



Università della Calabria

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

Tesi di Dottorato di Ricerca in

*“Metodologie per lo Sviluppo di Molecole di Interesse
Farmacologico”*

S. S. D.: CHIM/06 (*Chimica Organica*)

**NUOVE STRATEGIE PER LA SINTESI DI PEPTIDI E
STEROIDI MODIFICATI**

Supervisore

Ch.mo Prof. Angelo LIGUORI

Candidata

Dott.ssa Francesca PERRI

Coordinatore del Corso di Dottorato di Ricerca

Ch.mo Prof. Bartolo GABRIELE

XX Ciclo

INDICE

CAPITOLO 1: SINTESI DI D-OMOSTEROIDI E DERIVATI

<i>Introduzione</i>	Pg 1
1.1. D-OMOSTEROIDI ISOLATI DA FONTI NATURALI	Pg 7
1.2. SINTESI DI D-OMOSTEROIDI	Pg 10
1.2.1. SINTESI DI D-OMOSTEROIDI MENTIANTE RIARRANGIAMENTO	Pg 10
1.2.1.1. RIARRANGIAMENTI CATIONICI	Pg 11
1.2.1.2. RIARRANGIAMENTI ANIONICI/RADICALICI	Pg 18
1.2.2. STRATEGIE DI FRAMMENTAZIONE-CICLIZZAZIONE	Pg 19
1.2.3. SINTESI TOTALE DI D-OMOSTEROIDI	Pg 25

CAPITOLO 2: N-METIL- β^3 -AMMINOACIDI

<i>Introduzione</i>	Pg 31
2.1. PROCEDURE SINTETICHE PER L'OTTENIMENTO DI N-METIL- β^3 -AMMINOACIDI	Pg 36

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI SPERIMENTALI

3.1. SINTESI DI STEROIDI MODIFICATI	Pg 44
3.2. SINTESI DI N-METIL- β^3 -AMMINOACIDI	Pg 57
3.3. PROTEZIONE REVERSIBILE DELLA FUNZIONE AMMINICA CON IL GRUPPO NOSILE NELLA SINTESI PEPTIDICA IN SOLUZIONE	Pg 92
3.4. RIDUZIONE DELLE N-METIL-N-METOSSIAMMIDI NELLE CORRISPONDENTI AMMINE CON IL SISTEMA REAGENTE $AlCl_3/LiAlH_4$	Pg 108

CAPITOLO 4: PARTE SPERIMENTALE

BIBLIOGRAFIA	Pg 186
---------------------	--------

CAPITOLO 1

SINTESI DI D-OMOSTEROIDI E DERIVATI

Introduzione

Gli steroidi rappresentano un'importante classe di biomolecole, ampiamente diffusa in natura, che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione delle differenti funzioni dell'organismo umano ed animale.¹ Numerosi membri di questa classe di composti, largamente rappresentata anche nel regno vegetale,¹ presentano un ampio spettro di attività biologiche e, per questa ragione, notevoli e svariate sono le loro applicazioni in campo medico e farmaceutico.^{2,3}

Gli steroidei presentano una struttura base derivante dal nucleo policiclico *ciclopentanperidrofenantrenico*, costituito da tre anelli a sei atomi di carbonio ed un anello a cinque atomi di carbonio identificati rispettivamente con le lettere A, B, C e D (**Figura 1**). Tutti gli steroidi naturali presentano una giunzione degli anelli B e C di tipo *trans*, sebbene si possano ottenere sinteticamente delle forme *cis*. Mentre gli anelli C e D sono generalmente legati in posizione *trans*, la fusione A/B può essere *trans* o *cis* (**Figura 1**). La posizione di tutti gli atomi di idrogeno e dei sostituenti presenti sul nucleo steroideo viene riferita al gruppo metilico legato all'atomo di carbonio in posizione 10 (C-10), gruppo che sporge verso l'alto dal piano anulare (posizione β). Se il sostituito è posizionato dallo stesso lato del piano anulare nel quale si trova il metile legato al C-10 (C-19), si dice che esso è in posizione β , nel caso contrario è in posizione α (**Figura 1**). Le giunzioni degli anelli possono essere definite riportando l'orientazione α o β per gli opportuni idrogeni o eventuali sostituenti legati agli atomi di giunzione dei cicli. In particolare, le orientazioni degli atomi di idrogeno localizzati nelle posizioni 5 e 14 permettono di definire, rispettivamente, le fusioni A/B e C/D.

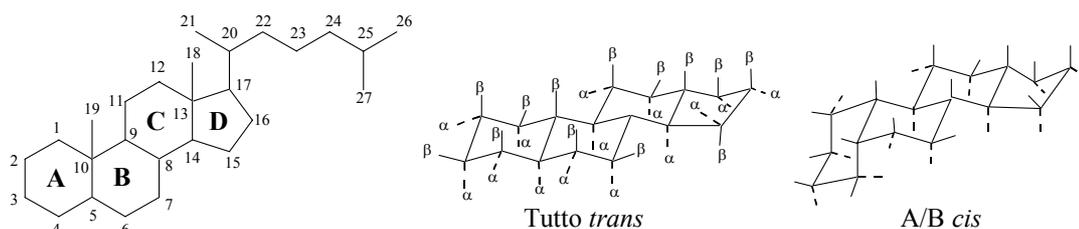


Figura 1. Rappresentazione del nucleo steroideo

Il gruppo degli steroidi include anche composti che presentano sostanziali variazioni del nucleo tetraciclico di base. Modifiche del normale scheletro steroideo sono, usualmente, indicate mediante prefissi: per esempio composti che mancano di una giunzione d'anello e presentano, pertanto, un anello aperto, sono chiamati 'seco' steroidi (vitamina D e analoghi), mentre steroidi con un atomo di carbonio addizionale sono indicati con il termine 'omo'. Il prefisso 'nor' indica la perdita di un atomo di carbonio: ad esempio i 19-*nor*-steroidi mancano del carbonio 19 (ovvero del metile legato al C-10); il prefisso 'ciclo' si riferisce alla presenza di un anello extra formato legando tra loro due atomi di carbonio dello scheletro steroideo.

La nomenclatura degli steroidi, originariamente basata sull'utilizzo di nomi comuni derivanti dalle circostanze legate alla loro scoperta, è stata ripresa e riorganizzata nel 1960 dalla International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).⁴ Tenendo conto delle regole emendate, la nomenclatura sistemica degli steroidi è basata su una serie di idrocarburi capostipiti che includono: l'estrano, l'androstano, il pregnano, il colano, il colestano, l'ergostano, il campestano, lo stigmastano, il lanostano e il cicloartano (**Figura 2**).

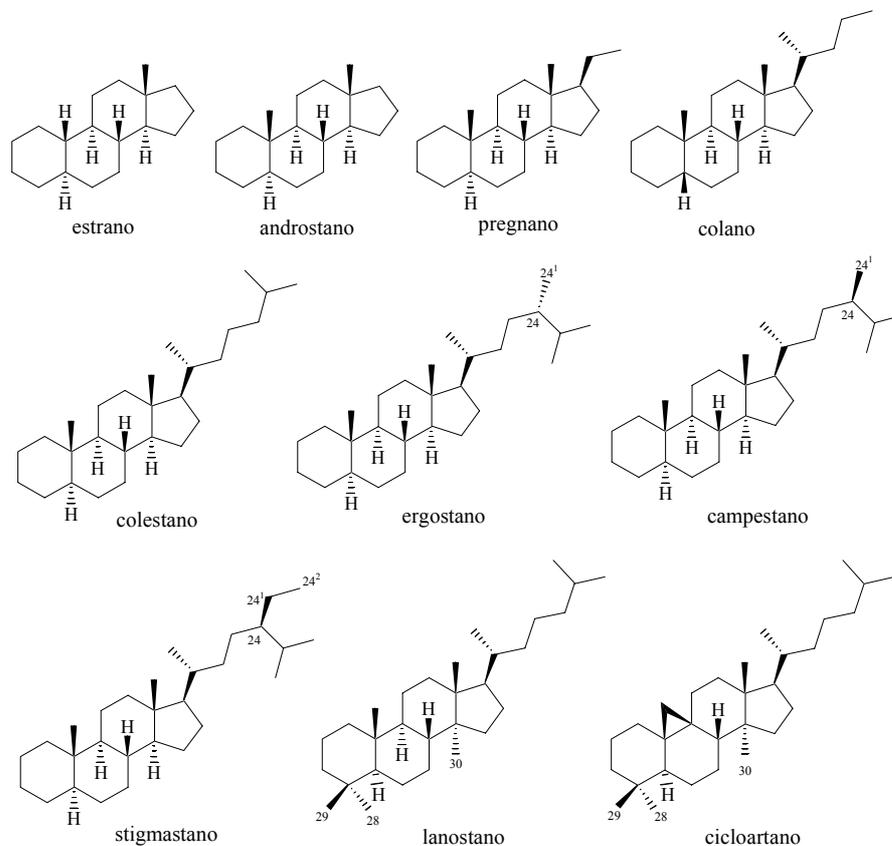
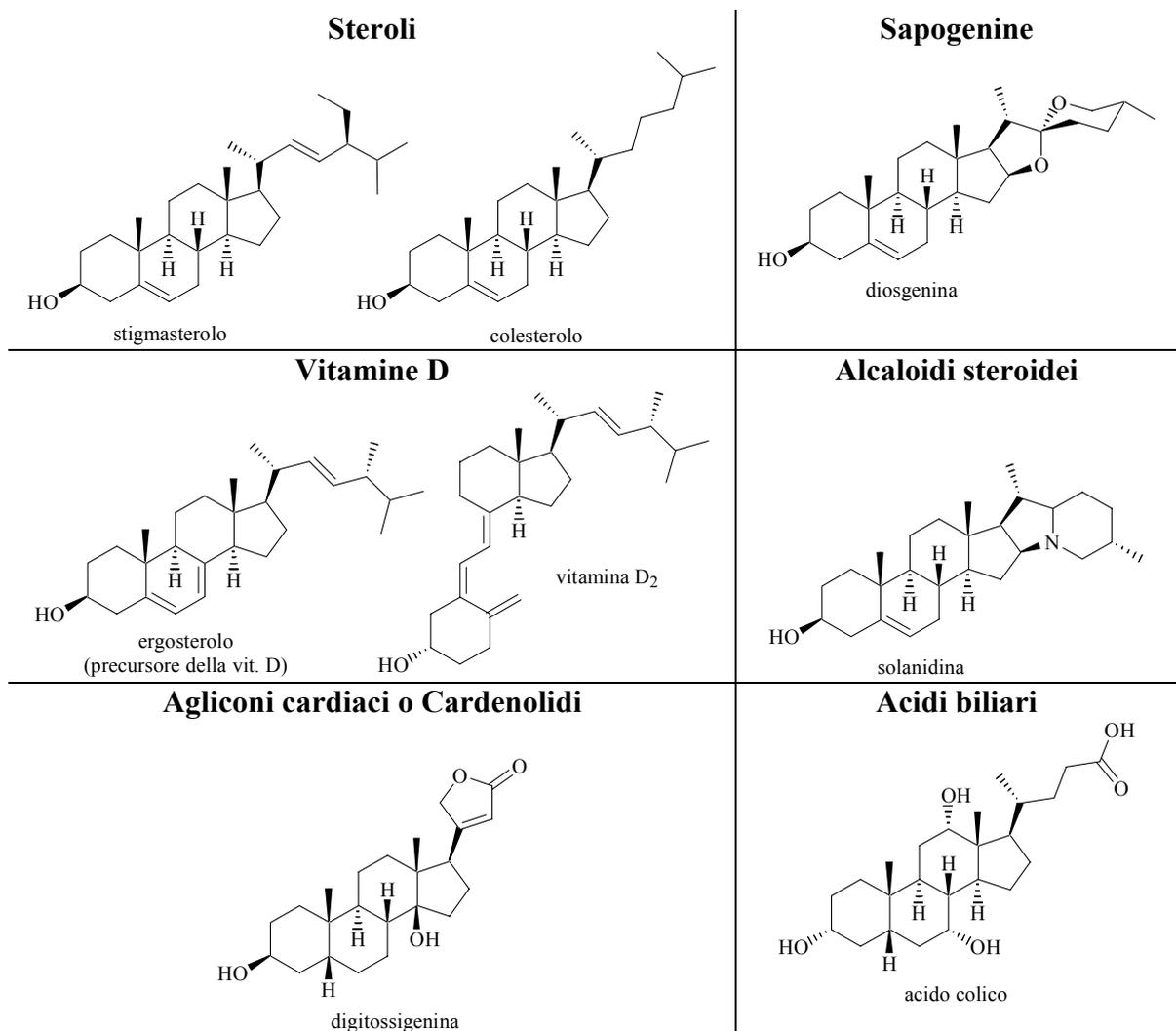


Figura 2. Rappresentazione degli scheletri steroidei di base da cui deriva la nomenclatura sistemica degli steroidi

I numerosi composti appartenenti alla famiglia degli steroidi possono essere suddivisi in diversi sottogruppi: steroli, saponine e sapogenine, glicosidi cardiaci ed agliconi, alcaloidi steroidei ed ecdisoni, isolati da piante e steroli, acidi biliari, ormoni corticosurrenali, ormoni sessuali femminili (estrogeni e progestinici), ormoni sessuali maschili (androgeni) e vitamina D, presenti negli animali (**Figura 3**).

Per molti di questi composti caratterizzati dalla stessa struttura scheletrica, è stata riscontrata un'attività biologica marcatamente diversa. In particolare, l'attività degli steroidi è correlata alla presenza di svariati gruppi funzionali in differenti posizioni, al grado di insaturazione degli anelli ed alla diversa stereochimica dei centri chirali presenti nello scheletro steroideo.



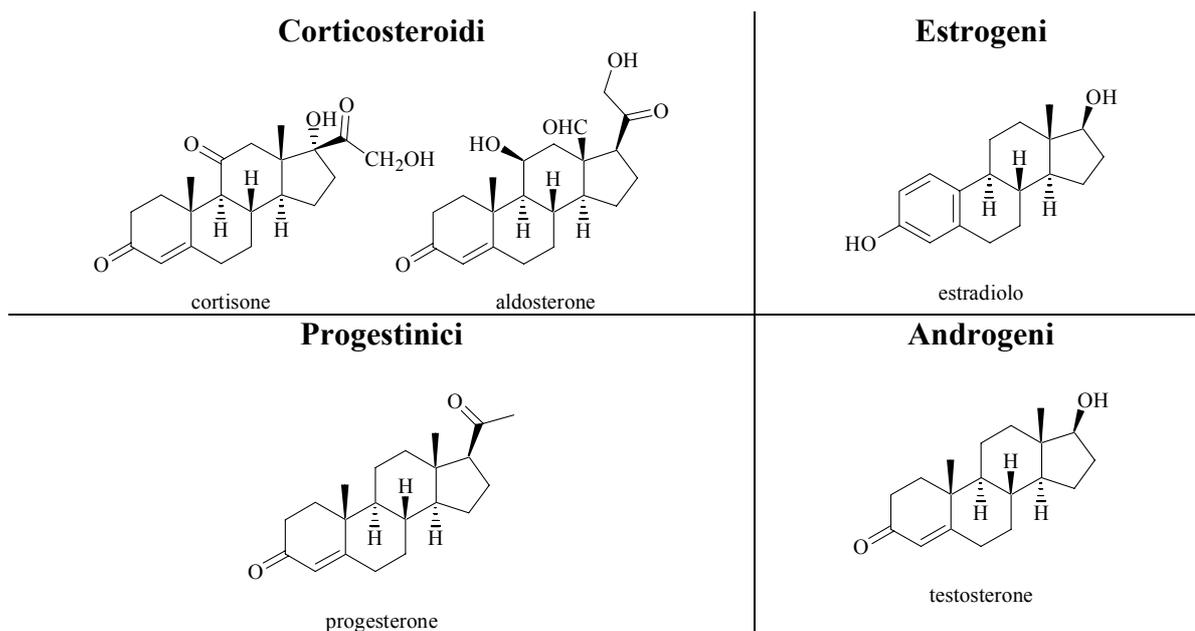


Figura 3. Composti rappresentativi dei diversi gruppi di steroidi

La progettazione e la sintesi di nuove molecole a struttura steroidea, biologicamente attive e capaci di esplicare un'efficace azione terapeutica, continuano da sempre ad attirare l'interesse dei ricercatori.⁵ Recentemente, uno degli approcci più frequentemente usato nella realizzazione di nuovi derivati steroidei prevede la combinazione di uno steroide con una o più molecole differenti,^{6,7} dotate di proprietà chimiche e biologiche diverse, in un nuovo ibrido, uno steroide coniugato⁸ le cui caratteristiche possono differire da quelle dei composti originali.⁹

Un'altra strada per ottenere nuovi steroidi biologicamente attivi è rappresentata dalla possibilità di modificare l'originale scheletro stearanico, ad esempio mediante l'espansione dell'anello D: queste reazioni portano alla formazione dei corrispondenti D-omosteroidi (**Figura 4**). Per via del loro significativo valore in campo medico, la sintesi di questi analoghi degli steroidi continua a rappresentare un'importante area d'interesse nell'ambito dello studio delle possibili modifiche chimiche del nucleo steroideo. L'inserimento di un atomo di carbonio addizionale nell'anello D di uno steroide può alterarne, infatti, le proprietà biologiche.¹⁰ Alcuni esempi sono rappresentati dal D-omoestradiolo (**1**, **Figura 4**) - che mostra un'affinità di legame per i recettori degli estrogeni di tre ordini di grandezza più bassa rispetto a quella dell'estradiolo¹¹ - da alcuni derivati del D-omoestrone (**2**), dotati di significative proprietà antiossidanti¹² (**Figura 4**) e da nuovi D-omosteroidi derivati dall'androsterone, che hanno mostrato attività anti-cancro, anti-diabetica ed ipolipidemica.¹³

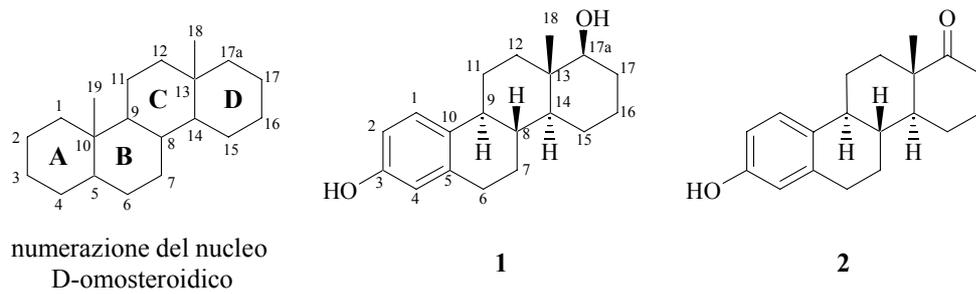


Figura 4. D-Omosteroidi

L'espansione dell'anello D costituisce, tra l'altro, una ben nota trasformazione coinvolta nel metabolismo di fase I degli steroidi.¹⁴ Steroidi identificati come 17 α -cheto-D-omo derivati rappresentano, infatti, i principali metaboliti isolati nel plasma, nelle urine e nelle feci di cani, dopo una singola somministrazione orale di desogestrel.¹⁵ Alcuni metaboliti con struttura D-omosteroidea sono stati isolati dalle urine umane, dopo somministrazione orale di etinilestradiolo,¹⁶ un ormone ad attività estrogena che rappresenta il principale costituente di numerosi contraccettivi orali.¹⁷ È stato ipotizzato che il meccanismo della reazione d'espansione dell'anello D dell'etinilestradiolo coinvolga, con molta probabilità, una iniziale reazione di ossidazione del triplo legame del gruppo etinilico, con formazione di un intermedio ad alta energia. Il riarrangiamento di quest'ultimo, mediante allargamento dell'anello D, porta ad un derivato più stabile, il 17-formil-17 α -cheto-D-omosteroide (**Figura 5**); l'ossidazione del gruppo formilico e la successiva spontanea decarbossilazione, fornisce il corrispondente 17 α -cheto-D-omosteroide. Il citocromo P450 sembra essere responsabile del primo processo di ossidazione coinvolto in questa trasformazione.^{18, 19}

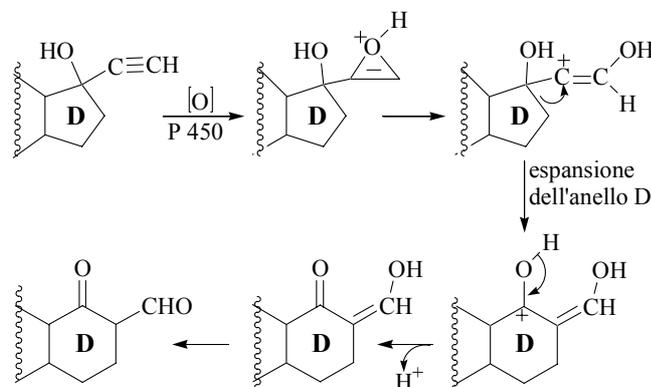


Figura 5. Possibile meccanismo della reazione d'espansione dell'anello D nel metabolismo di fase I degli steroidi

L'allargamento dell'anello D rappresenta, inoltre, un processo di decomposizione frequentemente osservato durante l'immagazzinamento di steroidi di comune impiego clinico.²⁰⁻²²

In questo contesto, lo studio e la realizzazione di nuove strategie sintetiche, finalizzate all'ottenimento di analoghi di steroidi naturali aventi uno scheletro D-omosteroidico, rappresentano un'importante area di ricerca nel campo della chimica degli steroidi.

1.1. D-OMOSTEROIDI ISOLATI DA FONTI NATURALI

La maggior parte dei D-omosteroidi presenti in natura appartiene alla famiglia degli alcaloidi steroidei,^{23, 24} composti usualmente isolati da piante superiori e, in misura minore, anche da microrganismi e da animali. In particolare, si tratta di C-nor-D-omosteroidi, un importante gruppo di alcaloidi steroidei in cui, oltre all'espansione di un atomo di carbonio dell'anello D, è presente anche un'alterazione delle dimensioni dell'anello C, che risulta a cinque termini.

Alcune piante della famiglia delle Liliaceae, soprattutto del genere *Veratrum*, contengono alcaloidi con scheletro C-nor-D-omosteroidico, che in passato sono stati ampiamente impiegati in medicina come agenti ipotensivi.

Il potenziale farmacologico dei D-omosteroidi di origine naturale e la possibilità di migliorarne l'attività biologica mediante opportune elaborazioni strutturali, rappresentano la forza trainante che, negli ultimi anni, ha mantenuto vivo l'interesse della ricerca per l'isolamento da fonti naturali e la delucidazione strutturale di nuovi derivati.

Due nuovi alcaloidi steroidei, la veramina (3) e la neojermininalina (4, **Figura 6**), insieme con il già noto glicoalcaloide pseudojervina, sono stati isolati da *Veratrum album* L.²⁵

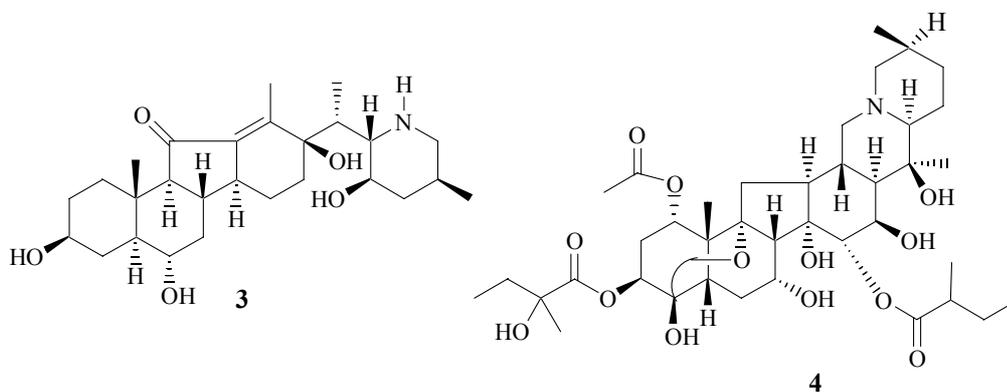


Figura 6. Alcaloidi steroidei isolati da *Veratrum album* L

La germinina (5, **Figura 7**), isolata da *Veratrum lobelianum* Bernh, ha una struttura strettamente correlata a quella della neojermininalina;²⁶ l'imperiazina (6, **Figura 7**) è stata isolata da *Petilium eduardi*.²⁷

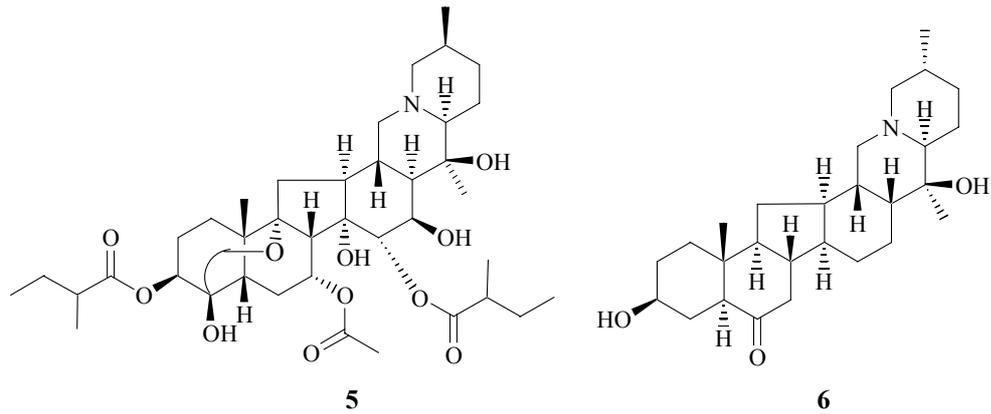


Figura 7. Germinina (5) e imperiazina (6)

Due membri di una nuova classe di alcaloidi C-nor-D-omosteroidi, l'impranina (7) e diidroimpranina (8, Figura 8) sono stati recentemente isolati da *Fritillaria imperialis*.²⁸

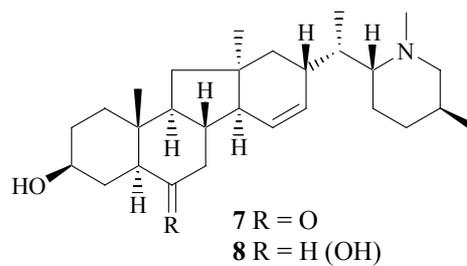


Figura 8. Alcaloidi steroidei isolati da *Fritillaria imperialis*

Sei nuovi alcaloidi, di cui cinque con struttura C-nor-D-omosteroidica sono stati isolati da *Fritillaria puziensis*: le puqienine C-E (9-11), la puqiedina (12) e il 3 α -puqiedin-7-olo (13, Figura 9).²⁹

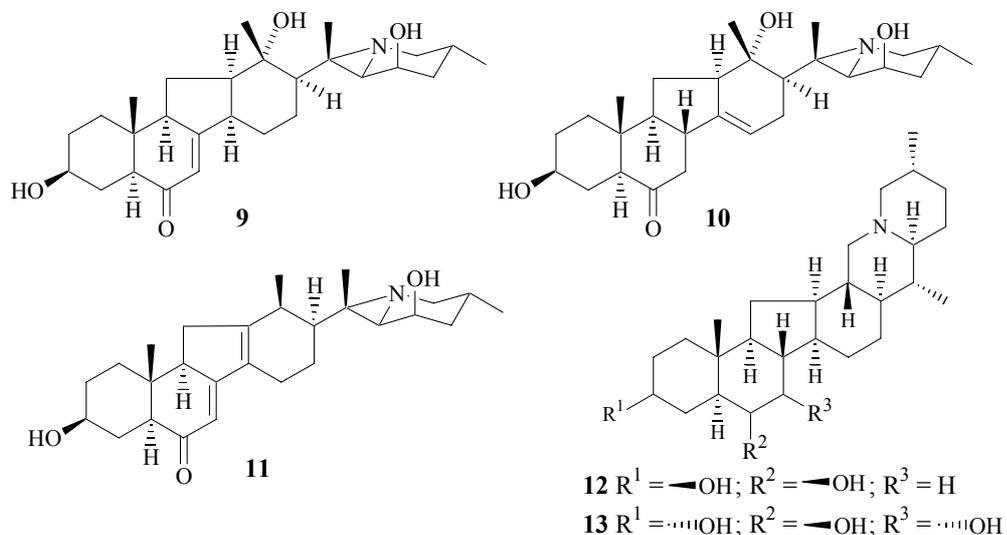


Figura 9. Alcaloidi steroidei isolati da *Fritillaria puziensis*

Tra i dodici nuovi glicosidi cardenolidici isolati da *Thevetia ahouai* (LINN), nove, tra cui la tevetiogenina 3-O- β -gentobiosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranoside (**14**), sono C-nor-D-omocardenolidi glicosidici (**Figura 10**).³⁰

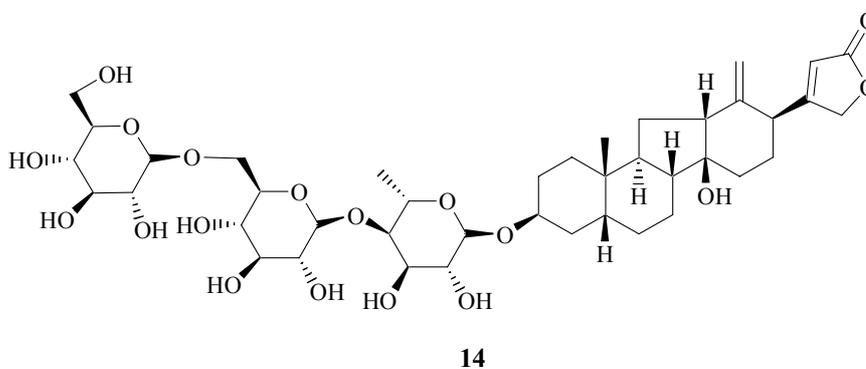


Figura 10. Tevetiogenina 3-O- β -gentobiosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranoside

La nakiterpiosina (**15**) e il nakiterpinosinone (**16**), recentemente isolati dalla spugna di Okinawan *Terpios hoshinota*, rappresentano i primi C-nor-D-omosteroidi ritrovati in un organismo marino (**Figura 11**). Entrambi i composti, contenenti un anello D aromatico, sono dotati di una potente attività citotossica contro cellule leucemiche linfocitiche di topo (P388).^{31, 32}

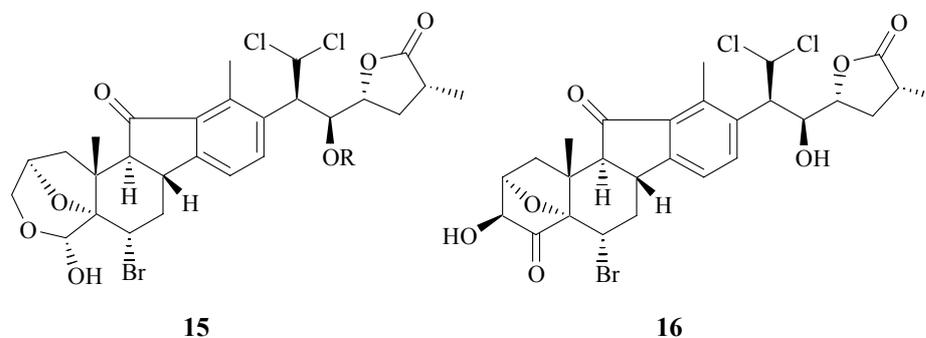


Figura 11. C-Nor-D-omosteroidi isolati dalla spugna di Okinawan *Terpios hoshinota*

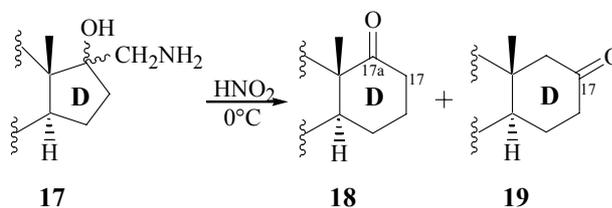
1.2. SINTESI DI D-OMOSTEROIDI

L'approccio più convenientemente utilizzato per la sintesi di D-omosteroidi, consiste nella conversione dell'anello D a cinque termini di steroidi naturali in un anello a sei termini.³³ Per realizzare questa trasformazione le strategie disponibili prevedono reazioni che determinano un riarrangiamento strutturale dell'anello D o, in alternativa, reazioni di apertura di anello seguite da ciclizzazione. Un importante vantaggio di queste procedure sintetiche è che, generalmente, lasciano inalterate le configurazioni della maggior parte dei centri chirali presenti nel nucleo steroideo. Tuttavia, la selettività di queste trasformazioni risulta spesso scarsa e, nel caso della sequenza di apertura-chiusura d'anello, le strategie utilizzate richiedono usualmente numerosi passaggi.

1.2.1. SINTESI DI D-OMOSTEROIDI MENTIANTE RIARRANGIAMENTO

L'applicazione del riarrangiamento di Tiffeneau^{34,35} a 17-amminometil-17-idrossisteroidi rappresenta una classica procedura utilizzata per la sintesi di D-omosteroidi.³⁶ Il trattamento con acido nitroso delle idrossiammine **17**, ottenute a partire dai corrispondenti 17-chetosteroidi^{37,38} attraverso la sequenza: chetone $\xrightarrow{\text{HCN}}$ cianoidrina $\xrightarrow{\text{riduzione}}$ idrossiammina, porta alla formazione dei corrispondenti D-omo-17a-chetoni **18** in misura prevalente, assieme ad una piccola quantità dei corrispondenti 17-chetoni **19** (**Schema 1**).

Questa reazione è stata oggetto di numerosi studi che ne hanno migliorato la selettività³⁹ e, recentemente, è stata spesso utilizzata per la sintesi di D-omopregnani.



Schema 1. Riarrangiamento di Tiffeneau di 17-amminometil-17-idrossisteroidi

1.2.1.1. RIARRANGIAMENTI CATIONICI

Il riarrangiamento dell'anello D di 17-idrossi-20-cheto steroidi è stato scoperto nel 1938⁴⁰ ed è ampiamente documentato in letteratura. Il meccanismo del riarrangiamento indotto da acidi di Lewis dei 17-idrossi-20-cheto steroidi può essere considerato come una trasposizione pinacolica; la chelazione iniziale dell'acido di Lewis da parte del gruppo ossidrilico in posizione 17 e del gruppo chetonico in 20 è seguita dalla migrazione del legame C-16-C-17.^{41,42} Questa chelazione determina un'orientazione reciproca *cis* delle funzionalità ossigenate, con conseguente formazione del corrispondente 17 α -cheto-17 α -idrossi-D-omosteroidi che possiede il gruppo ossidrilico legato al C-17 in posizione α (**Figura 12**).⁴³ Mentre la stereoselettività del riarrangiamento può essere spiegata sulla base della formazione del complesso ciclico mostrato in figura 12, i fattori che controllano la regioselettività del processo, ovvero la migrazione del legame C-16-C-17 piuttosto che quella del legame C-13-C-17, non sono stati completamente compresi.^{44, 45}

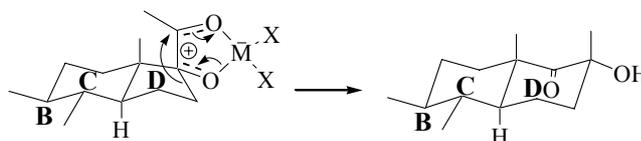


Figura 12. Meccanismo del riarrangiamento dei 17-idrossi-20-cheto steroidi indotto da acidi di Lewis

Anche il riarrangiamento, indotto da acidi di Lewis, dell'anello D di 17-idrossi-20-cheto steroidi, recanti sul C-16 un sostituito in posizione β , porta alla formazione dei corrispondenti 17 α -cheto-17 α -idrossi-D-omo isomeri.⁴⁶

Studi recenti hanno dimostrato che il trattamento del triamcinolone (**20**) con acidi di Lewis porta all'ottenimento del corrispondente 17 α -cheto-17 α -idrossi-D-omosteroidi **21** (**Figura 13**);⁴⁷ questo risultato è in disaccordo con dati precedentemente pubblicati che riportano, invece, il 17-cheto-17 α -idrossi-D-omo isomero **22** come unico prodotto di reazione (**Figura 13**).⁴⁸

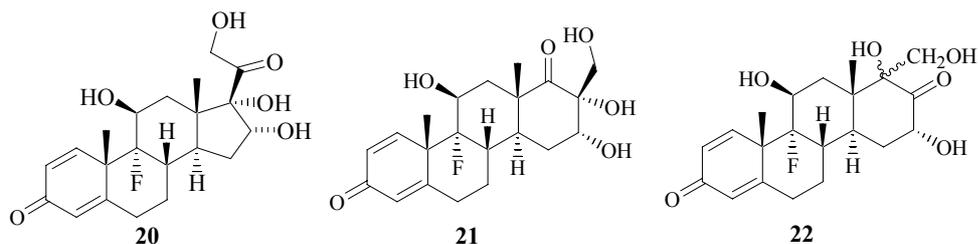


Figura 13. Struttura del triamcinolone (**20**) e dei corrispondenti 17 α -cheto-17 α -idrossi- e 17-cheto-17 α -idrossi-D-omosteroidi **21** e **22**

Nel riarrangiamento, indotto da acidi di Lewis, del triamcinolone la chelazione iniziale di un metallo divalente o trivalente da parte del gruppo ossidrilico in posizione 17 α e del gruppo chetonico in 20, catalizza una reazione retro-aldolica che determina l'apertura dell'anello D (**Figura 14**). La geometria del doppio legame C-17–C-20 è determinata dalla chelazione dello ione metallico da parte delle funzionalità ossigenate e la condensazione aldolica intramolecolare successiva procede attraverso uno stato di transizione a sedia, nel quale il carbonile aldeidico in C-16 assume una posizione pseudo-assiale. L'interazione diretta (intermedio **A**) o indiretta (intermedio **B**) tra il carbonile in C-16 e lo ione metallico durante la chiusura dell'anello, determina la stereochimica del centro chirale in C-16, nel prodotto finale (**Figura 14**).

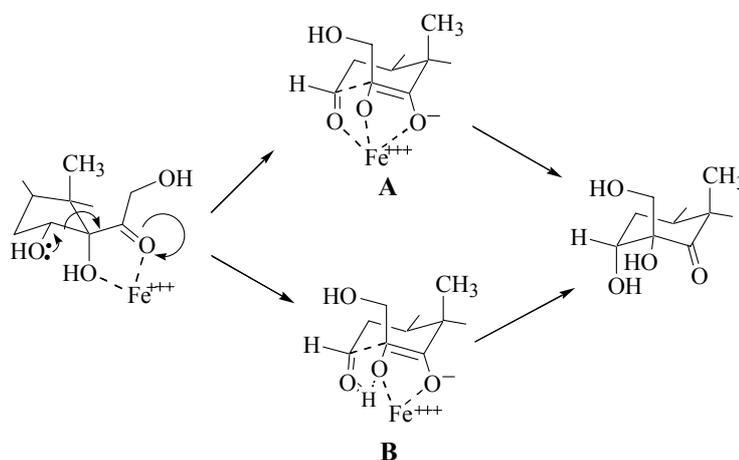
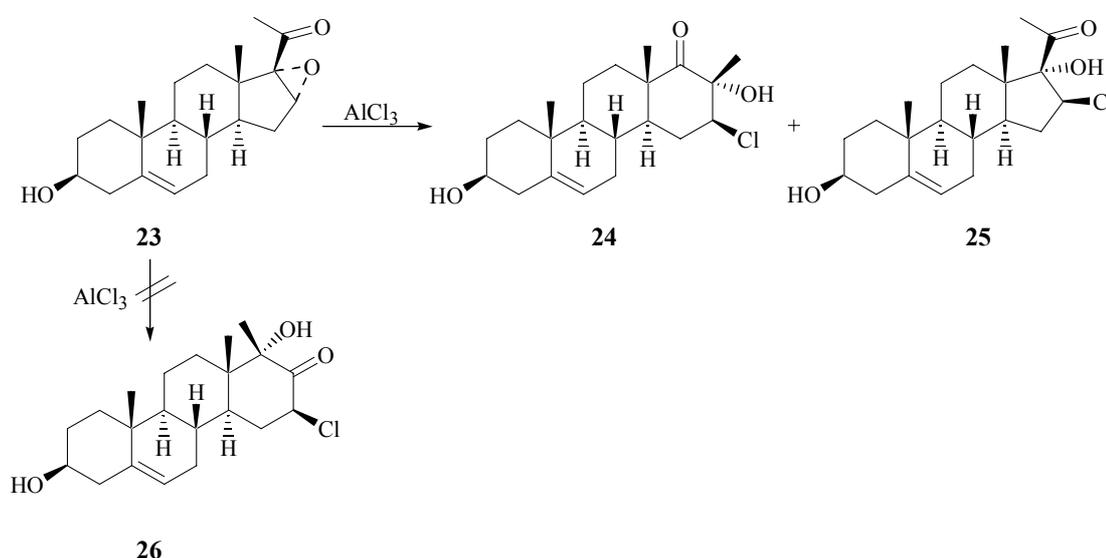


Figura 14. Meccanismo del riarrangiamento, indotto da acidi di Lewis, del triamcinolone (**20**)

Il trattamento del 16 α ,17 α -epossi-3 β -idrossi-5-pregnen-20-one (**23**) con tre equivalenti di tricloruro di alluminio anidro, in acetonitrile anidro a 10°C, porta alla formazione esclusiva e con rese elevate del 16 β -cloro-3 β ,17 α -diidrossi-17 β -metil-D-omo-5-androsten-17 α -one (**24**). L'uso di due equivalenti di tricloruro di alluminio anidro,

in acetonitrile a temperatura ambiente, porta, invece, ad una miscela del D-omosteroide **24** (65%) e della cloridrina **25** (35%) (Schema 2).⁴⁹

Quando la temperatura di reazione è mantenuta costante a 40°C per 7 ore, il trattamento di **23** con tre equivalenti di tricloruro di alluminio, in acetonitrile, fornisce una miscela di **24** (70%) e **25** (27%); se, dopo 7 ore, la miscela di reazione è trattata con un altro equivalente di tricloruro di alluminio oppure portata alla temperatura di riflusso del solvente, si osserva la formazione esclusiva del D-omosteroide **24**. In nessun caso è stata osservata la formazione del D-omosteroide **26** (Schema 2).



Schema 2. Trattamento del 16 α ,17 α -epossi-3 β -idrossi-5-pregnen-20-one (**23**) con AlCl_3

Da un punto di vista meccanicistico, l'apertura dell'anello ossiranicico in **23** e il riarrangiamento a D-omosteroide rappresentano, con molta probabilità, due vie distinte successive (Figura 15). A bassa temperatura ed in presenza di tre equivalenti di AlCl_3 , in un solvente polare come l'acetonitrile, la reazione segue la via **a** passando attraverso l'intermedio **A**. D'altro canto, se i reagenti sono aggiunti a temperatura ambiente e la temperatura viene poi aumentata e mantenuta costante a 40°C, si ottiene, oltre al D-omosteroide **24** (70%), anche la cloridrina **25** (27%); la percentuale di **25** arriva fino al 35%, utilizzando due equivalenti di AlCl_3 . In quest'ultimo caso, probabilmente attraverso l'intermedio **B**, si forma la cloridrina **25** o, per ulteriore aggiunta di AlCl_3 , il D-omo derivato **24** passando attraverso l'intermedio **A**; in condizioni di riflusso, l'intermedio **B** porta direttamente alla formazione di **24** attraverso l'intermedio **C** (Figura 15).

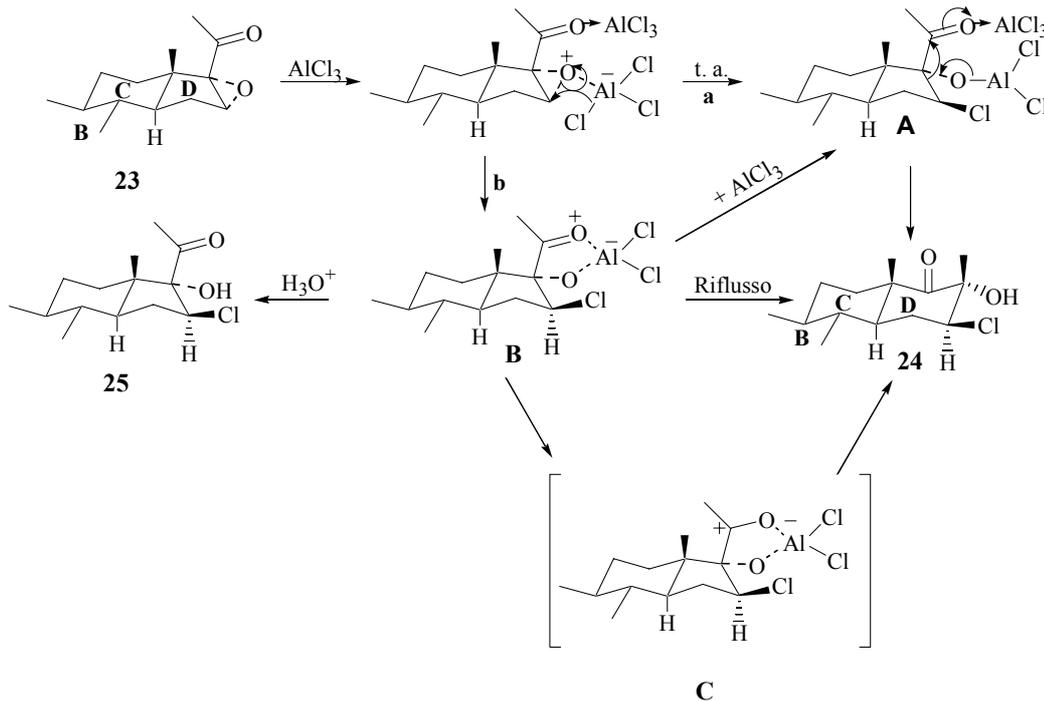
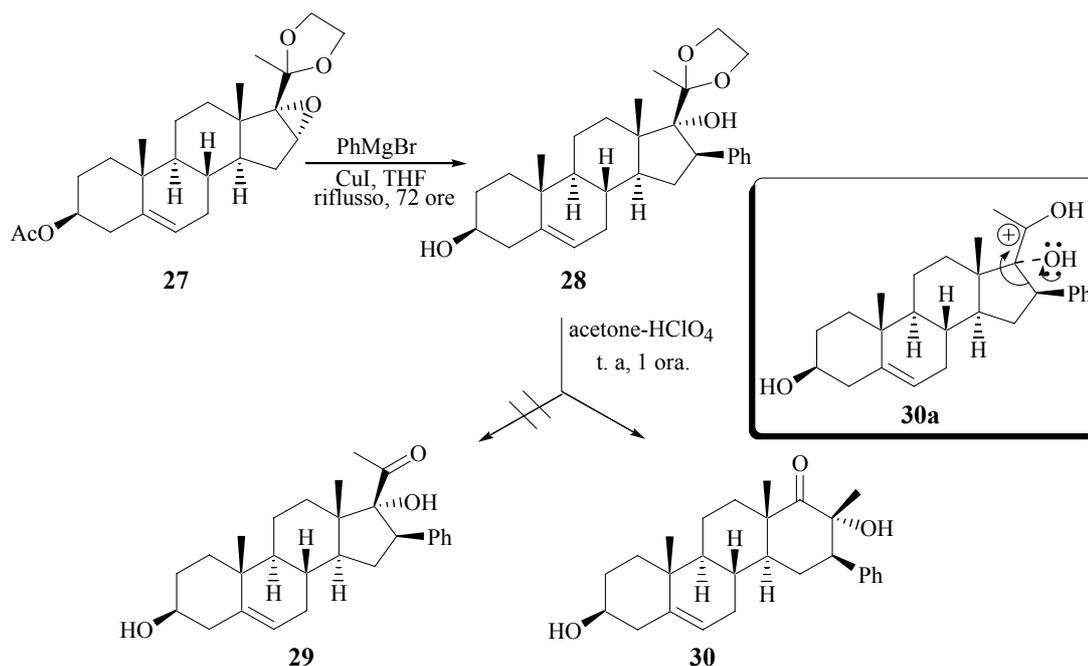


Figura 15. Meccanismo di formazione di **24** e **25**

L'apertura dell'anello ossiranico del derivato pregnenico protetto **27** con fenilmagnesio bromuro porta alla formazione del derivato **28**⁵⁰ che viene, successivamente, convertito nel corrispondente D-omosteroide **30**, mediante trattamento con acido perclorico (Schema 3).⁵¹

Il passaggio più interessante di questo processo sintetico è rappresentato dall'idrolisi del chetale **28**: questa reazione, infatti, non porta alla formazione dell'atteso intermedio **29**, ma del corrispondente D-omosteroide **30**. L'espansione dell'anello D⁵² potrebbe essere spiegata considerando la protonazione, da parte dell'acido perclorico, del gruppo carbonilico in C-20 del composto **29**, con formazione del carbocatione **30a**. Il successivo riarrangiamento di tipo Wagner-Meerwein, con migrazione regioselettiva del legame C-16–C-17 ed incorporazione del C-20 nell'anello D, porta alla formazione del D-omosteroide **30** (Schema 3).



Schema 3. Sintesi del D-omosteroide 30

Il D-omosteroide **30** rappresenta il precursore di una nuova classe di derivati pregnanici con potenziale attività antiandrogena;^{50,51} questi D-omosteroidi sono capaci, infatti, di inibire l'enzima 5α -reduttasi responsabile della conversione del testosterone nel più potente androgeno diidrotestosterone.⁵³⁻⁵⁵

In virtù della loro capacità di inibire l'enzima 5α -reduttasi, questi nuovi derivati pregnanici potrebbero trovare applicazione nel trattamento di disturbi legati ad una più alta attività androgena quali l'iperplasia prostatica benigna,⁵⁶ il cancro alla prostata⁵⁷ e i disordini della pelle come l'acne, la seborrea, l'irsutismo e l'alopecia androgenica.⁵⁸

L'ossidazione del (20*R*)-20-iodo-4-pregnen-3-one⁵⁹ (**31**) con acido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA) porta alla formazione del corrispondente iodossil derivato, che, comportandosi da carbocatione "mascherato", può subire un riarrangiamento di tipo Wagner-Meerwein; la migrazione regioselectiva del legame C-16-C-17 e l'incorporazione del C-20 nell'anello D portano alla formazione del D-omoandrostando **32** (Schema 4, Tabella 1).⁶⁰

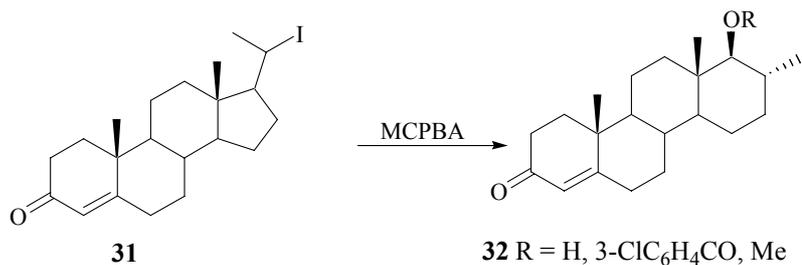

 Schema 4. Conversione del (20*R*)-20-iodo-4-pregnen-3-one (**31**) nel D-omoandrostando **32**

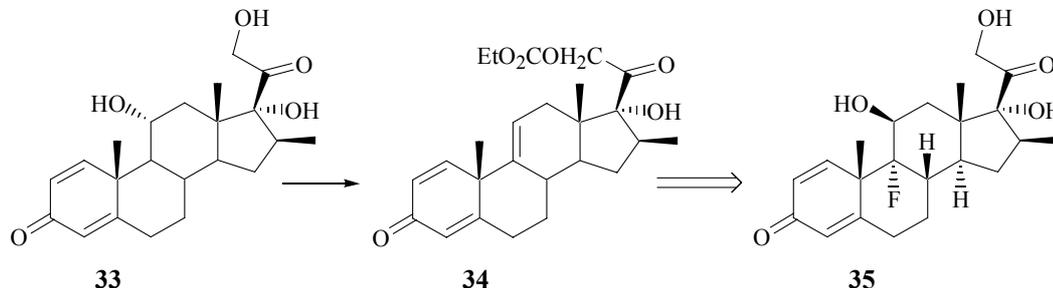
Tabella 1. Reazione del (20*R*)-20-iodo-4-pregnen-3-one (**31**) con MCPBA

MCPBA (equiv.)	Solvente	Prodotto (resa, %)
2.8	Cl ₂ CH ₂ saturato con H ₂ O	32 R = H (50); 32 R = 3-ClC ₆ H ₄ CO (45)
5	Bu' ^t OH–THF–H ₂ O (3 : 2 : 1)	32 R = H (75); 32 R = 3-ClC ₆ H ₄ CO (8)
5	THF–H ₂ O (3 : 1)	32 R = H (81)
8 ^a	MeOH anidro	32 R = Me (80)

^aMCPBA anidro

Due nuovi C-nor-D-omocorticosteroidi **37** e **38** (**Schema 6**) sono stati recentemente isolati, come impurezze, durante il processo di produzione del betametasono, potente agente antinfiammatorio ampiamente impiegato nella terapia dermatologica.⁶¹⁻⁶³

La sintesi del betametasono⁶⁴ (**35**) prevede un importante processo di fermentazione che è responsabile dell'introduzione, nel nucleo corticosteroidico, di una funzione ossidrilica, in posizione 11 α ; la trasformazione dell'intermedio **33** nel triene **34**, in cui il gruppo ossidrilico è stato convertito nel doppio legame $\Delta^{9,11}$, è necessaria per la successiva funzionalizzazione del C-9 e del C-11 (**Schema 5**).

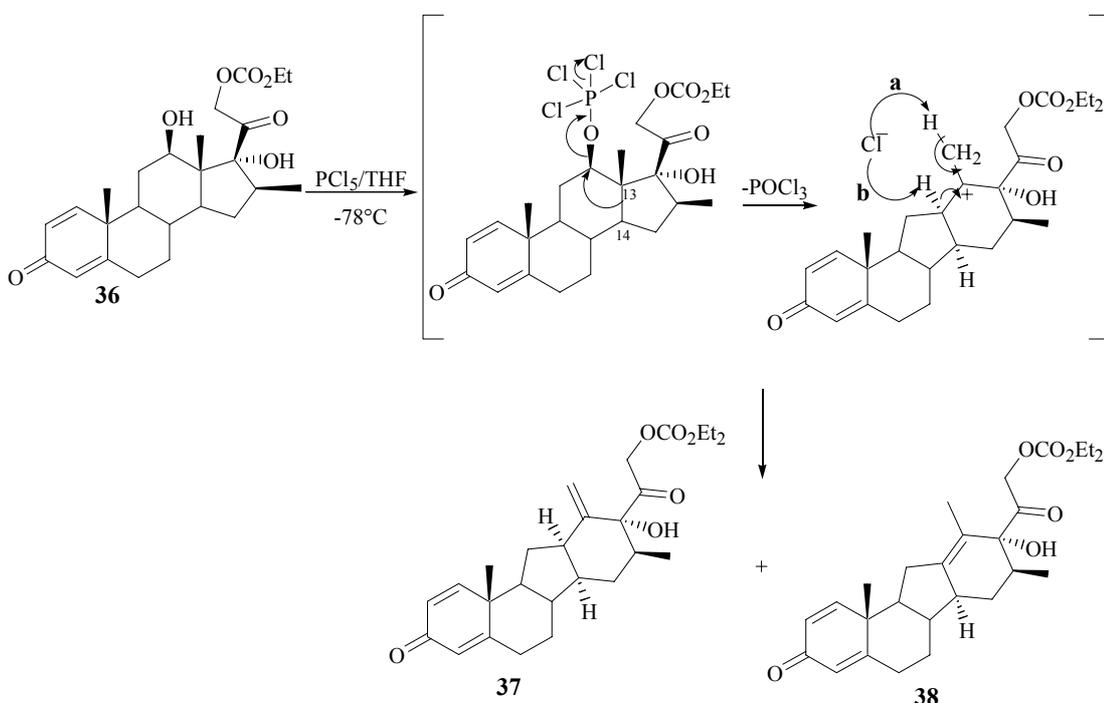

Schema 5. Alcuni passaggi del processo di produzione del betametasono (**35**)

La formazione dei C-nor-D-omocorticosteroidi **37** e **38**, isolati dal filtrato dell'intermedio **34**, può essere attribuita ad un processo di contrazione/espansione degli anelli C e D del corticosteroide **36**, indotto dal pentacloruro di fosforo (**Schema 6**). Il derivato **36**, contenente un gruppo ossidrilico in posizione 12 β , si ottiene come sottoprodotto durante il processo di ossidazione microbiologica necessario per la produzione di **33**.

È stato ipotizzato che il meccanismo di formazione di ciascuno di questi due steroidi sia, con molta probabilità, un riarrangiamento di Wagner-Meerwein del corrispondente 12 β -idrossi steroide **36**. L'origine dei C-nor-D-omocorticosteroidi **37** e **38**

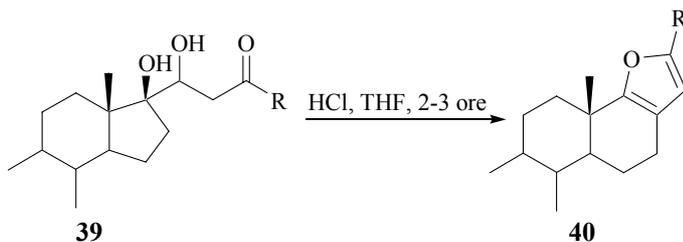
è stata, infatti, confermata mediante trattamento del 12 β -idrossicorticosteroide **36** con PCl₅ (Schema 6).

Il pentacloruro di fosforo è un efficiente agente disidratante usualmente impiegato nella conversione degli 11 α - e 11 β -idrossi steroidi nei corrispondenti derivati recanti un doppio legame in posizione $\Delta^{9,11}$.⁶⁵ Ciò nonostante, non è stata osservata alcuna formazione del $\Delta^{11,12}$ triene nella reazione di **36** con PCl₅. Il pentacloruro di fosforo reagisce con il gruppo ossidrilico in posizione 12 β formando il 12 β -clorofosfato; l'abilità di quest'ultimo a fungere da gruppo uscente è incrementata dalla migrazione del legame C-13–C-14 che porta alla formazione di un carbocatione intermedio più stabile dal quale si originano i C-nor-D-omocorticosteroidi **37** (via a) e **38** (via b) (Schema 6).⁶⁶



Schema 6. Meccanismo di formazione dei C-nor-D-omocorticosteroidi **37** e **38**

Il trattamento con acido cloridrico in tetraidroforano (THF) per 2-3 ore, di dioli steroidei del tipo **39** porta alla formazione dei corrispondenti prodotti riarrangiati **40** (Schema 7).⁶⁷

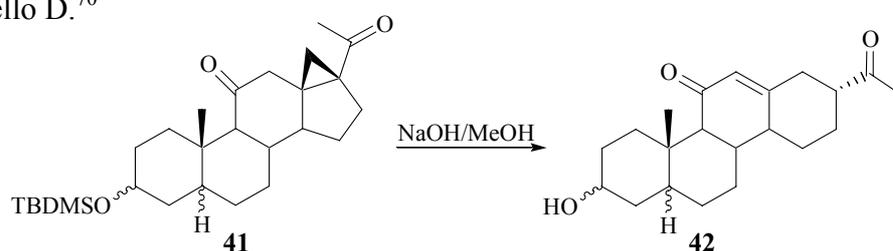


Schema 7. Riarrangiamento di dioli steroidei in ambiente acido

1.2.1.2. RIARRANGIAMENTI ANIONICI/RADICALICI

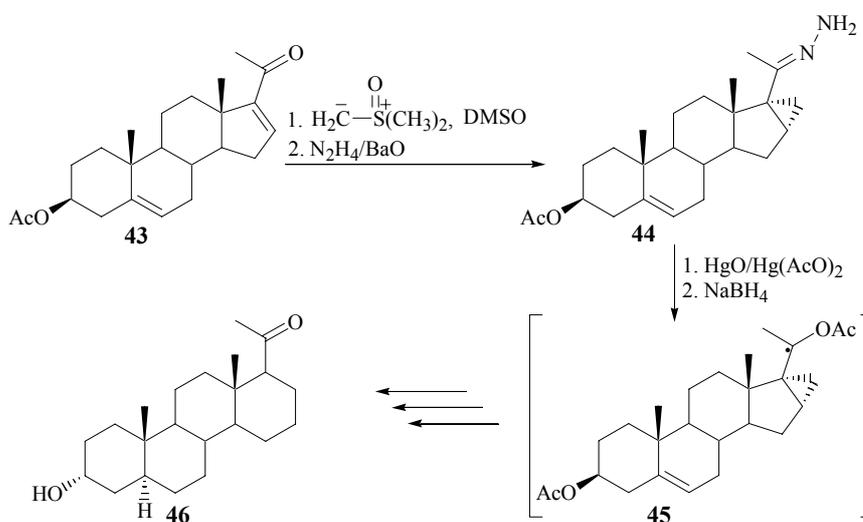
Recentemente sono state sviluppate numerose procedure per la preparazione di D-omosteroidi che prevedono l'espansione dell'anello D mediante riarrangiamenti anionici⁶⁸ o radicalici⁶⁹ dei corrispondenti ciclopropilchetoni steroidei.

In particolare, il trattamento con idrossido di sodio in metanolo degli 11,20-dichetosteroidi **41** porta alla formazione dei corrispondenti D-omosteroidi **42** (**Schema 8**). In condizioni alcaline, l'enolizzazione del carbonile in C-11 è seguita dalla rottura del legame C-12–C-13 con conseguente inserimento di un atomo di carbonio aggiuntivo nell'anello D.⁷⁰



Schema 8. Riarrangiamento anionico di ciclopropildichetoni

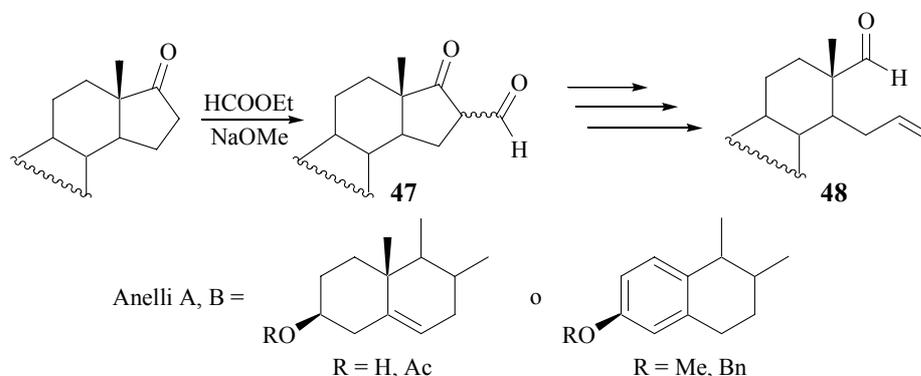
Il ciclopropilchetone ottenuto per trattamento del 16-deidropregnenolone **43** con dimetilsolfosonio metil ilide,^{71,72} è convertito nel corrispondente idrazone **44** (N_2H_4/BaO);⁷³ la reazione di **44** con $HgO/Hg(AcO)_2$, seguita dal trattamento con $NaBH_4$ produce il radicale **45** che riarrangia con rottura del legame C-16–C-17 per dare il corrispondente D-omosteroide (**Schema 9**). La successiva idrolisi dell'acetato, seguita dalla riduzione del doppio legame C-5–C-6 ($H_2/Pd-C$) e dall'inversione della configurazione al C-3, porta alla formazione D-omo analogo **46** (**Schema 9**).^{70, 74}



Schema 9. Riarrangiamento radicalico di **44**

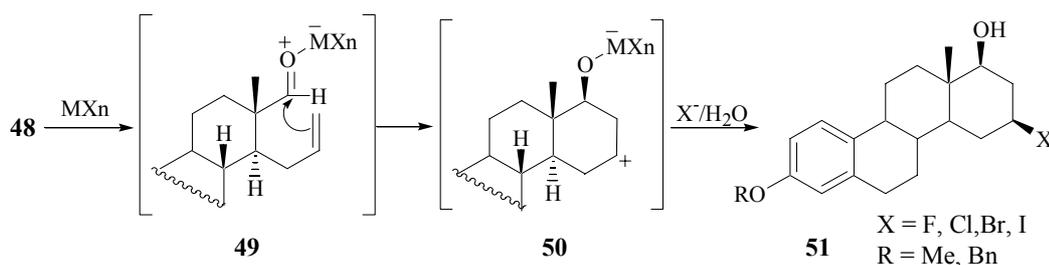
1.2.2. STRATEGIE DI FRAMMENTAZIONE-CICLIZZAZIONE

L'introduzione di un atomo di carbonio addizionale nelle molecole di steroidi naturali per l'ottenimento di D-omoandrosteni o D-omoestrani, è stata realizzata mediante una strategia di frammentazione-ciclizzazione che prevede la preliminare formilazione dell'atomo di carbonio in posizione 16 di 17-chetosteroidi;⁷⁵ il 16-formil-17-chetosteroide **47** può essere successivamente convertito nel corrispondente D-secosteroide **48** mediante una sequenza di reazioni che prevede una frammentazione di Grob come passaggio principale (**Schema 10**).^{76, 77} La presenza di un gruppo formilico e di un gruppo allilico in questi prodotti di frammentazione, permette un'ampia possibilità di ulteriori trasformazioni.



Schema 10. Strategia di frammentazione-ciclizzazione per l'ottenimento di D-omoandrosteni o D-omoestrani

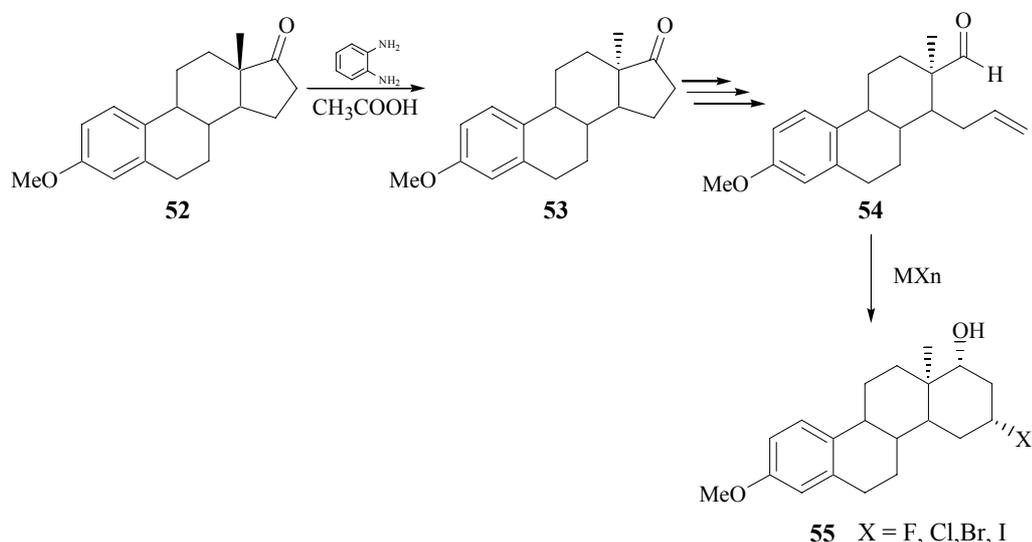
I 3-metil⁷⁷ e i 3-benzil⁷⁸ eteri del D-secoestrone **48** sono stati convertiti nei corrispondenti D-omosteroidi **51**, sostituiti in posizione 16 con un alogeno, mediante una reazione di ciclizzazione indotta da acidi di Lewis (MX_n).⁷⁹ Atomi di F, Cl, Br o I possono essere introdotti in posizione 16β mediante l'utilizzo di $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, SnCl_4 , ZnBr_2 o $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2/\text{NaI}$, rispettivamente (**Schema 11**). La reazione procede in maniera altamente stereoselettiva portando alla formazione di solo due dei quattro possibili isomeri: il 16β -alo- $17\alpha\beta$ -idrossi-D-omosteroidi **51**, come prodotto principale e l'isomero 16β -alo- $17\alpha\alpha$ -idrossi, come prodotto secondario.



