

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



FACOLTÀ DI FARMACIA

Dottorato di Ricerca in

“Scienza del Farmaco”

XXI CICLO 2005-2008

***Studi strutturali e sintetici sulle Callipeltine e sulle
Homophymine, peptidi bioattivi isolati da spugne marine***

Tutor:

Prof. Angela Zampella

Coordinatore:

Prof. M. Valeria D’Auria

Candidata

Dott. Filomena Bellotta

INDICE

INTRODUZIONE -La chimica delle sostanze naturali	1
CAPITOLO 1	
1.1. I poriferi	5
1.2. Metaboliti isolati da spugne	9
1.3. I peptidi ciclici	10
1.4. Esempi di ciclopeptidi bioattivi isolati da spugne	14
CAPITOLO 2	
2.1. Determinazione strutturale	18
2.1.1. Spettrometria di massa	18
2.1.2. Spettroscopia NMR	21
2.2. Determinazione della stereochimica	24
2.2.1. Metodo di Murata	26
2.2.2. Metodo di Marfey	32
2.2.3. Metodo di Mosher	35
CAPITOLO 3 - Presentazione del lavoro svolto	38
CAPITOLO 4	
4.1. Le Callipeltine	40
CAPITOLO 5	
5.1. Isolamento di nuove Callipeltine	51
CAPITOLO 6	
6.1. Studi biologici sulla Callipeltina A	75
6.1.1. Alterazione del gradiente del Na ⁺ per inibizione della Na ⁺ /K ⁺ ATPasi	76
6.1.2. Alterazione del gradiente del Na ⁺ per rimozione del Na ⁺ esterno	77
6.1.3. Studi NMR di complessazione della Callipeltina A con metalli alcalini	81
6.2. Studi biologici sulle nuove Callipeltine	84
CAPITOLO 7	
7.1. Apparecchiature utilizzate	85
7.2. Isolamento delle Callipeltine J e M	86
7.3. Determinazione della configurazione assoluta	87
7.3.1. Idrolisi del peptide	87
7.3.2. Derivatizzazione con il reattivo di Marfey	87
7.3.3. Determinazione della configurazione assoluta della β -OMeTyr	88
7.4. Procedure sintetiche e dati spettroscopici per l'acido 3-metil-L-glutammico	89

7.5. Test antifungini	97
CAPITOLO 8	
8.1. L'Homophymina A	98
8.1.1. Isolamento dell'Homophymina A	100
8.1.2. Studi strutturali sull'Homophymina A	101
8.1.3. Studi stereochimici sull'Homophymina A	109
CAPITOLO 9	
9.1. Isolamento di nuove Homophymine	130
9.2. Studi farmacologici sulle Homophymine	148
CAPITOLO 10	
10.1. Prospettive	150
CAPITOLO 11	
11.1. Apparecchiature utilizzate	151
11.2. Isolamento delle homophymine	152
11.3. Analisi strutturale dell'Homophymina A	152
11.4. Determinazione della configurazione assoluta	153
11.5. Metanolisi basica dell'Homophymina A	156
11.6. Procedure sintetiche e dati spettroscopici per l'L-ThrOMe e l'L-alloThrOMe	157
11.7. Procedure sintetiche e dati spettroscopici per l'acido (2R,3R,4R,6R)-3- idrossi- 2,4,6-trimetilottanoico (HTMOA)	160
BIBLIOGRAFIA	170

INTRODUZIONE

Per tutta la sua lunga storia l'uomo ha tratto dalla natura tutto quanto gli fosse indispensabile per la sopravvivenza e per il suo sviluppo.

Dal regno animale ha ottenuto alimenti ad elevato valore nutrizionale e pellame per difendersi dal freddo. Attraverso una lenta e attenta opera di scelta, l'uomo ha identificato, per tentativi ed errori, le piante nutritive e quelle aromatiche, quelle che erano in grado di fornire merci sempre più raffinate e diversificate come combustibili, prodotti chimici industriali, coloranti, fibre tessili.

Ben presto l'istinto di sopravvivenza ha portato alla ricerca nei prodotti naturali di rimedi per lenire le proprie sofferenze e quindi la conoscenza delle piante medicamentose è stata, da sempre, un patrimonio di tutti i popoli, tramandato di generazione in generazione. Ad esempio, le proprietà curative dell'aglio erano già note fin dall'antichità: la prima citazione è stata trovata nel Codex Ebers, un papiro egiziano datato 1550 a.C. dove vengono citati diversi medicinali da realizzare con l'aglio per combattere le punture di insetti e il mal di testa e per prevenire la comparsa di febbri e di infezioni.

In effetti le piante si sono rivelate le uniche risorse medicamentose che l'uomo abbia potuto utilizzare praticamente per quasi tutto il percorso della sua storia.

Innumerevoli sono i farmaci utilizzati in terapia che derivano direttamente o per via semisintetica da piante ed ogni elenco esemplificativo risulta estremamente riduttivo: tra essi troviamo antinfiammatori (aspirina), broncodilatatori (efedrina), cardiotonici (digitonina e digossina) ed antitumorali (vincristina, taxolo).

Attualmente, nonostante la crescente introduzione di farmaci di sintesi, circa il 45% degli agenti terapeutici sono di origine naturale o derivano direttamente da molecole naturali. L'importanza di alcuni dei prodotti offerti dalla natura ha fatto crescere la curiosità per le loro caratteristiche e la loro composizione.

La diversità chimica che caratterizza le molecole naturali rende l'esplorazione delle loro proprietà biologiche, non solo una delle principali fonti di nuovi composti potenzialmente utilizzabili per la realizzazione di farmaci, ma anche uno strumento utile per la scoperta di nuovi meccanismi d'azione.

Per i motivi su citati la chimica delle sostanze naturali ha avuto dei grandi progressi negli ultimi decenni, con il risultato di una migliore conoscenza dei processi

enzimatici e lo sviluppo delle teorie biogenetiche e biosintetiche in una classificazione logica che collega insieme una grande varietà di composti. È di fondamentale importanza capire come la natura elabora un gran numero di sostanze, il ruolo delle molecole biosintetizzate e soprattutto l'eventuale applicazione delle stesse in campo medico. Inoltre il crescente interesse verso molecole naturali è stato anche favorito dallo sviluppo delle moderne tecniche biochimiche e genetiche, dall'avvento di nuove tecniche di purificazione e di determinazione strutturale nonché da una serie di saggi biologici capaci di mettere in evidenza la natura e l'entità di un'eventuale attività farmacologica.

Negli ultimi decenni, il progresso tecnologico ha reso possibile l'estensione della ricerca anche agli organismi marini e ciò ha portato all'isolamento di nuove sostanze, che spesso esibiscono architetture molecolari tanto insolite e complesse, mai identificate in organismi terrestri, da far pensare all'esistenza di una distinta "Chimica del Mare".

Una piccolissima parte del mondo marino, dove la natura sembra aver giocato con le forme e i colori per stupire ogni volta l'uomo, ultimo arrivato a scoprire questo fantastico pianeta blu, è rappresentata dalla fauna bentonica, costituita da alghe, celenterati, echinodermi e poriferi. Questi ultimi, comunemente noti come spugne, rappresentano la fonte dominante di metaboliti bioattivi.

Le spugne marine (organismi privi di corazze e quindi senza difesa meccanica contro i nemici esterni) hanno elaborato, nel corso dell'evoluzione, una serie sofisticatissima di meccanismi biochimici atti alla salvaguardia della specie quali strategie di difesa dalla predazione e dalla proliferazione di specie competitive.

Grazie a questa capacità di barriera chimica riescono a difendersi dagli attacchi di virus, batteri e funghi offrendo a noi un'ampia gamma di possibili antipatogeni.

Molti chimici delle sostanze naturali ritengono che l'elevata capacità produttiva di metaboliti secondari da parte di questi organismi è anche da attribuire alla coesistenza degli stessi invertebrati marini con microrganismi di origine batterica.

Ad esempio nel caso delle spugne si ritiene, che la loro natura primitiva non permetterebbe la biosintesi di sostanze di notevole complessità strutturale. Ricerche finalizzate allo studio degli organismi simbiotici hanno rivelato casi in cui i batteri possono arrivare ad occupare il 40% del volume tissutale della spugna ed è verosimile credere che la maggior parte dei metaboliti isolati da una spugna siano prodotti da microrganismi simbiotici. Questa idea sembra essere confermata dal fatto

che molto spesso composti strutturalmente simili siano stati isolati da spugne appartenenti a specie molto diverse, come pure, metaboliti con notevoli differenze strutturali sono isolati da spugne della stessa specie.

Il grafico in figura 1 illustra la percentuale di prodotti naturali di origine marina utilizzata in campo terapeutico. L'analisi dei dati riportati giustifica il crescente entusiasmo da parte dei chimici e dei farmacologi per le sostanze prodotte da organismi marini.

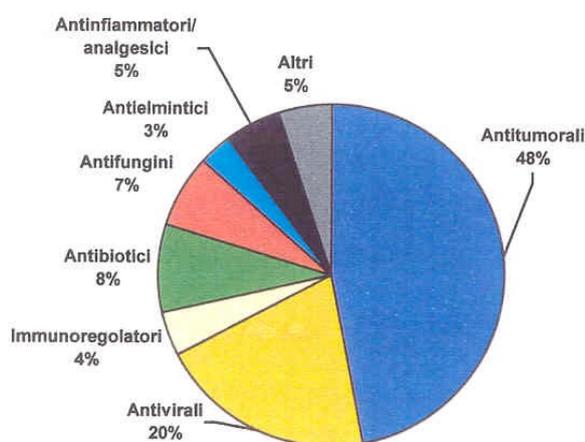


Figura 1. Prodotti naturali di origine marina utilizzati in campo terapeutico

La disponibilità di materia prima da cui estrarre i composti attivi rappresenta uno dei principali problemi da risolvere per lo sfruttamento delle risorse marine; per l'isolamento di pochi milligrammi di metaboliti attivi, appena sufficienti per effettuare i test farmacologici preliminari, è spesso necessario utilizzare centinaia di chilogrammi di organismi. Ma è evidente che, per evitare vere e proprie stragi, che possono minare anche la sopravvivenza delle specie interessate, le popolazioni naturali non possano essere considerate le fonti primarie per l'isolamento di sufficienti quantità di composti.

La sintesi chimica dei metaboliti farmacologicamente attivi, impresa tutt'altro che semplice come insegna il caso del tassolo, l'impiego di tecniche di ingegneria genetica, la realizzazione di impianti di acquacoltura degli organismi produttori ed infine l'allestimento di colture cellulari, rappresentano alcune delle possibili

soluzioni per ottenere quantità farmacologicamente utili di prodotto: “dove la natura finisce, l’uomo comincia” (Leonardo da Vinci).

Sarà inoltre necessario approfondire gli studi di correlazione struttura/attività al fine di identificare i “lead compounds” utili per la sintesi di analoghi meno tossici e quindi con indici terapeutici più favorevoli.

I farmaci del futuro in grado di sconfiggere numerose patologie saranno forse un prezioso regalo di qualche organismo marino?

CAPITOLO 1

1.1. I Poriferi

Tra i numerosissimi organismi che popolano i mari, i Poriferi, denominati comunemente spugne, rappresentano gli invertebrati pluricellulari meno evoluti. Occupano infatti una posizione intermedia tra i protozoi e i veri metazoi (parazoi) poiché possiedono solo pochi tipi di cellule che non sono organizzate in veri tessuti.

Sono organismi bentonici sessili che vivono ancorati a substrati quali rocce, alghe, conchiglie e granchi. Possono avere vita solitaria o costituire dense colonie che diventano importanti habitat per animali e vegetali. Infatti, le loro cavità possono ospitare numerosi organismi simbiotici come piccoli crostacei, larve di insetti, alghe unicellulari, cianobatteri etc. e molti sono gli animali che si nutrono di essi (pesci, molluschi, echinodermi).

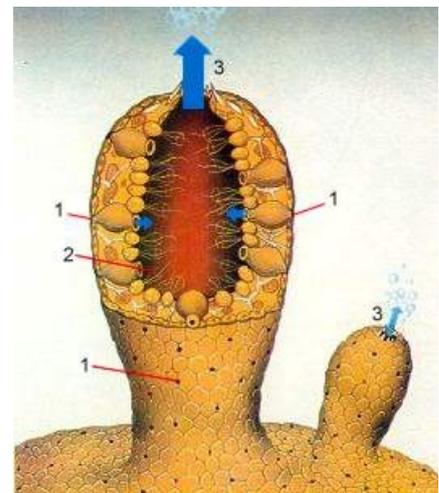
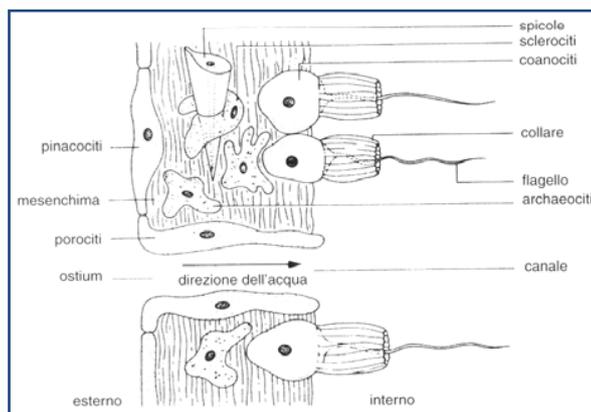
I poriferi sono organismi filtratori che utilizzano delle cellule flagellate per pompare acqua nei loro sistemi di canali; possono essere incrostanti o eretti, assumendo morfologie diverse secondo le caratteristiche ambientali (substrato, correnti, moto ondoso).



Alcuni esemplari di spugne

Schematicamente il corpo di un porifero può essere considerato a forma di sacco, tutto perforato (da qui il nome Poriferi) da pori sottili inalanti (*ostii*), con una grossa apertura detta *osculo* o *poro esalante* e una camera interna detta *cavità gastrale* o *spongocele*. La parete è doppia, esternamente costituita dal foglio dermale (*pinacoderma*) e internamente da quello gastrale (*coanoderma*). Su quest'ultimo sono inserite delle cellule munite di flagelli (*coanociti*), il cui movimento crea una corrente d'acqua che entra dai pori inalanti, attraversa la cavità gastrica ed esce dall'osculo. Il movimento dell'acqua creato dai coanociti apporta ossigeno, assicurando così lo scambio dei gas respiratori, e particelle alimentari, che trattenute e digerite dagli stessi coanociti tramite l'emissione di pseudopodi vengono poi trasportate nei vari tessuti da cellule di tipo ameboide (*amebociti*). All'interno del foglio dermale vi sono cellule piatte, *pinacociti*, e cellule contrattili, *porociti*. Tra il foglio dermale e quello gastrale è contenuto del mesenchima gelatinoso e proteico (*mesoglea*). In questa mesoglea si può trovare un'impalcatura scheletrica costituita da piccoli corpi calcarei o silicei (*spicole*) prodotti da cellule specializzate dette *scleroblasti* o da fibre di una scleroproteina (*spongina*) prodotta da particolari cellule dette *spongoblasti*.

Schema di un porifero



- 1) pori inalanti
- 2) coanociti
- 3) pori esalanti

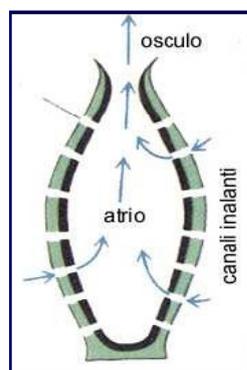
Nelle spugne vi sono tre gradi di organizzazione strutturale basati sulla complessità del sistema di canali che portano l'acqua all'interno del corpo:

- Tipo *ascon* – l'acqua entra attraverso gli ostii della sottile parete esterna, passa sullo strato di coanociti che tappezza lo spongocele ed esce dall'oscuro. Presente solo nelle spugne calcaree, ma si ritiene fosse abbastanza comune anche nelle spugne fossili.
- Tipo *sycon* – La struttura ascon impone limitazioni nelle dimensioni: se il volume dello spongocele aumenta, la superficie flagellata non aumenta in modo proporzionale e come risultato una grossa spugna asconoide conterrebbe più acqua di quanto i suoi coanociti potrebbero filtrare.

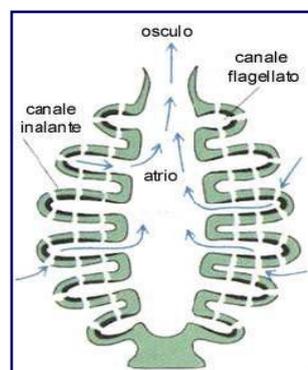
La risposta in termini evolutivisti è stata la comparsa di numerose evaginazioni esterne dello strato flagellato (canali flagellati) in modo da aumentarne la superficie di assorbimento, ed invaginazioni della superficie esterna (canali inalanti).

Si tratta di un insieme di strutture ascon riunite attorno allo spongocele che però non è tappezzato dai coanociti. Queste cellule rivestono invece le camere flagellate che sono in comunicazione con l'interno mediante i canali inalanti e con l'esterno mediante i canali esalanti. Presente attualmente nelle spugne calcaree ed in certe spugne silicee fossili.

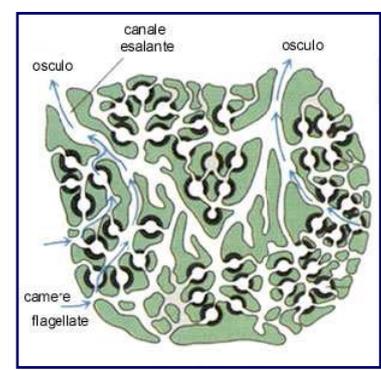
- Tipo *leucon* – si tratta della struttura più complessa essendo costituita da numerose camere flagellate tappezzate da coanociti e disposte lungo un sistema di canali ad andamento dendritico che conduce all'oscuro. Si può in pratica parlare di più strutture sycon riunite insieme attorno ad una sorta di cavità centrale. Questa struttura è la più comune.



Ascon



Sycon



Leucon

I Poriferi si riproducono sia asessualmente, per mezzo di gemme, che sessualmente. Nella riproduzione sessuata gli spermatozoi e le uova vengono spesso prodotti da uno stesso individuo, anche se in momenti differenti per evitare l'autofecondazione (ermafroditismo insufficiente). Gli spermatozoi vengono espulsi dalla spugna e trasportati da correnti d'acqua verso un'altra spugna: qui vengono fagocitati dai coanociti che si fondono alle cellule uovo trasferendo ad esse lo spermio. Dall'uovo fecondato si sviluppa una larva munita di flagelli che nuota liberamente e poi si fissa al substrato. In funzione del differente endoscheletro possiamo suddividere il *phylum* Porifera in quattro classi:

- 1) Le **Calcisponge** (spugne calcaree) sono spugne esclusivamente marine, con scheletri calcarei. Le loro spicole sono costituite di carbonato di calcio, sono strutturalmente semplici e possono presentare al massimo quattro raggi (tetractine). I rappresentanti di questa classe sono di piccole dimensioni, hanno forma tabulare o di piccoli vasi e presentano organizzazione interna di tipo ascon, sicon o leucon.
- 2) Le **Hexactinellida (Hyalospongiae)**, dette anche spugne vetrose a causa del loro scheletro siliceo, sono tutte marine, di acque profonde, e caratterizzate da un corpo cilindrico o imbutiforme. Le loro spicole, riunite a formare un reticolo complesso, sono del tipo esactina (sei punte), l'organizzazione è del tipo sicon o leucon. Numerose spugne vetrose hanno forma di coppa o di vaso e possono raggiungere un'altezza compresa tra i 10 e i 100 cm. La maggior parte si rinviene a profondità comprese tra i 200 e i 2000 metri.
- 3) Le **Demosponge** comprendono la maggior parte delle specie di spugne (circa il 90%) ed include sia forme marine che dulciacquicole. Il loro scheletro è composto di spicole silicee (non esactine), in alcune forme parzialmente o completamente sostituite da elementi scheletrici costituiti di una speciale proteina, la spongina. L'organizzazione interna, molto evoluta, è del tipo leucon. Numerose demosponge sono vivacemente colorate.
- 4) Le **Sclerospongiae** sono spugne coralline con lo scheletro costituito da cristalli di carbonato di calcio su un reticolo di fibre organiche. E' un ristretto gruppo di spugne, per lo più tropicali che vivono in grotte o in ambienti oscuri.

1.2. Metaboliti isolati da spugne

Sebbene le spugne siano degli organismi primitivi si sono rivelate una ricca fonte di metaboliti secondari. Queste molecole, spesso caratterizzate da architetture molecolari molto complesse, si sono rivelate interessanti soprattutto per le attività farmacologiche mostrate. Ad oggi il numero di nuovi composti isolati da spugne marine ammonta a diverse migliaia e sono centinaia i brevetti di farmaci che si basano su tali sostanze. In particolare si tratta di antitumorali, antivirali, antimicrobici, molecole con attività antiossidante e antiinfiammatoria in via di sperimentazione.

Tra i metaboliti più interessanti ricordiamo:

- **MACROLIDI**, caratterizzati da un macrociclo altamente funzionalizzato e generalmente chiuso con una funzione lattonica.
- **PEPTIDI CICLICI**, che spesso hanno la peculiarità di presentare amminoacidi inusuali e non naturali.
- **STEROLI**, caratterizzati dalla presenza di un nucleo ciclopentanoperidrofenantrenico, una struttura a quattro anelli di atomi di carbonio (uno a cinque termini e tre a sei termini). A questa struttura di base sono legati gruppi funzionali che contraddistinguono i diversi tipi di steroli, tra i quali di grande importanza biologica annoveriamo gli ormoni sessuali e il colesterolo.
- **TERPENI**, che costituiscono una vasta famiglia di sostanze naturali strutturalmente diverse tra loro derivanti da unità isopreniche C5 unite in modo testa-coda. Questi metaboliti contengono scheletri carboniosi costituiti da unità (C5)_n e sono classificati come monoterpeni (C10), sesquiterpeni (C15), diterpeni (C20) etc. Lo scheletro terpenoidico presenta spesso ulteriori modificazioni in seguito a reazioni di ciclizzazione, ossidazione e metilazione.

1.3. I peptidi ciclici

I peptidi ciclici costituiscono una classe di metaboliti secondari ampiamente diffusa tra gli organismi marini. La grande varietà di specie in grado di produrre ciclopeptidi ha dato impulso ad una cospicua attività di ricerca che ha altresì messo in luce per molti di questi composti potenzialità di impiego in medicina.

La caratteristica più importante dei ciclopeptidi isolati da spugne marine è la presenza di amminoacidi inusuali e non naturali, quali ad esempio β -idrossiamminoacidi, amminoacidi *N*-alchilati e quelli appartenenti alla serie sterica D.

Tali modifiche strutturali si riflettono sulle attività farmacologiche mostrate ed in particolare: la *N*-alchilazione e la mancanza di residui ammino e carbossi-terminali aumentano l'idrofobicità dei ciclopeptidi facilitandone il passaggio attraverso le membrane biologiche e aumentano la resistenza alla degradazione enzimatica; la sostituzione dell'azoto diminuisce la capacità di formare legami peptidici *trans* e favorisce l'esistenza di strutture β -turn biologicamente molto importanti; la ciclizzazione riduce inoltre la variabilità conformazionale e aumenta l'affinità recettoriale.

Si comprende quindi l'interesse rivolto verso tali molecole già ampiamente impiegate in numerose aree di ricerca biomedica come utili mezzi diagnostici e terapeutici.

Nell'ambito dei peptidi ciclici le variazioni più interessanti sono quelle riscontrate nei ciclodepsipeptidi dove la formazione del ciclo è ottenuta attraverso gruppi diversi dalle usuali funzioni amminiche e carbossiliche. In questo caso intervengono infatti altri gruppi funzionali, responsabili di uno scheletro peptidico altamente modificato e caratterizzato dalla presenza di lattoni, eteri e tioeteri. Ciò si può realizzare in quanto i ciclopeptidi includono nelle loro sequenze non solo α -amminoacidi ma anche idrossiacidi, β e γ -amminoacidi, frammenti di polilattone, polipropionati ed altri.

I ciclopeptidi naturali differiscono sostanzialmente dalle proteine in quanto la loro sintesi non ha luogo a livello ribosomiale e non è codificata direttamente dagli acidi nucleici, risultando invece frutto dell'attività di una classe di enzimi batterici.

Molti chimici delle sostanze naturali ritengono infatti che l'elevata capacità produttiva di metaboliti secondari da parte delle spugne marine sia da attribuire alla coesistenza degli stessi invertebrati con microrganismi di origine batterica.

L'enorme potenziale biosintetico dei batteri simbiotici è associato soprattutto a due complessi multienzimatici chiamati Non Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS)¹⁻³ e Poliketides Synthases (PKS).¹⁻³

Le NRPS sono megasintetasi responsabili della sintesi di peptidi e ciclodepsipeptidi, le PKS della biosintesi di macrolidi di origine polichetidica. Talvolta i due complessi sono associati e in tal caso si ottengono composti a biogenesi mista.

Molto già si conosce del complesso NRPS; esso è organizzato in più gruppi di siti attivi coordinati, definiti moduli, ognuno dei quali è responsabile del caricamento e in alcuni casi della modifica di ciascuna unità amminoacidica. Il numero e l'ordine dei moduli ed il tipo di domini enzimatici presenti in ogni modulo è diverso in ogni NRPS e tale differenza si rispecchia nella diversità dei risultanti prodotti peptidici, che possono differenziarsi nell'ordine, nel numero, nella scelta degli amminoacidi e nelle modifiche associate con il particolare tipo di allungamento.

Il minimo set di domini richiesto per un ciclo di allungamento in ciascun modulo è costituito da un dominio di Adenilazione (A), uno di Tiolazione (T), e uno di Condensazione (C).

Il dominio di adenilazione (A) è responsabile della scelta del substrato e della formazione del legame covalente con il braccio di fosfopanteina presente nel dominio di tiolazione (T). Il dominio di condensazione (C) catalizza la formazione del legame peptidico tra l'amminoacil- o il peptidil-S-PCP presente su un modulo e l'unità amminoacidica legata con un legame tioestereo al PCP del modulo precedente. Possono essere presenti ulteriori domini che catalizzano reazioni di epimerizzazione (molti prodotti delle NRPS presentano amminoacidi della serie sterica D), di *N*-metilazioni, etc. In molti casi nell'ultimo modulo è presente un dominio di Tioesterasi C-terminale (TE), responsabile della ciclizzazione e rilascio del prodotto finale. Il meccanismo d'azione è schematizzato di seguito:

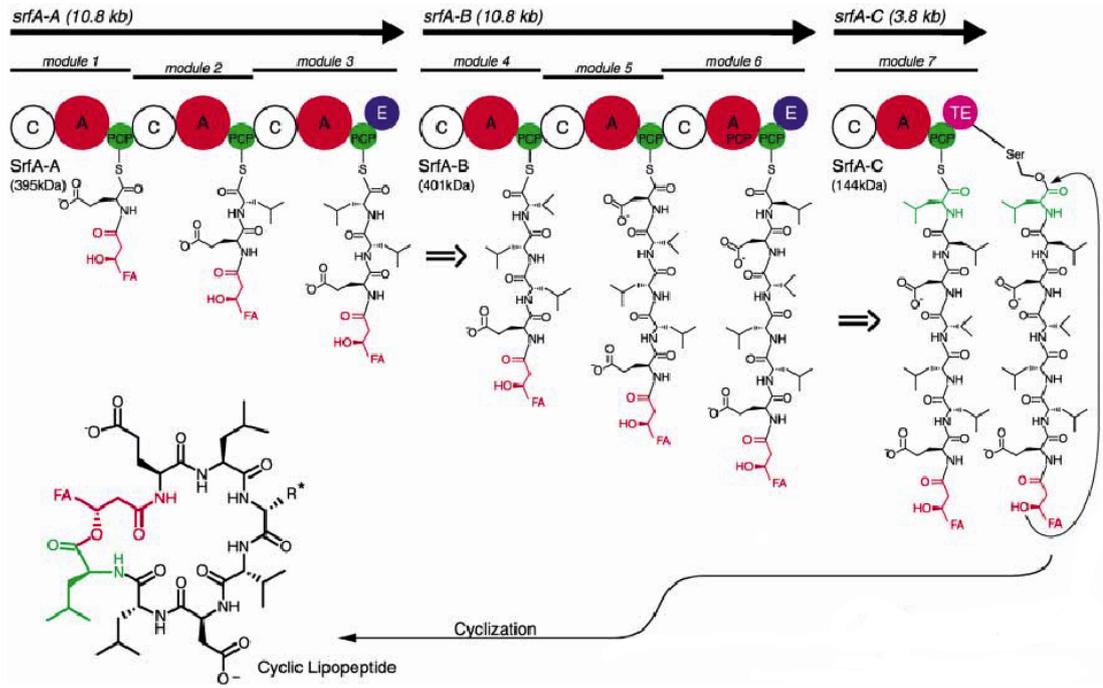
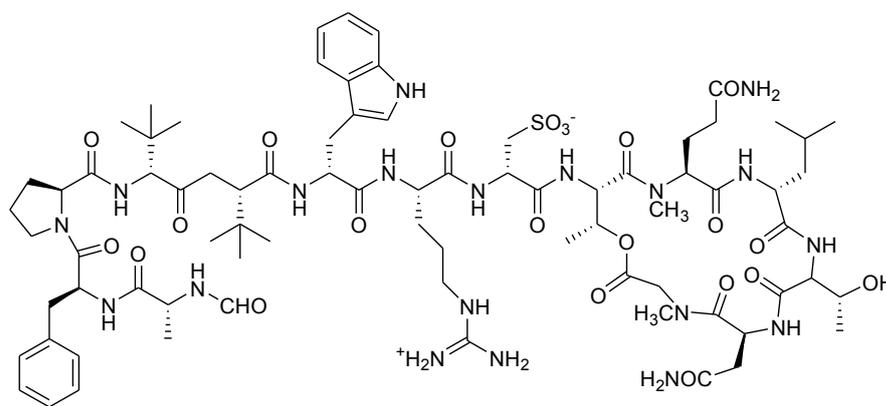


Tabella 1. ⁴⁻⁶ *Spugne e loro peptidi ciclici dotati di attività biologica*

Sponge	Bioactive cyclic peptides	Biological activity
Callipelta sp.	Callipeltins	Antifungal, cytotoxic, anti-HIV
Cymbastela sp.	Geodiamolides C-G	Cytotoxic
Discodermia kiiensis	Discodermin A	Cytotoxic, antimicrobial
Discodermia kiiensis	Discokiolides A	Cytotoxic
D. polydiscus	Polydiscamide A	Cytotoxic
Geodia sp.	Geodiamolides A-B	Cytotoxic
Hemiastrella minor	Geodiamolide TA	Cytotoxic
Hymeniacidon sp.	Hymenistatin 1	Cytotoxic
Hymeniacidon sp.	Hymenamamide	Antifungal, antitumor
Jaspis sp.	Jaspamide	Antifungal, cytotoxic
Microscleroderma	Microsclerodermins A-B	Antifungal
Mycale izuensis	Azumamides A-E	Anti-angiogenic
Neamphius huxleyi	Neamphamide A	Anti-HIV
Neosiphonia superstes	Neosiphoniamolide A	Antifungal
Phakellia costata	Phakellistatin 1	Cytotoxic
Sidonops microspinosa	Microspinosamide	Anti-HIV
Siliquariaspongia mirabilis	Mirabamides A-D	Anti-HIV
Theonella sp.	Cyclotheonamide A	Thrombin inhibitory
Theonella sp.	Keramamide A	SR Ca ²⁺ -ATPase-inhibitory
Theonella sp.	Konbamamide	Calmodulin antagonist
Theonella swinhoei	Motuporin	Inhibitory protein phosphatase1
Theonella swinhoei	Nagahamide	Antibacterial
Theonella swinhoei	Papuamides A-D	Anti-HIV
Theonella sp.	Perthamide B	Cytotoxic
Theonella swinhoei	Theonellapeptolide	Cytotoxic
Theonella swinhoei	Theopapuamide	Cytotoxic

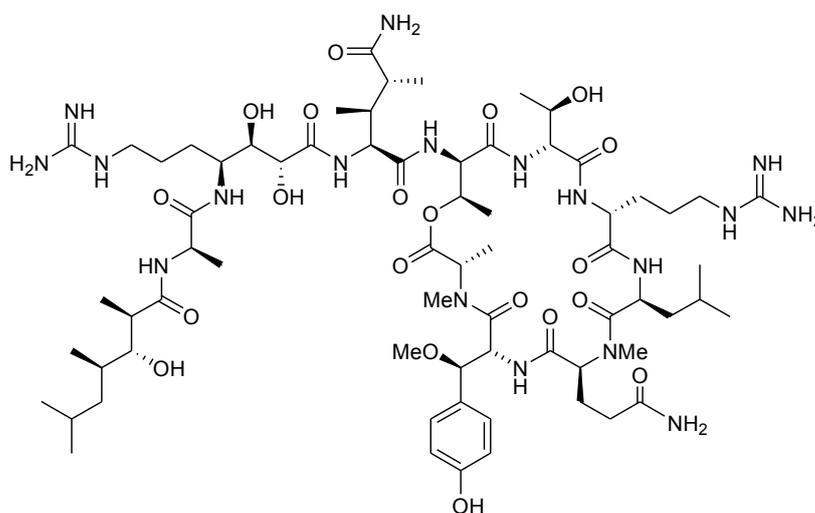
1.4. Esempi di ciclopeptidi bioattivi isolati da spugne

Il primo peptide bioattivo isolato da spugne è stata la **Discodermina A (1)** isolata dalla *Discodermia kiiensis*.⁷ Tale peptide mostra numerose attività biologiche, la più importante delle quali è la capacità di inibire la crescita del tumore promosso dall'acido okadaico. La somministrazione di 500 µg di Discodermina A prima dell'applicazione di 1 µg di acido okadaico, riduce la percentuale di comparsa del tumore nel topo dall'85 al 46 %.



Discodermina (1)

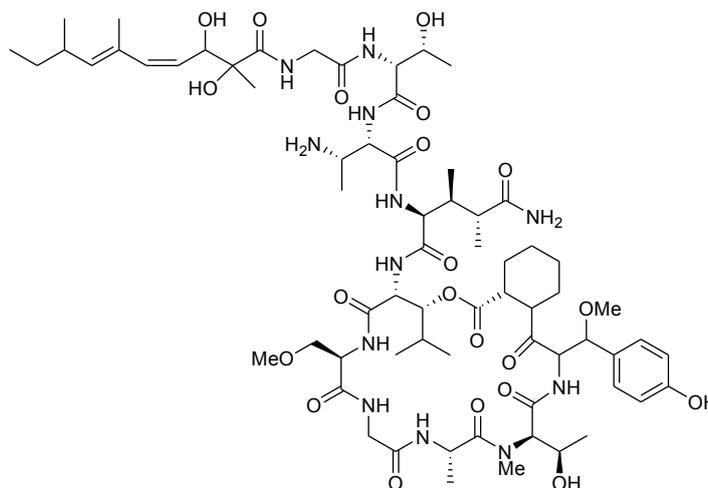
Del tutto singolare è una famiglia di ciclodepsipeptidi, strutturalmente simili tra di loro, dotati di una notevole attività antivirale. Il primo rappresentante di questa famiglia è la **Callipeltina A (2)**, isolata nel 1996 dalla spugna *Callipelta* sp..⁸⁻¹⁰



Callipeltina A (2)

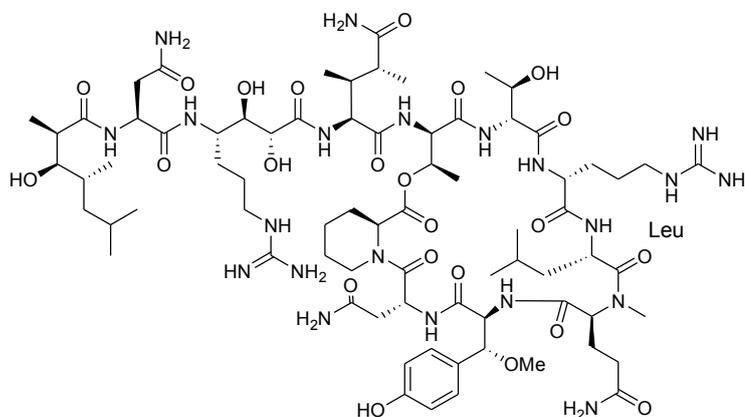
Seguono poi la **Papuamide A (3)**, la **Neamphamide A (4)**, la **Mirabamide A (5)** e la **Theopapuamide (6)**.

La **Papuamide A (3)** è un ciclodepsipeptide isolato dalle spugne *Theonella mirabilis* e *T. swinhoei*,¹¹ raccolte in Nuova Guinea. Questo metabolita possiede una potente attività anti-HIV testata su cellule T umane della linea CEM-SS infettate con il virus HIV-1_{RF}. Dopo sei giorni di incubazione si è osservato l'arresto dell'infezione con una EC₅₀ pari a 3.6 ng/mL.



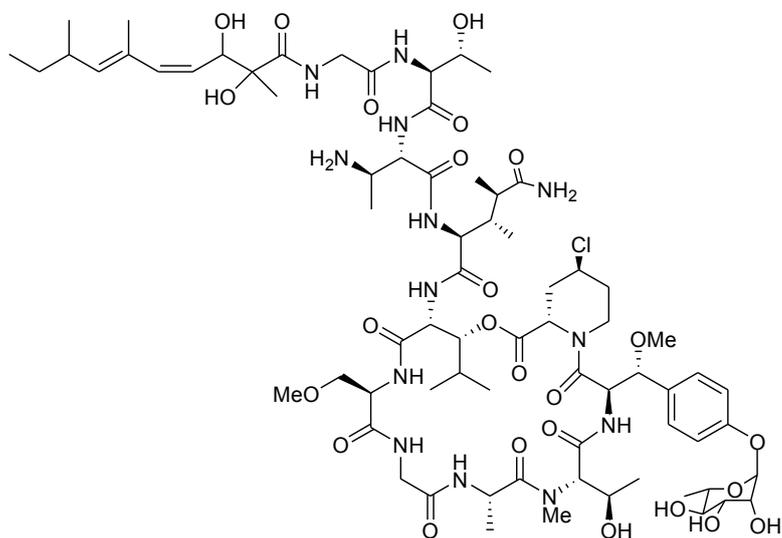
Papuamide A (3)

La **Neamphamide A (4)** è stata isolata dalla spugna *Neamphius huxleyi*,¹² sempre raccolta in Nuova Guinea. Anche per questo metabolita si è osservato un arresto dell'infezione delle cellule T umane della linea CEM-SS infettate con il virus HIV-1_{RF}. Dopo sei giorni di incubazione si è osservato l'arresto dell'infezione con una EC₅₀ pari a 28 nM.



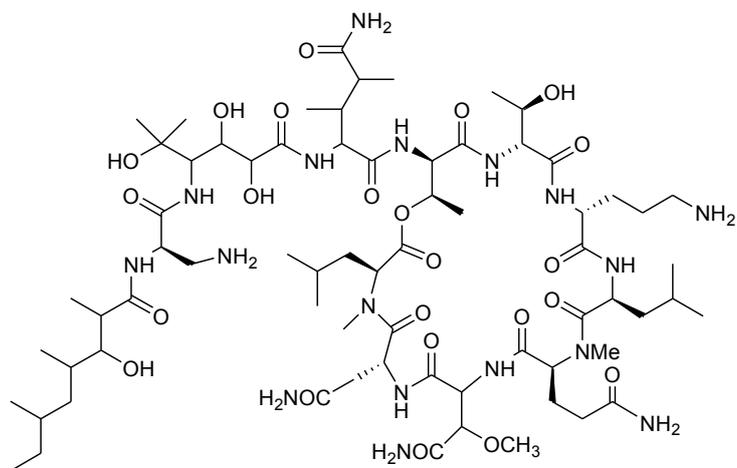
Neamphamide A (4)

La **Mirabamide A (5)** è un ciclodepsipeptide isolato recentemente dalla spugna *Siliquariaspongia mirabilis*.¹³ Anch'essa ha mostrato una potente attività anti-HIV-1 inibendo l'infezione con una IC₅₀ compresa tra 40 e 140 nM.



Mirabamide A (5)

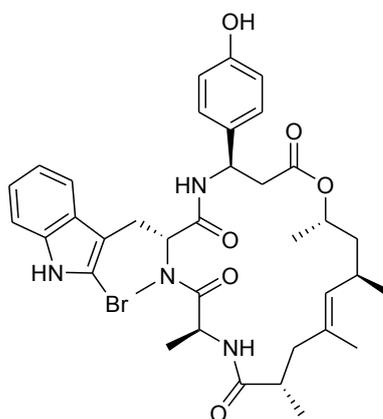
Un altro esempio di depsipeptide di origine marina è rappresentato dalla **Theopapuamide (6)**, isolata dalla spugna *Theonella swinhoei*.¹⁸ Tale metabolita ha mostrato una forte citotossicità sia verso cellule della linea CEM-TART infettate con il virus HIV-1, sia verso cellule umane della linea tumorale HCT-116 (human colon tumor), con valori rispettivamente di EC₅₀ pari a 0.5 e 0.9 μM.



Theopapuamide (6)

Questi peptidi condividono, insieme allo spettro di attività farmacologiche, caratteristiche strutturali come l'acilazione del residuo *N*-terminale, la presenza di un'insolita dimetilglutamina e di amminoacidi β -metossilati o alternativamente β -idrossilati.

I ciclodepsipeptidi isolati da spugne appartenenti al genere *Jaspis* sono un altro esempio: chimicamente costituiti da una porzione tripeptidica legata, a formare un ciclo, con un'unità di polipropionato a 12 atomi di carbonio. La **Jaspamide A**¹⁴⁻¹⁷ (7), il metabolita principale, è stato originariamente isolato dalla *Jaspis splendans* e poi ritrovato anche in altre spugne marine che includono *Auletta sp.*, *Hemiasterella minor* e *Cymbastela sp.*



Jaspamide A (7)

Da un punto di vista biologico la Jaspamide A ha mostrato promettenti attività antifungine, citotossiche, antimicrobiche, insetticide e antielmintiche. Ma l'azione più importante da attribuire al composto depsipeptidico è la sua capacità di inibire la crescita delle cellule di cancro alla prostata, mediata dall'interferenza con i fasci organizzati di actina, componenti strategici del citoscheletro.

CAPITOLO 2

2.1. Determinazione strutturale

La caratterizzazione strutturale di un composto naturale, faticosamente isolato e purificato in quantità spesso irrisorie, è senz'altro l'aspetto più affascinante del lavoro dei chimici che si occupano di sostanze naturali. Lo sviluppo della chimica delle sostanze naturali è proceduto parallelamente con il progresso tecnologico e con la messa a punto di strumentazioni analitiche sempre più efficienti e potenti. Il chimico organico analitico dispone di numerose e potenti armi (NMR, MS, CD, polarografia, ecc), ma solo il sapiente uso combinato di esse permette di giungere all'obiettivo. Nel perseguire tale obiettivo si cerca sempre di utilizzare tecniche non distruttive o alternativamente molto sensibili in modo da preservare parte dei campioni per i test farmacologici. È chiaro quindi che le tecniche spettroscopiche (NMR, IR, UV) e spettrometriche siano le tecniche preferite e le più adatte per tale lavoro.

Qui di seguito si analizzano brevemente gli approcci comunemente utilizzati per la determinazione della composizione amminoacidica e della sequenza di peptici lineari o ciclici attraverso tecniche NMR e di spettrometria di massa.

2.1.1. Spettrometria di massa

La prima applicazione di una tecnica spettrometrica risiede ovviamente nella possibilità di determinare la formula molecolare, sicuramente un parametro irrinunciabile per la caratterizzazione strutturale di una molecola organica.

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone; il catione radicalico che si forma (*ione molecolare*) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte generando cationi e/o radicali cationi (*ioni frammento*). Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi), vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector.

L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella *ionizzazione* di molecole in fase gassosa, nella *separazione* dei diversi ioni prodotti e nella loro *rivelazione*.

Il risultato dell'esperimento è lo spettro di massa, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica.

Questa tecnica quindi consente di misurare le masse molecolari e inoltre di ottenere informazioni strutturali che si spingono ben oltre, grazie alla possibilità di poter studiare i processi di frammentazione cui va incontro la molecola nello spettrometro.

Le frammentazioni risultano di fondamentale importanza proprio nell'analisi della sequenza di peptidi in quanto, essendo ben noto e razionalizzato il modo in cui uno scheletro peptidico frammenta, è possibile ottenere dall'analisi dei picchi di frammentazione preziose informazioni di sequenza.

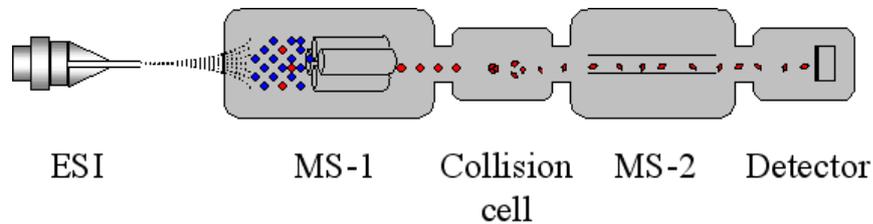
La tecnica di spettrometria di massa di elezione per l'analisi delle molecole peptidiche, ampiamente utilizzata negli ultimi anni, prevede l'uso di una sorgente ESI (*Electro Spray Ionization*).

Nella sorgente electrospray il campione è introdotto come soluzione in un solvente volatile, come acqua, metanolo, acetonitrile, cloroformio o loro miscele, talvolta contenente un po' di acido organico. Questa soluzione è spinta ad alta pressione attraverso un ago capillare, che è caricato ad un potenziale positivo di qualche migliaio di volt, e uscendo dall'ago si suddivide in tante piccole (1-2 μm) goccioline, generando uno spray. Dato l'elevato potenziale dell'ago, ogni gocciolina ha un eccesso di carica positiva. A causa delle loro ridotte dimensioni, il solvente evapora rapidamente da ogni gocciolina. La densità di carica della gocciolina quindi aumenta, finché diventa così alta che ioni positivi del soluto possono essere espulsi dalla gocciolina. Questi ioni sono poi spinti da un campo elettrico attraverso una serie di fenditure fino ad entrare nella zona a bassa pressione dello spettrometro di massa, dove sono poi accelerate ed inviate all'analizzatore. Una caratteristica fondamentale dell'electrospray è che, per molecole di massa piuttosto elevata, gli ioni che sono espulsi dalle goccioline hanno carica multipla, si tratta cioè di molecole poliprotonate. Per molti composti il numero delle cariche è più o meno proporzionale alla grandezza delle molecole, perciò il rapporto m/z di molecole che escono dall'electrospray è spesso nel range 500-2000. La formazione di ioni con cariche multiple è molto importante, perché riduce il rapporto massa/carica degli ioni, permettendo l'analisi di molecole molto pesanti come intere proteine.

L'unico svantaggio della sorgente ESI risiede nel fatto che, essendo una tecnica di ionizzazione piuttosto "soft", non produce frammentazioni. Questo limite può essere ampiamente superato grazie alla messa a punto di nuove strumentazioni basate essenzialmente sull'uso di trappole ioniche e/o sistemi MS/MS.

Un analizzatore a trappola ionica è un quadrupolo modificato, che consente l'intrappolamento dello ione pseudomolecolare e la sua frammentazione attraverso collisione con un gas inerte.

Le tecniche MS/MS tandem prevedono l'utilizzo di una sorgente e di due analizzatori messi in serie, separati da una camera di collisione.

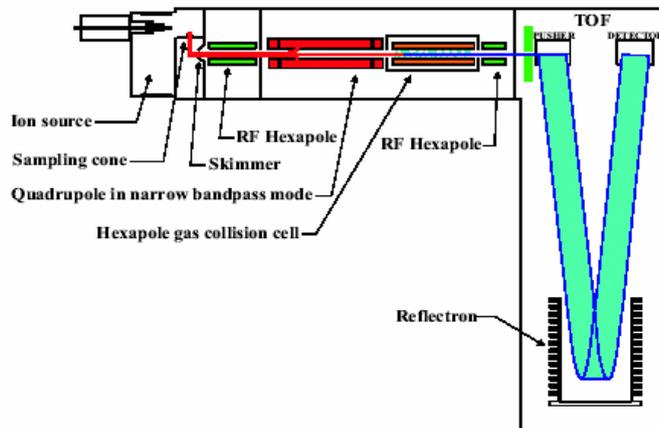


Il primo analizzatore è usato per selezionare un determinato ione (ione genitore MS1), che nella camera di collisione è fatto collidere con un gas a bassa pressione, il quale fornisce energia sufficiente per la frammentazione. Gli ioni figli prodotti saranno analizzati nel secondo analizzatore (MS2) e registrati.

