) sciolta nella minima quantità di DMSO anidro. Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight.

Si acidifica la reazione con acido citrico 10% e si estrae 3 volte con AcOEt, che viene lavato con brine. Si evapora il solvente e si ottiene un grezzo di reazione che viene purificato in colonna cromatografica usando come eluente AcOEt/EtPt 1:1 per ottenere il composto desiderato (**27 a**) come olio giallo (Resa = 56%).

Caratteristiche del composto (**27 a**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 318$.

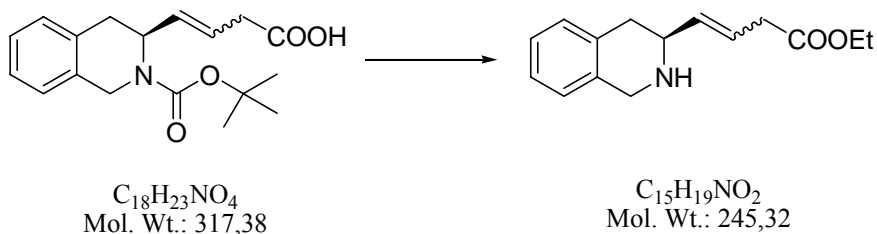
1H NMR ($CDCl_3$): δ : 9.600 (s, 1H, -COOH); 7.259-7.120 (m, 4H aromatici); 5.709-5.387 (m, 2H olefinici); 4.801-4.628 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 4.339-4.297 (d, 2H, Ar-CH₂-N-); 3.012-2.989 (m, 2H, =CH-CH₂-COOH); 2.692-2.653 (m, 2H, Ar-CH₂-CH-); 1.466 (s, 9H *terbutile*).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ : 177.304; 155.112; 133.134; 132.761; 132.274; 131.909; 129.065; 128.715; 128.525; 127.787; 60.536; 46.893; 37.387; 34.238; 28.785; 28.534 (3 C).

PREPARAZIONE DI:

Etil 4-(1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-il)but-3-enoato

(**H-Tic-CH=CH-CH₂-COOEt**) (**41 a**)



Si scioglie il composto Boc-Tic-CH=CH-CH₂-COOH (**27 a**) (261 mg, 0.82 mmoli) in EtOH assoluto (15 ml) e si aggiungono 2 gocce di H₂SO₄ concentrato. Si scalda a riflusso per 2 ore, quindi si evapora il solvente per ottenere il grezzo di reazione (olio giallo), che si utilizza nelle reazioni successive senza ulteriori purificazioni (Resa = 85%).

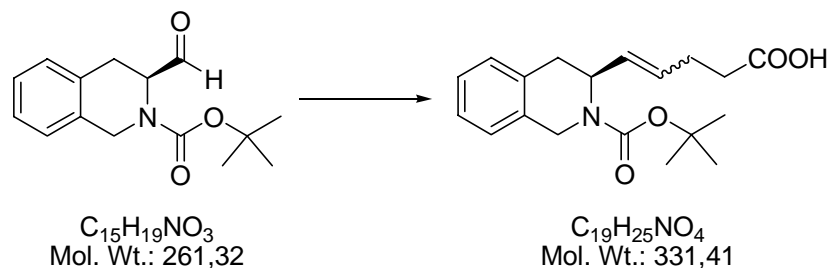
Caratteristiche del composto (**41 a**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 246.

IR: 2981,36; 1714; 1448.26; 1389.78; 1175.05; 1040.26; 1004.88; 917.81; 872.10; 783.62; 751.53.

PREPARAZIONE DI:

Acido-5-(2-(*ter*butossicarbonil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-il)pent-4-enoico
(**Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-COOH**) (**27 b**)



In un pallone a tre colli fiammato e in atmosfera di Argon, con tappi suba-seals nei colli laterali, si mette il NaH al 60% (1.38 g, 34.43 mmoli), che viene lavato dagli oli minerali con *n*-pentano anidro (su setacci molecolari 4Å). Il solvente viene aggiunto con una siringa, accuratamente avvinata con Argon, e dopo circa 10 minuti in agitazione viene tolto via canula. In totale si effettuano 5 lavaggi da 15 ml ciascuno. Il NaH viene poi seccato con Argon, quindi si aggiunge il DMSO anidro (20 ml). La reazione viene scaldata a 75° C per circa 40 minuti, fino ad ottenere una soluzione di colore verde (indice della formazione del dimetil sulfinil carbanione). Quindi si raffredda a 0° C e si gocciola lentamente il sale di fosfonio (acido butirrico 4-trifenilfosfonio bromuro, 6.7 g, 15.65 mmoli) sciolto in DMSO anidro (la reazione assume una colorazione rosso intenso, indice della formazione dell'anione). In seguito si gocciola l'aldeide (**24**) (817 mg, 3.13 mmoli) sciolta nella minima quantità di DMSO anidro. Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight.

Si acidifica la reazione con acido citrico 10% e si estrae 3 volte con AcOEt, che viene lavato con brine. Si evapora il solvente e si ottiene un grezzo di reazione che viene purificato in colonna cromatografica usando come eluente AcOEt/EtPt 1:1 per ottenere il composto desiderato (**27 b**) come olio giallo (Resa = 49%).

Caratteristiche del composto (**27 b**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 332$.

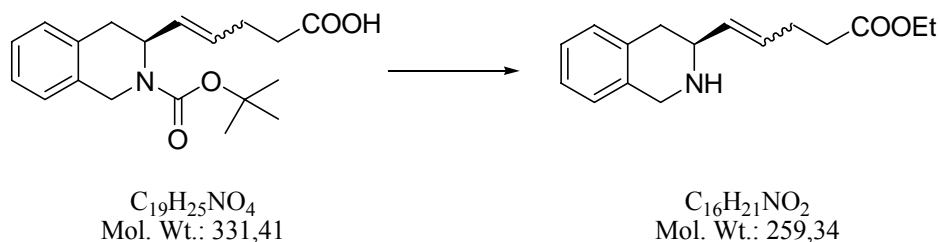
1H NMR ($CDCl_3$): δ : 9.458 (s, 1H, -COOH); 7.258-7.093 (m, 4H aromatici); 5.456-5.214 (m, 2H olefinici); 4.821-4.275 (m, 3H); 3.225-3.078 (m, 2H); 2.664-2.426 (m, 4H); 1.482 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ : 178.566; 156.492; 129.681; 129.210; 127.209; 127.095; 126.966; 126.601; 126.358; 126.168; 80.233; 59.213; 45.022; 34.588; 33.980; 28.534 (3 C); 23.044.

PREPARAZIONE DI:

Etil 5-(1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-il)pent-4-enoato

(**H-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-COOEt**) (**41 b**)



Si scioglie il composto Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-COOH (**27 b**) (513 mg, 1.55 mmoli) in EtOH assoluto (15 ml) e si aggiungono 2 gocce di H₂SO₄ concentrato. Si scalda a riflusso per 2 ore, quindi si evapora il solvente. Il grezzo di reazione così ottenuto (olio giallo) è sufficientemente puro per essere utilizzato come tale nelle reazioni successive (Resa = 96%).

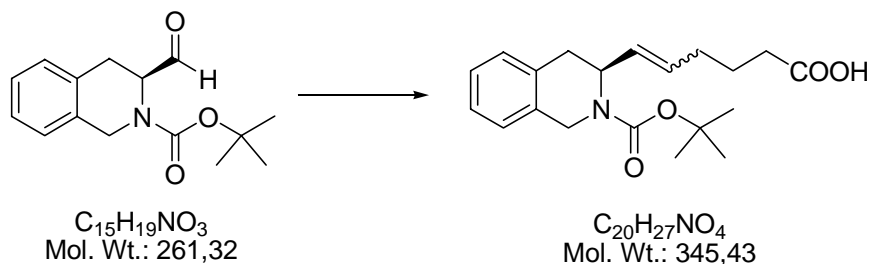
Caratteristiche del composto (**41 b**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 260.

PREPARAZIONE DI:

Acido 6-(2-(*ter*butossicarbonil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-il)es-5-enoico

(**Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-COOH**) (**27 c**)



In un pallone a tre colli fiammato e in atmosfera di Argon, con tappi suba-seals nei colli laterali, si mette il NaH al 60% (1.38 g, 34.43 mmoli), che viene lavato dagli oli minerali con *n*-pentano anidro (su setacci molecolari 4Å). Il solvente viene aggiunto con una siringa, accuratamente avvinata con Argon, e dopo circa 10 minuti in agitazione viene tolto via canula. In totale si effettuano 5 lavaggi da 15 ml ciascuno. Il NaH viene poi seccato con Argon, quindi si aggiunge il DMSO anidro (20 ml). La reazione viene scaldata a 75° C per circa 40 minuti, fino ad ottenere una soluzione di colore verde (indice della formazione del dimetil sulfinil carbanione). Quindi si raffredda a 0° C e si gocciola lentamente il sale di fosfonio (acido pentanoico 5-trifenilfosfonio bromuro, 6.93 g, 15.65 mmoli) sciolto in DMSO anidro (la reazione assume una colorazione rosso intenso, indice della formazione dell'anione). In seguito si gocciola l'aldeide (**24**) (817 mg, 3.13 mmoli) sciolta nella minima quantità di DMSO anidro. Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight.

Si acidifica la reazione con acido citrico 10% e si estrae 3 volte con AcOEt, che viene lavato con brine. Si evapora il solvente e si ottiene un grezzo di reazione che viene purificato in colonna cromatografica usando come eluente AcOEt/EtPt 1:1 per ottenere il composto desiderato (**27 c**) come olio giallo (Resa = 52%).

Caratteristiche del composto (**27 c**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 346$.

1H NMR (CDCl₃): δ : 9.454 (s, 1H, -COOH); 7.259-7.101 (m, 4H aromatici); 5.370-5.311 (m, 2H olefinici); 4.851-4.632 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 4.377-4.287 (m, 2H, Ar-CH₂-N-); 3.199-3.129 (dd, 2H, Ar-CH₂-CH-); 2.404-2.366 (t, 2H, -CH₂-COOH); 1.778-1.685 (m, 2H); 1.502-1.489 (m, 2H); 1.481 (s, 9H *ter*butile).

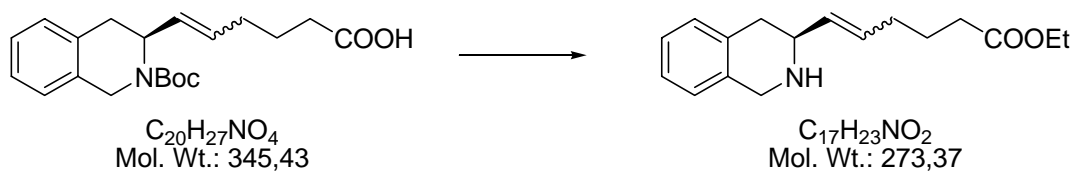
^{13}C NMR (CDCl₃): δ : 178.612; 154.572; 132.913 (2C); 129.255; 126.593; 126.342 (2C); 126.152 (2C); 80.150; 42.976; 34.702 (2C); 33.447; 32.930; 28.572 (3 C); 24.580.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.21, con picco di iniezione = 4.06 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

PREPARAZIONE DI:

Etil 6-(1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-il)es-5-enoato

(**H-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-COOEt**) (**41 c**)



Si scioglie il composto Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-COOH (**27 c**) (150 mg, 0.43 mmoli) in EtOH assoluto (15 ml) e si aggiungono 2 gocce di H₂SO₄ concentrato. Si scalda a riflusso per 2 ore, quindi si evapora il solvente per ottenere un grezzo di reazione (olio giallo) sufficientemente puro da essere utilizzato come tale nelle reazioni successive (Resa = 89%).

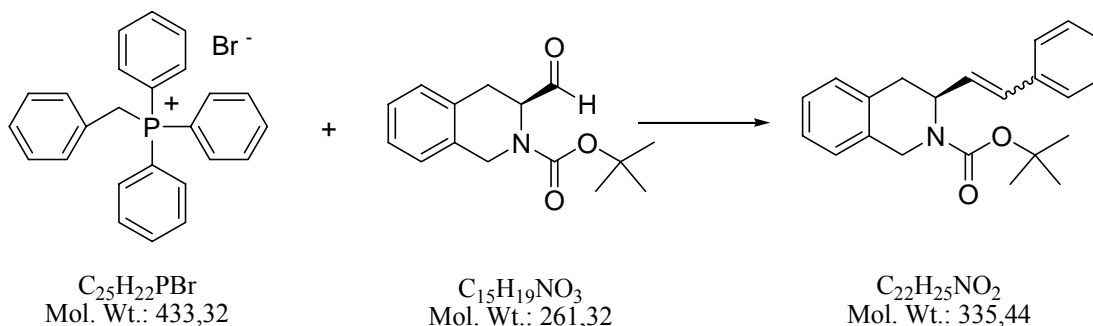
Caratteristiche del composto (**41 c**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 274.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.259-7.120 (m, 4H aromatici); 5.859-5.6102 (m, 2H olefinici); 4.137-4.046 (q, 2H, -CH₂-CH₃, J=6.9); 3.789-3.736 (m, 3H); 2.518-2.488 (m, 2H); 2.352-2.100 (m, 4H); 1.788-1.722 (m, 2H); 1.293-1.229 (t, 3H, -CH₂-CH₃, J=6.9).

PREPARAZIONE DI:

Terbutil 3,4 diidro-3-stirilisochinolin-2(1H)-carbossilato (**Boc-Tic-CH=CH-Ph**) (**46**)



In un pallone a due colli con valvola a CaCl_2 e imbuto gocciolatore si scioglie il sale di fosfonio (1.35 g, 3.12 mmoli) in 25 ml di THF anidro, si aggiunge *t*BuOK (385 mg, 3.43 mmoli) e si lascia reagire per 15 minuti. Quindi si gocciola l'aldeide (**24**) (407 mg, 1.56 mmoli) sciolta in 10 ml di THF anidro. La reazione viene seguita mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:1. Una volta terminata, si evapora il solvente, si riprende il residuo con AcOEt, che si lava con brine. Si purifica il grezzo di reazione in colonna cromatografica usando come eluente AcOEt/EtPt 1:6 per ottenere il composto desiderato (**46**) come olio giallo (Resa = 51%).

Caratteristiche del composto (**46**):

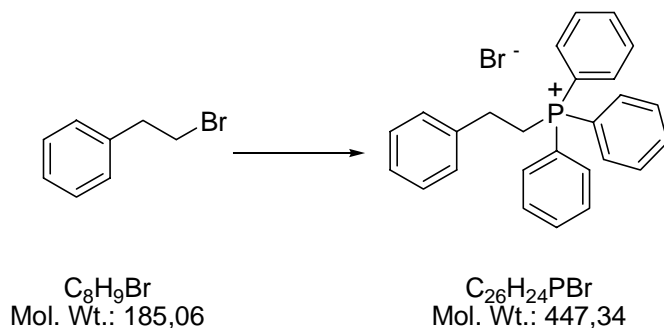
MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 336$.

^1H NMR (CDCl_3): δ : 7.365-7.118 (m, 9H aromatici); 6.459-6.408 (m, 1H olefinico); 6.089-6.007 (m, 1H olefinico); 4.876-4.768 (m, 1H, Ar- CH_2 -CH-); 4.403 (s, 2H, Ar- CH_2 -N-); 2.960-2.739 (m, 2H, Ar- CH_2 -CH-); 1.503 (s, 9H *ter*butile).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 132.936 (2 C); 130.076 (2 C); 128.822; 128.738; 128.510; 128.388; 128.259; 127.673; 127.536; 127.194; 126.692; 126.555; 126.403; 79.998; 43.433; 34.824; 29.766; 28.580 (3 C).

PREPARAZIONE DI:

Fenil trifenil fosfonio bromuro (**48**)



In circa 60 ml di toluene anidro si sciolgono il bromo derivato (4.9 g, 27 mmoli, 3.7 ml) e la trifenilfosfina (7.79 g, 29.7 mmoli). La reazione viene scaldata a riflusso tutta la notte. Si evapora il toluene e si conserva il sale di fosfonio (**48**) così ottenuto in EtPt, a causa della sua elevata igroscopicità (Resa = 83%).

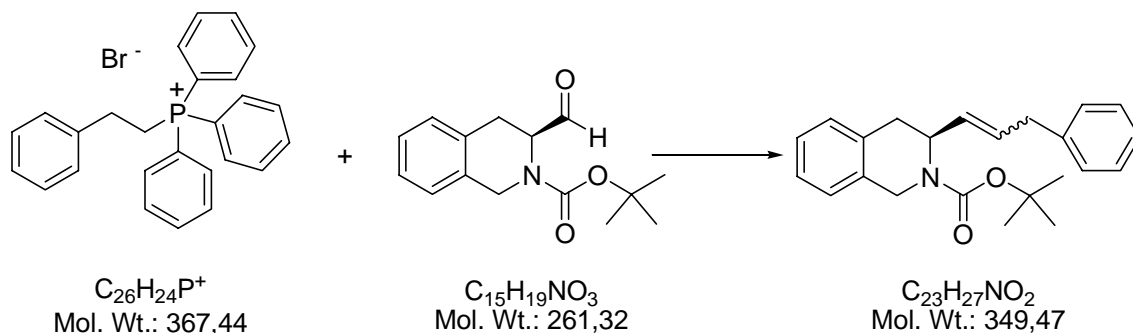
Caratteristiche del composto (**48**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 368$.

PREPARAZIONE DI:

Terbutil 3,4-diidro-3-(3-fenilprop-1-enil)isochinolin-2(1H)-carbossilato

(Boc-Tic-CH=CH-CH₂-Ph) (49)



In un pallone a due colli si scioglie il fosforano (**48**) (13.52 g, 30.24 mmoli) in una miscela di THF anidro (circa 40 ml) ed Et₂O anidro (circa 20 ml) e si raffredda a -60° C; quindi si aggiunge il *n*BuLi (1.6 M in esano: 0.03 mmoli, 18.9 ml) e si porta la temperatura a -40° C per circa 15 minuti, fino all'ottenimento di una colorazione rossa (indice della formazione dell'anione). Si raffredda nuovamente a -60° C e si gocciola l'aldeide (**24**) (2.61 g, 10 mmoli) sciolta in 10 ml di THF anidro. Si lascia reagire a temperatura ambiente e si controlla l'andamento mediante TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:8). Si spegne la reazione con H₂O, si concentra in vacuo, si riprende il residuo con AcOEt e si lava con brine. Si anidrifca la fase organica e si evapora a secchezza. Il grezzo di reazione così ottenuto si purifica tramite colonna cromatografica usando come eluente la miscela AcOEt/EtPt 1:9. Il prodotto desiderato (**49**) si presenta come un olio giallino (Resa = 49%).

Caratteristiche del composto (**49**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 350.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.357-7.128 (m, 9H aromatici); 6.009-5.947 (m, 2H olefinici); 4.815 (m, 2H, Ar-CH₂-CH-); 4.366-4.323 (d, 1H, Ar-CH₂-N-, J=17.2); 3.603-3.585 (d,

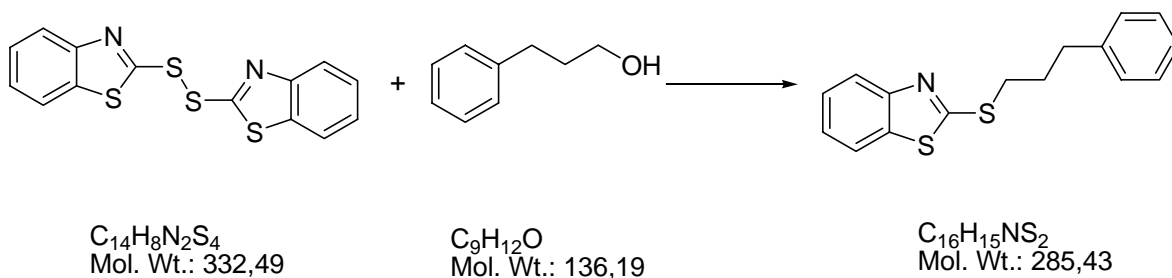
2H, Ph-CH₂-CH=, J=7.2); 3.209-3.197 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 2.703-2.660 (d, 1H, Ar-CH₂-N-, J=17.2); 1.497 (s, 9H *terbutile*).

¹³C NMR (CDCl₃): δ: 154.489; 137.142; 133.909; 133.727; 133.324; 132.868; 132.244; 129.346; 128.806; 128.616; 128.548; 126.578; 126.373; 126.221; 126.099; 80.066; 42.931; 34.679; 34.162; 32.018; 28.595 (3 C).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 22.73, con picco di iniezione = 1.66 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

PREPARAZIONE DI:

2-(3-Fenil-propilsulfanil)-benzotiazolo (**57 a**)



Si scioglie la trifenilfosfina (3.93 g, 15 mmoli) in toluene anidro; quindi si aggiunge il ditio-bis-benzotiazolo (5 g, 15 mmoli) e dopo 15 minuti il 3-fenil propanolo (2.04 g, 15 mmoli, 2 ml). Si lascia reagire overnight a temperatura ambiente e si controlla la reazione mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:4. Una volta giunta a completezza, si evapora il solvente e si purifica il grezzo di reazione in colonna cromatografica con eluente AcOEt/EtPt 1:7 per ottenere il composto desiderato (**57 a**) come solido bianco (Resa = 90%).

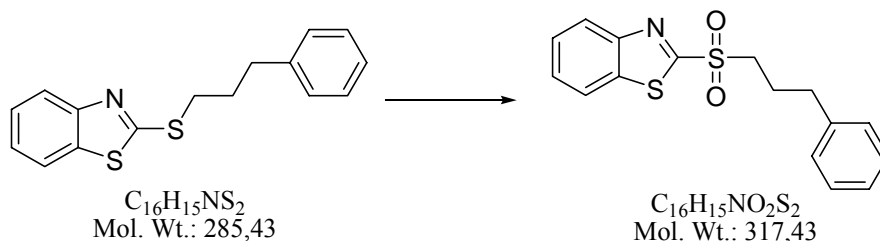
Caratteristiche del composto (**57 a**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 286$.

1H NMR (CDCl₃): δ : 7.919-7.736 (m, 2H aromatici); 7.438-7.216 (m, 7H aromatici); 3.407-3.335 (t, 2H, -S-CH₂-, J=7.2); 2.871-2.799 (t, 2H, Ph-CH₂-, J=7.2); 2.223-2.070 (m, 2H, Ph-CH₂-CH₂-).

PREPARAZIONE DI:

2-(3-Fenil-propan-1-sulfonyl)-benzotiazolo (**58 a**)



Si miscelano H₂O₂ al 30% (9 ml), AcOH (40 ml) e due gocce di H₂SO₄ concentrato. Quindi si gocciola il composto (**57 a**) (2 g, 7 mmoli), sciolto in 10 ml di AcOH. Si scalda a 80°C e si lascia reagire per un'ora. Si controlla la reazione mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:3; una volta completata si aggiunge una soluzione acquosa di Na₂SO₃, si filtrano i sali precipitati su celite e si estrae il filtrato con AcOEt, che viene lavato con NaHCO₃ saturo. Il prodotto ottenuto (**58 a**) viene utilizzato come tale nelle reazioni successive (Resa = 89%).

Caratteristiche del composto (**58 a**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 318.

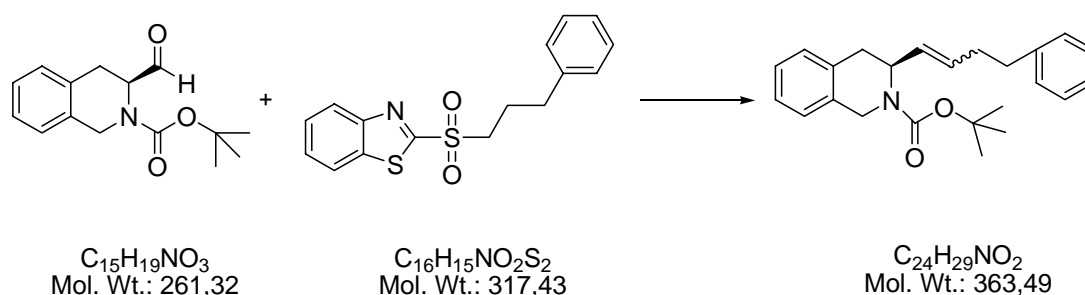
¹H NMR (CDCl₃): δ: 8.169-7.946 (m, 4H aromatici); 7.564-7.255 (m, 5H aromatici); 3.515-3.477 (t, 2H, -SO₂-CH₂-, J=7.6); 2.797-2.759 (t, 2H, Ph-CH₂-, J=7.6); 2.328-2.098 (m, 2H, Ph-CH₂-CH₂).

¹³C NMR (CDCl₃): δ: 165.774; 139.575 (2 C); 136.830; 128.738 (2 C); 128.487 (2 C); 128.122; 127.749; 126.624; 125.559; 122.418; 53.981; 34.078; 23.918.

PREPARAZIONE DI:

Terbutil 3,4-diidro-3-(4-fenilbut-1-enil)isochinolin-2(1H)-carbossilato

(Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-Ph) (**50 a**)



I METODO:

In un pallone a tre colli fiammato e sotto atmosfera di Argon si raffredda il THF anidro (circa 20 ml) a $-78^{\circ}C$ e via siringa si aggiungono la DIPA distillata (402 mg, 3.98 mmoli, 557 μ l) e il *n*BuLi (1,6M in esano: 4.37 mmoli, 2.73 ml). Si lascia il tutto in agitazione per circa 20 minuti, in modo da formare la LDA. Quindi si aggiunge velocemente il solfone (**58 a**) (1.14 g, 3.62 mmoli) sciolto in THF anidro e, dopo 5 minuti, si gocciola l'aldeide (**24**) (1 g, 3.8 mmol) sciolta in THF anidro. Si lascia reagire per un paio d'ore a $-78^{\circ}C$ e si controlla la reazione mediante spettrometro di massa e TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:3. La reazione non ha portato al prodotto desiderato, si recuperano perciò i reagenti tramite colonna cromatografica con eluente AcOEt/EtPt 1:3.

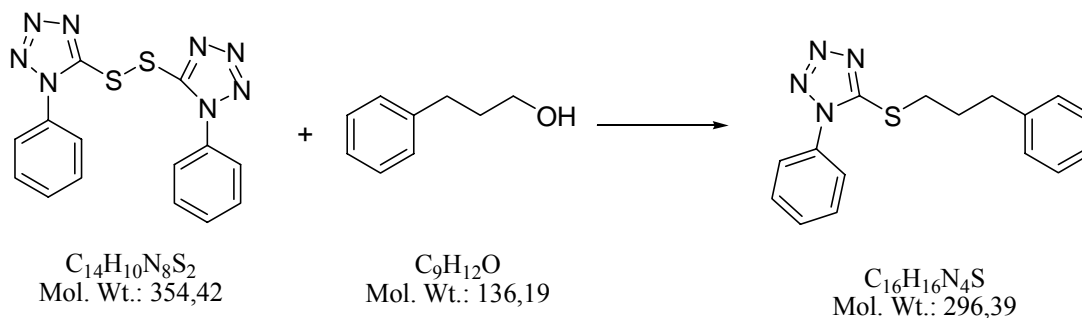
II METODO:

In un pallone a due colli, fiammato e sotto atmosfera di Argon, tappato con suba seals, si raffredda il THF anidro (circa 20 ml) a $-78^{\circ}C$ e via siringa si aggiungono la DIPA distillata (402 mg, 3.98 mmoli, 557 μ l) e il *n*BuLi (1,6M in esano: 4.37 mmoli, 2.73 ml). Si lascia il tutto in agitazione per circa 20 minuti, in modo da formare la LDA. In un altro pallone a due colli fiammato si scioglie il solfone (**58 a**) (1.14 g, 3.62 mmoli) in THF anidro e si raffredda a $-78^{\circ}C$. Dopo circa 20 minuti si canala la LDA alla soluzione contenente il solfone (**58 a**) e dopo 10 minuti si gocciola l'aldeide (**24**) (1 g,

3.8 mmol) sciolta in THF anidro. Si lascia reagire per 2 ore a -78°C e poi a temperatura ambiente per una notte. La reazione non ha portato ai risultati desiderati, quindi si raffredda a 0°C e si aggiunge la HMPA (783.1 mg, 4.37 mmol, 765 μl). Dopo un giorno si tratta la reazione (vedi I metodo), che ha portato solamente a tracce del prodotto desiderato (**50 a**). Quindi si recuperano i reagenti mediante colonna cromatografica con eluente AcOEt/EtPt 1:3.

PREPARAZIONE DI:

1-Fenil-5-(3-fenil-propilsulfanil)-1H-tetrazolo (**60 a**)



Si scioglie la trifenilfosfina (739.66 mg, 2.82 mmoli) in toluene anidro, si aggiunge il ditio-bis(1-fenil-tetrazolo) (1 g, 2.82 mmoli) e dopo circa 15 minuti si aggiunge il 3-fenil propanolo (384.26 mg, 2.82 mmoli, 369.48 μ l). Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight. Una volta avvenuta la reazione, si evapora il solvente e si purifica il grezzo mediante flash cromatografia usando come eluente AcOEt/EtPt 1:7 (Resa = 92%).

Caratteristiche del composto (**60 a**):

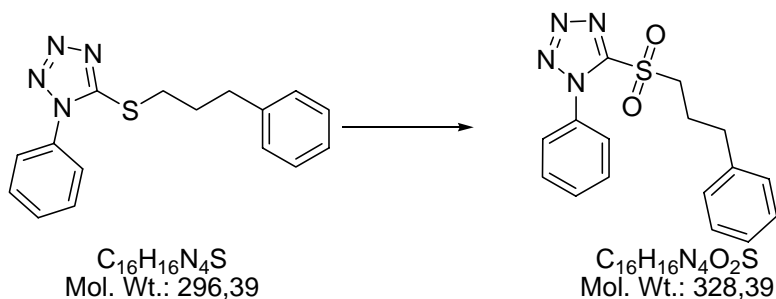
MS (ESI): $[MH]^+ = 297$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ : 7.583-7.550 (m, 5H aromatici); 7.289-7.270 (m, 2H aromatici); 7.195-7.174 (m, 3H aromatici); 3.414-3.376 (t, 2H, -S- CH_2 -, $J=7.6$); 2.802-2.764 (t, 2H, Ph- CH_2 -, $J=7.6$); 2.192-2.155 (m, 2H, Ph- CH_2-CH_2 -)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ : 154.329; 140.579; 133.742; 130.175 (2 C); 129.848 (2 C); 128.586 (2 C); 128.502 (2C); 126.266; 123.909; 34.573; 32.641; 30.633.

PREPARAZIONE DI:

1-Fenil-5-(3-fenil-propano-1-sulfonil)-1H-tetrazolo (**61 a**)



In un pallone si mettono l'H₂O₂ al 30% (circa 5 ml), l'AcOH (circa 40 ml) e due gocce di H₂SO₄ concentrato. Si aggiunge quindi il solfuro (**60 a**) (994 mg, 3.36 mmoli) sciolto in 10 ml di AcOH. Si scalda a 80° C e si lascia reagire per un'ora. Si raffredda a 0° C e si aggiunge una soluzione acquosa di Na₂SO₃; si diluisce con H₂O e si estrae con AcOEt, che si lava con NaHCO₃ saturo. Si anidrifca e si evapora il solvente per ottenere il composto desiderato (**61 a**), che viene utilizzato nelle reazioni successive senza ulteriori purificazioni (Resa = 88%).

Caratteristiche del composto (**61 a**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 329.

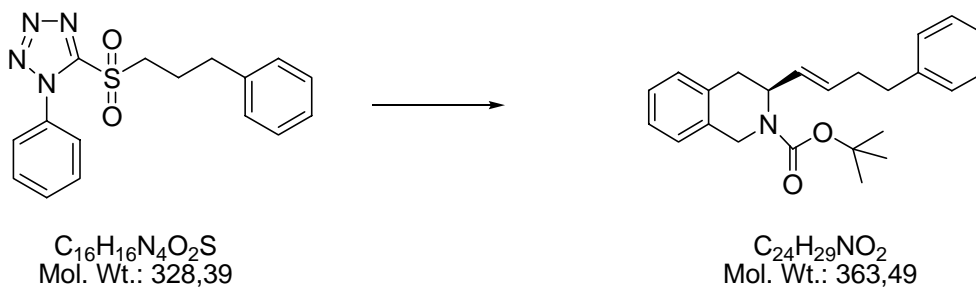
¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.666- 7.582 (m, 5H aromatici); 7.311-7.171 (m, 5H aromatici); 3.717-3.677 (t, 2H, -SO₂-CH₂-, J=7.6); 2.853-2.816 (t, 2H, Ph-CH₂-, J=7.6); 2.321-2.281 (m, 2H, Ph-CH₂-CH₂-)

¹³C NMR (CDCl₃): δ: 139.241; 133.027; 131.537 (2 C); 130.282 (2 C); 130.122; 129.788; 128.837; 128.495; 126.776; 125.110; 121.293; 55.258; 33.911; 23.622.

PREPARAZIONE DI:

Terbutil 3,4-diidro-3-(4-fenilbut-1-enil)isochinolin-2(1H)-carbossilato

(Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-Ph) (**50 a**)



In un pallone a due colli fiammato e chiuso con tappo suba-seal si scioglie il solfone (**61 a**) (478.8 mg, 1.46 mmol) in DME (circa 10 ml); si raffredda a $-60^{\circ}C$ e dopo 5 minuti si aggiunge la KHMDS (0.5 M in toluene: 1.752 mmol, 3.504 ml). Dopo 10 minuti si gocciola l'aldeide (**24**) (400 mg, 1.53 mmol) sciolta in DME. Dopo un'ora si alza gradatamente la temperatura fino a portarla a temperatura ambiente. Si lascia reagire overnight alla medesima temperatura.

Si spegne la reazione con NH_4Cl saturo, si filtrano i sali su celite e si concentra il filtrato in vacuo. Si riprende il residuo con AcOEt e si lava con brine. Si anidrifca la fase organica e si evapora a secchezza. Il grezzo di reazione viene purificato mediante flash cromatografia usando come eluente AcOEt/EtPt 1:5 (Resa = 90%).

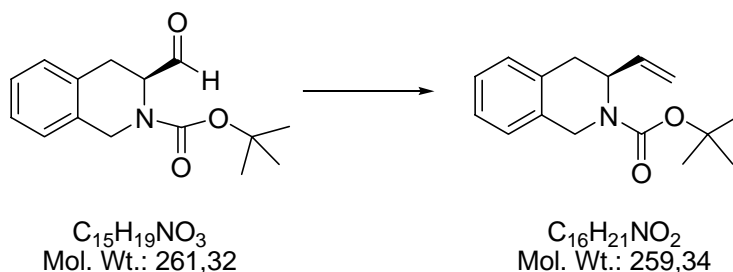
Caratteristiche del composto (**50 a**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 363$.

