

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Chimiche

Ciclo XXV

**Settore Concorsuale di afferenza: 03/C1**

**Settore Scientifico disciplinare: CHIM/06**

Sintesi di molecole biologicamente attive con tecniche chemoenzimatiche:  
 $\beta$ -lattami, profeni e  $\alpha$ -amminoacidi non naturali

**Presentata da: Matteo Pori**

**Coordinatore Dottorato**

**Adriana Bigi**

**Relatore**

**Daria Giacomini**

**Esame finale anno 2013**

# Indice

<b>MEDAGLIONE</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	
La sintesi organica: storia e recenti sviluppi	<b>5</b>
La biocatalisi	<b>7</b>
La sintesi organica per la costruzione di molecole biologicamente attive	<b>10</b>
Le classi di molecole sintetizzate durante il mio dottorato	<b>12</b>
<b>1) I <math>\beta</math>-LATTAMI</b>	
1.1 Struttura chimica dei $\beta$ -lattami	<b>15</b>
1.2 L'anello $\beta$ -lattamico nelle molecole biologicamente attive: antibiotici	<b>16</b>
1.3 L'anello $\beta$ -lattamico nelle molecole biologicamente attive: inibitore enzimatico e altre attività	<b>45</b>
1.4 L'anello $\beta$ -lattamico come sintone: sintesi di $\beta$ -amminoacidi	<b>53</b>
1.5 Parte sperimentale	<b>62</b>
<b>2) I PROFENI</b>	
2.1 Gli acidi 2-Aril Propionici	<b>82</b>
2.2 Metodologie di sintesi di (S)-Profeni	<b>84</b>
2.3 Metodo chemoenzimatico per la sintesi di (S)-Profeni con Alcol Deidrogenasi	<b>90</b>
2.4 Metodo chemoenzimatico per la sintesi di (S)-Profeni con Alcol Deidrogenasi: Ossidazione	<b>118</b>
2.5 Parte Sperimentale	<b>138</b>
<b>3) Gli <math>\alpha</math>-amminonitrili</b>	
3.1 $\alpha$ -amminonitrili : reattività e sintesi	<b>145</b>
3.2 La sintesi di Strecker degli $\alpha$ -amminonitrili	<b>149</b>
3.3 La sintesi di Strecker asimmetrica	<b>160</b>
3.4 Parte sperimentale	<b>171</b>

# Medaglione

Dott. PORI MATTEO

Chimica Organica

Relatore: Prof.ssa Daria Giacomini

*SINTESI DI MOLECOLE BIOLOGICAMENTE ATTIVE CON TECNICHE CHEMOENZIMATICHE:  $\beta$ -LATTAMI, PROFENI E  $\alpha$ -AMMINOACIDI NON NATURALI*

Durante il triennio di frequenza della Scuola di Dottorato in Scienze Chimiche, il Dott. Pori si è occupato della sintesi di molecole biologicamente attive quali profeni, beta-lattami e alfa-ammino nitrili utilizzando metodologie di sintesi organica e di biocatalisi.

Nell'ambito di nuove strategie di sintesi di molecole bioattive ha messo a punto un processo chemoenzimatico per la sintesi di profeni. Queste molecole sono derivati dell'acido 2-aril-propanoico particolarmente noti e molto utilizzati in ambito farmaceutico per la loro attività antiinfiammatoria. Abbiamo realizzato la loro sintesi utilizzando una reazione di riduzione di aldeidi arilpropioniche raceme ad opera dell'enzima Horse Liver Alcohol Dehydrogenase (HLADH) e ottenendo enantioselettivamente i corrispondenti (S)-alcooli.

Grazie ad una borsa di studio Marco Polo il candidato ha trascorso un periodo all'*University College* di Dublino (UCD) durante il quale ha stata messo a punto l'immobilizzazione di una nuova forma dell'enzima HLADH. Il nuovo enzima ha portato miglioramenti nel processo di ottenimento dei profenoli: la possibilità di riutilizzo dell'enzima per più cicli di reazione e inoltre una maggiore e completa enantioselettività. Per completare l'ottenimento di (S)-Profeni abbiamo infine realizzato la reazione di ossidazione degli (S)-aril propanoli ottenuti con HLADH secondo due strategie: una chimica utilizzando il sistema  $\text{NaCl}_2\text{O}$ - $\text{NaClO}$ -TEMPO ed una enzimatica tramite l'enzima Laccasi da *Trametes Versicolor* con ottimi risultati in termini di resa e di purezza ottica dei prodotti finali.

Per quanto riguarda la classe di molecole a scheletro beta-lattamico, sono stati sintetizzati beta-lattami monociclici *N* tiometilati, variamente sostituite in posizione C-3 e C-4 specialmente con residui polifenolici. Le molecole ottenute sono state valutate come antibatterici su ceppi di *Staphylococcus aureus* resistenti prelevati da pazienti affetti da fibrosi cistica. Sono state identificati quattro nuovi beta-lattami con ottimi valori di MIC. Di due di questi è stata studiata la biodegradabilità in condizioni acide e basiche con lo scopo di studiarne la stabilità nel tempo e la persistenza ambientale. Queste strutture sono poi state opportunamente modificate con fenoli aromatici quali acido siringico, caffeico e 3,4-diidrossi benzoico per associare al potere antibiotico anche quello antiossidante. Sono state poi progettate e sintetizzate molecole azetidioniche coniugate a precursori dell'acido retinoico valutate per il differenziamento su cellule staminali neuronali e altre con catene amminoacidiche mimanti il motivo strutturale del peptide RGD da valutare come inibitori di integrine.

Nell'ambito della sintesi di alfa-ammino acidi, il candidato si è inoltre occupato della messa a punto di una nuova metodologia di sintesi di  $\alpha$ -ammino nitrili tramite reazione di Strecker utilizzando acetone cianidrina come fonte di cianuro. Sono stati ottenuti ottimi risultati con composti carbonilici e ammine primarie o secondarie. Il protocollo è stato successivamente esteso ad ammine chirali derivate da amminoacidi con lo scopo di studiare la diastereoselettività e la sintesi di nuovi ammino-nitrili.

I risultati di queste ricerche sono stati pubblicati o sono in corso di pubblicazione su riviste internazionali e sono stati oggetto di comunicazioni a congressi nazionali ed internazionali.

Al termine del percorso di dottorato il Dott. Pori ha raggiunto ottime capacità nel portare avanti un progetto di ricerca in maniera autonoma sia nella fase di progettazione sia di realizzazione e nel relazionare anche in lingua inglese i risultati ottenuti in congressi internazionali.

*Il Collegio esprime pertanto un parere di eccellenza sull'attività complessivamente svolta dal candidato durante il ciclo di dottorato e lo ritiene meritevole di conseguire il Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche.*

## Abstract (inglese)

The research project of this thesis has been focused on the synthesis of three class of molecules:  $\beta$ -lactams, Profens and  $\alpha$ -aminonitriles by using modern techniques of organic synthesis, favouring sustainable and green methodologies, especially biocatalytic strategies.

Profens are a very important and widespread category of pain killer and in particular we developed and optimized a two steps procedure to obtain (*S*)-Profens from racemic 2-aryl propanals. The first step was a bio-reduction of the aldehydes to (*S*)-2-Aryl Propanols with a DKR process mediated by Horse Liver Alcohol Dehydrogenase (HLADH); the second one was a "green oxidation" to (*S*)-Profens promoted by  $\text{NaClO}_2$  and TEMPO/ $\text{NaClO}$  as catalyst. To improve the whole two-step process, in a collaboration with the research group of Francesca Paradisi at the University College of Dublin we immobilized a modified HLADH, with good yields and better enantioselectivity. We also proposed an interesting enzymatic approach for the oxidation of (*S*)-2-Aryl Propanols by using Laccase from *Trametes Versicolor*.

$\beta$ -lactam ring is a very important heterocycle, known to be an interesting pharmacophore. We synthesized new *N*-methylthio monobactams which showed an interesting antibacterial activity against resistant strains of *Staphylococcus Aureus* collected from patients of cystic fibrosis. We then conjugated polyphenolic groups to the new monobactams obtaining molecules with antioxidant and antibacterial with dual-activity. A new hybrid retinoid- $\beta$ -lactam was developed which induced differentiation on neuroblastoma cells. The ring opening of monobactams by hydrolytic enzymes was investigated to access desymmetrized chiral  $\beta$ -aminoacids such as beta-aminoglutamic acid monoesters.

For what concerns the third class of molecules reported, the  $\alpha$ -aminonitriles, a new Strecker protocol was developed. Reactions worked very well in water by using acetone cyanohydrin as cyanide source with different aldehydes and ketones and primary or secondary amines; to provide an asymmetric version of our protocol we used chiral amines from chiral pool obtaining new chiral  $\alpha$ -aminonitriles.

## Abstract (italiano)

Il progetto di ricerca di questa tesi è stato focalizzato sulla sintesi di tre classi di molecole:  $\beta$ -lattami, Profeni e  $\alpha$ -amminonitrili, utilizzando moderne tecniche di sintesi organica, metodologie ecosostenibili e strategie biocatalitiche.

I profeni sono una categoria di antiinfiammatori molto diffusa e in particolare abbiamo sviluppato e ottimizzato una procedura in due step per ottenere (*S*)-Profeni da 2-arilpropanali raceme. Il primo step consiste in una bioriduzione delle aldeidi per dare i relativi (*S*)-2-Aril Propanoli tramite un processo DKR mediato dall'enzima Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. Il secondo, l'ossidazione a (*S*)-Profeni, è promossa da  $\text{NaClO}_2$  e TEMPO come catalizzatore. Con lo scopo di migliorare il processo, in collaborazione con il gruppo di ricerca di Francesca Paradisi all'University College Dublino abbiamo immobilizzato l'enzima HLADH, ottenendo buone rese e una migliore enantioselettività. Abbiamo inoltre proposto un interessante approccio enzimatico per l'ossidazione degli (*S*)-2-Aril Propanoli utilizzando una laccasi da *Trametes Versicolor*.

L'anello  $\beta$ -lattamico è un eterociclo molto importante, noto per essere un interessante farmacoforo. Abbiamo sintetizzato nuovi *N*-metiltio beta-lattami, che hanno mostrato un'attività antibatterica molto interessante contro ceppi resistenti di *Staphylococcus Aureus* prelevati da pazienti affetti da fibrosi cistica. Abbiamo poi coniugato gruppi polifenolici a questi nuovi  $\beta$ -lattami ottenendo molecole antiossidanti e antibatteriche, cioè con attività duale. Abbiamo poi sintetizzato un nuovo ibrido retinoide-beta-lattame che ha indotto differenziazione si cellule di neuroblastoma. Abbiamo poi sfruttato la reazione di aperture dell'anello monobattamico tramite enzimi idrolitici, con lo scopo di ottenere  $\beta$ -amminoacidi chirali desimmetrizzati come il monoestere dell'acido  $\beta$ -aminoglutamic.

Per quando riguarda gli  $\alpha$ -amminonitrili, è stato sviluppato un protocollo di Strecker. Le reazioni sono state molto efficienti utilizzando come fonte di cianuro l'acetone cianidrina in acqua, utilizzando differenti aldeidi e chetoni, ammine primarie e secondarie. Per mettere a punto una versione asimmetrica del protocollo, abbiamo usato ammine chirali con lo scopo di ottenere nuovi  $\alpha$ -amminonitrili chirali.

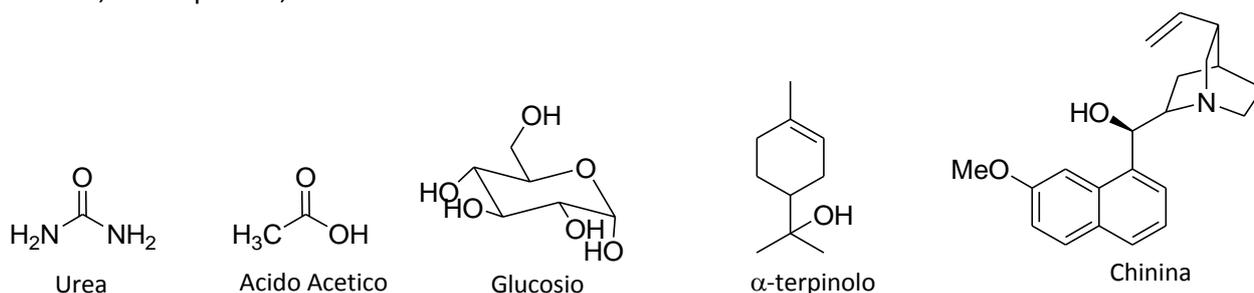
# Introduzione

## La sintesi organica: storia e recenti sviluppi

La chimica sintetica per sua stessa definizione (sintesi = processo di mettere insieme) è la scienza di costruire molecole a partire da atomi e/o molecole. Può essere suddivisa in chimica organica sintetica e chimica inorganica sintetica, in funzione della natura delle molecole target. La sintesi infine può essere definita a sua volta "totale" quando ci si pone l'obiettivo di sintetizzare una molecola, spesso complessa, a partire da semplici elementi. Nel corso degli anni la disciplina si è affermata soprattutto per l'ottenimento di molecole bioattive e/o naturali (ma non solo), portando ad un impatto considerevole in campo medico e farmacologico. La sintesi organica quindi è ora come ora una scienza che si pone l'obiettivo di costruire molecole complesse per i più svariati utilizzi. All'interno della mia tesi discuterò alcune metodologie di sintesi organica volte all'ottenimento di molecole dotate di specifiche attività biologiche: si parlerà quindi di sintesi "Target Oriented", cioè volta alla costruzione di molecole "ad hoc" con un design ben preciso.

## Una breve storia della sintesi organica fino ai giorni nostri

La sintesi organica ha una lunga storia rintracciabile fin dall'antichità, anche se non fu riconosciuta in quanto tale poiché praticata senza un metodo scientifico. Come scienza la sintesi organica è quindi relativamente giovane e si può definirne un inizio con la sintesi razionale e pensata dell'urea da parte di Wöhler<sup>1</sup> nel 1825. Da lì in poi vennero progettate altre sintesi: l'acido acetico ad opera di Kolbe<sup>2</sup>, il glucosio di Fisher,<sup>3</sup> l' $\alpha$ -terpinolo<sup>4</sup>, la chinina<sup>5</sup> e tante altre.



L'importanza di questa disciplina fu ampiamente riconosciuta nel secolo successivo con la vincita di numerosi Nobel da parte di chimici "sintetici". Tuttavia solo dopo la seconda guerra mondiale prese piede fortemente la sintesi di molecole più complesse, in particolare molecole naturali. Si svilupparono così vere e proprie teorie e metodologie per la sintesi organica, tra cui l'approccio retrosintetico, per cui Corey prese il premio Nobel nel 1990.

Negli ultimi anni però la tendenza del mondo della sintesi organica e della chimica in generale si sta fortemente indirizzando a reinventarsi tramite la green chemistry, cioè con la ricerca di uno sviluppo sostenibile in termini ambientali. Questo significa cominciare a sostituire metodologie inquinanti ed ad alto impatto ambientale con processi nuovi più ecosostenibili. Il professore Anastas nel 1991 ha enunciato le basi della "chimica verde", la chimica sostenibile, elencando i seguenti 12 principi:<sup>6</sup>

1. È meglio prevenire la produzione di rifiuti che trattare o ripulire i rifiuti dopo la loro formazione.
2. I metodi di sintesi devono essere progettati per massimizzare l'incorporazione di tutti i materiali utilizzati nel processo nel prodotto finale.

<sup>1</sup> Wöhler, F., *Ann. Phys Chem.*, **1828**, 12, 253

<sup>2</sup> Kolbe, H., *Ann. Phys Chem.*, **1845**, 54, 145

<sup>3</sup> Fisher, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, 23, 799

<sup>4</sup> Perkin, W.H., *J. Chem. Soc.*, **1904**, 654

<sup>5</sup> Woodward R. B., Doering W. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1944**, 66, 894.

<sup>6</sup> Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, 1998, p.30

3. Per quanto possibile, le metodologie di sintesi dovrebbero essere ideate per usare o generare sostanze che abbiano poca o nessuna tossicità per la salute umana e l'ambiente.
4. I prodotti chimici devono essere progettati per preservare l'efficacia della funzione, riducendo la tossicità.
5. L'uso di sostanze ausiliarie (come solventi, agenti di separazione, ecc.) deve essere reso non necessario se possibile e innocuo, se necessario.
6. I fabbisogni di energia dovrebbero essere valutati per il loro impatto ambientale ed economico che deve essere ridotto al minimo. I metodi di sintesi devono essere condotti a temperatura e pressione ambiente.
7. Una materia prima rinnovabile dovrebbe essere preferita ad una non rinnovabile, se ciò sia tecnicamente ed economicamente praticabile
8. Bisognerebbe ridurre i prodotti secondari laddove possibile
9. Bisognerebbe usare catalizzatori (più selettivi possibile) che siano recuperabili e riutilizzabili
10. I prodotti chimici devono essere progettati in modo che al termine della loro funzione non persistano nell'ambiente e diano prodotti di degradazione innocui.
11. Le metodologie analitiche devono essere ulteriormente sviluppati per consentire in tempo reale, per impedire la formazione di sostanze nocive.
12. Il processo di sintesi e l'ambiente di reazione devono essere scelti in modo da minimizzare il rischio di incidenti sia verso l'ambiente sia verso l'operatore

Tutti questi principi racchiudono in sé il senso della chimica verde (green chemistry): lo sviluppo di processi che utilizzano la minor quantità di materiale e di energia possibile e producono quindi minor inquinamento, il tutto nel rispetto della sicurezza degli operatori.

A livello generale, l'applicazione dei principi della green chemistry si basa sull'acquisizione di un'etica da parte dei chimici e della stessa umanità, fondata sulla consapevolezza del rispetto dell'ambiente in quanto risorsa limitata che necessita di tutela e protezione. In questo senso la green chemistry si traduce quindi in una disciplina del tutto trasversale nell'ambito della chimica.

Nell'ambito della sintesi organica assume poi significati più specifici, quali:

- 1) limitare l'utilizzo del solvente: sviluppare reazioni in stato solido o senza solvente, oppure utilizzare solventi a minor impatto ambientale, quali ad esempio l'acqua;
- 2) sviluppo di catalizzatori sempre più efficienti; sfruttare catalizzatori semplici che possono essere recuperabili, oppure metodologie biocatalitiche.
- 3) limitare il numero di step sintetici; evitare se possibile l'utilizzo di gruppi protettori e fare in modo di incorporare all'interno del prodotto finale il maggior numero di reagenti utilizzati.
- 4) privilegiare se possibile reazioni che avvengono a temperatura ambiente, ma se non si può sfruttare fonti di energia alternative;

Negli ultimi anni sono quindi state messe a punto parecchie metodologie innovative che si ricollegano proprio ad una visione nuova della sintesi organica. Nel complesso l'introduzione di queste metodologie sta a poco a poco rivoluzionando l'approccio alla sintesi organica, dando accesso a molecole dotate di notevole complessità per gli utilizzi più svariati, ma nel rispetto della salute e dell'ambiente. In particolare due aspetti sono stati riconosciuti come cruciali per lo sviluppo di processi più aderenti ai principi della green chemistry: la scelta del mezzo di reazione, cioè il solvente e la scelta di processi catalitici in opposizione a processi stechiometrici."

Per quanto riguarda il problema dell'utilizzo del solvente, sono noti processi che avvengono anche senza la solubilizzazione in solvente organico e a volte addirittura due solidi sono in grado di reagire, con elevati valori di resa e selettività. Ovviamente un processo senza solvente abbatta i costi, se è possibile trasferirlo a livello industriale.

Un'alternativa al solvente organico che via via si sta sempre diffondendo, è la possibilità di svolgere la reazione in acqua. L'acqua non ha mai attirato molta attenzione, per via della difficoltà di sciogliere composti lipofili. Tuttavia la possibilità di usare miscele di acqua e solvente organico spesso riesce a

superare il problema dell'insolubilità. Inoltre, se i reagenti anche solo parzialmente riescono a sciogliersi, la reazione può comunque procedere e spostare l'equilibrio verso i prodotti. In particolare però proprio la difficile solubilità dei reagenti in acqua, li può portare a "sciogliersi l'uno nell'altro" forzandoli in micelle inverse, per effetto idrofobo. Questo ha il risultato di accelerare la reazione ed è quindi un notevole e importante vantaggio cinetico.