In particolare, molto recentemente si è sviluppata una apparecchiatura MS/MS definita con la sigla ESI Q/TOF, dove alla sorgente ESI sono collegati due analizzatori; il primo è un quadrupolo classico ed il secondo è un TOF. L'analizzatore TOF è molto utilizzato in quanto si basa su un principio semplice; ioni di massa differente avranno differente velocità nell'arrivare al detector. Di conseguenza a differenza di tutti gli altri analizzatori non presenta limiti di massa registrabili. Per misurare il tempo di volo (*Time of fly*) occorre stabilire non solo il momento di arrivo al detector ma anche quello di partenza ed è per questo che esso deve essere abbinato esclusivamente a sorgenti impulsive (es. sorgente MALDI) se usato come unico analizzatore.

Una delle più recenti applicazioni prevede l'uso del TOF come secondo analizzatore in un'apparecchiatura MS/MS; ciò è notevolmente vantaggioso in quanto la sorgente utilizzata può essere di qualsiasi genere e non necessariamente impulsiva. Infatti il

momento di partenza del “*volo*” coincide con l’apertura della camera di collisione. Generalmente per aumentare la sensibilità e la risoluzione nell’analisi di massa tandem si usa l’apparecchiatura Q-TOF mostrata in figura:



Il TOF utilizzato in questo caso è un TOF con reflectron, in grado di produrre spettri di massa ad elevata risoluzione.

2.1.2. Spettroscopia NMR

Tra le tecniche usate per la determinazione strutturale dei metaboliti isolati, quella di gran lunga più importante è stata la risonanza magnetica nucleare (NMR). In particolare, oltre ai comuni esperimenti ^1H - e ^{13}C -NMR si è fatto un ampio uso di esperimenti NMR bidimensionali, che nella maggior parte dei casi sono stati sufficienti per la completa determinazione strutturale del composto in esame.

Gli esperimenti NMR bidimensionali presentano due importanti vantaggi rispetto ai corrispondenti esperimenti monodimensionali, e questi vantaggi diventano sempre più evidenti al crescere della complessità della molecola. In primo luogo si ha una drastica riduzione del tempo di acquisizione perché da un singolo spettro si possono ricavare informazioni ottenibili solo da un grande numero di spettri monodimensionali. Inoltre, la presenza di due dimensioni rende molto più

improbabile la possibilità di sovrapposizione di segnali, il che permette di discernere e attribuire anche nuclei che risuonano in zone molto affollate dello spettro.

Qui di seguito sono sommariamente descritti i principali esperimenti NMR bidimensionali usati.

COSY (COrrelation SpectroscopY):¹⁹ è un esperimento di correlazione omonucleare di *chemical shift* attraverso l'accoppiamento scalare spin-spin a due ($^2J_{H-H}$) o tre legami ($^3J_{H-H}$).

TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY):²⁰ come il COSY, è anch'esso un esperimento NMR bidimensionale di correlazione omonucleare, in cui però sono presenti cross peaks non solo in corrispondenza di nuclei direttamente accoppiati, ma anche tra qualunque coppia di protoni appartenenti allo stesso sistema di spin.

NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY):²¹ a differenza del COSY e del TOCSY che semplificano l'assegnazione dei segnali, l'esperimento NOESY fornisce informazioni conformazionali. L'esperimento, infatti, permette di osservare gli accoppiamenti dipolari (attraverso lo spazio) tra protoni appartenenti alla stessa molecola o a molecole diverse presenti in soluzione.

ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY):²² è analogo al NOESY ma si preferisce quando si studiano molecole con peso molecolare compreso tra 1000 e 2000 Dalton. Per quest'ultime, infatti, può accadere che gli effetti NOE positivi e negativi si elidano a vicenda. La tecnica ROESY non soffre tale limitazione in quanto tutti i segnali di correlazione danno luogo a NOE positivi, indipendentemente dalle dimensioni molecolari.

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence):²³ è un esperimento di correlazione eteronucleare di *chemical shift* ^1H - ^{13}C tramite la costante di accoppiamento diretta $^1J_{C-H}$.

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation):²⁴ questo esperimento consente di correlare ciascun protone con gli atomi di carbonio distanti due o tre legami.

Per determinare la struttura primaria di un polipeptide si devono seguire due tappe fondamentali:

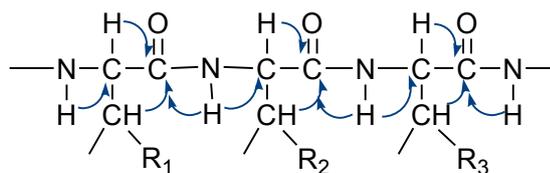
- ✓ Determinare la composizione amminoacidica ed assegnare tutte le risonanze di ciascun residuo.
- ✓ Connettere tra loro i residui attraverso lo studio di accoppiamenti dipolari ^1H - ^1H ed accoppiamenti scalari ^1H - ^{13}C .

Poiché ciascun amminoacido può essere considerato un sistema di spin isolato, l'analisi combinata di esperimenti bidimensionali di correlazione ^1H - ^1H , come COSY ed HOHAHA, consente di assegnare le risonanze protoniche per ciascun sistema di spin e quindi stabilire tutti i protoni appartenenti allo stesso amminoacido.

Ciò consente di determinare la composizione amminoacidica di un polipeptide.

Per connettere i residui tra loro, il passo successivo consiste nello studio delle correlazioni eteronucleari ^1H - ^{13}C , particolarmente utili nel caso delle molecole peptidiche. Dopo aver assegnato a ciascun protone il proprio carbonio attraverso l'analisi di uno spettro HSQC, si procede a correlare ciascun protone con gli atomi di carbonio distanti 2-3 legami.

A tal scopo si utilizza la tecnica HMBC che permette di individuare per ogni protone legato al C α -amminoacidico il proprio carbonile e consente di correlare ciascun carbonile con il protone dell'azoto ammidico dell'amminoacido successivo.

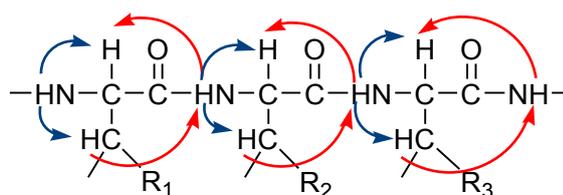


correlazioni HMBC

Informazioni di sequenza possono derivare anche dallo studio di spettri NOESY e ROESY.

Per quanto riguarda i peptidi, gli spettri devono essere acquisiti sciogliendo il campione in opportuni solventi, in genere polari protici o aprotici quali H_2O , DMSO o come nel nostro caso CD_3OH . Infatti in tali solventi i protoni normalmente scambiabili nei normali solventi deuterati (CD_3OD , D_2O , etc.) possono essere assegnati facilmente; e questo è particolarmente rilevante per gli idrogeni legati all'azoto coinvolto nel legame peptidico.

Infatti, assegnate le risonanze di tutti i protoni appartenenti a ciascun residuo amminoacidico, compreso il protone legato all'azoto, è possibile risalire alla sequenza studiando i cross-peaks intra ed inter-residuo a carico di ciascun protone legato al C α -amminoacidico.



correlazioni NOESY inter-residuo

correlazioni NOESY intra-residuo

In particolare le correlazioni NOE inter-residuo sono quelle più importanti oltre che le più intense. Di conseguenza l'analisi degli spettri NOESY permette di stabilire la struttura primaria di un polipeptide.

2.2. Determinazione della stereochimica

La conoscenza della stereochimica di una sostanza naturale rappresenta una tappa chiave nel processo di caratterizzazione strutturale della stessa. Solo conoscendo la stereochimica di una molecola è possibile risalire al suo assetto tridimensionale ed approcciare studi di tipo biologico, come ad esempio studi di interazione farmaco-recettore, o di tipo chimico, come gli studi relativi alla sintesi totale di molecole complesse con una buona attività farmacologica. Infatti, è ben noto che gli effetti che la chiralità ha sull'attività biologica sono spesso cruciali. La maggior parte dei composti di origine naturale presenta uno o più centri stereogenici. Di solito nella determinazione della stereochimica, si procede prima con lo stabilire la configurazione relativa dei vari stereocentri. Se, applicando specifiche metodologie, si riesce a stabilire una stereochimica relativa unica, mettendo in relazione tutti i centri chirali della molecola, è sufficiente la determinazione di un solo centro stereogenico per ottenere la configurazione assoluta di tutta la struttura. Se, invece, sono state determinate n stereochimiche relative, non correlabili tra loro, per ciascuna sub struttura bisognerà assegnare indipendentemente la configurazione assoluta.

Attraverso la spettroscopia NMR è possibile ottenere importanti informazioni sull'assetto tridimensionale delle molecole, soprattutto in sistemi rigidi.

I parametri più significativi nella determinazione della configurazione relativa attraverso l’NMR sono: i valori dei chemical shifts (δ), le costanti di accoppiamento (J) e gli effetti NOE.

I chemical shifts dei protoni sono influenzati dal loro intorno chimico, pertanto i protoni di due diastereoisomeri risentono di un intorno chimico differente.

Nell’ambito della spettroscopia NMR, possono essere ottenute numerose informazioni sulla stereochimica relativa di una molecola organica dallo studio dei valori delle costanti di accoppiamento (J_{H-H}). Infatti la legge di Karplus²⁵

$${}^3J = A \cos^2 \sigma + B \cos \sigma + C$$

evidenzia che il valore di tali costanti, sia omonucleari ${}^3J_{H-H}$, che eteronucleari ${}^3J_{C-H}$, dipende dall’angolo diedro σ tra gli atomi accoppiati. I valori di ${}^3J_{H-H}$ sono molto piccoli, circa 0-1.5 Hz, quando σ è circa 90° , mentre essi sono generalmente piuttosto grandi quando σ è intorno a 0° o 180° , generalmente J_{180° è maggiore di J_{0° . Di conseguenza è possibile distinguere facilmente una relazione assiale-assiale tra due protoni di un ciclo a sei termini, ${}^3J_{a-a} \sim 7-9$ Hz, rispetto a quella assiale-equatoriale e a quella equatoriale-equatoriale, ${}^3J_{a-e} \sim {}^3J_{e-e} \sim 2.5$ Hz. Inoltre è possibile discriminare facilmente la relazione *cis-trans* tra i protoni di un doppio legame, ${}^3J_{cis} \sim 6-12$ Hz, ${}^3J_{trans} \sim 14-20$ Hz.

Altre importanti informazioni riguardanti la stereochimica, in particolare la configurazione relativa dei centri stereogenici di una molecola, possono essere ottenute dallo studio degli accoppiamenti omonucleari tra protoni spazialmente vicini (accoppiamento dipolare) e non necessariamente accoppiati attraverso i legami (accoppiamento scalare). Mentre si registra lo spettro si può irradiare un segnale con una radiazione corrispondente alla sua frequenza di risonanza. Se l’intensità della radiazione è sufficientemente alta, il segnale si "satura", scomparendo dallo spettro. La saturazione del segnale ha due conseguenze notevoli: a) gli accoppiamenti degli altri protoni presenti sulla molecola con il protone irradiato scompaiono (tecnica di disaccoppiamento); questa tecnica permette di semplificare i multipletti complessi determinati da più accoppiamenti; b) La velocità di rilassamento di protoni spazialmente vicini a quello irradiato aumenta (l’aumento diminuisce con la distanza alla sesta potenza). Questo effetto favorisce il ripristino della popolazione di

Boltzmann, cioè favorisce il ritorno dei nuclei allo stato fondamentale, e si traduce in un aumento dell'intensità del segnale (effetto NOE: "Nuclear Overhauser Enhancement"). L'effetto può essere utilizzato per stabilire una relazione spaziale tra i sostituenti di una molecola, a patto che la molecola abbia una certa rigidità.

Le intensità delle interazioni dipolari NOE sono fortemente dipendenti dalla dimensione della molecola; infatti al crescere delle dimensioni della molecola gli accoppiamenti NOE sono prossimi allo zero, e quindi difficilmente evidenziabili. Per superare questo limite si può utilizzare l'esperimento ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect SpettroscopY) un esperimento bidimensionale di correlazione omonucleare, basato sul fenomeno ROE (Rotating-frame Overhauser Effect). Il ROE è un fenomeno simile al NOE, che però può essere messo in evidenza solo con esperimento 2D e, al contrario del NOE, è sempre positivo.

2.2.1. Metodo di Murata

La spettroscopia NMR è certamente uno degli strumenti tecnici più accurati per la determinazione della stereochimica relativa di composti organici e la sua applicazione rappresenta ormai una consuetudine nei più moderni laboratori di ricerca. Di norma le tecniche NMR sono applicate per l'analisi stereochimica di composti con proprietà conformazionali ben definite, e dotate di una certa rigidità. Normalmente composti ciclici con piccoli anelli (3-6 termini) mostrano un assetto conformazionale rigido piuttosto prevedibile mediante la misura di semplici parametri NMR, come le costanti (J) di accoppiamento protone-protone e l'intensità dell'accoppiamento dipolare, misurata attraverso i volumi degli effetti NOE (Nuclear Overhauser Effect).

Un aspetto più difficile è l'assegnazione della configurazione relativa nel caso di sistemi flessibili, come catene aperte polisostituite e/o composti macrociclici, per i quali non è tutt'oggi possibile definire una strategia stereochimica certa.

In sistemi aciclici tutte le costanti di accoppiamento osservate rappresentano la media ponderale di ogni conformero presente all'equilibrio, e per questo motivo gli angoli diedri ottenuti da questi dati danno informazioni molto più affidabili sul conformero più stabile rispetto ai dati ottenuti col NOE. Tuttavia l'uso delle sole costanti di

accoppiamento omonucleari ($^3J_{H-H}$), per l'assegnazione della stereochimica relativa in sistemi flessibili non è facilmente applicabile, poiché esse non permettono di discriminare tra tutti i possibili arrangiamenti spaziali dei sostituenti legati ad un frammento di due carboni, come è indispensabile per poter individuare il conformero con la corretta configurazione (figura 2).

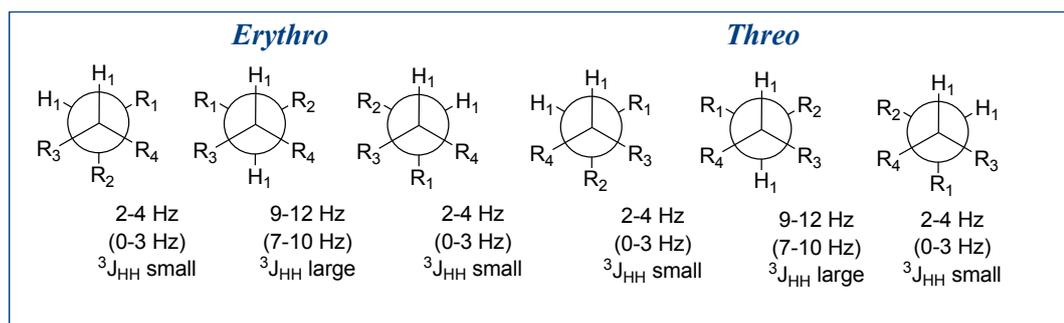
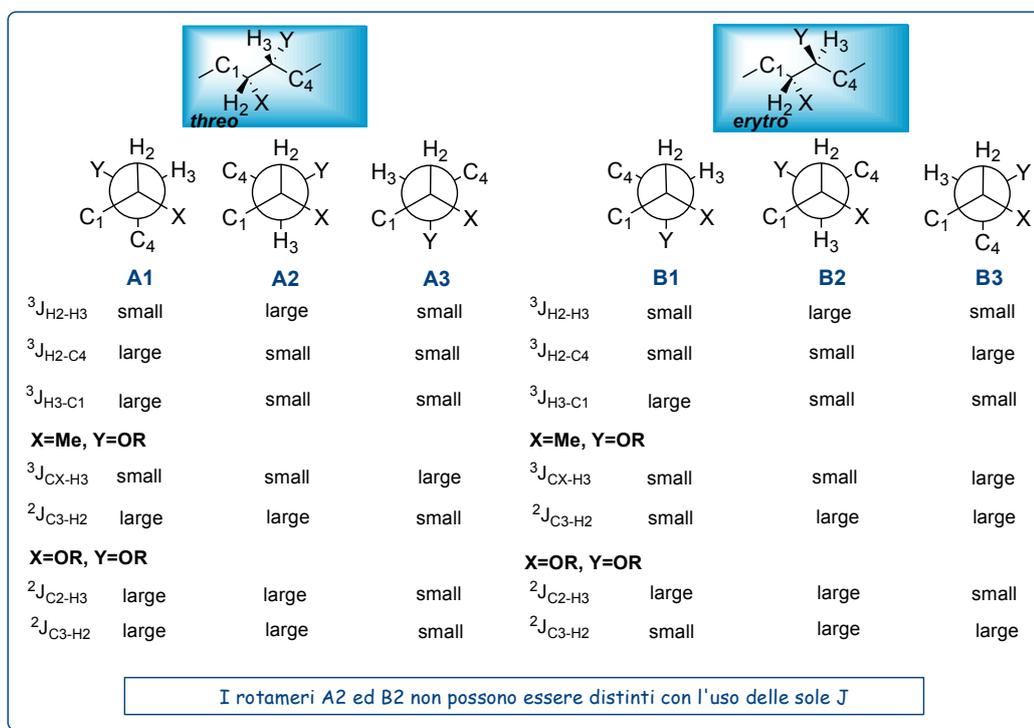


Figura 2. Valori delle $^3J_{H-H}$ per tutte le possibili conformazione sfalsate corrispondenti agli stereoisomeri erythro e threo per ogni frammento C2

In altre parole, anche se focalizziamo la nostra attenzione solo su conformazioni sfalsate, in mancanza di informazioni aggiuntive sulla geometria del sistema, una sola restrizione angolare per ogni segmento C2 non è sufficiente a risolvere il problema, che potrebbe essere risolto soltanto raccogliendo maggiori dati sperimentali. La situazione cambia drasticamente quando ulteriori informazioni sulle disposizioni angolari del frammento C2 derivano da costanti di accoppiamento eteronucleari ($^{2,3}J_{C-H}$). Questi valori di J ampiamente usati negli studi NMR di biopolimeri marcati²⁶ sono stati fino a poco tempo fa inaccessibili ai chimici organici, ma oggi, grazie al progresso conseguito nell'ambito delle tecniche NMR bidimensionali, allo sviluppo di nuovi software e alla diffusione di campi magnetici sempre più alti (500-700 MHz), è stato possibile misurare i valori delle J_{C-H} su un gran numero di composti organici. Su questa base, Murata²⁷ ed i suoi collaboratori hanno formulato un metodo per l'assegnazione della configurazione relativa di composti aciclici basandosi sull'uso combinato di costanti di accoppiamento protone-protone omonucleari ($^3J_{H-H}$), costanti di accoppiamento protone-carbonio eteronucleari ($^{2,3}J_{C-H}$) e dati NOE.

Questo metodo è applicabile a strutture acicliche contenenti carboni stereogenici che portano gruppi ossidrilici, alcossi o sostituenti metilici. La sua validità per composti organici recanti sostituenti elettronattrattori, come il gruppo nitro o il carbonile è tutt'ora oggetto di studio. Una molecola chirale contenente centri stereogenici consecutivi o alternati può essere idealmente divisa in frammenti di due atomi di carbonio ciascuno. Come si può osservare dallo schema 1 questa semplificazione permette per un singolo frammento di discriminare, attraverso l'uso di un approccio NMR basato sulle J , tra i sei possibili conformeri sfalsati, il rotamero con configurazione esatta. Per semplicità si può confrontare ogni singola coppia di carboni asimmetrici vicinali con quelli di un sistema butano 2,3-disostituito.

Schema 1



Tale strategia può essere applicata ad un gran numero di prodotti naturali e sintetici, nei quali i sostituenti sono gruppi metossilici, ossidrilici o metilici. Un butano 2,3-disostituito può avere due configurazioni relative diastereomeriche, definite *sin* (o *threo*) e *anti* (o *erythro*), ognuna di queste due configurazioni può presentarsi in tre rotameri sfalsati per un totale di sei possibili conformeri come mostra lo schema 1 (A1, A2, A3, B1, B2, B3). Ogni singolo rotamero mostra il proprio pattern di

costanti di accoppiamento omonucleari ed eteronucleari. Considerando di avere un numero sufficiente di costanti di accoppiamento vicinali e geminali sperimentali, è possibile discriminare uno tra i sei possibili rotameri.

I due rotameri A2 e B2, caratterizzati da una assetto anti dei due protoni vicinali, possono essere distinti solo sulla base di dati NOE (o ROE) perché mostrano lo stesso pattern di costanti di accoppiamento.

Quindi il primo step nella determinazione della configurazione relativa di due metini vicinali consiste nel valutare le costanti di accoppiamento protone-protone omonucleari del frammento C2 d'interesse, per stabilire se esiste o meno una conformazione predominante.

Piccoli valori (small) di ${}^3J_{\text{H-H}}$ (0-4 Hz) indicano un arrangiamento *gauche* tra i protoni H2 e H3. In questo caso la configurazione relativa può essere ottenuta valutando tre o quattro restrizioni angolari aggiuntive derivanti dai valori di costanti di accoppiamento eteronucleari. I valori di ${}^{2,3}J_{\text{C-H}}$ possono stabilire l'arrangiamento (*gauche* o *anti*) di H2 rispetto ai sostituenti Y e C4 e l'arrangiamento di H3 nei confronti dei sostituenti X e C1; perciò è possibile scegliere il rotamero *gauche* giusto tra A1, A3 (*threo*), B1 e B3 (*erythro*) (schema 1).

Alti valori (large) di ${}^3J_{\text{H-H}}$ (8-12 Hz) indicano invece una disposizione *anti* dei due protoni. I valori ${}^{2,3}J_{\text{C-H}}$ sono gli stessi per entrambi i rotameri A2 (*threo*) e B2 (*erythro*) (schema 1) e quindi non è possibile in questo caso discriminare tra loro. E' necessario l'uso di dati NOE relativi ai protoni su carboni C1 e C4 e ai protoni sui sostituenti Y ed X. Infatti un effetto NOE tra protoni al C1 e C4 e/o un effetto NOE tra protoni su Y e X indica che il rotamero A2 dello schema 1 è quello predominante, di contro un NOE tra protoni sul C1 e su Y e/o un NOE tra protoni su C4 e su X è indicativo che il rotamero predominante è B2.

Valori intermedi (medium) di ${}^3J_{\text{H-H}}$ (4-8 Hz) sono di norma indicativi di un'interconversione tra due o più conformeri che risulta essere più veloce del tempo di acquisizione dello spettro NMR. In tal caso, è possibile identificare i conformeri che si alternano utilizzando lo stesso metodo descritto precedentemente ma ponendo un'attenzione maggiore nella valutazione e nella esecuzione dello spettro stesso. Può essere d'aiuto in caso di complessi equilibri conformazionali, per esempio, eseguire spettri NMR a basse temperature in quanto in tal modo, si aumenta la popolazione presente all'equilibrio del conformero più stabile.

Il metodo introdotto da Murata permette di determinare la configurazione relativa di sistemi contenenti gruppi metinici asimmetrici vicinali e/o separati da uno o più gruppi metilenici, disponendo di un numero sufficiente di valori di costanti di accoppiamento J accuratamente misurate. Per piccole molecole, le $^3J_{\text{H-H}}$ omonucleari possono essere facilmente determinate con l'analisi di uno spettro protonico monodimensionale. Tuttavia, l'uso di tecniche bidimensionali NMR più sofisticate, come E. COSY²⁸ o P.E. COSY,²⁹ è indispensabile quando la lettura dei valori di J negli spettri protonici di prodotti ad alto e medio peso molecolare è ostacolata da un gran numero di segnali.

I valori di $^{2,3}J_{\text{C-H}}$ long range eteronucleari sono divenuti disponibili dopo l'introduzione delle tecniche NMR a fase inversa³⁰ e con l'incremento di hardware di pulse-field-gradient (PFG). Questi valori sono determinati nel metodo originalmente proposto da Murata, attraverso esperimenti 2D hetero half-filtered TOCSY (HETLOC),^{31,32} phase sensitive HMBC (PS-HMBC).³³⁻³⁶

Sebbene il metodo di Murata rappresenti un metodo altamente innovativo che ha fornito un contributo fondamentale alla determinazione della stereochimica relativa di molecole organiche flessibili, esso presenta dei limiti considerevoli che, in alcuni casi, possono portare ad errori nell'attribuzione della configurazione. Uno dei principali limiti risiede proprio nella difficoltà intrinseca di dare il "giusto peso" alle costanti di accoppiamento $^{2,3}J_{\text{C-H}}$ definite da Murata troppo genericamente come *small*, *large* e *medium*. Infatti, mentre per le costanti di accoppiamento omonucleari protoniche $^3J_{\text{H-H}}$ sono state elaborate, anche con il supporto dei dati sperimentali, equazioni multiparametriche per una valutazione abbastanza accurata di tali costanti, in letteratura sono pressoché assenti dati che consentono di dare un apprezzamento attendibile delle costanti di accoppiamento eteronucleari.

A questo inconveniente si aggiunge l'impossibilità di risolvere i problemi di attribuzione stereochimica quando il frammento C2 in analisi, presenta una conformazione predominante di tipo *anti*, dove i due stereoisomeri *erythro* e *threo* presentano lo stesso pattern di J .

Grande contributo al superamento di questi limiti è stato dato da un metodo di recente messo a punto dal gruppo di ricerca Riccio-Gomez-Bifulco-Bassarello³⁷ dell'Università di Salerno con cui il nostro gruppo di ricerca collabora da tempo. Tale metodo rappresenta una strategia per l'analisi configurazionale di molecole organiche flessibili basata sull'uso di calcoli quanto-meccanici (QM)^{38,39} in grado di

fornire una predizione quantitativa dei valori delle J che successivamente vanno confrontate con le corrispondenti J sperimentali. Il metodo di Murata modificato⁴⁰ ha quindi mantenuto l'innovatività del metodo originario di Murata ma ne ha superato i limiti e se gestito da “mani esperte” consente la predizione della stereochimica con un elevato grado di accuratezza.

Dati due centri stereogenici adiacenti il metodo QM ci consente di predire il valore delle costanti di accoppiamento omo ed eteronucleari per tutti i sei possibili rotameri mostrati in figura 8 in termini quantitativi e non qualitativi (non più *small*, *large* e *medium*)⁴¹⁻⁴³ attraverso dei calcoli quantomeccanici basati sulla teoria della “densità funzionale” (DFT).^{44,45}

L'applicazione di questo metodo prevede la disconnessione ideale dell'intera molecola in frammenti ciascuno contenente una coppia di stereocentri.

La disconnessione della molecola in frammenti C2 rappresenta una prerogativa indispensabile per facilitare il calcolo quantomeccanico. E' noto infatti che i valori di *chemical shift* sono influenzati notevolmente dalla presenza di gruppi funzionali a 3 e 4 legami di distanza e dall'assetto conformazionale che la molecola assume nello spazio mentre i valori di costanti di accoppiamento dipendono essenzialmente dall'intorno chimico limitato e gli effetti che si estendono al di là di due legami dai nuclei in esame non sono rilevanti.

L'intero “data set” di costanti di accoppiamento così calcolate è poi confrontato con le J sperimentali consentendo di ottenere la configurazione relativa per il frammento C2 esaminato.⁴⁶⁻⁴⁸

Prima di effettuare i calcoli quantomeccanici, ognuno dei sei rotameri è sottoposto ad una “ottimizzazione dell'assetto geometrico” usando una funzione mPW1PW91 che usa il set base del software di tipo gaussiano definito 6-31-G-(d).⁴⁹

Su questi assetti geometrici preferenziali segue poi il calcolo delle costanti di accoppiamento attraverso il software 6-31G-(d,p), effettuato tenendo conto dei contributi di tutte le possibili interazioni: Fermi (FC), paramagnetiche spin-orbita (PSO), diamagnetiche spin-orbita (DSO) e dipolo-spin (DSI). Come atteso il contributo FC è il termine più importante, attraverso il quale si può valutare l'accuratezza e la precisione prevista per l'applicazione del seguente metodo.⁵⁰

2.2.2. Metodo di Marfey

Uno dei metodi più utilizzati per la determinazione della serie sterica degli amminoacidi convenzionali è il metodo di Marfey.⁵¹ Questo metodo prevede la derivatizzazione di amminoacidi derivati dall'idrolisi acida del peptide intatto con un reattivo chirale, l'1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninammide (L-FDAA) e il confronto dei tempi di ritenzione in HPLC degli amminoacidi presenti nel peptide così derivatizzati con i tempi di ritenzione dei corrispondenti standard D e L derivatizzati con lo stesso reattivo.

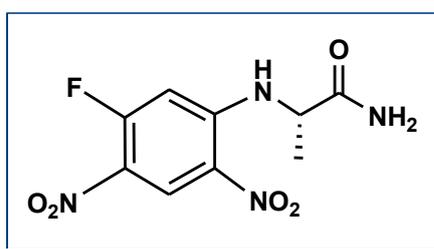


Figura 3. Struttura dell'L-FDAA

Per gli amminoacidi di cui si dispone di standard commerciali il lavoro risulta piuttosto agevole e consiste in più fasi sequenziali:

- Idrolisi del peptide con HCl 6N
- Derivatizzazione dell'idrolizzato con L-FDAA
- Derivatizzazione degli standard con L-FDAA; per ogni amminoacido si utilizza sia lo standard di serie sterica L che quello di serie sterica D. Qualora lo standard di serie sterica D non sia disponibile commercialmente, oppure risulti troppo costoso, si può derivatizzare l'amminoacido L con il D-FDAA.
- Analisi in LC/MS dei campioni derivatizzati e paragone dei rispettivi tempi di ritenzione.

Nonostante i numerosi vantaggi di tale metodo, rappresentati principalmente dall'elevata semplicità operativa e dal basso costo, esso presenta però un grosso limite. Infatti, il metodo di Marfey non ha un'applicabilità universale dal momento che può essere determinata la serie sterica solo per amminoacidi convenzionali, per i quali si dispone di standard. Un altro problema risiede nella possibilità di incorrere in errori di assegnazione basandosi esclusivamente sui t_R in HPLC.

Per quanto riguarda quest'ultimo problema, l'uso della LC/MS consente di migliorare le caratteristiche di attendibilità poiché le identità dei picchi vengono assegnate con l'ausilio delle informazioni di massa.

In tempi abbastanza recenti è apparsa in letteratura una modifica cromatografica del Marfey denominata "Metodo di Marfey Avanzato"⁵² che consente di determinare la serie sterica di amminoacidi non convenzionali per i quali non si dispone di standard. Il metodo, che si basa sull'ordine di eluizione di amminoacidi derivatizzati con L-FDAA, è stato testato su una serie di amminoacidi proteinogenici e non,⁵³ e ha mostrato che quasi invariabilmente l'amminoacido di serie L derivatizzato con L-FDAA viene eluito in una colonna C18 prima del suo corrispondente enantiomero D, sempre derivatizzato con L-FDAA.

È stato ben stabilito, dalle misurazioni NMR e UV che la risoluzione tra amminoacidi derivatizzati di serie sterica L e D è dovuta da una differente idrofobicità determinata da un riarrangiamento *cis* o *trans* dei sostituenti a maggiore idrofobicità presenti sull'amminoacido e sull'L-FDAA. In particolare è stato osservato un riarrangiamento di tipo *cis* per lo stereoisomero D-(amminoacido)-L-FDAA, che essendo maggiormente idrofobico interagisce più fortemente con la fase C18 mostrando un tempo di ritenzione maggiore rispetto allo stereoisomero meno idrofobico L-(amminoacido)-L-FDAA, che si dispone preferenzialmente in un riarrangiamento di tipo *trans* (Figura 4). Questo metodo ha superato i limiti del convenzionale Metodo di Marfey in quanto, si è prestato bene alla definizione della serie sterica di amminoacidi non convenzionali.

In pratica in presenza di un amminoacido non proteinogenico di cui si voglia definire la serie sterica si procede nel modo seguente:

- Un'aliquota di amminoacido si derivatizza con L-FDAA
- Un'aliquota di amminoacido si derivatizza con D-FDAA
- Analisi dei t_R su LC/MS

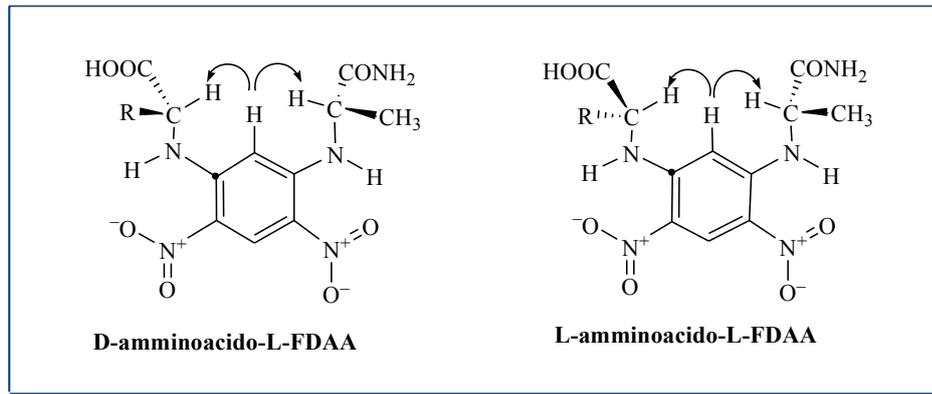


Figura 4. Struttura dei derivati FDAA di L e D amminoacidi

Per le caratteristiche precedentemente delineate il metodo risulta applicabile:

- Per determinare la configurazione assoluta dell' α -stereocentro di α -amminoacidi.
- Per assegnare la configurazione assoluta di un residuo α -amminoacidico con più stereocentri a patto che sia nota la configurazione relativa.

Il metodo non è applicabile:

- Ad amminoacidi con un gruppo amminico non in posizione α .
- Ad amminoacidi con più di un centro stereogenico a meno che non si abbiano informazioni addizionali sull'assetto relativo dei vari centri stereogenici.

2.2.3. Metodo di Mosher

Un metodo molto efficiente per la determinazione della configurazione assoluta di composti organici in soluzione è basato sull'uso di tecniche NMR. Il metodo consiste nella derivatizzazione di un substrato chirale (A) per il quale si vuole determinare la configurazione assoluta o la purezza enantiomerica con i due enantiomeri di un agente derivatizzante chirale (CAD) e nell'analisi degli spettri NMR dei due risultanti diastereoisomeri. La configurazione di A è stabilita sulla base di un modello conformazionale che mette in correlazione tale configurazione con il segno delle differenze osservate per i chemical shifts protonici ($\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$) dei sostituenti direttamente legati al centro stereogenico (L_1/L_2).

Nella figura 5 sono riportate le strutture generiche del substrato A, dell'agente derivatizzante chirale CAD e dei due diastereoisomeri sottoposti ad analisi NMR.

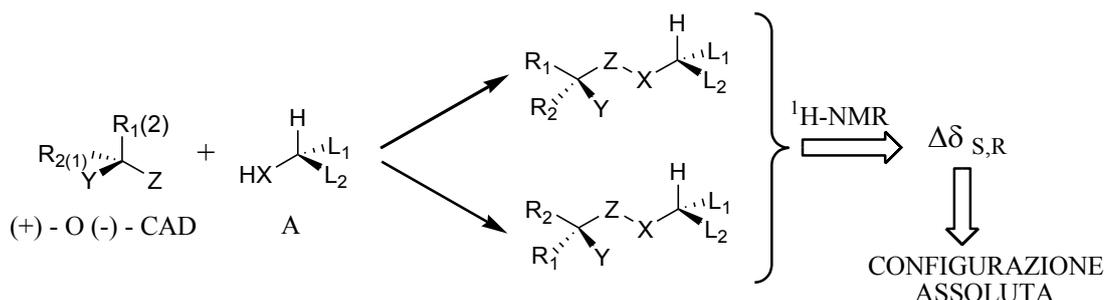


Figura 5. Metodo generale di determinazione della configurazione assoluta attraverso l’NMR

Di solito la reazione di derivatizzazione utilizzata è una reazione di acilazione e quindi il substrato chirale è un alcol secondario (caso più comune) o un alcol primario con un centro stereogenico in α , o un'ammina o un acido carbossilico.

L'agente derivatizzante chirale deve invece presentare i seguenti requisiti: a) deve contenere un gruppo funzionale (Z) in grado di reagire quantitativamente con il gruppo funzionale del substrato; b) deve contenere un sostituente (Y) a forte carattere anisotropico (di solito un anello aromatico), in modo da influenzare i chemical shifts dei sostituenti L_1 e L_2 ; c) dovrebbe contenere un gruppo polare (W) in grado di bloccare i derivati in una conformazione preferenziale.

L'agente derivatizzante chirale di gran lunga più utilizzato è il reattivo di Mosher (cloruro dell'acido 2-metossi-2-fenil-2-trifluorometilacetico o MTPA) (Figura 6).

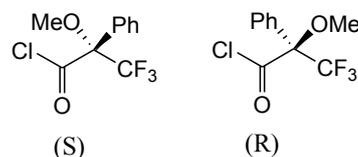


Figura 6. MTPA

Sulla base delle osservazioni sperimentali accumulate su una serie di alcoli secondari a configurazione nota, Mosher⁵⁴ osservò che c'era un andamento sistematico dei valori dei chemical shift dei protoni dei corrispondenti esteri derivatizzati con il reattivo di Mosher.

I dati sperimentali potevano essere razionalizzati ammettendo l'esistenza in soluzione di una conformazione preferenziale, in cui il protone carbinolico, il carbonile estereo e il gruppo trifluorometilico si trovano sullo stesso piano, detto piano dell'MTPA.

Se l'MTPA estere si trova nella conformazione ipotizzata, Mosher osservò che i valori di chemical shift dei protoni H_A vicino al centro carbinolico chirale, nell'(S)-MTPA sono maggiori dei corrispondenti valori osservati per l'(R)-MTPA.

Una revisione del metodo di Mosher da parte di Kakisawa e Kashman,⁵⁵ indicato come "Metodo di Mosher modificato", è quella che viene utilizzata attualmente per la determinazione della configurazione assoluta di alcol secondari chirali. I principi guida del metodo di Mosher modificato sono gli stessi proposti originariamente da Mosher, solo che, grazie alle moderne tecnologie, si cerca di assegnare il maggior numero possibile di risonanze protoniche dei gruppi adiacenti al centro carbinolico. Una volta assegnate le risonanze protoniche, per ciascuno dei due esteri diastereoisomerici, si calcolano i valori di $\Delta\delta$, per convenzione riportati come $\delta_S - \delta_R$. Se l'estere assume la conformazione preferenziale riportata (Figura 7), si osserva che tutti i protoni localizzati alla sinistra del piano dell'MTPA avranno valori $\Delta\delta < 0$, mentre quelli a destra avranno valori $\Delta\delta > 0$.

Se questa condizione è rispettata, la configurazione assoluta sarà indicata dal modello A.

CAPITOLO 3

Presentazione del lavoro svolto

L'attività di ricerca che ho svolto durante i tre anni di Dottorato va collocata nel campo della chimica delle sostanze naturali marine ed è stata focalizzata sull'isolamento di metaboliti secondari biologicamente attivi da poriferi e su studi stereochimici e sintetici.

Un primo progetto di ricerca ha riguardato le **Callipeltine**.

Le Callipeltine A, B e C sono stati i primi peptidi isolati nei nostri laboratori nel 1996 dalla spugna *Callipelta* sp. Il capostipite di questa famiglia di peptidi è la **Callipeltina A**.⁸⁻¹⁰

L'isolamento di questi peptidi ha suscitato l'attenzione di numerosi gruppi di ricerca, sia a livello nazionale che internazionale, non solo per le peculiarità strutturali che li contraddistinguono ma anche per le innumerevoli attività farmacologiche che hanno mostrato. Gli sforzi da parte dei diversi gruppi di ricerca, volti sia agli aspetti strutturali che farmacologici, sono testimoniati da numerosi articoli apparsi in letteratura.

Nel gruppo di ricerca nel quale ho svolto il mio Dottorato è in atto da tempo un ampio ed articolato progetto che riguarda tali metaboliti.

Recentemente è stato avviato uno studio di estrazione sulla spugna *Latrunculia* sp. i cui estratti polari avevano mostrato contenere callipeltine. Da una più approfondita analisi di tali estratti sono stati isolati una serie di nuovi derivati, le Callipeltine D-M, che risultano analoghi tronchi della Callipeltina C, il derivato lineare della Callipeltina A.

In particolare nei tre anni di attività di ricerca mi sono interessata dell'isolamento, della caratterizzazione strutturale e stereochimica delle Callipeltine J-M.

Un secondo progetto di ricerca ha riguardato invece l'analisi degli estratti polari della spugna *Homophymia* sp. che ha portato all'isolamento di un nuovo ciclodepsipeptide bioattivo denominato **Homophymina A**.⁵⁶

In tale ambito mi sono interessata dell'isolamento, della caratterizzazione strutturale e stereochimica dell'Homophymina A. Tra i numerosi target di questo progetto vi è anche la sintesi delle unità non proteinogeniche presenti nell'Homophymina A.

In tale contesto la sintesi stereoselettiva di amminoacidi non ribosomiali offre alla comunità scientifica nuovi sintoni la cui funzione è quella di costituire standard per lavori strutturali e stereochimici, innovativi building blocks per la costruzione di analoghi semplificati e di metaboliti affini all'Homophymina A o di derivati di natura peptidica o peptidomimetica.

In considerazione dell'interesse suscitato da tale ciclodepsipeptide e allo scopo di individuare ulteriori fonti naturali di homophymine, recentemente abbiamo avviato un ampio screening sulla spugna *Homophymia* sp. che ha portato all'isolamento delle homophymine A-E e A₁-E₁.

Tutte le homophymine isolate sono state sottoposte ad uno screening farmacologico mostrando una discreta attività *Antiplasmodium* e una attività citotossica su differenti linee cellulari tumorali.

Gli estratti polari della spugna *Homophymia* sp. sono tutt'ora sottoposti ad un intenso programma di frazionamento al fine di isolare nuove homophymine con lo scopo ultimo di costruire una piccola library di peptidi per approfondire le relazioni di tipo struttura-attività.

CAPITOLO 4

4.1. Le Callipeltine

Le Callipeltine, come già detto precedentemente, sono una famiglia di peptidi isolati da spugne marine dal gruppo di ricerca con cui ho lavorato durante il mio Dottorato.

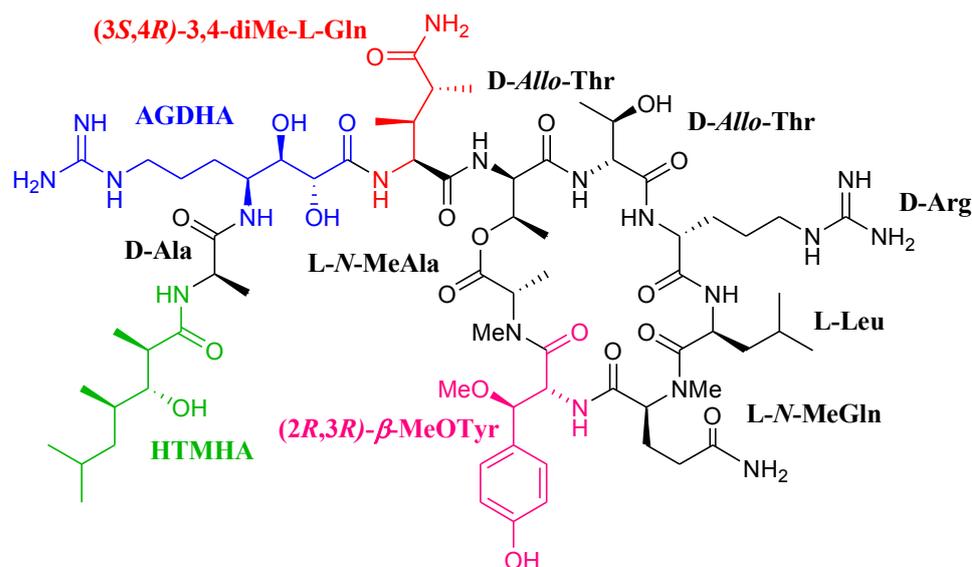
La **Callipeltina A (2)**, il metabolita principale, è stata isolata nel 1996 da una spugna dell'ordine Lithistidae, la *Callipelta* sp.⁸⁻¹⁰, raccolta nelle acque della Nuova Caledonia.

La comunità scientifica ha mostrato sin dall'inizio un grande interesse nei confronti della Callipeltina A, sia per le sue numerose peculiarità strutturali, che per le innumerevoli attività farmacologiche mostrate:

1. attività antifungina (contro *Fusarium oxysporium*, *Helminthosporium sativum* e *Phytophthora hevea*);
2. attività citotossica (contro cellule di tipo KB e P388);
3. potente ma non selettiva attività anti-HIV;
4. attività inotropica positiva (recentemente scoperta).

Attraverso l'applicazione estensiva di tecniche NMR mono e bidimensionali e metodi di degradazione chimica è stata definita la struttura chimica di tale metabolita.

Tali studi hanno mostrato la presenza di un anello macrociclico, derivante dalla lattonizzazione dell'unità C-terminale (*N*-MeAla) con il gruppo ossidrilico di un residuo di treonina, e il blocco dell'estremità *N*-terminale (Ala) con un β -idrossiacido, l'acido 3-idrossi-2,4,6-trimetileptanoico (HTMHA). Dei dieci residui amminoacidici che costituiscono la struttura della Callipeltina A solo due sono comuni L-amminoacidi (Ala, Leu). Sono infatti presenti amminoacidi appartenenti alla serie sterica D (due residui di *D-allo*-Thr e una *D*-arginina) e due amminoacidi *N*-alchilati (L-*N*-MeGlu e L-*N*-MeAla). I rimanenti residui sono amminoacidi insoliti: la (3*S*,4*R*)-3,4-dimetil-L-glutammina, la (2*R*,3*R*)- β -metossitirosina e l'acido (2*R*,3*R*,4*S*)-4-amino-7-guanidino-2,3-diidrossieptanoico (AGDHA), tutti i tre senza precedenti in sostanze di origine naturale.



Callipeltina A (2)

La caratterizzazione stereochimica della Callipeltina A ha richiesto un lungo lavoro, durato alcuni anni, che ha visto l'applicazione di un approccio combinato di tecniche di degradazione chimica, analisi spettroscopiche e spettrometriche, sintesi stereoselettiva e isolamento delle singole unità amminoacidiche.

Per la determinazione della configurazione assoluta dei residui amminoacidici convenzionali si è ricorso al metodo di Marfey.⁵¹

Per la determinazione della stereochimica degli amminoacidi non convenzionali, un'aliquota della Callipeltina A è stata sottoposta ad idrolisi acida; la miscela ottenuta, dopo trattamento con diclorometano per l'estrazione del residuo apolare di acido 3-idrossi-2,4,6-trimetileptanoico (HTMHA), è stata frazionata nei suoi componenti amminoacidici mediante DCCC.

La determinazione della configurazione di due residui amminoacidici non proteinogenici (AGDHA e diMeGlu) e dell'HTMHA è stata realizzata attraverso una combinazione di metodi chimici (reazioni di degradazione), spettroscopici (misure di costanti di accoppiamento, effetti NOE e metodo di Mosher modificato⁵⁵), chirottici (CD) e di analisi conformazionale (calcoli di meccanica molecolare).

Per quanto riguarda l'unità di β-idrossiacido (HTMHA), l'iniziale attribuzione della stereochimica assoluta come 2R,3R,4S, attraverso il metodo di Mosher modificato⁵⁵ e calcoli di meccanica molecolare, è stata successivamente rivista grazie alla sintesi enantioselettiva realizzata dal nostro gruppo di ricerca e stabilita come 2R,3R,4R.⁵⁷

Per quanto riguarda invece la (3*S*,4*R*)-3,4-dimetil-L-glutammina recentemente sono state proposte tre sintesi di tale unità. Le sintesi riportate dal gruppo di Lipton⁵⁸ e da quello di Hamada⁵⁹ utilizzano un approccio molto simile, che prevede l'uso dell'acido *S*-piroglutammico come prodotto di partenza, mentre la sintesi proposta dal gruppo di Joullie⁶⁰ prevede una addizione asimmetrica di Michael sul *trans*-crotil cloruro, seguita da un'azidazione elettrofila, con la generazione dei tre centri stereogenici adiacenti mediante l'uso dello stesso ausiliario chirale. I dati CD e NMR del derivato sintetico in paragone con quelli del corrispondente derivato ottenuto dopo idrolisi acida della Callipeltina A hanno confermato la stereochimica da noi originariamente proposta.

