UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

"AMEDEO AVOGADRO"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

Sviluppo e identificazione di un potente PROTAC per degradare la Nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT)

Relatore

Prof.ssa Ubaldina Galli

Candidato

Mikela Tabaku

Anno Accademico 2025-2026

Sessione autunnale

Indice

1. Introduzione *7*

1.1 La degradazione proteica mirata 9

1.1.1 *Le small molecule*: utilizzo e limiti 9

1.1.2 Il sistema Ubiquitina-Proteasoma 11

1.2 La tecnologia PROTAC 13

1.3 Progettazione di un PROTAC 16

1.3.1 Individuazione di POI e *warhead* 17

1.3.2 Individuazione di E3 ligasi e *anchor* 17

1.3.3 Ottimizzazione del *linker* 19

1.4 Funzione fisiologica e biosintesi di NAD^+ 21

1.5 NAMPT come target farmacologico 24

1.6 Modulazione farmacologica di NAMPT 27

2. Scopo del lavoro *33*

3. Risultati e discussione *37*

3.1 Sintesi e risultati biologici di PROTAC NAMPT-VHL con triazolo nel *linker* .. 39

3.1.1 Sintesi del *warhead* 40

3.1.2 Sintesi dei *linker* 42

3.1.3 Sintesi del ligando per la VHL E3 ligasi 43

3.1.4 Assemblaggio dei PROTAC 45

3.1.5 Risultati biologici 49

3.2 Sintesi e risultati biologici di PROTAC NAMPT-VHL e PROTAC NAMPT-CRBN con *linker* alcanici senza triazolo 50

3.2.1 Preparazione dei *linker* alcanici 51

3.2.2 Assemblaggio dei PROTAC NAMPT-VHL 52

3.2.3 Risultati biologici 61

4. Conclusione e sviluppi futuri *67*

5. Materiali e metodi *71*

5.1 Preparazione del *warhead* (ligando NAMPT) 74

5.2 Preparazione dei *linker* tosilati 82

5.3 Preparazione del ligando per la VHL E3 ligasi 85

5.4 Preparazione dell'azide 91

5.5 Preparazione dei PROTAC NAMPT-VHL con triazolo nel linker 94

5.6 Preparazione dei *linker* alcanici 105

5.7 Preparazione dei PROTAC NAMPT-VHL 109

5.8 Preparazione dei PROTAC NAMPT-CRBN 132

5.9 Sintesi del PROTAC U42 e del controllo negativo U42-NC con ligando (S)-metil VHL 140

6. Bibliografia *143*

Lista delle abbreviazioni

AcOK: Acetato di potassio

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina monofosfato

ART: ADP-ribosio transferasi

ATP: Adenosina trifosfato

ATTEC: *Autophagosome-tetherating compound*

AUTAC: Autophagy targeting chimera

CCR5: Recettore per le chemochine C-C di tipo 5

CD38: Cluster di differenziazione 38

CDK: Chinasi ciclina-dipendente

cIAP1: Proteina inibitrice dell'apoptosi cellulare 1

CRBN: Cereblon

DBU: 1,8-diazabiciclo [5,4,0] undec-7-ene

DC50: Concentrazione efficace per la degradazione del 50% della proteina bersaglio

DCM: Diclorometano

DIPEA: N,N-Diisopropiletilammina

DMA: N,N-Dimetilacetammide

DMAP: 4-Dimetilamminopiridina

DME: 1,2-Dimetossietano

DMF: N,N-Dimetilformammide

DNA: Acido desossiribonucleico

DPPA: Difenilfosforil azide

EC50: Concentrazione efficace al 50%

EDCI: 1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide

eNAMPT: Nicotinammide fosforibosiltransferasi extracellulare

ER: Recettore degli estrogeni

ESR1: Gene che codifica per il recettore alfa degli estrogeni

EtOAc: Acetato di etile

HATU: 1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-ossido esafluorofosfato

HER: Recettore per il fattore di crescita epiteliale umano

IC50: Concentrazione di inibizione del 50%

IMiDs: *ImmunoModulatory Imide Drugs*

iNAMPT: Nicotinammide fosforibosiltransferasi intracellulare

LYTAC: *Lysosome-Targeting Chimera*

MCF7: *Michigan Cancer Foundation-7*

MDM2: *Murine double minute 2*

MDSC: Cellule soppressorie di derivazione mieloide

MeOH: Metanolo

MGD: *Molecular glue degrader*

mRNA: RNA messaggero

MTT: Bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NA: Acido nicotinico

NAAD$^+$: Acido nicotinico adenina dinucleotide

NAD^+: Nicotinammide adenin dinucleotide (forma ossidata)
NADH: Nicotinammide adenin dinucleotide (forma ridotta)
$NADP^+$: Nicotinammide adenin dinucleotide fosfato (forma ossidata)
NADPH: Nicotinammide adenin dinucleotide fosfato (forma ridotta)
NADS: NAD^+ sintetasi
NAMN: Acido nicotinico mononucleoide
NAMNAT: Acido nicotinico mononucleotide adeniltransferasi
NAMPT: Nicotinammide fosforibosiltransferasi
NF-kB: Fattore nucleare kappa, potenziatore della catena leggera delle cellule B attivate
NM: Nicotinammide
NMN: Nicotinammide mononucleotide
NMNAT: Nicotinammide mononucleotide adeniltransferasi
NR: Nicotinammide riboside
NRK: Nicotinammide riboside chinasi
PARP: Poli ADP-ribosio polimerasi
PBEF: Fattore stimolante le colonie di cellule pre-B
PE: Etere di petrolio
PEG: Polietilenglicole
Phe: Fenilalanina
PK: Farmacocinetica
PM: Peso molecolare
POI: Proteina di interesse
PPI: Interazione proteina-proteina
PROTAC: *Proteolysis targeting chimera*
PRPP: Fosforibosil pirofosfato
QA: Acido nicotinico
QAPRT: Acido chinolinico fosforibosiltransferasi
RNA: Acido ribonucleico
ROS: Specie reattive dell'ossigeno
RPN: Subunità regolatoria non ATPasica del proteasoma
SAR: Relazione struttura-attività
Ser: Serina
SERD: Degradatore selettivo del recettore degli estrogeni
SIRT: Sirtuina
TEA: Trietilammina
TFA: Acido trifluoroacetico
THF: Tetraidrofurano
TLC: Cromatografia su strato sottile
TLR-4: Recettore toll-like 4
TPD: Degradazione proteica mirata
Trp: Triptofano
TsCl: Tosilcloruro
Tyr: Tirosina
UPS: Sistema Ubiquitina-Proteasoma
VEGF: Fattore di crescita dell'endotelio vascolare
VHL: Von Hippel-Lindau

1. *Introduzione*

1.1 La degradazione proteica mirata

1.1.1 *Le small molecule*: utilizzo e limiti

A oggi, molti dei farmaci che vengono sviluppati hanno come scopo quello di inibire in modo diretto una proteina target.[1]

Gli inibitori di interesse sono *small molecule*, molecole ad alta affinità per il sito attivo del target che adottano un approccio *occupancy-driven*: una singola molecola di farmaco si lega a una singola proteina di interesse (POI) e l'attività farmacologica termina non appena la molecola si stacca dalla proteina e viene eliminata dall'organismo. Tuttavia, questo meccanismo presenta dei limiti: essendo farmaci che agiscono in modo dose-dipendente, un'elevata concentrazione di inibitori *small molecule* può portare ad accumulo con effetti indesiderati o effetti off-target. Inoltre, non tutte le proteine presentano un sito enzimatico, come i fattori trascrizionali, le proteine scaffold e le proteine regolatorie, che vengono chiamate proteine *undruggable*.[2]

Per questo motivo sono state studiate altre strategie come:

- l'utilizzo di *small molecule* che agiscono su *chaperon* molecolari o che inducono stress per rimodulare l'omeostasi proteica, riducendo l'aggregazione e la tossicità di proteine associate a malattie;
- l'induzione di autofagia;
- la riduzione selettiva dei livelli di proteine patogene
    - tramite silenziamento genico, una terapia genica che utilizza reagenti a base di acidi nucleici che agiscono su RNA e DNA o reagenti per l'*editing* del genoma
    - tramite induzione della degradazione proteica indotta da small molecule.[1]

La degradazione proteica mirata (TPD) è diventata un grande oggetto di interesse grazie al suo potenziale effetto terapeutico e al suo meccanismo d'azione; l'aggiunta di un tag alla POI ne permette il riconoscimento da parte dei sistemi naturali di degradazione impiegati dalla cellula e la conseguente eliminazione.[1]

Nella TPD la strategia farmacologica impiegata dai *degrader* è *event-driven*: in questo caso non c'è bisogno di avere un'elevata quantità di farmaco per avviare l'azione farmacologica, perché anche se la molecola presenta bassa affinità per il ligando, essa è in grado di innescare un processo biologico che porta alla distruzione della proteina

bersaglio, quindi possono essere utilizzati in un rapporto substechiometrico. Si ha un'azione catalitica: il legame è temporaneo, perché una volta scatenato l'evento il farmaco si stacca ed è libero di ripetere il processo con un'altra POI. L'effetto terapeutico è più duraturo.[3,4]

Nelle cellule eucariote gli organelli e le proteine danneggiate vanno incontro a degradazione per via proteasoma-dipendente o lisosoma-dipendente. Queste due vie sono state studiate anche come eventuale approccio terapeutico per la degradazione di proteine patogene grazie al loro contributo nella proteostasi cellulare.[5]

- Il proteasoma fa parte del sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS), un complesso responsabile dell'eliminazione di proteine a breve durata e proteine solubili mal ripiegate. Una delle classi studiate che utilizza questa via è quella delle *proteolysis-targeting chimeras* (PROTAC), molecole eterobifunzionali capaci di legarsi in modo simultaneo a una POI e a una E3 ubiquitina ligasi causando l'ubiquitinazione del target e la sua successiva degradazione.[6]

  Oltre al PROTAC, un'altra tecnologia che adotta questo meccanismo è quella che utilizza le *molecular glue degrader* (MGD), molecole monovalenti che facilitano la dimerizzazione di due proteine (POI e un'ubiquitina ligasi) con la formazione di un complesso ternario.[2]
- Il lisosoma, al contrario, degrada proteine a lunga durata, aggregati di proteine insolubili, composti macromolecolari e parassiti intracellulari tramite endocitosi, fagocitosi e autofagia.

  Nella degradazione per via lisosomiale si possono utilizzare tre vie differenti:
  - endocitosi per eliminare materiale extracellulare e proteine di membrana,
  - fagocitosi per grosse particelle come virus e batteri,
  - autofagia per distruggere aggregati di proteine, proteine mal ripiegate, organuli danneggiati e patogeni intracellulari.[5]

Sono state sviluppate diverse strategie incoraggianti, tra cui: LYTAC, AUTAC e ATTEC. LYTAC (*lisosome-targeting chimera*) sfrutta la via endosoma-lisosoma e forma un complesso ternario con il dominio extracellulare di una proteina extracellulare e il recettore selettivo per il lisosoma presente sulla superficie cellulare. Questo porta a internalizzazione della proteina per endocitosi con conseguente degradazione di POI.

AUTAC (*autophagy-targeting chimera*) si basa sul meccanismo di poliubiquitinazione e la POI viene degradata per autofagia.

Infine, ATTEC (*autophagosome-tethering compound*) agisce indipendentemente dall'ubiquitinazione: la POI si lega direttamente all'autofagosoma permettendo la degradazione proteica.[1,5]

Tra queste nuove tecnologie si è visto che i degradatori che sfruttano l'autofagia sono in grado di eliminare aggregati proteici ed oligomeri che si formano in malattie neurodegenerative, come la Corea di Huntington, l'Alzheimer e il morbo di Parkinson.[7]

1.1.2 Il sistema Ubiquitina-Proteasoma

Per questo progetto di tesi si è deciso di approfondire la degradazione proteica che utilizza il sistema Ubiquitina-Proteasoma.

Nelle cellule eucariote il complesso Ubiquitina-Proteasoma agisce a partire dall'ubiquitinazione, ovvero il processo che aggancia molecole di ubiquitina, un oligopeptide composto da 76 amminoacidi, al substrato proteico, grazie all'attivazione della cascata enzimatica costituita da tre enzimi:

- Enzima ubiquitina-attivante (E1)
- Enzima ubiquitina-coniugante (E2)
- Ubiquitina protein-chinasi (E3).

Questo permette l'indirizzamento del substrato al proteasoma, dove avverrà la sua degradazione.

L'enzima E1 attiva l'ubiquitina tramite un meccanismo ATP-dipendente necessario per formare un intermedio ubiquitina-adenilato a livello di un residuo di glicina al C-terminale dell'ubiquitina in grado di legarsi a un residuo di cisteina di E1 tramite un legame tioestere.

Successivamente l'enzima coniugante E2 catalizza una reazione di transesterificazione per legare un suo residuo di cisteina all'ubiquitina attivata e formare il complesso E2-Ubiquitina.

Grazie alla capacità di E3 di conferire selettività di legame dell'ubiquitina ciascuna famiglia di E2 è in grado di interagire con un numero limitato di E3, formando così il

complesso E2-E3. Si ha, quindi, idrolisi del tioestere e la formazione di un legame ammidico tra l'ubiquitina e i residui di lisina del substrato a cui E3 è legato **(Figura 1)**.

Inoltre, la presenza di residui di lisina e di amminoacidi liberi a livello dell'ubiquitina permette al polipeptide stesso di legarsi ad altre ubiquitine dando via a un processo di poliubiquitinazione.[8]

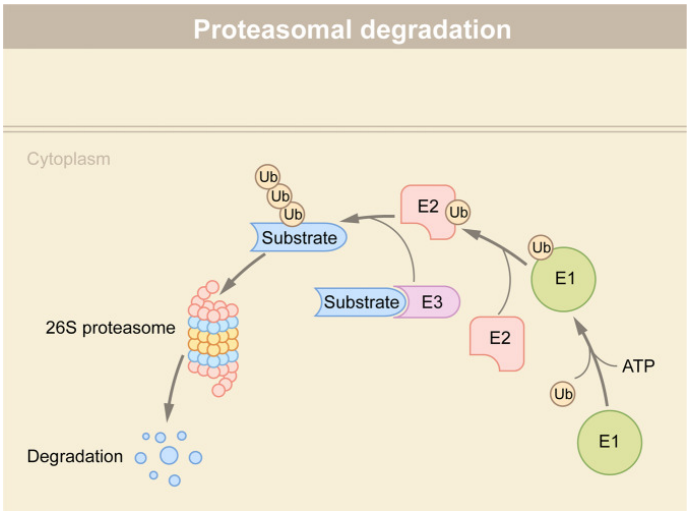


***Figura 1**. La degradazione tramite sistema ubiquitina-proteasoma.*[5]

Lo step successivo richiede il proteasoma 26s, un complesso multimolecolare formato da due particelle, 20s e 19s, che degrada le proteine in frammenti peptidici. La particella 20s costituisce il nucleo cavo ad attività proteolitica del complesso, mentre la particella 19s regola l'ingresso delle subunità proteiche; infatti la proteina poliubiquitinata si aggancia a 19s interagendo con:

- recettore dell'ubiquitina formato da Rpn10 e Rpn13
- subunità Rpn11.

Questo meccanismo è limitante dell'intero processo perché avviene solo quando le proteine target presentano catene di almeno 4 ubiquitine, altrimenti la doppia interazione non avviene.

Rpn11 taglia la catena poliubiquitinata del substrato proteico e rimette in circolo le molecole di ubiquitina che andranno ad essere riutilizzate; in più, causa un riarrangiamento strutturale che favorisce l'ingresso della POI nel nucleo catalitico del proteasoma.[9]

1.2 La tecnologia PROTAC

Un PROTAC è costituito da 3 componenti essenziali: il *warhead,* ovvero il ligando che andrà a legare la POI, l'*anchor* che recluta il complesso E3 ligasi e il *linker,* la porzione che unisce i due ligandi.

Il PROTAC può indurre la degradazione proteica solo dopo aver raggiunto lo spazio intracellulare, dove si trova UPS. Anche se la molecola ha un elevato peso molecolare e non rispetta la regola del 5 di Lipinski essa è in grado di attraversare la membrana citoplasmatica grazie a modifiche effettuate sulla sua struttura per migliorarne le proprietà chimico-fisiche. Superato il doppio strato fosfolipidico il PROTAC lega inizialmente uno dei due partner, la POI o la E3 ligasi, dando origine a un complesso binario; l'aggiunta del terzo partner permette di ottenere il complesso ternario POI-PROTAC-E3 ligasi. Questa vicinanza indotta innesca la poliubiquitinazione della POI da parte dell'E3 ligasi, segnando l'avvio della sua degradazione via proteasoma.[10]

Questo meccanismo è raffigurato in **Figura 2**.

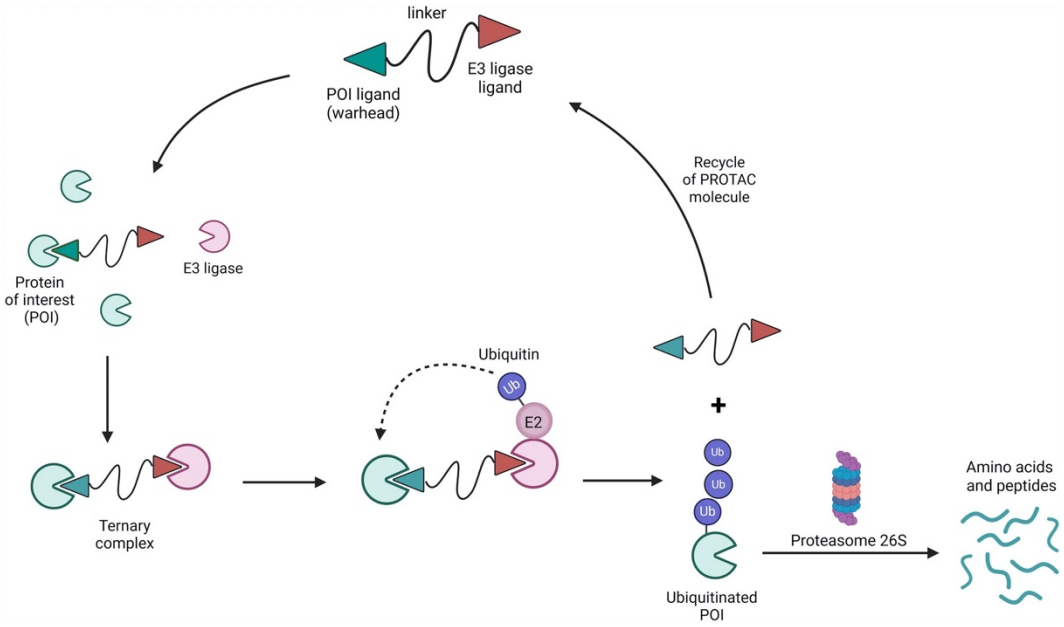


***Figura 2**. Meccanismo di funzionamento PROTAC.*[11]

Successivamente il PROTAC viene dissociato dal complesso per essere riutilizzato nella formazione di un altro complesso ternario agendo in modo catalitico, permettendo più cicli di degradazione della proteina target.[2]

Come già accennato, questo meccanismo catalitico rende i PROTAC più vantaggiosi degli inibitori *small molecule*, perché permette di avere un effetto terapeutico impiegando dosaggi minori di PROTAC ed evitando mutazioni e sovraespressioni della POI.

Con la degradazione del target per via proteasomale, il PROTAC annulla non solo l'attività enzimatica della proteina, ma anche l'attività strutturale, poiché si ha eliminazione fisica dell'intero target.

I PROTAC sono in grado di degradare in modo selettivo le varie isoforme della POI, perché modificando il *linker* della molecola si possono facilitare i legami proteina-proteina (PPI) specifici per la singola proteina, perciò vengono limitati gli effetti off-target.[12]

Un altro metodo che consente ulteriore riduzione di questi effetti è la possibilità di poter scegliere l'*anchor* da utilizzare. Nell'organismo umano sono state identificate più di 600 E3 ligasi che mostrano pattern di espressione diversi a seconda del tipo di tessuto e/o della localizzazione subcellulare. Con il PROTAC si può selezionare l'*anchor* adeguato a una determinata E3 ligasi, andando poi ad indirizzare selettivamente la degradazione della POI verso particolari tessuti migliorando il profilo di selettività e specificità del complesso.[13]

Nonostante i numerosi vantaggi, i PROTAC comportano comunque dei limiti:

- La degradazione della proteina è sicuramente più efficace della sua inibizione, ma allo stesso tempo può avere conseguenze serie poiché la proteina può essere coinvolta in altri processi.[14]
- Il PROTAC può competere con il substrato naturale di E3 ligasi, perciò un'elevata quantità di PROTAC può dare alterazione dei processi fisiologici in cui l'enzima è normalmente coinvolto. Questo problema viene risolto somministrando basse concentrazioni di farmaco in modo tale da impedire la saturazione di E3 ligasi e di conseguenza di UPS.
- Si può verificare l'*hook effect,* ovvero una proprietà intrinseca dei PROTAC che dipende dalla natura bivalente. Ad alte concentrazioni il PROTAC dà saturazione del legame con POI e con E3 ligasi portando alla formazione di soli complessi binari inattivi che compromettono il processo di degradazione e nel peggiore dei casi portano a degradazione off-target di altre proteine non di interesse **(Figura 3)**.[15]

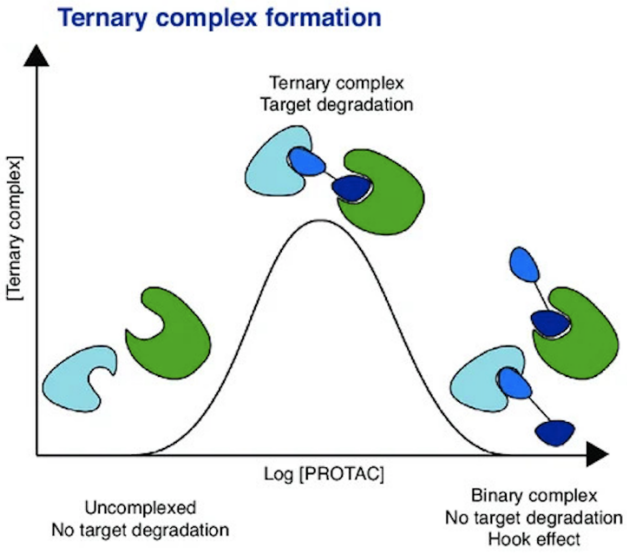


Figura 3. *Hook effect*.[16]

- In letteratura sono stati riportati casi di resistenza acquisita da parte delle cellule anche nei confronti di PROTAC che reclutano le E3 ligasi VHL e CRBN dimostrando la necessità di identificare nuovi ligandi pe E3 ligasi.[13]
- I PROTAC non sono in grado di degradare proteine extracellulari o proteine di membrana perché agiscono solo a livello intracellulare dove è presente UPS.[15]
- L'impossibilità di prevedere le proprietà chimico-fisiche del PROTAC rende il suo sviluppo un processo lungo e dispendioso.[14]

Nonostante questi limiti, la tecnologia ha raggiunto una validazione clinica importante con lo studio di fase III VERITAC-2, che ha valutato vepdegestrant (ARV-471), un degradatore PROTAC orale del recettore degli estrogeni, in pazienti con carcinoma mammario avanzato ER+/HER2- già trattati con un inibitore di CDK4/6 e terapia endocrina.

A livello molecolare, il POI di vepdegestrant è il recettore degli estrogeni, mentre l'E3 ligasi è cereblon (**Figura 4**).

Nel sottogruppo di pazienti con mutazione di ESR1, responsabile di resistenza endocrina in una quota rilevante di casi, vepdegestrant ha mostrato una sopravvivenza libera da progressione significativamente più lunga rispetto al fulvestrant, il degradatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERD) che rappresenta lo standard di cura attuale. Nella popolazione complessiva dello studio, invece, il beneficio non ha raggiunto la

significatività statistica, a conferma che il farmaco agisce in modo specifico sui tumori resi resistenti proprio dalla mutazione di ESR1. Il profilo di sicurezza è risultato nel complesso favorevole. Su questa base, nel 2026 la Food and Drug Administration ha approvato vepdegestrant (VEPPANU®) specificamente per questa popolazione di pazienti, sancendo la prima approvazione in assoluto di un farmaco della classe PROTAC.[17]

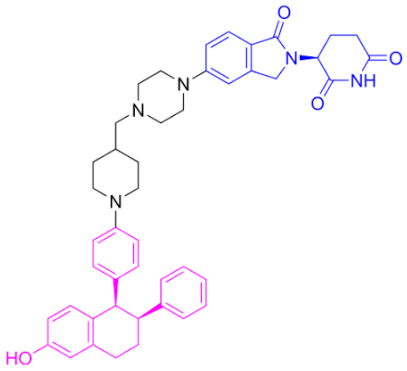


Figura 4. *Vepdegestrant*.[18]

1.3 Progettazione di un PROTAC

Negli ultimi anni l'interesse attorno alla tecnologia PROTAC è cresciuto in modo esponenziale, ponendola al centro della ricerca per lo sviluppo di terapie innovative. Ad ogni modo progettare e sintetizzare chimicamente un PROTAC è impegnativo perché bisogna:

- ✓ tenere in considerazione l'alto PM
- ✓ ipotizzare il profilo farmacocinetico e farmacodinamico della molecola
- ✓ garantire la presenza dei tre componenti del complesso.[19]

Il metodo ottimale per progettare un PROTAC è impiegare un approccio modulare: si scompone la molecola nelle sue tre parti andando a potenziarle singolarmente per poi riassemblarle testando le varie combinazioni possibili per ottenere una buona cooperazione tra i tre componenti.[20]

1.3.1 Individuazione di POI e *warhead*

La fase preliminare del processo di progettazione riguarda la selezione della proteina bersaglio. A questo proposito è stata adottata una metodologia sistematica per valutare la cosiddetta "PROTACtabilità" delle proteine, ovvero la loro idoneità a essere degradate tramite tecnologia PROTAC, basandosi su un insieme di parametri ricavabili da banche dati e risorse pubblicamente accessibili. La valutazione dei target ha tenuto conto della localizzazione subcellulare della proteina, del numero di siti disponibili per l'ubiquitinazione, dell'emivita e della presenza in letteratura di ligandi a piccola molecola già noti per quella proteina. Con questo studio sono state identificate 1336 proteine classificabili come "PROTACtabili", di cui 1058 risultano correlate a patologie note. Dopo aver trovato il target bisogna cercare in letteratura il ligando adeguato che vada ad occupare il sito di *binding* della POI.[21,22]

È stato dimostrato che ai fini della degradazione non è necessario che il PROTAC abbia un'alta affinità per POI, ma piuttosto che si abbia un'alta stabilità del complesso POI-PROTAC-E3 ligasi che permetta di orientare la proteina bersaglio in modo che siano esposti i residui di lisina per l'ubiquitinazione. È importante, quindi, avere un punto di ancoraggio stabile tra *warhead* e *linker*.[23]

1.3.2 Individuazione di E3 ligasi e *anchor*

Nonostante l'espressione di più di 600 E3 ligasi, quelle selezionate per partecipare alla progettazione di un PROTAC sono poche, perché i ligandi disponibili in letteratura sono limitati. Le E3 ligasi più utilizzate sono CRBN (cereblon), VHL (Von Hippel-Lindau), cIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis protein* 1) e MDM2 (*murine double minute 2*) e per ogni E3 ci sono i relativi *anchors* illustrati in **Figura 5**:

- CRBN E3 ligasi vengono reclutate da molecole conosciute come IMiDs (ImmunoModulatory imide Drugs), tra cui pomalidomide, talidomide e lenalidomide;
- VHL E3 ligasi viene reclutata da VH032 un peptidomimetico a base di idrossi-prolina e *tert*-leucina;
- cIAP1 E3 ligasi viene reclutata da Metilbestatina;
- MDM2 E3 ligasi viene reclutata da Nutlina-3.[23]

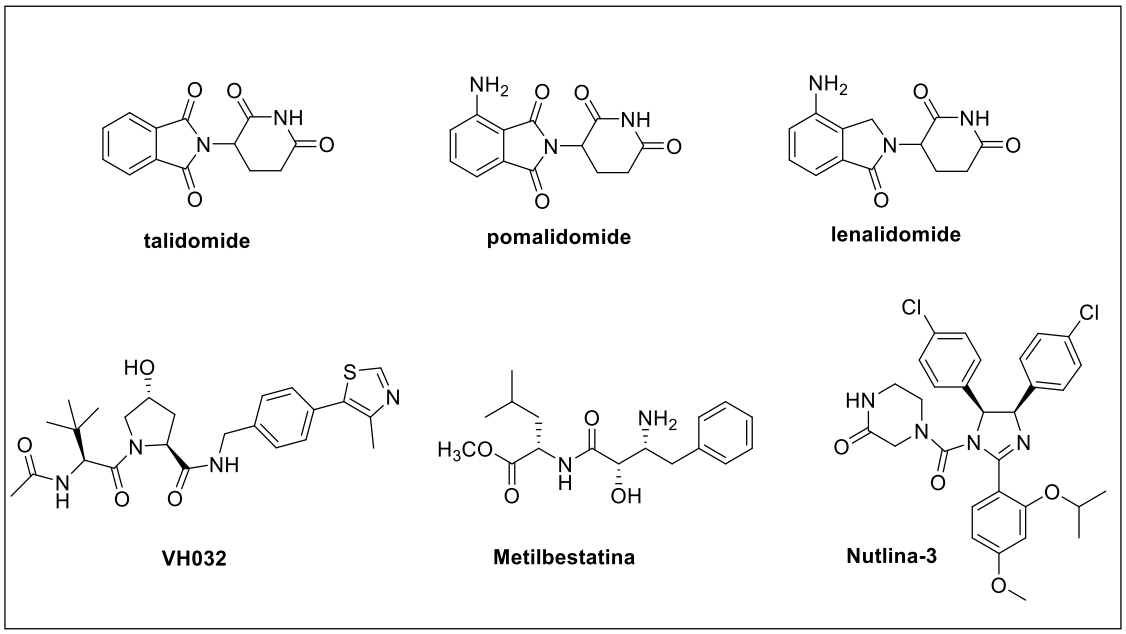


Figura 5. *Strutture di anchors impiegati*.

Per la selezione di queste E3 ligasi bisogna tener conto di diversi aspetti, per esempio alcune proteine sono più tolleranti e possono essere degradate da diverse E3 ligasi, quindi non necessitano di uno specifico enzima.

Come per la POI, anche per l'E3 ligasi è importante avere un punto di ancoraggio stabile tra il ligando e il *linker*, e pure l'*anchor* selezionato va ad avere una forte influenza sulle proprietà chimico-fisiche del PROTAC.

Tra quelli elencati in **Figura 5**, i ligandi d'elezione per la progettazione di PROTAC sono CRBN e VHL perché i loro geni sono espressi in diverse cellule tumorali. Buona parte dei PROTAC in fase clinica sono stati progettati con ligandi CRBN perché hanno migliori proprietà chimico-fisiche, però i ligandi VHL hanno dimostrato una maggiore stabilità chimica rispetto ai PROTAC basati sulla talidomide che invece subiscono decomposizione in tampone fosfato.[24]

In **Figura 6** sono riportate le percentuali di utilizzo dei ligandi CRBN e VHL con riferimento al loro punto di attacco utilizzato.

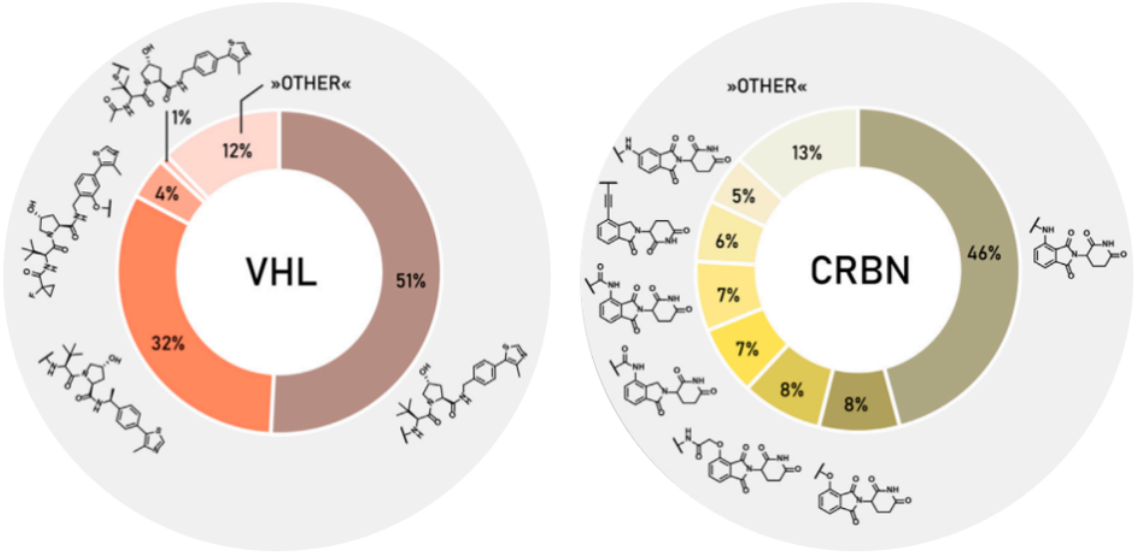


Figura 6. *Frequenze dei ligandi CRBN e VHL usati nei composti PROTAC*.[23]

1.3.3 Ottimizzazione del *linker*

Nella progettazione di un PROTAC è sempre più rilevante il ruolo del *linker*, ovvero la porzione che fa da ponte tra *warhead* e *anchor*. La lunghezza del *linker* e i punti di attacco presenti sui due ligandi sono essenziali per dare prima l'interazione binaria e poi la formazione del complesso ternario fondamentale per garantire il funzionamento del PROTAC. Un altro aspetto da tenere in considerazione è la composizione del *linker*, poiché questa va a influire sulle proprietà chimico-fisiche della molecola.[22]

La progettazione del *linker* è molto lunga e dispendiosa, poiché bisogna testare diversi composti e confrontarli per valutarne i migliori.

Come già anticipato, a causa dell'elevato peso molecolare, ma anche dell'alto numero di accettori di legami idrogeno, donatori di legami idrogeno e di legami rotazionali, i PROTAC non rispettano la regola del 5 di Lipinski e la regola di Veber, ovvero i parametri utilizzati per prevedere la biodisponibilità orale di un composto. In questo scenario va considerato che sia il *warhead* che l'*anchor* sono porzioni strutturalmente vincolate a ligandi già validati, quindi difficilmente modificabili senza compromettere l'affinità per il rispettivo target. Di conseguenza, si può intervenire solo sul *linker* per ottimizzare le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche dell'intera molecola.

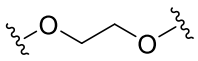
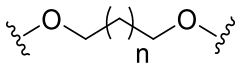
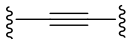
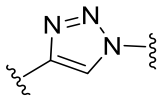
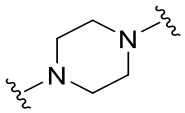
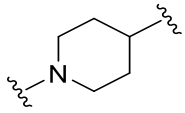
Struttura	Linker motif	Utilizzo %
	PEG (polietilenglicoli)	54
	Alcani	31
	Altri glicoli	14
	Alchini	7
	Triazolo	6
	Piperazina	4
	Piperidina	4

Tabella 1. *Linker più utilizzati*. [25]

Come si può osservare in **Tabella 1**, tra le diverse tipologie di *linker* impiegabili, le catene PEG (polietilenglicoli) e quelle alcaniche risultano essere le più diffuse nella pratica progettuale in quanto costituiscono la scelta di partenza pressoché obbligata per condurre i primi studi di SAR, finalizzati a individuare la distanza ottimale da mantenere tra la proteina bersaglio e l'E3 ligasi. Questi due motivi chimici sono vantaggiosi grazie alla facilità con cui possono essere sintetizzati e alla possibilità di alternare o combinare segmenti PEG e alchilici all'interno dello stesso *linker*, così da calibrare parametri chimico-fisici cruciali quali la solubilità del composto e la sua capacità di attraversare la membrana cellulare. Inoltre, queste tipologie di catena sono caratterizzate da una marcata flessibilità conformazionale che risulta essere determinante nel favorire l'assetto spaziale necessario alla formazione del complesso ternario tra POI, PROTAC ed E3 ligasi.[25]

Il *linker* può essere ottimizzato con l'aggiunta di sostituenti alla struttura.

- Gli scaffold alchinici ed eterociclici stabilizzano la formazione del complesso ternario grazie alla rigidità che conferiscono alla struttura. Questa rigidità può migliorare le proprietà chimico-fisiche della molecola riducendo il numero di legami rotabili e in più si può avere maggiore permeabilità della membrana cellulare con un miglioramento della biodisponibilità orale.[25]
- Anelli eterociclici, come piperidina o piperazina, oltre a conferire rigidità, consentono l'introduzione di gruppi funzionali ionizzabili favorendo potenzialmente un incremento della solubilità del composto.[25]
- Negli ultimi anni l'impiego di motivi triazolici all'interno dei *linker* dei PROTAC è divenuto sempre più diffuso, riflettendo l'interesse crescente verso questa classe.[25]

1.4 Funzione fisiologica e biosintesi di NAD^+

Tra i coenzimi piridinici la nicotinammide adenin dinucleotide (NAD^+) occupa un ruolo centrale nel metabolismo energetico cellulare, partecipando a tappe chiave come la glicolisi, il ciclo di Krebs e la catena di fosforilazione ossidativa per la sintesi di ATP. In questi contesti NAD^+ accetta e cede elettroni con reazioni redox che coinvolgono l'anello nicotinammidico, ovvero la porzione in cui si ha il passaggio tra la forma ossidata NAD^+ e la forma ridotta NADH con il trasferimento di un idruro. NAD^+ opera prevalentemente nelle vie cataboliche, mentre in quelle anaboliche interviene un suo analogo strutturale, ovvero $NADP^+$, in forma ridotta (NADPH) (**Figura 7**).[26]

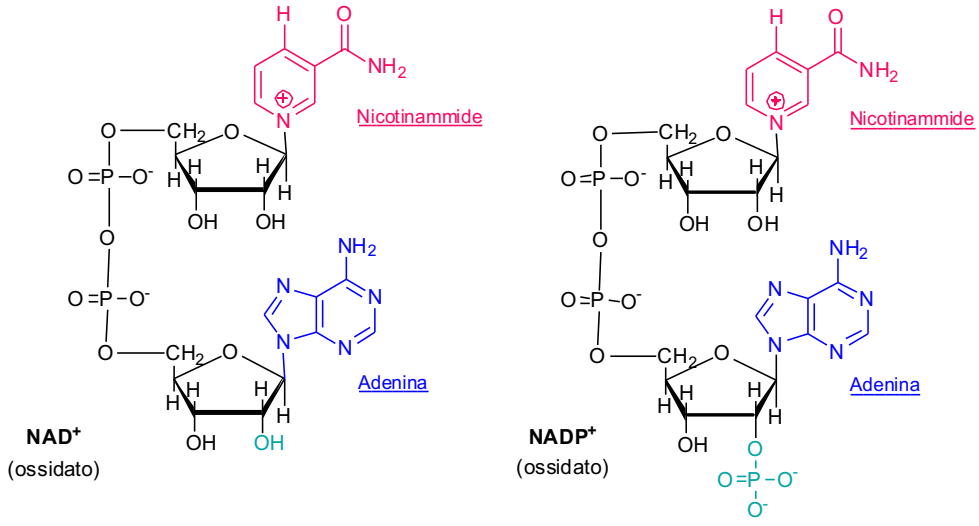


***Figura 7**. Struttura chimica del NAD^+ e del $NADP^+$.*

NAD^+ viene anche impiegato come substrato da parte di alcuni enzimi che agiscono a livello del legame glicosidico dando perdita del gruppo nicotinammidico e il rilascio del frammento ADP-ribosio; si ha quindi riduzione dei livelli di NAD^+.

Le maggiori famiglie che utilizzano NAD^+ come substrato sono tre:

- Le ADP-ribosio polimerasi, sia nella loro forma mono (ART) che poli-funzionale (PARP), catalizzano il trasferimento di unità ADP-ribosio capaci di legarsi in catene su specifici residui amminoacidici, ovvero acido glutammico e acido aspartico, presenti sul target. Queste due famiglie enzimatiche si differenziano nettamente per localizzazione e funzione biologica. Le ART sono ancorate alla membrana e fungono da sentinelle molecolari nelle risposte immunitarie e infiammatorie monitorando le variazioni di NAD^+ nello spazio extracellulare come segnale di allarme. Le PARP, al contrario, si trovano prevalentemente a livello nucleare e citoplasmatico, dove intervengono come componenti essenziali del sistema di riparazione del DNA. La loro attivazione è innescata dal riconoscimento di interruzioni nella doppia elica. L'esito di questa attivazione dipende dall'entità del danno genomico riscontrato: lesioni di lieve entità innescano i normali meccanismi riparativi, mentre un danno più severo determina un'iperattivazione delle PARP che consumando grandi quantità di NAD^+, ne provoca l'esaurimento e conduce la cellula verso l'apoptosi.[27,28]
- L'idrolasi dell'ADP-ribosio ciclico, ovvero CD38 dei linfociti umani, ha un ruolo importante nei processi che richiedono un rapido afflusso di calcio all'interno della cellula, come la contrazione muscolare, l'attivazione di linfociti T e la secrezione dell'insulina e di catecolammine, perché catalizza l'idrolisi del legame glicosidico tra nicotinammide e ribosio dando origine ad ADP-ribosio ciclico, una molecola che funge da secondo messaggero regolando il rilascio di calcio dai depositi cellulari.[29]
- Le sirtuine (SIRT) costituiscono una famiglia di enzimi deacetilanti che operano in stretta dipendenza dal NAD^+, agendo specificamente a livello degli istoni. Questa famiglia è composta da sette isoforme, ognuna delle quali presenta una collocazione subcellulare distinta e svolge compiti funzionalmente differenti dalle altre. A queste proteine vengono ricondotti molteplici ruoli biologici, tra cui controllo della morte cellulare programmata, regolazione delle fasi del ciclo cellulare, modulazione dell'espressione genica, omeostasi metabolica e i processi

legati all'invecchiamento. Dal punto di vista meccanicistico, le SIRT rimuovono i gruppi acetilici dai residui di lisina istonica, sfruttando l'energia liberata dall'idrolisi del NAD^+; tale reazione favorisce la formazione di eterocromatina silente.[28]

Vista la riduzione dei livelli intracellulari di NAD^+ le cellule eucariote ne sintetizzano altro impiegando tre vie biosintetiche a partire da triptofano (Trp), nicotinammide (NM), acido nicotinico (NA) e nicotinammide riboside (NR).[30]

All'inizio della sintesi *de novo* si ha la conversione del triptofano, assunto con la dieta, ad acido chinolinico (QA). Quest'ultimo va incontro a una reazione con 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) catalizzata da acido chinolinico fosforibosiltransferasi (QAPRT) per essere trasformato in acido nicotinico mononucleotide. L'aggiunta di adenina mononucleotide, attraverso l'acido nicotinico mononucleotide adeniltransferasi (NAMNAT), forma l'acido nicotinico adenina dinucleotide ($NAAD^+$), il cui gruppo carbossilico subisce l'azione dell'enzima NAD^+ sintetasi (NADS) che lo converte in ammide per ottenere una molecola di NAD^+.