Schema 11. Meccanismo di formazione del 16β -alo- $17\alpha\beta$ -idrossi-D-omosteroidi **51**

La selettiva formazione del prodotto *cis* **51** può essere spiegata esaminando il meccanismo della reazione: l'addizione dell'alchene al sale di osonio **49** avviene in *anti* rispetto al gruppo metilico legato al C-13, mentre il successivo attacco dell'alogenuro al carbocatione intermedio **50** avviene in *sin* rispetto allo stesso gruppo. L'ingresso del nucleofilo dalla direzione β non è sorprendente poiché, probabilmente, l'alogeno preferisce un'orientazione equatoriale.

Una simile sequenza di reazioni è stata utilizzata per la sintesi di 16 α -alo-17 α -idrossi-13 α -D-omoestroni **55** a partire dal 13 β -estrone **52** previa conversione nel corrispondente 13 α -epimero **53** (Schema 12).⁸⁰

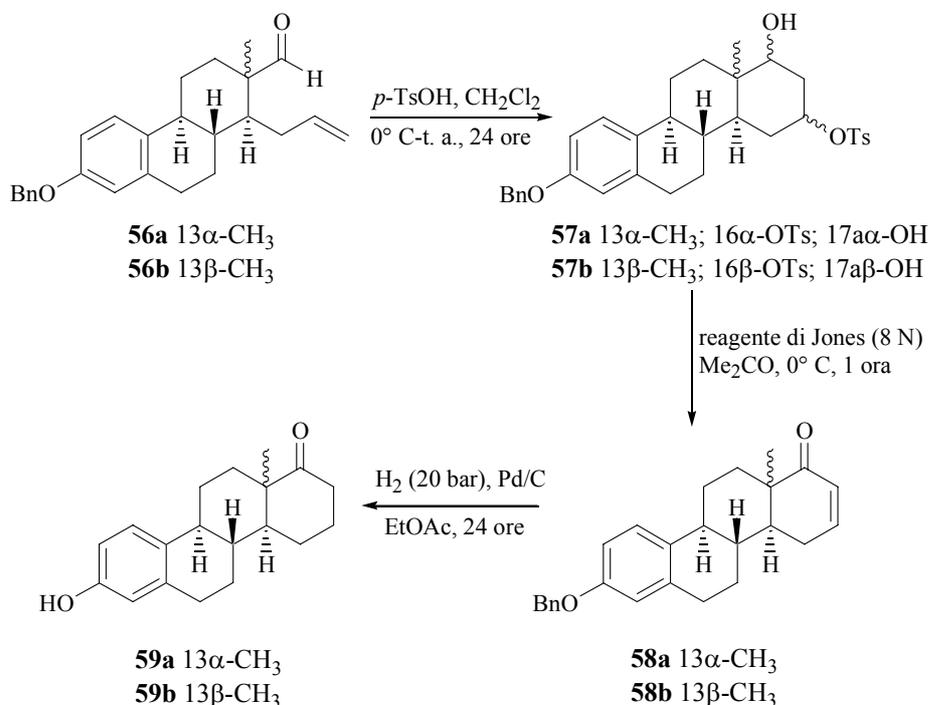


Schema 12. Sintesi del 16 α -alo-17 α -idrossi-13 α -D-omoestrone **55**

Gli steroidi appartenenti alla serie 13 α sono derivati sintetici di steroidi naturali caratterizzati dalla presenza di un metile 13 α in posizione quasi-equatoriale e da una giunzione *cis* degli anelli C e D. 17-Cheto-13 α -5-androsteni⁸¹ ed -estrani⁸² sono stati sintetizzati mediante semplici reazioni di epimerizzazione del C-13.

Il trattamento dell'aldeide **56a** o **56b** con 1.1 equivalenti di acido *p*-toluensolfonico in diclorometano, porta alla formazione dei corrispondenti D-omosteroidi **57a** o **57b**, rispettivamente, con i gruppi funzionali legati al C-16 e al C-17a in posizione reciproca *cis* (Schema 13). L'ossidazione dei tosilati **57a** e **57b** con il reagente di Jones (8 N), in acetone, produce i corrispondenti chetoni α,β -insaturi **58a** e **58b** mediante simultanea ossidazione e β -eliminazione. La successiva idrogenazione di **58a** e **58b**, in presenza di una quantità catalitica di Pd/C in EtOAc, determina la simultanea riduzione

del doppio legame C-16–C-17 e l'idrogenolisi del gruppo benzilossi legato al C-3, con conseguente formazione dei corrispondenti 3-idrossi-D-omoestroni **59a** e **59b** (Schema 13).⁸³ I derivati **59a**, appartenenti alla serie 13 α , mostrano un'elevata selettività di legame per i recettori degli estrogeni.¹¹

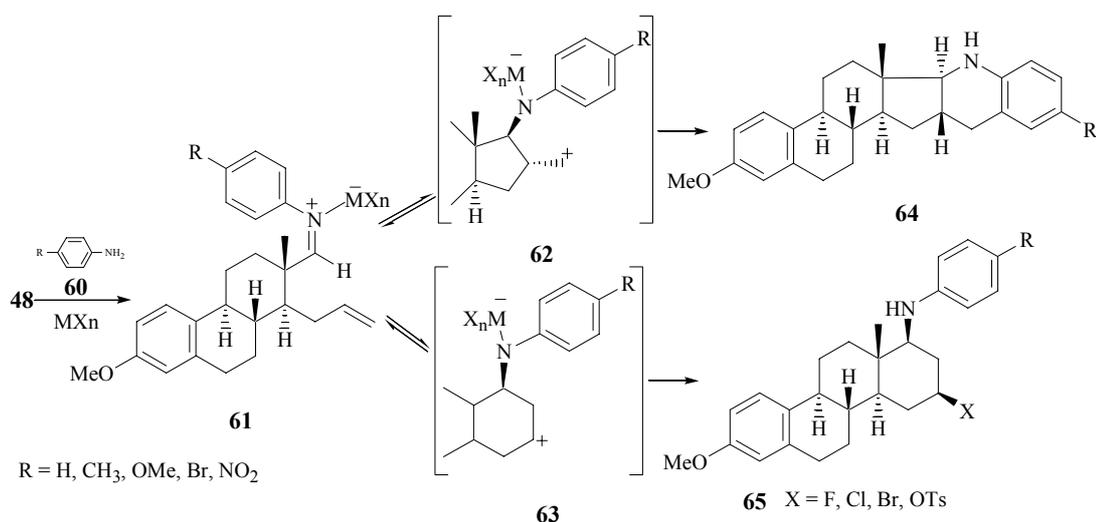


Schema 13. Sintesi dei 3-idrossi-D-omoestroni **59a** e **59b**

La reazione della secoaldeide **48** con aniline variamente sostituite **60**, ed il successivo trattamento con un acido di Lewis, porta alla formazione dei corrispondenti sali di ariliminio **61** (Schema 14);⁸⁴ la chemoselettività della successiva reazione di ciclizzazione intramolecolare, catalizzata dall'acido di Lewis, dipende fortemente dalla natura dell'anilina **60**. La presenza di sostituenti elettron-attrattori, come il nitro gruppo, favorisce la stereoselettiva formazione dell'*N*-arilammino-D-omosteroidi **65**, mentre sostituenti elettron-donatori portano alla formazione dei derivati tetraidrochinolinici **64** con elevata stereoselettività (Schema 14).⁸⁵⁻⁸⁷

I carbocationi primari **62**, che si originano dai sali di imminio **61** derivanti dalla condensazione di **48** con aniline contenenti sostituenti elettron-donatori, forniscono gli azasteroidi **64** attraverso una sostituzione elettrofila aromatica (Schema 14). I carbocationi primari **62** sono in equilibrio, presumibilmente attraverso **61**, con i carbocationi secondari **63** che vengono, successivamente, stabilizzati dall'addizione di un nucleofilo (X⁻), con formazione del D-omosteroidi **65**. Questa trasformazione prevale in

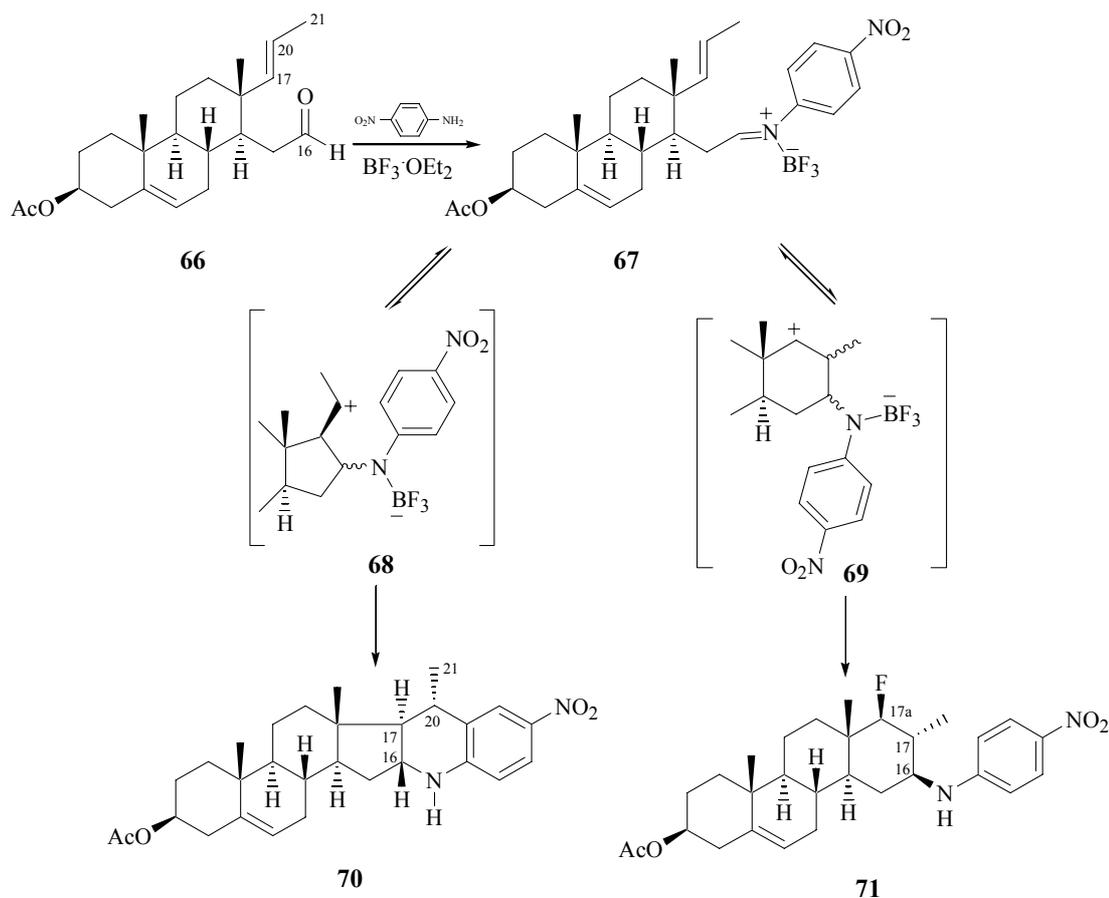
presenza di sostituenti elettron-attrattori sull'anello aromatico che sfavoriscono la reazione di Friedel-Crafts, permettendo, quindi, il percorso alternativo di ciclizzazione che fornisce i derivati **65**. La ciclizzazione del sale di imminio, ottenuto dalla condensazione di **48** con l'anilina dà una miscela 1:1 dell'azasteroide **64** e del D-omosteroide **65**. Una tendenza simile è stata osservata anche nella serie 13 α .⁸⁸



Schema 14. Reazione della secoaldeide **48** con aniline sostituite **60** e successiva ciclizzazione intramolecolare dei sali di imminio **61**

La ciclizzazione del sale di imminio **67**, derivante dalla D-seco-pregnen aldeide⁸⁹ **66**, porta alla formazione del corrispondente 16 β -arilamino-17 α -metil-17 β -fluoro-D-omosteroide **71** solo come prodotto secondario (**70:71** = 5,9:1) (**Schema 15**).⁹⁰ La ciclizzazione dei sali di imminio, ottenuti dalla condensazione di **66** con altre aniline (*p*-metossianilina, *p*-bromoanilina ed anilina), produce, esclusivamente, una miscela di due derivati tetraidrochinolinici diastereoisomerici: il prodotto principale, avente una giunzione *trans* (16 α , 17 β) tra gli anelli D ed E, e l'isomero *cis* (16 β , 17 β).

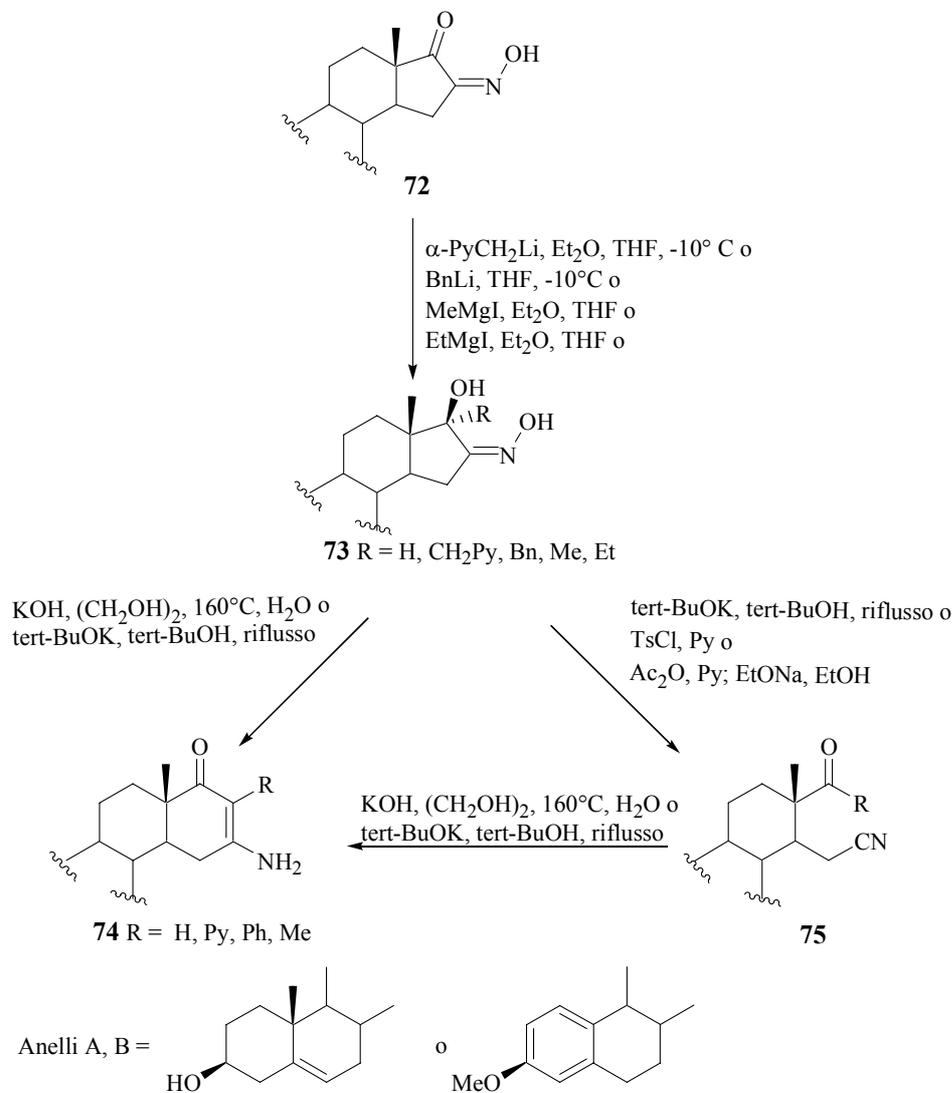
La differenza riscontrata nei prodotti ottenuti dalle reazioni di ciclizzazione dei sali di imminio **61** ($R = \text{NO}_2$) e **67** può essere spiegata confrontando le strutture dei carbocationi intermedi **62** (carbocatione primario) (**Schema 14**) e **68** (carbocatione secondario) (**Schema 15**). L'effetto stabilizzante in **68** promuove la reazione di Friedel-Crafts che porta alla formazione prevalente del derivato tetraidrochinolinico **70** (**Schema 15**).



Nuovi D-omosteroidi biologicamente attivi (**74**), appartenenti alla serie degli estrani e degli androstani, sono stati sintetizzati mediante una reazione di frammentazione-ciclizzazione a partire dai corrispondenti 17β -idrossi- 17α -sostituiti 16-ossimmino steroidi⁹¹ **73** o mediante una reazione di ciclizzazione dei corrispondenti D-seco derivati **75**.⁹²

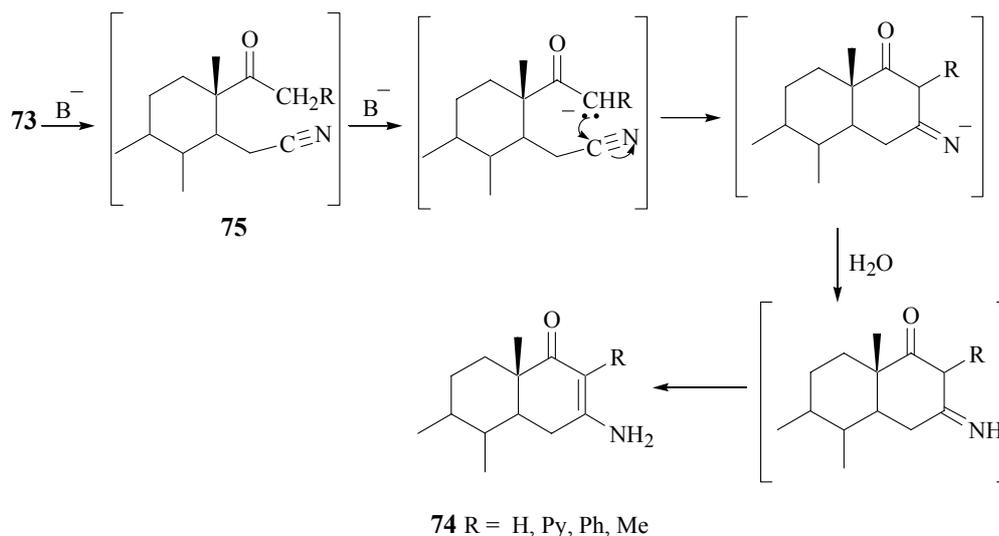
Il primo passaggio nella sintesi dei D-omosteroidi **74**, a partire dai corrispondenti ossimmino chetoni **72**, consiste in un'addizione stereospecifica di picolillitio, benzillitio, ioduro di metilmagnesio o ioduro di etilmagnesio, al gruppo carbonilico in C-17, con ottenimento dei corrispondenti 17β -idrossi-16-ossimmino steroidi **73** variamente sostituiti in posizione 17α ,^{93,94} il passaggio successivo, che porta alla formazione dei D-omosteroidi **74**, consiste in una reazione di frammentazione-ciclizzazione degli ossimmino alcoli **73**, mediante trattamento con idrossido di potassio in glicole etilenico a refluxo. Il trattamento con *t*-butossido di potassio in *t*-butanolo, a refluxo, dei 17α -metil o 17α -etil ossimmino alcoli **73** porta alla formazione dei corrispondenti D-omo derivati, con rese elevate (**Schema 16**).

Anche il trattamento dei D-seco derivati⁹³⁻⁹⁵ **72** con idrossido di potassio in glicole etilenico a refluxo, o con *t*-butossido di potassio in *t*-butanolo, a refluxo (nel caso dei seco-ciano metil o etil chetoni), porta alla formazione dei D-omosteroidi **74** (Schema 16).



Schema 16 Sintesi dei 16-ammino-17-sostituiti D-omosteroidi **74**

L'ottenimento dei D-omosteroidi **74**, mediante una reazione di ciclizzazione dei corrispondenti D-seco derivati **75**, conferma la formazione di un seco-ciano chetone **75** come intermedio nel meccanismo proposto per la reazione di frammentazione-ciclizzazione dei 17 β -idrossi-17 α -sostituiti 16-ossimmino steroidi **73** (Schema 17).

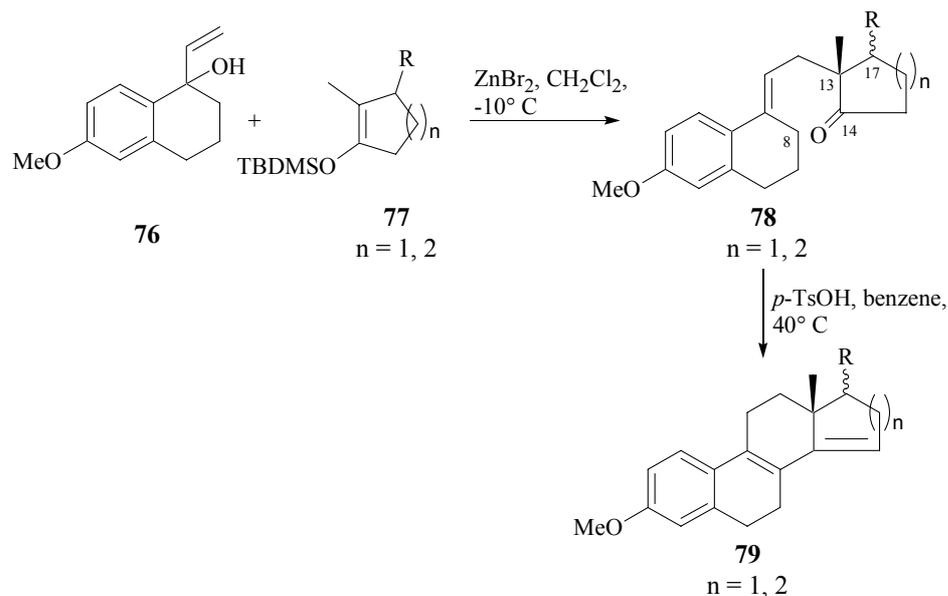


Schema 17. Meccanismo proposto per la reazione di frammentazione-cicizzazione dei 17 β -idrossi-17 α -sostituiti 16-ossimmino steroidi **73**

1.2.3. SINTESI TOTALE DI D-OMOSTEROIDI

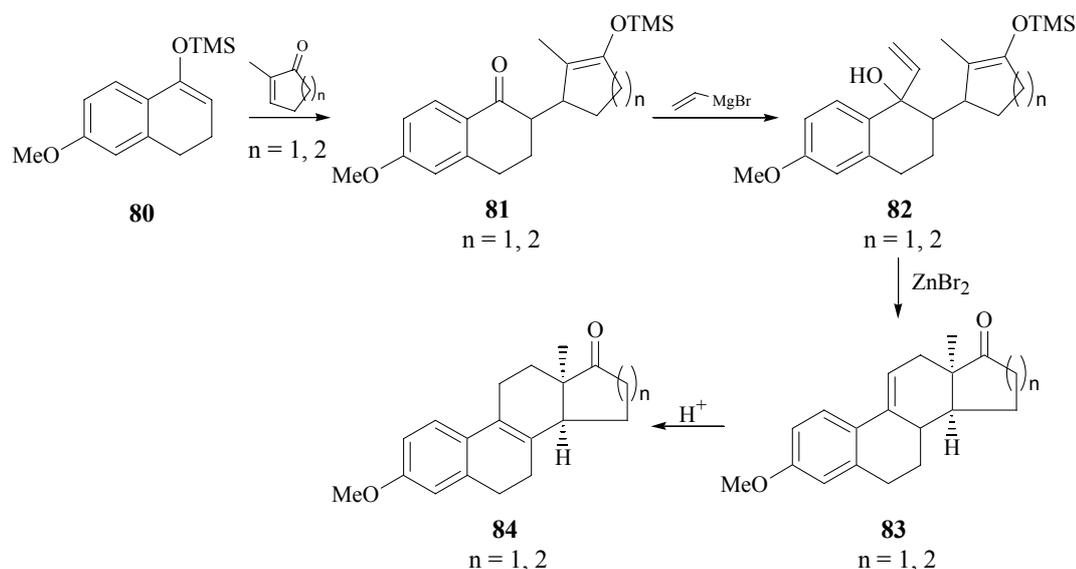
Il metodo di Torgov rappresenta una classica procedura per la sintesi totale di steroidi, che ha reso possibile la produzione degli estroni su scala industriale.⁹⁶ Questa sequenza di reazioni è stata anche applicata, con successo, alla sintesi D-omoestroni.⁹⁷

Recentemente è stata riportata una procedura per la sintesi di steroidi e D-omosteroidi sostituiti in posizione 17, basata sul metodo di Torgov. Questa strategia sintetica prevede, inizialmente, una reazione, catalizzata da acidi di Lewis,⁹⁸ tra il reagente di Torgov **76** ed un precursore dell'anello D **77**, contenente un silil enol etere; questo primo passaggio, che porta alla formazione dei seco steroidi **78**, permette la formazione del legame C-12–C-13. La successiva formazione, catalizzata da acidi, del legame C-8–C-14 determina la chiusura dell'anello C e l'ottenimento dei corrispondenti steroidi e D-omosteroidi **79** (**Schema 18**).^{99,100} La selettiva riduzione catalitica del doppio legame C-14–C-15 di **79** porta alla formazione dei corrispondenti steroidi e D-omosteroidi aventi una giunzione *trans* tra gli anelli C e D.



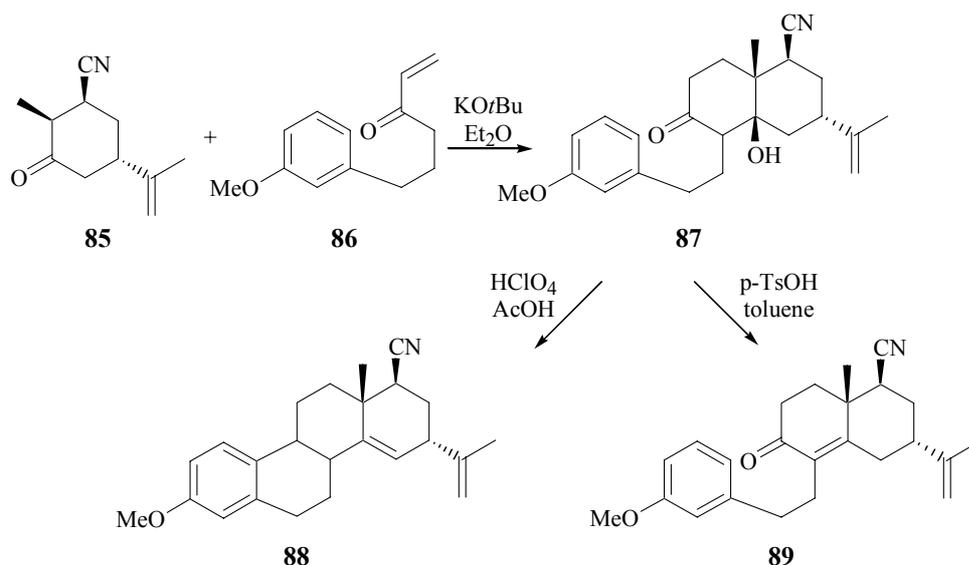
Schema 18. Sintesi totale di steroidi e D-omosteroidi sostituiti in posizione 17

La sintesi di steroidi e D-omosteroidi, aventi una giunzione *cis* tra gli anelli C e D, prevede l'iniziale formazione del legame C-8–C-14 mediante una reazione di Mukaiyama, con trasferimento del gruppo silile dal silil enol etere di partenza **80** all'enolo dell'addotto. La successiva addizione di vinilmagnesio bromuro al gruppo carbonilico non protetto di **81**, seguita da una reazione di ciclizzazione dell'addotto **82**, in presenza di ZnBr_2 , porta alla formazione dei corrispondenti steroidi e D-omosteroidi **83** (**Schema 19**).^{100,101} Sempre sulla base della chimica di Mukaiyama, è stata sviluppata un'ulteriore efficiente procedura per la sintesi di steroidi e D-omosteroidi, aventi una giunzione *trans* tra gli anelli C e D.¹⁰²



Schema 19. Sintesi di steroidi e D-omosteroidi, aventi una giunzione *cis* tra gli anelli C e D

L'anellazione del β -cianochetone ciclico **85** con il 6-(3-metossifenil)-1-esen-3-one **86**¹⁰³ porta alla formazione, con buone rese, del chetolo **87** che viene successivamente ciclizzato per trattamento con HClO₄ in AcOH (Schema 20).¹⁰⁴ Il trattamento di **87** con *p*-TsOH in toluene, invece, non conduce al risultato atteso: l'enone **89** (21%) insieme al chetolo di partenza **87** (19%) sono ottenuti con una piccola quantità del prodotto **88** (Schema 20).¹⁰⁵



Schema 20. Anellazione del β -cianochetone ciclico **85** con l'enone **86** e successiva ciclizzazione del chetolo **87**

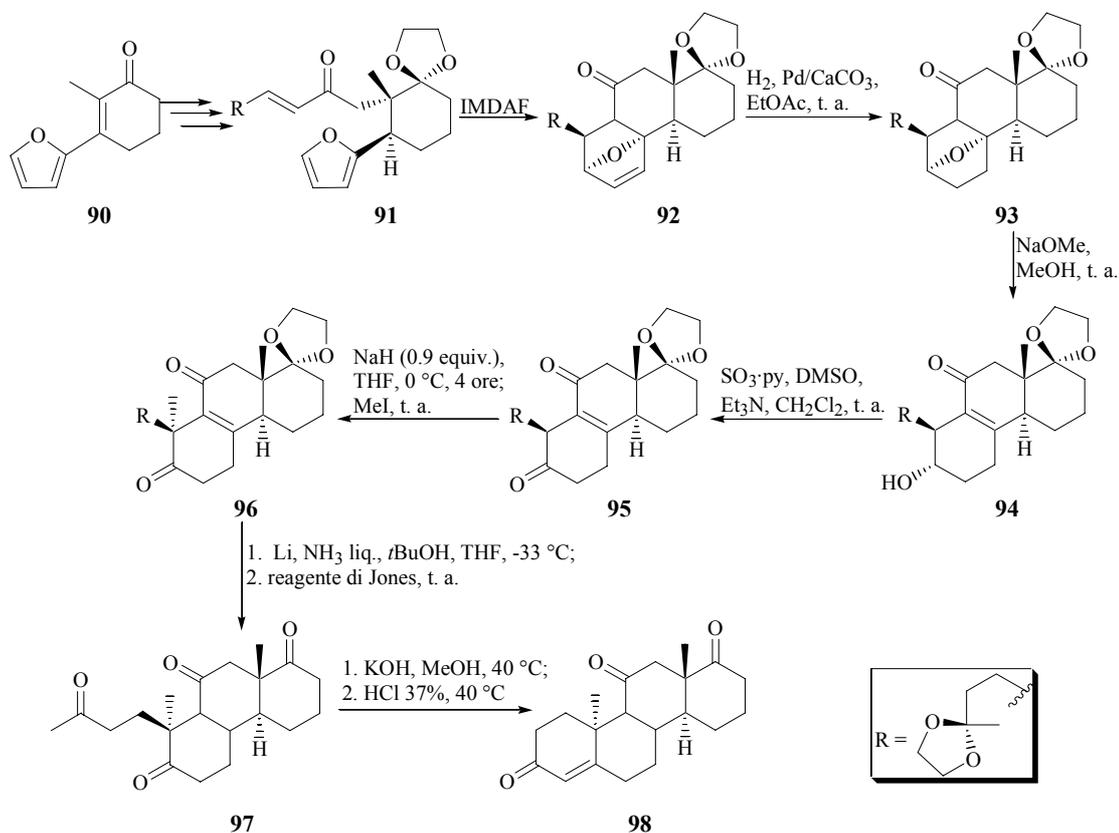
Recentemente è stata riportata una procedura per la sintesi totale di derivati del 10 α -D-omoadrenosterone¹⁰⁶ **98**, che prevede una reazione di cicloaddizione intramolecolare di Diels-Alder per la costruzione degli anelli B e C.^{107, 108} Si tratta di un processo IMDAF, in cui un anello furanico viene utilizzato come diene nella reazione di cicloaddizione di Diels-Alder.¹⁰⁹

L'approccio IMDAF è stato anche utilizzato con successo nella sintesi totale di vari prodotti naturali,^{110,111} tra cui il (\pm)-androsterone.^{107, 112}

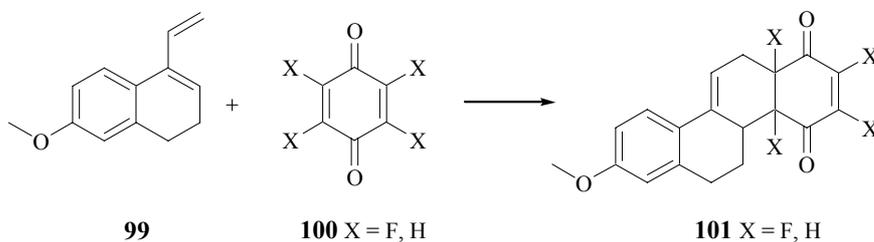
La cicloaddizione intramolecolare dell'(E)-enone **91**, in presenza di dimetilalluminio cloruro come catalizzatore e in condizioni di controllo cinetico (0,1 equiv., -25°C, 2 ore), porta alla formazione del prodotto *eso* **92**, con rese elevate (Schema 21).

L'apertura del ponte ossigeno nel derivato ridotto **93** e la successiva ossidazione dell'alcol risultante **94** forniscono l'intermedio **95**. Lo stadio successivo, che determina l'introduzione in posizione α del gruppo metilico al C-10, prevede la formazione dell'enolato termodinamico di **95** e la stereoselettiva introduzione dell'elettrofilo in posizione β .

La riduzione dell'enone **96**, direttamente seguita dall'ossidazione di Jones, fornisce il derivato **97** avente una fusione *trans* tra gli anelli B e C. Il D-omo derivato **98** viene, infine, ottenuto mediante la classica procedura che determina la formazione dell'anello A (Schema 21).

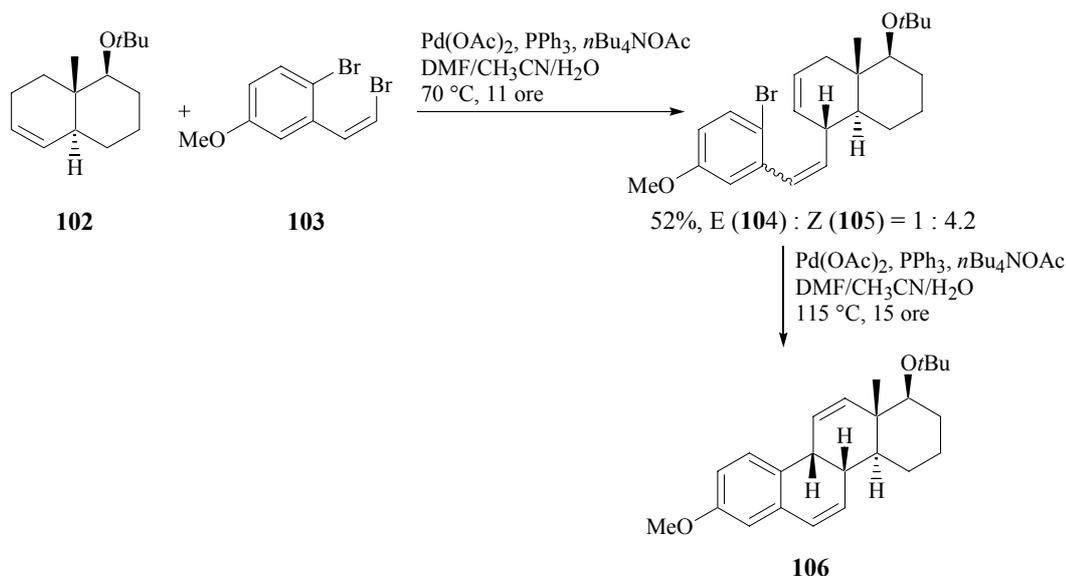


Una reazione di cicloaddizione di Diels-Alder del diene **99**^{113, 114} con *p*-benzoquinoni variamente sostituiti con atomi di fluoro (**100**) porta alla formazione dei corrispondenti D-omosteroidi **101** (Schema 22).¹¹⁵



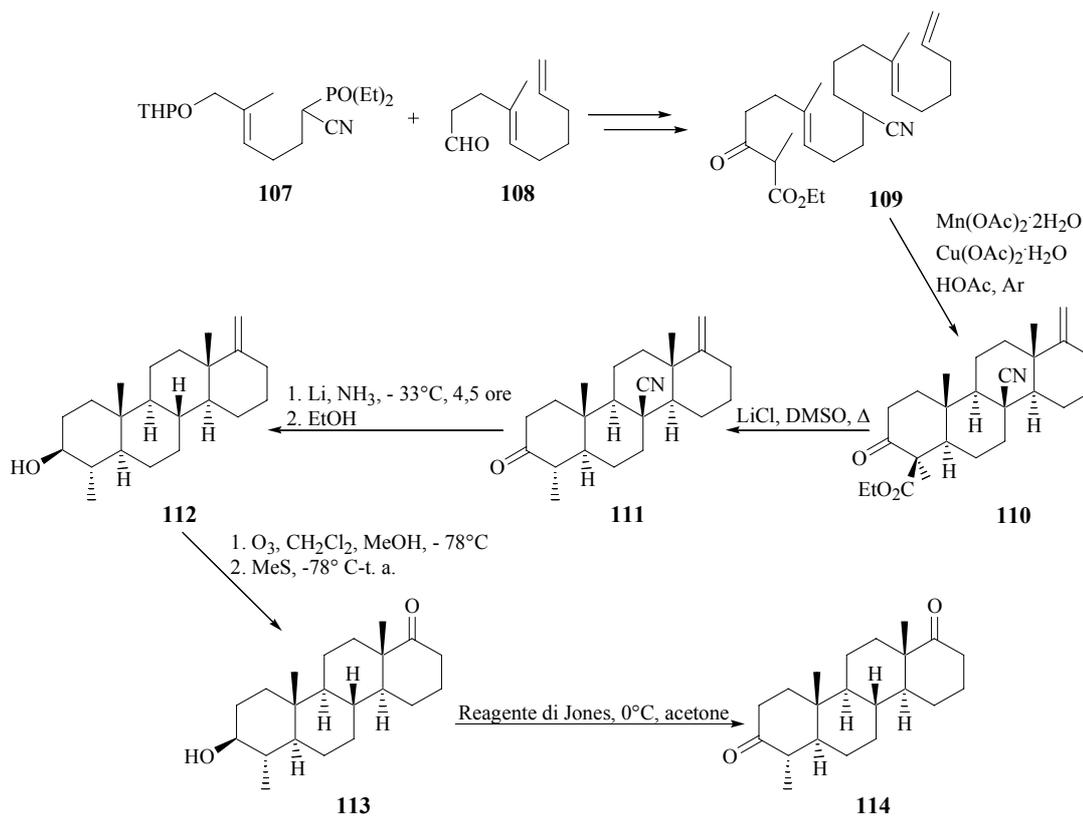
Recentemente è stata riportata la sintesi totale stereoselettiva di un nuovo tipo di steroide avente una giunzione *cis* non naturale tra gli anelli B e C (**106**, Schema 23). Questo derivato del D-omoestradiolo è stato ottenuto mediante una procedura che

prevede la formazione dell'anello B del nucleo steroideo, attraverso due successive reazioni di Heck.¹¹⁶⁻¹¹⁹ L'iniziale reazione di Heck intermolecolare tra il derivato dell'ottaidronaftalene^{120 - 126} **102** e il bromoarene^{127 - 130} **103**, contenente un gruppo (Z)-bromovinilico, porta alla formazione regio- e diastereoselettiva di **105** che viene convertito, mediante una successiva reazione intramolecolare di Heck, nel D-omoestradiolo **106** (Schema 23).¹³¹



Schema 23. Sintesi stereoselettiva del D-omosteroide **106**

Una sintesi totale del nucleo D-omosteroidico è stata realizzata con un approccio altamente stereoselettivo che prevede una ciclizzazione radicalica intramolecolare.¹³² Nel tetraciclo **110**, derivato dalla ciclizzazione radicalica del poliene **109**, il gruppo ciano legato al C-8 funge da gruppo funzionale latente per la successiva introduzione sul C-8 dell'atomo di idrogeno in posizione β , presente nel D-omoandrostano **114**. La rimozione del gruppo funzionale etossicarbonile sul C-4 fornisce il ciano chetone **111**; la reazione di questo ultimo con un eccesso di Li^{133} in NH_3 porta alla formazione dell'alcol **112**. L'ozonolisi di **112** e la successiva riduzione con Me_2S forniscono il corrispondente chetone **113**, che per trattamento con il reagente di Jones viene convertito nel 4-metil-D-omoandrostanolone **114** (Schema 24).



Schema 24. Sintesi del D-omosteroide 114

CAPITOLO 2

N-METIL- β^3 -AMMINOACIDI

Introduzione

Durante la scorsa decade, la sintesi stereoselettiva di β -amminoacidi ha ricevuto considerevole attenzione.¹³⁴⁻¹³⁷ I β -amminoacidi, sebbene meno abbondanti rispetto ai loro α -analoghi, sono ampiamente rappresentati in natura,¹³⁸⁻¹⁴⁰ specialmente in composti di origine marina, e sono comunemente prodotti da piante, animali, e microrganismi.

Oltre ad essere costituenti di numerosi prodotti naturali biologicamente attivi¹⁴¹⁻¹⁴⁴ quali peptidi, terpeni, alcaloidi, macrolidi ed antibiotici β -lattamici,^{145,146} alcuni β -amminoacidi, isolati in forma libera, presentano di per sé interessanti proprietà farmacologiche.^{147,148} In particolare, molti mostrano potente attività antibatterica. Sono conosciuti, inoltre, numerosi metaboliti contenenti residui β -amminoacidici otticamente attivi.¹⁴⁹

Il più semplice β -amminoacido è rappresentato dall'acido β -amminopropanoico (β -alanina), un amminoacido non proteinogenico, componente essenziale di molti composti biologicamente attivi, come la vitamina B₃ (acido pantotenico)¹⁵⁰ e l'L-Carnosina (**Figura 16**).

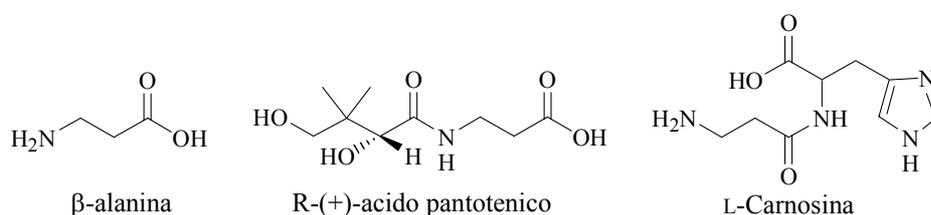


Figura 16. β -Alanina, acido pantotenico ed L-Carnosina

I β -amminoacidi possono essere considerati analoghi degli α -amminoacidi in cui il gruppo carbossilico e quello amminico sono separati da due atomi di carbonio. È possibile distinguere tre tipi generali di β -amminoacidi a catena aperta, a seconda che la sostituzione abbia luogo sul carbonio legato al gruppo carbossilico (*posizione α*) o sul

carbonio legato al gruppo amminico (*posizione* β) o, ancora, su entrambe le posizioni (α, β -*disostituzione*).¹⁵¹ In aggiunta, i β -amminoacidi ciclici possono presentare il gruppo carbossilico e/o il gruppo amminico come sostituenti dell'anello carbociclico o possono incorporare il gruppo amminico in un anello eterociclico. Recentemente, Seebach e collaboratori^{152,153} hanno proposto i termini β^2 - e β^3 -, dove i numeri 2 e 3 indicano la posizione delle catene laterali sullo scheletro dell'acido 3-amminopropanoico, allo scopo di distinguere gli isomeri di posizione (**Figura 17**).

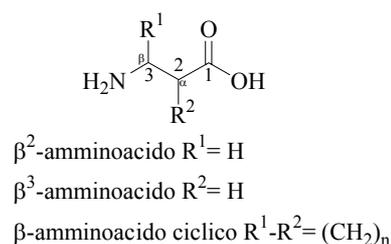


Figura 17. Generico β -amminoacido in cui sono indicati i possibili siti di sostituzione

L'inserimento di un atomo di carbonio addizionale nello scheletro amminoacidico è indicato nella nomenclatura con il prefisso omo. Quindi, con il termine di β -omoamminoacidi sono indicati analoghi degli α -amminoacidi in cui un gruppo CH_2 - è stato inserito tra il carbonio α e il gruppo carbossilico (β^3 -omoamminoacido) o tra il carbonio α e il gruppo amminico (β^2 -omoamminoacido) dell' α -amminoacido corrispondente (**Figura 18**).

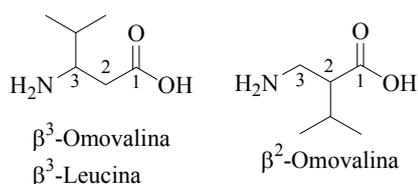


Figura 18. Esempio di nomenclatura per i β -amminoacidi

Un aspetto molto importante di questa classe di composti è rappresentato dal loro impiego nella sintesi di peptidi modificati e dal loro inserimento, dopo opportuna elaborazione, in sistemi peptidici isosterici.¹⁵⁴ I β -amminoacidi costituiscono, inoltre i precursori ideali degli antibiotici β -lattamici.¹⁵⁵

La sintesi di peptidi modificati contenenti β^3 -amminoacidi, come componenti strutturali chiave, ha attirato in maniera considerevole l'attenzione dei ricercatori:^{156,157} oligomeri composti esclusivamente da β -amminoacidi (β -peptidi) sono emersi recentemente come nuova classe di peptidomimetici.

Questi peptidi si sono rivelati interessanti per le loro caratteristiche strutturali¹⁵⁸ e per le importanti proprietà farmacologiche.¹⁵⁹ L'incorporazione di β^3 -amminoacidi in sequenze peptidiche consente, infatti, di ottenere ben definite strutture secondarie:^{160 - 165} oligomeri composti interamente di β -amminoacidi possono adottare strutture avvolte in soluzione ed hanno proprietà uniche rispetto ai corrispondenti α -peptidi.^{166 - 169} Si è scoperto che essi sono in grado di ripiegarsi e formare strutture secondarie ben ordinate come eliche¹⁷⁰ o configurazioni β ,¹⁷¹ o di organizzarsi in maniera tubolare a seconda del tipo di sostituenti della catena peptidica principale.

In aggiunta, è stato provato che i β^3 -amminoacidi sono un utile strumento nella sintesi di peptidi modificati con aumentata attività e stabilità in vivo.^{172 - 175} Peptidi contenenti β^3 -amminoacidi sono in grado di mimare gli α -peptidi nelle interazioni peptide-proteina e proteina-proteina e sono generalmente molto stabili all'idrolisi enzimatica^{176 - 178} a causa dell'incapacità da parte di proteasi e peptidasi di scindere i legami ammidici adiacenti ai β^3 -amminoacidi.^{179,180}

Inoltre, la *N*-metilazione di β^3 -amminoacidi ed il loro successivo inserimento in catene peptidiche, consentono l'ottenimento di analoghi sintetici che mostrano una maggiore attività biologica, biodisponibilità e durata d'azione. L'ingombro sterico generato dall'introduzione del gruppo metilico sull'atomo di azoto blocca i siti capaci di formare legami a idrogeno intramolecolari ed i cambiamenti conformazionali del peptide, conferendogli una minore flessibilità e modificandone, di conseguenza, l'intensità dell'attività biologica.¹⁸¹

Queste proprietà, insieme con l'aumentata idrofobicità, possono aumentare il potenziale terapeutico del peptide. La sostituzione di un atomo di idrogeno con un gruppo metilico sull'azoto negli *N*-metil- β^3 -amminoacidi, influisce notevolmente sulla conformazione del peptide di cui il residuo amminoacidico fa parte e, quindi, se si tratta di molecole d'interesse biologico, ciò influisce notevolmente sull'interazione di queste con lo specifico recettore. La rigidità conformazionale dei peptidi *N*-metilati^{182,183} può produrre composti con migliori caratteristiche di legame e nuova selettività per sottotipi recettoriali.^{184,185}

In particolare, l'introduzione nella sequenza peptidica di un *N*-metil- β -amminoacido si è rivelata una modifica particolarmente efficace¹⁸⁶ nella sintesi di analoghi della Dermorfina (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂),¹⁸⁷ un potente analgesico isolato dalla pelle di un anfibio del Sud America (*Phyllomedusa sauvagei*). La Dermorfina

mostra una potente affinità e un'elevata selettività nei confronti dei recettori μ-oppioidi e queste proprietà si sono dimostrate superiori a quelle della morfina stessa. La più piccola sequenza della Dermorfina dotata di attività analgesica è rappresentata dalla porzione tetrapeptidica *N*-terminale (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly).¹⁸⁸

Lo sviluppo di nuovi farmaci a struttura peptidica dotati di attività analgesica e privi degli effetti collaterali degli analgesici narcotici come la morfina, rappresenta da sempre un'interessante prospettiva, in particolare da quando sono state identificate ed isolate le encefaline ed altri peptidi oppioidi endogeni. Comunque, i numerosi tentativi di impiegare gli analgesici peptidici come agenti terapeutici, hanno avuto scarso successo a causa degli effetti collaterali, della bassa biodisponibilità e dell'alto costo legato alla loro produzione; inoltre, l'impiego di questi composti ha, in genere, una limitata efficacia *in vivo* attribuibile alla facile degradazione da parte di differenti proteasi: questo, naturalmente, si traduce in una minore durata dell'effetto analgesico rispetto a quello provocato dalla morfina.

Recentemente sono stati sintetizzati analoghi tetrapeptidici della Dermorfina (**Figura 19**) che hanno mostrato un'azione analgesica più potente e di più lunga durata rispetto a quella della morfina, in seguito a somministrazione orale.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ In questi derivati il residuo amminoacidico C-terminale in posizione 4 è sostituito dall'*N*-metil-β-alanina.

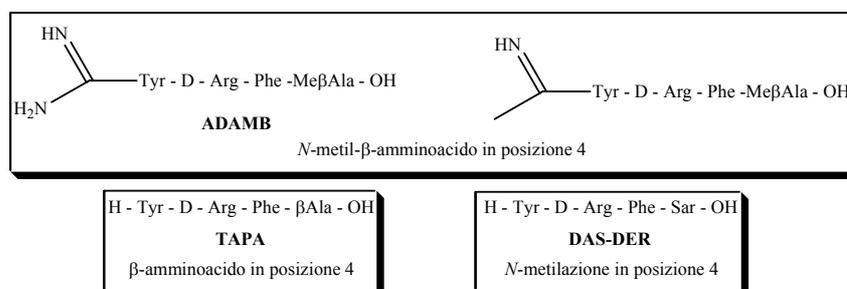


Figura 19. Analoghi tetrapeptidici della Dermorfina

L'introduzione di un *N*-metil-β-amminoacido in questi tetrapeptidi, determina una maggiore stabilità alla degradazione enzimatica¹⁹²⁻¹⁹⁴ ed un'incrementata attività analgesica che può essere attribuita a fattori conformazionali.^{189,191} La combinazione dell'*N*-metilazione e dell'omologazione del residuo amminoacidico in posizione 4, è, infatti, responsabile di un incremento della selettività per il sottotipo recettoriale μ¹: ciascuno degli analoghi in cui l'*N*-metil-β-alanina viene sostituita dalla β-alanina (TAPA, **Figura 19**) o da un *N*-metil-α-amminoacido (DAS-DER, **Figura 19**) mostrano, invece, una diminuzione dell'affinità per i recettori μ.

Recentemente è stata presa in considerazione la possibilità di utilizzare oligomeri dell'*N*-metil- β -alanina per la determinazione di sequenze peptidiche dotate di attività biologica. Negli ultimi anni si è osservato, infatti, un crescente interesse per la sintesi di nuove librerie di peptidi che hanno consentito l'identificazione, *in vitro*, di numerose sequenze biologicamente attive;¹⁹⁵ tuttavia questi composti presentano dei limiti, circa le loro applicazioni farmaceutiche, dovuti all'instabilità metabolica ed alle caratteristiche di scarso assorbimento. Sono state, quindi, necessarie estese modifiche dello scheletro peptidico al fine di ottenere composti con i livelli desiderati di attività *in vivo*: gli oligomeri di glicine *N*-sostituite¹⁹⁶ o peptoidi ne rappresentano un esempio. In maniera analoga, è stata preparata una libreria combinatoriale di oligomeri dell'acido β -amminopropanoico *N*-sostituito (β -peptoidi).¹⁹⁷ Ci si aspetta che queste librerie di β -peptoidi abbiano una maggiore stabilità metabolica e migliorate proprietà d'assorbimento, non solo perché le ammidi terziarie dei peptoidi forniscono uno scheletro strutturale che è più stabile all'idrolisi e meno polare dei tipici legami ammidici peptidici,¹⁹⁸ ma anche perché gli oligomeri dei β^3 -amminoacidi mostrano di per sé maggiore stabilità alle proteasi ed esibiscono ben definite strutture secondarie.

Inoltre, i β^3 -amminoacidi *N*-metilati potrebbero essere utili strutture di base per lo sviluppo di nuovi foldameri.¹⁹⁹ Per foldamero s'intende qualsiasi oligomero che è in grado di avvolgersi in modo conformazionalmente ordinato in soluzione, dando origine a strutture stabilizzate da una serie di interazioni non-covalenti tra unità monometriche non adiacenti.¹⁹⁹ Nell'ambito dello studio delle possibili soluzioni conformazionali adottate dalle catene peptidiche in soluzione, è ormai noto che i β -peptidi, e anche gli oligomeri di β -amminoacidi, formano, in modo sorprendente, eliche stabili in soluzione.¹⁹⁹ In particolare, i peptidi costituiti esclusivamente da β^3 -amminoacidi adottano una struttura a 14-elica, mentre i peptidi contenenti sia α che β -amminoacidi possono adottare strutture a 11, 14 o 15-elica.¹⁵⁷ Da questi studi è emerso, inoltre, che certi schemi di sostituzione, nell'ambito della famiglia dei β -amminoacidi, influenzano notevolmente la potenziale energia torsionale di superficie, permettendo la formazione di una grande varietà di conformazioni regolari. Tali cambiamenti strutturali includono, appunto, anche l'*N*-metilazione: di conseguenza gli *N*-metil- β^3 -amminoacidi potrebbero essere utili building block non solo nella sintesi di sostanze biologicamente attive ma anche per lo sviluppo di foldameri.

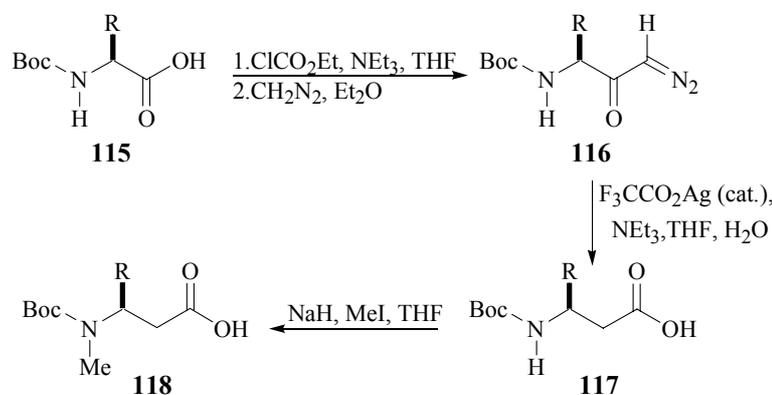
2.1. PROCEDURE SINTETICHE PER L'OTTENIMENTO DI *N*-METIL- β^3 -AMMINOACIDI

Considerata l'importanza dei β^3 -amminoacidi, nonché dei peptidi in cui essi sono inseriti, non deve stupire che lo sviluppo di nuovi metodi sintetici volti a fornire β^3 -amminoacidi enantiomericamente puri, stia diventando un'area molto attiva di ricerca. In questo contesto, l'interesse della comunità scientifica è stato rivolto anche verso la possibile applicazione biologica degli *N*-metil- β^3 -amminoacidi²⁰⁰ e verso le procedure sintetiche relative al loro ottenimento.

Seebach e collaboratori hanno riportato una procedura di sintesi, basata sull'omologazione di Arndt-Eistert degli α -amminoacidi, per la preparazione di *N*-metil- β^3 -amminoacidi enantiomericamente puri, protetti sulla funzione amminica con il gruppo *tert*-butilossicarbonile (Boc).^{201,202}

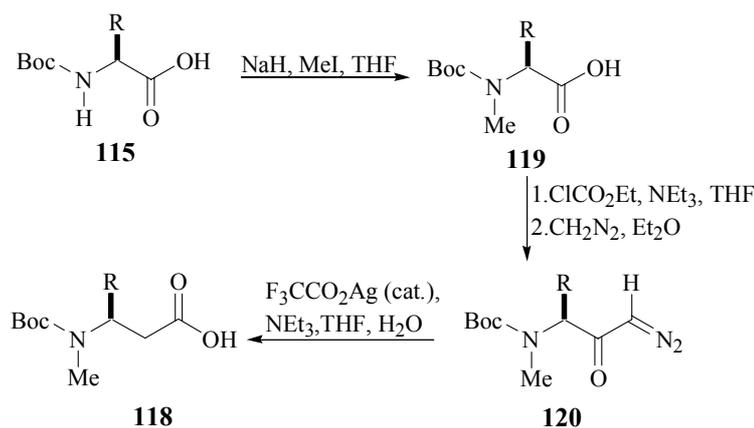
Gli *N*-Boc- α -amminoacidi (**115**) sono stati convertiti nei corrispondenti diazochetoni **116** mediante attivazione della funzione carbossilica via anidridi miste e successiva reazione con diazometano (**Schema 25**). Il riarrangiamento di Wolff del diazochetone **116**, contenente un centro chirale adiacente al gruppo carbonilico, avviene con ritenzione della configurazione e porta alla formazione degli *N*-Boc- β^3 -omoamminoacidi corrispondenti (**117**, **Schema 25**).

Gli *N*-Boc-*N*-metil- β^3 -omoamminoacidi (**118**) sono stati preparati con buone rese mediante la metilazione della funzione amminica degli *N*-Boc- β^3 -omoamminoacidi **117** con la procedura di Benoitons,^{203,204} originariamente utilizzata per la metilazione degli α -amminoacidi (**Schema 25**).



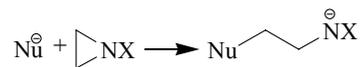
Schema 25. Metilazione della funzione amminica di *N*-Boc- β^3 -amminoacidi, ottenuti dai corrispondenti α -amminoacidi attraverso l'omologazione di Arndt-Eistert.

Gli *N*-Boc-*N*-metil- β^3 -omoamminoacidi (**118**) possono essere ottenuti anche mediante omologazione dei corrispondenti *N*-Boc-*N*-metil- α -amminoacidi (**119**, **Schema 26**). Tuttavia la purificazione degli *N*-metil- α -amminoacildiazometani **120**, ottenuti a partire dai corrispondenti *N*-metil- α -amminoacidi, mediante attivazione della funzione carbossilica via anidridi miste e successiva reazione con diazometano, risulta estremamente complicata.²⁰⁵

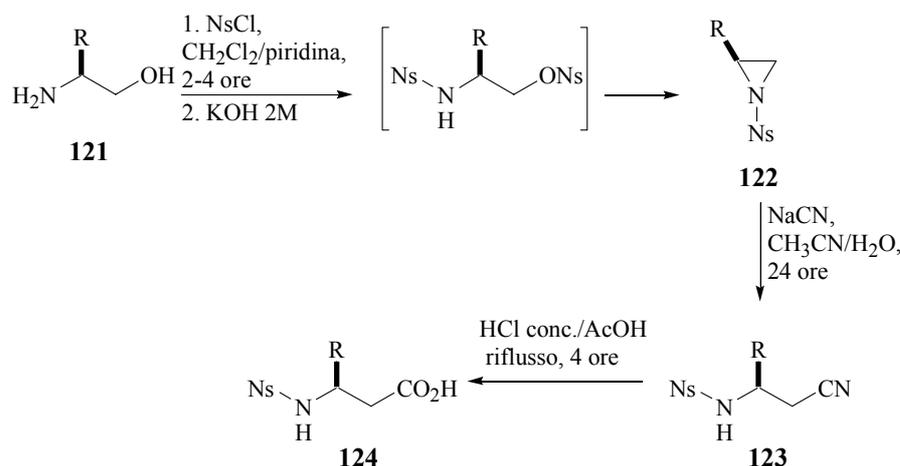


Schema 26. Omologazione di Arndt-Eistert degli *N*-Boc-*N*-metil- α -amminoacidi **119**

Piuttosto recentemente, è stata presa in considerazione la possibilità di utilizzare le *N*-(*p*-nitrobenzensolfonil) aziridine (*N*-nosil aziridine), prontamente disponibili a partire dai corrispondenti α -amminoacidi, come intermedi chiave nella sintesi di β^3 -amminoacidi e dei loro derivati *N*-alchilati.²⁰⁶ Il forte effetto elettronattrattore del gruppo *p*-nitrobenzensolfonile (Ns, nosile) può facilitare l'apertura nucleofila dell'anello dell'aziridina. È ben noto infatti, che, nonostante la tensione dell'anello renda le aziridine suscettibili a reazioni di apertura, sono richiesti nucleofili estremamente forti o catalisi acida nel caso di aziridine non attivate (X = H, alchile o arile, **Figura 20**). Pertanto, diventa importante introdurre sostituenti che stabilizzano la carica negativa sull'atomo di azoto (X = COR, CO₂R, SO₂R), al fine di aumentare la reattività degli anelli aziridinici verso i nucleofili.^{207,208} Il gruppo *p*-toluensolfonile (X = Ts) è probabilmente il prototipo di questo tipo di sostituenti e sono state riportate molte strategie per la preparazione di *N*-(*p*-toluensolfonil) aziridine enantiomericamente pure.²⁰⁹ La successiva rimozione del gruppo tosile, tuttavia, è problematica e richiede tempi lunghi di reazione e l'uso di condizioni di reazione drastiche.²¹⁰


Figura 20. Apertura dell'anello aziridinico

Pertanto, altri gruppi più facilmente rimovibili, quale il gruppo elettronattrattore nosile,²¹¹ sono stati presi in considerazione come equivalenti sintetici del gruppo tosile. Le *N*-nosil aziridine **122** possono essere sintetizzate a partire dai corrispondenti 1,2-amminoalcoli **121**, che sono commercialmente disponibili o, in alternativa, facilmente ottenuti a partire dai corrispondenti α-amminoacidi enantiomericamente puri.^{212,213} La successiva apertura nucleofila con ioni cianuro dell'anello delle aziridine **122**, seguita dall'idrolisi dei nitrili intermedi **123**, porta alla formazione degli *N*-nosil-β³-omoamminoacidi (**124**, **Schema 27**).

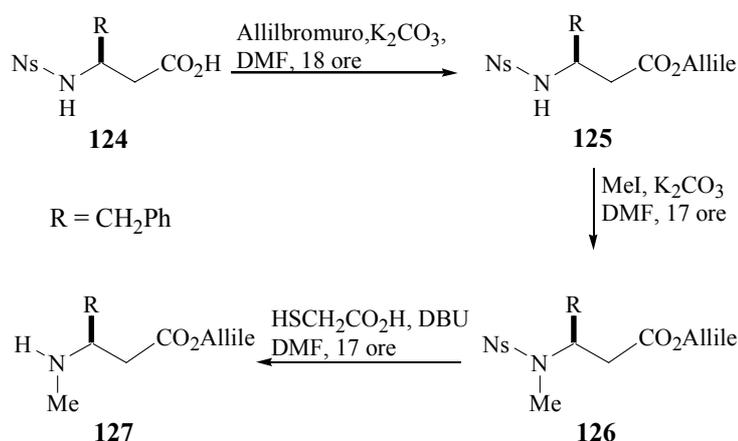

Schema 27. Sintesi di *N*-nosil-β³-amminoacidi mediante apertura nucleofila regioselettiva delle corrispondenti *N*-nosil aziridine

La preparazione delle aziridine **122** è risultata inizialmente problematica poiché la reazione di **121** con 2.2 equivalenti del cloruro di *p*-nitrobenzensolfonile (NsCl) in piridina, risultava incompleta anche a 100°C; tempi di reazione più lunghi conducevano a decomposizioni indesiderate ed i corrispondenti amminoalcoli dinosilati erano recuperati con basse rese. Le *N*-nosil aziridine (**122**) sono state ottenute trattando **121** con un eccesso di NsCl (3 equiv) in CH₂Cl₂/piridina a temperatura ambiente per 2-4 h, e successivo trattamento con una soluzione acquosa di KOH 2 M (**Schema 27**).

Il successivo trattamento delle *N*-nosil aziridine **122** con NaCN in CH₃CN/H₂O ha determinato l'apertura regioselettiva dell'anello aziridinico e la formazione dei corrispondenti *N*-nosil-β³-amminonitrili **123** (**Schema 27**). Gli *N*-nosil-β³-amminoacidi

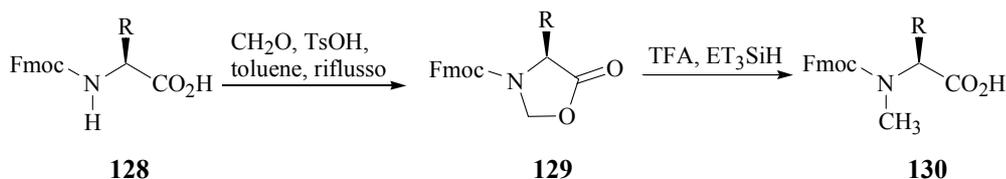
124 sono stati ottenuti mediante idrolisi di questi intermedi in una miscela di HCl concentrato ed acido acetico a refluxo (**Schema 27**).

L'*N*-nosil-β³-omofenilalanina (**124** R = CH₂Ph) ottenuta secondo la suddetta procedura, è stata convertita nel corrispondente estere allilico **125** e, successivamente, metilata per trattamento con CH₃I e K₂CO₃ (**Schema 28**). La rimozione del gruppo nosile da **126** con acido mercaptoacetico e DBU^{214,215} ha portato alla formazione del corrispondente *N*-metil β³-ammino estere **127** (**Schema 28**).