L'utilizzo dell'acqua, e/o l'ottimizzazione di un processo che operi in queste condizioni offre numerosi vantaggi:

- l'acqua è economica, molto più di qualsiasi altro solvente organico;
- l'acqua è sicura, non essendo infiammabile, non è né tossica, né carcinogenica;
- l'acqua consente di svolgere le reazioni senza bisogno dell'atmosfera inerte;
- l'acqua consente un miglior controllo della temperatura a causa della sua elevata capacità termica;
- l'acqua in alcuni casi facilita le reazioni organiche per effetto idrofobo.

Strettamente connesso ai principi della Green Chemistry è la ricerca di metodologie catalitiche sempre migliori. Il massimo risultato in termini di ecosostenibilità si può raggiungere utilizzando catalizzatori in gradi di funzionare in acqua e/o soluzioni saline: è il caso degli enzimi, biocatalizzatori fondamentali e ubiquitari. La biocatalisi, che sta via via sostituendo catalizzatori chimici e innovando la chimica organica, è comunque conosciuta dall'uomo da molto tempo.

## La biocatalisi

La biocatalisi<sup>7</sup> applicata affonda infatti le sue radici nell'antica Mesopotamia, nella Cina e nel Giappone, nella produzione di cibo e delle bevande, seppur con inconsapevolezza. Un approccio alla biocatalisi più scientifico cominciò però solo nell'800; Kirchoff, nel 1814, osservò che il glutine del grano riusciva a convertire l'amido in zucchero. Successivamente Payen e Persoz<sup>8</sup> osservarono che gli estratti dei germi di orzo riuscivano a idrolizzare l'amido con l'ottenimento di destrine e altri zuccheri. Questi estratti vennero chiamati "diastasi" e non erano altro che miscele di amilasi; nel 1935 Berzelius riconobbe il potere catalitico di questi estratti e da quegli anni le destrine cominciarono ad essere prodotte molto facilmente e comunemente.<sup>9</sup> Ma è solo dal 1894 in poi che le prime teorie sulla catalisi di questi estratti, sulla catalisi enzimatica, cominciarono ad essere interpretate e spiegate dal Emil Fisher. Lo scienziato era convinto che gli enzimi fossero proteine (la loro vera natura fu delucidata con sicurezza solo dopo 20 anni) e che funzionassero con un meccanismo "chiave-serratura". Un passo ulteriore sulla enzimologia fu fatto da Buchner, il quale affermò che la catalisi enzimatica non richiede necessariamente la presenza e l'azione di cellule vive.<sup>10</sup>

Al giorno d'oggi con la parola biocatalisi si intendono tutti i processi chimici che vengono mediati da enzimi o cellule intere; si va quindi dall'utilizzo di tecniche biocatalitiche per la sintesi di "fine chemicals", alle fermentazioni per la produzione di prodotti "bulk" quali l'etanolo e l'acido acetico. Ma all'interno della biocatalisi c'è anche la biotecnologia e l'ingegneria genetica, cioè quelle scienze che si pongono l'obiettivo di costruire enzimi e/o microorganismi ad hoc per svolgere funzioni specifiche.

### La biocatalisi:

I vantaggi

Il primo vantaggio e aspetto positivo della biocatalisi è sicuramente strettamente connesso alla natura stessa degli enzimi: sono catalizzatori regioselettivi, chemoselettivi e stereoselettivi particolarmente efficienti. Questo significa che molecole polifunzionali possono essere trasformate in modo molto selettivo e spesso evitando l'utilizzo di gruppi protettori, aspetto che non si può invece tralasciare nella normale sintesi organica. Tutto questo si traduce in un minor numero di passaggi per una sintesi, con guadagni economici e in termini di tempo. A questi aspetti si aggiunge anche la possibilità di poter effettuare la sintesi in soluzioni acquose ed evitare o diminuire l'utilizzo di solventi organici; a questo proposito molto è

<sup>7</sup>Bornscheuer U.T., Buchholz K., *Eng. Life. Sci.*, **2005**, 5, 4, 309.

<sup>8</sup>A. Payen, J. F. Persoz, *Annales de Chimie et de Physique*, 2m. Série, **1833**, 53, 73

<sup>9</sup>A. Payen, *Handbuch der Technischen Chemie*, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, **1874**, 2,

<sup>10</sup>E. Buchner, *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1898**, 31, 209; E. Buchner, *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1898**, 31, 209; <sup>10</sup>E. Buchner, *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1898**, 31, 209.

stato studiato in merito alla catalisi enzimatica in solventi organici. La chiralità sulle molecole può essere introdotta senza l'ausilio di catalizzatori chirali, spesso costosi e molto specifici, e/o ausiliari chirali tramite risoluzioni cinetiche, cinetico dinamiche, desimmetrizzazioni e altri processi.

L'utilizzo di sistemi biocatalitici quindi consente di rispettare molte "regole" connesse ai principi di "green chemistry" enunciati da Anastas

#### Gli svantaggi

Gli svantaggi connessi alla biocatalisi sono da ricondurre in generale alla natura dell'enzima e/o della cellula intera. Gli enzimi possono essere molto costosi, perché devono essere prodotti, estratti e purificati dalle cellule batteriche progenitrici. Spesso hanno bisogno di essere progettati ex-novo ma i tempi spesso sono molto lunghi e di pari passo costosi. Possono essere riutilizzati facilmente solo se supportati, ma ad oggi non esiste ancora una tecnica/teoria di immobilizzazione generale ed ogni enzima deve essere trattato come un caso a parte. L'immobilizzazione in alcuni casi può risultare anche impossibile, soprattutto per gli enzimi molto complessi come le deidrogenasi; spesso si deve quindi ricorrere alla modifica della struttura della proteina per adattarla all'immobilizzazione. Se il costo dell'enzima non è un problema, bisogna tenere presente che molti di loro funzionano con cofattori quali NADH, FADH; bisogna considerare il loro costo ed eventualmente superare il problema costruendo un sistema di riciclo del cofattore. Gli enzimi inoltre possono in alcuni casi non essere stabili, aspetto che ne impedisce una conservazione a lungo termine e ne diminuisce la disponibilità.

Se l'utilizzo dell'enzima spesso può essere tutt'altro che facile, spesso non è così invece con le cellule intere; i microorganismi infatti sono in genere molto resistenti, più economici e possono essere coltivati in modo da non esaurirli mai. Un ulteriore vantaggio è correlato al fatto che essendo cellule, non hanno bisogno di cofattori per funzionare.

#### La biocatalisi e l'industria

Negli anni sono stati messi a punto moltissimi processi enzimatici in tutti i campi della chimica, sia in quello dei polimeri che dell'industria cosmetica, ma soprattutto di quelle agro-alimentare e farmaceutica<sup>11</sup>.

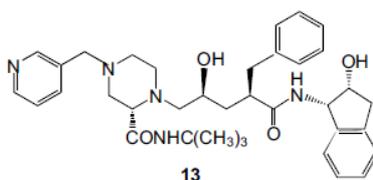
Un importante esempio in campo alimentare è l'idrolisi enzimatica dell'amido. Tale processo permette la produzione di sciroppi di glucosio o oligosaccaridi di largo impiego nel settore alimentare (non più di un terzo è invece usato nell'industria tessile e della carta). Per molto tempo l'idrolisi è stata effettuata chimicamente, con acidi inorganici e alte temperature. Con tale metodo le rese non sono elevate e si ottengono diversi sali e sottoprodotti indesiderati (soprattutto lo psicisio, zucchero non metabolizzabile)..

Altri enzimi come le pectinasi chiarificano i succhi di frutta. Molto importante è l'utilizzo invece delle lattasi: questi enzimi idrolizzano il lattosio, disaccaride che provoca spesso intolleranza, a galattosio e glucosio, aumentando quindi la digeribilità del latte.

Nell'ambito dei detersivi sono utilizzate diverse lipasi, amilasi e proteasi per rimuovere le macchie di varia natura.

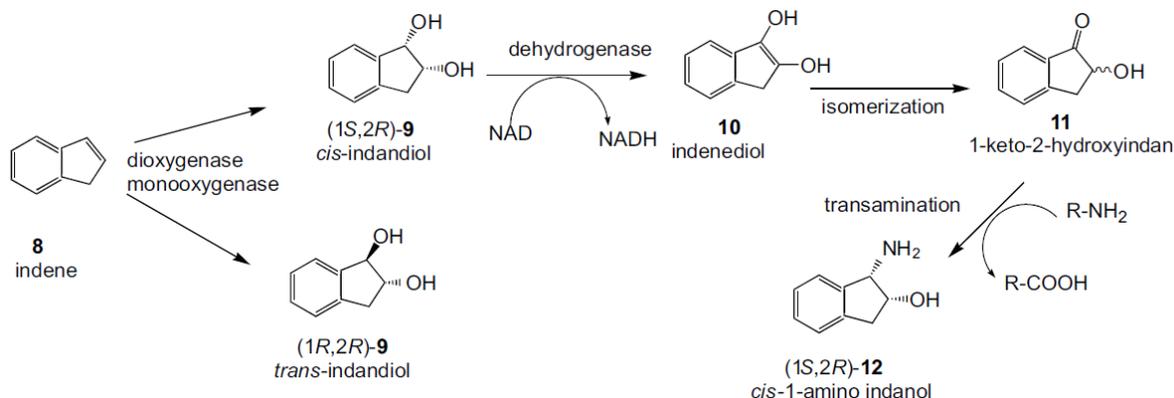
L'industria farmaceutica è un altro importante settore dove viene sempre più applicata la biocatalisi. Oltre alla produzione per via fermentativa di prodotti farmacologicamente attivi (ad es: antibiotici come penicilline e cefalosporine, antitumorali e macrolidi), altre tipologie di processi biocatalitici possono trovare applicazione nell'industria chimico-farmaceutica, soprattutto per la sintesi di farmaci molto complessi

Come esempio si può esaminare la sintesi dell'Indinavir, importante inibitore della proteasi di HIV.



<sup>11</sup> Straathof, A. J.J.; Sven Panke, S. and Schmid, A., *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13*, 548–556

Tramite la biocatalisi si può sintetizzare la parte dell'amminolo biciclico chirale, utilizzando diversi enzimi e approcci.<sup>12</sup>

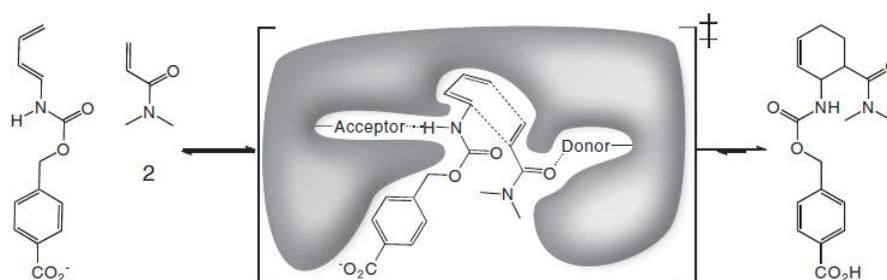


L'amminolo viene infatti sintetizzato a partire dall'indene con l'utilizzo di due passaggi di sintesi su tre catalizzati da enzimi.

Grazie all'ingegneria genetica si può "programmare" un microorganismo in modo che produca enzimi specifici con lo scopo di indurre una determinata trasformazione chimica. È il caso della "DuPont Tate & Lyle BioProducts" che ha ingegnerizzato un ceppo di *E. Coli* per produrre 1,3 propandiolo a partire da glicerolo.

Viene effettuata una disidratazione per opera di una glicerolo deidratasi e dopo equilibratura chetoenolica si procede ad una riduzione con l'enzima ADH. L'importanza dell'1,3 propandiolo sta nel suo utilizzo come liquido antigelo, solvente, precursore di polimeri e componente essenziale di numerosi prodotti industriali. Questo processo biocatalizzato offre una alternativa alla via chimica molto più "costosa" soprattutto in termini di ecosostenibilità.

Se l'ingegneria genetica offre queste possibilità, l'utilizzo anche di strumenti computazionali può permettere l'accesso alla sintesi di enzimi artificiali. Recentemente è la creazione di una "Diels Alderasi", proteina in grado di promuovere la reazione di Diels Alder, del tutto sconosciuta in natura. Baker e il suo gruppo nel 2010 hanno prodotto un enzima in grado di catalizzare questa reazione, modellandolo a priori tramite un algoritmo computazionale e poi sintetizzandolo con un microorganismo.



La reazione promossa da questo enzima artificiale è risultata enantio e diastereolettiva,.

## La sintesi organica per la costruzione di molecole biologicamente attive

La progettazione di molecole biologicamente attive è un aspetto che affronta tematiche trasversali che vanno dalla biologia molecolare, alla microbiologia, alla chimica organica e alla sintesi delle molecole.

<sup>12</sup> M. Chartrain, B. Jackey, C. Taylor, V. Sandfor, K. Gbewonyo, L. Lister, L. Dimichele, C. Hirsch, B. Heimbuch, C. Maxwell, D. Pascoe, B. Buckland, R. Greasham, *J. Ferment. Bioeng.* 86 (1998) 550–558. 19. B. Buckland, D. Robinson, M. Chartrain, *Metab. Eng.* (2000) 42–48. 20. M. Chartrain, P. Salmon, D. Robinson, B. Buckland, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2000) 209–214. 21. N. Zhang, B. Stewart, J. Moore, R. Greasham, D. Robinson, B. Buckland, C. Lee, *Metab. Eng.* 2 (2000) 339–348. 22. A. Amanullah, C. Hewitt, A. Nienow, C. Lee, M. Chartrain, B. Buckland, S. Drew, J. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* 80 (2002) 239–249.

L'identificazione del target biologico su cui progettare la sintesi della molecola (lead) non è che l'inizio del cammino che porta all'ottenimento del "farmaco". Occorre infatti seguire razionalmente alcuni step fondamentali:

- 1) Identificazione e scelta del target farmacologico;
- 2) Studio del sito attivo/recettoriale tramite metodologie dirette o indirette e dell'interazione e dello scaffold molecolare che meglio si adatta;
- 3) Sintesi della molecola.

#### Identificazione e scelta del target biologico

In primo luogo è necessario identificare il target biologico, generalmente un enzima o una proteina, e costruire una molecola che sappia interagire con essi in modo da bloccarne, inibirne o più generalmente modificarne l'attività. L'esercizio di questa attività nei confronti della proteina, classifica la molecola come farmaco. L'interazione tra una molecola ed un enzima fu ipotizzata per la prima volta da Hermann Emil Fischer nel 1894, secondo il quale l'enzima e il substrato possiedono una forma esattamente complementare che permette "un'incastro" perfetto.<sup>13</sup> Tale interazione venne definita "modello *chiave-serratura*" e suggeriva che una molecola e/o classi di molecole affini avessero la capacità unica di "aprire" l'enzima, cioè di interagire in maniera molto specifica con la proteina esercitando una determinata funzione. L'interpretazione dell'interazione tra l'enzima e substrato si è però evoluta nel tempo; si è cominciato ad osservare che l'enzima non si comportava in maniera così rigida nei confronti dei suoi substrati e il suo stesso sito attivo veniva modificato dal legame con le molecole. Si arrivò a definir quindi un nuovo modello, detto "mano-guanto" o anche "modello dell'adattamento indotto".<sup>14</sup> L'enzima giustamente non venne più considerato come una struttura rigida ma bensì dotato di un certo grado di flessibilità, caratteristica che gli consentiva di modellarsi in base alla presenza del substrato o meno. Il substrato quindi si lega al sito attivo e induce sull'enzima un cambiamento dovuto all'adattamento dello stesso enzima.

#### Lo studio del sito attivo

Il sito attivo di una proteina è la parte che lega il substrato e che induce l'enzima ad esercitare la sua attività. Da un punto di vista teorico viene suddiviso in sito di legame (dove avviene il legame con il substrato) e sito catalitico (dove avviene in effetti esercitata la funzione catalitica). Alcuni enzimi possiedono anche siti detti allosterici, che interagiscono con molecole dette effettori allosterici: queste molecole possono essere oppure no anche i substrati dello stesso enzima ma in generale modificano l'attività dell'enzima inducendo cambiamenti della struttura. I siti attivi e/o i siti allosterici devono essere identificati per poter capire la struttura delle molecole in grado di poter interagire; una metodologia diretta è sicuramente l'utilizzo dei raggi X della proteina target legata ad un suo substrato.

Se però non è possibile risalire alla struttura del recettore, si ricorre a delle tecniche computazionali, tra cui spicca la tecnica QSAR (relazione quantitativa struttura-attività). Questa metodologia stabilisce una relazione tra la struttura molecolare e l'attività biologica di una serie di composti notoriamente attivi nei confronti della proteina target. Predice la attività e la affinità di composti non noti dall'analisi delle loro similitudini e differenze strutturali, fornendo informazioni sui requisiti strutturali del sito attivo/recettoriale. Identificati i requisiti strutturali della molecola o della classe di molecola che esercita l'attività biologica, si può passare all'approccio sintetico.

La sintesi di molecole biologicamente attive, identificato un modello farmacoforico, si può orientare verso differenti approcci: 1) Target Oriented synthesis (TOS); 2) costruzione di library combinatoriali; 3) Diversity Oriented Synthesis (DOS).

La sintesi "target oriented" è una metodologia che porta alla produzione di un'unica molecola, con un set di sostituenti e spesso con un cammino di sintesi molto specifico. Questa metodologia è stata una delle prime ad essere utilizzata<sup>15</sup> ma in generale viene scelta quando il target molecolare ha una attività biologica forte e comprovata oppure ha una notevole complessità. Questo tipo di approccio però limita molto le

<sup>13</sup> Fischer E., 1894, *Ber. Dt. Chem. Ges.* 27: 2985-2993.

<sup>14</sup> Koshland D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1958, **44** (2): 98-104

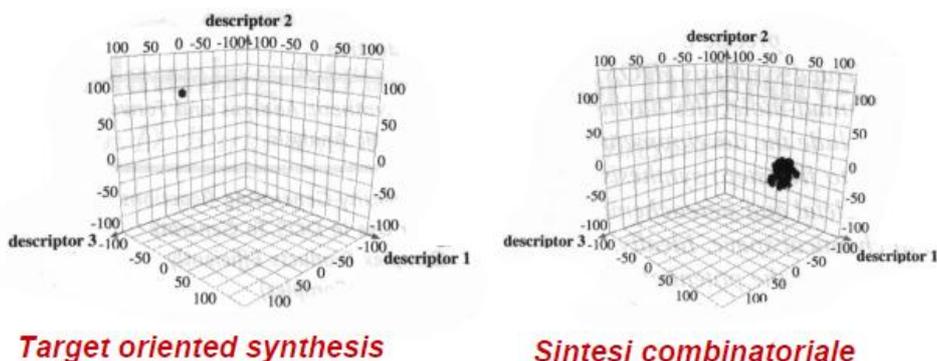
<sup>15</sup> E. J. Corey and X.-M. Cheng, *The Logic of Chemical Synthesis* (Wiley, New York, 1989)

possibilità di variare lo “scaffold” molecolare, per via della natura spesso molto specifica della via di sintesi scelta (che spesso si avvale di una strategia retrosintetica).

La sintesi combinatoriale, divenuta molto famosa soprattutto grazie alla sintesi peptidica su fase solida di Merrifield degli anni 70,<sup>16</sup> permette di ottenere una serie di n scaffold molecolari in un solo processo di sintesi, ottenendo quindi una grande diversità di substrati ottenuti. Dal punto di vista sintetico e operativo l’approccio combinatoriale permette di ampliare e arricchire il numero di molecole simili, variando i sostituenti in modo casuale e ottenendo così diverse combinazioni. Tramite questo schema si vede come, a partire da una unica molecola riconosciuta come composto capostipite (lead compound), si può ottenere, un numero elevato di nuove molecole generate da combinazioni di sostituenti diversi.

La chimica combinatoriale si è particolarmente diffusa e ha dato luogo a tecniche quali lo “split and mix” e molte altre.