Con la *Preiss-Handler pathway* l'acido nicotinico (NA), assunto dalla dieta, viene coniugato a PRPP e convertito in NAMN dall'enzima acido nicotinico fosforibosiltransferasi (NAPRT). NAMN segue poi il de novo pathway.

Il *salvage pathway* permette il riciclaggio della nicotinammide (NAM) prodotta dalle reazioni enzimatiche. NAM viene addizionata a PRPP dalla nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT) per produrre nicotinammide mononucleotide (NMN) che viene poi coniugato con AMP dall'enzima nicotinammide mononucleotide adeniltransferasi (NMNAT) per dare direttamente una molecola di NAD^+.

Infine, con la *nucleoside pathway* la nicotinammide riboside (NR), presente in tracce negli alimenti ma assunta spesso come integratore, può essere fosforilata a NMN dalla nicotinammide riboside chinasi (NRK) e dunque confluire nel *salvage pathway* oppure può essere fosforilata e subire idrolisi dell'ammide ad acido carbossilico per dare NAMN che è convertito in NAD^+ come precedentemente descritto.

Negli eucarioti la fonte principale di NAD^+ è il *salvage pathway* che risulta energeticamente vantaggioso rispetto alle altre vie biosintetiche.[30]

Le principali vie biosintetiche sono rappresentate in **Figura 8.**

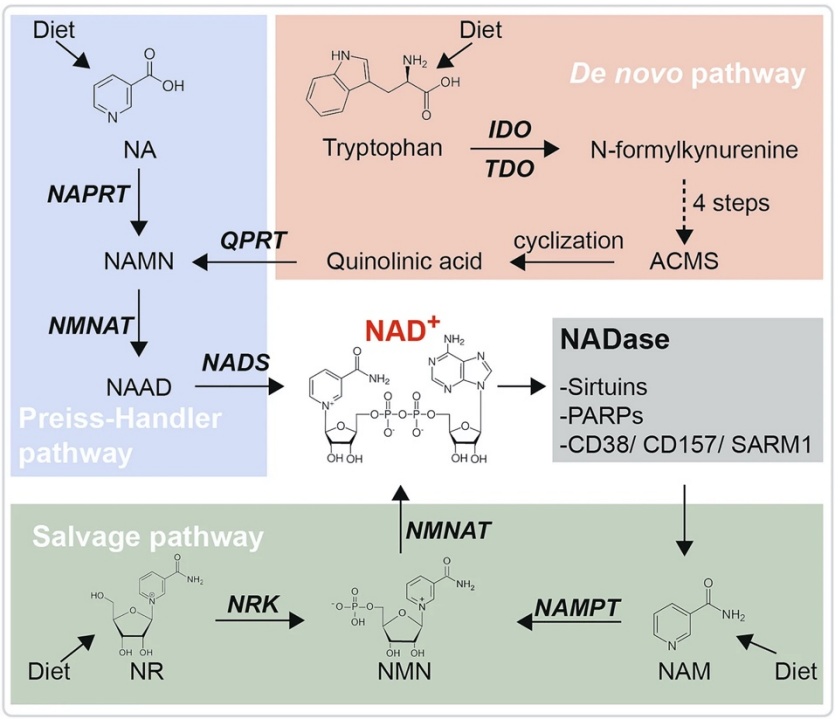


Figura 8. *Illustrazione dei principali pathway biosintentici di NAD⁺.*[31]

1.5 NAMPT come target farmacologico

La nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT) è una proteina pleiotropica che fa parte della classe delle fosforibosiltransferasi di tipo II a struttura dimerica. Prima di essere nota con il nome che oggi la identifica in ambito metabolico, venne scoperta come fattore stimolante per la proliferazione delle colonie di cellule Pre-B, da cui l'acronimo PBEF; solo in un secondo momento la ricerca ne rivelò la natura di adipochina, nota come Visfatina.[32]

NAMPT, PBEF e Visfatina costituiscono quindi tre etichette diverse per la medesima proteina, ciascuna legata al contesto storico o funzionale in cui è stata di volta in volta studiata.

La NAMPT non si limita a un'unica sede cellulare: si ritrova infatti sia nel compartimento citoplasmatico sia in quello nucleare, oltre che nello spazio extracellulare.

Proprio sulla base di questa duplice collocazione si distinguono due varianti, indicate rispettivamente con le sigle iNAMPT ed eNAMPT a seconda che si trovino all'interno o all'esterno della cellula. Alla forma intracellulare spetta un compito metabolico ben

preciso: catalizzare il passaggio iniziale della *salvage pathway*, meccanismo attraverso cui la cellula rigenera le proprie riserve di NAD^+.

iNAMPT è molto importante perché catalizza la tappa iniziale della *salvage pathway*.

A livello strutturale, ciascun monomero è formato da una catena di 491 amminoacidi, corrispondente a un PM di 55 kDa, ripartita in tre domimi A, B e C **(Figura 9)**. La sola forma monomerica non è sufficiente per avere un'azione enzimatica, infatti è solo con la formazione di un complesso omodimerico secondo un orientamento testa-coda, in cui il dominio A di una subunità combacia con il dominio B dell'altra, che iNAMPT acquisisce la capacità di svolgere la propria funzione catalitica.[33]

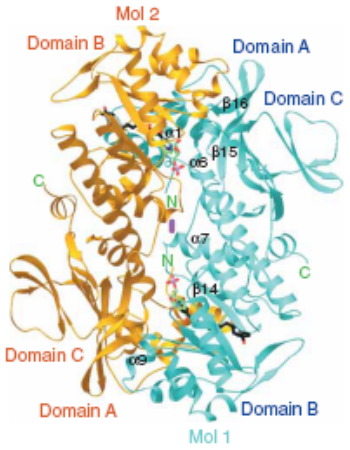


***Figura 9**. I domini della NAMPT.*[33]

Sono numerose le evidenze che collocano NAMPT al centro di processi patologici che spaziano dall'oncogenesi ai disordini infiammatori.[34]

Il metabolismo delle cellule neoplastiche, orientato a sostenere un ritmo replicativo accelerato, comporta un fabbisogno energetico nettamente superiore rispetto a quello delle cellule normali, con un conseguente aumento della domanda di ATP e, a monte, di $NAD(P)^+$. iNAMPT assume un ruolo primario, poiché regola la tappa limitante dell'intera via di recupero classica, meccanismo a cui le cellule neoplastiche fanno ampiamente ricorso.

Il ruolo protettivo di NAD^+ nei confronti della cellula tumorale non si esaurisce sul piano energetico, perché esso risulta determinante anche nel preservare le cellule dal danno ossidativo mediato da specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), scongiurandone la morte,

oltre a favorire i processi di riparazione del DNA e la sopravvivenza cellulare complessiva grazie all'attivazione di PARP e SIRT **(Figura 10)**.[35]

Inoltre, in tempi più recenti, si è scoperto che iNAMPT è in grado di indurre l'espansione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC), contribuendo a creare un ambiente immunosoppressivo favorevole alla progressione neoplastica.[36]

Dal punto di vista funzionale, la molecola mostra un comportamento per certi versi sovrapponibile a quello di una citochina; non è stato ancora identificato con certezza un recettore specifico, ma la ricerca ha indicato come candidati più plausibili il recettore delle chemochine CCR5 e il recettore *Toll-like* di tipo 4 (TLR-4), pur trattandosi di ipotesi che, tutt'oggi, richiedono un'ulteriore validazione sperimentale.[37]

Infine, la secrezione di eNAMPT partecipa attivamente a circuiti di comunicazione cellulare di tipo autocrino, paracrino ed endocrino nel contesto tumorale, esercitando un'azione pro-neoplastica che si concretizza nell'attivazione della via di NF-κB e nella secrezione di VEGF.[37]

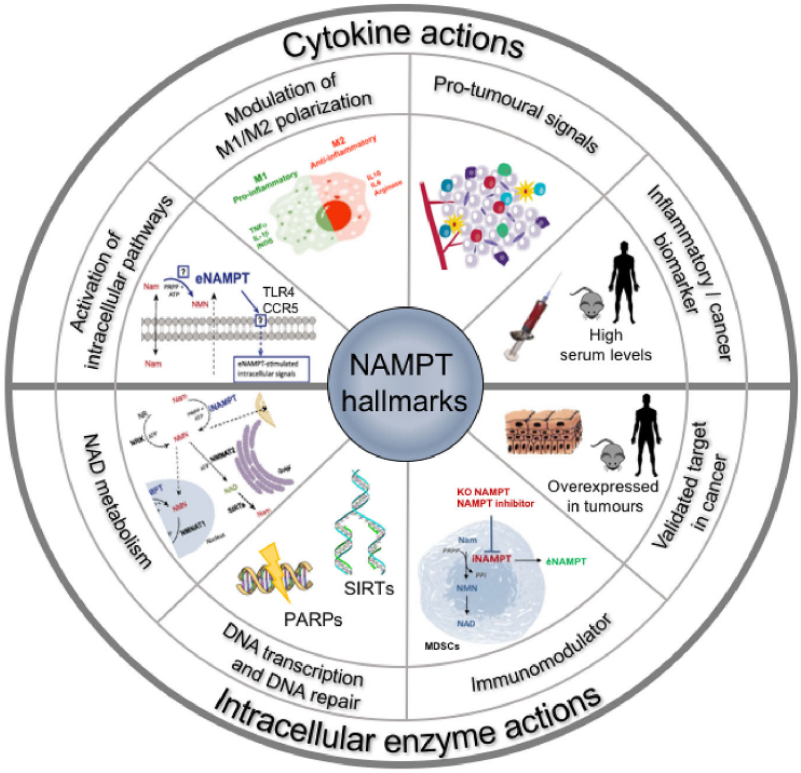


Figura 10. *Rappresentazione delle funzioni di iNAMPT ed eNAMPT.*[34]

Dall'analisi dei livelli di mRNA e proteina condotta sulla maggioranza dei tessuti neoplastici, è emersa una marcata iperespressione di NAMPT.

Parallelamente, la variante circolante eNAMPT è stata individuata in prelievi ematici e sieri provenienti da pazienti affetti da patologie tumorali. Nello specifico, in molteplici forme neoplastiche, alti livelli di NAMPT si associano all'avanzamento dello stadio della malattia e risultano frequentemente correlati a un esito clinico sfavorevole. È risaputo che entrambe le forme, iNAMPT ed eNAMPT, esercitano un'azione regolatoria sul sistema immunitario, risultando coinvolte in svariate condizioni autoimmuni e infiammatorie, quali lupus, artrite reumatoide, patologie infiammatorie intestinali croniche, sepsi e processi infettivi.[38]

1.6 Modulazione farmacologica di NAMPT

Per anni gli sforzi della ricerca farmaceutica nei confronti di NAMPT si sono concentrati quasi esclusivamente sull'inibizione enzimatica. I primi composti testati furono semplici analoghi della nicotinammide, con risultati piuttosto modesti. Tuttavia, la vera svolta si ebbe con l'identificazione di **FK866** (**APO866**), il primo inibitore capace di raggiungere un'attività nanomolare contro NAMPT.[39] Da questa molecola nacque un modello farmacoforico di riferimento, che negli anni successivi guidò la progettazione di composti affini come **CHS-828 (Figura 11)**.

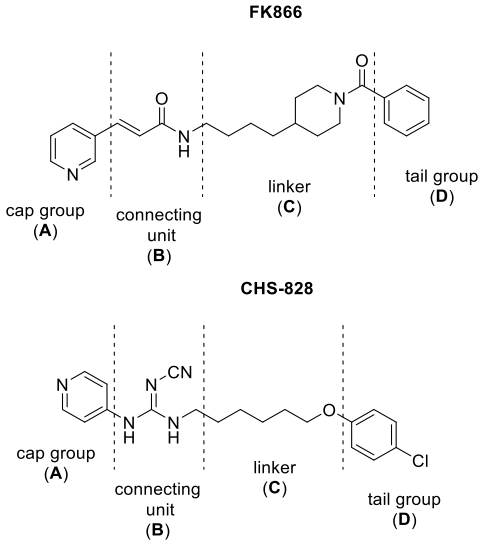


***Figura 11**. Struttura chimica di FK866 e CHS-828 con evidenza dei gruppi farmacoforici.*[34]

L'analisi della struttura cristallografica del complesso FK866-NAMPT ha permesso di stabilire che il composto occupa lo stesso tunnel catalitico riservato alla nicotinammide, situato all'interfaccia tra i domini A e B dell'omodimero (**Figura 12**). Quattro regioni della molecola contribuiscono al legame: il *cap group*, compreso tra Phe193 e Tyr18' e stabilizzato da interazioni π-*stacking* con l'anello piridinico; il gruppo carbonilico della *connecting unit*, ancorato a Ser275 tramite legame idrogeno e il gruppo N-H ammidico, che interagisce con una molecola d'acqua conservata nel sito attivo; il *linker*, sostenuto da interazioni di van der Waals con residui idrofobici lungo il tunnel e infine il *tail group* che contribuisce in maniera determinante alla stabilità del complesso inserendosi in un solco poco profondo esposto al solvente, dove interagisce con Tyr188 tramite legami π-π.[33] Sebbene un dimero sia in grado di legare due molecole di inibitore contemporaneamente, non è ancora stato chiarito se l'occupazione di entrambi i siti sia necessaria per ottenere l'effetto inibitorio.[38]

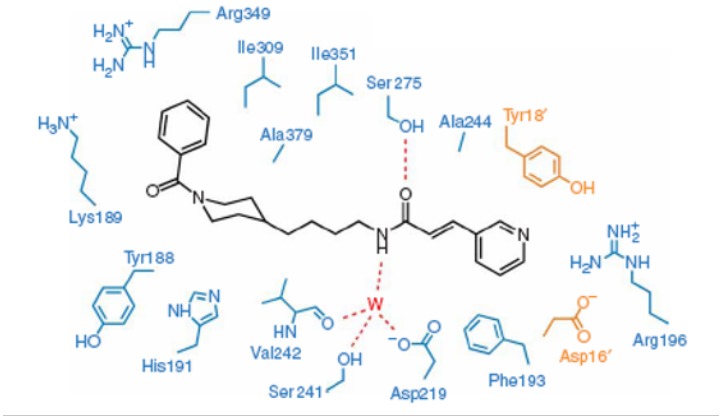


***Figura 12**. Rappresentazione delle interazioni tra **FK866** e i residui amminoacidici di NAMPT.*[33]

Il meccanismo d'azione di **FK866**, dapprima descritto come non competitivo, fu in seguito ricondotto a una modalità competitiva: tale revisione derivò dall'osservazione di un'affinità straordinariamente elevata per il target (Ki = 0,3 nM), compatibile con una velocità di dissociazione estremamente lenta.[39]

Sul piano funzionale, **FK866** esercita un marcato effetto citotossico su diverse linee cellulari tumorali: bloccando iNAMPT, FK866 induce una progressiva deplezione dei livelli di NAD^+, con accumulo di ROS, esaurimento delle scorte di ATP e riduzione

dell'attività di PARP e sirtuine, fino a innescare la morte della cellula tumorale per apoptosi o autofagia.[39]

Il composto agisce anche sul sistema immunitario, abbassando i livelli di citochine circolanti e l'attività delle sirtuine aprendo la strada a possibili applicazioni degli inibitori di NAMPT anche nel trattamento delle patologie infiammatorie.[38]

Meno definito resta invece il quadro relativo a eNAMPT: non essendo certo che questa forma extracellulare conservi attività enzimatica propria, risulta difficile stabilire se gli inibitori esercitino un'azione anche al di fuori della cellula: la libera diffusione delle piccole molecole attraverso la membrana plasmatica rende peraltro complesso isolare un'eventuale componente di inibizione extracellulare. Un approccio mirato specificamente a eNAMPT, basato sull'uso di anticorpi neutralizzanti, ha invece dato riscontri incoraggianti, riducendo la risposta infiammatoria in modelli di colite e nella malattia infiammatoria intestinale.[40]

Il successo di **FK866** ha aperto la strada all'identificazione di numerosi altri inibitori di NAMPT, alcuni dei quali sono giunti a sperimentazione clinica per il trattamento di neoplasie sia ematologiche sia solide. In particolare, **FK866**, **CHS-828** e il suo profarmaco idrosolubile **GMX-1777** hanno raggiunto le fasi I e II degli studi clinici.[41,43]

Tuttavia, questi trial hanno evidenziato importanti effetti collaterali dose-limitanti, tra cui trombocitopenia, tossicità retinica e tossicità cardiaca. Nel complesso, i dati raccolti indicano che tali inibitori risulterebbero più efficaci se impiegati in combinazione sinergica con altri agenti chemioterapici, piuttosto che come monoterapia.[34,38]

Alla luce della scarsa efficacia clinica finora dimostrata dagli inibitori enzimatici, si è reso necessario esplorare strategie alternative per modulare l'attività di NAMPT. Diversi elementi rendono questa proteina un bersaglio particolarmente adatto alla tecnologia PROTAC:

- la disponibilità di numerosi ligandi ad alta affinità già caratterizzati velocizza notevolmente la fase di progettazione molecolare;
- la localizzazione prevalentemente citoplasmatica di NAMPT è compatibile con i requisiti spaziali ottimali per l'azione dei PROTAC;

- l'emivita di NAMPT si attesta tra le 45 e le 153 ore;
- sono stati individuati almeno 24 potenziali siti di ubiquitinazione sulla proteina.

Sfruttando proprio queste caratteristiche, sono stati recentemente identificati alcuni PROTAC ad alta potenza, come **SIAIS630120 (Figura 13)**, ottenuto combinando **FK866** come *warhead* e lenalidomide come *anchor*. Testato su diverse linee cellulari tumorali, questo composto elimina contemporaneamente sia iNAMPT sia eNAMPT, superando in efficacia citotossica lo stesso **FK866**.[44]

Nel 2024 Lu e il suo gruppo ha dimostrato l'efficacia di **LYP-8** sul tumore al colon (CT-26) sfruttando la VHL come reclutatore della E3 ligasi (**Figura 13**).[45]

Il gruppo di Dong nel 2023 ha invece sviluppato un PROTAC basato su un inibitore a struttura ureica e VHL, anch'esso diretto contro NAMPT: il composto **B3** ha mostrato una potenza notevole, con un marcato effetto antiproliferativo su cellule di carcinoma ovarico. Studi *in vivo* successivi hanno confermato l'induzione di morte cellulare per eccessiva deplezione di NAD^+ e la degradazione di NAMPT, senza rilevare tossicità significative su bersagli non specifici. Questi risultati candidano il composto **B3** come possibile agente terapeutico per il trattamento del carcinoma ovarico (**Figura 13**).[46]

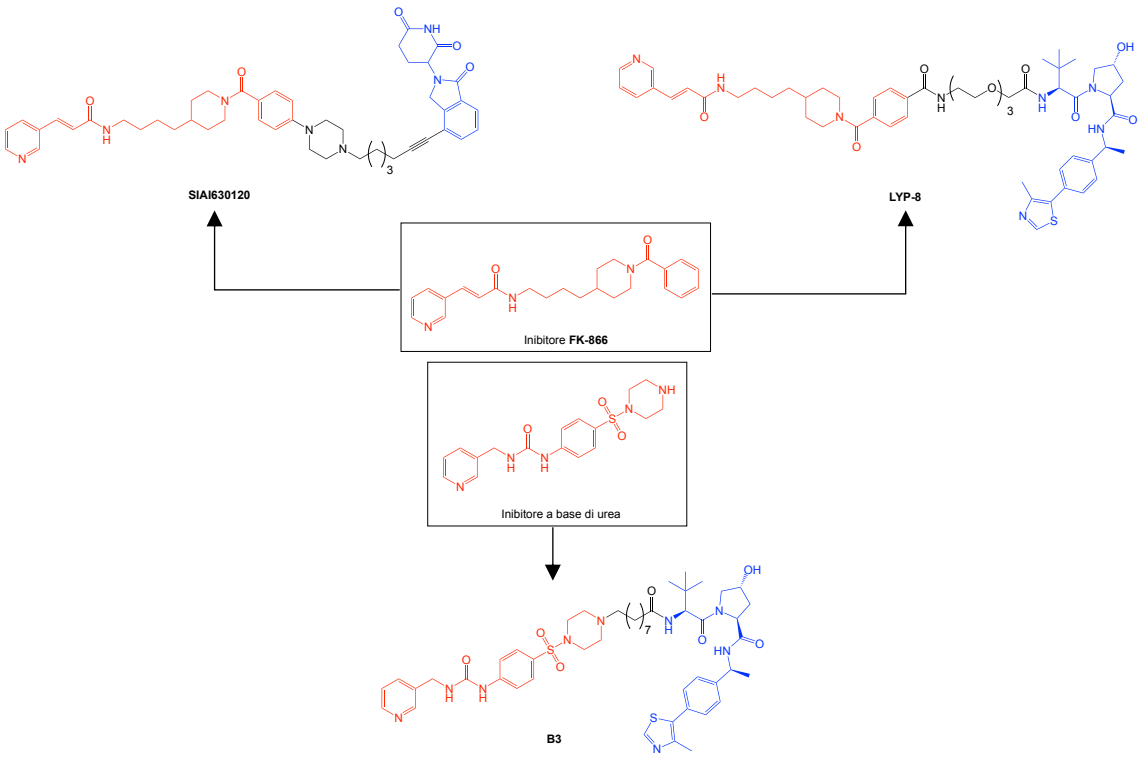


Figura 13. *Struttura chimica di* SIAI630120 [44], LYP-8 [45] *e B3* [46].

Lo stesso autore nel 2026 ha pubblicato una serie di PROTAC CRBN-based sviluppati utilizzando **OT-82**, un inibitore di NAMPT di nuova generazione, come *warhead*. Tra i composti sintetizzati, il derivato **A13** si è distinto come il degradatore più efficace, inducendo una quasi completa degradazione di NAMPT a concentrazioni nanomolari in cellule di carcinoma mammario triplo negativo, attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma. Oltre a una marcata attività antiproliferativa e antimetastatica, **A13** ha mostrato la capacità di riprogrammare il microambiente tumorale, favorendo la polarizzazione dei macrofagi associati al tumore verso il fenotipo M1 pro-infiammatorio. In modelli murini, questo duplice meccanismo si è tradotto in un'efficacia antitumorale nettamente superiore rispetto al solo inibitore **OT-82**, confermando il potenziale della degradazione mirata di NAMPT come strategia terapeutica anche in questo contesto oncologico **(Figura 14)**.[47]

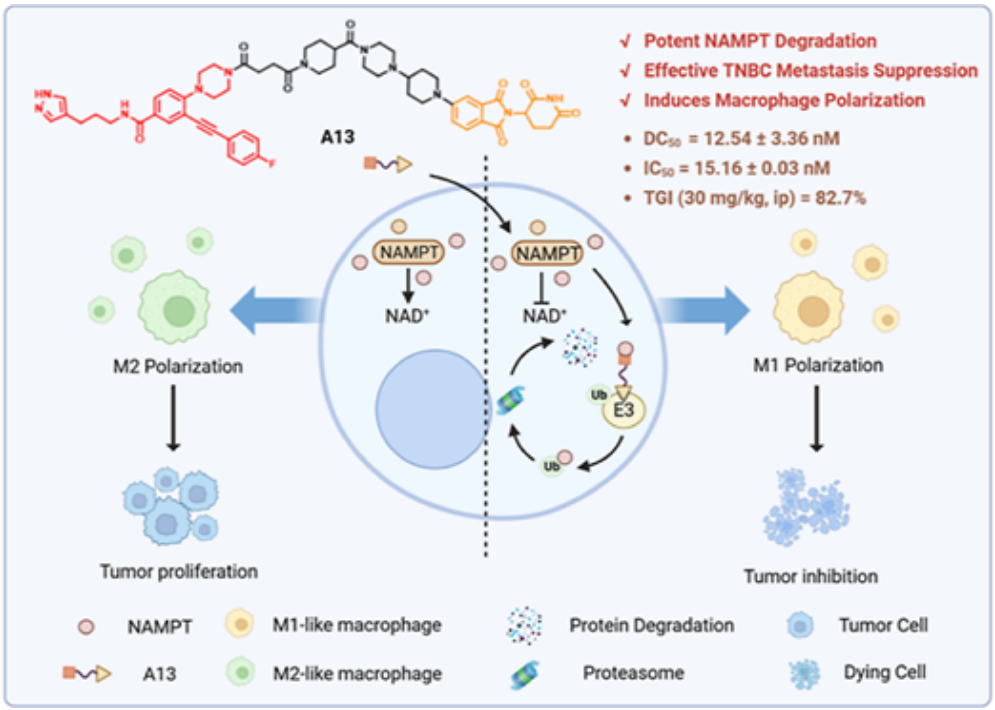


Figura 14. *Struttura di **A13**.*[47]

2. Scopo del lavoro

La Nicotinammide Adenin Dinucleotide (NAD^+) è sia un cofattore essenziale in reazioni di ossidoriduzione coinvolte nel metabolismo e respirazione cellulare, sia un substrato di diversi enzimi come PARP, CD38 e SIRT, che lo consumano riducendone i livelli intracellulari.[26-29] Nelle cellule eucariote NAD^+ viene sintetizzato attraverso diverse vie biosintetiche, tra cui la *salvage pathway* che ricicla la nicotinammide (NAM) prodotta in diverse reazioni enzimatiche. In questa via la tappa limitante è regolata dall'enzima pleiotropico Nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT) che a partire da NAM catalizza la sintesi di Nicotinammide monolucleotide (NMN).[30]

La NAMPT esiste in due forme: a livello intracellulare (iNAMPT) dove svolge la sua azione enzimatica e nello spazio extracellulare (eNAMPT) dove si comporta come una citochina proinfiammatoria e protumorale.[36,37]

Numerose neoplasie sono caratterizzate da un'iperespressione di iNAMPT e da un'aumentata secrezione di eNAMPT, riconducibili all'elevato consumo di ATP da parte della cellula tumorale e al conseguente incremento del catabolismo del NAD^+. Per questo motivo, NAMPT rappresenta un target di particolare interesse nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche in ambito oncologico. Negli ultimi decenni sono stati sviluppati diversi inibitori, tra cui **FK866**, **CHS-828** e la sua prodrug idrosolubile **GMX-1777** che tuttavia, sono stati ritirati dai trial clinici a causa degli effetti avversi. Attualmente solo **OT-82** è in fase clinica I.[47]

A causa della scarsa efficacia e delle limitazioni degli inibitori a *small molecule* è emersa la necessità di adottare nuove strategie per bersagliare sia iNAMPT che eNAMPT. Recentemente la tecnologia PROTAC ha suscitato un grande interesse come approccio terapeutico innovativo, poiché porta alla degradazione della proteina bersaglio: il PROTAC induce la formazione del complesso ternario POI-PROTAC-E3 ligasi e causa la degradazione della POI, in questo caso NAMPT, coinvolgendo il Sistema Ubiquitina-Proteasoma.[10]

Il meccanismo catalitico dei PROTAC risulta essere molto vantaggioso perché consente l'impiego di dosi inferiori di farmaco, riducendo potenzialmente il rischio di tossicità off-target e di effetti avversi. Inoltre, la diminuzione dei livelli di iNAMPT potrebbe influenzare anche la concentrazione di eNAMPT.[11]

Il gruppo di ricerca di chimica farmaceutica presso cui è stato svolto questo progetto di tesi ha precedentemente sviluppato una libreria di 17 PROTAC utilizzando come ligando della NAMPT il potente inibitore a struttura triazolil-piridinica **MV78**, pubblicato nel 2017.

Per reclutare CRBN E3 ligasi e VHL E3 ligasi sono stati utilizzati come *anchor* rispettivamente lenalidomide e VH032-ammina. Riguardo al *linker*, sono state scelte catene alcaniche e PEG all'interno delle quali è stato introdotto un anello 1,2,3-triazolico-1,4-disostituito, poiché questo eterociclo ha determinato importanti effetti di stabilizzazione nel complesso ternario in molti PROTAC di letteratura.

In questo progetto di tesi come primo obiettivo è stato necessario completare lo studio SAR in corso sintetizzando 4 nuovi PROTAC basati su **MV78** che utilizzano VH032-ammina come ligando per il reclutamento di VHL E3 ligasi e *linker* alcanici contenenti un anello triazolico incorporato.

Successivamente, è stata sintetizzata una serie di 12 PROTAC caratterizzati da *linker* alcanici privi dell'anello triazolico, utilizzando lenalidomide e VH032-ammina come ligandi per il reclutamento delle rispettive E3 ligasi, al fine di confrontare le due serie di PROTAC e valutare l'impatto del triazolo nel *linker* sull'attività di degradazione della NAMPT.

La **Figura 15** raffigura schematicamente la progettazione dei PROTAC diretti contro NAMPT.

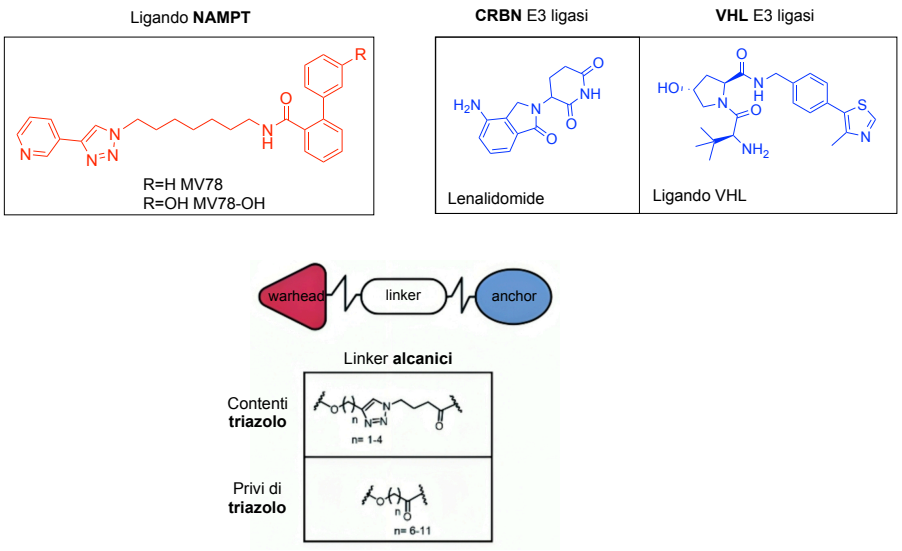


***Figura 15**. Rappresentazione schematica dei PROTAC diretti contro NAMPT e i loro tre componenti: warhead, linker e anchor.*[48]

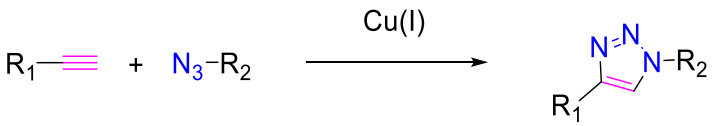
3. *Risultati e discussione*

3.1 Sintesi e risultati biologici di PROTAC NAMPT-VHL con triazolo nel *linker*

Negli ultimi decenni la *click chemistry* ha rappresentato una metodologia sintetica ampiamente sfruttata in ambito farmacologico per lo sviluppo rapido e affidabile di diversi composti.[49]

Con questo termine, coniato dal premio Nobel K. B. Sharpless nel 2001, si fa riferimento a reazioni che devono soddisfare una serie di requisiti ben definiti: *"La reazione deve essere modulare, dare alte rese, generare solamente sottoprodotti innocui che possono essere rimossi con metodi non cromatografici ed essere stereospecifica. Il processo deve essere condotto in condizioni semplici, con materiali e reagenti facilmente reperibili, senza l'uso di solventi o con l'uso di solventi non dannosi (come l'acqua) o almeno facilmente allontanabili e portare a un rapido isolamento del prodotto".*[49]

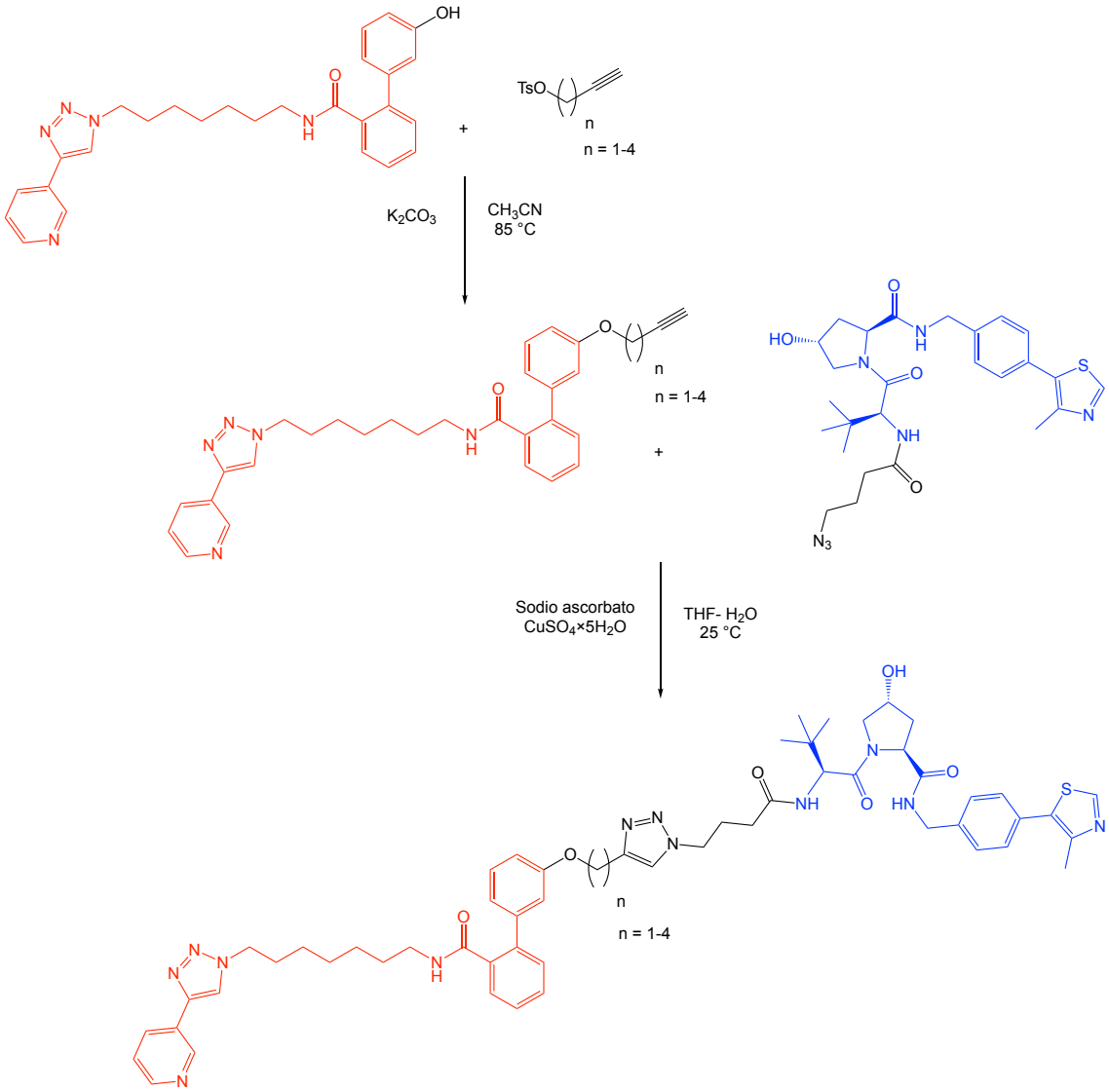
La cicloaddizione di Huisgen, una cicloaddizione 1,3-dipolare (Cu I), rappresenta uno degli esempi più rilevanti di reazione *click*, in cui, partendo da un alchino terminale e un azide, si ha la formazione di 1,2,3-triazoli 1,4-disostituiti (**Schema 1**). A differenza di una classica reazione di cicloaddizione non catalizzata, la *click chemistry* risulta essere più rapida, non richiede riscaldamento elevato, ha una resa maggiore ed è regioselettiva, perciò permette di ottenere solo l'isomero 1,4-disostituito.[50]



Schema 1. *Cicloaddizione di Huisgen*.

Il triazolo ottenuto dalla reazione possiede numerose proprietà vantaggiose nei processi di *drug discovery*, come l'alta stabilità all'idrolisi acida-basica e a condizioni ossidanti-riducenti, un'alta stabilizzazione aromatica e il fatto che questo eterociclo sia considerato un bioisostero non classico del gruppo ammidico. Inoltre, l'anello triazolico è molto resistente alla degradazione metabolica e a livello chimico partecipa in modo attivo alla formazione di legami idrogeno, interazioni π-stacking ed interazioni dipolo-dipolo, caratteristiche legate all'elevato momento dipolare.[51]

Con questa reazione di *click chemistry* è stato possibile sintetizzare 4 PROTAC NAMPT-VHL con anello triazolico incorporato nel *linker* alcanico indispensabili per completare un progetto precedentemente sviluppato dal gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta questa tesi. La sintesi di questi PROTAC è rappresentata nello **Schema 2**.



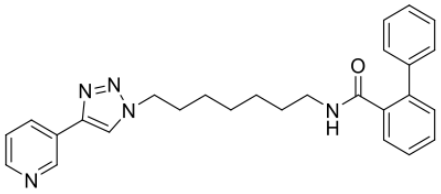
Schema 2. *Approccio utilizzato per la sintesi di PROTAC NAMPT-VHL con triazolo incorporato nel linker*.

3.1.1 Sintesi del *warhead*

MV78 è un potente inibitore enzimatico scoperto nel 2017 presso il laboratorio di chimica farmaceutica dove è stata svolta la presente tesi.[52]

Il composto presenta una buona attività sulla NAMPT, mostrando EC_{50} per la citotossicità di 5.8 ± 0.2 nM su cellule di neuroblastoma (SH-SY5Y) ed IC_{50} di inibizione enzimatica

pari a 3.1 ± 4.1 nM, una discreta solubilità acquosa e buona stabilità metabolica sia nel topo che nell'uomo rendendolo un ligando valido ad alta affinità per la proteina **(Figura 16).**



MV78

EC_{50} = 5.8 ± 0.2 nM on SH-SY5Y cell line
IC_{50} = 3.1 ± 4.1 nM on NAMPT inhibition assay
kinetic aqueous solubility = 201 µM
RLM = 45%
HLM = 88%

Figura 16. *Inibitore* ***MV78***

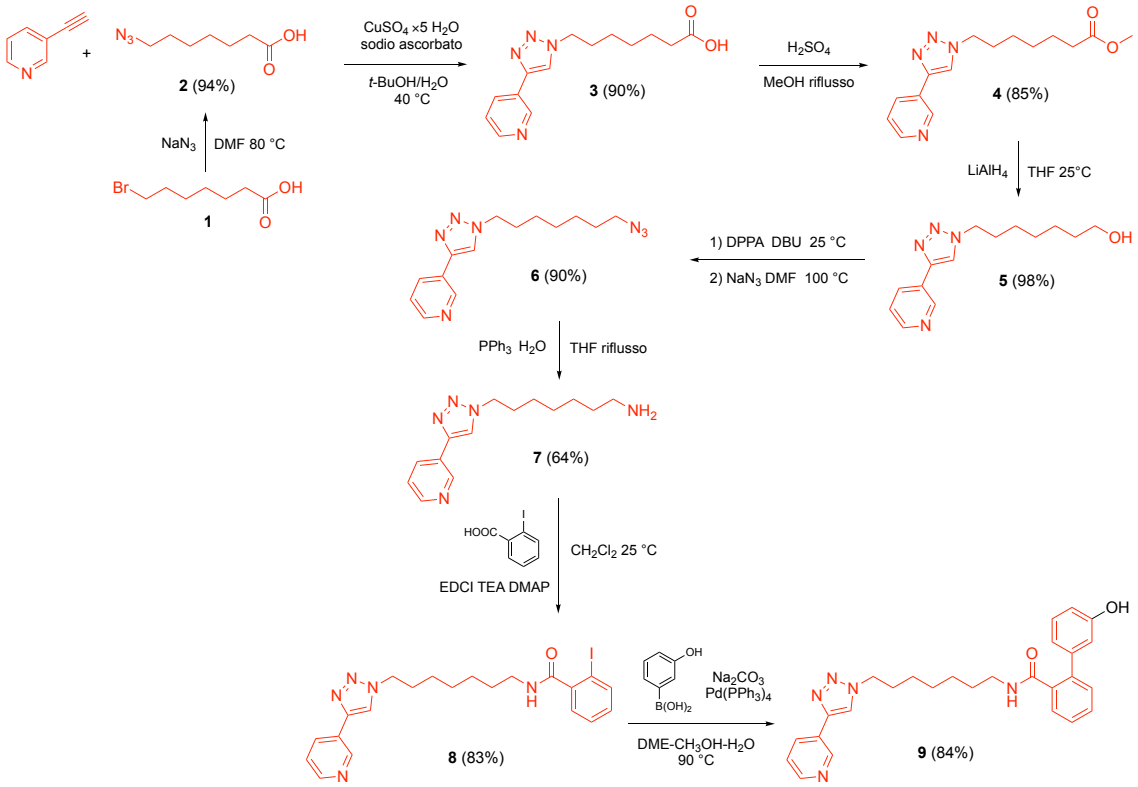
I primi sei step della sintesi del *warhead* sono stati eseguiti secondo quanto riportato in letteratura per **MV78**,[52] mentre le ultime due reazioni sono state appositamente progettate per l'introduzione della funzionalità ossidrilica.