Schema 28. Metilazione dell'*N*-nosil-β³-omofenilalanina e successiva rimozione del gruppo nosile

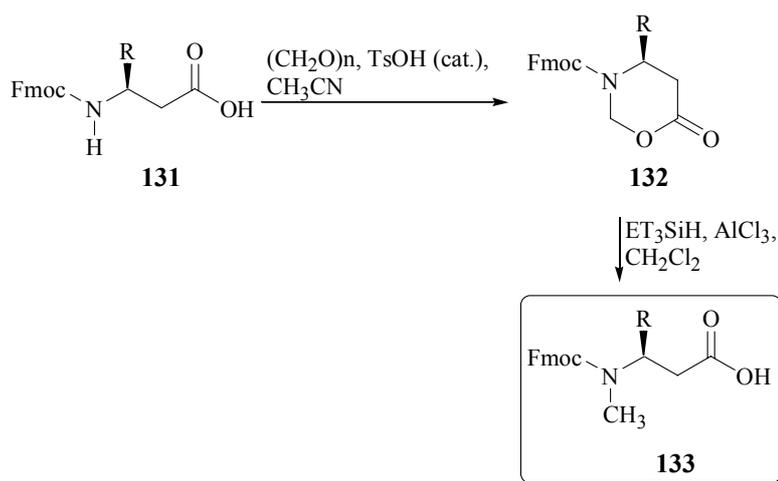
Considerata l'attività biologica notevolmente diversa dei peptidi contenenti residui amminoacidici metilati sulla funzione amminica, nel corso degli anni è stata indagata la possibilità di convertire gli α-amminoacidi protetti sulla funzione amminica con il gruppo fluorenilmetossicarbonile (Fmoc) nei corrispondenti derivati metilati. In particolare, Friedinger e collaboratori hanno sviluppato una procedura che prevede la reazione di *N*-Fmoc-α-amminoacidi (**128**) con formaldeide, seguita dalla riduzione dei corrispondenti 1,3-ossazolidin-5-oni **129** con trietilsilano (TES) ed acido trifluoroacetico (TFA) (**Schema 29**).²¹⁶



Schema 29. Sintesi degli *N*-Fmoc*N*-metil-α-amminoacidi **130**, mediante riduzione dei corrispondenti 1,3-ossazolidin-5-oni **129**

Procedure sintetiche più efficienti in termini di tempi e rese, prevedono l'utilizzo di acidi di Lewis, per esempio l' AlCl_3 al posto del TFA,²¹⁷ o, in particolare, l'impiego del riscaldamento mediante microonde, che ha consentito di sintetizzare gli ossazolidinoni intermedi in pochi minuti.²¹⁸

Recentemente una sequenza di reazioni simili è stata utilizzata per la conversione di *N*-Fmoc- β^3 -omoamminoacidi nei derivati metilati sulla funzione amminica, mediante riduzione dei corrispondenti ossazinanoni.²¹⁹ Il riscaldamento convenzionale degli *N*-Fmoc- β^3 -omoamminoacidi **131** con acido *p*-toluensolfonico e paraformaldeide in toluene porta, in 2 ore, alla formazione del prodotto **132** con rese mediocri; la reazione va a completezza solo utilizzando un eccesso di reagenti e tempi di reazione più lunghi. La resa ed i tempi di reazione sono migliorati significativamente utilizzando il riscaldamento con microonde, per 3 minuti a 130°C e come solvente l'acetonitrile, piuttosto che il toluene (**Schema 30**). La riduzione dell'intermedio 1,3-ossazinan-6-one **132** con AlCl_3 e trietilsilano in diclorometano anidro, fornisce l'amminocido *N*-metilato **133** in 4 ore, a temperatura ambiente e dopo 1 minuto, per riscaldamento a 100°C con microonde (**Schema 30**). Le difficoltà legate alla separazione del prodotto *N*-metilato **133** dall'*N*-Fmoc- β^3 -omoamminoacido di partenza hanno imposto la necessità di una purificazione del prodotto **132** dall'amminoacido non reagito e dal catalizzatore, prima dell'apertura riduttiva dell'anello.

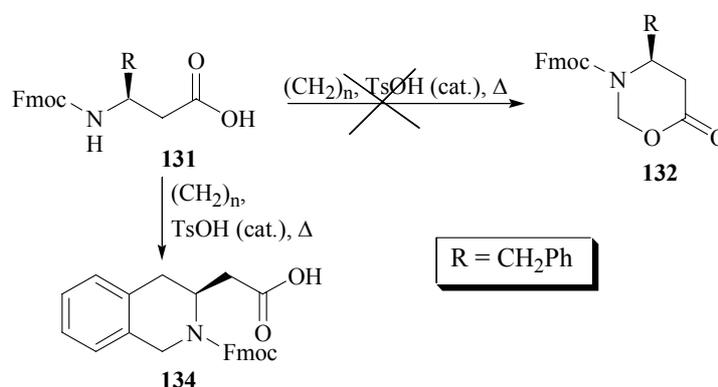


Schema 30. Sintesi di *N*-Fmoc-*N*-metil- β^3 -amminoacidi mediante riduzione dei corrispondenti ossazinanoni

L'assenza di racemizzazione durante la sequenza sintetica complessiva è stata provata mediante la sintesi dei derivati diastereoisomerici dell'(*R*)- α -metilbenzilammina con entrambi gli enantiomeri dell'*N*-Fmoc-*N*-metil- β^3 -omoalanina:

non si è osservata racemizzazione quando i diastereoisomeri risultanti sono stati analizzati mediante NMR e HPLC a fase inversa.

Tuttavia, i tentativi di sintetizzare l'*N*-metil-*N*-Fmoc- β^3 -omofenilalanina, sia impiegando la procedura di riscaldamento convenzionale, sia utilizzando il riscaldamento mediante microonde, sono risultati insoddisfacenti, poiché, invece del prodotto atteso, si otteneva, in tutti i casi, il derivato **134** (**Schema 31**). Composti di questo tipo si sono rivelati interessanti per le loro varie attività biologiche e per l'abilità di restringere la conformazione dei peptidi.^{220,221}



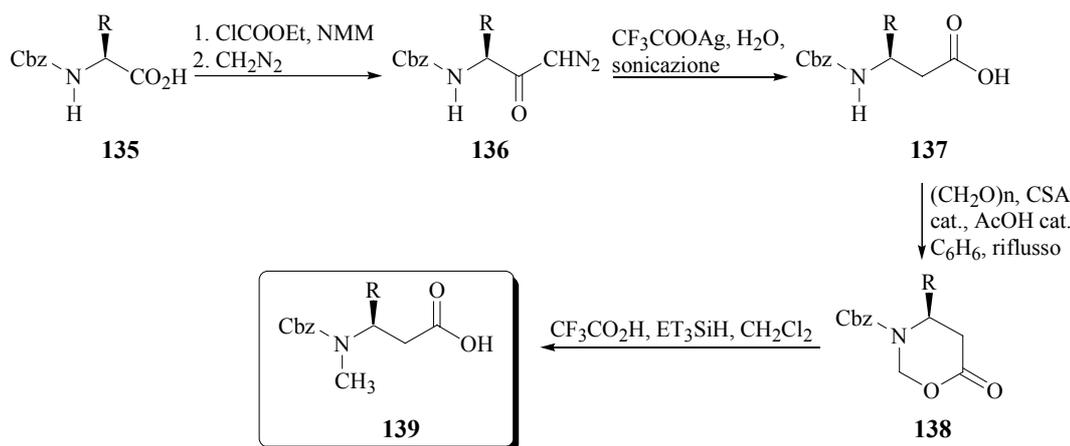
Schema 31. Sintesi dell'acido carbossilico **134**

Anche gli *N*-metil- β^3 -amminoacidi protetti sulla funzione amminica con il gruppo benzilossicarbonilico (Cbz), sono stati ottenuti mediante riduzione dei corrispondenti ossazinanoni (**Schema 32**).^{222,223}

La procedura prevede, inizialmente, il trattamento degli *N*-Cbz- α -amminoacidi **135** con etilcloroformiato ed *N*-metilmorfolina (NMM); le anidridi miste, così ottenute, sono, poi, convertite nei corrispondenti diazochetoni **136** per trattamento con diazometano.²²⁴

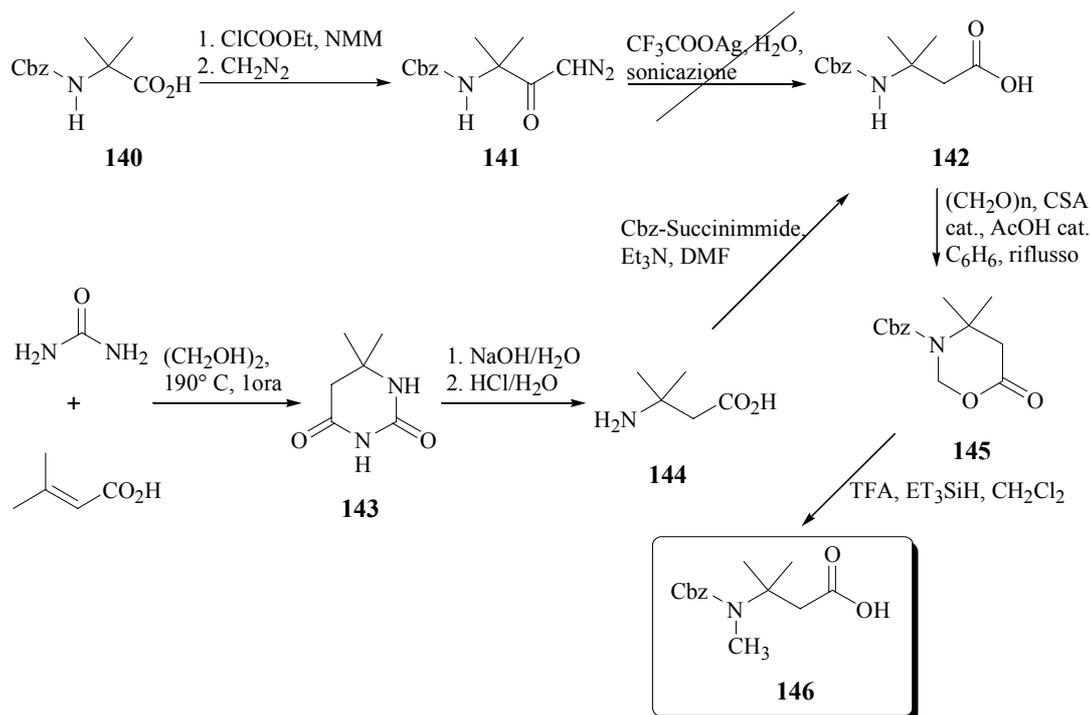
Il successivo riarrangiamento di Wolff dei diazochetoni²²⁵ **136** fornisce gli *N*-benzilossicarbonil- β^3 -omoamminoacidi **137**, che, per reazione con paraformaldeide, in presenza di acido canforsolfonico (CSA)/AcOH, sono, convertiti nei corrispondenti 1,3-ossazinan-6-oni **138**.

La riduzione di questi ultimi con trietilsilano, in presenza di acido trifluoroacetico, porta alla formazione dei corrispondenti *N*-benzilossicarbonil-*N*-metil- β^3 -omoamminoacidi **139** (**Schema 32**).



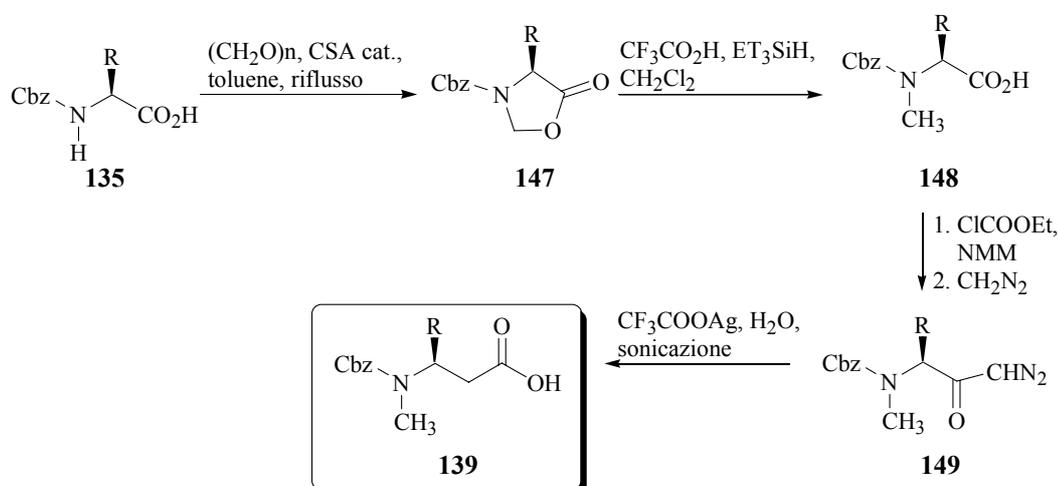
Schema 32. Sintesi degli *N*-Cbz-*N*-metil- β^3 -omoamminoacidi **139** mediante riduzione dei corrispondenti ossazinanoni **138**

L'*N*-Cbz-*N*-metil- β^3 -omoamminoacido **146** è stato preparato mediante una procedura alternativa, poiché non sono stati ottenuti risultati soddisfacenti dai numerosi tentativi di sintetizzare l'*N*-Cbz- β^3 -omoamminoacido **142** mediante il riarrangiamento di Wolff²²⁶ del diazochetone **141**, derivante dall'acido amminoisobutirrico protetto **140** (Schema 33).²²³ In particolare, l'acido 3-ammino-3-metilbutanoico^{227,228} **144**, ottenuto dall'idrolisi del diidropirimidindione **143**, è stato convertito nel corrispondente carbammato²²⁹ **142** (Schema 33). Il successivo trattamento dell'*N*-benzilossicarbonil- β^3 -omoamminoacido **142** con paraformaldeide, in presenza di (CSA)/AcOH porta alla formazione del corrispondente 4,4-dimetil-1,3-ossazinan-6-one **145**. Infine, la riduzione di **145** con trietilsilano, in presenza di acido trifluoroacetico, fornisce l'*N*-benzilossicarbonil-*N*-metil- β^3 -omoamminoacido **146** (Schema 33).


Schema 33. Sintesi dell'*N*-Cbz-*N*-metil-β³-omoamminoacido **146**

Un altro approccio impiegato per la sintesi di *N*-Cbz-*N*-metil-β³-amminoacidi è rappresentato dall'omologazione dei corrispondenti *N*-metil-α-amminoacidi.^{230,231}

Questa strategia prevede l'iniziale conversione degli *N*-Cbz-α-amminoacidi **135** nei corrispondenti 1,3-ossazolidin-5-oni **147**.²³⁰ La riduzione di questi ultimi con trietilsilano, in presenza di acido trifluoroacetico, fornisce i corrispondenti *N*-metil-α-amminoacidi **148**, che sono successivamente omologati mediante la procedura di Arndt-Eistert (**Schema 34**).²²³


Schema 34. Sintesi di *N*-Cbz-*N*-metil-β³-amminoacidi mediante omologazione di *N*-metil-α-amminoacidi, ottenuti per riduzione dei corrispondenti 1,3-ossazolidin-5-oni

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI SPERIMENTALI

3.1. SINTESI DI STEROIDI MODIFICATI

La progettazione e la realizzazione di molecole con potenziale impiego farmacologico, biologicamente attive e capaci di esplicare un'efficace azione terapeutica, rappresentano da sempre il centro dell'interesse della ricerca medico-scientifica.

L'approfondimento della conoscenza dei processi fondamentali che regolano funzioni specifiche dell'organismo, l'isolamento, la definizione strutturale e la piena comprensione dei meccanismi d'azione delle biomolecole coinvolte in questi processi, rappresentano il punto di partenza per lo sviluppo di nuove sostanze biologicamente attive. Uno degli orientamenti più frequentemente usati nella progettazione della sintesi di molecole di interesse farmacologico è, infatti, quello che prevede la modifica strutturale di sostanze attive note, sia di origine naturale che sintetica. Questo approccio risulta generalmente più semplice, ed economicamente più vantaggioso rispetto a quello che prevede la sintesi totale delle molecole desiderate. Ad esempio, l'elaborazione strutturale di steroidi naturali rappresenta, la metodologia più conveniente per l'ottenimento di nuove molecole a struttura steroidea.^{232,233} le difficoltà legate alla loro sintesi e dovute essenzialmente alla complessità sia strutturale che stereochimica di tali composti, ne rendono difficile la sintesi totale, sia a livello industriale che su piccola scala.

In questo contesto, nell'ambito dello studio delle possibili modifiche da apportare al nucleo steroideo di base al fine di ottenere molecole a struttura steroidea biologicamente attive, lo sviluppo di nuove metodologie sintetiche per l'ottenimento di D-omosteroidi continua a rappresentare un'importante area di ricerca nel campo della chimica degli steroidi.³³ L'inserimento di un atomo di carbonio addizionale nell'anello D di uno steroide può alterarne le proprietà biologiche.¹⁰ Vengono citati come esempi il D-omoestradiolo - che mostra un'affinità di legame per i recettori degli estrogeni di tre

ordini di grandezza più bassa rispetto a quella dell'estradiolo -,¹¹ alcuni derivati del D-omoestrone, dotati di significative proprietà antiossidanti¹² e nuovi D-omosteroidi derivati dall'androsterone, che hanno mostrato attività anti-cancro, anti-diabetica ed ipolipidemica.¹³

Le interessanti proprietà biologiche di alcuni rappresentanti di questa classe di composti,¹¹⁻¹³ l'esistenza di una importante via metabolica degli steroidi che prevede l'espansione dell'anello D e la formazione di metaboliti a struttura D-omosteroidea,¹⁴⁻¹⁶ insieme all'osservazione che, l'allargamento dell'anello D rappresenta un processo di decomposizione frequente durante l'immagazzinamento di steroidi di comune impiego clinico,²⁰⁻²² hanno diretto, negli ultimi anni, l'interesse di diversi gruppi di ricerca verso lo studio di nuove metodologie sintetiche per l'ottenimento di D-omosteroidi³³ e all'approfondimento di quelle già esistenti.

Tra le numerose procedure riportate per l'ottenimento di D-omosteroidi, alcune prevedono la conversione dell'anello D a cinque termini di 17-idrossi-20-chetosteroidi in un anello a sei termini, mediante un riarrangiamento indotto da acidi di Lewis.^{44,49}

Il meccanismo di questo tipo di riarrangiamento può essere considerato simile ad una trasposizione pinacolica: la chelazione iniziale dell'acido di Lewis da parte del gruppo ossidrilico in posizione 17 e del gruppo chetonico in 20 è seguita dalla migrazione del legame C-16-C-17.^{41,42} La chelazione determina una posizione reciproca *cis* delle funzionalità ossigenate, con conseguente formazione del corrispondente 17 α -cheto-17 α -idrossi-D-omosteroide che possiede il gruppo ossidrilico legato al C-17, in posizione α (**Figura 1**).⁴³

Mentre la stereoselettività del riarrangiamento può essere spiegata sulla base della formazione del complesso ciclico mostrato in figura 1, i fattori che controllano la regioselettività del processo, ovvero la migrazione del legame C-16-C-17 piuttosto che quella del legame C-13-C-17, non sono stati completamente compresi.^{44,45}

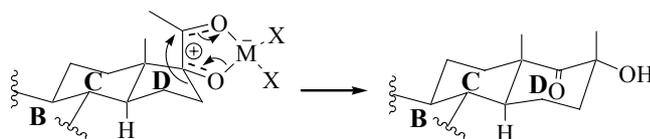


Figura 1. Meccanismo del riarrangiamento indotto da acidi di Lewis dei 17-idrossi-20-chetosteroidi

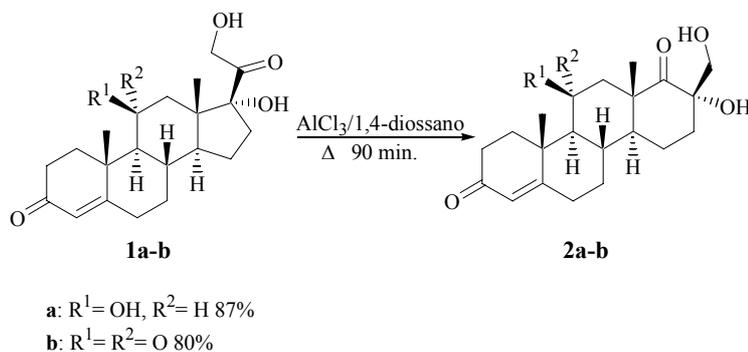
Il riarrangiamento indotto dagli acidi di Lewis dei 17-idrossi-20-chetosteroidi, è ampiamente documentato in letteratura; tuttavia non ci sono esempi di simili reazioni su

semplici strutture corticosteroidi, recanti in posizione C-17 una catena laterale a struttura diidrossiacetonica.

L'interesse per lo studio della reattività di questi composti, nasce dalla considerazione che la loro differenza strutturale rispetto agli altri sistemi riportati in letteratura, potrebbe influenzare il decorso della reazione. In particolare, il gruppo ossidrilico in posizione C-21 potrebbe coordinarsi all'acido di Lewis, controllando la stereochimica del processo di riarrangiamento.²³⁴

Al fine di studiare il riarrangiamento dell'anello D indotto da acidi di Lewis di sistemi corticosteroidi caratterizzati dalla presenza di un residuo idrossimetilchetone orientato in posizione β e di un gruppo α -ossidrilico entrambi legati al C-17, è stato scelto come sistema modello l'idrocortisone, un importante glucocorticoide dotato di proprietà anti-infiammatorie.²³⁵

L'idrocortisone (11 β ,17 α ,21-triidrossi-4-pregnen-3,20-dione) **1a**, è stato solubilizzato in 1,4-diossano anidro e trattato con tricloruro di alluminio (**1a**/AlCl₃, 1:3), alla temperatura di riflusso del solvente per 90 minuti (**Schema 1**). La purificazione del grezzo di reazione, mediante cromatografia su colonna corta, ha portato al recupero, con una resa dell'87% (**Tabella 1**), di un solido giallo che è stato identificato come l'11 β ,17 α -diidrossi-17 β -idrossimetil-D-omo-4-androsten-3,17a-dione (**2a**).



Schema 1. Conversione degli steroidi **1a-b** nei corrispondenti D-omo derivati **2a-b**

Tabella 1. Rese della conversione di **1a-b** nei corrispondenti D-omosteroidi **2a-b**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
2a	OH	H	87
2b	O	O	80

La conversione dell'idrocortisone (**1a**) nel prodotto di riarrangiamento **2a** non è stata invece osservata conducendo la reazione a temperatura ambiente. D'altro canto, il trattamento dell'idrocortisone (**1a**) con uno o due equivalenti di tricloruro di alluminio nelle stesse condizioni sperimentali riportate precedentemente, ha portato ad una parziale formazione del corrispondente D-omosteroide **2a**. Lo stesso risultato è stato ottenuto conducendo la reazione in etere etilico anidro alla temperatura di riflusso del solvente, in presenza di 3 equivalenti di tricloruro di alluminio.

La struttura di **2a** è stata identificata mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare protonica e al carbonio 13 .²³⁴ In particolare, lo spettro $^1\text{H-NMR}$ di **2a**, registrato in dimetilsolfossido deuterato a 298 K, ha mostrato il tipico segnale a 5.57 ppm attribuibile al protone H-4 dell'anello A. Inoltre, un doppietto a 4.42 ppm ed un multipletto centrato a 4.22 ppm sono indicativi per il gruppo ossidrilico legato al C-11 e per il protone H-11, rispettivamente: l'aggiunta di acqua deuterata al campione determina una semplificazione del segnale per H-11. I quattro protoni del gruppo ossidrilico e della catena idrossimetilica, entrambi legati al C-17, mostrano un singoletto a 4.82 ppm per il gruppo ossidrilico in C-17 e due multipletti centrati a 4.61 e 3.49 ppm per i protoni metilenici e per il gruppo ossidrilico, rispettivamente. Lo scambio isotopico consente di identificare i segnali relativi ad entrambe le funzioni ossidriliche e semplifica i segnali relativi alla catena idrossimetilica legata al C-17, in una coppia di doppietti.

La configurazione del C-17 nel composto **2a** (**Figura 2**) è stata stabilita mediante esperimenti NMR 2-D. In particolare lo spettro NOESY di **2a** mostra chiaramente le forti correlazioni indicate in **Figura 2**.

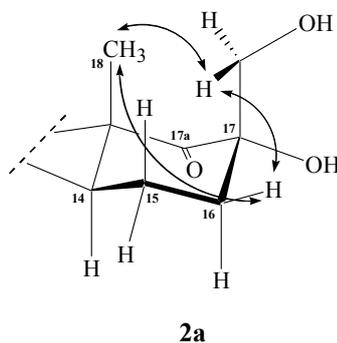


Figura 2. Correlazioni esistenti tra i protoni dell'anello D nel composto **2a**

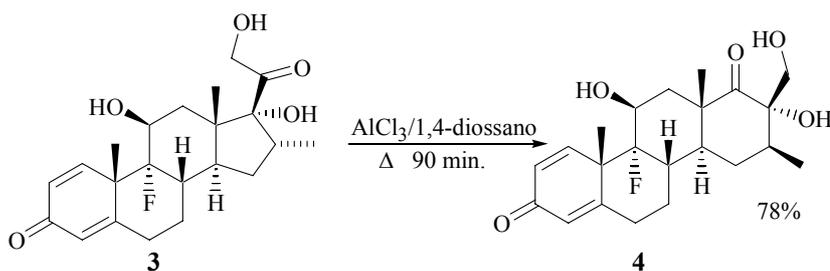
I risultati ottenuti hanno dimostrato che il gruppo metilico legato al C-18, il gruppo metilenico del sostituente in C-17 e l'idrogeno legato al C-16 si trovano sulla faccia β dell'anello D.

La procedura di riarrangiamento dell'anello D indotto da acidi di Lewis è stata

successivamente estesa al cortisone (17 α ,21-diidrossi-4-pregnen-3,11,20-trione) (**1b**, **Schema 1**). In particolare, **1b** è stato sottoposto alle stesse condizioni sperimentali adottate per **1a**, ed il corrispondente 17 α -cheto-17 α -idrossi-D-omosteroide **2b** è stato ottenuto con una resa dell'80%, in seguito a purificazione mediante cromatografia su colonna corta del grezzo di reazione (**Tabella 1**).²³⁴ La struttura di **2b** è stata identificata mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare protonica e al carbonio 13 e la stereochimica del C-17 è stata attribuita in analogia a quella determinata per il composto **2a**.

In letteratura è riportato che i 16 α -metil-17-idrossi-20-chetosteroidi sono stabili o scarsamente reattivi nelle condizioni sperimentali usate per il riarrangiamento dell'anello D indotto da acidi di Lewis;²³⁶⁻²³⁸ per questo motivo è stata valutata l'influenza della presenza di un gruppo metilico in posizione 16 α nel processo di riarrangiamento di sistemi corticosteroidi.

A tale scopo il desametasone (9 α -fluoro-11 β ,17 α ,21-triidrossi-16 α -metil-1,4-pregnandiene-3,20-dione) **3**, un 16 α -metil-corticosteroide dotato di potente attività antinfiammatoria, è stato sottoposto al processo di riarrangiamento (**Schema 2**). Il trattamento di **3** con tricloruro di alluminio, nelle stesse condizioni sperimentali adottate per **1a** e **1b**, ha portato alla formazione del 9 α -fluoro-11 β ,17 α -diidrossi-17 β -idrossimetil-16 β -metil-D-omo-1,4-androstadiene-3,17 α -dione (**4**) con una resa del 78%, in seguito a purificazione del grezzo di reazione (**Schema 2**).



Schema 2. Conversione del desametasone (**3**) nel D-omosteroide **4**

Dalla purificazione del grezzo di reazione mediante cromatografia su colonna corta, sono state ottenute un numero limitato di frazioni miste arricchite nel composto **4** e contenenti un secondo prodotto. L'analisi ¹H-NMR di queste frazioni conferma la presenza di segnali attribuibili ad un possibile isomero di **4**, probabilmente un epimero. Tuttavia la purificazione cromatografica del grezzo di reazione non ha consentito di isolare questo prodotto secondario.²³⁴ La struttura del D-omo derivato **4** è stata

determinata mediante ^1H - e ^{13}C -NMR. In particolare, lo spettro ^1H -NMR di **4** registrato in dimetilsolfossido deuterato a 298 K, ha mostrato i tipici segnali a 7.26, 6.20, e 5.99 ppm attribuibili ai protoni dell'anello A H-1, H-2, e H-4, rispettivamente (**Figura 3**).

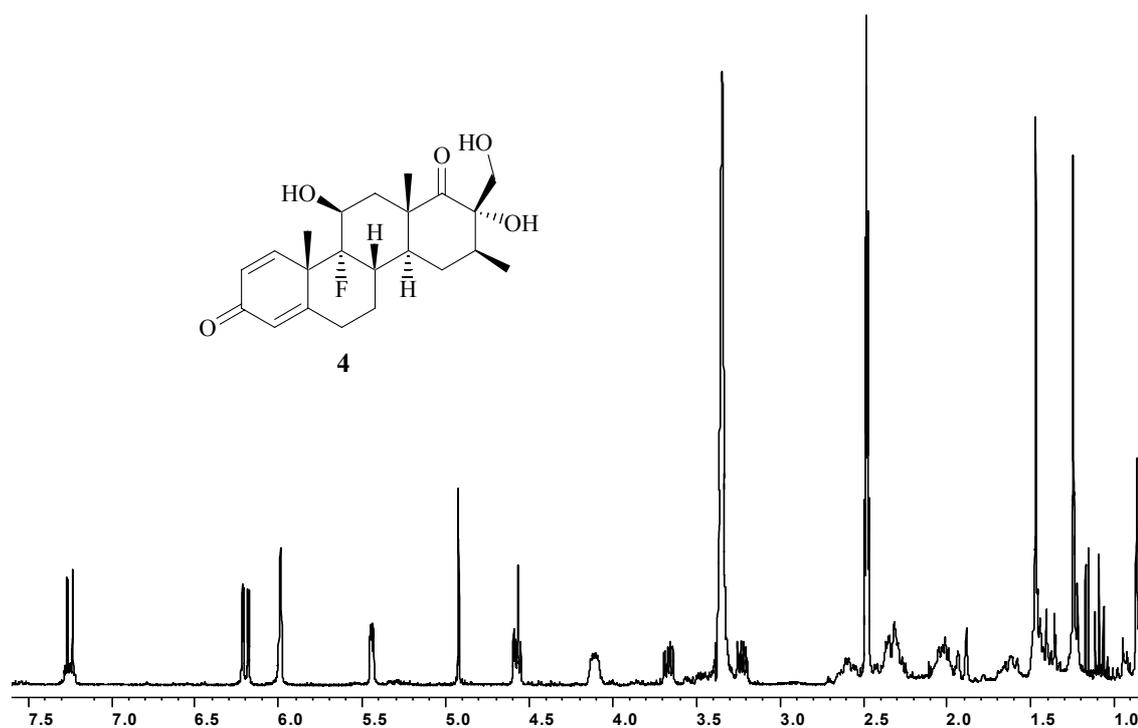
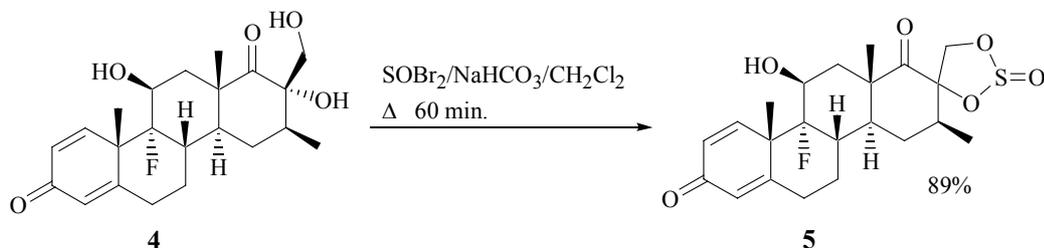


Figura 3. Spettro ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) del 9 α -fluoro-11 β ,17 α -diidrossi-17 β -idrossimetil-16 β -metil-D-omo-1,4-androstadiene-3,17a-dione (**4**)

Lo scambio isotopico consente di identificare i segnali relativi a tutte le funzioni ossidriliche del composto **4**. Dopo aggiunta di acqua deuterata al campione, il complicato multipletto a 5.43 ppm, il singoletto a 4.89 ppm, ed il tripletto a 4.55 ppm, attribuibili ai gruppi ossidrilici in posizione 11, 17, ed al gruppo ossidrilico della catena idrossimetilica in C-17, rispettivamente, spariscono. Lo scambio con deuterio semplifica la molteplicità del segnale di entrambi i protoni metilenici in C-17, che risuonano a 3.67 e a 3.24 ppm, ciascuno come un doppietto; in assenza di scambio isotopico, questi protoni mostrano, invece, due chiari doppietti di doppietti. Dopo aggiunta di acqua deuterata al campione, il complicato multipletto centrato a 4.11 ppm è stato assegnato al protone H-11. In seguito a scambio isotopico questo protone ha mostrato, infatti, un multipletto semplificato, derivante dall'accoppiamento con i protoni H-12 e con l'atomo di fluoro legato al C-9. Infine, lo spettro ^{19}F -NMR di **4**, registrato in cloroformio deuterato a 298 K, ha mostrato solo un doppietto di doppietti centrato a -136.07 ppm.

La stereochimica dell'atomo di carbonio in posizione 17 del composto **4** è stata

assegnata in seguito alla conversione di questo ultimo nel corrispondente solfito ciclico²³⁴ **5** (Schema 3). Il trattamento di **4** con bromuro di tionile, in diclorometano ed in presenza di bicarbonato di sodio, alla temperatura di riflusso per 60 minuti, ha portato alla formazione, dopo purificazione cromatografica, del composto **5**, con una resa dell'89%.



Schema 3. Conversione del D-omosteroide **4** nel corrispondente solfito ciclico **5**

La sintesi del derivato **5**, in cui entrambe le funzionalità ossigenate del C-17 sono bloccate in una struttura rigida, semplifica la determinazione della configurazione del C-17. In particolare, lo spettro NOESY di **5** mostra chiaramente le forti correlazioni esistenti tra i protoni metilenici in 4', i protoni in 18, il protone in posizione 15 β ed il gruppo metilico al C-16 (Figura 4).

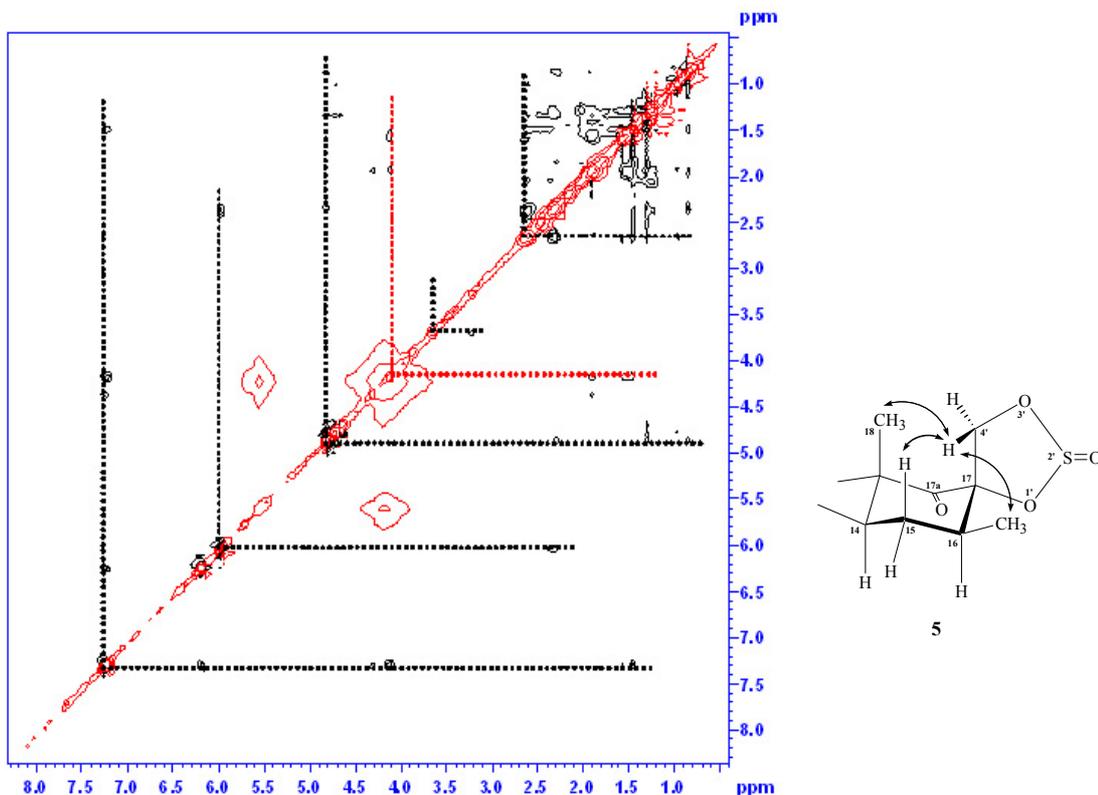


Figura 4. Spettro NOESY omonucleare del composto **5**

Inoltre, lo spettro NOESY non mostra correlazioni tra i protoni in 18 ed il gruppo metilico legato al C-16. Tutte le connessioni osservate per i protoni in 4', confermano l'orientazione β del gruppo metilenico. In particolare, la forte correlazione osservata tra i protoni in 4' ed il metile legato al C-16, suggeriscono per quest'ultimo un'orientazione equatoriale.

I dati forniti dallo spettro NOESY del composto **5** identificano chiaramente la configurazione del C-17 nel precursore **4**. L'inversione della configurazione dell'atomo di carbonio in posizione 16, osservata per il D-omosteroide **4**, suggerisce la possibile rottura, nel corso del processo di riarrangiamento, del legame C-16–C-17 e la conseguente formazione di un intermedio carbanionico al C-16; questo ultimo potrebbe invertire la sua originale configurazione prima della formazione dell'anello D.

I risultati illustrati nel presente lavoro rappresentano un importante avanzamento nell'ambito dello studio della reattività dei 17-idrossi-20-chetosteroidi nel processo di espansione dell'anello D, indotto dagli acidi di Lewis. In particolare, la presenza del gruppo ossidrilico in posizione C-21 non influenza il normale decorso della reazione di riarrangiamento: i D-omosteroidi preparati a partire dai corrispondenti corticosteroidi per trattamento con tricloruro di alluminio, sono caratterizzati da una ben definita stereochimica del C-17. Particolarmente interessante è l'inversione della configurazione osservata per l'atomo di carbonio in posizione 16 nel D-omosteroide ottenuto dal riarrangiamento del desametasone.

In questi nuovi isomeri dei corticosteroidi caratterizzati da un anello D a 6 termini, l'ulteriore elaborazione strutturale della funzione ossidrilica e di quella idrossimetilenica legate al C-17, potrebbe portare all'ottenimento di molecole più complesse di potenziale interesse biologico.

Un'altra interessante elaborazione strutturale del nucleo steroideo di base, è rappresentata dall'espansione dell'anello A. In particolare, l'interesse è stato rivolto alla sintesi di steroidi modificati aventi una struttura epossilattonica a sette termini sull'anello A.^{239,240} Questi derivati vengono generalmente recuperati in miscela con altri composti, come prodotti delle reazioni di ossidazione dei corrispondenti Δ^4 -3-chetosteroidi^{241,442} e sono stati utilizzati come precursori per ottenere analoghi di prodotti naturali, contenenti un anello A ad otto termini, caratterizzati da considerevole attività biologica²⁴³ (**Figura 5**). Essi, inoltre, rappresentano utili intermedi per la sintesi di molecole a struttura steroidea in cui l'anello A è rimpiazzato con una catena aperta

opportunamente sostituita.²⁴¹

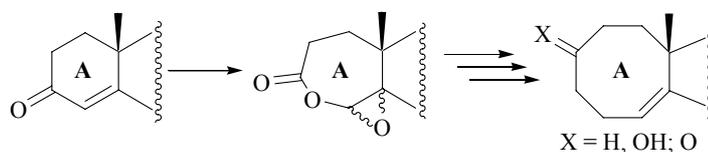


Figura 5. Steroidi con struttura epossilattonica a sette termini sull'anello A, precursori di analoghi contenenti un anello A ad otto termini

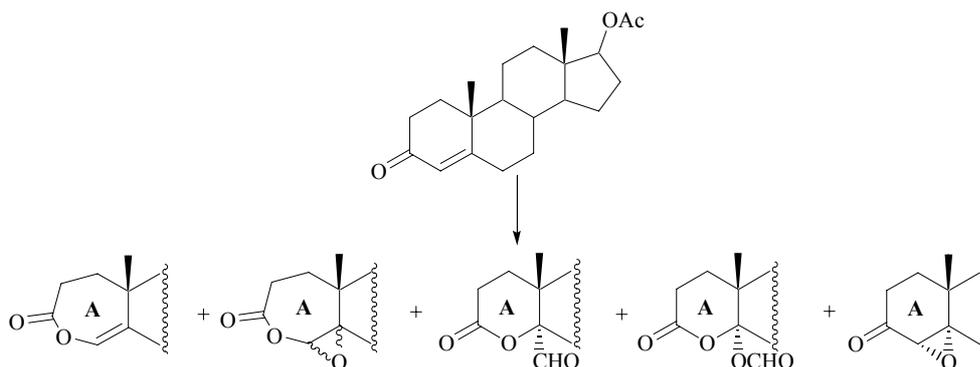
In letteratura sono riportate varie procedure per l'ossidazione di Δ^4 -3-chetosteroidi diversamente sostituiti sullo scheletro steroideo. Tuttavia, tutte queste metodologie non hanno avuto come obiettivo principale la sintesi degli epossilattoni, ma hanno portato all'ottenimento di altri prodotti di ossidazione; solo in alcuni casi, gli epossilattoni sono stati ottenuti in miscele complicate insieme ad altri composti.^{241,242} Differenti agenti ossidanti sono stati testati su substrati protetti sulle varie funzionalità presenti nello scheletro steroideo; reazioni di ossidazione condotte senza preliminare protezione dei gruppi funzionali presenti, hanno portato a rese di prodotto molto basse.

In particolare, il trattamento di Δ^4 -3-chetosteroidi con perossido di idrogeno in presenza di idrossido di sodio, o con *t*-butil idroperossido in presenza di idrossido di litio a temperatura ambiente, ha portato alla formazione stereospecifica dei corrispondenti $4\beta,5\beta$ -eossidi senza allargamento dell'anello A.²⁴⁴

Il trattamento di Δ^4 -3-chetosteroidi con perossido di litio ha fornito i corrispondenti $4,5$ -eossidi con rese basse, insieme ad un prodotto identificato come un A-nor- $3,5$ -secoacido, derivante dalla degradazione ossidativa del Δ^4 -3-chetone,²⁴⁵ l'impiego come agente ossidante di perossido di sodio acquoso ha portato, invece, alla formazione dei corrispondenti Δ^4 - $3,6$ -dioni. In queste condizioni sperimentali non è stata osservata la formazione dei corrispondenti epossilattoni.²⁴⁴

L'ossidazione con acido *m*-cloroperbenzoico di Δ^4 -3-chetosteroidi sostituiti in posizione 19, a temperatura ambiente per 11 giorni, ha fornito i corrispondenti lattoli e $3,19$ -lattoni attraverso la formazione di un intermedio, non isolato, a struttura epossilattonica.²⁴⁶

Differenti condizioni di ossidazione sono state sperimentate per il testosterone acetilato sulla funzione ossidrilica in C-17; il trattamento con acido perbenzoico e acido perclorico a temperatura ambiente, ha fornito miscele variabili di prodotti di ossidazione la cui composizione dipende dai rapporti molari dei reagenti e dai tempi di reazione (**Schema 4**).²⁴¹



Schema 4. Prodotti di ossidazione del testosterone acetato

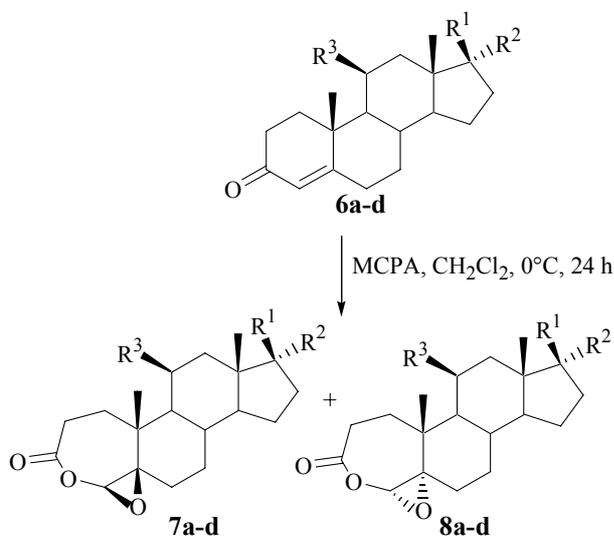
Il trattamento con acido *m*-cloroperbenzoico, a temperatura ambiente per due giorni, di sistemi steroidei simili, contenenti un gruppo ossidrilico in posizione C-3 o C-6, ha portato all'ottenimento dei corrispondenti enol lattoni come prodotti principali, insieme ad una miscela dei corrispondenti 4 β ,5 β -epossi lattoni (11%) e 4 α ,5 α -epossi lattoni (3%), risultanti, probabilmente, dalla ulteriore ossidazione degli enol lattoni, insieme a cospicue quantità di prodotto di partenza non reagito.²⁴²

Le procedure sintetiche presenti in letteratura consentono, quindi, di ottenere steroidi modificati contenenti il raggruppamento epossi lattonico, soltanto con basse rese ed in miscele complicate, insieme ad altri prodotti di ossidazione.^{241,242}

In questo contesto, lo scopo del lavoro è stato quello di sviluppare una nuova procedura sintetica basata sull'ossidazione dei Δ^4 -3-chetosteroidi con acido *m*-cloroperbenzoico, per l'ottenimento esclusivo di steroidi modificati con struttura epossi lattonica.

Al fine di determinare un percorso sintetico più efficace rispetto alle procedure riportate in letteratura, alcuni Δ^4 -3-chetosteroidi sono stati trattati con acido *m*-cloroperbenzoico (MCPA), in diclorometano a 0° C.²³⁹ Per evitare la formazione di prodotti indesiderati derivanti da ulteriori trasformazioni degli epossi lattoni,^{241,243} la reazione è stata costantemente controllata seguendo la scomparsa dei reagenti mediante TLC e GC-MS, e prontamente trattata subito dopo la totale conversione del substrato di partenza. La scelta della temperatura di 0° C è risultata altresì fondamentale per la esclusiva formazione degli epossi lattoni. Esperimenti riportati in letteratura hanno dimostrato, infatti, che l'uso di temperature più elevate porta al recupero di numerosi prodotti di reazione derivanti, presumibilmente, da ulteriori trasformazioni degli epossi lattoni,^{241,243} d'altro canto, quando la reazione è stata condotta a temperatura ambiente gli epossi lattoni sono stati recuperati con basse rese.²⁴⁶

Inizialmente la reazione è stata testata su un substrato steroideo non protetto contenente un gruppo ossidrilico in posizione C-17. In particolare, il testosterone (**6a**) è stato scelto come sistema modello e trattato con tre equivalenti di acido *m*-cloroperbenzoico, in diclorometano a 0°C, per 24 ore. La purificazione del grezzo di reazione, mediante cromatografia su colonna corta, ha portato al recupero degli epossilattoni **7a** e **8a** con rese del 63% e del 17%, rispettivamente (**Schema 5**, **Tabella 2**) e di un'esigua quantità di una miscela di entrambi i prodotti.



Schema 5. Conversione dei Δ^4 -3-chetosteroidi **6** nei corrispondenti epossilattoni **7** e **8**

Tabella 2. Conversione dei Δ^4 -3-chetosteroidi **6** nei corrispondenti epossilattoni **7** e **8**

	R ¹	R ²	R ³	7 Resa (%)	8 Resa (%)
6a	OH	H	H	63	17
6b	COCH ₃	H	H	67	12
6c	COCH ₃	OH	H	66	11
6d	OH	COCH ₂ OH	OH	68	14

Lo spettro ¹H-NMR del grezzo di reazione ha rivelato la presenza di **7a** e **8a** come unici prodotti di reazione. La sola differenza tra i due diastereoisomeri è rappresentata dal diverso valore dello spostamento chimico dell'idrogeno ossiriano, nei loro spettri ¹H-NMR. In particolare, l'idrogeno ossiriano dell'epossilattone **8a** cade a campi più alti (4.70 ppm) rispetto a quello di **7a** (4.78 ppm). D'altro canto, il differente valore dello spostamento chimico dell'idrogeno ossiriano è stato utilizzato,^{242,243} in letteratura, per distinguere i due diastereoisomeri, permettendo di assegnare, così, la stereochimica di **7a**

all'epossi lattone recuperato con resa più alta.

In un esperimento successivo **7a** è stato trattato con un eccesso di litio alluminio idruro, in tetraidrofurano anidro a refluxo. Questa reazione di riduzione ha portato alla formazione del composto **9a** che è stato recuperato con una resa del 75%, dopo purificazione del grezzo di reazione mediante cromatografia su colonna corta (**Figura 6**). La formazione di questo composto, derivante dall'apertura dell'anello ossiranicico e di quello lattonico, ha confermato la presenza della funzione epossilattonica sull'anello A del composto di partenza **7a**. La stereochimica di **9a** è stata assegnata assumendo che l'integrità di tutti i centri chirali non reattivi di **7a** rimanesse immutata.

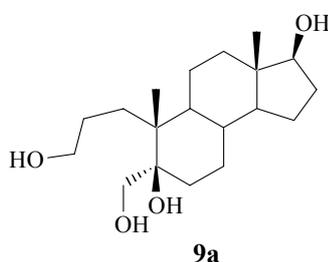


Figura 6. Struttura del derivato **9a**, ottenuto per riduzione dell'epossi lattone **7a**

Successivamente la reazione di ossidazione è stata estesa ad altri sistemi. In particolare, i Δ^4 -3-chetosteroidi **6b-d** sono stati trattati con acido *m*-cloroperbenzoico nelle stesse condizioni sperimentali adottate per **7a** ed i corrispondenti epossilattoni **7b-d** e **8b-d** sono stati recuperati con rese comprese tra il 66 e il 68% e l'11 e il 14%, rispettivamente (**Schema 5**, **Tabella 2**). In tutte le reazioni, la purificazione del grezzo mediante cromatografia su colonna corta, ha portato al recupero di una piccola quantità di una miscela dei due diastereoisomeri.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del grezzo di ciascuna reazione, ha rivelato la presenza di **7b-d** e **8b-d** come unici prodotti di reazione. Anche in questo caso, il differente valore dello spostamento chimico dell'idrogeno ossiranicico, osservato per i composti **7b-d** e **8b-d** nei loro spettri $^1\text{H-NMR}$, è stato utilizzato^{242,243} per distinguere i due diastereoisomeri. Questi esperimenti hanno dimostrato che la presenza dei gruppi funzionali in C-11 e C-17 e della catena funzionalizzata in C-17 non hanno avuto alcun effetto sul decorso della reazione di ossidazione.

In definitiva, la metodologia sviluppata consente l'ottenimento di steroidi modificati, aventi una struttura epossilattonica a sette termini sull'anello A, come unici prodotti della reazione di ossidazione dei corrispondenti Δ^4 -3-chetosteroidi. La procedura

consente il recupero e la separazione di epossilattoni con stereochimica definita; tali composti costituiscono utili precursori per l'ottenimento di nuove molecole a struttura steroidea, realizzate attraverso ulteriori elaborazioni dell'anello A. La reazione di riduzione che porta alla formazione del composto **9a**, costituisce, tra l'altro, una prova preliminare del potenziale utilizzo degli epossilattoni come intermedi per la sintesi di steroidi modificati con l'anello A aperto.²³⁹

3.2. SINTESI DI N-METIL- β^3 -AMMINOACIDI

Un'altra importante classe di biomolecole, anch'essa coinvolta in un ampio spettro di attività biologiche, è rappresentata da amminoacidi e peptidi naturali.

Negli ultimi anni sono stati scoperti e caratterizzati numerosi peptidi biologicamente attivi che, mediante interazioni con opportuni recettori, regolano le cellule in una serie di funzioni vitali quali il metabolismo, le difese immunitarie, la proliferazione cellulare. Molti peptidi, inoltre, sono coinvolti nella patogenesi e nel controllo di diverse malattie.

L'importanza del ruolo svolto dai peptidi endogeni in molteplici processi biologici dell'organismo, ha guidato da sempre l'interesse della comunità scientifica verso lo studio e l'utilizzo dei peptidi in campo medico e farmaceutico.

Tuttavia, i numerosi tentativi di impiegare i peptidi naturali come agenti terapeutici sono spesso falliti. Le limitazioni principali sono rappresentate dal rapido metabolismo di questi composti in seguito a proteolisi, sia nel tratto gastrointestinale che nel siero, dallo scarso assorbimento dopo somministrazione orale, dalla difficoltà ad attraversare le barriere biologiche come, ad esempio, la barriera ematoencefalica nel caso di peptidi che agiscono sul sistema nervoso centrale. In particolare, l'ostacolo principale che limita il potenziale terapeutico dei peptidi è rappresentato dall'azione metabolica degli enzimi idrolitici. Le peptidasi sono enzimi ubiquitari che, soprattutto nel tratto gastrointestinale, scindono velocemente i peptidi in frammenti più piccoli rendendoli completamente inattivi.

In questo contesto, diventa, quindi, importante disporre di analoghi sintetici dei peptidi endogeni capaci di mimarne gli effetti a livello dei recettori cellulari, ed, al contempo, dotati di una maggiore stabilità metabolica, una migliore biodisponibilità, una più alta affinità e selettività recettoriale.

La larga disponibilità e la facile reperibilità dei peptidi naturali ne permette l'utilizzo e l'elaborazione per l'ottenimento di peptidi modificati; in particolare, la sintesi di peptidomimetici,^{247,248} ottenuti attraverso una modifica strutturale del peptide nativo, determina un miglioramento di alcuni parametri farmaceutici quali la stabilità *in vivo*, la solubilità, la permeabilità alle membrane e la biodisponibilità.

Recentemente, nell'ambito di studi finalizzati alla ricerca di analoghi sintetici di peptidi naturali dotati di incrementata attività e stabilità metabolica, la sintesi di peptidi modificati contenenti β^3 -amminoacidi come componenti strutturali chiave ha attirato in

maniera considerevole l'attenzione dei ricercatori: questi peptidi, infatti, presentano interessanti caratteristiche strutturali¹⁵⁸ ed importanti proprietà farmacologiche.¹⁵⁹

Nella progettazione di peptidomimetici contenenti β^3 -amminoacidi, gli approcci frequentemente usati vanno dall'incorporazione di un singolo β^3 -amminoacido in un peptide standard costituito da α -amminoacidi, alla sintesi di peptidi composti interamente da β^3 -amminoacidi e conosciuti come β^3 -peptidi.^{156,157} Questi ultimi sono in grado di formare, in solvente acquoso, stabili strutture ad elica, anche nel caso di oligomeri relativamente corti costituiti solo da 6-8 residui; oligomeri di lunghezza simile composti esclusivamente da α -amminoacidi non formano, invece, eliche stabili.

L'incorporazione di β^3 -amminoacidi in sequenze peptidiche consente di ottenere non solo ben definite strutture secondarie,¹⁶⁰⁻¹⁶⁵ ma anche eccellente stabilità e resistenza metabolica. Peptidi contenenti β^3 -amminoacidi sono, infatti, generalmente molto stabili all'idrolisi enzimatica¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ a causa dell'incapacità di proteasi e peptidasi di scindere i legami ammidici adiacenti ai β^3 -amminoacidi.^{179,180} Un altro aspetto non trascurabile è rappresentato dall'osservazione che i β^3 -amminoacidi non sono mutagenici. Tutte queste caratteristiche fanno sì che i β^3 -peptidi siano promettenti candidati come peptidomimetici, per applicazioni farmaceutiche. La *N*-metilazione di β^3 -amminoacidi ed il loro successivo inserimento in catene peptidiche possono consentire l'ottenimento di analoghi sintetici che mostrano una maggiore attività biologica, stabilità metabolica, biodisponibilità e durata d'azione. La sostituzione di un atomo di idrogeno con un gruppo metilico sull'atomo di azoto, blocca i siti capaci di formare legami a idrogeno inter- ed intramolecolari e determina un cambiamento della conformazione del peptide, conferendogli una minore flessibilità e modificandone, di conseguenza, l'intensità dell'attività biologica.¹⁸¹ È stato dimostrato che l'incorporazione di un *N*-alchil amminoacido in un peptide riduce le conformazioni accessibili al legame C-C(O) del precedente residuo amminoacidico.²⁴⁹ Inoltre, l'ingombro sterico, generato dall'introduzione del gruppo metilico sull'atomo di azoto, blocca i potenziali siti di scissione degli enzimi proteolitici. Queste proprietà, insieme con l'aumentata idrofobicità, possono accrescere il potenziale terapeutico del peptide.

La sostituzione di un atomo di idrogeno con un gruppo metilico sull'azoto negli *N*-metil- β^3 -amminoacidi, influisce notevolmente anche sulla conformazione del peptide di cui fa parte e quindi, se si tratta di molecole d'interesse biologico, ciò influenza considerevolmente l'interazione di queste con lo specifico recettore. Ne consegue che,

l'inserimento in sequenze peptidiche di tali building block viene spesso presa in considerazione qualora si cerchi di ottenere degli analoghi sintetici di peptidi naturali con un'attività biologica migliore.

In particolare, questa modifica si è rivelata particolarmente efficace¹⁸⁶ nella sintesi di analoghi della Dermorfina (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂),¹⁸⁷ un potente analgesico isolato dalla pelle di un anfibio del Sud America (*Phyllomedusa sauvagei*). La Dermorfina mostra una potente affinità e un'elevata selettività nei confronti dei recettori μ -oppioidi e queste proprietà si sono dimostrate superiori a quelle della morfina stessa. La più piccola sequenza della Dermorfina dotata di attività analgesica è rappresentata dalla porzione tetrapeptidica *N*-terminale (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly).¹⁸⁸

Tuttavia, l'impiego di analgesici peptidici ha, in genere, una limitata efficacia *in vivo* attribuibile alla loro facile degradazione da parte di differenti proteasi: questo, naturalmente, si traduce in una minore durata dell'effetto analgesico rispetto a quello provocato dalla morfina.

Alcuni analoghi tetrapeptidici della Dermorfina, in cui il residuo amminoacidico C-terminale in posizione 4 è sostituito dall'*N*-metil- β -alanina, mostrano un'azione analgesica più potente e di più lunga durata rispetto a quella della morfina, in seguito a somministrazione orale.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ L'introduzione in questi peptidi di un *N*-metil- β -amminoacido determina, infatti, una maggiore stabilità alla degradazione enzimatica¹⁹²⁻¹⁹⁴ ed un'incrementata attività analgesica attribuibile a fattori conformazionali.

Inoltre, nell'ambito dello studio delle possibili soluzioni conformazionali adottate dalle catene peptidiche in soluzione, i β^3 -amminoacidi *N*-metilati potrebbero essere utili strutture di base per lo sviluppo di nuovi foldameri.^{183,199}

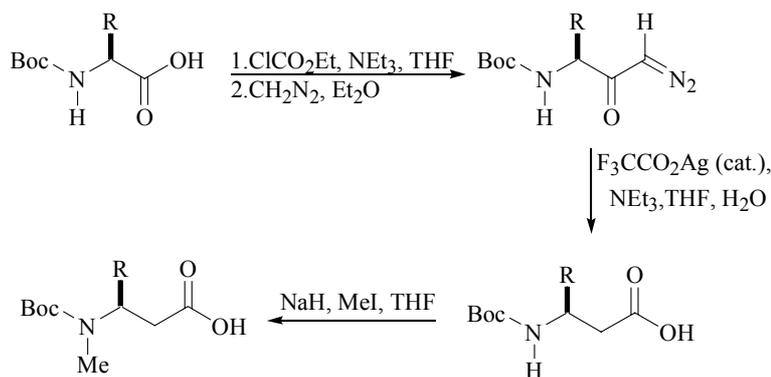
Alcuni *N*-metil- β -amminoacidi sono stati anche utilizzati per comprendere i meccanismi coinvolti nella regolazione dei sistemi di trasporto gastrointestinali ad alta affinità di β -amminoacidi, in organismi umani ed animali.²⁵⁰

In questo contesto, diventa, quindi, importante disporre di una procedura agevole che consenta di ottenere *N*-metil- β^3 -amminoacidi otticamente attivi.

Sono conosciuti pochi metodi per la sintesi in soluzione di *N*-metil- β^3 -amminoacidi; alcuni di questi approcci sintetici sono caratterizzati, tra l'altro, da tempi di reazione lunghi e/o condizioni di reazione drastiche.

In letteratura è riportata la *N*-metilazione di β^3 -amminoacidi, protetti sulla

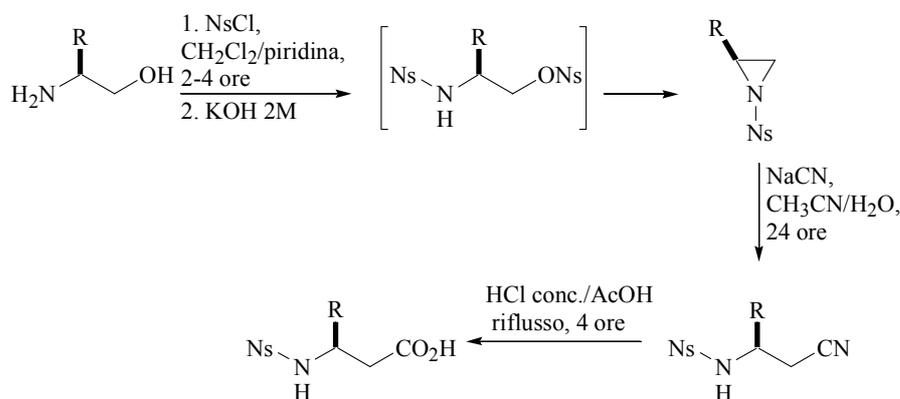
funzione amminica con il gruppo *tert*-butilossicarbonile (Boc), ottenuti dai corrispondenti α -amminoacidi attraverso l'omologazione di Arndt-Eistert:^{201,202} questa procedura, sebbene sia più conveniente dell'omologazione di *N*-metil- α -amminoacidi Boc-protetti,²⁰⁵ risulta spesso problematica e richiede un'attenta scelta delle condizioni di reazione per ottenere buone rese (**Schema 6**).



Schema 6. *N*-Metilazione di *N*-Boc- β^3 -amminoacidi ottenuti dai corrispondenti α -amminoacidi attraverso l'omologazione di Arndt-Eistert.

Un'altra metodologia per l'ottenimento di *N*-metil- β^3 -amminoacidi, prevede l'apertura con ioni cianuro dell'anello di *N*-(*p*-nitrobenzensolfonil)-aziridine (*N*-nosil aziridine), facilmente ottenute dai corrispondenti 1,2-ammino alcoli.²⁰⁶

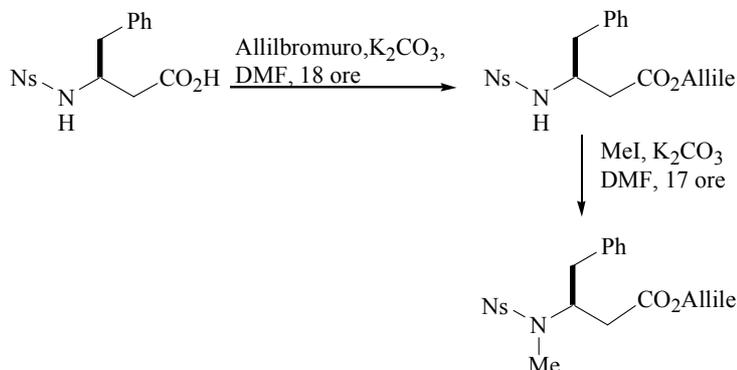
Gli *N*-nosil- β^3 -amminonitrili, ottenuti, vengono, successivamente, idrolizzati per dare i corrispondenti *N*-nosil- β^3 -amminoacidi (**Schema 7**).



Schema 7. Sintesi di *N*-nosil- β^3 -amminoacidi mediante apertura nucleofila regioselettiva delle corrispondenti *N*-nosil aziridine

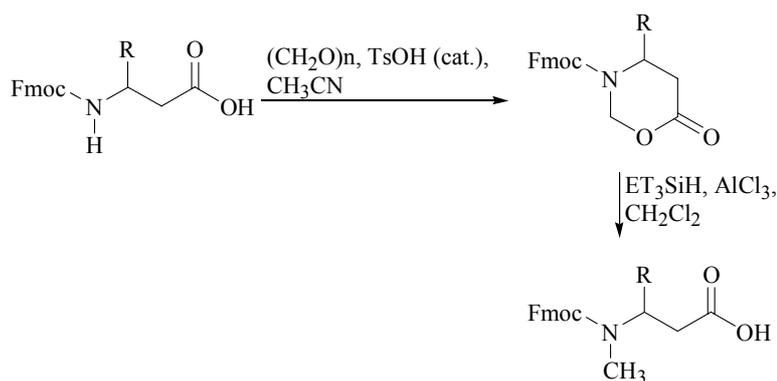
L'*N*-nosil- β^3 -omofenilalanina, ottenuta secondo la suddetta procedura, è stata

convertita nel corrispondente estere allilico e, successivamente, metilata per trattamento con CH_3I e K_2CO_3 (**Schema 8**).²⁰⁶



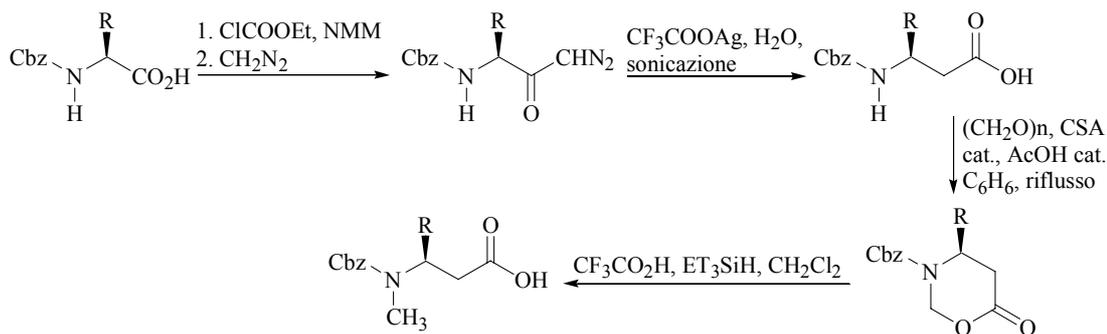
Schema 8. Metilazione dell'*N*-nosil- β^3 -omofenilalanina.

Recentemente è stata riportata una procedura che permette la conversione di β^3 -amminoacidi protetti sulla funzione amminica con il gruppo fluorenilmetossicarbonile (Fmoc), nei corrispondenti derivati metilati sulla funzione amminica. Questo metodo prevede, inizialmente, la formazione degli intermedi 1,3-ossazinan-6-oni, ottenuti per trattamento dei corrispondenti *N*-Fmoc- β^3 -amminoacidi con formaldeide; dalla riduzione di questi ultimi con trietilsilano, in presenza di AlCl_3 , si ottengono i corrispondenti *N*-Fmoc-*N*-metil- β^3 -amminoacidi (**Schema 9**).²¹⁹



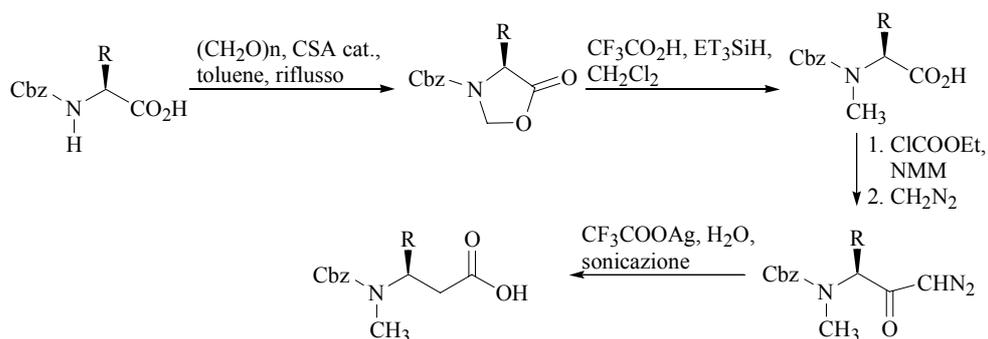
Schema 9. Sintesi di *N*-Fmoc-*N*-metil- β^3 -amminoacidi mediante riduzione dei corrispondenti ossazinanoni

Anche gli *N*-metil- β^3 -amminoacidi protetti sulla funzione amminica con il gruppo benzilossicarbonilico (Cbz), sono stati ottenuti mediante riduzione dei corrispondenti ossazinanoni (**Schema 10**).^{222,223}



Schema 10. Sintesi degli *N*-Cbz-*N*-metil-β³-omoaminoacidi mediante riduzione dei corrispondenti ossazinanoni

Un altro approccio impiegato per la sintesi di *N*-Cbz-*N*-metil-β³-amminoacidi prevede l'iniziale conversione degli *N*-Cbz-α-amminoacidi nei corrispondenti 1,3-ossazolidin-5-oni.²³⁰ La riduzione di questi ultimi con trietilsilano, in presenza di acido trifluoroacetico, fornisce i corrispondenti *N*-metil-α-amminoacidi, che sono, successivamente omologati mediante la procedura di Arndt-Eistert (**Schema 11**).^{223,230,231}



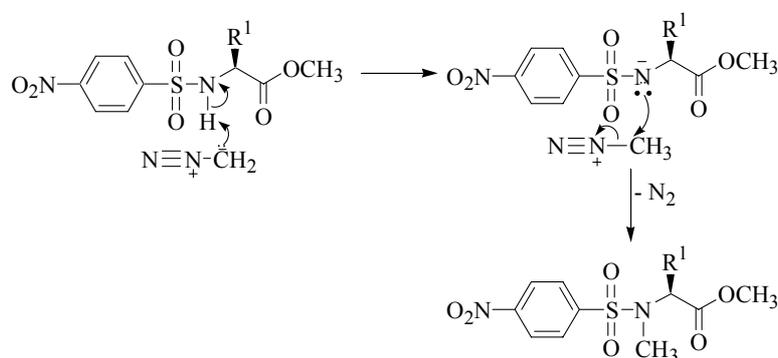
Schema 11. Sintesi di *N*-Cbz-*N*-metil-β³-amminoacidi mediante omologazione di *N*-metil-α-amminoacidi, ottenuti per riduzione dei corrispondenti 1,3-ossazolidin-5-oni

Nel presente lavoro di tesi di dottorato di ricerca è stata progettata e realizzata una strategia alternativa di sintesi in soluzione, che permette l'ottenimento di *N*-metil-β³-amminoacidi chirali a partire dai corrispondenti α-amminoacidi, in pochi stadi sintetici ed evitando l'utilizzo di condizioni di reazione drastiche.^{251,252} Tale strategia è basata sull'utilizzo del gruppo 4-nitrobenzensolfonile (nosile) quale gruppo protettore della funzione amminica.