Più complessa è la situazione relativa all'unità di acido (2*R*,3*R*,4*S*)-4-ammino-7-guanidino-2,3-diidrossieptanoico (AGDHA). La stereochimica relativa di tale unità è derivata da calcoli di dinamica molecolare, mentre la configurazione *S* al C-4 è stata determinata sottoponendo la funzione diolica vicinale al C2-C3 di tale residuo nel peptide intatto a scissione ossidativa; dopo idrolisi ed applicazione del metodo di Marfey⁵¹ si è ottenuta la L-Arg. Pur essendo apparse in letteratura due sintesi di tale unità esse appaiono poco soddisfacenti sia in termini di resa che di diastereoselezione. La recente pubblicazione però da parte del gruppo di Lipton⁶¹⁻⁶² sulla sintesi totale della callipeltina D ha dato definitiva conferma alla stereochimica dell'unità di AGDHA proposta inizialmente dal nostro gruppo.

Il problema dell'assegnazione della stereochimica dell'unità di β -metossitirosina è stato recentemente risolto dal nostro gruppo di ricerca attraverso un approccio combinato di NMR-sintesi enantioselectiva-LC/MS. In una prima fase l'assetto relativo dei due stereocentri presenti in questa unità è stato dedotto attraverso l'applicazione alla Callipeltina A del metodo di Murata modificato secondo un approccio quanto-meccanico.⁶³ In pratica dal confronto tra le costanti di accoppiamento protone-protone e protone-carbonio sperimentali con quelle calcolate e quantificate per tutti i possibili rotameri è stato possibile definire una configurazione relativa di tipo *erythro* per la β -OMeTyr.

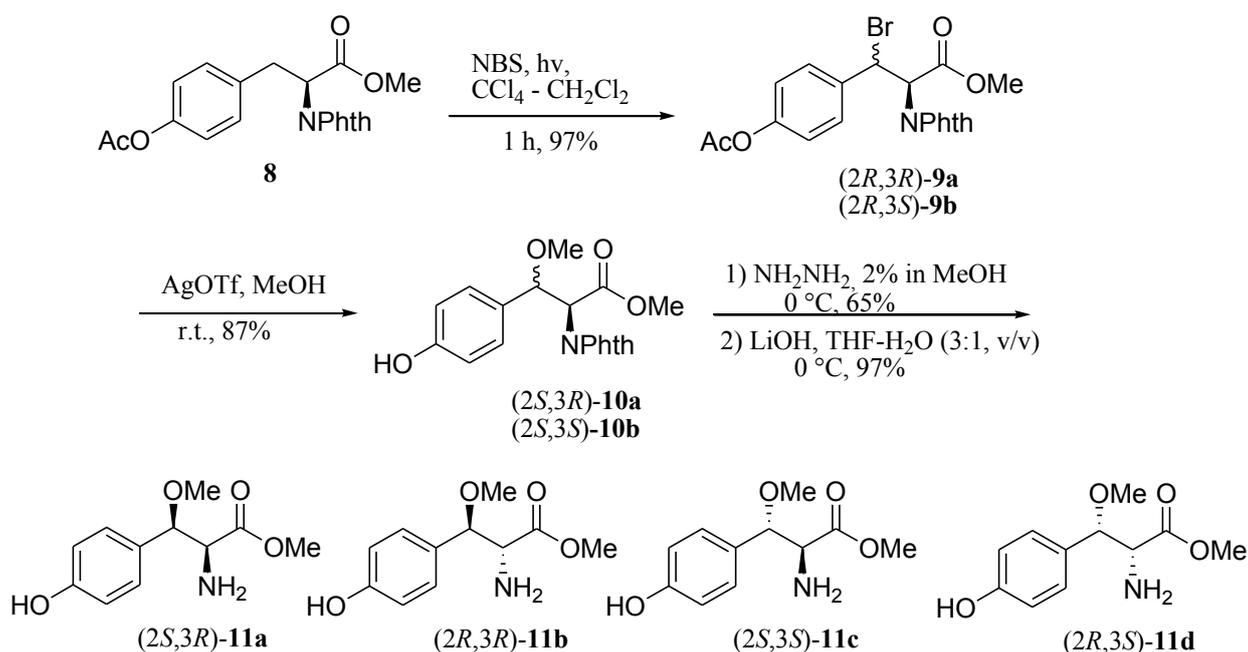
Passo successivo era quello di definirne la stereochimica assoluta (*S,S* oppure *R,R*). A tale scopo è stato intrapreso un progetto di natura sintetica, che ha portato alla realizzazione dei quattro stereoisomeri della β -OMeTyr.⁶⁴

Tale sintesi ha avuto il duplice scopo di fornire non solo opportuni standard per studi stereochimici ma anche di produrre quantità adeguate di tale residuo amminoacidico per studi futuri di sintesi totale della Callipeltina A e di suoi analoghi.

La sintesi che abbiamo realizzato (schema 2), basata sulla metodica di Easton-Hutton,^{65,66} è stata altamente efficiente sia in termini di rese che di step di reazione ed ha fornito i quattro possibili stereoisomeri della β -metossitirosina.

Con i quattro stereoisomeri a disposizione, definire la configurazione assoluta della β -OMeTyr nella Callipeltina A rappresentava “sulla carta” un obiettivo facile da raggiungere. Infatti bastava liberare la β -OMeTyr dalla Callipeltina A e confrontarla, attraverso metodiche cromatografiche, con i quattro standard sintetici, tutti opportunamente derivatizzati con un ausiliario chirale, quale L-FDAA.

Schema 2



E' nota però l'elevata sensibilità degli amminoacidi aromatici alle condizioni di idrolisi acida; sensibilità che nel nostro caso era ancora di più esaltata dalla presenza della funzione metossilica in posizione α all'anello aromatico.

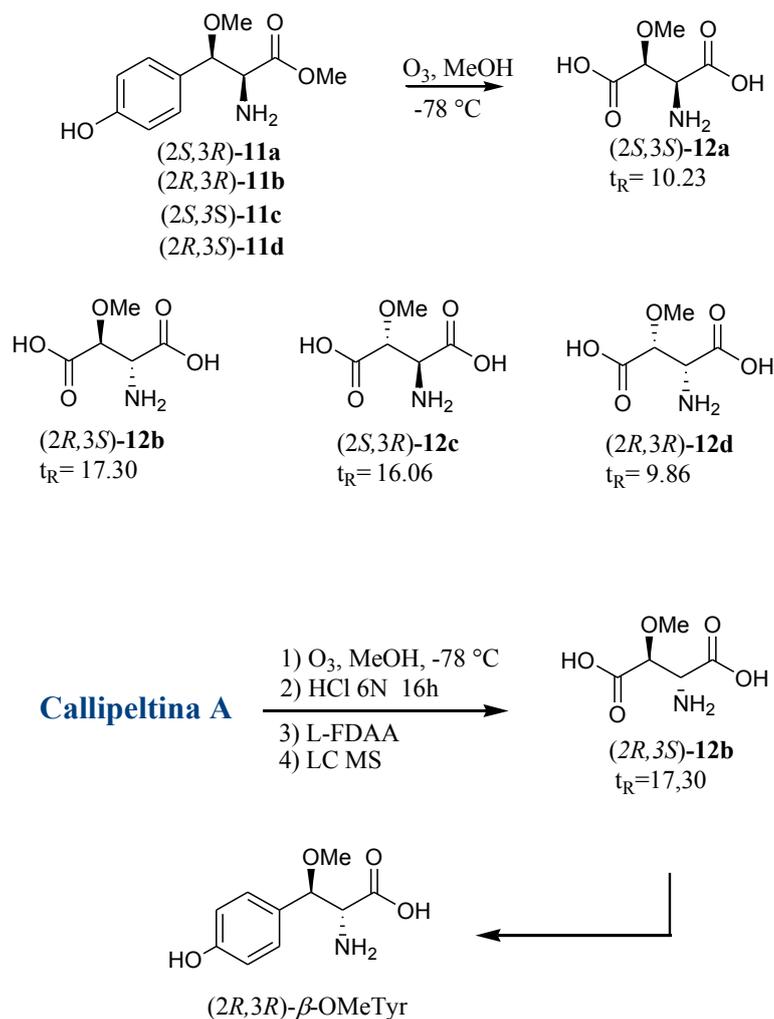
Molti sono stati i tentativi effettuati che sono di seguito riportati:

- acido 4-metansolfonico (4M) a 120 °C.
- KOH 4 M
- HCl gassoso in presenza di fenolo (un cristallino) usato per “disattivare” i radicali ipoclorito e del cloro che si generano nella reazione e che aggrediscono il substrato.
- HCl gassoso 6N a 120 °C 24 ore, per evitare il contatto diretto tra HCl e il campione.

Tutti gli approcci hanno portato alla degradazione della β -OMeTyr.

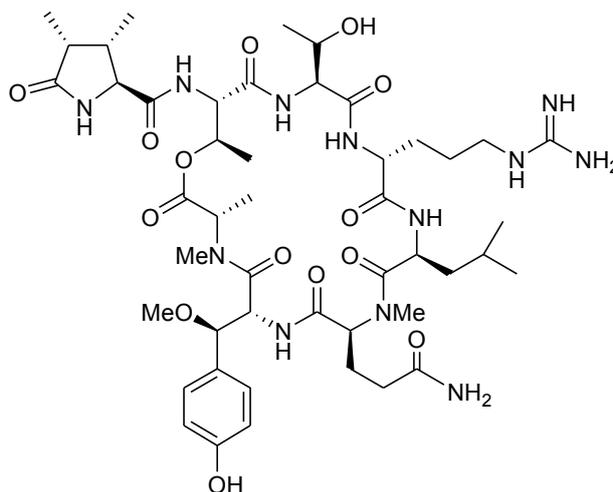
Definitiva risoluzione a questo problema è derivata da un'attenta analisi della letteratura⁶⁷ con la conseguente scelta di trasformare il gruppo fenolico, responsabile della labilità mostrata da questo residuo, in gruppo carbossilico via ozonolisi ossidativa. Quindi sia l'unità di β -OMeTyr presente nella Callipeltina A che i quattro stereoisomeri sintetici sono stati trasformati nei corrispondenti acidi metossiaspartici, come mostrato nello schema 3. Prima di procedere alla derivatizzazione con il reattivo chirale L-FDAA il prodotto di ozonolisi della Callipeltina A è stato sottoposto ad idrolisi acida (HCl 6N per circa 6 ore) per liberare il residuo di β -OMeAsp dal peptide.

Schema 3



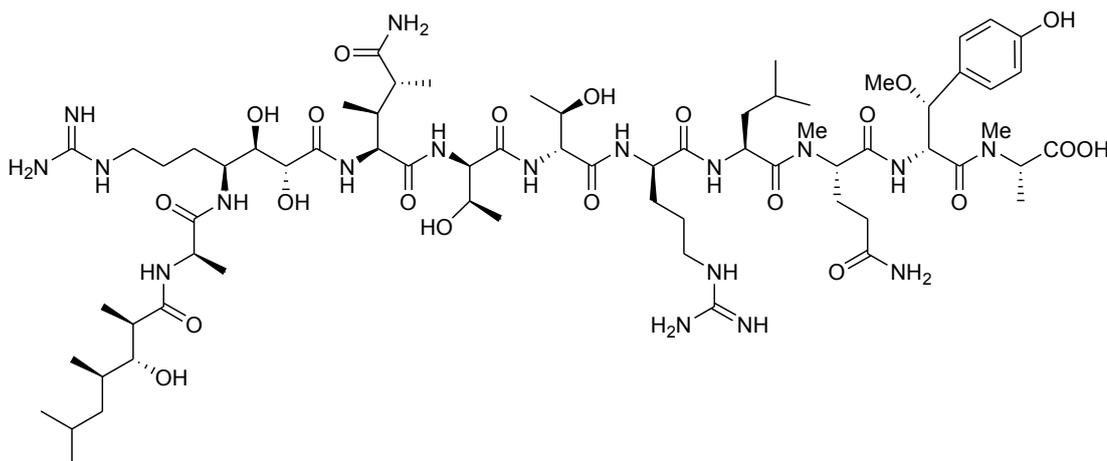
L'analisi LC/MS dei tempi di ritenzione degli FDAA ottenuti ha consentito di stabilire in modo non ambiguo la configurazione 2*R*,3*R* per il residuo di β -metossitirosina presente nella Callipeltina A. Va sottolineato che questo metodo, messo a punto dal nostro gruppo di ricerca rappresenta un utile strumento per la risoluzione di aspetti stereochimici di β -metossi- β -arilamminoacidi, spesso ritrovati come componenti di peptidi bioattivi di origine naturale.

Insieme alla Callipeltina A dalla spugna *Callipelta sp.* sono stati isolati anche altri due peptidi chimicamente correlati alla Callipeltina A, denominati Callipeltina B e C. La **Callipeltina B**⁶⁸ (**13**) è caratterizzata dallo stesso sistema macrociclico, mentre si differenzia nella catena laterale per la sostituzione della porzione tripeptidica con un residuo di acido-3,4-dimetilpiroglutamminico, che rappresenta l'unità *N*-terminale.



Callipeltina B (13)

La **Callipeltina C**⁶⁸ (**14**) rappresenta il corrispondente peptide lineare della Callipeltina A.

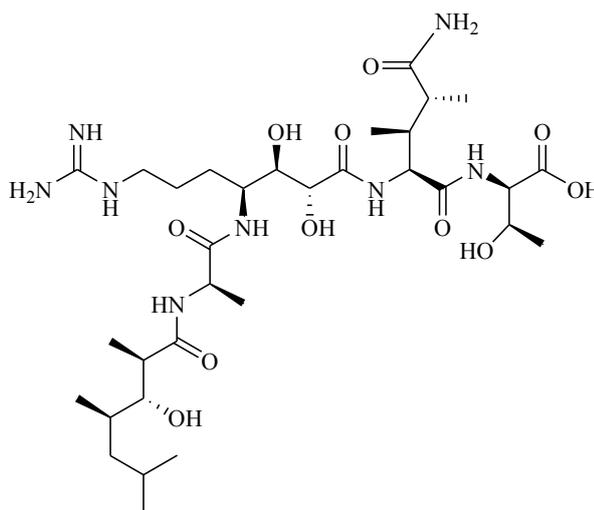


Callipeltina C (14)

Mentre la Callipeltina B continua a mantenere l'attività anti-HIV, anche se in misura molto minore, la Callipeltina C ne è completamente priva. La diversificazione nella loro attività ha fatto ritenere che la presenza dell'anello macrociclico, presente nella Callipeltina A e B, ma non nella C, sia un requisito fondamentale per l'attività anti-HIV.

Un ulteriore impulso allo studio delle callipeltine è derivato dall'isolamento dalla spugna *Latrunculia* sp, di una serie di derivati peptidici lineari correlati alla Callipeltina C e denominati callipeltine D-M.

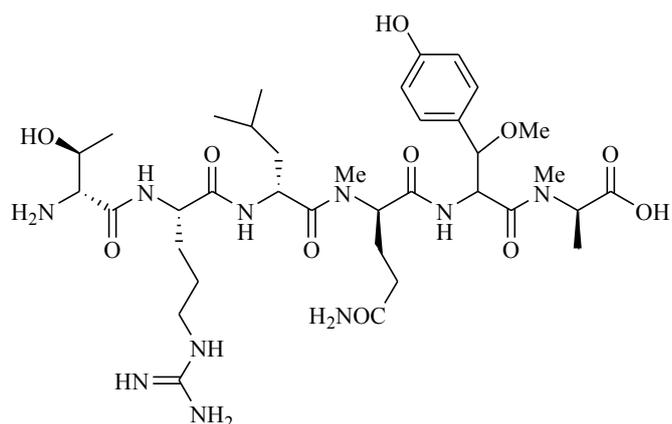
La **Callipeltina D**⁶⁹ (**15**) è un tetrapeptide costituito da un residuo di alanina (D-Ala), da una unità di AGDHA, una di MeGln e una Thr (D-*allo*-Thr), tutti amminoacidi presenti anche nella Callipeltina A con analoga sequenza. Anche in questo caso il residuo *N*-terminale di Ala risulta acilato con l'unità di acido (2*R*,3*R*,4*R*)-3-idrossi-2,3,4-trimetileptanoico.



Callipeltina D (15)

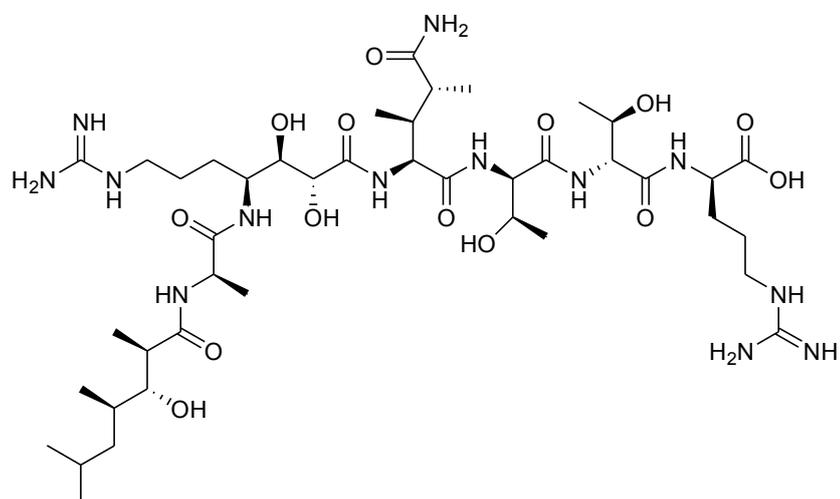
La **Callipeltina E**⁶⁹ (**16**) è un esapeptide costituito da sei residui amminoacidici presenti anche nella Callipeltina A: treonina (D-*allo*-Thr), arginina (Arg), leucina (Leu), *N*-metilglutamina (*N*-MeGln), β -metossitirosina (β -OMeTyr), *N*-metilalanina (*N*-MeAla).

Come risulta evidente dalle strutture mostrate, la Callipeltina D ed E possono essere considerate i precursori biologici della Callipeltina A.



Callipeltina E (16)

La **Callipeltina F⁷⁰ (17)** è un esapeptide analogo della Callipeltina D, con analoga sequenza a cui si aggiunge un secondo residuo di treonina (*D-allo*-Thr) e un'unità di arginina (*D*-Arg). Anche in questo caso l'estremità *N*-terminale risulta acilata con l'unità di β -idrossiacido.



Callipeltina F (17)

CAPITOLO 5

5.1. Isolamento di nuove Callipeltine

Nell'ambito del progetto relativo alle Callipeltine, durante il mio Dottorato di ricerca mi sono interessata dell'isolamento e della definizione strutturale di nuovi peptidi bioattivi, strutturalmente correlati alla Callipeltina A, dalla spugna *Latrunculia* sp. raccolta nelle isole Vanuatu.

Grazie all'uso di colonne HPLC di nuova generazione, specificatamente progettate per il frazionamento di miscele di peptidi, è stato possibile isolare dalla *Latrunculia* sp. non solo consistenti quantità di Callipeltine A-I ma anche una serie di nuovi derivati, le Callipeltine J-M.⁷¹

L'isolamento di tali molecole, oltre a rappresentare un'ulteriore testimonianza della variabilità dei metaboliti marini che non smette mai di stupire noi ricercatori, ha rappresentato un piccolo passo verso la costruzione di una library di peptidi analoghi al fine di approfondire le attività biologiche mostrate da tali molecole e definire delle relazioni struttura-attività.

Tabella 2. Dati ^1H e ^{13}C NMR (500 MHz, CD_3OD) della Callipeltina J (21)

residuo	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}
HTMHA		
1		177.8
2	2.61 m	45.6
3	3.50 m	79.9
4	1.79 m	33.8
5	1.20 m	39.8
6	1.67 m	26.5
7	0.95 d (6.4)	24.7
8	1.07 d (7.1)	14.4
9	0.98 d (6.4)	17.5
10	0.89 d (6.4)	22.0
Ala		
α	4.31 q	50.9
β	1.39 d (7.1)	17.6
CONH		175.9
AGDHA		
α	3.98 d (6.4)	72.7
β	3.75 dd (6.4, 2.6)	75.3
γ	4.15 m	50.7
δ	1.66, 1.30 m	26.4
ϵ	1.66 m	29.5
ζ	3.18 m	42.0
CO		175.9
Guan		157.8
NH-4		
3-MeGln		
α	4.46 ovl	58.1
β	2.21 m	39.7
βMe	1.04 d (6.8)	17.2
γ	2.39, 2.17 m	40.2
CONH		173.1
CONH ₂	7.61 br s	180.8
Thr		
α	4.47 d (6.3)	60.0
β	4.15 m	69.0
γ	1.24 d (7.1)	20.1
CONH		172.7

^a Le costanti di accoppiamento sono in parentesi e misurate in Hz.

^b Dati registrati in CD_3OH

Per la determinazione strutturale di quest'ultimo residuo è risultato molto utile l'esperimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) (Figura 8). Tale tecnica si basa sugli accoppiamenti ^1H - ^{13}C "long range", cioè accoppiamenti attraverso due o tre legami offrendoci uno spettro estremamente diagnostico.

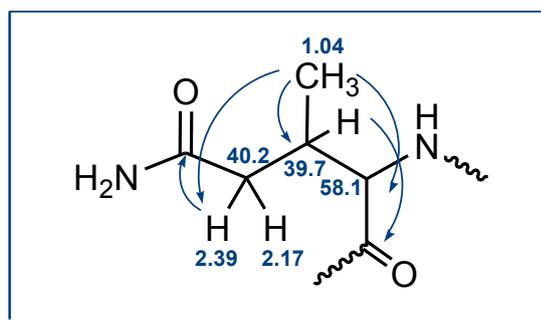


Figura 8 *Cross peaks diagnostici presenti nello spettro HMBC*

In particolare i cross peak, indicati nella figura 8, a partire dai protoni del metile presente in questo residuo rispettivamente verso il carbonio C- α ($\delta_{\text{C}} = 58.1$), il carbonio C- β ($\delta_{\text{C}} = 39.7$) e il carbonio C- γ ($\delta_{\text{C}} = 40.2$) consentivano di definire senza ambiguità la localizzazione di un metile sul C- β di una glutammina.

Definite le unità amminoacidiche, restavano da determinare la sequenza con cui erano legati e il loro assetto stereochimico (serie sterica degli amminoacidi).

Per la definizione della sequenza di grande aiuto è risultata l'analisi delle frammentazioni dello ione molecolare prodotte da un esperimento ESI (Electrospray Ionization) MS/MS. La Callipeltina J ha fornito tutti frammenti di tipo b, qui di seguito dettagliati (figura 9):

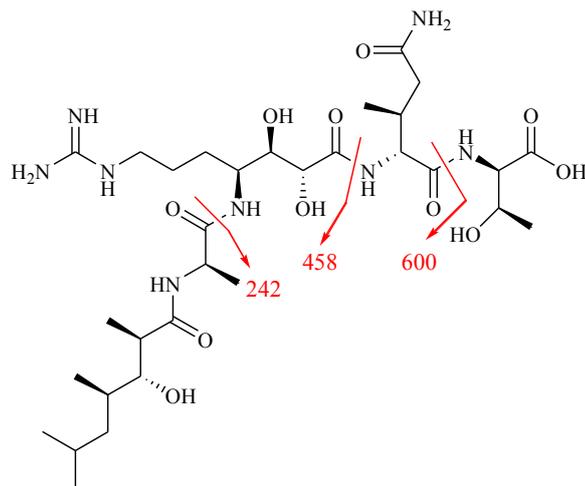


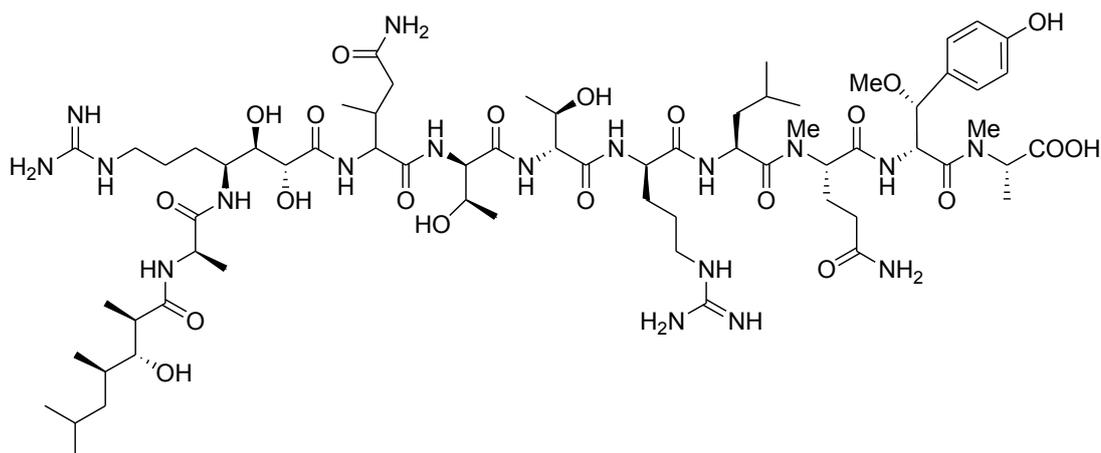
Figura 9 Frammentazioni ESI MS/MS della Callipeltina J

Per la determinazione della serie sterica degli aminoacidi è stato applicato il Metodo di Marfey.⁵¹ Questo metodo prevede la derivatizzazione di aminoacidi derivati dall'idrolisi acida del peptide intatto con un reattivo chirale, l'1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninammide (L-FDAA) e il confronto dei tempi di ritenzione in LC/MS degli aminoacidi presenti nel peptide così derivatizzati con i tempi di ritenzione dei corrispondenti standard D e L derivatizzati con lo stesso reattivo.

In particolare nel tracciato LC/MS degli L-FDAA derivatizzati erano presenti due picchi rispettivamente a $t_R=14.5$ min corrispondente alla Thr-FDAA ($m/z=372$) e a $t_R=20.5$ min corrispondente alla Ala-FDAA ($m/z=342$). Questi dati, paragonati ai t_R di tutti i possibili stereoisomeri della Thr e dell'Ala [L-Thr (12.5), D-Thr (17.6), L-*allo*-Thr (13.1), D-*allo*-Thr (14.1), L-Ala (16.6), D-Ala (20.0)] consentivano di definire la presenza di una D-*allo*-Thr e una D-Ala nella Callipeltina J.

Callipeltina K

La formula molecolare della **Callipeltina K**⁷¹ (**22**) ($[M+H]^+$ a $m/z=1509.8635$ $C_{67}H_{117}N_{18}O_{21}$), paragonata alla formula molecolare della Callipeltina C, rivelava la perdita di 14 u.m.a. razionalizzata con l'assenza di un gruppo CH_2 .



Callipeltina K (22)

Dall'analisi dello spettro ¹H-NMR risultava evidente l'analogia strutturale con la Callipeltina C, per cui l'assegnazione delle unità presenti nella Callipeltina K è stata effettuata mediante un'analisi degli spettri COSY, HOHAHA e HMQC ma anche per confronto con la Callipeltina C stessa (Tabella 3).

E' stato possibile definire la presenza di un residuo di alanina, di un acido-3-idrossi-2,4,6-trimetileptanoico (HTMHA), un acido-4-ammino-7-guanidino-2,3-diidrossieptanoico (AGDHA), un residuo di treonina (poi definita come *allo*-Thr), un'arginina, una leucina, una *N*-Metilglutammina, una β -metossitirosina, una *N*-MeAlanina, e infine una 3-metilglutammina al posto dell'usuale unità di 3,4-dimetilglutammina.

Tabella 3 Dati ^1H e ^{13}C NMR (500 MHz, CD_3OD) della Callipeltina K (22)

residuo	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}
HTMHA		
1		177.8
2	2.61 m	44.4
3	3.51 dd (8.5, 2.4)	79.4
4	1.79 m	33.1
5	1.20 m	39.0
6	1.67 m	25.9
7	0.95 d (6.2)	24.7
8	1.07 d (6.5)	14.6
9	0.98 d (6.9)	17.5
10	0.88 d (6.9)	22.0
Ala		
α	4.32 ovl	51.2
β	1.42 d (7.5)	17.7
CONH	8.27 ^b	175.9
AGDHA		
α	3.99 d (6.6)	72.7
β	3.69 dd (6.6, 2.2)	75.3
γ	4.15 ovl	50.9
δ	1.63, 1.30 m	26.4
ϵ	1.68 m	29.5
ζ	3.18 m	41.7
Guan	7.26 ^b br s	157.8
NH-4	7.74 ^b	
3-MeGln		
α	4.46 ovl	58.2
β	2.21 m	39.7
βMe	1.04 d (6.8)	17.2
γ	2.39, 2.17 m	39.4
CONH		173.1
CONH ₂	7.61 ^b br s	180.8
Thr		
α	4.36 d (8.1)	60.1
β	4.13 m	68.4
γ	1.26 d (6.5)	20.4
CONH	8.43 ^b br s	172.7
Thr		
α	4.22 d (6.4)	60.9
β	4.06 m	68.4
γ	1.31 d (6.5)	20.6
CONH	8.18 ^a br s	172.8
Arg		
α	4.32 ovl	54.0
β	1.97, 1.67 m	29.5
γ	1.68, 1.92 m	25.5
δ	3.19 m	41.7
CONH	7.71 ^b br s	na
Guan	7.40 ^b br s	157.8
Leu		
α	4.73 dd (10.2, 4.6)	50.1

β	1.67, 1.45 m	40.7
γ	1.67 m	25.8
Me- γ	0.92 d (6.1)	21.4
Me- ψ	0.95 d (6.5)	23.5
CONH	7.99 ^b br s	172.9
N-MeGln		
α	4.93 dd (10.4, 4.5)	57.3
β	1.70 m	26.4
γ	1.98, 1.92 m	32.4
NMe	3.09 s	32.7
CONH ₂	n.a.	176.9
β-OMeTyr		
α	5.23 d (8.4)	54.4
β	4.33 d (8.4)	85.2
C4		129.7
C5	7.21 d (7.9)	130.6
C6	6.82 d (7.9)	116.0
C7		157.9
OMe	3.14 s	56.7
CONH	7.71 ^b br s	174.9
N-MeAla		
α	5.14 q (7.1)	53.3
β	1.14 d (7.1)	14.7
NMe	2.83 s	31.4
COOH		174.2

^a Le costanti di accoppiamento sono in parentesi e misurate in Hz.

^b Dati registrati in CD₃OH

Per la determinazione strutturale di quest'ultimo residuo anche in questo caso come per la Callipeltina J è risultato molto utile, oltre all'esperimento 2D-COSY, l'esperimento HMBC (Figura 10).

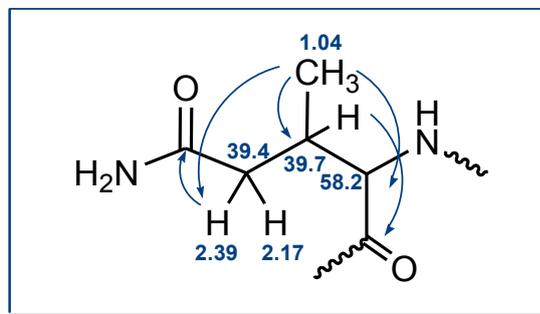


Figura 10 Cross peaks diagnostici presenti nello spettro HMBC

La sequenza amminoacidica è stata dedotta mediante l'analisi delle interazioni NOE interesiduo NH/CH α registrate in CD $_3$ OH e analisi delle correlazioni HMBC (Figura 11).

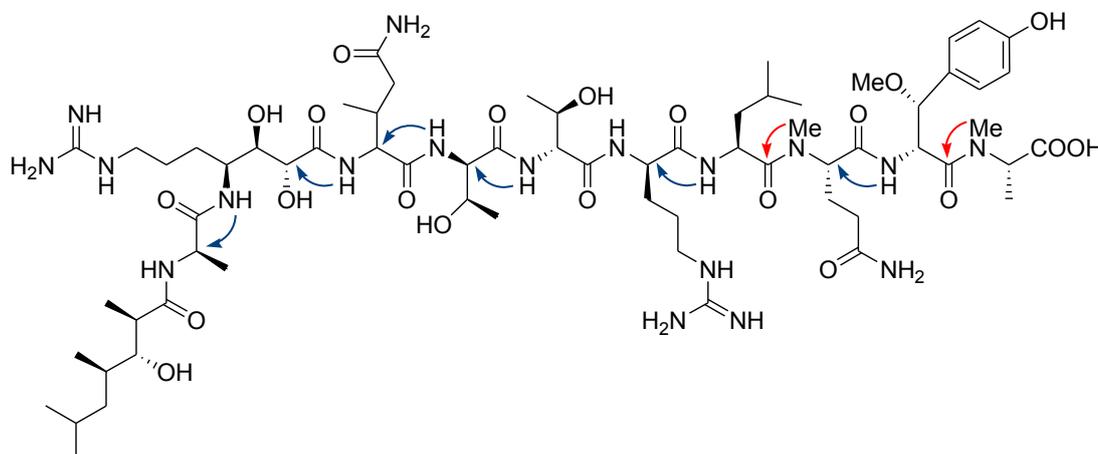


Figura 11 *Interazioni NOE (in blu) e Correlazioni HMBC (in rosso)*

L'esperimento NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) permette di osservare gli accoppiamenti dipolari, attraverso lo spazio, tra protoni appartenenti alla stessa molecola o a diverse molecole presenti in soluzione.

L'esperimento HMBC consente di assegnare non solo ad ogni protone α -amminoacidico il proprio carbonile ma anche di correlare il carbonile con il protone legato all'azoto dell'amminoacido successivo.

Entrambi gli spettri sono stati condotti in CD $_3$ OH così da osservare le risonanze dei protoni su eteroatomo e quindi analizzare gli effetti di vicinanza spaziale ascrivibili ai protoni su azoti amminoacidici.

La configurazione assoluta degli α -stereocentri degli amminoacidi convenzionali è stata determinata dall'analisi LC/MS dell'idrolizzato acido della Callipeltina K derivatizzato con il reattivo di Marfey e paragone dei tempi di ritenzione con gli opportuni amminoacidi standard derivatizzati.

L'analisi dei tempi di ritenzione in LC/MS ha indicato la presenza di una D-Ala (20.5), una D-Arg (13.0), due D-*allo*-Thr (14.5), una L-Leu (29.3), una L-N-MeAla (18.5) e una L-MeGln.

Per la definizione della stereochimica dell'unità di β -metossitirosina abbiamo seguito l'approccio applicato alla Callipeltina A e precedentemente descritto. Tale metodo ha

previsto la sintesi dei quattro possibili stereoisomeri di questo inusuale amminoacido,⁶⁴ la loro ossidazione per ozonolisi a β -metossiaspartico e registrazione dei tempi di ritenzione in LC/MS dei corrispondenti derivati L-FDAA.

Parallelamente una piccola aliquota di Callipeltina K è stata sottoposta ad ozonolisi, idrolisi acida e derivatizzazione con L-FDAA. Il paragone dei tempi di ritenzione in LC/MS con quelli registrati per gli standard consentiva di assegnare la stereochimica (2*R*,3*R*) per l'unità di β -OMeTyr nella Callipeltina K.

Nell'ambito della problematica della risoluzione definitiva delle stereochimiche delle Callipeltine J e K restava da determinare la configurazione assoluta dell'unità di 3-metilglutamina. A tal proposito abbiamo pianificato un progetto di natura sintetica per l'ottenimento dei due diastereoisomeri dell'acido (L)-3-metilglutammico e il loro paragone con il residuo naturale.⁷¹

Nella figura 12 è riportata l'analisi retrosintetica in cui si evince l'intento di pianificare una strategia sintetica efficace, rapida e poco costosa, che si avvallesse di "starting material" facilmente reperibile in commercio. Il sintone chirale di partenza è stato l'acido (L)-aspartico opportunamente protetto, che andava prima metilato al C- β e successivamente sottoposto ad una deprotezione regiospecifica della funzione carbossilica in β .

L'omologazione della funzione carbossilica, secondo la metodica di Arndt-Eistert⁷² consente infine di accedere all'unità di acido β -metilglutammico.

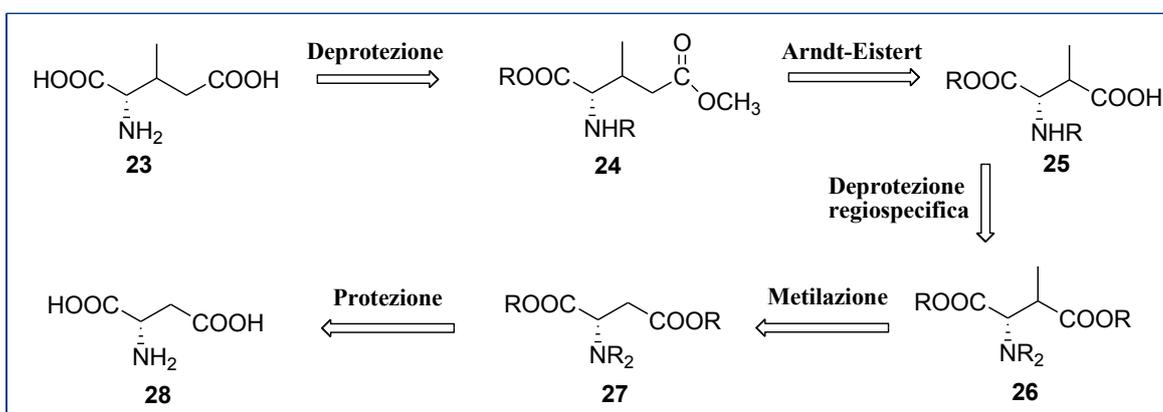


Figura 12 Schema retrosintetico dell'acido 3-metilglutammico

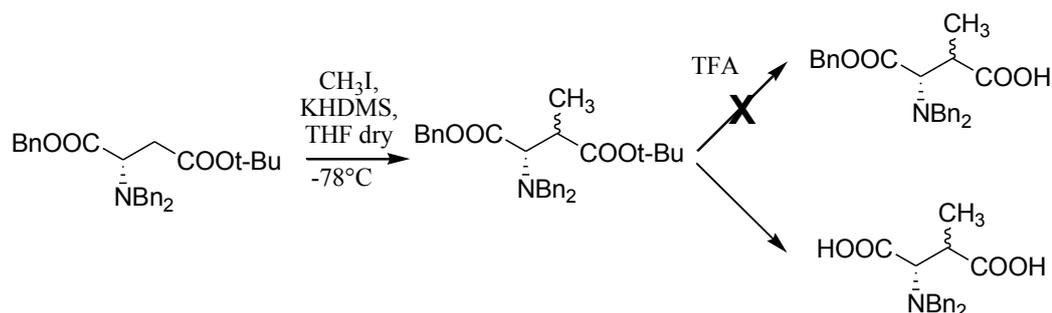
Il primo problema da affrontare è stata la scelta dei gruppi protettori della funzione amminica e delle due funzioni carbossiliche e i requisiti fondamentali richiesti sono di seguito elencati:

1. stabilità nelle condizioni di reazione previste
2. rimozione in condizioni blande
3. ortogonalità reciproca

Quest'ultimo requisito era in particolar modo importante, poiché bisognava poter rimuovere il gruppo protettore del COOH in catena laterale, lasciando protette le altre due funzioni, per poi procedere nella sintesi evitando reazioni collaterali.

Un primo tentativo è stato quello di proteggere la catena laterale con un gruppo *t*-butile, utilizzando gruppi benzilici per le altre due funzioni.

Dopo aver effettuato la metilazione, il trattamento con acido trifluoroacetico, riportato essere selettivo per la deprotezione delle funzioni *t*-butile estere rispetto alla funzione benzil estere, risultava procedere in modo inatteso.



Difatti la deprotezione con TFA avveniva simultaneamente sulle due funzioni COOH, probabilmente a causa dell'aumentata reattività del carbossile amminoacidico, il che ci obbligava a cambiare strategia per ottenere una deprotezione regioselettiva sul carbossile in catena laterale.

Si è quindi proceduto alla benzilazione totale delle tre funzioni dell'aspartico, una reazione facilmente ottenibile con benzilbromuro in acqua, con aggiunta di idrossido di sodio e carbonato di sodio, per poi realizzare la metilazione in α con iodometano e potassio esametildisililammide (KHMDS) in THF dry ottenendo, in tal modo, il composto (**26**) come miscela 3:2 dei due diastereoisomeri *syn/anti*.

Poiché i numerosi tentativi di separazione in HPLC sono risultati infruttuosi, si è deciso di proseguire con la sintesi rimandando il problema della separazione della miscela ad uno step successivo.

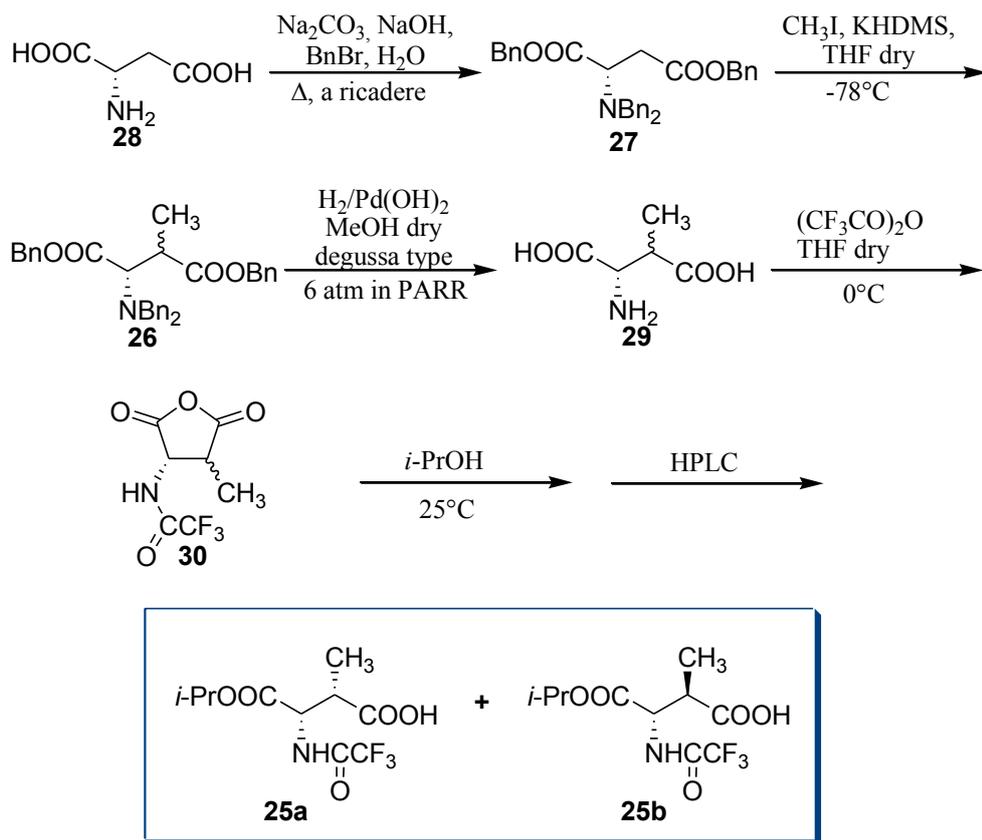
Così come la determinazione della configurazione dei due diastereoisomeri è stata affrontata nella fase finale del lavoro, dopo aver terminato la sintesi dei prodotti (**23a**) e (**23b**), per confronto con i dati NMR, sia ^1H che ^{13}C , dei due derivati metil-pirolglutammici metilesteri, che sono riportati in letteratura.⁷³

Il successivo step sintetico ha previsto la rimozione dei gruppi benzilici per idrogenazione ad alta pressione (6 atm) in apparecchio PARR in presenza di $\text{Pd}(\text{OH})_2$ Degussa type, ottenendo la miscela dei due diastereoisomeri dell'acido (L)-3-metilaspatico (**29a** e **29b**), ancora una volta inseparabili in HPLC.

Passo successivo è stata la protezione selettiva della funzione carbossilica amminoacidica. Il problema è stato risolto tenendo conto della differente reattività delle due funzioni carbossiliche: il composto (**29**) è stato dapprima sottoposto a reazione con anidride trifluoroacetica, per ottenere l'addotto (**30**), attraverso la contemporanea protezione del gruppo α -amminico e ciclizzazione delle due funzioni carbossiliche a formare un'anidride ciclica suscettibile all'apertura da parte di nucleofili.

L'apertura regioselettiva del ciclo con isopropanolo, per attacco preferenziale al gruppo carbonilico a maggiore carattere elettrofilo in prossimità dell'azoto (il carbossile della funzione α -amminoacidica), ha consentito l'accesso alla miscela diastereoisomerica (**25a**) e (**25b**).

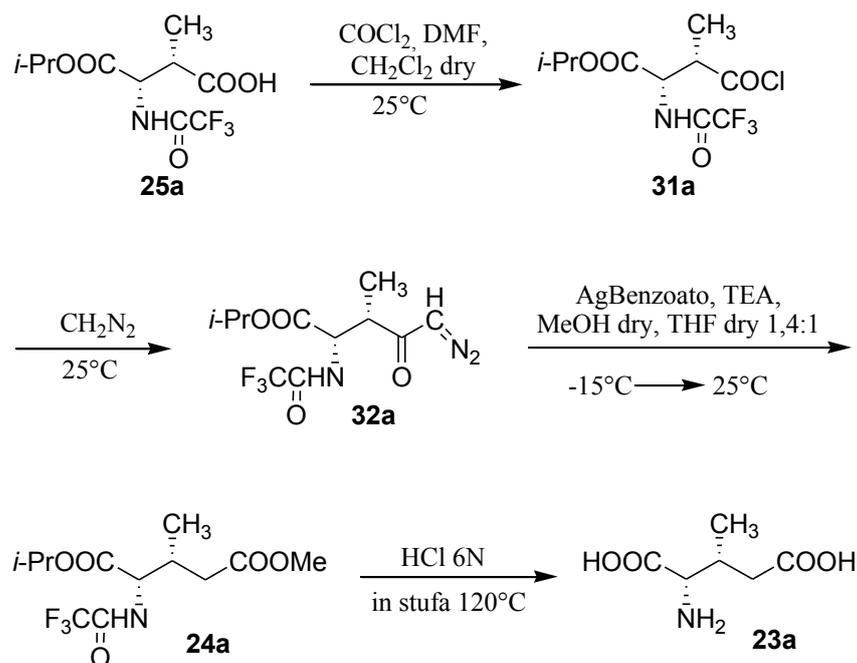
I due diastereoisomeri risultano separabili in HPLC, utilizzando una colonna Nucleosil semipreparativa, e eluendo con una miscela 8:2 esano/etilacetato contenente lo 0.05% di TFA.



Dopo la separazione, abbiamo proseguito con la sintesi in maniera analoga su entrambi i diastereoisomeri, ottenendo risultati speculari (in figura è riportato lo schema sintetico per il diastereoisomero **(25a)**).

Dopo avere ottenuto la deprotezione selettiva della catena laterale, è stato possibile procedere con l'omologazione secondo la procedura di Arndt-Eistert,⁷² il cui primo step è la formazione del diazochetone per reazione del corrispondente cloruro acilico con diazometano.

La formazione del cloruro acilico (**31a**) è stata oggetto di un'intensa attività sperimentale. Il trattamento con cloruro di tionile (SOCl_2) o alternativamente con etilcloroformiato e TEA, portavano a rese non soddisfacenti e a considerevole degradazione del substrato (**25a/25b**).



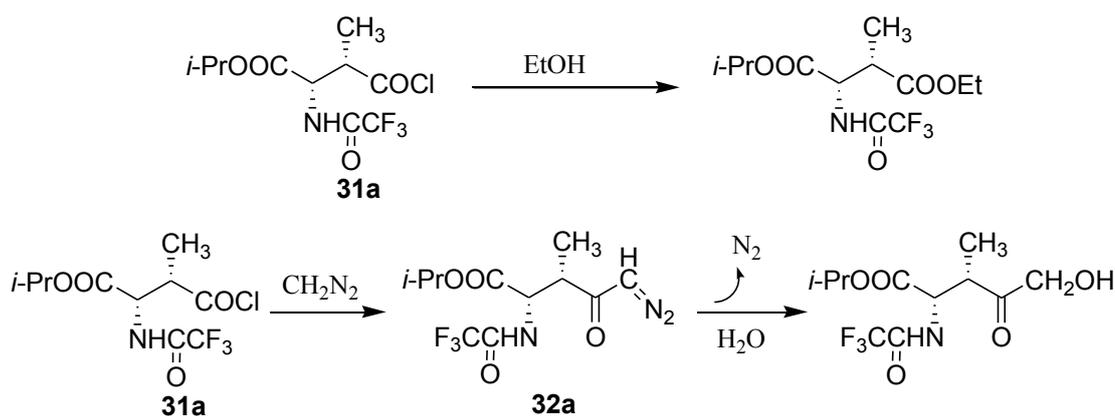
Abbiamo quindi optato per una metodica un po' più costosa ma decisamente più efficace, sia in termini di resa che di purezza del prodotto finale: il composto (**25a**) è stato fatto reagire con dimetilformammide e cloruro di ossalile a T ambiente.