In breve, come riportato nello **Schema 3**, l'acido 7-bromo eptanoico **1** commerciale viene sottoposto ad azidazione con sodio azide in DMF a 80 °C per ottenere la corrispondente azide **2**, la quale subisce la cicloaddizione 1,3-dipolare catalizzata da Cu (I), con la 3-etinilpiridina, in presenza di $CuSO_4$ come catalizzatore e sodio ascorbato come riducente, a 40 °C, per dare il triazolo **3** con alte rese. Quest'ultimo viene trasformato nel corrispondente estere metilico **4** tramite esterificazione di Fischer e successivamente ridotto ad alcol **5** con $LiAlH_4$ in THF a temperatura ambiente.

L'intermedio **5** viene trasformato in azide **6** utilizzando una procedura *one pot* con DPPA (difenilfosforilazide), DBU (1,8-diazabiciclo [5,4,0] undec-7-ene) e sodio azide in DMF a 100 °C. In seguito, l'azide **6** viene ridotta ad ammina **7** attraverso la reazione di Staudinger con PPh_3 e acqua in THF. Infine, l'ammina **7** viene accoppiata con l'acido 3-idrossifenilboronico in presenza di palladio tetrakis e sodio carbonato per ottenere, con alte rese, il *warhead* **MV78** funzionalizzato con il gruppo OH fenolico, il quale verrà utilizzato come punto di attacco per introdurre il *linker* tramite la reazione di Williamson.

Poiché **MV78** occupa il tunnel della NAMPT, l'unica regione della molecola modificabile per creare un punto di ancoraggio del *linker* è la porzione bifenilica terminale, che sporge leggermente oltre al tunnel in una zona esposta al solvente.

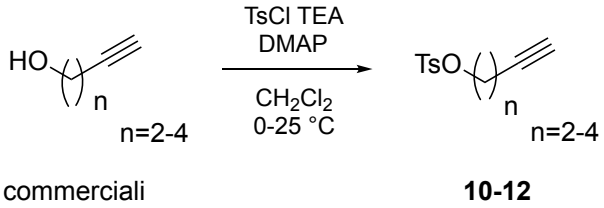
Grazie a un lavoro precedente[53] è stato dimostrato che il posizionamento dell'ossidrile fenolico in meta sul secondo anello aromatico del bifenile non comportava alcuna perdita di affinità nei confronti della proteina.



Schema 3. *Sintesi del warhead* ***MV78-OH 9***.

3.1.2 Sintesi dei *linker*

La sintesi dei *linker* alcanici è avvenuta a partire da alchinoli commerciali, contenenti da 2 a 4 gruppi metilenici, sottoposti a reazione di tosilazione con tosilcloruro, TEA e DMAP in DCM a temperatura ambiente per ottenere, con alte rese, i corrispondenti alchini tosilati (**10-12**). Nel caso del *linker* più corto (n=1) è stato impiegato il propargil bromuro commerciale (**Schema 4**).



Schema 4. *Sintesi degli alchini tosilati **10-12***.

In **Figura 17** sono illustrati gli alchini tosilati **10-12** sintetizzati con le rispettive rese.

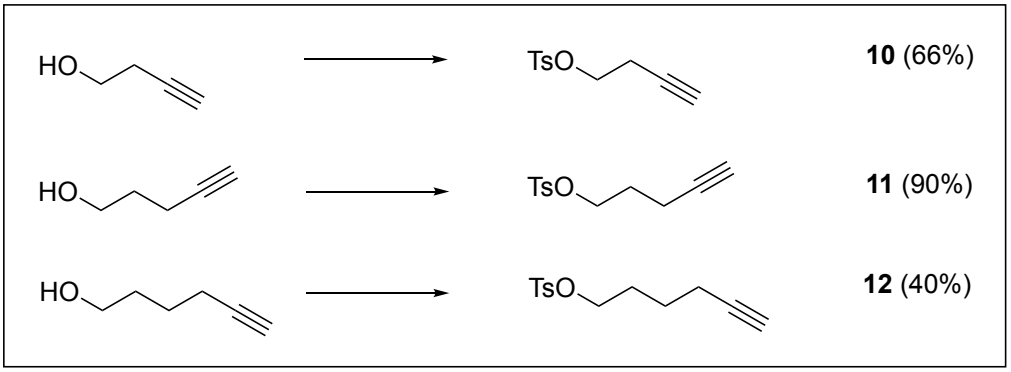


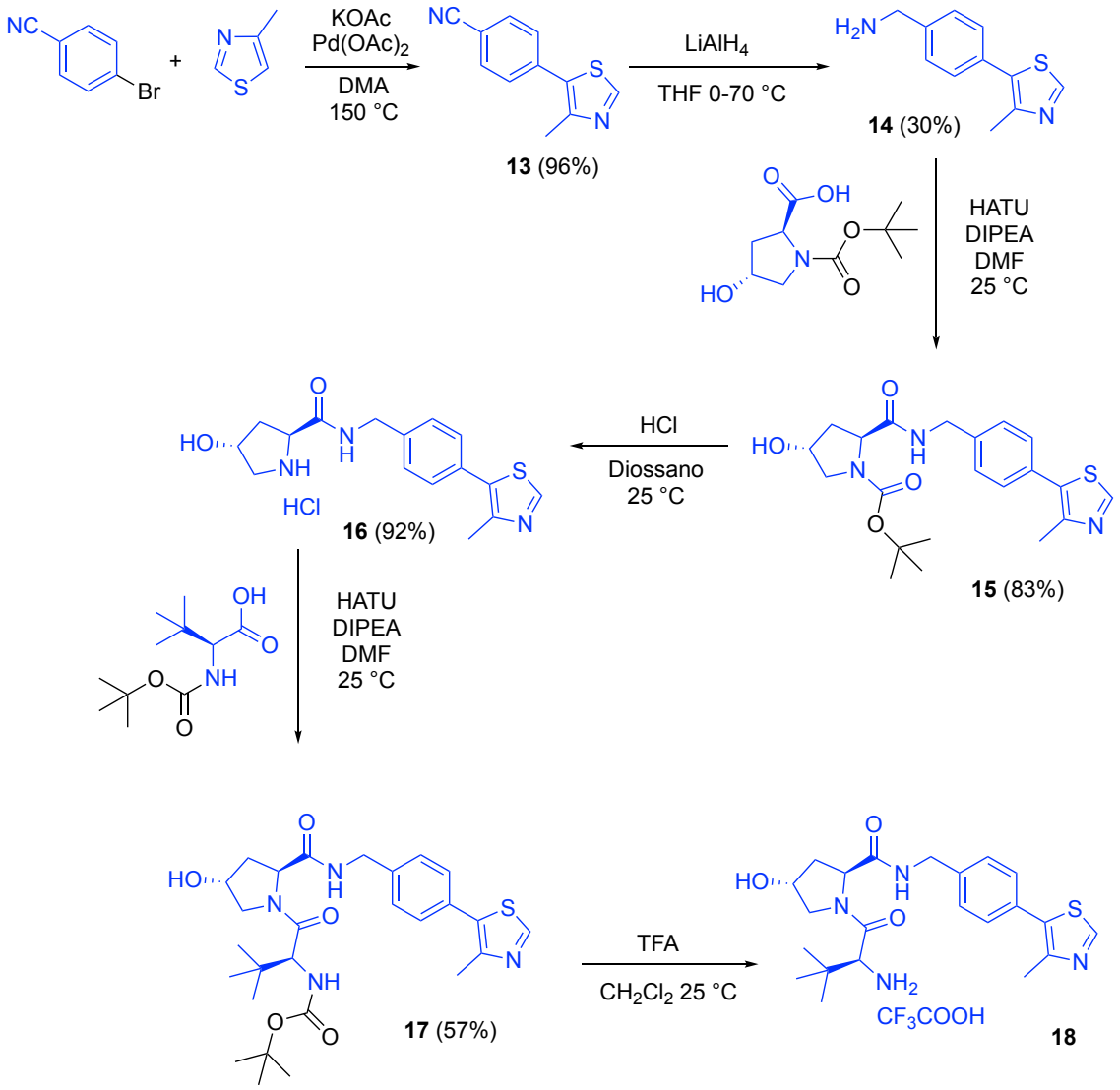
Figura 17. *Libreria di alchini tosilati **10-12** sintetizzati*.

3.1.3 Sintesi del ligando per la VHL E3 ligasi

Il ligando per la VHL è stato preparato secondo quanto riportato in letteratura[54,55] seguendo la via sintetica rappresentata nello **Schema 5**.

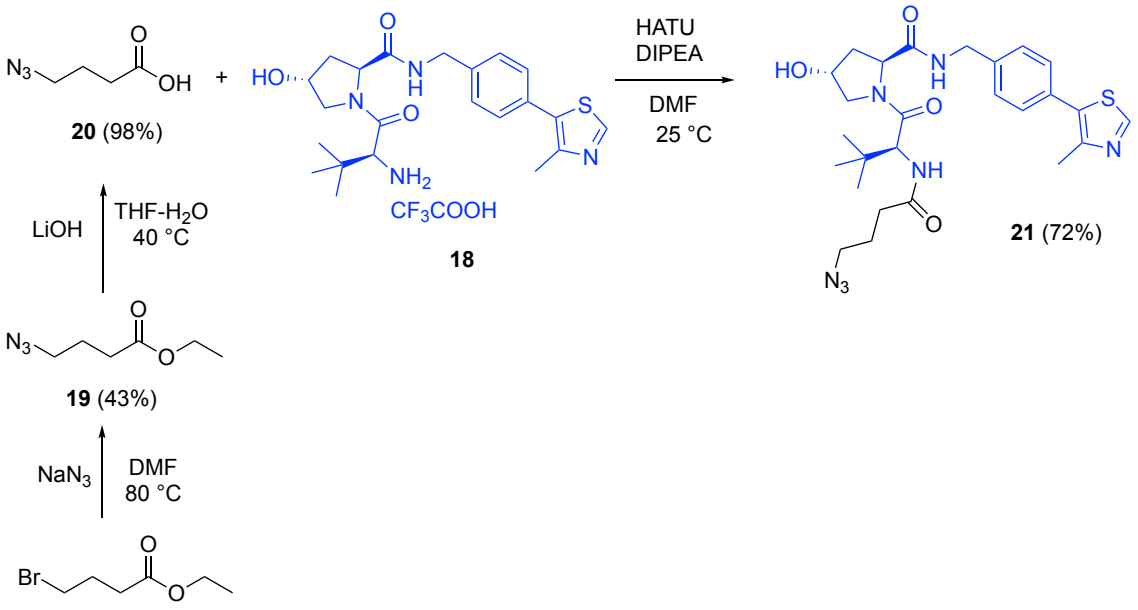
Tramite una reazione di arilazione catalizzata da palladio è stato possibile accoppiare 4-bromobenzonitrile e 4-metiltiazolo per dare l'intermedio **13**, che viene ridotto ad ammina **14** con $LiAlH_4$. Successivamente, è stato condotto un *coupling* ammidico tra l'ammina **14** e la *Boc-L*-idrossiprolina, impiegando HATU come agente condensante e DIPEA come base, ottenendo l'intermedio **15** che viene sottoposto a *Boc*-deprotezione in condizioni acide mediante HCl in diossano.

L'ammina **16** è stata coinvolta in una seconda reazione di *coupling* con *Boc-L-tert*-leucina fornendo l'intermedio protetto **17**. Quest'ultimo subisce deprotezione con TFA per dare il ligando di VHL come sale trifluoroacetato **18**.



Schema 5. *Sintesi del ligando di VHL **18**.*

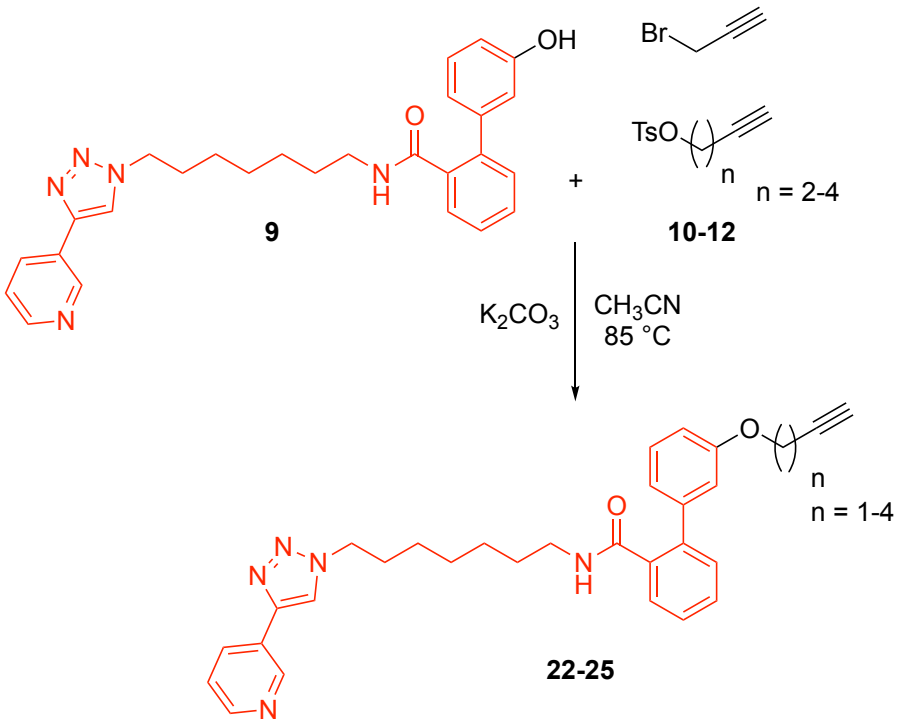
In prospettiva di mettere a punto la reazione *click* per l'assemblaggio dei PROTAC è stato necessario funzionalizzare l'*anchor* con un azide: il 4-bromobutanoato di etile è stato sottoposto a una reazione di sostituzione nucleofila con sodio azide per ottenere l'intermedio **19**, il quale è stato successivamente idrolizzato in condizioni basiche a dare l'acido carbossilico **20**. Infine, il ligando VHL **18** è stato sottoposto a reazione di ammidazione con l'acido carbossilico **20**, impiegando HATU e DIPEA come base, ottenendo l'*anchor* funzionalizzato con azide **21** (**Schema 6**).



Schema 6. *Funzionalizzazione con azide del ligando di VHL* ***21***.

3.1.4 Assemblaggio dei PROTAC

Una volta preparati i tre componenti principali del PROTAC, il primo step dell'assemblaggio sfrutta la reazione di eterificazione di Williamson per coniugare il *warhead* **9** con l'alchino tosilato corrispondente o il propargil bromuro in ambiente basico con potassio carbonato, in acetonitrile a 85 °C (**Schema 7**).



Schema 7. *Eterificazione di Williamson tra* ***MV78-OH*** *e alchini*.

Di seguito in **Figura 18** sono riportate le strutture degli eteri con le rispettive rese.

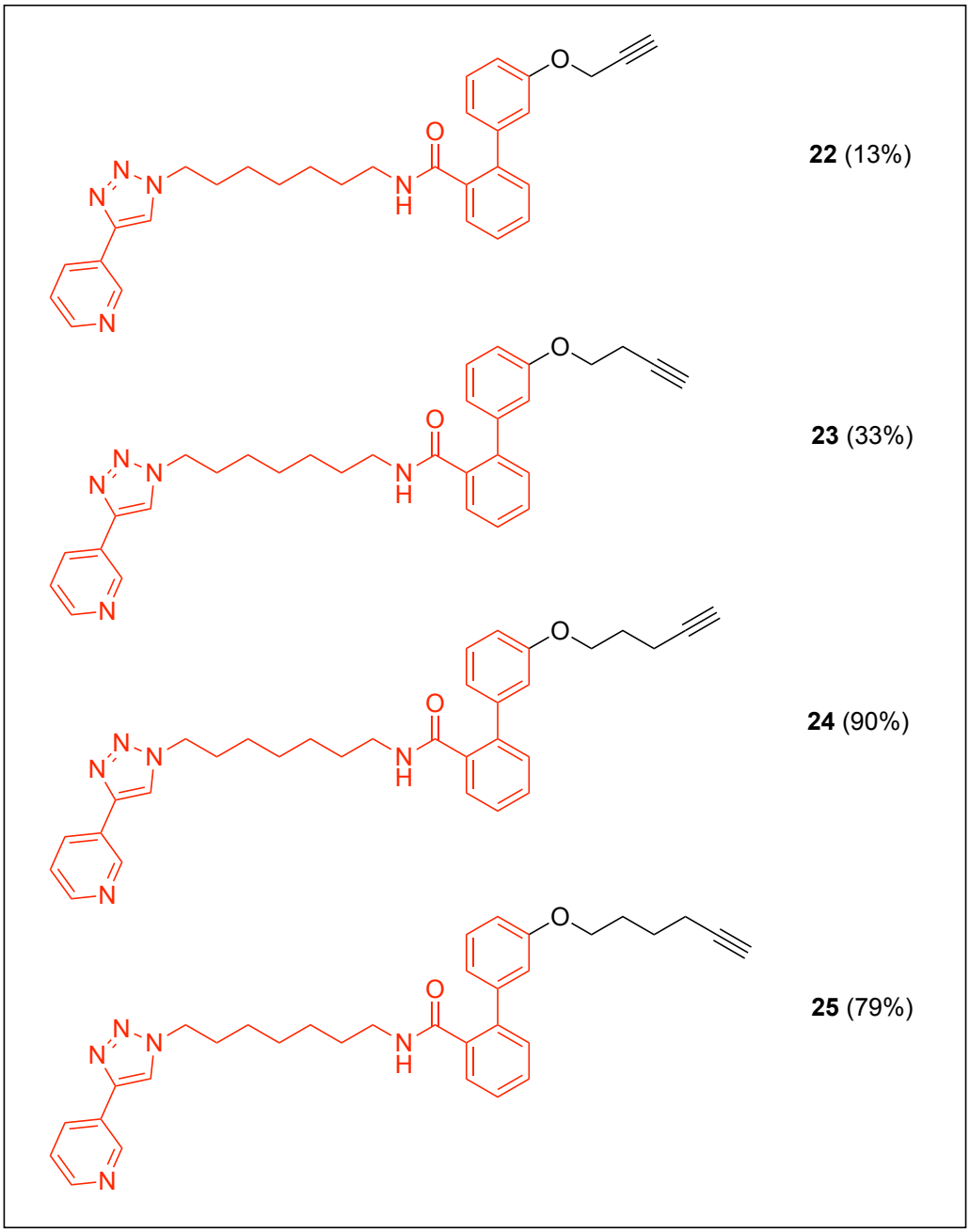
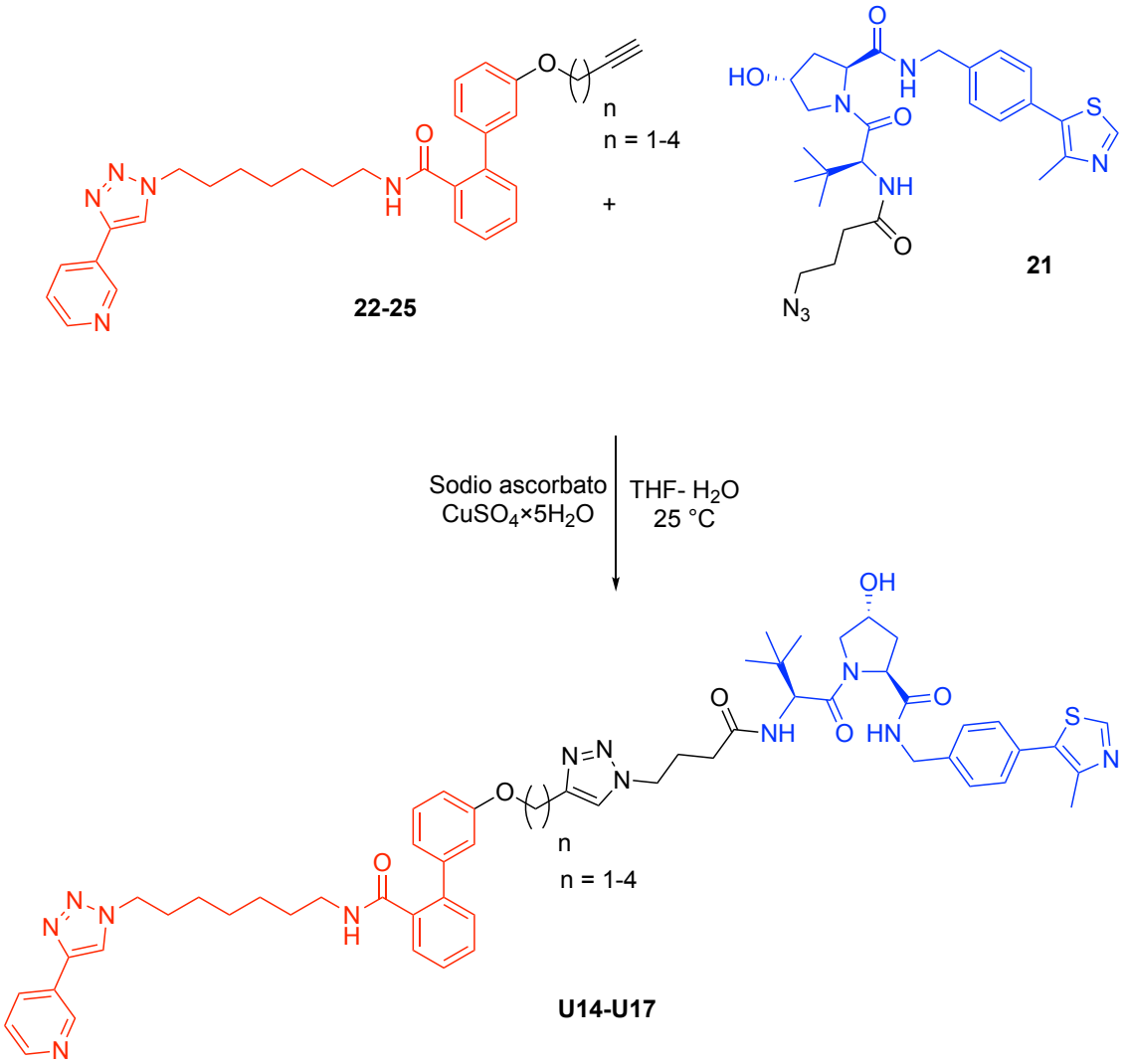


Figura 18. *Struttura chimica degli intermedi **22-25***.

Infine si ha l'applicazione della reazione *click* di cicloaddizione 1,3 dipolare catalizzata da Cu (I) tra gli alchini terminali **22-25** e l'intermedio azidico comune **21**. La reazione è stata condotta in THF-H_2O in rapporto 1:1, in presenza di sodio ascorbato e rame solfato pentaidrato, a temperatura ambiente per una notte, sotto vigorosa agitazione magnetica in atmosfera di azoto (**Schema 8**).



Schema 8. *Reazione click per ottenere i PROTAC con triazolo* ***U14-U17***.

Di seguito, in **Figura 19**, sono riportate le strutture dei 4 PROTAC **U14**-**U17** ottenuti con le rispettive rese.

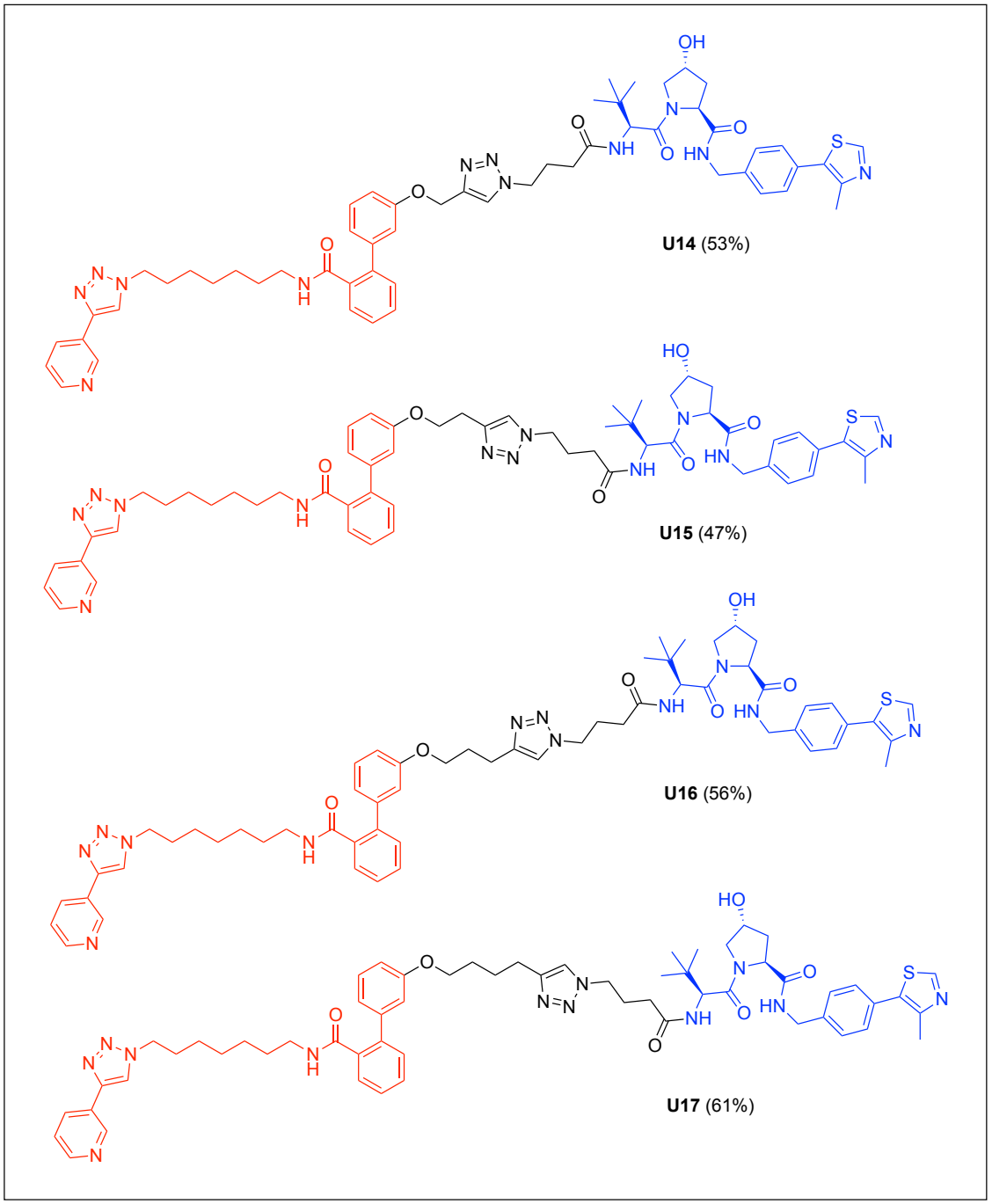


Figura 19. *Struttura chimica dei PROTAC NAMPT-VHL con triazolo nel linker* ***U14-U17***.

3.1.5 Risultati biologici

I 4 PROTAC **U14-U17** sono stati sottoposti a valutazione biologica presso il laboratorio di farmacologia della professoressa A. Grolla mediante saggi cellulari sia per verificare la capacità di attraversare la membrana plasmatica, sia la capacità di agire selettivamente su NAMPT. Considerando il ruolo essenziale di NAMPT nella biosintesi del NAD^+ e

sulla vitalità cellulare sono stati effettuati saggi di citotossicità. La vitalità cellulare è stata determinata attraverso il test MTT su cellule di carcinoma mammario umano MCF7 trattando con i PROTAC a 1 μM e 10 μM per 72 ore. In parallelo, i livelli della proteina NAMPT sono stati valutati mediante *Western blot* dopo 18 ore di esposizione a 1 μM.

I dati raccolti in **Tabella 2** mostrano che, alla concentrazione più alta, i composti dimezzano abbondantemente la vitalità cellulare, ma in nessun caso si è osservata una diminuzione dei livelli di NAMPT. Questo risultato suggerisce che i composti sono permeabili attraverso la membrana cellulare e agiscono solamente come inibitori enzimatici classici di NAMPT piuttosto che come *degrader*.[48]

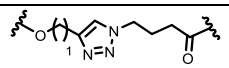
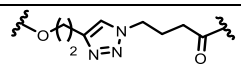
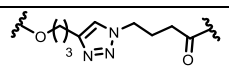
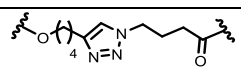
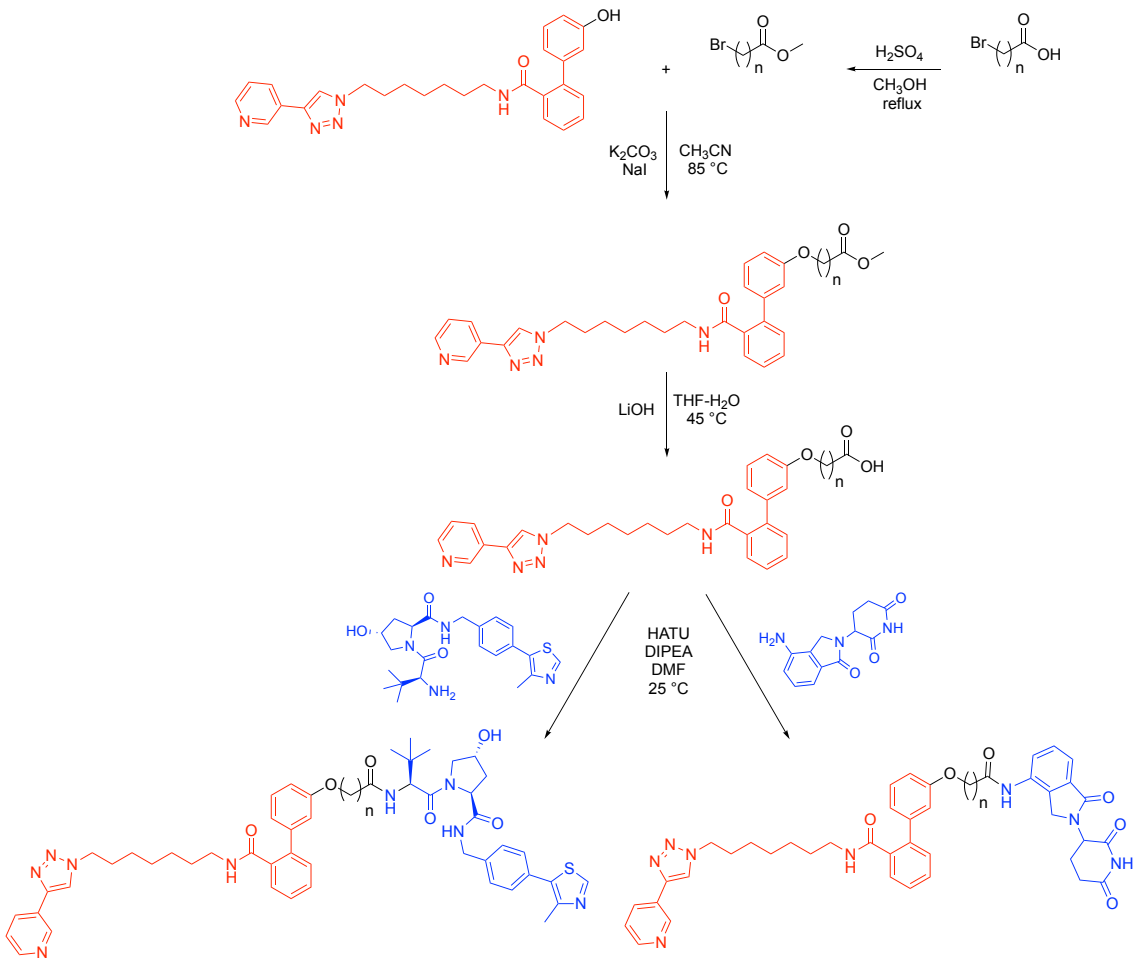
Cpd	*Linker*	Vitalità (%)		DC_{50} (nM)	D_{max} (%)
		1 μM	10 μM		1 μM
U14		73.9 ± 3.3	14.3 ± 2.3	n.d.	0
U15		68.6 ± 3.6	14.6 ± 0.9	n.d.	0
U16		58.9 ± 1.7	20.8 ± 1.5	n.d.	0
U17		73.8 ± 2.7	15.7 ± 1.7	n.d.	0

***Tabella 2**. Dati biologici ottenuti sui PROTAC **U14-U17**.*[48]

Il trend di attività osservato per questi 4 PROTAC è esattamente identico ai 17 PROTAC sintetizzati in un progetto precedente. La maggior parte dei 21 composti contenenti l'anello triazolico nel *linker* sono quindi risultati citotossici, ma non degradano la NAMPT.

3.2 Sintesi e risultati biologici di PROTAC NAMPT-VHL e PROTAC NAMPT-CRBN con *linker* alcanici senza triazolo

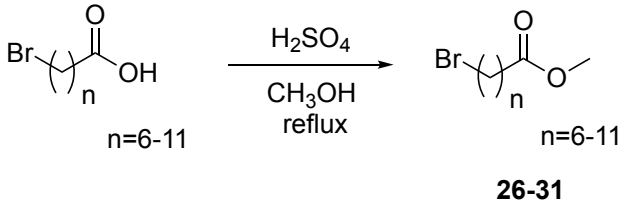
A fronte di questi risultati, abbiamo deciso di sintetizzare una nuova serie di PROTAC che reclutano sia VHL che CRBN utilizzando, però, dei *linker* alcanici privi di anello triazolico. L'approccio sintetico utilizzato è raffigurato nello **Schema 9**.



Schema 9. *Approccio utilizzato per la sintesi di PROTAC NAMPT-VHL e NAMPT-CRBN senza triazolo nel linker.*[48]

3.2.1 Preparazione dei *linker* alcanici

Gli esteri metilici **26-31** sono stati ottenuti a partire dai rispettivi bromoacidi commerciali per esterificazione di Fischer in metanolo in ambiente acido a riflusso. (**Schema 10**).



Schema 10. *Esterificazione di Fischer*.

Di seguito sono riportate le strutture degli esteri metilici **26-31** con le rispettive rese (**Figura 20**).

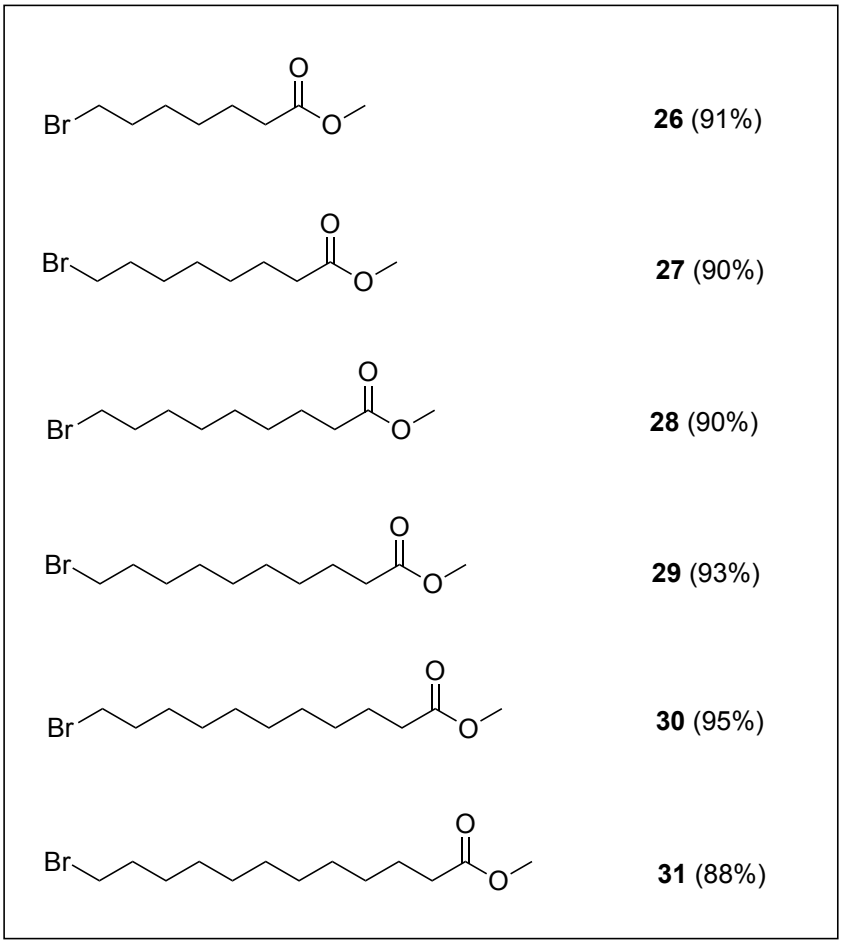
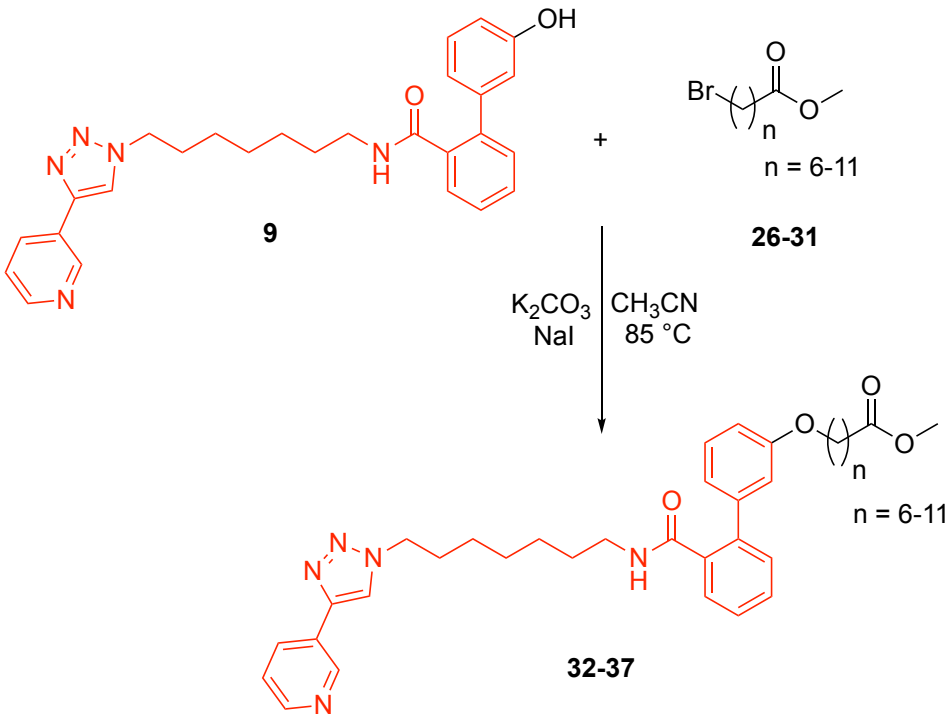


Figura 20. *Libreria degli esteri metilici* ***26-31***.

3.2.2 Assemblaggio dei PROTAC NAMPT-VHL

In seguito a esterificazione, i *linker* sono stati fatti reagire con il *warhead* **9** attraverso una reazione di eterificazione di Williamson condotta in ambiente basico utilizzando K_2CO_3 come base e NaI catalitico in acetonitrile a 85 °C (**Schema 11**); questo ha permesso di ottenere gli intermedi eterei **32-37** rappresentati in **Figura 21** con le rispettive rese.



Schema 11. *Reazione di Williamson impiegata per ottenere gli intermedi eterei* ***32-37***.

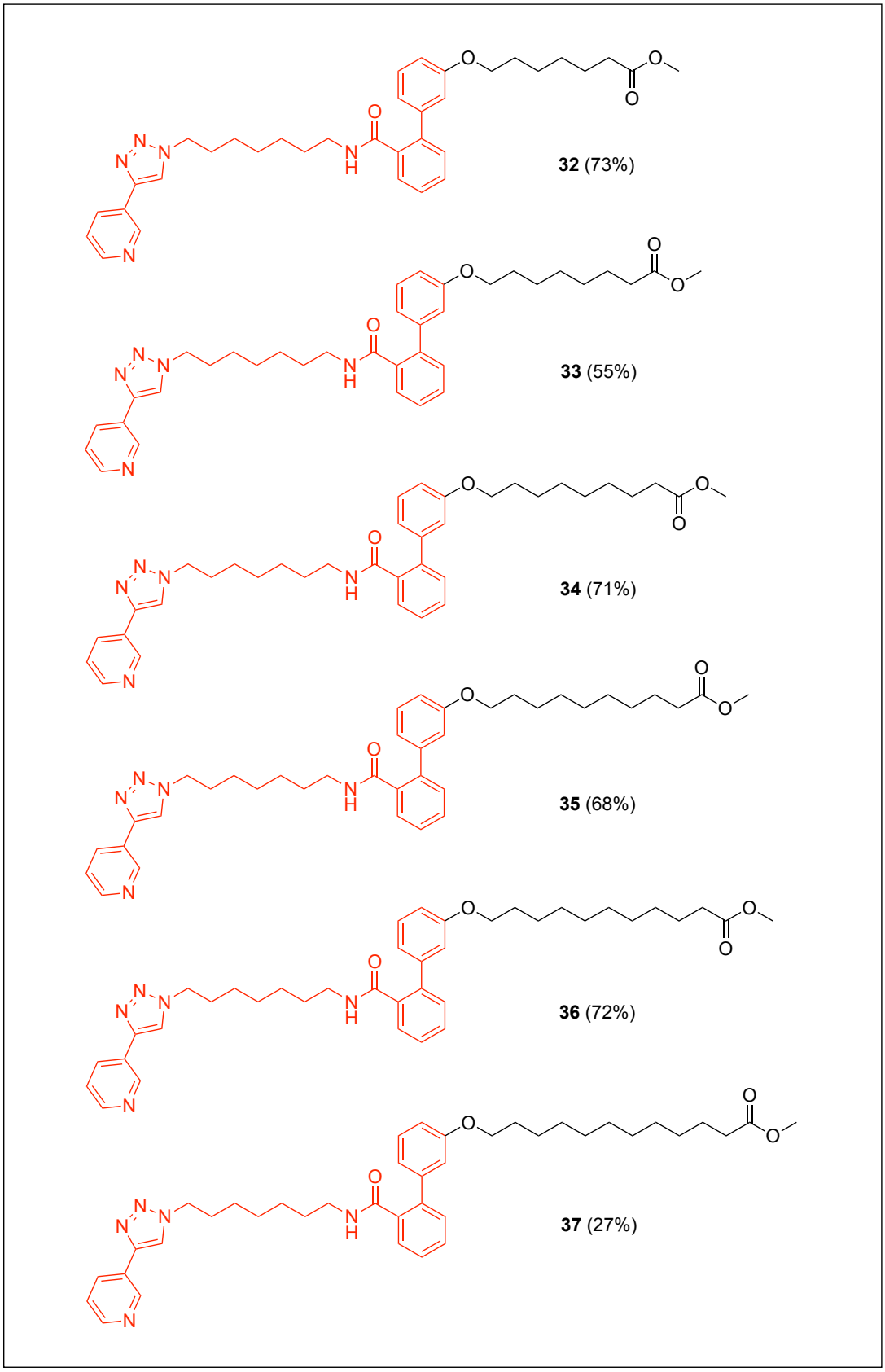
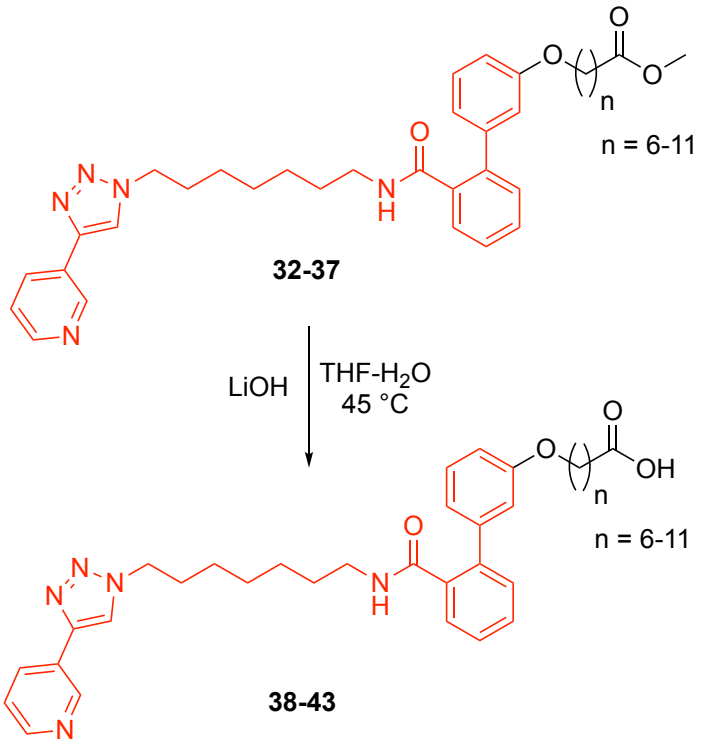


Figura 21. *Intermedi eterei* ***32-37***.