Nella sintesi peptidica, sia in fase solida che in soluzione, i gruppi orto e para nitrobenzensolfonilici sono usati soprattutto come gruppi protettori/attivanti per la *N*-alchilazione di peptidi,^{253,254} α-amminoacidi²⁵⁵ e derivati.²⁵⁶

In particolare, il gruppo nosile è stato utilizzato per la sintesi di *N*-metil-α-

ammino esteri, sia attraverso il trattamento degli esteri metilici degli *N*-nosil- α -amminoacidi con ioduro di metile in presenza di carbonato di potassio come base,²⁵⁷ sia attraverso l'alchilazione diretta degli stessi con diazometano.²⁵⁸ Attualmente quest'ultima metodologia, messa a punto nel nostro laboratorio, viene considerata come uno degli approcci più idonei per l'ottenimento di *N*-metil- α -amminoacidi ed *N*-metil peptidi in soluzione.²⁵⁹ Il gruppo protettore nosile, essendo fortemente elettronattrattore, aumenta la reattività della funzione solfonammidica nei confronti del diazometano, permettendo la formazione dello ione metil diazonio responsabile della metilazione (**Schema 12**).



Schema 12. Meccanismo della *N*-metilazione mediante diazometano.

Il diazometano è risultato, pertanto, un reagente molto efficace per la metilazione della funzione α -amminica di esteri metilici di α -amminoacidi *N*-nosil protetti. La reazione di metilazione è quantitativa, veloce e non comporta alcuna racemizzazione dei prodotti finali. Questa stessa procedura è stata anche utilizzata con successo per la *N*-metilazione sito-specifica di sistemi peptidici in soluzione.²⁶⁰

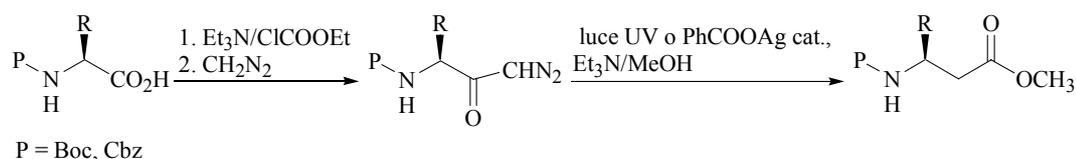
Tenendo conto che la reazione di Arndt-Eistert è considerata il metodo più vantaggioso per la preparazione di acidi omologati,²⁶¹ si è pensato di progettare e realizzare una semplice procedura di sintesi in soluzione che permettesse l'ottenimento di *N*-metil- β^3 -amminoacidi con pochi stadi sintetici ed in condizioni di reazione blande. Tale strategia di sintesi, basata sull'utilizzo del diazometano come agente metilante e del gruppo *p*-nitrobenzensolfonile come gruppo protettore/attivante della funzione amminica, prevede la diretta omologazione di α -amminoacidi ad *N*-metil- β^3 -amminoacidi, mediante la procedura di Arndt-Eistert.²⁵¹

L'omologazione di α -amminoacidi protetti sulla funzione amminica ed otticamente attivi, attraverso la trasposizione di Wolff dei corrispondenti diazochetoni, è

ben nota in letteratura.²⁶²⁻²⁶⁴ Le caratteristiche di facile reperibilità, basso costo ed elevata purezza enantiomerica degli α -amminoacidi naturali, hanno reso, infatti, tali substrati i materiali di partenza ideali per la preparazione di β^3 -amminoacidi.²⁶²

L'acilazione di diazoalcani attraverso l'uso dei cloruri degli acidi carbossilici, rappresenta una procedura comune per la sintesi di α -diazochetoni.^{265,266} Tale procedura di attivazione della funzione carbossilica non può essere utilizzata per *N*-Boc ed *N*-Cbz amminoacidi a causa della ben nota limitata stabilità dei corrispondenti cloruri che spontaneamente decompongono nelle anidridi di Leuch.²⁶³

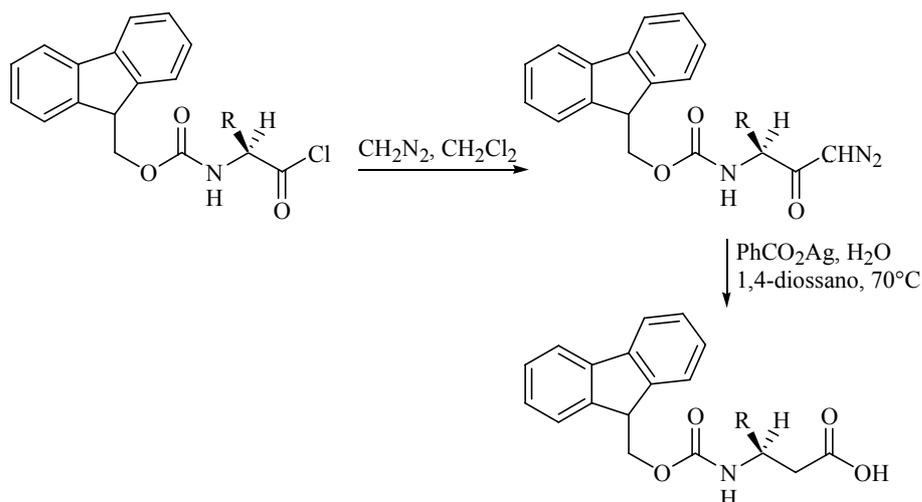
Come illustrato nello Schema 13, α -amminoacidi protetti sulla funzione amminica con il gruppo Cbz o Boc sono facilmente convertiti nei corrispondenti amminoacildiazometani mediante reazione delle relative anidridi miste con diazometano.^{267,268} Il successivo riarrangiamento di Wolff del diazochetone, contenente un centro chirale adiacente al gruppo carbonilico, avviene con ritenzione della configurazione.



Schema 13. Conversione di *N*-Boc- o *N*-Cbz- α -amminoacidi nei corrispondenti β^3 -ammino esteri.

Tuttavia, il metodo di attivazione della funzione carbossilica via anidridi miste è caratterizzato da numerose difficoltà relative alla preparazione di tali substrati e al loro successivo utilizzo;²⁶³ la conversione degli α -amminoacidi *N*-Boc ed *N*-Cbz protetti nei corrispondenti diazochetoni, attraverso la reazione delle anidridi miste con diazometano, è di fatto caratterizzata da basse rese. Miscele racemiche degli α -amminoacidi di partenza e dei corrispondenti esteri metilici sono spesso ottenute come prodotti secondari.²⁶⁷

L'impiego della protezione Fmoc permette, a differenza delle protezioni Z e Boc, di attivare la funzione carbossilica degli α -amminoacidi come cloruro, superando i problemi legati all'utilizzo delle anidridi miste. Recentemente i cloruri degli *N*-Fmoc- α -amminoacidi sono stati utilizzati con successo nella reazione di acilazione del diazometano; gli *N*-Fmoc- α -amminoacildiazometani ottenuti sono stati convertiti nei corrispondenti β^3 -amminoacidi mediante riarrangiamento di Wolff (**Schema 14**).²⁶¹

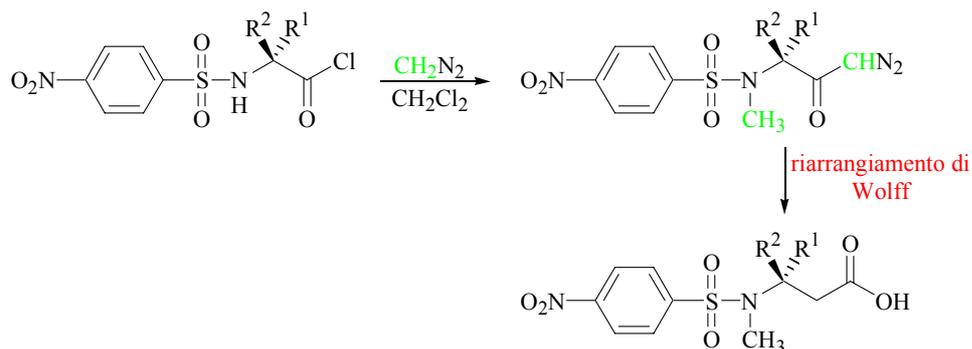


Schema 14. Sintesi di *N*-Fmoc- β^3 -amminoacidi a partire dai cloruri degli *N*-Fmoc- α -amminoacidi corrispondenti

In questo contesto, la stabilità del gruppo 4-nitrobenzensolfonile in ambiente acido ha suggerito che una strategia di sintesi basata sull'impiego della protezione nosile per gli α -amminoacidi, poteva consentire di utilizzare come substrati di partenza nella sintesi di Arndt-Eistert i cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi che sono facili da preparare e piuttosto stabili.²⁶⁰

I vantaggi legati all'utilizzo di tali composti sono rappresentati dalla facilità di esecuzione e dall'elevata velocità della procedura di sintesi dell'amminoacido attivato, dalle alte rese di reazione nonché, altro elemento non trascurabile, dall'agevole disponibilità dei reagenti e dai bassi costi. Ma l'aspetto più importante è sicuramente rappresentato dall'impossibilità dei cloruri degli *N*-arilsolfonilamminoacidi di racemizzare attraverso la formazione dell'ossazolone.²⁶⁹

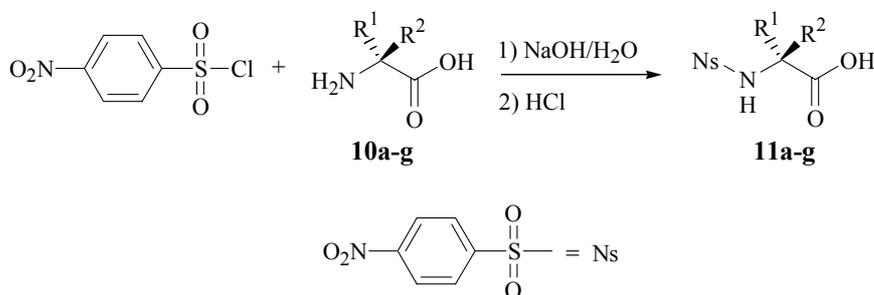
Il successivo trattamento dei cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi con diazometano dovrebbe consentire, in un unico stadio, non solo l'ottenimento dell'atteso α -diazochetone per addizione del diazometano al cloruro, ma anche la selettiva metilazione della funzione amminica protetta con il gruppo nosile. Ci si aspetta, infatti, che il diazometano si comporti da nucleofilo sul carbonio carbonilico attivato, ed anche da base sulla funzione solfonammidica. Di conseguenza, la *N*-metilazione, resa possibile dall'incremento dell'acidità della funzione NH dovuta alla presenza della protezione nosile, dovrebbe verificarsi direttamente durante l'acilazione del diazometano (**Schema 15**).



Schema 15. Ipotesi di lavoro: impiego dei cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi nella sintesi di Arndt-Eistert

La formazione, in un unico passaggio, dell'*N*-metildiazochetone renderebbe, perciò, non necessario un secondo stadio sintetico che invece è previsto in tutte le classiche procedure riportate in letteratura per la preparazione degli *N*-metil- β^3 -amminoacidi.

Al fine di verificare tale ipotesi, sono stati preparati e sperimentati un certo numero di α -amminoacidi protetti sulla funzione amminica con il gruppo nosile. In un esperimento tipico la L-valina (**10a**), scelta come substrato modello, è stata sospesa in acqua distillata e completamente solubilizzata mediante addizione di NaOH 1 N. Il cloruro dell'acido *p*-nitrobenzensolfonico è stato, poi, aggiunto lentamente alla soluzione, mantenendo il pH della miscela di reazione a circa 9 per piccole aggiunte della soluzione acquosa di NaOH (**Schema 16**).²⁶⁰ Gli estratti organici, ottenuti a seguito dell'acidificazione della soluzione acquosa, consentono il recupero dell'*N*-(4-nitrobenzensolfonil)-L-valina (**11a**) con una resa dell'86% (**Tabella 3**).



Schema 16. Protezione della funzione amminica degli α -amminoacidi **10a-g** con il gruppo nosile

Tabella 3. Sintesi degli *N*-(4-nitrobenzensolfonil)- α -amminoacidi **11a-g**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
11a	H	CH(CH ₃) ₂	86%
11b	H	CH ₃	84%
11c	CH ₃	H	67%
11d	H	CH ₂ (C ₆ H ₅)	65%
11e	H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	84%
11f	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	85%
11g	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	84%

La caratterizzazione del prodotto è stata realizzata mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare protonica, GC-MS, IR e ¹³C-NMR.

Nello spettro ¹H-NMR di **11a** è possibile distinguere due doppietti a 0.78 ppm e a 0.83 ppm caratteristici dei due gruppi metilici diastereotopici della valina. Il protone metinico del gruppo isopropilico della catena laterale è rappresentato da un multipletto che risuona a 1.89-2.10 ppm. È possibile, inoltre, distinguere un doppietto di doppietti a 3.60 ppm relativo al protone legato al carbonio in α alla funzione carbossilica e due doppietti a 8.03 ppm e a 8.38 ppm attribuibili ai protoni aromatici del nosile. Il doppietto a 8.49 ppm è relativo all'idrogeno solfonammidico, mentre il singoletto broad a 12.70 ppm è caratteristico del protone carbossilico.

L'analisi GC-MS del prodotto grezzo di reazione è stata effettuata previa conversione dell'*N*-nosil-L-valina (**11a**) nel corrispondente estere metilico mediante aggiunta di una soluzione di diazometano ad un campione dell'*N*-nosil- α -amminoacido; questa trasformazione è stata realizzata allo scopo di rendere il composto più volatile. Un vantaggio nell'utilizzo del gruppo protettore nosile rispetto agli altri gruppi protettori della funzione amminica (Fmoc, Boc) utilizzati nella sintesi peptidica è, infatti, rappresentato dalla possibilità di monitorare le reazioni e verificare la purezza dei prodotti mediante analisi GC-MS. Caratteristica dei prodotti nosil protetti è la presenza nei corrispettivi spettri di massa dei picchi tipici della frammentazione del gruppo nosile a m/z 186 e a m/z 122.

In particolare, lo spettro di massa (EI) dell'estere metilico del composto **11a** è caratterizzato dal picco relativo allo ione molecolare (M^+) a m/z 316. La perdita del radicale isopropile dallo ione molecolare giustifica la presenza del frammento a m/z 273. Il picco base dello spettro a m/z 257 è relativo al frammento che si origina per perdita del

Il prodotto di reazione **13a** è stato caratterizzato mediante $^1\text{H-NMR}$ (Figura 7) e $^{13}\text{C-NMR}$.

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ di **13a** è possibile distinguere due doppietti a 0.66 ppm e a 0.93 ppm caratteristici dei due gruppi metilici diastereotopici della valina. Il protone metinico del gruppo isopropilico della catena laterale è rappresentato da un multipletto che risuona a 2.15-2.29 ppm. È possibile, inoltre, distinguere un singoletto a circa 2.90 ppm, caratteristico dei protoni del gruppo NCH_3 , che conferma l'avvenuta metilazione ed un doppietto a 3.92 ppm relativo al protone legato al carbonio in α alla funzione carbonilica. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ presenta, come segnale caratteristico del diazochetone, un singoletto a circa 5.57 ppm corrispondente all'idrogeno del gruppo CHN_2 . I due multipletti a 7.97-8.04 e a 8.34-8.41 sono relativi ai protoni aromatici del nosile.

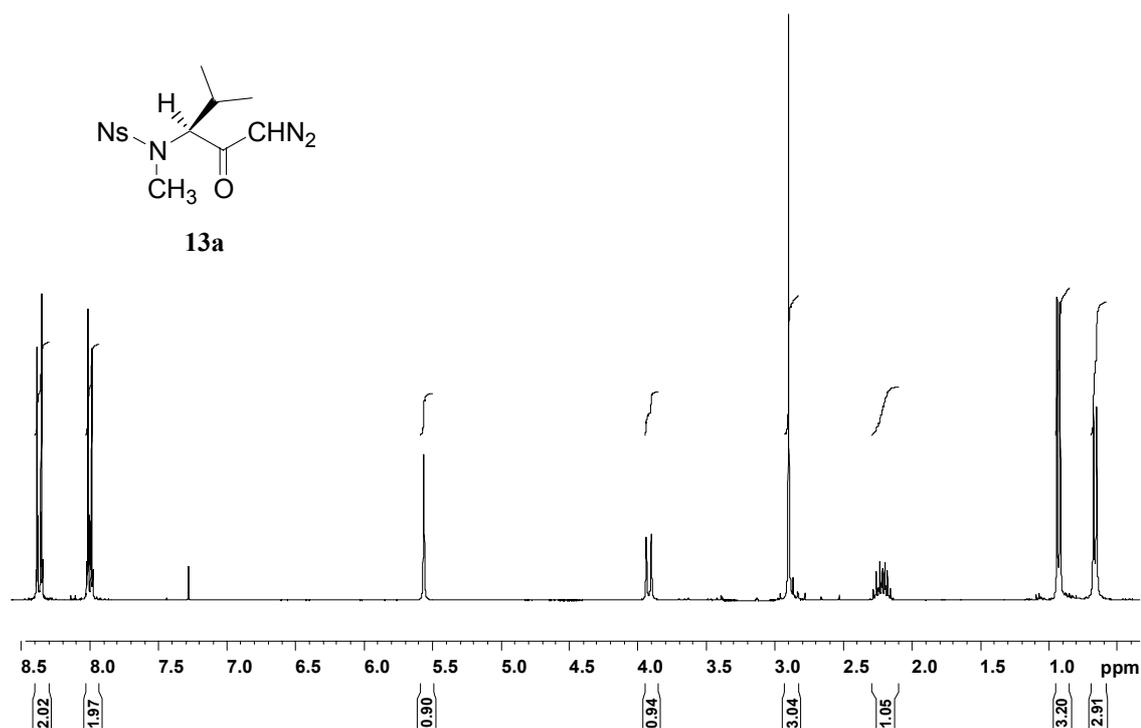


Figura 7. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) dell'*N*-metil-*N*-nosil-*L*-valildiazometano (**13a**)

Il trattamento, nelle stesse condizioni, dei cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi **12b-g** (Schema 18) ha portato alla formazione dei corrispondenti *N*-metil-*N*-(4-nitrobenzensolfonil)- α -amminoacildiazometani **13b-g** con rese comprese tra il 73% e il 89% (Tabella 5).²⁵¹

La formazione in un unico stadio dei composti **13b-g**, dovuta alla metilazione della funzione solfonammidica che si verifica simultaneamente durante l'acilazione del

diazometano, è stata confermata mediante spettroscopia di risonanza magnetica protonica. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ di ciascuno di questi composti presenta in tutti i casi singoletti che risuonano nei range di 2.81-2.92 e di 5.50-5.83 ppm, attribuibili al gruppo metilico sulla funzione amminica ed al protone del gruppo CHN_2 , rispettivamente.

Quindi il semplice trattamento dei cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi con diazometano consente di realizzare, in un singolo stadio, la sintesi degli *N*-metil-*N*-(4-nitrobenzensolfonil)- α -amminoacildiazometani precursori per l'ottenimento, nella successiva fase di omologazione, dei β^3 -amminoacidi corrispondenti, metilati sulla funzione amminica.

Per verificare l'assenza di racemizzazione nel processo di formazione degli *N*-metil-*N*-(4-nitrobenzensolfonil)- α -amminoacildiazometani, sono stati sintetizzati, con la metodologia già definita, gli *N*-metil-*N*-nosil- α -diazochetoni della *L*-isoleucina (**13e**, **Schema 18**) e della *D-allo*-isoleucina (**13f**). I due composti **13e** e **13f**, ottenuti rispettivamente con una resa dell'81% e dell'89% (**Tabella 5**), presentano due centri chirali, uno sulla catena laterale ed uno in posizione α rispetto al gruppo carbossilico e differiscono unicamente per la configurazione di quest'ultimo stereocentro. Qualora nei vari stadi di reazione ci fosse racemizzazione sullo stereocentro in α al carbonile, questo comporterebbe la formazione di un nuovo prodotto diastereoisomero del primo. Al fine di verificare la differenziazione dei segnali $^1\text{H-NMR}$ dei diastereoisomeri **13e** e **13f**, è stata predisposta una miscela dei due composti. Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ (**Figura 8**) della miscela dei prodotti di reazione, si può notare che i due diastereoisomeri si differenziano nettamente:

- nello spostamento chimico dei gruppi metilici in catena laterale;
- nello spostamento chimico relativo al protone legato al carbonio in α alla funzione carbonilica, per il quale è possibile distinguere un doppietto a 4.03 ppm per **13e**, ed un doppietto a 4.01 ppm per **13f**;
- nello spostamento chimico relativo all'idrogeno del gruppo CHN_2 , che è rappresentato da un singoletto a 5.50 ppm per **13e** e da un singoletto a 5.55 ppm per **13f**.

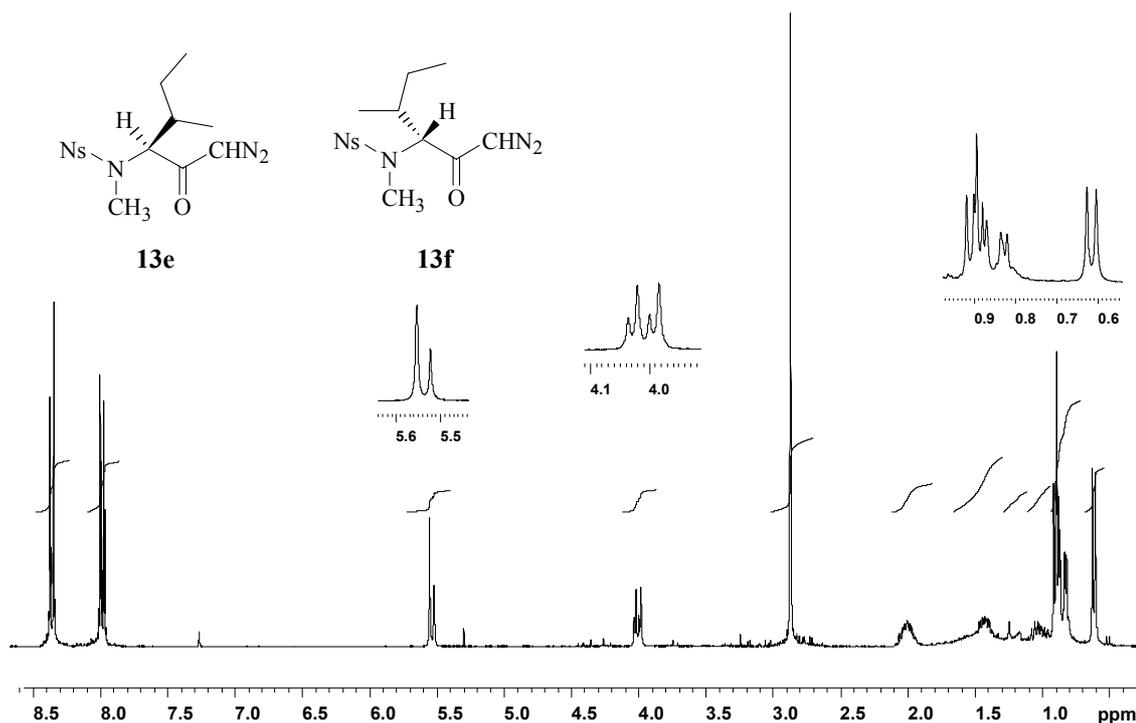


Figura 8. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) della miscela dell'*N*-metil-*N*-nosil-L-isoleucildiazometano (**13e**) e dell'*N*-metil-*N*-nosil-D-allo-isoleucildiazometano (**13f**)

Il confronto dello spettro $^1\text{H-NMR}$ della miscela (**Figura 8**) con gli spettri $^1\text{H-NMR}$ di **13e** (**Figura 9**) e di **13f** (**Figura 10**) esclude la presenza in ciascun grezzo di reazione dell'altro diastereoisomero.

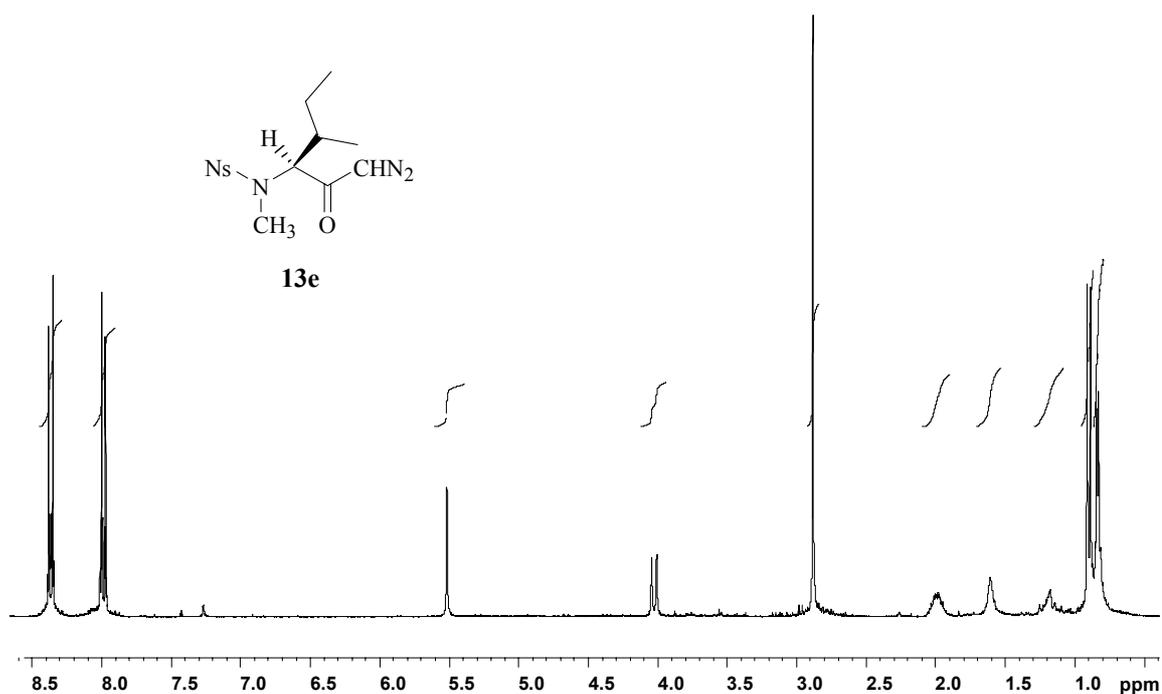


Figura 9. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) dell'*N*-metil-*N*-nosil-L-isoleucildiazometano (**13e**)

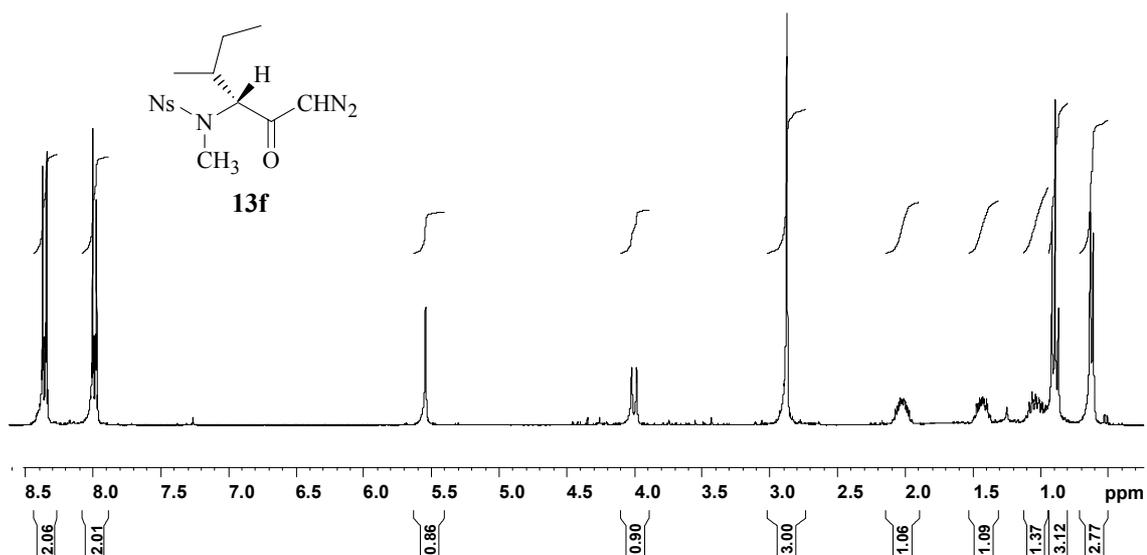
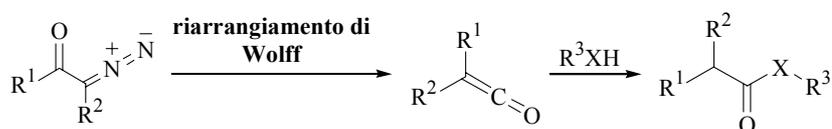


Figura 10. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) dell'*N*-metil-*N*-nosil-*D*-allo-isoleucildiazometano (**13f**)

Anche lo spettro $^{13}\text{C-NMR}$ della miscela dei due diastereoisomeri mostra che i composti si differenziano nettamente per i segnali relativi a cinque dei sette atomi di carbonio alifatici e per un segnale dei quattro complessivi relativi ai carboni aromatici. Ciascuno degli spettri $^{13}\text{C-NMR}$ dei due diastereoisomeri mostra segnali relativi ad una sola molecola e cioè sette segnali per i carboni alifatici, quattro per quelli aromatici ed uno per il carbonio carbonilico. Questi risultati dimostrano, quindi, che la stereochimica di tutti i centri chirali è totalmente mantenuta durante la reazione di formazione degli *N*-metil-*N*-(4-nitrobenzensolfonil)- α -amminoacildiazometani.

Una volta ottenuti gli *N*-metil-*N*-nosil- α -amminoacildiazometani, si è proceduto alla loro conversione nei corrispondenti *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi, mediante la trasposizione di Wolff.

Il riarrangiamento di Wolff²⁷² dei composti α -diazocarbonilici rappresenta il passaggio principale nella reazione di omologazione di Arndt-Eistert degli acidi carbossilici. Il riarrangiamento dell' α -diazochetone prevede una migrazione stereospecifica del gruppo R^1 che segue o accompagna la perdita di azoto (**Schema 19**); il chetene che ne deriva può reagire con diversi nucleofili (R^3XH) con conseguente formazione di acidi carbossilici omologati o derivati.²⁷³



Schema 19. Riarrangiamento di Wolff

L'applicazione del riarrangiamento di Wolff ai diazochetoni derivanti da α -amminoacidi è stata ben documentata.²⁷² Poiché nella maggior parte dei casi il riarrangiamento procede con ritenzione di configurazione del centro chirale adiacente al gruppo carbonilico, questo approccio è stato applicato nella sintesi di β^3 -amminoacidi otticamente puri attraverso la sequenza di reazioni di omologazione di Arndt-Eistert dei corrispondenti α -amminoacidi. È stato, in genere, osservato che, se il riarrangiamento è realizzato in un mezzo acquoso, l'acido omologato è il prodotto atteso, mentre se la reazione avviene in metanolo o ammoniaca, sarà ottenuto il corrispondente estere omologato o l'ammide.²⁷²

Si è pensato che, in maniera analoga, gli *N*-metil-*N*-nosil- α -amminoacildiazometani, sottoposti al riarrangiamento di Wolff, potessero essere facilmente convertiti nei corrispondenti *N*-metil- β^3 -amminoacidi nosil protetti (**Schema 15**). A tale proposito, è stata realizzata una serie di esperimenti per ottimizzare le condizioni di reazione, usando come sistema di riferimento l'*N*-metil-*N*-nosil-L-alanildiazometano.

La reazione di omologazione è stata inizialmente realizzata applicando le condizioni sperimentali già riportate in letteratura per la preparazione degli *N*-Fmoc- β^3 -amminoacidi a partire dai corrispondenti *N*-Fmoc- α -amminoacildiazometani.^{261,274}

L'*N*-metil-*N*-nosil-L-alanildiazometano (**13b**) è stato solubilizzato in una miscela di 1,4-diossano ed acqua ed è stato trattato alla temperatura di 70°C con una quantità catalitica di benzoato d'argento. L'andamento della reazione è stato seguito per TLC fino alla scomparsa del diazochetone che si è verificata dopo 5 ore. Al termine della reazione, dopo filtrazione ed allontanamento del solvente, il residuo ottenuto è stato sciolto in una soluzione acquosa satura di carbonato di sodio, che, successivamente, è stata estratta con etere etilico. Gli estratti organici, ottenuti a seguito dell'acidificazione della soluzione acquosa, hanno consentito il recupero del corrispondente *N*-metil- β^3 -amminoacido nosil protetto con una resa del 30%. Inaspettatamente, il prodotto principale della reazione è rappresentato dalla *N*-metil-4-nitrobenzensolfonammide presente negli estratti eterici; quest'ultima, probabilmente, deriva da un processo competitivo di degradazione del substrato.

Allo scopo di migliorare le rese e ridurre i tempi di reazione, sono state effettuate una serie di prove, variando singolarmente alcune condizioni e mantenendo inalterate le altre. Inizialmente, si è pensato di condurre la reazione ad una temperatura più alta (100°C) allo scopo di ridurre i tempi di reazione. Successivamente, si è valutata la

possibilità di variare la quantità di benzoato d'argento da catalitica a stechiometrica nonché di sostituire lo stesso con ossido d'argento. In nessun caso si sono ottenuti risultati soddisfacenti, dal momento che i tempi di reazione risultavano ancora estremamente lunghi e l'*N*-metil-4-nitrobenzensolfonammide continuava ad essere il prodotto principale.

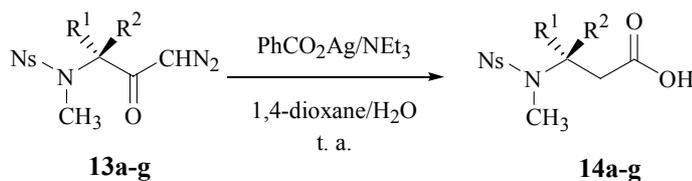
Una modifica sostanziale dell'andamento della reazione è stata osservata quando si è presa in considerazione la possibilità di utilizzare quantità catalitiche di benzoato d'argento in combinazione con la trietilammina. Queste condizioni hanno permesso di ottenere il prodotto di riarrangiamento con rese notevolmente più alte ed in tempi brevi, operando a temperatura ambiente.²⁵¹

Dati presenti in letteratura suggeriscono che il miglioramento della cinetica e delle rese della reazione dipende dall'azione solvente della trietilammina sul benzoato d'argento che probabilmente consente di realizzare la catalisi in condizioni omogenee.²⁷⁵

D'altro canto, più recentemente, si è ipotizzato che la trietilammina faciliti il processo di formazione di *nanocluster* d'argento che rappresentano le specie responsabili della catalisi nel riarrangiamento di Wolff del diazochetone.²⁷⁶ È plausibile, quindi, che la presenza di questo coreagente aumenti la velocità della reazione di formazione dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -amminoacido rispetto a quella della reazione competitiva di formazione della *N*-metil-4-nitrobenzensolfonammide.

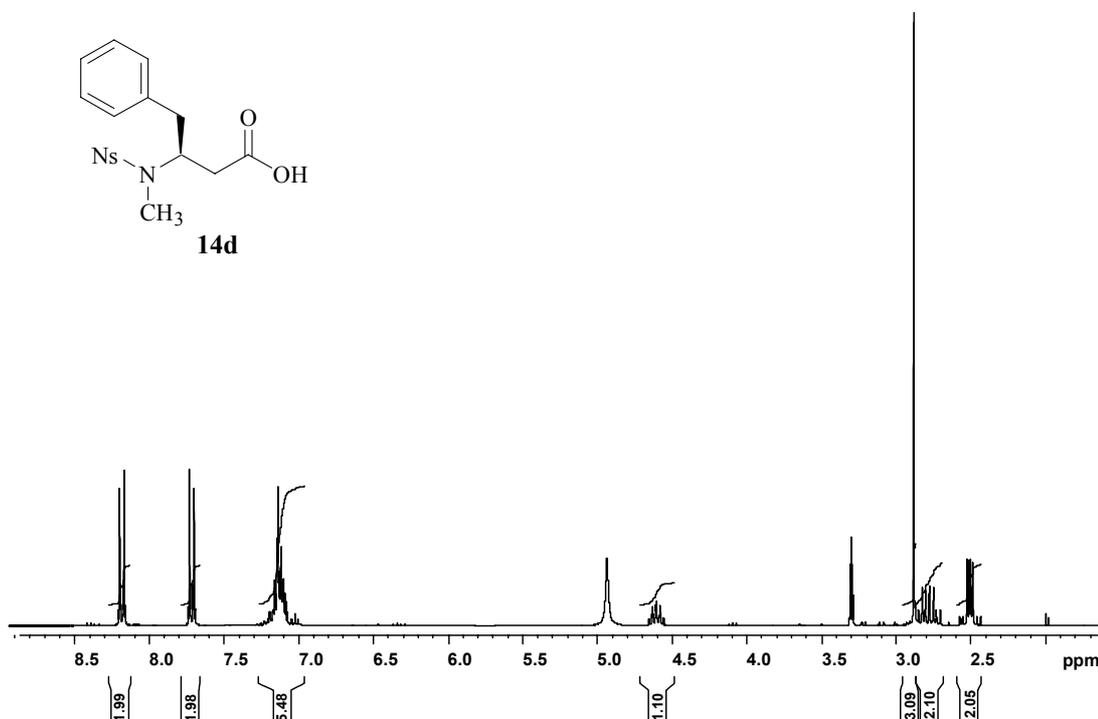
Il sistema catalitico trietilammina/benzoato d'argento produce solo tracce della solfonammide nella miscela di reazione.

In un esperimento tipico, una soluzione di benzoato d'argento in trietilammina è stata aggiunta goccia a goccia all'*N*-metil-*N*-nosil-*L*-fenilalanildiazometano **13d** solubilizzato in acqua e diossano distillato. L'andamento della reazione è stato seguito per TLC fino a scomparsa del diazochetone verificata dopo 20 minuti. Al termine della reazione, dopo filtrazione ed allontanamento del solvente, il residuo ottenuto è stato sciolto in una soluzione acquosa satura di carbonato di sodio, successivamente estratta con etere etilico. Gli estratti organici, ottenuti a seguito dell'acidificazione della soluzione acquosa, hanno consentito il recupero dell'*N*-metil-*N*-(4-nitrobenzensolfonil)- β^3 -omo-*L*-fenilalanina (**14d**) con una resa del 70% (**Schema 20, Tabella 6**).


Schema 20. Sintesi degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi **14a-g**
Tabella 6. Sintesi degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi **14a-g**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
14a	H	CH(CH ₃) ₂	60%
14b	H	CH ₃	83%
14c	CH ₃	H	82%
14d	H	CH ₂ (C ₆ H ₅)	70%
14e	H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	65%
14f	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	68%
14g	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	74%

Il prodotto di reazione **14d** è stato caratterizzato mediante ¹H-NMR (**Figura 11**) e ¹³C-NMR.


Figura 11. Spettro ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*L*-fenilalanina (**14d**).

Nello spettro ¹H-NMR di **14d** è possibile distinguere un multipletto a 2.44-2.60 ppm caratteristico dei due protoni del CH₂ in α al gruppo carbossilico ed un multipletto a 2.61-2.89 ppm relativo ai protoni metilenici in catena laterale. Il singoletto a 2.90 ppm è,

invece, relativo al gruppo NCH_3 . Si può, inoltre, distinguere un multipletto a 4.56-4.68 ppm caratteristico del gruppo CH in β al gruppo carbossilico ed un multipletto a 7.00-7.28 ppm relativo ai protoni aromatici del gruppo fenilico in catena laterale. I protoni aromatici del nosile generano due multipletti rispettivamente a 7.69-7.78 ppm e a 8.16-8.23 ppm.

L'*N*-metil-*N*-(4-nitrobenzensolfonil)- β^3 -omo-*L*-fenilalanina (**14d**), è stata caratterizzata mediante GC-MS dopo conversione nel corrispondente estere metilico, per trattamento con diazometano. Lo spettro di massa (EI) dell'estere metilico del composto **14d** è caratterizzato dal picco a m/z 319 relativo al frammento che si origina dallo ione molecolare per perdita del radicale $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ (**Figura 12**).

Il picco base dello spettro a m/z 301, indicativo dell'avvenuta reazione di omologazione, è relativo al frammento che si origina dallo ione molecolare per perdita del radicale $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$. I frammenti a m/z 186, a m/z 122 ed a m/z 156 sono caratteristici della frammentazione del gruppo 4-nitrobenzensolfonile, mentre il picco a m/z 91 è relativo allo ione tropilio (**Figura 12**).

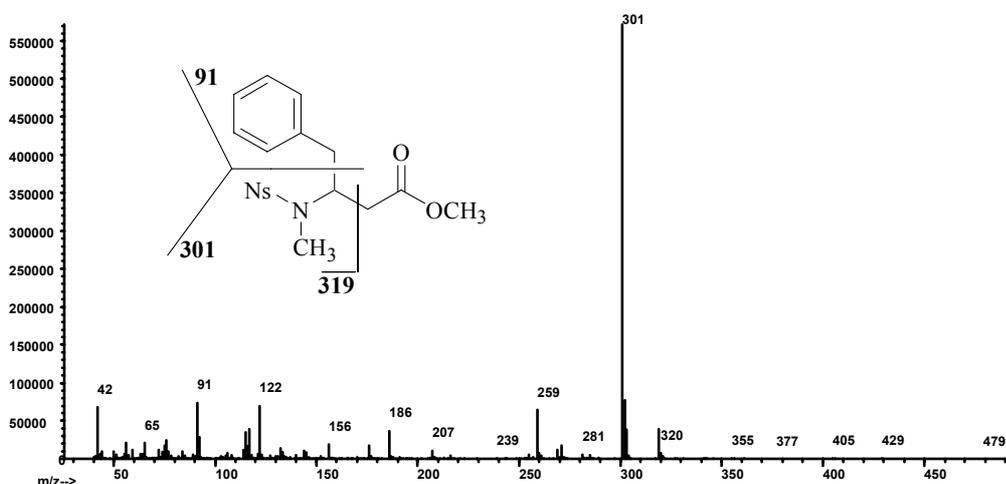


Figura 12. Spettro di massa dell'estere metilico dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*L*-fenilalanina

Il trattamento, nelle stesse condizioni, degli *N*-metil-*N*-(4-nitrobenzensolfonil)- α -amminodiazometani **13a-c** e **13e-g** (**Schema 20**) ha portato alla formazione degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi **14a-c** e **14e-g** con rese comprese tra il 60% e l'83% (**Tabella 6**). In tutti i casi, le reazioni, condotte a temperatura ambiente, terminano dopo pochi minuti e i prodotti ottenuti non necessitano di alcuna purificazione cromatografica.

Per verificare l'assenza di racemizzazione nel processo di formazione dei β^3 -amminoacidi, sono stati sintetizzati, con la metodologia già definita, l'*N*-metil-*N*-nosil-

β^3 -omo-L-isoleucina (**14e**) e l'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-D-*allo*-isoleucina (**14f**, **Schema 20**). I due prodotti **14e** e **14f** sono stati ottenuti sufficientemente puri da non richiedere ulteriori purificazioni e con rese rispettivamente del 65% e del 68% (**Tabella 6**).

Al fine di verificare la differenziazione dei segnali $^1\text{H-NMR}$ dei due diastereoisomeri, è stata predisposta una miscela dei grezzi di reazione di **14e** e **14f**. Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ (**Figura 13**) della miscela, si può notare che i due diastereoisomeri si differenziano nettamente:

- nello spostamento chimico relativo ai due protoni diastereotopici del CH_2 in α al gruppo carbossilico ciascuno dei quali rappresentato da un doppietto di doppietti (**14e**: 2.13 ppm; 2.46 ppm; **14f**: 2.15 ppm; 2.48 ppm).
- nello spostamento chimico dell' NCH_3 , che è rappresentato da un singoletto a 2.78 ppm per **14e** ed da un singoletto a 2.79 ppm per **14f**.

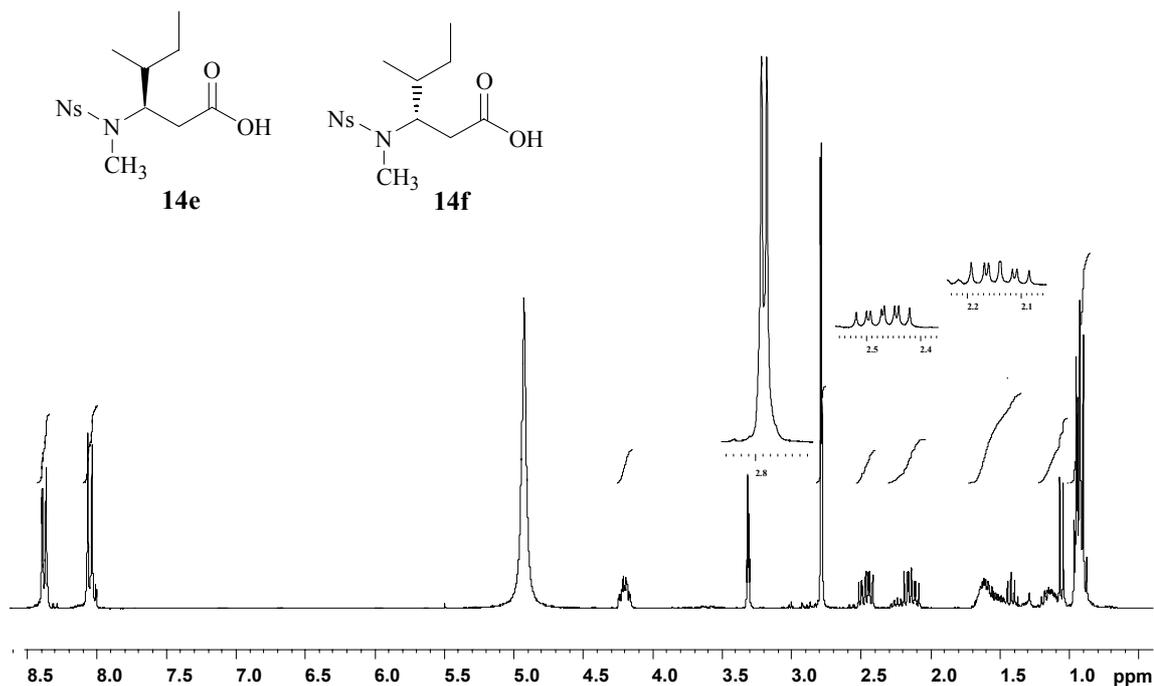


Figura 13. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) della miscela dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-L-isoleucina (**14e**) e dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-D-*allo*-isoleucina (**14f**).

Il confronto dello spettro $^1\text{H-NMR}$ della miscela (**Figura 13**) con gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei grezzi di reazione **14e** (**Figura 14**) e **14f** (**Figura 15**) esclude la presenza in ciascun grezzo di reazione dell'altro diastereoisomero.

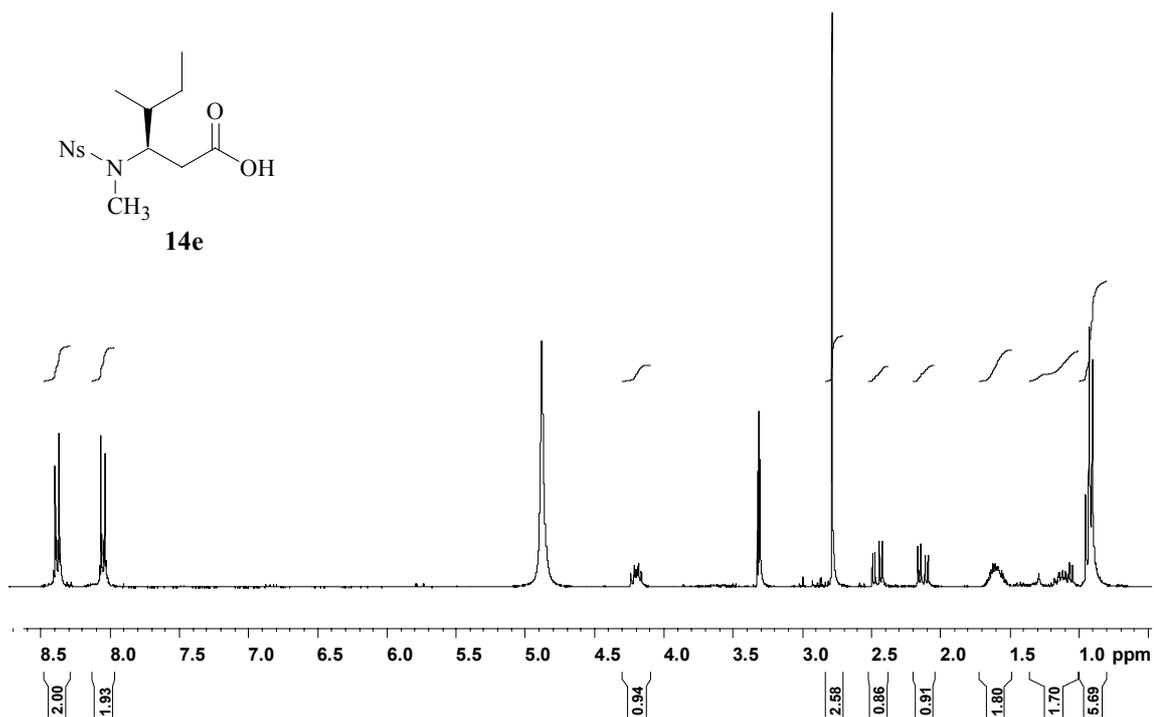


Figura 14. Spettro ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) dell'*N*-metil-*N*-nosil-β³-omo-*L*-isoleucina (**14e**)

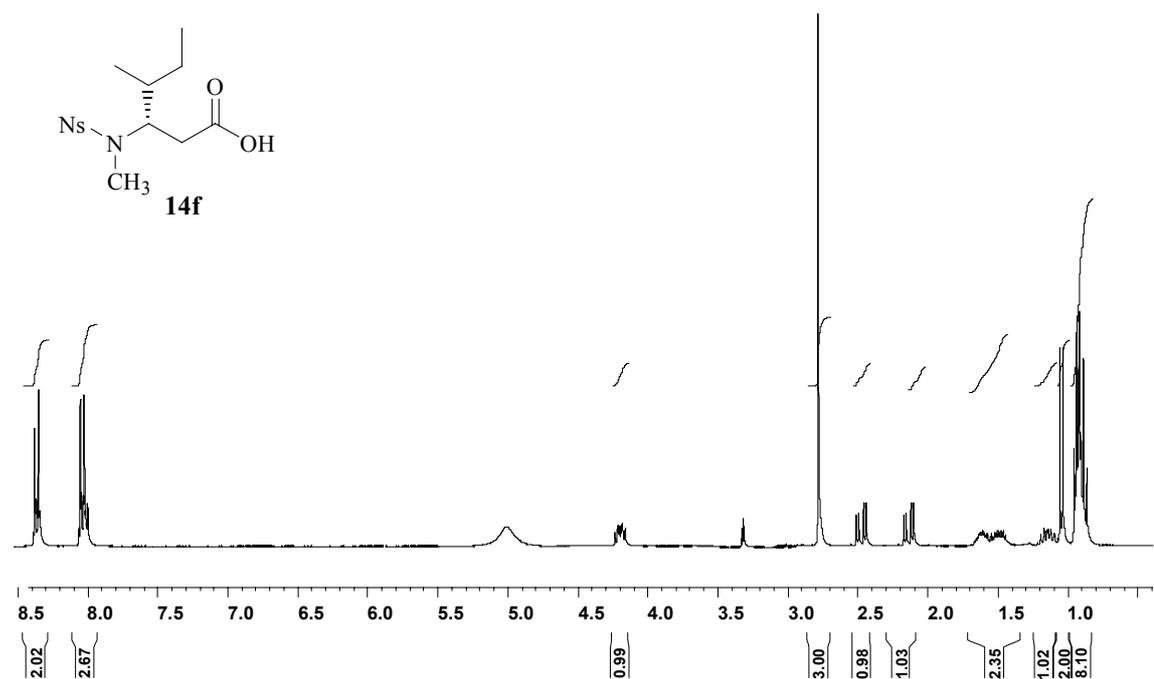


Figura 15. Spettro ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) dell'*N*-metil-*N*-nosil-β³-omo-*D*-allo-isoleucina (**14f**)

Anche lo spettro ¹³C-NMR della miscela dei due diastereoisomeri mostra che i composti si differenziano nettamente per i segnali relativi ai sette atomi di carbonio alifatici e per due segnali dei quattro complessivi relativi ai carboni aromatici. Ciascuno

degli spettri ^{13}C -NMR dei due diastereoisomeri mostra segnali relativi ad una sola molecola e cioè sette segnali per i carboni alifatici, quattro per quelli aromatici ed uno per il carbonio carbonilico. Questi risultati dimostrano, quindi, che le procedure di sintesi utilizzate per l'ottenimento degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -amminoacidi avvengono senza evidenze di racemizzazione.

Un'ulteriore conferma è stata fornita dall'analisi GC-MS di un campione contenente una miscela degli esteri metilici di **14e** e **14f**, ottenuta per trattamento della miscela dei grezzi di reazione con una soluzione di diazometano in diclorometano. Nel gascromatogramma i picchi relativi ai due diastereoisomeri si separano in maniera distinta (**Figura 16**).

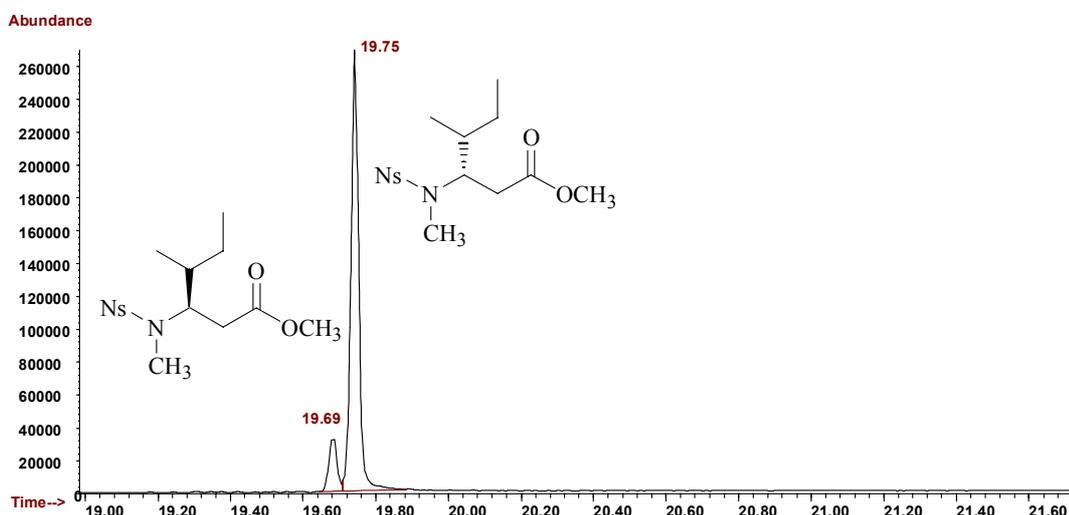


Figura 16. GC-MS della miscela degli esteri dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*L*-isoleucina e dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*D*-allo-isoleucina

L'analisi successiva degli esteri metilici di **14e** e di **14f** denota in ciascun grezzo di reazione l'assenza dell'altro diastereoisomero (**Figura 17**, **Figura 18**).

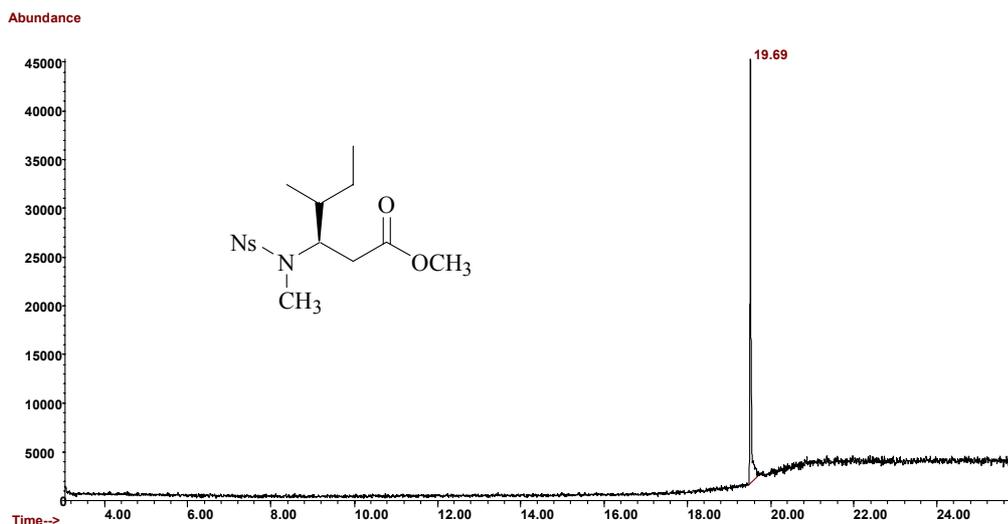


Figura 17. GC-MS dell'estere metilico dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*L*-isoleucina

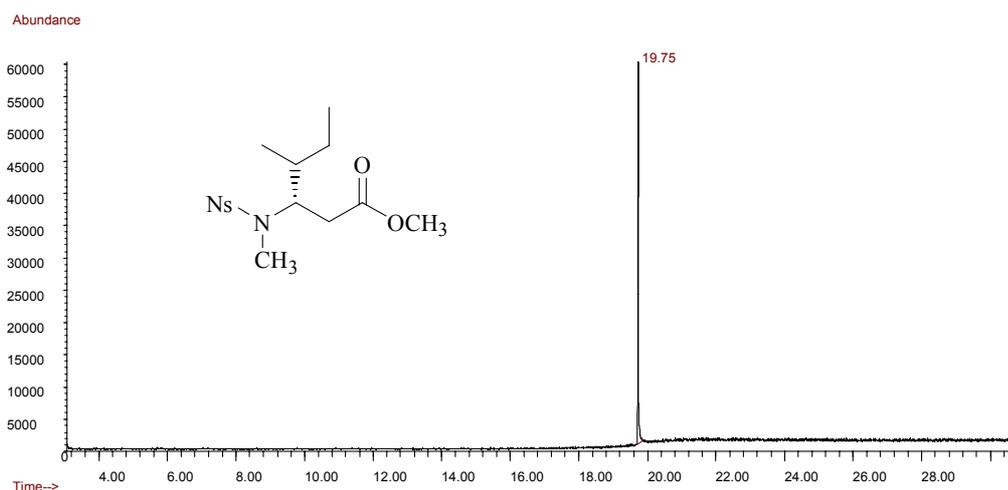


Figura 18. GC-MS dell'estere metilico dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*D-allo*-isoleucina

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ della miscela degli esteri metilici di **14e** e **14f**, mostra segnali distinti per i due diastereoisomeri: in particolare, i due composti si differenziano nettamente:

- nello spostamento chimico relativo ai due protoni diastereotopici del CH_2 in α al gruppo carbossilico;
- nello spostamento chimico dell' N-CH_3 , che è rappresentato da un singoletto a 2.77 ppm per l'estere metilico dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*L*-isoleucina ed da un singoletto a 2.76 ppm per l'estere metilico dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*D-allo*-isoleucina;
- nello spostamento chimico del gruppo OCH_3 , che, per l'estere metilico dell'*N*-

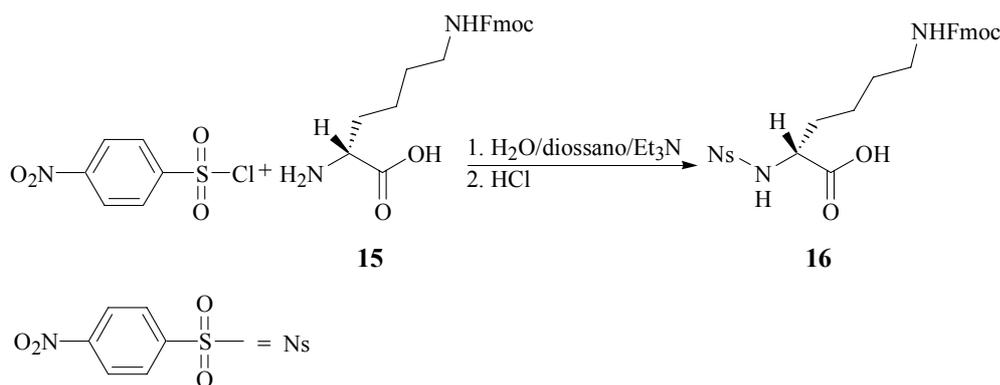
metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*L*-isoleucina cade a 3.51 ppm mentre per l'estere metilico dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*D*-*allo*-isoleucina cade a 3.52 ppm.

Il confronto dello spettro $^1\text{H-NMR}$ della miscela con gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei singoli esteri metilici esclude la presenza in ciascun grezzo dell'altro diastereoisomero.

Queste osservazioni portano alla conclusione che le condizioni di reazione adottate per la conversione degli α -diazochetoni nei corrispondenti β^3 -amminoacidi, non causano alcuna evidente racemizzazione degli stereocentri presenti.

In una fase successiva, si è pensato di estendere la procedura utilizzata per la sintesi degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi, agli α -amminoacidi funzionalizzati in catena laterale e recanti gruppi protettori compatibili con la metodologia sviluppata. Nello specifico, è stata scelta la lisina protetta sulla funzione ϵ -amminica con il gruppo uretanico fluorenilmetossicarbonile (Lys(Fmoc)OH, **15**).²⁵¹ La scelta di questo gruppo protettore consente la successiva attivazione come cloruro della funzione carbossilica dell' α -amminoacido.

L'*N* ^{ϵ} -Fmoc-*L*-lisina (**15**) è stata sospesa in acqua distillata e completamente solubilizzata mediante aggiunta di diossano distillato; sono stati poi aggiunti la trietilammina ed il cloruro dell'acido *p*-nitrobenzensolfonico solubilizzato in diossano distillato. Dopo soli 30 minuti, a seguito di trattamento acido, è stata recuperata la *N* ^{α} -nosil-*N* ^{ϵ} -Fmoc-*L*-lisina (**16**) con una resa dell'87% (**Schema 21**).



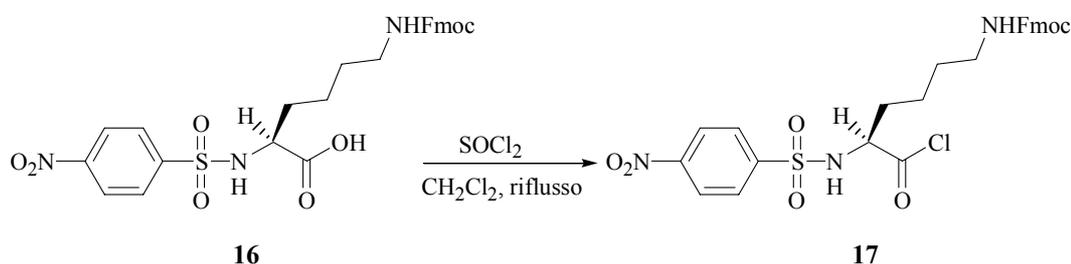
Schema 21. Protezione della funzione amminica della Lys(Fmoc)OH (**15**) con il gruppo nosile

La caratterizzazione del prodotto è stata realizzata mediante $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$.

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ di **16** è possibile distinguere tutti i segnali caratteristici del composto ed in particolare il multipletto a 3.70 ppm, attribuibile del protone legato al carbonio in α alla funzione carbossilica, e il multipletto di area 3 a 4.18-4.32 ppm, relativo al protone metinico ed ai protoni metilenici del gruppo Fmoc. Il multipletto di

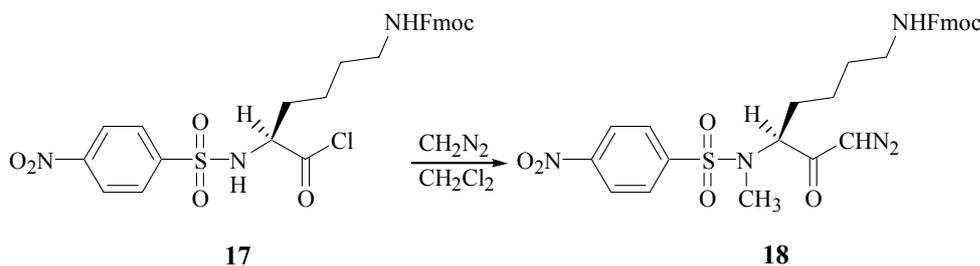
area 1 a 6.69-6.80 ppm corrisponde all' $N^{\epsilon}H$, mentre il multipletto di area 9 a 7.18-7.98 ppm è relativo ai protoni aromatici del gruppo Fmoc e all' NH solfonamidico. I protoni aromatici del nosile generano due doppietti rispettivamente a 8.00 e a 8.35 ppm.

L' N^{α} -nosil- N^{ϵ} -Fmoc-L-lisina (**16**) è stata, successivamente, convertita nel corrispondente cloruro per trattamento, in diclorometano anidro ed alla temperatura di riflusso del solvente, con il cloruro di tionile nel rapporto molare 1:12 (Schema 22). Il cloruro dell' N^{α} -nosil- N^{ϵ} -Fmoc-L-lisina (**17**) è stato recuperato dopo 20 minuti, in seguito ad allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta, con resa quantitativa.



Schema 22. Sintesi del cloruro dell' N^{α} -nosil- N^{ϵ} -Fmoc-L-lisina (**17**)

Il cloruro dell' N^{α} -nosil- N^{ϵ} -Fmoc-L-lisina (**17**), così ottenuto, è stato convertito nel corrispondente *N*-metildiazochetone. In particolare, il cloruro **17** solubilizzato in diclorometano anidro è stato aggiunto lentamente ad una soluzione di diazometano in diclorometano nel rapporto molare di 1:10. In seguito a purificazione cromatografica del grezzo di reazione ottenuto per evaporazione del solvente, si recupera l' N^{α} -metil- N^{α} -nosil- N^{ϵ} -Fmoc-L-lisinildiazometano (**18**) con una resa del 69% (Schema 23).