Il derivato (**31a**), così ottenuto, è stato trasformato nel diazochetone (**32a**) per reazione con diazometano. In questa fase del progetto abbiamo riscontrato un problema nella preparazione del diazometano, poiché la prima procedura da noi adottata dava luogo a reazioni collaterali che impedivano la formazione di (**32a**).

Infatti le condizioni riportate in letteratura prevedevano, per la sintesi del diazometano, l'utilizzo di alcol etilico e di etere dietilico, per il quale non veniva specificata la necessità di adottare precauzioni particolari durante il processo di anidrifcazione.

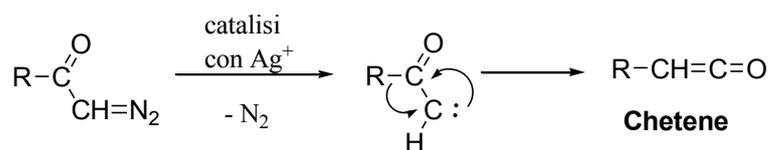
Al contrario la nostra esperienza ci ha dimostrato che eventuali tracce di acqua, dovute ad una non perfetta anidrifcazione dell'etere etilico e dell'alcol etilico, possono dar luogo a reazioni collaterali, poiché anche il diazometano così preparato risulterà contenere tracce di acqua residue.

Alla temperatura necessaria per la sintesi del diazometano (~60°C), infatti, pur trovandoci molto al di sotto del punto di ebollizione dell'acqua, avviene l'evaporazione della miscela azeotropica etanolo/acqua; in tal modo le due sostanze passano nel pallone di raccolta insieme al diazometano dando luogo a due reazioni collaterali illustrate di seguito:

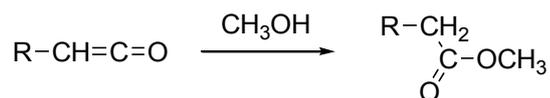


Entrambe queste problematiche sono state risolte sostituendo l'etanolo con dietilenglicole-monoetiletere (carbitolo), e ponendo ulteriori precauzioni nell'anidificazione dell'etere e di tutto l'ambiente di reazione, come l'utilizzo di vetreria fiammeggiata e la cannulazione del diazometano per la reazione con il cloruro acilico, che avviene anch'essa in dietiletere dry.

L'intermedio (**32a**) riarrangia spontaneamente, in presenza di benzoato di argento (come di un qualsiasi catalizzatore ad argento), a chetene secondo Wolff:

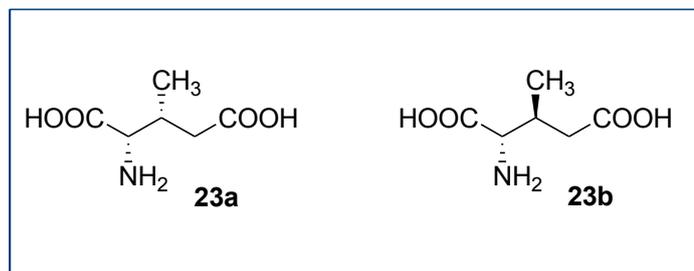


Il chetene derivato, per trattamento con metanolo, viene trasformato nel metil estere (**24a**), una forma protetta dell'acido 3-metilglutammico.



L'idrolisi con HCl 6N in fase vapore ha consentito la liberazione della funzione carbossilica per ottenere l'acido (L)-3-metilglutammico (**23a**), obiettivo finale della nostra sintesi.

Come già anticipato in precedenza, il processo descritto per il diastereoisomero (a) è stato applicato allo stesso modo per quello (b), in modo da pervenire alla sintesi di entrambi i diastereoisomeri dell'acido 3-metil L-glutammico (**23a** e **23b**):

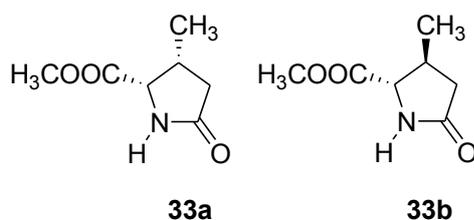


Realizzata la sintesi, bisognava procedere all'assegnazione delle identità stereochimiche dei due composti (**23a** e **23b**) e a tal fine ci siamo avvalsi di dati NMR riportati in letteratura.⁷³

Sono infatti riportati i dati ¹H-NMR e ¹³C-NMR di tutti i diastereoisomeri sia dell'acido metilaspatico che del metilglutammico. Tuttavia nel caso di composti così suscettibili alla ionizzazione, i valori di chemical shift dipendono in maniera stringente da una serie di fattori di non facile riproducibilità quali pH, concentrazione e forza ionica della soluzione, per cui il confronto con i dati riportati in letteratura rivelava una serie di discrepanze.

Fortunatamente, in tempi recenti, è stato riportato in letteratura la sintesi dei due possibili diastereoisomeri dell'estere metilico dell'acido (2*S*)-piroglutammico⁷³ (**33a** e **33b**).

In questi due composti, come si evince dalla figura, le funzioni ionizzabili non sono più libere, il che rende i dati NMR più riproducibili e di facile confronto.



Abbiamo quindi deciso di realizzare la conversione dei derivati (**23a/23b**) nelle corrispondenti forme cicliche (**33a/33b**). Poiché (**23a/23b**) sono ottenuti come

cloridrati per trattamento con HCl di (**24a/24b**), si è resa necessaria la reazione con propilene ossido per accedere alla base libera successivamente ciclizzata a acido piroglutammico tramite reazione a refluxo con acqua per circa 9 h.

L'esterificazione della funzione α -carbossilica con diazometano ha consentito l'ottenimento del prodotto (**33a**).

In tabella 4 si riportano i dati $^1\text{H-NMR}$ del derivato (**33a**) e quelli riportati per i diastereoisomeri ($2S,3R$) e ($2S,3S$).

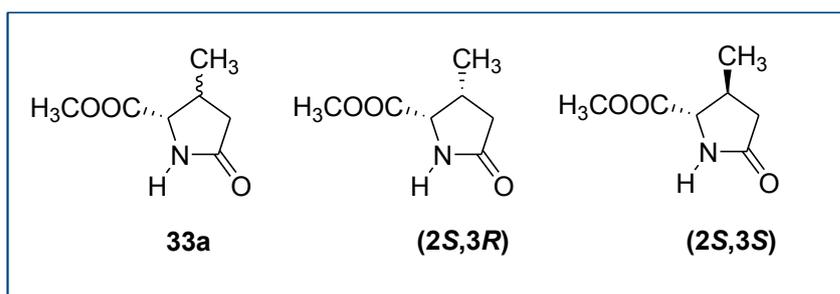
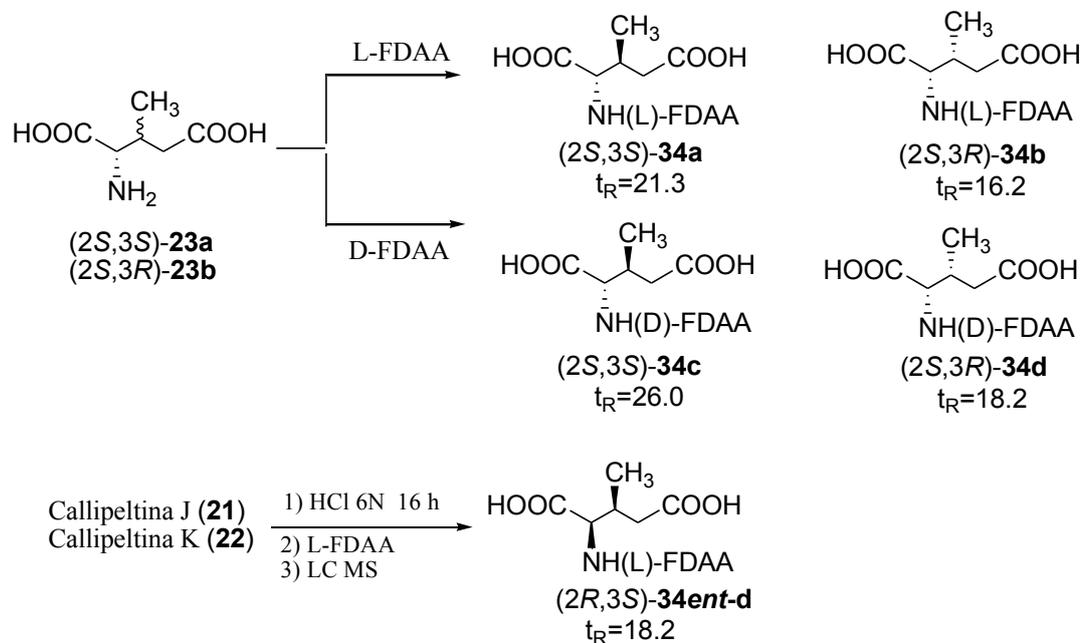


Tabella 4

Dati $^1\text{H-NMR}$ (δ ppm.)			
H	33a	(2S,3R)	(2S,3S)
2	4.26, d	4.26, d	3.83, d
3	2.84, m	2.83, m	2.58, m
4a	2.48, dd	2.48, q	2.51, q
4b	2.08, dd	2.08, q	2.01, q
Me	1.04, d	1.04, d	1.28, d
OMe	3.76, s	3.76, s	3.77, s
NH	5.8, br s	6.3, br s	6.5, br s

Dalla lettura dei valori riportati in tabella 4, si evince chiaramente che la stereochimica assoluta del nostro diastereoisomero sintetico (**33a**) è ($2S,3R$), di conseguenza il (**33b**) è il diastereoisomero ($2S,3S$).

Ottenuti gli standard sintetici, passo successivo è stato quello di sottoporre a derivatizzazione con il reattivo di Marfey (L-FDAA e D-FDAA) sia gli idrolizzati acidi delle Callipeltine J e K che gli standard stessi.



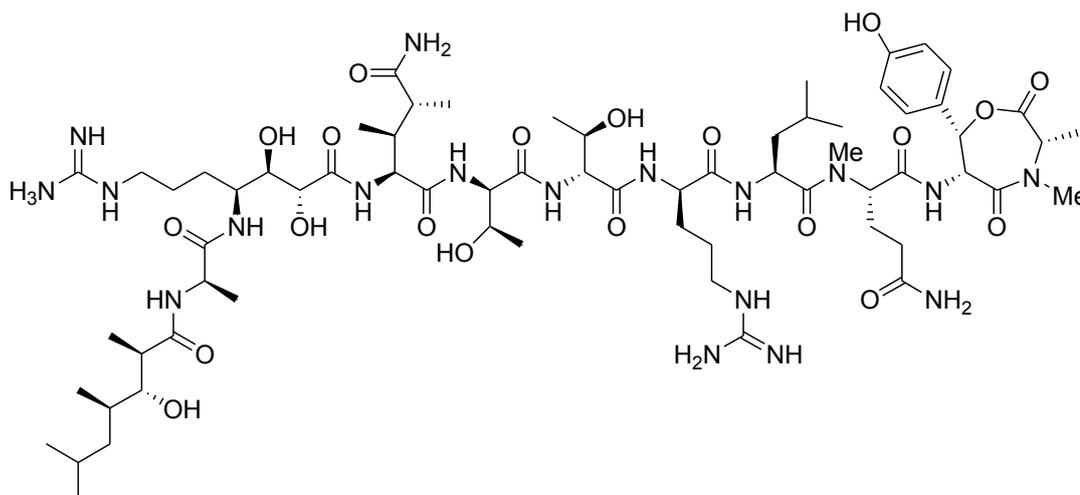
Gli FDAA-derivati così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi LC/MS monitorando lo ione a $m/z=413$ (acido 3-MeGlu-FDAA- H^+). Per l'idrolizzato delle Callipeltine J e K, derivatizzato con il reattivo chirale L-FDAA, si è osservato un picco a $t_R=18.2$ min mentre gli standard hanno mostrato rispettivamente:

- (2*S*,3*R*)-3-MeGlu-L-FDAA SIM $m/z = 414$ e t_R 16.2 min
- (2*S*,3*R*)-3-MeGlu-D-FDAA SIM $m/z = 414$ e t_R 18.2 min
- (2*S*,3*S*)-3-MeGlu-L-FDAA SIM $m/z = 414$ e t_R 21.3 min
- (2*S*,3*S*)-3-MeGlu-D-FDAA SIM $m/z = 414$ e t_R 26.0 min

La coeluizione delle Callipeltine J e K, idrolizzate e derivatizzate con L-FDAA, con il (2*S*,3*R*)-3-MeGlu-D-FDAA, ha mostrato un unico picco a $t_R=18.2$ min a $m/z=413$ il che indicava senza ambiguità che la configurazione della 3-MeGln nelle Callipeltine J e K era (2*R*,3*S*), cioè enantiomerica rispetto allo standard (**33a**) da noi preparato.

Callipeltina L

La **Callipeltina L**⁷¹ (**35**) è stata ottenuta come solido amorfo incolore la cui massa è stata determinata mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione HR ESIMS. Lo spettro mostra un picco pseudomolecolare $[M+H]^+$ a $m/z = 1491.8535$ corrispondente al peptide protonato, la cui formula molecolare è stata stabilita quale $C_{67}H_{115}N_{18}O_{20}$.



Callipeltina L (35)

Dall'analisi dello spettro ¹H-NMR è risultata evidente l'analogia strutturale con la Callipeltina C, anche se sono assenti i segnali diagnostici assegnati all'unità di β -metossitirosina.

L'analisi combinata degli spettri 2D-NMR e il confronto con i dati in possesso per la Callipeltina C ha indicato nella Callipeltina L la presenza degli stessi residui della Callipeltina C con una modifica strutturale all'estremità C-terminale riguardante i residui di β -OMeTyr e di *N*-MeAla.

Estremamente utile è risultata l'analisi degli spettri COSY e HMBC. In particolare lo spettro COSY indicava una piccola correlazione tra un protone α -amminoacidico a $\delta_H = 4.35$ ($\delta_C = 60.3$) con un protone carbinolico a $\delta_H = 6.17$ ($\delta_C = 77.7$). L'alto valore di chemical shift di quest'ultimo protone nonché le sue diagnostiche correlazioni HMBC con i carboni a $\delta_C = 126.0$ e $\delta_C = 128.7$ hanno indicato la presenza di un anello *p*-idrossifenile legato al C- β del suddetto sistema di spin.

Inoltre lo spettro HMBC mostrava un diagnostico cross peak tra il protone a $\delta_H=6.17$ e il carbonio C1 ($\delta_C= 169.4$) del residuo di *N*-MeAla indicando la presenza nella Callipeltina L di un inusuale sistema ε -lattone. L'origine di tale sistema deriva presumibilmente dall'attacco nucleofilo della funzione carbossilica terminale sul C- β della TyrOMe e successiva perdita di metanolo. Ciò è supportato dall'inversione della configurazione del C- β del residuo di tirosina nella Callipeltina L rispetto alla Callipeltina C come mostrato in tabella 5 dal valore della costante di accoppiamento $H\alpha$ - $H\beta$ (2.6Hz).

Tabella 5 Dati 1H e ^{13}C NMR (500 MHz, CD_3OD) della Callipeltina L (35)

residuo	δ_H^a	δ_C
HTMHA		
1		179.4
2	2.61 m	44.5
3	3.51 dd (9.3, 3.1)	79.4
4	1.76 m	33.8
5	1.20 m	39.3
6	1.67 m	25.5
7	0.95 d (6.2)	23.9
8	1.10 d (6.0)	14.6
9	0.99 d (6.7)	17.5
10	0.89 d (6.4)	21.6
Ala		
α	4.32 ovl	51.6
β	1.42 d (7.2)	17.5
CONH		175.1
AGDHA		
α	3.98 d (7.6)	72.8
β	3.73 dd (7.6, 3.5)	75.0
γ	4.15 ovl	50.6
δ	1.63, 1.41 m	25.9
ε	1.68 m	29.5
ζ	3.21 m	41.7
Guan		175.4
NH-4		
Di-MeGln		
α	4.43 d (8.5)	57.0
β	2.25 m	39.3
β Me	1.02 d (7.0)	13.7
γ	2.66 m	41.3
γ Me	1.18 d (6.7)	15.6
CONH		172.6
CONH ₂		179.3

Thr		
α	4.30 d (7.0)	60.0
β	4.11 m	68.0
γ	1.26 d (6.1)	20.2
CONH		172.6
Thr		
α	4.24 d (7.1)	60.7
β	4.06 m	68.4
γ	1.31 d (7.3)	20.3
CONH		171.9
Arg		
α	4.35 ovl	53.9
β	1.98 m	29.5
γ	1.68, 1.92 m	25.9
δ	3.19 m	41.7
CONH		174.7
Guan		157.8
Leu		
α	4.83 m	49.8
β	1.67, 1.45 m	40.6
γ	1.74 m	26.0
Me- γ	0.99 d (7.2)	22.2
Me- ψ	0.99 d (7.0)	22.2
CONH		174.2
N-MeGln		
α	5.26 dd (9.7, 3.1)	56.4
β	2.20 m	24.2
γ	2.19, 2.22 m	31.8
NMe	2.99 s	31.7
CONH ₂		176.9
CO		169.9
β-OTyr		
α	4.35 br d (2.6)	60.3
β	6.17 br d (2.6)	77.7
C4		128.7
C5	7.16 d (8.4)	126.0
C6	6.84 d (8.4)	116.0
C7		158.7
CONH		164.8
N-MeAla		
α	3.92 q (6.8)	56.6
β	1.53 d (6.8)	18.6
NMe	2.98 s	32.3
COOH		169.4

^a Le costanti di accoppiamento sono in parentesi e misurate in Hz.

^b Dati registrati in CD₃OH

L'analisi delle frammentazioni ottenute in apparecchio ESI con la diagnostica formazione dello ione a $m/z=1245.7$, corrispondente alla perdita di un dipeptide azepan-2-one, dava definitivo supporto alla struttura proposta per la Callipeltina L.

La Callipeltina L ha mostrato un'intensa labilità persino in condizioni neutre e a temperatura ambiente il che ha ostacolato ogni tentativo di analisi stereochimica.

Data la sovrapposizione nei dati ^1H e ^{13}C NMR con quelli della Callipeltina C, la serie sterica degli amminoacidi è stata quindi dedotta per analogia con il peptide di riferimento.

δ	3.18 m	42.2
CONH		173.8
Guan		
Leu		
α	4.76 m	48.9
β	1.70, 1.40 m	40.6
γ	1.70 m	25.7
Me- γ	0.94 d (7.4)	21.6
Me- ψ	0.94 d (7.4)	23.9
CONH		
N-MeGln		
α	4.90 dd (10.1, 4.7)	56.9
β	1.94, 1.70 m	24.6
γ	1.94 m	32.4
NMe	2.80 s	31.3
CONH ₂		
CO		169.7
β-OMeTyr		
α	5.23 d (8.1)	54.1
β	4.32 d (8.1)	85.0
C4		128.7
C5	7.21 d (8.1)	129.6
C6	6.79 d (8.1)	116.1
C7		158.5
CONH		
N-MeAla		
α	5.14 q (6.5)	53.9
β	1.42 d (6.5)	14.7
NMe	3.10 s	32.6
COOH		173.3

^a Le costanti di accoppiamento sono in parentesi e misurate in Hz.

^b Dati registrati in CD₃OH

CAPITOLO 6

6.1. Studi biologici sulla Callipeltina A

Inizialmente l'interesse farmacologico verso la Callipeltina A (2) ha riguardato l'attività antifungina (contro *Fusarium oxysporium*, *Helminthosporium sativum*, e *Phytophthora hevea*), l'attività citotossica contro cellule di tipo KB e P388 (10 µg/ml, ca 80% di inibizione) e la potente attività anti-HIV⁸⁻¹⁰.

L'attività antivirale è stata determinata *in vitro* su cellule linfocitarie CEM4. In particolare per valutare l'effetto antivirale della Callipeltina A è stato studiato l'inibizione dell'effetto citopatico (CEM) indotto dal virus HIV-1 su cellule MTT. Dopo sei giorni dall'incubazione è stato osservato un arresto dell'infezione con una CD₅₀ di 0.29 µg/mL e una ED₅₀ di 0.01 µg/mL, valori paragonabili a quelli dell'AZT anche se l'indice di selettività SI (CD₅₀/ ED₅₀) non è molto elevato (SI = 29).

Sulla base di precedenti evidenze dell'azione inotropa positiva sul cuore di ratto di alcuni ciclodepsipeptidi naturali (roseotossina B e roseocardina)⁷⁴ e, in relazione al lavoro di Khananshvili⁷⁵ che dimostrava, per una serie di peptidi ciclici costretti conformazionalmente, il loro effetto di inibizione dello scambiatore Na⁺/Ca²⁺, è stata testata l'attività esercitata dalla Callipeltina A su preparazione cardiache. Sono state osservate interessanti attività di regolazione da parte della Callipeltina A, in quanto si è dimostrata capace di indurre un significativo aumento della forza di contrazione dell'atrio di cavia, il che si riflette in un effetto inotropo positivo.

In un primo studio si era interpretato quest'effetto come dovuto ad una inibizione dello scambiatore Na⁺/Ca²⁺ cardiaco⁹ ma ulteriori ricerche sul meccanismo d'azione della Callipeltina A e dei suoi derivati, condotti in collaborazione con i laboratori del Dipartimento di Farmacologia e Anestesiologia dell'Università di Padova diretti dal Prof. S. Luciani, non hanno confermato quest'ipotesi iniziale. Si è osservato invece che la Callipeltina A agisce come ionoforo dello ione sodio¹⁰ e tale proprietà è responsabile degli effetti riscontrati a livello cardiaco. I risultati di questi studi saranno ampiamente discussi nei paragrafi successivi. L'effetto Na⁺-ionoforo può anche spiegare le proprietà antimicotiche e citotossiche della Callipeltina A. Infatti il meccanismo d'azione di molti agenti antibiotici, inclusi Valinomicina, Nistatina e Anfotericina B, è legato alla capacità di questi composti di favorire il trasporto di

ioni attraverso le membrane e quindi di alterare il gradiente fisiologico di ioni ai due lati della membrana, provocando pertanto morte cellulare.

6.1.1. Alterazione del gradiente del Na^+ per inibizione della Na^+/K^+ -ATPasi

E' stato riportato che alcuni inibitori dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, come ad esempio l'amiloride, sono in grado di prevenire nel muscolo liscio vascolare la contrazione indotta dall'ingresso del calcio mediato dallo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. Nel muscolo liscio vascolare probabilmente il contributo di questo scambiatore non è molto importante in condizioni non stimolate, mentre, al contrario, data una sua elevata capacità di trasporto, l'attività dello scambiatore diventa rilevante per riportare a livelli basali la concentrazione di calcio intracellulare dopo l'induzione della contrazione da parte di agonisti. Quindi, un inibitore dello scambiatore non dovrebbe avere effetto sulla contrattilità del vaso non stimolato, ma dovrebbe ritardare il rilasciamento dei vasi dopo stimolazione e impedire l'ingresso di calcio provocato dalle alterazioni del gradiente di sodio indotto sperimentalmente.

Dunque, inizialmente è stato testato l'effetto della Callipeltina A sulla contrattilità dell'aorta toracica di cavia a riposo.

La Callipeltina A, nell'intervallo di concentrazione da 0.1 a 3 μM , induce una contrazione dell'aorta di cavia concentrazione-dipendente.

Successivamente, sono state eseguite alcune prove per determinare l'effetto della Callipeltina A nella situazione in cui lo scambiatore promuove un consistente trasporto di calcio all'interno della cellula come, ad esempio, in seguito ad una diminuzione o ad un'inversione del gradiente di sodio.

Per diminuire il gradiente di sodio dall'esterno verso l'interno della cellula è sufficiente inibire la Na^+/K^+ -ATPasi, mediante l'uso di un inibitore (ouabaina) oppure mediante la rimozione del suo substrato (K^+). L'eliminazione del K^+ dalla soluzione salina fisiologica (PSS) determina una totale inibizione della Na^+/K^+ -ATPasi, cui segue un aumento della concentrazione di sodio e, quindi, una diminuzione del suo gradiente transmembranario. Questo provoca un aumento

dell'influsso del calcio mediato dallo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, con un conseguente aumento della concentrazione del calcio intracellulare (figura 13).

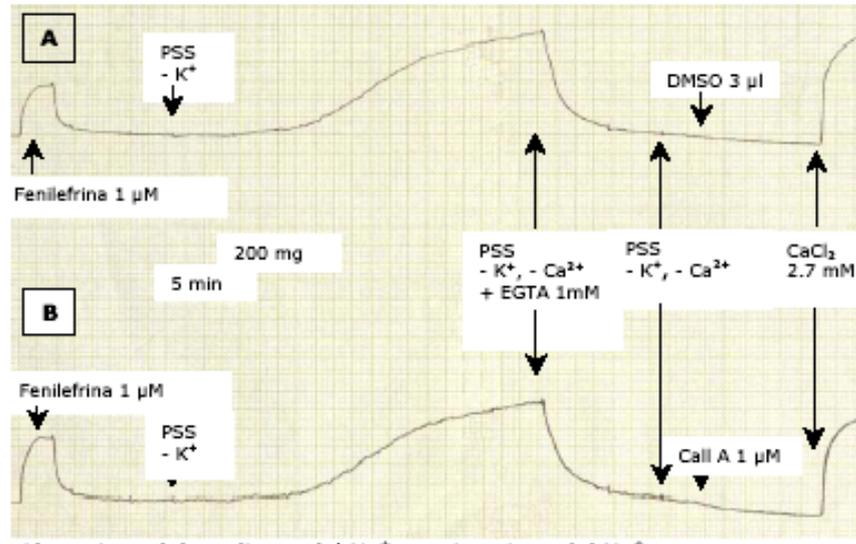


Figura 13. *Tracciati originali della contrazione di un anello di aorta toracica di cavia in PSS senza K^+ . (A) Tracciato di controllo. (B) Effetto dell'aggiunta di Callipeltina A ($1\mu\text{M}$).*

La sostituzione della PSS con una PSS priva di potassio produce una contrazione dell'aorta, che è dipendente dal calcio esterno (trasportato tramite lo scambiatore). A queste condizioni un inibitore dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ dovrebbe impedire l'ingresso di calcio e, quindi, la contrazione. La Callipeltina A (come si osserva in figura 13 B) non è in grado di inibire questa contrazione a concentrazione $1\mu\text{M}$.

6.1.2. Alterazione del gradiente del Na^+ per rimozione del Na^+ esterno

Per alterare il gradiente del sodio è possibile anche rimuovere il sodio dalla PSS. In questo modo si avrà un gradiente di sodio dall'interno verso l'esterno e lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ trasporterà il calcio all'interno della cellula provocando la contrazione dell'aorta. In una situazione del genere, un inibitore dello scambiatore

dovrebbe impedire l'aumento della contrazione quando è nuovamente aggiunto il calcio esterno. La Callipeltina A (1 μ M), anche in questo caso, non inibisce la contrazione (figura 14).

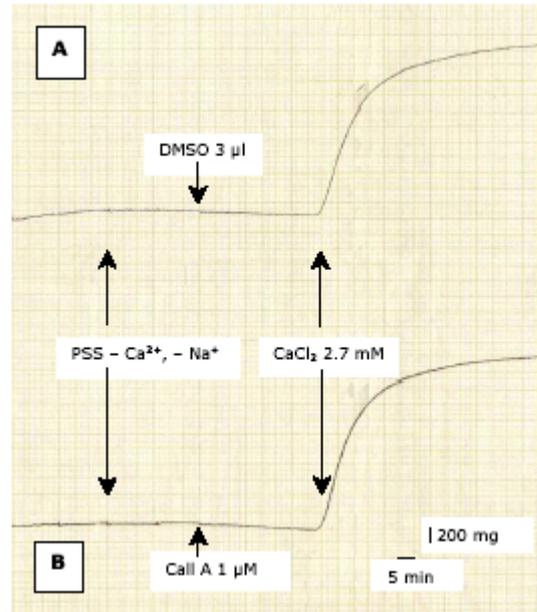


Figura 14. *Tracciati originali della contrazione di un anello di aorta toracica di cavia in PSS senza Na^+ e Ca^{++} . (A) Tracciato di controllo. (B) Effetto dell'aggiunta di Callipeltina A (1 μ M).*

Riassumendo, la contrazione dell'aorta di cavia indotta dalla Callipeltina A non può essere spiegata con l'inibizione dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. La mancata inibizione delle contrazioni da parte della Callipeltina A osservata nelle figure 13 e 14 ci ha spinto ad ulteriori indagini per chiarire il meccanismo attraverso il quale questa sostanza può indurre una risposta contrattile nell'aorta di cavia.

La Callipeltina A potrebbe esplicare il suo effetto aumentando la permeabilità al sodio e, quindi, stimolando l'ingresso di calcio tramite lo scambiatore. Per investigare su questa ipotesi è stato provato l'effetto dell'amiloride sulla contrazione indotta da Callipeltina A. L'amiloride a concentrazione elevata (0.5-1 mM) è un inibitore dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ cardiaco e del muscolo liscio vascolare. In figura 15 è mostrato che l'amiloride (0.5 mM) è in grado di rilasciare parzialmente la contrazione indotta da 1.5 μ M di Callipeltina A.

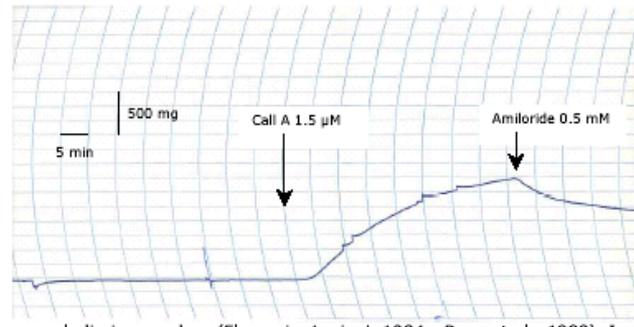


Figura 15. Effetto dell'amiloride (0.5 mM) sulla contrazione di un anello di aorta toracica di cavia indotta da Callipeltina A (1.5 μM).

Inoltre, se viene aggiunto prima, è capace di prevenire la contrazione dell'aorta indotta da 1.5 e 3 μM di Callipeltina A (figura 16), suggerendo che la contrazione data dalla Callipeltina A potrebbe essere mediata da un'attivazione e non da un'inibizione dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$.

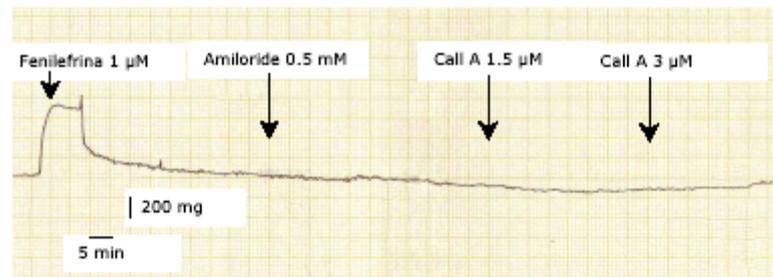


Figura 16. Effetto del pretrattamento con amiloride (0.5mM) sulla risposta dell'aorta di cavia alla Callipeltina A.

Una spiegazione a questi effetti potrebbe derivare coinvolgendo un'azione di tipo ionoforo della Callipeltina A attraverso la membrana cellulare.

Un'azione di tipo ionoforo del sodio potrebbe spiegare anche gli effetti della Callipeltina A a livello cardiaco; infatti, l'ingresso di sodio nell'atrio isolato induce una diminuzione del gradiente del sodio stesso, che provoca un aumento dell'ingresso di calcio tramite lo scambiatore sodio-calcio con conseguente effetto inotropo positivo. Inoltre, nelle vescicole di sarcolemma cardiaco un effetto ionoforo del sodio si traduce in un annullamento del gradiente di sodio che impedisce il

trasporto di calcio all'interno delle vescicole e che può essere interpretato come un'inibizione dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$.

Sono state, quindi, eseguite indagini sull'effetto ionoforo misurando la concentrazione di sodio intracellulare e le correnti di sodio in miociti cardiaci e vascolari. In pratica, le cellule vengono poste inizialmente in una soluzione fisiologica contenente sodio, poi lavate e messe in una soluzione senza sodio che contiene Callipeltina A. A determinati intervalli di tempo viene misurata la concentrazione di sodio extracellulare con spettroscopia ad assorbimento atomico. L'esperimento viene condotto anche in presenza di inibitori delle pompe presenti nella membrana e responsabili del trasporto di sodio verso l'esterno. Con questi esperimenti è stato possibile stabilire che la Callipeltina A induce un aumento della corrente di sodio concentrazione dipendente (figura 17) attraverso la membrana cellulare non mediata da altri trasportatori e probabilmente con un meccanismo di tipo ionoforo.

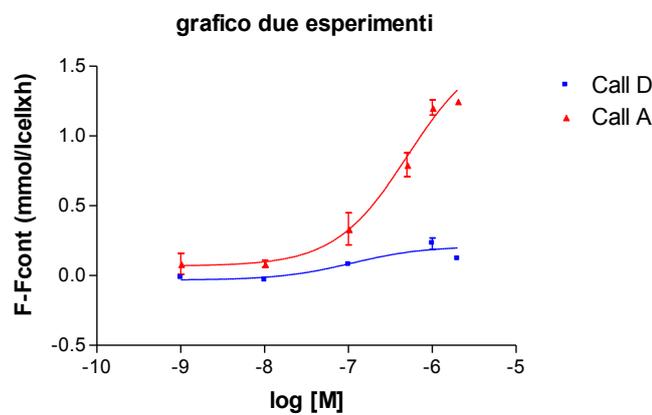


Figura 17. Effetto della Callipeltina A sul flusso di Na^+ in preparati di miociti cardiaci.

6.1.3. Studi NMR di complessazione della Callipeltina A con metalli alcalini

Al fine di confermare l'ipotesi farmacologica che l'induzione di un aumento di contrattilità cardiaca e vascolare da parte della Callipeltina A non sia imputabile ad un effetto diretto sullo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ bensì ad un aumento della concentrazione di sodio intracellulare per probabile effetto ionoforo precedentemente esposta, sono stati effettuati studi preliminari di spettroscopia NMR per stabilire la capacità della Callipeltina A di sequestrare cationi monovalenti come Na^+ , K^+ , Li^+ .

Lo studio degli ionofori è di particolare interesse e molte sono le teorie a sostegno del loro meccanismo d'azione. In particolare l'effetto ionoforo potrebbe essere spiegato coinvolgendo la creazione di pori o canali da parte della molecola organica o anche ammettendo che lo ionoforo possa agire come carrier mobile.

Una teoria molto più recente prevede la formazione di strutture sandwich generate da un rapporto 2:1 tra il peptide ciclico ed il catione. Indubbiamente in questi complessi sandwich il catione è effettivamente più protetto dalle interazioni con la porzione idrofobica del doppio strato lipidico e più efficiente risulta il passaggio attraverso il bilayer. Va sottolineato che importanti informazioni sulla struttura del complesso e sul meccanismo stesso di complessazione possono derivare da studi NMR di complessazione in soluzione.

A tal proposito è stata valutata la capacità della Callipeltina A di complessare cationi monovalenti come Li^+ , K^+ , e Na^+ attraverso studi spettroscopici.

Sono state quindi preparate soluzioni di 5-10 mg di Callipeltina A svolti in 500 μl di CD_3OD e titolati con soluzioni a titolo noto di cationi monovalenti. I sali scelti sono stati LiClO_4 , NaSCN e KSCN , come donatori di cationi Li^+ , Na^+ , e K^+ perché solubili in solventi organici e commercialmente disponibili a una purezza maggiore del 99.9%. La titolazione è stata eseguita aggiungendo alla cuvetta NMR contenente Callipeltina A quantità crescenti di sale sciolto nello stesso solvente deuterato. Con il LiClO_4 lo spettro $^1\text{H-NMR}$ della Callipeltina A complessata risulta praticamente invariato nei suoi chemical shift rispetto a quello della Callipeltina A anche usando rapporti stechiometrici elevati (1:5) tra Callipeltina A e Li^+ .

Ben più soddisfacenti risultano i dati ottenuti con la complessazione con il NaSCN . In particolare lo spettro $^1\text{H-NMR}$ della Callipeltina A complessata con 3 equivalenti di NaSCN (figura 18) mostra significative variazioni del chemical shift di alcuni protoni α -amminoacidici, coinvolti probabilmente nella complessazione con il

catione. In particolare considerevoli spostamenti si osservano per i protoni α -aminoacidici del residuo di Thr-acilata, NMeAla, MeGlu, Thr non acilata e Leu, tutti i residui presenti nel macrociclo e, quindi, presumibilmente coinvolti nella formazione della cavità in cui deve essere alloggiato il metallo.

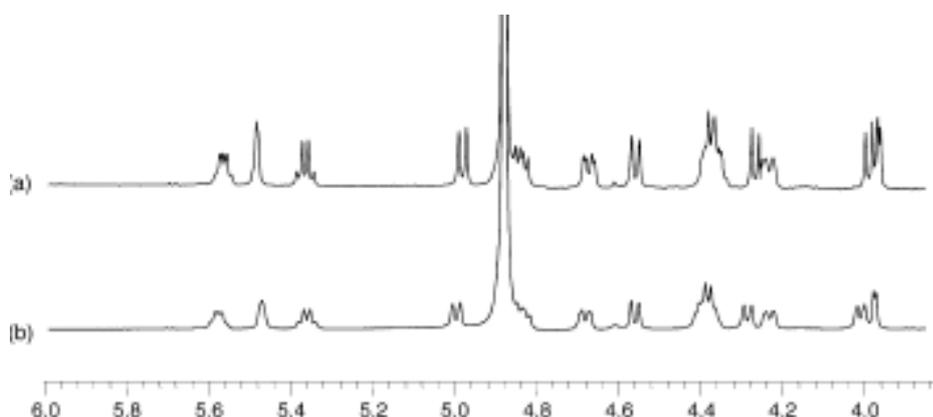


Figura 18. (a) ^1H NMR (espansione) della Callipeltina A. (b) Callipeltina A + 3 equivalente di NaSCN.

E', inoltre, ragionevole ipotizzare l'esistenza di interazioni di tipo ione-dipolo tra i C=O amidici ed il metallo stesso $[\text{C}=\text{O}\dots\text{Me}^+]$ che possono provocare il trasferimento di densità elettronica verso l'ossigeno carbonilico con conseguente deschermaggio del carbonio.

E' stato quindi registrato uno spettro ^{13}C -NMR della Callipeltina A complessata con 3 equivalenti di NaSCN (figura 19). Come si può osservare dall'espansione della zona compresa tra 160 e 180 ppm, molti segnali attribuiti ai carboni amidici subiscono considerevoli spostamenti in seguito all'aggiunta del catione. Dati ^1H -NMR e ^{13}C -NMR pressoché equivalenti sono stati ottenuti dalla titolazione di un campione della Callipeltina A con una soluzione a titolo noto di KCNS in CD_3OD .

Ulteriori studi mirati alla comprensione della struttura tridimensionale di questi complessi al calcolo della costante di affinità e soprattutto alla comprensione del meccanismo molecolare attraverso il quale la Callipeltina A consentirebbe il passaggio di questi ioni attraverso i sistemi biologici sono tuttora in corso.

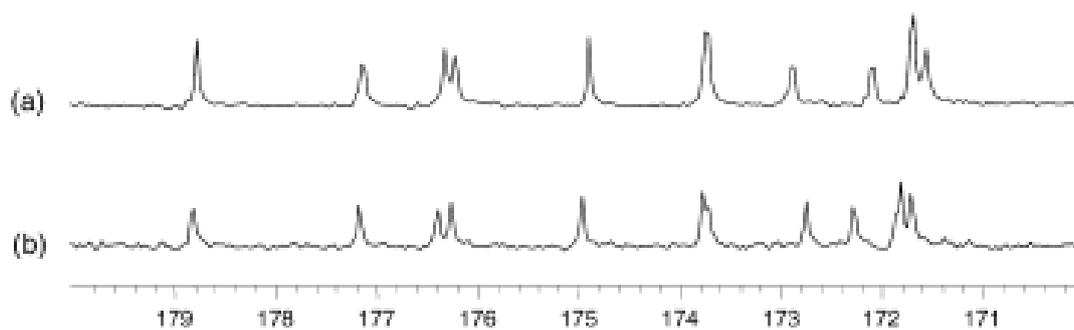


Figura 19. (a) ^{13}C NMR (regione carbonilica) della *Callipeltina A*. (b) *Callipeltina A* + 3 equivalente di NaSCN.

6.2. Studi biologici sulle nuove Callipeltine

Le nuove Callipeltine isolate sono state testate per valutare una eventuale attività anti HIV su cellule umane T-linfoblastoidi. Non è stata però osservata alcuna inibizione, neppure a concentrazioni di 2 µg/mL. Questi dati hanno confermato ancora una volta la necessità di una conformazione ciclica costretta per esplicitare tale attività come osservato per la Callipeltina A.

Tutti i nuovi metaboliti hanno però mostrato una inibizione della crescita di *Candida Albicans* (ATCC24433) mostrando delle MIC di 10^{-4} M⁷¹.

CAPITOLO 7

7.1. Apparecchiature utilizzate

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ sono stati realizzati su apparecchi Varian Mercury-400 e Inova-500 (^1H a 400 e 500 MHz, ^{13}C a 100 e 125 MHz) corredati di un computer Bruker X-32.

I valori $^1\text{H-NMR}$ sono riportati in unità δ (ppm), mentre i valori delle J sono riportati in Hz.

Le misure relative al potere ottico rotatorio, $[\alpha]_D$, sono state realizzate mediante un polarimetro Perkin-Elmer 243 B.

Le analisi spettrometriche di massa sono state realizzate utilizzando uno spettrometro a triplo quadrupolo Applied Biosystem API 2000 con sorgente ESI.

Le separazioni cromatografiche HPLC sono state effettuate utilizzando una pompa Waters modello 6000 A con iniettore U6K ed un rifrattometro differenziale modello 401.

La purificazione dei prodotti è stata ottenuta attraverso cromatografia su colonna solido-liquido utilizzando come fase stazionaria gel di silice (Macherey-Nagel 70-230 mesh) e come fase mobile miscele di *n*-esano/etilacetato o cloroformio/metanolo.

I profili di eluizione sono stati definiti caso per caso, tenendo conto dei valori di R_f ricavabili dalle TLC con Kieselgel 60 F₂₅₄ (rilevate con reattivo di Pancaldi o ninidrina) usate per monitorare l'andamento delle singole reazioni.

Tutti i reattivi impiegati corrispondono a quelli commercializzati dalla Sigma-AldrichTM.

I solventi dry utilizzati per le reazioni sono stati distillati immediatamente prima dell'uso, utilizzando come agente disidratante CaH_2 .

Tutte le reazioni sono state effettuate in vetreria fiammeggiata sotto argon ed eseguite in atmosfera inerte di argon.

7.2. Isolamento delle Callipeltine J e M

La spugna liofilizzata (800 g) è stata estratta con MeOH (4×2.5 l) a temperatura ambiente. L'estratto metanolico (80 g) è stato ripartito secondo la metodica di Kupchan⁷⁶ modificata. La frazione solubile in *n*-BuOH (4 g) è stata ulteriormente suddivisa mediante DCCC (CHCl₃/MeOH/H₂O, 7:13:8) in modo ascendente. Le singole frazioni sono state controllate con TLC su gel di silice, usando come fase eluente una miscela di *n*-butanolo/acido acetico/acqua 60:15:25 e riunite in base al comune comportamento cromatografico. In questo modo abbiamo ottenuto tre frazioni (4 ml).

La frazione 10 è stata purificata inizialmente mediante HPLC a fase inversa utilizzando una colonna Vydac C18 (10 μ , 250 x 10 mm, 4 ml/min) e come eluente una miscela CH₃CN/H₂O 28% (0.1 % TFA) portando a 16.8 mg di Callipeltina K (**22**) ($t_R = 5.4$ min). I picchi a $t_R = 2.4$ min e 3.1 min sono stati ulteriormente purificati mediante HPLC a fase inversa utilizzando una Thermo-Hypurity (5 μ , 250 x 4.6 mm) e come eluente una miscela CH₃CN/H₂O 28% (0.05 % TFA), portando a 6.9 mg di Callipeltina M (**36**) ($t_R = 3.4$ min) e a 1.2 mg di Callipeltina J (**21**) ($t_R = 5.4$ min).

Le frazioni 11-12 sono state purificate inizialmente mediante HPLC a fase inversa utilizzando una colonna Vydac C18 (10 μ , 250 x 10 mm, 4 ml/min) e come eluente una miscela CH₃CN/H₂O 28% (0.1 % TFA) portando ad un picco a $t_R = 10.6$ min contenente principalmente Callipeltina L (**30**). Tale picco è stato ulteriormente purificato mediante HPLC a fase inversa utilizzando una Thermo-Hypurity (5 μ , 25 x 4.6 mm) e come eluente una miscela CH₃CN/H₂O 27% (0.05 % TFA) per dare 5.0 mg di Callipeltina L (**35**) pura ($t_R = 4.2$ min).

7.3. Determinazione della configurazione assoluta

7.3.1. Idrolisi del peptide

200 µg di peptide sono stati sciolti in 0.5 ml di HCl 6 N vaporizzato sotto vuoto spinto e portata a una temperatura di 160 °C per 16 h in tubo chiuso. Il solvente è stato allontanato sotto vuoto e l'idrolizzato è successivamente sottoposto a derivatizzazione.

7.3.2. Derivatizzazione con il reattivo di Marfey

Un'aliquota del composto idrolizzato (800 µg) o dell'amminoacido standard (500 µg) sono sciolti in 80 µl di una soluzione TEA/MeCN 2:3 e trattati con 75 µl di una soluzione all'1% di 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamide (L-FDAA) in MeCN/acetone 1:2. Le vials sono state riscaldate a 70 °C per 1 h. Dopo il raffreddamento sono stati aggiunti 50 µl di HCl 0.2 N; la soluzione è stata quindi portata a secco e diluita con MeCN-5 % HCOOH in H₂O (1:1). La miscela di amminoacidi derivatizzati con il reattivo di Marfey è stata analizzata per HPLC su colonna analitica Vydac C18 (25 x 1.8 mm i.d.) utilizzando un gradiente lineare che va dal 10% al 50% di acqua:acetonitrile contenente 5% di acido formico e 0.05% di acido trifluoroacetico, per 45 min a 1 ml/min. Il sistema RP-HPLC è stato collegato a una sorgente di massa Elettrospray, inserendo una valvola splitter e il flusso all'interno dello spettrometro di massa era di 100 µl/min. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità di ioni positivi (intervallo $m/z=320-900$). I dati sono stati analizzati utilizzando il programma Xcalibur; tutte le masse sono state riportate come valori medi. La temperatura capillare è stata fissata a 280 °C, il voltaggio a 37 V e il voltaggio dello ione a 5 V.

I tempi di ritenzione dell'L-FDAA-amminoacidi di riferimento sono (min): L-Thr (12.5), D-Thr (17.6), L-*allo*-Thr (13.1), D-*allo*-Thr (14.1), D-Ala (20.0), L-Ala (16.6), L-*N*-MeAla (18.7), D-*N*-MeAla (19.4), L-Arg (11.7), D-Arg (13.08), L-Leu (28.9), D-Leu (34.8), (2*R*,3*R*,4*S*)-AGDHA (19.5), (3*S*,4*R*)-3,4-diMe-L-Glu (17.7).

L'idrolizzato della Callipeltina J (**21**) contiene: D-*allo*-Thr (14.5), D-Ala (20.5), (2*R*,3*R*,4*S*)-AGDHA (19.5), (2*R*,3*S*)-3-MeGlu (18.2).

L'idrolizzato della Callipeltina K (**22**) contiene: D-*allo*-Thr (14.5), D-Ala (20.5), L-N-MeAla (18.5), D-Arg (13.0), L-Leu (29.3), (2*R*,3*R*,4*S*)-AGDHA (19.5), (2*R*,3*S*)-3-MeGlu (18.2).

L'idrolizzato della Callipeltina M (**36**) contiene: D-*allo*-Thr (14.5), L-N-MeAla (18.5), D-Arg (13.0), L-Leu (29.3), (3*S*,4*R*)-3,4-diMe-L-Glu (17.7).

7.3.3. Determinazione della configurazione assoluta della β -OMeTyr

In una soluzione di Callipeltina K (0.5 mg), Callipeltina M (0.5 mg) o degli aminoacidi standard sintetici (1 mg) in metanolo (0,5 ml) viene fatto gorgogliare un flusso di ozono in O₂ a -78 °C per un'ora.

Alla miscela di reazione viene aggiunto perossido di idrogeno (35%; 10 gocce) e si lascia andare il tutto overnight a temperatura ambiente.