Successivamente, questi intermedi sono stati idrolizzati in ambiente basico con LiOH, lavorando in una miscela di THF:H_2O in rapporto 1:1 per ottenere i corrispondenti acidi carbossilici (**Schema 12**).



Schema 12. *Idrolisi basica per ottenere gli acidi carbossilici **38-43**.*

Gli intermedi acidi **38-43** sono raffigurati in **Figura 22** con le rispettive rese.

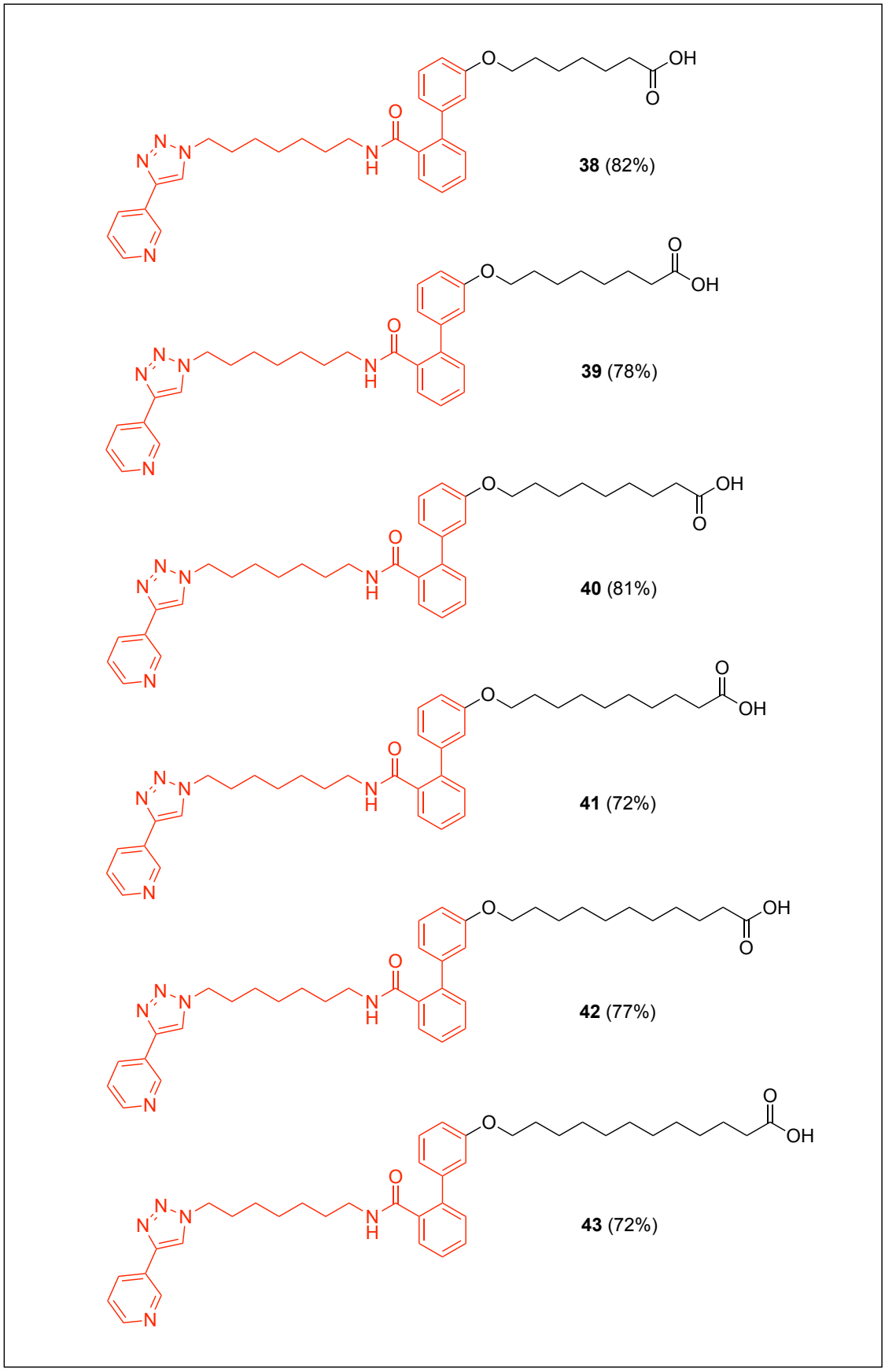
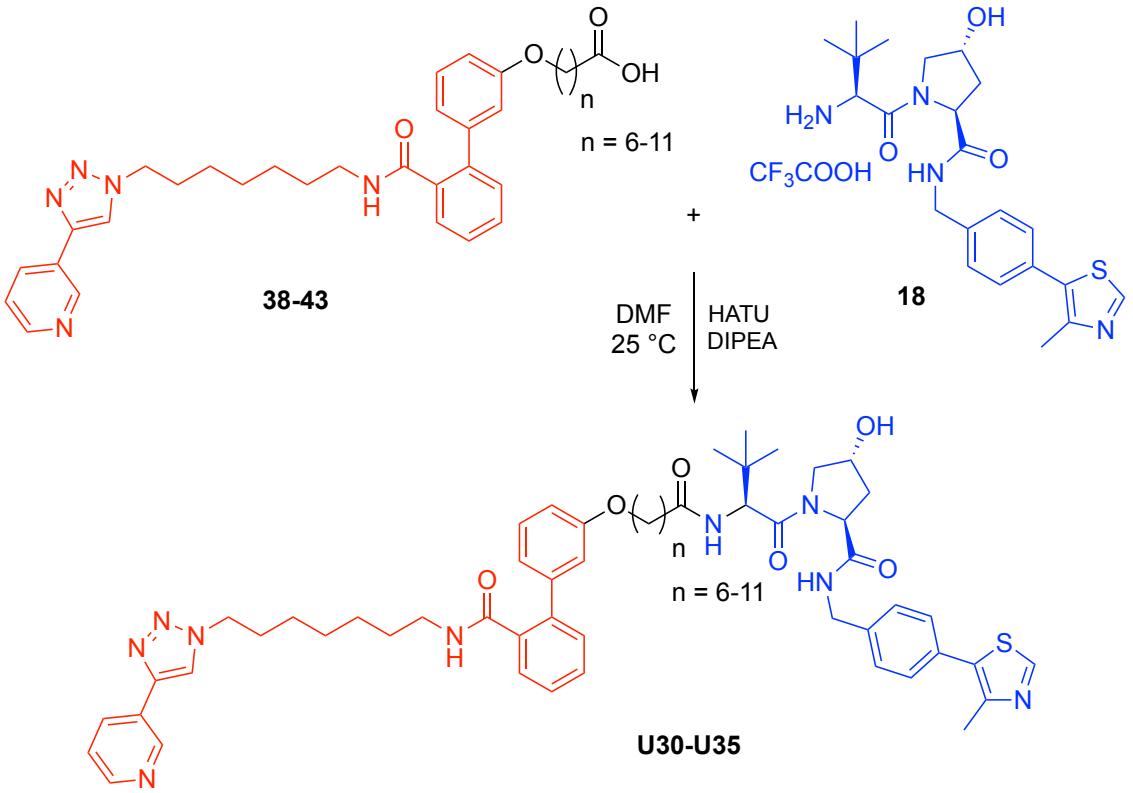


Figura 22. *Intermedi acidi* ***38-43***.

L'ultimo passaggio riguarda un *coupling* ammidico tra gli intermedi acidi **38-43** ottenuti e il ligando di VHL **18** utilizzando HATU come agente condensante e DIPEA come base, in DMF a temperatura ambiente, portando ai PROTAC finali (**Schema 13**).



Schema 13. *Coupling ammidico per ottenere i PROTAC **U30-U35**.*

I PROTAC **U30-U35** sono rappresentati nella **Figura 23** con le rispettive rese.

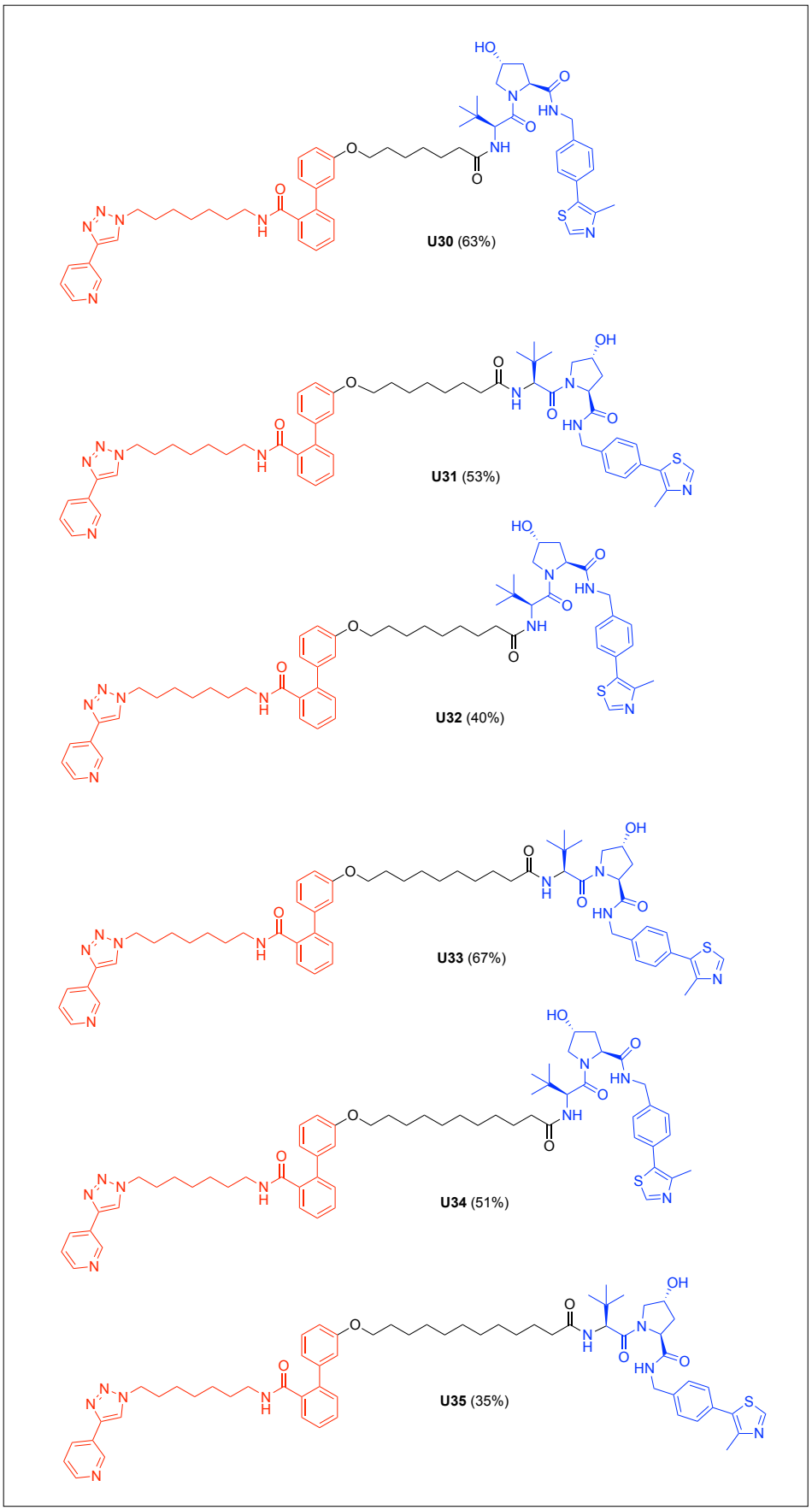
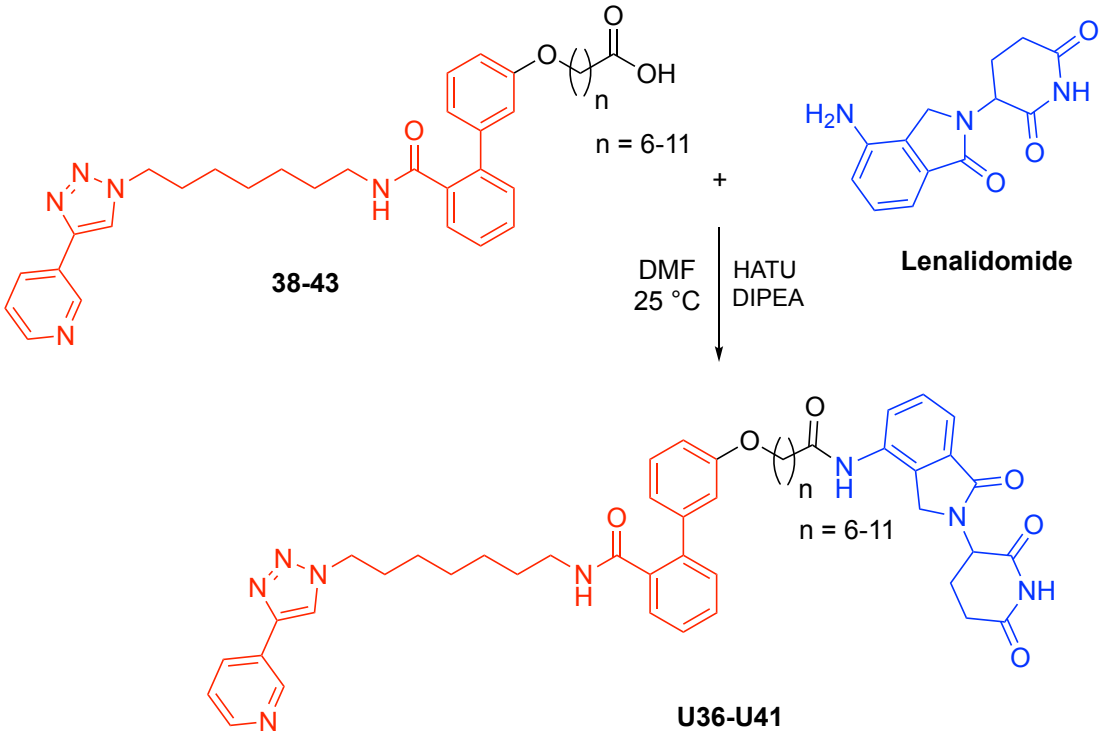


Figura 23. *Struttura chimica dei PROTAC NAMPT-VHL senza triazolo* ***U30-U35***.

Analogamente a quanto descritto per la serie PROTAC NAMPT-VHL, anche i PROTAC NAMPT-CRBN sono stati ottenuti seguendo lo stesso approccio sintetico; tuttavia, in questo caso, come ligando per il reclutamento della E3 ligasi è stata utilizzata la lenalidomide commerciale, nota per la sua affinità per CRBN (**Schema 14**).



Schema 14. *Coupling ammidico per ottenere i PROTAC **U36-U41**.*

In **Figura 24** sono rappresentati i PROTAC NAMPT-CRBN **U36-U41** con le rispettive rese.

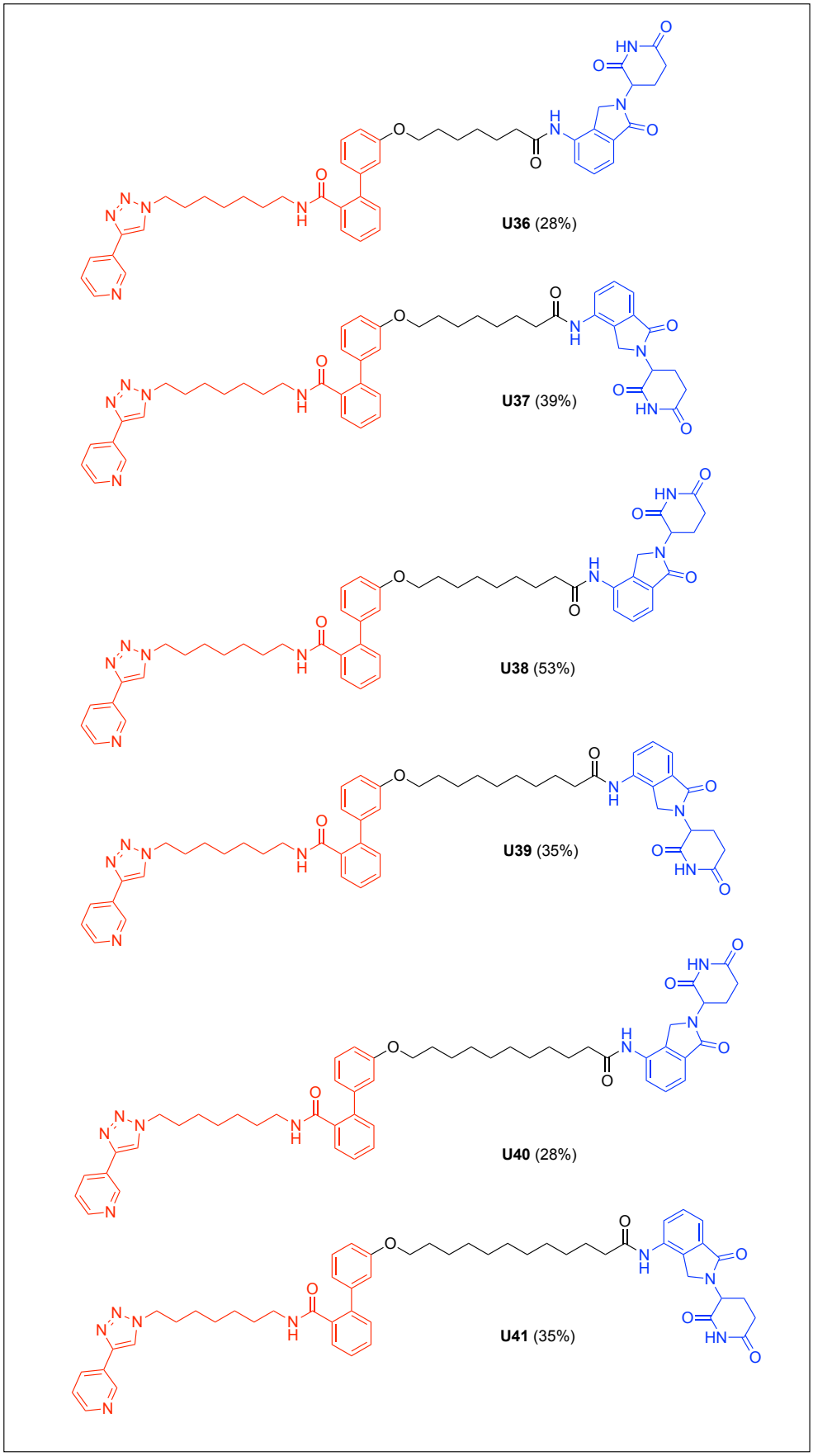
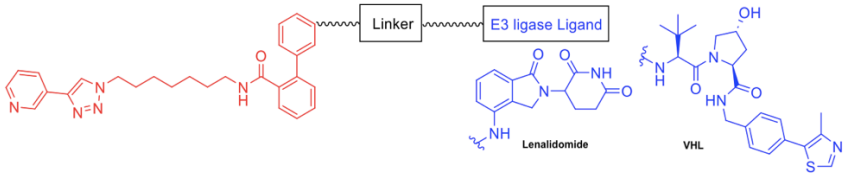
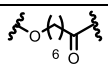
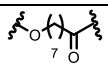
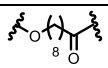
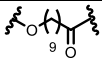
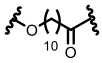
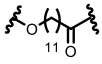
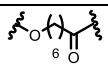
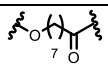
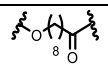
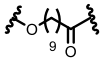


Figura 24. *Struttura chimica dei PROTAC NAMPT-CRBN* ***U36-U41***.

3.2.3 Risultati biologici

L'attività biologica dei 12 PROTAC **U30-U41** è stata valutata adottando lo stesso protocollo sperimentale descritto in precedenza. I dati riportati in **Tabella 3** mostrano che, tra i composti privi di gruppo triazolico nel *linker*, alcuni sono in grado di degradare la NAMPT, in particolare **U31** si è distinto sia come potente agente citotossico sia come migliore *degrader* di NAMPT.



Cpd	Ligando E3 ligasi	Linker	Vitalità (%) 1 µM	Vitalità (%) 10 µM	DC_{50} (nM)	D_{max} (%) 1 µM
U30	VHL		14.2 ± 1.1	12.8 ± 0.9	n.d.	0
U31	VHL		12.3 ± 0.3	13.2 ± 1.2	87	60
U32	VHL		63.2 ± 2.6	17.7 ± 0.2	n.d.	45
U33	VHL		31.8 ± 2.9	11.9 ± 0.6	n.d.	0
U34	VHL		69.3 ± 1.2	22.4 ± 0.7	n.d.	0
U35	VHL		72.9 ± 9.6	38.5 ± 1.9	n.d.	35
U36	Lena		75.8 ± 4.5	14.3 ± 1.7	n.d.	0
U37	Lena		109.8 ± 8.4	20.2 ± 0.4	n.d.	15
U38	Lena		101.7 ± 10.6	18.7 ± 0.3	n.d.	15
U39	Lena		67.9 ± 3.8	10.7 ± 0.1	n.d.	0

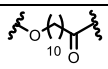
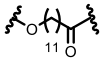
U40	Lena		89.4 ± 2.0	35.8 ± 0.3	n.d.	0
U41	Lena		109.9 ± 6.5	20.9 ± 1.2	n.d.	35

***Tabella 3**. Dati biologici ottenuti sui PROTAC **U30-U41**.*[48]

Il gruppo di farmacologia ha effettuato curve dose-risposta su **U31**, trattando le cellule con concentrazioni comprese tra 30 nM e 3 µM per 18 ore e misurando il grado di degradazione di NAMPT. Questi test sono stati eseguiti su cellule MCF7 e su un clone particolarmente invasivo e aggressivo di cellule 4T1 di carcinoma mammario triplo-negativo (4T1 clone 5) (**Figura 25**).

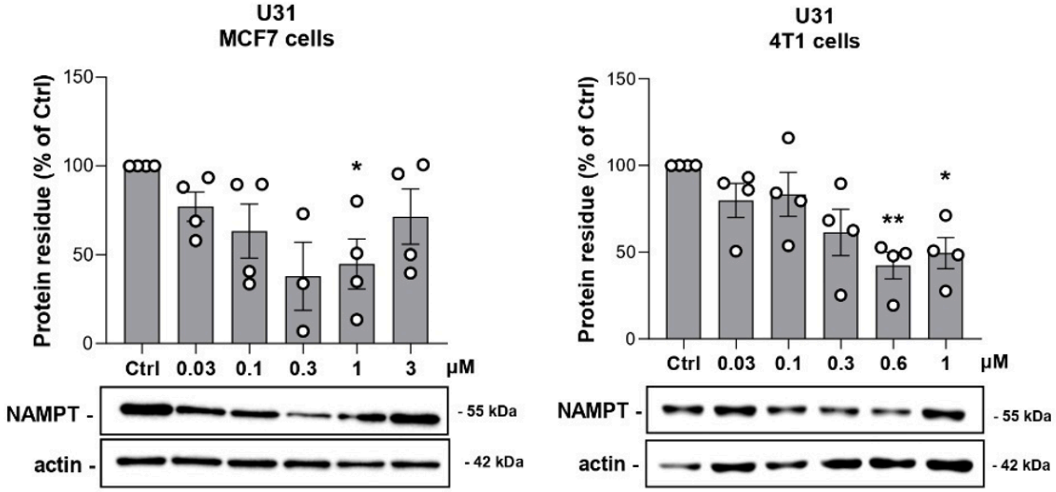


***Figura 25**. Quantificazione della degradazione della NAMPT di **U31** su linee cellulari MCF7 e 4T1.*[48]

Il composto ha mostrato un *hook effect* a concentrazioni superiori a 1 µM. Escludendo dal calcolo le concentrazioni influenzate da questo effetto, i valori DC_{50} ottenuti per **U31** sono stati 107 nM nelle celule MCF7 e 350 nM nelle cellule 4T1, confermando che **U31** rappresenta il degradatore di NAMPT più potente tra i PROTAC sintetizzati.[48]

Successivamente, è stata valutata l'attività citotossica di **U31**, il valore di IC_{50} su MCF7 è stato 550 ± 0,04 e su 4T1 687 ± 0,03 nM. Questi dati confermano la citotossicità elevata di **U31** tra i composti sintetizzati.[48]

Per verificare che il meccanismo d'azione di **U31** fosse effettivamente mediato dalla E3 ligasi e dal proteasoma, è stato eseguito un test sia in presenza che in assenza dell'inibitore

del proteasoma bortezomib (300 nM), utilizzando entrambe le linee cellulari MCF7 e 4T1.[48] In entrambi i casi l'inibizione del proteasoma ha bloccato la degradazione di NAMPT indotta da **U31**, un risultato che conferma la nostra ipotesi (**Figura 26**).

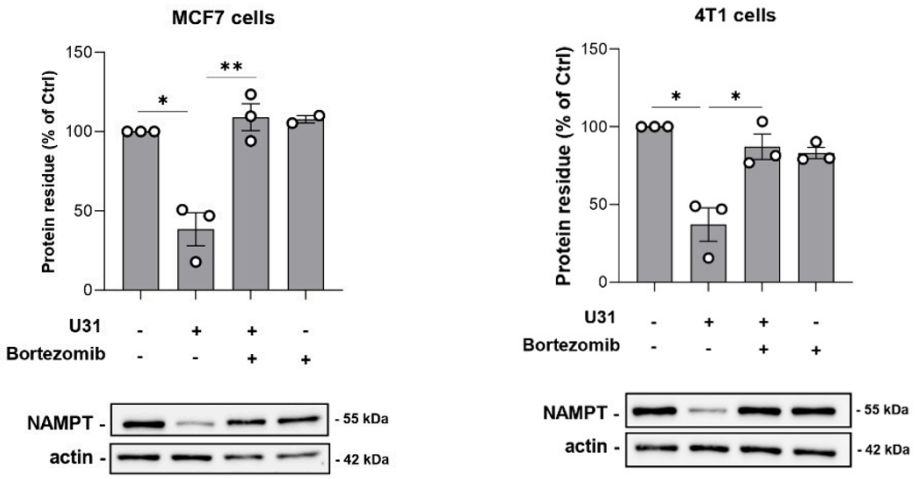
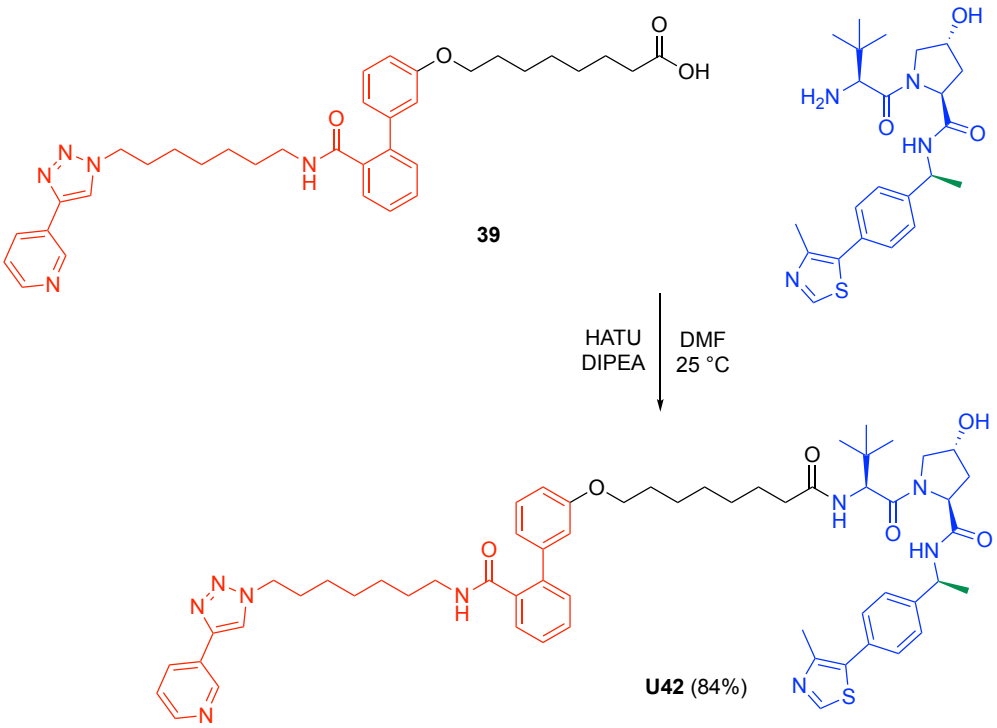


***Figura 26**. Quantificazione della degradazione di NAMPT di **U31** su linee cellulari MCF7 e 4T1 trattate per 18 ore con e senza bortezomib o in combinazione.[48]*

In letteratura è stato dimostrato che l'introduzione stereoselettiva di un gruppo (*S*)-metilico in posizione benzilica sul ligando VHL aumenta in modo significativo la sua affinità di legame per la VHL E3 ligasi.[56] Partendo da questo presupposto abbiamo deciso di sintetizzare una versione metilata di **U31**, denominata **U42**, ottenuta tramite l'accoppiamento dell'intermedio carbossilico **39** e il ligando VHL metilato in configurazione (*S*) commerciale (**Schema 15**).



Schema 15. *Coupling ammidico per la sintesi di* ***U42***.

La curva dose-risposta eseguita per **U42** su un intervallo di concentrazioni comprese tra 30 nM e 1 µM ha messo in luce un netto miglioramento in termini di efficienza degradativa: infatti **U42** promuove una maggiore degradazione di NAMPT rispetto a **U31**, con valori di DC_{50} pari a 45 nM nelle cellule MCF7 e a 55 nM nelle cellule 4T1 (**Figura 27**).[48]

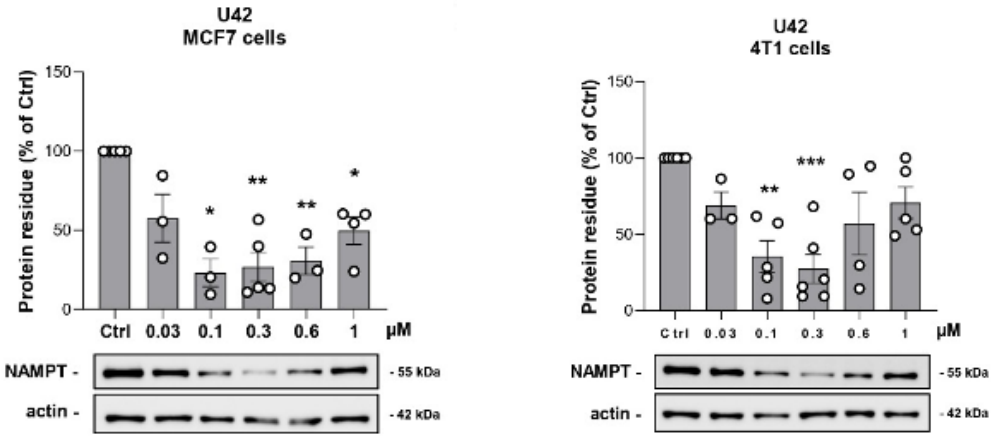


Figura 27. *Quantificazione della degradazione della NAMPT di* ***U42*** *su linee cellulari MCF7 e 4T1.*[48]

Conseguentemente **U42** ha mostrato un maggior effetto citotossico con IC_{50} di 110 ± 0.01 nM in MCF7 e 157 ± 0.04 nM in 4T1 (**Figura 28**).

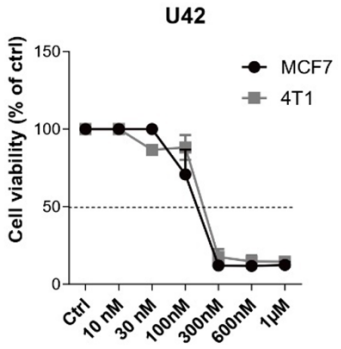


Figura 28. *Saggio di vitalità cellulare di **U42** su MCF7 e 4T1.*[48]

Successivamente, è stata esplorata la capacità di **U42** di reclutare la VHL E3 ligasi. Per validare il ruolo di VHL nel mediare il *binding* alla E3 ligasi è stata sintetizzata una versione inattiva di **U42**. Dal momento che la stereochimica del gruppo idrossilico sulla prolina è cruciale per il legame con la VHL,[57] il controllo negativo **U42-NC** è stato sintetizzato utilizzando un ligando inattivo di VHL, rappresentato dal diasteroisomero (*S*)-idrossiprolinico commerciale. Come mostrato in **Figura 29**, **U42-NC** ha fallito nel degradare la NAMPT in entrambe le linee cellulari.[48]

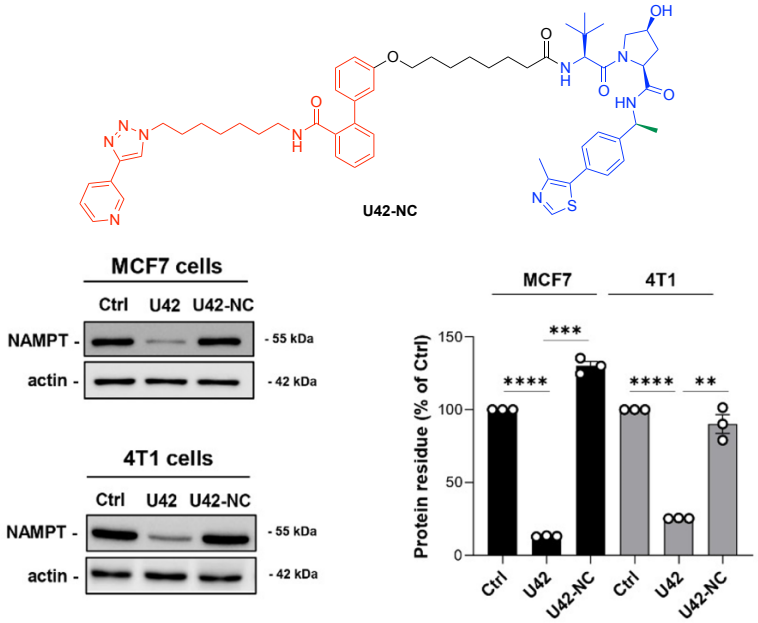


Figura 29. *Struttura chimica del controllo negativo **U42-NC** e quantificazione della degradazione di NAMPT in entrambe le linee cellulari trattate con **U42 e U42-NC**.*[48]

Il composto **U42** ha dimostrato una spiccata efficacia nell'indurre la degradazione della NAMPT extracellulare sulle linee MCF7 e 4T1 ed è stato anche sottoposto a studio di stabilità metabolica *in vitro*, evidenziando una notevole resistenza sia ai microsomi epatici murini che umani (> del 90%).[48]

Nello specifico, **U42** ha mostrato un'emivita compresa tra 52,5 e 55,7 minuti, rispettivamente nel topo e nell'uomo. Sulla base di questi dati è stato condotto uno studio farmacocinetico preliminare *in vivo* nel topo, somministrando il composto per via intraperitoneale a 20 mg/kg (**Tabella 4**).[48]

***In vitro* metabolic stability data**[a]			**U42**
	% residue after 60 min incubation		
Phosphate buffer pH=7.4			>99%
Mouse plasma			92%
Human plasma			>99%
MLM			>99%
U42[b]			
MLM $t_{1/2}$ (min)	52.5	HLM $t_{1/2}$ (min)	55.7
MLM CL *in vitro* ($\mu L\ min^{-1}\ mg^{-1}$)	13.2	HLM CL *in vitro* ($\mu L\ min^{-1}\ mg^{-1}$)	12.4
***In vivo* PK data**[c]			**U42**
$t_{1/2}$ (h)			1.6
T_{max} (h)			0.5
C_{max} ($\mu g\ L^{-1}$)			178.9
AUC $_{0\text{-}t}$ ($\mu g\ L^{-1}\ h^{-1}$)			412.1
CL/F ($L\ h^{-1}\ Kg^{-1}$)			48.5

***Tabella 4**. Stabilità metabolica in vitro e parametri farmacocinetici in vivo di **U42**.*[48]

4. Conclusione e sviluppi futuri

In questo progetto di tesi sono stati sintetizzati 4 PROTAC NAMPT-VHL con un anello triazolico nel *linker* per completare uno studio di SAR precedentemente iniziato. Molti composti di questa prima serie di PROTAC sono risultati citotossici, ma nessuno in grado di degradare la NAMPT.[48]

Successivamente, sono stati sintetizzati 12 PROTAC capaci di reclutare CRBN e VHL utilizzando *linker* alcanici senza triazolo; tra questi **U31** e la sua versione ottimizzata **U42** si sono distinti per la maggiore attività degradativa.[48]

Per razionalizzare a livello strutturale questa differenza di attività tra *linker* con anello triazolico e non, **U31** e il suo analogo triazolico **U14** sono stati confrontati mediante *molecular modeling.* Le simulazioni di dinamica molecolare hanno mostrato che il complesso ternario NAMPT-PROTAC-VHL rimane stabile con **U31**, mentre con **U14** va incontro a una progressiva perdita di interazione tra le due proteine. La rigidità introdotta dal triazolo compromette la capacità del *linker* di mantenere nel tempo il contatto tra target ed E3 ligasi, spiegando perché l'inibizione di NAMPT da sola non basti a garantirne la degradazione.

In conclusione, i dati raccolti in questo lavoro di tesi rafforzano l'ipotesi di proseguire lo sviluppo di PROTAC diretti contro NAMPT come possibile strategia terapeutica nel tumore mammario.

I futuri sviluppi di questo progetto prevedono la valutazione del PROTAC **U42** in modelli *in vivo*. Parallelamente, l'attenzione sarà rivolta al miglioramento della selettività, attraverso la progettazione di PROTAC attivabili solo nel microambiente tumorale.

5. Materiali e metodi

I reagenti e i solventi disponibili commercialmente (Merck, Fluorochem, Carlo Erba, Alfa Aesar) sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione.

Quando necessario, le reazioni sono state effettuate in vetreria anidrificata con pistola termica o essiccata in stufa, sotto pressione positiva di azoto anidro.

L'agente anidrificante utilizzato per le fasi organiche è Na_2SO_4 anidro.

I punti di fusione sono stati determinati utilizzando lo strumento Stuart Scientific SMP3 e i valori riportati non sono stati corretti.

Gli spettri di massa sono stati registrati su spettrometro di massa Thermo Finningan LCQ-deca XP-plus utilizzando una sorgente ESI.

Gli spettri ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR (APT) sono stati eseguiti a temperatura ambiente su strumento Bruker Avance Neo 400 MHz e i chemical shifts sono indicati in parti per milione (ppm).

Gli spettri IR sono stati registrati su spettrofotometro FT-IR Bruker Alpha II.

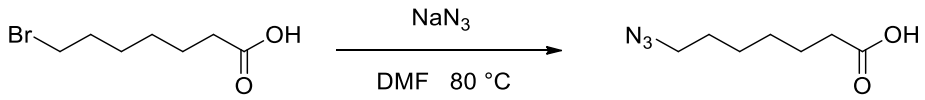
Per la flash cromatografia è stato usato gel di silice (Merck Kieselgel 60, 230-400 mesh-ASTM).

Per la cromatografia su strato sottile (TLC) sono state utilizzate lastrine 5 x 20 cm con spessore di 0.25 mm, rivestite di gel di silice (Merck Silica gel 60 F_{254}).

Quando necessario, i prodotti sono stati rivelati utilizzando una soluzione di $KMnO_4$ (ottenuta miscelando una soluzione di 2 g di $KMnO_4$ in 100 mL di acqua distillata con una soluzione di 4 g di $NaHCO_3$ in 100 mL di acqua distillata).