Il vasto numero di molecole ottenibili grazie alla chimica combinatoriale permette di estendere quello che si definisce lo “spazio chimico”. Lo spazio chimico è una zona virtuale a n dimensioni, dove le dimensioni sono “descrittori” di caratteristiche strutturali o chimico-fisiche (ad es. formula bruta, tavola di connessione molecolare, polarità (logP), volume molare, numeri di legami liberi di ruotare etc.). Lo spazio chimico dà un’idea della diversità delle molecole. Si stima che il numero di molecole possibili è  $10^{200}$ ; quelle che possono essere attive dal punto di vista biologico, sono  $10^{60}$ . Dalla letteratura però, nel corso degli anni, sono state sintetizzate solo  $10^7$  molecole differenti. Se paragoniamo lo spazio chimico di una sintesi “target oriented” e di una combinatoriale, si nota subito come la seconda metodologia porta ad una maggiore variabilità e quindi ad una maggior percentuale di successo nell’identificare nuove molecole attive.



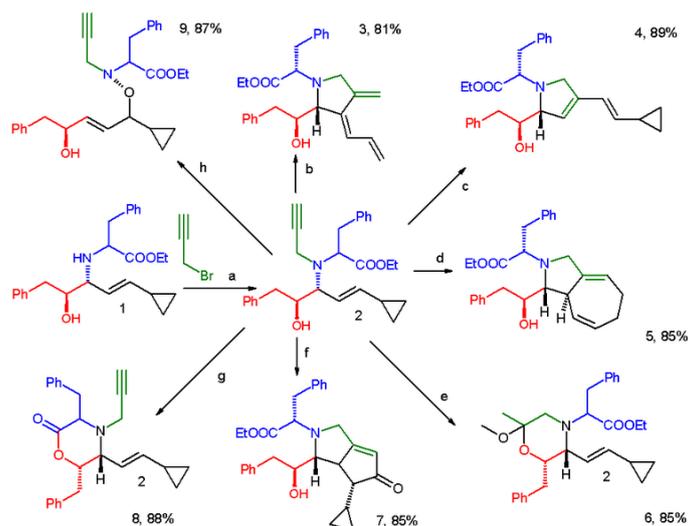
Il vantaggio della sintesi combinatoriale è notevole se si considera che spesso una molecola target può sì essere in grado di esercitare la sua attività biologica, ma allo stesso tempo potrebbe essere tossica, o portare a problemi di altra natura (problemi di assorbimento, escrezione, interazione contemporanea con altre proteine..). La possibilità di avere altre n-1 strutture analoghe ma leggermente diverse, come può garantire la costruzione di library combinatoriali, porta alla scoperta di molecole aventi con molta probabilità la stessa attività biologica (anche se eventualmente leggermente diminuita) ma non risultare tossiche.

Nel 2004 il professor Schreiber<sup>17</sup> ha proposto un approccio di sintesi che porta ad un ulteriore ampliamento dello spazio chimico; la “diversity oriented synthesis”. Questa metodologia va oltre l’approccio combinatoriale e si propone di elaborare strategie per sintetizzare molecole molto diverse a partire da molecole simili. Questo esempio mostra come da una molecola molto funzionalizzata, tramite 8 reazioni differenti, si ottengono 7 prodotti molto diversi tra di loro a partire dalla stessa molecola di partenza.<sup>18</sup>

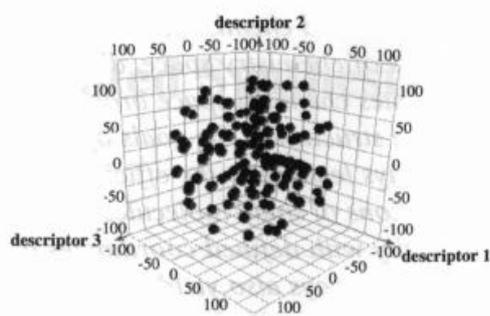
<sup>16</sup> R. B. Merrifield (1963), *Journal of the American Chemical Society* 85 (14): 2149

<sup>17</sup> Martin D. Burke and Stuart L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 46–58

<sup>18</sup> N. Kumagai, G. Muncipinto, S. L. Schreiber, *Angewandte Chemie International Edition*, 2006 45, 22, 3635.



Nello spazio chimico, questa strategia si traduce nell'ottenimento di un numero maggiore di potenziali lead compounds, con un numero di variabili  $n$  molto superiore a quello che può offrire la chimica combinatoriale. Se poi consideriamo che l'aumento dello spazio chimico è correlato, come trattato in precedenza, all'aumento del successo di un determinato lead, possiamo affermare che la diversity oriented synthesis, detta anche sintesi divergente, probabilmente potrà offrire grandi vantaggi.



### **Diversity oriented synthesis**

La sintesi divergente apre le porte al concetto di analisi Forward, il contrario della analisi retrosintetica. Se in una analisi retrosintetica ci si chiede come una molecola complessa può essere sintetizzata a partire da elementi semplici, in una analisi Forward ci si chiede come una collezione di molecole semplici e simili possono essere trasformati in una library di prodotti complessi.

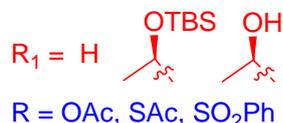
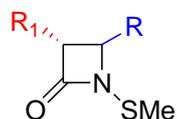
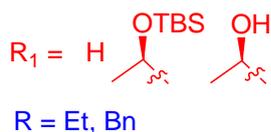
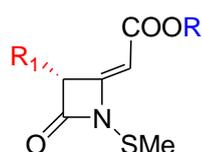
## **Le classi di molecole sintetizzate durante il mio dottorato**

Durante il mio periodo di dottorato ho utilizzato metodologie di sintesi organica e tecniche biocatalitiche con lo scopo di ottenere molecole biologicamente attive.

### **I $\beta$ -lattami**

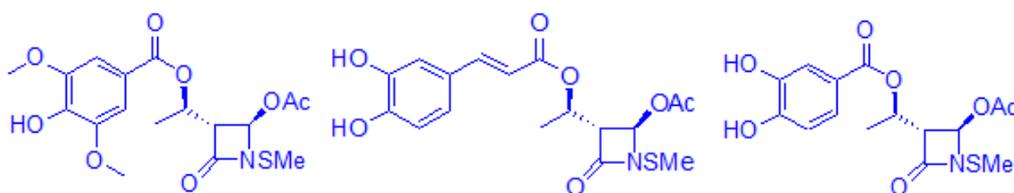
La prima classe di molecole di cui mi sono occupato è quella dei  $\beta$ -lattami, molecole note soprattutto per la loro attività biologica come antibiotici. L'anello  $\beta$ -lattamico in natura è presente in strutture bicicliche quali le penicilline e le cefalosporine, ma anche da solo come testimoniano le nocardicine.

Abbiamo sintetizzato una library di nuovi antibiotici monobattamici *N*-toliati, per conferire allo scaffold  $\beta$ -lattamico un'attività biologica di natura antibatterica.

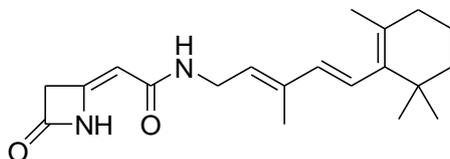


Questi nuovi antibiotici sono risultati attivi su ceppi batterici resistenti di *S. Aureus* e anche su ceppi prelevati da pazienti affetti da fibrosi cistica.

Per aumentare l'efficacia di questi antibiotici, abbiamo successivamente progettato e costruito  $\beta$  lattami coniugati a polifenoli, per conferire anche potere antiossidante. Questa modifica ha permesso di ottenere  $\beta$  lattami che hanno mostrato una certa attività antibiotica e una discreta attività antiossidante.

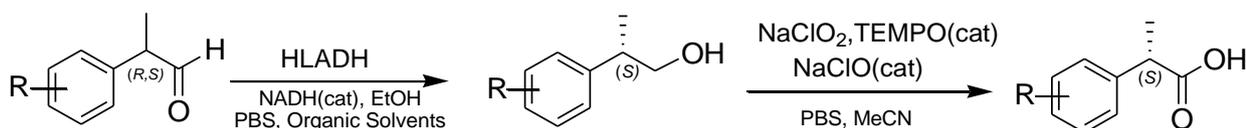


Abbiamo poi sintetizzato  $\beta$  lattami attivi nell'ambito del differenziamento cellulare, processo per cui una cellula matura e raggiunge una certa speciazione. Questo è stato possibile coniugando un monobattame 4-alchilidene ad un derivato retinoico, cioè appartenente ad una classe di molecole note per interagire nei processi di differenziamento.



## I profeni

I profeni sono molecole largamente utilizzate in ambito farmacologico in quanto antiinfiammatori non steroidei molto efficaci. Sono molecole chirali e gli studi di letteratura hanno dimostrato che l'attività biologica viene svolta in prevalenza dall'enantiomero *S*. La diffusione di questa classe di molecole e la sua commercializzazione e produzione su larga scala, ha portato alla ricerca e alla validazione di numerosi processi di sintesi. Durante il mio periodo di tesi abbiamo sviluppato una metodologia chemo-enzimatica per la sintesi di Profeni enantiomericamente puri partendo da aldeidi arilpropioniche.

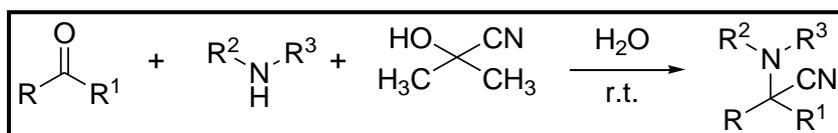


La metodologia prevede una bioriduzione catalizzata dall'enzima Horse Liver Alcohol dehydrogenase (HLADH) con l'ottenimento di (*S*)-Profenoli in elevata resa ed eccesso enantiomerico, grazie all'attivazione di un meccanismo di risoluzione cinetico-dinamica. Ho poi studiato la ossidazione (*S*)-Profenoli ad (*S*)-Profeni utilizzando  $\text{NaClO}_2$  come ossidante stechiometrico, e  $\text{NaClO}$  e TEMPO come ossidanti catalitici. Un ulteriore miglioramento della procedura è stato ottenuto con la biocatalisi. In particolare grazie ad uno stage che ho fatto presso l'università di Dublino (progetto Marco Polo, università di Bologna) è stato supportato l'enzima HLADH su resina epossidica, consentendo il recupero del biocatalizzatore e osservando

in generale una miglior stabilità in differenti solventi organici associati ad una migliore enantioselettiva. In seguito abbiamo poi studiato e realizzato una procedura di ossidazione dei profenoli a (S)-Profeni utilizzando l'enzima laccasi estratto dal fungo *Trametes Versicolor*.

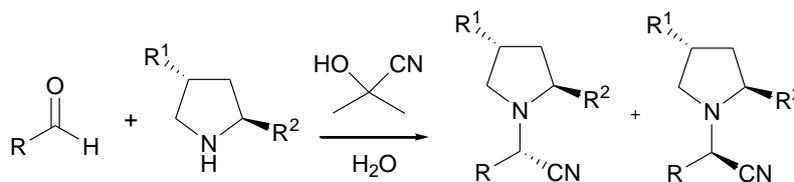
### Gli $\alpha$ -amminonitrili

L'ultima classe di molecole di cui mi sono occupato è quella degli  $\alpha$ -amminonitrili. L'estrema importanza degli  $\alpha$ -amminonitrili risiede nella capacità di poterli convertire in amminoacidi tramite semplice idrolisi della funzione nitrile ad acido carbossilico. Una delle più famose procedure per la sintesi di  $\alpha$ -ammino nitrili è il protocollo di Strecker, che consiste nel trattamento con HCN o cianuri alcalini di immine preformate partendo da composti carbonilici e cloruro di ammonio. Nel corso della mia tesi ho studiato un nuovo protocollo di sintesi di Strecker, che sfrutta la reazione tra aldeidi, ammine e acetone cianidrina in acqua.



Il protocollo si è dimostrato molto efficace, portando ad alte rese sia utilizzando aldeidi e chetoni come composti carbonilici e ammine primarie e secondarie come ammine.

In seguito abbiamo esteso lo studio alla sintesi di  $\alpha$ -ammino nitrili chirali, utilizzando ammine chirali appartenenti al "chiral pool" studiando la diastereoselezione del nostro protocollo. Ci siamo poi focalizzati in particolare sulla L-Prolina, ottenendo nuovi  $\alpha$ -amminonitrili chirali molto funzionalizzati.



R = Ph, Pr, *t*Pr, *t*Bu

R<sup>1</sup> = H, OH

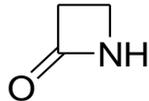
R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, COOMe, C(Ph)<sub>2</sub>OH

# 1

## $\beta$ -LATTAMI

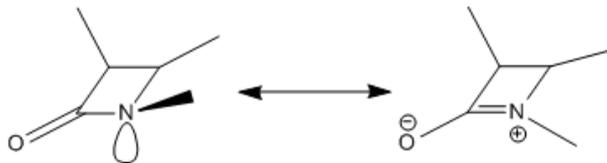
### 1.1 Struttura chimica dei $\beta$ -lattami

I  $\beta$ -lattami, chiamati anche 2 azetidioni, sono ammidi cicliche a 4 termini. Il legame chimico dell'azoto al carbonio in  $\beta$  rispetto al gruppo carbossilato porta le molecole a definirsi  $\beta$  lattami.



La struttura ciclica a 4 termini porta i carboni  $\alpha$  e  $\beta$ , ibridizzati  $sp^3$ , ad avere angoli di legame inferiori a  $109,5^\circ$  conferendo alla molecola un certo grado di tensione angolare. Questo porta i  $\beta$  lattami ad essere molto suscettibili alla reazione di apertura dell'anello da parte di nucleofili.

Un altro aspetto che favorisce l'apertura dell'anello  $\beta$  lattamico è l'assenza di delocalizzazione del doppietto dell'azoto ammidico in quanto la struttura che ne deriverebbe, con un atomo di azoto ibridizzato  $sp^2$ , porterebbe ad una tensione troppo elevata



Tutto ciò porta i  $\beta$ lattami ad avere delle caratteristiche chimiche peculiari non riconducibili alla classica reattività delle ammidi. Si può quindi schematizzare la chimica dei  $\beta$  lattami in questo modo:

- reattività del gruppo carbossilico paragonabile a quella di un chetone, mancando la delocalizzazione tipica dei derivati degli acidi carbossilici;
  - basicità dell'azoto più simile a quella di una ammina (con una ibridizzazione  $sp^3$  dell'azoto) che di una ammide;
  - tensione angolare della struttura ciclica che porta il  $\beta$  lattame ad essere molto suscettibile nei confronti dell'apertura da parte di nucleofili.
-

## 1.2 L'anello $\beta$ -lattamico nelle molecole biologicamente attive: Antibiotici

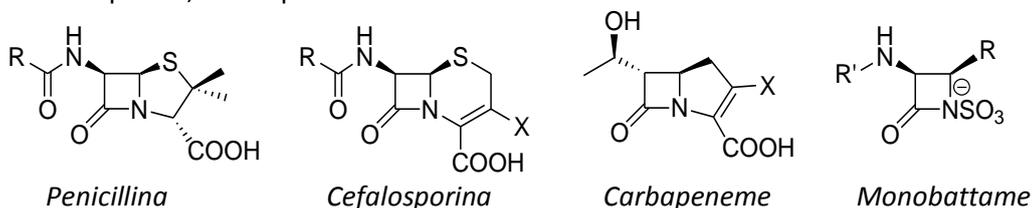
L'anello  $\beta$ -lattamico appare ubiquitario all'interno di numerose molecole dotate di attività biologica. Il loro ruolo principale è sicuramente quello di far parte di una importante classe di antibiotici, gli antibatterici  $\beta$ -lattamici.

### 2.2.1 $\beta$ -lattami come antibiotici

Gli antibiotici sono molecole in grado di mostrare attività farmacologica verso microorganismi quali batteri, funghi o protozoi. Il termine antibiotico fu coniato nel 1942 dallo scienziato Selman Waksman<sup>19</sup> e includeva tutte quelle molecole prodotte da microorganismi in grado di contrastare la vita e la sopravvivenza di altre specie microbiche, considerando quindi solamente molecole di origine naturale. Queste molecole vengono definite metaboliti secondari, in quanto non fondamentali per la crescita e lo sviluppo del microorganismo. La definizione di antibiotico nel corso degli anni è stata ampliata e generalizzata per includere anche molecole di sintesi che derivavano dalla modificazione di sostanze di origine naturale e dalla progettazione *ex novo* di nuovi composti.

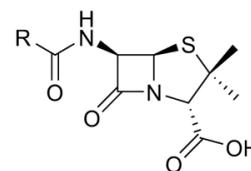
Gli antibiotici non definiscono un'unica classe di molecole, ma ne fanno parte diverse in funzione della struttura chimica caratterizzante. Ogni classe di antibiotici esercita la sua attività con modalità unica; tra le diverse classi di antibiotici, si hanno i  $\beta$ -lattami, i sulfamidici, chinoloni, macrolidi, tetracicline, polimixine. La modalità d'azione è molto diversa e sono legate all'interferenza con i meccanismi biochimici che regolano il ciclo vitale delle cellule batteriche. I sulfamidici interferiscono con il metabolismo energetico dei batteri, i chinoloni interferiscono con la sintesi degli acidi nucleici, i macrolidi e le tetracicline con la sintesi proteica e le polimixine con la membrana plasmatica.

Gli antibiotici  $\beta$ -lattamici sono una classe di molecole naturali e di sintesi caratterizzate dalla presenza di una struttura ciclica di natura azetidionica. Essi sono suddivisi in alcune principali categorie strutturali: le penicilline, le cefalosporine, i carbapenemi e i monobattami.



Le penicilline e le cefalosporine da sole rappresentano a tutt'oggi più della metà degli antibiotici prodotti ed usati nel mondo. La loro scoperta risale al 1928 grazie all'inglese Fleming<sup>20</sup>, che identificò la penicillina G, prodotta dalla muffa *Penicillium notatum*.

La molecola mostrò subito un'ottima attività contro ceppi batterici Gram-positivi, ed essa divenne l'antibiotico  $\beta$ -lattamico capostipite di una grande famiglia di farmaci sintetizzati e utilizzati fino ai nostri giorni. L'efficacia di questa molecola fu di mostrare attività antibatterica specifica accompagnata da una scarsa tossicità verso le cellule umane eucariote.

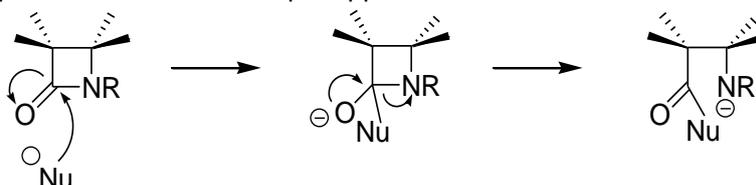


L'attività antibatterica degli antibiotici  $\beta$ -lattamici è associata alla loro interazione con le proteine responsabili della reticolazione della parete cellulare batterica. Essa è composta da una componente fibrillare polisaccaridica di strati sovrapposti di peptidoglicano, un polimero costituito da unità alternate di NAG (*N*-acetilglucosammina) e NAM (*N*-acetilmuramico) collegate tra loro da una piccola catena peptidica. La reticolazione tra le diverse catene polimeriche avviene tramite dei ponti di pentapeptide costituito da sola glicina; a livello biosintetico questa reticolazione avviene per opera di un enzima serino dipendente, il quale promuove la formazione del legame peptidico tra l'ultima glicina del cross-link pentaglicinico di una catena e la D-alanina dell'altra catena. Questo enzima è chiamato transpeptidasi ed è target bersaglio delle Penicilline.

<sup>19</sup> Davey PG, 2000. Concise Oxford Textbook of Medicine. Oxford: Oxford University, Press. pp. 1475

<sup>20</sup> Abraham, E. P., Le Scienze 1981, 24

La presenza dell'anello azetidionico nelle penicilline (e in tutte le molecole di natura  $\beta$ -lattamica) è responsabile, come detto in precedenza, della peculiare reattività di queste molecole. Nei confronti di un nucleofilo l'anello si apre secondo lo schema qui rappresentato



L'attacco nucleofilo al  $\beta$ -lattame porta alla formazione di un legame covalente di natura irreversibile, essendo la forma aperta dell'ammide altamente più stabile.