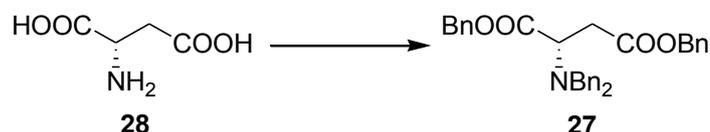
Work up: il solvente viene allontanato sotto un flusso di N₂; per gli aminoacidi standard, si ottengono i β -metossiaspartati che vengono subito derivatizzati secondo il metodo di Marfey. Il prodotto di ozonolisi delle Callipeltine K e M viene successivamente sottoposto ad idrolisi mediante una soluzione di HCl 6 N degassata (0.5 ml) in un apposito tubo di vetro a 160 °C per 16 ore. Il solvente viene allontanato sotto vuoto e l'idrolizzato sottoposto a derivatizzazione.

I tempi di ritenzione degli aminoacidi-L-FDAA di riferimento (β -OMeAsp) sono: (2*S*,3*S*)- β -OMeAsp (10.2 min), (2*S*,3*R*)- β -OMeAsp (16.1 min), (2*R*,3*S*)- β -OMeAsp (17.3 min), (2*R*,3*R*)- β -OMeAsp (9.9 min).

L'idrolizzato del prodotto di ozonolisi delle Callipeltine K e M contiene: (2*R*,3*S*)- β -OMeAsp (17.3 min).

7.4. Procedure sintetiche e dati spettroscopici per l'acido 3-metil-L-glutammico

Sintesi dell'estere dibenzilico dell'acido N,N-dibenzil-L-aspartico (27)



- **28** (1.0 g, 7.519 mmoli, P.M. 133)
- Na₂CO₃ (2.0 eq, P.M. 106)
- NaOH (2.0 eq, P.M. 40)
- BnBr (6.0 eq, P.M. 171.04, d = 1.438 g/ml)
- H₂O distillata
- T = 150°C a ricadere

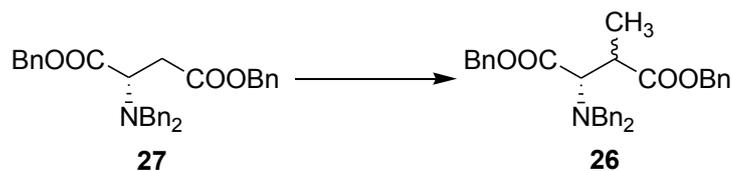
In acqua distillata si sciolgono 1.59 g di Na₂CO₃ e 600 mg di NaOH; a tale soluzione si aggiunge 1.0 g di L-Asp-OH. Si pone tutto a ricadere a 150°C circa. Appena la soluzione diventa limpida si aggiungono 5.3 ml di BnBr gtt a gtt. La reazione è lasciata sotto vigorosa agitazione per circa 1 h.

Work-up: la soluzione è trattata con acqua ed estratta per tre volte con etere. La fase organica risultante è anidrificata con Na₂SO₄, filtrata su buchner e concentrata al rotavapor. Il prodotto grezzo ottenuto è purificato su colonna di silice (SiO₂) in rapporto 1:20 eluendo con esano/etilacetato 94:6. Si ottengono 3.4 g del composto **27** con resa del 93%. La reazione è monitorata mediante TLC, usando come miscela eluente 9:1 di esano/etilacetato.

¹H-NMR **27**: (400 MHz, CDCl₃) δ 2.74 (1H, dd, J = 7.06 e 15.8 Hz), 2.95 (1H, dd, J = 8.13 e 15.8 Hz), 3.54 (2H, d, J = 13.8 Hz), 3.79 (2H, d, J = 13.8 Hz), 3.98 (1H, dd, J = 7.06 Hz, 8.13 Hz), 4.93 (1H, d, J = 12.2 Hz), 5.14 (2H, t, J = 12.5 Hz), 5.27 (1H, d, J = 12.2 Hz), 7.25 – 7.4 (20H, m).

¹³C-NMR **27**: (100 MHz, CDCl₃) δ 35.4, 55.0, 58.3, 66.7, 66.8, 127.4, 128.5, 128.5, 128.7, 128.8, 128.8, 128.9, 129.1, 135.9, 136.0, 139.1, 171.1, 171.6.

Sintesi dell'estere dibenzilico dell'acido N,N-dibenzil-L- β -metilaspartico (**26**)



- **27** (2.0 g, 4.06 mmoli, P.M. 493)
- CH₃I (3.0 eq, P.M. 141.94, d = 2.280 g/ml)
- KHMDS (2.2 eq, 0.5 M in toluene)
- THF dry
- T = -78°C

2.0 g di prodotto **27**, sciolto in THF dry, si pongono a -78°C. A questa soluzione si aggiungono 758 μl di CH₃I e 17.8 ml di KHMDS gtt a gtt. La reazione è lasciata sotto vigorosa agitazione a -78°C per circa 3 h fino a scomparsa del prodotto di partenza.

Work-up: la soluzione è trattata con una soluzione satura di NH₄Cl ed estratta per tre volte con etilacetato. Le fasi organiche riunite si lavano con una soluzione satura di NaHCO₃ e poi con acqua. La soluzione è anidrificata con Na₂SO₄, filtrata con buchner e concentrata al rotavapor. Si ottengono 1.83 g di prodotto **26** (miscela diastereoisomerica 3:2) con una resa dell'89%. La reazione è monitorata mediante TLC usando come miscela eluente 95:5 di esano/etilacetato.

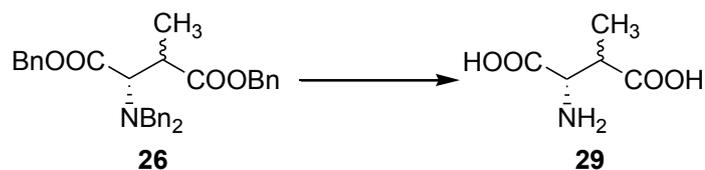
HRMS (ESI): calcolata per C₃₃H₃₄NO₄: 508.2488; trovata 508.2466 [M+H]⁺.

¹H-NMR **26a**: (400 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (3H, d, J = 7.05 Hz), 3.06 (1H, m), 3.37 (2H, d, J = 13.5 Hz), 3.55 (2H, d, J = 8.99 Hz), 4.00 (1H, d, J = 11.7 Hz), 4.93 (2H, m), 7.2 - 7.4 (20H, m).

¹H-NMR **26b**: (400MHz, CDCl₃) δ 1.06 (3H, d, J = 7.18 Hz), 3.24 (1H, m), 3.28 (2H, d, J = 13.5 Hz), 3.53 (2H, d, J = 8.99 Hz), 3.66 (1H, d, J = 11.2 Hz), 5.11 (2H, m), 7.2-7.4 (20H, m).

¹³C-NMR **26a**: (100 MHz, CDCl₃) δ 15.4, 39.6, 55.1, 66.4, 66.5, 128.5, 129.4, 129.5, 138.9, 139.3, 171.4, 171.7.

¹³C-NMR **26b**: (100 MHz, CDCl₃) δ 14.3, 35.4, 57.7, 66.4, 66.5, 127.4, 128.8, 129.2, 136.3, 137.6, 175.3, 176.8.

Sintesi dell'acido L- β -metilaspartico (**29**)

- **26** (1.0 g, 2.83 mmoli, P.M. 507)
- Pd(OH)₂degussa type
- Metanolo dry
- 6 atm

Una soluzione di 1.0 g del composto **26** in 20 ml di metanolo dry è idrogenata in apparecchiatura PARR alla pressione di 6 atm in presenza di Pd(OH)₂ (Degussa E101). La reazione viene lasciata per 12 h sotto vigorosa agitazione fino a completa scomparsa del composto di partenza. Il catalizzatore viene rimosso per filtrazione su setto di celite ed il filtrato viene concentrato al rotavapor.

Il prodotto grezzo ottenuto è purificato su colonna di silice RP18 in rapporto 5:1 eluendo con acqua distillata. Si ottengono 451 mg del prodotto **29** (miscela diastereoisomerica 3:2) con una resa dell'80%. La reazione è monitorata mediante TLC usando come miscela eluente 9:1 esano/etilacetato.

HRMS (ESI): calcolata per C₅H₁₀NO₄: 148.1367; trovata 148.1355 [M+H]⁺.

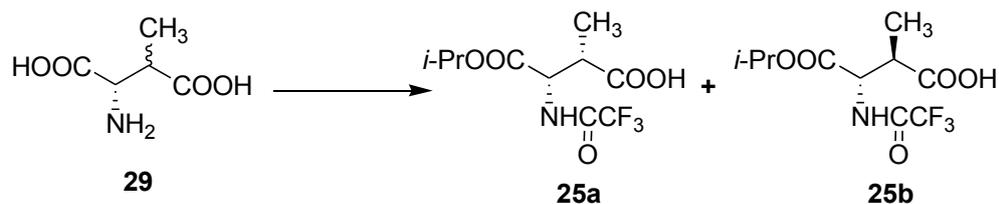
¹H-NMR **29a**: (400 MHz, D₂O) δ 1.08 (3H, d, J = 10.78 Hz), 2.94 (1H, m), 3.76 (1H, d, J = 4.39 Hz).

¹H-NMR **29b**: (400 MHz D₂O) δ 1.01 (3H, d, J = 7.56 Hz), 2.94 (1H, m), 3.88 (1H, d, J = 3.32 Hz).

¹³C-NMR **29a**: (100 MHz, D₂O) δ 14.2, 57.1, 65.1, 174.7.

¹³C-NMR **29b**: (100 MHz, D₂O) δ 11.5, 51.8, 61.0, 172.7.

Sintesi dell'isopropil L-3-metil-N-trifluoroacetilaspargato (**25a** e **25b**)



- **29** (2.11 mmoli, P.M. = 147)
- (CF₃CO)₂O (0.05 eq, P.M. = 210.03, d = 1.511 g/ml)
- THF dry
- T = 0°C
- **30** (2.86 mmoli, P.M. = 225)
- *i*-PrOH dry (3 eq, P.M. = 60.10, d = 0.785 g/ml)

A 420 mg del prodotto **29**, sciolto in THF dry e posto a 0°C, si aggiungono 14.6 µl di anidride trifluoroacetica. La reazione è lasciata sotto vigorosa agitazione per circa 30 min fino a completa scomparsa del prodotto di partenza.

Work up: si porta a secco per eliminare il solvente e si tiene al liofilizzatore per circa 4 h. Si ottengono 644 mg di prodotto **30** con resa quantitativa.

La reazione è monitorata mediante TLC utilizzando come miscela eluente 1:1 di diclorometano/metanolo.

Il prodotto **30**, 644 mg, si scioglie direttamente in isopropanolo dry. Si tiene per circa 6 h sotto vigorosa agitazione, fino a scomparsa del prodotto di partenza. La miscela di reazione resta collegata ad una pompa da vuoto per tutta la notte.

Il prodotto grezzo (389 mg) viene, a scopo analitico, frazionato mediante HPLC consentendo la separazione dei 2 diastereoisomeri **25a** (106.8 mg, *t_R*=10min) e **25b** (188.7 mg, *t_R*=13min). La colonna utilizzata è una Macherey-Nagel, SP 250/10 Nucleosil 50-7, 10µ, 250 x 10 mm, e la miscela eluente è 8:2 esano/etilacetato con lo 0.05% di acido trifluoroacetico ad un flusso di 5 mL/min.

25a HRMS (ESI): calcolata per C₁₀H₁₅F₃NO₅: 286.0902; trovata 286.0911 [M+H]⁺.

25b HRMS (ESI): calcolata per C₁₀H₁₅F₃NO₅: 286.0902; trovata 286.0905 [M+H]⁺.

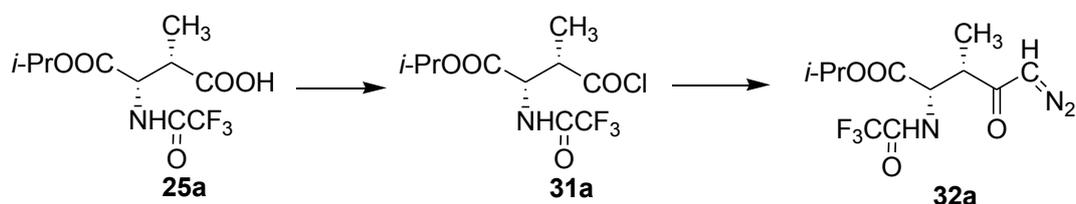
¹H-NMR **25a**: (400 MHz, CDCl₃) δ 1.29 (6H, 2d, J = 6.26 Hz), 1.33 (3H, d, J = 7.45 Hz), 3.08 (1H, dq, J = 4.21 Hz, 7.45 Hz), 4.81 (1H, dd, J = 4.21 Hz, 8.31 Hz), 5.10 (1H, sep, J = 6.26 Hz), 7.33 (1H, d, J = 8.31 Hz), 8.63 (1H, s).

¹H-NMR **25b**: (400 MHz, CDCl₃) δ 1.26 (3H, d, J = 6.20 Hz), 1.28 (3H, d, 6.20 Hz), 1.33 (3H, d, J = 7.3 Hz), 3.43 (1H, dq, J = 3.56 Hz, 7.3 Hz), 4.84 (1H, dd, J = 3.56 Hz, 8.96 Hz), 5.08 (1H, sep, J = 6.20 Hz), 7.29 (1H, d, J = 8.96 Hz), 7.69 (1H, s-br).

¹³C-NMR **25a**: (100 MHz, CDCl₃) δ 13.5, 21.7, 41.9, 54.5, 71.4, 168.6, 178.3.

¹³C-NMR **25b**: (100 MHz, CDCl₃) δ 13.5, 21.7, 21.8, 41.9, 54.4, 71.4, 168.6, 178.2.

Sintesi dell'isopropil (2*S*,3*R*)-5-diazo-4-oxo-N-trifluoroacetilisoleucinato (**32a**)



- **25a** (0.32 mmoli, P.M. = 285)
- COCl₂ 2M in CH₂Cl₂ (5.0 eq, P.M. = 216.93, d = 1.455 g/ml)
- DMF dry (0.16 eq, P.M. 73.10, d = 0.918 g/ml)
- CH₂Cl₂ dry
- **31a** (0.35 mmoli, P.M. = 303)
- CH₂N₂
- dietilere dry
- T = 0°C

A 90 mg del composto **25a**, sciolto in CH₂Cl₂ dry, si aggiungono 1.6 ml di COCl₂ e 4.0 µl di DMF dry. La reazione si tiene per circa 15 min.

Work up: si porta a secco sotto argon al rotavapor.

Si ottengono 106 mg del composto **31a** con resa quantitativa.

Al prodotto **31a**, in dietilere dry, si cannula il diazometano a 0°C (il diazometano è preparato di fresco con etere dry e dietilenglicole-monoetilere, in vetreria

fiammeggiata). La reazione è lasciata sotto vigorosa agitazione per circa 45 min, fino a completa scomparsa del prodotto di partenza.

Work up: si allontana il solvente al rotavapor.

Il prodotto grezzo ottenuto è purificato su colonna di silice (SiO₂) in rapporto 1:20, eluendo con esano/etilacetato 9:1. Si ottengono 58.4 mg del composto **32a** con una resa del 62%. La reazione è monitorata mediante TLC utilizzando come miscela eluente 8:2 di esano/etilacetato.

La stessa procedura sintetica è stata applicata al composto **25b** per dare il composto **32b**.

32a HRMS (ESI): calcolata per C₁₀H₁₅F₃N₃O₃: 282.1066; trovata 282.1055 [M+H]⁺.

32b HRMS (ESI): calcolata per C₁₀H₁₅F₃N₃O₃: 282.1066; trovata 282.1072 [M+H]⁺.

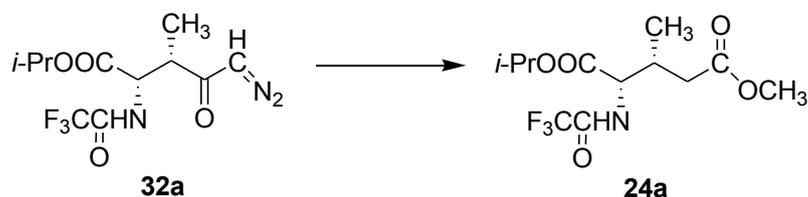
¹H-NMR **32a**: (400 MHz, CDCl₃) δ 1.27 (6H, d, J = 6.03 Hz), 1.34 (3H, d, J = 7.28 Hz), 2.98 (1H, m), 4.58 (1H, dd, J = 4.45 Hz, 7.38 Hz), 5.10 (1H, sep, J = 6.03 Hz), 5.38 (1H, s), 7.38 (1H, s).

¹H-NMR **32b**: (400 MHz, CDCl₃) δ 1.18 (6H, d, J = 6.84 Hz), 1.20 (3H, d, J = 7.44 Hz), 3.23 (1H, m), 4.61 (1H, dd, J = 3.11 Hz, 7.48 Hz), 4.97 (1H, sep J = 6.84 Hz), 5.29 (1H, s-br), 7.71 (1H, d, J = 7.48 Hz).

¹³C-NMR **32a**: (100 MHz, CDCl₃) δ 14.5, 21.8, 21.9, 46.2, 54.9, 55.4, 70.7, 168.6, 171.3.

¹³C-NMR **32b**: (100 MHz, CDCl₃) δ 14.8, 22.98, 23.0, 46.4, 54.8, 60.5, 69.1, 169.0, 179.0.

Sintesi dell'isopropil (2*S*,3*S*)-3-metil-N-trifluoroacetilglutammato (**22a**)



- **32a** (0.2 mmoli, P.M. = 309)
- Benzoato di Ag (0.1 eq, P.M. = 228.9)
- Trietilammina (2.9 eq, P.M. = 101, d = 0.725 g/ml)

- Metanolo dry: THF dry 1.4:1
- T = -15°C

55 mg del composto **32a** si sciolgono nella miscela metanolo dry: THF dry 1.4: 1 e si pone sotto argon, al riparo dalla luce, in un bagnetto di ghiaccio e sale ad una temperatura di -15°C. A questa soluzione si aggiunge un'altra soluzione composta da 4.58 mg di Ag benzoato in 83.6 µl di TEA. La reazione è lasciata sotto vigorosa agitazione a temperatura ambiente per 3 h, fino a completa scomparsa del prodotto di partenza.

Work up: si allontana il solvente al rotavapor, si tratta con una soluzione satura di NaHCO₃, e si estrae con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione satura di NH₄Cl e poi con una soluzione satura di NaCl. Quindi vengono anidificate con Na₂SO₄, filtrate e portate a secco. La reazione è monitorata mediante TLC usando come eluente 8:2 esano/etilacetato. Il prodotto grezzo così ottenuto è purificato mediante HPLC, utilizzando una colonna Macherey-Nagel, SP 250/10 Nucleosil 50-7, 10µ, 250 x 10 mm ed una miscela eluente di esano/etilacetato 75:25 con lo 0.05% di acido trifluoroacetico ad un flusso di 5 mL/min. Si ottengono 35.7 mg del composto **24a** con una resa del 57%.

La stessa procedura sintetica è stata applicata al composto **32b** per dare il composto **24b**.

24a HRMS (ESI): calcolata per C₁₂H₁₉F₃NO₅: 314.1215; trovata 314.1225 [M+H]⁺.

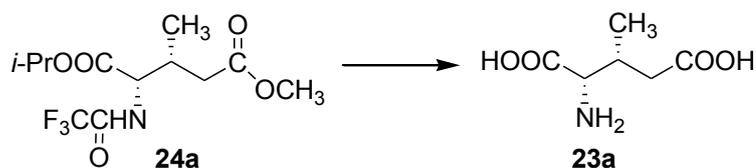
24b HRMS (ESI): calcolata per C₁₂H₁₉F₃NO₅: 314.1215; trovata 314.1207 [M+H]⁺.

¹H-NMR **24a**: (400 MHz, CDCl₃) δ 1.07 (3H, d, J = 7.02 Hz), 1.29 (6H, d, J = 6.35 Hz), 2.1 (1H, dd, J = 6.7 Hz, 16.5 Hz), 2.5 (1H, dd, J = 8.18 Hz, 16.5 Hz), 2.84 (1H, m), 3.71 (3H, s), 4.22 (1H, d, J = 7.5 Hz), 5.11 (1H, sep, J = 6.35 Hz), 5.9 (1H, s-br).

¹H-NMR **24b**: (400 MHz, CDCl₃) δ 1.04 (3H, d, J = 7.05 Hz), 1.29 (6H, d, J = 6.34 Hz), 2.33 (1H, dd, J = 6.75 Hz, 16.00 Hz), 2.47 (1H, dd, J = 5.20 Hz, 16.00 Hz), 2.62 (1H, m), 3.70 (3H, s), 4.55 (1H, dd, J = 5.20 Hz, 8.20 Hz), 5.09 (1H, sep, J = 6.34 Hz), 7.55 (1H, d, J = 8.20 Hz).

¹³C-NMR **24a**: (100 MHz, CDCl₃) δ 15.9, 22.0, 22.1, 29.9, 32.9, 37.9, 60.2, 69.5, 170.5, 177.4.

¹³C-NMR **24b**: (100 MHz, CDCl₃) δ 16.6, 21.9, 32.8, 37.5, 52.2, 57.1, 70.6, 94.6, 172.8, 175.7.

Sintesi dell'acido 3-metilglutammico (**23a**)

- **24a** (0.032 mmoli, P.M. = 313)

- HCl 6N

- T = 120°C in stufa

Un'aliquota di composto **24a**, pari a 10 mg, è stata sottoposta ad idrolisi acida con HCl 6N (0.5 ml), vaporizzato sotto vuoto spinto, e portata ad una temperatura di 120°C per 2-3 h.

Il solvente è stato allontanato sotto vuoto.

Si ottengono 5.15 mg del composto **23a** con una resa quantitativa.

La stessa procedura sintetica è stata applicata al composto **24b** per dare il composto **23b**.

23a HRMS (ESI): calcolata per C₆H₁₂NO₄: 162.0766; trovata 162.0755 [M+H]⁺.

23b HRMS (ESI): calcolata per C₆H₁₂NO₄: 162.0766; trovata 162.0772 [M+H]⁺.

¹H-NMR **23a**: (400 MHz, D₂O) δ 1.05 (3H, d, J = 6.74 Hz), 2.45 (1H, dd, J = 6.74 Hz, 15.84 Hz), 2.61 (1H, dd, J = 6.49 Hz, 15.84 Hz), 2.66 (1H, m-ovl), 4.07 (1H, d, J = 3.82 Hz).

¹H-NMR **23b**: (400 MHz, D₂O) δ 1.01 (3H, d, J = 6.62 Hz), 2.42 (1H, dd, J = 7.70 Hz, 15.6 Hz), 2.62 (1H, dd, J = 5.56 Hz, 15.6 Hz), 3.16 (1H, m), 3.82 (1H, d, J = 3.60 Hz).

¹³C-NMR **23a**: (100 MHz, D₂O) δ 15.0, 31.0, 37.8, 58.2, 169.3, 176.4.

¹³C-NMR **23b**: (400 MHz, D₂O) δ 14.4, 31.1, 37.6, 58.1, 163.5, 178.2.

7.5. Test antifungini

I test di macrodiluizione dei brodi di coltura sono ottenuti utilizzando il metodo di riferimento standard NCCLS. Delle soluzioni stock di Callipeltine J-M (10^{-3} M) sono state preparate, divise in aliquote e conservate a -80 °C. Una aliquota è scongelata ogni giorno. Prima di eseguire il test, il ceppo di *Candida Albicans* (ATCC-24433) è stato caricato su piastre di agar di Sabouraud ed incubate per 48h a 28 °C. Per preparare una fase di crescita stazionaria una colonia è stata presa dal piatto di agar e trasferita in 30 ml di brodo di coltura fatto di destrosio-Sabaraud (DIFCO laboratori, Detroit, Mi) ed incubata per 7 h a 35 °C. Le cellule sono state centrifugate a 1000 giri \times 10 min ed il surnatante è stato lavato con H_2O distillata per due volte. Le cellule sono state contate e sospese in RPMI 1640 plus 0.165M MOPS tampone alla densità di 5000 CFU/ml. 100 μ l di sospensione di coltura è stata trasferita nei pozzetti di controllo o in pozzetti che contengono le Callipeltine alla concentrazione variante da $10^{-4}/10^{-8}$ M. Le piastre sono state incubate all'aria a 35 °C senza agitazione per 48 h. Ogni esperimento è stato eseguito per tre volte. Una crescita negativa corrisponde ad una crescita non visibile all'interno del pozzetto.

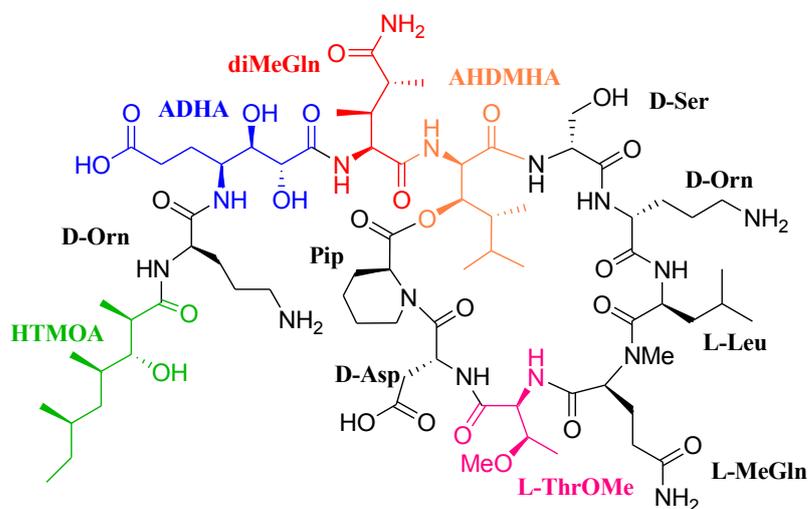
CAPITOLO 8

8.1. L'Homophymina A

Dalla spugna *Homophymia sp.*, appartenente allo stesso ordine, Lithistida, della Callipeltina A (2), è stato isolato un nuovo metabolita, l'**Homophymina A**⁵⁶(37), che presenta delle stringenti analogie farmacologiche e strutturali con la Callipeltina A.

Dal punto di vista strutturale l'Homophymina A è un cicloundecadepsipeptide derivante dalla lattonizzazione dell'estremità C-terminale (residuo di acido pipecolico Pip) con la funzione ossidrilica di un residuo di acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico (AHDMHA); è presente inoltre l'acilazione dell'estremità N-terminale con un β -idrossiacido (acido 3-idrossi-2,4,6-trimetilottanoico, HTMOA), C-1 omologo dell'HTMHA, residuo polichetidico legato all'N-terminale nella Callipeltina A.

Degli undici residui amminoacidici che costituiscono la struttura dell'Homophymina A solo tre sono L-amminoacidi (L-Leu, L-Pip, L-ThrOMe). Sono inoltre presenti amminoacidi appartenenti alla serie sterica D (due residui di D-Orn, una D-Ser e un D-Asp) un amminoacido N-alchilato (N-MeGln). L'aspetto più interessante di questo metabolita è la presenza di due residui amminoacidici mai precedentemente ritrovati in altri ciclodepsipeptidi naturali: l'acido 2,3-diidrossi-4-amminoeptano-1,7-dioico (ADHA) e l'acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico (AHDMHA) e la presenza di una (3S,4R)-3,4-dimetil-L-glutamina già ritrovata in altri ciclodepsipeptidi naturali.



Homophymina A (37)

Appare evidente la stretta analogia strutturale tra l'Homophymina A e la Callipeltina A. L'Homophymina A condivide con la Callipeltina A la presenza dell'unità di 3,4-diMeGln, Leu, N-MeGln e di un γ -amminoacido, C-2 omologo dell'acido glutammico, molto correlato all'AGDHA presente nella Callipeltina A. E' presente inoltre una correlazione strutturale molto evidente tra le due unità di β -idrossiacido che rispettivamente acilano l'unità N-terminale dei due peptidi.

Le analogie strutturali evidenziate si riflettono anche nelle proprietà farmacologiche esibite. In particolare anche l'Homophymina A risulta capace di inibire la moltiplicazione del virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1) e quindi, come la Callipeltina A, rappresenta un importante lead nella ricerca di nuovi farmaci per la terapia dell'AIDS.

8.1.1. Isolamento dell'Homophymina A

La spugna *Homophymia sp.* liofilizzata (200 g) è stata estratta con metanolo a temperatura ambiente.

L'estratto metanolico grezzo è stato sottoposto ad una versione modificata della metodica di estrazione di Kupchan,⁷⁶ la quale prevede la ripartizione tra solventi a polarità crescente (*n*-esano, CHCl₃ e *n*-BuOH):

- L'estratto metanolico è stato disciolto in una soluzione MeOH/H₂O al 10% v/v di H₂O ed estratto per tre volte con *n*-esano. Nella fase esanica si concentrano composti apolari come grassi, steroli, etc.
- La polarità della fase metanolica residua è stata aggiustata per aggiunta di H₂O fino alla concentrazione del 30% v/v ed estratta con CHCl₃ ottenendo anche in questo caso un estratto ricco di sostanze a media polarità come peptidi, macrolidi, steroli funzionalizzati, etc.
- La fase acquosa residua è stata concentrata a pressione ridotta per allontanare il metanolo ed è stata estratta per tre volte con *n*-BuOH. Nell'estratto butanolico si concentrano le sostanze più polari nonché i sali.

In particolare l'estratto cloroformico (3.5 g) conteneva derivati peptidici, come mostrato da un'analisi TLC e ¹H NMR dell'estratto grezzo.

La frazione solubile in cloroformio è stata ulteriormente frazionata mediante DCCC (cromatografia contro corrente a gocce, CHCl₃/MeOH/H₂O, 7:13:8) e le frazioni ottenute riunite in base al comune comportamento cromatografico. L'ulteriore purificazione in HPLC su colonna Vydac C₁₈ ha consentito la purificazione dell'Homophymina A, la cui caratterizzazione strutturale è stata oggetto del mio Dottorato di ricerca.

8.1.2. Studi strutturali sull'Homophymina A

Lo spettro di massa dell'Homophymina A (**37**) $\{[\alpha]_D = +9.30$ ($c=0.48$, MeOH) $\}$ mostrava un picco pseudomolecolare $[M+H]^+$ a $m/z = 1598.9307$ corrispondente al peptide protonato, da cui si stabiliva la formula molecolare $C_{73}H_{127}N_{15}O_{24}$.

L'assegnazione delle unità amminoacidiche presenti nell'Homophymina A è stata effettuata mediante un'accurata analisi degli spettri NMR mono e bidimensionali (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC e ROESY). L'analisi degli spettri COSY e TOCSY, eseguiti in CD_3OH al 700 MHz, ha permesso di assegnare tutte le risonanze protoniche, incluse quelle scambiabili. Dall'analisi dell'HSQC, è stato quindi possibile attribuire a ciascun protone la corrispondente risonanza ^{13}C e quindi identificare tutti i residui amminoacidici presenti.

Nel dettaglio l'Homophymina A contiene due unità di ornitina (Orn), una serina (Ser), una leucina (Leu), un'unità di aspartato (Asp), una 3,4-dimetilglutammina (3,4-diMeGln), una *N*-metilglutammina (*N*-MeGln), una *O*-metil-treonina (ThrOMe), un residuo di acido pipercolico (Pip) e un acido 3-idrossi-2,4,6-trimetilottanoico (HTMOA) già ritrovato nella Theopapuamide¹⁸. L'aspetto più interessante è stato la presenza di residui funzionalizzati del tutto nuovi, mai ritrovati in altri ciclodepsipeptidi di origine marina come, l'acido 2,3-diidrossi-4-amminoeptan-1,7-dioico (ADHA) e l'acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetil-esanoico (AHDMHA).

Per la determinazione strutturale di questi ultimi residui è risultato molto utile, oltre agli esperimenti COSY/TOCSY, l'esperimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). In figura 20 sono mostrate le correlazioni COSY/TOCSY (legami pieni) ed HMBC (frecce) per i residui di HTMOA, ADHA e AHDMHA.

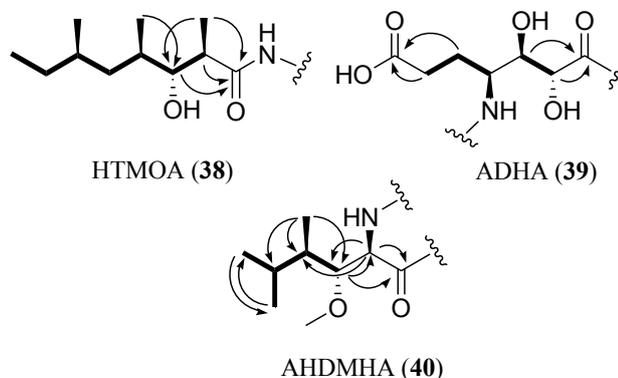


Figura 20 Correlazioni COSY/TOCSY (legami pieni) ed HMBC (frecce) per i residui di HTMOA, ADHA e AHDMHA.

**Tabella 7. Dati ^1H e ^{13}C NMR (700 MHz, CD_3OH)
dell'Homophymina A (37)**

Residuo	δ_{H}	δ_{C}	δ_{N}	HMBC	NOE ^b
HTMOA					
1	-	178.8		-	
2	2.66, m	44.5		1, 3, 4, 9	Orn ₁ -NH
3	3.54, dd (9.3, 2.3)	79.3		1, 2, 4, 9, 10	
4	1.77, ovl	33.1		2, 3, 5, 10	
5	1.09-1.32, ovl	36.9		3, 4, 6, 10	
6	1.47, ovl	32.4		4, 5, 7, 11	
7	1.01, 1.49, ovl	28.3		5, 6, 8	
8	0.89, t (7.0)	11.0		6, 7	
9	1.07, d (6.7)	14.5		1, 2, 3	
10	1.00, d (6.2)	17.5		3, 4, 5	
11	0.92, d (6.7)	20.5		5, 6, 7	
Orn₁					
1	-	174.3		-	
2	4.33, m	54.6		1, 3, 4	NH, ADHA-NH
3	1.78-1.91, ovl	29.0		2, 4, 5	
4	1.78, ovl	25.0		2, 3, 5	
5	3.03, ovl	40.4		3, 4	
NH	8.31, d (6.7)	-	124.3	1, 2, HTMOA-1	2, HTMOA-2
NH ₂	n.o.		n.o.		
ADHA					
1	-	176.1		-	
2	3.96, ovl	73.0		1, 3, 4	DiMeGln-NH
3	3.68, ovl	74.6		1, 2, 5	
4	4.11, ovl	50.7		5, 6	NH
5	1.83-1.92, ovl	27.5		4, 6, 7	
6	2.32-2.38, ovl	30.9		5, 7	
7		177.0			
NH	7.83, br s	-	118.5	Orn ₁ -1	4, Orn ₁ -2
3,4-DiMeGln					
1	-	174.2		-	
2	4.41, m	58.7		1, 3, 6, ADHA-1	AHDMHA-NH
3	2.22, m	38.0		1, 2, 4, 6, 7	
4	2.79, ovl	41.1		2, 3, 5, 6	
5	-	179.2		-	
6	1.08, d (6.8)	13.2		2, 3, 4	
7	1.20, d (7.0)	14.9		4, 5	
NH	8.97, br s	-	125.1	-	ADHA-2
NH ₂	6.74, 7.55 (s)	-	109.3	5	
AHDMHA					
1		173.4		-	
2	5.31, br s	55.2		1, 3, 4	7
3	5.61, br d (10.0)	77.3		2, 4, Pip-1	8
4	1.95, ovl	38.5		5, 7	
5	1.95, ovl	27.4		3, 7, 8	
6	0.93 d (6.8)	21.1		5, 8	
7	0.76 d (6.8)	8.7		3, 4, 5	2
8	0.73 d (6.8)	14.9		5, 6	3
NH	9.28, br s	-	116.2	-	DiMeGln-2
Ser					
1	-	172.5			

2	3.92, ovl	60.6		1, 3	Orn ₂ -NH
3	3.99-4.06, ovl	62.0		1, 2	
NH	8.34, br s		115.2	1	AHDMHA-2
Orn₂					
1	-	172.2		-	
2	4.53, m	52.5		1	
3	1.82-2.11, ovl	27.5		2, 4	
4	1.62-1.73, ovl	24.7		3, 5	
5	2.91, m	40.1		3, 4	
NH	8.36, br s		116.7	Ser-1	Ser-2
NH ₂	n.o.		n.o.		
Leu					
1	-	176.2		MeGln-NMe	
2	4.60, m	50.9		1, 3	MeGln-NMe
3	1.40-2.36, ovl	39.2		2, 4, 5	
4	2.02, ovl	25.7		3, 5, 6	
5	1.09, d (6.7)	23.9		3, 4	
6	1.00, d (6.3)	21.0		4, 5	
NH	7.60, br s		120.3	2, 3	
N-MeGln					
1	-	172.0		-	
2	5.45, br s	57.4		1	
3	1.92-2.45, ovl	23.0		1, 2, 4	
4	2.15-2.25, ovl	31.6		2, 3, 5	
5	-	177.2		-	
NMe	3.03, s	31.2		2, Leu-1	Leu-2
NH ₂	6.58-7.16 (s)	-	109.0	5	
ThrOMe					
1	-	170.6			
2	4.35, d (9.6)	58.7		1, 3, NMeGln-1	Asp-NH
3	4.11, ovl	76.3		1, 4, OMe	
4	1.20, ovl	16.1		2, 3	
OMe	3.27, s	56.9		3	
NH	6.45, d (8.8)	-	103.2	NMeGln-1	
Asp					
1		170.2			
2	5.25, ovl	46.9		1, 3	
3a-3b	2.49-2.84, ovl	36.1		1, 2, 4	
4	-	174.8			
NH	8.26 br s	-	118.2	2, ThrOMe-1	ThrOMe-2
Pip					
1	-	170.2		-	
2	5.25, ovl	53.6		1, 3, 4, 6	
3	1.63-2.18, ovl	27.1		2, 4, 5	
4	1.22-1.74, ovl	22.3		3, 5	
5	1.50-1.64, ovl	26.0		3, 4, 6	
6	3.00-3.72, ovl	44.4		2, 4, 5	

^a Le costanti di accoppiamento sono in parentesi e sono misurate in Hz;

Ovl: overlapped;

n.o.: non osservato

^b Correlazioni Noe ottenute dall'esperimento ROESY.

Per quanto riguarda l'unità polichetidica che acila l'N-terminale (**38**), il completo sistema di spin protonico dedotto dall'analisi degli spettri COSY/TOCSY nonché le correlazioni HMBC mostrate in figura 20 ci hanno permesso di stabilire la presenza di un acido 3-idrossi-2,4,6-trimetilottanoico (HTMOA) come end-group dell'Homophymina A e già ritrovato nella Theopapuamide.¹⁸

L'analisi degli spettri 2D-NMR ha rilevato la presenza di un secondo sistema di spin (**39**) strettamente correlato all'AGDHA, γ -amminoacido presente nella Callipeltina A.

In particolare, le correlazioni, indicate in figura 20, a partire dai protoni idrossimetinici che risuonano rispettivamente a $\delta_{\text{H}}= 3.96$ ($\delta_{\text{C}}= 73.0$) e $\delta_{\text{H}}= 3.68$ ($\delta_{\text{C}}= 74.6$) verso il carbonio acilico a $\delta_{\text{C}}= 176.1$ e del protone idrossimetinico a $\delta_{\text{H}}= 3.68$ verso il carbonio C4 a $\delta_{\text{C}}= 50.7$ ci hanno consentito di confermare la presenza di un gruppo 2,3-diidrossi-4-amminoacido come nell'unità di AGDHA.

La connessione del carbonio C4 ($\delta_{\text{H}}= 4.11$, $\delta_{\text{C}}= 50.7$) a due gruppi metilenici consecutivi i cui protoni diastereotopici risuonano a $\delta_{\text{H}}= 1.83-1.92$ e a $\delta_{\text{H}}= 2.32-2.38$ e le correlazioni di questi ultimi con un carbonio acilico a $\delta_{\text{C}}= 177.0$ completavano la struttura dell'acido 4-ammino-2,3-diidrossi-1,7-eptandioico (ADHA).

L'identità strutturale dell'ultimo residuo amminoacidico (AHDMHA, **40**) risultava complicata dall'assenza di costanti di accoppiamento scalari tra i protoni H2 e H3 e dalla sfortunata coincidenza dei valori di chemical shift dei protoni H4 e H5.

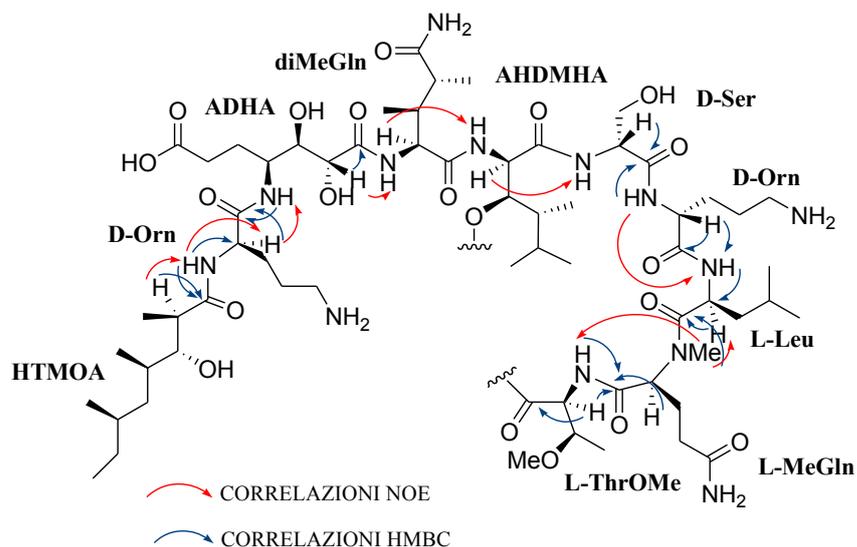
Definitiva conferma della presenza di un acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico (AHDMHA) nell'Homophymina A è derivata dall'analisi dei dati relativi all'esperimento HMBC che ci ha fornito uno spettro estremamente diagnostico.

In particolare le correlazioni, mostrate in figura 20, a partire dal protone metinico al C2 ($\delta_{\text{H}}= 5.31$ e $\delta_{\text{C}}= 55.2$) verso il C3 ($\delta_{\text{C}}= 77.3$) e il C1 ($\delta_{\text{C}}= 173.4$) e a partire dal protone metinico legato al carbonio C3 ($\delta_{\text{H}}= 5.61$ e $\delta_{\text{C}}= 77.3$) verso il carbonio C2 ($\delta_{\text{C}}= 55.2$) hanno consentito di definire senza alcuna ambiguità la presenza del residuo di β -idrossi- α -amminoacido.

Definite le unità amminoacidiche, restava da determinare la sequenza con cui erano legate nell'Homophymina A. Fondamentale è stata l'analisi dello spettro HMBC. Tale esperimento ci ha consentito di assegnare non solo ad ogni protone α -

amminoacidico il proprio carbonile ma anche di correlare il carbonile con il protone legato all'azoto dell'amminoacido successivo. Per confermare la sequenza amminoacidica ci siamo avvalsi anche di correlazioni NOE inter-residuo tra il protone α -amminoacidico di un dato amminoacido ed il protone legato all'azoto dell'amminoacido successivo. Dall'analisi combinata dei due spettri siamo riusciti a seguire la sequenza dell'Homophymina A a partire dal residuo di ornitina (N-terminale).

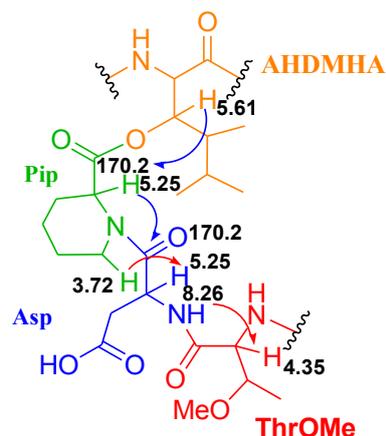
Nella figura successiva sono indicate le correlazioni HMBC e NOE che ci hanno consentito di sequenziare 9 degli 11 residui amminoacidici presenti nell'Homophymina A, compreso il legame dell'ornitina N-terminale con il residuo di β -idrossiacido.



Restava da stabilire la posizione dell'acido Pipicolico e dell'acido Aspartico e soprattutto stabilire quale dei due fosse coinvolto nel legame di tipo estereo con l'ossidrilico del residuo di AHDMA.

Questo è stato sicuramente il punto più arduo in quanto i due amminoacidi presentano delle sfortunate sovrapposizioni di chemical shift protonici e ^{13}C ; esibiscono infatti gli stessi valori di risonanza sia degli α -idrogeni amminoacidici (5.25 ppm), che dei carbonili (170.2 ppm).

Dalla correlazione HMBC tra il protone legato al C3 del residuo di AHDMHA, ($\delta_{\text{H}}=5.61$), ed un carbonile a $\delta_{\text{C}}=170.2$ ppm si stabiliva agevolmente che uno dei due amminoacidi era coinvolto nel legame estereo con l'ossidrile legato al C3 del residuo di AHDMHA. Ciò confermava la presenza di un peptide ciclico ma, a causa dei valori di chemical shift coincidenti, non consentiva di stabilire quale dei due amminoacidi fosse coinvolto nel legame estereo e quindi quale dei due fosse il C-terminale.



Informazioni aggiuntive sono derivate dall'esperimento NOE eseguito in CD_3OH . Il protone scambiabile a $\delta_{\text{H}}=8.26$ ppm, assegnato nello spettro COSY al sistema di spin del protone a $\delta_{\text{H}}=5.25$ ppm ed appartenente gioco forza al residuo di acido aspartico, mostrava una diagnostica correlazione NOE con il protone α -amminoacidico del residuo di ThrOMe ($\delta_{\text{H}}=4.35$ ppm).

Questo dato consentiva di collegare i due amminoacidi attraverso un legame peptidico e quindi indirettamente di assegnare l'acido pipercolico come unità C-terminale.

Definitiva conferma è derivata da esperimenti di spettrometria di massa.

In particolare la tecnica più utile per lo studio di molecole peptidiche è la spettrometria di massa tandem (MS/MS) che prevede la frammentazione della molecola nello spettrometro durante l'analisi.

L'apparecchiatura utilizzata è stata uno spettrometro ESI Q-TOF, il cui funzionamento è stato ampiamente descritto nel capitolo 2.

La frammentazione, però, doveva essere compiuta sul peptide lineare in quanto per i peptidi ciclici i percorsi di frammentazione non sono così semplici e gli spettri ottenuti possono essere di difficile interpretazione e razionalizzazione.

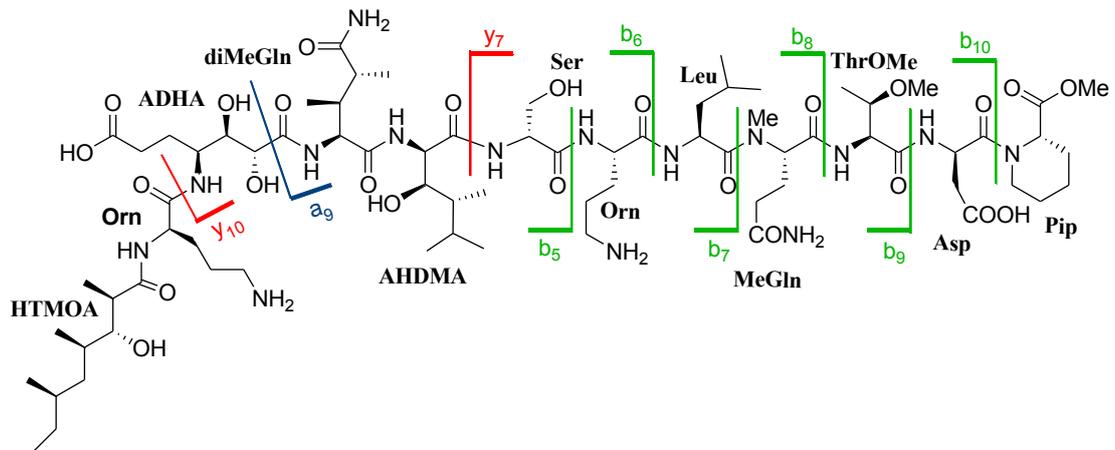
La tappa preliminare all'analisi di massa è quindi consistita nell'ottenere il peptide lineare. Poiché la ciclizzazione è dovuta ad un legame di natura esterea tra il carbossile C-terminale e la funzione ossidrilica del residuo dell'acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico (AHDMHA), abbiamo operato una rottura di tale legame per metanolisi basica. L'Homophymina A è stata quindi trattata con MeONa in MeOH dry e dopo circa 24 h la miscela di reazione è stata neutralizzata con HCl 0,1

N e poi estratta con *n*-BuOH. La fase butanolica, portata a secco, ha mostrato contenere il peptide lineare ed è stata sottoposta ad analisi di massa.

Lo spettro di massa ottenuto per l'estere metilico del peptide lineare mostrava uno ione pseudomolecolare $[M+H]^+$ a m/z 1630.74, accompagnato da uno ione doppia carica $[M+2H]^{2+}$ a $m/z=$ 815.94.