¹H NMR (CDCl₃): δ : 7.266-7.012 (m, 9H aromatici); 5.632-5.483 (m, 1H olefinico); 5.337-5.232 (dd, 1H olefinico, $J=15.3$; $J=5.8$); 5.097-4.852 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 4.769-4.684 (d, 1H, Ar-CH₂-N-); 4.257-4.173 (d, 1H, Ar-CH₂-N-); 3.113-3.034 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 2.802-2.633 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 2.601-2.508 (t, 2H, Ph-CH₂-CH₂-); 2.299-2.212 (t, 2H, Ph-CH₂-CH₂-); 1.498 (s, 9H terbutile).

PREPARAZIONE DI:

Terbutil 3,4-diidro-3-vinilisochinolin-2(1H)-carbossilato (**Boc-Tic-CH=CH₂**) (**51**)



In un pallone a due colli fiammato si sospende il trifenil metil fosfonio bromuro (3.35 g, 9.375 mmoli) in THF anidro e si aggiunge il *t*BuOK (999.46 mg, 8.91 mmoli). Si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti. Quindi si gocciola la Boc-Tic-aldeide (**24**) (978.75 mg, 3.75 mmol), sciolta nella minima quantità di THF anidro, e si lascia reagire a temperatura ambiente per una notte. Si evapora il solvente, si riprende il residuo con AcOEt e si lava con brine. Si anidrifca la fase organica e si concentra in vacuo. Il grezzo di reazione viene purificato mediante flash cromatografia usando come eluente AcOEt/EtPt 1:8 (Resa = 87%).

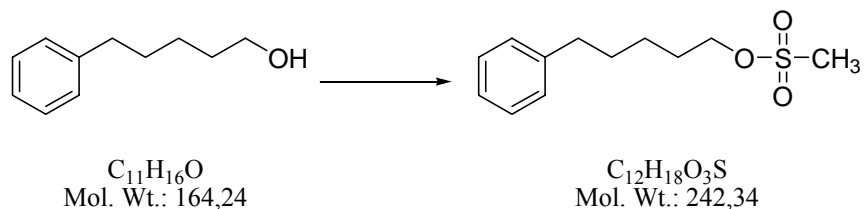
Caratteristiche del composto (**51**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 260$.

¹H NMR (CDCl₃): δ : 7.260-7.094 (m, 4H aromatici); 5.662-5.584 (m, 1H, -CH=CH₂); 5.101-4.994 (m, 3H, -CH-CH=CH₂); 4.776-4.693 (d, 1H, Ar-CH₂-N-, J=4.3); 4.367-4.283 (d, 1H, Ar-CH₂-N-, J=4.3); 3.20-3.083 (dd, 1H, Ar-CH₂-CH-); 2.848-2.757 (dd, 1H, Ar-CH₂-CH-); 1.495 (s, 9H *terbutile*).

PREPARAZIONE DI:

5-Fenilpentil metansolfonato (**53**)



Si scioglie il 5-fenil-1-pentanol (1 g, 6.08 mmoli, 1.02 ml) in DCM anidro (circa 10 ml) e si raffredda a 0° C. Quindi si aggiunge la TEA (6.68 mmoli, 938 µl) e si gocciola il mesilcloruro (6.68 mmoli, 519 µl). Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight. Si evapora il solvente, si riprende il residuo con AcOEt e si lava con HCl 1N, NaHCO₃ 5% e brine. Il prodotto così ottenuto (**53**) viene utilizzato come tale nelle reazioni successive (Resa = 92%).

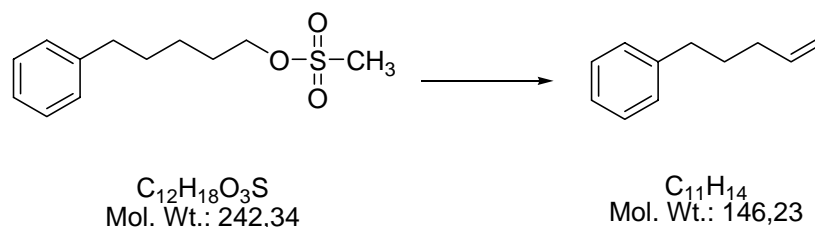
Caratteristiche del composto (**53**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 243.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.260-7.188 (m, 5H aromatici); 4.249-4.184 (m, 2H, CH₃-SO₃-CH₂-); 2.979 (s, 3H, -CH₃); 2.630-2.607 (m, 2H); 2.541-1.973 (m, 6H).

PREPARAZIONE DI:

1-(pent-4-enil)benzene (**52**)



In un pallone a due colli, fiammato e sotto atmosfera di Argon, si scioglie il mesil-derivato (**53**) (3.12 g, 12.89 mmoli) in DMF anidra (15 ml). Si aggiunge HMPA (5 ml) distillata, si raffredda a 0° C e si aggiunge il *t*BuOK (5.78 g, 51.57 mmoli). Si lascia reagire a temperatura ambiente per una notte. Si controlla la reazione mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:8. Si aggiunge un po' d'H₂O e si estrae con *n*-pentano. Si evapora il solvente senza scaldare il bagno del rotavapor vista l'elevata volatilità del composto. (Resa = 88%).

Caratteristiche del composto (**52**):

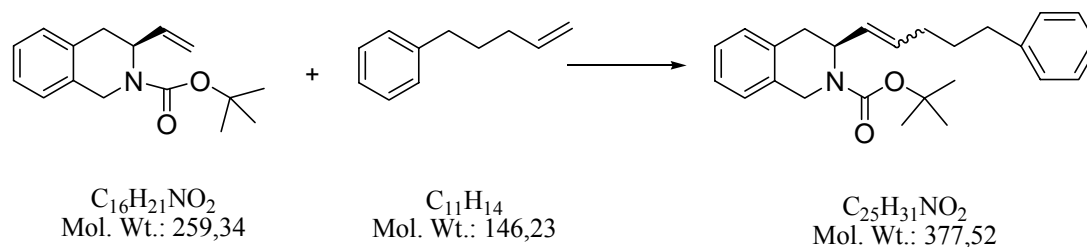
MS (ESI): [MH]⁺ = 147.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.289-7.175 (m, 5H aromatici); 6.437-5.998 (m, 3H olefinici); 3.493-3.310 (t, 2H, Ph-CH₂-); 2.688-2.594 (m, 2H, Ph-CH₂-CH₂-CH₂-); 1.737-1.548 (m, 2H, Ph-CH₂-CH₂-).

PREPARAZIONE DI:

*Ter*butil 3,4-diidro-3-(5-fenilpent-1-enil)isochinolin-2(1H)-carbossilato

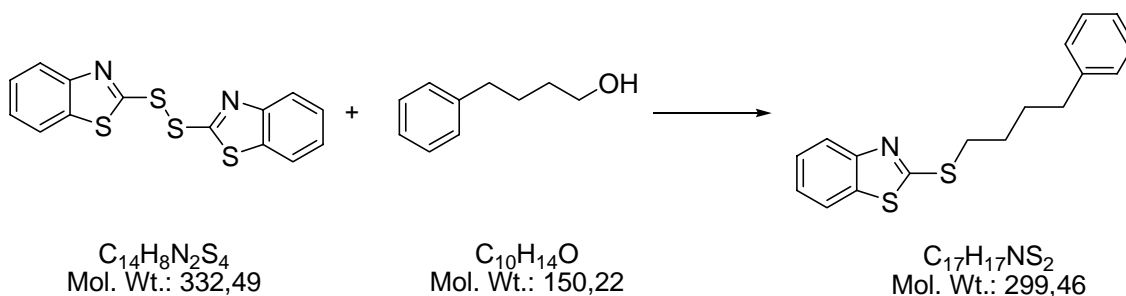
(Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-Ph) (**50 b**)



In un pallone fiammato e sotto atmosfera di Argon si sciolgono le due olefine (Boc-Tic-CH=CH₂ (**51**): 200 mg, 0.772 mmoli; 1-(pent-4-enil)benzene (**52**): 248 mg, 1.7 mmoli) in DCM anidro (circa 100 ml). Si aggiunge il catalizzatore di Grubbs di seconda generazione (24 mg, 0.386 mmoli) e si scalda a 40° C. Si lascia reagire per una notte. La reazione non ha portato a quantità apprezzabili di composto desiderato; si recuperano i reagenti.

PREPARAZIONE DI:

2-(4-Fenil-butilsulfanil)-benzotiazolo (**57 b**)



Si scioglie la trifenilfosfina (2.25 g, 8.6 mmoli) in toluene anidro quindi si aggiunge il ditio-bis-benzotiazolo (2 g, 8.6 mmoli) e dopo 15 minuti il 4-fenil-butanolo (1.3 g, 8.6 mmoli, 1.3 ml). Si lascia reagire overnight a temperatura ambiente e si controlla la reazione mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:4. Quando giunge a completezza, si evapora il solvente e si purifica il grezzo di reazione mediante colonna cromatografica con eluente AcOEt/EtPt 1:7 (Resa = 89%).

Caratteristiche del composto (**57 b**):

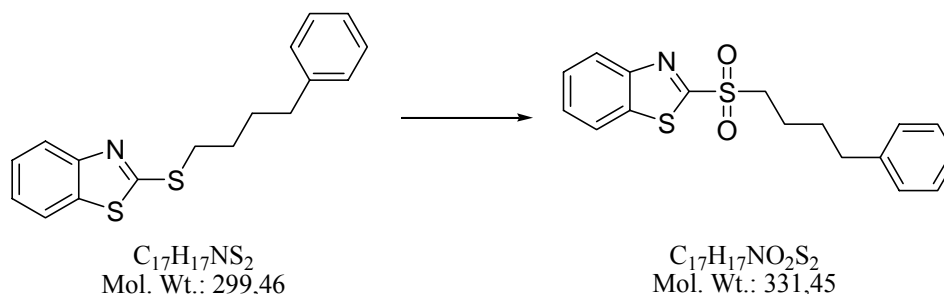
MS (ESI): [MH]⁺ = 300.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.887-7.863 (m, 1H aromatico); 7.765-7.742 (m, 1H aromatico); 7.315-7.259 (m, 4H aromatici); 7.203-7.181 (m, 3H aromatici); 3.397-3.361 (t, 2H, -S-CH₂-, J=7.2); 2.701-2.665 (t, 2H, Ph-CH₂-, J=7.2); 1.883-1.842 (m, 4H, Ph-CH₂-CH₂-CH₂-)

¹³C NMR (CDCl₃): δ: 167.242; 153.416; 141.986; 135.263; 128.479 (2 C); 128.441 (2 C); 126.091; 125.932; 124.221; 121.544; 121.004; 35.387; 33.470; 30.497; 28.854.

PREPARAZIONE DI:

2-(4-Fenil-butan-1-sulfonil)-benzotiazolo (**58 b**)



Si miscelano H_2O_2 al 30% (9 ml), AcOH (40 ml) e una goccia di H_2SO_4 concentrato. Quindi si aggiunge il solfuro (**57 b**) (2 g, 7 mmoli) sciolto in 10 ml di AcOH. Si scalda a $80^\circ C$ e si lascia reagire per un'ora. Si controlla la reazione mediante spettrometro di massa e TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:3. Giunta a completezza, si aggiunge alla miscela di reazione una soluzione acquosa di Na_2SO_3 , si filtrano i sali che precipitano e si estrae con AcOEt, che viene lavato con $NaHCO_3$ saturo. Il composto è sufficientemente puro da essere usato nelle reazioni successive senza ulteriori purificazioni (Resa = 91%).

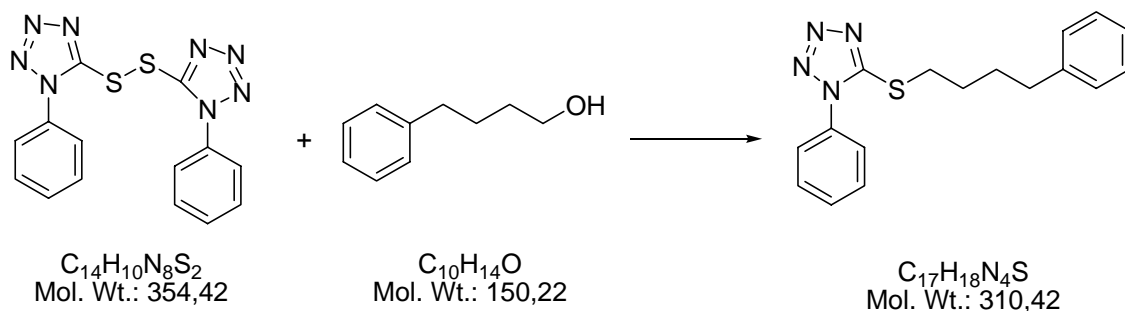
Caratteristiche del composto (**58 b**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 332$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ : 8.235-8.197 (m, 1H aromatico); 8.005-7.993 (m, 1H aromatico); 7.661-7.592 (m, 2H aromatici); 7.258-7.083 (m, 5H aromatici); 3.564-3.490 (t, 2H, $-SO_2-CH_2-$, $J=7.4$); 2.662-2.586 (t, 2H, $Ph-CH_2-CH_2-$, $J=7.6$); 1.923-1.766 (m, 4H, $Ph-CH_2-CH_2-CH_2-$).

PREPARAZIONE DI:

1-Fenil-5-(4-fenil-butilsulfanil)-1H-tetrazolo (**60 b**)



Si scioglie la trifenilfosfina (739.66 mg, 2.82 mmoli) in toluene anidro, si aggiunge il ditio-bis(1-fenil-tetrazolo) (1 g, 2.82 mmoli) e dopo circa 15 minuti si aggiunge il 4-fenil-butanolo (423.62 mg, 2.82 mmoli, 434.48 μ l). Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight. Si concentra in vacuo e si purifica il grezzo di reazione ottenuto mediante flash cromatografia usando come eluente AcOEt/EtPt 1:7 (Resa = 92%).

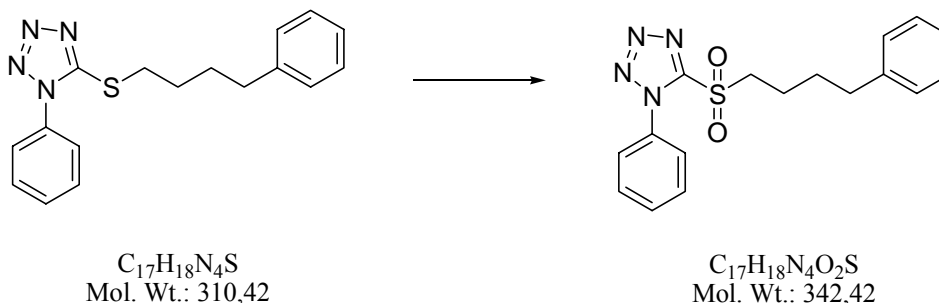
Caratteristiche del composto (**60 b**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 311$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ : 7.579-7.551 (m, 5H aromatici); 7.261-7.146 (m, 5H aromatici); 3.454-3.382 (t, 2H, -S- CH_2 -, $J=7.2$); 2.694-2.622 (t, 2H, Ph- CH_2 -, $J=7.2$); 1.849-1.808 (m, 4H, Ph- CH_2 - CH_2 - CH_2 -)

PREPARAZIONE DI:

1-Fenil-5-(4-fenil-butan-1-sulfonil)-1H-tetrazolo (**61 b**)



Si prepara una soluzione costituita da H_2O_2 al 30% (circa 5 ml), AcOH (circa 40 ml) e due gocce di H_2SO_4 concentrato. Quindi vi si gocciola il solfuro (**60 b**) (1.2 g, 3.8 mmoli) sciolto in 10 ml di AcOH. Si scalda a $80^\circ C$ e si lascia reagire per un'ora. Si raffredda a $0^\circ C$ e si aggiunge una soluzione acquosa di Na_2SO_3 ; si diluisce con H_2O e si estrae con AcOEt, che si lava con $NaHCO_3$ saturo. Il grezzo di reazione è sufficientemente puro da essere utilizzato come tale nelle reazioni successive (Resa = 94%).

Caratteristiche del composto (**61 b**):

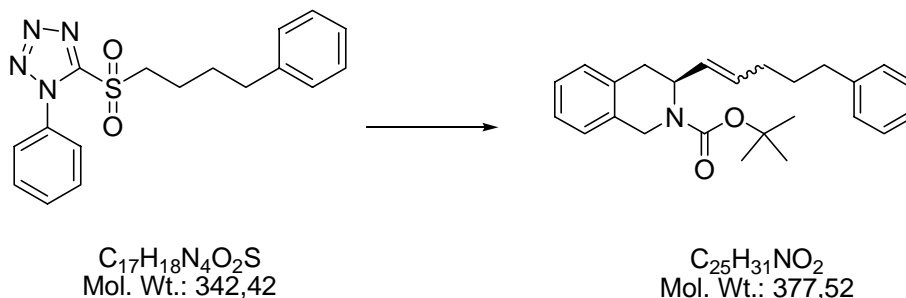
MS (ESI): $[MH]^+ = 343$.

1H NMR (CDCl₃): δ : 7.703-7.566 (m, 5H aromatici); 7.293-7.141 (m, 5H aromatici); 3.786-3.716 (t, 2H, $-SO_2-CH_2-$, $J=7$); 2.716-2.642 (t, 2H, $Ph-CH_2-$, $J=7.4$); 2.195-1.830 (m, 4H, $Ph-CH_2-CH_2-CH_2-$).

PREPARAZIONE DI:

Terbutil 3,4 diidro-3-(5-fenilpent-1-enil)isochinolin-2(1H)-carbossilato

(Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₃Ph) (**50 b**)



In un pallone a due colli fiammato e chiuso con tappo suba-seal si scioglie il solfone (**61 b**) (500 mg, 1.46 mmol) in DME (circa 10 ml); si raffredda a -60° C e dopo 5 minuti si aggiunge la KHMDS (0.5 M in toluene: 1.752 mmol, 3.504 ml). Dopo 10 minuti si gocciola la Boc-Tic-aldeide (**24**) (400 mg, 1.53 mmol) sciolta in DME. Dopo un'ora si alza gradatamente la temperatura fino a portarla a temperatura ambiente. Si lascia reagire overnight.

Si spegne la reazione con NH₄Cl saturo, si filtrano i sali su celite e si concentra il filtrato in vacuo. Si riprende il residuo con AcOEt e si lava con brine. Si anidrifca la fase organica e si evapora a secchezza. Il grezzo di reazione così ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia usando come eluente AcOEt/EtPt 1:5 (Resa = 90%).

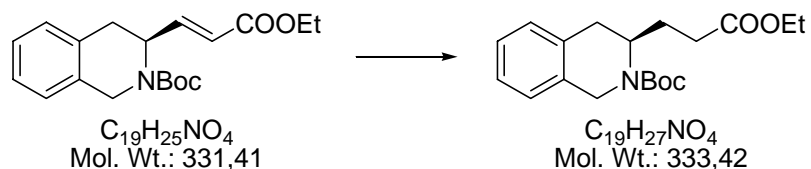
Caratteristiche del composto (**50 b**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 378.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.269-7.027 (m, 9H aromatici); 5.903-5.760 (m, 1H olefinico); 5.638-5.527 (m, 1H olefinico); 5.324-5.207 (m, 1H, Ar-CH₂-CH); 4.780-4.263 (dd, 2H, Ar-CH₂-N-); 3.202-2.765 (m, 2H, Ar-CH₂-CH-); 2.466-2.389 (t, 2H, Ph-CH₂-CH₂-); 2.048-1.920 (m, 2H, Ph-CH₂-CH₂-CH₂-); 1.602-1.523 (m, 2H, Ph-CH₂-CH₂-); 1.495 (s, 9H *terbutile*).

PREPARAZIONE DI:

Terbutil 3-(2-(etossicarbonil)etil)-3,4-diidroisochinolin-2(1H)-carbossilato
(**Boc-Tic-(CH₂)₂-COOEt**) (**65**)



Si scioglie il composto Boc-Tic-CH=CH-COOEt (**25**) (1.51 mmoli, 500 mg) in etanolo e si aggiungono 200 mg di C/Pd al 10%. Si idrogena la miscela di reazione al Parr in presenza di H₂ (40 psi) per 4 ore a temperatura ambiente, quindi si filtra il catalizzatore su celite e si evapora a secchezza il filtrato. Il residuo viene ripreso con H₂O ed estratto 3 volte con AcOEt. La fase organica viene anidrificata e concentrata in vacuo per dare il composto desiderato (**65**) come olio giallo. Tale grezzo di reazione è sufficientemente puro da essere utilizzato come tale nelle successive reazioni.

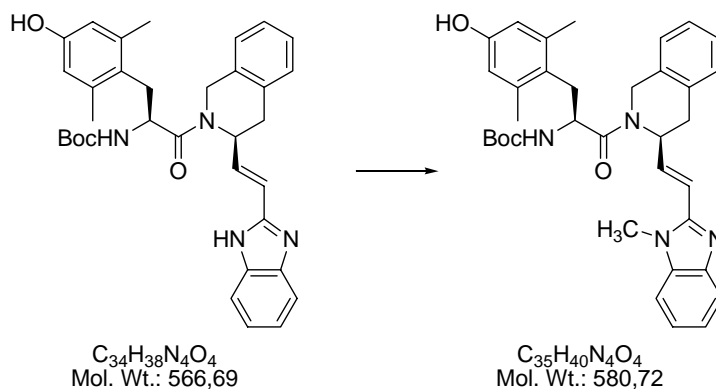
Caratteristiche del composto (**65**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 334.

¹H-NMR (CDCl₃): δ: 7.177-7.116 (4H aromatici), 4.657-4.636 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-), 4.141-4.086 (m, 4H, -CH₂-CH₃ e Ar-CH₂-N-), 3.198-3.057 (dd, 1H, Ar-CH₂-CH-), 2.701-2.586 (dd, 1H, Ar-CH₂-CH-), 2.394-2.278 (m, 2H, -CH₂-COOEt), 1.823-1.602 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COOEt), 1.489 (s, 9H *ter*butile), 1.296-1.199 (t, 3H, -CH₂-CH₃).

PREPARAZIONE DI:

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(Me)Bid (**79**)



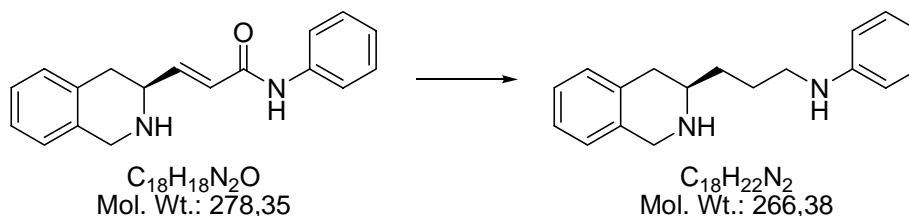
Si scioglie il composto Boc-Dmt-Tic-CH=CH-Bid (0.23 mmoli, 130 mg) in 15 ml di DMF anidra e si raffredda a 0°C. Si aggiungono K_2CO_3 (0.25 mmoli, 35 mg) e CH_3I (0.25 mmoli, 0.02 ml) e si lascia reagire a temperatura ambiente overnight. Dopo aver controllato che la reazione sia terminata mediante TLC in bagno 2, si evapora la DMF alla pompa meccanica, si riprende il residuo con AcOEt e si lava con acido citrico 10%, $NaHCO_3$ 5% e brine. Si anidrifca la fase organica e si concentra in vacuo per ottenere il composto desiderato (**79**) come olio giallo, che viene utilizzato nelle reazioni successive senza ulteriori purificazioni.

Caratteristiche del composto (**79**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 581$.

PREPARAZIONE DI:

N-(3-(1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-il)propil)fenilammina (**H-Tic-(CH₂)₃-NH-Ph**) (**82**)



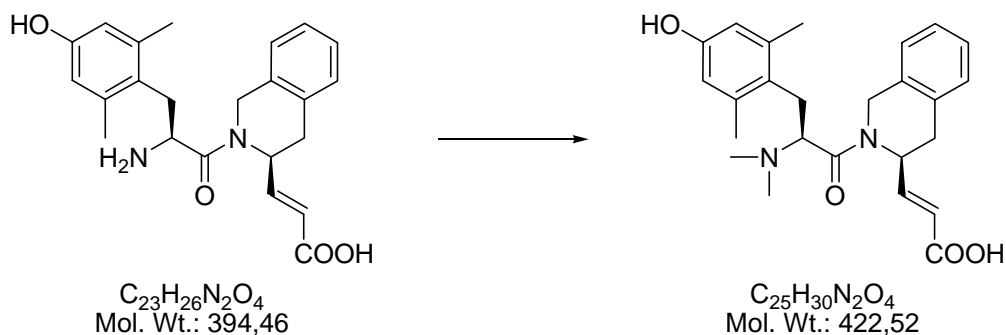
In un pallone da 100 ml a due colli, fiammato e sotto atmosfera di Argon, si scioglie l'ammide α,β-insatura H-Tic-CH=CH-CO-NH-Ph (0.32 mmoli, 90 mg) in 20 ml di THF anidro. Si raffredda a 0°C e si gocciola BH₃*(CH₃)₂S (3.24 mmoli, 0.3 ml). Quindi si scalda la reazione a rfx e si lascia reagire overnight. Si raffredda a 0°C e si acidifica con HCl 10%. Quindi si scalda nuovamente a rfx per 4h, poi si raffredda a 0°C e si basifica con NaOH 2N, si evapora il solvente e si riprende il residuo oleoso con AcOEt. Si lava due volte la fase organica con H₂O e si riestrae dalla fase acquosa con AcOEt. Si riuniscono le fasi organiche, si anidrifca e si evapora a secchezza. Si ottiene il composto desiderato (**82**) come olio giallo, che può essere utilizzato senza ulteriori purificazioni nelle reazioni successive.

Caratteristiche del composto (**82**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 267.

PREPARAZIONE DI:

N,N(CH₃)₂-Dmt-Tic-CH=CH-COOH (**81**)



Ad una soluzione del composto H-Dmt-Tic-CH=CH-COOH (0.44 mmoli, 226 mg) in 5 ml di CH₃CN e 5 ml di H₂O vengono aggiunti nell'ordine HCHO 37% (4.44 mmoli, 0.36 ml), NaCNBH₃ (1.32 mmoli, 83.16 mg) e AcOH glaciale (1.32 mmoli, 0.08 ml). Si lascia reagire a temperatura ambiente per circa un'ora e si controlla l'esito mediante spettrometria di massa ESI. Quando la reazione giunge a completezza, si concentra in vacuo e si purifica il grezzo di reazione mediante HPLC preparativo.

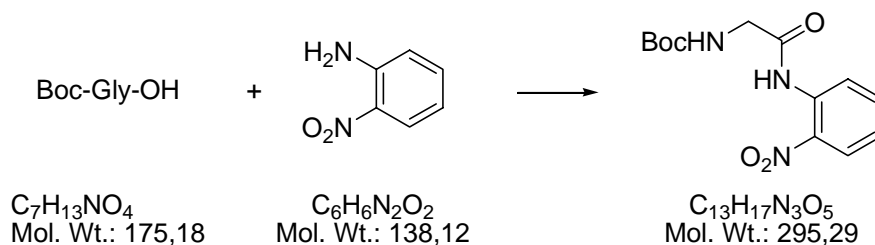
Caratteristiche del composto (**81**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 423.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 11.47; picco di iniezione = 1.96 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

PREPARAZIONE di:

Terbutil (2-nitrofenilcarbamoil)metilcarbammato (**Boc-Gly-(*o*-NO₂)-anilide**) (**91 e**)



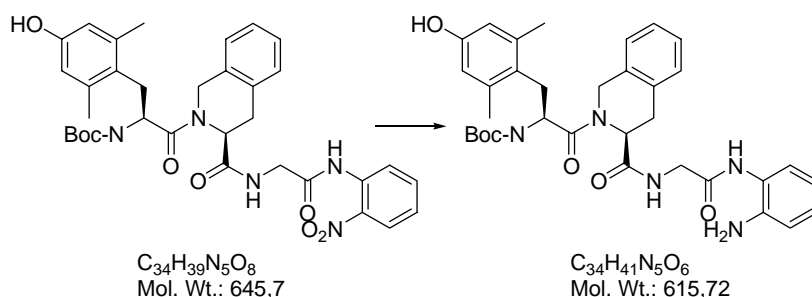
1.153 g (6.57 mmoli) di Boc-Gly-OH e 1 g (6.57 mmoli) di *o*-nitro-anilina vengono sciolti in 20 ml di piridina. Si raffredda a -15°C e si aggiunge 1 ml di POCl₃ (7.23 mmoli, 1.1 eq). L'andamento della reazione viene controllato dopo 3h mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:2. Giunta a termine, si aggiunge ghiaccio tritato e si acidifica con HCl 10% fino a pH acido stabile. La fase acquosa viene estratta con AcOEt, che si lava con NaHCO₃ 5% e Brine. Il grezzo di reazione viene purificato mediante colonna cromatografica (eluente AcOEt/EtPt 1:2).

Caratteristiche del composto (**91 e**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 296.

¹H-NMR (CDCl₃): δ: 10.998 (s, 1H, -NH), 8.832-8.783 (dd, 1H aromatico), 8.243-8.193 (dd, 1H aromatico), 7.654 (m, 1H aromatico), 7.258-7.199 (m, 1H aromatico), 4.029-3.999 (d, 2H, -CH₂-CO), 1.520-1.447 (s, 9H *terbutile*).

PREPARAZIONE di:
Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-amino)-anilide (**97**)



In un pallone fiammato e sotto atmosfera di Argon si sospendono 110 mg di C/Pd 10% in 10 ml di EtOH assoluto. Successivamente vengono aggiunti 344 mg (0.533 mmoli) del composto Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-nitro)-anilide e 205 mg (2.66 mmoli, 5eq) di HCOONH₄. Si lascia reagire a temperatura ambiente monitorando la reazione attraverso spettrometria di massa ESI. Quando la reazione giunge a completezza si filtra su celite il catalizzatore, si concentra la fase organica in vacuo, si solubilizza il residuo in AcOEt e si effettua un lavaggio con Brine. Dopo aver evaporato il solvente si ottiene un solido giallo, che viene utilizzato come tale nelle reazioni successive. (Resa = 97%).

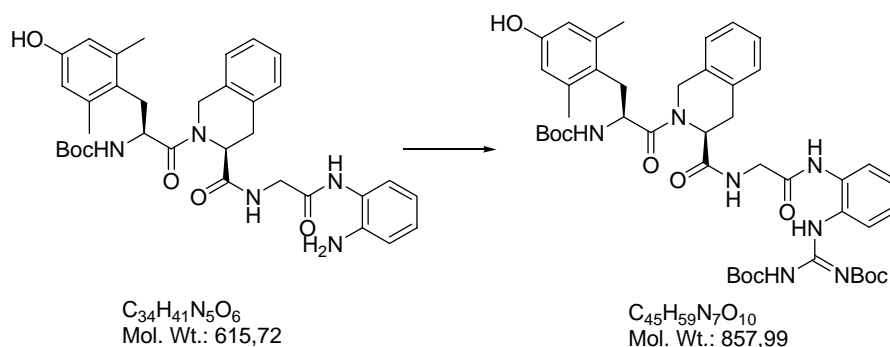
Caratteristiche del composto (**97**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 616.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 14.45; picco di iniezione = 1.10 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

PREPARAZIONE di:

Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-diBoc-guanidino)-anilide (**98**)



50 mg (0.081 mmoli) del composto Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-ammino)-anilide sono solubilizzati in 5 ml di DMF anidra. Alla soluzione si aggiungono 26.02 mg (0.089 mmoli) di N^1,N^2 -bis(*ter*butossicarbonil)-*S*-metilisotiourea, 0.102 ml (0.73mmoli) di TEA e 24.11 mg (0.089 mmoli) di $HgCl_2$. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 4h e monitorata attraverso spettrometria di massa ESI. Quando è giunta a termine, si elimina il solvente alla pompa meccanica, si solubilizza il residuo in AcOEt e si effettuano lavaggi con NH_4Cl saturo e brine. Dopo aver anidrificato e concentrato in vacuo la fase organica si ottiene un solido giallino, che viene utilizzato come tale nelle reazioni successive.

Caratteristiche del composto (**98**):

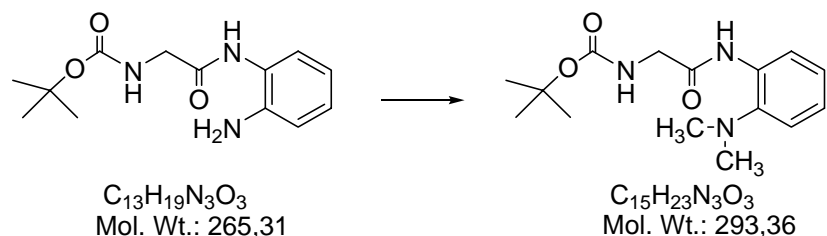
MS (ESI): $[MH]^+ = 858$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 27.28; picco di iniezione = 2.04 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

PREPARAZIONE di:

Terbutil(2-(dimetilammino)fenilcarbamoil)metilcarbammato

(Boc-Gly-(*o*-dimetilammino)-anilide) (102)



Si sciolgono 1.245 g (4.69 mmoli) di Boc-Gly-(*o*-ammino)-anilide in 10 ml di una miscela CH_3CN/H_2O 1:1 e si aggiungono 3.81 ml (46.98mmoli, 10 eq) di HCHO 37% e 886.4 mg (14.07 mmoli, 3eq) di $NaCNBH_3$. Dopo 1 minuto si addizionano 0,805 ml (14.07 mmoli, 3eq) di AcOH glaciale e dopo 5 minuti altri 3eq. Si lascia in agitazione a temperatura ambiente e si controlla mediante TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:2). Giunta a completezza, si evapora il solvente in vacuo, si riprende il residuo con AcOEt e si effettuano lavaggi con $NaHCO_3$ 5% e brine. Si anidrifca e si evapora a secchezza la fase organica. Il grezzo di reazione così ottenuto è sufficientemente puro da essere utilizzato senza ulteriori purificazioni nelle reazioni successive.

Caratteristiche del composto (102):

MS (ESI): $[MH]^+ = 294$.