1. L'effetto farmacologico esplicato dall'anello azetidionico è quello di formare un legame con il residuo idrossilico della serina dell'enzima che attacca il carbonio carbonilico del  $\beta$ -lattame. L'acil-enzima che si forma perde irreversibilmente la sua capacità di catalizzare la sintesi del legame peptidico con l'effetto immediato di non riuscire più a sintetizzare il peptidoglicano con sufficiente grado di reticolazione e portando alla morte il batterio per lisi della parete cellulare.<sup>21</sup> Lo studio delle relazioni struttura-attività delle penicilline ha portato al riconoscimento di specifiche caratteristiche strutturali che le penicilline dovrebbero Gruppo carbossilato, per l'interazione con una funzione cationica della transpeptidasi
2. Gruppi metilici della penicillina simili al metile terminale della D-Ala (del peptidoglicano)
3. Catena acil-amminica in 6 analoga della D-Ala interna (del peptidoglicano)

Si osservò poi i diversi gruppi acilici (R), condensati al gruppo amminico in posizione 6, influenzavano lo spettro anti-microbico e le proprietà farmacocinetiche delle molecola.

Lo schema mostra alcuni sostituenti della funzione amminica laterale delle principali penicilline naturali.

R	Nome
	Penicillina K
	Penicillina F
	Penicillina X
	Penicillina G
	Penicillina V

La scoperta degli antibiotici  $\beta$ -lattamici ha rappresentato un enorme passo in avanti verso la cura di moltissime infezioni che in molti casi erano letali, ma tuttavia l'abuso di questi farmaci ha causato lo sviluppo del fenomeno della *resistenza batterica*, che ha spinto e spinge tuttora la ricerca farmacologica verso lo studio e la sintesi di nuovi farmaci in grado di contrastare ceppi batterici sempre più aggressivi.

### La resistenza batterica<sup>22</sup>

La resistenza batterica viene comunemente definita come la capacità posseduta da alcune specie di sopravvivere e di moltiplicarsi in presenza di quantità di antibiotico in grado di inibire o uccidere microorganismi appartenenti alla stessa specie.

<sup>21</sup> Mascaretti, A. O.; Boschetti, C. E.; Danelon, G. O.; Mata, E. G.; Roveri, O. A., *Current Medicinal Chemistry* **1995**, 1441

<sup>22</sup> (a) Archer G. et al, *Science* 291,1915, **2001**; (b) Zhang H. Z. et al, *Science* 291,1962, **2001**; (c) Lessard I. et al, *PNAS* 96,11028-11032, **1999**; (d) M. C. Henry, *Science / Technology* March 6, **2000**; (e) J. R. Knowles, *Acc. Chem. Res.*, **1995**, 18, 97

Il fenomeno della resistenza di alcuni ceppi batterici è comunque noto fin dai primi tempi in cui si mosse la ricerca in tale ambito; tuttavia si parlava ancora di *resistenza naturale* ed era per esempio posseduta dai batteri Gram-negativi (che erano in grado di inattivare la penicillina). Ma a fianco di questa resistenza si cominciò a sviluppare il fenomeno della resistenza acquisita. Non si riusciva cioè ad arrestare la crescita di batteri con antibiotici che precedentemente erano in grado di farlo. Grande interesse è da sempre stato rivolto ai ceppi di *Staphylococcus Aureus*, batterio Gram-positivo responsabile di serie patologie della cute, dell'apparato scheletrico, urinario, respiratorio e del sistema nervoso centrale.

I primi ceppi di *Staphylococcus Aureus* resistenti alla penicillina risalgono al 1942. Per contrastarli si sostituì la penicillina con la meticillina, fino alla comparsa di fenomeni di resistenza anche nei confronti di questo farmaco; i MRSA sono i ceppi batterici di *Staphylococcus Aureus* resistenti alla meticillina legati soprattutto alle infezioni contraibili in ambito ospedaliero.

Dagli anni '80 si cominciò allora ad utilizzare la vancomicina e la teicoplanina. Tuttavia la verifica di episodi di resistenza anche nei confronti della vancomicina e in generale nei confronti di altri farmaci mostra che la ricerca scientifica si deve muovere verso la sintesi e la scoperta di nuovi farmaci in grado di contrastare ceppi batterici sempre più forti e pericolosi.

La causa della resistenza batterica si ritrova nella capacità dei ceppi batterici di sapersi via via adattare agli antibiotici utilizzati in larga scala; i meccanismi con cui riescono a portare avanti questa caratteristica sono fondamentalmente due:

- 1) mutazione spontanee o rafforzative con selezione naturale del batterio;
- 2) scambio e acquisizione di geni tra ceppi e specie.

Nel primo caso si tratta quindi di selezione naturale, ovvero solo le specie batteriche che riescono a resistere alla "pressione ambientale" sopravvivono e perpetuano la specie. La capacità di resistere è dovuta all'acquisizione di caratteristiche generate dalla mutazione di un gene appartenente al batterio; il fenomeno della mutazione spontanea è un evento che si genera circa ogni  $10^7$  divisioni cellulari, e si trasmette alle cellule figlie. Si parla di trasmissione della resistenza in modo "verticale". L'uso massivo e non controllato di antibiotici, oltre che causare la morte dei batteri, spinge quelli resistenti a moltiplicarsi e a dividersi, aumentando così la probabilità di mutazioni che possono portare alla *resistenza acquisita*. La probabilità di ottenere una mutazione spontanea utile, cioè che rende il batterio resistente ad agenti che lo contrastano, è comunque remota e cioè  $1/10^{28}$ . Tuttavia succede anche che specie non resistenti possano scambiare e ricevere materiale genetico da batteri che sopravvivono e quindi mutare direttamente, acquisendo resistenza. Si parla questa volta di trasmissione della resistenza in senso "orizzontale" ed è ciò che corrisponde al secondo punto.

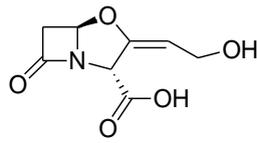
I meccanismi con cui viene manifestata la resistenza batterica sono molteplici:

- 1) Modificazione della struttura delle transpeptidasi utilizzate per costruire la parete cellulare;
- 2) modificazione della membrana esterna (soprattutto per i Gram-negativi), che provoca la perdita o la trasformazione della struttura delle porine, con l'effetto di diminuire la permeabilità del batterio alla specie antibiotica;
- 3) aumento della capacità dei batteri di espellere le molecole di antibiotico, con una sovraregolazione dei meccanismi che regolano appunto l'efflusso;
- 4) acquisizione della capacità di produrre delle  $\beta$ -lattamasi, proteine in grado di idrolizzare velocemente i substrati  $\beta$ -lattamici.

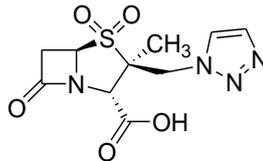
La produzione delle  $\beta$ -lattamasi rappresenta il meccanismo più efficace attraverso cui i batteri riescono a manifestare il fenomeno della resistenza: queste proteine sono prodotte sia da batteri Gram-negativi che Gram-positivi; per i primi esse sono costitutive, mentre per i secondi la biosintesi avviene quando il microorganismo viene a contatto con il farmaco. Esistono molte categorie di  $\beta$ -lattamasi<sup>23</sup>, ma la maggior parte di queste può essere ricondotta alle classi A,C,D ( $\beta$ -lattamasi seriniche) e B (metallo enzimi). Per la prima classe sono comunque disponibili inibitori specifici, tra i quali sono noti l'acido clavulanico, il tazobactam e il sulbactam.

---

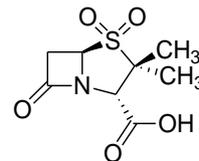
<sup>23</sup>G. P. Ellis, D. K. Luscombe, *Progress In Medicinal Chemistry*, 1994, 31, 297



acido clavulanico



tazobactam



sulbactam

Queste molecole vengono somministrate in genere assieme ad un altro substrato  $\beta$ -lattamico che funge da antibiotico, in modo da contrastare le  $\beta$ -lattamasi e avere una maggiore efficacia antibatterica del farmaco. Tra i farmaci in commercio si ricorda Augmentin® (amoxicillina e acido clavulanico), Timentin® (ticarcillina e acido clavulanico), Unasyn® (ampicillina e sulbactam) e Zosyn® (piperacillina e tazobactam).

Le cause che portano all'aumento del fenomeno della resistenza batterica possono sostanzialmente essere ricondotte all'abuso di antibiotici da parte dell'uomo, che negli ultimi anni si è fatto sempre più persistente, soprattutto nei paesi più industrializzati. Gli antibiotici non vengono utilizzati solo in ambito clinico, ma anche per l'agricoltura, per l'acquacoltura e per l'allevamento; il problema della resistenza batterica e tutto ciò che ne deriva si osserva quindi nell'uomo come negli animali e nelle piante. Il fenomeno pare quindi associato ad un utilizzo globale e in larga scala di questi farmaci, che ha portato i ceppi batterici ad evolvere nel tempo molto velocemente e a sviluppare meccanismi di resistenza.

D'altra parte purtroppo l'insorgenza di patologie molto serie e croniche portano gli individui ad un fenomeno di dipendenza obbligatoria dagli antibiotici, da cui non si può quindi prescindere.

Per contrastare quindi il fenomeno della resistenza batterica sono possibili quindi due vie:

- 1) utilizzo di antibiotici strettamente sotto controllo medico, in modo che essi vengano prescritti solo se davvero necessario e con eziologia batterica;
- 2) sviluppo di nuovi farmaci in grado di contrastare ceppi batterici multiresistenti, che mostrino eventualmente un'attività con un nuovo meccanismo di azione.

### Resistenza batterica e fibrosi cistica

Il fenomeno della resistenza batterica assume toni molto seri su pazienti affetti da patologie croniche che in virtù della loro condizione sono costretti ad assumere antibiotici spesso in maniera continuativa e prolungata. E' il caso di pazienti affetti da cancro, di persone che hanno subito dei trapianti e di malati di Fibrosi Cistica (FC). La fibrosi cistica è una malattia genetica autosomica recessiva causata dalla mutazione del gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) che codifica una proteina situata sulla membrana cellulare delle cellule epiteliali, la cui funzione è quella di trasportare il cloro attraverso le membrane cellulari a livello della membrana apicale delle cellule epiteliali delle vie aeree, del pancreas, dell'intestino, delle ghiandole sudoripare, delle ghiandole salivari e dei vasi deferenti. L'anomalo trasporto del cloro porta le ghiandole interessate alla secrezione di un muco denso e viscoso le cui conseguenze sono l'insorgenza di infezioni polmonari, insufficienza pancreatica e numerose altre sintomatologie, associate ad uno stato infiammatorio e anche all'incremento della concentrazione di neutrofili e altri leucociti. A livello del sistema respiratorio in particolare, la natura del tessuto polmonare di questi pazienti è il terreno adatto per la crescita di specie batteriche difficilmente debellabili. Studi clinici recenti mostrano lo sviluppo di ceppi resistenti di MRSA proprio in questi pazienti che hanno la capacità di sviluppare biofilm, di sintetizzare la tossina PVL (Panton-Valentine leukocidin) e causare complessivamente un danneggiamento della funzionalità polmonare e quindi minare seriamente la sopravvivenza del paziente.

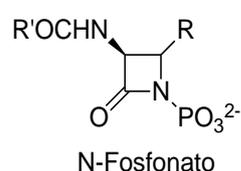
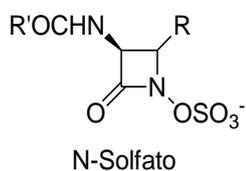
### I monobattami

La ricerca e lo studio di questa particolare classe di strutture  $\beta$ -lattamiche è rivolta a individuare nei monobattami nuovi potenziali antibiotici, con l'obiettivo di contrastare quei ceppi batterici che cominciano a mostrare resistenza multi farmaco. Anche i monobattami, come le strutture bicicliche (penicilline e cefalosporine), possono infatti avere la stessa reattività nei confronti delle peptidasi batteriche. Ma la struttura monociclica può aprire la strada ad un nuovo meccanismo di azione. L'unico antibiotico a struttura monobattamica utilizzato in ambito farmacologico è l'Aztreonam.

Questo perché l'interesse verso antibiotici  $\beta$ -lattamici di natura monociclica si è sviluppato solo verso la fine degli anni '70 e l'inizio degli anni '80, periodo in cui queste molecole furono estratte per la prima volta da fonti naturali.

Si scoprirono le nocardicine,<sup>24</sup> ottenute da culture di *gluconobacter* e *acetobacter*, e altri derivati monobattamici<sup>7</sup> naturali a struttura N-sulfonica.

I primi derivati sintetici ottenuti da strutture monobattamiche possedevano vari tipi di sostituenti anionici sull'atomo di azoto<sup>8</sup>.

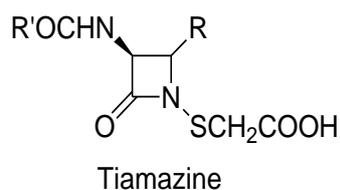
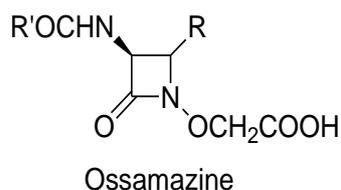


Queste molecole mostrarono un'attività a largo spettro contro batteri anaerobici Gram-negativi ma una inconsistente o nulla attività contro i Gram-positivi come lo *Staphylococcus aureus*. I motivi ipotizzati furono:

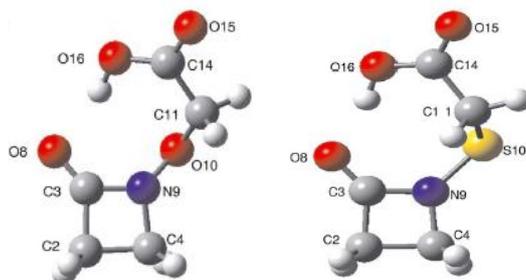
Impropria posizione della carica anionica netta che derivava dalla deprotonazione dell'acido idrossamico, rispetto alle altre molecole attive.

Dislocazione della carica all'interno dell'anello per effetto mesomerico, che portava la struttura azetidionica ad essere più elettronica e perdere la caratteristica reattività verso nucleofili.

Nel 1985 furono sintetizzati altri derivati monobattamici,<sup>25</sup> le ossamazine e le tiamazine.



Le prime mostravano una forte attività antimicrobica, a discapito dei derivati solforati. Di queste due molecole sono stati fatti studi *ab initio*<sup>10</sup> per determinare i parametri strutturali e riuscire a giustificare la differente attività biologica.



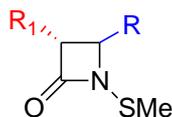
Determinante era la maggior lunghezza del legame N-S rispetto al legame N-O; questa caratteristica consentiva alla tiamazina di formare più facilmente un legame a idrogeno intramolecolare molto forte tra il protone carbossilico e l'ossigeno carbonilico, interazione geometricamente più impedita per l'ossamazine. L'impegno del gruppo ammidico del  $\beta$ -lattame in un legame a idrogeno provoca però una minore attività biologica e può quindi spiegare la mancanza di attività di questa classe di biomolecole.

### N-tiometil $\beta$ -lattami

<sup>24</sup> a) Imada A., Kitano K., Kintaka K., Muri M., Asai M., *Nature* **1981**, 289, 590; b) Sykes R. B., Cimarusti C. M., Bonner D. P., Bush K., Floyd D. M., Georgopapadakou N. H., Koster W. H., Trejo W. H., Wells J. S., *Nature* **1981**, 291, 489; c) Kamiya T., Hashimoto M., Nakaguchi O., Oku T., *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 35, 323

<sup>25</sup> Woulfe S. R., Miller M. J., *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3293

Gli *N*-tiometil  $\beta$ -lattami sono oggetto di studio già alcuni anni per la loro attività biologica su ceppi batterici resistenti quali MRSA e specie *Bacillus*<sup>14</sup>.



La sintesi di  $\beta$ -lattami con un legame N-S ma privi di un legame ad idrogeno intramolecolare che impegnasse il gruppo carbonile risale alla fine degli anni '80; vennero sintetizzati substrati  $\beta$ -lattamici *N*-tiometilici in cui però il gruppo funzionale -SMe era inserito unicamente come gruppo protettore. Questo gruppo funzionale era noto ed era generalmente utilizzato per proteggere le ammidi; mostrava stabilità a vari pH (da 1 a 10), resistendo cioè a soluzioni di NaOH 2.5 *N* e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%. La rimozione veniva effettuata con 2-piridin-tiolo e Et<sub>3</sub>N in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub><sup>26</sup>. L'interesse verso questa classe di biomolecole si è evoluto a causa della attività biologica mostrata soprattutto contro ceppi di *Staphylococcus*.

Il gruppo di ricerca del Professor Turos si è soffermato sulla sintesi e sulle proprietà antibatteriche di questi derivati monobattamici *N*-tiometilati<sup>27</sup>, (oltre che di derivati biciclici). Si individuarono soprattutto le proprietà chimiche che il gruppo -NSMe conferiva ai  $\beta$ -lattami; A) resistenza dell'intero substrato nei confronti di molti nucleofili utilizzati in sintesi organica (CN<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, alcoli) e biomolecole (come il glutatione o penicillanasi, proteina responsabile della degradazione della penicillina); B) carattere altamente lipofilo, che provoca una scarsa solubilità nel mezzo acquoso, ambiente in cui però la maggior parte dei farmaci risulta essere solubile; C) stabilità durante i processi di purificazione cromatografici.

Sono recentemente stati effettuati studi *ab initio*<sup>28</sup> comparativi tra l'*N*-tiometilazetidina-2-one e l'*N*-metossiazetidina-2-one per determinare analogie e differenze dei parametri strutturali dell'osso e del tio-derivato. Le differenze riscontrate più evidenti sono; 1) le lunghezze di legame N-S e S-CH<sub>3</sub> sono ovviamente maggiori degli analoghi N-O e O-CH<sub>3</sub> ( $\Delta_{(NS/NO)} = 0.335 \text{ \AA}$ ,  $\Delta_{(SCH_3/OCH_3)} = 0.390 \text{ \AA}$ ); 2) l'angolo N $\hat{S}$ CH<sub>3</sub> mostra che il gruppo tiometilico tende ad essere ortogonale rispetto alla struttura ciclica, con un valore di 101.8° (N $\hat{O}$ CH<sub>3</sub> = 110.8°); la conferma si ha dalla misura dell'angolo diedro tra il piano individuato dal  $\beta$ -lattame e il legame SCH<sub>3</sub>, che è di 90.4° (108.7° per l'osso-derivato).

### Struttura e spettro di azione degli *N*-tiometil $\beta$ -lattami

La resistenza ai nucleofili e. Queste molecole si stanno classificando come antibiotici in grado di inibire selettivamente la crescita di *MRSA* e *Bacillus anthracis* e hanno recentemente dimostrato di possedere proprietà anticancerose e di non essere letali per cellule umane sane come i fibroblasti<sup>17</sup>. La resistenza ai nucleofili e il carattere lipofilo portano a supporre che i meccanismi con cui questi substrati mostrano attività biologica siano molto diversi da quelli degli altri  $\beta$ -lattami

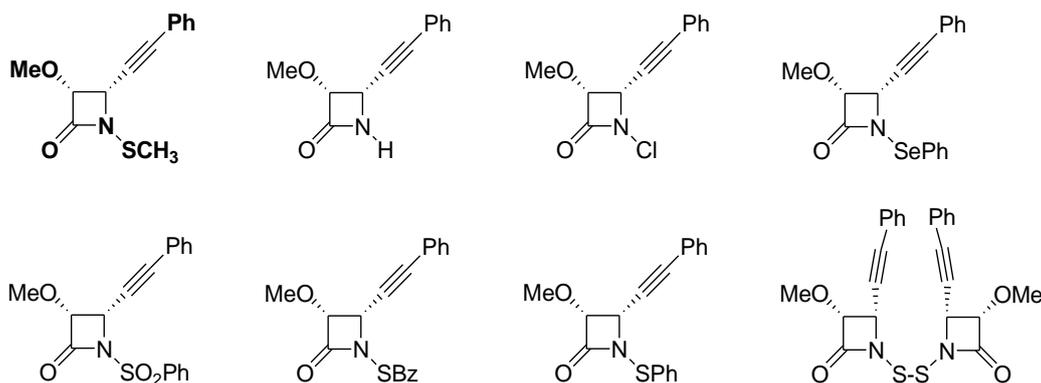
Rimane ancora sconosciuto sia il target che il modo di azione di queste molecole, anche se i diversi studi effettuati hanno permesso di fare ipotesi sui possibili meccanismi che intervengono.