Schema 23. Sintesi dell' N^{α} -metil- N^{α} -nosil- N^{ϵ} -Fmoc-L-lisinildiazometano (**18**)

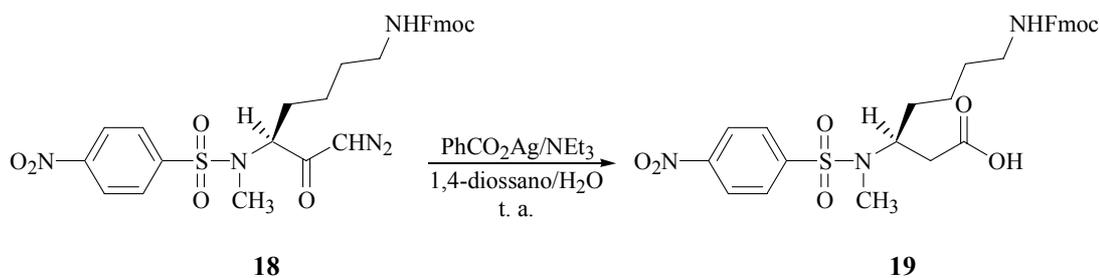
La caratterizzazione del prodotto è stata realizzata mediante 1H -NMR e ^{13}C -NMR.

Nello spettro 1H -NMR di **18** è possibile distinguere un multipletto di area 6 a 1.13-1.55 ppm relativo ai protoni metilenici in β , in γ ed in δ della catena laterale della lisina. È possibile inoltre distinguere un singoletto a circa 2.82 ppm, caratteristico dei protoni gruppo del NCH_3 , che conferma l'avvenuta metilazione. I protoni metilenici in ϵ

della catena laterale della lisina risuonano a 3.06-3.18 ppm. È possibile inoltre distinguere un multipletto di area 1 a 4.18-4.29 ppm relativo al protone metinico del gruppo Fmoc ed un multipletto di area 3 a 4.38-4.51 ppm attribuibile al protone legato al carbonio in α alla funzione amminica ed ai protoni metilenici del gruppo Fmoc. Il multipletto di area 1 a 4.78-4.86 ppm corrisponde all' $N^{\epsilon}H$, mentre il singoletto a 5.60 ppm corrispondente all'idrogeno del gruppo CHN_2 . I protoni aromatici del gruppo Fmoc generano un multipletto di area 8 a 7.25-7.81 ppm, mentre quelli del nosile due multipletti rispettivamente a 7.96-8.01 e a 8.33-8.38 ppm.

Anche in questo caso, il semplice trattamento del cloruro **17** con diazometano consente di realizzare in un singolo stadio la sintesi dell' N -metildiazochetone precursore per l'ottenimento, nella successiva fase di omologazione, del β^3 -amminoacido corrispondente, metilato sulla funzione amminica.

Ad una soluzione dell' N^{α} -metil- N^{α} -nosil- N^{ϵ} -Fmoc-L-lisinildiazometano (**18**) in acqua e diossano distillato, viene aggiunta lentamente una soluzione di benzoato d'argento in trietilammina, a temperatura ambiente. L'andamento della reazione è stato seguito per TLC fino a scomparsa del diazochetone **18** dopo 20 minuti. I trattamenti successivi permettono il recupero della N^{α} -metil- N^{α} -nosil- N^{ϵ} -Fmoc- β^3 -omo-L-lisina (**19**) con una resa del 62% (**Schema 24**).



Schema 24. Sintesi della N^{α} -metil- N^{α} -nosil- N^{ϵ} -Fmoc- β^3 -omo-L-lisina (**19**)

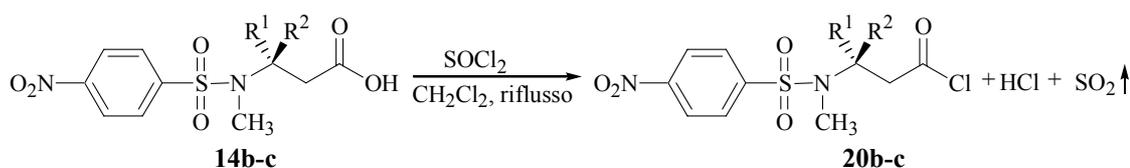
La caratterizzazione del prodotto è stata realizzata mediante 1H -NMR e ^{13}C -NMR.

Nello spettro 1H -NMR di **19** è possibile distinguere un multipletto di area 6 a 1.00-1.55 ppm relativo ai protoni metilenici in γ e in δ e in ϵ della catena laterale. I due protoni diastereotopici legati al carbonio in α alla funzione carbossilica generano due doppietti di doppietti, rispettivamente a 2.08 e a 2.35 ppm. È possibile, inoltre, distinguere un singoletto a circa 2.69 ppm, caratteristico dei protoni gruppo NCH_3 , I protoni metilenici in ζ della catena laterale risuonano a 2.86-2.99 ppm. È possibile inoltre distinguere un multipletto di area 4 a 4.11-4.33 ppm relativo al protone legato al carbonio

in α alla funzione amminica, ai protoni metilenici ed a quello metinico del gruppo Fmoc. Il multipletto di area 9 a 7.28-7.91 ppm corrisponde all' $N^{\epsilon}H$ ed ai protoni aromatici del gruppo Fmoc, mentre quelli del nosile generano due doppietti rispettivamente a 8.01 e a 8.37 ppm.

Al fine di valutare le possibili applicazioni degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi nella sintesi peptidica, si è pensato di ottenere e, successivamente, verificare la stabilità dei cloruri corrispondenti.²⁵¹

I cloruri degli *N*-metil- β^3 -amminoacidi nosil protetti **20b-c** (Schema 25) sono stati preparati usando la stessa procedura impiegata per gli α -analoghi, ponendo, cioè, a riflusso in diclorometano anidro per 25-30 minuti il cloruro di tionile ed i corrispondenti *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi (**14b-c**) nel rapporto molare di 12:1. I cloruri degli *N*-metil- β^3 -omoamminoacidi nosil protetti, recuperati dopo evaporazione del solvente con rese quantitative (Tabella 7), risultano facili da preparare ed abbastanza stabili.



Schema 25. Conversione degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi **14b-c** nei corrispondenti cloruri **20b-c**

Tabella 7. Sintesi dei cloruri degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi **20b-c**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
20b	H	CH ₃	100%
20c	CH ₃	H	100%

La caratterizzazione dei cloruri degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi è stata realizzata mediante conversione nei corrispondenti esteri metilici per trattamento con metanolo anidro.

A titolo esemplificativo, il cloruro dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-L-alanina (**20b**) è stato trattato con metanolo anidro e il corrispondente estere metilico è stato ottenuto con resa quantitativa. La caratterizzazione dell'estere metilico dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-L-alanina è stata effettuata mediante ¹H-NMR e GC-MS.

Nello spettro ¹HNMR dell'estere metilico di **20b** è possibile distinguere un doppietto a 1.05 ppm relativo al gruppo metilico in catena laterale ed un multipletto a 2.40-2.47 ppm caratteristico dei due protoni del CH₂ in α al gruppo estereo. I singoletti a

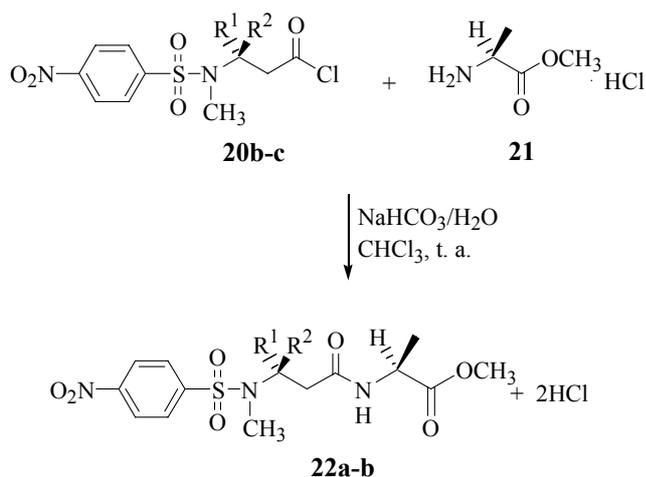
2.78 ppm e a 3.62 ppm sono relativi ai protoni dei gruppi metilici legati rispettivamente all'azoto e all'ossigeno. Il protone metinico in β al gruppo carbonilico è un multipletto che risuona a 4.48-4.61 ppm. I protoni aromatici del nosile generano due multipletti rispettivamente a 7.94-8.06 ed a 8.28-8.43 ppm.

Lo spettro di massa (EI) dell'estere metilico di **20b** è caratterizzato dal picco a m/z 301 relativo al frammento che si origina per perdita del radicale $\text{CH}_3\cdot$ dallo ione molecolare.

La perdita del radicale $\text{CH}_2\text{COOCH}_3\cdot$ dallo ione molecolare giustifica la presenza del frammento m/z 243.

Il picco base dello spettro a m/z 130 è relativo al frammento che si origina dallo ione molecolare per trasposizione, indotta dal radicale, di un atomo d'idrogeno seguita dalla scissione omolitica del legame S-N. I frammenti a m/z 186 e 122 sono strutturalmente correlabili alla presenza del gruppo 4-nitrobenzensolfonile.

Il dipeptide **22a** (Schema 26) è stato ottenuto per reazione del cloruro dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-L-alanina (**20b**), solubilizzato in cloroformio privo di etanolo, con il cloridrato dell'estere metilico della L-alanina (**21**) solubilizzato in una soluzione acquosa al 5% di NaHCO_3 , nel rapporto stechiometrico di 1:1. La reazione, condotta a temperatura ambiente per 25 minuti, ha portato alla formazione del dipeptide **22a** con una resa del 75% (Tabella 8).

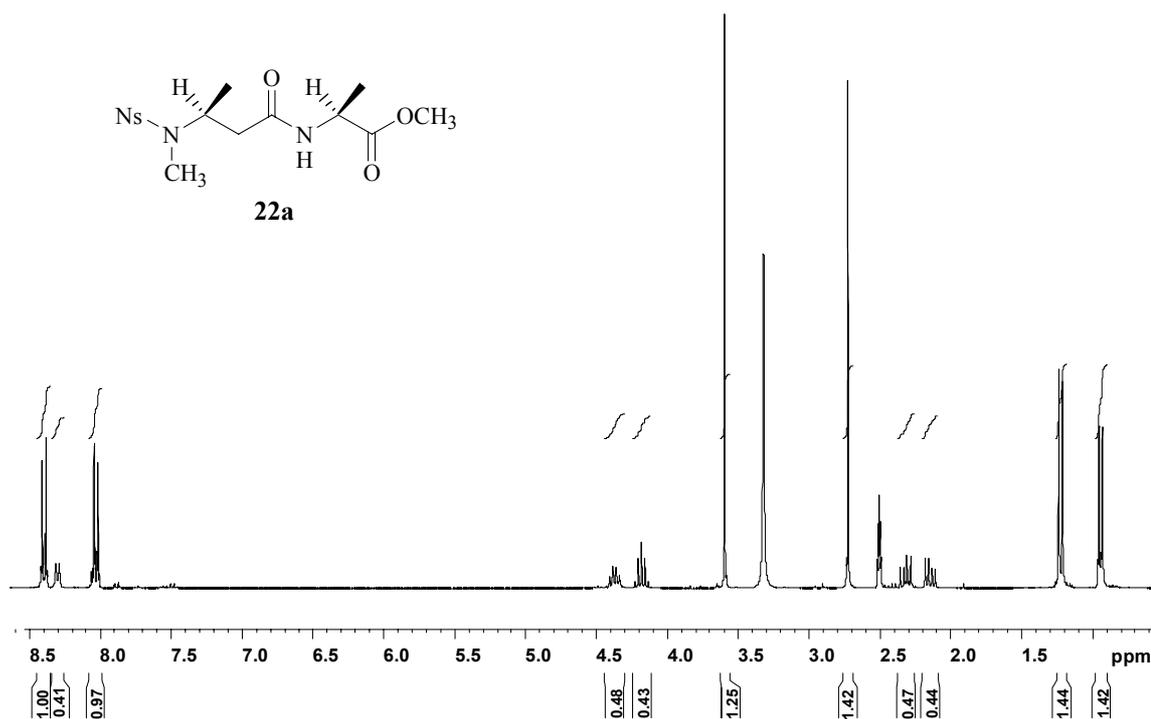


Schema 26. Sintesi degli *N*-metil-*N*-nosildipeptidi **22a-b**

Tabella 8. Sintesi degli *N*-metil-*N*-nosildipeptidi **22a-b**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
22a	H	CH ₃	75
22b	CH ₃	H	64

La caratterizzazione del dipeptide **22a** è stata effettuata mediante ¹H-NMR (Figura 19) e GC-MS.

Figura 19. Spettro ¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) di **22a**

Nello spettro ¹H-NMR di **22a** (Figura 19) è possibile distinguere un doppietto a 0.94 ppm relativo al gruppo metilico della catena laterale del residuo di *N*-metil-β³-alanina ed un doppietto a 1.22 ppm relativo all'altro gruppo metilico del dipeptide. I due protoni diastereotopici legati al carbonio in α alla funzione ammidica generano due doppietti di doppietti, rispettivamente a 2.14 ppm e a 2.32 ppm. Il singoletto a 2.73 ppm è caratteristico del gruppo NCH₃, mentre il singoletto a 3.59 ppm è relativo al gruppo OCH₃. Distinguiamo, inoltre, un multipletto a 4.12-4.24 ppm attribuibile al protone legato al carbonio in alfa al gruppo estereo, un multipletto a 4.33-4.42 ppm attribuibile al protone legato al carbonio in beta al gruppo ammidico ed un doppietto a 8.30 ppm caratteristico del protone del gruppo NH. I protoni aromatici del nosile generano due multipletti rispettivamente a 8.00-8.07 ed a 8.37-8.42 ppm.

Lo spettro di massa (EI) del dipeptide **22a** è caratterizzato dal picco a m/z 328 relativo al frammento che si origina dallo ione molecolare per perdita del radicale COOCH_3 . La perdita del radicale $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_3$ dallo ione molecolare giustifica il picco a m/z 243.

Il picco base dello spettro a m/z 201 è relativo al frammento che si origina dallo ione molecolare per trasposizione, indotta dal radicale, di un atomo d'idrogeno seguita dalla scissione omolitica del legame S-N. I frammenti a m/z 186 e a m/z 122 sono caratteristici della frammentazione del gruppo 4-nitrobenzensolfonile.

Allo stesso modo è stato ottenuto il dipeptide **22b** (Schema 26) con una resa del 64% (Tabella 8).

Al fine di verificare la differenziazione dei segnali $^1\text{H-NMR}$ dei due diastereoisomeri è stata predisposta una miscela dei grezzi di reazione di **22a** e **22b**.

Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ (Figura 20) della miscela dei grezzi di reazione, si può notare che i due diastereoisomeri si differenziano nettamente:

- nello spostamento chimico relativo ai protoni del gruppo metilico della catena laterale del residuo di *N*-metil- β^3 -alanina (**22a**: 0.94 ppm; **22b**: 0.96 ppm)
- nello spostamento chimico relativo ai protoni del gruppo metilico della catena laterale del residuo di L-alanina (**22a**: 1.22 ppm; **22b**: 1.19 ppm).

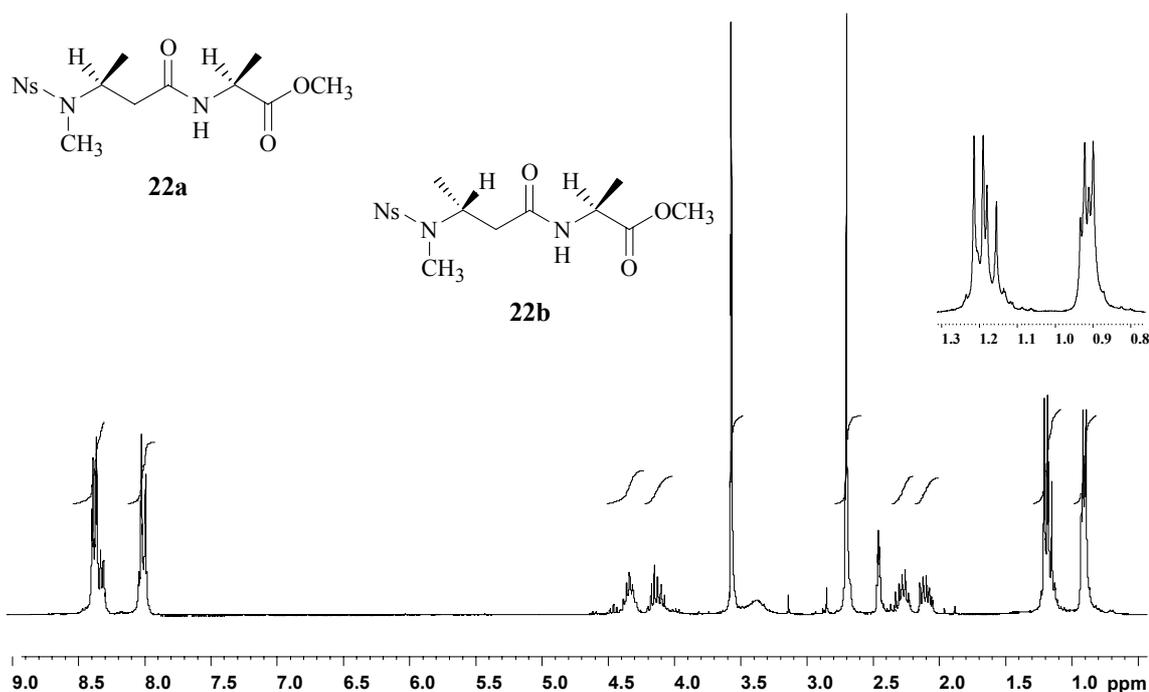


Figura 20. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) della miscela di **22a** e **22b**

Il confronto dello spettro $^1\text{H-NMR}$ della miscela (**Figura 20**) con gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei grezzi di reazione **22a** (**Figura 19**) e **22b** (**Figura 21**) esclude la presenza in ciascun grezzo dell'altro diastereoisomero.

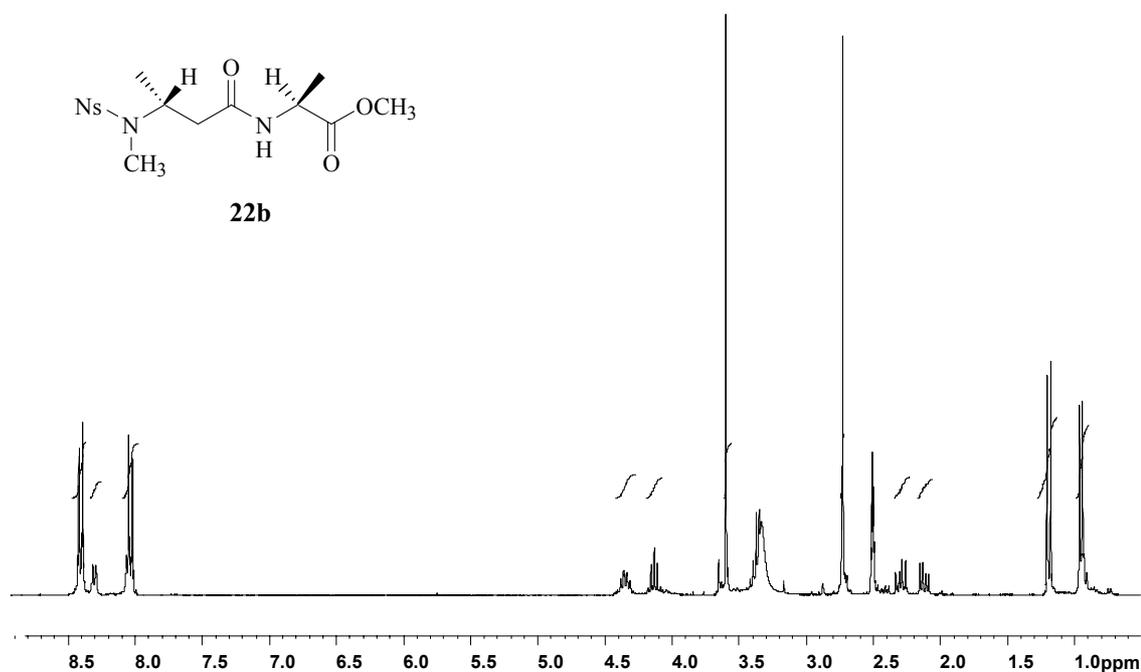


Figura 21. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 300 MHz) di **17b**

In conclusione, nella procedura di sintesi utilizzata per l'ottenimento dei dipeptidi ogni stereocentro mantiene inalterata la propria configurazione.

Un'ulteriore conferma è stata fornita dall'analisi GC-MS della miscela di **22a** e **22b**: nel gascromatogramma sono evidenti due picchi ben risolti (**Figura 22**).

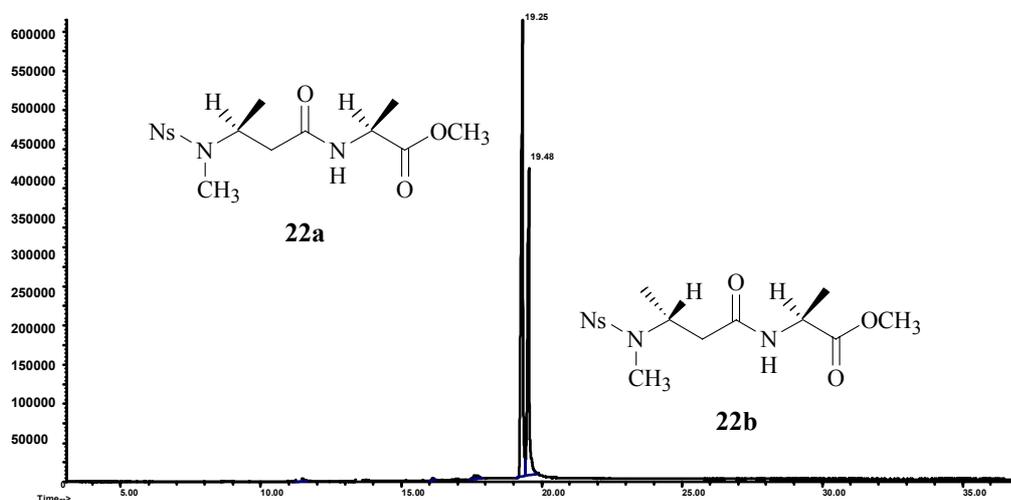


Figura 22. GC-MS della miscela dei dipeptidi **22a** e **22b**

L'analisi successiva dei due grezzi di reazione denota in ciascun grezzo l'assenza dell'altro diastereoisomero (Figura 23, Figura 24).

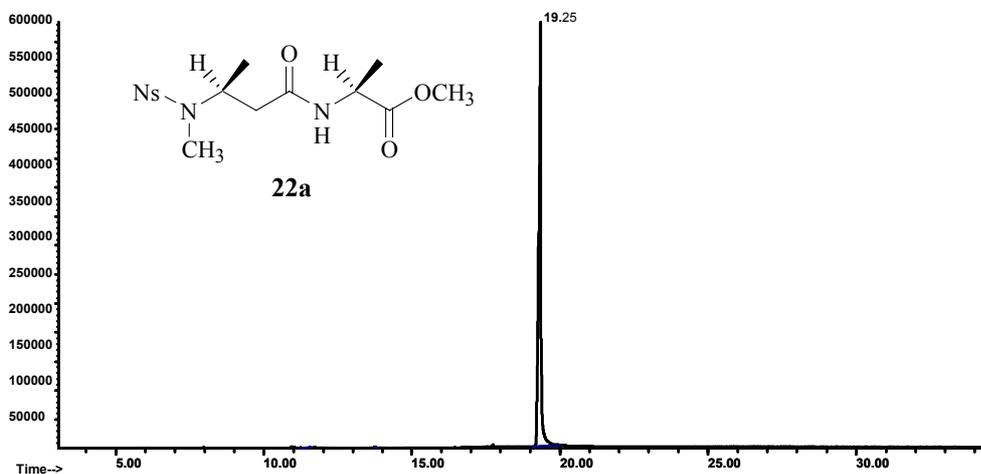


Figura 23. GC-MS del dipeptide 22a

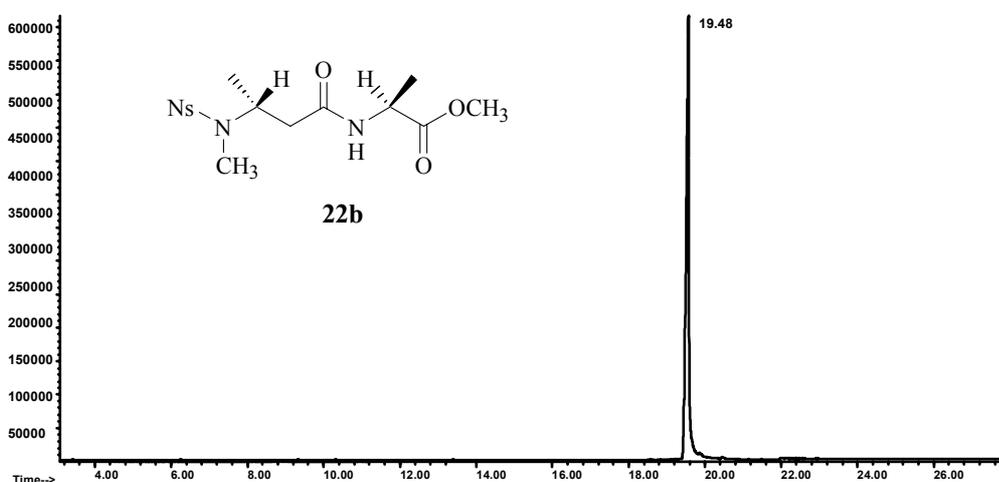


Figura 24. GC-MS del dipeptide 22b

In conclusione, è stata sviluppata una metodologia semplice e molto efficiente per l'omologazione di α -amminoacidi, protetti sulla funzione amminica con il gruppo nosile, nei corrispondenti *N*-metil- β^3 -amminoacidi.

In particolare, i risultati conseguiti nel presente lavoro evidenziano i vantaggi relativi alla scelta del gruppo protettore nosile nella preparazione in soluzione degli *N*-metil- β^3 -omoamminoacidi.

L'impiego di questo gruppo protettore, che rende possibile, tra l'altro, il facile

ottenimento dei cloruri degli α -amminoacidi, aumenta l'acidità del protone NH, permettendo la formazione dell' α -diazochetone e la simultanea metilazione della funzione amminica durante il trattamento dei cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi con diazometano.

Gli *N*-metil-*N*-nosil- α -amminoacildiazometani sono, poi, facilmente convertiti nei corrispondenti β^3 -amminoacidi mediante il riarrangiamento di Wolff.

Rispetto alle altre procedure riportate in letteratura, la metodologia proposta permette l'ottenimento degli *N*-metil- β^3 -amminoacidi in pochi stadi sintetici ed evitando l'utilizzo di condizioni di reazione drastiche. Un altro vantaggio è rappresentato dalla possibilità di convertire gli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi nei corrispondenti cloruri; la stabilità di questi intermedi e la loro agevole disponibilità ne hanno reso possibile l'impiego nelle procedure sintetiche relative alla formazione di peptidi modificati in soluzione.

È stato, altresì, dimostrato che tutta la procedura sintetica non causa alcuna evidente racemizzazione degli stereocentri presenti nei precursori.

Sebbene la sintesi degli *N*-metildiazochetoni mediante acilazione del diazometano con i corrispondenti cloruri non possa essere applicata ad α -amminoacidi funzionalizzati in catena laterale recanti gruppi protettori acido-labili, la strategia proposta può essere estesa alla sintesi *N*-metil- β^3 -amminoacidi funzionalizzati recanti gruppi protettori base-labili compatibili la "nosil-chemistry".

3.3. PROTEZIONE REVERSIBILE DELLA FUNZIONE AMMINICA CON IL GRUPPO NOSILE NELLA SINTESI PEPTIDICA IN SOLUZIONE

Come illustrato in precedenza, la strategia di sintesi basata sull'impiego della protezione nosile consente di realizzare la diretta omologazione di α -amminoacidi ad *N*-metil- β^3 -omoamminoacidi, mediante la procedura di Arndt-Eistert.²⁵¹ Oltre che nella sintesi in soluzione di *N*-metil- β^3 -omoamminoacidi otticamente attivi, nel nostro laboratorio il gruppo nosile è stato precedentemente utilizzato con successo per la metilazione diretta in soluzione di α -amminoesteri *N*-nosil-protetti.²⁵⁸ La metodologia basata sull'utilizzo del diazometano in presenza del gruppo protettore nosile si è dimostrata utile anche per la *N*-metilazione sito specifica di sistemi peptidici in soluzione.²⁶⁰ Inoltre, recentemente questa strategia sintetica è stata estesa con successo alla metilazione di α -amminoacidi su supporto solido.²⁷⁷

Alla luce di questi risultati, nel presente lavoro, si è pensato di utilizzare il gruppo protettore nosile in maniera generale come gruppo protettore dell'azoto α -amminico nella sintesi peptidica in soluzione.²⁷⁸

La scelta dei gruppi protettori riveste un ruolo fondamentale nella realizzazione della sintesi di un peptide. La necessità di una sequenziale protezione e deprotezione delle varie funzionalità presenti fa sì che, sia l'introduzione, sia la rimozione di un gruppo protettore richiedano un'accurata progettazione sintetica, al fine di garantire il grado richiesto di ortogonalità tra i vari gruppi protettori utilizzati.

Per questa ragione, la ricerca di nuovi gruppi protettori della funzione amminica, stabili ad una vasta gamma di condizioni di reazione, facilmente disponibili e selettivamente rimovibili in condizioni blande, continua ad attirare in maniera considerevole l'interesse dei ricercatori.

Sebbene esistano numerosi e svariati gruppi protettori della funzione amminica di α -amminoacidi, sicuramente, negli ultimi anni, maggiore attenzione è stata riservata all'uso dei carbammati per via della loro capacità di minimizzare il processo di racemizzazione base-catalizzato durante la sintesi peptidica.^{278,280} Le strategie basate sull'utilizzo dei gruppi protettori Fmoc e Boc sono, infatti, ben consolidate sia nella sintesi peptidica in soluzione che in fase solida.

Le metodologie esistenti basate sul gruppo protettore Boc richiedono l'impiego di acido trifluoroacetico in ogni stadio di rimozione del Boc e condizioni acide più drastiche per

rimuovere i gruppi protettori in catena laterale.²⁸¹

Il gruppo Fmoc²⁸²⁻²⁸⁴ è un gruppo protettore base-labile che è facilmente rimosso da una grande varietà di ammine, attraverso una β -eliminazione promossa dalla base; in sua presenza, gruppi protettori acido-labili possono essere rimossi usando condizioni acide più blande. La strategia Fmoc è comunque più indicata nella sintesi peptidica in fase solida rispetto a quella in soluzione a causa dei problemi connessi al processo di deprotezione. Infatti, il dibenzofulvene prodotto durante la rimozione del gruppo Fmoc, può non essere efficientemente catturato dalla base, portando così alla polimerizzazione dell'alchene e rendendo di conseguenza più complessa la procedura di purificazione.^{285,286}

L'uso del gruppo nosile nella sintesi peptidica è d'importanza fondamentale per la *N*-metilazione di amminoacidi e peptidi.^{211,253,254} Di conseguenza, la combinazione della "nosil-chemistry" con la "Fmoc-chemistry" acquista particolare rilievo nella sintesi di peptidi *N*-metilati: gli *N*-nosil- α -amminoacidi introdotti in una specifica posizione della catena peptidica, possono essere, infatti, facilmente metilati sulla funzione α -amminica.²⁶⁰

In questo contesto, è stata progettata e realizzata una nuova ed alternativa strategia per la sintesi peptidica in soluzione, che prevede la protezione con il gruppo nosile della funzione α -amminica anche di amminoacidi funzionalizzati in catena laterale e recanti gruppi protettori compatibili con il gruppo Fmoc.²⁷⁸

Lo stadio cruciale nell'utilizzo del gruppo nosile è certamente rappresentato dalla sua rimozione: come riportato per i derivati *N*-alchilati,²¹¹ la reazione coinvolta è, con molta probabilità, una sostituzione nucleofila aromatica (S_NAr) sul carbonio solfonammidico, con un tiolato come nucleofilo. La reazione avviene attraverso la formazione di un intermedio tetraedrico anionico che prende il nome di complesso di Meisenheimer.

La rimozione del gruppo protettore nosile da sistemi amminoacidici e peptidici alchilati all'azoto, avviene facilmente a temperatura controllata in tempi brevi, usando il sistema reagente acido mercaptoacetico/metossido di sodio.^{258,260}

Quando la funzione amminica non è alchilata, la rimozione del gruppo nosile non è così semplice: l'atomo di idrogeno relativamente acido sulla funzione solfonammidica, potrebbe ridurre l'efficienza del nucleofilo solforato nella sostituzione nucleofila aromatica.

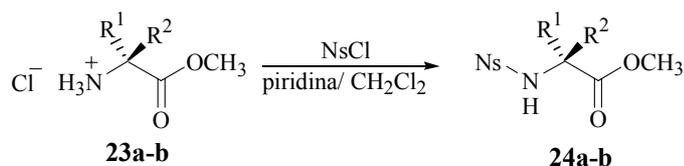
Allo scopo di studiare in maniera accurata la flessibilità di ogni stadio della

procedura progettata, inclusa la protezione degli α -amminoacidi, l'elongazione della catena peptidica e la deprotezione della funzione amminica terminale e per valutare meglio gli effetti dei reagenti usati su possibili e competitivi processi di racemizzazione, sono stati scelti come sistemi modello esteri metilici di amminoacidi lipofilici della serie D ed L.

La protezione dell'azoto α -amminico di amminoesteri può essere condotta in solvente organico in presenza di una base azotata.²⁵⁸

In un esperimento tipico, gli esteri metilici della *N*-nosil-L-valina (**24a**) e della *N*-nosil-D-valina (**24b**) sono stati preparati per trattamento dei corrispondenti cloridrati **23a** e **23b** con il cloruro di nosile in presenza di piridina, nel rapporto molare 1:1:3.²⁵⁸

La reazione è stata condotta in diclorometano a temperatura ambiente per circa 3 ore ed ha fornito gli esteri metilici dell'*N*-nosil-L-valina (**24a**) e dell'*N*-nosil-D-valina (**24b**) con rese del 90 e dell'84%, rispettivamente (**Schema 27**, **Tabella 9**).



Schema 27. Sintesi degli esteri metilici dell'*N*-nosil-L-valina (**24a**) e dell'*N*-nosil-D-valina (**24b**)

Tabella 9. Esteri metilici dell'*N*-nosil-L-valina (**24a**) e dell'*N*-nosil-D-valina (**24b**)

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
24a	H	(CH ₃) ₂ CH	90
24b	(CH ₃) ₂ CH	H	84

La caratterizzazione dei prodotti è stata realizzata mediante ¹H-NMR, ¹³C-NMR e GC-MS.

Nello spettro ¹H-NMR di **24a** è possibile distinguere tutti i segnali caratteristici del composto, quali il singoletto a 3.52 ppm corrispondente al metile estereo, il multipletto centrato a 3.85 ppm corrispondente al protone in posizione α alla funzione esterea ed il doppietto a 5.56 ppm corrispondente al protone legato all'azoto solfonammidico.

Il passaggio successivo è stato quello di individuare le condizioni di reazione ottimali per la deprotezione della funzione amminica degli esteri metilici degli α -amminoacidi protetti con il gruppo nosile e non sostituiti all'azoto. Inizialmente, è stata sperimentata la stessa procedura utilizzata con successo nel nostro laboratorio, per la

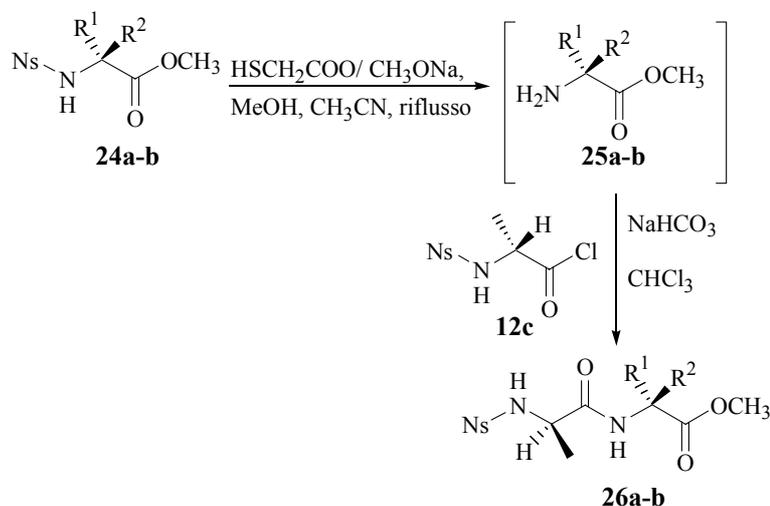
rimozione del gruppo nosile da amminoesteri metilati all'azoto.²⁵⁸

Tuttavia, la reazione di deprotezione della funzione amminica, realizzata mediante il trattamento di **24a** e **24b** con 3 equivalenti di acido mercaptoacetico in presenza di 8 equivalenti di metossido di sodio, in una soluzione di acetonitrile e metanolo alla temperatura di 50°C,²⁵⁸ procede ad una velocità estremamente bassa. Tipicamente, adoperando le medesime condizioni sperimentali, il tempo di reazione necessario per una completa rimozione del gruppo nosile da esteri metilici di *N*-nosil- α -amminoacidi *N*-metilati, è di circa 10 minuti.²⁵⁸

Una completa e più veloce deprotezione della funzione α -amminica è stata osservata utilizzando una maggiore quantità di metossido di sodio e conducendo la reazione a temperature più elevate.²⁷⁸

In particolare, l'estere metilico della *N*-nosil-L-valina (**24a**) è stato trattato con 3 equivalenti di acido mercaptoacetico e 10 equivalenti di metossido di sodio in acetonitrile e metanolo anidro (**Schema 28**). La reazione è stata condotta alla temperatura di riflusso per un'ora ed ha fornito il corrispondente amminoestere deproteetto **25a**. L'analisi GC-MS effettuata su un'aliquota del prodotto grezzo di reazione dopo work-up acido e trattamento con diazometano, mostra chiaramente la presenza del coprodotto di deprotezione il 2-(4-nitrofeniltilio)acetato di metile. La formazione di questo composto supporta l'ipotesi che la rimozione del gruppo nosile proceda attraverso una sostituzione nucleofila aromatica, come riportato per gli analoghi *N*-alchilati.²¹¹

Anche l'estere metilico della *N*-nosil-D-valina (**24b**) è stato sottoposto al processo di deprotezione utilizzando le stesse condizioni sperimentali adottate per **24a** (**Schema 28**).



Schema 28. Sintesi degli *N*-nosil-dipeptidi **26a** e **26b**

I due prodotti deprotetti **25a** e **25b** non sono stati isolati, ma direttamente utilizzati per l'accoppiamento in situ con il cloruro della *N*-nosil-D-alanina (**12c**), precedentemente preparato.²⁶⁰ La reazione di accoppiamento, condotta in una miscela bifasica di cloroformio e NaHCO₃, ha portato all'ottenimento, dopo work-up, dei corrispondenti dipeptidi diastereomerici Ns-D-Ala-L-Val-OCH₃ **26a** e Ns-D-Ala-D-Val-OCH₃ **26b** con una resa del 78% e del 71%, rispettivamente (**Schema 28**, **Tabella 10**). I prodotti sono stati caratterizzati mediante ¹H-NMR, ¹³C-NMR e GC-MS.

Tabella 10. Sintesi degli *N*-nosil-dipeptidi **26a** e **26b**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
26a	H	CH(CH ₃) ₂	78
26b	CH(CH ₃) ₂	H	71

L'analisi ¹H-NMR dei singoli prodotti grezzi di reazione **26a** (**Figura 25**) e **26b** (**Figura 26**) rivela chiaramente la presenza di un solo prodotto in ciascun campione, con segnali ¹H-NMR totalmente attribuibili ad un solo diastereoisomero.

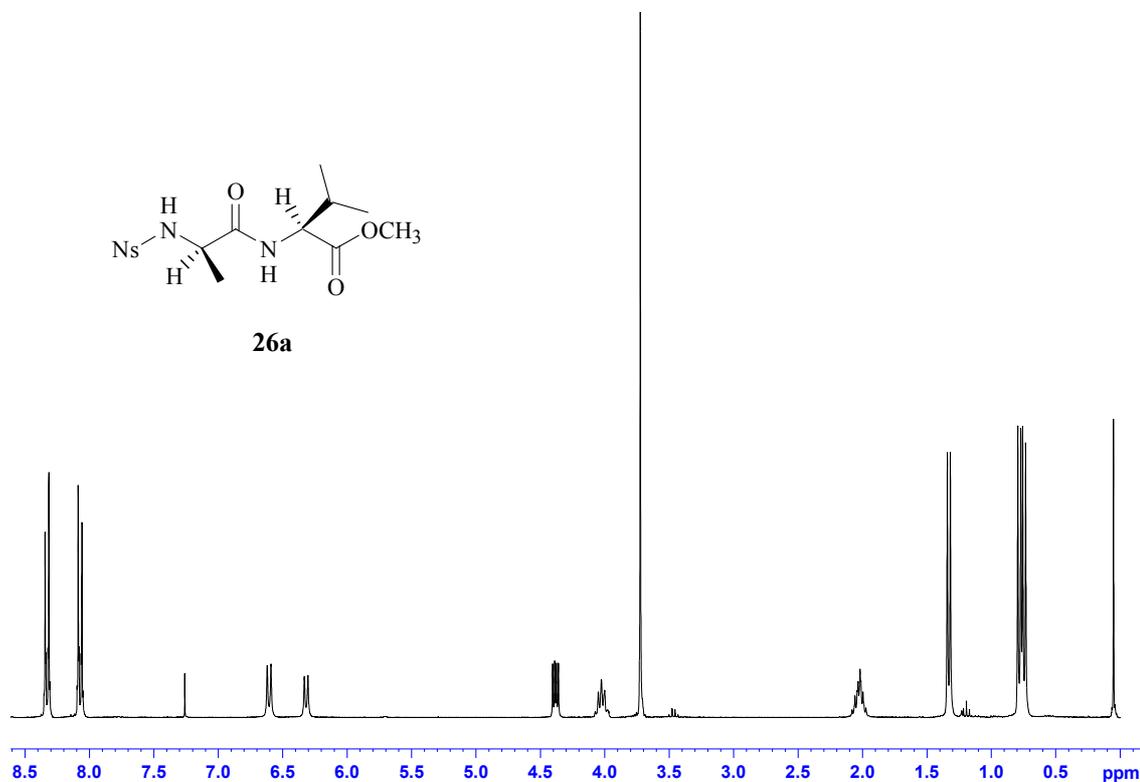


Figura 25. Spettro ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) di **26a**

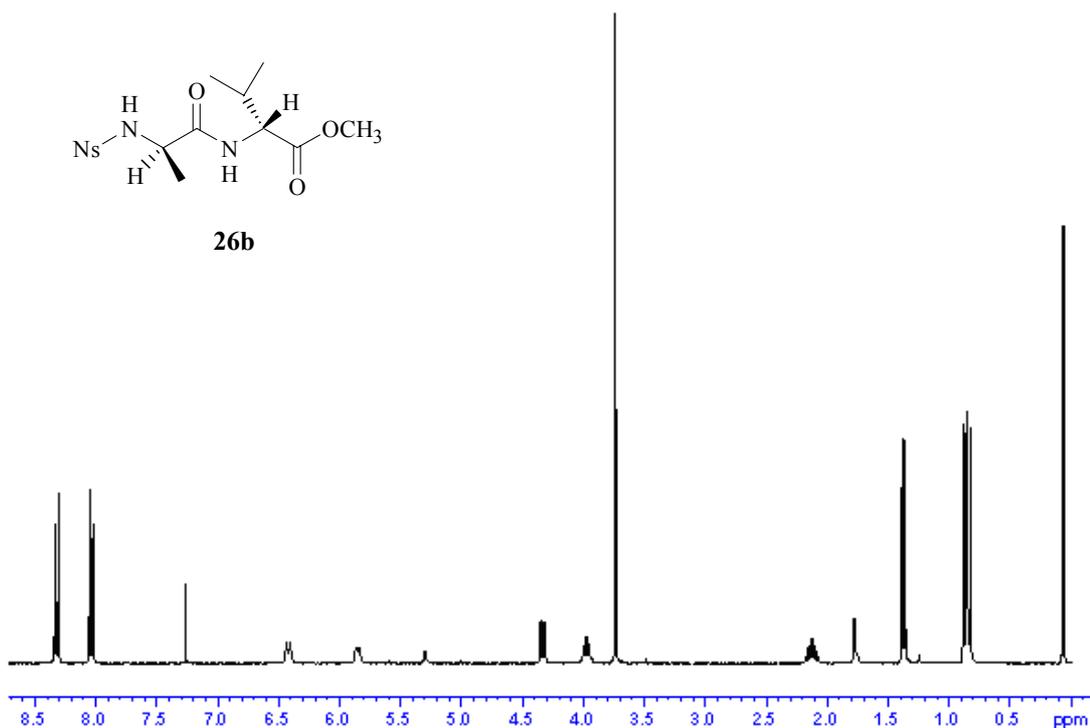


Figura 26. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) di **26b**

E' stata poi preparata un'appropriata miscela dei grezzi di reazione **26a** e **26b**, analizzata mediante $^1\text{H-NMR}$ (Figura 27).

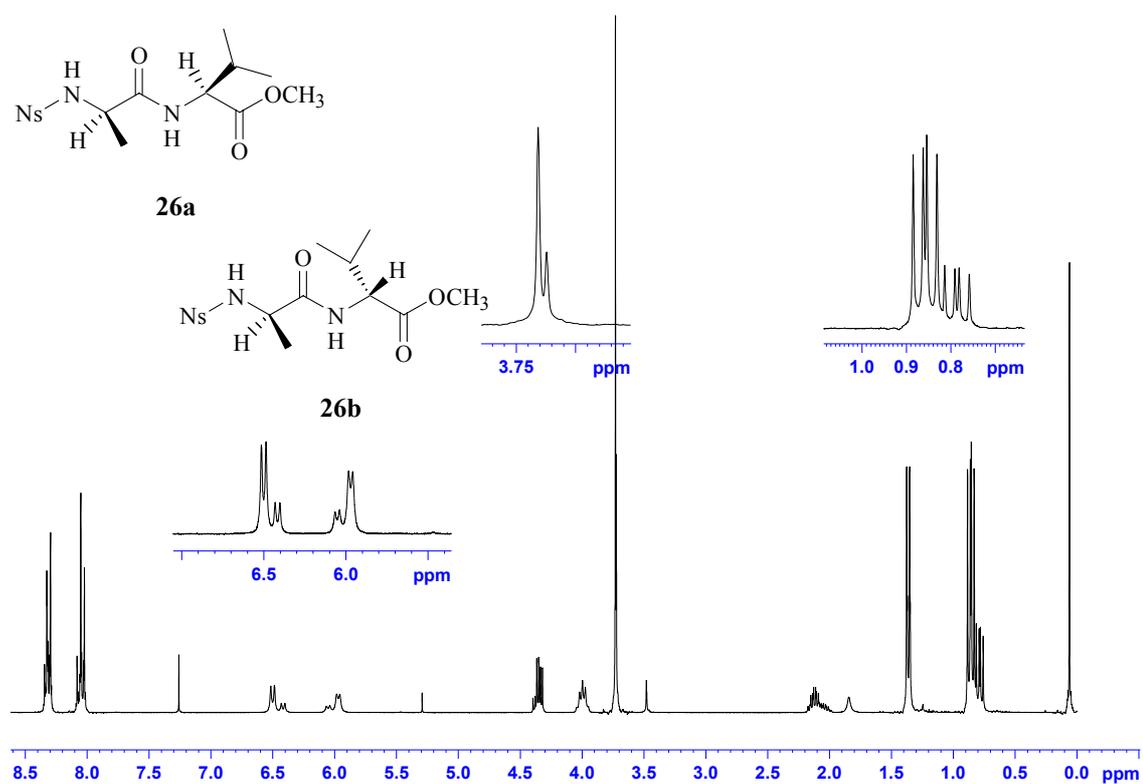


Figura 27. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) della miscela dei dipeptidi **26a** e **26b**

Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ ottenuto (**Figura 27**) si evidenzia che i segnali caratteristici dei due epimeri si differenziano nettamente.

In particolare, è possibile osservare segnali distinti per i metili diastereotopici dei residui di valina, per i protoni degli esteri metilici, per i protoni solfonamidici e per quelli ammidici.

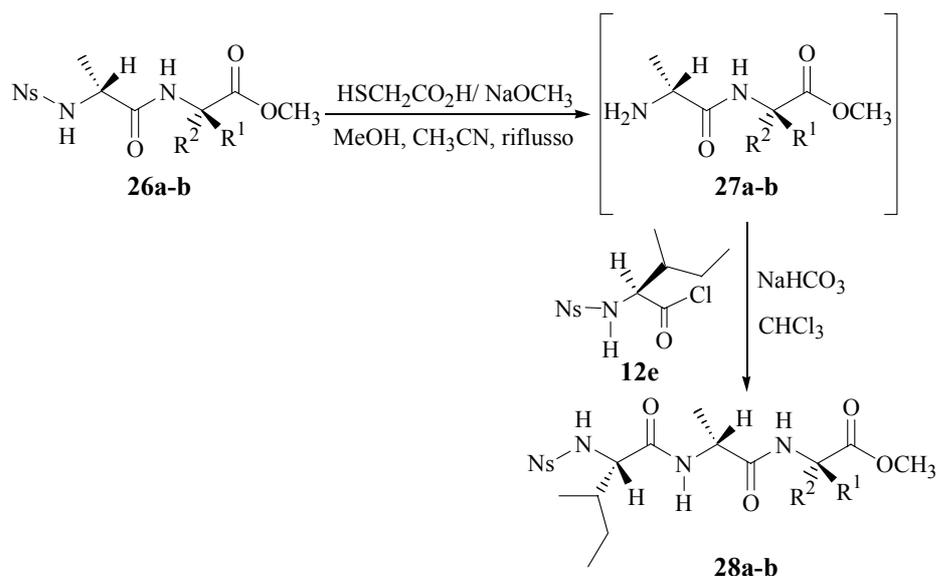
Il confronto dello spettro $^1\text{H-NMR}$ della miscela (**Figura 27**) con gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei singoli dipeptidi (**Figura 25** e **Figura 26**) esclude la formazione di prodotti derivanti da epimerizzazione.

Anche l'analisi GC-MS della stessa miscela di **26a** e **26b** ha evidenziato la presenza nel cromatogramma corrispondente di due picchi distinti, uno per ciascun diastereoisomero. L'analisi successiva dei due grezzi di reazione denota in ciascun grezzo l'assenza dell'altro diastereoisomero.

Successivamente sono stati sintetizzati tripeptidi diastereomerici al fine di ottenere catene peptidiche più lunghe e valutare gli aspetti stereochimici dell'intera procedura, che prevede la rimozione del gruppo nosile dalla funzione amminica terminale e l'accoppiamento del dipeptide deprotetto con il cloruro di un altro *N*-nosil- α -amminoacido. È stato osservato che per la rimozione del gruppo nosile dai sistemi dipeptidici **26a-b**, è necessario aumentare ulteriormente la quantità di metossido di sodio e che la reazione va a completezza in tempi più lunghi.

Gli *N*-nosildipeptidi **26a-b** sono stati deprotetti sulla funzione amminica mediante trattamento con 3 equivalenti di acido mercaptoacetico e 16 equivalenti di metossido di sodio a riflusso, in una miscela di acetonitrile e metanolo. La completa rimozione del gruppo protettore è stata osservata dopo 2 ore (**Schema 29**). Anche in questo caso i prodotti **27a-b** con la funzione α -amminica libera non sono stati isolati, ma direttamente utilizzati per l'accoppiamento con il cloruro dell'*N*-nosil-*L*-isoleucina (**12e**, **Schema 29**). I corrispondenti tripeptidi nosil-protetti $\text{Ns-L-Ile-D-Ala-L-Val-OCH}_3$ (**28a**) e $\text{Ns-L-Ile-D-Ala-D-Val-OCH}_3$ (**28b**) sono stati recuperati con rese dell'89% e dell'84%, rispettivamente (**Tabella 11**).

Tutti i prodotti sintetizzati seguendo le condizioni di reazione sinora descritte risultano sufficientemente puliti dopo semplice trattamento idrolitico della miscela grezza di reazione. I prodotti ottenuti, infatti, non necessitano di alcuna purificazione cromatografica.



Schema 29. Sintesi degli *N*-nosil tripeptidi **28a** e **28b**

Tabella 11. Risultati della sintesi degli *N*-nosil tripeptidi **28a** e **28b**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
28a	H	CH(CH ₃) ₂	89
28b	CH(CH ₃) ₂	H	84

La caratterizzazione dei prodotti è stata realizzata mediante ¹H-NMR, ¹³C-NMR e GC-MS.

Dallo spettro ¹H-NMR di una miscela opportunamente preparata dei due grezzi di reazione **28a** e **28b**, risulta evidente che i due tripeptidi diastereomerici si differenziano nettamente nello spostamento chimico relativo al protone ammidico ed ai protoni del gruppo OCH₃ del residuo amminoacidico C-terminale.

L'analisi ¹H-NMR dei singoli prodotti grezzi di reazione **28a** e **28b** rivela chiaramente la presenza di un solo prodotto in ciascun campione, con segnali ¹H-NMR totalmente attribuibili ad un solo diastereoisomero. In particolare, i picchi relativi al protone ammidico ed ai protoni del gruppo OCH₃ del residuo amminoacidico C-terminale, sono stati scelti per determinare l'eventuale presenza dell'altro diastereoisomero in ciascuno spettro.

Un'ulteriore conferma dell'assenza di epimerizzazione è fornita dall'analisi GC-MS della miscela di **28a** e **28b**: nel gascromatogramma i picchi relativi ai due diastereoisomeri si separano in maniera distinta (**Figura 28, [A]**). L'analisi GC-MS successiva dei due grezzi di reazione rileva in ciascuno grezzo l'assenza dell'altro

diastereoisomero (Figura 28, [B] e [C]).

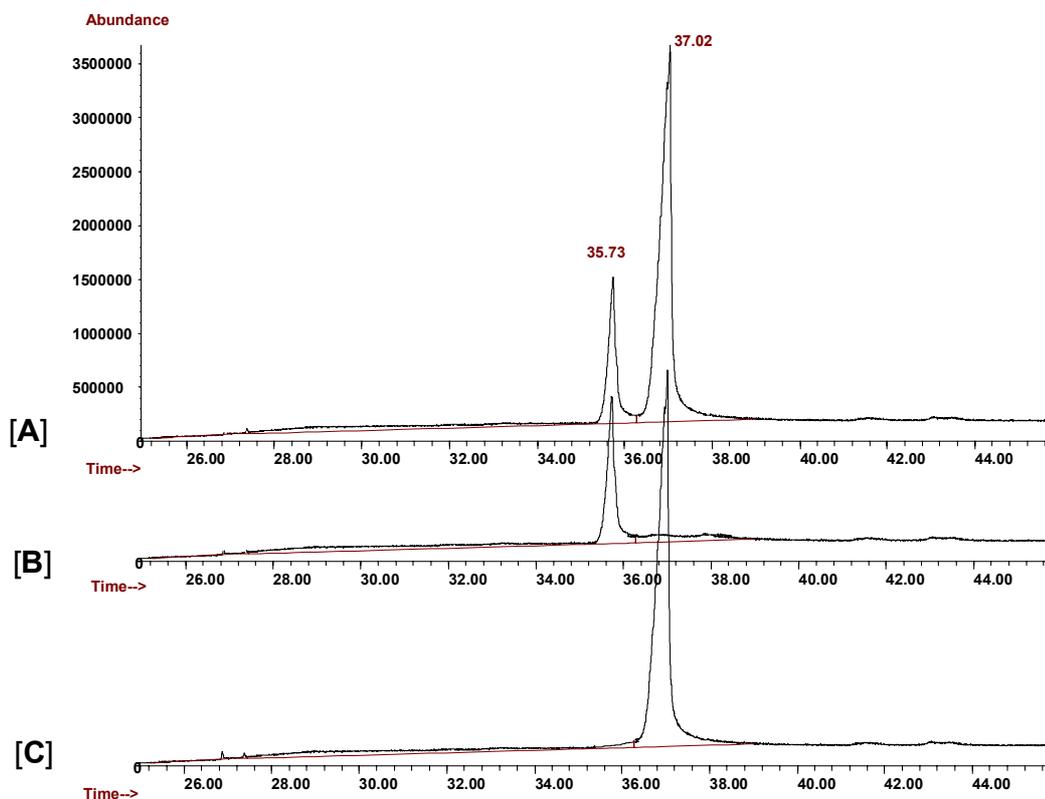


Figura 28. Confronto dei gas cromatogrammi: [A] miscela di *N*-Ns-L-Ile-D-Ala-L-Val-OCH₃ (35.73 min) e *N*-Ns-L-Ile-D-Ala-D-Val-OCH₃ (37.02 min); [B] GC-MS del diastereoisomero **28a**; [C] GC-MS del diastereoisomero **28b**

Lo spettro di massa (EI) dei due composti **28a** e **28b** (Figura 29) è caratterizzato dal picco relativo allo ione molecolare (M^+) a m/z 500. Il frammento a m/z 441 è dovuto alla perdita del radicale COOCH₃• dallo ione molecolare.

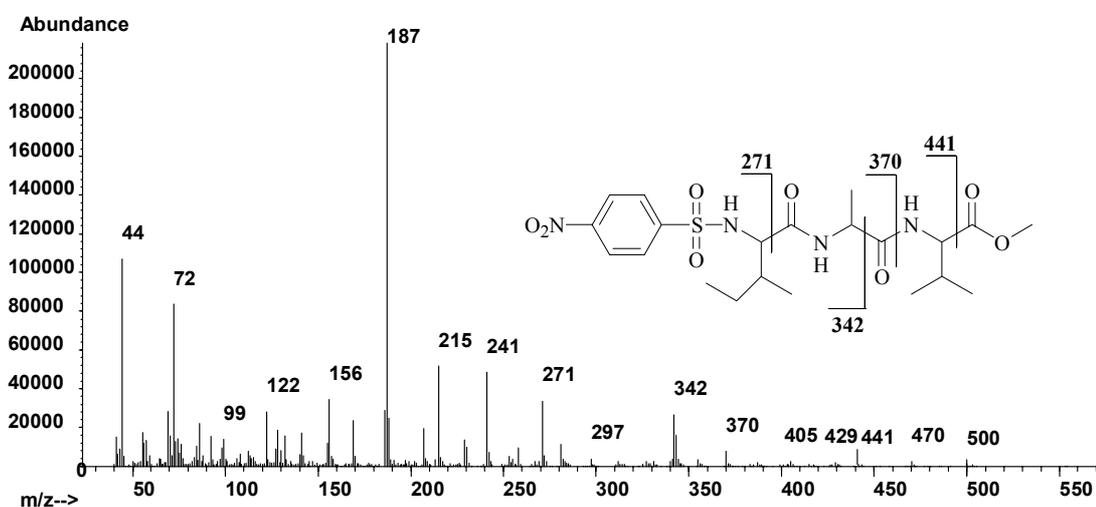


Figura 29. Spettro di massa del tripeptide *N*-Ns-L-Ile-D-Ala-L-Val-OCH₃ (**28a**)

Il frammento a m/z 370 deriva dallo ione molecolare per rottura del legame ammidico del residuo C-terminale della valina. Il picco a m/z 342 è relativo al frammento che si origina dallo ione molecolare per perdita del radicale $C_7H_{12}NO_3\cdot$. Il picco a m/z 271 è relativo al frammento che si origina per perdita del radicale $C_{10}H_{17}O_4N_2\cdot$ dallo ione molecolare.

Lo ione a m/z 187, che è anche il picco base nello spettro, deriva dallo ione molecolare per perdita iniziale di un radicale $CH_3\cdot$ della catena laterale del residuo di alanina e rottura successiva di un legame ammidico. I frammenti a m/z 186 e a m/z 122 sono caratteristici della frammentazione del gruppo 4-nitrobenzensolfonile.

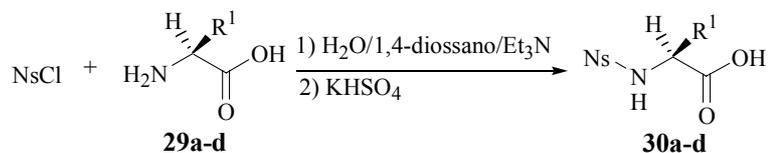
Nel lavoro descritto sinora sono stati evidenziati i vantaggi relativi all'utilizzo del gruppo protettore nosile nella sintesi di oligopeptidi contenenti amminoacidi lipofilici. In particolare, ogni passaggio sintetico della procedura descritta, ovvero la protezione della funzione α -amminica, la formazione del legame peptidico e la rimozione del gruppo solfonammidico, è caratterizzato da condizioni di reazioni blande, rese elevate ed eccellente purezza dei prodotti finali, i quali non necessitano di purificazione cromatografica e mantengono l'integrità dei centri chirali presenti.

Alla luce dei risultati ottenuti, il passo successivo è stato quello di verificare la versatilità del gruppo nosile valutando la possibile applicazione della metodologia proposta alla preparazione di piccole sequenze peptidiche contenenti amminoacidi funzionalizzati in catena laterale.²⁷⁸ In particolare, è stata presa in considerazione la possibilità di ottenere peptidi contenenti α -amminoacidi protetti in catena laterale con gruppi protettori stabili nelle condizioni di reazione richieste per la protezione e la deprotezione della funzione α -amminica e per la formazione del legame peptidico. Sono stati scelti a questo scopo amminoacidi recanti in catena laterale gruppi protettori acido labili che possono essere ortogonali al gruppo protettore nosile. La formazione del legame peptidico è stata realizzata mediante l'impiego di opportuni agenti di accoppiamento al fine di evitare la parziale deprotezione dei gruppi funzionali presenti in catena laterale durante la formazione dei cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi.

Gli *N*-nosil- α -amminoacidi **30a-d** sono stati preparati a partire dai corrispondenti α -amminoacidi **29a-d**, protetti in catena laterale con gruppi protettori acido labili.

In un esperimento tipico la *N*^ε-Boc-L-lisina (**29a**), scelta come substrato modello, è stata solubilizzata in una miscela 1:1 di acqua distillata e 1,4-diossano e trattata con il cloruro dell'acido *p*-nitrobenzensolfonico in presenza di trietilammina a 0°C (**Schema 30**). Dopo soli 30 minuti ed in seguito a trattamento acido con una soluzione di $KHSO_4$ al 5%, è

stata recuperata la N^α -nosil- N^ϵ -Boc-L-lisina (**30a**) con una resa del 73% (Tabella 12).



Schema 30. Protezione della funzione amminica degli α -amminoacidi **29a-d** con il gruppo nosile

Tabella 12. Sintesi degli N -nosil- α -amminoacidi **30a-d**

Composto	R ¹	Resa (%)
30a	(CH ₂) ₄ NH-(Boc)	73
30b	CH ₂ C ₆ H ₄ O-(<i>t</i> -Bu)	75
30c	CH ₂ S-(Trt)	83
30d	CH ₂ CONH-(Trt)	89

La caratterizzazione del prodotto è stata realizzata mediante ¹H-NMR, ¹³C-NMR e MALDI. Lo spettro ¹H-NMR di **30a** (Figura 30) mostra come segnali caratteristici del composto due doppietti di area 2 a 8.39 e 8.00 ppm relativi agli idrogeni del nosile e un doppietto a 8.58 ppm corrispondente all'NH solfonammidico. E' evidente nello spettro anche un singoletto relativo ai protoni del gruppo Boc in catena laterale a 1.34 ppm.

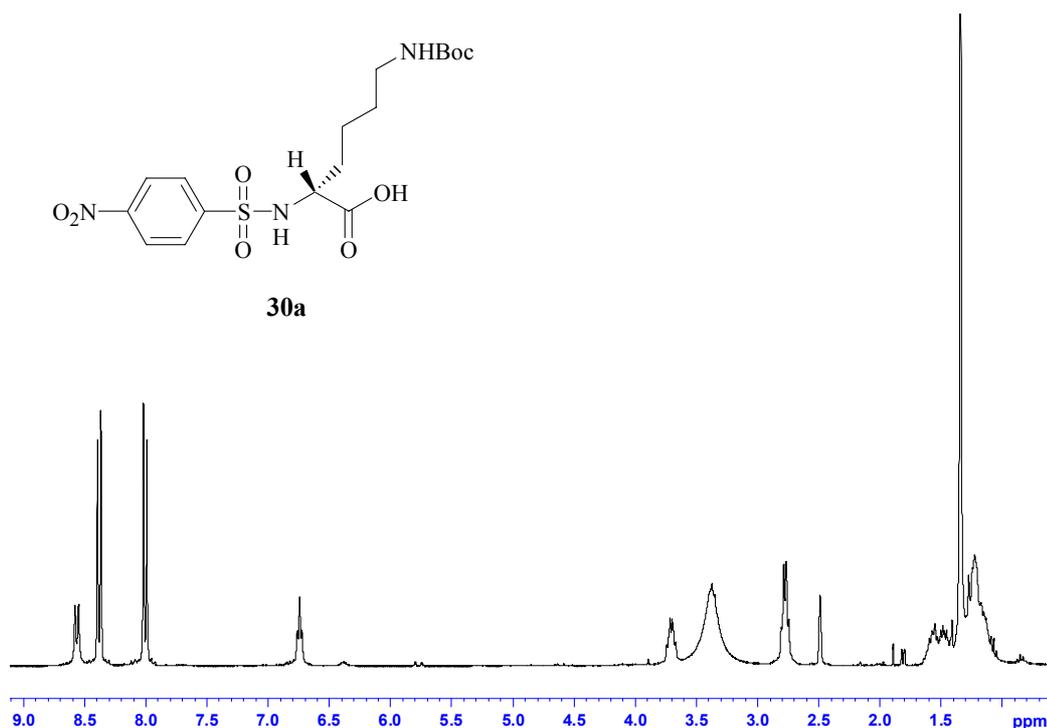


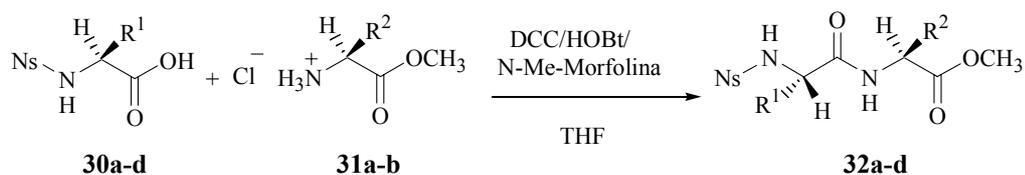
Figura 30. Spettro ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) della N^α -Ns- N^ϵ -(Boc)-Lys-OH (**30a**)

Non è stato possibile in questo caso analizzare il composto **30a** mediante GC/MS a causa della presenza del gruppo uretanico Boc.

In analogia al trattamento del sistema modello sono stati preparati altri amminoacidi *N*-nosil protetti recanti gruppi protettori acido labili in catena laterale. Gli α -amminoacidi *N*-nosil protetti **30b-d** sono stati ottenuti con rese eccellenti comprese tra il 75 e l'89%. La caratterizzazione di questi prodotti è stata effettuata mediante $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e MALDI.

Al fine di sintetizzare gli *N*-nosil dipeptidi contenenti residui amminoacidici funzionalizzati in catena laterale, è stato necessario cambiare la procedura sintetica di accoppiamento che prevedeva la attivazione della funzione carbossilica sotto forma di cloruro. A causa della presenza di protezioni acido labili in catena laterale, l'accoppiamento dei nosil amminoacidi **30a-d** con il cloridrato degli esteri metilici degli α -amminoacidi **31a** e **31b** è stato realizzato in presenza di dicicloesilcarbodimide, 1-idrossibenzotriazolo ed *N*-metilmorfolina (**Schema 31**).

In un esperimento tipico la *N* ^{α} -nosil-*N* ^{ϵ} -Boc-L-lisina (**30a**) solubilizzata in tetraidrofurano (THF) anidro è stata trattata con il cloridrato dell'estere metilico della L-alanina, in presenza di 1-idrossibenzotriazolo ed *N*-metilmorfolina; alla soluzione, raffreddata a 0° C con una miscela frigorifera di ghiaccio e cloruro di sodio e mantenuta sotto agitazione costante, è stata aggiunta la dicicloesilcarbodimide. Dopo 2 ore, il risultante dipeptide *N* ^{α} -nosil-*N* ^{ϵ} -Boc-L-lisinil-L-alaninaOMe (**32a**) è stato recuperato con una resa del 90% come unico prodotto di reazione (**Tabella 13**).