5.1 Preparazione del *warhead* (ligando NAMPT)

Sintesi dell'acido 7-azidoeptanoico (2)

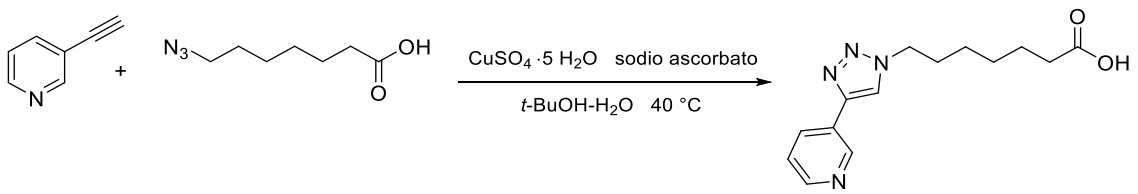


A una soluzione di acido 7-bromoeptanoico (1 eq) solubilizzato in DMF (0.4 M), posta sotto agitazione magnetica, si aggiunge NaN_3 (1.2 eq) e si lascia reagire a 80 °C per una notte. Al termine della reazione si aggiunge acqua e il prodotto desiderato viene estratto con etere etilico (x3). Le fasi organiche riunite sono lavate con acqua (x3), brine (x1), anidrificate con Na_2SO_4 anidro e concentrate sottovuoto per dare l'azide, che viene usata nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Formula bruta: $C_7H_{13}N_3O_2$
Resa: 94%
Stato fisico: olio incolore
Peso molecolare: 171

IR (KBr) 2950, 2870, 2095, 1712, 1424, 1258, 665 cm^{-1};
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 11.55 (br s, 1H), 3.14 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.22 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.56-1.45 (m, 4H), 1.30-1.24 (m, 4H) ppm;
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 178.3, 51.1, 33.7, 28.5, 28.4, 26.2, 24.4 ppm.

Sintesi dell'acido 7-(4-(piridin-3-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)eptanoico (3)

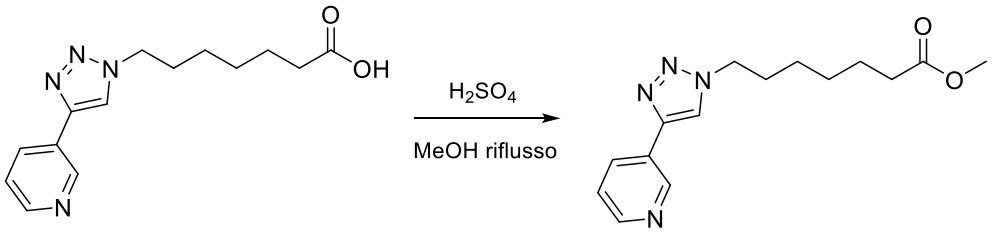


La 3-etinilpiridina (1 eq) e l'acido 7-azidoeptanoico (1 eq) vengono sospesi in una miscela di acqua-*tert*-butanolo 1:1 (0.08 M). Dopo aggiunta di una soluzione acquosa di sodio ascorbato 1 M preparata fresca (0.1 eq) e di $CuSO_4$ $5H_2O$ (0.01 eq), si scalda a 40 °C per 24 h sotto vigorosa agitazione. La miscela di reazione viene diluita con acqua, raffreddata in ghiaccio, il precipitato ottenuto viene raccolto per filtrazione, lavato con etere etilico ed essiccato sottovuoto. Si ottiene un solido giallino amorfo con una resa del 90%.

Formula bruta: $C_{14}H_{18}N_4O_2$
Resa: 90%
Stato fisico: solido giallino amorfo
Peso molecolare: 274

IR (KBr) 3560, 2975, 1715, 1420, 1055, 1030, 815 cm^{-1};
^{1}H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 11.80 (br s, 1H), 9.03 (br s, 2H), 8.60 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.60 (br s, 1H), 4.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.30 (br s, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.53 (br s, 2H), 1.25 (br s, 4H) ppm;
^{13}C NMR (75 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 182.5, 147.9, 147.5, 145.8, 134.3, 133.2, 130.3, 124.2, 51.9, 37.6, 31.6, 29.9, 27.8, 25.6 ppm.

Sintesi del metil 7-(4-(piridin-3-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)eptanoato (4)



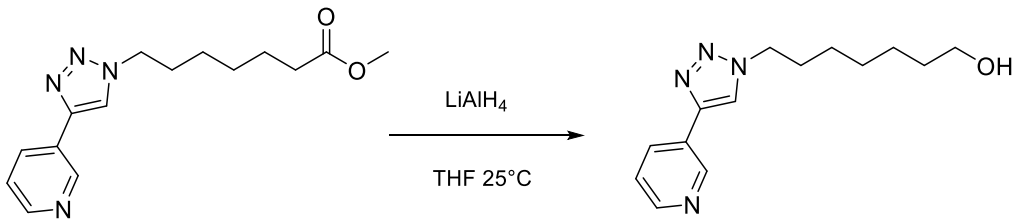
All'acido 7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptanoico (1 eq) sciolto in metanolo (0.4 M) viene addizionato H_2SO_4 96% p/p (1.1 eq) e si scalda a riflusso. Trascorse 2 ore si evapora il solvente sottovuoto. Il residuo ottenuto viene diluito con una soluzione acquosa satura di $NaHCO_3$ ed estratto con EtOAc (x3). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine, anidrificate su sodio Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Si

ottiene l'estere metilico che viene usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Formula bruta: $C_{15}H_{20}N_4O_2$
Resa: 85%
Stato fisico: solido bianco
Peso molecolare: 288
Punto di fusione: 74-75 °C

IR (KBr) 2942, 1732, 1442, 1053, 1032, 806 cm^{-1};
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.90 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.0/5.0 Hz, 1H), 4.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.52 (s, 3H), 2.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.84 (br quint, 2H), 1.49 (br quint, 2H), 1.27-1.22 (m, 4H) ppm;
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 175.2, 150.6, 148.4, 146.1, 134.5, 128.4, 125.3, 121.6, 53.0, 51.9, 35.3, 31.6, 29.9, 27.6, 26.1 ppm.

Sintesi del 7-(4-(piridin-3-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)eptan-1-olo (5)



A una soluzione di metil 7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptanoato (1 eq) in THF anidro (0.2 M), raffreddata a 0 °C e posta sotto agitazione magnetica in atmosfera di N_2, si aggiunge a piccole porzioni $LiAlH_4$ (1.5 eq). La miscela di reazione viene portata a temperatura ambiente e lasciata reagire per 30 minuti. La reazione viene spenta gocciolando lentamente una soluzione di NaOH 2 M sotto agitazione a 0 °C. La sospensione ottenuta viene filtrata sottovuoto e il precipitato viene lavato con MeOH. Il filtrato ottenuto viene concentrato sottovuoto e il residuo purificato per flash cromatografia DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 95:5 per ottenere l'alcol desiderato.

Formula bruta: $C_{14}H_{20}N_4$

Resa: 98%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 260

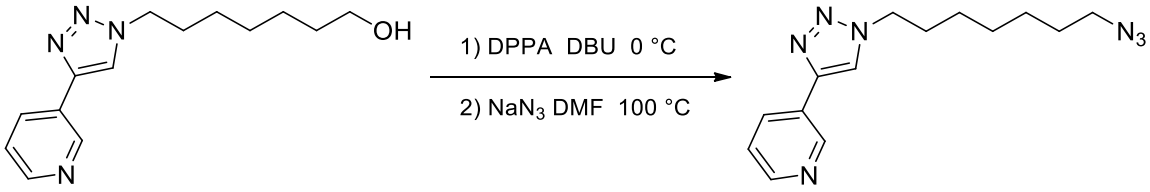
Punto di fusione: 96-97 °C

IR (KBr) 3268, 2933, 1455, 1056, 705 cm^{-1};

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.93 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.48 (dd, *J* = 4.6/1.5 Hz, 1H), 8.13 (dt, *J* = 8.0/1.8 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.31 (dd, *J* = 8.0/4.9 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.94 (br s, 1H), 1.90 (br quint, 2H), 1.49 (br quint, 2H) 1.31 (br s, 6H) ppm;

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 150.5, 148.4, 146.2, 134.6, 128.5, 125.4, 121.6, 64.0, 52.1, 34.1, 31.7, 30.3, 27.9, 27.1 ppm.

Sintesi della 3-(1-(7-azidoeptil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)piridina (6)



A una soluzione di 7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptan-1-olo (1 eq) in DMF (0.4 M), posta sotto agitazione magnetica, atmosfera di N_2 e raffreddata a 0 °C, si aggiungono DPPA (2 eq) e DBU (2 eq). Trascorsi 30 minuti si aggiunge NaN_3 (2 eq) e si scalda a 100 °C per 3 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, si diluisce con acqua e si estrae con etere etilico (x3). Le fasi organiche riunite vengono lavate con acqua (x2), brine (x1), anidrificate su Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo viene purificato per flash cromatografia, utilizzando come eluente PE/EtOAc 2:8.

Formula bruta: $C_{14}H_{19}N_7$

Resa: 90%

Stato fisico: olio giallino

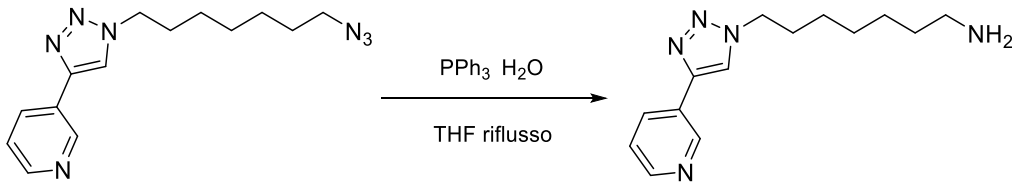
Peso molecolare: 285

IR (KBr) 2934, 2858, 2094, 1589, 1488, 1187, 970 cm^{-1};

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.96 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.48 (dd, *J* = 3.4/1.2 Hz, 1H), 8.14 (dt, *J* = 8.0/1.8 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.30 (dd, *J* = 8.0/4.9 Hz,1H), 4.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.15 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.87 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.48 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.28 (br s, 6H) ppm;

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 150.1, 148.1, 145.9, 134.9, 128.7, 125.5, 121.8, 52.8, 52.0, 31.7, 30.2, 30.0, 28.0, 27.8 ppm.

Sintesi della 7-(4-(piridin-3-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)eptan-1-ammina (7)



A una soluzione della 3-(1-(7-azidoeptil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridina (1 eq) in THF (0.3 M), posta sotto agitazione magnetica, si aggiunge acqua (6 eq) e trifenilfosfina (1.5 eq). La miscela di reazione viene riscaldata a riflusso e lasciata reagire per 3 ore. A reazione terminata il solvente viene evaporato sottovuoto e il residuo ottenuto viene purificato per flash cromatografia, utilizzando come eluenti EtOAc/MeOH 7:3 + 2% NH_3 e EtOAc/MeOH 5:5 + 2% NH_3.

Formula bruta: $C_{14}H_{21}N_5$

Resa: 64%

Stato fisico: solido bianco

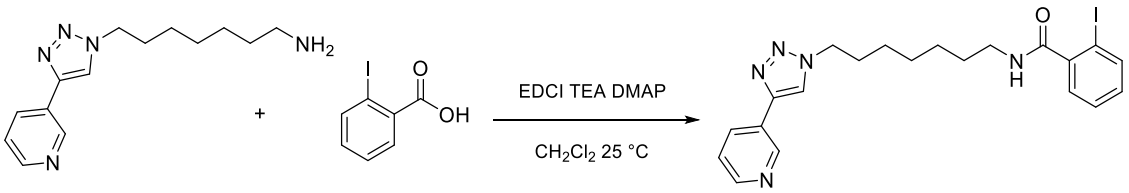
Peso molecolare: 259

Punto di fusione: 89-91 °C

IR (KBr) 2926, 2849, 1560, 1474, 1027, 808 cm^{-1};

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.96 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 8.51 (dd, *J* = 4.9/1.5 Hz, 1H), 8.16 (dt, *J* = 8.0/1.5 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.34-7.31 (m, 1H), 4.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.34 (br s, 2H), 1.91 (br quint, 2H), 1.40 (br quint, 2H), 1.30 (br s, 6H) ppm;
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 148.9, 146.8, 144.5, 132.9, 126.8, 123.7, 120.1, 50.4, 41.6, 32.6, 30.1, 28.6, 26.5, 26.3 ppm.

Sintesi della 2-iodo-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)benzammide (8)



A una soluzione di 7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptan-1-ammina (0.355 g, 1.37 mmol, 1 eq) in DCM anidro (5 mL), posta sotto agitazione magnetica, in atmosfera di N_2 a temperatura ambiente, si aggiungono in sequenza acido 2-iodobenzoico (0.374 g, 1.51 mmol, 1.1 eq), EDCl (0.340 g, 1.78 mmol, 1.3 eq), TEA (0.762 mL, 4 eq) e DMAP (0.0167, 0.1 eq). La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente tutta la notte. Dopo completamento della reazione si diluisce con acqua e si estrae con DCM (x3). Le fasi organiche riunite vengono lavate con NaOH 2 M (x1), brine (x1), anidrificate su Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo si purifica per flash cromatografia usando come eluente DCM/MeOH 98:2. Il composto viene triturato a 0 °C con EtOAc e successivamente filtrato sottovuoto su Büchner.
Si ottengono 0.294 g di prodotto come solido bianco (resa 83%).

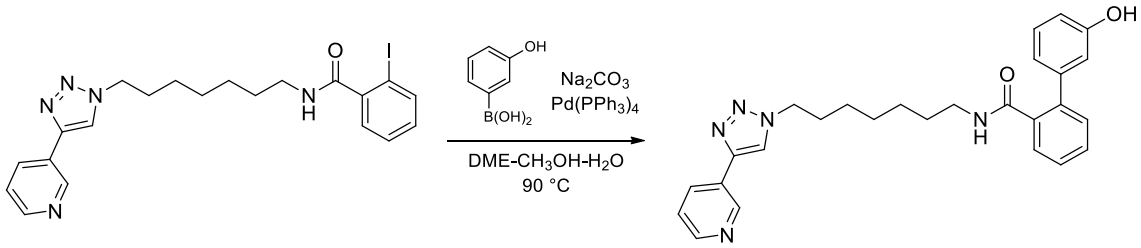
Formula bruta: $C_{21}H_{24}IN_5O$
Resa: 83%
Stato fisico: solido bianco
Peso molecolare: 489
Punto di fusione: 106-108 °C

IR (KBr) 3331, 3120, 2929, 2852, 1631, 1533, 1289, 806, 709 cm^{-1};

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.99 (s, 1H), 8.56 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.86-7.83 (m, 2H), 7.37-7.33 (m, 3H), 7.11-7.05 (m, 1H), 5.79 (br s, 1H), 4.43 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.45 (quart, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.98 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.66-1.61 (m, 4H), 1.42 (br s, 4H) ppm;

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.5, 148.9, 146.8, 144.4, 142.5, 139.5, 132.9, 130.7, 128.0 (2C), 126.8, 123.7, 120.2, 92.5, 50.4, 39.7, 30.1, 29.1, 28.4, 26.6, 26.2 ppm.

Sintesi della 3'-idrossi-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)-[1,1'-bifenil]-2-carbossammide (9)



In uno schlenk si introduce 2-iodo-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)benzammide (1,14 g, 2.35 mmol, 1 eq) e si solubilizza in DME (14 mL) MeOH (8.6 mL) e H_2O (2 mL) per poi aggiungere acido 3-idrossifenilboronico (0.454 g, 3.28 mmol, 1.4 eq), palladio tetrakis (0.407 g, 0.352 mmol, 0.15 eq) e K_2CO_3 (1.29 g, 9.39 mmol, 4 eq). Successivamente si gorgoglia N_2 per 10 minuti per degassare la miscela di reazione. Si lascia reagire sotto atmosfera di N_2 a 90 °C per una notte. Dopo completamento della reazione la miscela di reazione viene filtrata sottovuoto. Il solido viene lavato con MeOH, e poi il filtrato viene evaporato sottovuoto. Il residuo ottenuto viene diluito con acqua, estratto con EtOAc (x2), lavato con brine (x1) e anidrificato su Na_2SO_4 anidro. Si evapora il solvente sottovuoto. Il grezzo di reazione viene purificato mediante colonna cromatografica flash, utilizzando come eluente EtOAc e EtOAc/MeOH 95:5.

Si ottengono 0.901 g di prodotto come solido bianco con l'84% di resa.

Formula bruta: $C_{27}H_{29}N_5O_2$

Resa: 84%

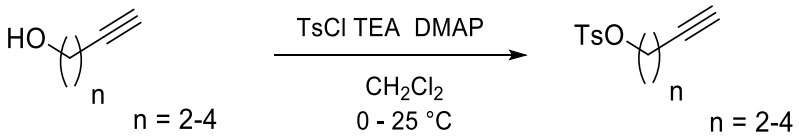
Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 455

HRMS (ESI) *m/z* calcolato per $C_{27}H_{30}N_5O_2$ $[M+H]^+$ 456.23940, trovato 456.23889;
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 9.02 (br s, 1H), 8.51 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.27 (dt, *J* = 8.0/1.8 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.52-7.35 (m, 5H), 7.17 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.88-6.86 (m, 2H), 6.78-6.75 (m, 1H), 4.46 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.14 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.94 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.33-1.28 (m, 6H), 1.07-1.03 (2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 171.5, 157.1, 148.1, 145.8, 143.9, 141.7, 139.8, 136.4, 133.5, 129.7, 129.4, 129.0, 127.4, 127.3, 126.9, 124.2, 121.7, 119.6, 115.3, 114.1, 50.2, 39.3, 29.8, 28.4, 28.3, 26.2, 26.0 ppm.

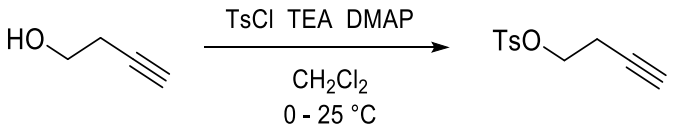
5.2 Preparazione dei *linker* tosilati

Procedura generale (A) per la tosilazione degli alchinoli



A una soluzione del corrispondente alchino commerciale (1 eq) in diclorometano anidro (0.45M), raffreddata a 0 °C si aggiunge TEA (1.5 eq), DMAP (0.05 eq) e tosilcloruro (1.2 eq) a piccole porzioni. Si lascia sotto agitazione a 25 °C in atmosfera di azoto per una notte. Si diluisce la miscela di reazione con acqua e si estrae con diclorometano (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa satura di $NaHCO_3$ (x1), HCl 2M (x1) e brine (x1). Si anidrifica con Na_2SO_4 anidro e si concentra sottovuoto. Il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia.

Sintesi di but-3-in-1-il 4-metilbenzensolfonato (10)

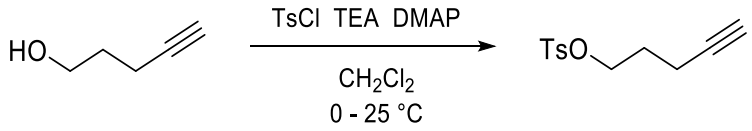


Il composto è stato preparato dal but-3-in-1-olo seguendo la procedura generale A, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti PE/EtOAc 9.5:0.5 e PE/EtOAc 9:1.

Formula bruta: $C_{11}H_{12}O_3S$
Resa: 66%
Stato fisico: olio giallino
Peso molecolare: 224

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.52 (td, *J* = 6.9/2.7 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.97 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H) ppm; **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 143.0, 132.7, 130.0, 127.9, 78.5, 70.9, 67.6, 21.6, 19.4 ppm.

Sintesi di pent-4-in-1-il 4-metilbenzensolfonato (11)

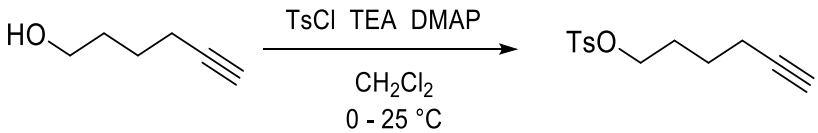


Il composto è stato preparato dal pent-4-in-1-olo seguendo la procedura generale A, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti PE/EtOAc 9.5:0.5 e PE/EtOAc 9:1.

Formula bruta: $C_{12}H_{14}O_3S$
Resa: 90%
Stato fisico: olio giallino
Peso molecolare: 238

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.69 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* =7.3 Hz, 2H), 4.05 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.35 (br s, 3H), 2.16 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.84 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 1.76 (quint, *J* = 6.1 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 144.7, 132.6, 129.7, 127.6, 81.9, 69.4, 68.6, 27.5, 21.4, 14.4 ppm.

Sintesi di es-5-in-1-il 4-metilbenzensolfonato (12)



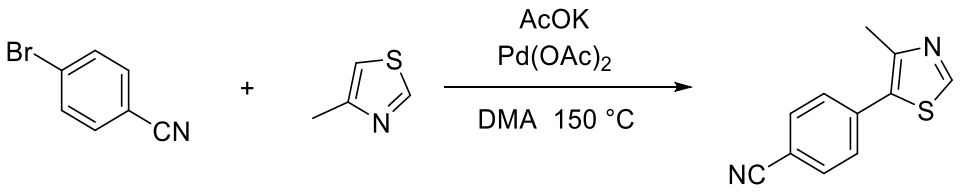
Il composto è stato preparato dal es-5-in-1-olo seguendo la procedura generale A, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti PE/EtOAc 9.5:0.5 e PE/EtOAc 9:1.

Formula bruta: $C_{13}H_{16}O_3S$
Resa: 40%
Stato fisico: olio incolore
Peso molecolare: 252

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.04 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.15 (td, *J* = 7.0/2.6 Hz, 2H), 1.92 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.76 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.54 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 144.8, 133.0, 129.9, 127.8, 83.4, 70.0, 69.0, 27.7, 24.2, 21.6, 17.7 ppm.

5.3 Preparazione del ligando per la VHL E3 ligasi

Sintesi di 4-(4-metiltiazol-5-il)benzonitrile (13)



A una soluzione di 4-bromobenzonitrile (5.00 g, 27.5 mmol, 1 eq) in DMA anidro (50 mL), posta sotto agitazione magnetica in atmosfera di N_2, si aggiunge 4-metiltiazolo (5.45 g, 54.9 mmol, 2 eq), AcOK (5.39 g, 54.94 mmol, 2 eq) e $Pd(OAc)_2$ (61.6 mg, 0.27 mmol, 0.01 eq) e si lascia reagire a 150 °C per 4 ore. A reazione terminata si diluisce con acqua e si estrae con EtOAc (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1) anidrificate su Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia usando come eluente PE/EtOAc 9:1.

Si ottengono 5.62 g di prodotto come solido giallo con una resa del 98%.

Formula bruta: $C_{11}H_8N_2S$

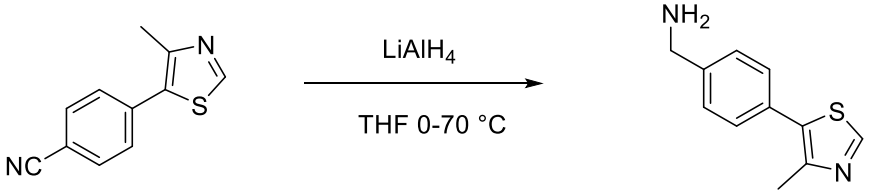
Resa: 98%

Stato fisico: solido giallo

Peso molecolare: 200

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.78 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.59 (s, 3H) ppm.

Sintesi di (4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)metilamina (14)



A una soluzione di 4-(4-metiltiazolo-5-il)benzonitrile (2.00 g, 9.98 mmol, 1eq) in THF anidro (35 mL), posta sotto agitazione magnetica in atmosfera di N_2 e raffreddata a 0°C, si aggiunge a piccole porzioni $LiAlH_4$ (755 mg, 19.9 mmol, 2 eq) e si lascia reagire a 70° C per 5 ore. La reazione viene spenta gocciolando lentamente una soluzione acquosa di NaOH 10% sotto agitazione a 0 °C. La sospensione ottenuta viene filtrata sottovuoto su celite e il precipitato viene lavato con una soluzione di MeOH in DCM. Il filtrato viene concentrato sottovuoto e il residuo viene purificato mediante colonna cromatografica flash usando come eluente EtOAc e EtOAc/MeOH 9:1.

Si ottengono 0.61 g di prodotto come olio giallo con una resa del 30%

Formula bruta: $C_{11}H_{12}N_2S$

Resa: 30%

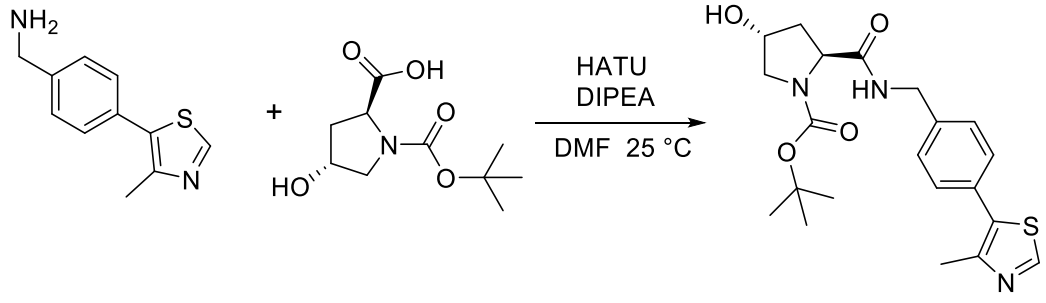
Stato fisico: olio giallo

Peso molecolare: 204

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.89 (s, 1H), 7.46 (m, 4H), 3.86 (s, 2H), 2.50 (s, 3H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 151.4, 147.7, 141.9, 132.0, 130.1, 129.1, 127.8, 44.8, 14.7 ppm.

Sintesi di tert-butil(2S, 4R)-4-idrossi-2-((4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)pirrolidin-1-carbossilato (15)



A una soluzione di (4-(4-metiltiazolo-5-il)fenil)metilamina (930 mg, 4.55 mmol, 1eq) in DMF anidra (47 mL) posta sotto agitazione magnetica in atmosfera di N_2, si aggiunge

acido (2S, 4R)-1-(tert-butossicarbonil)-4-idrossipirrolidina-carbossilico (1.05 g, 4.55 mmol, 1 eq), HATU (2.16 g, 5.69 mmol, 1.25 eq), DIPEA (3.17 mL, 18.2 mmol, 4 eq) e si lascia reagire sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per una notte. Dopo completamento della reazione si diluisce con brine e si estrae con EtOAc (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x2), anidrificate su Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia usando come eluente EtOAc e EtOAc/MeOH 95:5.

Si ottengono 1.57 g di prodotto come solido off-white con una resa dell'83%.

Formula bruta: $C_{21}H_{27}N_3O_4S$

Resa: 83%

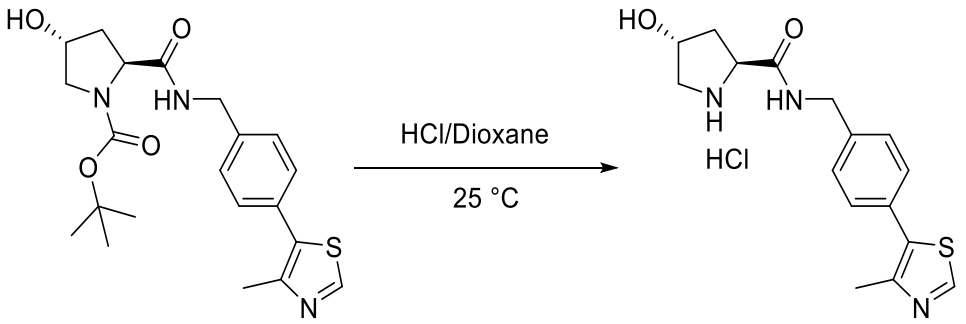
Stato fisico: solido off-white

Peso molecolare: 417

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.88 (s, 1H), 7.44-7.42 (m, 4H), 4.55-4.33 (m, 4H), 3.64-3.50 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.31-2.02 (m, 2H), 1.49-1.34 (m, 9H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 174.2, 154.8, 151.6, 147.7, 138.9, 131.9, 130.5, 129.1, 128.3, 80.2, 68.7, 59.5, 54.7, 42.4, 39.5, 27.2, 14.5 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)pirrolidina-2-carbossamide cloridrato (16)



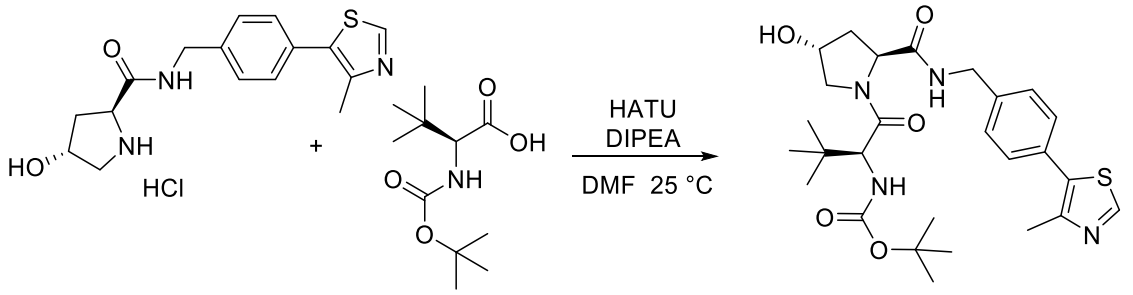
A una soluzione di HCl 4 M in diossano (11.5 mL), posta sotto agitazione magnetica, si aggiunge tert-butil(2S, 4R)-4-idrossi-2-((4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)pirrolidin-1-

carbossilato (1.16 g, 3.65 mmol, 1 eq) e si lascia reagire a temperatura ambiente per un'ora. A reazione terminata il solvente viene evaporato sottovuoto e il residuo ottenuto viene triturato a 0 °C con EtOAc e qualche goccia di MeOH. Successivamente, il composto viene filtratato sottovuoto su Büchner.
Si ottengono 1.18 g di prodotto come solido off-white con una resa del 92%.

Formula bruta: $C_{16}H_{20}ClN_3O_2S$
Resa: 92%
Stato fisico: solido off-white
Peso molecolare: 354

^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 9.33 (br t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.67 (br s, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.44-4.35 (m, 5H), 3.36-3.34 (m, 1H), 3.17-3.11 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.38-2.32 (m, 1H), 1.96-1.89 (m, 1H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 168.5, 151.0, 147.8, 139.0, 131.8, 130.4, 129.5, 128.3, 69.5, 58.4, 53.7, 42.5. 39.2, 16.2 ppm.

Sintesi di *tert*-butil((S)-1-((2S,4R)-4-idrossi-2-((4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)carbamoil)pirrolidin-1-yl)-3,3-dimethil-1-ossobutan-2-il)carbammato (17)



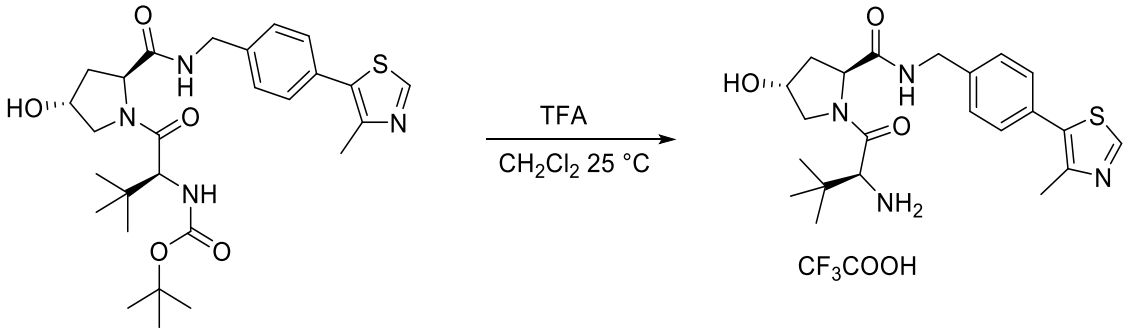
A una soluzione di (2S,4R)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)pirrolidina-2-carbossamide cloridrato in DMF anidra (20mL), posta sotto agitazione magnetica per cinque minuti, si aggiunge acido (S)-2-((*tert*-butossicarbonil)amino)-3,3-dimetilbutanoico (0.37 g, 1.58 mmol, 1 eq) e DIPEA (1.65 mL, 3.16 mmol, 6 equiv). Successivamente si aggiunge HATU (1.20 g, 3.16 mmol, 2 eq) e si lascia reagire a

temperature ambiente in atmosfera di azoto per 6 ore. Dopo completamento della reazione si diluisce con acqua e si estrae con EtOAc (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x2), anidrificate su Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia usando come eluente EtOAc e EtOAc/MeOH 95:5.
Si ottengono 0.48 g di prodotto come solido off-white con una resa del 57%.

Formula bruta: $C_{27}H_{38}N_4O_5S$
Resa: 57%
Stato fisico: solido off-white
Peso molecolare: 530

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.88 (s, 1H), 7.48-7.42 (m, 4H), 4.61 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.52 (br s, 1H), 4.54 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H, AB system), 4.41 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H, AB system) 4.33-4.31 (m, 1H), 3.91-3.80 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.27-2.08 (m, 2H), 9.06 (s, 9H), 1.03 (s, 9H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 173.0, 171.5, 151.0, 147.7, 138.9, 132.0, 130.1, 129.0, 127.6, 79.3, 69.7, 59.4, 59.1, 59.0, 56.6, 42.3, 37.5, 35.4, 27.3, 25.5, 14.4 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-2-amino-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossamide 2,2,2-trifluoroacetato (18)



A una soluzione di *tert*-butil((S)-1-((2S,4R)-4-idrossi-2-((4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)carbamoil)pirrolidin-1-yl)-3,3-dimetil-1-ossobutan-2-il)carbammato (0.48 g, 0.9 mmol, 1eq) in DCM (4 mL), posta sotto agitazione in atmosfera di N_2, si aggiunge

TFA (4 mL). Si lascia reagire a temperatura ambiente per 30 minuti. A reazione terminata si evapora il solvente sottovuoto e il residuo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia usando come eluente EtOAc/MeOH 9:1 e EtOAc/MeOH 8:2.
Si ottengono 0.42 g di prodotto come solido giallo pallido con una resa dell'86%.

Formula bruta: $C_{24}H_{31}F_3N_4O_5S$

Resa: 86%

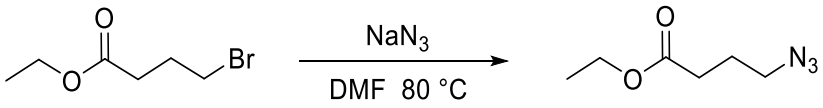
Stato fisico: solido giallo pallido

Peso molecolare: 544

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.89 (s, 1H), 7.51-7.39 (m, 4H), 4.65 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 15.4 Hz, 2H), 4.38 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 3.85-3.70 (m, 3H), 2.49 (s, 3H), 2.26 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 2.12 (ddd, *J*= 13.3/9.1/4.3 Hz, 1H), 1.10 (s, 9H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 172.6, 167.3, 151.5, 147.6, 138.8, 132.0, 130.1, 129.0, 127.5, 69.8, 59.6, 59.0, 56.7, 42.3, 37.6, 34.4, 25.3, 14.4 ppm.

5.4 Preparazione dell'azide

Sintesi di 4-azidobutanoato di etile (19)



A una soluzione di etil-4-bromobutanoato (3.00 g, 15.4 mmol, 1 eq) in DMF (28 mL), posta sotto agitazione magnetica, si aggiunge a piccole porzioni NaN_3 (1.20 g, 15.4 mmol, 1.2 eq) e si lascia reagire a 80 °C per una notte. Dopo completamento della reazione si diluisce con acqua e si estrae con EtOAc (x3). Le fasi organiche riunite vengono lavate con acqua (x2), brine (x1), anidrificate su $NaSO_4$, filtrate e concentrate sottovuoto.
Si ottengono 1.04 g di prodotto come olio incolore con una resa del 43%.

Formula bruta: $C_6H_{11}N_3O_2$

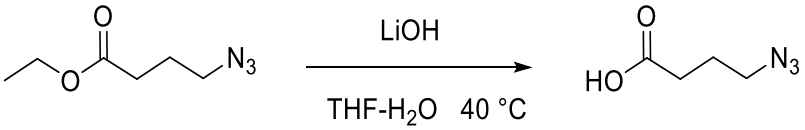
Resa: 43%

Stato fisico: olio incolore

Peso molecolare: 157

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.03 (q, *J* = 4.1 Hz, 2H), 3.25 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.81 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.5, 60.3, 50.5, 31.0, 24.1, 14.0 ppm.

Sintesi di acido 4-azidobutanoico (20)



A una soluzione di 4-azidobutanoato di etile (1.04 g, 6.61 mmol, 1 eq) in una soluzione di THF-acqua 1:1(10 mL), posta sotto agitazione, si aggiunge LiOH (0.48 g, 19.9 mmol. 3 eq) e si scalda a 40 °C per una notte. A reazione terminata si quencha aggiungendo una soluzione acquosa di HCl 3 M (pH ~ 1-2) e si estrae con EtOAc (x4). Le fasi organiche riunite vengono anidrificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto.
Si ottengono 0.83 g di prodotto come olio incolore con una resa del 98%.

Formula bruta: $C_4H_7N_3O_2$

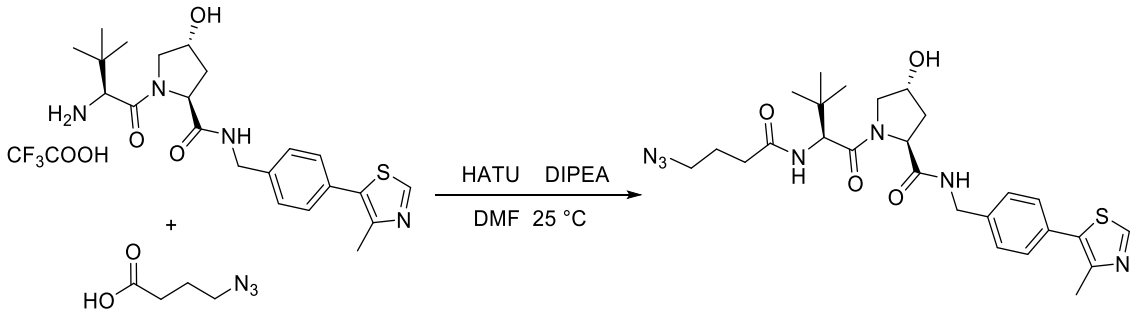
Resa: 98%

Stato fisico: olio incolore

Peso molecolare: 129

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.55 (br s, 1H), 3.36 (t, *J* = 6.72 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 7.28 Hz, 2H), 1.90 (quint, *J* = 6.97 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 179.1, 50.4, 30.9, 23.9 ppm.

Sintesi di (2S,4R*)*-1-((S)-2-(4-azidobutanamido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossamide (21)



A una soluzione di acido 4-azidobutanoico (0.0877 g, 0.680 mmol, 1eq) in DMF anidro (10 mL), si aggiunge DIPEA (0.533 mL, 3.06 mmol, 4.5 eq) e HATU (0.323 g, 0.850 mmol, 1.25 eq) e si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti. Successivamente, si aggiunge a piccole porzioni (2S,4R)-1-((S)-2-amino-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossamide

2,2,2-trifluoroacetato (0.370 g, 0.680 mmol, 1 eq). Dopo completamento della reazione, si diluisce con brine e si estrae con EtOAc (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1), anidrificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia usando come eluente DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 97:3.

Si ottengono 0.266 g di prodotto come solido giallo pallido con una resa del 72%

Formula bruta: $C_{26}H_{35}N_7O_4S$

Resa: 72%

Stato fisico: solido giallo pallido

Peso molecolare: 541

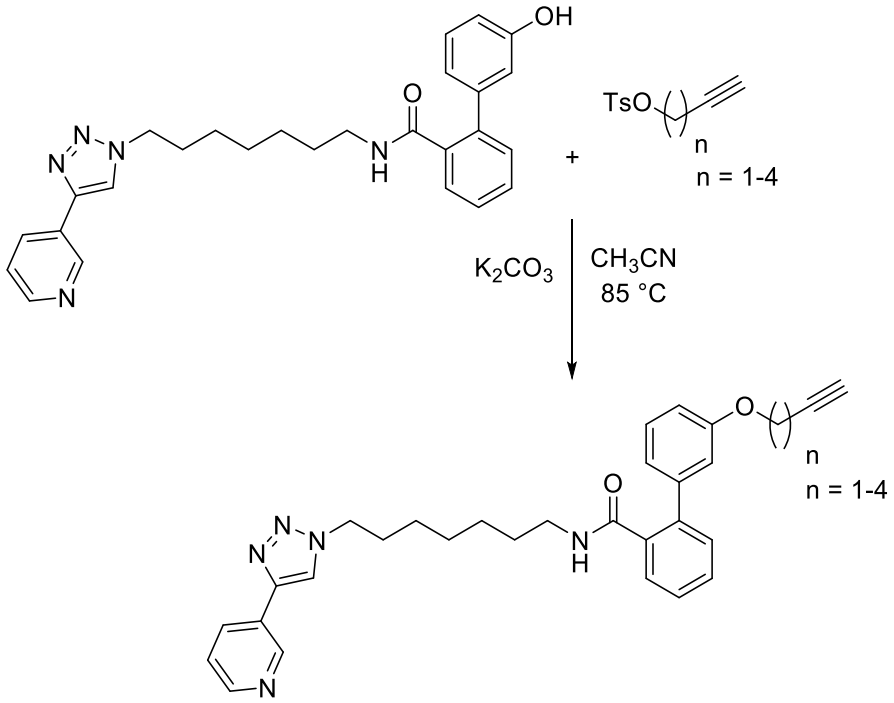
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{26}H_{36}N_7O_4S$ $[M+H]^+$ 542.25495, found 542.25461;

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.88 (s, 1H), 8.66 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.66-4.53 (m, 4H), 4.41-4.36 (m, 1H), 3.95-3.80 (m, 2H), 3.37-3.34 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.43-2.33 (m, 2H), 2.27-2.07 (m, 2H), 1.86 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.06 (s, 9H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) i chemical shift sono riferiti al rotamero principale δ 173.5, 173.0, 170.9, 151.5, 147.6, 138.9, 132.0, 130.1, 129.0, 127.6, 69.7, 59.4, 57.8, 56.6, 50.5, 42.3, 37.5, 35.1, 32.1, 25.7, 24.7, 14.5 ppm.