Per mostrare l'importanza del gruppo SMe nell'evidenziare tutte queste peculiarità il professor Turos ha confrontato l'attività di un *N*-tiometil  $\beta$ -lattame attivo (il primo della serie) con altri substrati  $\beta$ -lattamici identici (stessa struttura e stereochimica dei sostituenti in C3 e in 4) con gruppi funzionali alternativi sull'atomo di azoto.

<sup>26</sup> Kessler, Iselin, *Helv. Chem. Acta* **1966**, 49, 1330

<sup>27</sup> a) E. Turos, M. Konaklieva, R. X. F. Ren, H. Shi, J. Gonzalez, S. Dickey, D. Lim, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 5571-5578; b) R. K. Mishra, K. D. Revell, C. M. Coates, E. Turos, S. Dickey, D. V. Lim, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 2081-2083

<sup>28</sup> Cz. Dobrowolski, J. Sadlej, A.P. Mazurek, *Journal of Molecular Structure (TEOCHEM)*, **2004**, 684, 181-186



Tutti i derivati ottenuti sono risultati inattivi, eccetto una debole attività riscontrata per il substrato *S*-Benzilico.

Tutti gli studi effettuati su queste molecole nel corso degli anni hanno suggerito quali siano le caratteristiche strutturali ottimali di questi derivati<sup>14</sup>.

1) L'attività di questi composti è indipendente dai sostituenti presenti in C<sub>3</sub> e in C<sub>4</sub> e dalla loro stereochimica; questa caratteristica è molto diversa rispetto alla reattività dei β-lattami non *N*-tiometilati, per i quali invece i gruppi funzionali legati all'anello azetidionico sono importanti soprattutto perché possono fungere da siti di riconoscimento molecolare;

2) mostrano attività nonostante non possiedano un gruppo funzionale ionizzabile sull'anello (o nella struttura biciclica, per strutture non monobattamiche) come molti gli altri β-lattami, che normalmente possiedono ad esempio gruppi carbossilici;

3) si osservano variazioni di attività se si cambia il gruppo alchilico dello zolfo: l'attività biologica permane con sostituenti arilici, ma è migliore con piccoli sostituenti alchilici fino a 4 atomi di carbonio. I risultati migliori contro *Staphylococcus aureus* si hanno con sostituenti poco ramificati (isopropile, *s*-butile) mentre quelli molto ramificati come il *t*-butile portano ad una drammatica caduta di attività. Lo stato di ossidazione dello zolfo è importante: i gruppi *N*-sulfenici (NSR) e *N*-sulfonici (NS=OR) sono migliori rispetto ai gruppi *N*-sulfonilici (NSO<sub>2</sub>R) e *N*-sulfonici (NSO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Si può ipotizzare che l'attività di questi β-lattami sia sostanzialmente dipendente solo dal sostituente sull'atomo di azoto, suggerendo che esso abbia un ruolo chiave nel meccanismo antibiotico. La tolleranza verso i sostituenti all'anello azetidionico suggerisce che la modalità di azione non coinvolga direttamente un target biologico ben preciso, ma che possa in qualche modo influenzare la permeabilità della membrana batterica e l'uptake cellulare, oltre che interferire con altri meccanismi. E' stato recentemente effettuato uno studio sulla attività biologica di *N*-tiometil 2-ossazolidinoni su ceppi di MRSA,<sup>29</sup> paragonandolo all'attività di un *N*-tiometil β-lattame di riferimento con struttura simile.



Esso ha mostrato che le molecole sono attive nei confronti dei ceppi batterici allo stesso livello del β-lattame e questo porta a supporre che ciò sia dovuto soprattutto alla presenza del gruppo NSMe e non unicamente alla struttura ciclica.

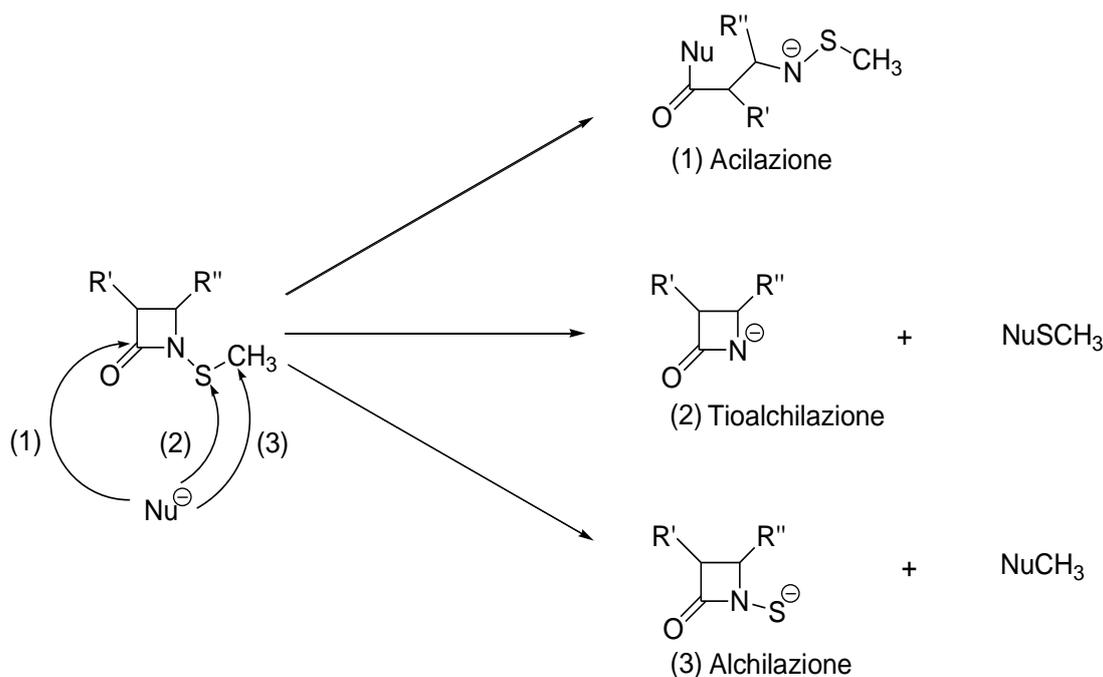
Il potere antibiotico degli *N*-tiometil β-lattami è stato testato non solo su batteri Gram-positivi come *Staphylococcus aureus* ma anche su specie Gram-negative; nonostante alcune fluttuazioni i dati raccolti erano consistenti e mostravano come microorganismi appartenenti a specie simili manifestassero gli stessi livelli di suscettibilità a diversi substrati β-lattamici. L'azione di concentrazioni crescenti di queste molecole su culture di MSSA (*Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*) e MRSA mostra che le popolazione

<sup>29</sup> a) E. Turos, M. Konaklieva, R. X. F. Ren, H. Shi, J. Gonzalez, S. Dickey, D. Lim, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 5571-5578; b) R. K. Mishra, K. D. Revell, C. M. Coates, E. Turos, S. Dickey, D. V. Lim, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 2081-2083

batteriche non diminuiscono, ma rimangono invece costanti. Il potere antibiotico appare esclusivamente batteriostatico e non battericida.

### Attività antibiotica degli *N*-tiometil $\beta$ -lattami

L'attività di un antibiotico  $\beta$ -lattamico può essere potenzialmente messa in relazione con la reattività come elettrofilo della stessa molecola. Se si effettua questo paragone e si studia la struttura di un ipotetico *N*-tiometil  $\beta$ -lattame, si osserva che questo particolare substrato è suscettibile di attacco da parte di un nucleofilo (che può far parte di una proteina o essere di natura strettamente chimica) su tre posizioni differenti. Gli attacchi nucleofili possibili portano a queste tre differenti reazioni:



#### La reazione di acilazione

La reazione di acilazione avviene tramite la formazione di un legame covalente tra il residuo di una serina (Nu = -OH) del sito attivo di una PBP (penicillin-binding-protein) con formazione di un estere a catena aperta. Il processo è generalmente coadiuvato dalla presenza di siti riconoscimento del  $\beta$ -lattame che facilitano l'interazione con la proteina che lo idrolizza, e sostituenti sull'anello in grado di aumentare l'elettrofilia e la reattività del carbonio ammidico. Come è stato sperimentato molti *N*-tiometil  $\beta$ -lattami si sono dimostrati attivi pur non possedendo questo tipo di caratteristiche, e questo può far supporre che queste molecole non abbiano una reattività associata all'apertura dell'anello azetidionico.

#### La reazione di alchilazione

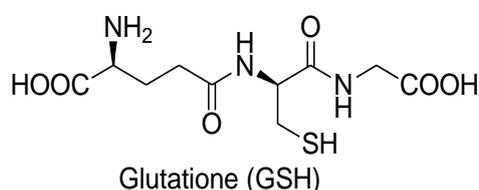
Studi sperimentali in vitro per verificare una eventuale reazione di alchilazione di queste molecole hanno rivelato che questa reazione pare non essere favorita. Non si spiegherebbe altrimenti la maggiore attività biologica di specie con un gruppo alchilico sullo zolfo più grandi di quello metilico (R = Et, *s*-Bu), che sono elettrofili peggiori essendo stericamente più ingombrati. L'ipotesi è stata anche verificata osservando l'inefficacia del  $\beta$ -lattame nell'inibire la replicazione del DNA, prevedendone la possibile alchilazione a livello degli atomi di azoto delle basi. Alcuni profarmaci come la leinamicina<sup>30</sup> e la mitomicina<sup>31</sup> acquistano potere alchilante verso acidi nucleici dopo una reazione di attivazione mediata da un gruppo tiolico presente nella matrice biologica (per esempio quello del glutatione o di un residuo di cisteina). Sono state condotte quindi prove di denaturazione per alchilazione del DNA incubandolo con l'*N*-tiometil  $\beta$ -lattame e agenti attivanti tiolici (glutatione, ditiotreitolo e  $\beta$ -mercaptoetanolo); anche in questo caso non si è osservata alcuna reazione, e l'acido nucleico ha conservato la sua struttura terziaria.

<sup>30</sup> Hara M., Takahashi I., Yoshida M., Asano K., Kawamoto I., Morimoto M., Nakano H. J., *Antibiot.* **1989**, 42, 333

<sup>31</sup> Hata, Hoshi, Kanamori, Matsumae, Sano, Shima, Suguwara, *Antibiot.* **1956**, 9, 141

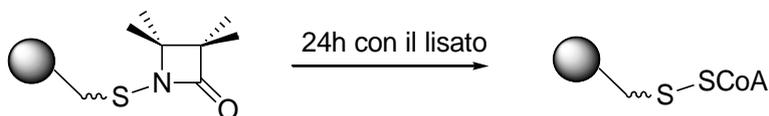
### La reazione di tioalchilazione

La tioalchilazione sembra essere la reazione chimica più probabile di questi substrati. Essi si comportano quindi come agenti che trasferiscono gruppi tiometilici, mostrando le stesse proprietà dei reagenti di tioalchilazione utilizzati per sintetizzarli. Come già affermato in precedenza il legame N-S è molto stabile, ma il gruppo funzionale risulta sensibile a nucleofili dal carattere fortemente tiofilo. Studi di incubazione dell'*N*-tiometil  $\beta$ -lattame con *Staphylococcus aureus* con micro quantità del  $\beta$ -lattame mostrano la formazione del derivato col gruppo NH libero e non idrolizzato con l'analisi all'  $^1\text{H}$  NMR (manca il segnale diagnostico a circa 2.40-2.50 ppm) dopo estrazione con acetato di etile. Per determinare quale fosse il nucleofilo che aveva reagito con il gruppo SMe, sono state effettuate prove di incubazione del  $\beta$ -lattame di riferimento con i 20 aminoacidi normalmente contenuti nelle proteine, in condizioni fisiologiche. L'unica reazione che ha portato alla detiometilazione è stata quella con la cisteina, che ha il gruppo -SH come nucleofilo; l'ipotesi è che la tioalchilazione avvenga sul residuo cisteinico di una proteina e che il risultato sia l'inibizione della crescita del batterio. Successive prove di incubazione con altri metaboliti recanti funzioni tioliche nucleofile hanno mostrato che il  $\beta$ -lattame reagiva anche con il glutatione.



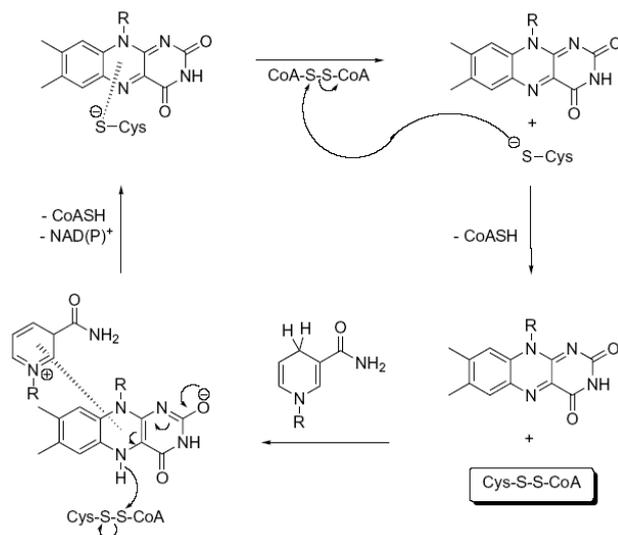
Questo risultato poteva suggerire che batteri con elevati livelli di glutatione citoplasmatico sapevano resistere all'*N*-tio  $\beta$ -lattame disattivandolo e prevenendo l'attacco ad altri metaboliti e biomolecole cellulari, primi tra tutti le proteine.

Per determinare invece il target di *Staphylococcus aureus* è stato effettuato un esperimento in cui un *N*-alchiltio  $\beta$ -lattame collegato ad una resina veniva messo in incubazione per 24 ore con un lisato dello stesso batterio.



Dopo la purificazione della resina il risultato ha mostrato la formazione di un legame covalente con CoA; questo risultato porta ad ipotizzare che batteri con elevate concentrazioni di questo cofattore siano anche le più sensibili agli *N*-alchiltio  $\beta$ -lattami. In queste specie batteriche le concentrazioni di CoA sono molto elevate. Esso è parte del tampone ossidoriduttivo citoplasmatico tiolico<sup>32</sup> assieme a NAD(P)H e FADH<sub>2</sub>; la sua funzione è quella di assorbire le specie reattive all'ossigeno generate dallo stress ossidativo cellulare.

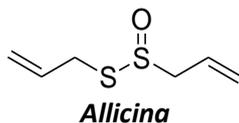
<sup>32</sup> delCardayre, Davies, *Biol. Chem.*, **1998**, 273, 5752



Le concentrazioni dei cofattori e l'equilibrio sono regolati dalla disolfuro reduttasi; l'ipotesi relativa all'attività antibiotica degli *N*-alchilto β-lattami è che essi formino un legame a ponte disolfuro con il CoA oppure con aminoacidi presenti nei siti attivi delle proteine, molto probabilmente delle cisteine.



L'ipotesi è supportata dal fatto che le specie batteriche in questione non possiedono elevati livelli di glutatione, molecola in grado di reagire con l' *N*-alchilto β-lattame e bloccarne gli effetti antibatterici. Un interessante paragone è il confronto tra la modalità d'azione degli *N*-alchilto β-lattame con quelle dell'allicina,<sup>33</sup> molecola contenuta nell'aglio di cui sono state dimostrate le proprietà antibiotiche, oltre che antivirali, antifungali, antiparassitarie e anticancerose.



Questa molecola come gli *N*-alchil β-lattami mostra potere antibiotico soprattutto su batteri che non hanno elevate concentrazioni di glutatione. Reagisce direttamente con residui tiolici di varie proteine, tra le quali alcol deidrogenasi, tioredoxina reduttasi, e RNA polimerasi tramite la formazione di legami covalenti

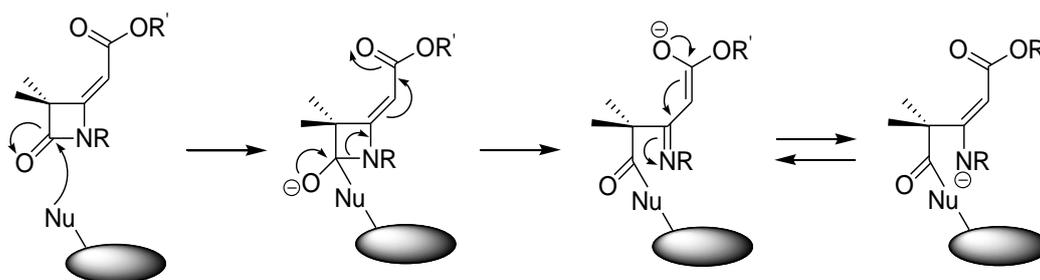
### 1.2.1. Sintesi di nuovi *N*-tiometil monobattami come antibiotici contro ceppi resistenti presenti su pazienti affetti da FC<sup>34</sup>

Il gruppo di Ricerca presso cui ho svolto la tesi di Dottorato ha già in contribuito in maniera significativa alla sintesi di monobattami, in particolare con la scoperta del nucleo 4-alchiliden β lattamico, attivo contro ceppi batterici resistenti.

In questi azetidiononi, per i quali è stata messa a punto una sintesi molto accurata, è presente un doppio legame in posizione 4 coniugato ad una funzionalità esterea. Questo porta il carbonio carbonilico ad essere molto elettrofilo a e favorire così l'attacco nucleofilo del residuo aminoacidico della transpeptidasi batterica, seguendo il "modello inibitorio" tipico dei monobattami.

<sup>33</sup> a) Cavallito, Bailey, *J. Am. Chem. Soc.*, **1944**, 66 1944; b) Ankri, Mirelman, *Microbes Infect*, **1999**, 2, 125; c) Block, *Scient. Am.*, **1985**, 252, 94

<sup>34</sup> P. Galletti, C. Cocuzza, R. Musumeci, M. Pori, A. Quintavalla, D. Giacomini, "Antibiotics and Cystic Fibrosis: Synthesis and antimicrobial evaluation of a series of *N*-thiomethyl-azetidionones", *Chem Med Chem*, **2011**, 6, 1919-1927



Il doppio legame in posizione 4 consente infatti la stabilizzazione del prodotto di apertura dell'anello  $\beta$ -lattamico tramite la delocalizzazione della carica per risonanza all'interno del sistema insaturo.

Ulteriori funzionalizzazioni hanno riguardato l'introduzione di gruppi sull'azoto  $\beta$ -lattamico<sup>35</sup> e l'inserimento di particolari funzioni in posizione 3 sui 4-alchilideni.<sup>36</sup> L'attività antibatterica dei 4-alchiliden- $\beta$ -lattami è stata valutata dal gruppo di ricerca della Prof. Cocuzza dell'Università di Milano Bicocca in vitro tramite studi di MIC. I ceppi batterici utilizzati comprendono specie Gram-positive e Gram-negative. Tra i Gram-positivi gli *Streptococcus Pyogenes*, sensibili o resistenti all'eritromicina, Pneumococchi sensibili e resistenti alla penicillina, *Staphylococcus Aureus* sensibile e resistente alla meticillina. Tra i Gram-negativi ci sono ceppi ad elevata resistenza e ceppi produttori di  $\beta$ -lattamasi e non.