Schema 31. Sintesi degli *N*-nosil dipeptidi **32a-d**

Tabella 13. Sintesi degli *N*-nosil dipeptidi **32a-d**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
32a	(CH ₂) ₄ NH-(Boc)	CH ₃	90
32b	CH ₂ C ₆ H ₄ O-(t-Bu)	CH(CH ₃) ₂	82
32c	CH ₂ S-(Trt)	CH ₃	87
32d	CH ₂ CONH-(Trt)	CH ₃	95

Il dipeptide è stato caratterizzato mediante $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e MALDI. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (**Figura 31**) di **32a** ha evidenziato la presenza dei segnali caratteristici del nosile a 8.05 e 8.30 ppm; sono evidenti i doppietti relativi all'NH ammidico a 7.10 ppm e all'NH solfonammidico 6.40 ppm. Il multipletto relativo al protone del carbonio in α della lisina risuona a 4.31 ppm, mentre il multipletto corrispondente al protone del carbonio in α dell'alanina risuona a 3.85 ppm.

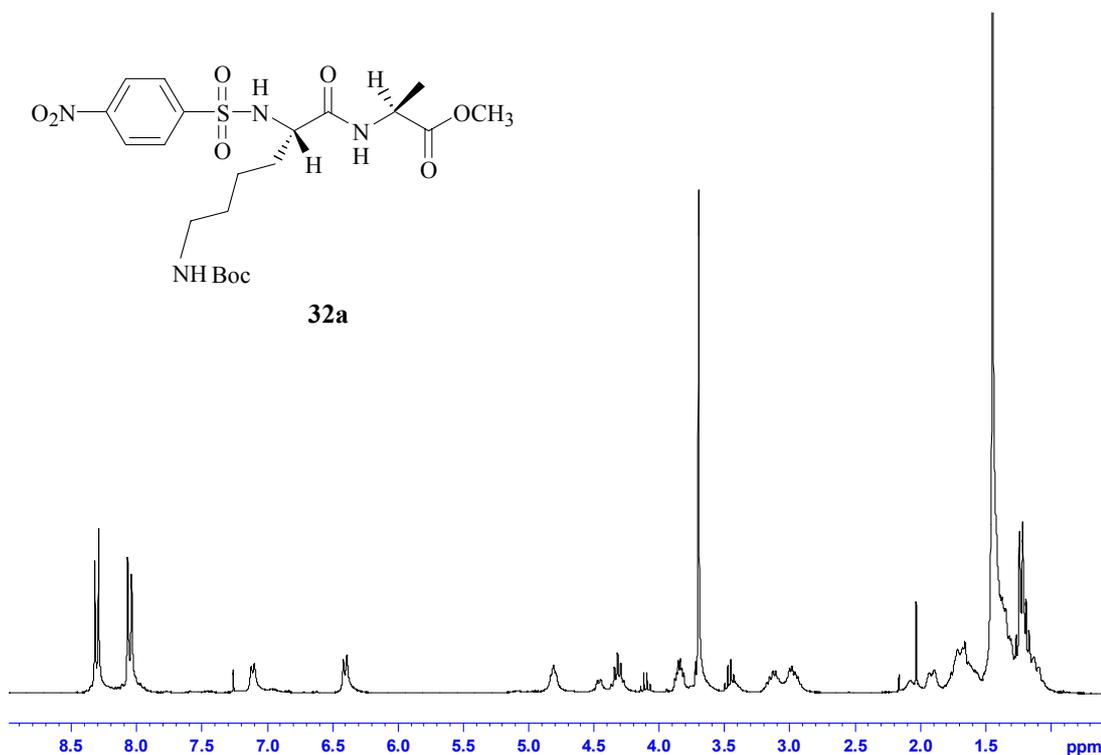


Figura 31. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) di $N^\alpha\text{-Ns-}N^\epsilon\text{-Boc-Lys-Ala-OMe}$ (**32a**)

Utilizzando le stesse condizioni di accoppiamento sono stati sintetizzati gli altri dipeptidi nosil protetti **32b-d** elencati in tabella 13, con rese comprese tra l'82 e il 95%. La struttura dei dipeptidi ottenuti è stata confermata mediante $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e MALDI. In particolare gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei grezzi di reazione mostrano, in tutti i casi, il segnale relativo al protone ammidico e quello relativo al protone solfonammidico; inoltre, tutto il processo di accoppiamento avviene senza evidenze di racemizzazione dei centri chirali coinvolti.

Dopo aver verificato l'efficacia della procedura sintetica per l'ottenimento dei dipeptidi funzionalizzati in catena laterale, è stata verificata la possibilità di rimuovere selettivamente il gruppo protettore nosile presente sull'azoto α -amminico.

Il dipeptide $N^\alpha\text{-nosil-}N^\epsilon\text{-Boc-L-lisinil-L-alaninaOMe}$ (**32a**) scelto come substrato modello è stato solubilizzato in acetonitrile e addizionato di acido mercaptoacetico e metossido di

sodio in un rapporto stechiometrico di 1:3:16 rispetto al dipeptide di partenza. E' stata poi aggiunta una quantità di metanolo tale da solubilizzare il metossido di sodio presente. La miscela di reazione, mantenuta alla temperatura di riflusso per un'ora, ha fornito il dipeptide deprotetto sulla funzione α -amminica **33a**, che è stato utilizzato immediatamente come tale e senza purificazione per l'accoppiamento in situ con il cloruro dell'amminoacido nosil protetto **12a**, opportunamente preparato (Schema 32). La reazione di accoppiamento è stata condotta in una soluzione bifasica di carbonato di sodio e cloroformio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Il successivo trattamento della miscela di reazione ha consentito il recupero del corrispondente tripeptide N^α -nosil-L-valil- N^ϵ -Boc-L-lisinil-L-alaninaOMe (**34a**) con una resa dell'85% (Tabella 14).

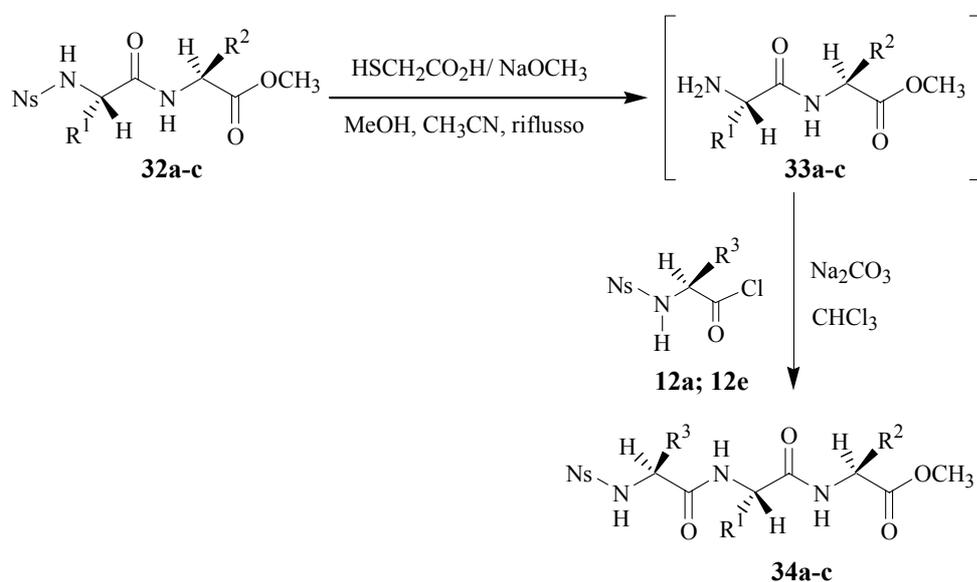

 Schema 32. Sintesi dei tripeptidi **34a-c**

 Tabella 14. Sintesi dei tripeptidi **34a-c**

Composto	R ¹	R ²	R ³	Resa (%)
34a	(CH ₂) ₄ NH-(Boc)	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	85
34b	CH ₂ C ₆ H ₄ O-(<i>t</i> -Bu)	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	75
34c	CH ₂ S-(Trt)	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	71

Il prodotto grezzo di reazione è stato caratterizzato mediante ¹H-NMR, ¹³C-NMR e MALDI.

Lo spettro ¹H-NMR di **34a** (Figura 32) mostra segnali attribuibili con evidenza alla presenza di un solo diastereoisomero. Particolarmente indicativi della struttura di **34a**

sono i segnali corrispondenti ai protoni ammidici della lisina e dell'alanina, a 7.10 e 7.30 ppm, rispettivamente e quelli relativi al protone solfonamidico ed al protone uretanico a 6.51 e 4.92 ppm, rispettivamente. Anche l'esistenza di un unico singoletto a 3.75 ppm relativo al protone metil estereo, conferma la presenza di un solo diastereoisomero.

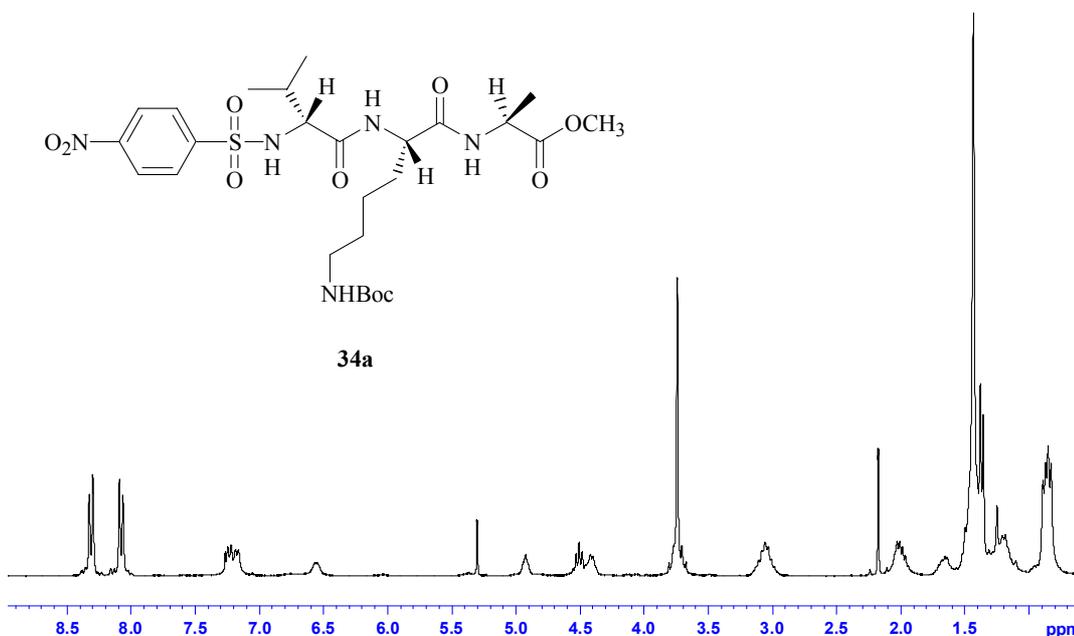


Figura 32. Spettro $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) del tripeptide **34a**

Un'ulteriore conferma è fornita dalla presenza nello spettro del segnale relativo al CH in α all'azoto ammidico del residuo di alanina a 4.51 ppm, del segnale relativo al CH in α all'azoto solfonamidico della valina a 4.41 ppm e dal segnale relativo al CH in α all'azoto ammidico del residuo di lisina a 3.88 ppm.

I tripeptidi **34b** e **34c** sono stati sintetizzati utilizzando la stessa procedura adottata per la preparazione di **34a**, con rese rispettivamente del 75 e del 71% (**Schema 32**, **Tabella 14**). I prodotti grezzi di reazione sono stati caratterizzati mediante $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e MALDI.

L'analisi spettroscopica $^1\text{H-NMR}$ dei tripeptidi **34a-c** permette di escludere l'indesiderata reazione di deprotezione dei gruppi funzionali presenti in catena laterale. Infatti, negli spettri $^1\text{H-NMR}$ di ciascun composto si osserva la presenza soltanto di segnali attribuibili alla struttura dei tripeptidi **34a-c**, mentre risultano assenti segnali estranei distinguibili.

In definitiva, la metodologia sviluppata, basata sull'utilizzo del gruppo protettore nosile, consente di realizzare la sintesi in soluzione di piccole sequenze peptidiche, in

maniera agevole e in condizioni di reazione blande. In particolare, i risultati conseguiti hanno evidenziano diversi vantaggi relativi all'utilizzo di questo gruppo protettore.

Innanzitutto nella reazione di protezione della funzione amminica di α -amminoacidi, il nosile viene introdotto facilmente e con alte rese, sia nel caso di amminoacidi lipofilici che di amminoacidi funzionalizzati in catena laterale.

I cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi²⁶⁰ possono essere utilizzati per l'elongazione della catena peptidica ed hanno il vantaggio di essere sintetizzati facilmente e con alte rese. L'elongazione della catena peptidica procede efficientemente anche utilizzando opportuni agenti di accoppiamento.

Il sistema reagente acido mercaptoacetico/metossido di sodio adottato per la rimozione del gruppo nosile, consente una completa e specifica deprotezione della funzione α -amminica mantenendo, invece, inalterati i gruppi protettori in catena laterale.

Il metodo descritto risulta particolarmente vantaggioso perché le condizioni di reazione adottate in ogni stadio dell'intero processo sintetico, non causano alcuna racemizzazione degli stereocentri presenti nel peptide.

La strategia proposta è di generale applicazione ed è stata estesa alla sintesi di peptidi contenenti α -amminoacidi funzionalizzati in catena laterale; in particolare, sono stati impiegati α -amminoacidi recanti gruppi protettori acido-labili, al fine di dimostrare la compatibilità di questi ultimi con il gruppo nosile.

I risultati ottenuti dimostrano che l'utilizzo del gruppo nosile si combina molto bene con differenti gruppi protettori ampiamente usati nella sintesi peptidica in soluzione basata sulla strategia Fmoc.

Quindi, il gruppo nosile può essere considerato una valida alternativa al gruppo Fmoc nella sintesi peptidica in soluzione; la sua rimozione dalla funzione amminica terminale della catena peptidica, fornisce il prodotto deprotetto con elevata purezza senza necessità di complesse procedure di purificazione.

Inoltre, il reagente necessario per sintetizzare gli *N*-nosil- α -amminoacidi, il *p*-nitrobenzensolfonil cloruro, è commercialmente disponibile e molto più economico del reagente utilizzato per l'introduzione del gruppo protettore Fmoc.

La procedura sviluppata risulta, per di più, particolarmente conveniente per sintetizzare peptidi *N*-metilati su specifici residui amminoacidici²⁶⁰ e rappresenta una nuova ed alternativa strategia nella sintesi peptidica.

3.4. RIDUZIONE DELLE *N*-METIL-*N*-METOSSIAMMIDI NELLE CORRISPONDENTI AMMINE CON IL SISTEMA REAGENTE $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$

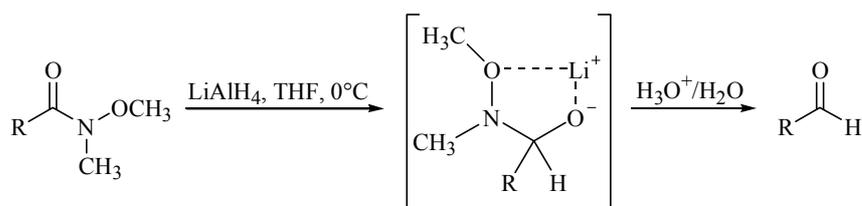
Nell'ambito della sintesi di peptidi modificati l'interesse è stato rivolto, in un secondo momento, alla realizzazione di un'altra modifica dello scheletro peptidico e, in particolare, all'introduzione sull'estremità C-terminale di amminoacidi e peptidi, della funzionalità *N*-metil-*N*-metossiamminica.

Le *N*-metil-*N*-metossiammine rappresentano utili intermedi di reazione nella sintesi organica;²⁸⁷ diverse molecole biologicamente attive, o intermedi coinvolti nella loro sintesi,²⁸⁸⁻²⁹⁰ sono caratterizzati dalla presenza di un gruppo funzionale *N*-metil-*N*-metossiamminico. In particolare, alcuni *N*-metil-*N*-metossiamminoacidi hanno mostrato un'interessante attività anticonvulsione.²⁸⁹

Al fine di realizzare una nuova procedura sintetica per la preparazione di *N*-metil-*N*-metossiammine, si è pensato che le *N*-metil-*N*-metossiammidi (ammidi di Weinreb) potessero rappresentare utili precursori.^{291,292}

A tale proposito, sono state sintetizzate le *N*-metil-*N*-metossiammidi^{293,294} di semplici sistemi alifatici ed aromatici ed è stata studiata la loro riduzione nelle corrispondenti ammine.²⁹¹

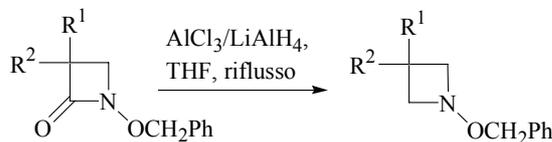
In letteratura è noto che la riduzione delle ammidi di Weinreb con un eccesso di LiAlH_4 porta alla formazione delle corrispondenti aldeidi.²⁹⁵ La reazione procede attraverso la formazione di un intermedio ciclico molto stabile, che si origina in seguito all'addizione dell'idruro al carbonile amidico e alla successiva coordinazione intramolecolare dello ione litio. La stabilità di quest'intermedio tetraedrico impedisce l'ulteriore addizione di idruro: soltanto il successivo trattamento idrolitico causa l'eliminazione della metilmetossiammina e la formazione della funzione aldeidica, senza ulteriore riduzione ad alcool (**Schema 33**).



Schema 33. Conversione delle ammidi di Weinreb nelle corrispondenti aldeidi

Sono riportati solo pochi esempi in cui le *N*-metil-*N*-metossiammidi vengono convertite nelle corrispondenti ammine mediante riduzione.^{288,296} Un idrossammato legato ad una

resina è stato convertito nella corrispondente idrossilammina terziaria mediante riduzione con monocloroalani.²⁹⁷ Lo stesso reagente è stato usato per la conversione degli 1-(benzilossi)-2-azetidioni nelle corrispondenti 1-(benzilossi)azetidina²⁹⁸ (**Schema 34**).



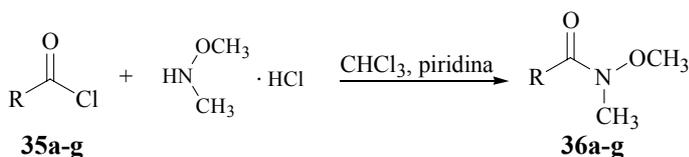
Schema 34. Conversione degli 1-(benzilossi)-2-azetidioni nelle corrispondenti azetidina

Tuttavia tutti questi approcci richiedono riscaldamento e tempi di reazione lunghi.

In un prova iniziale è stata sperimentata la riduzione diretta delle *N*-metil-*N*-metossiammidi con litio alluminio idruro utilizzando le stesse condizioni sperimentali riportate in letteratura.²⁸⁸

Le *N*-metil-*N*-metossiammidi **36a-g** sono state facilmente ottenute facendo reagire i corrispondenti cloruri **35a-g** con il cloridrato dell'*N,O*-dimetilidrossilammina in presenza di piridina (**Schema 35**). La reazione, condotta a temperatura ambiente per 50-60 minuti, ha prodotto, dopo trattamento idrolitico, le *N*-metil-*N*-metossiammidi **36a-g** con rese comprese tra l'84% e il 99% (**Tabella 15**). I prodotti sono stati caratterizzati mediante ¹H-NMR e GC-MS.

L'analisi dello spettro ¹H-NMR dei composti **36a-g** ha evidenziato la presenza, in ciascuno spettro, di due singoletti di area tre intorno a 3.19-3.39 ppm ed intorno a 3.50-3.70 ppm relativi ai protoni dei due gruppi metilici legati rispettivamente all'azoto e all'ossigeno.



Schema 35. Sintesi delle *N*-metil-*N*-metossiammidi **36a-g**

Tabella 15. Sintesi delle *N*-metil-*N*-metossiammidi **36a-g**

Composto	R	Resa (%)
36a	C ₆ H ₅	99
36b	4-CH ₃ C ₆ H ₄	93
36c	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	91
36d	4-ClC ₆ H ₄	86
36e	4-NO ₂ C ₆ H ₄	84
36f	C ₆ H ₅ CH ₂	89
36g	CH ₃ (CH ₂) ₄	90

L'*N*-metil-*N*-metossi-2-fenilacetammide (**36f**), scelta come substrato modello, è stata solubilizzata in tetraidrofurano anidro e la soluzione ottenuta è stata aggiunta lentamente per due ore ad una sospensione di litio alluminio idruro in etere etilico anidro, a temperatura ambiente; successivamente la miscela di reazione è stata sottoposta a riflusso.²⁸⁸ Al fine di monitorare la reazione di riduzione, aliquote della miscela di reazione prelevate in tempi diversi, sono state trattate con una soluzione acquosa satura di carbonato di sodio ed estratte con etere; le fasi organiche sono state analizzate mediante GC-MS.

Dopo 30 minuti dall'inizio del riflusso, l'analisi GC-MS del primo campione ha evidenziato l'assenza dell'ammide **36f** e la formazione della 2-fenilacetaldeide, insieme a tracce del 2-feniletanolo ed una piccola quantità dell'*N*-metil-*N*-metossi-2-feniletanammina. Le analisi successive hanno mostrato una progressiva diminuzione dell'aldeide ed un incremento della concentrazione dell'ammina. Dopo 12 ore, la miscela di reazione conteneva solo l'ammina ed una piccola quantità della 2-fenilacetaldeide.

La purificazione del grezzo di reazione, mediante cromatografia su colonna corta, ha portato al recupero dell'*N*-metil-*N*-metossi-2-feniletanammina (**37f**) e della 2-fenilacetaldeide con rese del 62% e del 12%, rispettivamente. Pertanto, la conversione delle *N*-metil-*N*-metossiammidi nelle corrispondenti ammine mediante l'uso del litio alluminio idruro come unico reagente, richiede condizioni di reazione vigorose e tempi lunghi.

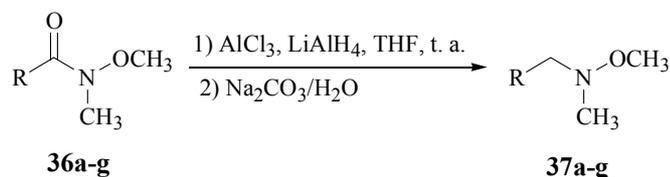
Il decorso di questa reazione di riduzione suggerisce il coinvolgimento dell'intermedio tetraedrico metallo-chelato²⁹³ sia nella formazione dell'aldeide, che viene recuperata dopo il trattamento idrolitico, sia nella formazione a riflusso dell'ammina.

Per questa ragione, si è pensato che le ammidi di Weinreb potevano essere selettivamente convertite nelle corrispondenti *N*-metil-*N*-metossiammine scegliendo condizioni sperimentali opportune che impedissero la formazione del ciclo pentatomico metallo-chelato e che favorissero, allo stesso tempo, la trasformazione dell'ossigeno carbonilico in un buon gruppo uscente.

Per raggiungere tale obiettivo si è pensato di utilizzare il tricloruro di alluminio accoppiato all'agente riducente litio alluminio idruro.²⁹¹

L'*N*-metil-*N*-metossibenzammide (**36a**), è stata scelta come substrato modello per testare la reazione di riduzione con il sistema reagente tricloruro di alluminio/litio alluminio idruro. In un esperimento tipico, l'ammide **36a** è stata solubilizzata in THF

anidro e trattata con tricloruro di alluminio a temperatura ambiente; successivamente è stato aggiunto il litio alluminio idruro e l'*N*-metil-*N*-metossibenzilammina (**37a**) è stata ottenuta dopo 10 minuti con una resa dell'85%, in seguito ad un semplice work-up, senza necessità di ulteriori purificazioni (**Schema 36**, **Tabella 16**).



Schema 36. Conversione delle *N*-metil-*N*-metossiammidi **36** nelle corrispondenti ammine **37**

Tabella 16. Sintesi delle *N*-metil-*N*-metossiammine **37**

Composto	R	Resa (%)
37a	C ₆ H ₅	85
37b	4-CH ₃ C ₆ H ₄	84
37c	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	100
37d	4-ClC ₆ H ₄	97
37e	4-NO ₂ C ₆ H ₄	95
37f	C ₆ H ₅ CH ₂	84
37g	CH ₃ (CH ₂) ₄	84 ^a

^a L'*N*-metil-*N*-metossi-1-esanamina (**37g**) è stata isolata come cloridrato

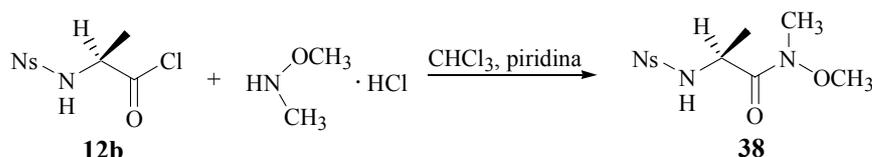
Alla luce degli eccellenti risultati ottenuti con l'ammide **36a**, la reazione è stata estesa ad altri sistemi alifatici ed aromatici (**Schema 36**). La reazione procede andando a completezza in pochi minuti e a temperatura ambiente per tutte le ammidi di Weinreb sottoposte a riduzione e riportate in tabella.

I prodotti sono stati caratterizzati mediante ¹H-NMR, ¹³C-NMR e GC-MS. L'analisi dello spettro ¹H-NMR dei composti **37a-g** ha evidenziato la presenza in ciascuno spettro di due singoletti di area tre intorno a 2.60-3.05 ppm ed intorno a 3.31-3.78 ppm relativi ai protoni dei due gruppi metilici legati, rispettivamente, all'azoto e all'ossigeno ed un singoletto di area due intorno a 2.95-3.84 ppm, relativo ai protoni metilenici.

La reazione di riduzione realizzata usando il sistema reagente AlCl₃/LiAlH₄, rappresenta un eccellente approccio che consente di convertire, in tempi estremamente brevi e a temperatura ambiente, le ammidi di Weinreb nelle corrispondenti ammine. L'aspetto più importante della metodologia sviluppata è sicuramente rappresentato dalla coordinazione del tricloruro di alluminio all'ossigeno carbonilico dell'ammide: questa coordinazione impedisce la formazione del complesso litio-chelato ed il successivo ottenimento dell'aldeide. La mancata formazione dell'intermedio metallo-chelato, implicato nel

cammino che porta dall'*N*-metil-*N*-metossiammide all'aldeide, può risultare determinante sull'attivazione di una reazione alternativa che porta alla formazione delle *N*-metil-*N*-metossiammine: queste ultime che rappresentano, infatti, gli unici prodotti della reazione di riduzione, sono state ottenute facilmente e con rese elevate, in condizioni di reazione blande.

In una fase successiva, al fine di sostituire la funzione carbossilica C-terminale di sistemi peptidici con la funzionalità *N*-metil-*N*-metossiamminica, si è pensato di utilizzare lo stesso sistema reagente per convertire le ammidi di Weinreb di α -amminoacidi opportunamente protetti sulla funzione amminica, nelle corrispondenti *N*-metil-*N*-metossiammine. A tale scopo il cloruro dell'*N*-nosil-L-alanina (**12b**), solubilizzato in diclorometano anidro, è stato trattato con il cloridrato dell'*N,O*-dimetilidrossilammina, in presenza di piridina anidra, a temperatura ambiente per 1 ora; i trattamenti successivi hanno consentito il recupero della corrispondente *N*-metil-*N*-metossiammide **38** con una resa dell'80% (**Schema 37**).



Schema 37. Conversione del cloruro dell'*N*-nosil-L-alanina (**12b**) nella corrispondente *N*-metil-*N*-metossiammide **38**

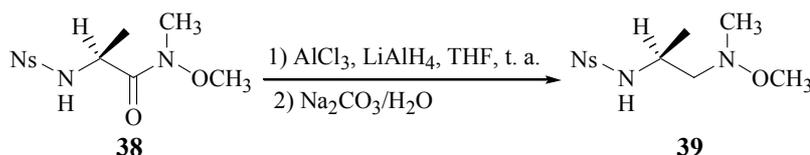
Il prodotto **38** è stato caratterizzato mediante $^1\text{H-NMR}$ e GC-MS.

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ di **38** è possibile distinguere un doppietto a 1.35 ppm relativo al gruppo metilico della catena laterale dell'alanina e due singoletti a 3.04 ppm e a 3.69 ppm relativi ai protoni dei due gruppi metilici legati, rispettivamente, all'azoto e all'ossigeno. Il protone legato al carbonio in α al gruppo carbonilico è rappresentato da un multipletto che risuona a 4.40-4.56 ppm. È possibile, inoltre, distinguere un doppietto a 5.90 ppm relativo al protone solfonamidico e due multipletti a 8.00-8.15 ppm e a 8.45 ppm attribuibili ai protoni aromatici del nosile.

La reazione di riduzione realizzata mediante il sistema reagente $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$ è stata utilizzata per la successiva conversione dell'ammido **38** nella corrispondente *N*-metil-*N*-metossiammina. Tuttavia, in questo caso l'applicazione delle condizioni sperimentali impiegate precedentemente per la sintesi delle *N*-metil-*N*-metossiammine **37a-g**, ha portato ad una parziale formazione del prodotto atteso. Una reazione completa e più veloce è stata osservata utilizzando una maggiore quantità sistema del sistema reagente

$\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$ sempre conducendo la reazione a temperature ambiente.

In particolare l'ammide **38** è stata solubilizzata in THF anidro e trattata con tricloruro di alluminio nel rapporto molare di 1:4; successivamente è stato aggiunto il litio alluminio idruro ($\text{38}/\text{LiAlH}_4$, 1:2) e il prodotto **39** è stata ottenuto dopo 20 minuti con una resa del 98%, in seguito ad un semplice work-up, senza necessità di ulteriori purificazioni (**Schema 38**).



Schema 38. Riduzione dell'ammide **38** con il sistema reagente $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$

Il prodotto **38** è stato caratterizzato mediante $^1\text{H-NMR}$ e GC-MS. Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ di **38** (**Figura 33**) è possibile distinguere un doppietto a 1.16 ppm relativo al gruppo metilico legato al carbonio in α alla funzione solfonammidica e due singoletti a 2.49 ppm e a 3.30 ppm relativi ai protoni dei due gruppi metilici legati, rispettivamente, all'azoto e all'ossigeno. Il protone metinico è rappresentato da un multipletto a 2.52-2.57 ppm, mentre i protoni metilenici generano un multipletto a 3.63-3.41 ppm. È possibile, inoltre, distinguere un doppietto a 5.75 ppm relativo al protone solfonammidico e due multipletti rispettivamente a 8.06-8.19 ppm e a 8.31-8.42 ppm attribuibili ai protoni aromatici del nosile.

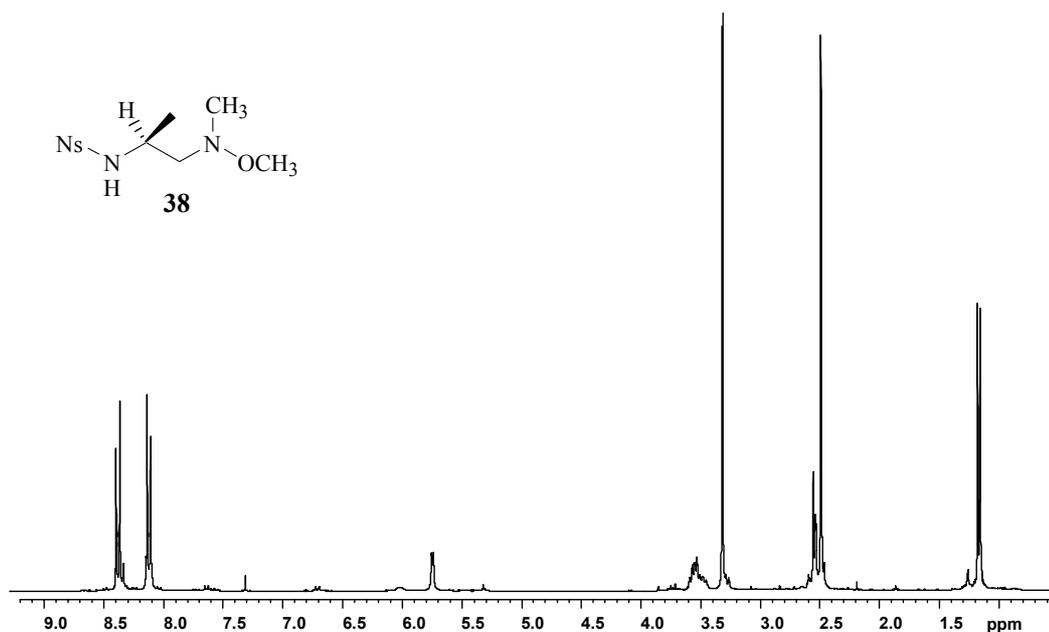


Figura 33. Spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) di **38**

L'analisi spettroscopica $^1\text{H-NMR}$ del composto **38**, permette di escludere la presenza di segnali attribuibili a prodotti derivanti dall'indesiderata deprotezione della funzione amminica. Infatti, nello spettro $^1\text{H-NMR}$ si osservano soltanto segnali attribuibili alla struttura di **38**, mentre risultano assenti segnali estranei distinguibili.

Per realizzare l'ottenimento dei sistemi peptidici modificati in cui la funzione carbossilica C-terminale è sostituita della funzionalità *N*-metil-*N*-metossiamminica, il passo successivo è rappresentato dalla rimozione del gruppo nosile, facilmente realizzabile mediante l'utilizzo del sistema reagente acido mercaptoacetico/metossido di sodio,²⁷⁸ seguita dalla reazione di accoppiamento con un amminoacido attivato.

CAPITOLO 4

PARTE SPERIMENTALE

Premessa

Le analisi GC-MS sono state realizzate con lo strumento Hewlett/Packard GCD serie II (Gas-cromatografo con detector a ionizzazione elettronica), utilizzando una colonna capillare HP-5 MS (95% polidimetil-5% polidifenilsilicone; $l = 30$ m, $d = 0.25$ mm).

Il metano alla pressione di circa 2 Torr, è stato usato come gas reagente per la ionizzazione chimica (CI).

Gli spettri di massa sono stati ottenuti con lo spettrometro Fision Vacuum Generators ZAB-2F mediante la tecnica FAB^+/MS ed impiegando come matrice l'alcol 3-nitrobenzilico. È stato utilizzato un fascio di atomi di xenon operante ad 8 KeV ed una corrente totale di 10 mA.

Gli spettri di massa MALDI sono stati registrati con uno spettrometro TOF/TOF 4700 PROTEOMICS (Applied Biosystems) mediante tecnica *MALDI-Tandem Mass Spectrometry*, utilizzando l'acido α -ciano-4-idrossicinnammico (α -CHH) come matrice, ed una sorgente laser pulsata Nd:YAG operante alla frequenza di 200 Hz ed alla potenza di 6315.

Gli spettri 1H -NMR e gli esperimenti di disaccoppiamento protonico sono stati registrati a 300 MHz con lo spettrometro Bruker Avance 300, usando come solventi $CDCl_3$, CD_3COCD_3 , DMSO- d_6 , D_2O o CD_3OD e come standard interno tetrametilsilano (TMS).

Gli spettri ^{13}C -NMR e gli esperimenti DEPT sono stati registrati a 75.5 MHz con lo stesso strumento.

Gli spettri 2D NOESY sono stati ottenuti con un tempo di mescolamento di 200 msec.

Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in ppm ed i valori delle costanti di accoppiamento (J) sono riportati in Hz.

Gli spettri ^{19}F -NMR sono stati registrati a 470.5 MHz, con lo spettrometro Bruker Avance 500 usando CDCl_3 come solvente. Gli spostamenti chimici del fluoro (δ) sono espressi in ppm e riferiti al triclorofluorometano utilizzato come standard interno.

Gli spettri IR sono stati ottenuti con lo spettrofotometro FT-IR Paragon 1000PC. I valori delle frequenze di assorbimento (ν) sono riportati in cm^{-1} .

I punti di fusione sono stati determinati con l'apparecchiatura Reichert Thermovar "Kofler" in condizioni di pressione atmosferica.

I solventi utilizzati nelle reazioni sono stati purificati ed anidrificati secondo le procedure standard e distillati prima dell'uso.

Il decorso delle reazioni è stato monitorato mediante analisi cromatografica su strato sottile (TLC) eseguita usando lastre di gel di silice 60-F₂₅₄, con spessore di 0.25 mm, su alluminio o su vetro acquistate dalla Merck. Le lastre TLC sono state visualizzate sotto luce ultravioletta alla lunghezza d'onda di 254 nm.

I prodotti grezzi di reazione sono stati purificati mediante cromatografia rapida su colonna corta (FCC), con gel di silice 60 H privo di gesso come fase stazionaria, ed utilizzando come gradienti per l'eluizione le stesse miscele eluenti di solventi selezionate per la cromatografia su strato sottile analitica, con la componente polare ridotta ad un quarto.

I solventi ed i reagenti commercialmente disponibili sono stati acquistati dalla Aldrich Chemical Co., dalla Senn Chemicals, dalla Fluka, dalla Across, dalla Merck e dalla Carlo Erba Reagenti. Tutti i reagenti sono stati usati come tali senza ulteriori purificazioni.

Sintesi dei reagenti di base

N-Nitroso-N-Metilurea

In una beuta raffreddata con una miscela frigorifera di ghiaccio e cloruro di sodio, contenente 90 g di ghiaccio e 7.80 ml (14.12 g) di H₂SO₄ concentrato, si aggiunge lentamente, sotto vigorosa agitazione magnetica, una soluzione acquosa (70 ml) di *N*-metilurea (15.90 g) e NaNO₂ (15.70 g al 95%). Al termine dell'aggiunta si recupera un solido cristallino mediante filtrazione sottovuoto. Il solido viene lavato con 50 ml di acqua distillata calda ed anidrificato in essiccatore sottovuoto, usando P₂O₅ come agente anidrificante. La resa quantitativa della reazione porta all'ottenimento di 27.70 g di *N*-nitroso-*N*-metilurea.

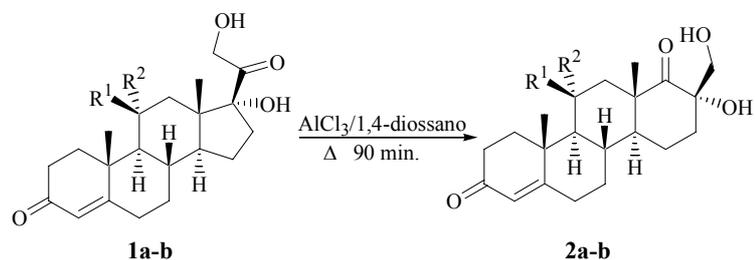
Diazometano

In un pallone a due colli contenente 100 ml di diclorometano e 30 ml di una soluzione acquosa di KOH al 40%, si introducono, a piccole porzioni, 10 g (96 mmoli) di *N*-nitroso-*N*-metilurea. La temperatura all'interno della miscela di reazione non deve superare i 4°C. La reazione termina dopo 20 minuti. La fase organica contenente il diazometano viene separata dalla fase acquosa e conservata su KOH a -20 °C.

Titolazione del diazometano

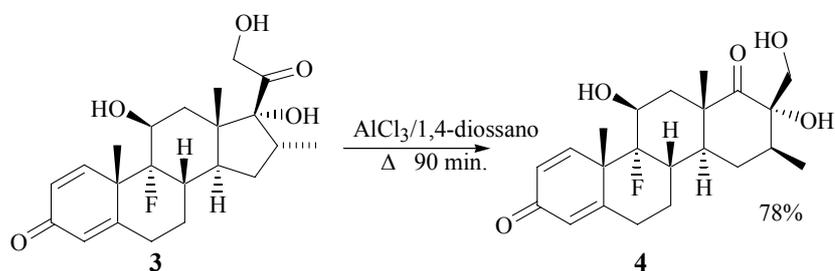
Ad una soluzione di acido benzoico (0.25 g, 2 mmoli) in 12.50 ml di diclorometano anidro, si aggiungono 2.40 ml di una soluzione di diazometano in diclorometano. L'eccesso di acido benzoico viene titolato con una soluzione di NaOH 0.1 N utilizzando come indicatore di pH la fenolftaleina. Si utilizzano 3.80 ml (0.38 mmoli) di NaOH. Il titolo della soluzione di diazometano è 0.66 N.

Sintesi dei D-omosteroidi 2a, 2b e 4


 a: R¹=OH, R²=H

 b: R¹=R²=O

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
2a	OH	H	87
2b	O	O	80


Procedura generale

In un pallone a due colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si solubilizza il corticosteroide opportuno **1a**, **1b** o **3** (1 mmole) in 1,4-diossano anidro (20 ml) e si introduce il tricloruro di alluminio (3 mmoli). La miscela di reazione viene mantenuta sotto costante agitazione magnetica ed alla temperatura di riflusso per 90 minuti, finchè l'analisi TLC della miscela (Et₂O/CH₃OH 98:2, v/v) mostra la completa conversione del precursore nel corrispondente D-omosteroide. Al termine della reazione il solvente viene allontanato in condizioni di pressione ridotta ed il residuo ottenuto viene trattato con acqua distillata ed estratto con acetato di etile (3 X 25 ml). Le fasi organiche

riunite sono lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl (1 X 20 ml) ed anidificate su Na₂SO₄ anidro. Dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta, si purifica il residuo ottenuto mediante cromatografia su colonna corta (Et₂O/CH₃OH 98:2, v/v) e si ottengono, sotto forma di solidi di colore giallo, i corrispondenti D-omosteroidi **2a**, **2b** e **4** con rese comprese tra il 78% e l'87%.

11β,17α-Diidrossi-17β-idrossimetil-D-omo-4-androsten-3,17a-dione (2a)

Resa: 87%.

p. f. = 192-196 °C

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

5.57 (s, 1 H, H4), 4.82 (s, 1 H, 17-OH), 4.61 (m, 1 H, CH₂OH), 4.42 (d, 1 H, 11-OH, *J* = 3.2 Hz), 4.22 (m, 1 H, H11) 3.49 (m, 2 H, CH₂OH), 2.51-1.70 (m, 13 H), 1.58-1.22 [m, 6 H (C18 + C19) + 2 H], 1.02-0.87 (m, 2 H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

213.66 (C17a), 198.45 (C3), 172.62 (C5), 121.63 (C4), 77.06 (C17), 67.56 (CH₂OH), 65.79 (C11), 54.61, 48.24 (C14), 42.20, 39.33, 34.35, 33.92, 32.36, 32.17, 31.83, 31.29, 20.93, 20.73, 20.49, 17.45.

17α-Idrossi-17β-idrossimetil-D-omo-4-androsten-3,11,17a-trione (2b)

Resa: 80%.

p. f. = 134-137 °C

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

5.62 (s, 1 H, H4), 4.95 (s, 1 H, 17-OH), 4.80 (m, 1 H, CH₂OH), 3.77 (dd, 1 H, CH₂OH, *J* = 9.5 Hz, *J* = 6.3 Hz), 3.47 (dd, 1 H, CH₂OH, *J* = 9.5 Hz, *J* = 6.3 Hz), 2.54-1.79 (m, 14 H), 1.67-1.43 (m, 3 H), 1.32 (s, 3 H, CH₃), 0.92 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

212.05 (C11), 209.75 (C17a), 198.72 (C3), 169.37 (C5), 123.70 (C4), 78.98 (C17), 71.61, 67.69 (CH₂OH), 63.42, 61.52, 51.96, 50.40, 47.94, 38.12, 38.06, 34.37, 33.73, 31.86, 31.32, 18.63, 15.77.

9 α -Fluoro-11 β ,17 α -diidrossi-17 β -idrossimetil-16 β -metil-D-omo-1,4-androstadiene-3,17 α -dione (4)**Resa:** 78%.**p. f.** = 138-141 °C**¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

7.26 (d, 1 H, H1, $J_{H1H2} = 10.2$ Hz), 6.20 (dd, 1 H, H2, $J_{H1H2} = 10.2$ Hz, $J_{H2H4} = 1.8$ Hz), 5.99 (m, 1 H, H4), 5.43 (m, 1 H, 11-OH), 4.89 (s, 1 H, 17-OH), 4.55 (t, 1 H, CH₂OH, $J = 5.6$ Hz), 4.11 (m, 1 H, H11), 3.67 (dd, 1 H, CH₂OH, $J = 10.3$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 3.24 (dd, 1 H, CH₂OH, $J = 10.3$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 2.68-2.24 [m, 3 H (H15 + H16) + 2 H], 1.87-2.09 (m, 3 H), 1.62 (m, 1 H), 1.41-1.50 [m, 3 H (H19) + 2 H], 1.24 (s, 3 H, H18), 0.86 (d, 3 H, 16-CH₃, $J = 6.9$ Hz).

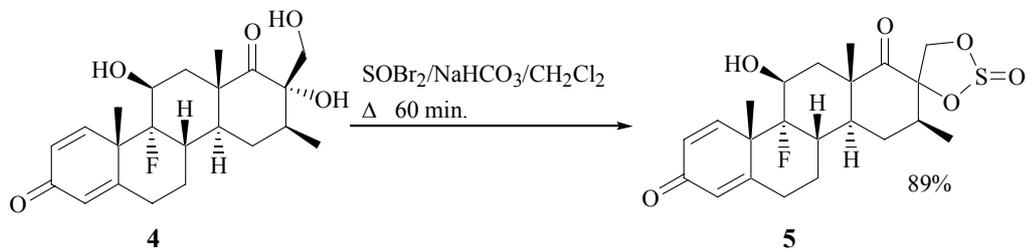
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

212.81 (C17a), 185.62 (C3), 167.35 (C5), 152.93 (C1), 129.57 (C2), 124.27 (C4), 102.34 (d, C9, $J_{CF} = 174.6$ Hz), 77.36 (C17), 69.97 (d, C11, $J_{CF} = 32.1$ Hz), 62.58 (CH₂OH), 48.37 (d, C10, $J_{CF} = 23.1$ Hz), 44.34, 38.44, 36.58, 34.62 (d, C8, $J_{CF} = 19.8$ Hz), 30.67, 29.60, 28.89, 26.96 (d, C7, $J_{CF} < 0.4$ Hz), 23.58 (d, C19, $J_{CF} = 4.4$ Hz), 17.86 (16-CH₃), 15.68 (C18).

¹⁹F-NMR (CDCl₃) δ (ppm):

-136.07 (dd).

Sintesi del 9 α -fluoro-11 β -idrossi-16 β -metil-D-omo-1,4-androstadiene-3,17a-dione-17-spiro-5'-(2'-ossido-1',3'-diossatiolano) (5)



Procedura

In un pallone a due colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si solubilizza il D-omosteroide **4** (1 mmole) in diclorometano anidro (10 ml) e si introducono il bicarbonato di sodio (13 mmoli) ed il bromuro di tionile (4 mmoli). La miscela eterogenea risultante è mantenuta sotto costante agitazione magnetica ed alla temperatura di riflusso per 60 minuti, finchè l'analisi TLC della miscela (Et₂O/CH₃OH 98:2, v/v) mostra la completa conversione del precursore nel corrispondente solfito ciclico **5**.

Al termine della reazione il solvente viene allontanato in condizioni di pressione ridotta ed il residuo viene solubilizzato in diclorometano. La miscela viene filtrata ed il solvente evaporato a secchezza sotto vuoto; la purificazione del residuo solido ottenuto, mediante cromatografia su colonna corta (Et₂O/CH₃OH 98:2, v/v), porta al recupero del solfito ciclico **5** con una resa dell'89%, sotto forma di un solido amorfo giallo pallido.

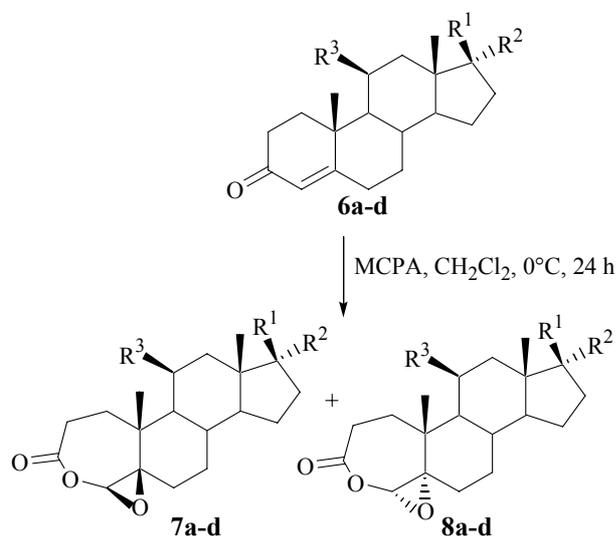
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

7.26 (d, 1 H, H1, $J_{H1H2} = 10.1$ Hz), 6.21 (dd, 1 H, H2, $J_{H1H2} = 10.1$ Hz, $J_{H2H4} = 1.89$ Hz), 6.01 (m, 1 H, H4), 5.57 (S_{broad}, 1 H, OH), 4.86 (d, 1 H, CH₂OSO₂, $J = 9.08$ Hz), 4.77 (d, 1 H, CH₂OSO₂, $J = 9.08$), 4.14 (m, 1 H, H11), 2.71-2.52 (m, 2 H), 2.41-2.23 (m, 2 H, H15 + H16), 2.10-1.72 (m, 4 H), 1.52-1.41 [m, 3 H (H19) + 2 H], 1.32 (s, 3 H, H18), 1.30-1.19 (m, 1 H), 0.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 3 H, 16-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

206.12 (C17a), 185.57 (C3), 166.90 (C5), 152.93 (C1), 129.66 (C2), 124.37 (C4), 100.99 (d, C9, $J_{CF} = 172.1$ Hz), 92.56 (C17), 70.76 (CH₂OSO₂), 69.53 (d, C11, $J_{CF} = 29.5$ Hz), 46.34 (d, C10, $J_{CF} = 22.7$ Hz), 37.93, 36.92, 34.00, 33.54 (d, C8, $J_{CF} = 20.4$ Hz), 30.48, 28.92, 28.51, 27.05 (d, C7, $J_{CF} < 0.4$ Hz), 23.48 (d, C19, $J_{CF} = 5.3$ Hz), 18.13 (16-CH₃), 15.70 (C18).

Sintesi degli epossi lattoni 7-8



	R ¹	R ²	R ³	7 Resa (%)	8 Resa (%)
6a	OH	H	H	63	17
6b	COCH ₃	H	H	67	12
6c	COCH ₃	OH	H	66	11
6d	OH	COCH ₂ OH	OH	68	14

Procedura generale

In un pallone a due colli, in atmosfera inerte d'azoto, si solubilizza il Δ^4 -3-chetosteroide opportuno **6a-d** (1 mmole) in diclorometano anidro (30 ml). Si porta la temperatura della soluzione a 0 °C e, successivamente, si aggiunge l'acido *m*-cloroperbenzoico (3 mmoli). La miscela di reazione viene mantenuta sotto costante agitazione magnetica a 0 °C per 24 ore, finchè l'analisi TLC della miscela (Et₂O/etere di petrolio 95:5, v/v) mostra la completa conversione del precursore nel corrispondente epossilattone. Al termine della reazione il solvente viene allontanato in condizioni di pressione ridotta e il residuo ottenuto viene solubilizzato in acetato di etile (40 ml) e trattato, prima con una soluzione

acquosa di Na₂S₂O₅ (2 X 5 ml), poi con una soluzione acquosa NaHCO₃ al 5% (2 X 5 ml), ed infine con una soluzione acquosa satura di NaCl (1 X 5 ml). La fase organica è anidrificata su Na₂SO₄ anidro; dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta, si purifica il residuo ottenuto mediante cromatografia su colonna (Et₂O/etere di petrolio 20:80, v/v). Si recuperano i composti **7a-d** con rese comprese tra il 63% e il 68%, i composti **8a-d** con rese variabili tra l'11% e il 17% insieme ad una miscela di **7a-d** e **8a-d** (7-12%).

4β,5β-Eossi-17-idrossi-A-omo-4-ossaandrostan-3-one (7a)

Resa: 63 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

4.78 (s, 1 H), 3.70-3.62 (m, 1 H), 2.76 (ddd, 1 H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 9.5 Hz, *J* = 16.5 Hz), 2.55 (ddd, 1 H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 10.4 Hz, *J* = 16.5 Hz), 2.13-0.95 (m, 17 H), 1.21 (s, 3 H), 0.78 (s, 3 H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

171.54, 87.38, 81.37, 71.09, 50.31, 48.78, 42.70, 38.47, 36.18, 34.69, 31.14, 30.22, 30.04, 29.35, 29.22, 23.22, 20.74, 18.80, 10.90.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

320 (M⁺, 1 %), 302 (2), 291 (100), 273 (77), 255 (20), 237 (5), 219 (19), 159 (22), 147 (24), 119 (22), 105 (22), 93 (34), 55 (69).

4α,5α-Eossi-17-idrossi-A-omo-4-ossaandrostan-3-one (8a)

Resa: 17 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

4.70 (s, 1 H), 3.70-3.62 (m, 1 H), 2.76 (ddd, 1 H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 9.5 Hz, *J* = 16.5 Hz), 2.55 (ddd, 1 H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 10.4 Hz, *J* = 16.5 Hz), 2.13-0.95 (m, 17 H), 1.21 (s, 3 H), 0.78 (s, 3 H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

171.58, 86.20, 81.41, 71.15, 50.18, 49.96, 42.75, 38.53, 36.38, 35.11, 31.02, 30.25, 29.62, 28.16, 26.01, 23.11, 21.15, 17.64, 11.08.

GC-MS (E.I.) m/z :

320 (M^+ , 1 %), 302 (2), 291 (100), 273 (94), 255 (21), 237 (7), 219 (19), 159 (25), 147 (22), 119 (22), 105 (20), 93 (34), 55 (83).

4 β ,5 β -Eossi-A-omo-4-ossapregnan-3,20-dione (7b)

Resa: 67 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

4.72 (s, 1 H), 2.78-2.40 (m, 3 H), 2.15-0.95 (m, 17 H), 2.06 (s, 3 H), 1.12 (s, 3H), 0.58 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

209.22, 171.50, 87.46, 70.96, 63.41, 55.93, 48.81, 43.84, 38.72, 38.51, 34.68, 31.47, 31.22, 30.18, 29.69, 29.60, 24.35, 22.77, 21.19, 18.79, 13.26.

GC-MS (E.I.) m/z :

346 (M^+ , 1 %), 328 (2), 318 (11), 317 (49), 299 (15), 281 (12), 275 (14), 262 (8), 257 (9), 239 (7), 43 (100).

GC-MS (C.I.) m/z :

347 [$(M+H)^+$, (39 %)], 329 (100), 317 (17), 311 (22), 303 (17), 301 (26), 285 (17), 283 (13), 259 (7), 241 (5), 217 (99).

4 α ,5 α -Eossi-A-omo-4-ossapregnan-3,20-dione (8b)

Resa: 12 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

4.64 (s, 1 H), 2.76-2.41 (m, 3 H), 2.15-0.95 (m, 17 H), 2.06 (s, 3 H), 1.12 (s, 3H), 0.58 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

209.37, 168.26, 86.26, 72.83, 63.48, 55.73, 49.80, 43.96, 38.57, 38.44, 35.11, 30.47, 31.12, 29.94, 28.24, 26.72, 24.22, 23.23, 21.61, 17.68, 13.45.

GC-MS (E.I.) m/z :

346 (M^+ , 1 %), 328 (2), 318 (10), 317 (48), 299 (15), 281 (11), 275 (14), 262 (10), 257 (11), 239 (5), 43 (100).

GC-MS (C.I.) m/z :

347 [(M+H)⁺, (32 %)], 329 (100), 317 (19), 311 (36), 303 (23), 301 (24), 285 (31), 283 (17), 259 (22), 241 (17), 217 (9).

4 β ,5 β -Eossi-17 α -idrossi-A-omo-4-ossapregnan-3,20-dione (7c)

Resa: 66 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

4.79 (s, 1 H), 3.48 (s, 3 H), 2.84-1.08 (m, 19 H), 1.22 (s, 3 H), 0.91 (s, 3 H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

202.65, 171.33, 88.39, 70.81, 51.77, 50.08, 47.48, 38.61, 35.77, 35.71, 35.35, 34.50, 31.13, 30.90, 30.16, 29.59, 28.57, 21.75, 20.51, 18.78, 13.65.

GC-MS (E.I.) m/z :

289 (100 %), 271 (34), 261 (9), 253 (15), 229 (9), 227 (7), 211 (18), 119 (24), 99 (44), 55 (70).

GC-MS (C.I.) m/z :

363 [(M+H)⁺, (1 %)], 319 (15), 303 (14), 301 (56), 289 (7), 275 (40), 257 (100), 241 (11), 189 (21).

4 α ,5 α -Eossi-17 α -idrossi-A-omo-4-ossapregnan-3,20-dione (8c)

Resa: 11 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

4.71 (s, 1 H), 3.47 (s, 3 H), 2.84-1.05 (m, 19 H), 1.22 (s, 3 H), 0.91 (s, 3 H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

202.48, 171.35, 87.21, 72.64, 51.54, 51.04, 47.59, 37.68, 35.79, 35.76, 35.71, 34.76, 31.33, 31.04, 30.11, 29.43, 28.33, 21.65, 20.92, 17.72, 13.82.

GC-MS (E.I.) m/z :

289 (100 %), 271 (32), 261 (10), 253 (13), 229 (9), 227 (9), 211 (18), 119 (26), 99 (44), 55 (72).

GC-MS (C.I.) m/z :

363 [(M+H)⁺, (2 %)], 345 (5), 335 (27), 317 (100), 307 (37), 299 (34), 273 (46), 205 (56).

4 β ,5 β -Eossi-17,21-diidrossi-A-omo-4-ossapregnan-3,20-dione (7d)

Resa: 68 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

5.23 (S_{broad}, 1 H), 4.93 (s, 1 H), 4.69 (S_{broad}, 1 H), 4.54 (d, 1 H, *J* = 19.2 Hz), 4.31 (S_{broad}, 1 H), 4.20 (m, 1 H), 4.11 (d, 1 H, *J* = 19.2 Hz), 2.73-0.96 (m, 17 H), 1.30 (s, 3 H), 0.76 (s, 3 H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

212.20, 171.86, 88.95, 87.66, 72.99, 67.02, 66.35, 51.84, 49.32, 46.89, 46.74, 39.27, 39.17, 33.39, 30.90, 30.84, 30.39, 30.30, 23.86, 22.35, 17.31.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

377 (2), 305 (100), 290 (15), 287 (64), 281 (12), 269 (42), 261 (27), 245 (23), 227 (32), 55 (51).

4 α ,5 α -Eossi-17,21-diidrossi-A-omo-4-ossapregnan-3,20-dione (8d)

Resa: 14 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

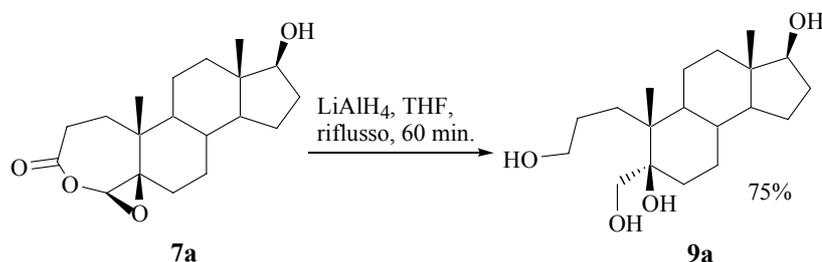
5.23 (S_{broad}, 1 H), 4.86 (s, 1 H), 4.69 (S_{broad}, 1 H), 4.54 (d, 1 H, *J* = 19.2 Hz), 4.31 (S_{broad}, 1 H), 4.20 (m, 1 H), 4.11 (d, 1 H, *J* = 19.2 Hz), 2.73-0.96 (m, 17 H), 1.30 (s, 3 H), 0.76 (s, 3 H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

212.13, 172.08, 87.58, 86.72, 74.49, 66.90, 66.65, 52.09, 49.68, 46.78, 47.00, 41.47, 38.90, 34.31, 31.60, 30.72, 30.59, 29.01, 23.30, 22.39, 17.43.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

377 (3), 305 (100), 290 (27), 287 (67), 281 (15), 269 (47), 261 (28), 245 (22), 227 (33), 55 (58).

Trattamento di 7a con LiAlH₄Procedura

In un pallone a tre colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si aggiunge lentamente, mediante un imbuto gocciolatore, una soluzione dell'epossi lattone **7a** (1 mmole) in tetraidrofurano anidro (15 ml), ad una sospensione di LiAlH₄ (1.5 mmoli) in tetraidrofurano anidro (10 ml). La miscela di reazione viene mantenuta sotto costante agitazione magnetica ed alla temperatura di riflusso per 60 minuti; successivamente, si aggiunge acqua distillata (10 ml) fino a scomparsa dell'effervescenza. Si allontana il solvente organico in condizioni di pressione ridotta e la fase acquosa risultante viene estratta con etere etilico (3 X 10 ml). Le fasi organiche riunite sono anidrificate su Na₂SO₄ anidro. Dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta, si purifica il residuo ottenuto mediante cromatografia su colonna corta (CHCl₃/CH₃OH 98:2, v/v) e si ottiene il composto **9a** con una resa del 75%.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

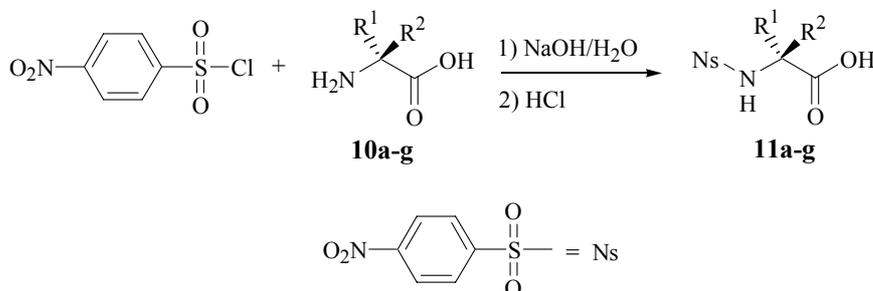
4.42 (d, 1 H, *J* = 5.7 Hz, scompare in D₂O), 4.31-4.22 (m, 2 H, scompare in D₂O), 3.61 (s, 1 H, scompare in D₂O), 3.58-3.19 (m, 5 H), 1.83-0.81 (m, 24 H), 0.87 (s, 3 H), 0.61 (s, 3 H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):

80.48, 72.72, 62.70, 62.54, 51.02, 49.23, 42.91, 41.87, 40.76, 37.27, 35.43, 33.10, 30.33, 29.74, 27.99, 23.58, 22.34, 15.42, 11.84.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

326 (M⁺, 3 %), 295 (28), 277 (22), 259 (11), 221 (23), 203 (18), 133 (31), 121 (25), 107 (38), 95 (45), 93 (42), 85 (100).

Sintesi degli *N*-nosil- α -amminoacidi **11a-g**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
11a	H	CH(CH ₃) ₂	86%
11b	H	CH ₃	84%
11c	CH ₃	H	67%
11d	H	CH ₂ (C ₆ H ₅)	65%
11e	H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	84%
11f	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	85%
11g	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	84%

Procedura generale

In un pallone a due colli si solubilizza l' α -amminoacido opportuno **10a-g** (1 mmole) in una soluzione acquosa di NaOH 1 N (20 ml).

Alla soluzione, raffreddata con una miscela frigorifera di ghiaccio e cloruro di sodio e mantenuta sotto costante agitazione magnetica, si aggiunge molto lentamente il cloruro di 4-nitrobenzensolfonile (1.5 mmoli). Per mantenere basico il pH della miscela di reazione (intorno a 9) si aggiungono piccoli volumi di una soluzione acquosa di NaOH 1 N. Terminata l'aggiunta, si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 3-4 ore, seguendo mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 80:20, v/v) la scomparsa dell' α -amminoacido.

Terminata la reazione, si lava la soluzione con acetato di etile; la fase acquosa basica viene acidificata con una soluzione di HCl 1 N fino a pH 2 ed estratta con acetato di etile (3 X 15 ml).

Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl (1 X 15 ml) ed anidificate su solfato di sodio anidro. Successivamente si allontana l'acetato di etile in condizioni di pressione ridotta e si ottengono gli *N*-nosil- α -amminoacidi (**11a-g**) con rese comprese tra il 65% e l'86%, sotto forma di solido giallo.

L'analisi GC-MS è stata eseguita sui corrispondenti esteri metilici ottenuti per trattamento degli *N*-nosil- α -amminoacidi con una soluzione 0.66 M di diazometano in diclorometano.

***N*-Nosil-*L*-valina (11a)**

Resa: 86%.

p.f. = 186-187 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3120, 2965, 1721, 1665, 1538, 1361, 1065, 860, 747.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (p.p.m.):

12.70 (S_{broad} , 1 H, COOH), 8.49 (d, 1 H, NH, $J = 8.8$ Hz), 8.38 (d, 2 H, ArH; $J = 8.1$ Hz), 8.03 (d, 2 H, ArH; $J = 8.1$ Hz), 3.60 (dd, 1 H, CHCOOH, $J = 8.8$ Hz, $J = 6.0$ Hz), 2.10-1.89 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 0.83 (d, 3 H, CH₃, $J = 6.7$ Hz), 0.78 (d, 3 H, CH₃, $J = 6.7$ Hz).

GC-MS (E.I.) m/z :

316 (M^+ , 1 %), 273 (3), 257 (100), 186 (17), 122 (33).

***N*-Nosil-*L*-alanina (11b)**

Resa: 84%.

p.f. = 140-143 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3110, 2972, 2962, 1720, 1665, 1532, 1361, 1064, 870, 747.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (p.p.m.):

12.70 (S_{broad}, 1 H, COOH), 8.60 (d, 1 H, NH, $J = 8.1$ Hz), 8.40-8.20 (m, 2 H, ArH), 8.10-7.80 (m, 2 H, ArH), 3.91-3.70 (m, 1 H, CH), 1.10 (d, 3 H, CH₃, $J = 7.1$ Hz).

GC-MS (E.I.) m/z :

288 (M⁺, 1%), 229 (100), 186 (33), 122 (19).

N-Nosil-D-alanina (11c)

Resa: 67%.

p.f. = 140-143 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

3110, 2972, 2962, 1720, 1665, 1532, 1361, 1064, 870, 747.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (p.p.m.):

12.72 (S_{broad}, 1 H, COOH), 8.60 (d, 1 H, NH, $J = 8.1$ Hz), 8.42-8.37 (m, 2 H, ArH), 8.07-8.01 (m, 2 H, ArH), 3.92-3.81 (m, 1 H, CH), 1.20 (d, 3 H, CH₃, $J = 7.2$ Hz).

GC-MS (E.I.) m/z :

288 (M⁺, 1%), 229 (100), 186 (33), 122 (19).

N-Nosil-L-fenilalanina (11d)

Resa: 65%.

p.f. = 163-165 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

3110, 2970, 2960, 1760, 1665, 1532, 1361, 1064, 850, 747.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (p.p.m.):

8.76 (d, 1 H, NH, $J = 9.0$ Hz), 8.20-8.10 (m, 2 H, ArH), 7.70-7.60 (m, 2 H, ArH), 7.10-7.04 (m, 5 H, ArH), 4.04-3.91 (m, 1 H, CH), 2.97 (dd, 1 H, CH₂, $J = 13.7$ Hz, $J = 10.1$ Hz), 2.69 (dd, 1 H, CH₂, $J = 13.7$ Hz, $J = 4.1$ Hz).

GC-MS (E.I.) m/z :

305 (26 %), 273 (43), 218 (4), 186 (61), 162 (86), 122 (42), 91 (100).