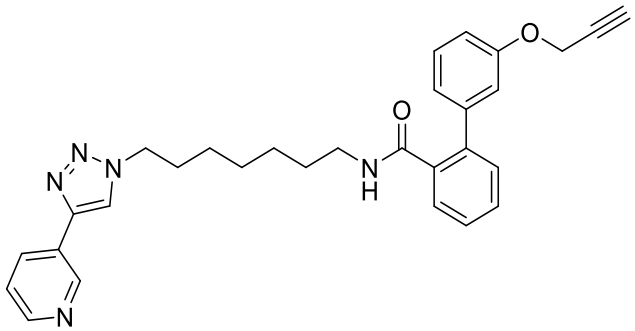
5.5 Preparazione dei PROTAC NAMPT-VHL con triazolo nel *linker*

Procedura generale (B) per l'eterificazione di Williamson



A una soluzione di fenolo **MV 78-OH** (1 eq) in acetonitrile anidro (0.06 M), posta sotto vigorosa agitazione magnetica, in atmosfera di azoto e scaldata a 85 °C, si aggiunge K_2CO_3 anidro (4 eq) e si lascia reagire per 15 minuti. Si aggiunge lentamente il corrispondente alchino tosilato (2 eq) sciolto in 2 mL di acetonitrile anidro si lascia reagire a 85 °C sotto atmosfera di N_2 per 5-6 ore. A reazione terminata, la miscela di reazione viene filtrata sottovuoto su büchner facendo dei lavaggi con DCM. Il filtrato viene concentrato sottovuoto e il grezzo ottenuto viene purificato mediante colonna cromatografica flash.

Sintesi di 3'-(prop-2-in-1-ilossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil-[1,1'-bifenil]-2-carbossammide (22)

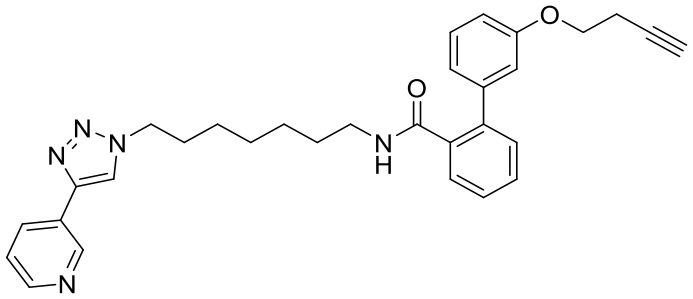


Il composto è stato preparato da propargil bromuro commerciale seguendo la procedura B, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 99:1, DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 95:5.

Formula bruta: $C_{30}H_{31}N_5O_2$
Resa: 13%
Stato fisico: olio giallo
Peso molecolare: 493

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (s, 1H), 8.57 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.70 (dd, *J* = 7.4/1.2 Hz, 1H), 7.49-7.28 (m, 5H), 7.04-6.96 (m, 3H), 5.31 (br s, 1H), 4.71 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 4.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.15 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.55 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 1.94 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.29-1.17 (m, 6H), 1.06 (quint, *J* =7.4 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169.3, 157.7, 149.1, 146.9, 144.6, 141.8, 139.0, 135.8, 133.0, 130.0 (2C), 129.7, 128.8, 127.8, 126.9, 123.8, 122.0, 119.9, 115.0, 114.4, 78.3, 75.8, 55.9, 50.5, 39.7, 30.2, 28.9, 28.5, 26.4, 26.2 ppm.

Sintesi di 3'-(but-3-in-1-ilossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil-[1,1'-bifenil]-2-carbossammide (23)

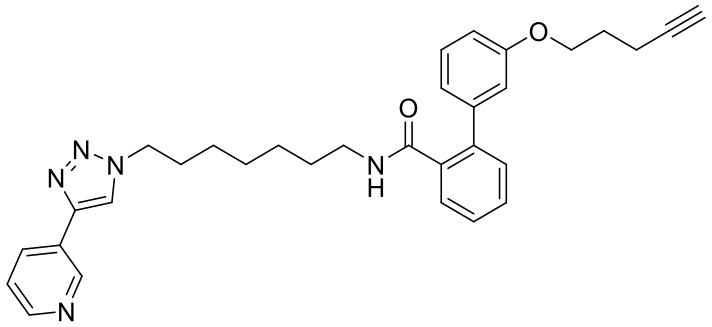


Il composto è stato preparato da but-3-in-1-il 4-metilbenzensolfonato seguendo la procedura B, il grezzo viene purificato mediante colonna cromatografica flash utilizzando come eluenti DCM/MeOH 99:1 e DCM/MeOH 98:2.

Formula bruta: $C_{31}H_{33}N_5O_2$
Resa: 33%
Stato fisico: olio giallo
Peso molecolare: 507

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.05 (br s, 1H), 8.59 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.30 (dt, *J* = 8.0/1.9 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.70 (dt, *J* = 6.2/1.8 Hz, 1H), 7.50 – 7.29 (m, 5H), 7.02 – 6.87 (m, 3H), 5.32 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.43 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.10 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.15 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.69 (td, *J* = 6.9/2.7 Hz, 2H), 2.05 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.94 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.32 – 1.18 (m, 6H), 1.09 – 1.00 (m, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169.4, 158.6, 148.2, 146.1, 144.3, 141.8, 139.1, 135.8, 133.8, 132.1, 130.0, 129.7, 128.8, 127.8, 127.3, 124.1, 121.5, 120.2, 114.8, 114.4, 80.4, 70.0, 66.1, 50.5, 39.7, 30.2, 28.9, 28.5, 26.4, 26.2, 19.6 ppm.

Sintesi di 3'-(pent-4-in-1-ilossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil-[1,1'-bifenil]-2-carbossammide (24)

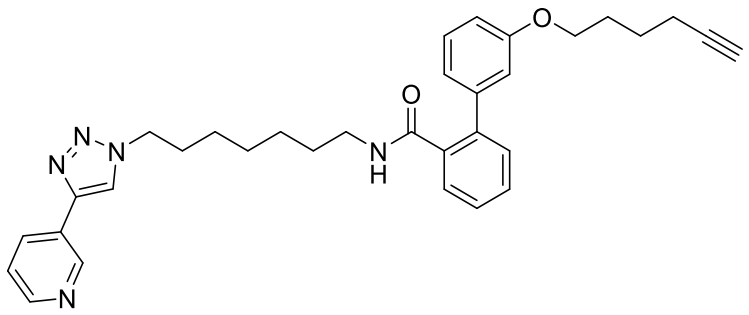


Il composto è stato preparato da pent-4-in-1-il 4-metilbenzensolfonato seguendo la procedura B, il grezzo viene purificato mediante colonna cromatografica flash utilizzando come eluenti DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 97:3.

Formula bruta: $C_{32}H_{35}N_5O_2$
Resa: 90%
Stato fisico: olio giallo
Peso molecolare: 521

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (br s, 1H), 8.56 (br d, 1H), 8.22 (dt, *J* = 8.0/1.8 Hz, 1H), 7.9 (s, 1H), 7.68 (dd, *J* = 7.5/1.3 Hz, 1H), 7.48 – 7.33 (m, 4H), 7.28 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.98 – 6.88 (m, 3H), 5.37 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.15 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.40 (td, *J* = 7.0/2.6 Hz, 2H), 2.04 – 1.90 (m, 5H), 1.31 – 1.17 (m, 6H), 1.04 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169.4, 159.0, 148.8, 146.7, 144.5, 141.7, 139.2, 135.8, 133.2, 130.0, 130.0, 129.7, 128.8, 127.7, 127.0, 123.9, 121.1, 120.0, 114.7, 114.1, 83.4, 69.0, 66.2, 50.5, 39.6, 30.2, 28.9, 28.5, 28.2, 26.4, 26.2, 15.2 ppm.

Sintesi di 3'-(es-5-in-1-ilossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil-[1,1'-bifenil]-2-carbossammide (25)

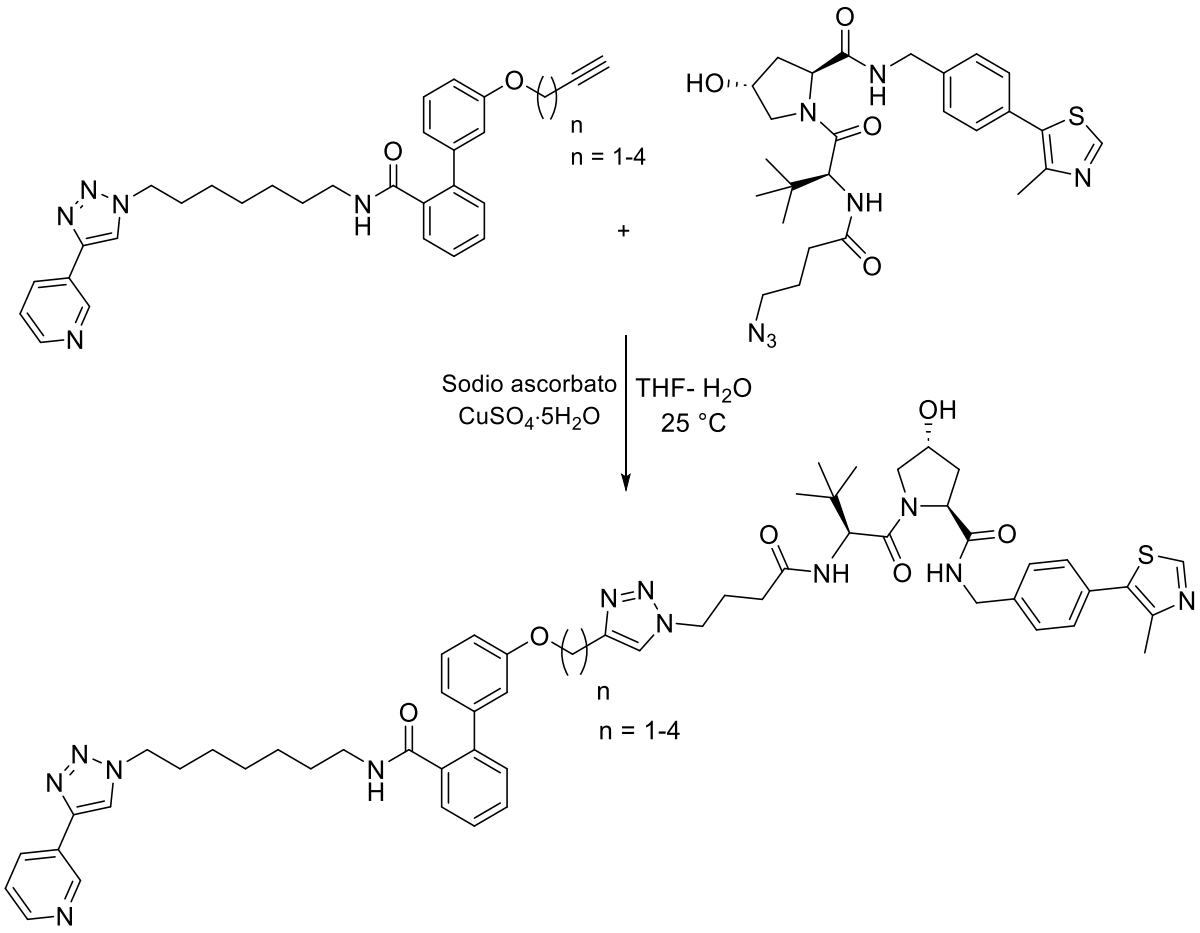


Il composto è stato preparato da es-5-in-1-il 4-metilbenzensolfonato seguendo la procedura B, il grezzo viene purificato mediante colonna cromatografica flash utilizzando come eluenti DCM/MeOH 99:1, DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 95:5.

Formula bruta: $C_{33}H_{37}N_5O_2$
Resa: 69%
Stato fisico: olio giallo
Peso molecolare: 535

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.00 (br s, 1H), 8.55 (br d, 1H), 8.22 (dt, *J* = 8.0/1.9 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.69 (dd, *J* = 7.4/1.2 Hz, 1H), 7.47 – 7.26 (m, 5H), 6.97 – 6.88 (m, 3H); 5.37 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.98 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.14 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.27 (td, *J* = 7.1/2.6 Hz, 2H), 1.97 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.95 – 1.87 (m, 4H), 1.71 (quint, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.31 – 1.17 (m, 6H), 1.04 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169.4, 159.1, 148.8, 146.7, 144.5, 141.7, 139.2, 135.8, 133.2, 130.0, 130.0, 129.6, 128.8, 127.7, 127.0, 123.9, 121.0, 120.0, 114.6, 114.1, 84.0, 68.8, 67.4, 50.5, 39.6, 30.2, 28.9, 28.5, 28.3, 26.4, 26.2, 25.1, 18.2 ppm.

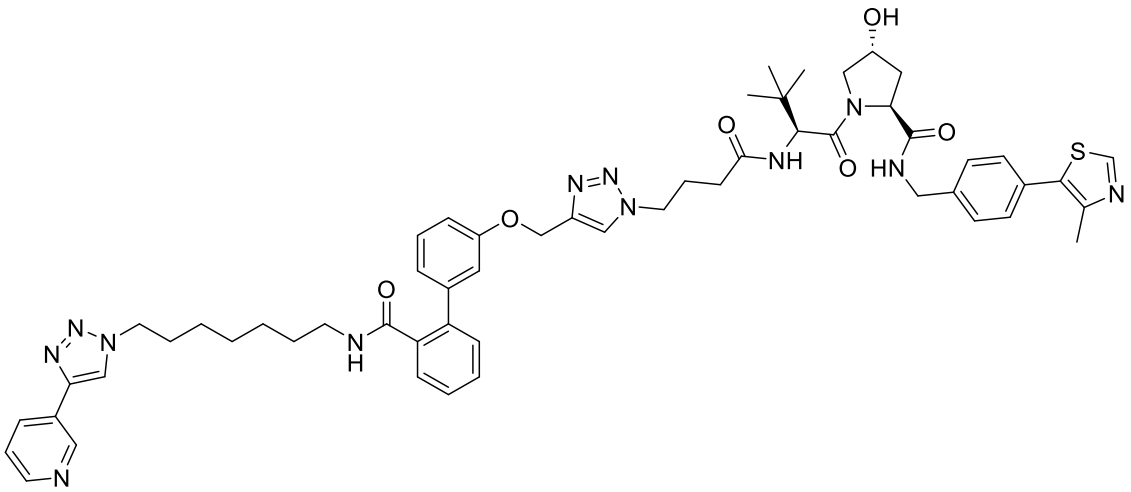
Procedura generale (C) per la reazione click



A una soluzione del corrispondente alchino (1 eq) in THF-H_2O 2:1 (0.08 M), posta sotto vigorosa agitazione magnetica in atmosfera di N_2, si aggiunge l'azide (1 eq), sodio ascorbato (1 eq) e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.2 eq). La reazione viene lasciata reagire a temperatura ambiente per una notte. A reazione terminata si diluisce la miscela di reazione con acqua e si estrae con DCM (x3). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa di EDTA 1% (x1), brine (x1), vengono anidrificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo ottenuto viene purificato mediante colonna cromatografica flash.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(4-(4-(((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-

il)butanammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U14)



Il composto è stato preparato da 3'-(prop-2-in-1-ilossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil-[1,1'-bifenil]-2-carbossammide seguendo la procedura C, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{56}H_{66}N_{12}O_6S$

Resa:53%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 1034

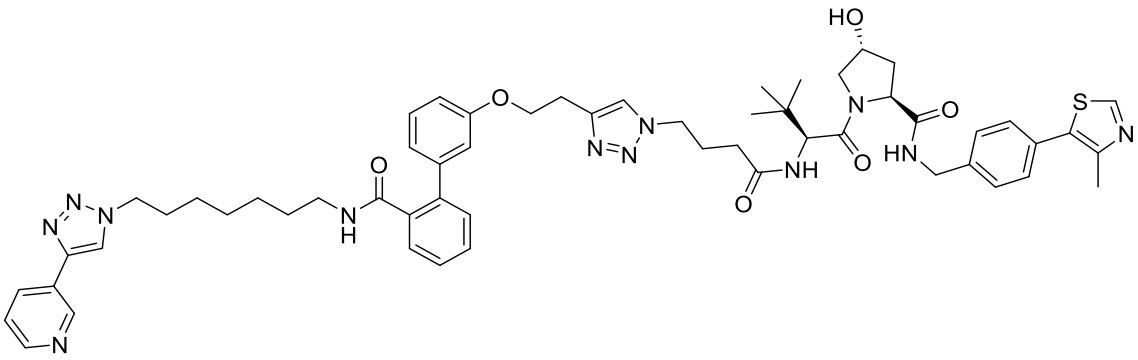
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{56}H_{67}N_{12}O_6S$ $[M+H]^+$ 1035.50272 , found 1035.50167;

IR (KBr) 3293, 3066, 2929, 2858, 1630, 1526, 1434, 1194, 1010, 790, 759, 697 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.00 (br s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.54 (br s, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.48-7.28 (m, 10H), 7.02-6.94 (m, 3H), 6.73 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.41 (br s, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.76 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.59-4.31 (m, 8H), 4.07 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.10 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.51-2.48 (m, 4H), 2.30-2.18 (m, 5H), 1.92 (quint, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.22-1.12 (m, 6H), 1.00-0.94 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 171.8 (2C), 170.9, 169.6, 158.2, 150.3, 148.8, 148.4, 146.8, 144.5, 143.6, 141.8, 139.0, 138.2, 136.0, 133.2, 131.6, 130.9, 130.0 (2C), 129.9, 129.5, 128.6, 128.0, 127.8, 127.1, 123.9, 123.8, 121.6, 120.4, 114.8, 114.6, 70.0, 61.7, 58.6, 57.9, 56.8, 50.4, 49.2, 43.2, 39.6, 36.4, 35.1, 32.3, 30.1, 28.8, 28.5, 26.4, 26.3, 26.1, 25.8, 16.0 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(4-(4-(2-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)etil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butanammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U15)



Il composto è stato preparato da 3'-(but-3-in-1-ilossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil-[1,1'-bifenil]-2-carbossammide seguendo la procedura C, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{57}H_{68}N_{12}O_6S$

Resa:47%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 1048

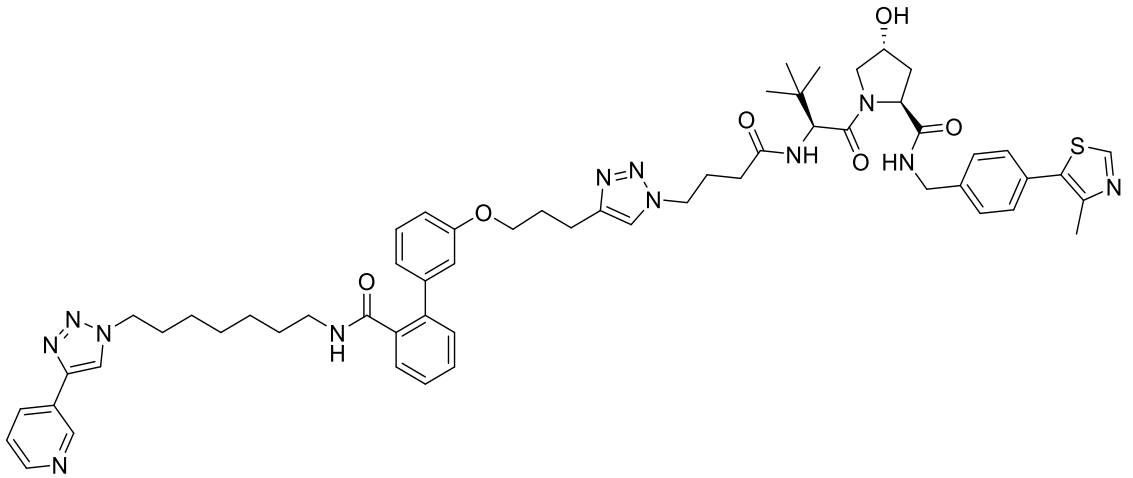
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{57}H_{69}N_{12}O_6S$ $[M+H]^+$ 1049.51837, found 1049.51786 ;

IR (KBr) 3272, 3067, 2928, 2857, 1632, 1531, 1434, 1204, 1020, 759, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.00 (br s, 1H), 8.67 (br s, 2H), 8.25 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.54-6.98 (m, 11H), 6.92-6.85 (m, 3H), 6.78 (br s,

1H), 5.39 (br s, 1H), 4.76 (br s, 1H), 4.59-4.32 (m, 8H), 4.31 (br s, 2H), 4.08 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 3.62 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.18-3.09 (m, 4H), 2.50 (br s, 4H), 2.28-2.17 (m, 5H), 1.92 (quint, J = 6.7 Hz, 2H), 1.26-1.11 (m, 6H), 0.97-0.94 (m, 11H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 171.9, 171.4, 171.0, 169.6, 158.6, 150.3, 148.8, 148.4, 146.8, 144.5, 144.3, 141.7, 139.0, 138.2, 135.9, 133.1, 131.6, 130.8, 130.0 (2C), 129.8, 129.4, 128.6, 128.2, 128.0, 127.7, 122.6 (2C), 121.2, 120.3, 115.2, 113.7, 70.0, 66.8, 58.6, 57.9, 56.8, 50.4, 49.0, 43.1, 39.7, 36.4, 35.1, 32.3, 30.1, 28.8, 28.5, 26.5, 26.4, 26.2, 26.1, 26.0, 16.0 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(4-(4-(3-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)propil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butanammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U16)



Il composto è stato preparato da 3'-(pent-4-in-1-ilossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil-[1,1'-bifenil]-2-carbossammide seguendo la procedura C, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{58}H_{70}N_{12}O_6S$
Resa: 56%
Stato fisico: solido bianco
Peso molecolare: 1062

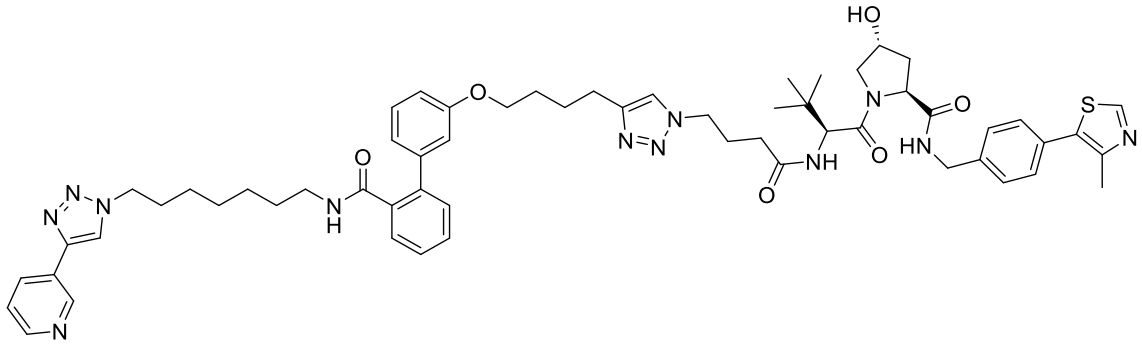
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{58}H_{71}N_{12}O_6S$ $[M+H]^+$ 1063.53402, found 1063.53299;

IR (KBr) 3291, 3067, 2930, 2860, 1630, 1530, 1435, 1202, 1052, 791, 760, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.67 (br s, 1H), 8.29 (br s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.46-7.29 (m, 11H), 6.98 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.89-6.86 (m, 3H), 5.41 (br s, 1H), 4.78-4.36 (m, 9H), 4.09 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.00 (br s, 1H), 3.63 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.12 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.89 (br s, 2H), 2.50 (br s, 4H), 2.16 (br s, 7H), 1.94 (br s, 2H), 1.27-1.16 (m, 6H), 1.00-0.95 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 171.9, 171.7, 171.1, 169.6, 158.9, 150.3, 148.4 (2C), 146.9, 144.8 (2C), 141.7, 139.2, 138.2, 135.9, 132.9, 131.8, 130.8, 130.0 (2C), 129.7, 129.4, 128.6, 128.2, 128.0, 127.7, 121.7 (2C), 121.0, 120.4, 114.5, 114.3, 70.0, 67.0, 58.7, 57.9, 56.8, 50.4, 49.0, 43.1, 39.7, 36.6, 35.3, 32.4, 30.1, 28.8 (2C), 28.5, 26.5, 26.4, 26.2, 25.9, 22.1, 16.0 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(4-(4-(4-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)butil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butanammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U17)



Il composto è stato preparato da 3'-(es-5-in-1-ilossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil-[1,1'-bifenil]-2-carbossammide seguendo la procedura C, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{59}H_{72}N_{12}O_6S$

Resa: 61%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 1076

HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{59}H_{73}N_{12}O_6S$ $[M+H]^+$ 1077.54967, found 1077.54962;

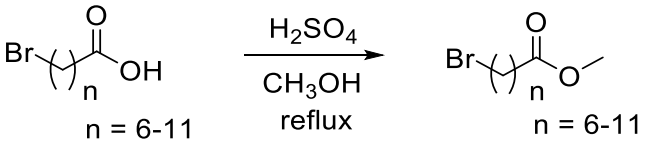
IR (KBr) 3291, 3066, 2929, 2860, 1629, 1527, 1434, 1201, 1051, 791, 759, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.65 (br s, 1H), 8.23 (d, *J* = 5.9, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.45-7.25 (m, 11H), 6.96-6.84 (m, 3H), 6.70 (br s, 1H), 5.41 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.75 (br s, 1H), 4.52-4.33 (m, 8H), 4.06-3.97 (m, 3H), 3.65-3.61 (m, 1H), 3.12 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.75 (br s, 2H), 2.49 (br s, 4H), 2.24-2.14 (m, 5H), 1.93-1.83 (m, 6H), 1.26-1.15 (m, 6H), 1.05-0.94 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR δ 171.9, 171.6, 171.1, 169.5, 159.0, 150.3, 148.8, 148.4, 146.5, 144.7, 141.7, 139.2, 138.2, 135.8, 132.9, 131.7, 130.8, 130.0, 129.9, 129.7, 129.4, 128.7, 128.2, 128.0, 127.7, 121.4 (2C), 121.0, 120.4, 114.7, 114.0, 70.0, 67.6, 58.7, 57.9, 56.8, 50.4, 49.0, 43.1, 39.7, 36.6, 35.3, 32.4, 30.1, 28.8, 28.7, 28.5, 26.5, 26.4, 26.2, 26.0, 25.9, 25.3, 16.0 ppm.

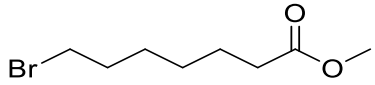
5.6 Preparazione dei *linker* alcanici

Procedura generale (D) per la sintesi degli esteri metilici



Al corrispondente bromoacido commerciale (1 eq) sciolto in metanolo (0.4 M) viene addizionato H_2SO_4 conc (18 M) (1.1 eq) e si lascia reagire sotto agitazione magnetica a 80 °C a riflusso. Trascorse 4 ore si evapora il solvente sottovuoto e il residuo ottenuto viene diluito con una soluzione acquosa satura di $NaHCO_3$ ed estratto con EtOAc (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1), anidrificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto.

Sintesi di metil-7-bromoeptanoato (26)

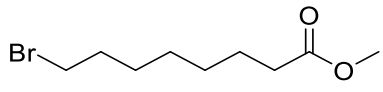


Il composto è stato preparato dall'acido 7-bromoeptanoico seguendo la procedura generale D, il grezzo viene usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Formula bruta: $C_8H_{15}O_2Br$
Resa: 91%
Stato fisico: olio incolore
Peso molecolare: 223

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.63 (s, 3H), 3.37 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.81 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.59 (quint, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.44-1.31 (m, 4H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174.0, 51.4, 33.8, 33.7, 32.5, 28.2, 27.7, 24.6 ppm.

Sintesi di metil-8-bromoottanoato (27)

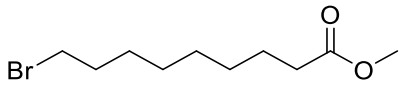


Il composto è stato preparato dall'acido 8-bromoottanoico seguendo la procedura generale D, il grezzo viene usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Formula bruta: $C_9H_{17}O_2Br$
Resa: 90 %
Stato fisico: olio incolore
Peso molecolare: 237

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.63 (s, 3H), 3.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.26 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.80 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.58 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.40-1.27 (m, 6H) ppm.
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174.0, 51.4, 33.9, 33.8, 32.6, 28.8, 28.3, 27.9, 24.7 ppm.

Sintesi di metil-9-bromononanoato (28)

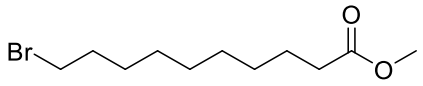


Il composto è stato preparato dall'acido 9-bromononanoico seguendo la procedura generale D, il grezzo viene usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Formula bruta: $C_{10}H_{19}O_2Br$
Resa: 90%
Stato fisico: olio incolore
Peso molecolare: 251

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.64 (s, 3H), 3.38 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.83 (quint, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.60 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.40 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.30 (br s, 6H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174.2, 51.4, 34.0, 33.9, 32.7, 29.0, 29.0, 28.5, 28.0, 24.8 ppm.

Sintesi di metil-10-bromodecanoato (29)

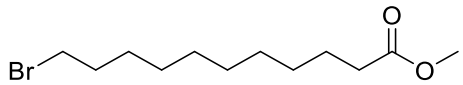


Il composto è stato preparato dall'acido 10-bromodecanoico seguendo la procedura generale D, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente PE/EtOAc 98:2 e PE/EtOAc 95:5.

Formula bruta: $C_{11}H_{21}O_2Br$
Resa: 88%
Stato fisico: olio incolore
Peso molecolare: 265

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.56 (s, 3H), 3.30 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.76 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.72-1.50 (m, 2H), 1.35-1.33 (m, 2H), 1.21 (br s, 8H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9, 51.2, 33.9, 33.7, 32.7, 29.1, 29.0, 29.0, 28.6, 28.0, 24.8 ppm.

Sintesi di metil-11-bromoundecanoato (30)

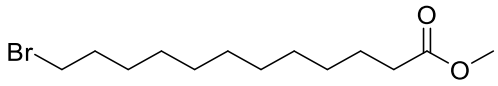


Il composto è stato preparato dall'acido 11-bromoundecanoico seguendo la procedura generale D, il grezzo viene usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Formula bruta: $C_{12}H_{23}O_2Br$
Resa: 95%
Stato fisico: olio incolore
Peso molecolare: 279

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.66 (s, 3H), 3.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.83 (quint, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.61-1.60 (m, 2H), 1.41-1.40 (m, 2H), 1.28 (br s, 10H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9, 51.2, 33.9, 33.7, 32.7, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.6, 28.1, 24.8 ppm.

Sintesi di metil-12-bromododecanoato (31)



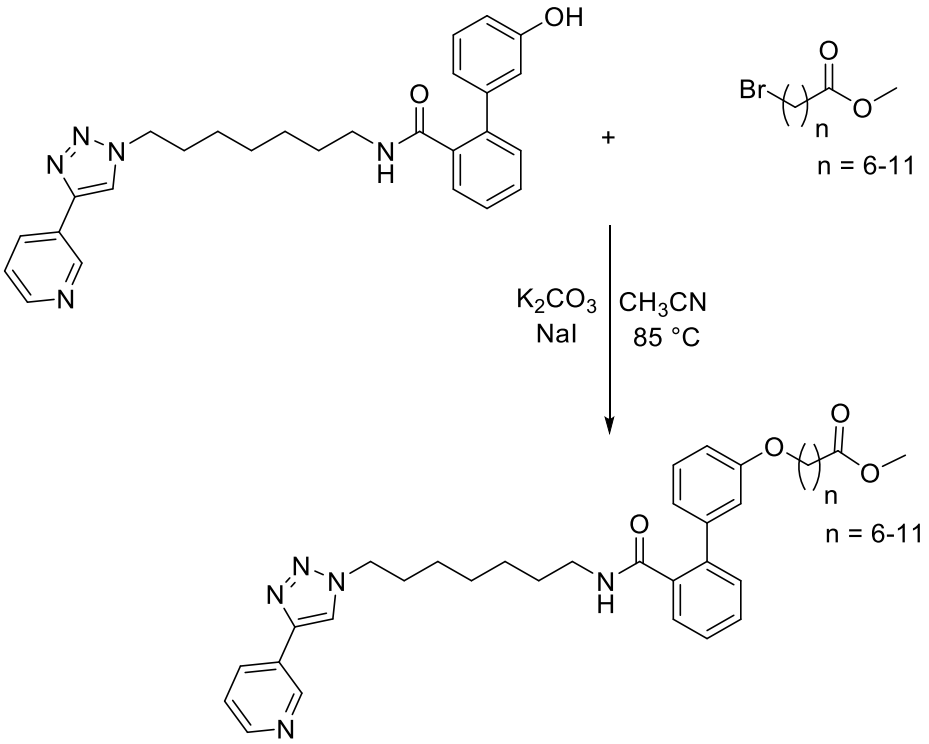
Il composto è stato preparato dall'acido 12-bromododecanoico seguendo la procedura D, il grezzo viene usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Formula bruta: $C_{13}H_{25}O_2Br$
Resa: 88%
Stato fisico: olio incolore
Peso molecolare: 293

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.64 (s, 3H), 3.38 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.83 (quint, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.60 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.42-1.40 (m, 2H), 1.26 (br s, 12H) ppm;
^{13}C NMR (101MHz, $CDCl_3$) 174.2, 51.4, 34.0, 33.9, 32.8, 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.7, 28.1, 24.9 ppm.

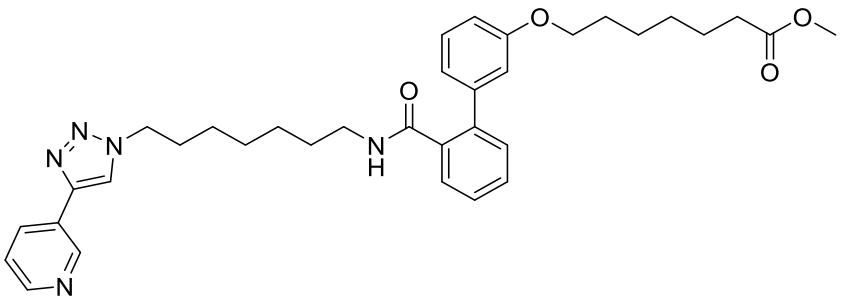
5.7 Preparazione dei PROTAC NAMPT-VHL

Procedura generale (E) per l'eterificazione di Williamson



A una soluzione di fenolo **MV 78-OH** (1 eq) in acetonitrile anidro (0.06 M), posta sotto vigorosa agitazione magnetica, in atmosfera di azoto e scaldata a 85 °C, si aggiunge K_2CO_3 anidro (4 eq), NaI (0.5 eq), e si lascia reagire per 15 minuti. Successivamente si aggiunge goccia a goccia il corrispondente bromo-estere (1.6 eq) sciolto in 2 mL di acetonitrile anidro e si lascia reagire a 85 °C, in atmosfera di N_2 per 5-6 ore. La miscela di reazione viene filtrata sottovuoto su Büchner facendo dei lavaggi con DCM. Il filtrato viene concentrato sottovuoto e il grezzo ottenuto viene purificato mediante cromatografia flash.

Sintesi di metil 7-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)eptanoato (32)



Il composto è stato preparato dal metil-7-bromoeptanoato seguendo la procedura generale E, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 99:1 e DCM/MeOH 98:2.

Formula bruta: $C_{35}H_{43}N_5O_4$

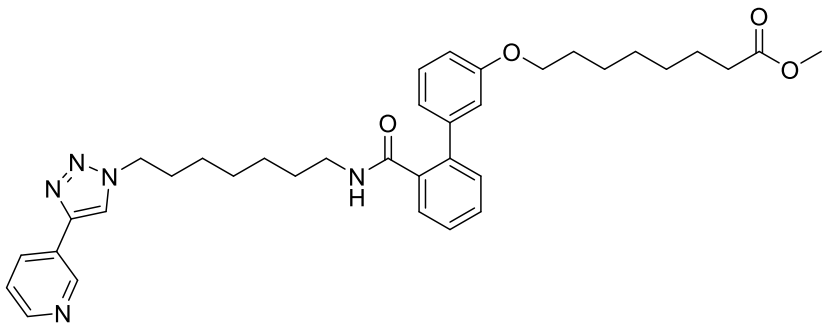
Resa: 73%

Stato fisico: olio giallo

Peso molecolare: 597

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ 9.02 (br s, 1H), 8.59 (br s, 1H), 8.24 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.49-7.27 (m = 5H), 6.98-6.88 (m, 3H), 5.29 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.96 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.16 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.95 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.79 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.67 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.52-1.17 (m, 10H), 1.05 (quint, *J* = 7.3 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$), δ 174.2, 169.3, 159.2, 149.0, 146.9, 144.6, 141.7, 139.3, 135.7, 133.1, 130.0, 130.0, 129.6, 128.8, 127.7, 126.9, 123.8, 120.9, 119.9, 114.6, 114.2, 67.9, 51.5, 50.5, 39.6, 34.0, 30.2, 29.1, 28.9 (2C), 28.5, 26.4, 26.2, 25.8, 24.8 ppm.

Sintesi di metil 8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)ottanoato (33)



Il composto è stato preparato dal metil-8-bromoottanoato seguendo la procedura generale E, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 97:3.

Formula bruta: $C_{36}H_{45}N_5O_4$

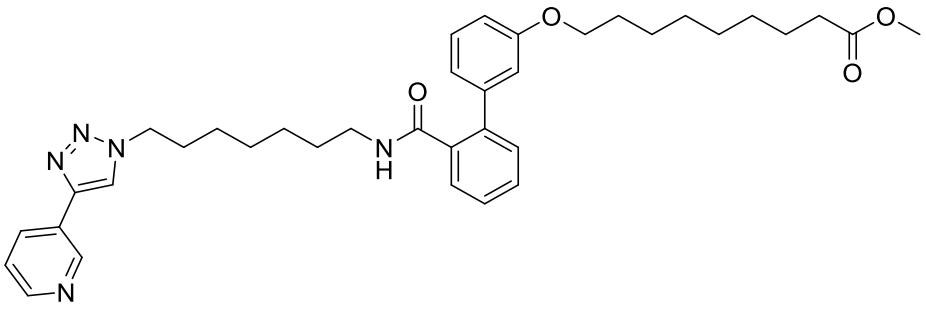
Resa: 55%

Stato fisico: olio giallo

Peso molecolare: 611

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ 9.01 (s, 1H), 8.56 (dd, *J* = 4.8/1.6 Hz, 1H), 8.22 (dt, *J* = 8.0/2.1 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.72-7.70 (m, 1H), 7.48-7.27 (m = 5H), 6.98-6.87 (m, 3H), 5.31 (br s, 1H), 4.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.15 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.94 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.78 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.64 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.47-1.17 (m, 12H), 1.05 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174.2, 169.3, 159.2, 149.2, 147.0, 144.7, 141.7, 139.3, 135.8, 133.0, 130.0, 130.0, 129.6, 128.8, 127.7, 126.9, 123.7, 120.9, 119.8, 114.6, 114.2, 68.0, 51.4, 50.4, 39.6, 34.0, 30.2, 29.2, 29.0, 29.0, 28.9, 28.5, 26.4, 26.2, 25.9, 24.8 ppm.

Sintesi di metil 9-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)nonanoato (34)



Il composto è stato preparato dal metil-9-bromononanoato seguendo la procedura generale E, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 99:1, DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 95:5.

Formula bruta: $C_{37}H_{47}N_5O_4$

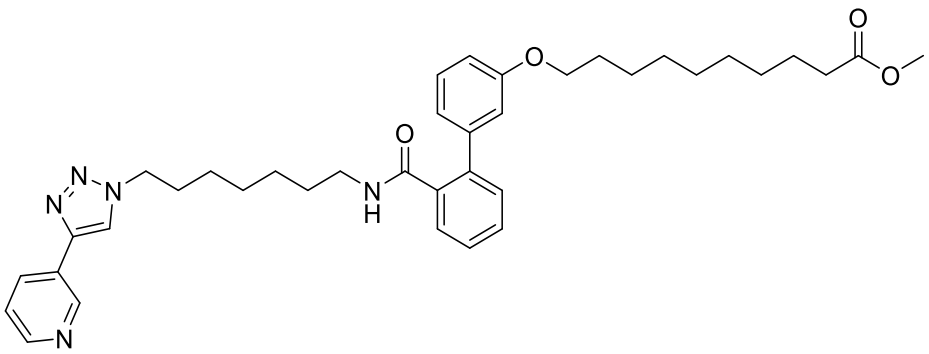
Resa: 71%

Stato fisico: olio giallo

Peso molecolare: 625

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ 8.96 (s, 1H), 8.50 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.16 (dt, *J* = 7.9/1.9 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.64 (dd, *J* = 7.4/1.2 Hz, 1H), 7.43-7.22 (m, 5H), 6.92-6.83 (m, 3H), 5.46 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.12 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.90 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.73 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.60-1.14 (m, 14H), 1.01 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174.2, 169.4, 159.2, 149.0, 146.9, 144.6, 141.7, 139.3, 135.8, 132.9, 130.0, 129.9, 129.5, 128.7, 127.6, 126.9, 123.7, 120.9, 120.0, 114.6, 114.1, 68.0, 51.4, 50.4, 39.6, 34.0, 30.1, 29.2, 29.1 (2C), 29.0, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 24.9 ppm.

Sintesi di metil 10-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)decanoato (35)



Il composto è stato preparato dal metil-10-bromodecanoato seguendo la procedura generale E, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 95:5.

Formula bruta: $C_{38}H_{49}N_5O_4$

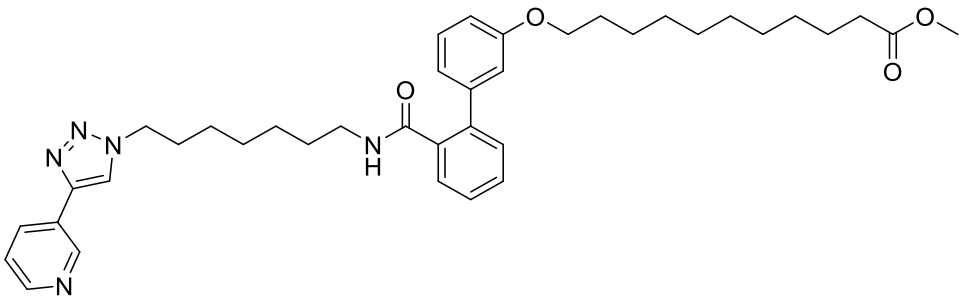
Resa: 68%

Stato fisico: olio giallo

Peso molecolare: 639

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ 9.01 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.58 (dd, *J* = 4.8/1.4 Hz, 1H), 8.23 (dt, *J* = 8.0/1.9 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.71 (dd, *J* = 7.5/1.3 Hz, 1H), 7.49-7.27 (m, 5H), 6.97-6.88 (m, 3H), 5.30 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.15 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.96 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.78 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.62 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.45 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.32-1.19 (m, 14H), 1.05 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174.3, 169.3, 159.3, 149.0, 146.9, 144.6, 141.7, 139.3, 135.7, 133.1, 130.0, 130.0, 129.6, 128.8, 127.7, 126.9, 123.8, 120.9, 119.8, 114.6, 114.2, 68.1, 51.4, 50.4, 39.6, 34.1, 30.2, 29.3, 29.2, 29.2, 29.1, 28.9, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 24.9 ppm.