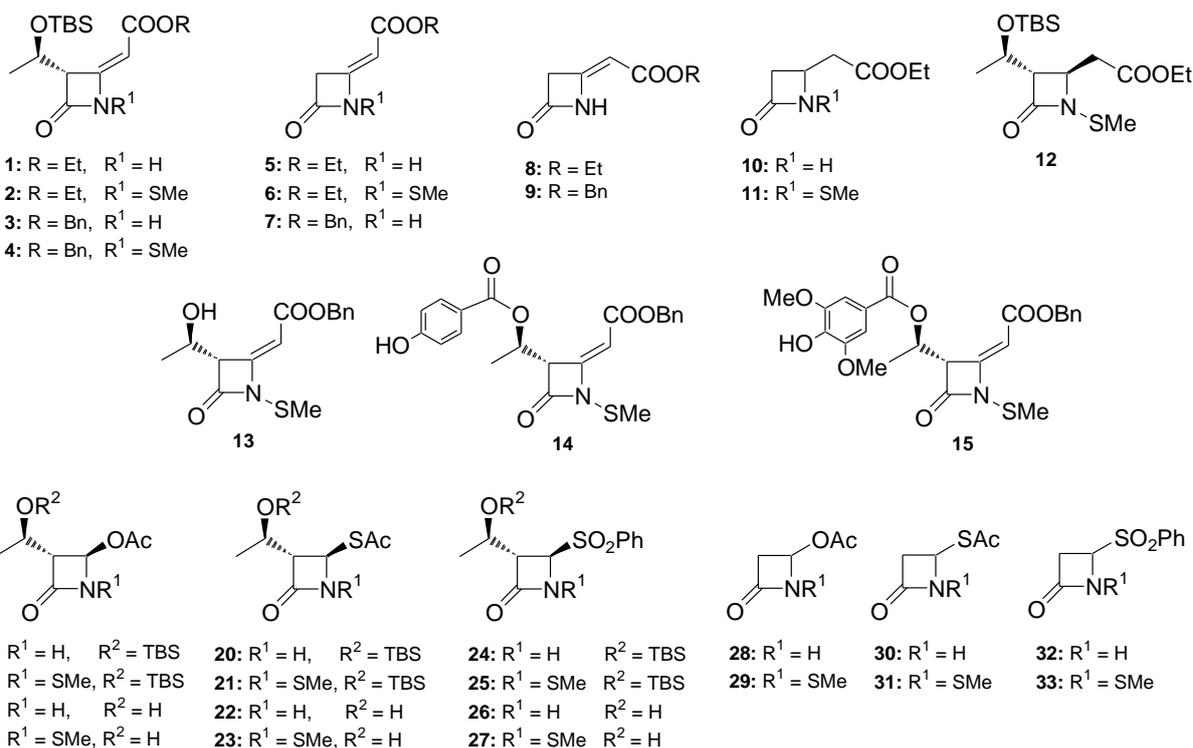
Tabella 1

Composto	MIC					
	<i>S. Pyog.</i>	<i>S. Pneum.</i>	<i>MRSA</i>	<i>MSSA</i>	<i>S. Epiderm.</i>	<i>H. Infl</i>
 (A)	32	128	16	8	8	1
 (B)	16	128	128	32	64	64
 (C)	128	>128	128	8	4	>128
 (D)	128	128	32	16	2	64

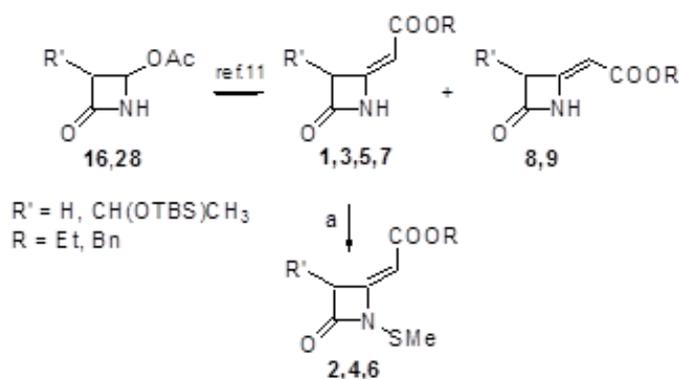
Gli incoraggianti risultati ottenuti dai test di attività biologica (Tabella 1) hanno portato allo studio di ulteriori modifiche alle strutture 4-alchilideniche, in particolare alla sintesi di 4-alchiliden- $\beta$ -lattami caratterizzati dal gruppo tiometile (-SMe). Sono poi stati sintetizzati altri  $\beta$  lattami con la presenza in 4 di un gruppo elettron attrattore e sempre *N*-Tiometilati. Tutti questi  $\beta$  lattami schematizzati sono stati sintetizzati e testati ed è stata paragonata la loro attività agli analoghi non tiometilati

<sup>35</sup> G. Cainelli, D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 6269-6272

<sup>36</sup> F. Broccolo, G. Cainelli, G. Caltabiano, C. E. A. Cocuzza, C. G. Fortuna, P. Galletti, D. Giacomini, G. Musumarra, R. Musumeci, A. Quintavalla, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 2804-2811

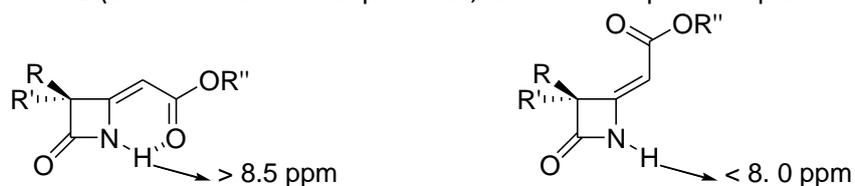


I 4 alchiliden β lattami sono quindi stati sintetizzati tramite un protocollo noto e ben conosciuto, partendo dai due substrati commerciali **16** (3*R*,4*R*)-4-acetossi-3-[(1*R*)-1-(*tert*-butildimetilsililossi)etil]azetidina-2-one)



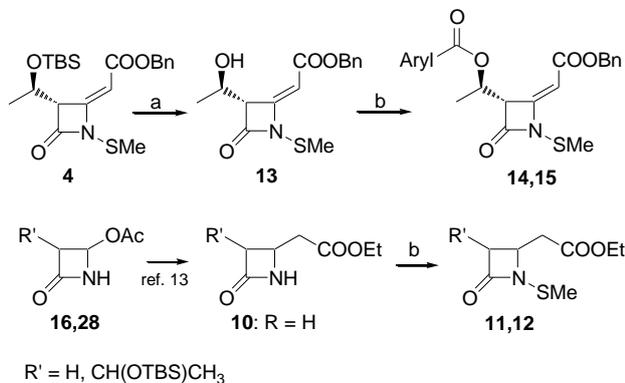
e **28** (4-acetossiazetidina-2-one) con etil o benzil diazoacetato, ottenendo quindi i composti **1**, **3**, **5**, **7**, **8**, and **9**.

I diastereoisomeri *E* e *Z* di ciascun 4-alkilidene sono stati facilmente separati con flash cromatografia. Si è poi proceduto con la tiometilazione, che è stata possibile solo sull'isomero *E* con LDA o con LiHMDSA e successive addizione di *S*-metil metantiosulfonato per ottenere i composti **2**, **4**, and **6**. Ogni tentativo di *N*-tiometilare l'isomero *Z* (anche con altre basi quali NaH, *t*butOK e temperature più elevate) è fallito.

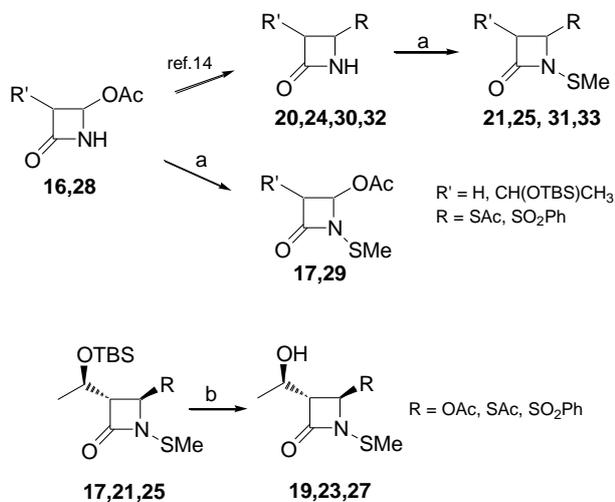


La difficoltà nel derivatizzare l'azoto nell'isomero *Z* è la presenza di un forte legame ad idrogeno tra l'ossigeno dell'estere e l'idrogeno NH del β lattame, come testimoniato dal chemical shift all'NMR e dai raggi X.

Successivamente, il derivato *N*-tiometilato **4** è stato ulteriormente derivatizzato con esteri fenolici, previa deprotezione del gruppo tertbutil dimetil silile presente sulla catena idrossi etilica con  $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$  (**13**) seguita dal trattamento del relativo cloruro acido arilico in presenza di  $\text{SnCl}_4$  (5%) ottenendo i  $\beta$  lattami **14** e **15**. Per verificare l'effetto del gruppo 4 alchilidenico, sono stati sintetizzati i composti **11** e **12**, in cui come il doppio legame  $\text{C}=\text{C}$  è stato sostituito da un legame saturo. La sintesi è stata effettuata tramite idrogenazione catalitica di **1** e **5** e successiva *N*-tiometilazione.



Abbiamo poi sintetizzato una seconda serie di azetidioni *N*-tiometilati in cui in **4** era presente un gruppo elettron attrattore: sono stati ottenuti derivati del 4-acetato, 4-tioacetato e 4-benzensulfonato. I 4-Thioacetossi e i 4-SO<sub>2</sub>Ph sono stati facilmente ottenuti dai 4-acetossi azetidioni commerciali tramite reazioni di sostituzione nucleofila.<sup>14</sup>



I tioacetossi sono stati ottenuti utilizzando il tioacetato di potassio, mentre i 4-SO<sub>2</sub>Ph con il benzensulfonato di sodio. È interessante notare come siano state necessarie procedure di sostituzione nucleofila differenti per il substrato **16** e per il **28**. Sono state poi effettuate ulteriori elaborazioni quali la *N*-tiometilazione (composti **17**, **29**, **21**, **25**, **31**, e **33**) e la rimozione del TBS (**19**, **23**, and **27**) con le procedure già note.

### Analisi Saggi di attività antibatterica

Su tutti i composti sintetizzati sono state effettuate le saggi di attività su ceppi batterici resistenti Gram-positivi e Gram-negativi: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*,

**Table 1.** Antimicrobial activity of the new monocyclic  $\beta$ -lactams relative to reference antibiotics.<sup>(a)</sup>

Compd	<i>S. pyogenes</i> (10)		<i>S. pneumoniae</i> (10)		<i>E. faecalis</i> (10)		MSSA (13)		MRSA (13)		<i>S. epidermidis</i> (10)		<i>E. coli</i> (10)	
	MIC	MIC <sub>90</sub>	MIC	MIC <sub>90</sub>	MIC	MIC <sub>90</sub>	MIC	MIC <sub>90</sub>	MIC	MIC <sub>90</sub>	MIC	MIC <sub>90</sub>	MIC	MIC <sub>90</sub>
<b>2</b>	64	>128	>128	>128	>128	>128	32	128	32	128	>128	>128	>128	>128
<b>3<sup>(b)</sup></b>	32-64	64	16-32	32	64	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<b>4</b>	4-8	8	64->128	128	32-64	64	4-128	16	4-64	16	32-128	32	32->128	64
<b>7</b>	128	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<b>9</b>	128	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<b>17</b>	64	64	64-128	128	128	128	8-32	8	32-64	32	64	64	32	128
<b>19</b>	64->128	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<b>22</b>	8-16	8	>128	>128	64	64	16-64	32	16-128	64	32-128	64	64	128
<b>23</b>	16-32	16	>128	>128	64-128	64	64-128	64	128	128	64-128	64	64-128	64
<b>29</b>	64->128	>128	>128	>128	64-128	128	32-128	32	32-64	32	64	>128	>128	>128
<b>30</b>	4-8	4	>128	>128	32-128	32	8-32	16	16-64	32	16-128	32	16-128	32
<b>31</b>	16-32	16	32	>128	64-128	64	8-64	32	16-32	16	32	64-128	64	128
AMX <sup>(c)</sup>	≤0.06	≤0.06	≤0.06-8	≤0.06	4	2	≤0.06-1	0.25	1	64-128	64	128	0.25-8	0.5
CTX <sup>(d)</sup>	≤0.06	≤0.06	≤0.06-0.25	≤0.06	0.25	1	0.5-4	1	4	1->128	8	>128	2-64	8

[a] All values are reported in mg L<sup>-1</sup>; the number of clinical isolates for each species is indicated in parentheses. [b] Antibacterial activities of compounds **1** and **3** were previously reported.<sup>(11)</sup> [c] AMX = amoxicillin. [d] CTX = ceftioxone.

*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, e *Serratia marcescens*.

Nella tabella sono descritte le attività biologiche dei composti che hanno mostrato la migliore attività antimicrobica espressa in un range di minima concentrazione inibente

(MICs, in  $\text{mgL}^{-1}$ ) assieme alla minima concentrazione inibente la crescita del 50 e 90% del microorganismo ( $\text{MIC}_{50}$  and  $\text{MIC}_{90}$ , rispettivamente). In particolare sono stati inseriti solo i risultati che mostravano valori di MIC compresi tra 31 e 1  $\text{mg/L}$  almeno su di una specie batterica. Non sono quindi mostrati dati relativi alle molecole che non hanno mostrato alcun segno di attività.

Dai risultati si osserva una attività biologica promettente contro alcuni ceppi batterici Gram-Positivi per alcuni NH e NSMe monobattani.

Per quanto riguarda i 4 alchilideni, gli *N*-tiometili **2** e **4** hanno mostrato attività contro ceppi di *S. Aureus* (MSSA) et (MRSA). In particolare per il composto **4** la migliore attività è contro *S. pyogenes* (MIC range: 4–8  $\text{mg/L}$ ). I risultati per i corrispondenti NH 4 alchilideni testati in precedenza hanno mostrato l'inattività del composto **1** e una certa attività del composto **3** su ceppi Gram-positivi; (MIC range: 16–32  $\text{mg/L}$  contro *pneumoniae*). I 4 alchilideni polifenolici non sono mostrati in quanto sono risultati del tutto inattivi. Per quanto riguarda la sostituzione in C3, i 4 alchilideni **7** e **9** hanno mostrato solo una attività modesta contro *E. Coli* mentre il composto **6**, *N*-tiometilato, è del tutto inattivo. Anche i composti **10,11** e **12**, gli analoghi saturi dei 4 alchilideni, sono risultati inattivi. Tra la serie dei 4 acetosi derivati, il composto **17** ha mostrato attività contro MSSA, MRSA, e *S. epidermidis*. L'analogo **29** C3 non sostituito ha mostrato una diminuzione della attività contro MSSA, MRSA, *E. faecalis*, e *E. coli*. I derivati 4-benzensulfonici hanno mostrato una attività molto bassa con una certa attività solo per i composti **25,27** e **33** (MIC range of 64–128  $\text{mg/L}$  contro MSSA, MRSA, *S. pyogenes*, and *E. coli*).

I derivati 4-tioacetato **22**, **23**, **30**, and **31**, hanno mostrato una interessante attività soprattutto contro specie Gram-positiva

Successivamente, le migliori molecole in termini di attività antibatterica sono state testate ulteriormente su ceppi batterici MSSA e MRSA isolati da pazienti pediatriche affetti da fibrosi cistica.

I composti **30** e **31** hanno mostrato la stessa attività mentre per i composti **4** e **17** si è osservato un interessante incremento della attività contro *S. Aureus*. In particolare il composto **17** ha mostrato un incremento nella attività anche contro isolati di MRSA e MSSA. È stata successivamente misurata la minima concentrazione battericida (MBC) e il rapporto MBC/MIC maggiore di **4** per i composti **4**, **17**, **30** e **31** sembrano caratterizzare l'attività biologica di questi monobattani come batteriostatica contro MSSA e MRSA.

I buoni risultati ottenuti hanno ci hanno spinti a costruire un modello preliminare di SAR per comprendere e caratterizzare i fattori strutturali determinanti per l'attività biologica. Per quanto riguarda i 4-alchilideni sembra importante la combinazione tra il gruppo *N*-tiometile e il benzil estere, con la conseguente maggiore attività biologica contro ceppi batterici Gram-positivi. L'assenza di un sostituente sul C3 sembra conferire una attività specifica contro *S. pyogenes* e aumentarla invece contro *E. coli*, anche se in modo modesto, per i composti **7** e **9**. La presenza di un gruppo polifenolico al C3 causa una diminuzione della attività antibatterica. Quindi sfortunatamente, combinando un estere fenolico con un gruppo *N*-tiometile si ha l'inattivazione dell'attività biologica. Per quanto riguarda la serie dei 4 acetosi, i composti **17**, **19** e **29** chiaramente vedono una attività migliorata sicuramente per via del gruppo *N*-tiometile.

Paragonando i 4-OAc, 4-SAc, and 4-SO<sub>2</sub>Ph, i 4-SAc hanno mostrato la migliore efficienza; in particolare per questi derivati, la presenza del gruppo *N*-tiometile non ne migliora l'attività biologica. Come già affermato in precedenza, Turos e i colleghi hanno tentato di comprendere il meccanismo di azione dei derivati *N*-tiometilici

L'ipotesi è che il gruppo tiometilico venga trasferito dal  $\beta$  lattame ad un determinato target cellulare. Il target sembra possa essere il Coenzima A (come appare da studi in "vitro") e da questo punto di vista gli *N*-tiometil  $\beta$  lattami sembrano caratterizzarsi come "profarmaci". In questa visione sembra quindi che l'attività biologica non necessiti di particolari requisiti da parte della struttura  $\beta$  lattamica, che funziona quindi semplicemente come "carrier di gruppi tioalchilanti", causando non un effetto battericida ma batteriostatico. Osservando in particolare quindi che i monobattani **4**, **17**, e **31** mostrano una attività batteriostatica, si può asserire che il meccanismo di azione sia quello di agenti tiometilanti come afferma

Turos. In ogni caso il  $\beta$  lattame **30**, non *N*-tiometilato, ha mostrato una considerevole attività contro ceppi Gram-positivi e Gram-negativa. Questo aspetto associato alla attività comunque mostrata da monobattami non tiometilati mostra che in effetti il gruppo tiometilico non sembra essere essenziale per l'attività biologica, anche se può avere un ruolo nell'aumentare complessivamente la lipofilia e quindi la penetrabilità nella membrana. In ultima analisi, le attività antibatteriche simili mostrate contro MRSA e MSS suggeriscono che la PB17 (penicillin binding protein 2) non rappresenta un target specifico per questi monobattami.

### 1.2.2 *N*-tiometil monobattami ad attività duale<sup>37</sup>

La fibrosi cistica, come è stato descritto in precedenza, causa al sistema polmonare uno stato di infiammazione cronica e costante anche in assenza di una infezione batterica. In queste condizioni sia i neutrofili che le cellule epiteliali rilasciano nello spazio extracellulare alte concentrazioni di specie reattive all'ossigeno (ROS) e all'azoto (RNS) con l'obiettivo di attaccare ed eliminare gli agenti patogeni.<sup>38</sup> Nei pazienti affetti da fibrosi cistica questo meccanismo di difesa si dimostra essere assolutamente inefficace e progressivamente porta alla disfunzione cellulare e a una accelerazione della malattia.<sup>39</sup> Quindi, la presenza dello stress ossidativo causato dall'incremento delle specie reattive all'ossigeno e ad un loro stato di non bilanciamento, in particolare durante uno stadio di infezione polmonare cronica, porta alla luce nuovi target che contrastino queste molecole.<sup>40</sup>

#### Lo stress ossidativo: i ROS e i RNS

L'acronimo ROS e RNS significa specie reattiva all'ossigeno e all'azoto, normalmente specie di natura radicalica. I radicali liberi è qualsiasi specie chimica contenente uno o più elettroni spaiati: questo conferisce loro una particolare reattività e porta la molecola ad acquistare elettroni ricercando stabilità attaccando altre molecole.

I radicali liberi si possono originare attraverso due processi:

1) *rottura omolitica di un legame*

2) *trasferimento di un singolo elettrone da una specie ad un'altra.*

La rottura omolitica di un legame può avvenire per assorbimento di energia sotto forma di radiazione elettromagnetica o di calore.

Il trasferimento monoelettronico, invece, porta alla formazione di un radicale catione e di un radicale anione, specie caratterizzate dalla presenza sia di un elettrone spaiato che di una carica elettrica.

Il corpo umano è continuamente soggetto all'attacco dei radicali liberi i quali, oltre ad essere ritenuti responsabili del processo d'invecchiamento, sono anche implicati nell'insorgenza di patologie molto gravi: tra cui si annoverano le malattie cardiovascolari, ritenute la principale causa di morte nei paesi occidentali. Alcuni studi hanno indicato i radicali liberi come concausa di danni a livello epatico e renale, della cataratta, di disturbi polmonari, neurologici, sessuali, nonché di alcune forme neoplastiche.

Oltre ai danni cardiovascolari, si è ipotizzato che lo stress ossidativo possa favorire anche l'insorgenza di patologie neurodegenerative quali il morbo di Parkinson e la malattia di Alzheimer.