N-Nosil-L-isoIeucina (11e)

Resa: 84%.

p.f. = 126-129 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

3120, 2965, 1721, 1665, 1538, 1361, 1065, 860, 747.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (p.p.m.):

12.70 (S_{broad}, 1 H, COOH), 8.50 (d, 1 H, NH, *J* = 9.1 Hz), 8.40 (d, 2 H, ArH; *J* = 8.7 Hz), 8.01 (d, 2 H, ArH; *J* = 8.7 Hz), 3.64 (dd, 1 H, CHCOOH, *J* = 9.1 Hz, *J* = 6.3 Hz), 1.75-1.67 (m, 1 H, CHCH₃), 1.40-1.30 (m, 1 H, CH₂CH₃), 1.15-1.03 (m, 1 H, CH₂CH₃), 0.89-0.71 (m, 6 H, CH₂CH₃, CHCH₃).

GC-MS (E.I.) *m/z*:

271 (100 %), 215 (52), 186 (39), 122 (35), 88 (87).

N-Nosil-D-Allo-isoIeucina (11f)

Resa: 85%.

p.f. = 126-129 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

3120, 2965, 1721, 1665, 1538, 1361, 1065, 860, 747.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (p.p.m.):

8.43-8.34 (m, 3 H, ArH, NH), 8.06-7.99 (m, 2 H, ArH), 3.79 (dd, 1 H, CHCOOH, *J* = 8.40 Hz, *J* = 4.65 Hz), 1.84-1.69 (m, 1 H, CHCH₃), 1.38-1.22 (m, 1 H, CH₂CH₃), 1.20-1.04 (m, 1 H, CH₂CH₃), 0.85-0.72 (m, 6 H, CH₂CH₃, CHCH₃).

GC-MS (E.I.) *m/z*:

271 (100 %), 215 (36), 186 (22), 122 (15), 88 (24).

N-Nosil-L-leucina (11g)

Resa: 84%.

p.f. = 134-135°C

IR (KBr) cm⁻¹:

3120, 2965, 1721, 1665, 1538, 1361, 1065, 860, 747.

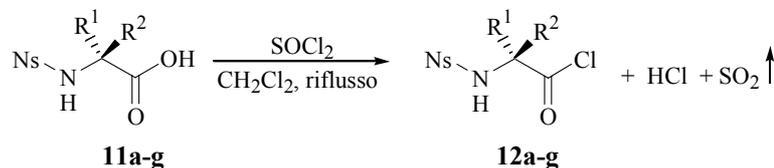
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (p.p.m.):

12.69 (s_{broad}, 1 H, COOH), 8.58 (d, 1 H, NH, $J = 9.0$ Hz), 8.40-8.32 (m, 2 H, ArH), 8.10-7.95 (m, 2 H, ArH), 3.80-3.70 (m, 1 H, CHCOOH), 1.62-1.52 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 1.45-1.38 (m, 2 H, CH₂), 0.81 (d, 3 H, CH₃, $J = 6.6$ Hz), 0.72 (d, 3 H, CH₃, $J = 6.5$ Hz).

GC-MS (E.I.) m/z :

271 (100 %), 255 (2), 229 (18), 215 (42), 186 (56), 122 (45).

Sintesi dei cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi **12a-g**



Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
12a	H	CH(CH ₃) ₂	99%
12b	H	CH ₃	100%
12c	CH ₃	H	95%
12d	H	CH ₂ (C ₆ H ₅)	86%
12e	H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	100%
12f	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	100%
12g	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	95%

Procedura generale

In un pallone a due colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si solubilizza l'*N*-nosil- α -amminoacido opportuno **11a-g** (1 mmole) in diclorometano anidro (20 ml). Si introduce il cloruro di tionile (12 mmoli) e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a riflusso per 20-30 minuti seguendo, mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 90:10, v/v), la scomparsa dell'*N*-nosil- α -amminoacido.

La formazione del cloruro dell'*N*-nosil- α -amminoacido (**12a-g**) viene seguita per TLC trasformando il cloruro formatosi in estere metilico per aggiunta di metanolo anidro ad un campione prelevato dalla miscela di reazione.

Terminata la reazione, si elimina il solvente mediante distillazione a pressione ridotta. Successivamente si aggiungono piccoli volumi di diclorometano prima e di etere etilico dopo che vengono rimossi, per distillazione in condizioni di pressione ridotta. L'operazione viene ripetuta fino a completa eliminazione del cloruro di tionile non reagito.

I cloruri degli *N*-nosil- α -amminoacidi **12a-g** si ottengono con rese comprese tra l'86% e il 100% e sono stati caratterizzati mediante GC-MS previa trasformazione nei corrispondenti esteri metilici, per trattamento con metanolo anidro.

Cloruro dell'*N*-nosil-L-valina (12a)

Resa: 99%.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

316 (M^+ , 1%), 273 (3), 257 (100), 186 (17), 122 (33).

Cloruro dell'*N*-nosil-L-alanina (12b)

Resa: 100%.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

288 (M^+ , 1%), 229 (100), 186 (33), 122 (19).

Cloruro dell'*N*-nosil-D-alanina (12c)

Resa: 95%.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

288 (M^+ , 1%), 229 (100), 186 (33), 122 (19).

Cloruro dell'*N*-nosil-L-fenilalanina (12d)

Resa: 86%.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

305 (26 %), 273 (43), 218 (4), 186 (61), 162 (86), 122 (42), 91 (100)

Cloruro dell’N-nosil-L-iso-leucina (12e)

Resa: 100%.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

271 (100 %), 215 (52), 186 (39), 122 (35), 88 (87).

Cloruro dell’N-nosil-D-Allo-iso-leucina (12f)

Resa: 100%.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

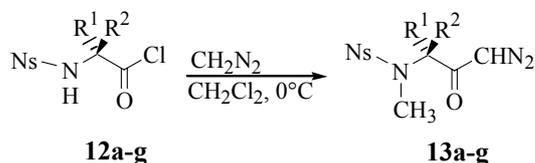
271 (100 %), 215 (52), 186 (39), 122 (35), 88 (87).

Cloruro dell’N-nosil-L-leucina (12g)

Resa: 95%.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

271 (100 %), 255 (2), 229 (18), 215 (42), 186 (56), 122 (45).

Sintesi degli *N*-metil-*N*-nosil- α -amminocildiazometani **13a-g**

Composti	R ¹	R ²	Resa (%)
13a	H	CH(CH ₃) ₂	73%
13b	H	CH ₃	78%
13c	CH ₃	H	81%
13d	H	CH ₂ (C ₆ H ₅)	77%
13e	H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	81%
13f	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	89%
13g	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	77%

Procedura generale

In un pallone a tre colli, munito d'imbuto gocciolatore ed in atmosfera inerte d'azoto, viene introdotta una soluzione 0.66 M di diazometano in diclorometano (10 mmoli); si aggiunge, poi, lentamente il cloruro dell'*N*-nosil- α -amminoacido opportuno (**12a-g**) solubilizzato nella minima quantità necessaria di diclorometano anidro (10 ml). Si lascia la reazione sotto agitazione magnetica, in una miscela frigorifera di ghiaccio e NaCl, per 50-60 minuti, seguendo mediante TLC (CHCl₃/Et₂O 90:10, v/v) la scomparsa del cloruro dell'*N*-nosil- α -amminoacido, previa trasformazione nel corrispondente estere metilico per aggiunta di metanolo anidro ad un campione prelevato dalla miscela di reazione. Al termine della reazione il solvente viene allontanato in condizioni di pressione ridotta ed il residuo oleoso ottenuto viene purificato mediante cromatografia su colonna. Si ottengono gli *N*-metil-*N*-nosil- α -amminocildiazometani (**13a-g**) con rese comprese tra il 73 ed il 93%.

N-Metil-N-nosil-L-valildiazometano (13a)

Resa: 73%, dopo purificazione cromatografica (etere di petrolio/AcOEt 70:30, v/v).

p. f. = 88.6-90.3 °C.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

8.41-8.34 (m, 2 H, ArH), 8.04-7.97 (m, 2 H, ArH), 5.57 (s, 1 H, CHN₂), 3.92 (d, 1 H, CHCOCHN₂, *J* = 10.86 Hz), 2.90 (s, 3H, NCH₃), 2.29-2.15 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 0.93 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 6.50 Hz), 0.66 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 6.50 Hz).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.2, 149.8, 145.0, 128.1, 124.1, 67.3, 55.9, 29.9, 26.3, 19.2.

N-Metil-N-nosil-L-alanildiazometano (13b)

Resa: 78%, dopo purificazione cromatografica (CHCl₃/Et₂O 90:10, v/v).

p.f = 81.8-83.3 °C

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

8.44-8.38 (m, 2 H, ArH), 8.05-7.99 (m, 2 H, ArH), 5.79 (s, 1 H, CHN₂), 4.61 (q, 1 H, CHCH₃, *J* = 7.35 Hz), 2.81 (s, 3 H, NCH₃), 1.09 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 7.35 Hz).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ:

191.67, 149.39, 144.57, 128.39, 124.58, 58.90, 54.40, 30.19, 12.30.

N-Metil-N-nosil-D-alanildiazometano (13c)

Resa: 81%, dopo purificazione cromatografica (CHCl₃/Et₂O 90:10, v/v).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

8.44-8.38 (m, 2 H, ArH), 8.05-7.99 (m, 2 H, ArH), 5.79 (s, 1 H, CHN₂), 4.61 (q, 1 H, CHCH₃, *J* = 7.35 Hz), 2.81 (s, 3 H, NCH₃), 1.09 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 7.35 Hz).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ:

191.67, 149.39, 144.57, 128.39, 124.58, 58.90, 54.40, 30.19, 12.30.

N-Metil-N-nosil-L-fenilalanildiazometano (13d)

Resa: 77%, dopo purificazione cromatografica (CHCl₃/Et₂O 95:5, v/v).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

8.09 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.70 Hz), 7.44 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.70 Hz), 7.26-7.10 (m, 3 H, ArH), 7.06-6.99 (m, 2 H, ArH), 5.83 (s, 1 H, CHN₂), 4.85 (dd, , 1 H, CHCO, *J* = 10.20 Hz, *J* = 5.25 Hz), 3.31 (dd, 1 H, CH₂Ph *J* = 14.70 Hz, *J* = 5.40 Hz), 2.92 (s, 3 H, NCH₃), 2.69 (dd, 1 H, CH₂Ph, *J* = 14.70 Hz, *J* = 10.05 Hz).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ:

190.08, 149.03, 144.04, 137.00, 129.04, 128.90, 128.00, 127.04, 124.14, 65.06, 55.18, 33.35, 30.08.

N-Metil-N-nosil-L-isoileucildiazometano (13e)

Resa: 81%, dopo purificazione cromatografica (CHCl₃/AcOEt 95:5, v/v).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

8.40-8.34 (m, 2 H, ArH), 8.02-7.95 (m, 2 H, ArH), 5.50 (s, 1 H, CHN₂), 4.03 (d, 1 H, CHCO, *J* = 10.80 Hz), 2.88 (s, 3 H, NCH₃), 2.05-1.92 (m, 1 H, CHCH₃), 1.67-1.53 (m, 1 H, CH₂CH₃), 1.26-1.13 (m, 1 H, CH₂CH₃), 0.90 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 6.30 Hz), 0.86-0.79 (m, 3 H, CH₂CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ:

194.90, 159.51, 152.90, 128.38, 124.27, 66.14, 56.06, 32.45, 30.24, 25.15, 15.52, 10.65.

N-Metil-N-nosil-D-Allo-isoileucildiazometano (13f)

Resa: 89%, dopo purificazione cromatografica (CHCl₃/AcOEt 98:2, v/v).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ:

8.40-8.31 (m, 2 H, ArH), 8.09-7.95 (m, 2 H, ArH), 5.55 (s, 1 H, CHN₂), 4.01 (d, 1 H, CHCO, *J* = 11.10 Hz), 2.87 (s, 3 H, NCH₃), 2.10-1.94 (m, 1 H, CHCH₃), 1.50-1.36 (m, 1 H, CH₂CH₃), 1.13-0.95 (m, 1 H, CH₂CH₃), 0.94-0.85 (m, 3 H, CH₂CH₃), 0.62 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 6.60 Hz).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ:

194.90, 159.51, 152.90, 128.32, 124.30, 66.14, 56.06, 32.67, 30.06, 25.93, 15.37, 11.20.

N-Metil-N-nosil-L-leucildiazometano (13g)

Resa: 77%, dopo purificazione cromatografica (CHCl₃/AcOEt 98:2, v/v).

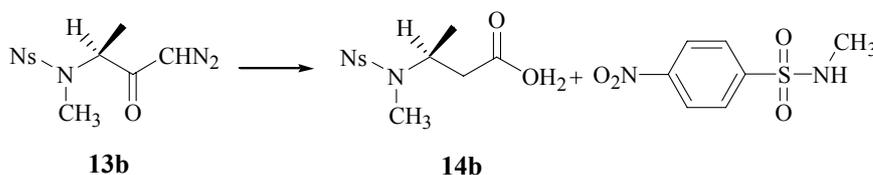
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ :

8.44-8.32 (m, 2 H, ArH), 8.08-7.95 (m, 2 H, ArH), 5.60 (s, 1 H, CHN₂), 4.59-4.48 (m, 1 H, CHCO), 2.85 (s, 3 H, NCH₃), 1.73-1.62 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 1.50-1.35 (m, 1 H, CHCH₂), 1.30-1.19 (m, 1 H, CHCH₂), 0.89 (d, 3 H, CHCH₃, $J = 6.60$ Hz), 0.87 (d, 3 H, CHCH₃, $J = 6.60$ Hz).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ :

191.21, 150.05, 144.89, 128.41, 124.32, 60.88, 54.83, 36.60, 30.23, 24.74, 22.89, 21.90.

Prove per la sintesi degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi



1. Procedura

In un pallone a due colli munito di refrigerante, si solubilizza l'*N*-metil-*N*-nosil-L-alanildiazometano (**13b**) (1 mmole) in 1,4-diossano/acqua (1:5 v/v). Alla soluzione viene, poi, aggiunta una quantità catalitica di benzoato d'argento (rapporto in moli benzoato d'argento/**13b**, 0.08:1) a 70° C. Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per 5 ore, seguendo la scomparsa del diazochetone mediante TLC (CHCl₃/MeOH 9:1, v/v). Successivamente si filtra la miscela di reazione su setto poroso e si elimina il solvente in condizioni di pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene solubilizzato con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (20 ml) e la soluzione risultante viene lavata con etere etilico (3 X 10 ml).

Gli estratti organici vengono anidrificati su solfato di sodio anidro. Dopo allontanamento del solvente, in condizioni di pressione ridotta, si recupera l'*N*-metil-4-nitrobenzenesulfonammide con una resa 75%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ :

8.45-8.35 (m, 2 H, ArH), 8.12-8.00 (m, 2 H, ArH), 4.94 (q, 1 H, NH, $J = 5.73$ Hz), 2.75 (d, 3 H, NCH₃, $J = 5.73$).

GC-MS (E.I.) m/z :

216 (M⁺, 4 %), 186 (3), 122 (100), 92 (5)

La fase acquosa viene acidificata con HCl 1 N ed estratta con acetato di etile (3 X 10 ml).

Gli estratti organici vengono anidrificati su solfato di sodio anidro.

Dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta si recupera l'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-L-alanina (**14b**) con una resa del 30%.

2. Procedura

In un pallone a due colli, munito di refrigerante, si solubilizza l'*N*-metil-*N*-nosil-L-alanildiazometano (**13b**) (1 mmole) in 1,4-diossano/acqua (1:5 v/v). Alla soluzione viene, poi, aggiunta una quantità catalitica di benzoato d'argento (rapporto in moli benzoato d'argento/**13b**, 0.08:1) a 100° C. Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per 4 ore, seguendo la scomparsa del diazochetone mediante TLC (CHCl₃/MeOH 9:1, v/v). Successivamente si filtra la miscela di reazione su setto poroso e si elimina il solvente in condizioni di pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene solubilizzato con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (20 ml) e la soluzione risultante viene lavata con etere etilico (3 X 10 ml).

Gli estratti organici vengono anidrificati su solfato di sodio anidro. Dopo allontanamento del solvente, in condizioni di pressione ridotta, si recupera l'*N*-metil-4-nitrobenzensolfonammide con una resa del 78%.

La fase acquosa viene acidificata con HCl 1 N ed estratta con acetato di etile (3 X 10 ml). Gli estratti organici vengono anidrificati su solfato di sodio anidro.

Dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta si recupera l'*N*-metil-*N*-nosil-β³-omo-L-alanina (**14b**) con una resa del 25%.

3. Procedura

In un pallone a due colli munito di refrigerante, si solubilizza l'*N*-metil-*N*-nosil-L-alanildiazometano (**13b**) (1 mmole) in 1,4-diossano/acqua (1:5 v/v). Alla soluzione viene, poi, aggiunto il benzoato d'argento (1 mmole) a 70°C. Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per 5 ore, seguendo la scomparsa del diazochetone mediante TLC (CHCl₃/MeOH 9:1 v/v). Successivamente si filtra la miscela di reazione su setto poroso e si elimina il solvente in condizioni di pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene solubilizzato con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (20 ml) e la soluzione risultante viene lavata con etere etilico (3 X 10 ml). Gli estratti organici vengono anidrificati su solfato di sodio anidro. Dopo allontanamento del solvente, in condizioni di pressione ridotta, si recupera l'*N*-metil-4-nitrobenzensolfonammide con una resa del 78%.

La fase acquosa viene acidificata con HCl 1 N ed estratta con acetato di etile (3 X 10 ml).

Gli estratti organici vengono anidrificati su solfato di sodio anidro.

Dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta, si recupera l'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-L-alanina (**14b**) con una resa del 35%.

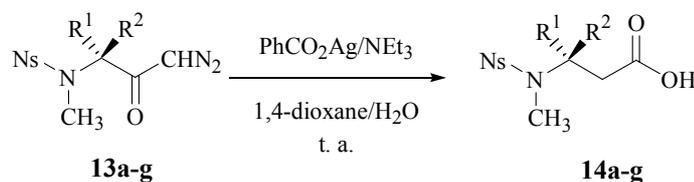
4. Procedura

In un pallone a due colli munito di refrigerante, si solubilizza l'*N*-metil-*N*-nosil-L-alanildiazometano (**13b**) in 1,4-diossano/acqua (1:5 v/v). Alla soluzione viene, poi, aggiunta una quantità catalitica di ossido d'argento (rapporto in moli ossido d'argento/**13b**, 0.08:1) a 70°C. Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per 5 ore, seguendo la scomparsa del diazochetone mediante TLC (CHCl₃/MeOH 9:1 v/v). Successivamente si filtra la miscela di reazione su setto poroso e si elimina il solvente in condizioni di pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene solubilizzato con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (20 ml) e la soluzione risultante viene lavata con etere etilico (3 X 10 ml). Gli estratti organici vengono anidrificati su solfato di sodio anidro. Dopo allontanamento del solvente, in condizioni di pressione ridotta, si recupera l'*N*-metil-4-nitrobenzensolfonammide, con una resa del 70%

La fase acquosa viene acidificata con HCl 1 N ed estratta con acetato di etile (3 X 10 ml).

Gli estratti organici vengono anidrificati su solfato di sodio anidro.

Dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta si recupera l'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-L-alanina (**14b**) con una resa del 35%.

Sintesi degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi **14a-g**


Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
14a	H	CH(CH ₃) ₂	60%
14b	H	CH ₃	83%
14c	CH ₃	H	82%
14d	H	CH ₂ (C ₆ H ₅)	70%
14e	H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	65%
14f	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	68%
14g	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	74%

Procedura generale

In un pallone a due colli, munito di imbuto gocciolatore, si solubilizza l'*N*-metil-*N*-nosil- α -amminoacildiazometano opportuno (**13a-g**) in 1,4-diossano/acqua (4:1 v/v). Alla soluzione mantenuta sotto costante agitazione magnetica a temperatura ambiente, viene, poi, aggiunta goccia a goccia una soluzione di benzoato d'argento (0.13 moli equiv.) in trietilammina distillata (il volume di trietilammina è circa 1/8 di quello della soluzione di 1,4-diossano/H₂O). La miscela risultante è lasciata sotto costante agitazione magnetica alla stessa temperatura per 20-30 minuti, finché l'analisi TLC (CHCl₃/MeOH 9:1, v/v) della miscela di reazione mostra la completa conversione del precursore nel corrispondente *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacido. Successivamente, si filtra la miscela di reazione su setto poroso e si elimina il solvente in condizioni di pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene solubilizzato con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (20 ml) e la soluzione risultante viene lavata con con etere etilico (3 X 10 ml). La fase acquosa viene acidificata fino a pH 2 con una soluzione acquosa di HCl 1 N (10 ml) ed estratta con acetato di etile (3 X 20 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio ed anidificate su solfato di sodio anidro.

Dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta, si recuperano gli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi **14a-g** con rese comprese tra il 65% e l'83%.

L'analisi GC-MS è stata eseguita sui corrispondenti esteri metilici ottenuti per trattamento degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi con una soluzione 0.66 M di diazometano in diclorometano.

***N*-Metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*L*-valina (14a)**

Resa: 60 %.

p.f. = 111.8-114.6 °C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :

8.30-8.21 (m, 2 H, ArH) 7.98-7.90 (m, 2 H, ArH), 4.05-3.92 (m, 1 H, CHCH₂), 2.68 (s, 3 H, NCH₃), 2.37 (dd, 1 H, CH₂COOH, $J = 15.64$ Hz, $J = 5.84$ Hz), 2.06 (dd, 1 H, CH₂COOH, $J = 15.64$ Hz, $J = 7.19$ Hz), 1.79-1.65 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 0.86-0.82 (m, 6 H, CHCH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :

174.82, 151.31, 146.83, 129.80, 125.33, 62.74, 36.90, 32.61, 32.02, 20.65, 19.86.

GC-MS (E.I.) m/z :

301 (100 %), 285 (1), 271 (11), 259 (15), 186 (12), 158 (6), 122 (33).

***N*-Metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*L*-alanina (14b)**

Resa: 83%.

p.f. = 102.7-106.1 °C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :

8.46-8.36 (m, 2 H, ArH), 8.10-8.04 (m, 2 H, ArH), 4.56-4.43 (m, 1 H, CHCH₃), 2.81 (s, 3 H, NCH₃), 2.48-2.32 (m, 2 H, CH₂COOH), 1.06 (d, 3 H, CHCH₃, $J = 6.60$ Hz).

GC-MS (E.I.) m/z :

301 (4 %), 243 (84), 186 (30), 130 (100), 122 (55), 98 (17), 88 (3), 76 (21).

N-Metil-N-nosil-β³-omo-D-alanina (14c)

Resa: 82%.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ:

8.46-8.36 (m, 2 H, ArH), 8.10-8.04 (m, 2 H, ArH), 4.56-4.43 (m, 1 H, CHCH₃), 2.81 (s, 3 H, NCH₃), 2.48-2.32 (m, 2 H, CH₂COOH), 1.06 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 6.60 Hz).

GC-MS (E.I.) *m/z*:

301 (4 %), 243 (84), 186 (30), 130 (100), 122 (55), 98 (17), 88 (3), 76 (21).

N-Metil-N-nosil-β³-omo-L-fenilalanina (14d)

Resa: 70 %.

p.f. = 142.8-149.4 °C.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ:

8.23-8.16 (m, 2 H, ArH), 7.78-7.69 (m, 2 H, ArH), 7.28-7.00 (m, 5 H, ArH), 4.68-4.56 (m, 1 H, CHCH₂COOH), 2.90 (s, 3 H, NCH₃), 2.89-2.61 (m, 2 H, CH₂Ph), 2.60-2.44 (m, 2 H, CH₂COOH).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ:

174.30, 151.01, 147.21, 139.10, 130.22, 129.61, 129.32, 127.70, 125.21, 58.43, 39.51, 38.55, 29.24.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

319 (5 %), 301(100), 259 (10) 186 (5), 156 (4), 122 (11), 91 (12).

N-Metil-N-nosil-β³-omo-L-isoleucina (14e)

Resa: 65%.

p.f. = 137.9-139.9 °C.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ:

8.41-8.35 (m, 2 H, ArH), 8.08-8.03 (m, 2 H, ArH), 4.24-4.16 (m, 1 H, CHCH₂COOH), 2.78 (s, 3 H, NCH₃), 2.46 (dd, 1H, CH₂COOH, *J* = 15.60 Hz, *J* = 6.00 Hz), 2.13 (dd, 1H, CH₂COOH, *J* = 15.90 Hz, *J* = 6.90 Hz), 1.70-1.50 (m, 2 H, CH₂CH₃, CHCH₃), 1.20-1.01 (m, 1 H, CH₂CH₃), 0.97-0.83 (m, 6 H, CHCH₃, CH₂CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :

174.91, 151.44, 146.72, 129.83, 125.32, 61.15, 39.12, 36.74, 29.83, 27.00, 15.71, 10.40.

GC-MS (E.I.) m/z :

301 (100 %), 285 (8), 259 (13), 186 (8), 172 (2), 156 (8), 122 (17)

N-Metil-N-nosil- β^3 -omo-D-Allo-iso-leucina (14f)

Resa: 68%.

p. f. = 28.15-129.05 °C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :

8.39-8.33 (m, 2 H, ArH) 8.07-8.01 (m, 2 H, ArH), 4.25-4.15 (m, 1 H, CHCH₂COOH), 2.79 (s, 3 H, NCH₃), 2.48 (dd, 1 H, CH₂COOH, $J = 15.90$ Hz, $J = 5.55$ Hz), 2.15 (dd, 1 H, CH₂COOH, $J = 15.60$ Hz, $J = 7.35$ Hz), 1.67-1.45 (m, 2 H, CH₂CH₃, CHCH₃), 1.21-1.08 (m, 1 H, CH₂CH₃), 0.95-0.87 (m, 6 H, CHCH₃, CH₂CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :

173.47, 154.86, 145.51, 128.34, 123.92, 59.54, 37.51, 35.48, 28.49, 25.32, 15.04, 10.59.

GC-MS (E.I.) m/z :

301 (100%), 285 (8), 259 (13), 186 (8), 172 (2), 156 (8), 122 (17).

N-Metil-N-nosil- β^3 -omo-L-leucina (14g)

Resa: 74%.

p.f. = 128.2-129.1°C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :

8.46 -8.25 (m, 2 H, ArH), 8.11-8.01 (m, 2 H, ArH), 4.54-4.38 (m, 1 H, CHCH₂COOH), 2.74 (s, 3 H, NCH₃), 2.32 (dd, 1H, CH₂COOH, $J = 15.30$ Hz, $J = 7.65$ Hz), 2.11 (dd, 1H, CH₂COOH, $J = 15.30$ Hz, $J = 6.30$ Hz), 1.54-1.40 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 1.29-1.10 (m, 2 H, CH₂CH(CH₃)₂), 0.95-0.75 (m, 6 H, CH(CH₃)₂).

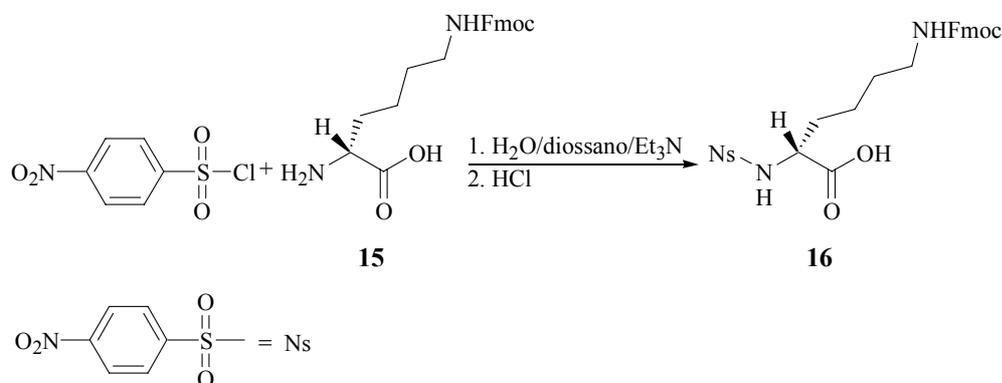
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ :

174.31, 151.54, 146.80, 129.73, 125.48, 54.54, 42.60, 38.51, 28.70, 25.62, 23.30, 22.11.

GC-MS (E.I.) m/z :

301 (100 %), 285 (50), 259 (17), 243 (10), 229 (7), 207 (16), 186 (27), 172 (39), 156 (11), 122 (41).

Sintesi della N^α -nosil- N^ϵ -Fmoc-L-lisina (**16**)



Procedura

In un pallone a due colli, munito di imbuto gocciolatore, si solubilizza l' N^ϵ -Fmoc-L-lisina (**15**) (0.50 mmoli) in una miscela di acqua distillata (10 ml) e 1,4-diossano distillato (10 ml); Per mantenere basico il pH della soluzione e favorire la solubilizzazione dell' α -aminoacido si aggiungono 1.5 mmoli di trietilammina distillata.

Alla soluzione, raffreddata con una miscela frigorifera di ghiaccio e cloruro di sodio e mantenuta sotto costante agitazione magnetica, si aggiunge lentamente, mediante un imbuto gocciolatore, una soluzione del cloruro di 4-nitrobenzensolfonile (0.75 mmoli) solubilizzato in diossano distillato (10 ml).

Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per 30 minuti, seguendo mediante TLC ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 90:10, v/v) la scomparsa dell'amminoacido.

Terminata la reazione si allontana il solvente per distillazione a pressione ridotta e si solubilizza il residuo ottenuto con una soluzione acquosa di Na_2CO_3 al 5% (20 ml).

La soluzione risultante è lavata con etere etilico (3 X 10 ml), acidificata fino a pH 2 con una soluzione acquosa di HCl 1 N ed estratta con acetato di etile (3 X 20 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl (1 X 10 ml) ed anidificate su Na_2SO_4 anidro. Dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta, si recupera l' N^α -nosil- N^ϵ -Fmoc-L-lisina (**16**) con una resa dell'87%, sotto forma di un solido bianco.

p. f.

89.7-91.7 °C

¹H-NMR (300 MHz, CD₃COCD₃) δ:

8.35 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.4 Hz), 8.00 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.9 Hz), 7.98-7.18 (m, 9 H, ArH_{Fmoc}, SO₂NH), 6.80-6.69 (m, 1 H, N^εH), 4.32-4.18 (m, 3 H, CH_{Fmoc}, CH₂Fmoc), 3.70 (dd, 1 H, α-CH, *J* = 13.5 Hz, *J* = 8.4 Hz), 2.80-2.70 (m, 2 H, ε-CH₂), 1.60-1.40 (m, 2 H, δ-CH₂), 1.27-1.10 (m, 4 H, β-CH₂, γ-CH₂).

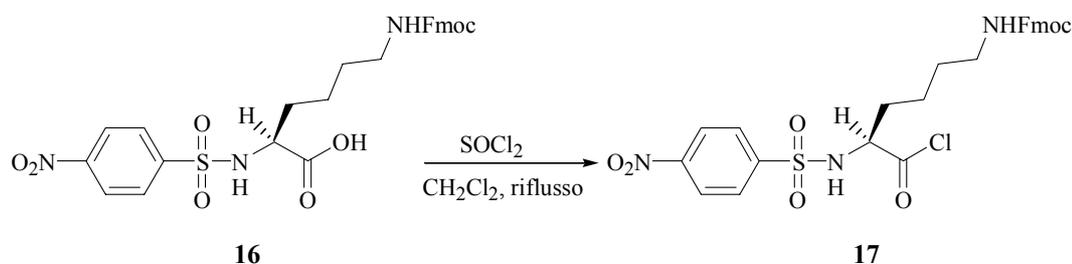
¹³C-NMR (75 MHz, CD₃COCD₃) δ:

157.22, 150.13, 145.78, 143.82, 143.66, 141.23, 128.35, 127.82, 127.12, 124.29, 120.08, 47.04, 40.07, 32.80, 29.20, 22.03, 21.83, 19.01.

MS (MALDI) *m/z*:

575.8325 (M+Na)⁺.

Sintesi del cloruro della N^α -nosil- N^ϵ -Fmoc-L-lisina (**17**)



Procedura

In un pallone a due colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si solubilizza l' N^α -nosil- N^ϵ -Fmoc-L-lisina (**16**) (1 mmole) in diclorometano anidro (20 ml). Si introduce il cloruro di tionile (12 mmoli) e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a refluxo per 20-30 minuti seguendo mediante TLC ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 90:10, v/v) la scomparsa dell' N -nosil- α -amminoacido.

La formazione del cloruro dell' N^α -nosil- N^ϵ -Fmoc-L-lisina viene seguita per TLC trasformando il cloruro formatosi in estere metilico per aggiunta di metanolo anidro ad un campione prelevato dalla miscela di reazione.

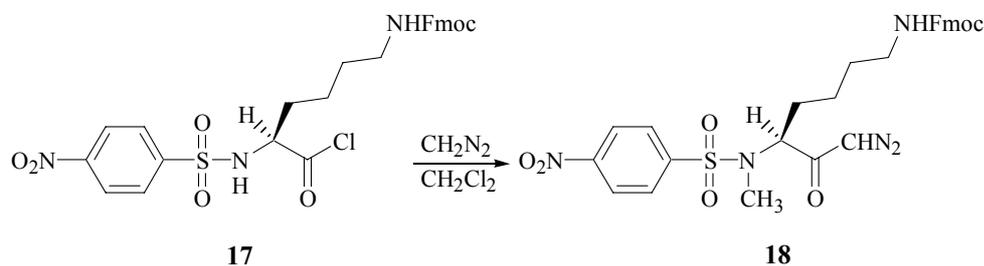
Terminata la reazione, si elimina il solvente mediante distillazione a pressione ridotta. Successivamente si aggiungono piccoli volumi di diclorometano prima, e di etere etilico dopo, che vengono rimossi mediante distillazione in condizioni di pressione ridotta. L'operazione viene ripetuta fino a completa eliminazione del cloruro di tionile non reagito.

Si ottiene il cloruro dell' N^α -nosil- N^ϵ -Fmoc-L-lisina (**17**) con resa quantitativa.

MS (MALDI) m/z :

593.8436 $[(M+Na)^+]$, 100%

Sintesi dell' N^α -metil- N^α -nosil- N^ϵ -Fmoc-L-lisinildiazometano (**18**)



Procedura

In un pallone a tre colli, munito d'imbuto gocciolatore ed in atmosfera inerte d'azoto, viene introdotta una soluzione 0.66 M di diazometano in diclorometano (10 mmoli); si aggiunge, poi, lentamente il cloruro dell' N^α -nosil- N^ϵ -Fmoc-L-lisina (**17**) solubilizzato nella minima quantità necessaria di diclorometano anidro (10 ml). Si lascia la reazione sotto agitazione magnetica, in una miscela frigorifera di ghiaccio e NaCl, per 65 minuti, seguendo mediante analisi TLC ($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 60:40, v/v) la scomparsa del cloruro dell' N -nosil- α -amminoacido, previa trasformazione nel corrispondente estere metilico per aggiunta di metanolo anidro ad un campione prelevato dalla miscela di reazione. Al termine della reazione il solvente viene allontanato in condizioni di pressione ridotta ed il residuo oleoso ottenuto viene purificato mediante cromatografia su colonna corta ($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 60:40, v/v). Si ottiene l' N^α -metil- N^α -nosil- N^ϵ -Fmoc-L-lisinildiazometano (**18**), sotto forma di un olio giallo chiaro, con una resa del 69%.

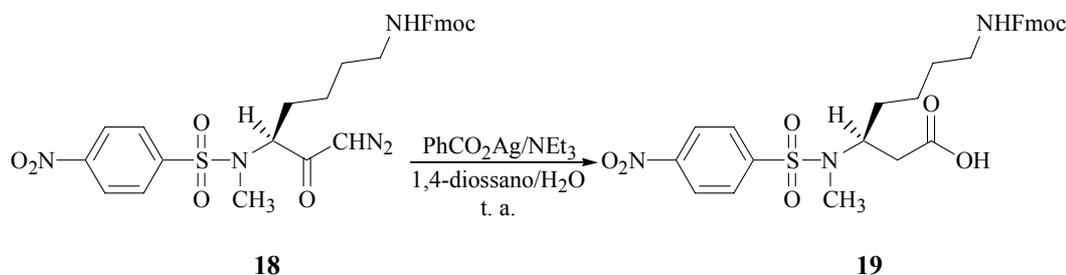
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :

8.38-8.33 (m, 2 H, ArH), 8.01-7.96 (m, 2 H, ArH), 7.81-7.25 (m, 8 H, ArH_{Fmoc}), 5.60 (s, 1 H, CHN₂), 4.86-4.78 (m, 1 H, N ^{ϵ} H), 4.51-4.38 (m, 3 H, CH₂Fmoc CHCOCHN₂), 4.29-4.18 (m, 1 H, CH_{Fmoc}), 3.18-3.06 (m, 2 H, ϵ -CH₂), 2.82 (s, 3 H, NCH₃), 1.55-1.13 (m, 6 H, β -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :

176.98, 157.00, 150.30, 145.15, 143.95, 141.99, 128.40, 127.72, 127.06, 125.02, 124.43, 120.01, 66.55, 63.01, 54.25, 47.27, 40.33, 30.14, 29.35, 27.14, 23.26.

Sintesi dell' N^α -metil- N^α -nosil- N^ζ -Fmoc- β^3 -omo-L-lisina (**19**)



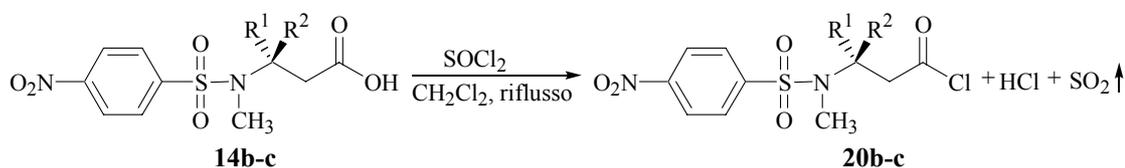
Procedura

In un pallone a due colli, munito di imbuto gocciolatore, si solubilizza l' N^α -metil- N^α -nosil- N^ζ -Fmoc-L-lisinildiazometano (**18**) in 1,4-diossano/acqua (4:1 v/v). Alla soluzione mantenuta sotto costante agitazione magnetica a temperatura ambiente, viene, poi, aggiunta goccia a goccia una soluzione di benzoato d'argento (0.13 moli equiv.) in trietilammina distillata (il volume di trietilammina è circa 1/8 di quello della soluzione di 1,4-diossano/H₂O). La miscela risultante è lasciata sotto costante agitazione magnetica alla stessa temperatura per 20 minuti, finchè l'analisi TLC (CHCl₃/AcOEt 60:40, v/v) della miscela di reazione mostra la completa conversione del precursore nel corrispondente N -metil- N -nosil- β^3 -omoamminoacido. Successivamente, si filtra la miscela di reazione su setto poroso e si elimina il solvente in condizioni di pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene solubilizzato con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (20 ml) e la soluzione risultante viene lavata con con etere etilico (3 X 10 ml). La fase acquosa viene acidificata fino a pH 2 con una soluzione acquosa di HCl 1 N (10 ml) ed estratta con acetato di etile (3 X 20 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio ed anidificate su solfato di sodio anidro. Dopo allontanamento del solvente in condizioni di pressione ridotta si recupera N^α -metil- N^α -nosil- N^ζ -Fmoc- β^3 -omo-L-lisina (**19**) con una resa del 62%, sotto forma di un olio giallo.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ :

8.37 (d, 2 H, ArH, $J = 8.40$ Hz) 8.01 (d, 2 H, ArH, $J = 8.40$ Hz), 7.91-7.28 (m, 9 H, N ^{ζ} H, ArH_{Fmoc}), 4.33-4.11 (m, 4 H, CH_{Fmoc}, CH_{2Fmoc}, CHCH₂COOH), 2.99-2.86 (m, 2 H, CH₂N ^{ζ} H), 2.69 (s, 3 H, NCH₃), 2.35 (dd, 1 H, CH₂COOH, $J = 15.00$ Hz, $J = 7.80$ Hz), 2.08 (dd, 1 H, CH₂COOH, $J = 15.30$ Hz, $J = 6.30$ Hz), 1.55-1.00 (m, 6H, γ -CH₂, δ -CH₂, ε -CH₂).

Sintesi dei cloruri degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi (**20b-c**)



Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
20b	H	CH ₃	100%
20c	CH ₃	H	100%

Procedura generale

In un pallone a due colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si solubilizza l'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacido opportuno **14b-c** (1 mmole) in diclorometano anidro (20 ml). Si introduce il cloruro di tionile (12 mmoli) e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica alla temperatura di riflusso per 20-30 minuti, seguendo mediante analisi TLC (CHCl₃/CH₃OH 90:10, v/v) la scomparsa dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacido.

La formazione del cloruro dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacido (**20b-c**) viene seguita per TLC trasformando il cloruro formatosi in estere metilico per aggiunta di metanolo anidro ad un campione prelevato dalla miscela di reazione.

Terminata la reazione, si elimina il solvente mediante distillazione a pressione ridotta. Successivamente si aggiungono piccoli volumi di diclorometano prima, e di etere etilico dopo, che vengono rimossi per distillazione in condizioni di pressione ridotta. L'operazione viene ripetuta fino a completa eliminazione del cloruro di tionile non reagito.

I cloruri degli *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacidi (**20b-c**) si ottengono con rese quantitative e sono caratterizzati previa trasformazione nei corrispondenti esteri metilici, per trattamento con metanolo anidro.

Cloruro dell' *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*L*-alanina (20b)

Resa: 100%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3Cl_3) δ (p.p.m.):

8.43-8.28 (m, 2 H, ArH), 8.06-7.94 (m, 2 H, ArH), 4.61-4.48 (m, 1 H, CHCH₃), 3.62 (s, 3 H, OCH₃), 2.78 (s, 3 H, NCH₃), 2.47-2.40 (m 2 H, CH₂COOCH₃), 1.05 (d, 3 H, CHCH₃, $J = 6.60$ Hz).

GC/MS (E.I.) m/z :

301 (4 %), 243 (84), 186 (30), 130 (100), 122 (55), 98(17), 88 (3), 76 (21).

Cloruro dell' *N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omo-*D*-alanina (20c)

Resa: 100%.

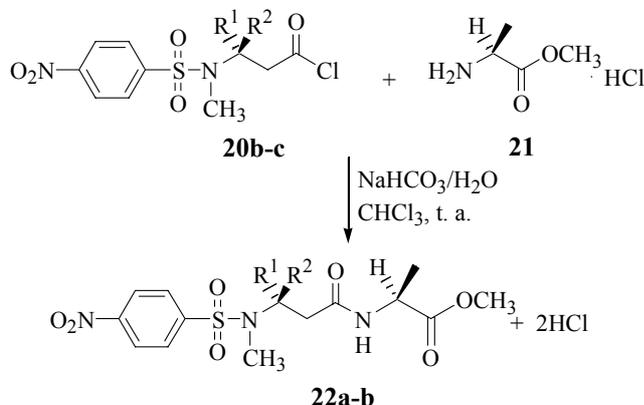
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3Cl_3) δ (p.p.m.):

8.43-8.28 (m, 2 H, ArH), 8.06-7.94 (m, 2 H, ArH), 4.61-4.48 (m, 1 H, CHCH₃), 3.62 (s, 3 H, OCH₃), 2.78 (s, 3 H, NCH₃), 2.47-2.40 (m 2 H, CH₂COOCH₃), 1.05 (d, 3 H, CHCH₃, $J = 6.60$ Hz).

GC/MS (E.I.) m/z :

301 (4 %), 243 (84), 186 (30), 130 (100), 122 (55), 98(17), 88 (3), 76 (21).

Sintesi degli *N*-nosil-dipeptidi **22a-b**



Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
22a	H	CH ₃	75
22b	CH ₃	H	64

Procedura generale

In un pallone a due colli, munito di imbuto gocciolatore si solubilizza il cloridrato dell'estere metilico dell' α -amminoacido C-terminale **21** (1 mmole) in una soluzione acquosa di NaHCO₃ al 5% (10 ml). Alla soluzione, mantenuta sotto costante agitazione magnetica, si aggiunge lentamente, mediante imbuto gocciolatore, il cloruro dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacido opportuno **20b-c** (1 mmole) solubilizzato in cloroformio privo di etanolo (10 ml).

Al termine dell'aggiunta si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 25-30 minuti, seguendo mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 95/5 v/v) la scomparsa del cloruro dell'*N*-metil-*N*-nosil- β^3 -omoamminoacido. Terminata la reazione, si separa la fase organica da quella acquosa e si estrae più volte quest'ultima con cloroformio (3 X 10 ml). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa di HCl 1 N (1 X 10 ml) e poi con una soluzione acquosa satura di NaCl (1 X 10 ml) ed anidificate su solfato di sodio anidro. Si elimina il solvente in condizioni di pressione ridotta, e si ottengono i dipeptidi **22a-b** con rese comprese tra il 64% e il 75%.

N-Metil-N-nosil- β^3 -omo-L-alanil-L-alanina metil estere (22a)

Resa: 75%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ :

8.42-8.37 (m, 2 H, ArH) 8.30 (d, 1 H, NH, $J = 7.20$ Hz), 8.07-8.00 (m, 2 H, ArH), 4.42-4.33 (m, 1 H, CHCH₂), 4.24-4.12 (m, 1 H, CHCOOCH₃), 3.59 (s, 3 H, OCH₃), 2.73 (s, 3 H, NCH₃), 2.32 (dd, 1 H, CH₂CONH, $J = 14.20$ Hz, $J = 8.10$ Hz), 2.14 (dd, 1 H, CH₂CONH, $J = 14.16$ Hz, $J = 6.60$ Hz), 1.22 (d, 3 H, CHCH₃, $J = 7.28$ Hz), 0.94 (d, 3 H, CH₂CHCH₃, $J = 6.73$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ :

173.39, 168.93, 149.93, 145.39, 128.31, 124.10, 52.55, 51.00, 48.06, 41.4, 28.59, 18.18, 17.69.

GC-MS (EI) m/z :

328 (3%), 243 (51), 201 (100), 186 (16), 122 (24).

N-Metil-N-nosil- β^3 -omo-D-alanil-L-alanina metil estere (22b)

Resa: 64%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ :

8.44-8.37 (m, 2 H, ArH), 8.30 (d, 1 H, NH, $J = 6.94$), 8.08-8.00 (m, 2 H, ArH), 4.39-4.30 (m, 1 H, CHCH₂), 4.19-4.08 (m, 1 H, CHCOOCH₃), 3.60 (s, 3 H, OCH₃), 2.72 (s, 3 H, NCH₃), 2.29 (dd, 1 H, CH₂CONH, $J = 13.94$ Hz, $J = 8.40$ Hz), 2.12 (dd, 1 H, CH₂CONH, $J = 13.90$ Hz, $J = 6.10$ Hz), 1.19 (d, 3 H, CHCH₃, $J = 7.30$), 0.96 (d, 3 H, CH₂CHCH₃, $J = 6.74$ Hz).

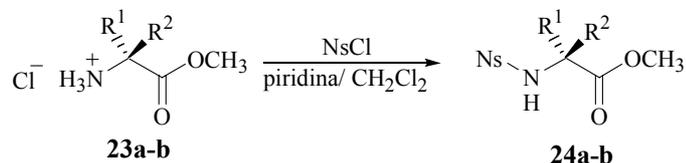
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ :

173.39, 169.10, 149.93, 145.39, 128.40, 124.10, 52.55, 51.00, 48.06, 41.21, 28.59, 18.18, 17.69

GC-MS (E.I.) m/z :

328 (3%), 243 (51), 201 (100), 186 (16), 122 (24).

Sintesi degli esteri metilici degli *N*-nosil- α -amminoacidi **24a-b**



Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
24a	H	(CH ₃) ₂ CH	90
24b	(CH ₃) ₂ CH	H	84

Procedura generale

In un pallone a due colli, in atmosfera inerte d'azoto, si aggiunge il cloruro dell'acido *p*-nitrobenzensolfonico (1 mmole) ad una soluzione del cloridrato dell'estere metilico dell' α -amminoacido appropriato **23a-b** (1 mmole) in diclorometano anidro (20 ml), contenente piridina anidra (3 mmoli).

Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per circa 3 ore, monitorando, mediante TLC (CHCl₃/Et₂O 80:20, v/v), la conversione del precursore nel corrispondente estere metilico protetto (**24a-b**). Terminata la reazione, si acidifica la miscela di reazione con una soluzione di HCl 1 N fino a pH 2 e si estrae con diclorometano (3 X 10 ml). La fase organica viene poi lavata con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (3 X 10 ml), e successivamente anidrificata su Na₂SO₄ anidro. Si elimina poi il diclorometano in condizioni di pressione ridotta e si recuperano gli esteri metilici degli *N*-nosil- α -amminoacidi (**24a-b**) con rese comprese tra l'84 e il 90%, come solidi di colore giallo.

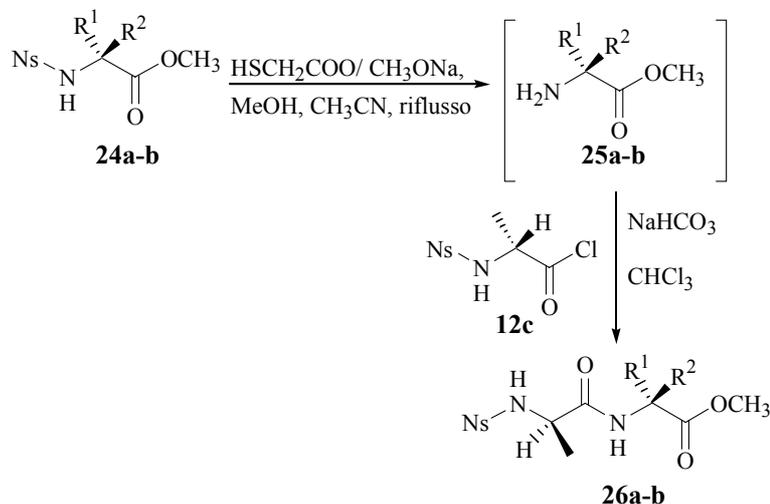
Estere metilico dell' N-nosil-L-valina (24a)**Resa:** 90%.**p.f.** = 97-100 °C**IR** (KBr) cm⁻¹:

3297, 3110, 1734, 1529, 1349, 1174, 1089, 859, 741.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm):8.39-8.32 (m, 2 H, ArH), 8.09-8.02 (m, 2 H, ArH), 5.56 (d, 1 H, NH, $J = 9.8$ Hz), 3.85 (dd, 1 H, CHNH, $J = 4.9$ Hz, $J = 9.8$ Hz), 3.52 (s, 3 H, OCH₃), 2.11 (m, 1 H, (CH₃)₂CH), 0.96 (d, 3 H, (CH₃)₂CH, $J = 6.8$ Hz), 0.88 (d, 3 H, (CH₃)₂CH, $J = 6.8$ Hz).**FAB/MS** m/z :317 [(M + H)⁺, 31 %], 273 (18), 257 (100), 241 (23), 186 (20), 122 (29).***Estere metilico dell' N-nosil-D-valina (24b)*****Resa:** 84%.**p.f.** = 98-101 °C**IR** (KBr) cm⁻¹:

3297, 3110, 1734, 1529, 1349, 1174, 1089, 859, 741

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm):8.39-8.32 (m, 2 H, ArH), 8.09-8.02 (m, 2 H, ArH), 5.56 (d, 1 H, NH, $J = 9.8$ Hz), 3.85 (dd, 1 H, CHNH, $J = 4.9$ Hz, $J = 9.8$ Hz), 3.52 (s, 3 H, OCH₃), 2.11 (m, 1 H, (CH₃)₂CH), 0.96 (d, 3 H, (CH₃)₂CH, $J = 6.8$ Hz), 0.88 (d, 3 H, (CH₃)₂CH, $J = 6.8$ Hz).**FAB/MS** m/z :317 [(M + H)⁺, 31 %], 273 (18), 257 (100), 241 (23), 186 (20), 122 (29).

Sintesi degli *N*-nosil-dipeptidi **26a-b**

Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
26a	H	CH(CH ₃) ₂	78
26b	CH(CH ₃) ₂	H	71

Procedura generale

In un pallone a due colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si pongono a reagire l'estere metilico dell'*N*-nosil- α -amminoacido appropriato **24a-b** (1 mmole), solubilizzato in acetonitrile anidro (10 ml), l'acido mercaptoacetico (3 mmoli) ed il metossido di sodio (12 mmoli); quest'ultimo viene solubilizzato aggiungendo una quantità variabile di metanolo anidro.

Si lascia la miscela di reazione a riflusso sotto agitazione magnetica per circa 60 minuti, seguendo l'andamento della reazione mediante TLC (Et₂O/etere di petrolio 60:40, v/v).

Terminata la reazione, si elimina il solvente per distillazione a pressione ridotta, si acidifica con una soluzione acquosa di HCl 1 N e si estrae con acetato di etile (3 X 10 ml). La fase acquosa viene basificata con una soluzione acquosa saturata di Na₂CO₃.

Successivamente la fase acquosa basica, contenente l' α -amminoestere deproteetto (**25a-b**), viene trattata con il cloruro dell'*N*-nosil-D-alanina (**12c**) (1 mmole), solubilizzato in

cloroformio privo di etanolo (10 ml). Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per circa 60 minuti, controllando, mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 98:2, v/v), la formazione del dipeptide.

Terminata la reazione si separano le due fasi e si estrae più volte la soluzione acquosa con cloroformio (3 X 10 ml). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa di HCl 1 N, successivamente con una soluzione acquosa satura di NaCl ed anidificate su solfato di sodio anidro. Si allontana il solvente in condizioni di pressione ridotta e si ottengono gli *N*-nosil-dipeptidi **26a-b** con rese comprese tra il 71% e il 78%, sotto forma di solidi bianchi.

***N*-Nosil-*D*-Alanil-*L*-Valina metil estere (26a)**

Resa: 78%.

p.f. = 146-147 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

3350, 3119, 2976, 1730, 1645, 1536, 1352, 1042, 856, 742.

¹H-NMR (CDCl₃), δ (p.p.m.):

8.32 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.6 Hz), 8.05 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.6 Hz), 6.51 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz CONH), 5.98 (d, 1 H, *J* = 6.7 Hz, SO₂NH), 4.33 (dd, 1 H, CHCOOCH₃, *J* = 8.8 Hz, *J* = 4.7 Hz), 3.98 (m, 1 H, CHCH₃), 3.73 (s, 3 H, OCH₃), 2.12 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 1.37 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 7.0 Hz), 0.87 (d, 3 H, CH(CH₃)₂, *J* = 6.8 Hz), 0.83 (d, 3 H, CH(CH₃)₂, *J* = 6.8 Hz).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ:

172.09, 170.76, 150.12, 145.41, 128.53, 124.43, 56.94, 52.65, 52.48, 31.27, 20.33, 18.91, 17.47.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

328 (13%), 229 (100), 186 (36), 158 (9), 130 (20), 122 (30), 72 (31).

***N*-Nosil-*D*-Alanil-*D*-Valina metil estere (26b)**

Resa: 71%.

p.f. = 160-162 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3350, 3119, 2976, 1730, 1645, 1536, 1352, 1042, 856, 742.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (p.p.m.):

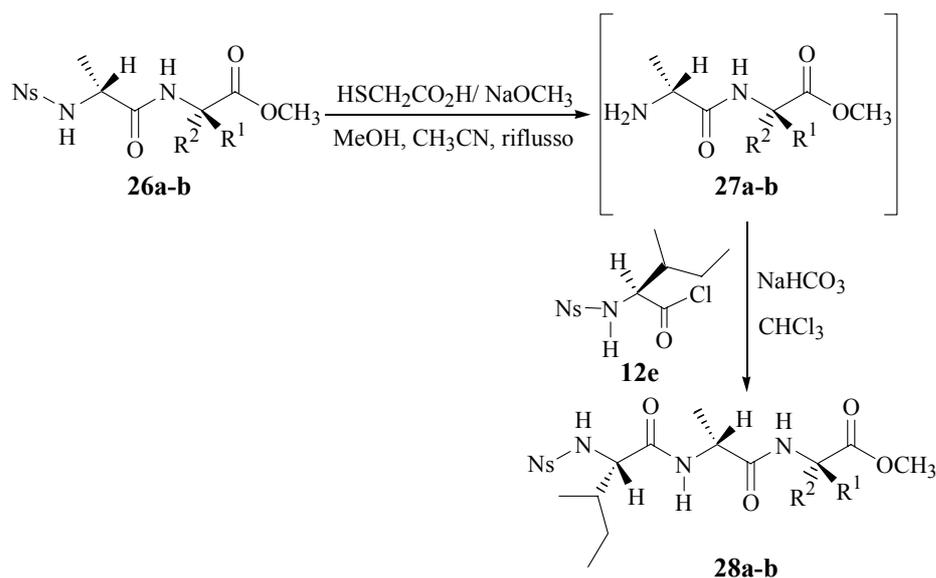
8.32 (d, 2 H, ArH, $J = 8.6$ Hz), 8.08 (d, 2 H, ArH, $J = 8.6$ Hz), 6.75 (d, 1 H, CONH, $J = 8.7$ Hz), 6.50 (d, 1 H, SO_2NH , $J = 8.5$ Hz), 4.38 (dd, 1 H, CHCOOCH_3 , $J = 8.7$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 4.06 (m, 1 H, CHCH_3), 3.73 (s, 3 H, OCH_3), 2.02 (m, 1 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.32 (d, 3 H, CHCH_3 , $J = 7.0$ Hz), 0.89 (d, 3 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $J = 6.9$ Hz); 0.75 (d, 3 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $J = 6.9$ Hz).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :

172.06, 171.27, 149.98, 145.91, 128.34, 124.33, 57.25, 52.48, 52.38, 31.09, 19.76, 18.61, 17.54.

GC-MS (E.I.) m/z :

328 (13%), 229 (100), 186 (36), 158 (9), 130 (20), 122 (30), 72 (31)

Sintesi degli *N*-nosil-tripeptidi **28a-b**


Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
28a	H	CH(CH ₃) ₂	89
28b	CH(CH ₃) ₂	H	84

Procedura generale

In un pallone a due colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si pongono a reagire l'appropriato *N*-nosil-dipeptide **26a-b** (1 mmole), solubilizzato in acetonitrile anidro (10 ml), l'acido mercaptoacetico (3 mmoli) ed il metossido di sodio (16 mmoli), che viene solubilizzato aggiungendo una quantità variabile di metanolo anidro.

Si lascia la miscela di reazione a riflusso sotto agitazione magnetica per circa 2 ore, seguendo l'andamento della reazione mediante TLC (Et₂O/etere di petrolio 60:40, v/v).

Terminata la reazione, si elimina il solvente per distillazione a pressione ridotta, si acidifica con una soluzione acquosa di HCl 1 N e si estrae con acetato di etile (3 X 10 ml). La fase acquosa viene basificata con una soluzione acquosa saturata di Na₂CO₃.

Successivamente la fase acquosa basica, contenente il dipeptide deprotetto (**27a-b**), viene trattata con il cloruro dell'*N*-nosil-L-isoleucina (**12e**) (1 mmole), solubilizzato in cloroformio privo di etanolo (10 ml). Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per circa 60 minuti, controllando mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 98:2, v/v) la formazione del tripeptide.

Terminata la reazione si separano le due fasi e si estrae più volte la soluzione acquosa con cloroformio (3 X 10 ml). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa di HCl 1 N, successivamente con una soluzione acquosa satura di NaCl ed anidificate su solfato di sodio anidro. Si allontana il solvente in condizioni di pressione ridotta e si ottengono gli *N*-nosil-tripeptidi **28a-b** con rese comprese tra l'84% e il 89%, sotto forma di solidi bianchi.

N-Nosil-L-isoleucil-D-alanil-L-valina metil estere (**28a**)

Resa: 89%.

p. f. = 195-198°C

IR (KBr) cm⁻¹:

3376, 1637, 1545, 1361, 1352, 856, 800, 742.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ:

8.22 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.6 Hz), 8.06 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.6 Hz), 7.51 (d, 1 H, SO₂NH, *J* = 8.4), 7.09 (d, 1 H, NHCHCH₃, *J* = 7.8 Hz), 6.75 (d, 1 H, NHCHCOOCH₃, *J* = 9.0 Hz), 4.61 (dd, 1 H, CHCOOCH₃, *J* = 8.0, *J* = 5.9 Hz), 4.19 (m, CHCH₃, 1 H), 3.89 (s, 3 H, OCH₃), 3.71 (t, 1 H, SO₂NHCH, *J* = 8.1 Hz), 2.19 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 1.78-1.58 (m, 2 H, CH₂CH₃, CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.28 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 7.2 Hz), 1.12 (m, 1 H, CH₂CH₃), 1.00-0.80 (m, 12 H, CH(CH₃)₂, CH₂CH₃, CH(CH₃)CH₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ:

172.52, 171.60, 169.81, 149.74, 146.26, 127.77, 124.11, 61.62, 56.85, 52.79, 48.36, 38.38, 31.74, 24.89, 19.15, 18.85, 17.59, 15.06, 11.09.

GC-MS (E.I.) *m/z*:

500 (M⁺, 1%), 441 (4), 370 (3), 342 (13), 271 (16), 241 (22), 215 (25), 187 (100), 186 (13), 156 (16), 122 (13), 72 (41).

N-Nosyl-L-isoleucil-D-alanil-D-valina metil estere (28b)

Resa: 84%.

p. f. = 221-223 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3378, 1637, 1545, 1361, 1352, 858, 800, 741

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :

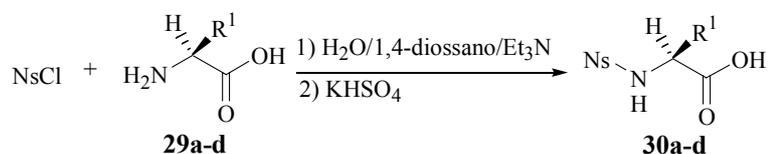
8.32 (d, 2 H, ArH, $J = 8.6$ Hz), 8.14 (d, 1 H, SO_2NH , $J = 8.5$ Hz), 8.04 (d, 2 H, ArH, $J = 8.6$ Hz), 6.82 (d, 1 H, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)$, $J = 7.3$ Hz), 6.51 (d, 1 H, NHCHCOOCH_3 , $J = 8.2$ Hz), 4.47 (dd, 1 H, CHCOOCH_3 , $J = 8.0$ Hz, $J = 6.6$ Hz), 4.38 (m, 1 H, CHCH_3), 3.70-3.55 (m, 4 H, OCH_3 , SO_2NHCH), 1.97 (m, 1 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.62-1.42 (m, 2 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.08 (m, 1 H, CHCH_3), 0.93 (d, 3 H, CHCH_3 , $J = 7.2$ Hz), 0.86-0.73 (m, 12 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, CH_2CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :

172.56, 172.25, 169.57, 149.77, 147.22, 128.77, 124.48, 60.70, 57.72, 52.09, 47.91, 37.32, 30.30, 24.70, 19.25, 18.55, 18.15, 15.40, 10.87.

GC-MS (E.I.) m/z :

500 (M^+ , 1%), 441 (2), 370 (3), 342 (14), 271 (15), 241 (30), 215 (23), 187 (100), 186 (12), 156 (26), 122 (12), 72 (40).

Sintesi degli *N*-nosil- α -amminoacidi **30a-d**

Composto	R ¹	Resa (%)
30a	(CH ₂) ₄ NH-(Boc)	73
30b	CH ₂ C ₆ H ₄ O-(<i>t</i> -Bu)	75
30c	CH ₂ S-(Trt)	83
30d	CH ₂ CONH-(Trt)	89

Procedura generale

In un pallone a due colli, munito di imbuto gocciolatore, si solubilizza l' α -amminoacido opportuno **29a-d** (1 mmole) in una soluzione di acqua distillata (10 ml) e di diossano distillato (10 ml), in presenza di trietilammina distillata (20 mmoli).

Successivamente nel pallone di reazione, raffreddato con una miscela frigorifera di ghiaccio e cloruro di sodio, si aggiunge lentamente, mediante imbuto gocciolatore, il cloruro di 4-nitrobenzensolfonile (1.5-1.6 mmoli), solubilizzato in diossano anidro (10 ml). Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per 30-50 minuti, seguendo mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 90:10, v/v) la scomparsa dell' α -amminoacido.

Terminata la reazione, si allontana il solvente per distillazione a pressione ridotta, si basifica il residuo con una soluzione acquosa di Na₂CO₃ al 5% e si estrae con etere etilico (3 X 10 ml). La fase acquosa viene acidificata con una soluzione acquosa di KHSO₄ al 5% fino a pH 3-4 ed estratta con acetato di etile (3 X 10 ml).

Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio ed anidificate su solfato di sodio anidro. Dopo allontanamento del solvente, mediante distillazione a pressione ridotta, si recuperano gli *N*-nosil- α -amminoacidi **30a-d** con rese comprese tra il 73% e l'89%, sotto forma di solidi bianchi.

N^α-Nosil-N^ε-Boc -L-Lisina (30a)

Resa: 73%.

p. f. = 153-155 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

3426, 3408, 3108, 2964, 1730, 1662, 1528, 1342, 1261, 1092, 800.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ:

12.72 (S_{broad} 1 H, COOH), 8.58 (d, 1 H, N^αH, *J* = 8.7 Hz), 8.39 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.4 Hz), 8.00 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.9 Hz), 6.75 (m, 1 H, N^εH), 3.70 (dd, 1 H, α-CH, *J* = 13.5 Hz, *J* = 8.4 Hz), 2.78 (m, 2 H, ε-CH₂), 1.60-1.40 (m, 2H, δ-CH₂), 1.34 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.27-1.10 (m, 4H, β-CH₂, γ-CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ:

172.99, 155.98, 149.85, 147.25, 144.76, 128.53, 124.79, 77.80, 56.10, 31.98, 29.20, 28.70, 22.76, 18.06.

MS (MALDI) *m/z*:

453.8931 [(M+Na)⁺, 100%]

N^α-Nosil-O-tert-butil-L-Tirosina (30b)

Resa: 75%.

p.f. = 150-152 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

3183, 2982, 1727, 1608, 1530, 1349, 1308, 1147, 850, 738.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ:

12.76 (S_{broad}, 1 H, COOH), 8.70 (S_{broad}, 1 H, N^αH), 8.20 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.4 Hz), 7.75 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.9 Hz), 6.98 (d, 2 H, Ar_{Tyr}-H, *J* = 8.2 Hz), 6.65 (d, 2 H, Ar_{Tyr}-H, *J* = 8.2 Hz), 3.92 (m, 1H, CH), 2.92 (m, 1H, CH₂), 2.62 (m, 2H, CH₂), 1.37 (s, 9 H, C-CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ:

171.62, 151.69, 145.83, 145.83, 131.11, 128.45, 128.23, 121.46, 114. 35, 78.05, 54.78, 51.97, 36.13, 29.53.

MS (MALDI) *m/z*:

444.8162 [(M+Na)⁺, 100%]

N^α-Nosil-S-tritile-L-cisteina (30c)

Resa: 83%.

p. f. = 99-101 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3271, 3100, 3056, 1725, 1606, 1530, 1348, 1164, 1090, 854, 740, 700.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ :

12.98 (*S*_{broad} 1 H, COOH), 8.82 (d, 1 H, N^αH, *J* = 8.2 Hz), 8.35 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.4 Hz), 7.96 (d, 1 H, ArH, *J* = 8.9 Hz), 7.34-7.16 (m, 15H, ArH_{Trt}), 3.59 (m, 1 H, α-CH), 2.32 (m, 2 H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ :

174.90, 151.67, 145.83, 143.92, 129.38, 128.28, 128.21, 126.38, 121.44, 67.36, 55.74, 26.81.