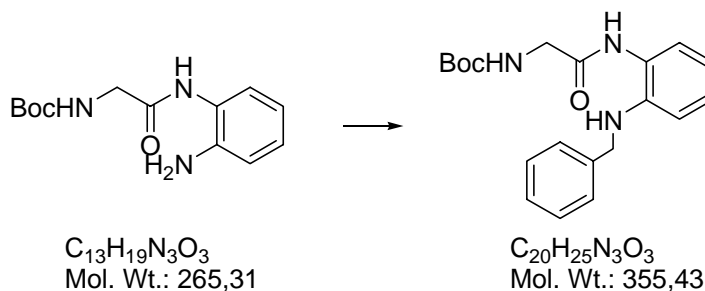
1H -NMR ($CDCl_3$): δ : 9.05 (s, 1H, -NH), 8.25 (m, 1H, -NH), 7.258-7.094 (m, 4H aromatici), 4.350 (s, 2H, -NH- CH_2 -CO-), 2.633 (s, 6H, 2- CH_3), 1.475 (s, 9H *terbutile*).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ : 167.886, 143.153, 132.584, 125.068, 124.382, 120.068, 119.595, 118.073, 79.453, 48.857, 44.866 (2 C), 28.390 (3 C).

PREPARAZIONE di:

Terbutil(2-(benzilammino)fenilcarbamoil)metilcarbammato

(Boc-Gly-(*o*-benzilammino)-anilide) (108)



In un pallone da 100 ml a due colli, munito di tappo suba seal nel collo laterale, si sciolgono 500 mg (1.89 mmoli) del composto Boc-Gly-(*o*-ammino)-anilide in 20 ml di THF anidro. Si aggiungono 0.29 ml (1.1 eq) di TEA e 0.25 ml (2.075 mmoli) di benzilbromuro. Si lascia reagire overnight a temperatura ambiente. Si controlla la reazione mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:1, si filtrano i sali su Gooch e si evapora a secchezza il filtrato. Si riprende il residuo con AcOEt e si effettuano lavaggi con NaHCO₃ 5% e brine. Il prodotto è purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente la miscela AcOEt/EtPt 1:1. (Resa = 60%).

Caratteristiche del composto (108):

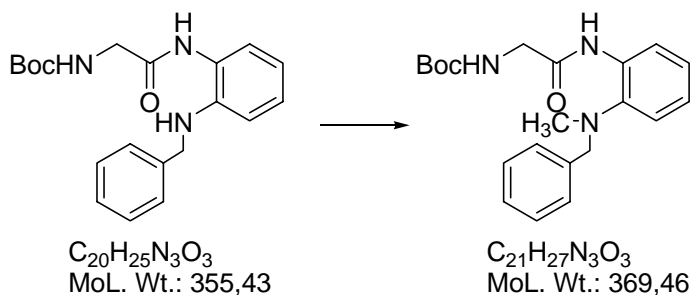
MS (ESI): [MH]⁺ = 356.

¹H-NMR (CDCl₃): δ: 7.830 (s, 1H, -NH), 7.346-6.651 (m, 9H aromatici), 5.312-5.293 (m, 1H, -NH), 4.339 (s, 2H, -NH-CH₂-CO), 3.911-3.883 (d, 2H, -NH-CH₂-Bzl), 1.417 (s, 9H *terbutile*).

PREPARAZIONE di:

Terbutil(2-(*N*-benzil-*N*-metilammino)fenilcarbamoil)metilcarbammato

(Boc-Gly-(*o*-*N*-benzil-*N*-metilammino)-anilide) (109)



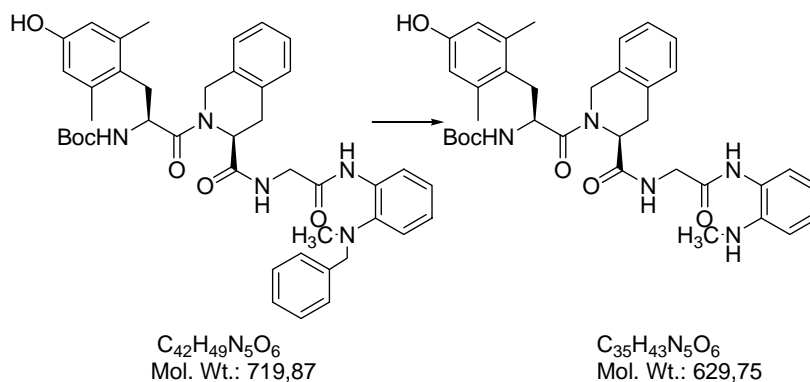
331 mg (0.93 mmoli) del composto Boc-Gly-(*o*-benzilammino)-anilide si solubilizzano in 20 ml di THF anidro e si gocciolano 64 μ l (1.025 mmoli, 1.1 eq) di CH_3I . Si lascia reagire a temperatura ambiente overnight e si controlla l'andamento mediante TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:1). Non essendo andata del tutto si fanno aggiunte progressive di 64 μ l di CH_3I in modo da indurla a completezza (occorreranno complessivamente 4.4 equivalenti di CH_3I). Si elimina il THF in vacuo, si riprende il residuo oleoso con AcOEt e si effettuano due lavaggi con $NaHCO_3$ 5% e uno con brine. Si anidrifca e si concentra in vacuo la fase organica per ottenere il composto desiderato (**109**) come olio giallino, sufficientemente puro da essere utilizzato nelle reazioni successive senza ulteriori purificazioni.

Caratteristiche del composto (**109**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 370$.

PREPARAZIONE di:

Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-metilammino)-anilide (**115**)



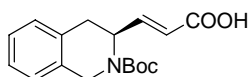
Una soluzione del composto Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-N-benzil-N-metilammino)-anilide (100 mg, 0.138 mmoli) in 50 ml di MeOH viene idrogenata al Parr ad una pressione di 70 psi di idrogeno per 24 ore in presenza di C/Pd 10% (10 mg). La reazione viene controllata mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:1 ed una volta giunta a completezza si filtra il catalizzatore su celite. Il filtrato viene evaporato a secchezza in modo da ottenere il composto desiderato (**115**) sufficientemente puro da essere utilizzato come tale nella reazione successiva.

Caratteristiche del composto (**115**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 630$.

CARATTERIZZAZIONE DEI COMPOSTI DI CUI NON E' DESCRITTA LA
PROCEDURA SINTETICA

Boc-Tic-CH=CH-COOH (26)

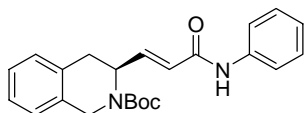


Ottenuto seguendo la procedura e).

MS (ESI): $[MH]^+ = 304$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ : 9.600 (s, 1H, -COOH); 7.260-7.112 (m, 4H aromatici); 6.768-6.716 (dd, 1H olefinico, $J=5.2$, $J=15.8$); 5.810-5.766 (dd, 1H olefinico, $J=1.6$, $J=15.8$); 5.003 (m, 1H); 4.744-4.702 (d, 1H, $J=16.8$); 4.376-4.334 (d, 1H, $J=16.8$); 3.229-3.185 (dd, 1H); 2.947-2.891 (m, 1H); 1.490 (s, 9H *terbutile*).

Boc-Tic-CH=CH-CO-NH-Ph (28 a)



Ottenuto seguendo la procedura a).

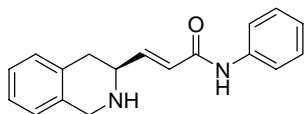
MS (ESI): $[MH]^+ = 379$

1H NMR ($CDCl_3$): δ : 7.490-7.075 (m, 9H aromatici); 6.832-6.705 (d, 1H); 6.001-5.854 (d, 1H); 5.203 (m, 1H); 4.799-4.315 (dd, 2H); 3.306-2.809 (dd, 2H); 1.498 (s, 9H *terbutile*).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ : 163.296; 155.062; 137.963; 132.868; 132.253; 129.035; 127.000 (2 C); 126.764 (2 C); 126.267 (2 C); 124.879; 124.414; 119.847 (2 C); 80.673; 60.514; 43.825; 33.391; 28.556 (3 C).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 19.74, con picco di iniezione = 1.94 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Tic-CH=CH-CO-NH-Ph (29 a)

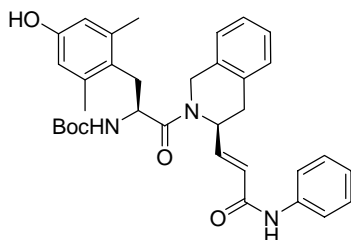


Ottenuto seguendo la procedura d).

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

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 12.88, con picco di iniezione = 2.13 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CO-NH-Ph (30 a)

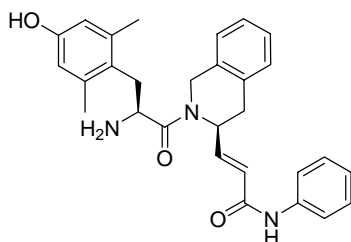


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 570.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 21.20, con picco di iniezione = 2.15 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-CO-NH-Ph (31 a)



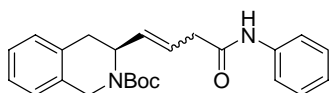
Ottenuto seguendo la procedura d).

[α]_D²⁰ = -10° (c = 0.12, in EtOH).

MS (ESI): [MH]⁺ = 470.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 14.73, con picco di iniezione = 2.12 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-CH=CH-CH₂-CO-NH-Ph (28 b)

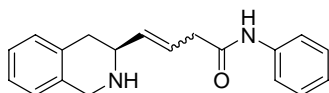


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 393.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 24.33, con picco di iniezione = 2.31 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-CH=CH-CH₂-CO-NH-Ph (29 b)

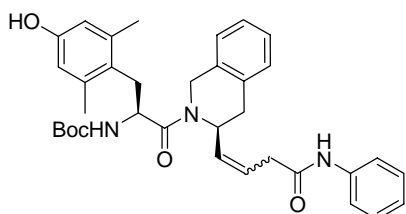


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 293$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 13.66, con picco di iniezione = 2.14 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-CO-NH-Ph (30 b)

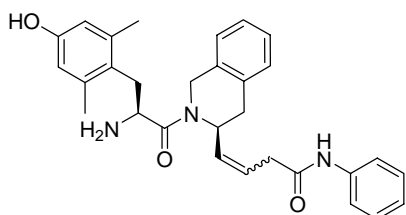


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 584$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 21.19, con picco di iniezione = 2.39 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-CO-NH-Ph (31 b)

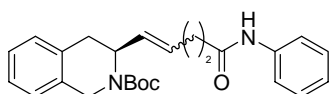


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 484$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 18.24 , con picco di iniezione = 2.36 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-CO-NH-Ph (28 c)



Ottenuto seguendo la procedura a).

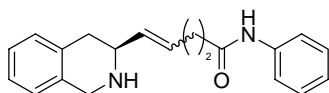
MS (ESI): $[MH]^+ = 407$.

1H NMR (CDCl₃): δ : 8.904 (br, 1H, -NH); 7.323-7.073 (m, 9H aromatici); 5.537-5.317 (m, 2H); 4.873-4.751 (m, 2H); 4.420-4.299 (m, 1H); 3.735 (s, 2H); 2.666-2.235 (m, 4H); 1.432 (s, 9H *terbutile*).

^{13}C NMR (CDCl₃): δ : 157.310; 155.029; 147.401; 132.609; 130.738; 129.293; 128.913 (2 C); 126.745 (2 C); 126.426 (2 C); 126.122; 123.840; 119.642 (2 C); 80.492; 59.167; 36.870; 34.215; 32.824; 28.610; 28.390 (3 C).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 21.60, con picco di iniezione = 2.00 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-CO-NH-Ph (29 c)

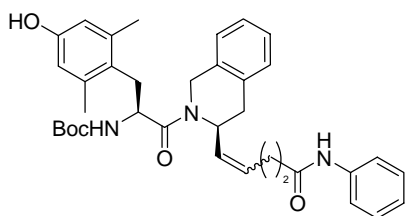


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 307$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 13.61, con picco di iniezione = 2.12 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-CO-NH-Ph (30 c)

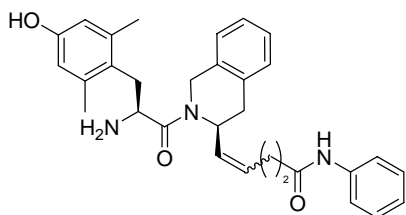


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 598$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 21.74, con picco di iniezione = 2.13 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-CO-NH-Ph (31 c)

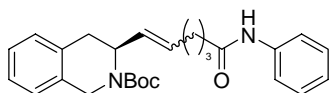


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 498.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 16.82, con picco di iniezione = 2.25 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-CO-NH-Ph (28 d)

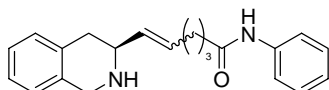


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 421.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 22.23, con picco di iniezione = 2.02 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-CO-NH-Ph (29 d)

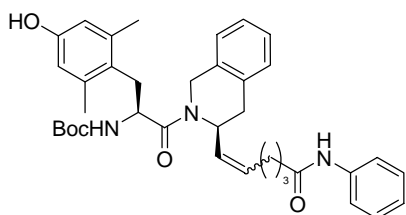


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 321.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 14.13, con picco di iniezione = 2.12 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-CO-NH-Ph (30 d)

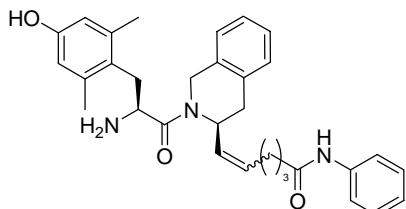


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 612$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 22.28, con picco di iniezione = 2.13 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-CO-NH-Ph (31 d)



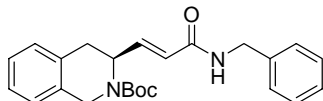
Ottenuto seguendo la procedura d).

$[\alpha]_D^{20} = +21^\circ$ (c= 0.11, in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 512$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 16.42, con picco di iniezione = 2.13 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Tic-CH=CH-CO-NH-Bzl (32 a)



Ottenuto seguendo la procedura a).

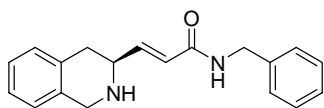
MS (ESI): $[MH]^+ = 393$.

¹H NMR (CDCl₃): δ : 7.306-7.119 (m, 9H aromatici); 6.80-6.60 (br, 1H, -NH); 5.80 (m, 2H olefinici); 4.733-4.691 (d, 1H, Ar-CH₂-N-Boc, J=16.8); 4.428-4.414 (d, 2H, Ph-CH₂-NH-, J=5.6); 4.350-4.308 (d, 1H, Ar-CH₂-N-Boc, J=16.8); 3.20-3.15 (dd, 1H, Ar-CH₂-CH-); 2.847-2.79 (dd, 1H, Ar-CH₂-CH-); 1.476 (s, 9H *ter*butile); 1.271-1.235 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-).

¹³C NMR (CDCl₃): δ : 165.045; 154.862; 142.588; 137.948; 132.207; 128.693; 127.933 (2 C); 127.568 (2 C); 126.822 (2 C); 126.594 (2 C); 126.168; 124.305; 80.409; 51.434; 43.707; 33.250; 29.699; 28.452 (3 C).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 19.73, con picco di iniezione = 1.96 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Tic-CH=CH-CO-NH-Bzl (33 a)

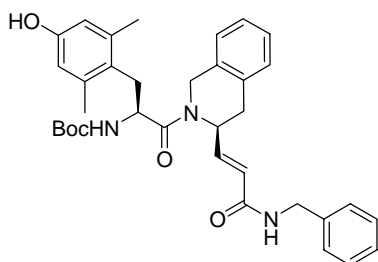


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 293$

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 13.53, con picco di iniezione = 2.13 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CO-NH-Bzl (34 a)

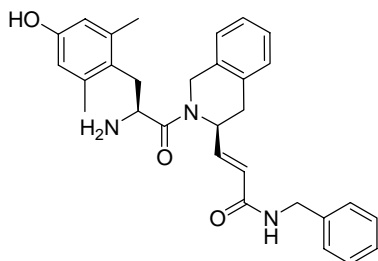


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 586$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 20.72, con picco di iniezione = 2.13 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-CH=CH-CO-NH-Bzl (35 a)



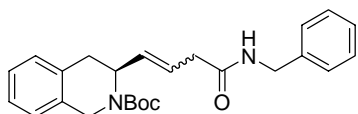
Ottenuto seguendo la procedura d).

$[\alpha]_D^{20} = +3.33^\circ$ (c= 0.1, in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 484$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.14, con picco di iniezione = 1.62 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Tic-CH=CH-CH₂-CO-NH-Bzl (32 b)

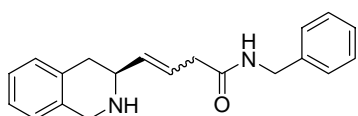


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 407$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 21.16, con picco di iniezione = 1.98 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-CH=CH-CH₂-CO-NH-Bzl (33 b)

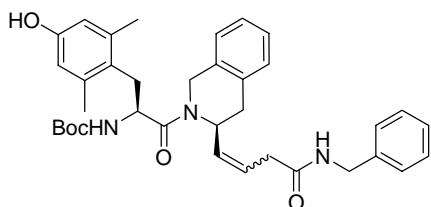


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 307$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 12.66, con picco di iniezione = 2.09 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-CO-NH-Bzl (34 b)

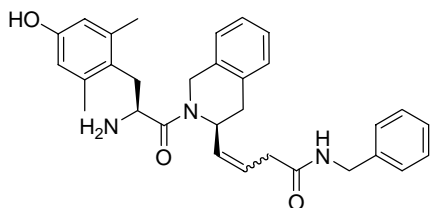


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 598$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 20.66, con picco di iniezione = 2.14 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-CO-NH-Bzl (35 b)

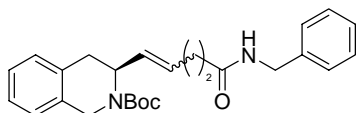


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 498$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.18, con picco di iniezione = 2.12 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-CO-NH-Bzl (32 c)



Ottenuto seguendo la procedura a).

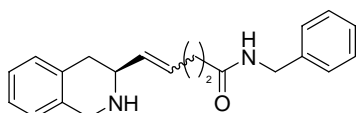
MS (ESI): $[MH]^+ = 421$.

¹H NMR (CDCl₃): δ : 7.293-7.057 (m, 9H aromatici); 5.441-5.269 (m, 2H olefinici); 4.749-4.240 (m, 5H); 3.177-3.080 (br, 1H); 2.669-2.225 (m, 6H); 1.372 (s, 9H *terbutile*).

¹³C NMR (CDCl₃): δ : 174.836; 155.070; 137.569; 132.853; 132.758; 130.179; 129.848; 129.146; 128.728 (2 C); 127.939 (2 C); 127.608; 126.866; 126.519; 126.117; 80.602; 44.007; 36.561 (2 C); 34.392 (2 C); 28.485 (3 C); 24.644.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 21.22, con picco di iniezione = 1.98 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-CO-NH-Bzl (33 c)

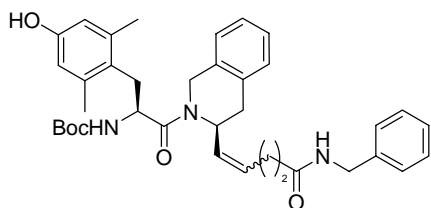


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 321$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 16.72, con picco di iniezione = 2.12 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-CO-NH-Bzl (34 c)

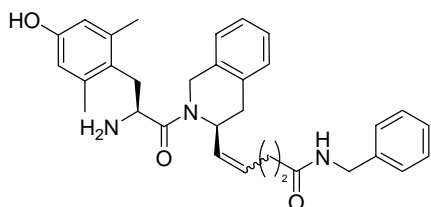


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 612.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 21.20, con picco di iniezione = 2.13 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-CO-NH-Bzl (35 c)



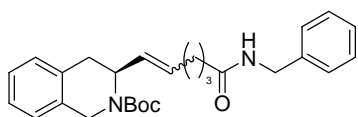
Ottenuto seguendo la procedura d).

[α]_D²⁰ = +6.66° (c= 0.15, in EtOH).

MS (ESI): [MH]⁺ = 512.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 18.85, con picco di iniezione = 2.12 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-CO-NH-Bzl (32 d)



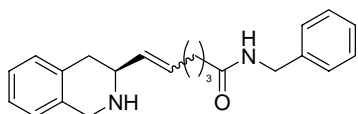
Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 435.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.290-7.087 (m, 9H aromatici); 5.326-5.066 (m, 2H olefinici); 4.518-4.178 (m, 5H); 3.041-2.993 (m, 1H); 2.583-2.537 (d, 2H); 2.260-2.235 (m, 6H); 1.439 (s, 9H *terbutile*).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 22.22, con picco di iniezione = 2.01 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-CO-NH-Bzl (33 d)

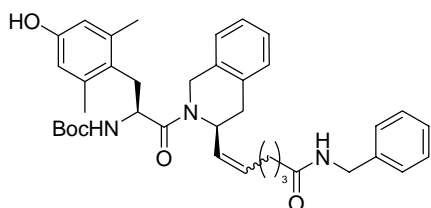


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 335.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 17.46, con picco di iniezione = 2.01 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-CO-NH-Bzl (34 d)

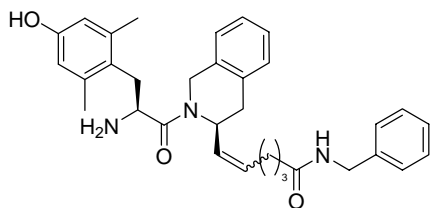


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 626.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 17.34, con picco di iniezione = 1.99 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-CO-NH-Bzl (35 d)



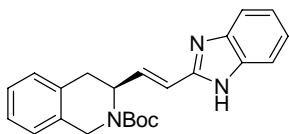
Ottenuto seguendo la procedura d).

[α]_D²⁰ = +6.66° (c=0.1, in EtOH).

MS (ESI): [MH]⁺ = 526.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.40, con picco di iniezione = 2.00 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-CH=CH-Bid (36 a)

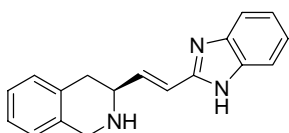


Ottenuto seguendo la procedura c).

MS (ESI): $[MH]^+ = 376$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 17.78, con picco di iniezione = 3.75 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Tic-CH=CH-Bid (37 a)



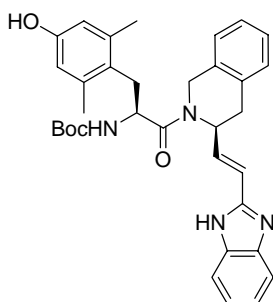
Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 276$.

1H NMR (CDCl₃): δ : 12.405 (br, 1H, -NH); 7.456 (br, 1H, -NH); 7.094-7.042 (m, 8H aromatici); 6.924-6.869 (dd, 1H olefinico, J=5.6, J=16.2); 6.696-6.656 (d, 1H olefinico, J=16.2); 4.050 (s, 2H); 3.761-3.735 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 2.949-2.898 (m, 1H); 2.772-2.747 (m, 1H).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 8.65, con picco di iniezione = 1.85 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-Bid (38 a)

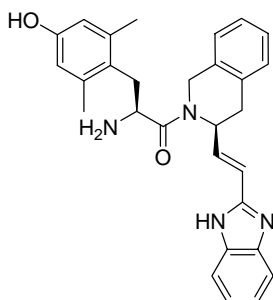


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 567$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.24, con picco di iniezione = 1.62 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-CH=CH-Bid (39 a)



Ottenuto seguendo la procedura d).

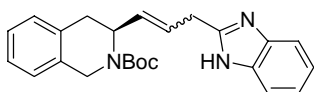
$[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$ (c= 0.1, in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 467$.

1H NMR (CDCl₃): δ : 7.708-7.210 (m, 8H); 6.438-6.270 (m, 4H); 4.515-4.428 (m, 4H); 3.956 (m, 1H); 3.137-3.024 (m, 4H); 2.500 (s, 6H); 2.241-2.188 (m, 2H).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 10.86 , con picco di iniezione = 1.84 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-CH=CH-CH₂-Bid (36 b)



Ottenuto seguendo la procedura c).

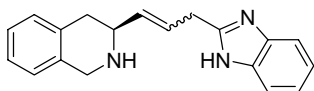
MS (ESI): $[MH]^+ = 390$.

1H NMR (CDCl₃): δ : 7.528-7.505 (m, 2H aromatici); 7.258-7.158 (m, 6H aromatici); 5.645-5.587 (m, 1H olefinico); 5.405-5.335 (m, 1H olefinico); 4.699-4.411 (dd, 2H); 3.687-3.600 (dd, 1H); 3.480 (s, 2H); 3.289-3.179 (m, 1H); 2.805-2.730 (m, 1H); 1.624 (s, 9H *terbutile*).

^{13}C NMR (CDCl₃): δ : 156.055; 135.073; 133.027; 132.959; 130.609 (2 C); 128.624; 127.323; 126.799; 126.487; 126.160; 125.711; 122.722 (2 C); 122.167 (2 C); 81.260; 61.601; 44.573; 34.923; 29.751; 28.755 (3 C).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 18.44, con picco di iniezione = 2.00 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-CH=CH-CH₂-Bid (37 b)

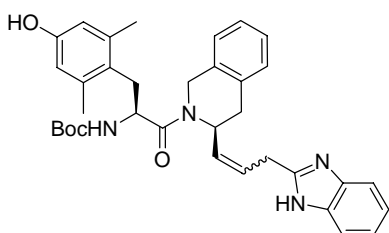


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 290$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 10.53, con picco di iniezione = 2.14 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-Bid (38 b)

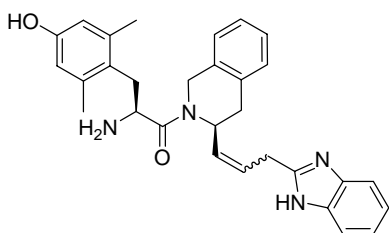


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 581$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 16.57, con picco di iniezione = 2.15 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-Bid (39 b)

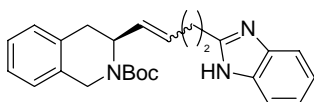


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 481$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.23, con picco di iniezione = 2.23 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-Bid (36 c)



Ottenuto seguendo la procedura c).

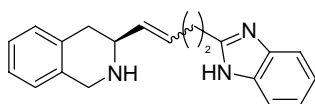
MS (ESI): $[MH]^+ = 404$.

1H NMR (CDCl₃): δ : 7.754-7.731 (m, 2H aromatici); 7.454-7.431 (m, 2H aromatici); 7.259-7.152 (m, 4H aromatici); 5.601-5.312 (m, 2H olefinici); 4.707-4.666 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 4.482-4.328 (m, 2H, Ar-CH₂-N-); 3.262-3.222 (m, 2H, Ar-CH₂-CH-); 2.975-2.885 (m, 2H); 2.679-2.620 (m, 2H); 1.572 (s, 9H *ter*butile).

^{13}C NMR (CDCl₃): δ : 153.393; 134.396; 133.118 (2 C); 132.335; 131.263 (2 C); 128.860; 128.639; 128.335; 127.415; 126.882; 126.418; 126.099; 125.901; 114.121; 50.072; 48.049; 44.071; 34.626 (2 C); 31.668; 28.694 (3 C).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 18.33, con picco di iniezione = 2.00 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-Bid (37 c)

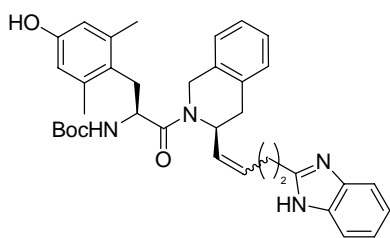


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 304$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 10.36, con picco di iniezione = 2.11 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-Bid (38 c)

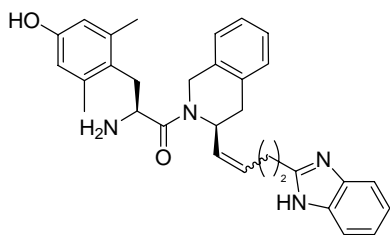


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 595$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 20.23, con picco di iniezione = 2.11 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-Bid (39 c)

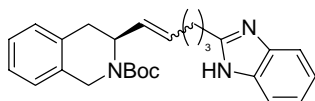


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 495$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 12.77, con picco di iniezione = 2.13 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-Bid (36 d)



Ottenuto seguendo la procedura c).

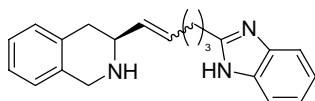
MS (ESI): $[MH]^+ = 418$.

¹H NMR (CDCl₃): δ : 7.626-7.603 (m, 2H aromatici); 7.276-7.088 (m, 6H aromatici); 5.346-5.327 (m, 2H olefinici); 4.773-4.731 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 4.273-4.180 (m, 2H, Ar-CH₂-N-); 3.125-3.087 (m, 2H, Ar-CH₂-CH-); 2.616-2.570 (m, 2H); 2.400-2.311 (m, 2H); 2.000-1.889 (m, 2H); 1.562 (s, 9H *terbutile*).

¹³C NMR (CDCl₃): δ : 154.914; 136.769; 135.634 (2 C); 132.868 (2 C); 130.867; 129.605; 129.004; 126.951; 126.548; 126.084; 122.951; 120.312; 116.806; 114.547; 61.934; 47.190; 34.968; 29.751; 28.671 (3 C); 27.698; 27.150; 26.283.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 17.90, con picco di iniezione = 1.97 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-Bid (37 d)

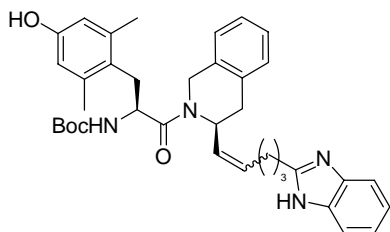


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 318$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 10.81, con picco di iniezione = 2.15 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-Bid (38 d)

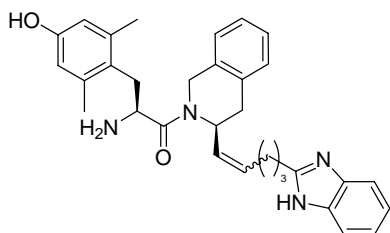


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+$ = 609.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 18.95, con picco di iniezione = 1.83 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-Bid (39 d)



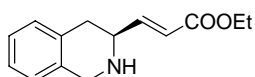
Ottenuto seguendo la procedura d).

$[\alpha]_D^{20}$ = +24° (c= 0.12, in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+$ = 509.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 12.76, con picco di iniezione = 2.16 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Tic-CH=CH-COOEt (40)

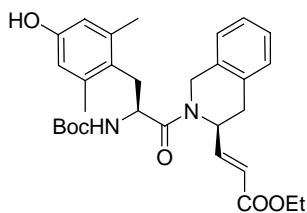


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+$ = 232.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 16.96, con picco di iniezione = 2.46 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

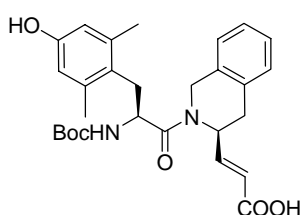
Boc-Dmt-Tic-CH=CH-COOEt (42 a)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 523$.

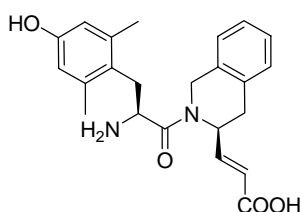
Boc-Dmt-Tic-CH=CH-COOH (43 a)



Ottenuto seguendo la procedura e).

MS (ESI): $[MH]^+ = 495$.

H-Dmt-Tic-CH=CH-COOH (44 a)

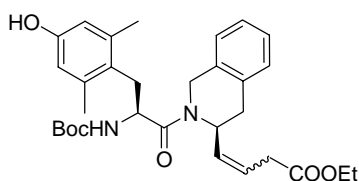


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 395$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.13, con picco di iniezione = 2.21 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

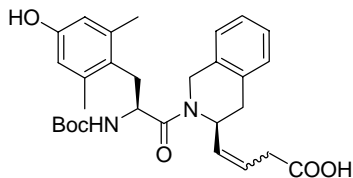
Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-COOEt (42 b)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 537$.

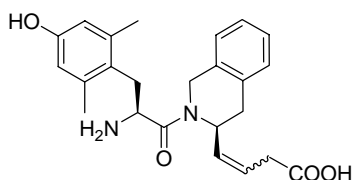
Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-COOH (43 b)



Ottenuto seguendo la procedura e).

MS (ESI): $[MH]^+ = 509$.

H-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-COOH (44 b)

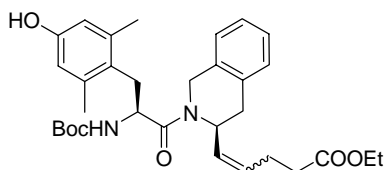


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 409$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.38, con picco di iniezione = 2.63 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-COOEt (42 c)

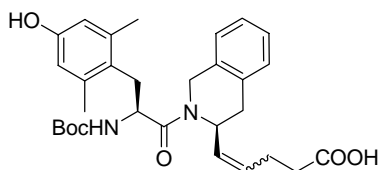


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 551$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 24.33, con picco di iniezione = 2.46 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-COOH (43 c)

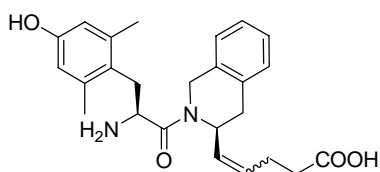


Ottenuto seguendo la procedura e).

MS (ESI): [MH]⁺ = 523.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 21.25, con picco di iniezione = 2.65 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-COOH (44 c)

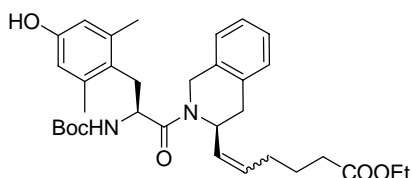


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 423.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 16.17, con picco di iniezione = 2.47 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-COOEt (42 d)

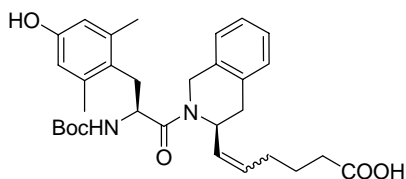


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 565.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 24.64, con picco di iniezione = 2.47 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-COOH (43 d)

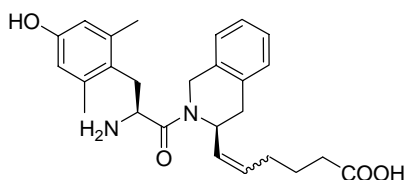


Ottenuto seguendo la procedura e).

MS (ESI): [MH]⁺ = 537.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 20.64, con picco di iniezione = 2.30 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-COOH (44 d)

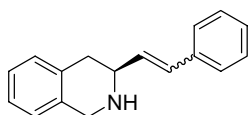


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 437.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.01, con picco di iniezione = 3.29 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-CH=CH-Ph (62 a)

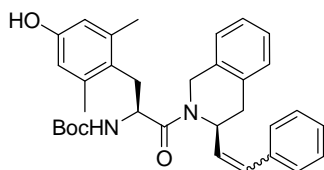


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 236.

¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.394-7.122 (m, 9H aromatici); 6.776-6.607 (m, 2H olefinici); 4.276-4.074 (m, 2H, Ar-CH₂-NH); 3.910-3.862 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 3.024-2.843 (m, 2H, Ar-CH₂-CH-).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-Ph (63 a)

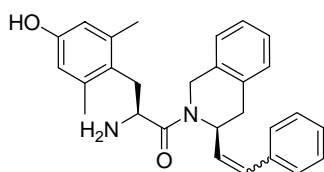


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 529$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 22.98, con picco di iniezione = 3.51 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-CH=CH-Ph (64 a)



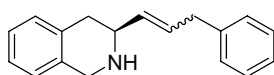
Ottenuto seguendo la procedura d).

$[\alpha]_D^{20} = +12^\circ$ (c= 0.13, in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 427$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.03, con picco di iniezione = 1.44 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Tic-CH=CH-CH₂-Ph (62 b)



Ottenuto seguendo la procedura d).

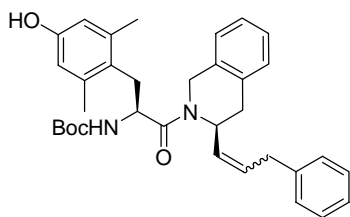
$[\alpha]_D^{20} = +16.06^\circ$ (c = 0.13, CHCl₃)

MS (ESI): $[MH]^+ = 250$.

¹H NMR (CDCl₃): δ : 10.2521 (br, 1H, -NH); 7.300-1.156 (m, 9H aromatici); 5.954-5.909 (m, 1H olefinico); 5.716-5.666 (m, 1H olefinico); 4.377-4.317 (m, 2H, Ar-CH₂-CH=); 3.515-3.496 (d, 2H, Ar-CH₂-N-); 3.214-3.145 (m, 1H, Ar-CH₂-CH-); 2.994-2.941 (m, 2H, Ph-CH₂-CH-)

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.62, con picco di iniezione = 1.48 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-Ph (63 b)

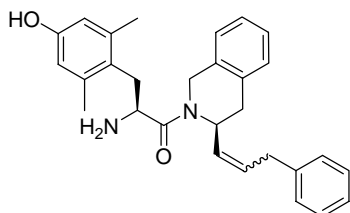


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 541$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 24.41, con picco di iniezione = 3.79 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-CH₂-Ph (64 b)



Ottenuto seguendo la procedura d).

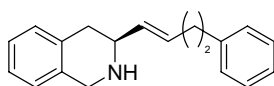
$[\alpha]_D^{20} = +33.75^\circ$ (c= 0.1, in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 441$.

¹H NMR (CDCl₃): δ : 7.282-7.0 (m, 11H); 4.187-4.076 (m, 2H); 2.954-2.880 (m, 2H); 2.342-1.987 (m, 8H); 1.275 (s, 6H).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 17.60, con picco di iniezione = 3.35 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-Ph (62 c)



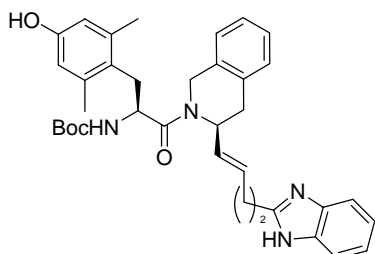
Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 264$.

¹H NMR (CDCl₃): δ : 7.293-7.092 (m, 9H aromatici); 5.878-5.503 (m, 2H olefinici); 4.133-4.118 (m, 2H); 3.574-3.496 (t, 2H); 2.961-2.599 (m, 2H); 2.407-2.366 (m, 1H); 1.979-1.733 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 165.835; 152.800; 141.743; 131.780; 129.194; 128.487; 128.381; 128.099; 127.742; 126.457; 126.198; 126.129; 126.061; 125.924; 55.342; 54.582; 47.425; 29.979; 21.941.

Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-Ph (63 c)

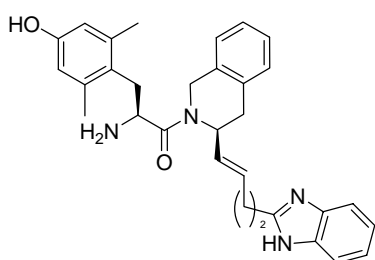


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 555$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 28.93, con picco di iniezione = 5.46 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₂-Ph (64 c)

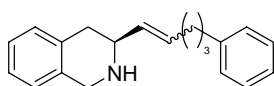


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 455$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 21.76, con picco di iniezione = 5.64 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-Ph (62 d)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 278$.

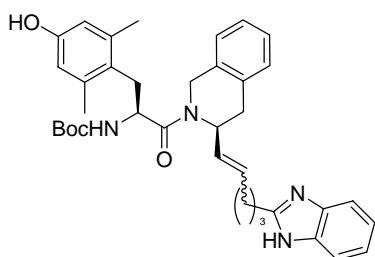
^1H NMR (CDCl_3): δ : 7.260-7.124 (m, 9H aromatici); 5.903-5.760 (m, 1H olefinico); 5.638-5.527 (m, 1H olefinico); 5.324-5.207 (m, 1H); 4.172-4.072 (m, 2H); 3.715-3.612

(m, 1H); 2.910-2.881 (m, 2H); 2.652-2.575 (t, 2H); 2.119-2.049 (m, 2H); 1.803-1.636 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ: 142.252; 134.579; 133.012; 131.582; 129.156; 128.997 (2C); 128.533; 128.396 (2C); 127.012; 126.464; 126.244; 125.833; 55.258; 46.178; 35.295; 33.820; 31.957; 30.664.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 18.13, con picco di iniezione = 3.10 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

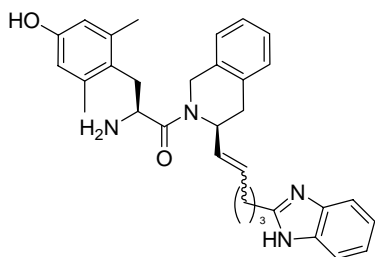
Boc-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-Ph (63 d)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 569.

H-Dmt-Tic-CH=CH-(CH₂)₃-Ph (64 d)

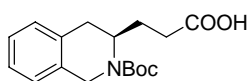


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 469.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 22.94, con picco di iniezione = 5.19 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-(CH₂)₂-COOH (66)

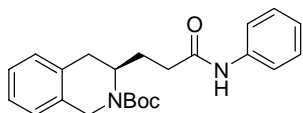


Ottenuto seguendo la procedura e).

MS (ESI): [MH]⁺ = 306.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 18.96; picco di iniezione = 2.16 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

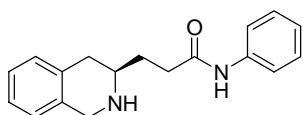
Boc-Tic-(CH₂)₂-CO-NH-Ph (68)



Ottenuto seguendo la procedura b).

MS (ESI): [MH]⁺ = 381.

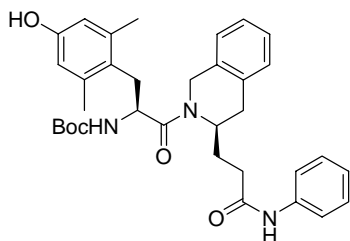
H-Tic-(CH₂)₂-CO-NH-Ph (69)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 281.

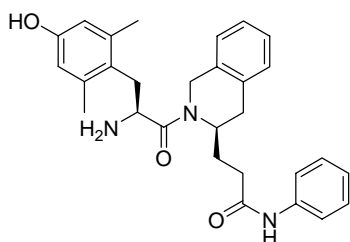
Boc-Dmt-Tic-(CH₂)₂-CO-NH-Ph (71)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 572.

H-Dmt-Tic-(CH₂)₂-CO-NH-Ph (73)

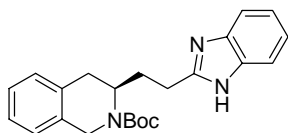


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 472.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 9.90; picco di iniezione = 1.90 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

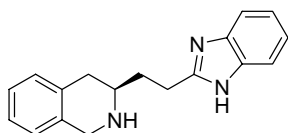
Boc-Tic-(CH₂)₂-Bid (67)



Ottenuto seguendo la procedura c).

MS (ESI): $[MH]^+ = 378$.

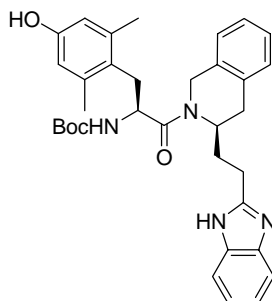
H-Tic-(CH₂)₂-Bid (70)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 278$.

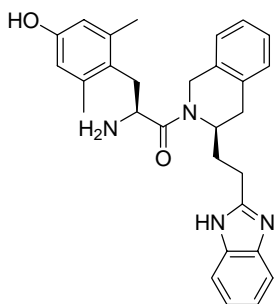
Boc-Dmt-Tic-(CH₂)₂-Bid (72)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 569$.

H-Dmt-Tic-(CH₂)₂-Bid (74)

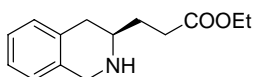


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 469.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 8.31; picco di iniezione = 1.96 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Tic-(CH₂)₂-COOEt (75)

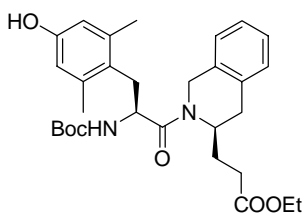


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 234.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 16.09; picco di iniezione = 2.10 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Dmt-Tic-(CH₂)₂-COOEt (76)

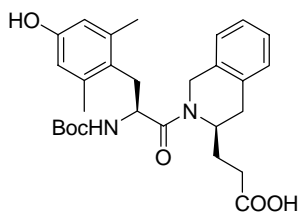


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 525.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 20.73; picco di iniezione = 1.95 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

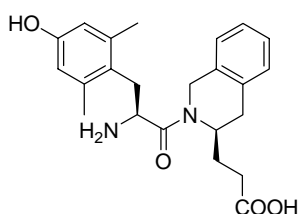
Boc-Dmt-Tic-(CH₂)₂-COOH (77)



Ottenuto seguendo la procedura e).

MS (ESI): [MH]⁺ = 497.

H-Dmt-Tic-(CH₂)₂-COOH (78)

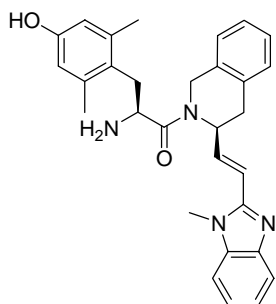


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 397.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.04; picco di iniezione = 2.18 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-CH=CH-(Me)Bid (80)

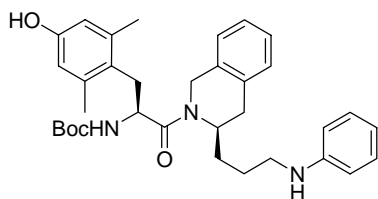


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 481.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 8.50; picco di iniezione = 1.99 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

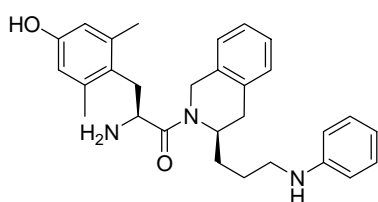
Boc-Dmt-Tic-(CH₂)₃-NH-Ph (83)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 558.

H-Dmt-Tic-(CH₂)₃-NH-Ph (84)

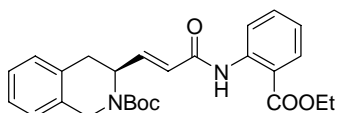


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 458.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 8.50; picco di iniezione = 2.01 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

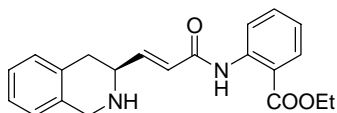
Boc-Tic-CH=CH-CO-NH-(*o*-COOEt)Ph (85)



Ottenuto seguendo la procedura b).

MS (ESI): [MH]⁺ = 451.

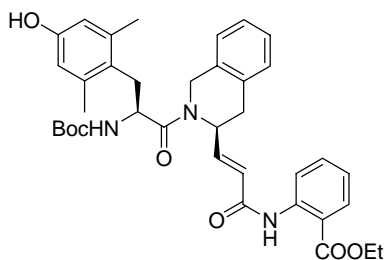
H-Tic-CH=CH-CO-NH-(*o*-COOEt)Ph (86)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 351.

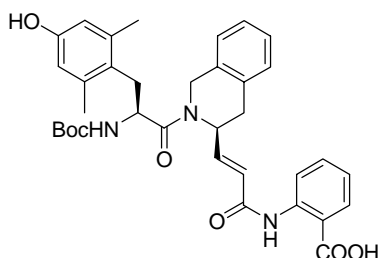
Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CO-NH-(*o*-COOEt)Ph (87)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 642$.

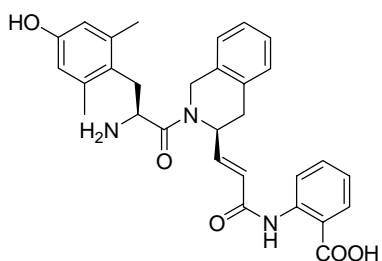
Boc-Dmt-Tic-CH=CH-CO-NH-(*o*-COOH)Ph (88)



Ottenuto seguendo la procedura e).

MS (ESI): $[MH]^+ = 614$.

H-Dmt-Tic-CH=CH-CO-NH-(*o*-COOH)Ph (89)



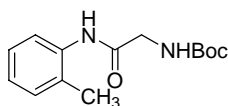
Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 514$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 13.66; picco di iniezione = 1.97 (eluente 100%

A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Gly-(*o*-metil)-anilide (91 a)

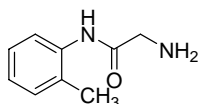


Ottenuto seguendo la procedura b).

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

1H -NMR (CDCl₃): δ : 10.013 (s, 1H, -NH), 7.954 (s, 1H, -NH), 7.564-7.129 (m, 4H aromatici), 4.153 (s, 2H, -CO-CH₂-NH-), 2.354 (s, 3H, -CH₃), 1.876 (s, 9H *terbutile*).

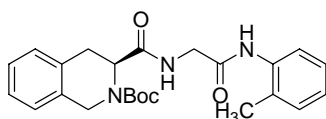
H-Gly-(*o*-metil)-anilide (92 a)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 165$.

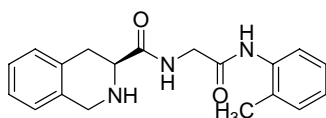
Boc-Tic-Gly-(*o*-metil)-anilide (93 a)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 424$.

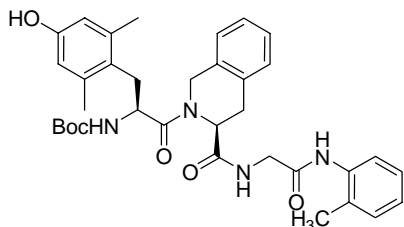
H-Tic-Gly-(*o*-metil)-anilide (94 a)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 324$.

Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-metil)-anilide (95 a)

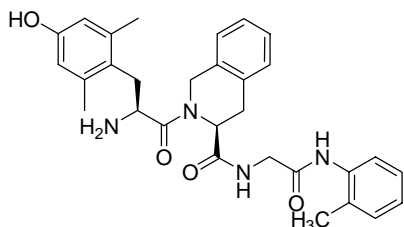


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 615$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 13.76; picco di iniezione = 1,97 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-metil)-anilide (96 a)



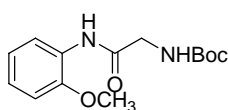
Ottenuto seguendo la procedura d).

$[\alpha]_D^{20} = + 8,72^\circ$ (c = 0.11, in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 515$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 10.02; picco di iniezione = 1.87 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

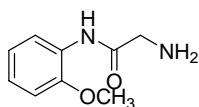
Boc-Gly-(*o*-metossil)-anilide (91 b)



Ottenuto seguendo la procedura b).

MS (ESI): $[MH]^+ = 281$.

H-Gly-(*o*-metossil)-anilide (92 b)

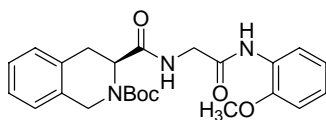


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 181$.

¹H-NMR (CDCl₃): δ : 9.65 (br, 1H, -NH), 8.440-8.393 (m, 2H, -NH₂), 7.055-6.859 (m, 4H aromatici), 3.922-3.842 (m, 2H, NH₂-CH₂-CO-), 3.503 (s, 3H, -OCH₃).

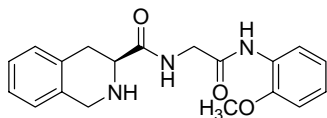
Boc-Tic-Gly-(*o*-metossil)-anilide (93 b)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 440$.

H-Tic-Gly-(*o*-metossil)-anilide (94 b)

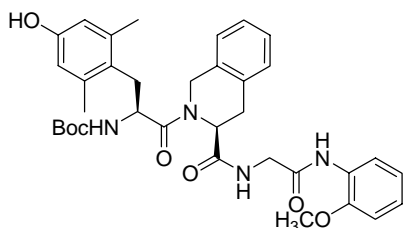


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 340$.

¹H-NMR (CDCl₃): δ : 8.358-8.208 (m, 2H aromatici), 7.134-6.812 (m, 6H aromatici), 4.133-4.073 (m, 2H), 3.995 (s, 2H, NH-CH₂-CO), 3.796 (s, 3H, -OCH₃), 3.166 (dd, 1H), 2.833-2.783 (m, 2H).

Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-metossil)-anilide (95 b)

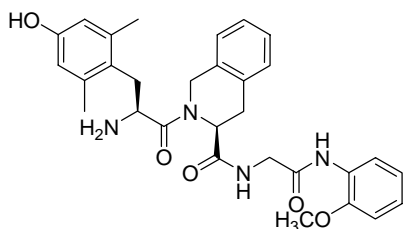


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 631$.

HLPC analitico: tempo di ritenzione = 13.98; picco di iniezione = 1.97 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A t₃₀).

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-metossil)-anilide (96 b)



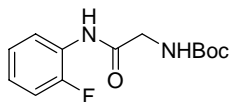
Ottenuto seguendo la procedura d).

$[\alpha]_D^{20} = + 10,43^\circ$ (c = 0.115, in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 631$.

HLPC analitico: tempo di ritenzione = 10.38; picco di iniezione = 1.89 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A t_{30}).

Boc-Gly-(*o*-fluoro)-anilide (91 c)

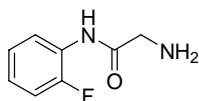


Ottenuto seguendo la procedura b).

MS (ESI): $[MH]^+ = 269$.

1H -NMR (CDCl₃): δ : 8.263 (m, 2H, -NH e 1H aromatico), 7.260-7.025 (m, 3H aromatici), 5.25 (br, 1H, -NH), 3.969-3.939 (d, 2H, -NH-CH₂), 1.471 (s, 9H *ter*butile).

H-Gly-(*o*-fluoro)-anilide (92 c)

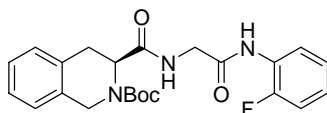


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 169$.

1H -NMR (CDCl₃): δ : 9.859 (br, 1H, -NH), 8.396 (m, 1H aromatico), 7.130-6.926 (m, 3H aromatici), 3.514 (s, 2H, NH₂-CH₂).

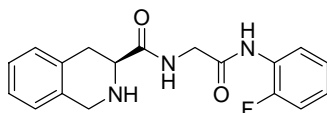
Boc-Tic-Gly-(*o*-fluoro)-anilide (93 c)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 428$.

H-Tic-Gly-(*o*-fluoro)-anilide (94 c)

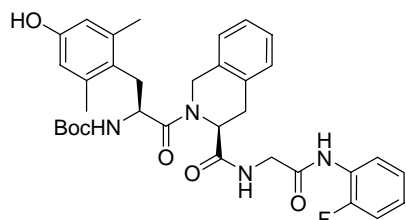


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 328$.

¹H-NMR (CDCl₃): δ : 8.390-8.050 (m, 2H aromatici), 7.258-7.036 (m, 6H aromatici), 4.167-4.125 (dd, 2H), 4.019-3.953 (m, 2H), 3.719-3.640 (m, 1H), 3.333-3.225 (dd, 1H), 2.939-2.806 (m, 1H).

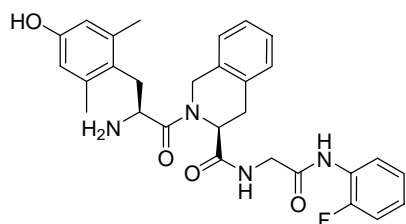
Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-fluoro)-anilide (95 c)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 619.

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-fluoro)-anilide (96 c)



Ottenuto seguendo la procedura d).

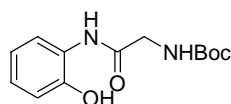
[α]_D²⁰ = + 19,09° (c = 0.11, in EtOH).

MS (ESI): [MH]⁺ = 519.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 10.26; picco di iniezione = 1.97 (eluente 100%

A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Gly-(*o*-idrossi)-anilide (91 d)



Ottenuto seguendo la procedura b).

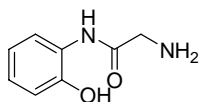
MS (ESI): [MH]⁺ = 267.

¹H-NMR (CDCl₃): δ : 7.953 (br, 1H, -NH), 7.258-6.847 (m, 4H aromatici), 3.995-3.964 (d, 2H, -NH-CH₂-), 1.478 (s, 9H *ter*butile).

¹³H-NMR (CDCl₃): δ: 169.535, 156.327, 148.398, 127.166, 125.202, 122.371, 120.604, 119.248, 77.100, 60.553, 28.343 (3 C).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 18.02; picco di iniezione = 4.00 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀)

H-Gly-(*o*-idrossi)-anilide (92 d)

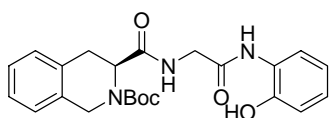


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 167.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 8.59; picco di iniezione = 4.19 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A a t₃₀).

Boc-Tic-Gly-(*o*-idrossi)-anilide (93 d)

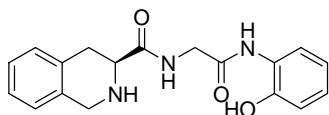


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 426.

¹H-NMR (CDCl₃): δ: 10.015 (s, 1H, -NH), 9.832 (s, 1H, -NH), 7.415-7.012 (m, 8H aromatici), 4.603 (dd, 1H), 4.270 (dd, 2H), 3.939 (s, 2H), 3.176 (dd, 2H), 1.431 (s, 9H *terbutile*).

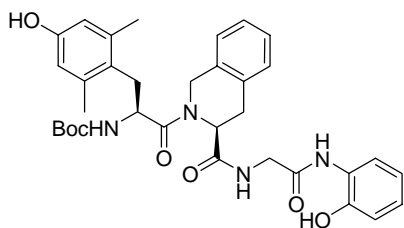
H-Tic-Gly-(*o*-idrossi)-anilide (94 d)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 326.

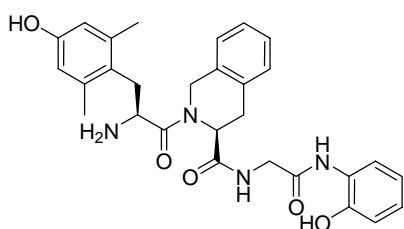
Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-idrossi)-anilide (95 d)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 617$.

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-idrossi)-anilide (96 d)

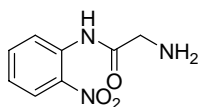


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 517$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 9.10; picco di iniezione = 1.97 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Gly-(*o*-nitro)-anilide (91 e)

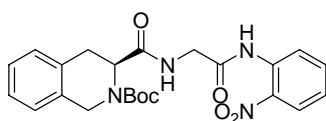


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 196$

1H -NMR (CDCl₃): δ : 10.150 (s, 1H, -NH), 8.866-8.823 (dd, 1H aromatico), 8.220-8.087 (dd, 1H aromatico), 7.678-7.608 (m, 1H aromatico), 7.258-7.141 (m, 1H aromatico), 5.123 (s, 2H, -NH₂), 3.568 (s, 2H, -CH₂).

Boc-Tic-Gly-(*o*-nitro)-anilide (92 e)

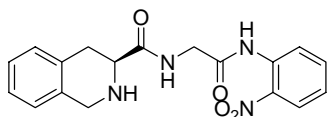


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 455$.

1H -NMR ($CDCl_3$): δ : 10.057 (s, 1H, -NH), 8.980 (br, 1H, -NH), 8.179 (dd, 1H aromatico), 7.287-7.070 (m, 7H aromatici), 3.493 (s, 2H), 3.742 (m, 1H), 4.219-4.190 (m, 2H), 3.529-3.468 (m, 2H), 1.997 (s, 9H *terbutile*).

H-Tic-Gly-(*o*-nitro)-anilide (93 e)



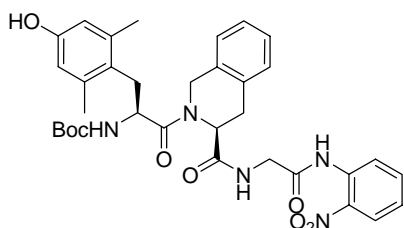
Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 355$.

1H -NMR ($CDCl_3$): δ : 10.125 (s, 1H, -NH), 9.058 (br, 1H, -NH), 8.220 (dd, 1H aromatico), 7.258-7.070 (m, 7H aromatici), 3.493 (s, 2H), 3.951 (m, 1H), 3.883 (m, 2H), 3.529-3.468 (m, 2H).

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 8.11; picco di iniezione = 1.97 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-nitro)-anilide (94 e)

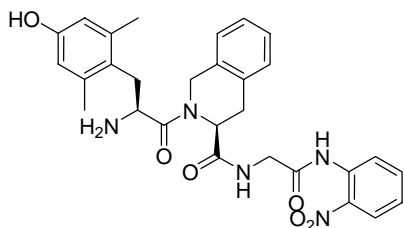


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 646$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 14.13; picco di iniezione = 1,96 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-nitro)-anilide (95 e)



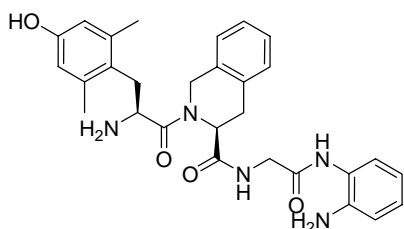
Ottenuto seguendo la procedura d).

$[\alpha]_D^{20} = +30^\circ$ (c = 0,10 in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 546$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 20.74; picco di iniezione = 1.43 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-ammino)-anilide (96 e)



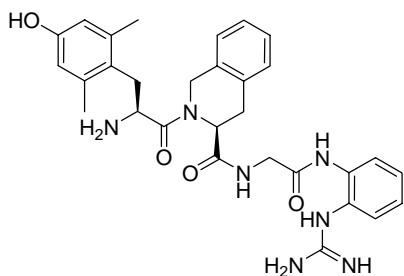
Ottenuto seguendo la procedura d).

$[\alpha]_D^{20} = +13^\circ$ (c = 0,1 in D₂O).

MS (ESI): $[MH]^+ = 516$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 9.90; picco di iniezione = 1.27 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-guanidino)-anilide (100)

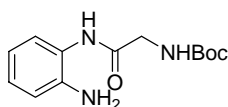


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 558$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 11.76; picco di iniezione = 1.15 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Gly-(*o*-ammino)-anilide (101)



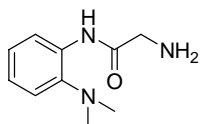
Ottenuto seguendo la procedura b).

MS (ESI): $[MH]^+ = 266$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.84; picco di iniezione = 5.00 (eluente 100%

A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

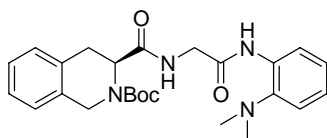
H-Gly-(*o*-dimetilammino)-anilide (103)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 194$.

Boc-Tic-Gly-(*o*-dimetilammino)-anilide (104)



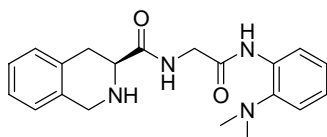
Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 453$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 18.45; picco di iniezione = 4.97 (eluente 100%

A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Tic-Gly-(*o*-dimetilammino)-anilide (105)



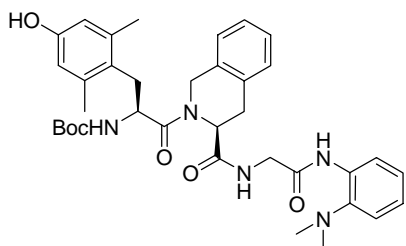
Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 353$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 11.45; picco di iniezione = 4.03 (eluente 100%

A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-dimetilammino)-anilide (106)

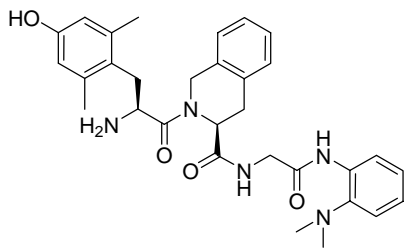


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 643$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 10.82; picco di iniezione = 4.38 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-dimetilammino)-anilide (107)

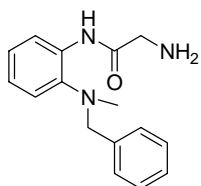


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 544$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 14.29; picco di iniezione = 5.03 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

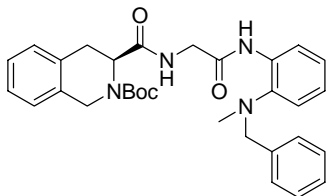
H-Gly-(*o*-metil-benzil-ammino)-anilide (110)



Ottenuto seguendo la procedura d).

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

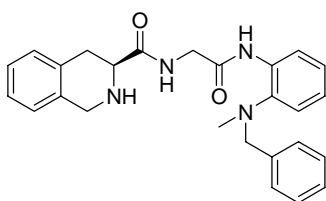
Boc-Tic-Gly-(*o*-metil-benzil-ammino)-anilide (111)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 529$.

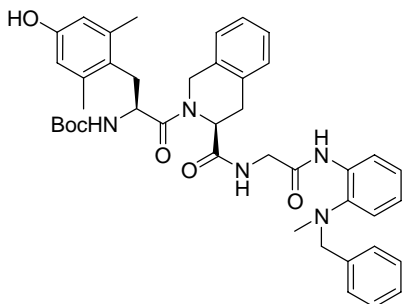
H-Tic-Gly-(*o*-metil-benzil-ammino)-anilide (112)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 429$.

Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-metil-benzil-ammino)-anilide (113)



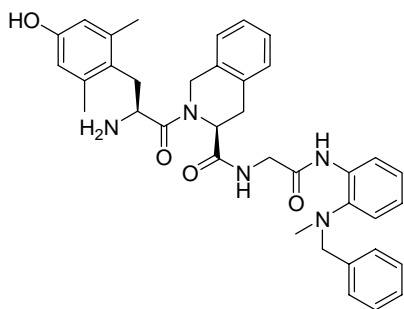
Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): $[MH]^+ = 720$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 20.88; picco di iniezione = 2.82 (eluente 100%

A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-metil-benzil-ammino)-anilide (114)

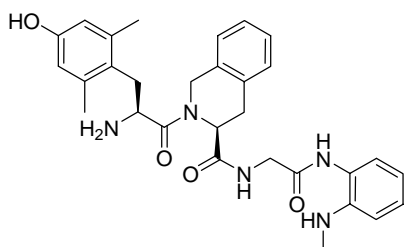


Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): $[MH]^+ = 620$.

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 16.23; picco di iniezione = 3.58 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-metilammino)-anilide (116)



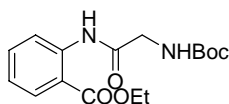
Ottenuto seguendo la procedura d).

$[\alpha]_D^{20} = +21,9^\circ$ (c = 0.10, in EtOH).

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

HPLC analitico: tempo di ritenzione = 15.81; picco di iniezione = 5.44 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A a t_{30}).

Boc-Gly-(*o*-COOEt)-anilide (117)



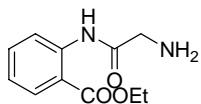
Ottenuto seguendo la procedura b).

MS (ESI): $[MH]^+ = 323$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ : 11.587 (s, 1H, -NH), 8.728-8.860 (d, 1H aromatico, J=1), 8.058-8.010 (d, 1H aromatico, J=1), 7.575-7.488 (dd, 1H aromatico, J=1), 7.129-7.047 (dd, 1H

aromatico, J=1), 5.218 (br, 1H, -NH), 4.412-4.305 (q, 2H, -CH₂-CH₃, J=7), 4.019-3.990 (s, 2H, NH-CH₂-CO), 1.487 (s, 9H *ter*butile), 1.433-1.361 (t, 3H, -CH₂-CH₃, J=7).

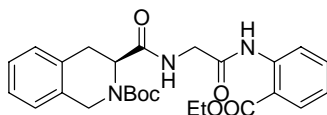
H-Gly-(*o*-COOEt)-anilide (118)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 223.

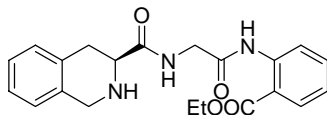
Boc-Tic-Gly-(*o*-COOEt)-anilide (119)



Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 482.

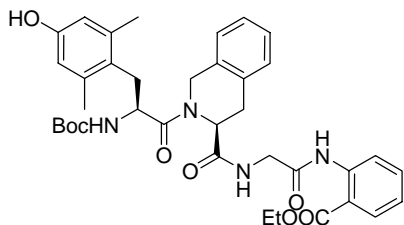
H-Tic-Gly-(*o*-COOEt)-anilide (120)



Ottenuto seguendo la procedura d).

MS (ESI): [MH]⁺ = 382.

Boc-Dmt-Tic-Gly-(*o*-COOEt)-anilide (121)

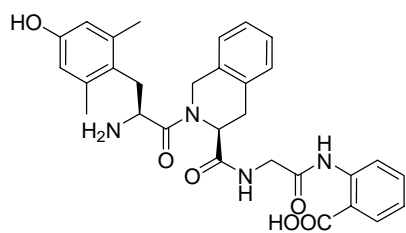


Ottenuto seguendo la procedura a).

MS (ESI): [MH]⁺ = 672.

HLPC analitico: tempo di ritenzione = 9.93; picco di iniezione = 1.87 (eluente 100% A a t₀, 100% B a t₂₅, 100% A t₃₀).