Lo ione pseudomolecolare veniva selezionato e sottoposto quindi a frammentazione.

Nella figura che segue sono riportate le frammentazioni chiave, ottenute.



Come si evince il peptide frammenta meglio dalla porzione C-terminale e i frammenti più intensi sono quelli relativi alla rottura del legame peptidico con la carica verso l'estremità N-terminale (serie b).

Le frammentazioni a partire dalla porzione N-terminale (serie y) risultavano poco presenti ma questo non ha rappresentato un grosso problema in quanto la sequenza amminoacidica nella porzione N-terminale era ben supportata dall'analisi NMR (HMBC e NOE).

Il frammento N-terminale a $m/z=$ 1487.76 (b_{10}) derivava dal peptide lineare per perdita di un residuo di estere metilico dell'acido pipercolico (di peso pari a 142.98) conseguente alla rottura del legame NH-CO.

E' stato quindi possibile confermare la presenza dell'unità di acido pipercolico come residuo C-terminale. Per definire in maniera inequivocabile la struttura primaria si è proseguito con l'esame delle frammentazioni. Il frammento a $m/z=$ 1372.74, assegnato come b_9 , si otteneva per perdita di un residuo amminoacidico di massa 115.02 e cioè di un residuo di acido aspartico. Di conseguenza al residuo di acido

pipecolico risultava legato il residuo di acido aspartico. Continuando nell'esame dei picchi di frammentazione siamo stati in grado di collegare tutti gli amminoacidi fino alla Leucina.

Come già detto i frammenti C-terminali sono sicuramente in minor numero. Si sono assegnati da questa porzione solo tre frammenti. In particolare quello a $m/z= 1332.70$ (y_{10}), che corrisponde alla perdita del residuo di Ornitina N-terminale, legato al β -idrossiacido e un insolito residuo a_9 di peso pari a $m/z= 1172.7$, che deriva da una rottura del legame $C\alpha$ -CO del γ -amminoacido ADHA. Siamo riusciti inoltre ad assegnare il frammento y_7 a $m/z= 831.7$ che deriva dalla rottura del legame CO-NH tra il residuo di acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico (AHDMA) ed il residuo di serina.

Utilizzando la spettrometria di massa tandem ed in particolare una apparecchiatura ESI Q-TOF di cui è nota la sensibilità nella misura e l'incontrovertibilità dei risultati, siamo riusciti quindi a confermare la sequenza primaria di questo complesso ciclodepsipeptide.

8.1.3. Studi stereochimici sull'Homophymina A

Il passo successivo nello studio di questo complesso ciclodepsipeptide è stato la determinazione della stereochimica relativa ed assoluta di tutti i residui presenti.

La caratterizzazione stereochimica è stata effettuata sia attraverso l'applicazione della versione LC/MS del metodo di Marfey⁵¹ per la determinazione della configurazione degli α -stereocentri, che attraverso il metodo spettroscopico di Murata,²⁷ che consente, come già descritto, di definire la stereochimica relativa dei centri stereogenici presenti in unità flessibili.

Per la definizione della serie sterica dei residui amminoacidici di cui si dispone di standard (Leu, Orn, Pip, Ser, Asp, N-MeGln) il lavoro risulta piuttosto agevole e consiste in più fasi sequenziali:

- ❖ Idrolisi del peptide con HCl
- ❖ Derivatizzazione dell'idrolizzato con L-FDAA
- ❖ Derivatizzazione degli standard con L-FDAA
- ❖ Analisi in LC/MS dei campioni derivatizzati e paragone dei rispettivi tempi di ritenzione.

Il tracciato ottenuto in LC/MS per l'Homophymina A idrolizzata e derivatizzata con L-FDAA mostrava picchi a t_R (minuti), 8.9, 28.3, 31.5 assegnati rispettivamente in base allo spettro di massa a: Orn-L-FDAA+H⁺ ($m/z= 385.14$), Pip-L-FDAA+H⁺ ($m/z= 382.13$), Leu-L-FDAA+H⁺ ($m/z= 384.14$).

Gli standard derivatizzati con L-FDAA mostravano i seguenti t_R : L-Orn (11.1 min), D-Orn (8.6 min), L-Pip (27.8 min), D-Pip (26.3 min), L-Leu (31.3 min), D-Leu (36.5 min).

Dal paragone con i tempi di ritenzione è stato possibile stabilire senza alcuna ambiguità la presenza nell'Homophymina A di : L-Leu, due D-Orn, L-Pip.

Per l'assegnazione della serie sterica della Ser, dell'*N*-MeGlu e dell'Asp ci siamo trovati dinanzi a due differenti problemi: la D e la L-Ser mostrano identici tempi di ritenzione quando derivatizzati con L-FDAA anche su colonne HPLC 3 μ ad elevato potere risolutivo, mentre la *N*-MeGlu e l'Asp non reagivano bene con l'L-FDAA. Ne consegue quindi che per questi amminoacidi non è stato possibile applicare il metodo di Marfey.

Per ovviare a questo inconveniente si è pensato di utilizzare un altro reattivo chirale derivatizzante, il GITC (2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil isotiocianato),⁷⁷ che reagisce facilmente con la funzione amminica primaria e secondaria (figura 21).

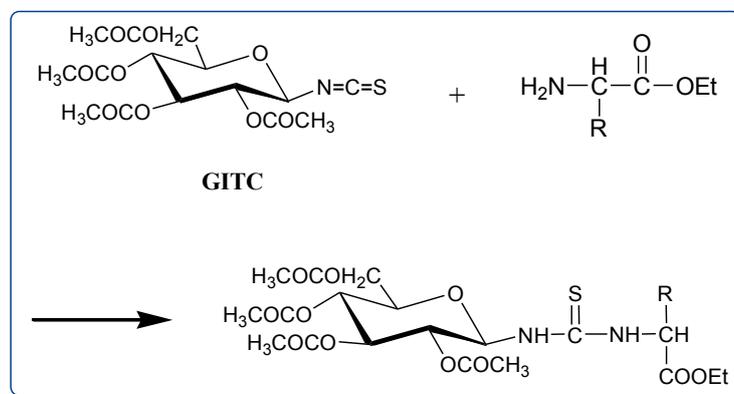


Figura 21 *Struttura e reattività del GITC*

Il cromatogramma ottenuto per l'Homophymina A idrolizzata e derivatizzata con il GITC mostrava picchi a t_R (minuti) 17.9, 15.9 e 25.5 assegnati rispettivamente a: Asp-GITC+ H^+ ($m/z= 523.12$), Ser-GITC+ H^+ ($m/z= 495.12$) e *N*-MeGlu-GITC+ H^+ ($m/z= 551.16$).

Per la *N*-MeGln, non essendo tale amminoacido disponibile in commercio a basso costo, abbiamo deciso di utilizzare come standard l'*N*-MeGln presente nella Callipeltina A, in quanto per questa unità è stata definita la serie sterica come L.

Gli standard derivatizzati con il GITC mostravano i seguenti t_R : L-Ser (15.6), D-Ser (16.3), L-Asp (16.9), D-Asp (17.9), L-*N*-MeGln (25.3).

Dal confronto con i tempi di ritenzione è stato possibile stabilire la presenza nell'Homophymina A di un'unità di D-Asp e un'unità di L-*N*-MeGln.

La serie sterica della Ser resta però ancora indeterminata essendo, come nel caso degli FDAA-derivati, i t_R dei GITC derivati troppo simili tra loro (L-Ser e D-Ser rispettivamente 15.6 e 16.3).

Per ovviare a questo problema si è pensato di determinare la serie sterica della Ser sottoponendo l'idrolizzato dell'Homophymina A ad analisi in HPLC a fase stazionaria chirale.

Gli standard hanno mostrato i seguenti t_R : L-Ser (5.7), D-Ser (5.1).

Dal confronto con i tempi di ritenzione è stato possibile assegnare al residuo di Ser presente nell'Homophymina A l'appartenenza alla serie sterica D.

Per l'assegnazione della configurazione assoluta dell'unità di 3,4-dimetilglutammina, si è proceduto per confronto con la Callipeltina A, in quanto la stereochimica assoluta di tale unità amminoacidica è stata definita in modo non ambiguo per sintesi come (3*S*,4*R*)-3,4-dimetil-L-Gln. In pratica la Callipeltina A è stata idrolizzata con HCl 6N e derivatizzata con l'L e D-FDAA per ottenere gli standard del (3*S*,4*R*)-3,4-diMeGlu. Passo successivo è stato quello di sottoporre a derivatizzazione con il reattivo di Marfey (L-FDAA) l'idrolizzato dell'Homophymina A. Gli FDAA così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi LC/MS monitorando lo ione a $m/z = 428.13$ (acido 3,4-diMeGlu-FDAA- H^+).

Per l'Homophymina A, derivatizzata con L-FDAA, si è osservato un picco a $t_R = 20.6$ min, mentre gli standard hanno mostrato i seguenti risultati:

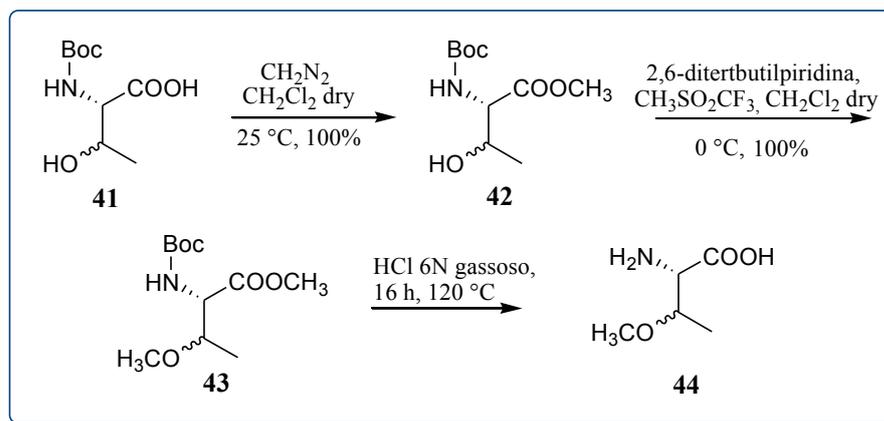
- (3*S*,4*R*)-3,4-diMe-L-Glu-L-FDAA SIM $m/z = 428.13$ e $t_R = 20.5$ min
- (3*S*,4*R*)-3,4-diMe-L-Glu-D-FDAA SIM $m/z = 428.13$ e $t_R = 22.7$ min

Dal confronto dei t_R si è stabilito in modo inequivocabile la configurazione 3*S*,4*R* del residuo di 3,4-diMeGln presente nell'Homophymina A.

Per la determinazione della serie sterica dell'unità di O-metil-treonina (ThrOMe), non disponendo di standard commerciali, abbiamo proceduto a sintetizzare tale residuo amminoacidico. Questa sintesi ha avuto il duplice scopo di fornire quantità adeguate di tale unità amminoacidica per studi di sintesi totale dell'Homophymina A, che di fornire opportuni standard per studi stereochimici.

Il substrato di partenza da noi scelto è stata la *N*-Boc-L-ThrOH (**41**), disponibile in commercio in forma enantiomericamente pura e a basso costo (schema 4).

Schema 4



Il primo problema da affrontare è stata la scelta di un gruppo protettore della funzione carbossilica, tale da essere stabile nei confronti delle condizioni di reazione previste dalla strategia sintetica e da poter essere rimosso in condizioni blande. Abbiamo quindi inizialmente trattato il composto (41) con diazometano a temperatura ambiente in CH₂Cl₂ dry.

Si è poi proceduto alla reazione di metilazione della funzione ossidrilica del metilestere (42) con metiltrifluorometansolfonato (CH₃SO₂CF₃) in ambiente basico per 2,6-ditertbutilpiridina, ottenendo così il composto (43) con una resa quantitativa. Infine si è proceduto alla idrolisi condotta con HCl 6N gassoso che ha fornito la L-ThrOMe (44) con una resa quantitativa.

Per l'ottenimento del diastereoisomero *allo* sono state utilizzate le stesse procedure sintetiche partendo dalla *N*-Boc-L-*allo*-ThrOH.

Passo successivo è stato quello di sottoporre a derivatizzazione con il reattivo di Marfey⁵¹ (L-FDAA e D-FDAA) sia l'idrolizzato acido dell'Homophymina A che gli standard sintetici. Gli FDAA-derivati così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi LC/MS monitorando lo ione a $m/z = 386$ (ThrOMe-FDAA-H⁺).

Per l'Homophymina A, derivatizzata con il reattivo chirale L-FDAA, si è osservato un picco a $t_R = 19.6$ min mentre gli standard hanno mostrato rispettivamente:

- L-ThrOMe-L-FDAA SIM $m/z = 386$ e $t_R = 19.6$ min
- D-ThrOMe-D-FDAA SIM $m/z = 386$ e $t_R = 24.8$ min
- L-*allo*-ThrOMe-L-FDAA SIM $m/z = 386$ e $t_R = 18.3$ min
- D-*allo*-ThrOMe-D-FDAA SIM $m/z = 386$ e $t_R = 23.1$ min

Questi dati sperimentali hanno indicato senza ambiguità che l'unità di ThrOMe presente nell'Homophymina A appartiene alla serie sterica L.

Nell'ambito degli studi stereochimici sull'Homophymina A mi sono interessata anche della determinazione della configurazione assoluta delle unità non convenzionali, AHDMA, ADHA e HTMOA.

**Determinazione della configurazione assoluta
dell'acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico (AHDMA)**

Il primo passo è stato la determinazione della stereochimica relativa dei centri stereogenici presenti nel residuo in questione attraverso l'applicazione del metodo di Murata.²⁷

Tale metodo, ampiamente descritto nel capitolo "Introduzione", si basa sull'analisi combinata di costanti di accoppiamento protone-protone omonucleari ($^3J_{H-H}$), costanti di accoppiamento protone-carbonio eteronucleari ($^{2,3}J_{C-H}$) e dati NOE.

Uno degli aspetti più delicati di questo metodo è la misura sperimentale delle costanti di accoppiamento eteronucleari. Sono riportate in letteratura numerose sequenze di impulsi che consentono la misura di tali costanti. Uno degli esperimenti più popolari, utilizzato nella nostra determinazione, è HSQC-TOCSY che di solito consente una misura precisa di J_{H-C} e inoltre rispetto ad altre tecniche ha una buona sensibilità.

A causa, però, del notevole affollamento di segnali presenti nella zona dello spettro protonico in cui risuonano i protoni appartenenti al sistema di spin dell'AHDMA, l'analisi delle costanti di accoppiamento omo ed etero nucleari è stata effettuata sull'amminoacido isolato.

Quindi, un'aliquota di Homophymina A (30 mg) è stata sottoposta ad idrolisi acida con HCl 6N e l'idrolizzato ottenuto è stato frazionato in HPLC usando una colonna a fase inversa Phenomenex Hydro ottenendo 0.7 mg di AHDMA puro, il quale è stato successivamente sottoposto ad analisi di Murata.

Il metodo di Murata²⁷ prevede la ideale disconnessione della molecola in frammenti C_2 contenenti ciascuno due centri stereogenici; quindi avendo l'acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico tre centri chirali, si può scomporre la molecola in esame in due frammenti, C2-C3 e C3-C4, per ognuno dei quali è possibile il confronto fra i valori delle $^3J_{H-H}$ e $^{2,3}J_{C-H}$ sperimentali e quelli tabulati.

Dall'analisi degli spettri NMR bidimensionali sono state attribuite le risonanze 1H e ^{13}C di tutti i nuclei presenti nel residuo amminoacidico in questione. I risultati di tale analisi sono riportati nella figura 22:

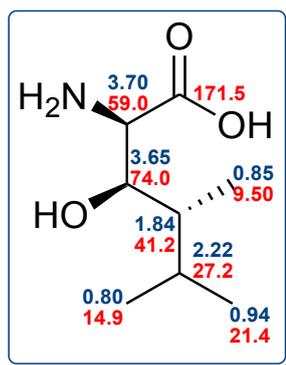


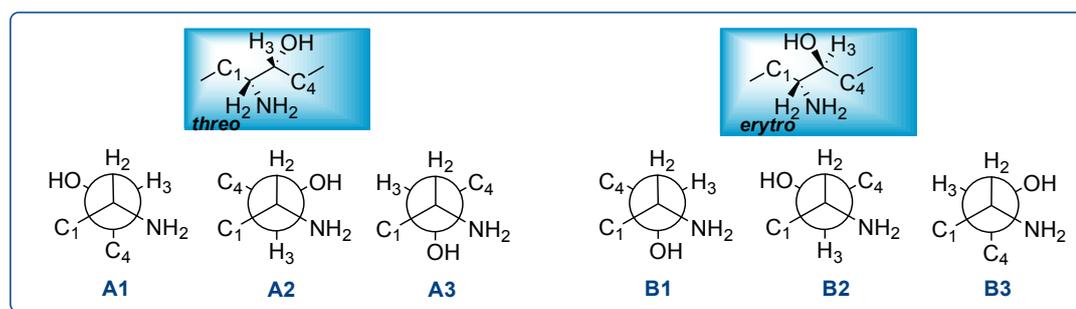
Figura 22 Risonanze magnetiche ^1H (in blu) e ^{13}C (in rosso) dei nuclei dell'acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico (AHDMA)

✓ **Stereochimica relativa del frammento C2-C3**

Analizziamo in prima istanza il frammento C2-C3 che ha il pattern di sostituzione indicato in figura 23. Date le due possibili configurazioni diastereoisomeriche relative, *threo* ed *erythro*, per ciascuna di esse si possono individuare tre rotameri sfalsati per un totale di sei possibili conformeri definiti A1, A2, A3, B1, B2, B3.

Per ogni singolo conformero esiste un pattern qualitativo di J omo ed eteronucleari, da confrontare con i valori sperimentali.

Figura 23

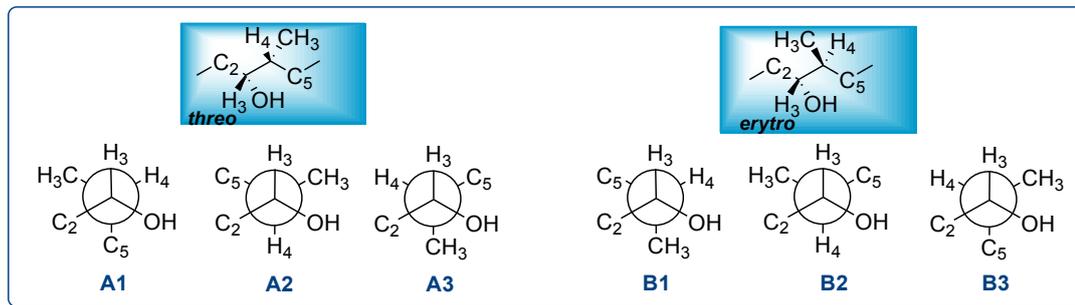


La ^3J tra H2 e H3 (2.6 Hz) indicava un arrangiamento gauche tra i protoni H2 e H3 il che identificava quattro tra i sei possibili rotameri (A1, A3, B1 e B3).

La successiva valutazione della $^3\text{J}_{\text{H2-C4}}$ (1.5 Hz) ha quindi ristretto le possibilità ai due assetti configurazionali A3 (*threo*) e B1 (*erythro*).

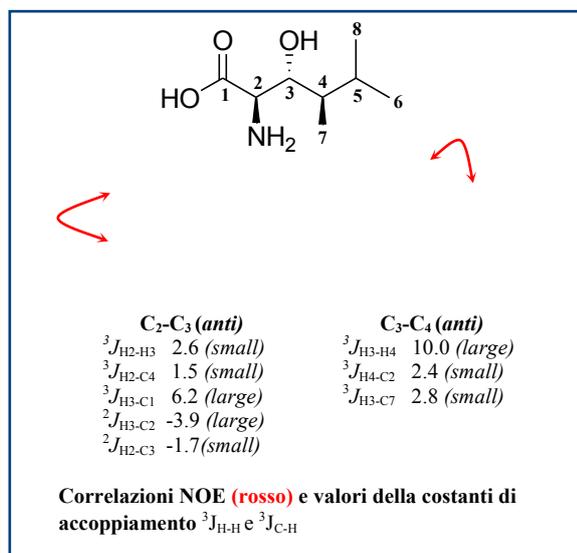
Infine il valore sperimentale della $^2\text{J}_{\text{C2-H3}}$ pari a -3.9 Hz (large) ci ha consentito di identificare B1 come rotamero preferenziale a configurazione *erythro*.

✓ Stereochimica relativa del frammento C3-C4



Il valore large (10 Hz) della $^3J_{H3/H4}$ corrispondeva ai rotameri A2 (*threo*) e B2 (*erythro*), non distinguibili per semplice confronto di costanti di accoppiamento eteronucleari, per cui non si è proceduto alla determinazione sperimentale delle J_{H-C} . A questo punto siamo passati all'analisi degli spettri ROESY che consente di correlare ciascun protone con protoni legati ad atomi di carbonio distanti due o tre legami. Questi esperimenti hanno evidenziato tre effetti NOE: CH_3-H_2 ; H_3-H_5 ; H_3-CH_3 . In particolare la presenza di un diagnostico *cross-peak* NOE che correla il metile (CH_3-4) a $\delta_H = 0.76$ e il protone sul C2 a $\delta_H = 5.31$, è compatibile solo con il rotamero B2 e non con quello A2 attestando una configurazione di tipo *erythro* tra il C3 ed il C4.

Qui di seguito sono riportati i valori sperimentali delle costanti di accoppiamento omo ed eteronucleari dei frammenti C2-C3 e C3-C4.



Il secondo stadio ha riguardato la determinazione della configurazione dell' α -stereocentro per la quale ci siamo avvalsi del "Metodo di Marfey Avanzato"⁵² che consente di determinare la serie sterica di amminoacidi non convenzionali per i quali non si dispone di standard.

La procedura è di seguito riportata:

- ❖ Un'aliquota di amminoacido si derivatizza con L-FDAA.
- ❖ Un'aliquota di amminoacido si derivatizza con D-FDAA.
- ❖ Analisi dei t_R su LC/MS.

Il metodo è stato da noi applicato con successo all'analisi configurazionale dell'unità di acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico. L'Homophymina A è stata sottoposta ad idrolisi acida con HCl 6N per liberare i singoli amminoacidi che poi sono stati derivatizzati con i due enantiomeri del reattivo di Marfey (L-FDAA e D-FDAA) in aliquote separate.

Gli FDAA derivati così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi LC/MS monitorando lo ione a $m/z= 428.17$ (AHDMHA-FDAA- H^+).

Per l'Homophymina A, derivatizzata con L-FDAA e D-FDAA, si è osservato rispettivamente un picco a $t_R= 33.5$ min e uno a $t_R= 28.1$ min.

Come indicato nel Capitolo 2 un amminoacido in serie sterica L derivatizzato con L-FDAA viene eluito prima del suo isomero D, sempre derivatizzato con L-FDAA.

Parallelamente se il derivato con L-FDAA di un amminoacido a configurazione non nota viene eluito prima del suo corrispondente derivato ottenuto per reazione con il D-FDAA, si può stabilire la configurazione L al carbonio amminoacidico.

Sulla base di questa considerazione la serie sterica del C- α -amminoacidico dell'unità di acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico è stata proposta come D.

Avendo determinato l'assetto relativo tra gli stereocentri C2/C3/C4 come C2-C3 *erythro* e C3-C4 *erythro* si stabiliva la stereochimica assoluta dell'unità di AHDMHA come 2*R*,3*R*,4*R*.

Determinazione della configurazione assoluta
dell'acido 4-ammino-2,3-diidrossi-1,7-eptandioico (ADHA)

Come per il residuo di AHDMA, anche per l'acido 4-ammino-2,3-diidrossi-1,7-eptandioico (ADHA) abbiamo deciso di procedere con il metodo di Murata eseguito ancora una volta sull'amminoacido isolato nelle stesse condizioni dell'AHDMA. Dall'analisi degli spettri NMR bidimensionali sono state assegnate le risonanze ^1H e ^{13}C di tutti i nuclei presenti nel residuo amminoacidico in questione. I risultati di tale analisi sono mostrati nella figura 24:

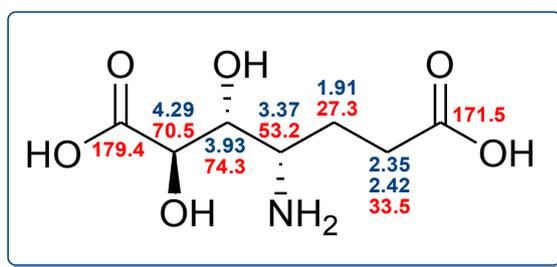
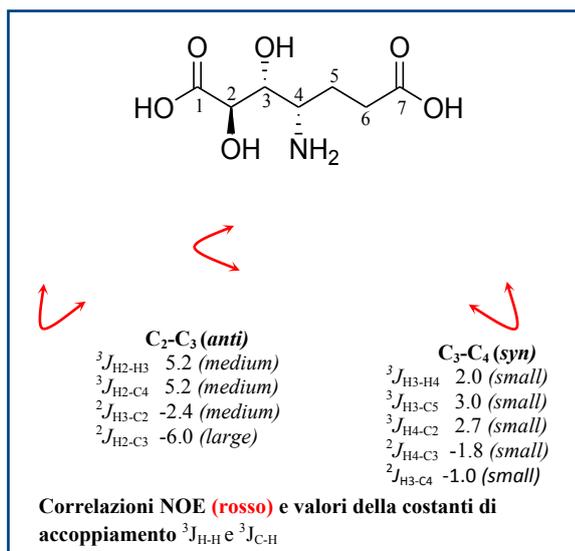


Figura 24 Risonanze magnetiche ^1H (in blu) e ^{13}C (in rosso) dei nuclei dell'acido 4-ammino-2,3-diidrossi-1,7-eptandioico (ADHA)

Il valore della costante di accoppiamento omonucleare $^3\text{J}_{\text{H}_2\text{-H}_3}$ per il frammento C2-C3 di 5.2 Hz (medium), indicativo dell'interconversione tra due o più conformeri, identificava per questa subunità una miscela dei rotameri *gauche* e *anti* all'equilibrio. La successiva valutazione delle costanti di accoppiamento eteronucleari e la presenza di due diagnostiche correlazioni NOE tra H2-H4 e H2-H3 ci hanno permesso di discriminare tra i possibili rotameri e di assegnare una configurazione *erythro* tra il C2-C3.

L'assetto relativo *syn* tra il C3-C4 è stato stabilito mediante la misura delle $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ e $^3\text{J}_{\text{H-C}}$ che sperimentalmente hanno mostrato tutte valori small corrispondenti al rotamero A3.



Stabilita la stereochimica relativa il passo successivo è stata la determinazione della configurazione assoluta per il frammento ADHA.

La configurazione *S* al C4 dell'acido 4-ammino-2,3-diidrossi-1,7-eptandioico è stata determinata sottoponendo la funzione diolica vicinale presente al C2-C3 di tale residuo a scissione ossidativa eseguita sul peptide intatto. Dopo idrolisi acida con HCl 6N e applicazione del metodo di Marfey si è ottenuto l'acido L-Glu. Dall'analisi combinata dei dati ottenuti è stato possibile stabilire la stereochimica assoluta come 2*R*,3*R*,4*S*.

Determinazione della configurazione assoluta dell'acido 3-idrossi 2,4,6-trimetilottanoico (HTMOA)

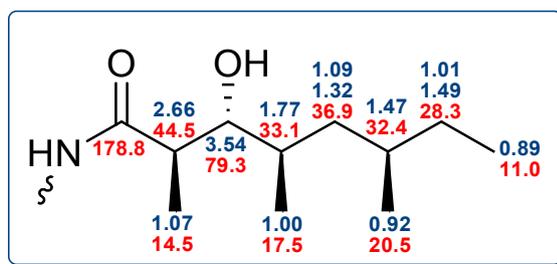


Figura 25 Risonanze magnetiche 1H (in blu) e ^{13}C (in rosso) dei nuclei dell'acido 3-idrossi-2,4,6-trimetilottanoico

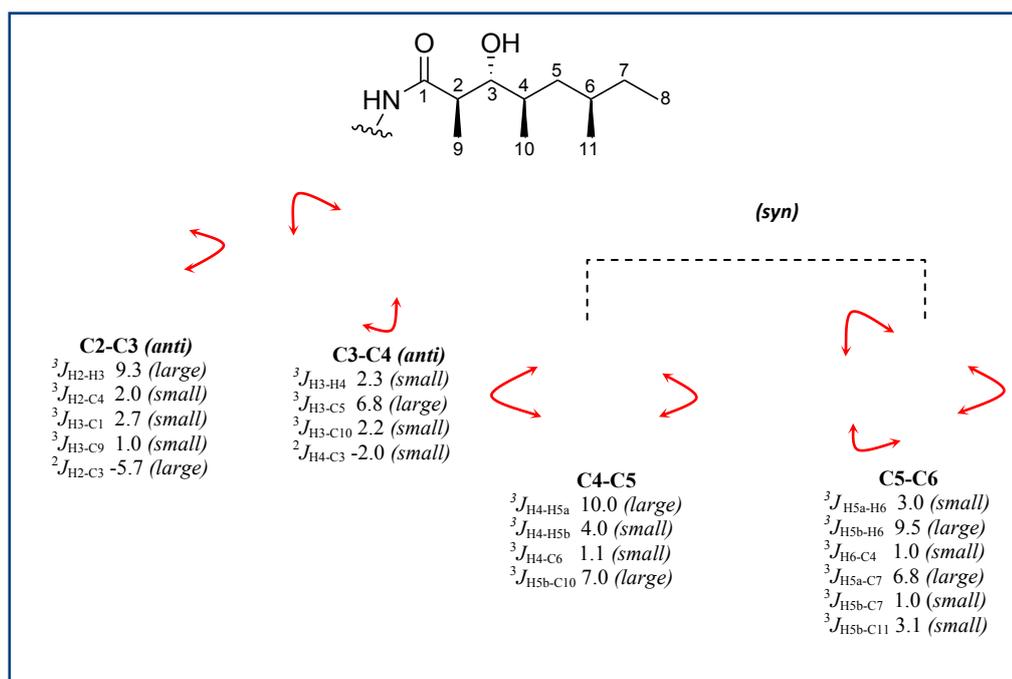
L'HTMOA è l'unico residuo per il quale l'analisi configurazionale di Murata è stata eseguita sul peptide intatto rivelando un assetto relativo 2,3-*anti*-3,4-*anti*-4,6-*syn*.

L'assetto 2,3-*anti* è risultato dal valore della $^3J_{H_2-H_3}$ di 9.3 Hz (large) e dall'effetto NOE osservato tra H3 ($\delta_H = 3.54$) e il CH₃ ($\delta_H = 1.07$) legato al C2.

L'assetto relativo *anti* tra il C3 ed il C4 è stato determinato dal valore della J tra H3-H4 (2.3 Hz) in aggiunta all'analisi delle J tra H3-C10, H4-C3 e H3-C5.

L'ultimo stadio è stata la definizione dell'assetto relativo *syn* tra il C4 e C6.

Sebbene siano due centri stereogenici non contigui ma separati da un metilene, il metodo di Murata²⁷ ne prevede l'analisi configurazionale purché i due protoni al C5 siano diastereotopici. In figura sono riportate tutte le J misurate e l'assegnazione della stereochimica relativa.



Per la definizione della configurazione assoluta dell'unità HTMOA è stato applicato il metodo di Mosher.⁵⁴ La derivatizzazione dell'ossidrilico carbinolico con il C3 con l'*R* e *S*-MTPA cloruro ha richiesto però la liberazione del β -idrossiacido dal peptide per idrolisi acida e sua selettiva estrazione con diclorometano.

La configurazione al C3 veniva stabilita quale *R* e di conseguenza si determinava la stereochimica assoluta dell'intero frammento quale 2*R*,3*R*,4*R*,6*R*.

Definita la stereochimica assoluta dell'Homophymina A, cominciava l'ultima fase del mio lavoro di ricerca focalizzata sulla sintesi stereoselettiva dell'unità di β -idrossiacido.

Tale sintesi ha il duplice scopo di dare definitiva conferma all'analisi stereochimica ma anche di fornire quantità adeguate di tale residuo, utile 'building block' per studi futuri di sintesi totale dell'Homophymina A e di eventuali derivati.

Nella messa a punto dello schema sintetico, l'attenzione va rivolta in primo luogo alla scelta di prodotti di partenza facilmente reperibili e a basso costo, di reazioni che portino ad eccessi enantiomerici elevati, e alla minimizzazione del numero degli step di reazione così da ottenere rese elevate.

Per direzionare in modo enantioselectivo una reazione, esistono tre approcci possibili:

- uso di un reattivo chirale;
- catalisi con un derivato chirale;
- temporanea introduzione di un ausiliario chirale.

Le prime due possibilità hanno limiti intrinseci in quanto non sempre una reazione prevede catalisi come molto spesso i reattivi chirali non sono commercialmente disponibili.

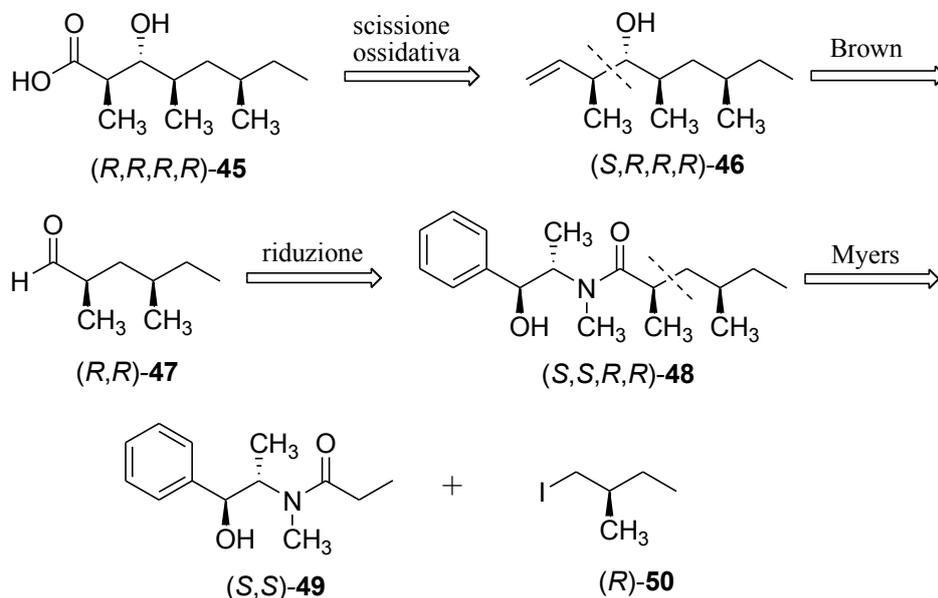
In questo senso gli ausiliari chirali rappresentano un'utile alternativa i cui notevoli vantaggi sono strettamente correlati ad alcune caratteristiche richieste per l'ausiliario stesso:

- enantiomericamente puro;
- non costoso;
- facilmente agganciabile al substrato;
- alto e prevedibile controllo della stereoselettività;
- facilità di purificazione del principale diastereoisomero;
- facilmente rimovibile;
- facilmente separabile dal prodotto di reazione e recuperabile.

La strategia sintetica pianificata per la costruzione del residuo di HTMOA prevede due tappe di introduzione di stereocentri controllata da ausiliari chirali.

In pratica è stata scelta la reazione di crotilazione di Brown⁷⁸ come tappa chiave per la costruzione stereocontrollata dei due centri stereogenici adiacenti C2/C3 in assetto *anti* e la reazione di alchilazione diastereoselettiva al carbonio α di un enolato chirale

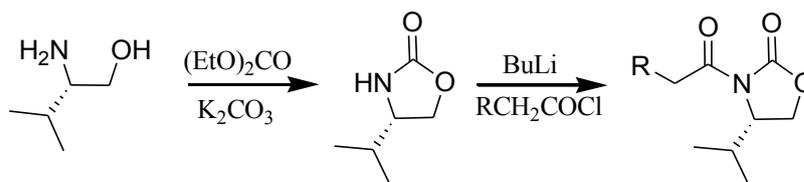
per l'introduzione stereocontrollata dei due gruppi metilici in posizione 1,3 (C4/C6) e in assetto *syn*.



Le reazioni di alchilazione presenti in letteratura prevedono la reazione di un enolato chirale con un substrato elettrofilo, generalmente un ioduro alchilico.

In questo ambito gli approcci più utilizzati sono quelli messi a punto da Evans⁷⁹⁻⁸¹ e da Myers.⁸²

Gli acilderivati degli ossazolidinoni di Evans⁷⁹⁻⁸¹ rappresentano un esempio eccellente per il direzionamento stereoselettivo nella creazione di un centro chirale, in quanto garantiscono una enantioselettività nell'ordine del 98-99.8% e una buona resa chimica. Questi ausiliari chirali sono facilmente preparabili da 1,2-amminoalcoli agevolmente disponibili, ed i loro anioni reagiscono rapidamente con acilcloruri per dare gli ossazolidinoni acilati, precursori degli enolati, richiesti per l'alchilazione.

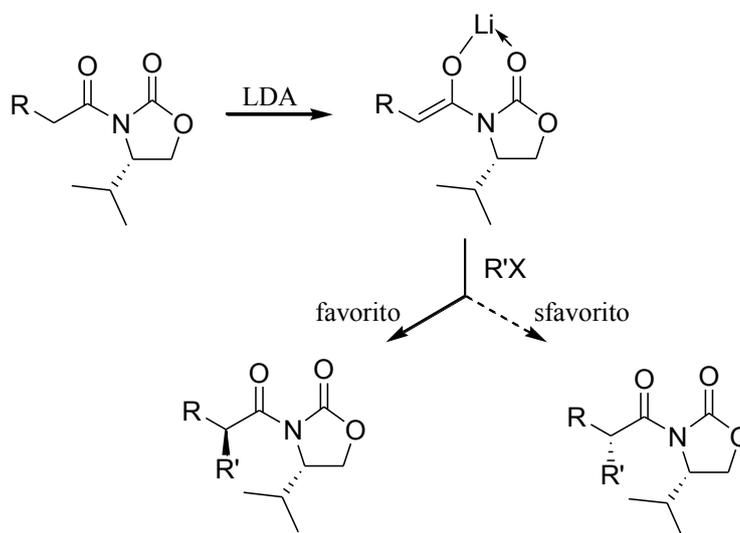


L'enolato formato, per trattamento con LDA, viene poi in situ alchilato enantioselettivamente da un opportuno elettrofilo.

Sebbene la planarità del sistema enolico suggerisca una stessa probabilità di attacco all'elettrofilo da parte di entrambe le facce, la presenza del gruppo isopropilico dell'ausiliario di Evans ingombra una di esse al punto da direzionare, in modo pressochè quantitativo, l'attacco sulla faccia superiore dell'enolato.

Inoltre, l'enolato stesso è rapidamente gelato nella conformazione mostrata in figura 26 a causa della chelazione del litio da parte del gruppo carbonilico dell'ossazolidinone. In questa conformazione, la faccia inferiore dell'enolato è bloccata e pertanto dovrebbe orientare l'alchilazione sulla faccia superiore.

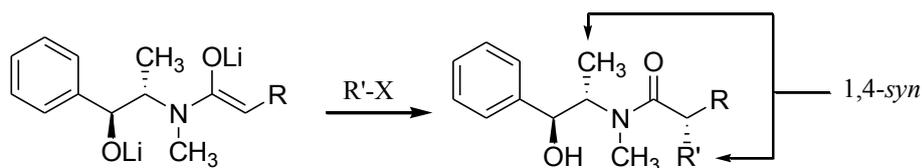
Figura 26



Il ruolo dell'ausiliario chirale si esaurisce dopo l'introduzione della chiralità nel nostro intermedio, per cui si procede alla sua rimozione, che può essere realizzata per idrolisi, alcolisi o riduzione, portando alla formazione di acidi carbossilici, esteri, alcoli o aldeidi chirali a seconda delle esigenze.

L'approccio di Myers,⁸² in alternativa, prevede l'uso della pseudoefedrina ammido come ausiliario chirale, i cui enolati reagiscono con alta diastereoselettività (95-99%) con una gran varietà di alogenuri alchilici primari.

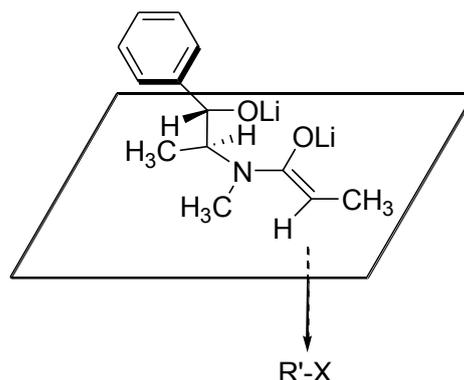
La diastereoselettività è assicurata dall'attacco preferenziale dell'elettrofilo sulla faccia dell'enolato Z dove giace il sostituito metilico della pseudoefedrina ammido (attacco 1,4-*syn*).



Questo risultato può essere razionalizzato invocando il modello di Askin⁸³ la cui rappresentazione è mostrata in figura 27.

Possiamo osservare come i gruppi alcossi e le molecole di solvente ad essi associate, occupando una delle facce π dell'enolato Z, sono responsabili di una forte selettività facciale, indirizzando in tal modo l'attacco elettrofilo dell'alogenuro sulla faccia 'inferiore' dell'enolato.

Figura 27 Modello di Askin



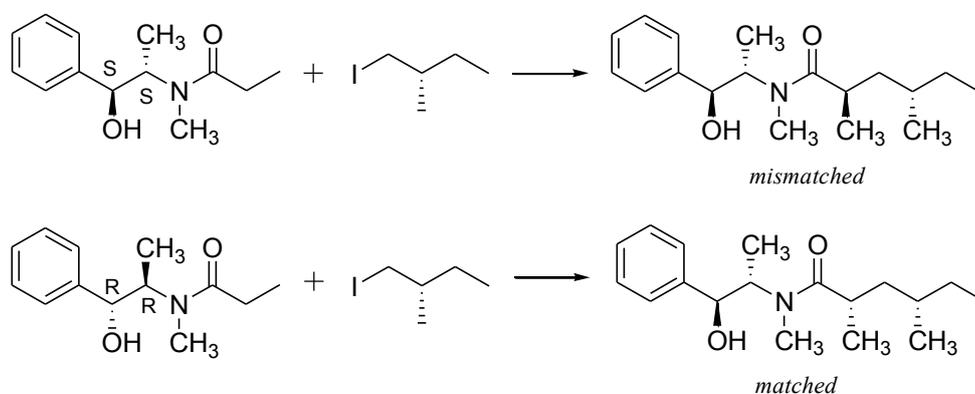
L' α -sostituzione della pseudoefedrina ammido fornisce un'efficace via d'accesso anche per la sintesi asimmetrica di catene carboniose 1,3 dialchil-sostituite, quando si utilizzano alogenuri alchilici β -ramificati.⁸² La reazione procede con alto e prevedibile stereocontrollo ed è condotta utilizzando un eccesso di enolato, per superare la limitata reattività di substrati ingombrati.

L'alchilazione di entrambi gli enantiomeri della pseudoefedrina propionammide con l'(*S*)-1-iodio-2-metilbutano rappresenta l'esempio più semplice di reazione enantioselettiva di enolati con elettrofili chirali. Come si può osservare in figura 28 la reazione dell'alogenuro alchilico con la (*R,R*)-pseudoefedrina propionammide fornisce con alta efficienza e diastereoselettività (99%) il prodotto 1,3-*syn*-alchilato,

suggerendo che questo rappresenta un caso “matched”. Di contro, l’uso dell’enolato proveniente dalla (*S,S*)-pseudofedrina ammide porta alla formazione di un prodotto 1,3-*anti* con una diastereoselettività 62:1, rappresentando questo un caso “mismatched”.

Questi risultati dimostrano come il controllo stereochimico della reazione sia governato esclusivamente dalla stereochimica dell’enolato e non dell’agente elettrofilo.

Figura 28



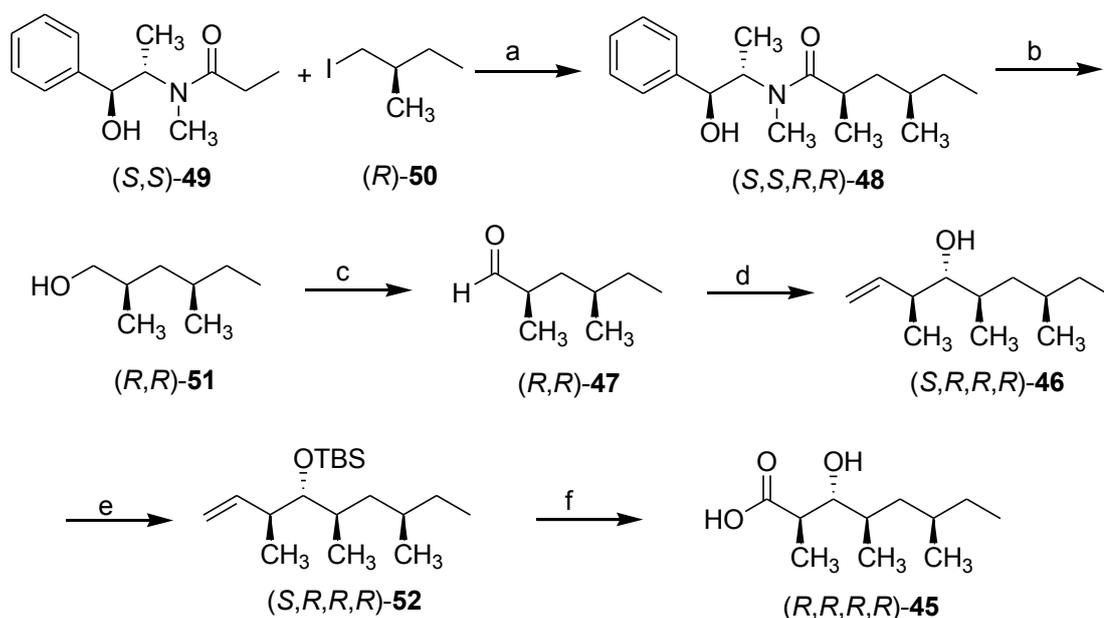
Analizziamo ora in dettaglio il nostro percorso sintetico che ha portato alla costruzione dell’acido (*2R,3R,4R,6R*)-3-idrossi-2,4,6-trimetilottanoico (Figura 29).

Poiché l’assetto relativo tra i due stereocentri al C4 e al C6 presenti nel residuo di HTMOA è 1,3-*syn*, la metodica di Myers⁸² si prestava molto bene per l’introduzione dei due gruppi metilici.

Quindi l’alchilazione asimmetrica dell’enolato della (*S,S*)-pseudofedrina propionammide con l’(*R*)-1-iodio-2-metilbutano e la successiva riduzione dell’ammide (**41**) poteva fornire l’aldeide (**42**), substrato della successiva reazione di crotilboronazione.

Il primo problema da affrontare è stata la preparazione dell’alogenuro alchilico chirale, in quanto non commercialmente disponibile.

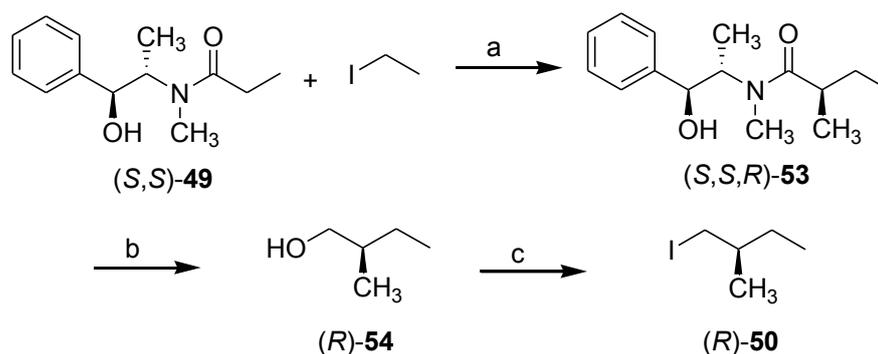
Figura 29



Condizioni di reazione: a) LDA, LiCl, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$; b) LAB, THF; c) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH_2Cl_2 ; d) *t*-BuOK, *trans*-2-butene, *n*-BuLi, -78 to $-57\text{ }^{\circ}\text{C}$, (-)-*B*-metossidiisopinocampheilborano, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, (R,R)-47; e) TBSCl, imidazolo, DMF; f) OsO_4 , NaIO_4 , NMO, diossano- H_2O .