MS (MALDI) *m/z*:

571.9175 [(M+Na)⁺, 100%]

N^α-Nosil-N^β-tritile-L-asparagina (30d)

Resa: 89%.

p. f. = 136-138 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3426, 3358, 3112, 2964, 1725, 1616, 1533, 1348, 1184, 1112, 850, 743, 700.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ :

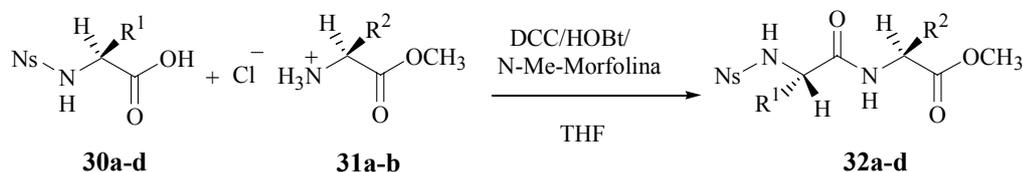
12.81 (*S*_{broad} 1 H, COOH), 8.15 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.6 Hz), 7.90 (d, 2 H, ArH, *J* = 8.6 Hz), 7.28-7.02 (m, 15 H, ArH_{Trt}), 6.51 (s, 1 H, NHCO), 6.00 (*S*_{broad}, 1 H, N^αH), 4.02 (m, 1 H, CH), 3.01 (m, 1 H, CH₂), 2.83 (m, 1 H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ :

174.97, 173.78, 151.63, 145.81, 145.06, 128.32, 128.27, 126.33, 121.43, 72.77, 50.08, 34.15.

MS (MALDI) *m/z*:

567.8831 [(M+Na)⁺, 100%]

Sintesi degli *N*-nosil-dipeptidi 32a-d


Composto	R ¹	R ²	Resa (%)
32a	(CH ₂) ₄ NH-(Boc)	CH ₃	90
32b	CH ₂ C ₆ H ₄ O-(t-Bu)	CH(CH ₃) ₂	82
32c	CH ₂ S-(Trt)	CH ₃	87
32d	CH ₂ CONH-(Trt)	CH ₃	95

Procedura generale

In un pallone a due colli, in atmosfera inerte d'azoto, vengono introdotti e solubilizzati in tetraidrofurano anidro (20 ml), il cloridrato dell'estere metilico dell' α -amminoacido opportuno **31a-b** (1 mmole), l'1-idrossibenzotriazolo (1.1 mmoli), la *N*-metilmorfolina (1 mmole) e l'appropriato *N*ⁿ-nosil- α -amminoacido **30a-d** (1 mmole). Successivamente alla soluzione, mantenuta sotto costante agitazione magnetica e raffreddata utilizzando una miscela frigorifera di ghiaccio e cloruro di sodio, viene aggiunta la diciolesilcarbodimmide (1.15 mmoli).

La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica costante ed alla temperatura di 0°C, per un'ora circa e per altri 60 minuti, a temperatura ambiente. Il decorso della reazione è seguito mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 80:20, v/v).

Terminata la reazione, la *N,N'*-diciolesilurea viene rimossa per filtrazione ed il solvente allontanato per distillazione in condizioni di pressione ridotta. Al residuo ottenuto viene aggiunta una miscela di acetato di etile (30 ml) e di una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (10 ml). Successivamente, la fase organica viene lavata con una soluzione

acquosa di acido citrico al 5% (10 ml), di seguito con una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 (10 ml) ed infine con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio (10 ml). La fase organica viene anidrificata su solfato di sodio anidro; la successiva rimozione del solvente consente il recupero, sotto forma di solidi di colore giallo pallido, degli *N*-nosil-dipeptidi **32a-d** con rese comprese tra l'87% ed il 90%.

N^α-Nosil-N^ε-Boc-L-lisinil-L-alaninaOMe (32a)

Resa: 90%.

p.f. = 102 -104 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3336, 3260, 3108, 2931, 1741, 1686, 1647, 1529, 1450, 1352, 1261, 1166, 1090, 801.

¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

8.30 (d, 2 H, ArH, $J = 8.8$ Hz), 8.03 (d, 2 H, ArH, $J = 8.7$ Hz), 7.10 (d, 1H, NH_{Ala} , $J = 8.1$ Hz), 6.40 (d, 1H, $\text{N}^{\alpha}\text{H}_{\text{Lys}}$, $J = 5.5$ Hz), 4.80 (m, 1 H, $\text{N}^{\epsilon}\text{H}$), 4.31 (m, 1 H, CH_{Ala}), 3.85 (m, 1 H, CH_{Lys}), 3.68 (s, 3 H, OCH_3), 3.18-3.08 (m, 1 H, $\epsilon\text{-CH}_2$), 3.03-2.82 (m, 1 H, $\epsilon\text{-CH}_2$), 1.65 (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2$), 1.46-1.25 (m, 3 H, CH_3), 1.44 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.17-1.06 (m, 4 H, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ :

172.84, 170.37, 156.74, 156.05, 150.05, 128.64, 124.22, 79.63, 56.33, 52.60, 49.31, 48.09, 38.98, 31.95, 29.01, 28.45, 24.90, 21.22, 17.90.

MS (MALDI) m/z :

538.8431 [(M+Na)⁺, 100%]

N^α-Nosil-O-tert-butil- L-tirosinil-L-valinaOMe (32b)

Resa: 82%.

p.f. = 64-66 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3394, 3213, 3119, 2963, 1749, 1637, 1535, 1351, 1261, 1093, 1024, 799.

¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

8.20 (d, 2 H, ArH, $J = 8.9$ Hz), 7.78 (d, 2 H, ArH, $J = 8.4$ Hz), 6.91 (d, 2 H, Ar_{Tyr}, $J = 8.5$ Hz), 6.71 (d, 2 H, Ar_{Tyr}, $J = 8.5$ Hz), 6.62 (d, 1 H, SO₂NH, $J = 8.2$ Hz), 6.05 (d, 1 H, NH, $J = 8.5$ Hz), 4.38 (dd, 1 H, CH_{Val}, $J = 8.5$ Hz, $J = 4.8$ Hz), 4.00 (m, 1H, CH_{Tyr}), 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 3.02 (dd, 1 H, CH₂, $J = 14.1$ Hz, $J = 8.3$ Hz), 2.88 (dd, 1 H, CH₂, $J = 14.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.08 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.30 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.81 (d, 6 H, CH(CH₃)₂, $J = 6.9$ Hz).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ :

171.67, 170.07, 154.87, 149.94, 145.27, 129.83, 129.70, 128.16, 124.33, 124.29, 58.70, 57.46, 52.35, 38.17, 33.83, 31.24, 28.74, 18.85, 17.70.

MS (MALDI) m/z :

557.9979 [(M+Na)⁺, 100%]

N ^{α} -Nosil-S-tritil-L-cisteinil-L-alaninaOMe (32c)

Resa: 87%.

p.f. = 138 -142 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

3332, 3274, 3059, 2932, 1731, 1663, 1536, 1347, 1261, 1164, 1089, 800, 698.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ :

8.18 (d, 2 H, ArH, $J = 8.8$ Hz), 7.92 (d, 2H, ArH, $J = 8.7$ Hz), 7.28 (m, 15H, ArH_{Trit}), 6.20 (d, 1 H, N ^{α} H_{Ala} $J = 7.2$ Hz), 5.70 (d, 1 H, N ^{α} H_{Cys}, $J = 7.5$ Hz), 4.32 (m, 1H, CH_{Ala}), 3.68 (s, 3 H, OCH₃), 3.14 (m, 1 H, CH_{Cys}), 2.60 (dd, 1 H, SCH₂, $J = 13.8$ Hz, $J = 5.4$ Hz), 2.48 (dd, SCH₂, 1 H, $J = 13.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz), 1.22 (d, 3 H, CH₃, $J = 7.2$ Hz).

MS (MALDI) m/z :

656.9899 [(M+Na)⁺, 100%]

N ^{α} -Nosil-N ^{β} -tritil-L-asparaginil-L-alaninaOMe (32d)

Resa: 95%.

p.f. = 138 -141 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

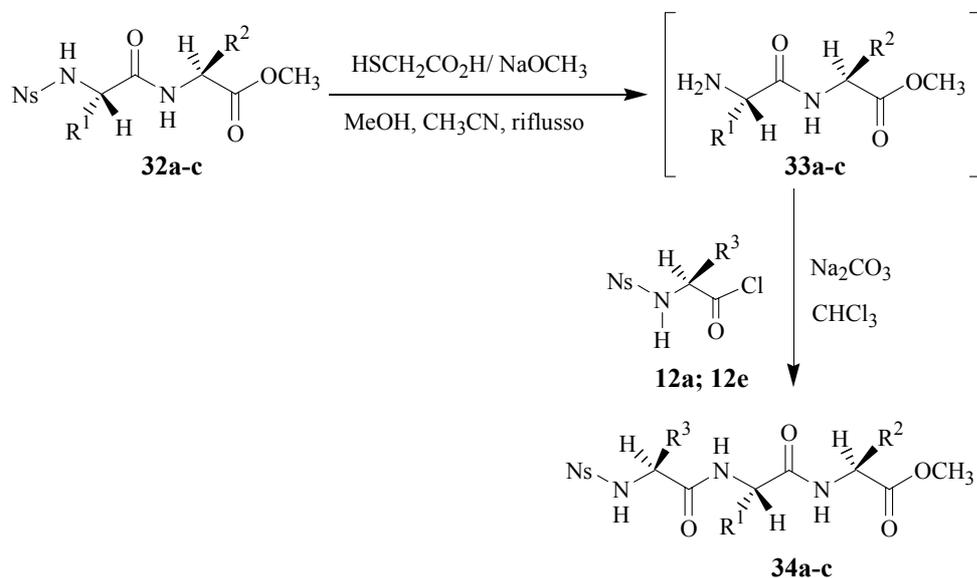
3325, 3062, 2932, 2849, 1742, 1666, 1625, 1531, 1348, 1165, 1089, 853, 700.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

8.15 (2 H, d, ArH, $J = 8.8$ Hz), 7.90 (2 H, d, ArH, $J = 8.9$ Hz), 7.10-7.28 (m, 15 H, Ar_{Trit}H), 6.53 (s, 1 H, N ^{β} H), 5.98 (s_{broad}, 1 H, SO₂NH), 5.56 (d, 1 H, NH_{Ala}, $J = 9.8$ Hz), 4.32 (m, 1 H, CH_{Ala}), 4.05 (m, 1 H, CH_{Asn}), 3.68 (s, 3 H, OCH₃), 3.09 (m, 1 H, CH₂), 2.84 (m, 1 H, CH₂), 1.25 (d, 3 H, CH₃, $J = 7.2$ Hz).

MS (MALDI) m/z :

652.7740 [(M+Na)⁺, 100%]

Sintesi degli *N*-nosil-tripeptidi 34a-b


Composto	R ¹	R ²	R ³	Resa (%)
34a	(CH ₂) ₄ NH-(Boc)	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	85
34b	CH ₂ C ₆ H ₄ O-(<i>t</i> -Bu)	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	75
34c	CH ₂ S-(Trt)	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	71

Procedura generale

In un pallone a due colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si pongono a reagire l'estere metilico dell'*N*-nosil-dipeptide appropriato **32a-c** (1 mmole), solubilizzato in acetonitrile anidro (10 ml), il metossido di sodio (16 mmoli), che viene solubilizzato aggiungendo una quantità variabile di metanolo anidro, ed infine l'acido mercaptoacetico (3 mmoli).

Si lascia la miscela di reazione a riflusso sotto agitazione magnetica per circa 1-2 ore, seguendo l'andamento della reazione mediante TLC (Et₂O/etere di petrolio 90:10, v/v).

Terminata la reazione, si elimina il solvente per distillazione a pressione ridotta, si acidifica con una soluzione acquosa di KHSO₄ al 5% fino a pH 3-4 e si estrae con acetato di etile (3 X 10 ml). La fase acquosa viene basificata con una soluzione acquosa satura di Na₂CO₃.

Successivamente la fase acquosa basica, contenente l'estere metilico del dipeptide deproteetto (**33a-b**), viene trattata con il cloruro dell'*N*-nosil- α -amminoacido opportuno **12a**, **12e** (1 mmole), solubilizzato in cloroformio privo di etanolo (5 ml). Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per circa 2 ore, controllando mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 98:2, v/v) la formazione del tripeptide.

Terminata la reazione si separano le due fasi e si estrae più volte la soluzione acquosa con cloroformio (3 X 10 ml). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa di acido citrico al 5%, successivamente con una soluzione acquosa satura di NaCl ed anidificate su solfato di sodio anidro. Si allontana il solvente in condizioni di pressione ridotta e si ottengono, sotto forma di solidi bianchi, gli *N*-nosil-tripeptidi **34a-c** con rese comprese tra il 71% e l'85%.

***N*-Nosil-*L*-valil-*N*^ε-*Boc*-*L*-lisinil-*L*-alaninaOMe (**34a**)**

Resa: 85%.

p. f. = 166-168 °C

IR (KBr) cm⁻¹:

3315, 3260, 3103, 2964, 2937, 1727, 1686, 1633, 1531, 1349, 1261, 1170, 1091, 798.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ :

8.31 (d, 2 H, ArH, $J = 7.5$ Hz), 8.08 (d, 2 H, ArH, $J = 7.8$ Hz), 7.28-7.15 (m, 2 H, NH_{Ala}, NH_{Lys}), 6.51 (m, 1 H, SO₂NH), 4.90 (m, 1 H, N^εH), 4.54-4.45 (m, 2 H, CH_{Ala}, CH_{Val}), 3.80-3.65 (m, 4 H, OCH₃, CH_{Lys}), 3.08 (m, 2 H, ϵ -CH₂), 2.18 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 1.65 (m, 2 H, β -CH₂), 1.45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.36 (d, 3 H, CH₃, $J = 6.7$ Hz), 1.10-1.27 (m, 4 H, γ -CH₂, δ -CH₂), 0.85 (m, 6H, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ :

173.00, 171.00, 170.47, 156.50, 149.23, 146.10, 128.57, 124.18, 62.21, 52.61, 48.22, 39.72, 32.05, 31.84, 29.71, 29.37, 28.45, 22.15, 19.17, 17.79, 17.66.

MS (MALDI) m/z :

637.9419 [(M+Na)⁺, 100%]

***N*-Nosil-*L*-isoleucil-*O*-*tert*-butil-*L*-tirosinil-*L*-valinaOMe (**34b**)**

Resa: 75%.

p. f. = 203-205 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3324, 3270, 3177, 2963, 1743, 1644, 1530, 1261, 1165, 1094, 1024, 800.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

8.31 (d, 2 H, ArH, $J = 8.6$ Hz), 8.04 (d, 2 H, ArH, $J = 8.6$ Hz), 7.08-6.90 (m, 5H, ArH_{Tyr}+SO₂NH), 6.50 (d, 1 H, NH_{Tyr}, $J = 8.4$ Hz), 6.18 (m, 1 H, NH_{Val}), 4.61 (m, 1 H, CH_{Leu}), 4.39 (m, 1 H, CH_{Tyr}), 3.88 (m, 1 H, CH_{Val}), 3.71 (s, 3 H, OCH₃), 2.85 (m, 2 H, CH_{2Tyr}), 2.05 (m, 2 H, CH_{2Ile}), 1.50-1.39 (m, 2 H, CH₂CH(CH₃)₂, CH(CH₃)₂), 1.32 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.87-0.70 (m, 12 H, CH₂CH(CH₃)₂, CH(CH₃)₂).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ :

171.58, 171.03, 170.59, 154.60, 150.07, 145.62, 129.69, 128.57, 124.47, 124.32, 57.63, 55.67, 54.56, 52.34, 42.34, 37.69, 30.97, 28.81, 24.35, 22.85, 21.19, 18.81, 17.89.

MS (MALDI) m/z :

670.9496 [(M+Na)⁺, 100%]

N-Nosil-L-valil-S-tritil-L-cisteinil-L-alaninaOMe (34c)

Resa: 71%.

p. f. = 180-182 °C

IR (KBr) cm^{-1} :

3338, 3261, 2963, 1733, 1643, 1529, 1350, 1265, 1087, 1030, 806, 697.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

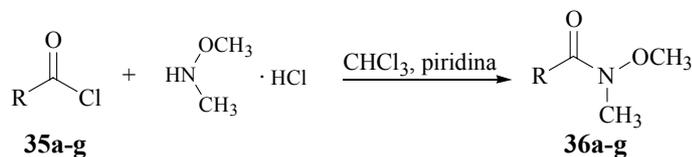
8.35 (d, 2 H, ArH, $J = 9.0$ Hz), 8.05 (d, 2 H, ArH, $J = 9.0$ Hz), 7.28 (m, 15 H, Ar_{Trit}H), 6.20 (d, 1 H, SO₂NH, $J = 7.2$ Hz), 5.70 (d, 1 H, NH_{Cys}, $J = 7.5$ Hz), 5.56 (d, 1 H, NH_{Ala}, $J = 9.8$ Hz), 4.32 (m, 1 H, CH_{Ala}), 3.95 (m, 1 H, CH_{Val}), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 3.14 (m, 1 H, CH_{Cys}), 2.58-2.70 (m, 2 H, CH₂), 2.11 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 1.22 (d, 3 H, CH₃, $J = 7.2$ Hz), 0.98 (d, 3 H, CH(CH₃)₂, $J = 6.8$ Hz), 0.88 (d, 3 H, CH(CH₃)₂, $J = 6.8$ Hz).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

171.84, 171.63, 171.17, 151.62, 145.83, 143.95, 128.41, 128.22, 127.23, 126.32, 124.07, 66.92, 61.96, 61.07, 51.92, 48.46, 31.47, 28.63, 18.85, 17.05, 13.88.

MS (MALDI) m/z :

755.8488 [(M+Na)⁺, 100%]

Sintesi delle *N*-metil-*N*-metossiammidi **36a-g**

Composto	R	Resa (%)
36a	C ₆ H ₅	99
36b	4-CH ₃ C ₆ H ₄	93
36c	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	91
36d	4-ClC ₆ H ₄	86
36e	4-NO ₂ C ₆ H ₄	84
36f	C ₆ H ₅ CH ₂	89
36g	CH ₃ (CH ₂) ₄	90

Procedura generale

In un pallone a due colli, in atmosfera inerte d'azoto, si solubilizza il cloridrato dell'*N,O*-dimetilidrossilammina (1,1 mmoli) in cloroformio anidro (15 ml); si aggiungono, poi, la piridina anidra (2,2 mmoli) ed il cloruro dell'acido carbossilico opportuno **35a-g** (1 mmole).

Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente, per 1-2 ore, controllando la scomparsa del cloruro dell'acido carbossilico mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 95:5, v/v).

Terminata la reazione si estrae la fase organica con una soluzione acquosa di HCl 1 N (2 X 7 ml); successivamente si effettuano ulteriori estrazioni con una soluzione acquosa di carbonato di sodio saturo (2 X 7 ml).

La fase organica viene anidrificata su solfato di sodio anidro; si allontana il solvente in condizioni di pressione ridotta e si recuperano le *N*-metil-*N*-metossiammidi **36a-g**, sotto forma di olio, con rese comprese tra l'84% e il 99%.

N-Metil-N-metossibenzammide (36a)

Resa: 99%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

7.63-7.60 (m, 2 H, ArH), 7.43-7.29 (m, 3 H, ArH), 3.51 (s, 3 H, OCH₃), 3.32 (s, 3 H, NCH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ:

169.90, 134.08, 130.56, 128.09, 128.01, 61.02, 33.76.

GC-MS (EI) *m/z*:

165 (M⁺, 3%), 105 (100), 77 (41), 51 (10).

N-Metil-N-metossi-4-metilbenzammide (36b)

Resa: 93%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

7.57-7.54 (m, 2 H, ArH), 7.24-7.19 (m, 2 H, ArH), 3.54 (s, 3 H, OCH₃), 3.36 (s, 3 H, NCH₃), 2.39 (s, 3 H, Ar-CH₃).

GC-MS (EI) *m/z*:

179 (M⁺, 5%), 119 (100), 91 (100), 65 (39).

N-Metil-N-metossi-4-metossibenzammide (36c)

Resa: 91%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

7.74-7.68 (m, 2 H, ArH), 6.92-6.84 (m, 2 H, ArH), 3.80 (s, 3 H, ArOCH₃), 3.53 (s, 3 H, NOCH₃), 3.33 (s, 3 H, NCH₃).

GC-MS (EI) *m/z*:

195 (M⁺, 1%), 149 (1), 135 (100), 107 (7), 92 (9), 77 (14).

N-Metil-N-metossi-4-clorobenzammide (36d)

Resa: 86%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

7.68-7.59 (m, 2 H, ArH), 7.38-7.30 (m, 2 H, ArH), 3.50 (s, 3 H, OCH_3), 3.32 (s, 3 H, NCH_3).

GC-MS (EI) m/z :

199 (M^+ , 3%), 141 (32), 139 (100), 111 (30), 75 (14).

***N*-Metil-*N*-metossi-4-nitrobenzammide (36e)**

Resa: 84%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

8.27 (d, 2 H, ArH, $J = 9.0$ Hz), 7.84 (d, 2 H, ArH, $J = 9.0$ Hz), 3.54 (s, 3 H, OCH_3), 3.39 (s, 3 H, NCH_3).

GC-MS (EI) m/z :

210 (M^+ , 3 %), 179 (1), 150 (100), 120 (9), 104 (34), 92 (13), 76 (18).

***N*-Metil-*N*-metossi-2-feniletanammide (36f)**

Resa: 89%.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

7.45-7.20 (m, 5 H, ArH), 3.80 (s, 2 H, CH_2), 3.61 (s, 3 H, OCH_3), 3.20 (s, 3 H, NCH_3).

GC-MS (EI) m/z :

179 (M^+ , 11%), 148 (3), 119 (14), 118 (64), 91 (100), 61 (9).

***N*-Metil-*N*-metossi-1-esanammide (36g)**

Resa: 90%.

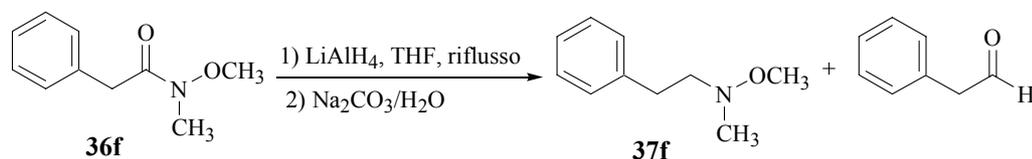
^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

3.70 (s, 3 H, OCH_3), 3.19 (s, 3 H, NCH_3), 2.40 (t, 2 H, CH_2CO , $J = 7.6$ Hz), 1.68-1.56 (m, 2 H, H-3), 1.37-1.23 (m, 4 H, H-4, H-5), 0.89 (t, 3 H, CH_3 , $J = 6.9$ Hz).

GC-MS (EI) m/z :

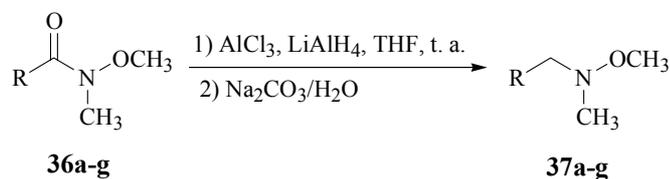
159 (M^+ , 2%), 144 (1), 130 (4), 99 (99), 71 (68), 61 (80), 55 (18), 43 (100).

Riduzione dell'*N*-metil-*N*-metossi-2-feniletanammide (**36f**) con litio alluminio idruro



Procedura

In un pallone a tre colli, munito di refrigerante ed in atmosfera inerte d'azoto, si aggiunge lentamente, mediante un imbuto gocciolatore, una soluzione dell'*N*-metil-*N*-metossi-2-fenilacetammide (**36f**) (1 mmole) in tetraidrofurano anidro (10 ml), ad una sospensione di litio alluminio idruro (1 mmole) in etere etilico anidro (20 ml), a temperatura ambiente. La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica costante, a temperatura ambiente per circa due ore e per altre 12 ore alla temperatura di riflusso, controllando la scomparsa dell'*N*-metil-*N*-metossi-2-fenilacetammide (**36f**) mediante TLC (EtO₂/etere di petrolio 80:20, v/v). Successivamente si elimina l'eccesso di LiAlH₄ con l'aggiunta di una soluzione acquosa satura di Na₂CO₃ (5 ml) e si estrae più volte la fase acquosa con etere etilico (3 X 5 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl (10 ml) ed anidificate su solfato di sodio anidro; si allontana il solvente in condizioni di pressione ridotta e si purifica il grezzo di reazione, mediante cromatografia su colonna corta (EtO₂/etere di petrolio 80:20, v/v). Si ottengono l'*N*-metil-*N*-metossi-2-feniletanamina (**37f**) e la 2-fenilacetaldeide con rese del 62% e del 12%, rispettivamente.

Sintesi delle *N*-metil-*N*-metossiammine 37a-g

Composto	R	Resa (%)
37a	C ₆ H ₅	85
37b	4-CH ₃ C ₆ H ₄	84
37c	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	100
37d	4-ClC ₆ H ₄	97
37e	4-NO ₂ C ₆ H ₄	95
37f	C ₆ H ₅ CH ₂	84
37g	CH ₃ (CH ₂) ₄	84

^a L'*N*-metil-*N*-metossi-1-esanammina (**37g**) è stata isolata come cloridrato

Procedura generale

In un pallone a due colli, in atmosfera inerte d'azoto, si aggiunge l'AlCl₃ (2 mmoli) ad una soluzione dell'appropriata l'*N*-metil-*N*-metossiammide **36a-g** (1 mmole) in THF anidro (10 ml); si aggiunge il LiAlH₄ (1 mmole) e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per circa 10 minuti, controllando la scomparsa dell'*N*-metil-*N*-metossiammide mediante TLC (EtO₂/etere di petrolio 80:20, v/v) o GC-MS.

Terminata la reazione si elimina l'eccesso di LiAlH₄ con l'aggiunta di una soluzione acquosa satura di Na₂CO₃ (5 ml). Si estrae più volte la fase acquosa con etere etilico (3 X 5 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl (10 ml) ed anidificate su solfato di sodio anidro; successivamente, si allontana il solvente in condizioni di pressione ridotta e si ottengono l'*N*-metil-*N*-metossiammine corrispondenti **37a-f** con rese comprese tra l'84% e il 100%, sotto forma di olio.

L'*N*-metil-*N*-metossi-1-esanammina (**37g**) è stata isolata sotto forma del corrispondente cloridrato: a tale scopo si fa gorgogliare acido cloridrico gassoso (preparato aggiungendo lentamente acido solforico concentrato al cloruro di sodio) attraverso la soluzione eterea contenente l'ammina **37g**; successivamente si allontana il solvente in condizioni di

pressione ridotta e si anidrifica il residuo su P₂O₅ in un essiccatore sotto vuoto. Si ottiene il cloridrato dell'*N*-metil-*N*-metossi-1-esanammina con una resa dell'84%, sotto forma di un solido giallo.

***N*-Metil-*N*-metossibenzilammina (37a)**

Resa: 85%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

7.71-7.59 (m, 2 H, ArH), 7.48-7.25 (m, 3 H, ArH), 3.79 (s, 2 H, CH₂), 3.40 (s, 3 H, OCH₃), 2.62 (s, 3 H, NCH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ:

129.5, 128.6, 128.2, 127.3, 62.7, 59.9, 44.9.

GC-MS (EI) *m/z*:

151 (M⁺, 22 %), 136 (1), 91 (100), 77 (3), 65 (7), 51 (3).

***N*-Metil-*N*-metossi-4-metilbenzilammina (37b)**

Resa: 84%

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

7.30-7.10 (m, 4 H, ArH), 3.75 (s, 2 H, CH₂), 3.40 (s, 3 H, OCH₃), 2.60 (s, 3 H, NCH₃), 2.35 (s, 3 H, Ar-CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ:

136.8, 134.4, 129.4, 128.9, 64.4, 59.9, 44.8, 21.2.

GC-MS (EI) *m/z*:

165 (M⁺, 12%), 132 (16), 105 (100), 91 (7), 77 (9).

***N*-Metil-*N*-metossi-4-metossibenzilammina (37c)**

Resa: 100%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

7.30-7.20 (m, 2 H, ArH), 6.90-6.80 (m, 2 H, ArH), 3.80 (s, 3 H, ArOCH₃), 3.70 (s, 2 H, CH₂), 3.40 (s, 3 H, NOCH₃), 2.60 (s, 3 H, NCH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ:

158.9, 130.7, 128.6, 113.8, 64.0, 60.0, 55.2, 45.0.

GC-MS (EI) *m/z*:

181 (M⁺, 3%), 121 (100), 91 (3).

N-Metil-N-metossi-4-clorobenzilamina (37d)

Resa: 97%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

7.35-7.20 (m, 4H, ArH), 3.71 (s, 2 H, CH₂), 3.35 (s, 3 H, OCH₃), 2.60 (s, 3 H, NCH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ:

136.1, 133.0, 130.8, 128.3, 63.9, 60.0, 44.9.

GC-MS (EI) *m/z*:

185 (M⁺, 15), 127 (32), 125 (100), 99 (3), 89 (9).

N-Metil-N-metossi-4-nitrobenzilamina (37e)

Resa: 95%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

8.22-8.11 (m, 2 H, ArH), 7.60-7.50 (m, 2 H, ArH), 3.84 (s, 3 H, CH₂), 3.31 (s, 3 H, OCH₃), 2.65 (s, 3 H, NCH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ:

147.1, 145.5, 130.0, 123.4, 63.9, 60.0, 45.1.

GC-MS (EI) *m/z*:

196 (M⁺, 92 %), 181 (32), 136 (100), 106 (49), 90 (39), 89 (42), 78 (38).

N-Metil-N-metossi-2-feniletanamina (37f)

Resa: 84%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

7.40-7.15 (m, 5 H, ArH), 3.58 (s, 3 H, OCH₃), 2.95-2.80 (m, 4 H, CH₂CH₂), 2.61 (s, 3 H, NCH₃)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ:

140.1, 128.6, 128.5, 126.1, 62.5, 60.2, 45.3, 33.9.

GC-MS (EI) *m/z*:

165 (M⁺, 1%), 105 (2), 91 (15), 74 (100), 65 (6).

Cloridrato dell'N-metil-N-metossi-1-esanamina

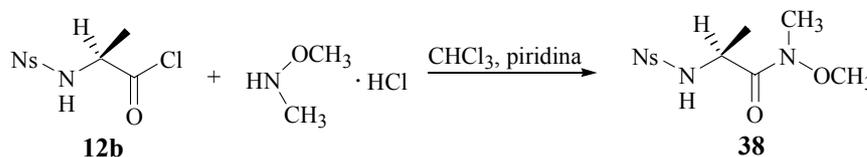
Resa: 84%.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ:

3.78 (s, 3 H, OCH₃), 3.40-3.24 (m, 2 H, H-1), 3.05 (s, 3 H, NCH₃), 1.51-1.69 (m, 2 H, H-2), 1.11-1.30 (m, 6 H, H-3, H-4, H-5), 0.71 (t, 3 H, *J* = 7.0, CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, D₂O) δ:

59.4, 58.0, 41.3, 30.2, 25.0, 22.5, 21.5, 13.1.

Sintesi dell'*N*-metil-*N*-metossiammide **38**Procedura

In un pallone a due colli, in atmosfera inerte d'azoto, si solubilizza il cloridrato dell'*N,O*-dimetilidrossilammina (1,1 mmoli) in diclorometano anidro (20 ml); si aggiungono, poi, la piridina anidra (2,2 mmoli) ed il cloruro dell'*N*-nosil-L-alanina (**12b**, 1 mmole).

Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente, per 1 ora, controllando, mediante TLC ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 90:10, v/v), la scomparsa del cloruro dell'*N*-nosil-L-alanina.

Terminata la reazione si estrae la fase organica con una soluzione acquosa di HCl 1 N (2 X 10 ml); successivamente si effettuano ulteriori estrazioni con una soluzione acquosa di carbonato di sodio saturo (2 X 10 ml).

La fase organica viene anidrificata su solfato di sodio anidro; successivamente si allontana il solvente in condizioni di pressione ridotta e si recupera l'*N*-metil-*N*-metossiammide **38** sotto forma di un olio, con una resa dell'80 % .

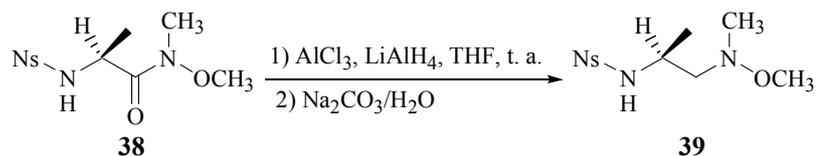
¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

8.45-8.30 (m, 2 H, ArH), 8.15-8.00 (m, 2 H, ArH), 5.90 (d, 1 H, NH, $J = 9.3$ Hz), 4.56-4.40 (m, 1 H, CH), 3.69 (s, 3 H, OCH₃), 3.04 (s, 3 H, NCH₃), 1.35 (d, 3 H, CHCH₃, $J = 6.9$ Hz).

GC-MS (EI) m/z :

317 (M^+ , 1%), 302 (1), 229 (100), 186 (50), 122 (50), 106 (5), 92 (10), 76 (18), 61 (60).

Riduzione dell'*N*-metil-*N*-metossiammide **38 con il sistema reagente
AlCl₃/LiAlH₄**



Procedura

In un pallone a due colli, in atmosfera inerte d'azoto, si aggiunge l'AlCl₃ (4 mmoli) ad una soluzione dell'*N*-metil-*N*-metossiammide **38** (1 mmole) in THF anidro (15 ml); si aggiunge il LiAlH₄ (2 mmoli) e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per circa 20 minuti, controllando la scomparsa dell'*N*-metil-*N*-metossiammide mediante TLC (CHCl₃/CH₃OH 90:10, v/v).

Terminata la reazione si elimina l'eccesso di LiAlH₄ con l'aggiunta di una soluzione acquosa di Na₂CO₃ saturo (5 ml). Si estrae più volte la fase acquosa con etere etilico (3 X 10 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione acquosa saturo di NaCl (10 ml) ed anidificate su solfato di sodio anidro; successivamente, si allontana il solvente in condizioni di pressione ridotta e si ottiene *N*-[2-(metilmetossiammino)-1-metiletil]-4-nitro-benzenesulfonamide (**39**) con una resa del 98%, sotto forma di olio.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ:

8.42-8.31 (m, 2 H, ArH), 8.19-8.06 (m, 2 H, ArH), 5.75 (d, 1 H, NH, *J* = 4.5 Hz), 3.63-3.41 (m, 2 H, CH₂), 3.30 (s, 3 H, OCH₃), 2.57-2.52 (m, 1 H, CHCH₃), 2.49 (s, 3 H, NCH₃), 1.16 (d, 3 H, CHCH₃, *J* = 6.6 Hz).

GC-MS (EI) *m/z*:

229 (1), 186 (2), 122 (4), 92 (1), 74 (100).

BIBLIOGRAFIA

1. Lenz, G. R. In *Encyclopedia of chemical technology*; Kirk-Othmer, Ed.; John Wiley & Sons: New York; p 645-729.
2. Mann, J. *Secondary Metabolism*; second ed.; Clarendon Press: Oxford, **1987**.
3. Torrsell, K. B. G. In *Natural Product Chemistry*; second ed.; Apotekarsocieteten, Ed.; Kristianstads Boktryckeri: Stockholm, **1997**; p 292-312.
4. *Definitive Rules for Nomenclature of Steroids*; *Pure Appl. Chem.* **1972**, *31*, 85.
5. Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 886.
6. Mehta, G.; Singh, V. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 324.
7. Tietze, L. F.; Bell, H. P.; Chandrasekhar, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3996.
8. Salunke, D. B.; Hazra, B. G.; Pore, V. S. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 813.
9. Tamminen, J.; Kolehmainen, E. *Molecules* **2001**, *6*, 21.
10. Duax, W. L.; Smith, G. D.; Swenson, D. C.; Strong, P. D.; Weeks, C. M.; Ananchenko, S. N.; Egorova, V. V. *J. Steroid Biochem.* **1981**, *14*, 1.
11. Wölfling, J.; Mernyák, E.; Frank, É.; Falkay, G.; Márki, Á.; Minorics, R.; Schneider, Gy. *Steroids* **2003**, *68*, 277.
12. Zakharova, N. A.; Sholina, S. I.; Kruglyakova, K. E.; Karpukhin, O. N.; Ananchenko, S. N.; Limanov, V. E.; Torgov, I. V.; Émanuél, N. M. *Russ. Chem. Bull.* **1966**, *15*, 429.
13. Schwartz, A. G.; Lewbart, M. L. United States Patent 5028631, **1991**
14. Abdel-Aziz M. T.; Williams K. I. H. *Steroids* **1969**, *13*, 809.
15. Verhoeven C. H. J.; Krebbers S. F.; Wagenaars G. N.; Vos R. M. E. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, *26*, 927.
16. Abdel Aziz, M. T.; Williams, K. I. H. *Steroids* **1970**, *15*, 695.
17. Carson, S. L. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1993**, *168*, 1017.
18. Schmid, S. E.; Au, W. Y. W.; Hill, D. E.; Kadlubar, F. F.; Slikker, W. Jr. *Drug. Metab. Dispos.* **1983**, *11*, 531.
19. Kent, U. M.; Mills, D. E.; Rajendram, V.; Rajnarayanan, R. V.; Alworth, W. L.; Hollenberg P. F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *300*, 549.
20. Dekker, D. *Pharm Weekbl [Sci]* **1980**, *2*, 59.
21. Beijnen, J. H.; Dekker, D. *Pharm Weekbl [Sci]* **1984**, *6*, 1.
22. Beijnen, J. H.; Dekker, D. *Acta Pharm Suec* **1981**, *18*, 185.
23. Lee, K. R.; Kozukue, N.; Han, J. S.; Park, J. H.; Chang, E. Y.; Baek, E. J.; Chang, J. S.; Friedman, M. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2832.
24. Glendinning, J. I. *Science* **1993**, *259*, 582.

25. Atta-ur-Rahman; Ali, R. A.; Ashraf, M.; Choudhary, M. I.; Sener, B.; Turkoz, S. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 907.
26. Shakirov, R. *Chem. Nat. Compd.* **1997**, *33*, 479.
27. Shakirova, U. T.; Shakirov, R. *Chem. Nat. Compd.* **2001**, *37*, 474.
28. Akhtar, M. N.; Atta-ur-Rahman; Choudhary, M. I.; Sener, B.; Erdogan, I.; Tsuda, Y. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 115.
29. Jiang, Y.; Li, P.; Li, H.-J.; Yu, H. *Steroids* **2006**, *71*, 843.
30. Endo, H.; Warashina, T.; Noro, T.; Castro, V. H.; Mora, G. A.; Poveda, L. J.; Sanchez, P. E. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1536.
31. Teruya, T.; Nakagawa, S.; Koyama, T.; Suenaga, K.; Kita, M.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5171.
32. Teruya, T.; Nakagawa, S.; Koyama, T.; Arimoto, H.; Kita, M.; Uemura, D. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6989.
33. Wölfling, J.; *Arkivoc* **2007**, (v), 210.
34. Smith, P. A. S.; Baer, D. R. *Org. React.* **1960**, *11*, 157.
35. Blicke, F. F.; Azuara, J.; Dorrenbos, N. J.; Hotelling, E. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5418.
36. Goldberg, M. N.; Monnier, R., *Helv. Chim. Acta* **1940**, *23*, 376.
37. Kirk, D. N.; Klyne, W.; Peach, C. M.; Wilson, M. A. *J. Chem. SOC. (C)* **1970**, 1454.
38. Kirk, D. N.; Wilson, M. A. *J. Chem. SOC. (C)* **1971**, 414.
39. Pellicciari, R.; Natalini, B.; Fringuelli, R. *Steroids* **1987**, *49*, 433.
40. Ruzicka, L.; Meldahi, H. F. *Helv. Chim. Acta* **1938**, *21*, 1760.
41. Kirk, D. N.; Hartshorn, M. P. *Steroid Reaction Mechanisms*; Elsevier: Amsterdam, **1968**; p 294-301.
42. Wendler, N. L. *Molecular Rearrangements*; In: de Mayo P, Ed.; Interscience: New York, **1964**; 2 p 1099-1101 e 1114-1121.
43. Kirk, D. N.; McHugh, C. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1978**, 173.
44. Schor, L.; Seldes, A. M.; Gros, E. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1990**, 163.
45. Schor, L.; Seldes, A. M.; Gros, E. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1992**, 453.
46. Bischofberger, N.; Walker, K. A. M. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3604.
47. Delaney, E. J.; Sherrill, R. G.; Palaniswamy, V.; Sedergran, T. C.; Taylor, S. P. *Steroids* **1994**, *59*, 196.
48. Smith, L. L.; Marx, M.; Garbarini, J. J.; Foell, T.; Origoni, V. E.; Goodmann, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4616.
49. Girdhar, N. K.; Ishar, M. P. S.; Kumar, R.; Singh, R.; Singh, G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7199.

50. Bratoeff, E.; Herrera, H.; Ramírez, E.; Solórzano, K.; Murillo, E.; Quiroz, A.; Cabeza, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1249.
51. Cabeza, M.; Heuze, I.; Bratoeff, E.; Ramírez, E.; Martínez, R. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 525.
52. Soriano-García, M.; Hernández-Ortega, S.; Bratoeff, E.; Valencia, N.; Ramírez, E.; Flores, G. *J. Chem. Crystallogr.* **1998**, *28*, 487.
53. Bruchowsky, N.; Wilson, J. D. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 2012.
54. Broods, R.; Herman, C.; Nguyen, C. *Prostate* **1991**, *18*, 215.
55. Imperato-McGinley, J.; Guerrero, L.; Gautier, T.; Petersen, R. E. *Science* **1974**, *186*, 1213.
56. Mallamo, J.; Pilling, G.; Wetzel J. *J. Med. Chem.* **1991**, *35*, 1663.
57. Wingo, P. A.; Tong, T.; Baleden S. *J. Clin.* **1960**, *45*, 8.
58. Chen, C.; Li, X.; Singh, S. M.; Latrue, F. *J. Invest. Dermatol.* **1998**, *111*, 273.
59. Nicoletti, D.; Ghini, A. A.; Burton, G. *An. Asoc. Quim. Argent.*, **1998**, *86*, 336.
60. Nicoletti, D.; Ghini, A. A.; Baggio, R. F.; Garland, M. T.; Burton, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 1511.
61. Herzog, H.; Oliveto, E. P. *Steroids* **1992**, *57*, 617.
62. Hogg, J. A. *Steroids* **1992**, *57*, 593.
63. Hirschmann, R. *Steroids* **1992**, *57*, 579.
64. Andrews, D. R.; Giusto, R. A.; Sudhakar, A. R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3417.
65. Fu, X.; Tann, C. H.; Thiruvengadam, T. K.; Lee, J.; Colon, C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2639.
66. Fu, X.; Chan, T.-M.; Tann, C.-H.; Thiruvengadam, T. K. *Steroids* **2002**, *67*, 549.
67. Litvinovskaya, R. P.; Drach, S. V.; Khripach, V. A. *Russ. J. Org. Chem.* **2000**, *36*, 599.
68. Ferrara, A.; Burton, G. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 929.
69. Ferrara, A.; Benedetti, M. O. V.; Ghini, A. A.; Burton, G. *J. Chem. Res. (S)* **1993**, 276.
70. Di Chenna, P. H.; Ghini, A. A.; Burton, G. *Molecules* **2000**, *5*, 447.
71. Corey, E. J.; Chaykovsky, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1353.
72. Steinberg, N. G.; Rasmusson, G. H.; Reamer, R. A. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2294.
73. Holton, T. L.; Shecheter, H. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4725.
74. Di Chenna, P. H.; Ferrara, A.; Ghini, A. A.; Burton, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 227.
75. Schneider, Gy.; Vincze, I.; Hackler, L.; Dombi, Gy. *Synthesis* **1983**, 665.
76. Schneider, Gy.; Vincze, I.; Hackler, L.; Szabó, J. A.; Dombi, Gy. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1982**, *110*, 429.
77. Schneider, Gy.; Bottka, S.; Hackler, L.; Wölfling, J.; Sohár, P. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 263.

78. Tietze, L. F.; Schneider, Gy.; Wölfling, J.; Fecher, A.; Nöbel, T.; Petersen, S.; Schuberth, I.; Wulff, C. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3755.
79. Frank, É.; Mernyák, E.; Wölfling, J.; Schneider, Gy. *Synlett* **2002**, 419.
80. Wölfling, J.; Frank, É.; Mernyák, E.; Bunkóczi, G.; Cuesta Seijo, J. A.; Schneider, Gy. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6851.
81. Yaremenko, F. G.; Khvat, A. V. *Mendeleev Commun.* **1994**, 187.
82. Schönecker, B.; Lange, C.; Kötteritzsch, M.; Günther, W.; Weston, J.; Anders, E.; Görls, H. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5487.
83. Takaki, K.; Ohsugi, M.; Okada, M.; Yasumura, M.; Negoro, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1984**, *1*, 741.
84. Wölfling, J.; Frank, É.; Schneider, G.; Tietze, L. F. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3013.
85. Wölfling, J.; Frank, É.; Schneider, Gy.; Bes, M. T.; Tietze, L. F. *Synlett* **1998**, 1205.
86. Frank, É. *Magy. Kém. Folyóirat* **2002**, *108*, 39.
87. Noltemeyer, N.; Tietze, L. F.; Wölfling, J.; Frank, É.; Schneider, Gy. *Acta Cryst.* **1996**, *C52*, 2258.
88. Mernyák, E.; Schneider, Gy.; Herbst-Irmer, R.; Kubas, M.; Wölfling, J. *Steroids* **2006**, *71*, 558.
89. Magyar, A.; Wölfling, J.; Schneider, G. *Monatshefte Chem* **2003**, *134*, 1387.
90. Magyar, A.; Wölfling, J.; Kubas, M.; Cuesta Seijo, J. A.; Sevvana, M.; Herbst-Irmer, R.; Forgó, P.; Schneider, Gy. *Steroids* **2004**, *69*, 301.
91. Penov-Gaši, K.; Miljković, D.; Medić-Mijačević, L.; Đurendić, E.; Petrović, J.; Pejanović, V.; Stanković, S.; Lazar, D. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9759.
92. Penov Gaši, K. M.; Miljković, D. A.; Medić Mijačević, Lj. D.; Djurendić, E. A.; Stojanović, S. Z.; Sakač, M. N.; Djurendić, M. D.; Stanković, S. M.; Lazar, D.; Andrić, S.; Kovačević, R. *Steroids* **2003**, *68*, 667.
93. Penov Gaši, K.; Stanković, S.; Csanadi, J.; Đurendić, E.; Sakač, M.; Medić-Mijačević, L.; et al. *Steroids* **2001**, *66*, 645.
94. Miljković, D. A.; Penov Gaši, K.; Djurendić, E. A.; Sakač, M.; Medić-Mijačević, Lj.; Pejanović, V.; et al. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4683.
95. Penov Gaši, K.; Stanković, S.; Medić Mijačević, Lj.; Molnar Gabor, D.; Pejanović, V.; Sakač, M. *Acta Period. Technol.* **2001**, *32*, 139.
96. Nazarov, I. N.; Torgov, I. V.; Verkholetova, G. N. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **1957**, *112*, 1067.
97. Ananchenko, S. N.; Limanov, V. Y.; Leonov, V. N.; Rzhaznikov, V. N.; Torgov, I. V. *Tetrahedron* **1962**, *18*, 1355.
98. Djuric, S.; Sarkar, T.; Magnus, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6885.
99. Sarabèr, F. C. E.; de Groot, A. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 9431.
100. Sarabèr, F. C. E.; Dratch, S.; Baranovsky, A.; Charnikhova, T.; Pogrebnoi, S.; Jansen, B. J. M.; de Groot, A. *Polish J. Chem.* **2006**, *80*, 535.

101. Dratch, S.; Charnikhova, T.; Sarabèr, F. C. E.; Jansen, B. J. M.; de Groot, A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4287
102. Sarabèr, F. C. E.; Baranovsky, A.; Jansen, B. J. M.; Posthumus, M. A.; de Groot, A. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1726.
103. Douglas, G. H.; Graves, J. M. H.; Hartley, D.; Hughes, G. A.; McLoughlin, B. J.; Siddall, J.; Smith, H. J. *Chem. Soc.* **1963**, 5072.
104. Daniewski, A. R.; Kowalczyk-Przewloka, T. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2976.
105. Sobolev, A.; Vos, M.; Zuilhof, H. T.; Sarabèr, F. C. E.; Jansen, B. J. M.; de Groot, A. *Arkivoc* **2005**, (xiv), 29.
106. Claeys, S.; Van Haver, D.; De Clercq, P. J.; Milanese, M.; Viterbo, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1051.
107. Van Royen, L. A.; Mijngheer, R.; De Clercq, P. J. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 4667.
108. Missiaen, P.; De Clercq, P. J. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1990**, *99*, 271.
109. Kappe, C. O.; Murphree, S. S.; Padwa, A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14179.
110. Brickwood, A. C.; Drew, M. G.; Harwood, L. M.; Ishikawa, T.; Marais, P.; Morisson, V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1999**, 913.
111. Toro, A.; Wang, Y.; Drouin, M.; Deslongchamps, P. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2769.
112. Van Royen, L. A.; Mijngheer, R.; De Clercq, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 3145.
113. Dane, E.; Höss, O.; Bindseil, A. W.; Schmitt, J. *Liebigs Ann. Chem.* **1937**, *532*, 39.
114. Symmes, C. Jr.; Quin, L. D. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1048.
115. Essers, M.; Haufe, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, 2719.
116. Tietze, L. F.; Nöbel, T.; Spescha, M. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2385.
117. Tietze, L. F.; Nöbel, T.; Spescha, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8971.
118. Tietze, L. F.; Nöbel, T.; Spescha, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 259.
119. Tietze, L. F.; Ferraccioli, R. *Synlett* **1998**, 145.
120. Tietze, L. F.; Utecht, J. *Synthesis* **1993**, 957.
121. Wieland, P.; Miescher, K. *Helv. Chim. Acta* **1950**, *33*, 2215.
122. Tietze, L. F.; Subba Rao, P. S. V. *Synlett* **1993**, 291.
123. Ramachandran, S.; Newman, M. S. *Org. Synth.* **1961**, *41*, 38.
124. Mandai, T.; Matsumoto, T.; Tsuji, J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2513.
125. Mandai, T.; Matsumoto, T.; Kawada, M.; Tsuji, J. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 5483.
126. Tsuji, J.; Mandai, T. *Synthesis* **1996**, 1.

127. Uenishi, J.; Kawahama, R.; Yonemitsu, O.; Tsuji, J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5716.
128. Uenishi, J.; Kawahama, R.; Yonemitsu, O.; Wada, A.; Ito, M. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 334.
129. Uenishi, J.; Kawahama, R.; Yonemitsu, O.; Wada, A.; Ito, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 320.
130. Corey, E. J.; Fuchs, P. L. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 3769.
131. Tietze, L. F.; Petersen, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1827.
132. Zoretic, P. A.; Chen, Z.; Zhang, Y. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7909.
133. Arapakos, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 6794.
134. Ye, T.; McKervey, M. A. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1091.
135. Sewald, N. *Amino Acids* **1996**, *11*, 397.
136. Cole, D. C. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9517.
137. Ojima I.; Delalogue, F. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 377.
138. Nomoto, S.; Teshima, T.; Wakamiya, T.; Shiba, T. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 921.
139. Lelais, G.; Seebach, D. *Biopolymers* **2004**, *76*, 206.
140. Yang, L.; Weber, A. E.; Greenlee, W. J.; Patchett, A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7035.
141. Rane, D. F.; Girijavallabhan, V. M.; Ganguly, A. K.; Pike, R. E.; Saksena, A. K.; McPhail, A. T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3201.
142. Berks, A. H. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 331.
143. Onuki, H.; Tachibana, K.; Fusetani, N. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5609.
144. Bewley, C. A.; Faulkner, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2162.
145. Jefferson, E. A.; Swayze, E. E. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7757.
146. Tanner, D.; Somfai, P. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 613.
147. Shinagawa, S.; Kanamaru, T.; Harada, S.; Asai, M.; Okazaki, H. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1458.
148. Kanamaru, T.; Shinagawa, S.; Asai, M.; Okazaki, H.; Sugijama, Y.; Fujita, T.; Iwatsuka, H.; Yoneda, M. *Life Sci* **1985**, *37*, 217.
149. Cardillo, G.; Tomasini, C. *Chem. Soc. Rev.* **1996**, *25*, 117.
150. Windholz, M.; Budavari, S.; Stroumstos, L. Y.; Fertig, M. N., Eds. *The Merk Index, An Encyclopedia of Chemical and Drug*, 9th ed., Merk, Rahway, NJ, **1976**, p. 909.
151. Thompson, C. F. *ChemTracts-Org. Chem.* **2003**, *16*, 505.
152. Hintermann, T.; Seebach, D. *Synlett* **1997**, 437.
153. Seebach, D.; Gademann, K.; Schreiber, J. V.; Matthews, J. L.; Hintermann, T.; Juan, B.; Oberer, L.; Hommer, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2033.

154. Chen, H. G.; Tustin, J. M.; Wuts, P. G. M.; Sawyer, T. K.; Smith, C. W. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1995**, *45*, 1.
155. Benaglia, M.; Cinquini, M.; Cozzi, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 563.
156. Stephens, O. M.; Kim, S.; Welch, B. D.; Hodson, M. E.; Kay, M. S.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13126.
157. Schmitt, M. A.; Choy, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13130.
158. Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173.
159. Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J. *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1111.
160. Fernández-Santin, J. M.; Muñoz-Guerra, S.; Rodríguez-Galan, A.; Aymami, J.; Lloveras, J.; Subirana, J. A.; Giralt, E.; Ptak, M. *Macromolecules* **1987**, *20*, 62.
161. Fernández-Santin, J. M.; Aymami, J.; Rodríguez-Galan, A.; Muñoz-Guerra, S.; Subirana, J. A. *Nature* **1984**, *311*, 53.
162. Iverson, B. L. *Nature* **1997**, *385*, 113.
163. Koert, U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1836.
164. Seebach, D.; Matthews, J. L. *Chem. Commun.* **1997**, 2015.
165. Gademann, K.; Hintermann, T.; Schreiber, J. V. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 905.
166. Woll, M. G.; Fisk, J. D.; LePlae, P. R.; Gellmann, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12447.
167. Glattli, A.; Daura, X.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12972.
168. Cheng, R. P.; Gellmann, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem Rev.* **2001**, *101*, 3219.
169. Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Powell, D. R.; Huang, S.; Barchi, J. J.; Gellmann, S. H. *Nature* **1997**, *387*, 381.
170. Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellmann, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071.
171. Abele, S.; Seiler, P.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1559.
172. Drey, C. N. C. In *The Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*; Barrett, G. C., Ed.; Chapman and Hall: London, **1985**; Chapter 3.
173. Spatola, A. F. In *Chemistry and Biochemistry of The Amino acids, Peptides and Proteins*; Weinstein, B., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1983**; Vol. 7, p 331-333.
174. Griffith, O. W. *Ann. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 855.
175. Iizuka, K.; Kamijo, T.; Harada, H.; Akahane, K.; Kubota, T.; Umeyama, H.; Kiso, Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1678.
176. Seebach, D.; Abele, S.; Schreiber, J. V.; Martinoni, B.; Nussbaum, A. K.; Schild, H.; Schulz, H.; Hennecke, H.; Woessner, R.; Bitsch, F. *Chimia* **1998**, *52*, 734.
177. Werder, M.; Hauser, H.; Abele, A.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1774.
178. Huang, L.; Lee, A.; Ellman, J. A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 676.

179. Franckenpohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V.; Seebach, D. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 445.
180. Hintermann, T.; Seebach, D. *Chimia* **1997**, *50*, 244.
181. Gademann, K.; Ernst, M.; Seebach, D.; Hoyer, D. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 16.
182. Mark, J. E.; Goodman, M. *Biopolymers* **1967**, *5*, 809.
183. Fairlie, D. P.; Abbenante, G.; March, D. R. *Curr. Med. Chem.* **1995**, *2*, 654.
184. Rajeswaran, W. J.; Hocart, S. J.; Murphy, W. A.; Taylor, J. E.; Coy, D. H. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1305.
185. Rajeswaran, W. J.; Hocart, S. J.; Murphy, W. A.; Taylor, J. E.; Coy, D. H. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1416.
186. Ogawa, T.; Miyamae, T.; Okayama, T.; Hagiwara, M.; Sakurada, S.; Morikawa, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 771.
187. Erspamer, V.; Melchiorri, P. *Growth Hormone and Other Biological Peptides* Pecil A., Muller E. E., Eds.; Excerpta Medica: Amsterdam, **1980**, p 185-200.
188. De Castiglione, R.; Faoro, F.; Perseo, G.; Piani, S.; Santangelo, F.; Melchiorri, P.; Erspamer, G. F.; Erspamer, V.; Guglietta, A. *Peptides* **1981**, *2*, 265.
189. Ogawa, T.; Miyamae, T.; Murayama, K.; Okuyama, K.; Okayama, T.; Hagiwara, M.; Sakurada, S.; Morikawa T. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5081.
190. Masakatsu, E. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 182.
191. Ogawa, T.; Araki, M.; Miyamae, T.; Okayama, T.; Hagiwara, M.; Sakurada, S.; Morikawa T. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 759.
192. Sasaki, Y.; Matsui, M.; Fujita, H.; Hosono, M.; Taguchi, M.; Suzuki, K.; Sakurada, S.; Sato, T.; Sakurada, T.; Kisara, K. *Neuropeptides* **1985**, *5*, 391.
193. Chaki, K.; Sakurada, S.; Sakurada, T.; Kisara, K.; Suzuki, K. *Life Sciences* **1990**, *46*, 1671.
194. Marastoni, M.; Salvatori, S.; Baloboni, G.; Andrea, P.; Marzola, G.; Tomatis, R. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1538.
195. Houghten, R. A.; Dooley, C. T. *Biomed. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 405.
196. Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bertlett, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 9367.
197. Hamper, B. C.; Kolodziej, S. A.; Scates, A. M.; Smith, R. G.; Cortez, E. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 708.
198. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646.
199. Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore J. S. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893.
200. *Enantioselective Synthesis of β -Amino Acids*; second ed.; Juaristi, E.; Soloshonok, V., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, New York, **2005**.
201. Hintermann, T.; Mathes, C.; Seebach, D. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2379.
202. Gademann, K.; Ernst, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 16.

203. McDermott, J. R.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1972**, *51*, 1915.
204. Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 916.
205. Matthews, J. L.; Overhand, M.; Kühnle, F. N. M.; Ciceri, P. E.; Seebach, D. *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 1371.
206. Farràs, J.; Ginesta, X.; Sutton, P. W.; Taltavull, J.; Egeler, F.; Romea, P.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7665.
207. McCoull, W.; Davis, F. A. *Synthesis* **2000**, 1347.
208. Stamm, H. *J. Prakt. Chem.* **1999**, *341*, 319.
209. Osborn, H. M. I.; Sweeney, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1693.
210. Li, G.; Sharpless, K. B. *Acta Chem. Scan.* **1996**, *50*, 649.
211. Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373.
212. Bergmeier, S. C. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2561.
213. McKennon, M. J.; Meyers, A. I.; Drauz, K.; Schwarm, M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3568.
214. Sutton, P. W.; Bradley, A.; Farràs, J.; Romea, P.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7947.
215. Sutton, P. W.; Bradley, A.; Elsegood, M. R. J.; Farràs, J.; Jackson, R. F. W.; Romea, P.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2629.
216. Freidinger, R. M.; Hinkle, J. S.; Perlow, D. S.; Arison, B. H. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77.
217. Zhang, S.; Govender, T.; Norström, T.; Arvidsson, P. I. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6918.
218. Tantry, S. J.; Kantharaju, Babu, V. V. S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9461.
219. Govender, T.; Arvidsson, P. I. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1691.
220. Harrison, J. R.; O'Brien, P.; Porter, D. W.; Smith, N. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 3623.
221. Salvadori, S.; Guerrini, R.; Balboni, G.; Bianchi, C.; Bryant, S. D.; Cooper, P. S.; Lazarus, L. H. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5010.
222. Hughes, A. B.; Sleebbs, B. E. *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 778.
223. Hughes, A. B.; Sleebbs, B. E. *Helv. Chim. Acta.* **2006**, *89*, 2611.
224. Hudlicky, M. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5377.
225. Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer, L.; Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer, H.; *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043.
226. Abele, S.; Seebach, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1.
227. Cassal, J. M.; FHerst, A.; Meier, W. *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1917.
228. Balaspiri, L.; Penke, B.; Papp, G.; Dombi, G.; Kovacs, K. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 969.

229. DeVita, R. J.; Bochis, R.; Frontier, A. J.; Kotliar, A.; Fisher, M. H.; Schoen, W. R.; Wyvratt, M. J.; Cheng, K.; Chan, W. W.-S.; Butler, B.; Smith, R. G.; Jacks, T. M.; Hickey, G. J.; Schleim, K. D.; Leung, K.; Chen, Z.; Chiu, S.-H. L.; Feeney, W. P.; Cunningham, P. K.; *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1716.
230. Aurelio, L.; Brownlee, R. T. C.; Hughes, A. B.; Sleebs, B. E. *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 425.
231. Aurelio, L.; Box, J. S.; Brownlee, R. T. C.; Hughes, A. B.; Sleebs, M. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2652.
232. Di Gioia, M. L.; Leggio, A.; Le Pera, A.; Liguori, A.; Napoli, A.; Siciliano, C.; Sindona, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7413.
233. Le Pera, A.; Leggio, A.; Siciliano, C.; Di Gioia, M. L.; Napoli, A.; Sindona, G.; Liguori, A. *Steroids* **2003**, *68*, 139.
234. Liguori, A.; Perri, F.; Siciliano, C. *Steroids*, **2006**, *71*, 1091.
235. Barnes, P.J. *Clin. Sci.* **1998**, 557.
236. Kirk, D. N.; Mudd, A. *J. Chem. Soc. Perkin I* **1975**, 1450.
237. May, P. J.; Nice, F. A.; Phillipps, G. H. *J. Chem. Soc. (C)* **1966**, 2210.
238. Taub, D.; Hoffsommer, R. D.; Slates, H. L.; Kuo, C. H.; Wendler, N. L. *J. Amer. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4012.
239. Di Gioia, M. L.; Leggio, A.; Le Pera, A.; Liguori, A.; Perri, F.; Pitrelli, A. *Steroids* **2006**, *71*, 116.
240. Di Gioia, M. L.; Leggio, A.; Le Pera, A.; Liguori, A.; Perri, F. *II Scuola delle Sostanze Naturali e di Chimica Bioorganica "Luigi Minale"*, Napoli, **2005**.
241. Gorodetsky, M.; Danieli, N.; Mazur, Y.; *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 760.
242. Mendelovici, M.; Glotter, E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1992**, 1735.
243. Paquette, L. A.; Philippo, C. M. G.; Vo, N. H. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 1356.
244. Holland, H. L.; Riemland, E.; Daum, U. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1919.
245. Windaus, A. *Chem. Ber.* **1906**, *39*, 2008.
246. Hrycko, S.; Morand, P.; Lee, F. L.; Gabe, E. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1989**, 1311.
247. Morgan, B. A.; Gainor, J. A. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1989**, *24*, 243.
248. Ripka, S. A.; Rich, D. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 441.
249. Mark, J. E.; Goodmann, M. *Biopolymers* **1967**, *5*, 809.
250. Munck, L. K.; Grøndahl, M. L.; Skadhauge, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1238*, 49.
251. Belsito, E.; Di Gioia, M. L.; Greco, A.; Leggio, A.; Liguori, A.; Perri, F.; Siciliano, C.; Viscomi, M. C. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4798.
252. Di Gioia, M. L.; Greco, A.; Leggio, A.; Liguori, A.; Perri, F.; Siciliano, C.; Viscomi, M. C. *Convegno Congiunto delle Sezioni Calabria e Sicilia*, Palermo, 4,5 Dicembre **2006**.
253. Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2301.

254. Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2690.
255. Yang, L.; Chiu, K. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7307.
256. Albanese, D.; Landini, D.; Lupi, V.; Penso, M. *Eur. J. Org. Chem.* **1997**, 1443.
257. Bowman, W. R.; Coghlan, D. R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15787.
258. Di Gioia, M. L.; Leggio, A.; Le Pera, A.; Liguori, A.; Napoli, A.; Siciliano, C.; Sindona, G. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7416.
259. Aurelio L.; Brownlee R. T. C.; Hughes A. B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5823.
260. Di Gioia, M. L.; Leggio, A.; Liguori, A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3892.
261. Leggio, A.; Liguori, A.; Procopio, A.; Sindona, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1969.
262. Matthews, J. L.; Braun, C.; Guibourdenche, C.; Overhand, M. Seebach, D. *Enantioselective Synthesis of β -Amino Acids*; Juaristi, E., Ed.; Wiley-VCH: New York, **1997**; p 105-126.
263. Plucinska, K.; Liberek, B. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 3509.
264. Kimmerlin, T.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2098.
265. Bradley, W.; Eaton, J. K. *J. Chem. Soc.* **1937**, *2*, 1914.
266. Duggleby, P. McC.; Holt, G. *J. Chem. Soc.* **1962**, *3*, 3579.
267. Seebach, D.; Overhand, M.; Kühnle, F. N. M.; Martinoni, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913.
268. Guichard, G.; Abele, S.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 187.
269. Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A.; Henklein, P.; Wenschuh, H.; Bienert, M.; Beyermann, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 241.
270. Venier, C. G.; Hsieh, H. H.; Barager, H. J. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*.
271. Arndt F., *Syn, Coll.* **1943**, 165.
272. Kirmse, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2193.
273. Newmann, M. S.; Arkell, A. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 385.
274. Babu, V. V. S.; Gopi, H. N.; Ananda, K. *J. Peptide Res.* **1999**, *53*, 308.
275. Newman, M. S.; Beal, P. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5163.
276. Sudrik S. G.; Maddanimath T.; Chaki N. K.; Chavan S. P.; Chavan S. P.; Sonawane H. R.; Vijayamohan K. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2355.
277. Di Gioia, M. L.; Leggio, A.; Liguori, A.; Perri, F. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3723.
278. Di Gioia, M. L.; Leggio, A.; Liguori, A.; Perri, F. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8164.
279. *Methods in Molecular Biology*; Pennington, M. W.; Dunn, B. M., Eds.; Peptide and Protocols; Humana Press: Totowa, NJ, **1994**; Vol.35, p 91-169.

280. Atherton, E.; Sheppard, R. C. In *Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach*; Oxford-IRL Press: New York, NY, **1989**.
281. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. In *Protective Groups in Organic Synthesis*; 3rd ed.; Wiley: New York, **1999**.
282. Carpino, L. A. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 401.
283. Atherton, E.; Sheppard, R. C. In *The Peptides*; Udenfriend, S.; Meienhofer, J., Eds.; Academic Press: New York, NY, **1987**; Vol.9, p. 1.
284. Sheppard, R. *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 545.
285. Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadat-Aalae, S. Y.; Tien, J. H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3732.
286. Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 721.
287. Seko, S.; Tani, N. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8117.
288. Uneme, H.; Mitsudera, H.; Yamada, J.; Kamikado, T.; Kono, Y.; Manade, Y.; Numata, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 1293.
289. Béguin, C.; LeTiran, A.; Stables, J. P.; Voyksner, R. D.; Kohn, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3079.
290. Naskar, D.; Roy, A.; Seibel, W. L.; Portlock, D. E. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8865.
291. Di Gioia, M. L.; Leggio, A.; Le Pera, A.; Liguori, A.; Perri, F.; Viscomi M.C. *Letters in Organic Chemistry* **2006**, *3*, 468.
292. Canale Parola, T.; Leggio, A.; Liguori, A.; Perri XXX Corso Estivo "A. Corbella" Seminari di *Chimica Organica*, Gargnano del Garda 13-17 Giugno, **2005**.
293. Nahm, S.; Weinreb, S. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815.
294. Sibi, M. P. *Org. Prep. Proced. Int.* **1993**, *25*, 15.
295. Fehrentz, J. A.; Castro, B. *Synthesis* **1983**, 676.
296. Godjoian, G.; Singaram, B. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1717.
297. Blaney, P.; Grigg, R.; Rankovic, Z.; Thotoughgood, M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6635.
298. Van Elburg, P. A.; Reinhoudt, D. N. *Heterocycles* **1987**, *26*, 437.