H-Dmt-Tic-Gly-(*o*-COOH)-anilide (123)



Ottenuto seguendo nell'ordine le procedure e) e d), senza isolare l'intermedio della saponificazione.

$[\alpha]_D^{20} = + 32,75^\circ$ (c = 0.12, in EtOH).

MS (ESI): $[MH]^+ = 544$.

HLPC analitico: tempo di ritenzione = 9.95; picco di iniezione = 1.97 (eluente 100% A a t_0 , 100% B a t_{25} , 100% A t_{30}).

BIBLIOGRAFIA

1. Masagatsu Eguchi; *Medicinal Research Reviews* **2004**; 24 (2): 182-212.
2. Svoboda K.R. *et al.*; *J. Neurosci.* **1998**; 18: 7084-7098.
3. Huges J. *et al.*; *Nature* **1975**; 258: 577-580.
4. Traynor J., Elliot J.; *Trends. Pharmacol. Sci.* **1993**; 14: 84-85.
5. Berque-Bestel *et al.*; *Curr. Drug Discov. Technol.* **2008**; 5(4): 312-318.
6. Shimohigashi Y. *et al.*; *Nature*; **1982**; 333-335.
7. Portoghese P.S. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1993**; 36: 2572-2574.
8. Suzuki T. *et al.*; *Life Sci.* **1995**; 57: 155-168.
9. Calderon S.N. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1994**; 37: 2125-2128
10. Chang K.J. *et al.*; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**; 267: 852-857.
11. Dondio R. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1997**; 40: 3192-3198.
12. Amiche M. *et al.*; *Mol. Pharmacol.* **1989**; 35: 774-779.
13. Williams J.T. *et al.*; *Physiol. Rev.* **2001**; 81: 299-343.
14. Kieffer & Gaveriaux-Ruff; *Prog. Neurobiol.* **2002**; 66: 285-306.
15. Abdelhamid *et al.*; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**; 258: 299-303.
16. Welles J.L. *et al.*; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**; 297: 597-605.
17. Shiller P. W. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1999**; 42 (18): 3520-3526.
18. Vergura R. *et al.*; *Peptides* **2008**; 29: 93-103.
19. Tancredi T. *et al.*; *Eur. J. Biochem.* **1994** ; 224: 241-247.
20. Salvadori S. *et al.*; *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1994**; 198: 933-939.
21. Guerrini R. *et al.*; *Bioorg. & Med. Chem.* **1998**; 6: 57-62.
22. Salvadori S. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1997**; 40: 3100-3108.
23. Salvadori S. *et al.*; *J. Med. Chem.* **1999**; 42: 5010-5019.
24. Balboni G. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2004**; 47: 4066-4071.
25. Balboni G. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2002**; 45: 713-720.
26. Balboni G. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2005**; 48: 8112-8114.
27. Balboni G. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2002**; 45: 5556-5563.
28. Vergura *et al.*; *Peptides* **2006**; 12: 3322-3330.
29. Schiller P.W. *et al.*; *Proct. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**; 89: 11871-11875.
30. Victor J. Hruby *et al.*; *Tetrahedron Asymmetry* **2000**; 11: 2917-2925.
31. John H. Dygos *et al.*; *Synthesys* **1992**; 741-743.

32. Orena M.; Porzi G.; Sandri S., *J. Org. Chem.* **1992**, 57: 6532.
33. Su-Dong Cho *et al.*, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, 25: 415.
34. Greenwald R. *et al.*; *JOC* **1963**; 28: 1128-1129.
35. Corey E.J. *et al.*; *JACS* **1962**; 84: 866-867.
36. Jih Ru Hwu *et al.*; *Tetrahedron Letters* **1996**; 37 (12): 2035-2038.
37. Arnab K. Chatterjee *et al.*; *JACS* **2003**; 125: 11360-11370.
38. Julia M. *et al.*; *Tetrahedron Letters* **1973**; 4833-4836.
39. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**; 2563-2585.
40. Vincenzo Calò *et al.*; *Tetrahedron* **1992**; 29: 6051-6058.
41. Peter T. Gallagher *et al.*; *J. C. S. Perkin Transaction I* **1980**; 2362-2370.
42. Legrand Y.M. *et al.*; *JACS* **2003**; 125: 15789-15795.
43. Powell D.A. *et al.*; *JOC* **2003**; Vol.68; No.6.
44. M. Labarre *et al.*; *European Journal of Pharmacology* **2000** ; R1-R3.
45. Schwyzer R. *et al.*; *Biochemistry* **1986**; 25: 6335-6341.

Further studies on the effect of lysine at the C-terminus of the Dmt-Tic opioid pharmacophore

Gianfranco Balboni,^{a,b,*} Valentina Onnis,^a Cenzo Congiu,^a Margherita Zotti,^b Yusuke Sasaki,^c Akihiro Ambo,^c Sharon D. Bryant,^d Yunden Jinsmaa,^d Lawrence H. Lazarus,^d Iliaria Lazzari,^b Claudio Trapella^b and Severo Salvadori^b

^aDepartment of Toxicology, University of Cagliari, I-09124 Cagliari, Italy

^bDepartment of Pharmaceutical Sciences and Biotechnology Center, University of Ferrara, I-44100 Ferrara, Italy

^cTohoku Pharmaceutical University, 4-1, Komatsushima 4-chome, Aoba-Ku, Sendai 981-8558, Japan

^dMedicinal Chemistry Group, Laboratory of Pharmacology and Chemistry, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC 22709, USA

Received 11 January 2007; revised 13 February 2007; accepted 20 February 2007

Available online 22 February 2007

Abstract—A wide range of activities are induced by Lys when introduced at C-terminus of the δ -opioid Dmt-Tic pharmacophore through the α -amine group, including: improved δ -antagonism, μ -agonism and μ -antagonism. Here we report the synthesis of a new series of compounds with the general formula H-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(R)-R' (R = -NH₂, -NH-Ac, -NH-Z; R' = CO-NH-Ph, -CO-NH-CH₂-Ph, -Bid) in which Lys is linked to Dmt-Tic through its side-chain amine group. All new compounds (**1–9**) displayed potent and selective δ -antagonism (MVD, $pA_2 = 7.81–8.27$), which was independent of the functionalized α -amine and carboxylic groups of C-terminal Lys. This behaviour suggests a direct application as a prototype intermediate, such as Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-OMe, which could be successfully applied in the synthesis (after Z or methyl ester removal) of unique designed multiple ligands containing the pharmacophore of the quintessential δ -antagonist Dmt-Tic and another opioid or biologically active non-opioid ligand. © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Extensive structure–activity studies on the prototype δ -opioid receptor antagonist, H-Dmt-Tic-OH,^{†,1} revealed that even minor chemical modifications changed its pharmacological profile,² including enhanced δ -antagonism,³ the reversal to δ -agonism,⁴ the appearance of mixed μ -agonism/ δ -agonism,⁵ as well as formation of mixed μ -agonism/ δ -antagonism,⁵ μ -agonism⁶ and -antagonism.⁶ Each pharmacological profile indicated interesting potential for therapeutic applications, such as analgesia with low tolerance and dependence,⁵ antidepressant activity,^{7,8}

neuroprotection and neurogenesis,⁹ regulation of food intake¹⁰ and in the treatment of alcoholism.¹¹

Recently, we demonstrated that the substitution of C-terminal amino acids in tri- and tetrapeptides containing the Dmt-Tic pharmacophore with side-chain protected Lys improved δ -antagonist potency.^{12,13} On the basis of these results, we extended the substitution of the side-chain protected or unprotected Lys to other biologically active compounds previously developed by us [H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid (Bid = 1*H*-benzimidazole-2-yl) a δ -agonist; H-Dmt-Tic-Gly-NH-Ph a μ -agonist/

Keywords: δ -Opioid receptors; Dmt-Tic pharmacophore; Designed multiple ligands; Opioid peptides.

* Corresponding author. Tel.: +39 532 291 275; fax: +39 532 291 296; e-mail addresses: gbalboni@unica.it; bbg@unife.it

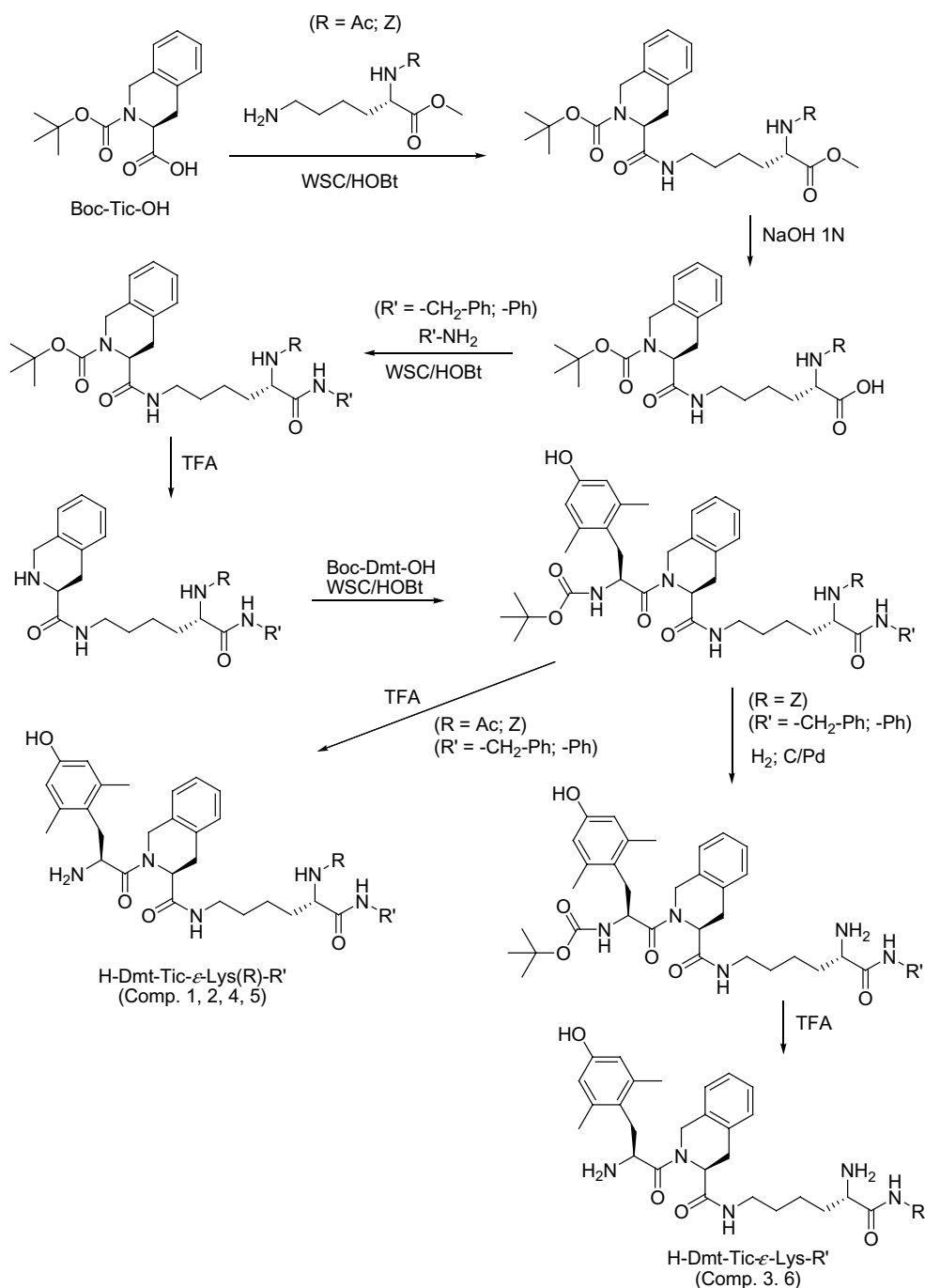
[†] **Abbreviations.** In addition to the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (*J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14–42), this paper uses the following additional symbols and abbreviations: Ac, acetyl; Bid, 1*H*-benzimidazole-2-yl; Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; DAMGO, [*D*-Ala²,*N*-Me-Phe⁴,Gly-ol⁵]enkephalin; Deltorphin II, H-Tyr-*D*-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMSO-*d*₆, hexadeuteriodimethyl sulfoxide; Dmt, 2',6'-dimethyl-L-tyrosine; EtOAc, ethyl acetate; GPI, guinea-pig ileum; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole; HPLC, high performance liquid chromatography; IBCF, isobutyl chloroformate; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight; MeOH, methanol; MVD, mouse vas deferens; NMM, 4-methylmorpholine; pA_2 , negative log of the molar concentration required to double the agonist concentration to achieve the original response; Pe, petroleum ether; TFA, trifluoroacetic acid; Tic, 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid; TLC, thin-layer chromatography; WSC, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide; Z, benzyloxycarbonyl.

δ -agonist and H-Dmt-Tic-Gly-NH-CH₂-Ph a μ -agonist/ δ -antagonist] with a quite surprising array of interesting results. Lysine, when introduced in place of the C-terminal amino acid in the above reference compounds, did not produce a simple improvement in the original pharmacological activities but provided opioid ligands which exhibited mixed properties ranging from δ -antagonism, μ -agonism and interestingly, μ -antagonism.⁶ Considering the variety of biological effects induced by Lys in tripeptides and pseudotripeptides of the general formula H-Dmt-Tic-Lys(R)-R', the studies described herein extend our initial investigations on the synthesis and biological evaluation of a new series of constitutional isomers

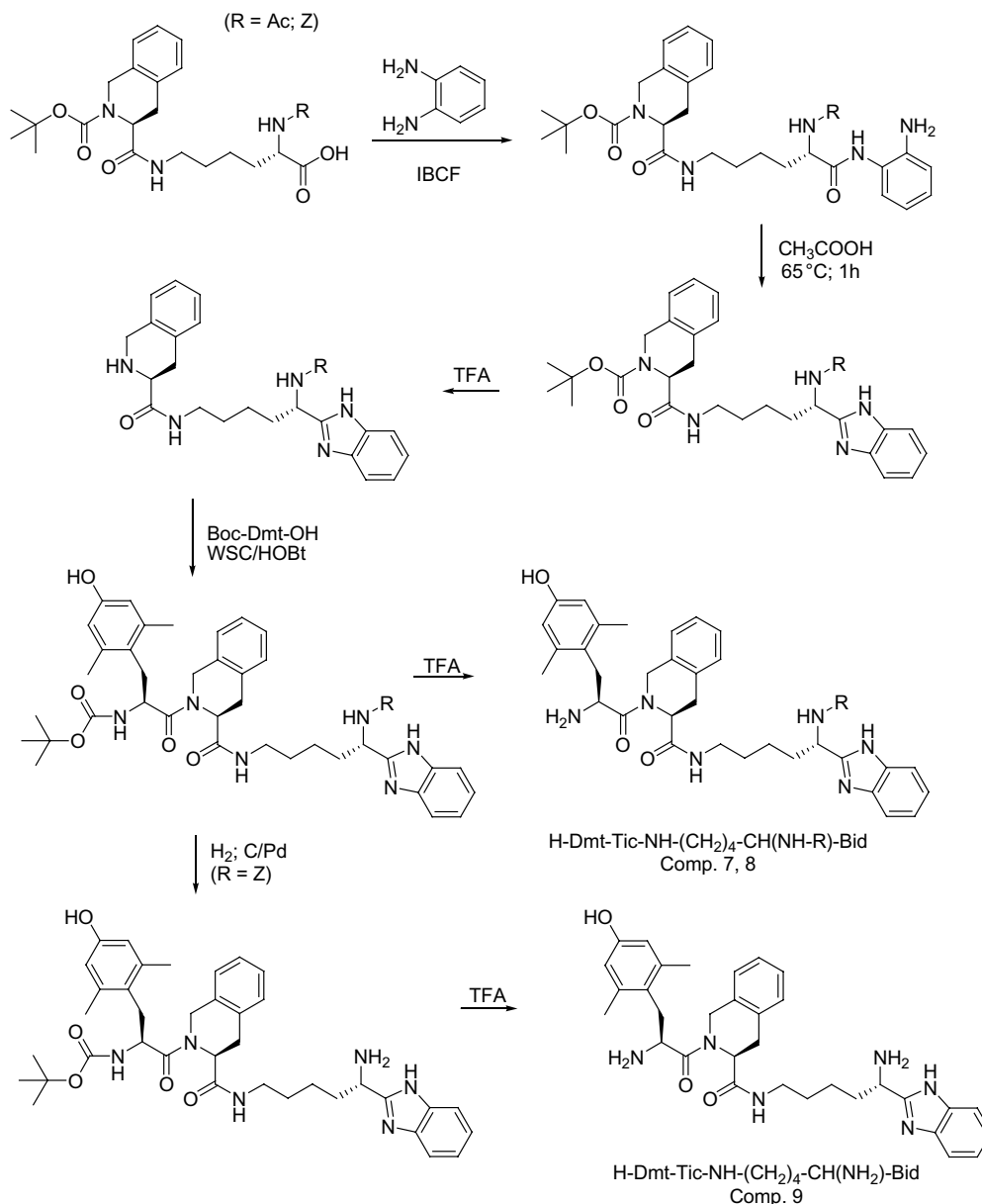
developed on the framework of H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(R)-R', where Lys is linked to the Dmt-Tic dipeptide through the ϵ -amine group, in order to further evaluate the important influence of Lys on opioid receptor interactions and functional bioactivities to produce opioid ligands for potential translation into human health initiatives.

2. Chemistry

Peptides (1–6) and pseudopeptides (7–9) were prepared stepwise by solution peptide synthetic methods, as outlined in Schemes 1 and 2, respectively. Boc-Tic-OH was



Scheme 1. Synthesis of compounds 1–6.



Scheme 2. Synthesis of compounds 7–9.

condensed with commercially available *Z*-Lys-OME or Ac-Lys-OME via WSC/HOBt obtaining the corresponding Boc-Tic- ϵ -Lys(*Z*)-OME or Boc-Tic- ϵ -Lys(Ac)-OME. C-Terminal methyl ester protecting groups were removed by hydrolysis with 1 N NaOH and then each pseudodipeptide was condensed with benzylamine or aniline via WSC/HOBt. N-terminal Boc-protected pseudodipeptide amides were treated with TFA and condensed with Boc-Dmt-OH via WSC/HOBt. Final N-terminal Boc deprotection with TFA gave compounds **1**, **2**, **4** and **5** (Scheme 1). Catalytic hydrogenation (10% Pd/C) and TFA treatment of Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys(*Z*)-amides gave the final products **3** and **6** (Scheme 1). Pseudopeptides (**7–9**), containing C-terminal 1*H*-benzimidazol-2-yl (Bid), were synthesized in a similar manner (Scheme 2). Mixed carbonic anhydride coupling of Boc-Tic- ϵ -Lys(*Z*)-OH or Boc-Tic- ϵ -Lys(Ac)-OH with *o*-phenylenediamine gave the corresponding crude intermediate monoamides, which were

converted without purification to the desired heteroaromatic derivatives by cyclization and dehydration in acetic acid. As detailed in Scheme 1, after N^α deprotection with TFA, each derivative was condensed with Boc-Dmt-OH via WSC/HOBt. Final N-terminal Boc deprotection with TFA gave compounds **7**, **8** (Scheme 2). Catalytic hydrogenation (10% Pd/C) and TFA treatment of Boc-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-*Z*)-Bid provided the product **9** (Scheme 2). Final compounds (**1–9**) were purified by preparative HPLC as described in Experimental Section.

3. Results and discussion

3.1. Receptor affinity analysis

Receptor binding and functional bioactivities are reported in Table 1. All the compounds (**1–9**) exhibited

Table 1. Receptor binding affinities and functional bioactivities of compounds **1–9**

Compound	Structure	Receptor affinity ^a (nM)		Selectivity	Functional bioactivity	
		K_i^δ	K_i^μ		MVD pA_2 ^c	GPI IC_{50} ^b (nM)
	<i>H-Dmt-Tic-NH₂</i> ^d	1.22	277	227	7.2	>10,000
1	H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH ₂ -Ph	0.53 ± 0.08 (4)	3.15 ± 0.39 (4)	5.9	8.27	1451 ± 200
2	H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Ac)-NH-CH ₂ -Ph	0.21 ± 0.01 (3)	3.43 ± 0.54 (4)	16.3	8.07	1990 ± 674
3	H-Dmt-Tic- ϵ -Lys-NH-CH ₂ -Ph	1.00 ± 0.02 (4)	0.60 ± 0.11 (4)	1.7*	7.81	553 ± 173
4	H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-Ph	0.47 ± 0.04 (4)	2.67 ± 0.41 (4)	5.7	8.23	711 ± 194
5	H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Ac)-NH-Ph	0.22 ± 0.005 (3)	2.57 ± 0.34 (4)	11.7	8.18	486 ± 63
6	H-Dmt-Tic- ϵ -Lys-NH-Ph	2.02 ± 0.20 (4)	0.89 ± 0.12 (4)	2.3*	7.92	515 ± 73
7	H-Dmt-Tic-NH-(CH ₂) ₄ -CH(NH-Z)-Bid	0.86 ± 0.06 (3)	2.78 ± 0.27 (4)	3.2	7.82	618 ± 140
8	H-Dmt-Tic-NH-(CH ₂) ₄ -CH(NH-Ac)-Bid	0.21 ± 0.01 (3)	0.99 ± 0.06 (4)	4.7	8.12	610 ± 185
9	H-Dmt-Tic-NH-(CH ₂) ₄ -CH(NH ₂)-Bid	2.64 ± 0.18 (3)	1.02 ± 0.08 (3)	2.6*	8.09	434 ± 26

^a The K_i values (nM) were determined according to Cheng and Prusoff.²⁴ The means ± SE with n repetitions in parentheses is based on independent duplicate binding assays with 5–8 peptide doses using several different synaptosomal preparations.

^b Agonist activity was expressed as IC_{50} obtained from dose–response curves. These values represent means ± SE for at least 5–6 fresh tissue samples. Deltorphin II and endomorphin-2 were the internal standards for MVD (δ -opioid receptor bioactivity) and GPI (μ -opioid receptor bioactivity) tissue preparation, respectively.

^c The pA_2 values of opioid antagonists against the agonist deltorphin II were determined by the method of Kosterlitz and Watt.²⁵

^d Data taken from Salvadori et al.¹

* μ -Opioid receptor selectivity K_i^δ/K_i^μ .

nanomolar affinity for δ -opioid receptors ($K_i^\delta = 0.21$ – 2.64 nM). As expected, the lack of a free carboxylic function in molecules containing the Dmt-Tic pharmacophore induces a substantial increase in μ -opioid receptor affinity ($K_i^\mu = 0.60$ – 3.43 nM).^{12,4} Compounds (**1**, **2**, **4**, **5**, **7**, **8**) containing a Lys residue protected at the α -amine function (Z, Ac) had weak δ -opioid receptor selectivity ($K_i^\mu/K_i^\delta = 16.3$ – 3.2); the acetyl protecting group confers marginally better selectivity than the Z group. Removal of the α -amine protecting group of Lys (**3**, **6**, **9**) shifted the δ -opioid selectivity to a very weak μ -selective ligands essentially attributable to the presence of the additional positive charge.¹⁴ The same general behaviour was observed previously in the series of Dmt-Tic containing peptides with Lys in the third position.⁶

3.2. Functional bioactivity

Compounds **1–9** were tested in the electrically stimulated MVD and GPI assays for intrinsic functional bioactivity (Table 1). We and other investigators have previously discussed the discrepancy in the correlation between receptor binding affinities and functional bioactivity. Unfortunately, we have neither definitive nor comprehensive explanations for these observations.^{12,6} In comparison to the Dmt-Tic peptides containing a protected or unprotected Lys residue at the C-terminus⁶ all the analogues are inactive as δ -opioid agonists in the MVD assay (Table 1). Furthermore, they exhibited a weak or very weak μ -agonism in the GPI assay (GPI, IC_{50} 434–1990 nM), which is in quite good agreement with the previous studies, except analogues containing Bid at C-terminus.⁶ When Lys was linked to Dmt-Tic through the α -amine group and its carboxylic function transformed into Bid, the pseudopeptides predominately had selective μ -agonism. On the other hand, when Lys was linked to Dmt-Tic through the ϵ -amine group and its carboxylic function once again transformed into

Bid, no interesting μ -agonism activity was observed. Interestingly, all these compounds (**1–9**) had about the same order of magnitude of δ -antagonism (MVD, pA_2 7.82–8.27), which was independent of the substitutions and modifications made on the α amine and carboxylic functions of Lys, but in quite good agreement with the reference dipeptide H-Dmt-Tic-NH₂.¹

4. Conclusions

Considering the new derivatives (**1–9**) as analogues of the published reference compounds [H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid δ -agonist, H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid δ -agonist, H-Dmt-Tic-Gly-NH-Ph μ -agonist/ δ -agonist and H-Dmt-Tic-Gly-NH-CH₂-Ph μ -agonist/ δ -antagonist] the introduction of Lys (linked through its ϵ amine group to the Dmt-Tic pharmacophore) in place of the C-terminal amino acid failed to maintain the original pharmacological activity, as previously reported for the corresponding isomers containing Lys linked through its α -amine group.⁶ While isomers containing the C-terminal α -Lys revealed a variety of opioid effects (δ -antagonism, μ -agonism and μ -antagonism),⁶ the isomers containing C-terminal ϵ -Lys demonstrated a unique δ -opioid antagonism of about the same order of magnitude, and independent of the substituents linked on the α position. Without taking into considerations the different behaviour of Lys when coupled to the Dmt-Tic pharmacophore through its α - or ϵ -amine group, it is of notable significance to utilize these new isomers as potential precursors in the synthesis of ‘designed multiple ligands’, where one of the two pharmacophores is represented by the δ -selective antagonist dipeptide Dmt-Tic.^{15,16} The four methylene groups of Lys side chain can be considered the spacer linked to the first pharmacophore (Dmt-Tic) and, as reported by Neumeyer et al., its length generally does not influence the biological activity of either pharmacophores.^{17,18}

The second pharmacophore, required to complete the potential designed multiple ligands, preferentially should be selected among the compounds in the opioid field, but other pharmacophores endowed with activity for other receptors would be readily inserted as well.^{16,19} More importantly, the second pharmacophore can be conveniently inserted using the deprotected α -amino or carboxylic function depending on the required final bioactive product. Furthermore, very similar compounds were obtained when using fluorescent chromophores in place of the second pharmacophore.^{20,21} Recently, Okada et al. reported the synthesis of similar compounds with the general formula H-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₆-NH-R (where R = Dmt, Phe, Tic and Tic-Dmt) in which all the opioids displayed increased δ antagonism attributable to the additional aromatic amino acids.²² However, the same enhancement in δ -antagonist activity could be derived, at least in part, by the presence of the spacer as reported here and in preceding studies.^{20,21}

In summary, we suggest the possibility to use a unique intermediate [for example Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-OMe] for the synthesis of designed multiple ligands containing: (a) the δ -antagonist pharmacophore Dmt-Tic, (b) a spacer of defined length and (c) two different protected functionalities (amine and carboxylic functions) for the linkage to a variety of second pharmacophores. As further explorations of this proposal, the synthesis of multiple ligands derived from the coupling of the selectively deprotected δ -antagonist intermediate Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-OMe with salvinorin A^{23a} (κ -agonist); and the synthesis of H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(4-Fluorobenzoyl)-OH as a potential pharmacological tool for PET imaging of δ receptors,^{23b,c} are currently in progress in our laboratory.

5. Experimental

5.1. Chemistry

5.1.1. General methods. Crude peptides and pseudopeptides were purified by preparative reversed-phase HPLC [Waters Delta Prep 4000 system with Waters Prep LC 40 mm Assembly column C18 (30 \times 4 cm, 15 μ m particle)] and eluted at a flow rate of 25 mL/min with mobile phase solvent A (10% acetonitrile + 0.1% TFA in H₂O, v/v), and a linear gradient from 25% to 75% B (60%, acetonitrile + 0.1% TFA in H₂O, v/v) in 25 min. Analytical HPLC analyses were performed with a Beckman System Gold (Beckman ultrasphere ODS column, 250 \times 4.6 mm, 5 μ m particle). Analytical determinations and capacity factor (K') of the products used HPLC in solvents A and B programmed at flow rate of 1 mL/min with linear gradients from 0% to 100% B in 25 min. Analogues had less than 1% impurities at 220 and 254 nm.

TLC was performed on precoated plates of silica gel F254 (Merck, Darmstadt, Germany): (A) 1-butanol/AcOH/H₂O (3:1:1, v/v/v); (B) CH₂Cl₂/toluene/methanol (17:1:2). Ninhydrin (1% ethanol, Merck), fluorescamine (Hoffman-La Roche) and chlorine spray reagents. Melt-

ing points were determined on a Kofler apparatus and are uncorrected. Optical rotations were assessed at 10 mg/mL in methanol with a Perkin-Elmer 241 polarimeter in a 10 cm water-jacketed cell. Molecular weights of the compounds were determined by a MALDI-TOF analysis (Hewlett Packard G2025A LD-TOF system mass spectrometer) and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix. ¹H NMR (δ) spectra were measured, when not specified, in DMSO-*d*₆ solution using a Bruker AC-200 spectrometer, and peak positions are given in parts per million downfield from tetramethylsilane as internal standard.

5.2. Peptide synthesis

5.2.1. Boc-Tic- ϵ -Lys(Z)-OMe. To a solution of Boc-Tic-OH (0.9 g, 3.24 mmol) and HClZ-Lys-OMe (0.95 g, 3.24 mmol) in DMF (10 mL) at 0 °C, NMM (0.35 mL, 3.24 mmol), HOBt (0.54 g, 3.56 mmol) and WSC (0.68 g, 3.56 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 3 h at 0 °C and 24 h at room temperature. After DMF was evaporated, the residue was dissolved in EtOAc and washed with citric acid (10% in H₂O), NaHCO₃ (5% in H₂O) and brine. The organic phase was dried (Na₂SO₄) and evaporated to dryness. The residue was precipitated from Et₂O/Pe (1:9, v/v): yield 1.4 g (78%); R_f (B) 0.89; HPLC K' 5.43; mp 101–103 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -20.1; m/z 554 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.90 (m, 15H), 3.05–3.67 (m, 7H), 4.22–4.42 (m, 3H), 4.92–5.34 (m, 3H), 6.96–7.19 (m, 9H).

5.2.2. Boc-Tic- ϵ -Lys(Z)-OH. To a solution of Boc-Tic- ϵ -Lys(Z)-OMe (1.4 g, 2.53 mmol) in MeOH (10 mL) was added 1 N NaOH (2.8 mL). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature. After solvent evaporation, the residue was dissolved in EtOAc and washed with citric acid (10% in H₂O) and brine. The organic phase was dried (Na₂SO₄) and evaporated to dryness. The residue was precipitated from Et₂O/Pe (1:1, v/v): yield 1.1 g (81%); R_f (B) 0.42; HPLC K' 3.71; mp 120–122 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -21.2; m/z 540 (M+H)⁺.

5.2.3. Boc-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph. To a solution of Boc-Tic- ϵ -Lys(Z)-OH (0.52 g, 0.96 mmol) and benzylamine (0.1 mL, 0.96 mmol) in DMF (10 mL) at 0 °C, HOBt (0.16 g, 1.06 mmol) and WSC (0.2 g, 1.06 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 3 h at 0 °C and 24 h at room temperature. After DMF was evaporated, the residue was dissolved in EtOAc and washed with citric acid (10% in H₂O), NaHCO₃ (5% in H₂O) and brine. The organic phase was dried (Na₂SO₄) and evaporated to dryness. The residue was precipitated from Et₂O/Pe (1:9, v/v): yield 0.53 g (88%); R_f (B) 0.85; HPLC K' 5.37; mp 102–104 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -17.7; m/z 629 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.79 (m, 15H), 3.05–3.20 (m, 4H), 4.22–4.53 (m, 5H), 4.92–5.34 (m, 3H), 6.96–7.14 (m, 14H).

5.2.4. TFA H-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph. Boc-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph (0.47 g, 0.75 mmol) was treated with TFA (2 mL) for 0.5 h at room temperature. Et₂O/Pe (1:1, v/v) were added to the solution until the product

precipitated: yield 0.34 g (87%); R_f (A) 0.51; HPLC K' 4.3; mp 115–117 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –19.8; m/z 529 (M+H)⁺.

5.2.5. Boc-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph. To a solution of Boc-Dmt-OH (0.075 g, 0.24 mmol) and TFAH-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph (0.15 g, 0.24 mmol) in DMF (10 mL) at 0 °C, NMM (0.03 mL, 0.24 mmol), HOBt (0.04 g, 0.26 mmol) and WSC (0.05 g, 0.26 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 3 h at 0 °C and 24 h at room temperature. After DMF was evaporated, the residue was dissolved in EtOAc and washed with citric acid (10% in H₂O), NaHCO₃ (5% in H₂O) and brine. The organic phase was dried (Na₂SO₄) and evaporated to dryness. The residue was precipitated from Et₂O/Pe (1:9, v/v): yield 0.17 g (87%); R_f (B) 0.81; HPLC K' 5.23; mp 129–131 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –16.6; m/z 820 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.79 (m, 15H), 2.35 (s, 6H), 3.05–3.20 (m, 6H), 4.46–4.53 (m, 5H), 4.92–5.34 (m, 4H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.19 (m, 14H).

5.2.6. TFAH-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph (1). Boc-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph (0.11 g, 0.13 mmol) was treated with TFA (1 mL) for 0.5 h at room temperature. Et₂O/Pe (1:1, v/v) were added to the solution until the product precipitated: yield 0.09 g (96%); R_f (A) 0.47; HPLC K' 3.63; mp 125–127 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –14.6; m/z 721 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.79 (m, 6H), 2.35 (s, 6H), 3.05–3.20 (m, 6H), 3.95–4.53 (m, 6H), 4.92–5.34 (m, 3H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.19 (m, 14H). Anal. Calcd for C₄₄H₅₀F₃N₅O₈: C, 63.37; H, 6.04; N, 8.40. Found: C, 63.22; H, 5.98; N, 8.21.

5.2.7. Boc-Tic-ε-Lys(Ac)-OMe. This intermediate was obtained by condensation of Boc-Tic-OH with HClAc-Lys-OMe via WSC/HOBt, as reported for Boc-Tic-ε-Lys(Z)-OMe: yield 1.6 g (82%); R_f (B) 0.77; HPLC K' 5.32; mp 127–129 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –20.5; m/z 463 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.90 (m, 15H), 2.02 (s, 3H), 2.92–3.67 (m, 7H), 4.17–4.92 (m, 4H), 6.96–7.02 (m, 4H).