Sintesi di metil 11-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)undecanoato (36)



Il composto è stato preparato dal metil-11-bromoundecanoato seguendo la procedura generale E, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 96:4.

Formula bruta: $C_{39}H_{51}N_5O_4$

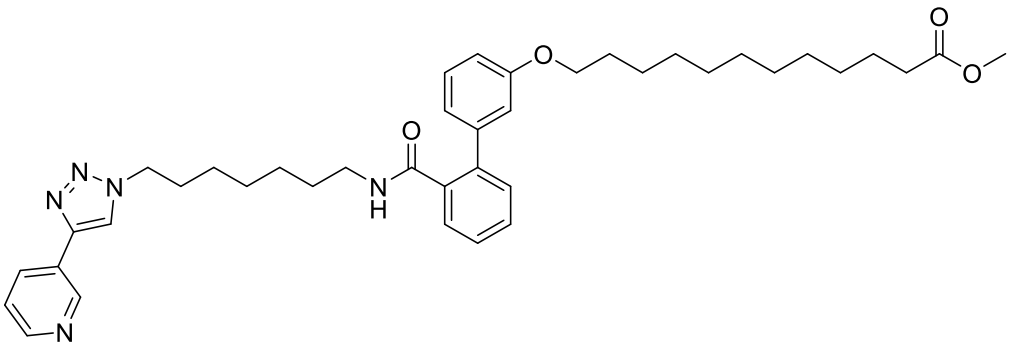
Resa: 72%

Stato fisico: olio giallo

Peso molecolare: 653

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ 8.98 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.53 (dd, *J* = 4.8/1.5 Hz, 1H), 8.18 (dt, *J* = 8.0/1.8 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.66 (dd, *J* = 7.4/0.8 Hz, 1H), 7.45-7.24 (m, 5H), 6.94-6.85 (m, 3H), 5.42 (br s, 1H), 4.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.64 (s, 3H), 3.12 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.91 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.75 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.57 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.40 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.22-1.15 (m, 16H), 1.02 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174.3, 169.4, 159.2, 149.1, 146.9, 144.6, 141.7, 139.3, 135.8, 132.9, 130.0, 129.9, 129.6, 128.7, 127.6, 126.8, 123.7, 120.8, 119.9, 114.6, 114.1, 68.0, 51.4, 50.4, 39.6, 34.1, 30.2, 29.5, 29.3 (2C), 29.2, 29.2, 29.1, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 24.9 ppm.

Sintesi metil 12-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)dodecanoato (37)



Il composto è stato preparato dal metil-12-bromododecanoato seguendo la procedura generale E, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 98:2.

Formula bruta: $C_{40}H_{53}N_5O_4$

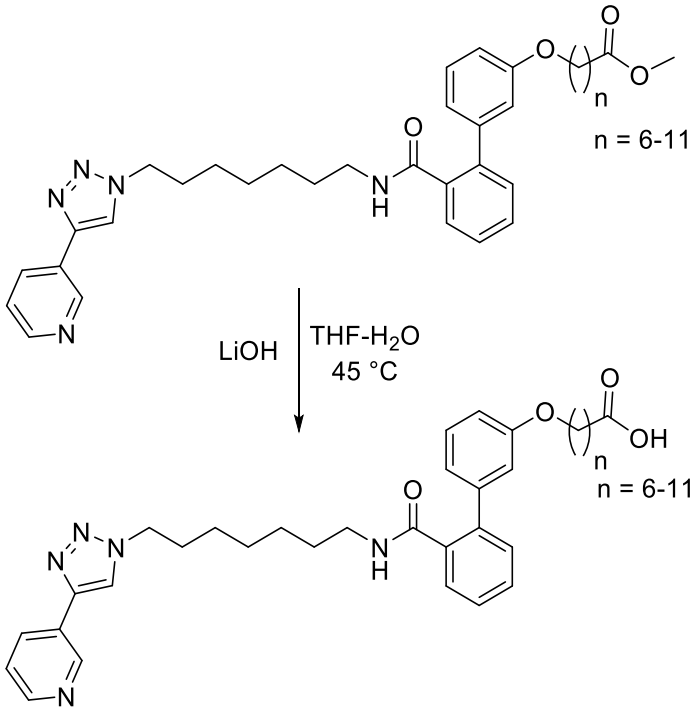
Resa: 27%

Stato fisico: olio giallo

Peso molecolare: 667

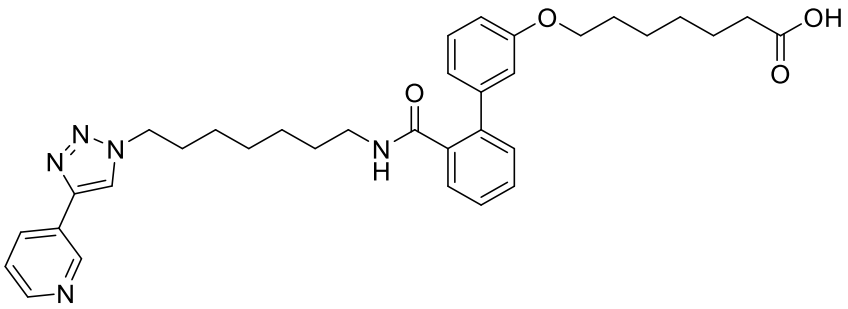
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ 9.00 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.56 (dd, *J* = 4.8/1.6 Hz, 1H), 8.21 (dt, *J* = 8.0/1.9 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.70 (dd, *J* = 7.5/1.5 Hz, 1H), 7.48-7.26 (m, 5H), 6.96-6.87 (m, 3H), 5.33 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.14 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.94 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.77 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.61 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.45 (quint, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.40-1.16 (m, 18H), 1.04 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174.3, 169.4, 159.2, 149.1, 147.0, 144.7, 141.7, 139.3, 135.8, 132.9, 130.0, 130.0, 129.6, 128.8, 127.7, 126.8, 123.7, 120.9, 119.9, 114.6, 114.2, 68.1, 51.4, 50.4, 39.6, 34.1, 30.2, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.9, 28.5, 26.4, 26.2, 26.1, 24.9 ppm.

Procedura generale (F) di idrolisi dell'estere



A una soluzione del corrispondente estere metilico (1 eq) in THF/acqua 1:1 (0.05 M), posta sotto agitazione magnetica, si aggiunge LiOH (4 eq) e si lascia reagire a 45 °C per 4 ore. A reazione terminata si acidifica con una soluzione acquosa di HCl 3 M (pH ~ 3), si diluisce con acqua, si estrae con DCM (x3). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1), anidrificate su Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo ottenuto viene purificato mediante colonna cromatografica flash.

Sintesi dell'acido 7-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)eptanoico (38)



Il composto è stato preparato da metil 7-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)eptanoato seguendo la procedura generale F, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{34}H_{41}N_5O_4$

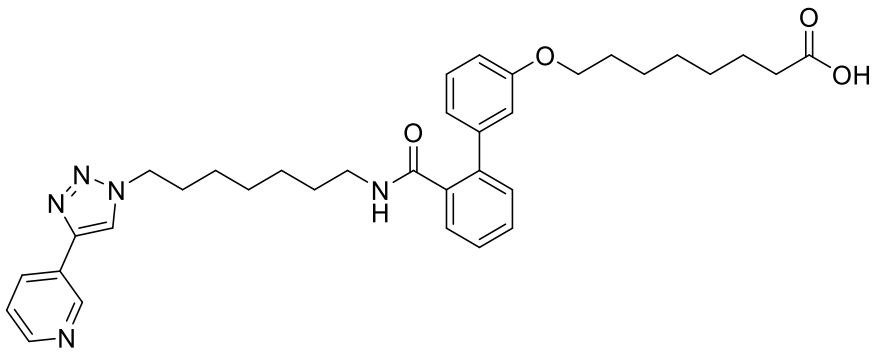
Resa: 82%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 583

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (s, 1H), 8.52 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 8.29 (dt, *J* = 8.0/1.8 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.5/1.2 Hz, 1H), 7.47-7.25 (m, 5H), 6.95-6.85 (m, 3H), 5.43 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.14 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.92 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.78 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.68 (quint, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.52-1.38 (m, 4H), 1.28-1.17 (m, 6H), 1.01 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 177.1, 169.6, 159.2, 148.0, 146.1, 144.2, 141.6, 139.3, 135.7, 133.7, 130.0 (2C), 129.6, 128.8, 127.7, 127.3, 124.2, 120.9, 120.3, 114.6, 114.2, 67.9, 50.5, 39.7, 34.1, 30.2, 29.0, 28.8 (2C), 28.5, 26.4, 26.2, 25.8, 24.8 ppm.

Sintesi dell'acido 8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)ottanoico (39)



Il composto è stato preparato da metil 8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)ottanoato seguendo la procedura generale F, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{35}H_{43}N_5O_4$

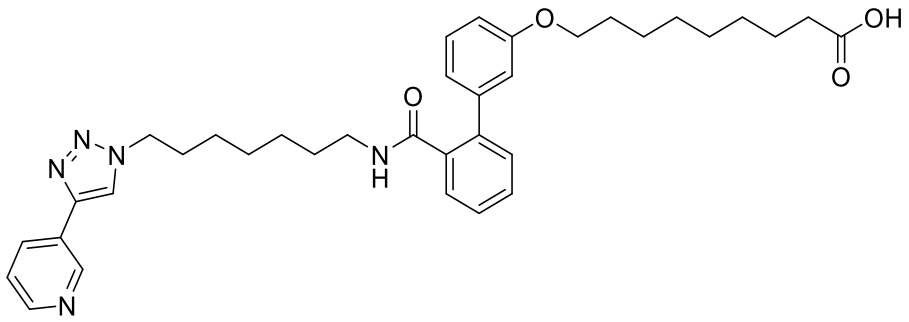
Resa: 78%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 597

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.02 (br s, 1H), 8.55 (br s, 1H), 8.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.68 (dd, *J* = 7.5/1.1 Hz, 1H), 7.46-7.25 (m, 5H), 6.96-6.86 (m, 3H), 5.41 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.14 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.92 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.77 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.66 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.48-1.39 (m, 6H), 1.38-1.16 (m, 6H), 1.03 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 177.0, 169.6, 159.2, 148.0, 146.0, 144.2, 141.6, 139.3, 135.6, 133.7, 130.0, 130.0, 129.6, 128.7, 127.6, 127.4, 124.2, 120.9, 120.3, 114.6, 114.1, 67.9, 50.4, 39.7, 34.4, 30.1, 29.1, 29.0, 28.9, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 25.8, 24.8 ppm.

Sintesi dell'acido 9-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)nonanoico (40)



Il composto è stato preparato da metil 9-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)nonanoato seguendo la procedura generale F, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 98:2, DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{36}H_{45}N_5O_4$

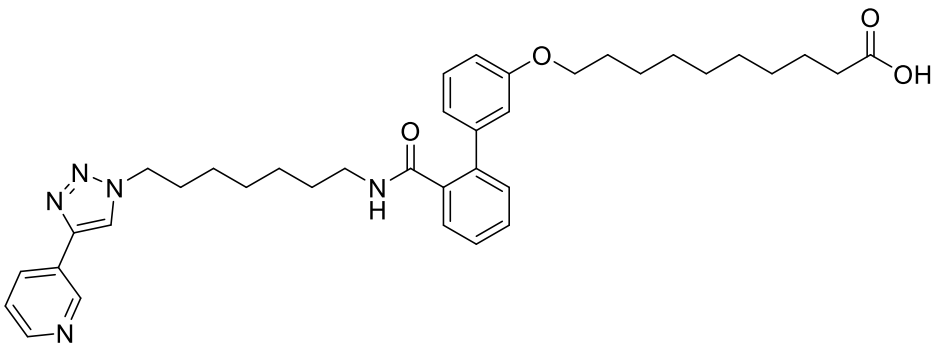
Resa: 81%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 611

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.98 (br s, 1H), 8.51 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 8.25 (dt, *J* = 8.0/1.8 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.65 (dd, *J* = 7.5/1.2 Hz, 1H), 7.44-7.23 (m, 5H), 6.93-6.84 (m, 3H), 5.45 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.13 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.90 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.74 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.62 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.44-1.14 (m, 14H), 1.00 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 177.3, 169.6, 159.2, 148.0, 146.0, 144.2, 141.6, 139.3, 135.7, 133.7, 130.0, 129.8, 129.6, 128.7, 127.6, 127.2, 124.1, 120.8, 120.3, 114.6, 114.1, 68.0, 50.5, 39.7, 34.3, 30.1, 29.2, 29.1, 29.1, 29.0, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 25.9, 24.9 ppm.

Sintesi dell'acido 10-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)decanoico (41)



Il composto è stato preparato da metil 10-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)decanoato seguendo la procedura generale F, il grezzo viene usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Formula bruta: $C_{37}H_{47}N_5O_4$

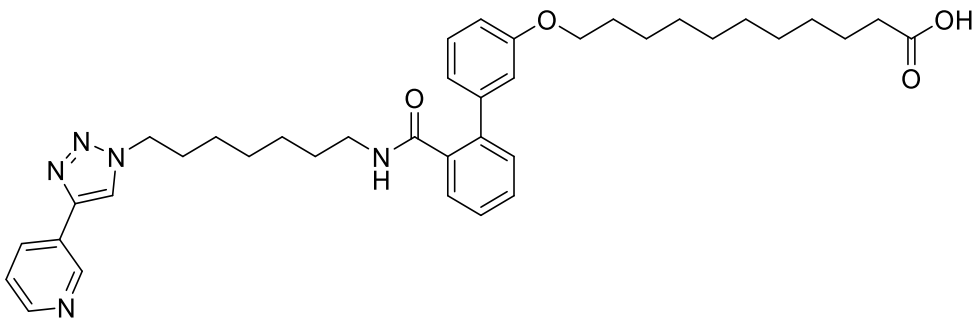
Resa: 72%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 625

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.03 (br s, 1H), 8.56 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 8.33 (dt, *J* = 8.0/1.8 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.70 (dd, *J* = 7.5/1.2 Hz, 1H), 7.48-7.27 (m, 5H), 6.97-6.87 (m, 3H), 5.34 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.15 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.94 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.77 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.65 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.47-1.16 (m, 16H), 1.04 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 177.2, 169.5, 159.3, 148.1, 146.1, 144.3, 141.7, 139.3, 135.6, 133.7, 130.0 (2C), 129.6, 128.8, 127.7, 127.3, 124.1, 120.8, 120.1, 114.5, 114.3, 68.1, 50.5, 39.7, 34.1, 30.2, 29.2, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 24.8 ppm.

Sintesi dell'acido 11-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)undecanoico (42)



Il composto è stato preparato da metil 11-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)undecanoato seguendo la procedura generale F, il grezzo viene usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Formula bruta: $C_{38}H_{49}N_5O_4$

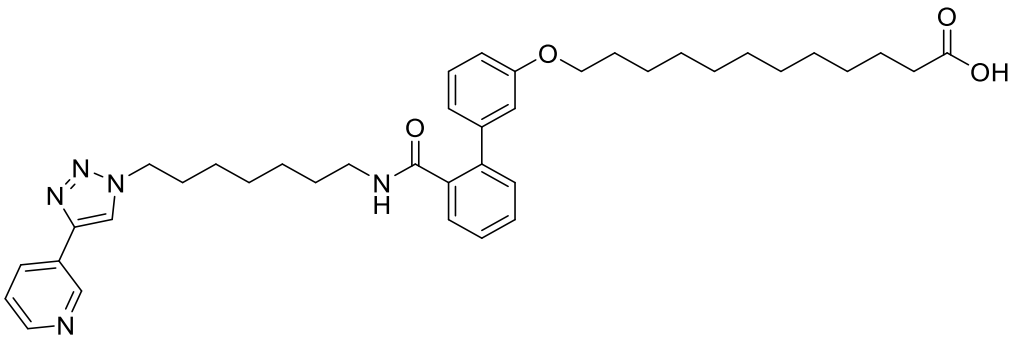
Resa: 77%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 639

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.02 (br s, 1H), 8.55 (br s, 1H), 8.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.0/1.2 Hz, 1H), 7.46-7.24 (m, 5H), 6.94-6.85 (m, 3H), 5.44 (br s, 1H), 4.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.13 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.91 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.75 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.63 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.42-1.15 (m, 18H), 1.01 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 177.4, 169.6, 159.2, 148.1, 146.1, 144.3, 141.6, 139.3, 135.6, 133.6, 130.0, 130.0, 129.6, 128.8, 127.6, 127.1, 124.2, 120.8, 120.2, 114.6, 114.2, 68.0, 50.5, 39.7, 34.3, 30.1, 29.4, 29.3 (2C), 29.2, 29.2, 29.1, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 24.9 ppm.

Sintesi dell'acido 12-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)dodecanoico (43)



Il composto è stato preparato da metil 12-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)dodecanoato seguendo la procedura generale F, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente DCM/MeOH 98:2, DCM/MeOH 97:3 e DCM/MeOH 95:5.

Formula bruta: $C_{39}H_{51}N_5O_4$

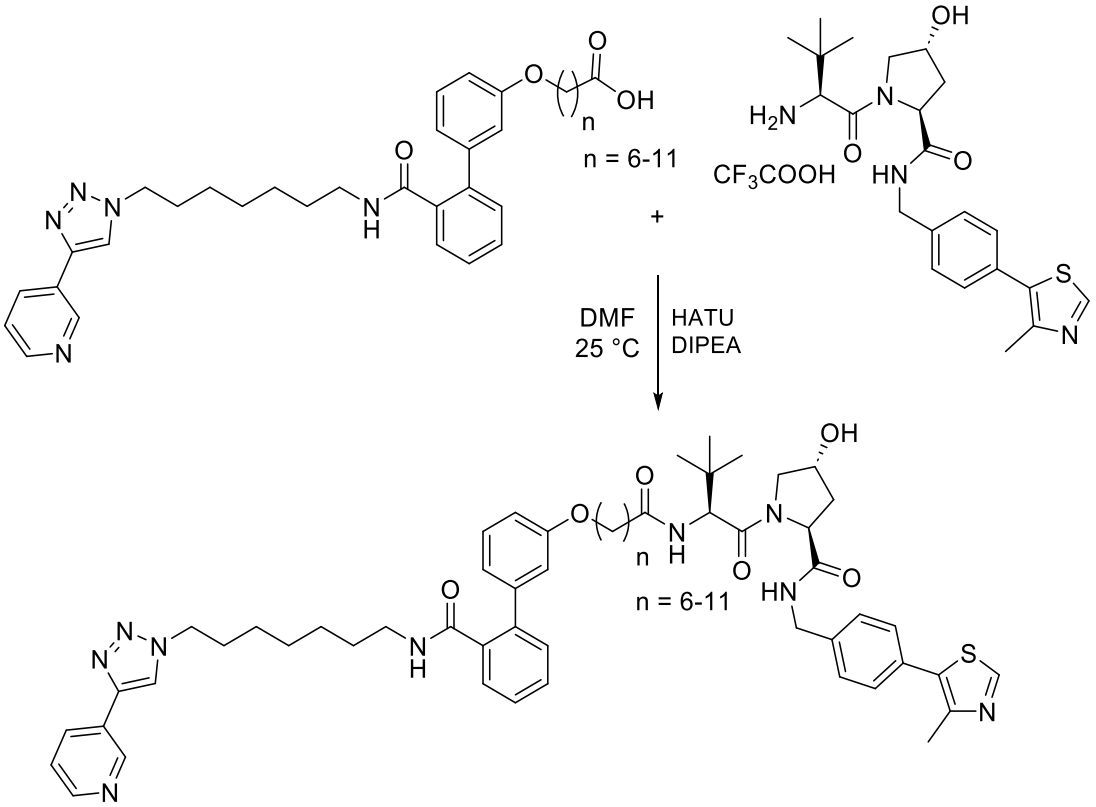
Resa: 72%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 653

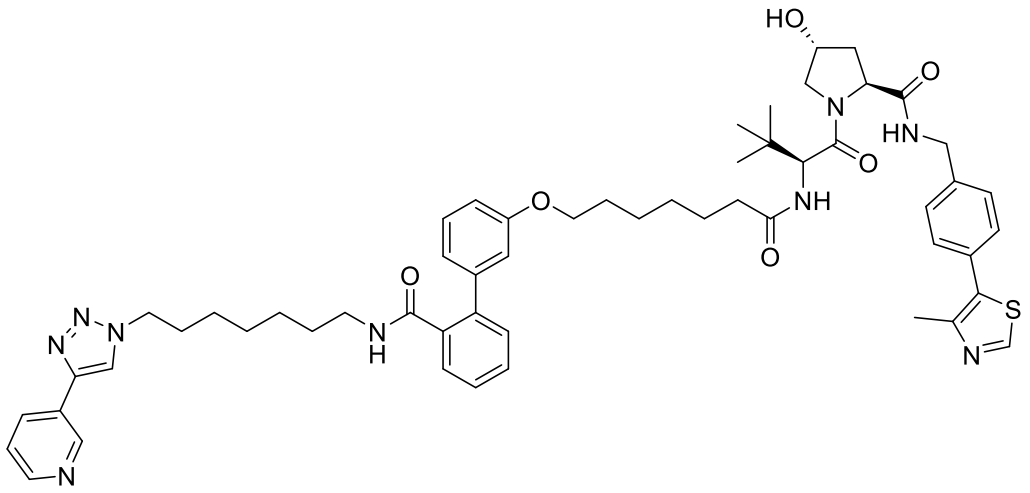
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (br s, 1H), 8.55 (br s, 1H), 8.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.69 (dd, *J* = 7.6/1.0 Hz, 1H), 7.47-7.26 (m, 5H), 6.96-6.87 (m, 3H), 5.38 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.14 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.93 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.76 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.64 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.45-1.16 (m, 20H), 1.03 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H) ppm;
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 177.5, 169.5, 159.3, 148.2, 146.2, 144.3, 141.7, 139.3, 135.6, 133.6, 130.0, 130.0, 129.6, 128.8, 127.6, 127.2, 124.1, 120.8, 120.1, 114.6, 114.3, 68.1, 50.5, 39.7, 34.2, 30.2, 29.4, 29.4, 29.3 (2C), 29.2, 29.2, 29.0, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 24.9 ppm.

Procedura generale (G) di coupling ammidico



A una soluzione del corrispondente acido carbossilico (1 eq) in DMF anidra (0.033 M), posta sotto agitazione magnetica, in atmosfera di N_2, si aggiunge (2S,4R)-1-((S)-2-amino-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossamide 2,2,2-trifluoroacetato (1.1 eq), DIPEA (6 eq) e HATU (1.5 eq) e si lascia reagire a temperatura ambiente sotto azoto per una notte. Dopo completamento della reazione, si diluisce con acqua e si estrae con DCM (x2). Le fasi organiche vengono lavate con brine (x1), anidrificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(7-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)eptanammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U30)



Il composto è stato preparato dall'acido 7-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)eptanoico seguendo la procedura generale G, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{56}H_{69}N_9O_6S$

Resa: 63%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 995

HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{56}H_{70}N_9O_6S$ $[M+H]^+$ 996.51698, found 996.51558;

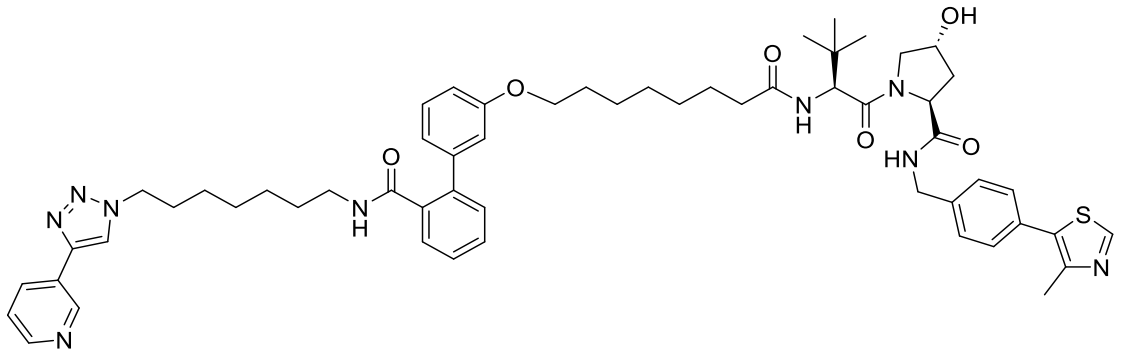
IR (KBr) 3303, 3066, 2930, 2858, 1630, 1528, 1434, 1201, 847, 759 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.03 (br s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.55 (br s, 1H), 8.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.49-7.28 (m, 10H), 6.98-6.86 (m, 3H), 6.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.32 (br s, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.61-4.54 (m, 3H), 4.44-4.33 (m, 3H), 4.08 (br d, 1H), 3.92 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.63-3.60 (m, 1H), 3.16-3.15 (m, 2H), 2.57-2.52 (m, 4H), 2.24-2.12 (m, 3H), 1.95 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.75 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.64 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.53-1.15 (m, 10H), 1.00-0.94 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.4, 171.8, 170.9, 169.5, 159.1, 150.3, 148.7, 148.4, 146.7, 144.5, 141.7, 139.3, 138.2, 135.8, 133.2, 131.6, 130.9, 130.0 (2C), 129.7, 129.5, 128.7, 128.1, 127.7, 127.2, 124.0, 120.8, 120.3, 114.5, 114.3, 69.9, 67.8, 58.7, 57.3, 56.9,

50.5, 43.2, 39.7, 36.3, 36.1, 35.2, 30.2, 29.0 (2C), 28.9, 28.8, 28.6, 26.4, 26.2, 25.8, 25.5, 16.0 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)octanammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il) benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U31)



Il composto è stato preparato dall' acido 8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)ottanoico seguendo la procedura generale G, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{57}H_{71}N_9O_6S$

Resa: 53%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 1009

HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{57}H_{72}N_9O_6S$ $[M+H]^+$ 1010.53263, found 1010.53113;

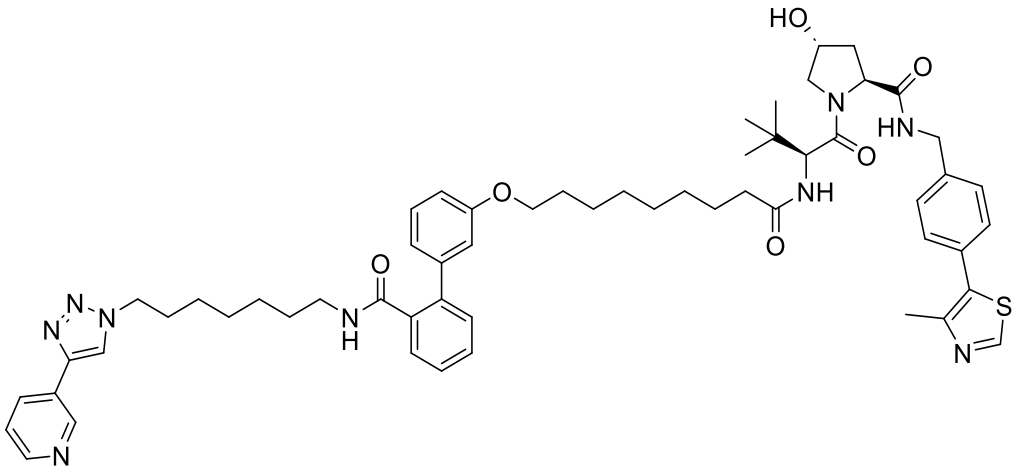
IR (KBr) 3291, 3066, 2927, 2855, 1629, 1529, 1435, 1201, 759, 697 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.00 (br s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.54 (br s, 1H), 8.24 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.47-7.26 (m, 10H), 6.96-6.84 (m, 3H), 6.36 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.40 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.59-4.42 (m, 3H), 4.41-4.31 (m, 4H), 4.06-4.03 (m, 1H), 3.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.65-3.61 (m,

1H), 3.14 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.50-2.40 (m, 4H), 2.34-2.11 (m, 3H), 1.92 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.73 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.59 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.42-1.14 (m, 12H), 1.04-0.94 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.5, 171.8, 171.0, 169.5, 159.1, 150.3, 148.9, 148.4, 146.8, 144.6, 141.7, 139.3, 138.2, 135.8, 133.1, 131.6, 130.9, 130.0 (2C), 129.7, 129.5, 128.8, 128.1, 127.7, 127.1, 124.0, 120.8, 120.2, 114.6, 114.2, 69.9, 67.9, 58.7, 57.3, 56.9, 50.4, 43.2, 39.7, 36.4, 36.1, 35.2, 30.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.8, 28.5, 26.4, 26.3, 26.2, 25.8, 25.5, 16.0 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(9-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)nonammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il) benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U32)



Il composto è stato preparato dall'acido 9-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)nonanoico seguendo la procedura generale G, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 98:2, DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 96:4, DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{58}H_{73}N_9O_6S$

Resa: 40%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 1023

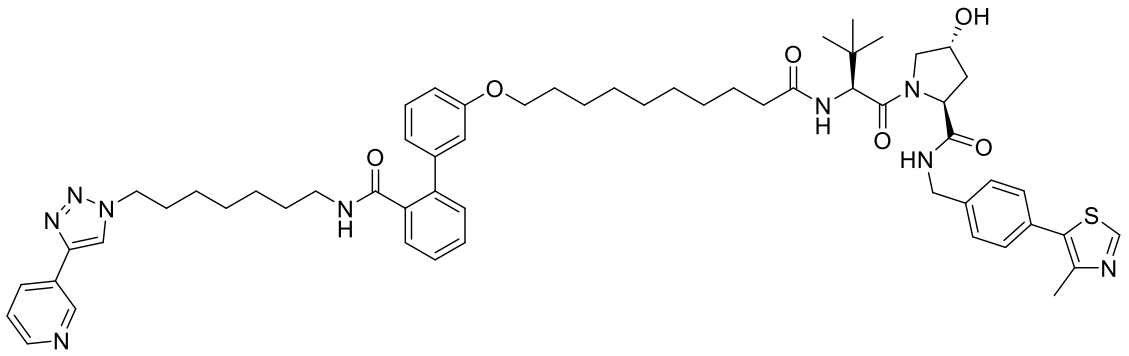
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{58}H_{74}N_9O_6S$ $[M+H]^+$ 1024.54828, found 1024.54812;

IR (KBr) 3288, 3067, 2927, 2855, 1629, 1527, 1436, 1201, 759, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.00 (br s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.53 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.25 (dt, *J* = 8.0/1.9 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.69 (dd, *J* = 7.5/1.3 Hz, 1H), 7.48-7.26 (m, 10H), 6.97-6.86 (m, 3H), 6.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.37 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.59-4.53 (m, 3H), 4.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.37-4.32 (m, 1H), 4.27 (br s, 1H), 4.06 (br d, 1H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.64-3.61 (m, 1H), 3.14 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.51-2.45 (m, 4H), 2.20-2.11 (m, 3H), 1.93 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.74 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.59 (quint, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.40 (quint, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.29-1.15 (m, 12H), 1.05-0.94 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.6, 171.8, 170.9, 169.4, 159.2, 150.3, 148.9, 148.4, 146.8, 144.6, 141.7, 139.3, 138.1, 135.7, 133.1, 131.6, 130.9, 130.0 (2C), 129.7, 129.5, 128.8, 128.1, 127.7, 127.0, 123.9, 120.8, 120.1, 114.6, 114.2, 69.9, 68.0, 58.7, 57.3, 56.9, 50.5, 43.2, 39.7, 36.5, 36.0, 35.2, 30.2, 29.2 (3C), 29.1, 29.0, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 25.6, 16.0 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(10-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)decanammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il) benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U33)



Il composto è stato preparato dall'acido 10-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)decanoico seguendo la procedura generale G,

il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 98:2, DCM/MeOH 97:3 e DCM/MeOH 96:4.

Formula bruta: $C_{59}H_{75}N_9O_6S$
Resa: 67%
Stato fisico: solido bianco
Peso molecolare: 1037

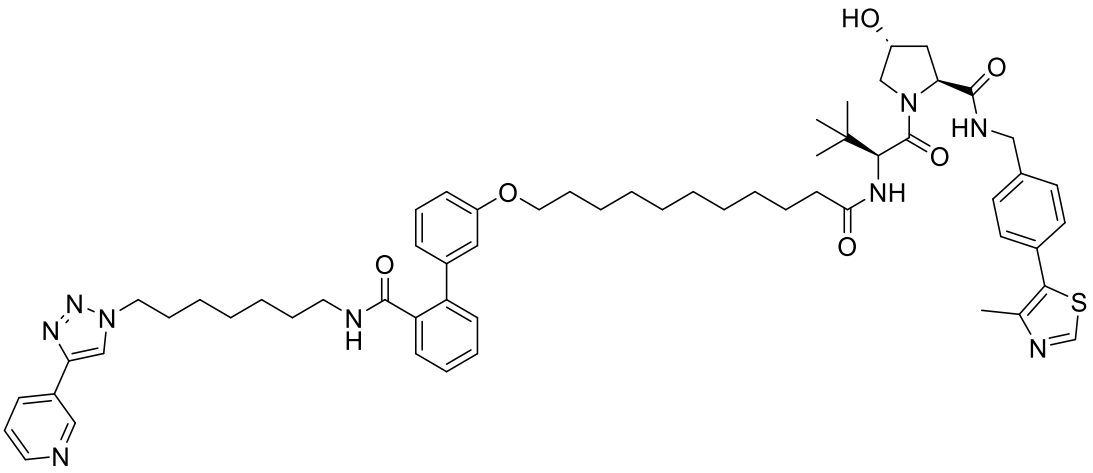
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{59}H_{76}N_9O_6S$ $[M+H]^+$ 1038.56393, found 1038.56175;

IR (KBr) 3290, 3065, 2925, 2854, 1628, 1528, 1434, 1201, 1028, 759, 697 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.00 (br s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.54 (br s, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.47-7.26 (m, 10H), 6.97-6.87 (m, 3H), 6.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.37 (br s, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.58-4.53 (m, 3H), 4.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.37-4.32 (m, 1H), 4.08-4.05 (m, 1H), 3.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.65-3.61 (m, 1H), 3.14 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.51 (br s, 4H), 2.20-2.14 (m, 3H), 1.93 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.75 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.58-1.51 (m, 2H), 1.44-1.15 (m, 16H), 1.04-0.94 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.7, 171.8, 170.9, 169.4, 159.2, 150.3, 148.8, 148.4, 146.7, 144.5, 141.7, 139.3, 138.1, 135.7, 133.2, 131.6, 130.9, 130.1, 130.0, 129.7, 129.5, 128.8, 128.1, 127.7, 127.1, 124.0, 120.8, 120.1, 114.6, 114.2, 69.9, 68.0, 58.7, 57.3, 56.8, 50.5, 43.2, 39.7, 36.5, 36.1, 35.2, 30.2, 29.3, 29.2, 29.2, 29.1, 29.1, 28.8, 28.5, 26.4, 26.3, 26.2, 26.0, 25.6, 16.0 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(11-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)undecanammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il) benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U34)



Il composto è stato preparato dall'acido 11-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)undecanoico seguendo la procedura generale G, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 98:2, DCM/MeOH 97:3 e DCM/MeOH 95:5.

Formula bruta: $C_{60}H_{77}N_9O_6S$

Resa: 51%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 1051

HRMS (ESI) *m/z* calcd.for $C_{60}H_{78}N_9O_6S$ $[M+H]^+$ 1052.57958, found 1052.57738;

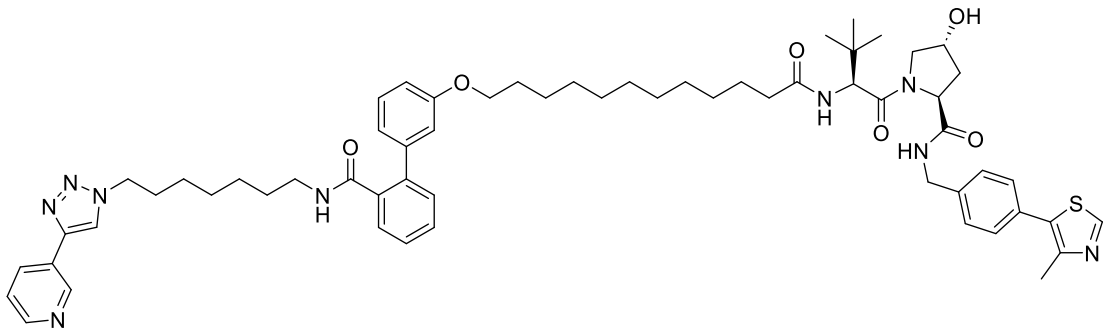
IR (KBr) 3294, 3066, 2922, 2852, 1628, 1528, 1434, 1201, 844, 759, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (br s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.57 (d, *J* = 4Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.49-7.28 (m, 10H), 6.98-6.89 (m, 3H), 6.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.30 (br s, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.61-4.53 (m, 3H), 4.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.38-4.33 (m, 1H), 4.13-4.11 (m, 1H), 3.95 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.63-3.60 (m, 1H), 3.18-3.13 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.60-2.53 (m, 4H), 2.21-2.12 (m, 3H), 1.97-1.92 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.77 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.59 (br s, 2H), 1.50-1.44 (m, 4H), 1.28-1.19 (m, 14H), 1.06-0.95 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.8, 171.9, 170.8, 169.4, 159.2, 150.3, 149.0, 148.5, 146.8, 144.6, 141.7, 139.3, 138.1, 135.7, 133.1, 131.6, 131.0, 130.0 (2C), 129.7, 129.5, 128.8, 128.1, 127.7, 127.0, 123.9, 120.8, 120.1, 114.6, 114.2, 70.0, 68.0, 58.5, 57.4, 56.8,

50.5, 43.3, 39.7, 36.5, 35.8, 35.0, 30.2, 29.4, 29.3 (2C), 29.2 (3C), 29.1, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 25.6, 16.0 ppm.

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(12-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)dodecanammido)butanoil)-4-idrossi-N-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide (U35)



Il composto è stato preparato dall'acido 12-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)dodecanoico seguendo la procedura generale G, il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 98:2, DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 96:4 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{61}H_{79}N_9O_6S$

Resa: 35%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 1065

HRMS (ESI) *m/z* calcd.for $C_{61}H_{80}N_9O_6S$ $[M+H]^+$ 1066.59523, found 1066.59612;

IR (KBr) 3285, 3069, 2922, 2853, 1630, 1528, 1435, 1201, 759, 697 cm^{-1};

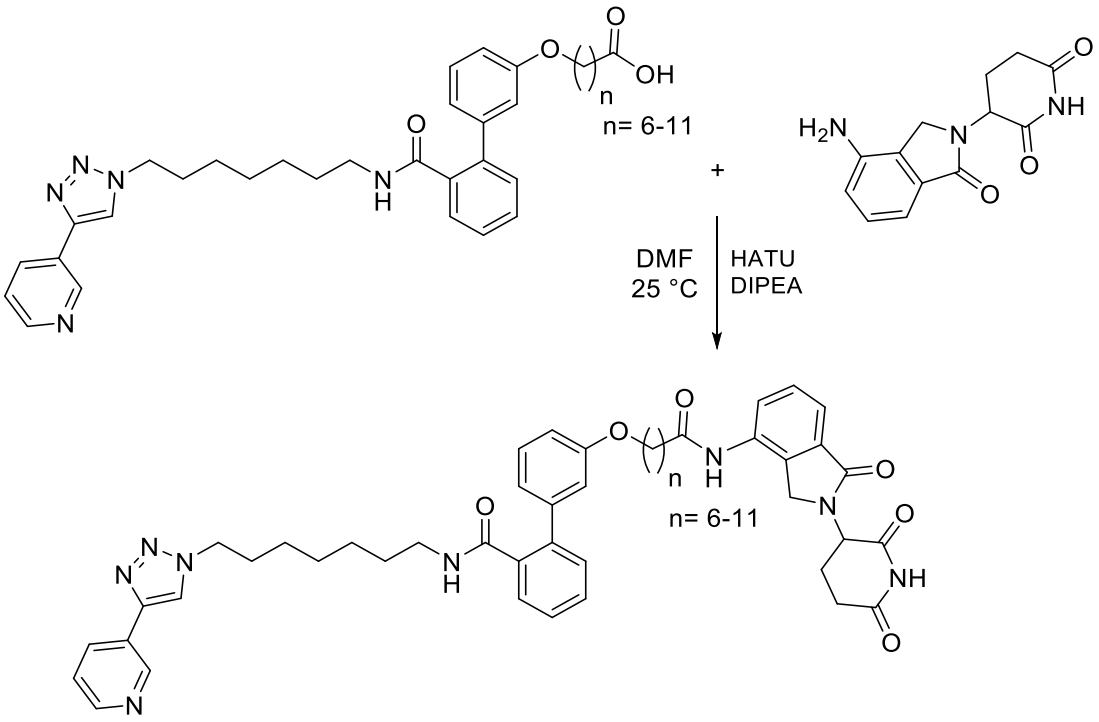
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (br s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.57 (br s, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.49-7.28 (m, 10H), 6.98-6.88 (m, 3H), 6.20 (br d, 1H), 5.31 (br s, 1H), 4.74 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.61-4.54 (m, 3H), 4.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.38-4.33 (m, 1H), 4.11-4.08 (br d, 1H), 3.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.64-3.60 (m, 1H), 3.15 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.57-2.52 (m, 4H), 2.21-2.15 (m, 3H), 1.94 (quint,

J = 7.0 Hz, 4H), 1.77 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.59 (br s, 2H), 1.44 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.26-1.18 (m, 16H), 1.06-0.94 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.7, 172.0, 170.7, 169.4, 159.2, 150.3, 149.0, 148.5, 146.9, 144.6, 141.7, 139.3, 138.1, 135.7, 133.1, 131.6, 131.0, 130.1, 130.0, 129.7, 129.5, 128.9, 128.1, 127.7, 127.0, 123.9, 120.8, 120.0, 114.6, 114.2, 70.0, 68.0, 58.5, 57.4, 56.8, 50.5, 43.3, 39.7, 36.5, 35.8, 35.0, 30.2, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.2 (3C), 29.1, 28.9, 28.5, 26.4, 26.3, 26.0, 25.5, 16.1 ppm.