A tale scopo abbiamo utilizzato ancora una volta il protocollo di Myers.⁸² In pratica, la (*S,S*)-pseudofedrina propionammide (49) è stata alchilata, previa deprotonazione del carbonio in α da parte della base LDA, con lo iodoetano portando alla formazione del prodotto (*S,S,R*)-53 con una resa dell'88% e un eccesso diastereoisomerico del 99%. Successivamente si è proceduto alla riduzione dell'ammide terziaria, condotta con litio-ammido-triidroborano (LAB),⁸⁴ che ci ha fornito l'alcool primario (*R*)-54, substrato per la successiva reazione di iodurazione con iodio e trifenilfosfina (figura 30).

Figura 30



Condizioni di reazione: a) LDA, LiCl, THF, -78 °C; iodioetano;
b) LAB, THF; c) iodio, imidazolo, trifenilfosfina, CH₂Cl₂.

L'(*R*)-1-iodio-2-metilbutano (**50**) ottenuto è stato poi trasformato nell'aldeide (**47**) in tre step di reazione, con una resa totale dell'88%, che hanno coinvolto l'alchilazione della (*S,S*)-pseudoefedrina propionammide (**49**), la riduzione della funzione ammidica con il riducente LAB⁸⁴ seguita dall'ossidazione dell'alcool (**51**) ottenuto con tetrapropilammonio perrutenato (TPAP).⁸⁵

Va sottolineato che la riduzione di un'amide terziaria ad alcool primario presenta non pochi problemi. Classici riducenti quali LiAlH₄ e diborano portano alla formazione di ammine terziarie e non di alcoli primari. Nel 1996 però Myers⁸⁴ riporta un nuovo reagente, litio-ammido-triidroborano (LiH₂NBH₃, LAB) in grado di ridurre le ammidi terziarie in modo molto pulito e con ritenzione di configurazione del substrato. Il LAB è preparato per deprotonazione del complesso commerciale borano-ammoniacca con LDA.

L'aldeide prodotta (**47**) è stata sottoposta alla reazione di crotilazione di Brown,⁷⁸ ampiamente utilizzata per la sintesi di unità di polipropionato. Tale reazione prevede l'addizione nucleofila al carbonio carbonilico di un aldeide di un crotilboranato omochirale, ottenuto per condensazione di (+) o (-)- β -metossidiisopinocampfeilborano con (*E*)- o (*Z*)-crotilpotassio. Dopo il quencing con H₂O₂ in ambiente basico per NaOH si ottengono gli alcoli omoallilici corrispondenti.

Dal punto di vista stereochimico, la reazione è caratterizzata da un alto grado di diastereoselezione ed enantioselezione. La diastereoselezione è assicurata dalla geometria dell'alchene utilizzato ed in particolare gli *E*-allilborani, derivati da *E*-alcheni, portano ad alcoli omoallilici con assetto *anti* fra l'ossidrilile ed il gruppo

metilico adiacente, mentre gli *Z*-allilborani portano ad alcoli omoallilici con assetto *sin* fra l'ossidrile ed il metile adiacente. L'enantioselezione è invece assicurata dall'ausiliario chirale utilizzato ossia (+) o (-)- β -metossidiisopinocampfeilborano. Entrambi gli aspetti stereochimici sono interpretabili sulla base di uno stato di transizione *chair-like*, descritto in figura 31.

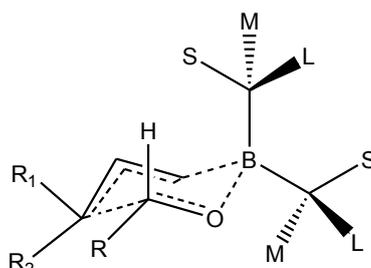
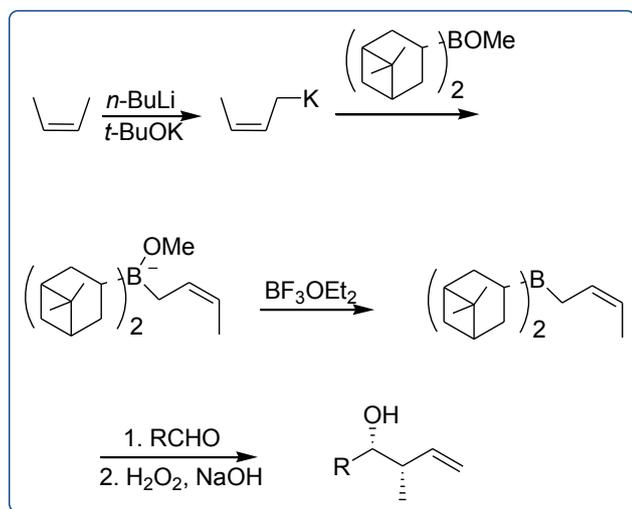


Figura 31 *Crotilborazione di Brown: stato di transizione chair-like*

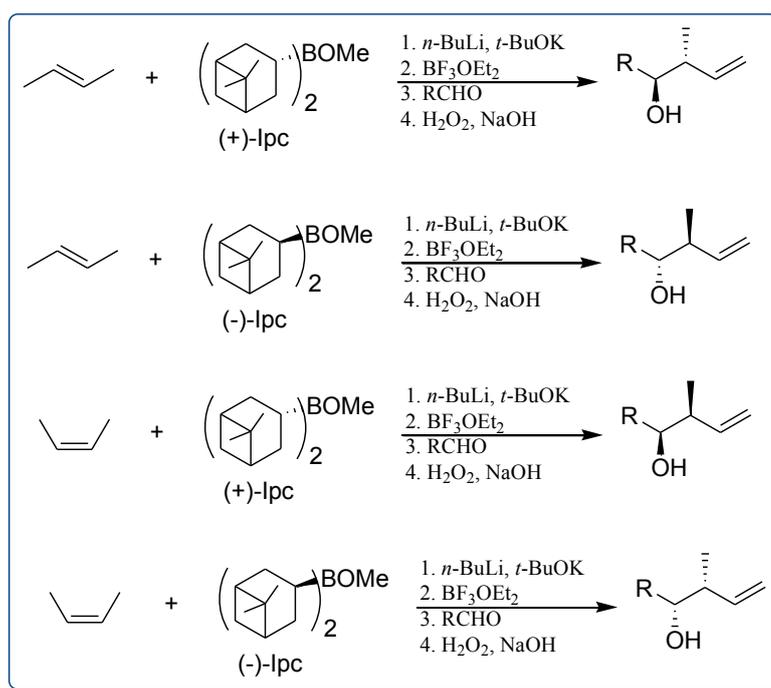
Nello stato di transizione il sostituente sull'aldeide occupa preferenzialmente la posizione equatoriale in modo da minimizzare le interazioni steriche con i sostituenti del boro, mentre la posizione del gruppo metilico risulta predefinita dalla geometria del doppio legame dell'allilborano. Poiché al boro sono legati i due gruppi chirali, ossia i due residui di isopinocampfeile, la discriminazione tra le due facce dell'aldeide deve portare ad una minimizzazione delle possibili interazioni attraverso una complessa combinazione di fattori sterici ed elettronici.

Anche dal punto di vista operativo la reazione di Brown è alquanto complessa perché prevede l'utilizzo di *E*- o *Z*-2-butene, gassosi a T ambiente, da condensare a -78°C . La reazione complessivamente si articola in più fasi, delineate nel seguente schema e che hanno previsto:

- ❖ Generazione del crotilpotassio per reazione del butene con *n*-BuLi e *t*-BuOK
- ❖ Condensazione con β -metossidiisopinocampfeilborano
- ❖ Trattamento con acido di Lewis per generare l'allilborano
- ❖ Condensazione con l'aldeide
- ❖ Work-up ossidativi



Quindi variando sia l'alchene che l'ausiliario chirale per la formazione del crotilborano, è possibile sintetizzare i possibili alcool omoallilici diastereoisomerici.



Procedendo nel percorso sintetico (figura 29), l'aldeide (47) è stata sottoposta a crotilboronazione di Brown utilizzando il *trans*-2-butene e il (-)- β -metossidiisopinocampfelborano fornendo l'alcool omoallilico (46) con un alto grado di stereocontrollo. Un problema accessorio è stata l'impossibilità di separare in

questa fase il prodotto (**46**) dall'isopinocanfeolo che si genera in seguito al work-up ossidativo della miscela di reazione.

Si è proceduto quindi a protezione con TBSCl⁸⁶ della miscela grezza: l'alcool TBS protetto (**52**) veniva quindi agevolmente purificato per cromatografia su silice.

L'introduzione della funzione carbossilica, come la contemporanea liberazione della funzione ossidrilica, è stata realizzata attraverso scissione ossidativa del doppio legame con cloruro di rutenio e periodato di sodio, accedendo al target finale (**45**).

Al fine però di confermare la stereochimica relativa e assoluta dell'unità di β -idrossiacido presente nell'Homophymina A, determinata mediante combinazione dei metodi di Mosher⁵⁴ e di Murata,²⁷ una piccola aliquota del peptide è stata idrolizzata in ambiente acido. L'estrazione con diclorometano dell'idrolizzato acido forniva l'unità di HTMOA.

Dal confronto tra lo spettro ¹H-NMR del composto sintetizzato (**45**) con quello del frammento naturale è immediatamente risultata evidente la completa sovrapposibilità dei valori di chemical shift protonici e delle costanti di accoppiamento.

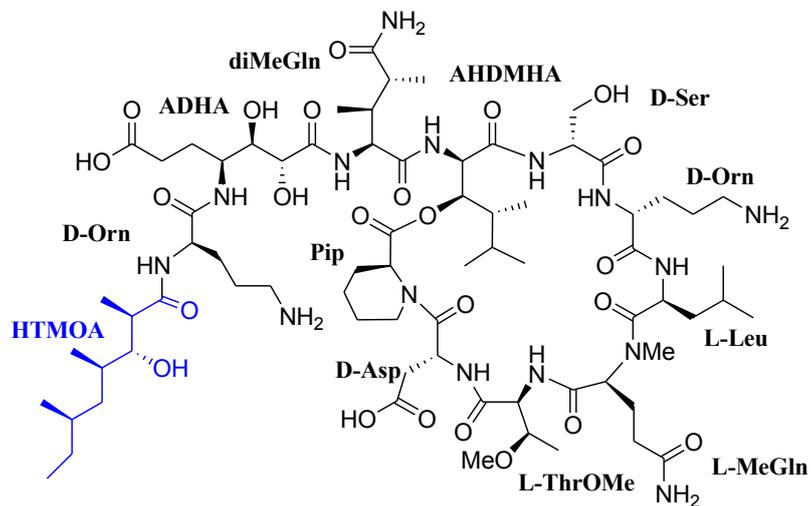
Definitiva conferma dell'identità stereochimica del residuo polichetidico è derivata dal confronto dei valori degli $[\alpha]_D$ che si sono rivelati praticamente coincidenti [sintetico: $[\alpha]_D=+21.2$, (c 7.3, CHCl₃); naturale: $[\alpha]_D=+21.8$, (c 5.4, CHCl₃)].

CAPITOLO 9

9.1. Isolamento di nuove Homophymine

L'Homophymina A è stato, da un punto di vista temporale, il primo metabolita isolato dagli estratti dell'*Homophymia* sp., il cui ampio screening, recentemente avviato, ha portato all'isolamento di una nutrita serie di derivati, denominati homophymine A-E.

Tutte le homophymine isolate sono caratterizzate dallo stesso sistema macrociclico e dalla stessa composizione amminoacidica, mentre si differenziano nella porzione polichetidica legata all'estremità *N*-terminale.



HOMOPHYMINA A	
HOMOPHYMINA B	
HOMOPHYMINA C	
HOMOPHYMINA D	
HOMOPHYMINA E	

Homophymina B

Lo spettro di massa ad alta risoluzione dell'Homophymina B mostra un picco pseudomolecolare corrispondente al peptide protonato $[M+H]^+$ a $m/z= 1584.9100$, cioè 14 u.m.a. in meno rispetto all'Homophymina A, e corrispondente alla formula molecolare $C_{72}H_{125}N_{15}O_{24}$.

Dall'analisi dello spettro 1H -NMR risultava evidente l'analogia strutturale con l'Homophymina A, anche se erano assenti alcuni dei segnali caratteristici assegnati a quest'ultima.

In particolare risultava l'assenza del segnale tripletto a $\delta_H= 0.89$ ppm assegnato al metile terminale del residuo di HTMOA nell'Homophymina A.

Questo dato ci ha fatto supporre che il β -idrossiacido avesse un metile in meno rispetto al residuo HTMOA presente nell'Homophymina A.

Un'analisi accurata degli spettri bidimensionali, in particolare COSY e HMBC ha rivelato lo stesso sistema di spin presente nella Callipeltina A, confermando così la presenza di un acido 3-idrossi-2,4,6-trimetileptanoico (HTMHA).

Tabella 8. ^1H and ^{13}C NMR (700 MHz, CD_3OH) dell'Homophymina B

residuo	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}	δ_{N}	HMBC	NOE
HTMHA					
1		178.7			
2	2.68, m	44.7		1, 3	Orn ₁ -NH
3	3.57, dd (9.3, 2.3)	79.1		5	
4	1.79, ovl	32.9		2, 3, 5, 11	
5	1.19-1.22, ovl	38.5		4, 6	
6	1.70, ovl	26.0			
7	0.95, d	24.6			
8	1.07, d (6.7)	14.3		1, 2, 3	
9	1.01, d (6.7)	17.5		3, 4, 5	
10	0.89, d (6.7)	21.3		5, 6, 7	
Orn₁					
1		175.0			
2	4.35, m	54.9		1, 3, 4	NH, ACDHA-NH
3	1.85-1.94, m	28.7		2, 4, 5	
4	1.73-1.78, m	25.0		2, 3, 5	
5	3.06, ovl	40.4		3, 4	
NH	8.31, d (6.7)		123.8	1, 2, HTMHA-1	2, HTMHA-2
NH ₂					
ADHA					
1		175.8			
2	4.0, d	73.4		1	DiMeGln-NH
3	3.75, dd	74.1		1, 2, 5	
4	4.03, ovl	51.1		5, 6	
5	1.82-1.92, m	28.7		4, 6, 7	
6	2.24, m	32.4		5, 7	
7		177.8			
NH	7.65, br s		117.8	Orn ₁ -1	4, Orn ₁ -1
3,4-DiMeGln					
1		174.0			
2	4.43, m	58.2		1, 3 ACDHA-1	AHDMHA-NH
3	2.26, m	37.9			
4	2.71, ovl	41.9			
5		179.5			
6	1.07, d (6.8)	14.3		2, 3, 4	
7	1.22, d (7.0)	14.6		3, 4, 5	
NH	9.02		125.5		ACDHA-2
NH ₂	7.01, 7.69, br s		109.0	4, 5	
AHDMHA					
1		173.5			
2	5.29, br s	55.1		1, 3, 4	Ser-NH
3	5.65, br d (10)	77.6		1, 2, 4, Pip-1	
4	1.93, ovl	38.7		4, 5, 7	
5	1.96, ovl	27.5		3, 7, 8	
6	0.95, d (6.8)	21.2		5, 8	
7	0.74, d (6.8)	8.74		3, 4, 5	2
8	0.76, d (6.8)	15.1		5, 6	3
NH	9.12, br s		116.2		diMeGln-2
Ser					
1		172.2			
2	3.98, ovl	60.4		1, 3	Orn ₂ -NH

3	4.00-4.09, ovl	61.7		1, 2	
NH	8.37, br s		114.4	1	AHDMHA-2
Orn₂					
1		173.0			
2	4.47, m	52.9		1	
3	1.62-2.10, ovl	27.7		2, 4	
4	1.62-1.72, ovl	25.0		3, 5	
5	2.92, m	39.9		3, 4	
NH	8.39, br s		116.7	Ser-1	Ser-2, Leu-NH
NH ₂					
Leu					
1		176.2		N-MeGln	
2	4.61, m	51.1		1, 3	N-MeGln
3	1.40-2.38, ovl	39.5		2, 4, 5	
4	2.04, ovl	26.1		3, 5, 6	
5	1.10, d (6.7)	24.0		3, 4	
6	1.01, d (6.3)	21.1		4, 5	
NH	7.63, br s		120.0	2, 3	Orn ₂ -NH
N-MeGln					
1		171.5			
2	5.47, br s	57.6		1	
3	1.96-2.46, ovl	23.1		1, 2, 4	
4	2.19-2.26, ovl	31.8		2, 3, 5	
5		177.7			
NMe	3.05, s	31.3		2, Leu-1	2, Leu-2, ThrOMe-NH
NH ₂	6.83, 7.19, s		109.2	4, 5	
ThrOMe					
1		170.2			
2	4.36, d (9.6)	58.8		1, 3, N-MeGln-1	Asp-NH
3	4.13, ovl	76.3		1, 4, OMe	
4	1.20, ovl	16.5		2, 3	
OMe	3.29, s	57.0		3	
NH	6.49, d (8.8)		102.6	NMeGln-1	
Asp					
1		170.2			
2	5.22, ovl	47.6		1, 3	3, NH, Pip-6
3	2.54-2.84, ovl	36.0		1, 2, 4	
4		174.4			
NH	8.24, br s		117.7	2, ThrOMe-1	
Pip					
1		170.2			
2	5.24, ovl	53.8		1, 3, 4, 6, Asp-1	3, 6
3	1.67-2.21, ovl	27.5		2, 4, 5	
4	1.24-1.77, ovl	22.4		3, 5	
5	1.51-1.65, ovl	26.3		3, 4, 6	
6	3.01-3.76, ovl	44.5		2, 4, 5	2, Asp-2

^a Le costanti di accoppiamento sono in parentesi e sono misurate in Hz;

Ovl: overlapped;

n.o.: non osservato

^b Correlazioni Noe ottenute dall'esperimento ROESY.

Homophymina C

La formula molecolare $C_{74}H_{130}N_{15}O_{24}$ dell'Homophymina C, determinata mediante spettrometria di massa HRESIMS, ha indicato la presenza di un'unità CH_2 in più rispetto all'Homophymina A.

Una prima analisi dello spettro protonico dell'Homophymina C ha mostrato la presenza di due protoni diastereotopici a campi alti, rispettivamente a $\delta_H = 1.27$ ppm e $\delta_H = 1.41$ ppm, che erano assenti nello spettro protonico dell'Homophymina A.

La presenza nello spettro protonico dell'Homophymina C di due segnali in più ha suggerito, in concomitanza con il dato di massa, la presenza di un gruppo etilico legato al C7 in luogo del gruppo metilico.

A causa del notevole affollamento di segnali presenti nella zona dello spettro protonico compresa tra $\delta_H = 0.8$ ppm e $\delta_H = 1.8$ ppm, l'assegnazione della struttura dell'unità polichetidica legata all'N-terminale dell'Homophymina C, ha richiesto un'analisi accurata degli spettri bidimensionali.

Infatti lo spettro COSY mostra la presenza di un sistema di spin di questo tipo: due segnali protonici diastereotopici a $\delta_H = 1.27$ ppm e $\delta_H = 1.41$ ppm (accoppiati nello spettro HSQC a un carbonio a $\delta_C = 21.3$ ppm) accoppiati con un segnale tripetto a $\delta_H = 0.90$ ppm (correlato nello spettro HSQC a un carbonio a $\delta_C = 14.9$ ppm). Il gruppo etilico è stato poi collegato ad un carbonio di tipo metilenico grazie alle correlazioni COSY dei protoni diastereotopici a $\delta_H = 1.27$ ppm e $\delta_H = 1.41$ ppm con due protoni diastereotopici a $\delta_H = 0.99$ ppm e $\delta_H = 1.39$ ppm attribuiti al carbonio a $\delta_C = 38.6$ ppm dall'analisi dello spettro HSQC. A partire poi dal suddetto metilene, si seguiva un sistema di spin identico (C1-C6) a quello presente nell'Homophymina A.

Definitiva conferma della presenza nell'Homophymina C di un residuo di acido 3-idrossi-2,4,6-trimetilnonanoico (HTMHA) è derivata dall'analisi dei dati relativi all'esperienza HMBC (figura 32).

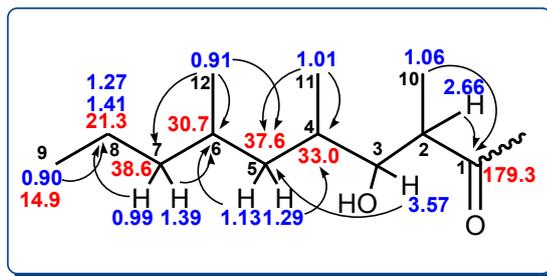


Figura 32 *Correlazioni diagnostiche HMBC relative al residuo di acido 3-idrossi-2,4,6-trimetilnonanoico presente nell'Homophymina C.*

In particolare le correlazioni, indicate in figura 32, a partire dai protoni del metile a $\delta_{\text{H}}= 0.90$ verso il C8 ($\delta_{\text{C}}= 21.3$), e dai protoni diastereotopici del metilene che risuonano a $\delta_{\text{H}}= 0.99$ e $\delta_{\text{H}}= 1.39$ verso il C8 ($\delta_{\text{C}}= 21.3$) e C9 ($\delta_{\text{C}}= 14.9$) hanno consentito di definire senza alcuna ambiguità la presenza di un gruppo etilico come terminazione della catena alchilica laterale dell'Homophymina C al posto del gruppo metilico terminale presente nell'Homophymina A.

Tabella 9. ^1H and ^{13}C NMR (700 MHz, CD_3OH) dell'Homophymina C

residuo	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}	δ_{N}	HMBC	NOE
HTMNA					
1		179.3			
2	2.66, m	44.7		1, 3	Orn ₁ -NH
3	3.57, dd (9.3, 2.3)	79.7		5	
4	1.79, ovl	33.0		2, 3, 5, 11	
5	1.13-1.29, ovl	37.6		4, 6	
6	1.55, ovl	30.7			
7	0.99, 1.39, ovl	38.6			
8	1.27, 1.41, ovl	21.3			
9	0.90, t	14.9			
10	1.08, d (6.7)	14.5			
11	1.00, d (6.7)	17.8		7, 8, 13	
12	0.92 d (6.7)	21.6		1, 2, 3	
Orn₁					
1		174.3			
2	4.32, m	54.8		1, 3, 4	NH, ACDHA-NH
3	1.80-1.91, m	28.4		2, 4, 5	
4	1.62-1.80, m	25.0		2, 3, 5	
5	3.04, ovl	40.5		3, 4	
NH	8.31, d (6.7)		123.8	1, 2, HTMNA-1	2, HTMNA-2
NH ₂					
ADHA					
1		176.1			
2	3.96, d	73.5		1	DiMeGln-NH
3	3.72, dd	74.3		1, 2, 5	
4	4.11, m	50.7		5, 6	
5	1.81-1.91, ovl	29.3		4, 6, 7	
6	2.22, m	32.7		5, 7	
7		177.0			
NH	7.65, br s		117.8	Orn ₁ -1	4, Orn ₁ -1
3,4-DiMeGln					
1		174.0			
2	4.41, m	58.2		1, 3 ACDHA-1	AHDMHA-NH
3	2.22, m	37.9			
4	2.73, ovl	41.9			
5	-	179.5			
6	1.08, d (6.8)	14.3		2, 3, 4	
7	1.22, d (7.0)	14.6		3, 4, 5	
NH	9.02		125.5		ACDHA-2
NH ₂	7.01, 7.69, br s		109.0	4, 5	
AHDMHA					
1		173.4			
2	5.31, br s	55.3		1, 3, 4	Ser-NH
3	5.63, br d (10)	77.5		1, 2, 4, Hpr-1	
4	1.92, ovl	38.7		4, 5, 7	
5	1.96, ovl	27.6		3, 7, 8	

6	0.92, d (6.8)	21.4		5, 8	
7	0.75, d (6.8)	8.8		3, 4, 5	2
8	0.74, d (6.8)	15.2		5, 6	3
NH	9.12, br s		116.2		diMeGln-2
Ser					
1		172.5			
2	3.96, ovl	60.7		1, 3	Orn ₂ -NH
3	4.00-4.06, ovl	62.2		1, 2	
NH	8.37, br s		114.4	1	AHDMHA-2
Orn₂					
1		172.2			
2	4.52, m	52.8		1	
3	1.63-2.10, ovl	27.7		2, 4	
4	1.73-1.80, ovl	25.0		3, 5	
5	2.91, m	40.1		3, 4	
NH			116.7	Ser-1	Ser-2, Leu-NH
NH ₂					
Leu					
1		176.2		N-MeGln	
2	4.60, m	51.1		1, 3	N-MeGln
3	1.40-2.37, ovl	39.4		2, 4, 5	
4	2.04, ovl	26.0		3, 5, 6	
5	1.10, d (6.7)	24.1		3, 4	
6	1.01, d (6.3)	21.4		4, 5	
NH	7.63, br s		120.0	2, 3	Orn ₂ -NH
N-MeGln					
1		172.0			
2	5.47, br s	57.6		1	
3	1.93-2.47, ovl	23.1		1, 2, 4	
4	2.19-2.26, ovl	31.8		2, 3, 5	
5		177.2			
NMe	3.03, s	31.2		2, Leu-1	2, Leu-2, ThrOMe-NH
NH ₂	6.83, 7.19, s		109.2	4, 5	
ThrOMe					
1		170.6			
2	4.35, d (9.6)	59.0		1, 3, N-MeGln-1	Asp-NH
3	4.11, ovl	76.4		1, 4, OMe	
4	1.20, ovl	16.3		2, 3	
OMe	3.27, s	56.9		3	
NH	6.49, d (8.8)		102.6	NMeGln-1	
Pip					
1		170.2			
2	5.24, ovl	53.9		1, 3, 4, 6, Asp-1	3, 6
3	1.67-2.21, ovl	27.5		2, 4, 5	
4	1.24-1.76, ovl	22.6		3, 5	
5	1.51-1.66, ovl	26.2		3, 4, 6	
6	3.04-3.75, ovl	44.9		2, 4, 5	2, Asp-2
Asp					
1		170.2			
2	5.26, ovl	47.0		1, 3	3, NH, Hpr-6

3	2.54-2.84, ovl	36.1		1, 2, 4	
4		174.8			
NH	8.24, br s		117.7	2, ThrOMe-1	

^a Le costanti di accoppiamento sono in parentesi e sono misurate in Hz;

Ovl: overlapped;

n.o.: non osservato

^b Correlazioni Noe ottenute dall'esperimento ROESY.

Homophymina D

La formula molecolare $C_{75}H_{132}N_{15}O_{24}$ dell'Homophymina D, determinata mediante spettrometria di massa HRESIMS, ha indicato la presenza di una C-1 omologazione rispetto all'Homophymina C, anche in questo caso riferita all'end-group.

L'analisi dello spettro protonico dell'Homophymina D ha mostrato due segnali doppietto a campi alti, rispettivamente a $\delta_H = 0.87$ ppm e $\delta_H = 0.91$ ppm attribuiti a due gruppi CH_3 , in luogo di un segnale tripletto presente nell'Homophymina A.

Questo dato ha suggerito, in concomitanza con il dato di massa la presenza di un gruppo isopropilico legato al C7 in luogo del gruppo metilico.

Infatti lo spettro COSY mostra la presenza di un sistema di spin di questo tipo: un segnale protonico a $\delta_H = 1.70$ ppm (accoppiato nello spettro HSQC a un carbonio a $\delta_C = 26.4$ ppm) accoppiato con i due segnali doppietto a $\delta_H = 0.87$ ppm e $\delta_H = 0.91$ ppm attribuiti a due metili. Il gruppo isopropilico è stato poi collegato ad un carbonio di tipo metilenico grazie alle correlazioni COSY del protone a $\delta_H = 1.70$ ppm con due protoni diastereotopici a $\delta_H = 1.23$ ppm e $\delta_H = 0.94$ ppm attribuiti al carbonio a $\delta_C = 46.4$ ppm dall'analisi dello spettro HSQC. A partire poi dal suddetto metilene, si seguiva un sistema di spin identico (C1-C6) a quello presente nell'Homophymina A. Definitiva conferma della presenza nell'Homophymina D di un residuo di acido 3-idrossi-2,4,6,8-tetrametilnonanoico è derivata dall'analisi dello spettro HMBC.

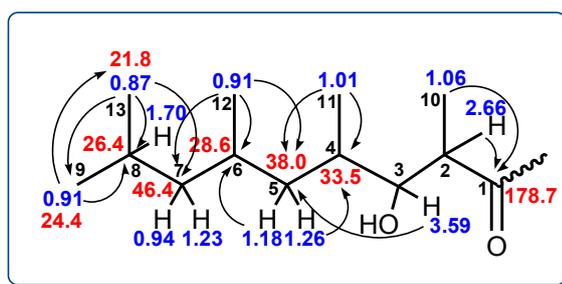


Figura 33 *Correlazioni diagnostiche HMBC relative al residuo di acido 3-idrossi-2,4,6,8-tetrametilnonanoico presente nell'Homophymina D.*

In particolare le correlazioni, indicate in figura 33, a partire dai protoni del metile che risuonano a $\delta_H = 0.87$ verso il C7 ($\delta_C = 46.4$), C8 ($\delta_C = 26.4$) e C9 ($\delta_C = 24.4$), e dai protoni del metile che risuonano a $\delta_H = 0.91$ verso il C8 ($\delta_C = 26.4$) e C13 ($\delta_C = 21.8$)

hanno consentito di definire senza alcuna ambiguità la presenza di un gruppo isopropilico come terminazione della catena alchilica laterale dell'Homophymina D al posto del gruppo metilico terminale presente nell'Homophymina A.

Tabella 10. ^1H and ^{13}C NMR (700 MHz, CD_3OH) dell'Homophymina D

residuo	δ_{H}	δ_{C}	δ_{N}	HMBC	NOE
HTMNA					
1		178.7			
2	2.66, m	44.7		1, 3, 4, 10	Orn ₁ -NH
3	3.59, dd (9.3, 2.3)	79.1		1, 2, 4, 5, 10, 11	
4	1.79, ovl	33.5		2, 3, 5, 11	
5a-5b	1.18-1.26, ovl	38.0		3, 4, 6, 11	
6	1.60, ovl	28.6		4, 5, 7, 12	
7a-7b	0.94, 1.23, ovl	46.4		5, 6, 8	
8	1.70, m	26.4		6, 7, 9, 13	
9	0.91, d (6.7)	24.4		7, 8, 13	
10	1.06, d (6.7)	14.5		1, 2, 3	
11	1.01, d (6.7)	17.6		3, 4, 5	
12	0.91, d (6.7)	21.5		5, 6, 7	
13	0.87, d (6.7)	21.8		7, 8, 9	
Orn₁					
1		175.0			
2	4.32, ovl	54.8		1, 3, 4	NH, ADHA-NH
3a-3b	1.85-1.94, m	28.7		2, 4, 5	
4a-4b	1.73-1.78, m	25.0		2, 3, 5	
5	3.06, ovl	40.5		3, 4	
NH	8.31, d (6.7)		123.8	1, 2, HTMNA-1	2, HTMNA-2
NH ₂					
ADHA					
1		175.8			
2	3.97, d	73.4		1, 3, 4	DiMeGln-NH
3	3.73, dd	74.0		1, 2, 5	
4	4.03, ovl	51.1		5, 6	
5a-5b	1.82-1.92, m	28.7		4, 6, 7	
6a-6b	2.22, m	32.4		5, 7	
7		177.8			
NH	7.65, br s		117.8	Orn ₁ -1	4, Orn ₁ -2
NH ₂	6.90, 7.59, s		108.6	6, 7	
3,4-DiMeGln					
1		174.0			
2	4.43, m	58.2		1, 3, 6, DAHD-1	AHDMHA-NH
3	2.29, m	39.7		1, 2, 4, 6, 7	
4	2.72, ovl	42.1		2, 3, 5, 6	
5		179.5			
6	1.07, d (6.8)	14.3		2, 3, 4	
7	1.22, d (7.0)	14.6		4, 5	
NH	9.02		125.5		ADHA-2
NH ₂	7.01, 7.69, br s		109.0	4, 5	
AHDMHA					
1		173.5			
2	5.32, br s	55.3		1, 3, 4	7
3	5.65, br d (10)	77.4		1, 2, 4, Hpr-1	8
4	1.92, ovl	38.9		4, 5, 7	
5	1.98, ovl	27.6		3, 7, 8	
6	0.95, d (6.8)	21.3		5, 8	
7	0.75, d (6.8)	8.8		3, 4, 5	2

8	0.73, d (6.8)	15.2		5, 6	3
NH	9.12, br s		116.2		diMeGln-2
Ser					
1		172.2			
2	3.97, ovl	40.6		1, 3	Orn ₂ -NH
3a-3b	4.00-4.09, ovl	61.9		1, 2	
NH	8.37, br s		114.4	1	AHDMHA-2
Orn₂					
1		173.0			
2	4.52, m	52.6		1	
3a-3b	1.62-2.10, ovl	27.7		2, 4	
4a-4b	1.62-1.72, ovl	25.0		3, 5	
5	2.93, m	39.9		3, 4	
NH	8.39, br s		116.7	Ser-1	Ser-2
NH ₂					
Leu					
1		176.2		N-MeGln	
2	4.61, m	51.1		1, 3	N-MeGln
3a-3b	1.44-2.39, ovl	39.4		2, 4, 5	
4	2.05, ovl	25.8		3, 5, 6	
5	1.10, d (6.7)	24.2		3, 4	
6	1.01, d (6.3)	21.1		4, 5	
NH	7.63, br s		120.0	2, 3	
N-MeGln					
1		171.5			
2	5.47, br s	57.6		1	
3a-3b	1.96-2.46, ovl	23.1		1, 2, 4	
4a-4b	2.16-2.18, ovl	31.8		2, 3, 5	
5		177.7			
NMe	3.05, s	31.3		2, Leu-1	2, Leu-2
NH ₂	6.83, 7.19, s		109.2	4, 5	
ThrOMe					
1		170.2			
2	4.37, d (9.6)	58.8		1, 3, N-MeGln-1	Asp-NH
3	4.12, ovl	76.3		1, 4, OMe	
4	1.20, ovl	16.5		2, 3	
OMe	3.29, s	57.0		3	
NH	6.49, d (8.8)		102.6	NmeGln-1	
Pip					
1		170.2			
2	5.23, ovl	53.8		1, 3, 4, 6, Asp-1	3, 6
3a-3b	1.67-2.21, ovl	27.5		2, 4, 5	
4a-4b	1.24-1.77, ovl	22.4		3, 5	
5a-5b	1.51-1.65, ovl	26.3		3, 4, 6	
6a-6b	3.04-3.75, ovl	44.7		2, 4, 5	2, Asp-2
Asp					
1		170.2			
2	5.25, ovl	47.0		1, 3	3, NH, Hpr-6
3a-3b	2.54-2.84, ovl	36.0		1, 2, 4	
4		174.4			
NH	8.24, br s		117.7	2, ThrOMe-1	

^a Le costanti di accoppiamento sono in parentesi e sono misurate in Hz;

^b Correlazioni Noe ottenute dall'esperimento ROESY.

Homophymina E

Lo spettro di massa dell'Homophymina E ha mostrato un picco pseudomolecolare corrispondente al peptide protonato $[M+H]^+$ a $m/z=1640.9726$, cioè 14 u.m.a. in più rispetto all'Homophymina D, e corrispondente alla formula molecolare $C_{76}H_{134}N_{15}O_{24}$.

Una prima analisi dello spettro protonico dell'Homophymina E ha mostrato la presenza di due segnali a campi alti, rispettivamente a $\delta_H=1.10$ ppm e $\delta_H=1.46$ ppm, che erano assenti nello spettro protonico dell'Homophymina D.

Un'analisi accurata dello spettro COSY ha rivelato un sistema di spin di questo tipo: due segnali protonici diastereotopici a $\delta_H=1.10$ ppm e $\delta_H=1.46$ ppm ($\delta_C=25.2$ ppm) accoppiati con un segnale tripletto a $\delta_H=0.88$ ppm ($\delta_C=20.6$ ppm).

Il gruppo etilico è stato poi collegato ad un carbonio di tipo metinico grazie alle correlazioni COSY dei protoni diastereotopici a $\delta_H=1.10$ ppm e $\delta_H=1.46$ ppm con un protone a $\delta_H=1.78$ ppm attribuito al carbonio a $\delta_C=25.6$ ppm dall'analisi dello spettro HSQC. A partire poi dal suddetto metino, si seguiva un sistema di spin identico a quello presente nell'Homophymina D.

Questi dati, in concomitanza con il dato di massa, ci ha fatto supporre la sostituzione di un gruppo *sec*-butilico legato al C7 in luogo del gruppo isopropilico.

Definitiva conferma della presenza nell'Homophymina E di un residuo di acido 3-idrossi-2,4,6,8-tetrametildecanoico è derivata dall'analisi dei dati relativi all'esperimento HMBC (figura 34).

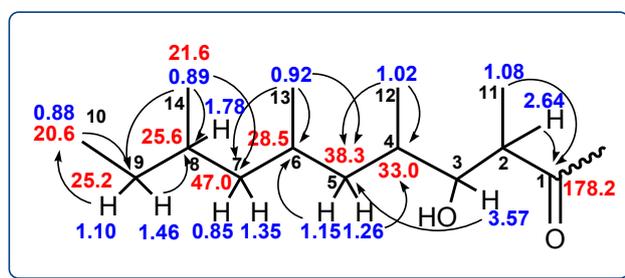


Figura 34 Correlazioni diagnostiche HMBC relative al residuo di acido 3-idrossi-2,4,6,8-tetrametildecanoico presente nell'Homophymina D.

Tabella 11. ^1H and ^{13}C NMR (700 MHz, CD_3OH) dell'Homophymina E

residuo	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	δ_{C}	δ_{N}	HMBC	NOE
HTMDA					
1		178.7			
2	2.66, m	44.7		1, 3	Orn ₁ -NH
3	3.59, dd	79.1		5	
4	1.78, ovl	32.2		2, 3, 5, 11	
5	1.15-1.26, ovl	37.7		4, 6	
6	1.60, ovl	28.7			
7	0.85, 1.35, ovl	44.7			
8	1.78, m	31.8			
9	1.08, 1.46	29.0			
10	0.88, t	11.2			
11	1.08, d	14.2		7, 8, 13	
12	1.01, d	17.5		1, 2, 3	
13	0.92, d	21.7		3, 4, 5	
14	0.89, d	20.5		5, 6, 7	
Orn₁					
1		175.0			
2	4.32, ovl	54.8		1, 3, 4	NH, ACDHA-NH
3	1.85-1.94, m	28.7		2, 4, 5	
4	1.73-1.78, m	25.0		2, 3, 5	
5	3.06, ovl	40.5		3, 4	
NH	8.31, d		123.8	1, 2, HTMNA-1	2, HTMNA-2
NH ₂					
ADHA					
1		175.8			
2	3.97, d	73.4		1	DiMeGln-NH
3	3.73, dd	74.0		1, 2, 5	
4	4.03, ovl	51.1		5, 6	
5	1.82-1.92, m	28.7		4, 6, 7	
6	2.22, m	32.4		5, 7	
7		177.8			
NH	7.65, br s		117.8	Orn ₁ -1	4, Orn ₁ -1
3,4-DiMeGln					
1		174.0			
2	4.43, m	58.2		1, 3 ACDHA-1	AHDMHA-NH
3	2.29, m	39.7			
4	2.72, ovl	42.1			
5		179.5			
6	1.08, d	14.2		2, 3, 4	
7	1.21, d	14.7		3, 4, 5	
NH	9.02		125.5		ACDHA-2
NH ₂	7.01, 7.69, br s		109.0	4, 5	
AHDMHA					
1		173.5			
2	5.32, br s	55.3		1, 3, 4	Ser-NH
3	5.65, br d (10)	77.4		1, 2, 4, Hpr-1	
4	1.92, ovl	38.9		4, 5, 7	
5	1.98, ovl	27.6		3, 7, 8	
6	0.95, d (6.8)	21.3		5, 8	
7	0.75, d (6.8)	8.8		3, 4, 5	2
8	0.73, d (6.8)	15.2		5, 6	3

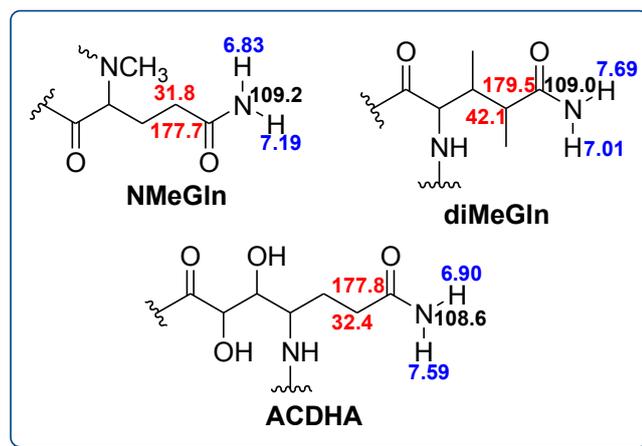
NH	9.12, br s		116.2		diMeGln-2
Ser					
1		172.2			
2	3.97, ovl	40.6		1, 3	Orn ₂ -NH
3	4.00-4.09, ovl	61.9		1, 2	
NH	8.37, br s		114.4	1	AHDMHA-2
Orn₂					
1		173.0			
2	4.52, m	52.6		1	
3	1.62-2.10, ovl	27.7		2, 4	
4	1.62-1.72, ovl	25.0		3, 5	
5	2.93, m	39.9		3, 4	
NH	8.39, br s		116.7	Ser-1	Ser-2, Leu-NH
NH ₂					
Leu					
1		176.2		N-MeGln	
2	4.61, m	51.1		1, 3	N-MeGln
3	1.44-2.39, ovl	39.4		2, 4, 5	
4	2.05, ovl	25.8		3, 5, 6	
5	1.10, d (6.7)	24.2		3, 4	
6	1.01, d (6.3)	21.1		4, 5	
NH	7.63, br s		120.0	2, 3	Orn ₂ -NH
N-MeGln					
1		171.5			
2	5.47, br s	57.6		1	
3	1.96-2.46, ovl	23.1		1, 2, 4	
4	2.16-2.18, ovl	31.8		2, 3, 5	
5		177.7			
NMe	3.05, s	31.3		2, Leu-1	2, Leu-2, ThrOMe-NH
NH ₂	6.83, 7.19, s		109.2	4, 5	
ThrOMe					
1		170.2			
2	4.37, d (9.6)	58.8		1, 3, N-MeGln-1	Asp-NH
3	4.12, ovl	76.3		1, 4, OMe	
4	1.20, ovl	16.5		2, 3	
OMe	3.29, s	57.0		3	
NH	6.49, d (8.8)		102.6	NMeGln-1	
Pip					
1		170.2			
2	5.23, ovl	53.8		1, 3, 4, 6, Asp-1	3, 6
3	1.67-2.21, ovl	27.5		2, 4, 5	
4	1.24-1.77, ovl	22.4		3, 5	
5	1.51-1.65, ovl	26.3		3, 4, 6	
6	3.04-3.75, ovl	44.7		2, 4, 5	2, Asp-2
Asp					
1		170.2			
2	5.25, ovl	47.0		1, 3	3, NH, Hpr-6
3	2.54-2.84, ovl	36.0		1, 2, 4	
4		174.4			
NH	8.24, br s		117.7	2, ThrOMe-1	

I cromatogrammi in cui venivano isolate le homophymine A-E risultavano molto complessi in quanto ogni picco era immediatamente seguito da un picco addizionale la cui analisi NMR rivelava una perfetta sovrapposizione delle risonanze protoniche e ^{13}C di tutti i nuclei rispetto a quelle riportate per il metabolita corrispondente al picco maggioritario. Il dato di massa rivelava però un peso molecolare differente e precisamente minore di una unità di massa atomica. Quindi insieme alle homophymine A-E, appena descritte, abbiamo potuto isolare anche le homophymine A₁-E₁.

Per giustificare il dato di massa abbiamo supposto la sostituzione di una funzione carbossilica (quella dell'unità di aspartato oppure dell'unità di ADHA) con una funzione ammidica.

La risoluzione di questo problema strutturale è derivata da una analisi combinata dell'esperimento HMBC e dell'esperimento ^{15}N -HSQC, entrambi eseguiti in CD_3OH . In particolare l'esperimento di correlazione diretta ^{15}N - ^1H ha permesso di attribuire a ciascun segnale protonico scambiabile compreso nella zona $\delta_{\text{H}} = 6.5 - 9.2$ ppm dello spettro protonico, il corrispettivo segnale ^{15}N . Dall'analisi di questo esperimento è risultata la presenza di tre gruppi amminici primari (NH_2) i cui corrispettivi idrogeni risultavano diastereotopici.

Nella figura 35 sono riportati i valori protonici e di ^{15}N per questi tre sistemi relativi all'Homophymina A₁.

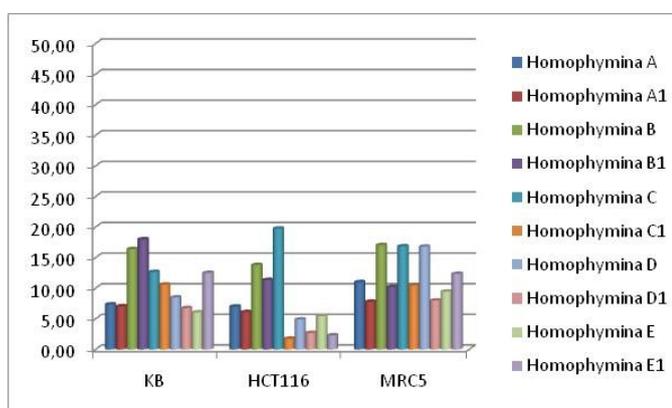
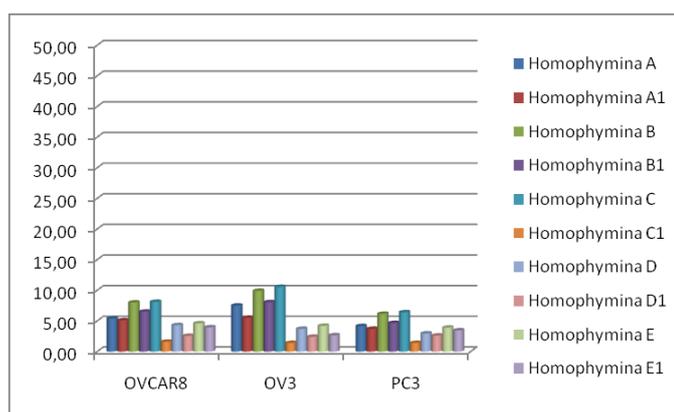


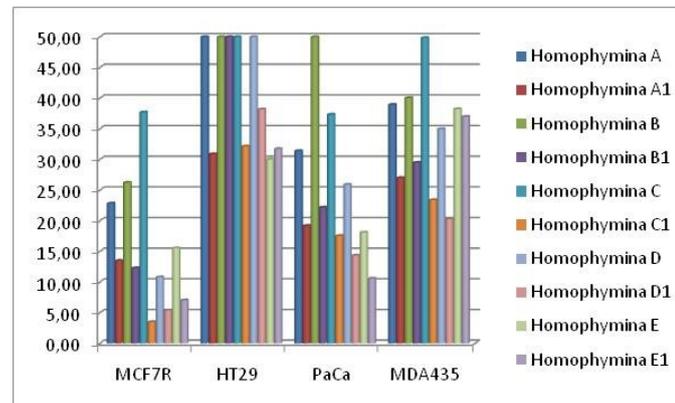
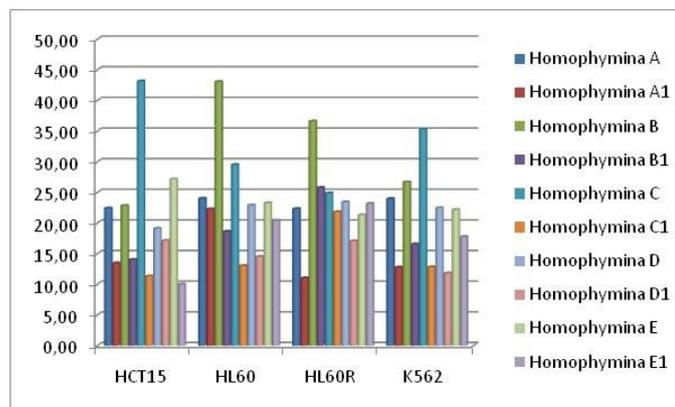
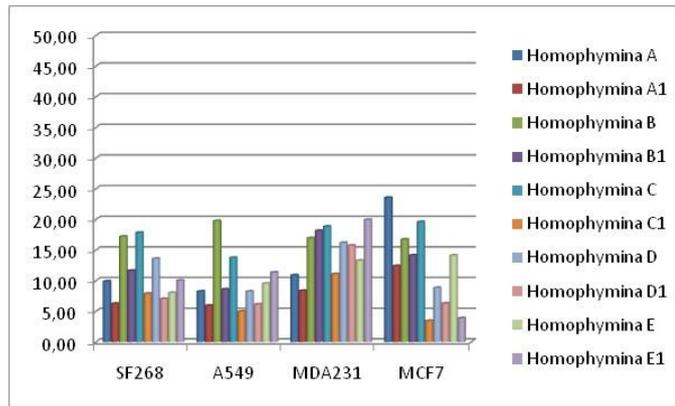
A questo punto l'analisi dello spettro HMBC ha consentito di collegare i tre gruppi NH_2 ai corrispondenti carbonili e definire la presenza di tre funzioni ammidiche nelle homophymine A_1 - E_1 . Come nel caso dell'Homophymina A, due delle funzioni ammidiche appartengono rispettivamente all'unità di diMeGln e di *N*-MeGln. L'ultima funzione ammidica diastereotopica ($\delta_{\text{H}} = 6.90$ ppm e 7.59 ppm) è stata attribuita al sistema di spin dell'acido 4-ammino-6 carbamoil-2,3 diidrossiesanoico sulla base della correlazione chiave con i carboni a $\delta_{\text{C}} = 177.8$ ppm e $\delta_{\text{C}} = 32.4$ ppm assegnati rispettivamente al C6 e al C7 del sistema di spin del residuo di ACDHA.