5.2.8. Boc-Tic-ε-Lys(Ac)-OH. This intermediate was obtained by hydrolysis of Boc-Tic-ε-Lys(Ac)-OMe as reported for Boc-Tic-ε-Lys(Z)-OH: yield 1.26 g (82%); R_f (B) 0.45; HPLC K' 5.18; mp 135–137 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –22.3; m/z 449 (M+H)⁺.

5.2.9. Boc-Tic-ε-Lys(Ac)-NH-CH₂-Ph. This intermediate was obtained by condensation of Boc-Tic-ε-Lys(Ac)-OH with benzylamine via WSC/HOBt as reported for Boc-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.33 g (81%); R_f (B) 0.79; HPLC K' 5.32; mp 108–110 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –18.6; m/z 537 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.79 (m, 15H), 2.02 (s, 3H), 2.92–3.20 (m, 4H), 4.17–4.92 (m, 6H), 6.96–7.14 (m, 9H).

5.2.10. TFAH-Tic-ε-Lys(Ac)-NH-CH₂-Ph. Boc-Tic-ε-Lys(Ac)-NH-CH₂-Ph was treated with TFA as reported for TFAH-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.21 g (97%); R_f (A) 0.48; HPLC K' 3.92; mp 121–123 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –20.7; m/z 437 (M+H)⁺.

5.2.11. Boc-Dmt-Tic-ε-Lys(Ac)-NH-CH₂-Ph. This intermediate was obtained by condensation of Boc-Dmt-OH with TFAH-Tic-ε-Lys(Ac)-NH-CH₂-Ph via WSC/HOBt as reported for Boc-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.14 g (83%); R_f (B) 0.75; HPLC K' 4.92; mp 135–137 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –17.5; m/z 729 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.79 (m, 15H), 2.02 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 4.41–4.92 (m, 7H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.14 (m, 9H).

5.2.12. TFAH-Dmt-Tic-ε-Lys(Ac)-NH-CH₂-Ph (2). Boc-Dmt-Tic-ε-Lys(Ac)-NH-CH₂-Ph was treated with TFA as reported for TFAH-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.08 g (96%); R_f (A) 0.45; HPLC K' 3.21; mp 131–133 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –15.5; m/z 629 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.79 (m, 6H), 2.02 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 3.95–4.92 (m, 7H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.14 (m, 9H). Anal. Calcd for C₃₈H₄₆F₃N₅O₇: C, 61.53; H, 6.25; N, 9.44. Found: C, 61.77; H, 6.39; N, 9.15.

5.2.13. Boc-Dmt-Tic-ε-Lys-NH-CH₂-Ph. To a solution of Boc-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph (0.1 g, 0.12 mmol) in methanol (30 mL) was added Pd/C (10%, 0.07 g), and H₂ was bubbled for 1 h at room temperature. After filtration, the solution was evaporated to dryness. The residue was precipitated from Et₂O/Pe (1:9, v/v): yield 0.07 g (85%); R_f (B) 0.58; HPLC K' 4.98; mp 144–145 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –18.7; m/z 687 (M+H)⁺.

5.2.14. 2TFAH-Dmt-Tic-ε-Lys-NH-CH₂-Ph (3). Boc-Dmt-Tic-ε-Lys-NH-CH₂-Ph was treated with TFA as reported for TFAH-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.07 g (95%); R_f (A) 0.39; HPLC K' 3.32; mp 148–150 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –16.2; m/z 587 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.79 (m, 6H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 3.56–4.92 (m, 7H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.14 (m, 9H). Anal. Calcd for C₃₈H₄₅F₆N₅O₈: C, 56.08; H, 5.57; N, 8.61. Found: C, 56.30; H, 5.68; N, 8.70.

5.2.15. Boc-Tic-ε-Lys(Z)-NH-Ph. This intermediate was obtained by condensation of Boc-Tic-ε-Lys(Z)-OH with aniline via WSC/HOBt as reported for Boc-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.52 g (88%); R_f (B) 0.81; HPLC K' 5.61; mp 94–96 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –19.4; m/z 615 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.89 (m, 15H), 2.92–3.20 (m, 4H), 4.17–5.34 (m, 6H), 6.96–7.64 (m, 14H).

5.2.16. TFAH-Tic-ε-Lys(Z)-NH-Ph. Boc-Tic-ε-Lys(Z)-NH-Ph was treated with TFA as reported for TFAH-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.37 g (95%); R_f (A) 0.46; HPLC K' 4.32; mp 111–113 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –19.9; m/z 515 (M+H)⁺.

5.2.17. Boc-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-Ph. This intermediate was obtained by condensation of Boc-Dmt-OH with TFAH-Tic-ε-Lys(Z)-NH-Ph via WSC/HOBt as reported for Boc-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.17 g (87%); R_f (B) 0.76; HPLC K' 5.73; mp 124–126 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –15.9; m/z 807 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.89 (m, 15H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 4.41–5.34 (m, 7H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.64 (m, 14H).

5.2.18. TFA H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-Ph (4). Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-Ph was treated with TFA as reported for TFA H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.09 g (90%); R_f (A) 0.40; HPLC K' 3.70; mp 133–135 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –13.9; m/z 707 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.89 (m, 6H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 3.95–5.34 (m, 7H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.64 (m, 14H). Anal Calcd for C₄₃H₄₈F₃N₅O₈: C, 62.99; H, 5.90; N, 8.54. Found: C, 62.95; H, 5.76; N, 8.41.

5.2.19. Boc-Tic- ϵ -Lys(Ac)-NH-Ph. This intermediate was obtained by condensation of Boc-Tic- ϵ -Lys(Ac)-OH with aniline via WSC/HOBt as reported for Boc-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.32 g (81%); R_f (B) 0.74; HPLC K' 4.21; mp 100–102 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –19.9; m/z 524 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.89 (m, 15H), 2.02 (s, 3H), 2.92–3.20 (m, 4H), 4.17–4.92 (m, 4H), 6.96–7.64 (m, 9H).

5.2.20. TFA H-Tic- ϵ -Lys(Ac)-NH-Ph. Boc-Tic- ϵ -Lys(Ac)-NH-Ph was treated with TFA as reported for TFA H-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.27 g (96%); R_f (A) 0.43; HPLC K' 3.47; mp 117–119 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –20.8; m/z 424 (M+H)⁺.

5.2.21. Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Ac)-NH-Ph. This intermediate was obtained by condensation of Boc-Dmt-OH with TFA H-Tic- ϵ -Lys(Ac)-NH-Ph via WSC/HOBt as reported for Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.15 g (88%); R_f (B) 0.71; HPLC K' 5.21; mp 130–132 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –16.8; m/z 715 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.89 (m, 15H), 2.02 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 4.41–4.92 (m, 5H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.64 (m, 9H).

5.2.22. TFA H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Ac)-NH-Ph (5). Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Ac)-NH-Ph was treated with TFA as reported for TFA H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.08 g (98%); R_f (A) 0.37; HPLC K' 2.89; mp 127–129 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –14.8; m/z 615 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.89 (m, 6H), 2.02 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 3.95–4.92 (m, 5H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.64 (m, 9H). Anal Calcd for C₃₇H₄₄F₃N₅O₇: C, 61.06; H, 6.09; N, 9.62. Found: C, 60.96; H, 6.03; N, 9.48.

5.2.23. Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys-NH-Ph. Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-Ph was dissolved in methanol and treated with Pd/C (10%) and H₂ as reported for Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys-NH-CH₂-Ph: yield 0.08 g (87%); R_f (B) 0.55; HPLC K' 5.12; mp 146–148 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –19.1; m/z 673 (M+H)⁺.

5.2.24. 2TFA H-Dmt-Tic- ϵ -Lys-NH-Ph (6). Boc-Dmt-Tic- ϵ -Lys-NH-Ph was treated with TFA as reported for TFA H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.04 g (95%); R_f (A) 0.37; HPLC K' 2.58; mp 147–149 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –14.8; m/z 573 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.89 (m, 6H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 3.56–4.92 (m, 5H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.64 (m, 9H). Anal Calcd for C₃₇H₄₃F₆N₅O₈: C, 55.57; H, 5.42; N, 8.76. Found: C, 55.82; H, 5.53; N, 8.47.

5.2.25. Boc-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid. A solution of Boc-Tic- ϵ -Lys(Z)-OH (0.5 g, 0.93 mmol) and NMM (0.1 mL, 0.93 mmol) in DMF (10 mL) was treated at –20 °C with IBCF (0.12 mL, 0.93 mmol). After 10 min at –20 °C, *o*-phenyldiamine (0.1 g, 0.93 mmol) was added. The reaction mixture was allowed to stir while slowly warming to room temperature (1 h) and was then stirred for an additional 3 h. The solvent was evaporated and the residue was partitioned between EtOAc and H₂O. The EtOAc layer was washed with NaHCO₃ (5% in H₂O) and brine and dried over Na₂SO₄. The solution was filtered, the solvent evaporated, and the residual solid was dissolved in glacial acetic acid (10 mL). The solution was heated at 65 °C for 1 h. After the solvent was evaporated, the residue was precipitated from Et₂O/Pe (1:9, v/v): yield 0.47 g (82%); R_f (B) 0.66; HPLC K' 4.92; mp 134–136 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –12.8; m/z 613 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.84 (m, 15H), 2.92–3.20 (m, 4H), 4.17–5.34 (m, 6H), 6.96–7.70 (m, 13H).

5.2.26. 2TFA H-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid. Boc-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid was treated with TFA as reported for TFA H-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.33 g (96%); R_f (A) 0.41; HPLC K' 3.57; mp 137–139 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –14.1; m/z 513 (M+H)⁺.

5.2.27. Boc-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid. To a solution of Boc-Dmt-OH (0.075 g, 0.24 mmol) and 2TFA H-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid (0.18 g, 0.24 mmol) in DMF (10 mL) at 0 °C, NMM (0.05 mL, 0.48 mmol), HOBt (0.04 g, 0.26 mmol) and WSC (0.05 g, 0.26 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 3 h at 0 °C and 24 h at room temperature. After DMF was evaporated, the residue was dissolved in EtOAc and washed with NaHCO₃ (5% in H₂O) and brine. The organic phase was dried (Na₂SO₄) and evaporated to dryness. The residue was precipitated from Et₂O/Pe (1:9, v/v): yield 0.16 g (85%); R_f (B) 0.66; HPLC K' 4.93; mp 137–139 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –14.3; m/z 804 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.84 (m, 15H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 4.41–5.34 (m, 7H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.70 (m, 13H).

5.2.28. 2TFA H-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid (7). Boc-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid was treated with TFA as reported for TFA H-Dmt-Tic- ϵ -Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.05 g (94%); R_f (A) 0.33; HPLC K' 2.95; mp 143–145 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –17.8; m/z 704 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.84 (m, 6H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 3.95–5.34 (m, 7H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.70 (m, 13H). Anal Calcd for C₄₅H₄₈F₆N₆O₉: C, 58.06; H, 5.20; N, 9.06. Found: C, 57.97; H, 5.16; N, 8.89.

5.2.29. Boc-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Ac)-Bid. This intermediate was obtained by condensation of Boc-Tic- ϵ -Lys(Ac)-OH with *o*-phenyldiamine via mixed anhydrides (IBCF) as reported for Boc-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid: yield 0.34 g (88%); R_f (B) 0.60; HPLC K' 4.31; mp 140–142 °C; $[\alpha]_D^{20}$ –13.7; m/z 521 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.84 (m, 15H), 2.02 (s, 3H), 2.92–3.20 (m, 4H), 4.17–4.92 (m, 4H), 6.96–7.70 (m, 8H).

5.2.30. 2TFA H-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Ac)-Bid. Boc-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Ac)-Bid was treated with TFA as reported for TFA H-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.20 g (90%); *R_f* (A) 0.44; HPLC *K'* 3.21; mp 143–145 °C; [α]_D²⁰ –15.0; *m/z* 421 (M+H)⁺.

5.2.31. Boc-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Ac)-Bid. This intermediate was obtained by condensation of Boc-Dmt-OH with 2TFA H-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Ac)-Bid via WSC/HOBt as reported for Boc-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid: yield 0.14 g (85%); *R_f* (B) 0.60; HPLC *K'* 4.21; mp 132–134 °C; [α]_D²⁰ –15.2; *m/z* 712 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.84 (m, 15H), 2.02 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 4.41–4.92 (m, 5H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.70 (m, 8H).

5.2.32. 2TFA H-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Ac)-Bid (8). Boc-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Ac)-Bid was treated with TFA as reported for TFA H-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.08 g (98%); *R_f* (A) 0.30; HPLC *K'* 2.63; mp 149–151 °C; [α]_D²⁰ –18.7; *m/z* 612 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.84 (m, 6H), 2.02 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 3.95–4.92 (m, 5H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.70 (m, 8H). Anal Calcd for C₃₉H₄₄F₆N₆O₈: C, 55.84; H, 5.29; N, 10.02. Found: C, 56.01; H, 5.38; N, 10.12.

5.2.33. Boc-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH₂)-Bid. Boc-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH-Z)-Bid was dissolved in methanol and treated with Pd/C (10%) and H₂ as reported for Boc-Dmt-Tic-ε-Lys-NH-CH₂-Ph: yield 0.08 g (86%); *R_f* (B) 0.51; HPLC *K'* 3.56; mp 140–142 °C; [α]_D²⁰ –19.3; *m/z* 670 (M+H)⁺.

5.2.34. 3TFA H-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH₂)-Bid (9). Boc-Dmt-Tic-NH-(CH₂)₄-CH(NH₂)-Bid was treated with TFA as reported for TFA H-Dmt-Tic-ε-Lys(Z)-NH-CH₂-Ph: yield 0.06 g (95%); *R_f* (A) 0.29; HPLC *K'* 2.86; mp 154–156 °C; [α]_D²⁰ –19.9; *m/z* 570 (M+H)⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.29–1.84 (m, 6H), 2.35 (s, 6H), 2.92–3.20 (m, 6H), 3.90–4.92 (m, 5H), 6.29 (s, 2H), 6.96–7.70 (m, 8H). Anal Calcd for C₃₉H₄₃F₉N₆O₉: C, 51.43; H, 4.76; N, 9.23. Found: C, 51.32; H, 4.62; N, 9.12.

5.3. Pharmacology

5.3.1. Radioreceptor binding assays. Opioid receptor affinity was determined under equilibrium conditions [2.5 h at room temperature (23 °C)] in a competition assay using brain P₂ synaptosomal membranes prepared from Sprague–Dawley rats.^{26,27} Synaptosomes were pre-incubated to remove endogenous opioid peptides and stored at –80 °C in buffered 20% glycerol.^{26,28} Each analogue was analyzed in duplicate assays using 5–8 dosages and 3–5 independent repetitions with different synaptosomal preparations (*n* values are listed in Table 1 in parentheses and results are means \pm SE). Unlabelled peptide (2 μ M) was used to determine non-specific binding in the presence of 1.9 nM [³H]deltorphin II (45.0 Ci/mmol, Perkin-Elmer, Boston, MA; *K_D* = 1.4 nM) for δ -opioid receptors and 3.5 nM [³H]DAMGO (50.0 Ci/mmol, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK; *K_D* = 1.5 nM) for μ -opioid receptors. Glass fibre filters

(Whatman GFC) were soaked in 0.1% polyethylenimine in order to enhance the signal-to-noise ratio of the bound radiolabelled-synaptosome complex, and the filters were washed thrice in ice-cold buffered BSA.²⁶ The affinity constants (*K_i*) were calculated according to Cheng and Prusoff.²⁴

5.3.2. Biological activity in isolated tissue preparations.

The myenteric plexus longitudinal muscle preparations (2–3 cm segments) from the small intestine of male Hartley strain guinea pigs (GPI) measured μ -opioid receptor agonism, and a single mouse vas deferens (MVD) was used to determine δ -opioid receptor agonism as described previously.^{6,29} The isolated tissues were suspended in organ baths containing balanced salt solutions in a physiological buffer, pH 7.5. Agonists were tested for the inhibition of electrically evoked contraction and expressed as IC₅₀ (nM) obtained from the dose–response curves. The IC₅₀ values represent means \pm SE of five or six separate assays. δ -antagonist potencies in the MVD assay were determined against the δ -agonist deltorphin II and are expressed as pA₂ determined using the Schild Plot.³⁰

Acknowledgments

This research was supported in part by the University of Cagliari (PRIN 2004), University of Ferrara (PRIN 2004), and the Intramural Research Program of NIH and NIEHS. The authors appreciate the professional expertise and assistance of the library staff and the Comparative Medicine Branch at NIEHS.

References and notes

- Salvadori, S.; Attila, M.; Balboni, G.; Bianchi, C.; Bryant, S. D.; Crescenzi, O.; Guerrini, R.; Picone, D.; Tancredi, T.; Temessi, P. A.; Lazarus, L. H. *Mol. Med.* **1995**, *1*, 678.
- Bryant, S. D.; Jinsmaa, Y.; Salvadori, S.; Okada, Y.; Lazarus, L. H. *Biopolymers* **2003**, *71*, 86.
- Salvadori, S.; Balboni, G.; Guerrini, R.; Tomatis, R.; Bianchi, C.; Bryant, S. D.; Cooper, P. S.; Lazarus, L. H. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3100.
- Balboni, G.; Salvadori, S.; Guerrini, R.; Negri, L.; Giannini, E.; Jinsmaa, Y.; Bryant, S. D.; Lazarus, L. H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5556.
- Balboni, G.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Bianchi, C.; Rizzi, A.; Bryant, S. D.; Lazarus, L. H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 713.
- Balboni, G.; Onnis, V.; Congiu, C.; Zotti, M.; Sasaki, Y.; Ambo, A.; Bryant, S. D.; Jinsmaa, Y.; Lazarus, L. H.; Trapella, C.; Salvadori, S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5610.
- Torregrossa, M. M.; Jutkiewicz, E. M.; Mosberg, H. I.; Balboni, G.; Watson, S. J.; Woods, J. H. *Brain Res.* **2006**, *1069*, 172.
- Vergura, R.; Valenti, E.; Hebbes, C. P.; Gavioli, E. C.; Spagnolo, B.; McDonald, J.; Lambert, D. G.; Balboni, G.; Salvadori, S.; Regoli, D.; Calò, G. *Peptides* **2006**, *27*, 3322.
- Narita, M.; Kuzumaki, N.; Miyatake, M.; Sato, F.; Wachi, H.; Seyama, Y.; Suzuki, T. *J. Neurochem.* **2006**, *97*, 1494.
- Israel, Y.; Kandov, Y.; Khaimova, E.; Kest, A.; Lewis, S. R.; Pasternak, G. W.; Pan, Y. X.; Rossi, G. C.; Bodnar, R. J. *Peptides* **2005**, *26*, 1167.

11. Oswald, L. H.; Wand, G. S. *Physiol. Behav.* **2004**, *81*, 339.
12. Balboni, G.; Salvadori, S.; Guerrini, R.; Negri, L.; Giannini, E.; Bryant, S. D.; Jinsmaa, Y.; Lazarus, L. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4066.
13. Balboni, G.; Cocco, M. T.; Salvadori, S.; Romagnoli, R.; Sasaki, Y.; Okada, Y.; Bryant, S. D.; Jinsmaa, Y.; Lazarus, L. H. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5608.
14. Schwyzer, R. *Biochemistry* **1986**, *25*, 6335.
15. Hopkins, A. L.; Mason, J. S.; Overington, J. P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 127.
16. Morphy, R.; Rankovic, Z. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6523.
17. Peng, X.; Knapp, B. I.; Bidlack, J. M.; Neumeyer, J. L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 256.
18. Neumeyer, J. L.; Peng, X.; Knapp, B. I.; Bidlack, J. M.; Lazarus, L. H.; Salvadori, S.; Trapella, C.; Balboni, G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5640.
19. Dardonville, C.; Fernandez-Fernandez, C.; Gibbons, S.-L.; Ryan, G. J.; Jagerovic, N.; Gabilondo, A. M.; Meana, J. J.; Callado, L. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6570.
20. Balboni, G.; Salvadori, S.; Dal Piaz, A.; Bortolotti, F.; Argazzi, R.; Negri, L.; Lattanzi, R.; Bryant, S. D.; Jinsmaa, Y.; Lazarus, L. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6541.
21. Vázquez, M. E.; Blanco, J. B.; Salvadori, S.; Trapella, C.; Argazzi, R.; Bryant, S. D.; Jinsmaa, Y.; Lazarus, L. H.; Negri, L.; Giannini, E.; Lattanzi, R.; Colucci, M.; Balboni, G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3653.
22. Li, T.; Shiotani, K.; Miyazaki, A.; Fujita, Y.; Tsuda, Y.; Ambo, A.; Sasaki, Y.; Jinsmaa, Y.; Marczak, E.; Bryant, S. D.; Lazarus, L. H.; Okada, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5517.
23. (a) Lee, D. Y. W.; He, M.; Liu-Chen, L.-Y.; Wang, Y.; Li, J.-G.; Xu, W.; Ma, Z.; Carlezon, W. A.; Cohen, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5498; (b) Zhang, X.; Cai, W.; Cao, F.; Schreiber, E.; Wu, Y.; Wu, J. C.; Xing, L.; Chen, X. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 492; (c) Tyake, R. J.; Robinson, E. S. J.; Schnabel, R.; Lewis, J. W.; Husbands, S. M.; Nutt, D. J.; Hudson, A. L. *Nucl. Med. Biol.* **2002**, *29*, 455.
24. Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099.
25. Kosterlitz, H. W.; Watt, A. J. *Br. J. Pharmacol.* **1968**, *33*, 266.
26. Lazarus, L. H.; Salvadori, S.; Santagada, V.; Tomatis, R.; Wilson, W. E. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1350.
27. Lazarus, L. H.; Salvadori, S.; Attila, M.; Grieco, P.; Bundy, D. M.; Wilson, W. E.; Tomatis, R. *Peptides* **1993**, *14*, 21.
28. Lazarus, L. H.; Wilson, W. E.; De Castiglione, R.; Guglietta, A. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3047.
29. Sasaki, Y.; Sasaki, A.; Niizuma, H.; Goto, H.; Ambo, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 675.
30. Arunlakshana, Q.; Schild, H. O. *Br. J. Pharmacol.* **1959**, *14*, 48.

Original article

C-terminal constrained phenylalanine as a pharmacophoric unit in peptide-based proteasome inhibitors

Anna Baldisserotto^a, Mauro Marastoni^{a,*}, Ilaria Lazzari^a, Claudio Trapella^a,
Riccardo Gavioli^b, Roberto Tomatis^a

^a Department of Pharmaceutical Sciences and Biotechnology Center, University of Ferrara, Via Fossato di Mortara 17-19, I-44100 Ferrara, Italy

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Ferrara, I-44100 Ferrara, Italy

Received 6 August 2007; received in revised form 1 October 2007; accepted 2 October 2007

Available online 7 October 2007

Abstract

Here we report the synthesis and biological properties of peptide-based molecules bearing constrained analogues of phenylalanine at the C-terminal. Compounds were tested as proteasome subunits' inhibitors. Dehydro-peptides showed good inhibition, in particular against trypsin-like (T-L) proteasome activity while some C-terminal Tic-derivatives inhibit only caspase-like activity in enzymatic $\beta 1$ subunits with a certain degree of efficacy. The best analogues of the series demonstrated good resistance to proteolysis and a capacity to permeate the cell membrane.
© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Constrained phenylalanine analogues; Synthesis; Pseudopeptides; Proteasome inhibition

1. Introduction

The ubiquitin–proteasome pathway is considered to be the best means of extralysosomal cytosolic and nuclear protein degradation in cells [1–5]. The 26S proteasome expressed in eukaryotic cells is a large multicatalytic intracellular protease complex and represents the central proteolytic machinery of the system. The proteasome regulates basic cellular processes and is responsible for the degradation and proteolytic processing of proteins essential for the regulation of development, differentiation, proliferation, cell cycling, senescence, apoptosis, gene transcription, signal transduction, antigen presentation, immune activation and the inflammatory and stress responses [6]. The proteasomal pathway represents a new approach in the treatment of a range of pathologies such as cancer, inflammation, immune diseases and others [7–12].

Cell proteins must be targeted for recognition and subsequent degradation by covalent attachments of a ubiquitin

polypeptide [13]. The proteolytic activities of the 26S proteasome are carried out in its barrel-shaped 20S catalytic core, which is flanked by two 19S regulatory caps. Ubiquitinated substrates are recognized and bound to the complex, then unfolded and deubiquitinated, and subsequently transferred to the catalytic chamber, where they are degraded. Proteasome 20S is composed of four axially-stacked rings; the outer ring consists of seven different non-proteolytic α subunits, which allow substrate translocation into the central cavity formed by two inner rings formed by seven β subunits [14–16]. Only the $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$ subunits retain proteolytic activity by means of N-terminal threonine residues which face the central cavity. Based on their specificity towards peptidyl substrates, the $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$ subunits have been assigned caspase-like (PGPH), trypsin-like (T-L) and chymotrypsin-like (ChT-L) peptidase activities, respectively [17,18].

Several classes of synthetic and biological compounds which inhibit the proteolytic activities of the multicatalytic-complex have been developed [19–23], and have contributed greatly to the identification of essential functions of the 26S proteasome in various processes and pathways in eukaryotic

* Corresponding author. Tel.: +39 532 455281; fax: +39 532 291296.

E-mail address: mru@dns.unife.it (M. Marastoni).

cells [6]. In particular, proteasome inhibitors could act as therapeutic agents in the prevention of tumoral cell proliferation and as modulators of antigen presentation [8,12,24]. The elucidation of the 3D structure of proteasomal inhibitors provides interesting informations required for improving existing inhibitors and in the design of new compounds [25].

The major family of multicatalytic-complex inhibitors has a peptide-based structure with a C-terminal functional group able to interact with proteasomal catalytic threonine. Short peptide inhibitors include synthetic and natural molecules with a pharmacophoric function, such as vinyl sulfone, boronic acid, aldehyde and epoxyketone. Other classes are comprised of peptide macrocycles and non-peptidic inhibitors with a wide structural variety [26–39].

Involvement of the different proteasomal subunits in the process of protein degradation is evaluated by the employment of selective inhibitors of the individual active sites [40]. We have previously developed new oligopeptidic proteasome inhibitors bearing different pharmacophoric units at the C-terminal [41–46]. In particular we have identified and characterized a new class of inhibitors selective for trypsin-like activity and specific for the multicatalytic 20S complex with a vinyl ester function. This class of inhibitors is able to interact with enzymatic threonine in the same way that has been suggested for the well-known vinyl sulfone peptide. The best of these derivatives inhibit the β_2 subunit in a nM range, are non-toxic, do not affect cell proliferation and are able to modulate the generation of antigenic peptides linked by MHC class I molecules. Moreover, vinyl ester inhibitors have demonstrated good resistance to proteolysis in plasma, as well as an ability to permeate the cell membrane [42].

On the basis of our previous results we prepared and tested a new series of compounds presented in Fig. 1 with reference vinyl ester inhibitors HMB-AA₁-AA₂-Leu-VE. New oligopeptide-based molecules contain selected amino-acidic sequences derived from the most representative inhibitors of the previous series. All pseudotri- and pseudotetrapeptides are functionalized at the N-terminal position with a 2-methyl-3-hydroxybenzoyl (HMB) group, while the C-terminal pharmacophoric unit consists of constrained phenylalanine analogues. Compounds 5–8 bear an α,β -dehydro-phenylalanine (Δ Phe), meaning that the substrate for Michael addition for catalytic threonine is directly inserted into the peptidic backbone. 1,2,3,4-Tetrahydro-isoquinoline-3-ethyl acrylate (Tic-VE) in an L or D configuration is the pharmacophore in the pseudo-peptides 12–19, analogous to reference leucine-vinyl ester (Leu-VE) inhibitors.

2. Chemistry

Pseudopeptides 5–8 contain pharmacophoric α,β -dehydro-phenylalanine at the C-terminal position, as reported in Scheme 1. The Δ Phe moiety was obtained through azlactonization and dehydration of Boc-Ser-(β -OH)Phe-OH (1) or Boc-Leu-(β -OH)Phe-OH (2), using sodium acetate in acetic anhydride [47,48]. Treatment of the azlactones with sodium ethylate resulted in the formation of N_α -protected

dehydro-dipeptides 3 or 4 with Δ Phe in a Z-configuration [49]. Deprotection with trifluoroacetic acid and coupling steps utilizing water soluble carbodiimide and 1-hydroxybenzotriazole (WSC–HOBt) yielded the desired products.

Compounds 12–19 bearing a tetrahydro-isoquinoline vinyl ester (Tic) at the C-terminal in an L or D configuration were then synthesized stepwise by solution methods (Scheme 2). L or D N_α -protected Tic-VEs were prepared from the corresponding aldehyde, which is obtained via the Fehrenz method [50] by reaction with [(ethoxycarbonyl)methylidene]triphenylphosphorane [51]. HATU were employed for acylation of the H-Tic-VEs, the other coupling steps were accomplished using WSC/HOBt; Bocs were removed by TFA treatment.

All products were purified by preparative RP-HPLC, and structural verification was achieved by mass spectrometry and NMR spectroscopy. HPLC capacity factors (K^1) and other physicochemical properties of compounds 5–8 and 12–19 are reported in Table 1.

3. Biological activity

The capacity of the Δ Phe peptides 5–8 and tetrahydro-isoquinoline vinyl ester derivatives 12–18 to inhibit the three catalytic activities of isolated 20S proteasome was tested. All compounds were assayed at different concentrations (from 0.001 to 10 μ M) for their capacity to inhibit the in vitro trypsin-like (T-L), chymotrypsin-like (ChT-L) and caspase-like (PGPH) activities of proteasome purified from lymphoblastoid cell lines using a fluorogenic substrate specific for the three major proteolytic activities of the enzymatic complex [52]. IC₅₀ values against proteasome subsite activities obtained after 30 min of incubation are reported in Table 2, and compared to prototype vinyl ester inhibitor HMB-Val-Ser-Leu-VE and the two known inhibitors Epoxomicin and MG132.

The cell membrane permeation ability of dehydro-peptides and the most active Tic-VE analogues was tested against the β_1 subsite (13, 15) in live cells. After cell treatment, the proteasomes were purified and assayed for proteolytic activity as described above.

The same compounds tested in vivo were evaluated for their susceptibility to enzymatic hydrolysis by incubation at 37 °C in human plasma [53]. The degradation half-lives of the pseudopeptides, reported in Table 2, were determined as described in Section 6.

4. Results and discussion

The data obtained from enzyme inhibition tests against the catalytic subunits highlighted that the new peptide-based inhibitors generally show different potency and selectivity depending on their molecular structure.

The P1 position favours α,β -dehydro-phenylalanine (Δ Phe) to the bicyclic tetrahydro-isoquinolinic vinyl ester (Tic-VE) system. Compounds 4–8 are more active against the β_2 and β_5 subunits, while compounds 12–19 showed moderate inhibition of the β_1 subunit of the 20S proteasome in certain cases. In terms of potency, the unsaturated residue was found to be

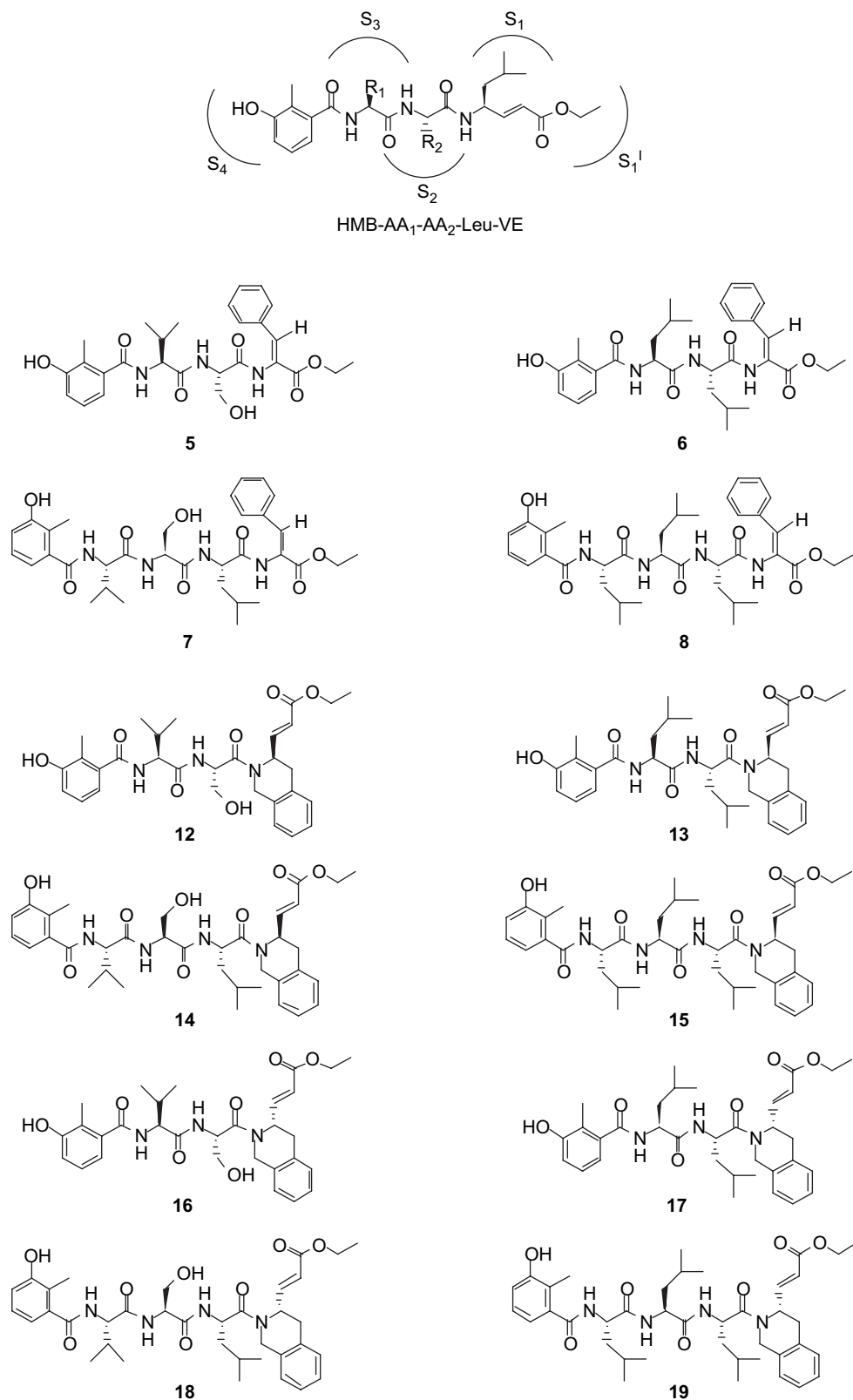
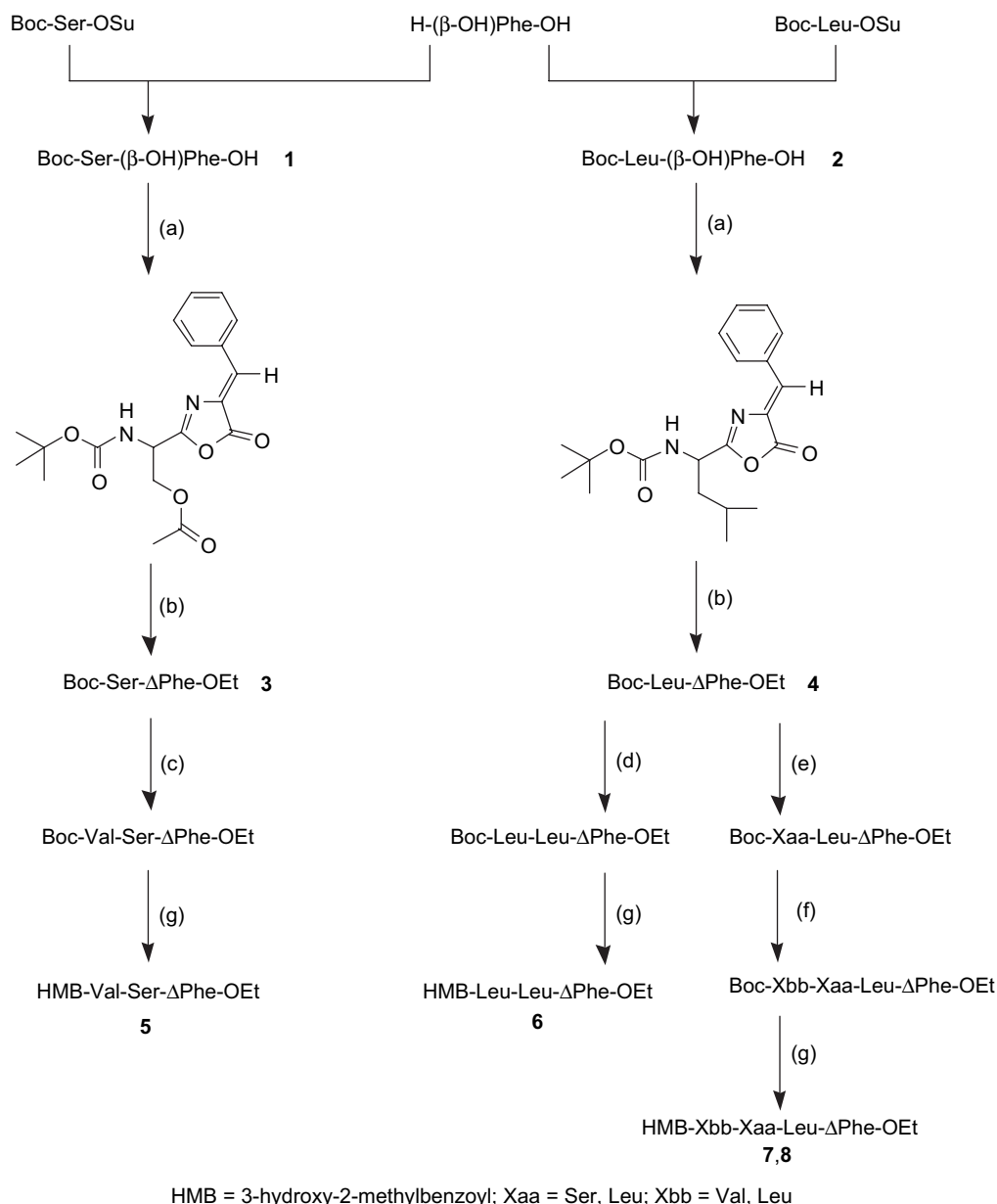


Fig. 1. Structure of the prototype and new vinyl ester pseudotripeptide inhibitors.

more efficacious as a C-terminal pharmacophoric unit and represents the best substrate for Michael addition. With regard to the Tic-derivatives, we noted that the configuration of the constrained analogue of phenylalanine is not so influential, the

presence of the L-amino acid is slightly favoured and both of tetrahydro-isoquinolinic residue configurations of the vinyl ester chain do not reveal the correct interaction with the catalytic threonine.