Fattori ambientali e nutrizionali, come le radiazioni (raggi X, raggi  $\gamma$ , UV), gli inquinanti atmosferici (ozono,  $N_2O_2$ ,  $NO_2$ , fumo di sigaretta, ecc.), una dieta povera di frutta e verdura, di acidi grassi poliinsaturi e vitamine antiossidanti, possono incrementare l'attività dei sistemi generanti i ROS, inducendo lo stress ossidativo.

La produzione di specie radicaliche non è solo da ricondurre all'esposizione a xenobiotici esterni (irraggiamento, inquinanti aerei, agenti chimici), ma anche al metabolismo umano, che essendo aerobio, è concentrato necessariamente sull'ossigeno.

<sup>37</sup> R. Cervellati, P. Galletti, E. Greco, L. Bardini, F. Paolucci, M. Pori, Daria Giacomini, "Monocyclic  $\beta$ -Lactams as antibacterial agents: Facing antioxidant activity of *N*-thiomethyl-azetidiones", *Europ. Journ. of Medicinal chemistry*, **2013**, 60, 340

<sup>38</sup> a) G. Folkerts, J. Kloek, R.B. Muijsers, F.P. Nijkamp, *Eur. J. Pharmacol.* 429, **2001**, 251–262; b) M.C. Martinez, R. Andriantsitohaina, *Antioxid. Redox Signal.* 11, **2009**, 669–702

<sup>39</sup> M. Rottner, S. Tual-Chalot, H.A. Mostefai, R. Andriantsitohaina, J.M. Freyssinet, M.C. Martinez, *PLoS One* 6, **2011**, e24880, DOI: 10.1371/journal.pone.0024880

<sup>40</sup> P.Ø. Jense, J. Lykkesfeldt, T. Bjarnsholt, H.P. Hougen, N. Høiby, O. Ciofu, *Basic Clin. Pharmacol.*, **2012**, Doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00822.x

Le specie reattive all'ossigeno (ROS) e all'azoto (RNS) sono normalmente prodotte in ogni cellula dell'organismo umano, come risultato della riduzione dell'ossigeno ad acqua a livello della catena respiratoria mitocondriale.

Lo squilibrio tra la produzione di ROS e RNS e la capacità antiossidante cellulare in favore delle specie radicaliche, causa lo stress ossidativo che contribuisce all'insorgenza di numerose patologie, risultanti dai danni provocati dall'ossidazione delle proteine, del DNA e della perossidazione lipidica.

I radicali liberi che rivestono maggiore importanza negli organismi viventi sono quelli centrati sull'ossigeno (ROS) e si possono dividere in:

- radicali molto reattivi, come l'ossidrile  $\text{HO}^\bullet$  e gli alcossili  $\text{RO}^\bullet$ , che attaccano molecole di qualsiasi tipo,
- radicali moderatamente reattivi, quali l'anione superossido  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , l'idroperossile  $\text{HOO}^\bullet$  ed i perossili  $\text{ROO}^\bullet$  che reagiscono solo con poche molecole biologiche (ad esempio i lipidi poliinsaturi), ma sono capaci di originare perossidi ed idroperossidi, precursori sia del radicale ossidrile che degli alcossili estremamente reattivi.

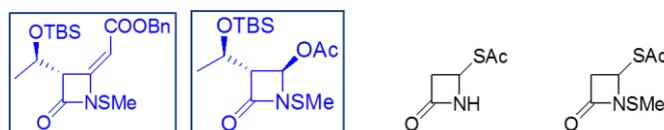
I ROS coinvolti nello stress ossidativo sono in prevalenza specie radicaliche, ma possono essere anche specie non radicaliche ad azione ossidante, come il perossido di idrogeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  e l'acido ipocloroso  $\text{HOCl}$ . Tuttavia, oltre ai ROS anche altri radicali possono essere potenzialmente dannosi per l'organismo.

Gli antiossidanti esogeni ed endogeni sono indispensabili per il mantenimento dell'equilibrio ossido-riduttivo fra radicali liberi ed antiossidanti.

Gli antiossidanti enzimatici endogeni come la superossido dismutasi, la catalasi e la glutazione perossidasi, e quelli non enzimatici esogeni ed endogeni come il glutazione, la vitamina C, la vitamina E ed il  $\beta$ -carotene "detossificano" i ROS e i RNS minimizzando i danni causati alle molecole biologiche.

Gli enzimi sono antiossidanti endogeni poiché prodotti dall'organismo umano, mentre le vitamine e il  $\beta$ -carotene sono antiossidanti esogeni in quanto l'organismo non è in grado di sintetizzarli e devono essere assunti con la dieta. Per quanto riguarda gli antiossidanti esogeni, i polifenoli sono un'importante categoria di sostanze di origine naturale contenuti nelle piante, di cui sono principalmente metaboliti secondari (sono detti anche biofenoli) e suddivisibili in due grandi classi: flavonoidi e acidi fenolici. In particolare il mio gruppo di ricerca in passato si è occupato di sintetizzare 4-alciliden  $\beta$  lattami coniugati a strutture polifenoliche, osservando che l'attività antiossidante riconducibile al substrato fenolico veniva conservata.<sup>41</sup>

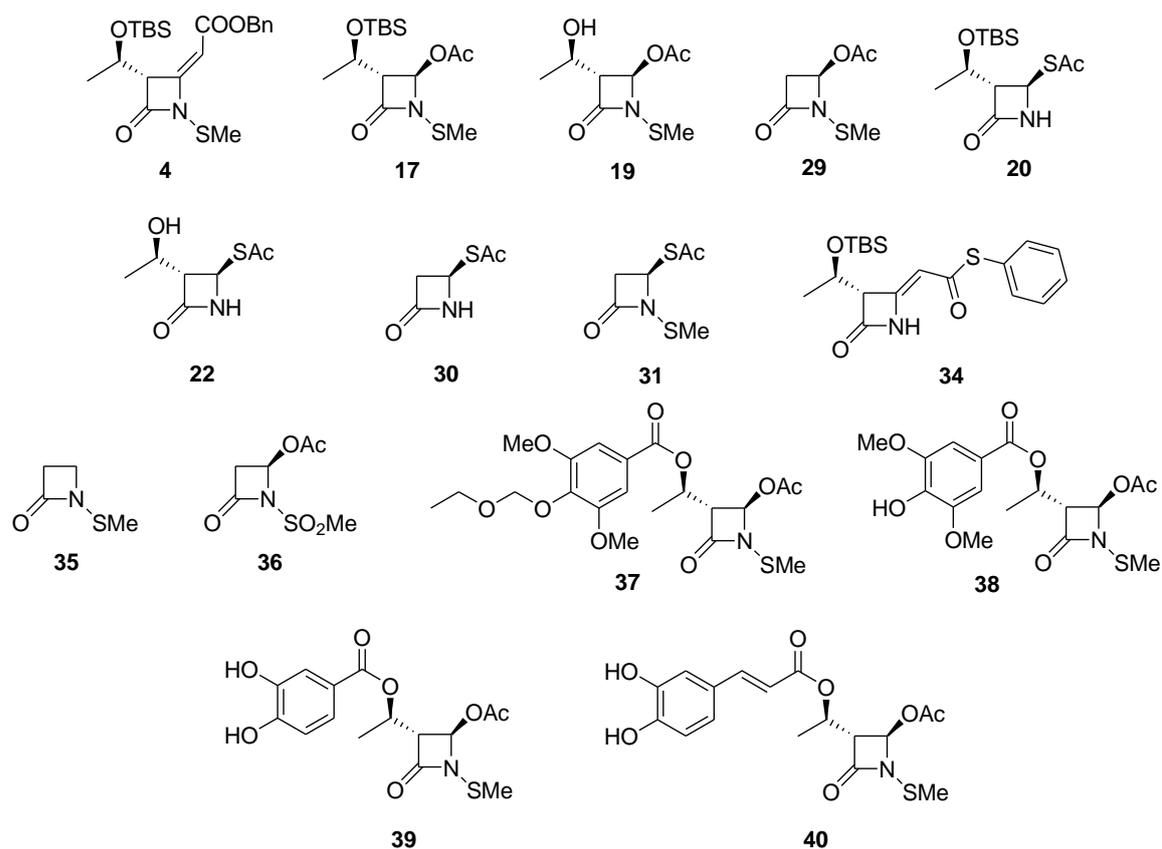
Visti gli ottimi risultati in termini di attività biologica in vitro degli *N*-tiometil 2 azetidioni contro isolati clinici Gram-positivi e Gram-negativi e in particolare su ceppi di MRSA e MSSA isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica, le migliori strutture  $\beta$  lattamiche testate e qui sotto rappresentate sono state opportunamente derivatizzate sulla catena idrossi etilica con una catena polifenolica per "aggiungere" a queste molecole anche un substrato che potesse fungere da antiossidante.



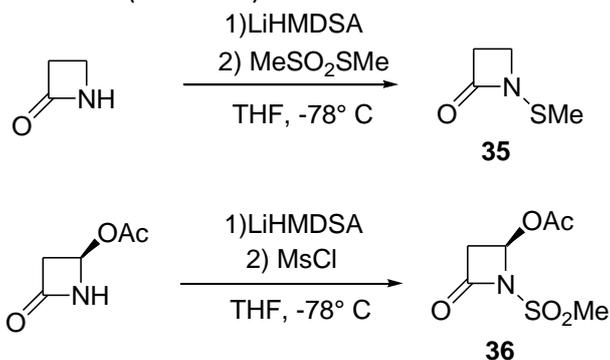
Le nuove molecole sono poi stati effettuati test di attività biologica su ceppi batterici presenti su pazienti affetti da fibrosi cistica e test di attività biologica per verificare la potenziale capacità in vivo di intercettare speci ROS e RNS.

Le nuove molecole sintetizzate dovrebbero avere la caratteristica di essere sia antibiotiche che antiossidanti, acquisendo quindi un'attività duale.

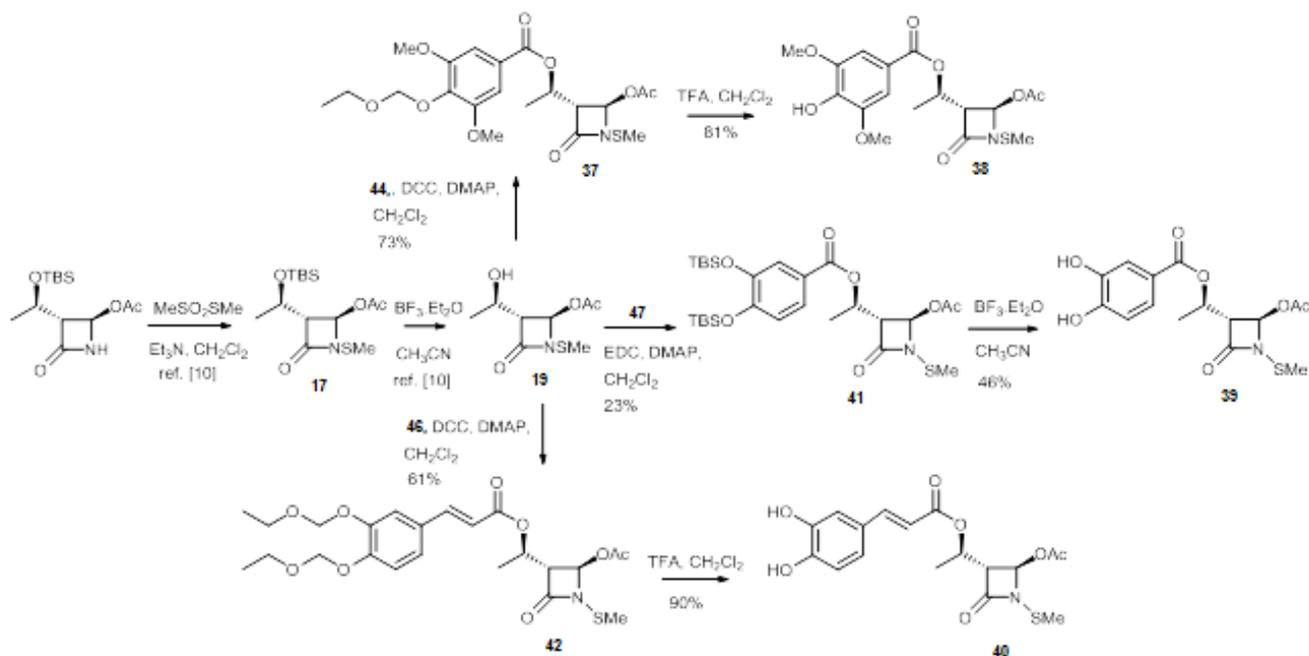
<sup>41</sup> G. Cainelli, C. Angeloni, R. Cervellati, P. Galletti, D. Giacomini, S. Hrelia, R. Sinisia, *Chemistry & Biodiversity*, 5 (2008) 811



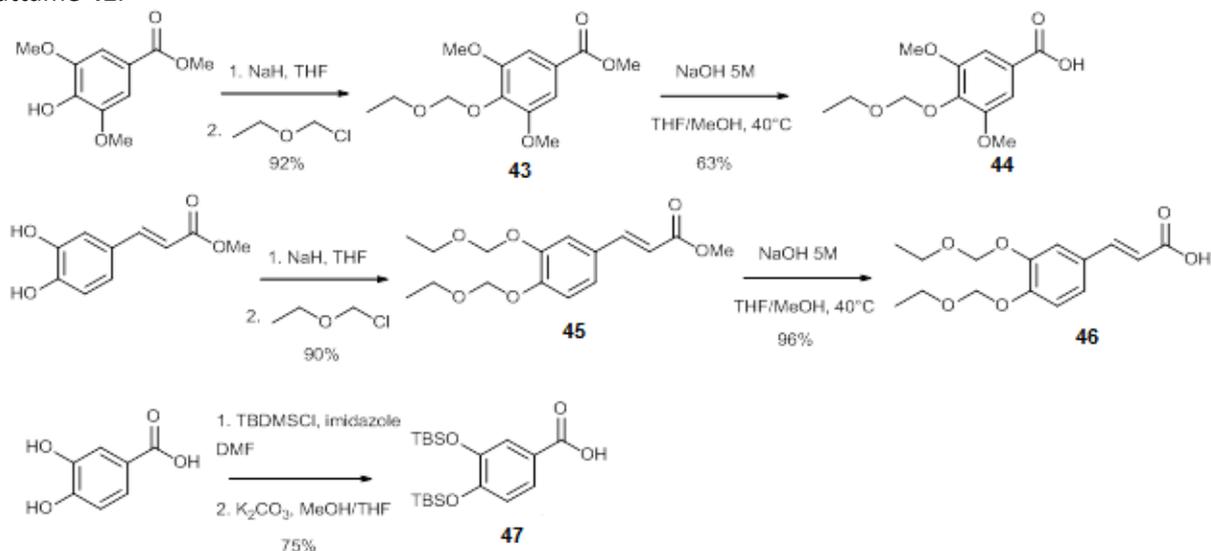
Le 15 molecole qui sopra rappresentate sono state tutte sintetizzate e testate. Le molecole **4**, **17**, **19**, **29**, **20**, **22**, **30**, **31**, e **34** sono state preparate secondo procedure di letteratura già note [10,16]. L'*N*-metilfosfido-4-acetossi-azetidin-2-one **36** è stato preparato a partire dal β lattame commerciale trattandolo con LiHMDSA e poi MsCl. In maniera analogo ail β lattame **35** è stato ottenuto trattando l'azetidin-2-one commerciale con LiHMDSA e poi *S*-metilmetansulfonato (Scheme 1).



I composti **37-40** sono stati preparati dal substrato commerciale **16**. Il composto **16** è stato inizialmente *N*-tiometilato utilizzando una nuova procedura messa a punto da noi usando Et<sub>3</sub>N invece di LiHMDSA o LDA per limitare la formazione di sottoprodotti. Il β lattame **17** è stato poi deproteetto dal gruppo TBS dando **19** e trattato successivamente con il relativo acido benzoico *O*-protetto **44**, **46**, e **47** in presenza di DCC o EDC come reagenti di coupling e quantità catalitiche di DMAP in dichloromethane ottenendo infine i composti **37**, **41** e **42**.



Per quanto riguarda gli acidi benzoici, è risultato fondamentale proteggerli in quanto il processo di coupling con un gruppo fenolico libero porta alla formazione di dimeri e processi di omocoupling. L'acido metil 4-(etossimetossi)-3,5-dimetossi benzoico **44** e l'acido (*E*)-3-(3,4-bis(etossimetossi)fenil) acrilico **46** sono stati preparati dal metil estere dell'acido siringico e dal metil estere dell'acido caffeico, tramite protezione del gruppo fenolico con clorometil etil etere e successiva idrolisi alcalina del gruppo estereo di **43** and **45**. Infine i composti **37** e **42** sono stati trattati con acido trifluoroacetico per eliminare la protezione fenolica e ottenere quindi i prodotti **38** e **40**. La stessa procedura applicata all'acido 3,4-dirossido benzoico non è stata efficace per l'ottenimento di **39**; è stata scelta una strategia di protezione con dei gruppi TBS, con l'ottenimento del  $\beta$  lattame **41**.

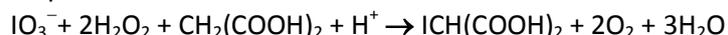


### Attività antiossidante

L'attività antiossidante degli azetidioni sintetizzati è stata verificata tramite quattro diversi protocolli che tengono conto dei differenti meccanismi potenziali con cui l'ossidazione può intervenire.<sup>42</sup>

<sup>42</sup> K. Schlesier, M. Harwat, V. Böhm, R. Bitsch, *Free Radic. Res.* 36, **2002**,177-187

Il primo approccio sfrutta l'azione inibitoria di un antiossidante di radicali liberi nei confronti della reazione oscillante di Briggs–Rauscher (BR) a pH 2.2. In Una reazione chimica si dice oscillante quando le concentrazioni dei reagenti e dei prodotti oscillano nel tempo senza l'intervento di fattori esterni. La reazione di Brigg-Rauscher può essere così schematizzata:



La reazione procede tramite intermedi ionici e radicali, e tra le specie radicali quelli presenti in maggior concentrazione sono i radicali idroperossili  $\text{HOO}^\bullet$ . Sostanzialmente quando degli “scavenger” radicalici sono addizionati ad una miscela attiva di BR si assiste ad uno spegnimento istantaneo della reazione, un tempo di inibizione che dipende linearmente dalla concentrazione dell'antiossidante cui segue poi una ripresa delle oscillazioni.<sup>43</sup>

Il secondo approccio utilizzato per valutare l'attività antiossidante è stato il metodo TEAC. Il metodo si basa sulla decolorazione del radicale catione blu-verde dell'ABTS<sup>•+</sup> per opera di antiossidanti,<sup>44</sup> che viene preformato con  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  in tampone fosfato a pH 7.4 (il pH del sangue, per mimare le condizioni fisiologiche). Si effettuano poi misure spettroscopiche in triplicato a 734 nm a quattro concentrazioni di antiossidante in DMSO. Con la stessa metodologia si preparano allo stesso modo soluzioni diluite di Trolox, che viene utilizzato come standard. La differenza di assorbanza tra il bianco (solo DMSO) e il campione fornisce un  $\Delta E6$  ( $E6_{\text{blank}} - E6_{\text{sample}} = \Delta E6$ ). In queste condizioni sperimentali il valore di  $\Delta E6$  plottato contro la concentrazione segue la legge di Lambert Beer. L'attività antiossidante è data dal rapporto  $m(\text{cmp})/m(\text{std})$ ,  $m$  = pendenza della linea dritta, ed è riportata come millimoli di equivalenti di Trolox.

Il test DPPH si basa sulla decolorazione del radicale stabile 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH<sup>•</sup>) per opera di antiossidanti.<sup>45</sup> Il radicale DPPH<sup>•</sup> è colorato intensamente di rosso ( $\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$ ). La sua decolorazione è una funzione della concentrazione e del tempo e anche in questo caso si usa Trolox come standard. La relativa attività antiossidante è quindi ottenuta tramite il paragone tra la retta relativa alla percentuale di inibizione plottate rispettivamente in relazione alla concentrazione di Trolox. Si riportano poi i dati come mMoli di equivalenti di Trolox.