5.8 Preparazione dei PROTAC NAMPT-CRBN

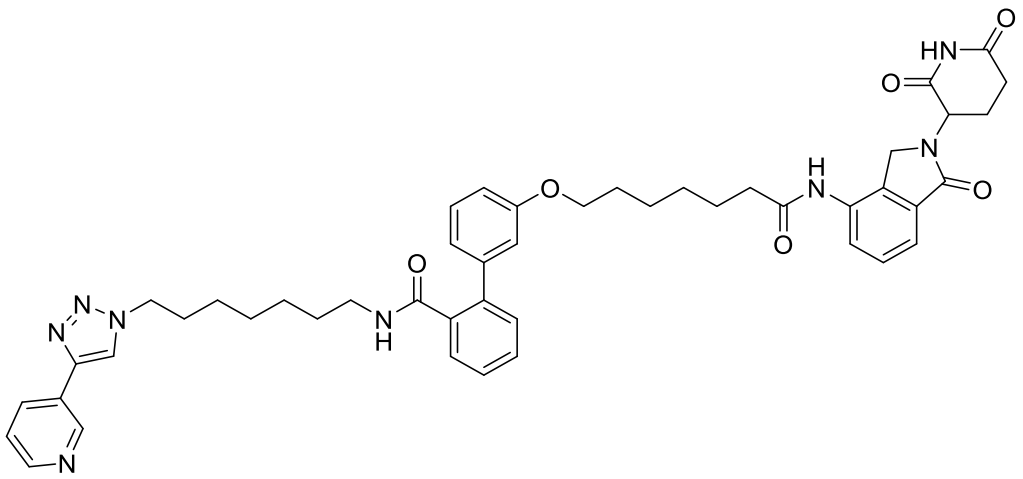
Procedura generale (H) di coupling ammidico



A una soluzione del corrispondente acido carbossilico (1 eq) in DMF anidro (0.033 M), posta sotto vigorosa agitazione magnetica, in atmosfera di azoto, si aggiunge 3-(4-amino-1-ossoisoindolin-2-il)piperidin-2,6-dione (1 eq), DIPEA (5 eq) e HATU (2 eq). Si lascia reagire a temperatura ambiente sotto azoto per una notte.

La miscela di reazione viene diluita con brine ed estratta con DCM (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1), anidrificate con Na_2SO_4, filtrate e concentrate sottovuoto. Il grezzo ottenuto viene purificato mediante colonna cromatografica flash.

Sintesi di 3'((7-((2-(2,6-diossopiperidin-3-il)-1-ossoisoindolin-4-il)amino)-7-ossoeptil)ossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)-[1-1'-bifenil]-2-carbossammide (U36)



Il composto è stato preparato dall'acido 7-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)eptanoico seguendo la procedura generale H, il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 96:4, DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{47}H_{52}N_8O_6$

Resa: 49%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 824

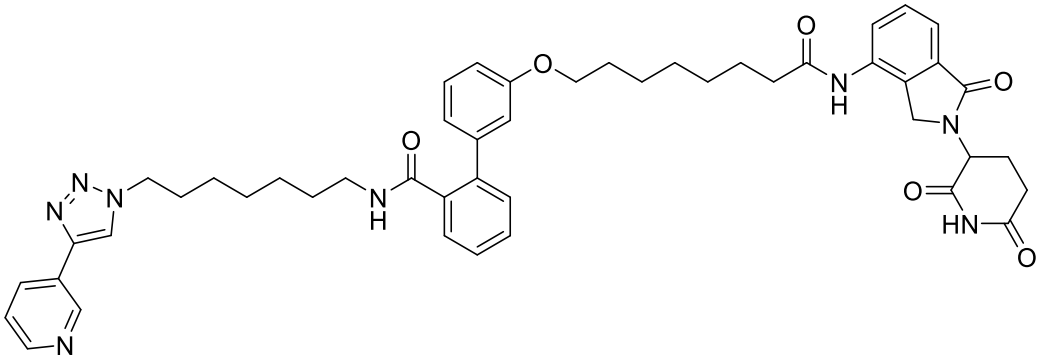
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{47}H_{53}N_8O_6$ $[M+H]^+$ 825.40881, found 825.40767;

IR (KBr) 3269, 3068, 2928, 2856, 1686, 1638, 1529, 1429, 1200, 752, 726, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.23 (s, 1H), 8.99 (br s, 2H), 8.55 (br s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.71-7.63 (m, 3H), 7.47-7.52 (m, 6H), 6.96-6.83 (m, 3H), 5.53 (br s, 1H), 5.07 (dd, *J* = 12.9/4.8 Hz, 1H), 4.41-4.33 (m, 4H), 3.90 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.14 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.78-2.66 (m, 2H), 2.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.19-2.09 (m, 2H), 1.91-1.89 (m, 2H), 1.74 (br s, 4H), 1.43 (br s, 4H), 1.23-1.19 (m, 6H), 1.00 (br d, 2H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.2, 175.6, 170.0, 169.8, 169.1, 159.1, 148.8, 146.6, 144.5, 141.6, 139.3, 135.8, 134.1, 133.3, 133.3, 132.6, 130.1 (2C), 129.7, 128.9, 128.5, 127.7, 126.9, 126.2, 124.0, 120.7, 120.5, 120.3, 114.9, 114.1, 67.9, 51.8, 50.5, 46.8, 39.7, 36.6, 31.5, 30.1, 28.8 (2C), 28.5, 26.3, 26.1, 25.6, 25.4, 23.2 ppm.

Sintesi di 3'((8-((2-(2,6-diossopiperidin-3-il)-1-ossoisoindolin-4-il)amino)-8-ossoottil)ossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)-[1-1'-bifenil]-2-carbossammide (U37)



Il composto è stato preparato dall'acido 8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)ottanoico seguendo la procedura generale H, il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 96:4, DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{48}H_{54}N_8O_6$

Resa: 39%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 838

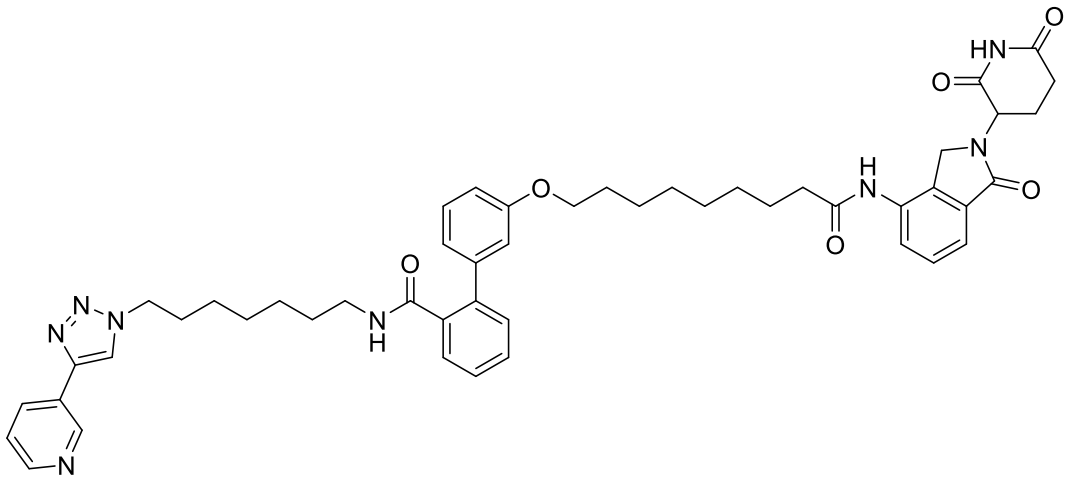
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{48}H_{55}N_8O_6$ $[M+H]^+$ 839.42446, found 839.42275;

IR (KBr) 3256, 3066, 2923, 2853, 1682, 1639, 1601, 1534, 1430, 1201, 1051, 793, 751, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (s, 2H), 8.90 (s, 1H), 8.57 (br s, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.68-7.63 (m, 3H), 7.49-7.27 (m, 6H), 6.96 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.89-6.86 (m, 2H), 5.43 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.13 (dd, *J* = 13.1/5.2 Hz, 1H), 4.46-4.36 (m, 4H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.15 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.83-2.69 (m, 2H), 2.43 (t, *J* = 7.3

Hz, 2H), 2.29-2.18 (m, 1H), 2.14-2.11 (m, 1H), 1.92 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.74 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.46-1.38 (m, 6H), 1.27-1.15 (m, 6H), 1.00 (quint, J = 7.0 Hz, 2H) ppm; **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.1, 171.4, 169.8, 169.7, 169.1, 159.1, 148.9, 146.6, 144.6, 141.6, 139.3, 135.7, 134.4, 133.3, 133.2, 132.7, 130.1, 130.0, 129.8, 128.9, 128.6, 127.7, 127.0, 126.2, 124.0, 120.7, 120.6, 120.2, 114.7, 114.3, 68.0, 51.8, 50.5, 46.8, 39.8, 36.6, 31.5, 30.2, 28.9, 28.8, 28.8, 28.7, 28.5, 26.4, 26.2, 25.9, 25.4, 23.3 ppm.

Sintesi di 3'((9-((2-(2,6-diossopiperidin-3-il)-1-ossoisoindolin-4-il)amino)-9-ossononil)ossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)-[1-1'-bifenil]-2-carbossammide (U38)



Il composto è stato preparato dall'acido 9-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)nonanoico seguendo la procedura generale H, il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 95:5 e DCM/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{49}H_{56}N_8O_6$

Resa: 53%

Stato fisico: solido off-white

Peso molecolare: 852

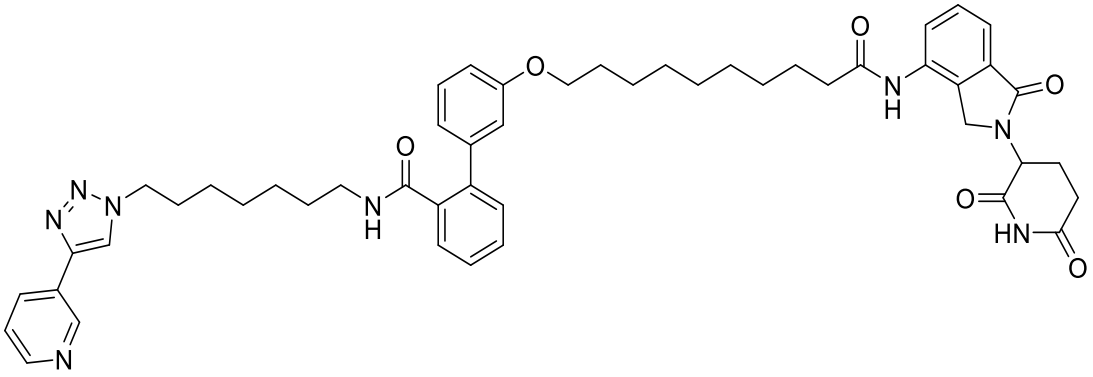
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{49}H_{57}N_8O_6$ $[M+H]^+$ 853.44011, found 853.43877;

IR (KBr) 3270, 3065, 2925, 2852, 1677, 1638, 1534, 1430, 1200, 1051, 751, 698 cm^{-1}.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (br s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.57 (br s, 1H), 8.22 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.68-7.65 (m, 3H), 7.49-7.28 (m, 6H), 6.97 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.89-6.87 (m, 2H), 5.40 (br t, 1H), 5.14 (dd, *J* = 13.1/4.9 Hz, 1H), 4.45-4.40 (m, 4H), 3.93 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.15 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.85-2.70 (m, 2H), 2.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.28-2.16 (m, 2H), 1.93 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.79-1.74 (m, 4H), 1.43-1.17 (m, 14H), 1.02-1.00 (m, 2H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.3, 171.7, 170.1, 169.7, 169.1, 159.1, 148.9, 146.7, 144.5, 141.6, 139.3, 135.7, 134.2, 133.4, 133.2, 132.6, 130.1 (2C), 129.7, 128.9, 128.6, 127.7, 126.9, 126.2, 124.0, 120.7, 120.5, 120.3, 114.8, 114.1, 68.0, 51.8, 50.5, 46.8, 39.7, 36.8, 31.5, 30.2, 29.0 (2C), 29.0 (2C), 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 25.8, 25.6, 23.2 ppm.

Sintesi di 3'((10-((2-(2,6-diossopiperidin-3-il)-1-ossoisoindolin-4-il)amino)-10-ossodecil)ossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)-[1-1'-bifenil]-2-carbossammide (U39)



Il composto è stato preparato dall'acido 10-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)decanoico seguendo la procedura generale H, il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 98:2 e DCM/MeOH 97:3.

Formula bruta: $C_{50}H_{58}N_8O_6$

Resa: 35%

Stato fisico: solido off-white

Peso molecolare: 866

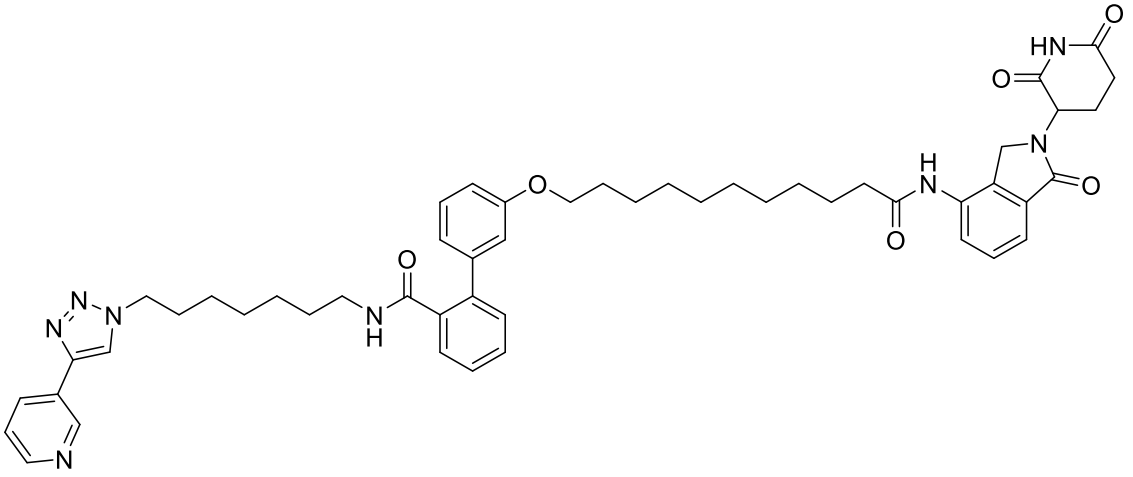
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{50}H_{59}N_8O_6$ $[M+H]^+$ 867.45576, found 867.45320;

IR (KBr) 3260, 3065, 2926, 2854, 1686, 1639, 1601, 1534, 1430, 1201, 1050, 793, 752, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.19 (br s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.80 (br s, 1H), 8.55 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 8.20 (dt, *J* = 6.1/1.8 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.69-7.63 (m, 3H), 7.48-7.27 (m, 6H), 6.95 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.89-6.86 (m, 2H), 5.47 (t, *J* =5.6 Hz, 1H), 5.09 (dd, *J* = 13.1/5.2 Hz, 1H), 4.42-4.37 (m, 4H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.14 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.24-2.08 (m, 2H), 1.92 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.77-1.68 (m, 4H), 1.41-1.15 (m, 16H), 1.01 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.3, 171.6, 170.0, 169.6, 169.1, 159.2, 148.8, 146.6, 144.5, 141.6, 139.3, 135.6, 134.2, 133.3, 133.2, 132.6, 130.1 (2C), 129.7, 128.9, 128.7, 127.7, 127.0, 126.2, 124.0, 120.8, 120.6, 120.2, 114.8, 114.1, 68.0, 51.8, 50.5, 46.8, 39.7, 38.8, 31.5, 30.2, 29.2, 29.1, 29.0, 29.0, 28.9, 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 25.9, 25.6, 23.2 ppm.

Sintesi di 3'((11-((2-(2,6-diossopiperidin-3-il)-1-ossoisoindolin-4-il)amino)-11-ossoundecil)ossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)-[1-1'-bifenil]-2-carbossammide (U40)



Il composto è stato preparato dall' acido 11-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)undecanoico seguendo la procedura generale H, il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 98:2, DCM/MeOH 97:3, DCM/MeOH 96:4 e DCM/MeOH 95:5.

Formula bruta: $C_{51}H_{60}N_8O_6$

Resa: 28%

Stato fisico: solido off-white

Peso molecolare: 880

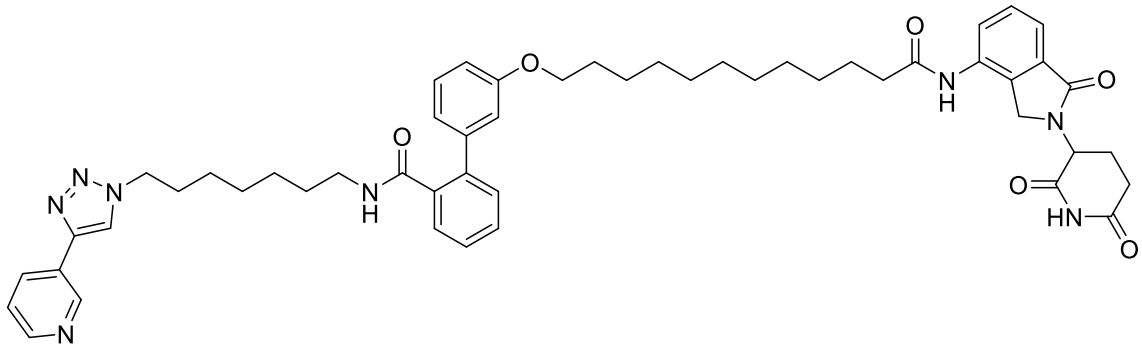
HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{51}H_{61}N_8O_6$ $[M+H]^+$ 881.47141, found 861.46948;

IR (KBr) 3269, 3058, 2923, 2852, 1686, 1639, 1535, 1453, 1430, 1201, 1050, 751, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.07 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.56 (br s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.69-7.65 (m, 3H), 7.48-7.27 (m, 6H), 6.97-6.87 (m, 3H), 5.42 (t, *J* =5.5 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 13.0/4.9 Hz, 1H), 4.42-4.38 (m, 4H), 3.93 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.15 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.80-2.66 (m, 2H), 2.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.25-2.20 (m, 1H), 2.18-2.09 (m, 1H), 1.90 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.76-1.69 (m, 4H), 1.42-1.18 (m, 18H), 1.04-1.02 (m, 2H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.2, 171.5, 169.9, 169.5, 169.1, 159.2, 149.0, 146.8, 144.6, 141.7, 139.3, 135.6, 134.2, 133.2, 133.1, 132.6, 130.1 (2C), 129.7, 128.9, 128.7, 127.7, 126.9, 126.2, 123.9, 120.8, 120.7, 120.1, 114.8, 114.2, 68.0, 51.8, 50.5, 46.8, 39.7, 36.8, 31.5, 30.1, 29.7, 29.3, 29.2, 29.1, 29.1 (2C), 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 25.6, 23.2 ppm.

Sintesi di 3'((12-((2-(2,6-diossopiperidin-3-il)-1-ossoisoindolin-4-il)amino)-12-ossododecil)ossi)-N-(7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)-[1-1'-bifenil]-2-carbossammide (U41)



Il composto è stato preparato dall'acido 12-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)dodecanoico seguendo la procedura generale H, il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti DCM/MeOH 98:2, DCM/MeOH 97:3 e DCM/MeOH 95:5.

Formula bruta: $C_{52}H_{62}N_8O_6$

Resa: 35%

Stato fisico: solido off-white

Peso molecolare: 894

HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{52}H_{63}N_8O_6$ $[M+H]^+$ 895.48706, found 895.48523;

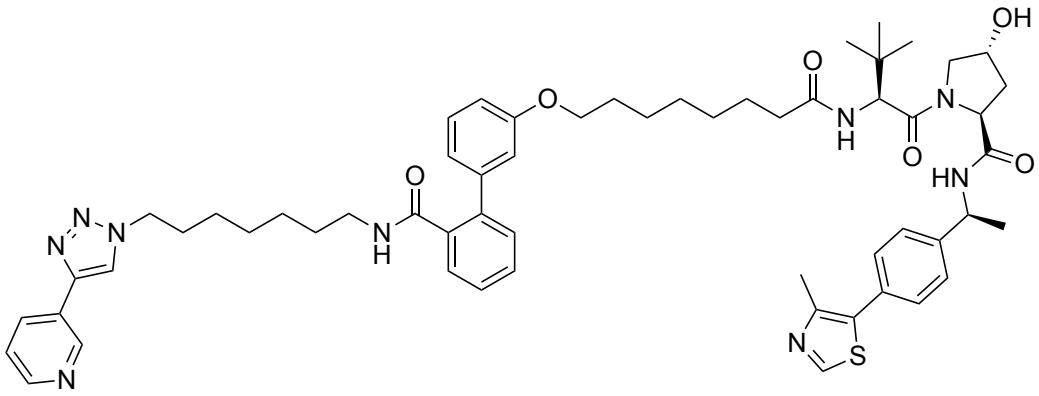
IR (KBr) 3269, 3066, 2923, 2852, 1684, 1639, 1602, 1533, 1430, 1297, 1200, 1051, 751, 698 cm^{-1};

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.02 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.57 (br s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.70-7.67 (m, 3H), 7.49-7.28 (m, 6H), 6.97-6.88 (m, 3H), 5.39 (br t, 1H), 5.13 (dd, *J* = 13.0/5.0 Hz, 1H), 4.43-4.40 (m, 4H), 3.94 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.15 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.84-2.70 (m, 2H), 2.41 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.30-2.15 (m, 2H), 1.93 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.77-1.70 (m, 4H), 1.43-1.16 (m, 20H), 1.04 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.1, 171.4, 169.9, 169.5, 169.0, 159.2, 148.9, 146.7, 144.6, 141.6, 139.3, 135.6, 134.3, 133.2, 133.1, 132.7, 130.1 (3C), 129.7, 129.0, 128.8, 127.7, 127.0, 126.2, 124.0, 120.8, 120.1, 114.8, 114.1, 68.0, 51.8, 50.5, 46.7, 39.7, 36.9, 31.5, 30.2, 29.3 (3C), 29.2 (4C), 28.8, 28.5, 26.4, 26.2, 26.0, 25.6, 23.3 ppm.

5.9 Sintesi del PROTAC U42 e del controllo negativo U42-NC con ligando (S)-metil VHL

Sintesi di (2S,4R)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)octanammido)butanoil)-4-idrossi-N-((S)-1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etil)pirrolidin-2-carbossamide (U42)



Il composto è stato preparato dall' acido 8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)ottanoico e (2S,4R)-1-((S)-2-amino-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-N-((S)-1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etil)pirrolidin-2-carbossamide commerciale seguendo la procedura generale G.

Il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti CH_2Cl_2/MeOH 98:2 e CH_2Cl_2/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{58}H_{73}N_9O_6S$

Resa: 84%

Stato fisico: solido bianco

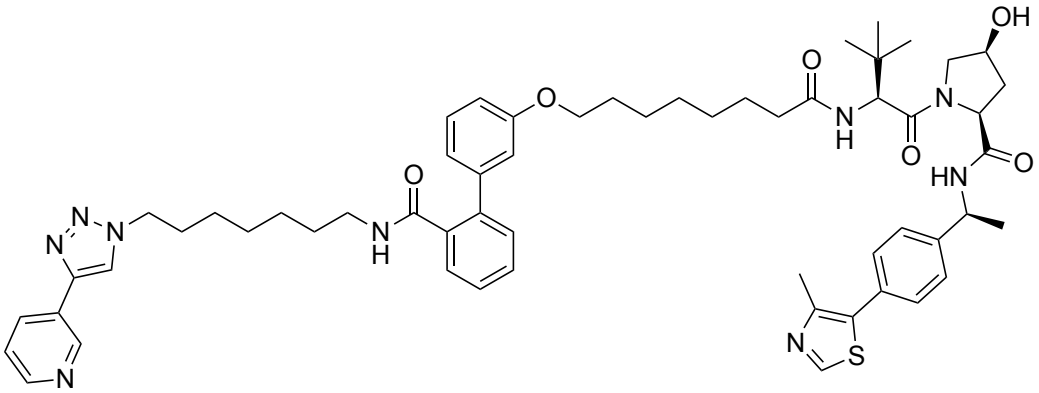
Peso molecolare: 1023

HRMS (ESI) m/z calcd. for $C_{58}H_{74}N_9O_6S$ $[M+H]^+$ 1024.54828, found 1024.54811;
IR (neat) 3292, 3065, 2929, 2858, 1627, 1528, 1436, 1300, 1201, 759, 698 cm^{-1};
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.99 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.53 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 8.24 (dt, J = 8.0, 1.9 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.68 (dd, J = 7.5, 1.6 Hz, 1H), 7.46-7.25 (m, 11H), 6.95 (dt, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 6.89 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 6.85 (ddd, J = 8.3, 2.6, 1.0 Hz,

1H), 6.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.30 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.07 (quint, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.51 (brs, 1H), 4.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.06 (dt, *J* = 11.5, 1.9 Hz, 1H), 3.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.59 (dd, *J* = 11.3, 3.8 Hz, 1H), 3.13 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.54-2.48 (m, 4H), 2.21-2.17 (m, 2H), 2.09-2.03 (m, 1H), 1.92 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.73 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.61 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.46 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.43-1.38 (m, 2H), 1.34-1.21 (m, 8H), 1.17 (quint, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.03-0.97 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.6, 172.2, 169.8, 169.5, 159.3, 150.4, 149.1, 148.6, 147.0, 144.7, 143.3, 141.8, 139.4, 135.9, 133.2, 131.7, 131.0, 130.2, 130.1, 129.8, 129.7, 128.9, 127.8, 127.2, 126.6, 124.0, 121.0, 120.3, 114.7, 114.3, 70.0, 68.0, 58.6, 57.6, 56.9, 50.6, 49.0, 39.8, 36.5, 35.6, 35.3, 30.4, 29.2, 29.2, 29.1, 29.0, 28.7, 26.6, 26.5, 26.4, 26.0, 25.6, 22.3, 16.2 ppm.

Sintesi di (2S,4S)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1,1'-bifenil]-3-il)ossi)octanammido)butanoil)-4-idrossi-N-((S)-1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etil)pirrolidin-2-carbossamide (U42-NC)



Il composto è stato preparato dall' acido 8-((2'-((7-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)eptil)carbamoil)-[1-1'-bifenil]-3-il)ossi)ottanoico e (2S,4S)-1-((S)-2-amino-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-N-((S)-1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etil)pirrolidin-2-carbossamide commerciale seguendo la procedura generale G.

Il grezzo viene purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluenti CH_2Cl_2/MeOH 98:2 e CH_2Cl_2/MeOH 9:1.

Formula bruta: $C_{58}H_{73}N_9O_6S$

Resa: 56%

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 1023

HRMS (ESI) *m/z* calcd. for $C_{58}H_{74}N_9O_6S$ $[M+H]^+$ 1024.54828, found 1024.54576;

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.02 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.22 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.71-7.65 (m, 2H), 7.48-7.27 (m, 10H), 6.98-6.87 (m, 3H), 6.19 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.31 (brt, 1H), 5.09 (quint, J = 7.1 Hz, 1H), 4.75 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.47-4.41 (m, 3H), 3.95-3.82 (m, 4H), 3.15 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.36-2.15 (m, 4H), 1.93 (quint, J = 6.9 Hz, 2H), 1.76 (quint, J = 6.4 Hz, 2H), 1.63 (brs, 2H), 1.52-1.18 (m, 15H), 1.07-1.04 (m, 11H) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.1, 172.5, 171.5, 169.4, 159.2, 150.4, 149.1, 148.6, 147.0, 144.7, 142.3, 141.7, 139.2, 135.8, 133.0, 131.4, 131.2, 130.1, 130.0, 129.7 (2C), 128.8, 127.7, 126.9, 126.5, 123.8, 120.9, 119.9, 114.6, 114.2, 71.0, 68.0, 59.9, 58.6, 57.0, 50.4, 49.3, 39.6, 36.4, 35.1, 34.7, 30.2, 29.2 (2C), 29.0, 28.9, 28.5, 26.4, 26.3, 26.2, 25.9, 25.4, 21.9, 16.1 ppm.

6. Bibliografia

1. Ding Y, Fei Y, Lu B. Emerging New Concepts of Degrader Technologies. *Trends Pharmacol Sci*. **2020**, 41(7):464-474.
2. Liu Z, Hu M, Yang Y, Du C, Zhou H, Liu C, Chen Y, Fan L, Ma H, Gong Y, Xie Y. An overview of PROTAC: a promising drug discovery paradigm. *Mol Biomed*. **2022**, 3(1):46.
3. Hinterndorfer M, Spiteri VA, Ciulli A, Winter GE. Targeted protein degradation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. **2025**, 25(7):493-516.
4. Peng W, Pan X, Wang S, Huang G, Qian Y. New PROTAC Designs for Targeted Protein Degradation in 2021-2025: Novel E3 Ligases and Pre-PROTAC. *J Med Chem*. **2026**, 69(8):8688-8718.
5. Zhao L, Zhao J, Zhong K, Tong A, Jia D. Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application. *Signal Transduct Target Ther*. **2022**, 7(1):113.
6. Békés M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov*. **2022**, 21(3):181-200.
7. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. **2006**, 443(7113):780-6.
8. Berndsen CE, Wolberger C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol*. **2014**, 21(4):301-7.
9. Kleiger G, Mayor T. Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol*. **2014**, 24(6):352-9.
10. Liu, X.; Zhang, X.; Lv, D.; Yuan, Y.; Zheng, G.; Zhou, D. Assays and Technologies for Developing Proteolysis Targeting Chimera Degraders. *Future Med. Chem*., **2020**, fmc-2020-0073.
11. Gentile G, D'Aguanno S, Di Martile M, Petricca A, Valentini E, Scalera S, Del Bufalo D. PROTAC-based protein degradation: a window of opportunity for melanoma therapy. *J Biomed Sci*. **2026**, 33(1):23.
12. Bondeson, D. P.; Smith, B. E.; Burslem, G. M.; Buhimschi, A. D.; Hines, J.; Jaime-Figueroa, S.; Wang, J.; Hamman, B. D.; Ishchenko, A.; Crews, C. M. Lessons in PROTAC Design from Selective Degradation with a Promiscuous Warhead. *Cell Chem. Biol*., **2018**, *25* (1), 78-87.e5.

13. Dale, B.; Cheng, M.; Park, K.-S.; Kaniskan, H. Ü.; Xiong, Y.; Jin, J. Advancing Targeted Protein Degradation for Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **2021**, *21* (10), 638–654.
14. Garber, K. The PROTAC Gold Rush. *Nat. Biotechnol.*, **2022**, *40* (1), 12–16.
15. Moreau, K.; Coen, M.; Zhang, A. X.; Pachl, F.; Castaldi, M. P.; Dahl, G.; Boyd, H.; Scott, C.; Newham, P. Proteolysis-targeting Chimeras in Drug Development: A Safety Perspective. *Br. J. Pharmacol.*, **2020**, *177* (8), 1709–1718.
16. Pettersson M, Crews CM. PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTAC) - Past, present and future. *Drug Discov Today Technol*. **2019**, 31:15-27.
17. Campone M, De Laurentiis M, Jhaveri K, Hu X, Ladoire S, Patsouris A, Zamagni C, Cui J, Cazzaniga M, Cil T, Jerzak KJ, Fuentes C, Yoshinami T, Rodriguez-Lescure A, Sezer A, Fontana A, Guarneri V, Molckovsky A, Mouret-Reynier MA, Demirci U, Zhang Y, Valota O, Lu DR, Martignoni M, Parameswaran J, Zhi X, Hamilton EP; VERITAC-2 Study Group. Vepdegestrant, a PROTAC Estrogen Receptor Degrader, in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. **2025**, 393(6):556-568.
18. https://www.medchemexpress.com/vepdegestrant.html?srsltid=AfmBOoqhMoxWi_sUORWT3OXvrL5uadcVkuFT_2B848F0YvX2fOMAq0Gw (ultimo accesso 11/09/2026)
19. Liu, Z.; Hu, M.; Yang, Y.; Du, C.; Zhou, H.; Liu, C.; Chen, Y.; Fan, L.; Ma, H.; Gong, Y.; et al. An Overview of PROTAC: A Promising Drug Discovery Paradigm. *Mol. Biomed.*, **2022**, *3* (1), 46.
20. Ciulli, A.; Trainor, N. A Beginner's Guide to PROTAC and Targeted Protein Degradation. *The Biochemist*, **2021**, *43* (5), 74–79.
21. Schneider, M.; Radoux, C. J.; Hercules, A.; Ochoa, D.; Dunham, I.; Zalmas, L.-P.; Hessler, G.; Ruf, S.; Shanmugasundaram, V.; Hann, M. M.; et al. The PROTACtable Genome. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2021**, *20* (10), 789–797.
22. Burslem, G. M.; Crews, C. M. Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell*, **2020**, *181* (1), 102–114.
23. Bricelj, A.; Steinebach, C.; Kuchta, R.; Gütschow, M.; Sosič, I. E3 Ligase Ligands in Successful PROTAC: An Overview of Syntheses and Linker Attachment Points. *Front. Chem.*, **2021**, *9*, 707317.

24. Luo, X.; Archibeque, I.; Dellamaggiore, K.; Smither, K.; Homann, O.; Lipford, J. R.; Mohl, D. Profiling of Diverse Tumor Types Establishes the Broad Utility of VHL-Based PROTAC and Triages Candidate Ubiquitin Ligases. *iScience*, **2022**, *25* (3), 103985.
25. Troup, R. I.; Fallan, C.; Baud, M. G. J. Current Strategies for the Design of PROTAC Linkers: A Critical Review. *Explor. Target. Anti-Tumor Ther.*, **2020**, *1* (5).
26. Verdin, E. NAD + in Aging, Metabolism, and Neurodegeneration. *Science*, **2015**, *350* (6265), 1208–1213.
27. Rosado, M. M.; Bennici, E.; Novelli, F.; Pioli, C. Beyond DNA Repair, the Immunological Role of PARP -1 and Its Siblings. *Immunology*, **2013**, *139* (4), 428–437.
28. Luk, T.; Malam, Z.; Marshall, J. C. Pre-B Cell Colony-Enhancing Factor (PBEF)/Visfatin: A Novel Mediator of Innate Immunity. *J. Leukoc. Biol.*, **2008**, *83* (4), 804–816.
29. Berger, F. The New Life of a Centenarian: Signalling Functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.*, **2004**, *29* (3), 111–118.
30. Khan, J. A.; Forouhar, F.; Tao, X.; Tong, L. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Metabolism as an Attractive Target for Drug Discovery. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2007**, *11* (5), 695–705.
31. Li F, Wu C, Wang G. Targeting NAD Metabolism for the Therapy of Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Neurosci Bull*. **2024**, 40(2):218-240.
32. Wang, T.; Zhang, X.; Bheda, P.; Revollo, J. R.; Imai, S.; Wolberger, C. Structure of Nampt/PBEF/Visfatin, a Mammalian NAD+ Biosynthetic Enzyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2006**, *13* (7), 661–662.
33. Khan, J. A.; Tao, X.; Tong, L. Molecular Basis for the Inhibition of Human NMPRTase, a Novel Target for Anticancer Agents. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2006**, *13* (7), 582–588.
34. Galli, U.; Colombo, G.; Travelli, C.; Tron, G. C.; Genazzani, A. A.; Grolla, A. A. Recent Advances in NAMPT Inhibitors: A Novel Immunotherapic Strategy. *Front. Pharmacol.*, **2020**, *11*, 656.

35. Kennedy, B. E.; Sharif, T.; Martell, E.; Dai, C.; Kim, Y.; Lee, P. W. K.; Gujar, S. A. NAD+ Salvage Pathway in Cancer Metabolism and Therapy. *Pharmacol. Res.*, **2016**, *114*, 274–283.
36. Travelli, C.; Consonni, F. M.; Sangaletti, S.; Storto, M.; Morlacchi, S.; Grolla, A. A.; Galli, U.; Tron, G. C.; Portararo, P.; Rimassa, L.; et al. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Acts as a Metabolic Gate for Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.*, **2019**, *79* (8), 1938–1951.
37. Grolla, A. A.; Travelli, C.; Genazzani, A. A.; Sethi, J. K. Extracellular Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, a New Cancer *Metabokine*. *Br. J. Pharmacol.*, **2016**, *173* (14), 2182–2194.
38. Galli, U.; Travelli, C.; Massarotti, A.; Fakhfouri, G.; Rahimian, R.; Tron, G. C.; Genazzani, A. A. Medicinal Chemistry of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56* (16), 6279–6296.
39. Hasmann M, Schemainda I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res*. **2003**, 63(21):7436-42.
40. Colombo, G.; Clemente, N.; Zito, A.; Bracci, C.; Colombo, F. S.; Sangaletti, S.; Jachetti, E.; Ribaldone, D. G.; Caviglia, G. P.; Pastorelli, L.; et al. Neutralization of Extracellular NAMPT (Nicotinamide Phosphoribosyltransferase) Ameliorates Experimental Murine Colitis. *J. Mol. Med.*, **2020**, *98* (4), 595–612.
41. Https://Clinicaltrials.Gov/Search?Intr=apo866.
42. Https://Clinicaltrials.Gov/Search?Intr=chs-828.
43. Https://Clinicaltrials.Gov/Study/NCT03921879.
44. Zhu, X.; Liu, H.; Chen, L.; Wu, C.; Liu, X.; Cang, Y.; Jiang, B.; Yang, X.; Fan, G. Addressing the Enzyme-Independent Tumor-Promoting Function of NAMPT via PROTAC-Mediated Degradation. *Cell Chem. Biol.*, **2022**, *29* (11), 1616-1629.e12.
45. Lu, T.; Chen, F.; Yao. J.; Bu, Z.; Kyani, A.; Liang, B.; Chen, S.; Zheng, Y.; Liang, H.; Neamati, N.; Liu, Y. Design of FK866-Based Degraders for Blocking the Nonenzymatic Functions of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *J. Med. Chem.*, **2024**, *67* (10), 8099-8121.

46. Bi, K.; Cheng, J.; He, S.; Fang, Y.; Huang, M.; Sheng, C.; Dong, G. Discovery of Highly Potent Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Degraders for Efficient Treatment of Ovarian Cancer. *J. Med. Chem.*, **2023**, *66* (1), 1048–1062.
47. Yingqi Song, Chengjie Yang, Qingjun Li, Shijie Huang, Shaojie Chen, Zhewei Xia, Xiaojun Yao, Chunquan Sheng, Guoqiang Dong; Discovery of a Potent NAMPT-Targeting PROTAC for the Suppression of Triple-Negative Breast Cancer via Macrophage Reprogramming. *J. Med. Chem.* **2026**, 69 (14): 16801–16818.
48. Galli, U.; Moro, M.; Balestrero, F. C.; Colombo, G.; Koten, M.; Roncaglio, B.; Genazzani, A. A.; Aprile, S.; Massarotti, A.; Orsomando, G.; Pirali, T.; Grolla, A. A. Development of PROTAC Targeting the Moonlighting Enzyme Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) for Breast Cancer Therapy. *J. Med. Chem.*, **2026**, 69:5259-5290.
49. Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **2001**, *40*, 2004- 2021.
50. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41* (14), 2596–2599.
51. Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. Freeze-frame inhibitor captured acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. U.S.A. **2004**, *101 (6)*, 1449-1454.
52. Travelli, C.; Aprile, S.; Rahimian, R.; Grolla, A. A.; Rogati, F.; Bertolotti, M.; Malagnino, F.; Di Paola, R.; Impellizzeri, D.; Fusco, R.; Mercalli, V.; Massarotti, A.; Stortini, G.; Terrazzino, S.; Del Grosso, E.; Fakhfouri, G.; Troiani, M. P.; Alisi, M. A.; Grosa, G.; Sorba, G.; Canonico, P. L.; Orsomando, G.; Cuzzocrea, S.; Genazzani, A. A.; Galli, U.; Tron, G. C. Identification of novel triazole-based nicotinamide phosphoribosyltrasferase (NAMPT) inhibitors endowed with antiproliferative and antiinflammatory activity. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1768-1792.
53. Grolla, A. A.; Miggiano, R.; Di Marino, D.; Bianchi, M.; Gori, A.; Orsomando, G.; Gaudino, F.; Galli, U.; Del Grosso, E.; Mazzola, F.; Angeletti, C.; Guarnieri, M.; Torretta, S.; Calabrò, M.; Boumya, S.; Fan, X.; Colombo, G.; Travelli, C.;

Rocchio, F.; Aronica, E.; Wohlschlegel, J. A.; Deaglio, S.; Rizzi, M.; Genazzani, A. A.; Garavaglia, S. A nicotinamide phosphoribosyltransferase–GAPDH interaction sustains the stress-induced NMN/NAD^+ salvage pathway in the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*. **2020**, *295*, 3635-3651.

54. Yan, W.; Pan, B.-S.; Shao, J.; Lin, H.; Li, H. Feasible Column Chromatography-Free, Multi-Gram Scale Synthetic Process of VH032 Amine, Which Could Enable Rapid PROTAC Library Construction. *ACS Omega*, **2022**, *7* (30), 26015–26021.
55. Crew, A. P.; Raina, K.; Dong, H.; Qian, Y.; Wang, J.; Vigil, D.; Serebrenik, Y. V.; Hamman, B. D.; Morgan, A.; Ferraro, C.; et al. Identification and Characterization of Von Hippel-Lindau-Recruiting Proteolysis Targeting Chimeras (PROTAC) of TANK-Binding Kinase 1. *J. Med. Chem.*, **2018**, *61* (2), 583–598.
56. Raina, K.; Lu, J.; Qian, Y.; Altieri, M.; Gordon, D.; Rossi, A. M.; Wang, J.; Chen, X.; Dong, H.; Siu, K.; Winkler, J. D.; Crew, A. P.; Crews, C. M.; Coleman, K. G. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 7124-7129.
57. Galdeano, C.; Gadd, M. S.; Soares, P.; Scaffidi, S.; Van Molle, I.; Birced, I.; Hewitt, S.; Dias, D. M.; Ciulli, A. Structure-Guided Design and Optimization of Small Molecules Targeting the Protein−Protein Interaction between the von Hippel−Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase and the Hypoxia Inducible Factor (HIF) Alpha Subunit with in Vitro Nanomolar Affinities. *J. Med. Chem*. **2014**, *57*, 8657−8663.