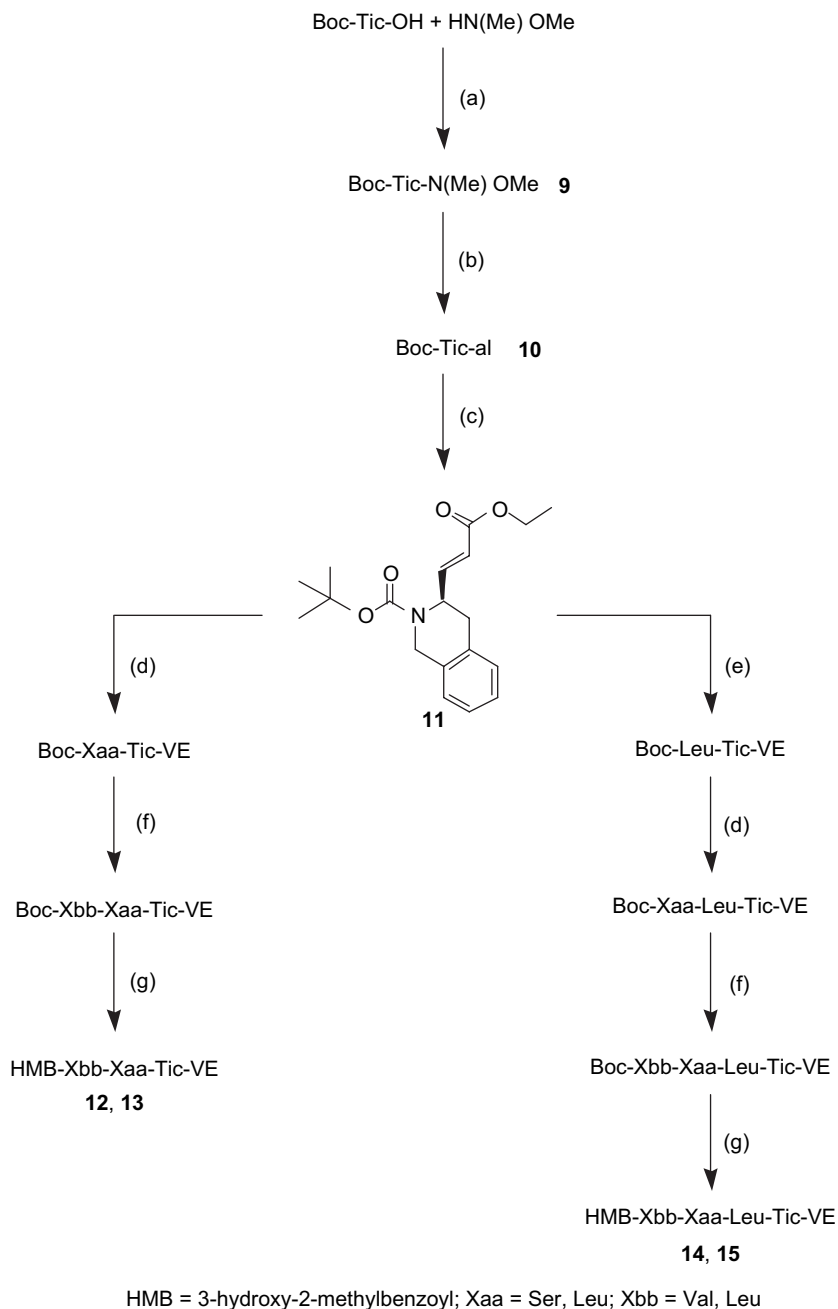


Scheme 1. Synthesis of Δ Phe derivatives 5–8. Reagents: (a) Ac_2O , AcONa ; (b) Na , EtOH ; (c) (1) TFA; (2) Boc-Val-OH, WSC, HOBT, NMM, DMF; (d) (1) TFA; (2) Boc-Leu-OH, WSC, HOBT, NMM, DMF; (e) (1) TFA; (2) Boc-Xaa-OH, WSC, HOBT, NMM, DMF; (f) (1) TFA; (2) Boc-Xbb-OH, WSC, HOBT, NMM, DMF; (g) (1) TFA; (2) HMB-OH, WSC, HOBT, NMM, DMF.

The remaining part of the sequence corresponding to positions P2–P4 influences enzymatic inhibition in terms of potency and selectivity as the confirmed parameters.

A more concrete analysis of IC_{50} values of the dehydrotrapeptides shows that the presence of a hydrophobic residue such as Val or Leu in P4 position increases inhibition; the greater length of the sequence in compounds with L or D Tic aids the interaction with the post-acidic pocket. In general, the presence of the hydrophilic Ser in P2 or P3 allows specific inhibition of the trypsin-like activity; compound 7 is the best of the series towards the β_2 subunit, with an IC_{50} value a little over the reference prototype. The more hydrophobic sequences show a major selectivity for the chymotrypsin-like

activity, even if the inhibition values are not so significant. The derivatives with the α,β -dehydro residue at the C-terminal are the most interesting. Their major structural rigidity could permit molecular modellistic studies with the aim to optimize the enzyme–inhibitor interaction. We postulate that the substitution of the Δ Phe with α,β -unsaturated amino acids such as Δ Leu or Δ Ala with a lateral chain that is not so bulky could promote the primary interaction with the catalytic Thr. Finally, in comparison with Epoxomicin and the aldehydic inhibitor MG132, potent and selective against chymotrypsin-like (ChT-L) activity (Table 2), the dehydro-peptidic derivatives are resulted in some cases more efficacious for the β_2 subunits while the compounds with the Tic-VE at the C-terminal have



Scheme 2. Synthesis of vinyl ester peptides **12–15**. Reagents: (a) WSC, HOBt, NMM, DMF; (b) LiAlH_4 , THF; (c) EtO-CO-CH=PPh_3 , toluene; (d) (1) TFA; (2) Boc-Xaa-OH, WSC, HOBt, NMM, DMF; (e) (1) TFA; (2) Boc-Leu-OH, WSC, HOBt, NMM, DMF; (f) (1) TFA; (2) Boc-Xbb-OH, WSC, HOBt, NMM, DMF; (g) (1) TFA; (2) HMB-OH, WSC, HOBt, NMM, DMF.

demonstrated a better inhibition of the caspase-like activity. In addition to the chymotryptic activity showed by the inhibitors used as references, it is important for the development of potent and specific molecules for the two other catalytic activities. The specificity of the new vinyl ester derivatives could be interesting in consideration of the fact that in addition to the chymotrypsin-like ($\beta 5$) site, the caspase-like site has been recently identified as a secondary target of Bortezomib (VELCADE), a proteasome inhibitor being used for the treatment of multiple myeloma. Specific inhibitors of the caspase-like site are needed to address the question that whether

inhibition of this site is important for anti-neoplastic activity and thus facilitate the development of new drugs of this class [54,55].

The compounds that showed the most interesting in vitro data (**5–8**, **13** and **15**) were also evaluated in cellular lines. The IC_{50} values obtained on the single catalytic subunits confirmed the in vitro data, proving the capacity of these new inhibitors to penetrate the cellular membrane and the possibility of an in vivo action on the multicatalytic-complex.

Stability in the presence of peptidases is an important pharmacokinetic parameter required for molecules with

Table 1
Analytical data and physicochemical properties of pseudopeptides 5–8 and 12–19

No	Compound	^a HPLC		^b [α] _D ²⁰	M.p. (°C)	M + H ⁺
		<i>K</i> ¹ (a)	<i>K</i> ¹ (b)			
5	HMB-Val-Ser- Δ Phe-OEt	7.44	5.97	+15.1	195–197	512.6
6	HMB-Leu-Leu- Δ Phe-OEt	8.47	6.88	+25.5	198–202	552.7
7	HMB-Val-Ser-Leu- Δ Phe-OEt	8.09	6.45	+3.7	135–138	625.5
8	HMB-Leu-Leu-Leu- Δ Phe-OEt	9.58	8.04	+14.3	211–214	665.9
12	HMB-Val-Ser-Tic-VE	6.23	4.98	+25.1	121–123	552.5
13	HMB-Leu-Leu-Tic-VE	8.87	7.34	–18.3	107–110	592.6
14	HMB-Val-Ser-Leu-Tic-VE	7.96	6.47	+15.9	136–140	665.7
15	HMB-Leu-Leu-Leu-Tic-VE	9.34	7.98	–24.8	145–148	704.7
16	HMB-Val-Ser-D-Tic-VE	6.09	4.92	+38.4	114–117	552.5
17	HMB-Leu-Leu-D-Tic-VE	8.77	7.13	–25.7	127–131	592.6
18	HMB-Val-Ser-Leu-D-Tic-VE	7.54	6.22	+21.8	156–160	665.7
19	HMB-Leu-Leu-Leu-D-Tic-VE	9.11	7.79	–34.5	120–124	704.7

^a Capacity factors (*K*¹) are determined in two different solvent systems reported in Section 6.

^b *c* = 1, MeOH.

therapeutic potential, and in particular for peptide derivatives, so the compounds of the new series with a better profile were tested by enzymatic degradation in human plasma. All the tested derivatives containing the constrained analogues of Phe in C-terminal position were found to be stable in the presence of plasmatic proteases, thereby confirming that the introduction of unusual residues results in a greater enzymatic resistance to the oligopeptidic sequence.

5. Conclusion

Considering the high therapeutic potential of molecules which are active, selective and specific for the catalytic subunits of the 20S proteasome, we designed, synthesized and tested new peptide-based compounds with new C-terminal pharmacophoric units. We inserted Δ Phe and Tic (L or D), constrained analogues of phenylalanine, as potential substrates of the catalytic γ -hydroxy threonine side-chain in Michael addition. Dehydro-peptides were demonstrated to be the most efficacious in the interaction with β 2 and β 5 subunits of the

multicatalytic-complex with a nM range inhibition. In order to simplify the molecular structure, to improve the synthesis and pharmacokinetic properties, we inserted the α,β -dehydro-phenylalanine in such a way as to insert the substrate for the enzymatic threonine directly in the peptidic backbone.

Δ Phe inhibitors can be considered to be a good target for the development of new compounds with other α,β -unsaturated residues as they possess less bulky lateral chains and are able to interact in an effective way with the catalytic subunits of the proteasome.

6. Experimental protocols

6.1. General

Amino acids, amino acid derivatives and chemicals were purchased from Bachem, Novabiochem and Fluka (Switzerland).

Crude products were purified by preparative reversed-phase HPLC using a Waters Delta Prep 4000 system with a Waters PrepLC 40 mm Assembly Column C₁₈ (30 × 4 cm, 300 Å,

Table 2
Proteasome inhibition and enzymatic stability of C-terminal-constrained derivatives

No	Compound	Isolated enzyme ^a IC ₅₀ (μM)			In vivo inhibition ^a IC ₅₀ (μM)			Half-life (min) plasma
		T-L	ChT-L	PGPH	T-L	ChT-L	PGPH	
	HMB-Val-Ser-Leu-VE	0.033	>10	>10	0.050	>10	>10	>360
5	HMB-Val-Ser- Δ Phe-OEt	0.183	>10	>10	0.231	>10	>10	>360
6	HMB-Leu-Leu- Δ Phe-OEt	1.761	1.187	>10	2.179	1.548	>10	>360
7	HMB-Val-Ser-Leu- Δ Phe-OEt	0.079	>10	>10	0.092	>10	>10	>360
8	HMB-Leu-Leu-Leu- Δ Phe-OEt	1.315	0.894	>10	1.815	1.045	>10	>360
12	HMB-Val-Ser-Tic-VE	3.674	>10	2.958				
13	HMB-Leu-Leu-Tic-VE	>10	3.734	1.481			2.052	>360
14	HMB-Val-Ser-Leu-Tic-VE	7.946	>10	2.354				
15	HMB-Leu-Leu-Leu-Tic-VE	>10	8.451	0.952			1.412	>360
16	HMB-Val-Ser-D-Tic-VE	2.787	>10	3.917				
17	HMB-Leu-Leu-D-Tic-VE	5.839	2.065	2.142				
18	HMB-Val-Ser-Leu-D-Tic-VE	>10	>10	2.498				
19	HMB-Leu-Leu-Leu-D-Tic-VE	>10	5.295	1.731				
	Epoxomicin	0.284	0.005	4.560				
	MG132	1.077	0.002	>10				

^a The values reported are the average of three independent determinations.

15 μm spherical particle size column). The column was perfused for 30 min at a flow rate of 30 mL/min with a mobile phase containing solvent A (10%, v/v, acetonitrile in 0.1% TFA); a linear gradient from 0 to 100% of solvent B (60%, v/v, acetonitrile in 0.1% TFA) was adopted for the elution of compounds. HPLC analysis was performed by a Beckman System Gold with a Hypersil BDS C18 column (5 μm , 4.6 \times 250 mm). Analytical determination and capacity factor (K') of the peptides were determined using HPLC conditions in the above solvent system (solvents A and B) programmed at flow rates of 1 mL/min using the following linear gradients: (a) from 0 to 90% B for 25 min and (b) from 30 to 100% B for 25 min. All pseudopeptides showed less than 1% impurity when monitored at 220 and 254 nm.

The molecular weight of the compounds was determined by electrospray ionisation (ESI) (MICROMASS ZMD 2000) and the values are expressed as $[\text{MH}]^+$. TLC was performed in precoated plates of silica gel F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany) using the following solvent systems: (c) AcOEt/*n*-hexane (1:1, v/v), (d) CH₂Cl₂/methanol (9.5:0.5, v/v), (e) CH₂Cl₂/methanol (9:1, v/v), (f) CH₂Cl₂/methanol/toluene (17:2:1, v/v/v). Ninhydrin (1%) or chlorine iodine spray reagents were employed to detect the peptides. Melting points were determined by a Kofler apparatus and are uncorrected. Optical rotations were determined by a Perkin–Elmer 141 polarimeter with a 10-cm water-jacketed cell. ¹H NMR spectroscopy was obtained on a Bruker AC 200 spectrometer.

6.2. Chemistry

6.2.1. Boc-Xaa-DL-(β -OH)Phe-OH (**1**, **2**)

NMM (2 mmol) and Boc-Ser-OSu or Boc-Leu-OSu (1.8 mmol) were added to a solution of H-DL-(β -OH)Phe-OH (2 mmol) in DMF (10 mL). The reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. The residue obtained after evaporation of the solvent was dissolved with AcOEt (100 mL) and washed consecutively with HCl 0.1 N and brine. The organic phase was dried (MgSO₄), filtered and evaporated to dryness. The residue was treated with Et₂O and the resulting oil (yield 85–89%) directly utilized for the following steps.

6.2.2. Boc-Xaa- Δ Phe-OEt (**3**, **4**)

Sodium acetate trihydrate was added to a solution of **1** or **2** (1.5 mmol) in 5 mL of acetic anhydride and the resulting solution was stirred at room temperature overnight. Ice-water (10 mL) was added to the reaction mixture and the precipitate azlactone was collected, washed with NaHCO₃ (5%) and water then dried (yield 70–75%). Azlactone (1 mmol) in absolute EtOH (5 mL) was added dropwise to a solution of sodium (1.5 mmol) in absolute EtOH (7.5 mL). After 30 min at room temperature the reaction mixture was neutralized by acetic acid, evaporated, diluted with AcOEt (50 mL) and washed consecutively with HCl 0.1 N, brine, NaHCO₃ and brine. The organic phase was dried (MgSO₄), filtered and evaporated to dryness. The residue was treated with Et₂O/light petroleum

(1:1) and the resulting solid separated by centrifugation (yield 80–84%).

Boc-Ser- Δ Phe-OEt (**3**): m.p. ($^{\circ}\text{C}$) = 112–114; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +44.5$ ($c = 1$, MeOH); ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.52 (s, 9H), 3.8–4.2 (m, 3H), 7.14–7.32 (m, 5H), 7.60 (s, 1H); $[\text{M} + \text{H}]^+ = 378.2$.

Boc-Leu- Δ Phe-OEt (**4**): m.p. ($^{\circ}\text{C}$) = 103–105; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +38.4$ ($c = 1$, MeOH); ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.05 (d, 6H), 1.38 (s, 9H), 1.59 (m, 2H), 1.95 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 7.11–7.33 (m, 6H), 7.63 (s, 1H); $[\text{M} + \text{H}]^+ = 403.3$.

6.2.3. Boc-Tic-VE (**II**)

A solution of aldehyde (1.18 mmol) dissolved in 5 mL of anhydrous THF was added dropwise to a solution of [(ethoxycarbonyl)methylidene]triphenylphosphorane (2.36 mmol) in 15 mL of anhydrous THF. The reaction was left to work at room temperature for 2 h, and then the solvent was removed by vacuum evaporation. The crude product was dissolved in ethyl acetate and washed twice with brine; the crude product was purified by fc (ethyl acetate/light petroleum, 1:5) with a 65% final yield. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.27–1.21 (t, 3H), 1.49 (s, 9H), 2.94–2.89 (m, 1H), 3.22–3.18 (dd, 1H), 4.13–4.08 (q, 2H), 4.37–4.33 (d, 1H, $J = 16.8$), 4.74–4.70 (d, 1H, $J = 16.8$), 5.00 (m, 1H), 5.81–5.76 (dd, 1H, $J = 1.6$; $J = 15.8$), 6.76–6.71 (dd, 1H, $J = 5.2$; $J = 15.6$), 7.260–7.112 (m, 4H).

6.2.4. General synthetic procedures

6.2.4.1. TFA deprotection. Boc was removed by treating intermediates with aqueous 90% TFA (1:10, w/v) for 30–40 min. After evaporation, the residue was triturated with Et₂O, centrifuged, and the resulting solid was collected and dried.

6.2.4.2. Coupling with WSC/HOBt. The deprotected α -amine intermediate (1 mmol), NMM (1 mmol), WSC (1 mmol) and HOBt (1 mmol) were added to a solution of the carboxylic component (1 mmol) in DMF (3 mL) at 0 $^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0 $^{\circ}\text{C}$ and 18 h at room temperature, then the solution was diluted with AcOEt (80 mL) and washed consecutively with HCl 0.1 N and brine then NaHCO₃ and brine. The organic phase was dried (MgSO₄), filtered and evaporated to dryness. The residue was treated with Et₂O and the resulting solid separated by centrifugation.

6.2.4.3. Coupling with HATU. The deprotected H-Tic-VE (1 mmol), NMM (1 mmol), and HATU (1 mmol) were added to a solution of Boc-Xaa-OH (1 mmol) in DMF (3 mL) at 0 $^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0 $^{\circ}\text{C}$ and 24 h at room temperature, then the solution was diluted with AcOEt (70 mL) and treated as described above.

6.2.5. ¹H NMR data of products **7** and **15**

HMB-Val-Ser-Leu- Δ Phe-OEt (**7**): ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.99 (d, 12H), 1.30 (t, 3H), 1.73–1.78 (m, 2H), 1.85–1.89 (m, 1H), 2.01 (br s, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.62–2.67 (m, 1H), 3.97–4.02 (m, 2H), 4.15 (q, 2H), 4.51–4.63 (m, 3H), 5.03 (br s, 1H), 6.89–7.33 (m, 9H), 8.02 (br s, 4H).

HMB-Leu-Leu-Leu-Tic-VE (**15**): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 1.01 (d, 12H), 1.06 (d, 6H), 1.28 (t, 3H), 1.72–1.81 (m, 9H), 2.30 (s, 2H), 2.80–2.84 (m, 2H), 3.42–3.50 (m, 2H), 4.09 (q, 2H), 4.47–4.53 (m, 3H), 4.98 (br s, 1H), 5.49 (d, 1H), 5.81 (d, 1H), 7.00–7.74 (m, 8H), 8.05 (br s, 3H).

6.3. Proteasome purification

Proteasome was isolated from lymphoblastoid cell lines, untreated or treated with the inhibitors for 12 h at 37 °C, as previously described [56]. A subsequent purification was carried out by affinity chromatography (mAb α -subunit, Affinity). Fractions containing proteasomes were combined and dialyzed against 25 mM Tris–HCl pH 7.5. Protein concentration was determined using BCA protocol (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.).

6.4. Proteasome subunit inhibition assays

Suc-LLVY-AMC, Boc-LRR-AMC and Ac-YVAD-AMC (Sigma) were used to measure chymotrypsin-like, trypsin-like and post-acidic proteasome activities, respectively. Substrates were incubated at 37 °C for 30 min with proteasomes, untreated or pretreated with 0.001–10 μM of test compounds in activity buffer. Fluorescence was determined by a fluorimeter (Spectrafluor plus, Tecan, Salzburg, Au) using an excitation of 360 nm and emission of 465 nm. Activity was evaluated in fluorescence units and inhibitory activity of the compounds is expressed as IC_{50} . The data were plotted as percentage control (the ratio of percentage conversion in the presence and absence of inhibitor) vs. inhibitor concentration, and fitted with the equation $Y = 100/1 + (X/\text{IC}_{50})^A$, where IC_{50} is the inhibitor concentration at 50% inhibition, and A is the slope of the inhibition curve.

6.5. Enzymatic stability assays

The degradation kinetics of selected C-terminal constrained inhibitors were studied in human plasma. Test compounds were incubated with plasma (0.6 mL) in a total volume of 1.5 mL of 10 mM Tris–HCl buffer at pH 7.5. Incubation was performed at 37 °C up to 360 min. The incubation was terminated by addition of ethanol (0.2 mL), the mixture poured at 21 °C, and, following centrifugation (5000 rpm for 10 min), aliquots (20 μL) of the clear supernatant were injected into the RP-HPLC column. HPLC was performed as described in analytical determinations. The degradation half-life ($T_{1/2}$) was obtained by least-squares linear regression analysis of a plot of the logarithmic inhibitor concentration vs. time, using a minimum of five points.

Acknowledgements

This work was financially supported by the University of Ferrara, the Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST), the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), and the Istituto Superiore di

Sanità (progetto AIDS). English revision of the text was carried out by Anna Forster.

References

- [1] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 425–479.
- [2] O. Coux, K. Tanaka, A.L. Goldberg, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 801–847.
- [3] M.H. Glickman, A. Ciechanover, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 373–428.
- [4] A. Ciechanover, *Cell* 79 (1994) 13–21.
- [5] D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 1015–1068.
- [6] C. Naujokat, S. Hoffmann, *Lab. Invest.* 82 (2002) 965–980.
- [7] D.H. Wolf, W. Hilt, *Biochim. Biophys. Acta* 1695 (2004) 19–31.
- [8] J. Adams, M. Kauffman, *Cancer Invest.* 22 (2004) 304–311.
- [9] T. Kalogeris, L. Gray, F.S. Laroux, A. Cockrell, J. Fuseler, E.M. Conner, S. Brand, M.B. Grisham, *Expert Opin. Investig. Drugs* 8 (1999) 1397–1407.
- [10] M. Di Napoli, B. McLaughlin, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 6 (2005) 686–699.
- [11] P.M. Kloetzel, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 179–187.
- [12] E. Krüger, U. Kuckelkorn, A. Sijts, P.M. Kloetzel, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 148 (2003) 81–104.
- [13] A.L. Goldberg, *Nature* 426 (2003) 895–899.
- [14] J. Löwe, D. Stock, P. Zwickl, W. Baumeister, H. Huber, *Science* 268 (1995) 533–539.
- [15] J. Walz, A. Erdmann, M. Kania, D. Typke, A.J. Koster, W. Baumeister, *J. Struct. Biol.* 121 (1998) 19–29.
- [16] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H.D. Bartunik, R. Huber, *Nature* 386 (1997) 463–471.
- [17] T.P. Dick, A.K. Nussbaum, M. Deeg, W. Heinemeyer, M. Groll, M. Schirle, W. Keilholz, S. Stevanovic, D.H. Wolf, R. Huber, H.G. Rammensee, H.J. Schild, *Biol. Chem.* 273 (1998) 25637–25646.
- [18] A.F. Kisselev, T.N. Akopian, V. Castillo, A.L. Goldberg, *Mol. Cell* 4 (1999) 395–402.
- [19] M. Groll, R. Huber, *Biochim. Biophys. Acta* 1695 (2004) 33–44.
- [20] P. Andre, M. Groettrup, P. Klenermann, R. De Giulii, B.L. Booth, V. Cerundolo, M. Bonneville, F. Jotereau, R.M. Zinkernagel, V. Lotteau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 13120–13124.
- [21] K.L. Rock, A.L. Goldberg, *Annu. Rev. Immunol.* 17 (1999) 739–779.
- [22] R.Z. Orlowski, *Cell Death Differ.* 6 (1999) 303–313.
- [23] M. Gaczynska, P.A. Osmulski, *Methods Mol. Biol.* 301 (2005) 3–22.
- [24] P.M. Voorhees, R.Z. Orlowski, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46 (2006) 189–213.
- [25] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* 107 (2007) 687–717.
- [26] J.G. Delcros, M. Baudy Floch'h, C. Pringet, Y. Arlot-Bonnemains, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 479–503.
- [27] A.F. Kisselev, A.L. Goldberg, *Chem. Biol.* 8 (2001) 739–758.
- [28] M. Iqbal, S. Chatterjee, J.C. Kauer, M. Das, P.A. Messina, B. Freed, W. Biazzo, R. Siman, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 2276–2277.
- [29] A. Craiu, M. Gaczynska, T. Akopian, C.F. Gramm, G. Fenteany, A. Goldberg, K.L. Rock, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 13437–13445.
- [30] G. Loidl, M. Groll, H.-J. Musiol, R. Huber, L. Moroder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 5418–5422.
- [31] L. Meng, R. Mohan, B.H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C.M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 10403–10408.
- [32] G. Loidl, M. Groll, H.J. Musiol, L. Ditzel, R. Huber, L. Moroder, *Chem. Biol.* 6 (1999) 197–203.
- [33] T. Nazif, M. Bogoy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 2967–2972.
- [34] A.V. Purandare, H. Wan, N. Laing, K. Benbatoul, W. Vaccaio, M.A. Poss, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4701–4704.
- [35] P. Furet, P. Imbach, M. Noorani, J. Koeppler, K. Lumen, M. Lang, V. Guaniano, P. Fuerst, J. Roessel, J. Zimmermann, C. Garcia-Echeverria, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 4810–4813.
- [36] I. Momose, Y. Umezawa, S. Hirotsawa, M. Iijima, H. Inuma, D. Ikeda, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005) 1733–1742.

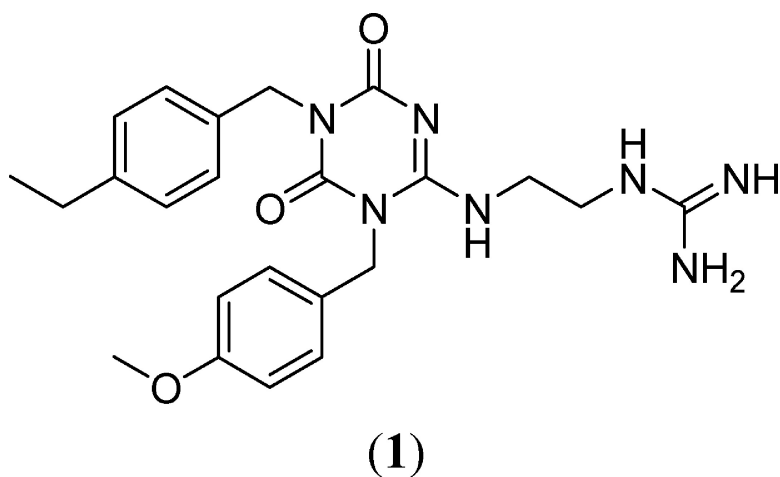
- [37] P. Imbach, M. Lang, C. Garcia-Echeverria, V. Guagnano, M. Noorani, J. Roesel, F. Bitsch, G. Rihs, P. Furet, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 358–362.
- [38] P. Furet, P. Imbach, P. Fuerst, M. Lang, M. Noorani, J. Zimmermann, C. Garcia-Echeverria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 1331–1334.
- [39] M. Verdoes, B.I. Florea, W.A. van der Linden, D. Renou, A.M.C.H. van den Nieuwendijk, G.A. van der Marel, H.S. Overkleeft, *Org. Biomol. Chem.* 5 (2007) 1416–1426.
- [40] A.F. Kisselev, A. Callard, A.L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8582–8590.
- [41] M. Marastoni, J. McDonald, A. Baldisserotto, A. Canella, R. Gavioli, C. De Risi, G.P. Pollini, R. Tomatis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 1965–1968.
- [42] M. Marastoni, A. Baldisserotto, A. Canella, R. Gavioli, C. De Risi, G.P. Pollini, R. Tomatis, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1587–1590.
- [43] M. Marastoni, A. Baldisserotto, S. Cellini, R. Gavioli, R. Tomatis, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 5038–5042.
- [44] M. Marastoni, A. Baldisserotto, C. Trapella, R. Gavioli, R. Tomatis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 3125–3130.
- [45] M. Marastoni, A. Baldisserotto, C. Trapella, R. Gavioli, R. Tomatis, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 978–984.
- [46] A. Baldisserotto, M. Marastoni, C. Trapella, R. Gavioli, V. Ferretti, L. Pretto, R. Tomatis, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 586–592.
- [47] S. Konno, C.H. Stammer, *Synthesis* (1978) 598–601.
- [48] Y. Shimohigashi, C.H. Stammer, T. Costa, P.F. Von Voigtlander, *Int. J. Pept. Protein Res.* 22 (1983) 489–494.
- [49] D.H. Rich, J.P. Tam, *J. Org. Chem.* 42 (1977) 3815–3819.
- [50] J.A. Fehrentz, C. Pothion, J.C. Califano, A. Loffet, J. Martinez, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994) 9031–9034.
- [51] M.T. Reez, J. Kanand, N. Griebenow, K. Harms, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 31 (1992) 1626–1629.
- [52] K.B. Hendil, W. Uerkvitz, *J. Biochem. Biophys. Methods* 22 (1991) 159–165.
- [53] S. Manfredini, M. Marastoni, R. Tomatis, E. Durini, S. Spisani, A. Pani, T. Marceddu, C. Musiu, M.E. Marongiu, P. La Colla, *Bioorg. Med. Chem.* 8 (2000) 539–547.
- [54] M. Altun, P.J. Galaray, R. Shringarpure, T. Hideshima, R. LeBlanc, K.C. Anderson, H.L. Ploegh, B.M. Kessler, *Cancer Res.* 65 (2005) 7896–7901.
- [55] E. Lichtman, E. Fiebiger, B.M. Kessler, K.C. Anderson, H.L. Ploegh, H. Ova, P.J. Galaray, *Nat. Methods* 2 (2005) 357–362.
- [56] R. Gavioli, S. Vertuani, M.G. Masucci, *Int. J. Cancer* 101 (2002) 532–538.