9.2. Studi farmacologici sulle Homophymine

Tutte le Homophymine isolate sono state sottoposte ad uno screening farmacologico su una serie di linee cellulari per valutare una eventuale attività antifungina e citotossica. Come si può osservare dai seguenti istogrammi, tutte le Homophymine hanno una buona attività citotossica su tutte le linee cellulari umane. In particolare è stata osservata per tutte una forte inibizione della crescita delle cellule tumorali ovariche e prostatiche con valori di IC₅₀ intorno a 7.0 nM.

Inoltre si può notare come le homophymine che presentano il γ -amminoacido in forma ammidica (A₁-E₁) hanno mostrato dei valori di IC₅₀ inferiori a quelli dei corrispondenti peptidi (A-E) con catena laterale in forma carbossilica.

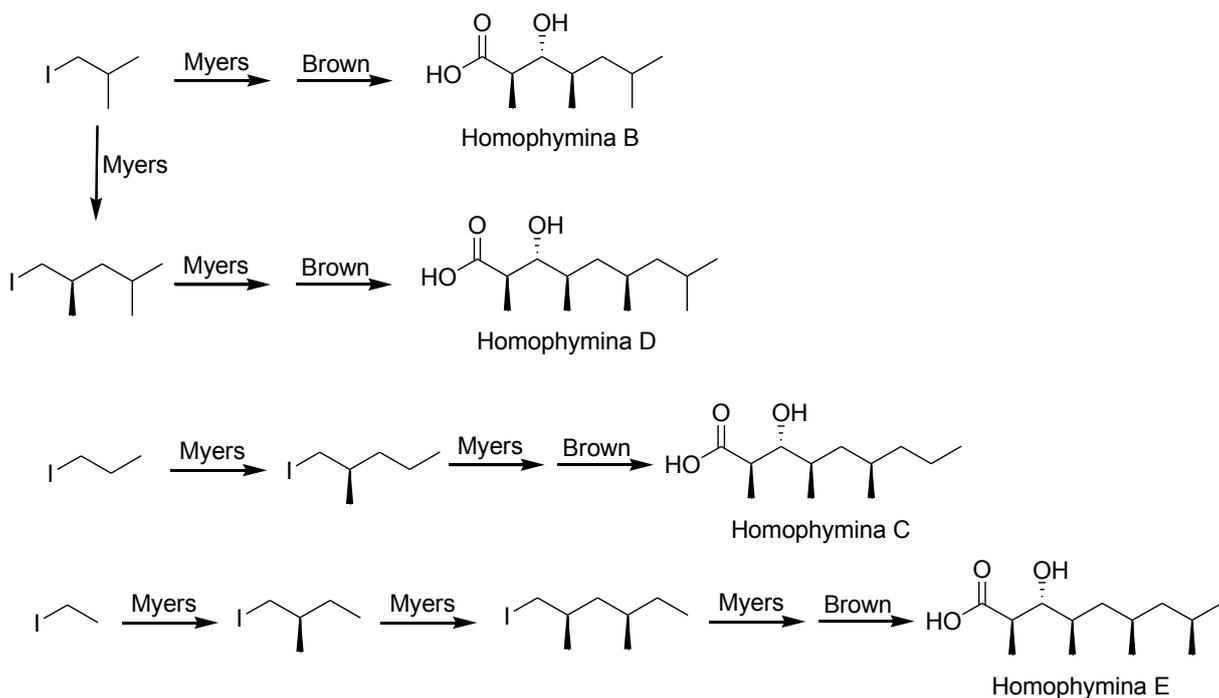




CAPITOLO 10

10.1. Prospettive

L'isolamento delle homophymine A-E rappresenta, come visto, un utile strumento per approfondire le conoscenze farmacologiche su questa interessante famiglia di ciclodepsipeptidi. Un ulteriore stimolo deriva dalla possibilità di accedere sinteticamente alla costruzione stereoselettiva delle unità polichetidiche ritrovate in questi peptidi. A tale scopo la procedura sintetica messa a punto per la sintesi dell'unità HTMOA presente nel capostipite Homophymina A risulta altamente efficiente e facilmente applicabile. Come si evince dalla seguente figura basta cambiare l'alogenuro alchilico iniziale e/o gli step di alchilazione secondo Myers, il tutto seguito dalla crotilboronazione do Brown, per accedere ai 4 differenti β -idrossiacidi.



CAPITOLO 11

11.1. Apparecchiature utilizzate

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ sono stati realizzati su apparecchi Inova-500 e 700 MHz.

I valori $^1\text{H-NMR}$ sono riportati in unità δ (ppm), mentre i valori delle J sono riportati in Hz.

Le misure relative al potere ottico rotatorio, $[\alpha]_D$, sono state realizzate mediante un polarimetro Perkin-Elmer 243 B.

Le analisi spettrometriche di massa sono state realizzate utilizzando uno spettrometro a triplo quadrupolo Applied Biosystem API 2000 con sorgente ESI.

Le separazioni cromatografiche HPLC sono state effettuate utilizzando una pompa Waters modello 6000 A con iniettore U6K ed un rifrattometro differenziale modello 401.

La purificazione dei prodotti è stata ottenuta attraverso cromatografia su colonna solido-liquido utilizzando come fase stazionaria gel di silice (Macherey-Nagel 70-230 mesh) e come fase mobile miscele di *n*-esano/etilacetato o cloroformio/metanolo.

I profili di eluizione sono stati definiti caso per caso, tenendo conto dei valori di R_f ricavabili dalle TLC con Kieselgel 60 F₂₅₄ (rilevate con reattivo di Pancaldi o ninidrina) usate per monitorare l'andamento delle singole reazioni.

Tutti i reattivi impiegati corrispondono a quelli commercializzati dalla Sigma-Aldrich™.

I solventi dry utilizzati per le reazioni sono stati distillati immediatamente prima dell'uso, utilizzando come agente disidratante CaH_2 .

Tutte le reazioni sono state effettuate in vetreria fiammeggiata sotto argon ed eseguite in atmosfera inerte di argon.

11.2. Isolamento delle homophymine

La spugna liofilizzata (200 g) è stata estratta con MeOH (4 × 2.5 l) a temperatura ambiente. L'estratto metanolico (30g) è stato ripartito secondo la metodica di Kupchan⁷⁶ modificata. La frazione solubile in CHCl₃ (3.5 g) è stata ulteriormente suddivisa mediante DCCC (CHCl₃/MeOH/H₂O, 7:13:8) in modo ascendente. Le singole frazioni sono state controllate con TLC su gel di silice, usando come fase eluente una miscela di *n*-butanolo/acido acetico/acqua 60:15:25 e riunite in base al comune comportamento cromatografico. In questo modo abbiamo ottenuto tre frazioni (4 ml).

Le frazioni 7-10 sono state purificate mediante HPLC a fase inversa utilizzando una colonna Vydac C18 (10 μ, 250 x 10 mm, 4 ml/min) e come eluente una miscela CH₃CN/H₂O 42% (0.1 % TFA), portando all'isolamento delle homophymine A-E e A₁-E₁.

11.3. Analisi strutturale dell'Homophymina A

11.3.1. Idrolisi dell'Homophymina A

L'Homophymina A (30 mg) è stata sottoposta ad idrolisi acida con HCl 6N (5 ml) ad una temperatura di 130 °C per 12 ore. L'idrolizzato ottenuto è stato estratto con CH₂Cl₂. Dalla fase organica è stato isolato l'acido 3-idrossi-2,4,6-trimetilottanoico (HTMOA); la fase acquosa è stata, invece, frazionata mediante HPLC a fase inversa utilizzando una colonna Phenomenex Hydro (4 μ, 250 x 4.6 mm) eluendo con una miscela metanolo/acqua al 98%. In queste condizioni sono stati isolati 2.2 mg di acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico (AHDMHA) e 0.7 mg di acido 4-ammino-2,3-diidrossieptandioico (ADHA).

Acido 3-idrossi-2,4,6-trimetilottanoico (HTMOA)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.48 (1H, t, *J*=5.8 Hz, H-3), 2.74 (1H, quintet, *J*=7.1 Hz, H-2), 1.72 (1H, m, H-4), 1.46 (1H, m, H-7), 1.40 (1H, m, H-6), 1.29 (3H, d, *J*=7.2 Hz, H-9), 1.06-1.07 (2H, m, H-5, H-7'), 1.03 (1H, m, H-5'), 0.97 (3H, d, *J*=8 Hz, H-10), 0.91 (3H, d, *J*=6.1 Hz, H-11), 0.87 (3H, t, *J*=7.4 Hz, H-8).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 180.5, 78.3, 42.1, 37.7, 33.4, 31.5, 27.7, 20.4, 16.9, 14.8, 11.0.

Acido 2-ammino-3-idrossi-4,5-dimetilesanoico (AHDMHA)

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 3.70 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H-2), 3.65 (1H, dd, $J=10.0$, 2.6 Hz, H-3), 2.22 (1H, m, H5), 1.84 (1H, m, H-4), 0.94 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-6), 0.85 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-8), 0.80 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-7).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 171.5, 74.0, 59.0, 41.2, 27.2, 21.4, 14.9, 9.5.

Acido 4-ammino-2,3-diidrossieptandioico (ADHA)

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 4.29 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-2), 3.93 (1H, dd, $J=5.2$, 2.0 Hz, H-3), 3.37 (1H, m, H-4), 2.35 (1H, m, H-6), 2.42 (1H, m, H-6'), 1.91 (2H, m, H-5).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 179.4, 171.5, 74.3, 70.5, 53.2, 33.5, 27.3.

11.4. Determinazione della configurazione assoluta

11.4.1. Idrolisi del peptide

L'Homophymina A (1 mg) e la Callipeltina A (1 mg) sono state sottoposte ad idrolisi acida con HCl 6N (0.5 ml) vaporizzato sotto vuoto spinto e portate ad una temperatura di 120 °C per 16 ore. L'idrolizzato ottenuto è stato liofilizzato e successivamente sottoposto a derivatizzazione.

11.4.2. Derivatizzazione con il reattivo di Marfey

Un'aliquota dei due peptidi idrolizzati e degli aminoacidi usati come standard (800 μg) è stata sciolta in 80 μl di una soluzione di trietilammina (TEA) : acetonitrile (CH_3CN) in rapporto 2:3 e trattata con 75 μl di 1% N-(3-fluoro-4,6-dinitrofenil)-L-alanilamide (L-FDAA) in acetonitrile : acetone in rapporto 1:2. Le vials sono riscaldate a 70 °C per 1 ora ed il contenuto è stato neutralizzato con HCl 0.2N (50 μl) e poi portato a temperatura ambiente. La soluzione è stata quindi concentrata e diluita con MeCN-5% HCOOH in H_2O (1:1). La miscela di aminoacidi derivatizzati con il reattivo di Marfey è stata analizzata per HPLC su colonna

analitica Vydac C18 (25x1.8mm i.d.) usando un gradiente lineare dal 10% al 50% di acetonitrile acquoso con 5% di acido formico 0.05% di acido trofluoroacetico, per 45 min con un flusso di 1 ml al minuto. Il sistema RP-HPLC è collegato ad una sorgente di massa elettrospray attraverso l'inserimento di uno splitter e il flusso all'interno dello spettrometro di massa è regolato a 100 μ l al min. Gli spettri di massa sono acquisiti in modalità di ioni positivi, (intervallo m/z di 320-900) e i dati sono analizzati usando il programma Xcalibur (Thermo Quest; San Josè, California); tutte le masse sono riportate come valori medi. La temperatura del capillare è 280 °C, il voltaggio capillare 37V e il voltaggio dello ione a 5V.

I tempi di ritenzione dell'L-FDAA-amminoacidi di riferimento sono (min): L-ThrOMe (19.6), D-ThrOMe (24.8), L-*allo*ThrOMe (18.3), D-*allo*ThrOMe (23.1), L-Leu (31.3), D-Leu (36.5), L-Pip (27.8), D-Pip (26.3), L-Orn (11.1), D-Orn (8.6), (2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-diMeGlu (20.5).

L'idrolizzato dell'Homophymina A contiene: L-Pip (28.3), D-Orn (8.9), L-Leu (31.5), L-ThrOMe (19.6), (2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-diMe-Glu (20.6).

Per determinare la configurazione assoluta dell' α -stereocentro del residuo di AHDMHA, due aliquote separate dell'idrolizzato dell'Homophymina A sono state derivatizzate con l'L- e D-FDAA e sottoposte ad analisi LC/MS.

Si sono così osservati rispettivamente un picco a $t_R=33.5$ min e uno a $t_R=28.1$ min.

11.4.3. Derivatizzazione con GITC e analisi LC/MS

Un'aliquota dei due peptidi idrolizzati e degli aminoacidi usati come standard (100 μ g) è stata sciolta in 30 μ l di trietilammina (TEA) e trattata con 150 μ l di 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil isotiocianato (GITC) in aceto nitrile. Le reazioni sono lasciate sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti.

La soluzione è stata quindi diluita con MeCN-5% CH₃COOH in H₂O (1:1). La miscela di aminoacidi derivatizzati con il GITC è stata analizzata per HPLC su colonna analitica Vydac C18 (25x1.8mm i.d.) usando un gradiente lineare dal 10% al 50% di acetonitrile acquoso con 5% di acido formico 0.05% di acido trofluoroacetico, per 45 min con un flusso di 1 ml al minuto. Il sistema RP-HPLC è collegato ad una sorgente di massa elettrospray attraverso l'inserimento di uno splitter e il flusso all'interno dello spettrometro di massa è regolato a 100 μ l al min. Gli spettri di massa sono acquisiti in modalità di ioni positivi, (intervallo m/z di 320-

900) e i dati sono analizzati usando il programma Xcalibur (Thermo Quest; San José, California); tutte le masse sono riportate come valori medi. La temperatura del capillare è 280 °C, il voltaggio capillare 37V e il voltaggio dello ione a 5V.

I tempi di ritenzione dei GITC-amminoacidi di riferimento sono (min): L-NMeGlu (25.3), L-Asp (16.9), D-Asp (17.9), L-Glu (15.6), D-Glu (14.5).

L'idrolizzato dell'Homophymina A contiene: L-NMeGlu (25.5) e D-Asp (17.9).

11.4.4. Scissione ossidativa dell'ADHA

A 1 mg di ADHA, sciolti in una miscela di etanolo/acqua in rapporto 1:2, si aggiunge NaIO₄ 1% w/w. La reazione è lasciata sotto vigorosa agitazione per circa 18 ore a temperatura ambiente fino a completa scomparsa del prodotto di partenza.

La soluzione viene concentrata al rotavapor, sciolta con AcOH/H₂O al 50% (700µl) e riscaldata per 2 ore a 120 °C in presenza di H₂O₂ al 30% (200µl) e HCl concentrato (100µl).

Il residuo, derivatizzato con L-FDAA, ha mostrato un picco a $t_R=15.4$ min corrispondente all'acido L-Glu.

11.4.5. Derivatizzazione dell'HTMOA con il reattivo di Mosher

Due aliquote di 0.5 mg di HTMOA, sciolte in CH₂Cl₂ dry, sono state esterificate con i cloruri degli acidi (+)-(R)- e (-)-(S)- α -metossi- α -(trifluorometil)-fenilacetico in presenza di 5 µl di TEA e di quantità catalitiche di 4-dimetilamminopiridina. La reazione è lasciata sotto vigorosa agitazione a temperatura ambiente per circa 12 ore fino a completa scomparsa del prodotto di partenza.

Work-up: la soluzione viene concentrata al rotavapor.

Il residuo è stato frazionato mediante HPLC a fase inversa utilizzando un gradiente lineare da 100% acqua a 100% acetonitrile.

(+)-(R)-MTPA-HTMOA

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.68 (1H, dd, H-3), 3.14 (1H, q, H-2), 1.70 (1H, ovl, H-4), 1.36 (3H, d, J=6.8 Hz, H-9), 0.92 (3H, d, J=7.5 Hz, H-10), 0.89 (3H, d, J=6.8 Hz, H-11), 0.87 (3H, t, J=7.1 Hz, H-8).

(-)-(S)-MTPA-HTMOA

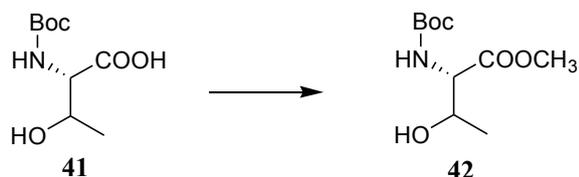
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 3.68 (1H, dd, H-3), 3.12 (1H, q, H-2), 1.77 (1H, ovl, H-4), 1.32 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-9), 0.92 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-10), 0.91 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-11), 0.87 (3H, t, $J=7.1$ Hz, H-8).

11.5. Metanolisi basica dell'Homophymina A

A 2 mg di Homophymina A si aggiunge una soluzione di 2.1 mg di MeONa sciolto in 200 μl di MeOH dry a temperatura ambiente. La miscela di reazione si tiene sotto decisa agitazione per 24h. Successivamente si neutralizza con HCl 0.1N a 0 °C e si estrae con *n*-BuOH per volte. L'estratto butanologico è concentrato sotto vuoto al rotavapor. La fase butanologica contiene circa 0.8 mg di peptide lineare, che è di seguito sottoposto direttamente ad analisi di massa tandem.

11.6. Procedure sintetiche e dati spettroscopici per l'L-ThrOMe e l'L-*allo*-ThrOMe

Sintesi della *N*-Boc-treonina metilestere (**42**)



- **41** (4.56 mmoli, P.M. 219.23)
- Diazometano
- CH₂Cl₂ dry
- T=25 °C

A 1.0 g del composto **41**, sciolti in CH₂Cl₂ dry, è aggiunto il diazometano fino a persistenza della colorazione giallina. La reazione viene lasciata sotto vigorosa agitazione fino a completa scomparsa del prodotto di partenza.

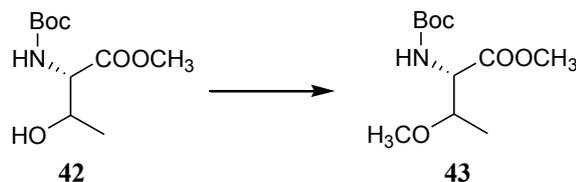
Work-up: la soluzione viene portata a secco al rotavapor.

Si ottengono 1.1 g del composto **42** con una resa del 100%.

La reazione viene monitorata mediante TLC utilizzando come miscela eluente 9:1 di cloroformio/metanolo.

¹H NMR **42**: (400 MHz, CDCl₃) δ 1.18 (3H, d, J=6.1Hz), 1.39 (9H, s), 3.70 (3H, s), 4.10 (1H, d, J=8.10 Hz) 4.21 (1H, m), 5.46 (1H, d, J = 8.10 Hz).

¹³C NMR **42**: (100 MHz, CDCl₃) δ 20.2, 28.7, 52.7, 59.1, 68.3, 80.4, 156.6, 172.2.

Sintesi della *N*-Boc-OMe-treonina metilestere (**43**)

- **42** (4.71 mmoli, P.M. 233.33)
- 2,6-ditertbutilpiridina (30 eq, P.M. 191.32, d=0.852 g/ml)
- metiltrifluorometansolfonato (30 eq, P.M. 164.1, d=1.496 g/ml)
- CH₂Cl₂ dry
- T=0 °C

A 1.1 g del composto **42**, sciolti in CH₂Cl₂ dry, è aggiunta la 2,6-ditertbutilpiridina a 0 °C. Dopo circa 10 minuti si aggiunge il metiltrifluorometansolfonato e si lascia tornare a temperatura ambiente. La reazione viene lasciata sotto vigorosa agitazione overnight fino a completa scomparsa del prodotto di partenza.

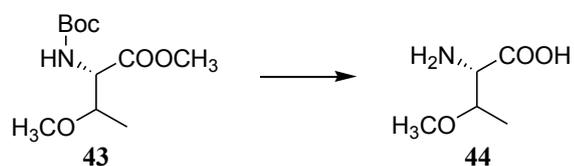
Work-up: la miscela di reazione è diluita con una soluzione satura di NaHCO₃ ed estratta per tre volte con CH₂Cl₂. Le fasi organiche riunite sono lavate con acqua fredda, poi anidificate con MgSO₄, filtrate su bukner e concentrate al rotavapor.

Il prodotto grezzo ottenuto è purificato su colonna di silice (SiO₂) in rapporto 1:20 eluendo con esano al 100%. Si ottengono 1.7 g del composto **43** con una resa del 100%.

La reazione viene monitorata mediante TLC utilizzando come miscela eluente 8:2 di esano/acetato di etile.

¹H NMR **43**: (400 MHz, CDCl₃) δ 1.18 (3H, d, J=6.1Hz), 1.39 (9H, s), 3.22 (3H, s), 3.70 (3H, s), 4.10 (1H, d, J=8.10 Hz) 4.21 (1H, m).

Sintesi della treonina-OMe (44)



- **43** (0.202 mmoli, P.M. 247.29)
- HCl 6N gassoso
- T=120 °C

50 mg del composto **43** sono sottoposti ad idrolisi mediante una soluzione di HCl 6 N degassata in un apposito tubo di vetro a 120 °C in stufa per una notte.

Work-up: la soluzione è portata a secco.

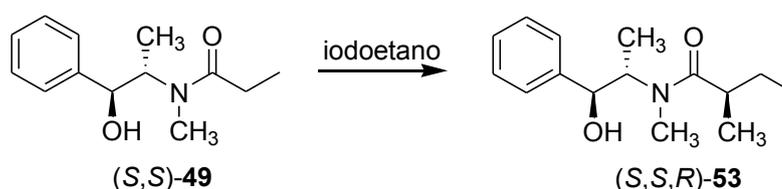
La resa della reazione è quantitativa.

^1H NMR **44**: (400 MHz, CD_3OD) δ 1.34 (3H, d, $J=6.9$ Hz), 3.38 (3H, s), 3.80 (1H, d), 4.25 (1H, m).

^{13}C NMR **44**: (100 MHz, CD_3OD) δ 19.9, 59.3, 65.5, 74.8, 177.5.

11.7. Procedure sintetiche e dati spettroscopici per l'acido (2*R*,3*R*,4*R*,6*R*)-3-idrossi-2,4,6-trimetilottanoico (HTMOA)

Sintesi del composto (*S,S,R*)-53



- **49** (20.3 mmoli, P.M.= 221.30)
- Iodoetano (4.00 eq, P.M. = 155.97, d = 1.950 g/ml)
- LiCl (7.00 eq, P.M. = 42.3937)
- DIPA (2.30 eq, P.M. = 101.19, d = 0.716 g/ml)
- BuLi 2.5 M in esano (2.10 eq)
- THF dry
- T = -78°C – 0 °C

Una soluzione di BuLi (17.0 ml) è aggiunta via cannula ad una sospensione di LiCl (6.02 g) e DIPA (6.60 ml) in THF a -78°C. La risultante sospensione è portata a 0 °C per 10 min e successivamente riportata a -78 °C. Dopo 10 min si aggiunge gtt. a gtt. la (*S,S*)-pseudoefedrina propionammide **49** sciolta in THF. La miscela di reazione è lasciata a -78 °C per 1 h, portata a 0 °C per 20 min e poi a temperatura ambiente per 5 min. Successivamente è riportata a 0 °C per l'aggiunta dello iodioetano (6.50 ml) e lasciata a temperatura ambiente sotto vigorosa agitazione per 18 h fino a completa scomparsa del reagente limitante.

Work-up: la miscela di reazione è trattata con una soluzione satura di NH₄Cl ed estratta per tre volte con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono anidificate con Na₂SO₄, filtrate con buckner e concentrate al rotavapor.

Il prodotto grezzo ottenuto è purificato su colonna di silice (SiO₂) in rapporto 1:20, eluendo con esano/etilacetato 7:3.

Si ottengono 4.45 g del composto **53** con una resa dell'88%.

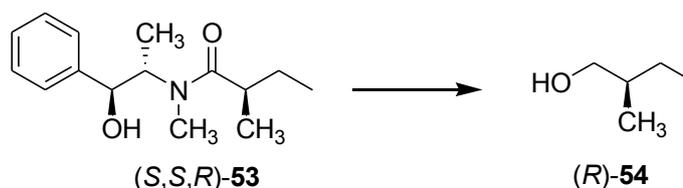
La reazione è monitorata mediante TLC usando come miscela eluente 4:6 di esano/etilacetato.

$[\alpha]_D = +90.2$ ($c=60.0$, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ **53**: (400 MHz, CDCl_3) δ 0.84 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.09 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.14 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.37 (1H, m), 1.62 (1H, m), 2.53 (1H, m), 2.85 (1H, s), 4.09 (1H, m), 4.41 (1H, m), 4.61 (1H, br t), 7.31-7.37 (5H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ **53**: (100 MHz, CDCl_3) δ 11.9, 14.5, 16.9, 26.9, 38.2, 57.8, 76.4, 126.3, 126.8, 127.4, 128.2, 128.6, 142.5, 179.1.

Sintesi del composto (*R*)-54



- **53** (17.3 mmoli, P.M.= 249.1729)
- DIPA (4.20 eq, P.M. = 101.19, $d = 0.716$ g/ml)
- BuLi 2.5 M in esano (3.90 eq)
- BH_3NH_3 (4.00 eq, P.M. = 30.87)
- THF dry
- $T = -78^\circ\text{C} - 0^\circ\text{C}$

Una soluzione di BuLi (27.0 ml) è aggiunta via cannula ad una soluzione di DIPA (10.3 ml) in THF a -78°C . Dopo 20 min la miscela di reazione è portata a 0°C e lasciata a tale temperatura per 15 min. Successivamente è aggiunto il complesso borano-ammoniacale (2.14 g) e la risultante sospensione è lasciata a 0°C per 15 min e poi portata a temperatura ambiente. Dopo la formazione del riducente litio-ammidotriidroborationo (LiH_2NBH_3 , LAB), si riporta a 0°C ed è aggiunta una soluzione in THF del composto **53** (4.30 g). Dopo 2 h sotto vigorosa agitazione, l'eccesso di idruro è quenciato da una lenta aggiunta di una soluzione acquosa di HCl 3N.

Si ottengono 1.20 g del composto **50** con una resa dell'85%.

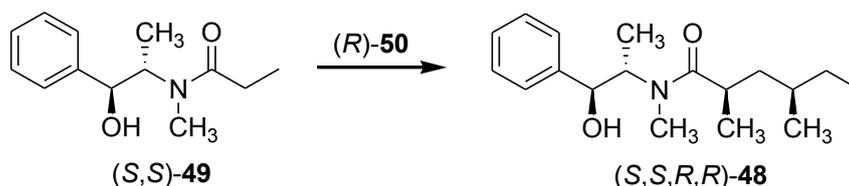
La reazione è monitorata mediante TLC usando come miscela eluente 9:1 di esano/etilacetato.

$[\alpha]_D = -8.6$ ($c=12.3$, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ **50**: (400 MHz, CDCl_3) δ 0.89 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 0.97 (3H, d, $J = 7.4$ Hz), 1.26 (1H, m), 1.39 (2H, m), 3.20 (2H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ **50**: (100 MHz, CDCl_3) δ 11.3, 17.5, 20.1, 29.1, 36.3.

Sintesi del composto (S,S,R,R)-48



- **49** (2.10 eq, P.M.= 221.30)
- (R)-**50** (1.00 g, 5.05 mmoli, P.M. = 198.05)
- LiCl (12.7 eq, P.M. = 42.3937)
- DIPA (4.31 eq, P.M. = 101.19, $d = 0.716$ g/ml)
- BuLi 2.5 M in esano (4.00 eq)
- THF dry
- $T = -78^\circ\text{C} - 0^\circ\text{C}$

Una soluzione di BuLi (8.08 ml) è aggiunta via cannula ad una sospensione di LiCl (2.72 g) e DIPA (3.08 ml) in THF a -78°C . La risultante sospensione è portata a 0°C per 10 min e successivamente riportata a -78°C . Dopo 10 min si aggiunge gtt. a gtt. la (S,S)-pseudoefedrina propionammide **49** (2.35 g) sciolta in THF. La miscela di reazione è lasciata a -78°C per 1 h, portata a 0°C per 20 min e poi a temperatura ambiente per 5 min. Successivamente è riportata a 0°C per l'aggiunta dell'alogenuro (1.00 g) e lasciata a temperatura ambiente sotto vigorosa agitazione per 18 h fino a completa scomparsa del reagente limitante.

Work-up: la miscela di reazione è trattata con una soluzione satura di NH_4Cl ed estratta per tre volte con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono anidrificate con Na_2SO_4 , filtrate con buckner e concentrate al rotavapor. Il prodotto grezzo ottenuto è purificato su colonna di silice (SiO_2) in rapporto 1:20, eluendo con esano/etilacetato 8:2. Si ottengono 1.40 g del composto **48** con una resa del 95%.

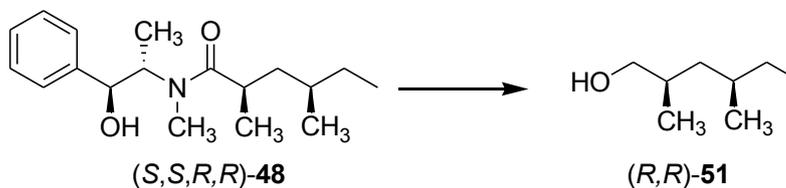
La reazione è monitorata mediante TLC usando come miscela eluente 4:6 di esano/etilacetato.

$[\alpha]_{\text{D}} = +62.5$ ($c=12.0$, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ **48**: (400 MHz, CDCl_3) δ 0.77 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.87 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.08 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 1.22 (2H, ovl), 1.36 (2H, m), 1.70 (1H, m), 2.70 (1H, m), 2.86 (1H, s), 4.11 (1H, m), 4.38 (1H, m), 4.62 (1H, br t), 7.30-7.38 (5H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ **48**: (100 MHz, CDCl_3) δ 11.5, 14.6, 18.1, 19.4, 29.9, 32.2, 34.3, 41.4, 58.3, 75.3, 76.6, 126.6, 127.2, 127.6, 128.5, 128.8, 142.9, 179.3.

Sintesi del composto (*R,R*)-51



- **48** (4.46 mmoli, P.M.= 291.2198)
- DIPA (4.20 eq, P.M. = 101.19, $d = 0.716$ g/ml)
- BuLi 2.5 M in esano (3.90 eq)
- BH_3NH_3 (4.00 eq, P.M. = 30.87)
- THF dry
- $T = -78^\circ\text{C} - 0^\circ\text{C}$

Una soluzione di BuLi (6.96 ml) è aggiunta via cannula ad una soluzione di DIPA (2.65 ml) in THF a -78°C . Dopo 20 min la miscela di reazione è portata a 0°C e

lasciata a tale temperatura per 15 min. Successivamente è aggiunto il complesso borano-ammoniaca (550 mg) e la risultante sospensione è lasciata a 0 °C per 15 min e poi portata a temperatura ambiente. Dopo la formazione del riducente litio-ammido-triidroborano (LiH₂NBH₃, LAB), si riporta a 0 °C ed è aggiunta una soluzione in THF del composto **48** (1.30 g). Dopo 2 h sotto vigorosa agitazione, l'eccesso di idruro è quenciato da una lenta aggiunta di una soluzione acquosa di HCl 3N.

Work-up: la miscela di reazione è estratta per tre volte con etere dietilico; le fasi organiche riunite sono lavate con HCl 3N, NaOH 2N e H₂O fredda e poi anidificate con Na₂SO₄, filtrate con buckner e concentrate al rotavapor.

Il prodotto grezzo ottenuto è purificato su colonna di silice (SiO₂) in rapporto 1:20, eluendo con esano al 100%.

Si ottengono 510 mg del composto **51** con una resa dell'88%.

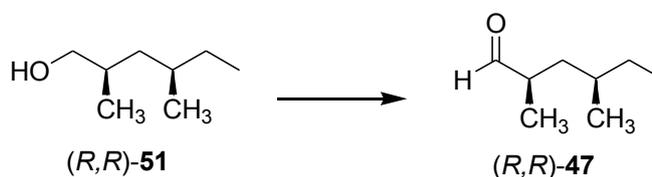
La reazione è monitorata mediante TLC usando come miscela eluente 4:6 di esano/etilacetato.

$[\alpha]_D = +4.0$ (c=8.7, CDCl₃)

¹H-NMR **51**: (400 MHz, CDCl₃) δ 0.86 (3H, d, J = 6.4 Hz), 0.87 (3H, t, J = 7.3 Hz), 0.92 (3H, d, J = 6.7 Hz), 1.05 (1H, m), 1.31-1.54 (4H, ovl), 1.71 (1H, m), 3.37 (1H, dd, J₁ = 6.8 Hz, J₂ = 10.2 Hz), 3.52 (1H, dd, J₁ = 5.1 Hz, J₂ = 10.4 Hz).

¹³C-NMR **51**: (100 MHz, CDCl₃) δ 11.1, 17.3, 19.8, 29.0, 31.5, 33.1, 40.5, 68.6.

Sintesi del composto (R,R)-47



- **51** (3.84 mmoli, P.M.= 130.1358)
- NMO (2.00 eq, P.M. = 117.15)
- TPAP (0.05 eq, P.M. = 351.43)

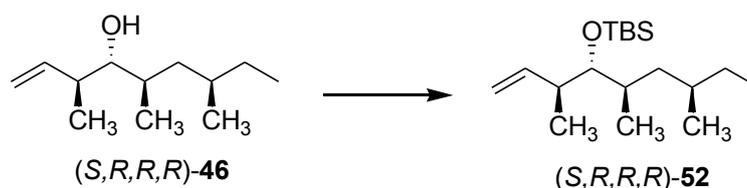
goccia a goccia e si lascia sotto agitazione a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 20 min. Si riporta la temperatura a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ e si aggiunge $(-)\text{-(Ipc)}_2\text{BOMe}$ sciolto in THF dry. Dopo 35 min si aggiunge il $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ e l'aldeide (**47**) sciolta in THF dry. La miscela di reazione è lasciata sotto vigorosa agitazione fino a completa scomparsa del prodotto di partenza. Quencing: Si aggiunge una soluzione di NaOH 3N (7.5ml/mmol) e una di H_2O_2 al 30% (7.5 ml/mmol) a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ e poi si lascia a temperatura ambiente sotto agitazione per una notte.

Work-up: si diluisce con una soluzione satura di NaCl e si estrae con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono anidrificate con Na_2SO_4 , filtrate su bukner e concentrate al rotavapor.

La reazione viene monitorata mediante TLC utilizzando come miscela eluente 98:2 esano/etilacetato.

Il prodotto grezzo ottenuto (3.80 g) viene sottoposto allo step successivo senza purificazione.

Sintesi del composto $(S,R,R,R)\text{-52}$



- **46** (3.80 g, P.M.= 184.1827)
- TBSCl (2.00 eq, P.M.= 150.73)
- Imidazolo (2.40 eq, P.M.= 68.08)
- DMF dry
- T= $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Al composto **46**, sciolto in DMF dry, si aggiungono 3.36 g di imidazolo e 25.7 g di *tert*-butildimetilsililcloruro ad una temperatura di $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. La reazione è lasciata sotto

Ad una soluzione del composto **52** in diossano:H₂O in rapporto 1:1 sono aggiunti NMO e OsO₄. Dopo 1 h si aggiunge NaIO₄ e si lascia sotto vigorosa agitazione per 1.5 h. La miscela di reazione è poi portata a 0 °C, si aggiunge NaClO₂ e acido sulfamico. Dopo 2 h si tratta.

Work-up: si aggiunge una soluzione di HCl al 5% e si estrae con CH₂Cl₂.

La reazione è monitorata mediante TLC usando come eluente 7:3 esano/etilacetato.

Il prodotto grezzo così ottenuto è purificato mediante HPLC, utilizzando una colonna Macherey-Nagel, Nucleosil 5μ, ed una miscela eluente di esano/etilacetato 75:25 con lo 0.1% di acido trifluoroacetico ad un flusso di 1.5 ml/min (t_R= 4.0 min).

Si ottengono 254 mg del composto **45** con una resa del 75%.

[α]_D=+21.2, (c 7.3, CHCl₃)

¹H NMR **45**: (500 MHz, CDCl₃) δ 3.49 (1H, t, *J*=5.8 Hz), 2.74 (1H, quintet, *J*=7.02 Hz), 1.74 (1H, m), 1.44 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.27 (3H, d, *J*=7.2 Hz), 1.06-1.07 (2H, m), 1.03 (1H, m), 0.97 (3H, d, *J*=6.8 Hz), 0.91 (3H, d, *J*=6.2 Hz), 0.88 (3H, t, *J*=7.3 Hz).

¹³C NMR **45**: (125 MHz, CDCl₃) δ 180.5, 78.3, 42.3, 37.5, 33.2, 31.5, 27.7, 20.4, 16.9, 14.8, 11.0.

BIBLIOGRAFIA

1. Perkel. *The Scientist*, **2003**, 17, 6.
2. Mootz et al. *Chembiochem*, **2002**, 3, 490-504.
3. Von Dohren, Kaufer et al. *Chembiochem*, **2006**, 7, 612-622.
4. Carole A. Bewley, D. John Faulkner. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2162-2178.
5. Marwa Donia, Mark T. Hamann. *The Lancet Infectious Diseases*, **2003**, 3, 338-348.
6. Nobuhiro Fusetani, Shigeki Matsunaga. *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1793-1806.
7. S. Matsunaga, N. Fusetani, S. Konosu. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 5165-5168.
8. Zampella, A.; D'Auria M. V.; Gomez-Paloma, L.; Casapullo, A.; Minale, L.; Debitus, C.; Henin, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 6202-6209.
9. Trevisi, L.; Bova, S.; Cargnelli, G.; Danieli. Betto, D.; Floreali, M.; Germinarlo, E.; D'Auria, M.V.; Luciani, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 279, 219-222.
10. Trevisi, L.; Cargnelli, G.; Ceolotto, G.; Papparella, I.; Semplicini, A.; Zampella, A.; D'Auria, M.V.; Luciani, S. *Biochemical Pharmacology.*, **2004**, 68, 1331-1338.
11. Ford, P. W.; Gustafson, K. R.; Mckee, T. C.; Shigematsu, N.; Maurizi, L. K.; Pannell, L. K.; Williams, D. E.; de Silva, E. D.; Lassota, P.; Allen, T. M.; Van Soest, R.; Andersen, R. J.; Boyd, M. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5899-5909.
12. Oku, N.; Gustafson, K.R.; Carter, Wilson, J. A.; Shigematsu, N.; Hess, S.; Pannell, L. K.; Boyd, M. R.; McMahon, J. B. *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 1407-1411.
13. Alberto Plaza, Elena Gustchina, Heather L. Baker, Michelle Kelly, Carole A. Bewley. *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70, 1753-1760.
14. Zabriskie, T. M.; Kloche, J. A.; Ireland, C. M.; Marcus, A. H.; Molinski, T. F.; Faulkner, D. J.; Xu, C.; Clardy, J. C.. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 3123-3124.
15. Crews, P.; Manes, L. V.; Boehler, m.. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 2797-2800.
16. Braekman, J. C.; Daloze, D.; Moussiaux, B.; Riccio, R.. *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50, 994-995.
17. Zampella, A.; Giannini, C.; Debitus, C.; Roussakis, C.; D'Auria, M. V.. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 332-334.

18. Anokha S. Ratnayake, Tim S. Bugni, Xidong Feng, Mary Kay Harper, Jack J. Skalicky, Kaleem A. Mohammed, Cynthia D. Andjelic, Louis R. Barrows, Chris M. Ireland. *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 1582-1586.
19. Bax, A.; "Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquidis", Delf University Press, Dordrecht, **1982**.
20. Braunschweiler L., Ernst R. R.. *J. Magn. Reson.*, **1983**, *53*, 521.
21. Marion D., Wutrich K.. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, *124*, 774.
22. Bax A., Davis D. G.. *J. Magn. Reson.*, **1985**, *66*, 207.
23. Palmer III, A. G.; Cavanagh, J.; Wright P. E.; Rance, M.. *J. Magn. Reson*, **1991**, 151-170.
24. Davis, D. G.; Bax, A.. *J. Magn. Reson*, **1986**, 565.
25. Karplus, M.. *J. Chem. Phys*, **1959**, 11.
26. Wang, A. C.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 2483.
27. Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K.. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 866.
28. Griesenger, C.; Sorensen, O. W.; Ernst, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6394.
29. Mueller, L. *J. Magn. Reson.*, **1987**, *72*, 191.
30. Biamonti, C.; Rios, C. B.; Lyons, B. A.; Montelione, G. T.. *Adv. Biophys. Chem.*, **1994**, *4*, 51.
31. Kurz, M.; Schmieder, P.; Kessler, H.. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, *30*, 1329.
32. Wollborn, U.; Leibfritz, D.. *J. Magn. Reson.*, **1992**, *98*, 142.
33. Zhu, G.; Live, D.; Bax, A.. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 8370.
34. Zhu, G.; Bax, A.. *J. Magn. Reson.*, **1993**, *Ser. A 104*, 353.
35. Boyd, J.; Soffe, N.; John, B.; Plant, D.; Hurd, R.. *J. Magn. Res.*, **1992**, *98*, 660.
36. Davis, A. L.; Keeler, J.; Lane, E. D.; Moskau, D.. *J. Magn. Reson.*, **1992**, *98*, 207.
37. Bifulco, G.; Bassarello, C.; Riccio, R.; L. Gomez-Paloma. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 1025-1028.
38. Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. V. R.; Pople, J. A.. *Ab initio Molecular Orbital Theory*; Wiley: New York, **1986**.
39. Nàray-Szabò, G.; Surján, P. R.; Àngyàn, S. G.. In *Applied Quantum Chemistry*; Reidel: Boston, **1897**.

40. Peter, A.; Olajos, E.; Casimir, R.; Tourwè, D.; Broxterman, Q. B.; Kaptein, B.; Armstrong, D. W. J. *Chromatogr.*, **2000**, *871*, 105-113.
41. Hansen, P. E. *Prog. NMR Spectrosc.*, **1981**, *14*, 175-295.
42. Munzarova, M. L.; Sklenar, V.. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 3649-3658.
43. Morvai, M.; Nagy, T.; Koesis, A.; Szabo, L. F.; Pondanyi, B.. *Magn. Reson. Chem.*, **2000**, *38*, 343-359.
44. Hohemberg, P.; Kohn, W.. *Phys. Rev.*, **1964**, *136*, B864-B861.
45. Kohn, W.; Sham, L.J.. *Phys. Rev.*, **1965**, *140*, A1133-A1138.
46. Barone, G.; Gomez-Paloma, L.; Duca, D.; Silvestri, A.; Riccio, R.; Bifulco, G. *Chem. Eur. J.*, **2002**, *64*, 3233-3239.
47. Barone, G.; Duca, D.; Silvestri, A.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R.; Bifulco, G. *Chem. Eur. J.*, **2002**, *64*, 3240-3245.
48. Bassarello, C.; Cimmino, P.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, L.; Bifulco, G. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 9555-9562.
49. Frisch, M. J.; Trucks, J. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E et al.. *Gaussian 03*, Revision B.01, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **2003**.
50. Bagno, A.; Rastrelli, F.; Sacelli, G.. *J. Phys. Chem. A*, **2003**, *107*, 9964-9973.
51. Marfey, P.. *Carlsberg Res. Commun.*, **1984**, *49*, 591-596.
52. Fujii, K.; Harada, K. et al.. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 3346-3352.
53. Mooberry, S. L.; Tien, G.; et al. *Cancer Res.*, **1998**, *58*, 653-660.
54. Dale, J., A.; Mosher, H., S.. *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 3732. Dale, J., A.; Dull, D., L., Mosher, H., S.. *J. Org. Chem.*, **1969**, 2543.
55. Ohtani, I.; Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H.. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 4092.
56. Angela Zampella, Valentina Sepe, Paolo Luciano, Filomena Bellotta, Maria Chiara Monti, Maria Valeria D'Auria, Trine Jepsen, Sylvain Petek, Marie-Thérèse Adeline, Olivier Laprèvote, Anne-Marie Aubertin,| Cécile Debitus, Christiane Poupat, and Alain Ahond. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 5319-5327.
57. Angela Zampella, Maria Valeria D'Auria. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 1237-1239.
58. Cristina M. Acevedo, Eugene F. Kogut, Mark A. Lipton. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 6353-6359.

59. Naoki Okamoto, Osamu Hara, Kazuishi Makino, Yasumasa Hamada. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 1353-1358.
60. Bo Liang, Patrick J. Carroll, Madeleine M. Joullié. *Organic Letters*, **2000**, *2*, 26, 4157-4160.
61. Jason C. Thoen, Angel Morales-Ramos, Mark A. Lipton. *Organic Letters*, **2002**, *4*, 25, 4455-4458.
62. David C. Cranfill, Angel Morales-Ramos, Mark A. Lipton. *Organic Letters*, **2005**, *7*, 26, 5881-5883.
63. Carlo Bassarello, Angela Zampella, Maria Chiara Monti, Luigi Gomez Paloma, Maria Valeria D'Auria, Raffaele Riccio, Giuseppe Bifulco. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 604-609.
64. Angela Zampella, Rosa D'Orsi, Valentina Sepe, Agostino Casapullo, Maria Chiara Monti, Maria Valeria D'Auria. *Organic Letters*, **2005**, *7*, 16, 3585-3588.
65. Easton, C. J.; Hutton, C. A.; Roselt, P. D.; Tiekink, E. R. T. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7327-7340.
66. Hutton, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5899-5902.
67. Faulkner, J. D.; Harper, M. K.; Reddy, R. V. M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10649-10656.
68. Maria Valeria D'Auria, Angela Zampella, Luigi Gomez Paloma, Luigi Minale. *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 9589-9596.
69. Zampella A.; Randazzo A.; Borbone N.; Luciani S.; Debitus C.; D'Auria M.V. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 6163-6166.
70. Valentina Sepe, Rosa D'Orsi, Nicola Borbone, Maria Valeria D'Auria, Anna Catania, Angela Zampella. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 131-140.
71. Maria Valeria D'Auria, Valentina Sepe, Rosa D'Orsi, Filomena Bellotta, Cecile Debitus, Angela Zampella. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 131-140.
72. Panek, S.J.; Hongbing, H. *Organic Letters*, **2004**, *23*, 4383-4385.
73. Mauger, A.B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1032-1035.
74. Tsunoo A.; Kamijo M. *J Pharm Exp Ther.* 1999, 290, 1006-12.
75. Khanansvili D. et al, *Mol. Pharmacol.* 1997, 51, 126-31.
76. Kupchan S. M., Britton R. W., Ziegler M. F., Sigel C. W., *J. Org. Chem.* 1973, *38*, 178.

77. Naoya Oku, Kirk R. Gustafson, Laura K. Cartner, Jennifer A. Wilson, Nobuharu Shigematsu, Sonja Hess, Lewis K. Pannell, Michael R. Boyd, James B. McMahon; *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 1407-1411.
78. Brown, H.C.; Bhat, K.S.; Randad, R.S. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 54, 1570-1576.
79. Evans D. A.. *Asymmetric Synthesis*, Vol. 3, 1-110, Academic Press, New York.
80. Evans D. A., Gage D. A. *Organic Synthesis*, 68, 77.
81. Evans D. A., Ennis M. D. Mathre D. J.. *J. Amer. Chem. Soc.*, 104, 1737.
82. Andrew G. Myers, Bryant H. Yang, Hou Chen, Lydia McKinstry, David J. Kopecky, James L. Gleason. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 6496-6511.
83. Askin D., Volante R. P., Ryan K. M., Reamer R. A. Shinkai I. *Tetrahedron Lett.*, 1988, 29, 4245.
84. Myers A. G., Yang B. H., Kopecky D. J.. *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37, 3623.
85. Ley S. V., Norman J., Griffith W. D., Marsden S. D.. *Synthesis*, 1994, 6, 639-666.
86. Corey E. J., Cho H., Rucker C., Hua D. H.. *Tetrahedron Lett.*, 1981, 22, 3455-3458.