Triazine Compounds as Antagonists at Bv8-Prokineticin Receptors

Gianfranco Balboni, Ilaria Lazzari, Claudio Trapella, Lucia Negri, Roberta Lattanzi, Elisa Giannini, Annalisa Nicotra, Pietro Melchiorri, Sergio Visentin, Chiara De Nuccio, and Severo Salvadori

J. Med. Chem., **2008**, 51 (23), 7635-7639 • DOI: 10.1021/jm800854e • Publication Date (Web): 12 November 2008

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on March 3, 2009



More About This Article

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

[View the Full Text HTML](#)

Brief Articles

Triazine Compounds as Antagonists at Bv8-Prokineticin Receptors

Gianfranco Balboni,^{*,†,||} Ilaria Lazzari,[†] Claudio Trapella,[†] Lucia Negri,[‡] Roberta Lattanzi,[‡] Elisa Giannini,[‡] Annalisa Nicotra,[‡] Pietro Melchiorri,[‡] Sergio Visentin,[§] Chiara De Nuccio,[§] and Severo Salvadori[†]

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara, I-44100 Ferrara, Italy, Department of Physiology and Pharmacology "Vittorio Erspamer", University "La Sapienza", I-00185 Rome, Italy, Department of Cell Biology and Neuroscience, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, Department of Toxicology, University of Cagliari, I-09124, Cagliari, Italy

Received July 11, 2008

On the basis of a Janssen's patent, we approached a new synthesis of some 1,3,5-triazin-4,6-diones as potential non peptidic prokineticin receptor antagonists, containing the following substitutions: (*N*¹ and *N*⁵ link a 4-methoxybenzyl and a 4-ethylbenzyl, respectively; *C*² can link an amino-ethyl-guanidine (reference compound **1**) or an ethyldiamine (**2**) or an amino-ethyl-amino-2-imidazoline (**3**). New compounds were assessed for PKR1 and PKR2 affinity. Antagonist properties were evaluated as inhibition of 1 nM Bv8-induced intracellular Ca²⁺ mobilization.

Introduction

A small protein, named Bv8 to indicate its origin from the skin secretion of *Bombina variegata* and its molecular weight (8 kDa), is the first amphibian member of the Bv8-Prokineticin family.¹ Homologues of Bv8 are present in skin secretion of other *Bombina* species, in the venom of the snake black mamba (mamba intestinal toxin, MIT-1^a), in lizards, and in fishes. Striking characterization of these proteins are their identical amino terminal sequence, AVITG, and the presence of 10 cysteines with identical spacing that define a five disulphide-bridged motif called a colipase fold.² The high degree of identity between amphibian Bv8 peptides, fish peptides, and mamba MIT-1 (58%) suggested that similar peptides could also be present in other species, including mammals. In the mouse, rat, cattle, monkey, and man, cDNA cloning identified orthologues of Bv8. The two mammalian proteins were named prokineticin 1 (PK1, or EG-VEGF) that is 80% homologous to MIT, and prokineticin 2 (PK2 or mBv8) that is an orthologue of amphibian Bv8. The name prokineticin refers to the ability of these peptides to contract guinea pig ileum (GPI), a property shared with amphibian Bv8.³ The two G-protein-coupled receptors for Bv8-PKs, prokineticin receptor 1 (PKR1) and prokineticin receptor 2

(PKR2), encoded within distinct chromosomes in both mouse and human, share about 85% amino acid identity, with most differences at the N-terminal. Their sequences are almost identical in the transmembrane domains. Affinity of Bv8 and PKs for their receptors is similar, with Bv8 showing a 10 times higher affinity for either receptor, while MIT-1 is a PKR2 preferring ligand. PKRs have been reported to couple either to G_i or to G_{q/o} proteins.^{4–6} Intensive research over the past few years has shown that the biological activities of Bv8/PK proteins range from angiogenesis and involvement in reproduction and cancer, to neuronal survival and neurogenesis, hypothalamic hormone secretions, circadian rhythm control, and modulation of complex behaviours such as feeding and drinking. The high expression level of human Bv8/PK2 in bone marrow, lymphoid organs, and leukocytes suggested an involvement of these peptides in hematopoiesis and in inflammatory and immunomodulatory processes. Moreover, the dramatic reduction in the pain threshold produced by Bv8 indicates that Bv8/PKs and their receptors may act as mediators of inflammatory and neuropathic pain.^{7–11} PKRs are present in DRG, in the outer layers of the dorsal horns of the spinal cord, and in peripheral terminals of nociceptor axons. Activation of nociceptor PKRs by Bv8 in rats and mice produces sensitization to thermal and mechanical stimuli. A physiological role of Bv8/PKs as peripheral and central pain modulators is supported by the observation that mice lacking the PKRs or PK2 are less sensitive to noxious stimuli than wild type mice. PKR1-null mice also exhibited impaired development of hyperalgesia after tissue injury. PK2 released by inflammatory cells can bind and activate PKRs on the primary sensitive neurons, contributing to inflammatory pain.^{11,12} Hence the PKRs are potential targets for novel analgesic drugs that block the nociceptive information before it reaches the brain. Identifying of the structural determinants required for receptor binding and hyperalgesic activity of Bv8-PKs is thus mandatory for the design of PKR antagonists. The highly conserved amino terminal sequence AVITGA and the tryptophan (Trp) residue in position 24 in all members of the Bv8/PK family

* To whom correspondence should be addressed. Phone: (+39)-70-675-8625. Fax: (+39)-70-675-8612. E-mail: gbalboni@unica.it; bbg@unife.it.

[†] Department of Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara.

^{||} Department of Toxicology, University of Cagliari.

[‡] Department of Physiology and Pharmacology "Vittorio Erspamer", University "La Sapienza".

[§] Department of Cell Biology and Neuroscience, Istituto Superiore di Sanità.

^a Abbreviations. In addition to the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (*J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14–42), this paper uses the following additional symbols and abbreviations: AcOEt, ethyl acetate; Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; CDCl₃, deuteriochloroform; DCM, dichloromethane; DEAD, diethyl azodicarboxylate; DIPEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMSO-*d*₆, hexadeuteriodimethyl sulfoxide; ESI, electrospray ionization; Et₂O, diethyl ether; HPLC, high performance liquid chromatography; MIT, mamba intestinal toxin; Pe, petroleum ether; PKR1, prokineticin receptor 1; PKR2, prokineticin receptor 2; PPh₃, triphenylphosphine; TEA, triethylamine; TFA, trifluoroacetic acid; THF, tetrahydrofuran; TLC, thin-layer chromatography; Y, yield.

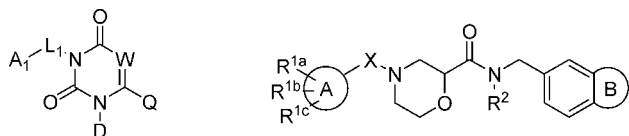


Figure 1. General structures of patented non-peptide prokineticin antagonists.

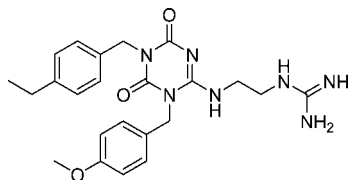


Figure 2. Structure of patented reference 1.

Table 1. Effect of Triazine Compounds 1–3 on 1 nM Bv8 Induced Intracellular Ca^{2+} Mobilization

treatment	PKR1% active cells	PKR2 % active cells
BV8 1 nM	93 ± 8.6	95 ± 7.8
+(1) 100 nM	52 ± 4.8	48 ± 3.7
+(1) 300 nM	4 ± 0.7	6 ± 0.9
+(2) 10 μM	90 ± 9.3	89 ± 9.2
+(2) 1 mM	0.3 ± 0.7	2 ± 1
+(3) 100 μM	91 ± 12	92 ± 8.8

are required for biological activity: deletions and substitutions in these conserved residues produces antagonist molecules.^{13,14} The N-terminal deletion of alanine and valine, in Bv8 molecule (dAV-Bv8), yields an analogue lacking any biological activity but still able to bind the receptors acting as PKR-antagonist in vitro and in vivo.¹⁴ In rats and mice, dAV-Bv8 dose-dependently reduced and abolished Bv8-induced hyperalgesia.¹⁴ Owing to the involvement of the prokineticin system in various biological and pathological functions, the availability of effective antagonists of the PKRs may be useful in the treatment and prevention of various mammalian disease states, for example, visceral pain that is associated with irritable bowel syndrome (IBS) and inflammatory bowel disease (IBD). Furthermore, PK receptor antagonists could be useful in treating cancer-specific angiogenesis, hence in

preventing tumoral development/progression. Recently, some patents regarding the synthesis and pharmacological characterization of non-peptide prokineticin antagonists were deposited by Janssen Pharmaceutica and Merck.^{15–18} General structures of patented compounds, summarized in Figure 1, are as follows: 1,3,4-trisubstituted 1,2,3,6-tetrahydro-2,6-dioxopyrimidines, 1,2,5-trisubstituted 1,4,5,6-tetrahydro-4,6-dioxo-1,3,5-triazines, and *N*,4-disubstituted morpholine-2-carboxamides, respectively. Considering the completely different structures reported in Figure 1, we selected to study the structure/activity relationship related to the triazine/pirimidine scaffold on the basis of better pharmacological data reported for its analogues.

With the aim to ameliorate the synthetic way to triazine compounds, among all patented 1,3,5-triazine prokineticin antagonists, on the basis of its pharmacological data and its easy synthetic feasibility, we focalized our attention on compound 1 [(2-(5-(4-ethylbenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,4,5,6-tetrahydro-4,6-dioxo-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethyl)guanidine] reported in the patent WO2006104713 as compound 46 (Figure 2).

Chemistry

A useful amelioration in the new synthetic way for the synthesis of compound 1 (Scheme 1) regards the preparation of the intermediate 1-(4-methoxybenzyl)-2-methylisothiourea. In the patented scheme (Supporting Information, Scheme 2), it was prepared by alkylation of 1-(4-methoxybenzyl)thiourea with methyl iodide. This reaction per se is not difficult, but the *N*-alkylation of thiourea often is a source of side reactions and it is quite easy to obtain considerable amounts of the disubstituted thiourea with an important yield decrease. To avoid this drawback, it is convenient to start the synthesis from the commercially available (Sigma-Aldrich) 1,3-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopsedourea that, under Mitsunobu conditions, is treated with 4-methoxybenzyl alcohol to yield the *N,N'*-Boc diprotected 1-(4-methoxybenzyl)-2-methylisothiourea (4), which upon TFA treatment gives the Boc deprotected (5) in good yield. The reaction of (5) with the commercially available *N*-(chlorocarbonyl) isocyanate provides the ring closure to the triazine intermediate (6) in 31% yield, in accord with the corresponding patented reaction. A second Mitsunobu reaction

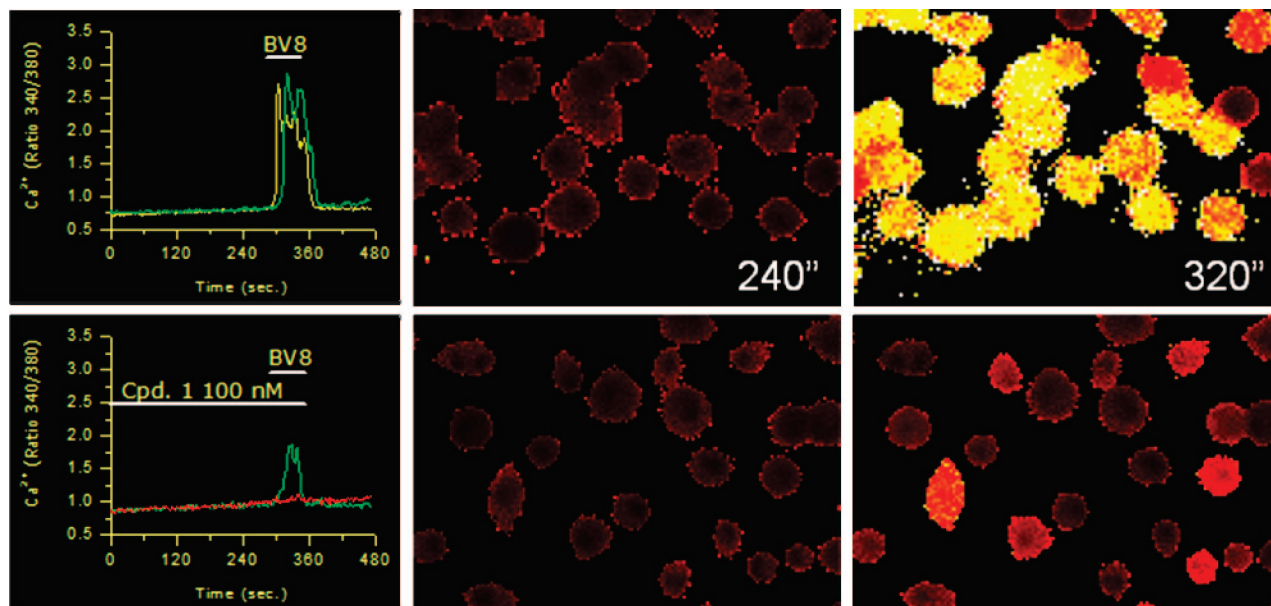
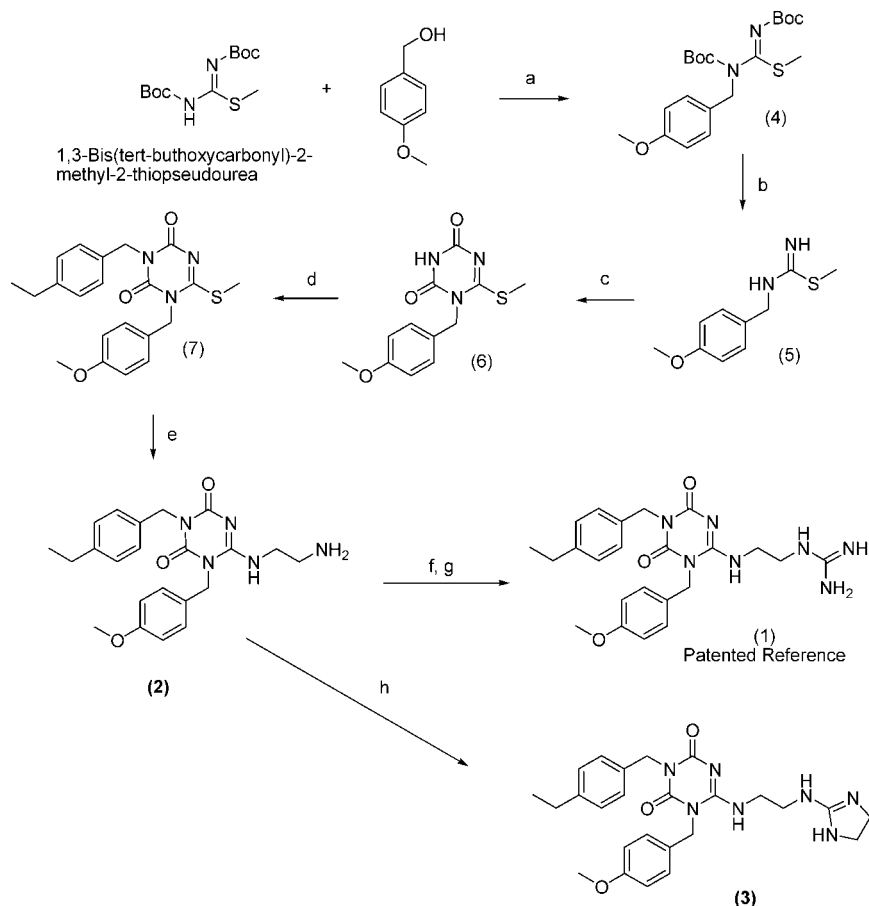


Figure 3. Effect of 1 on 1 nM Bv8-triggered cytoplasmic Ca^{2+} signals.

Scheme 1. Synthesis of the Triazine Compounds (1–3)^a

^a Reagents: (a) THF, DEAD, PPh₃, room temp. *Y* = 78%; (b) TFA, room temp. *Y* = 91%; (c) DCM, Cl(C=O)-N=C=O, DIPEA, *Y* = 31%; (d) THF, DEAD, PPh₃, 4-ethylbenzyl alcohol, room temp. *Y* = 80%; (e) toluene, NH₂CH₂CH₂NH₂, reflux *Y* = 95%; (f) 1,3-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudourea, THF/H₂O, 50 °C, *Y* = 77%; (g) TFA, room temp. *Y* = 95%; (h) 4,5-dihydro-2-(methylthio)-1*H*-imidazole, THF/H₂O, 50 °C, *Y* = 65%.

inserts the second benzyl group providing the intermediate (7), which upon treatment with ethylenediamine yields the compound 2. Finally, (2) can be converted to the reference (1) by the reaction with 1,3-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudourea and subsequent TFA deprotection or to compound 3 by the reaction with 4,5-dihydro-2-(methylthio)-1*H*-imidazole.

Results and Discussion

Binding of Triazine Compounds to Prokineticin Receptors.

The affinity of the new compounds for the prokineticin receptors was expressed as inhibition constant (*K_i*) of the binding of ¹²⁵I-MIT on PKR1 and PKR2 as detailed in the Supporting Information. The results from the binding assay indicated that the reference (1) is a PKR1 preferring ligand with an apparent affinity about 70-fold higher for PKR1 (*K_i* = 22 nM) than for PKR2 (*K_i* = 1610 nM). PKR1 affinity of 2 (*K_i* = 440 nM) and 3 (*K_i* = 4719 nM) was 20- and 200-fold lower than that of (1). PKR2 affinity of (2) and (3) is negligible, on the order of μM (Figures 4–5, Supporting Information).

The competitive displacement of ¹²⁵I-MIT from PKR1 and PKR2 by graded concentration of compounds 2 and 3 indicated that the lack of the guanidine function reduced the affinity for both receptors.

Effect of Triazine Compounds on Bv8 Triggered [Ca²⁺]_i. Fura-2 loaded CHO cells stably transfected with the PKR1 or PKR2¹⁴ were utilized to evaluate the antagonistic effect of compounds 1–3 on Bv8-triggered cytoplasmic Ca²⁺ signals.

Bv8 induced transient increases in [Ca²⁺]_i in a concentration-dependent number of cells.¹⁴ As shown in Figure 3, PKR1 expressing cells were challenged with 1 nM Bv8 in the absence (upper panels) or presence (lower panels) of 100 nM (1).

In the left panels is reported the time-course of the intracellular Ca²⁺ concentration (expressed as ratio between the emissions at 340 and 380 nm). In the right panels are reported the pseudocolor images of the emission intensity ratios recorded just before (240 s) and during (320 s) Bv8 challenge. Compound 1 dose dependently antagonized the 1 nM Bv8-induced intracellular Ca²⁺ mobilization ([Ca²⁺]_i) in PKR1- and PKR2-transfected CHO cells (IC₅₀ = 100 nM; IC₁₀₀ = 300 nM). 2 and 3 slightly reduced Bv8-induced [Ca²⁺]_i at 10 and 100 μM. Compound 2 completely blocked Bv8-induced intracellular Ca²⁺ mobilization at 1 mM concentration (Table 1).

Conclusion

Here we improved the synthesis and confirmed the activity of a non-peptidic prokineticin antagonist characterized by a structure much more simple than the corresponding cysteine-rich small proteins endowed with the same activity. Making a comparison between the two synthetic ways to the reference 1, our method, reported in Scheme 1, provides an overall yield of the final compound of about 13% vs an overall yield of about 3% calculated in accord with the synthesis reported in the patent (Scheme 2, Supporting Information). The same synthetic method we applied to (1), can be extended to a

wide range of triazine analogues deriving for example by the insertion of different benzyl groups. Interestingly, (1) showed comparable affinity but higher selectivity for PKR1 than the nonselective prokineticin receptor antagonist dAV-Bv8 obtained from Bv8 by N-terminal deletion of alanine and valine residues.¹⁴ Preliminary in vivo studies (data not shown) indicate that (1) and (2) both behave as antihyperalgesic and anti-inflammatory drugs.

Experimental Section

Chemistry. 1,3-Bis-(tert-butoxycarbonyl)-1-(4-methoxybenzyl)-2-methyl-3-thiopseudourea (4). To a solution of 1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudourea (2.0 g, 6.90 mmol), 4-methoxybenzyl alcohol (0.94 mL, 7.59 mmol) and triphenylphosphine (1.99 g, 7.59 mmol), at 0 °C in anhydrous THF, was added a solution of diethyl azodicarboxylate (1.4 mL, 7.59 mmol) dissolved in anhydrous THF. After 10 min, the reaction was warmed at room temperature and stirred overnight. The solvent was removed under vacuum, and the crude intermediate was purified by flash chromatography (EtOAc/Pe, 1:9, v/v): yield 2.21 g (78%); *R*_f(A) 0.60; HPLC *K'* 9.54; mp oil; *m/z* 412 (M + H)⁺. ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.27–7.25 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 6.84–6.82 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 4.69 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 1.50 (s, 9H), 1.40 (s, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.28, 158.99, 158.04, 152.00, 129.53, 129.35 (2 carbon atoms), 113.69 (2 carbon atoms), 82.59, 81.74, 55.21, 51.82, 28.01 (6 carbon atoms), 15.57.

1-(4-Methoxybenzyl)-2-methyl-3-thiopseudourea (5). Intermediate (4) (1.51 g, 3.68 mmol) was treated with TFA (10 mL) for 2 h. at room temperature. TFA was removed under vacuum, and the deprotected intermediate was precipitated from Et₂O: yield 1.08 g (91%); *R*_f(B) 0.32; HPLC *K'* 6.51; mp >250 °C; *m/z* 211 (M + H)⁺.

1-(4-Methoxybenzyl)-6-(methylthio)-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H)-dione (6). To a solution of (5) (0.5 g, 1.54 mmol) in dichloromethane (10 mL) at 0 °C, diisopropylethylamine (0.79 mL, 4.63 mmol) was added. At the same temperature, *N*-chlorocarbonyl isocyanate (0.12 mL, 1.54 mmol), dissolved in dichloromethane (3 mL), was added dropwise. The reaction mixture was allowed to stir while slowly warming to room temperature (1 h) and was then stirred for an additional 24 h. The solvent was evaporated, and the residue was partitioned between EtOAc and H₂O. The EtOAc layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. The solution was filtered, the solvent evaporated, and the residual oil was precipitated from methanol: yield 0.13 g (31%); *R*_f(C) 0.25; HPLC *K'* 5.33; mp 210–212 °C; *m/z* 280 (M + H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.60 (bs, 1H), 7.24–7.22 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 6.91–6.89 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 4.97 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.45 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 171.08, 158.62, 152.15, 149.98, 128.34 (2 carbon atoms), 126.86, 113.87 (2 carbon atoms), 55.00, 46.13, 14.68.

3-(4-Ethylbenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-6-(methylthio)-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H)-dione (7). To a solution of intermediate (6) (0.55 g, 1.97 mmol), triphenylphosphine (0.57 g, 2.17 mmol) and 4-ethylbenzyl alcohol (0.29 mL, 2.17 mmol), at 0 °C in anhydrous THF, a solution of diethyl azodicarboxylate (0.4 mL, 2.17 mmol) in anhydrous THF (3 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, the solvent was evaporated in vacuo, dissolved in EtOAc, and washed twice with water (20 mL each). After solvent evaporation, the residue was purified by flash chromatography (EtOAc/Pe, 1:2, v/v) to give a colorless oil: yield 0.62 g (80%); *R*_f(D) 0.35 HPLC *K'* 6.23; mp oil; *m/z* 398 (M + H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.27–7.16 (m, 6H), 6.92–6.88 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 5.02 (s, 2H), 4.91 (s, 2H), 4.05–4.01 (q, 2H, *J* = 7 Hz) 3.73 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 1.10–1.04 (t, 3H, *J* = 7 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): 170.06, 158.77, 151.58, 150.35, 142.88, 133.78 128.52 (2 carbon atoms), 127.73 (2 carbon atoms), 126.72 (2 carbon atoms), 113.87 (2 carbon atoms), 63.29, 55.10, 47.56, 44.72, 27.85, 15.69, 14.75.

6-(2-Aminoethylamino)-3-(4-ethylbenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H)-dione (2). To a solution of intermediate (7) (0.38 g, 0.95 mmol) in toluene (10 mL) at room temperature,

ethylenediamine (0.38 mL, 5.7 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 18 h. After solvent evaporation, the residue was dissolved in EtOAc and washed twice with water (2 × 10 mL). The organic layer was dried (Na₂SO₄) and evaporated to afford the final compound 2 as a pale-yellow oil: yield 0.37 g (95%); *R*_f(B) 0.92; HPLC *K'* 5.22; mp oil; *m/z* 410 (M + H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.21–7.10 (m, 6H), 6.92–6.88 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 5.02–4.98 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 4.86 (s, 2H), 4.08–3.98 (q, 2H, *J* = 7 Hz) 3.73 (s, 3H), 3.28–3.25 (t, 2H, *J* = 6.4), 2.53–2.50 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 1.14–1.10 (t, 3H, *J* = 7 Hz). Anal. C₂₆H₂₉F₆N₅O₇: C; H; N.

(2-(5-(4-Ethylbenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,4,5,6-tetrahydro-4,6-dioxo-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethyl)-*N,N'*-di-tert-butylloxycarbonyl-guanidine (*N,N'*-di-Boc-1). To a solution of 1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudourea (0.15 g, 0.51 mmol) in distilled THF (5 mL) and H₂O (50 μL) (2) (0.2 g, 0.49 mmol) was added at room temperature. The reaction was heated at 50 °C for 3 h. The solvent was evaporated under vacuum and the crude intermediate was precipitated from Et₂O/Pe (1:9, v/v) to give a white solid: yield 0.25 g (77%); *R*_f(D) 0.62; HPLC *K'* 6.45; mp 132–134 °C; *m/z* 653 (M + H)⁺. ¹H NMR (CDCl₃): 7.41–7.14 (m, 6H), 6.95 (bs, 1H), 6.87–6.85 (d, 1H, *J* = 8.8), 6.75–6.73 (d, 1H, *J* = 8.8), 6.43 (bs, 1H), 5.07 (s, 2H), 5.00 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.46–3.27 (m, 4H), 2.62–2.58 (q, 2H, *J* = 7.6), 1.52 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.22–1.18 (t, 3H, *J* = 7.6).

(2-(5-(4-Ethylbenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,4,5,6-tetrahydro-4,6-dioxo-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethyl)-guanidine (reference 1). *N,N'*-di-Boc-1 (0.21 g, 0.32 mmol) was treated with TFA (2 mL) for 0.5 h at room temperature. Et₂O/Pe (1:1, v/v) were added to the solution until the product precipitated: yield 0.21 g (95%); *R*_f(D) 0.46; HPLC *K'* 5.34; mp >250 °C; *m/z* 453 (M + H)⁺. ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.24 (bs, 1H), 7.78 (bs, 1H), 7.26–7.10 (m, 6H), 6.92–6.87 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz) 5.06 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.51 (q, 2H, *J* = 7 Hz), 2.57–2.50 (m, 4H), 1.78–1.10 (t, 3H, *J* = 7 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.03, 158.55, 157.04, 153.89, 153.35, 150.99, 142.58, 134.51, 128.21 (2 carbon atoms), 127.58 (2 carbon atoms), 127.20 (2 carbon atoms), 113.83 (2 carbon atoms), 55.02, 44.16, 40.65, 38.57, 27.74, 24.37, 15.63. Anal. C₂₇H₃₁F₆N₇O₇: C; H; N.

6-(2-(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)ethylamino)-3-(4-ethylbenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H)-dione (3). To a solution of 4,5-dihydro-2-(methylthio)-1H-imidazole, (0.03 g, 0.25 mmol) in distilled THF (5 mL) and H₂O (50 μL) (2) (0.1 g, 0.24 mmol) was added at room temperature. The reaction was heated at 50 °C for 3 h. The solvent was evaporated under vacuum, and the crude intermediate was precipitated from Et₂O/Pe (1:9, v/v) to give a pale-yellow solid: yield 0.11 g (65%); *R*_f(D) 0.53; HPLC *K'* 6.08; mp 220–222 °C; *m/z* 479 (M + H)⁺. ¹H NMR (CDCl₃): 7.41–7.14 (m, 6H), 6.95 (bs, 1H), 6.87–6.85 (d, 1H, *J* = 8.8), 6.75–6.73 (d, 1H, *J* = 8.8), 6.43 (bs, 1H), 5.07 (s, 2H), 5.00 (s, 2H), 3.83 (s, 4H) 3.79 (s, 3H), 3.46–3.27 (m, 4H), 2.62–2.58 (q, 2H, *J* = 7.6), 1.22–1.18 (t, 3H, *J* = 7.6). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.03, 158.55, 157.04, 153.89, 153.35, 150.99, 142.58, 134.51, 128.21 (2 carbon atoms), 127.58 (2 carbon atoms), 127.20 (2 carbon atoms), 113.83 (2 carbon atoms), 55.02, 51.3, 44.16, 40.65, 38.57, 33.6, 27.74, 24.37, 15.63. Anal. C₂₉H₃₃F₆N₇O₇: C; H; N.

Pharmacology. Receptor Binding Assay. Affinity of compounds 1–3 for prokineticin receptors was assayed on membrane preparation from PKR1- or PKR2-transfected CHO cells.¹⁴ The prokineticin binding sites were labeled with ¹²⁵I-MIT (*K*_d = 4 pM for PKR1; *K*_d = 1.24 pM for PKR2, PerkinElmer, Membrane Target Systems). The inhibition constant (*K*_i) of the three compounds was calculated from competitive binding curves with the PRISM software (GraphPad Software, San Diego, CA)

Intracellular Ca²⁺ Imaging. PKR1- or PKR2-transfected CHO cells, were loaded for 50 min at room temperature with 2 μM-Fura-2-AM in a balanced saline solution. Bv8 1 nM induced increases in [Ca²⁺]_i in 10–40 s in about 95% of cells. Compounds were added and incubated for 4 min, and then 1 nM Bv8 was added and the fluorescent signal was evaluated for 2 min. The IC₅₀ is

defined as the amount of a given compound required to inhibit 50% of the maximum signal that is generated by 1 nM Bv8.

Acknowledgment. This study was supported in part by the University of Cagliari (G.B.), and the University of Ferrara (S.S.). Pharmacological tests were supported by grants of the University of Rome "La Sapienza" (L.N.).

Supporting Information Available: Chemistry general methods, patented synthetic scheme of Reference 1, receptor binding assay, figures 1 and 2 related to prokineticin receptors binding, elemental analysis and MS data. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Mollay, C.; Wechselberger, C.; Mignogna, G.; Negri, L.; Melchiorri, P.; Barra, D.; Kreil, G. Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *374*, 189–196.
- (2) Kaser, A.; Winklmayr, M.; Lepperdinger, G.; Kreil, G. The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 469–473.
- (3) Li, M.; Bullock, C. M.; Knauer, D. J.; Ehlert, F. J.; Zhou, Q. Y. Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 692–698.
- (4) Lin, D. C.; Bullock, C. M.; Ehlert, F. J.; Chen, J. L.; Tian, H.; Zhou, Q. Y. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19276–19280.
- (5) Masuda, Y.; Takatsu, Y.; Terao, Y.; Kumano, S.; Ishibashi, Y.; Suenaga, M.; Abe, M.; Fukusumi, S.; Watanabe, T.; Shintani, Y.; Yamada, T.; Hinuma, S.; Inatomi, N.; Ohtaki, T.; Onda, H.; Fujino, M. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 396–402.
- (6) Soga, T.; Matsumoto, S.; Oda, T.; Saito, T.; Hiyama, H.; Takasaki, J.; Kamohara, M.; Ohishi, T.; Matsushime, H.; Furuichi, K. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1579*, 173–179.
- (7) LeCouter, J.; Kowalski, J.; Foster, J.; Hass, P.; Zhang, Z.; Dillard-Telm, L.; Frantz, G.; Rangell, L.; Deguzman, L.; Keller, G.; Peale, F.; Gurney, A.; Hillan, K.; Ferrara, N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* **2001**, *412*, 876–884.
- (8) Shojaei, F.; Wu, X.; Zhong, C.; Yu, L.; Liang, X. H.; Yao, J.; Blanchard, D.; Bais, C.; Peale, F. V.; Van Bruggen, N.; Ho, C.; Ross, J.; Tan, M.; Carano, R. A.; Meng, Y. G.; Ferrara, N. Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* **2007**, *450*, 825–831.
- (9) Zhou, Q. Y. The prokineticins: a novel pair of regulatory peptides. *Mol. Interv.* **2006**, *6*, 3330–3338.
- (10) Negri, L.; Lattanzi, R.; Giannini, E.; Melchiorri, P. Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sci.* **2007**, *81*, 1103–1116.
- (11) Negri, L.; Lattanzi, R.; Giannini, E.; Melchiorri, P. Modulators of pain: Bv8 and prokineticins. *Curr. Neuropharmacol.* **2006**, *4*, 207–215.
- (12) Negri, L.; Lattanzi, R.; Giannini, E.; Colucci, M.; Margheriti, F.; Melchiorri, P.; Vellani, V.; Tian, H.; De Felice, M.; Porreca, F. Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behaviour. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 6716–6727.
- (13) Bullock, C. M.; Li, J. D.; Zhou, Q. Y. Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 582–588.
- (14) Negri, L.; Lattanzi, R.; Giannini, E.; Colucci, M. A.; Mignogna, G.; Barra, D.; Grohovaz, F.; Codazzi, F.; Kaiser, A.; Kreil, G.; Melchiorri, P. Biological activities of Bv8 analogues. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 625–632.
- (15) Coats, S. J.; Dyatkin, A. B.; He, W.; Lisko, J.; Ralbovsky, J. L.; Schultz, M. J. Prokineticin 1 receptor antagonists. Patent WO2006104715, 2006.
- (16) Coats, S. J.; Dyatkin, A. B.; He, W.; Lisko, J.; Ralbovsky, J. L.; Schultz, M. J. Pyrimidindione derivatives as prokineticin 2 receptor antagonists. Patent WO2006104713, 2006.
- (17) Coats, S. J.; Dyatkin, A. B.; He, W.; Lisko, J.; Miskowski, T. A.; Ralbovsky, J. L.; Schultz, M. J. Prokineticin 2 receptor antagonists. Patent WO2007079214, 2007.
- (18) Thompson, W. J.; Melamed, J. Y. Preparation of morpholinecarboxamides as prokineticin 2 receptor antagonists. Patent WO2007067511, 2007.

JM800854E