L'ultimo metodo utilizzato è il FRAP, come descritto da Benzie e Strain, che misura l'attività antiossidante come la capacità di ridurre lo ione  $\text{Fe}^{3+}$ .<sup>46</sup> La procedura si basa sulla riduzione del complesso incolore 2,4,6-Tris(2-piridil)-s triazin- $\text{Fe}^{3+}$ ,  $(\text{TPTZ})_2\text{Fe}^{3+}$  a quello blu 2,4,6-Tris(2-piridil)-s triazin- $\text{Fe}^{2+}$  per opera di antiossidanti. Vengono testate quattro o cinque concentrazioni diverse di antiossidante a 593 nm confrontando l'assorbanza plottata contro la concentrazione relativa allo standard ( $\text{FeSO}_4$ ) ottenendo infine un valore misurato in mM equivalenti di  $\text{Fe}(\text{II})$ .

La maggior parte dei  $\beta$  lattami testati non ha mostrato una significativa attività antiossidante con i metodi TEAC (Tabella 2), DPPH or FRAP. In più i composti **4**, **17**, e **31** sono stati anche testati con il reagente di Folin-Ciocalteu (FC, chiamato anche il metodo dell'acido gallico equivalente) per verificare l'attività riduttiva dello scheletro dell'*N*-tiometil  $\beta$  lattame, ma con risultati negativi. Anche i composti **22** e **30** non sostituiti sono risultati essere negativi ai test di attività antiossidante. Solo gli *N*-tiometil  $\beta$  lattami **37-40**, con esteri fenolici sulla catena idrossi etilica, sono risultati attivi.

<sup>43</sup> R. Cervellati, K. Höner, S.D. Furrow, F. Mazzanti, F. S. Costa, *Helv. Chim. Acta* **87**, **2004**, 133-155

<sup>44</sup> a) R. Re, N. Pellegrini, A. Progettante, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.* **26**, **1999**, 1231-1237; b) A. Prakash, F. Rigelhof, E. Miller, *Antioxidant Activity*, [www.medlabs.com/Downloads/Antiox\\_acti\\_.pdf](http://www.medlabs.com/Downloads/Antiox_acti_.pdf)

<sup>45</sup> M.S Blois, *Nature* **181**, **1958**, 1199-1200, W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm. Wiss. Technol./Food Sci. Technol.* **28**, **1995**, 25-30

<sup>46</sup> I.F.F. Benzie, J.J. Strain, *Anal. Biochem.* **239**, **1996**, 70-76

Tabella 2

Comp	BR ( $\mu\text{M}$ eq. Resorcinol)	TEAC (mmol eq. TROLOX)	DPPH (mmol eq. TROLOX)	FRAP (mmol eq.Fe)	Attività antimicrobica su MRSA da CF <sup>a</sup>		
					MIC range (mg/L)	MIC <sub>50</sub> (mg/L)	MIC <sub>90</sub> (mg/L)
<b>19</b>	na <sup>b</sup>	na	na	na	32->128	64	>128
<b>29</b>	na	na	na	na	32-64	32	64
<b>22</b>	na	na	na	na	16-128	64	128
<b>30</b>	na	na	na	na	16-64	32	64
<b>31</b>	na	na	na	na	16-32	16	32
<b>37</b>	0.70 <sup>c</sup>	na	neglegibile	na	nd <sup>b</sup>	nd	nd
<b>38</b>	1.8 $\pm$ 0.3	0.037 $\pm$ 0.001	0.0091 $\pm$ 0.0002	0.19 $\pm$ 0.02	16-128	64	128
<b>39</b>	0.38 $\pm$ 0.02	1.23 $\pm$ 0.02	1.96 $\pm$ 0.13	1.91 $\pm$ 0.07	32->128	128	>128
<b>40</b>	1.95 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.03	1.23 $\pm$ 0.03	1.98 $\pm$ 0.04	16-128	64	64
<b>FOT<sup>e</sup></b>					1->128	128	>128
<b>CTX<sup>e</sup></b>					1->128	8	>128

<sup>a</sup> Le colture di *S. aureus* American ATCC 29213, and ATCC 43300 sono state usate come controllo.

<sup>b</sup> na = nessuna attività; nd = non determinato.

<sup>c</sup> risultato di una sola misura in una miscela a concentrazione 14.7  $\mu\text{M}$ .

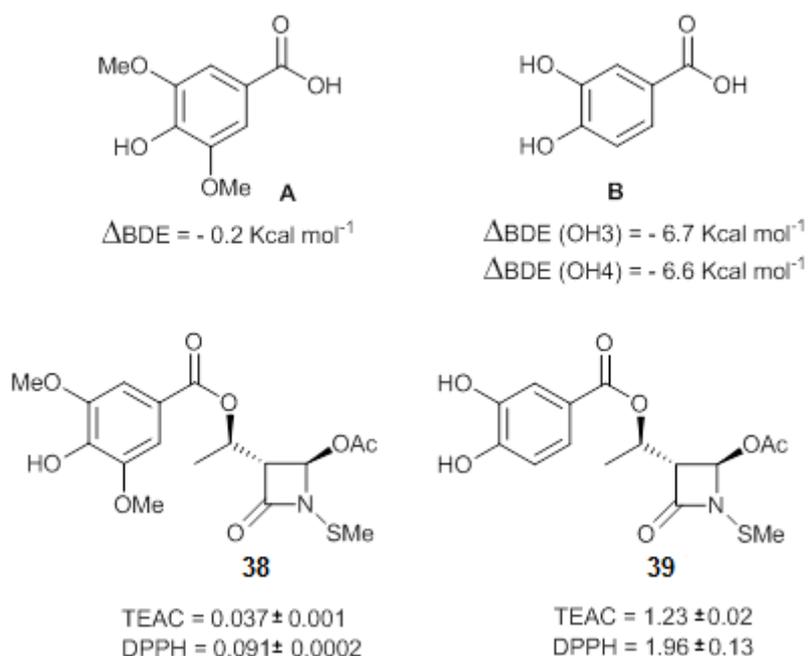
I valori di TEAC per i composti **39** e **40** sono in linea con quelli di  $\beta$  lattami polifenolici riportati in articoli precedenti, attestandosi tra gli 0.40 e i 2.0 mM di Trolox. I metodi DPPH e FRAP sono sostanzialmente in accordo con o valori ottenuti dal TEAC, considerando comunque la differenza chimica di entrambi i metodi. Infatti per confronto, i valori di TEAC per l'acido Ascorbico (Vitamina C) e l' $\alpha$ -Tocoferolo (Vitamina E) sono 1.05 e 0.97 rispettivamente, i valori di DPPH sono 1.1 e 0.5, mentre il valore FRAP per le due vitamine è 2.0. Come atteso il composto **37** non mostra attività antiossidante con questi tre metodi (controllo negativo) in quanto non contiene gruppi OH liberi, essendo protetto come etere. Il composto **13** si dimostra essere un composto con una attività antiossidante molto bassa ma tramite studi SAR si può tentare di interpretare il risultato.

I valori BR per tutti i composti sono sorprendentemente più alti rispetto a quelli sui  $\beta$  lattami polifenolici riportati in precedenza, attestandosi tra 0.021 e 0.28  $\mu\text{M}$  eq. di Resorcinolo. Il sospetto è che questi risultati inusuali possano essere dovuti ad una ossidazione dello zolfo del gruppo N-tiometil per opera dello iodato acido che compete con la reazione di "scavenging" del radicale  $\text{HOO}^\bullet$ . E ovviamente sui substrati non N-tiometilati la reazione non può avvenire.

### Relazione struttura-attività

In generale il potere antiossidante si rivela per quelle molecole in cui sono presenti uno o più gruppi OH liberi sulla catena fenolica.<sup>47</sup> Wright ha riportato un modello teorico per calcolare le entalpie di dissociazione di legame (BDE) per quelle molecole appartenenti alla classe dei fenoli per correlarlo poi con la loro attività di "scavengers" radicalici. Gli stessi autori dicono che per determinare il potere antiossidante di ciascun gruppo OH (e quindi la BDE) di una molecola polifenolica bisogna prendere in considerazione in maniera additiva i seguenti elementi: l'elettronica i legami a idrogeno e gli effetti dei sostituenti. In questo modo il valore di BDE o  $\Delta\text{BDE} = (\text{BDE}_{\text{comp}} - \text{BDE}_{\text{D-OH}})$  può essere semplicemente calcolato dai dati riportati per ciascun polifenolo. Si è osservato che il numero di gruppi OH non è così importante e che risulta strategica la loro posizione rispetto agli altri sostituenti a determinarne l'attività e la forza antiossidante. Dai dati riportati in tabella 1 abbiamo calcolato i valori di  $\Delta\text{BDE}$  per l'acido siringico **A** e l'acido 3,4 diidrossi benzoico **B** paragonandola all'attività di scavenging radicalica dei **13** e **14**.

<sup>47</sup> C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Free Radic Biol. Med. 20, 1996, 933-956

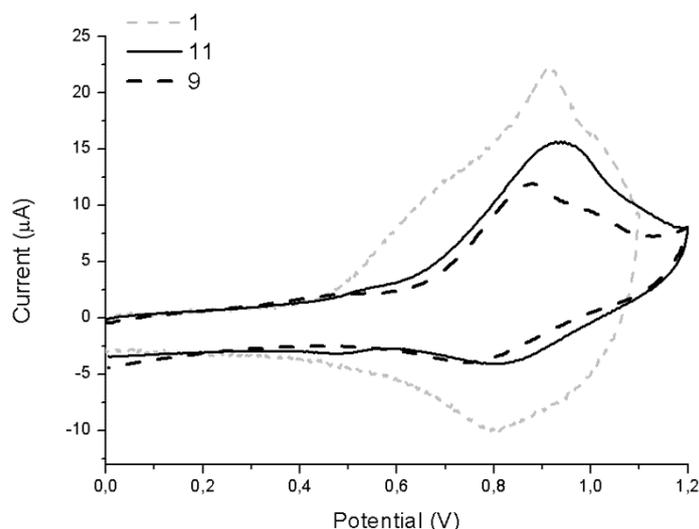


Come si vede dalla figura il modello costruito si **A** e **B** si adegua molto bene ai dati sperimentali, giustificando anche la bassa attività antiossidante di **38** rispetto a **39**.

### Voltammetria

Per interpretare il ruolo nell'attività antiossidante dell'atomo di zolfo di questi  $\beta$ -lattami sono stati fatti studi di voltammetria ciclica. E' infatti ben noto che i tioeteri possono ossidarsi a solfossidi e poi a solfoni in  $\text{H}_2\text{O}_2$  o con altri agenti ossidanti.<sup>48</sup> I primi risultati dei test antiossidanti però sembrano mostrare che il gruppo N-tiometilico non sembra essere disposto ad ossidarsi. Sono quindi stati effettuati studi di voltammetria ciclica partendo dai composti **30** e **31**, scelti come modello. Nella prima molecola l'atomo di zolfo bivalente è legato al carbonio C4 mentre nella seconda all'atomo di azoto dell'anello  $\beta$ -lattamico. Lo scopo è di misurare l'abilità di questi composti modello di venire ossidati per valutare la loro attività antiossidante tramite la misura del potenziale standard corrispondente. Per avere una migliore interpretazione dei dati abbiamo anche effettuato la voltammetria ciclica del derivato **34**, che aveva mostrato una attività antibiotica nulla ma che era risultata antiossidante in maniera modesta nei test BR e TEAC (condizioni acide e neutre rispettivamente) che può essere spiegata, visto il profilo del voltammogramma, con la formazione di un radical catione intermedio  $\text{R}_2\text{S}^{+\bullet}$ .

<sup>48</sup> M.B. Smith, J. March, March's Advanced Organic Chemistry, Wiley Interscience New Jersey **2007**, ch. 19, p. 1780



Anche le specie **30** e **31** hanno mostrato in MeCN un profilo voltammografico simile nella regione del potenziale positivo con un grande picco anodico a circa 0.9 V attribuibile alla ossidazione reversibile della specie originale. Nel profilo CV sono stati osservati fenomeni di adsorbimento “Weak-to-strong” che nella maggior parte dei casi portano all’accumulo di particolato sulla superficie dell’elettrodo e quindi ad un comportamento irreversibile. Nel caso dell’elettrodo ad oro comunque è stato osservato un comportamento molto più riproducibile anche se in questo caso erano presenti fenomeni di adsorbimento responsabili per il pattern asimmetrico del voltammogramma e l’apparente più larga corrente anodica (forward scan) rispetto alla catodica (reverse scan). Questo aspetto è risultato particolarmente evidente per il composto **34**. In tal caso infatti, la crescita di una intensa spalla anodica situata a potenziali meno positivi rispetto al picco principale suggerisce un adsorbimento relativamente forte del prodotto di ossidazione anodica sulla superficie di oro.<sup>49</sup> Visti i gruppi funzionali della molecola in questione, ciò può succedere molto facilmente. Oltre allo zolfo, sia i gruppi fenilici che i gruppi carbossilici possono promuovere l’adsorbimento sull’oro; ciò complica molto l’identificazione della natura esatta del processo. Si è cercato di superare i problemi relativi all’adsorbimento e loro effetti sulla morfologia della curva di CV, valutando i potenziali standard delle molecole: 0.82, 0.86 e 0.88 V per i composti **30**, **31** e **34**, rispettivamente.

Sulla base di questi risultati, e assumendo di poter direttamente confrontare i potenziali determinati nelle condizioni della voltammetria ciclica (solventi apolari, aprotici) con quelli misurati in solvente acquoso tutti i composti in effetti non dovrebbero realmente mostrare una apprezzabile attività antiossidante con i test TEAC, DPPH o FRAP. I potenziali redox delle coppie  $\text{ABTS}^{\bullet+}/\text{ABTS}$  (TEAC),  $\text{DPPH}^{\bullet}/\text{DPPH}$ ,  $(\text{TPTZ})_2\text{Fe}^{3+}/(\text{TPTZ})_2/\text{Fe}^{2+}$  (FRAP) sono infatti 0.68 V,<sup>50</sup> 0.28 V,<sup>51</sup> and 0.77 V,<sup>52</sup> rispettivamente e poi  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ,  $\text{DPPH}^{\bullet}$ ,  $(\text{TPTZ})_2\text{Fe}^{3+}$  possono essere ridotti termodinamicamente da composti con potenziale di riduzione più basso. Questo è applicabile a tutti gli *N*-tiometil  $\beta$ -lattami qui sintetizzati ad eccezione dei composti **38**, **39** e **40**. Questi composti infatti contengono gruppi fenolici sulla catena laterale e molti composti di natura fenolica hanno potenziali di ossidazione più bassi anche reagendo  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ,  $\text{DPPH}^{\bullet}$  e  $(\text{TPTZ})_2\text{Fe}^{3+}$ .

In conclusione, la bassa attività antiossidante del composto 1 osservata nel precedente lavoro non può essere attribuita, sulla base dei potenziali standard riportati qui, al trasferimento di elettroni “outer-sphere” tra l’atomo di zolfo (donatore) e i reagenti usati per i test di ossidazione ( $\text{HOO}^{\bullet}$ ,  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ,  $(\text{TPTZ})_2\text{Fe}^{3+}$ , accettori) perché la forza guida sarebbe largamente sfavorevole. D’altra parte si può ipotizzare la formazione di un complesso tra il  $\beta$  lattame e i reagenti usati per i test di ossidazione. Quindi potrebbe avere luogo una sorta di interazione tra i due “partners” che sarebbe in grado di rendere termodinamicamente più accessibile il

<sup>49</sup> A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications* 2<sup>nd</sup>, Wiley, **2001**, p. 598

<sup>50</sup> K. Schlesier, M. Harwat, V. Böhm, R. Bitsch, *Free Rad. Res.* **36**, **2002**, 177-187

<sup>51</sup> Milardovic, D. Iveković, V. Rumenjak, B. S. Grabarić *Electroanalysis* **17**, **2005**, 1847-1853

<sup>52</sup> K.M. Schaich, *Cracking the code on antioxidant testing-sorting your ORAC from your FRAP*, Nutraingredients Antioxidant Conference, Brussels, June 30, 2010, slides 21

trasferimento di elettroni, in maniera verosimile al meccanismo “inner-sphere” evidenziato nella reazione tra i reagenti di Grignard e il benzofenone.<sup>53</sup>

In linea con questa ipotesi quindi il composto **34**, mostrando il più forte adsorbimento tra tutti sulla superficie di oro, per via della stessa energia libera di adsorbimento, la sua ossidazione (inner-sphere) diventa significativamente più facile di quella con specie libere in soluzione (outer-sphere).

### Attività antibatterica

È stata infine valutata l'attività antibatterica espressa come MIC in vitro su 45 ceppi clinici di MRSA isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica.

I test mostrano che i composti **38-40** risultano tra i più attivi con range di MIC da 16 a 128 mg/L; in particolare il β lattame **40** ha mostrato una MIC<sub>50</sub> e una MIC<sub>90</sub> uguali a 64 mg/L.

In questa ultima tabella sono infine riassunti i dati di attività antiossidante e antibatterica delle molecole testate. Malgrado i composti **19, 22, 29, 30, e 31** mostrino attività contro ceppi di *S. aureus* resistente [10], la sola presenza dell'atomo di zolfo, come già discusso in precedenza, non porta la molecola ad avere grande potere antiossidante. L'attività duale è invece presente sui composti **38, 39, 40** per via dei gruppi fenolici, in cui i buoni risultati in termini di attività biologica possono essere un buon punto di partenza per la progettazione di altre molecole.

### 1.2.3 Studi di biodegradazione dei beta lattami 17 e 29<sup>54</sup>

La precedente discussione sulla resistenza batterica ha mostrato come essa sia sicuramente causata l'uso massiccio e non controllato di antibiotici, fenomeno esteso all'ambito umano, all'allevamento e all'agricoltura. I rischi in termini di salute umana e inquinamento causati dall'uso massiccio di antibiotici e/o dai loro metaboliti sulla superficie terrestre e nel mare sta quindi ricevendo un interesse sempre crescente.<sup>55</sup>

Studi recenti stanno cominciando ad evidenziare come l'utilizzo di grandi quantitativi di antibiotici non biodegradabili porta alla loro persistenza in organismi marini e terreni, dove possono continuare ad esercitare i loro effetti anche per lunghi periodi.<sup>56</sup> Si stanno osservando fattori di resistenza non solo in casi clinici e veterinari ma anche in “comparti” ambientali (è il caso di terreni non più coltivati e fognature) si osserva la presenza di microorganismi resistenti.<sup>57</sup> Inoltre anche in alcune acque potabili sono state trovati a volte ceppi batterici resistenti.<sup>58</sup>

Tutti questi aspetti dovrebbero spingere allo sviluppo ragionato di nuovi antibiotici e/o loro formulazioni, assieme alla consapevolezza di limitare il più possibile l'utilizzo indiscriminato e la diffusione nell'ambiente di queste molecole.<sup>59</sup> Purtroppo a tutt'oggi solo alcune molecole e formule sono state introdotte nelle ultime decadi.

Nei precedenti paragrafi è stata descritta la sintesi e l'attività biologica di famiglie di monobattami *N*-tiometilati: in particolare il composto **29**, il (2*R*)-1-(metiltio)-4-ossazetidina-2-il acetato e il **17**, (2*R*,3*R*)-3-((1*R*)-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl)-1-(metiltio)-4-ossazetidina-2-il acetato hanno mostrato attività promettenti su ceppi resistenti di MRSA e MSSA. Inoltre il composto **17** è stato testato su ceppi batterici da pazienti affetti da fibrosi cistica. Si è quindi deciso di valutare una valutazione sulla persistenza di questi due nuovi potenziali antibiotici contro ceppi batterici resistenti su acque e terreni a diversi pH, con l'obiettivo di inquadrarne il comportamento in termini di biodegradabilità. Il cammino di biodegradazione di questi due monobattami è stato poi paragonato a quello della amoxicillina triidrato, un antibiotico a largo spettro a base di penicillina usato in maniera massiccia in ambito umano e veterinario dagli anni '70.

<sup>53</sup> a) T. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, **1993**, 916-918; b) T. Holm, *Acta Chem. Scand. Ser. B* **42**, **1998**, 685-689; (c) T. Lund, D. Ohlrich, P. Borling, *Acta Chem. Scand.* **53**, **1999**, 932-937

<sup>54</sup> D. Giacomini, S. Blasioli, C. Fellet, A. Garelli, M. Pori, I. Braschi, “Persistence and degradation of new β-lactam antimicrobial agents in the soil-water system”, submitted to *Chemosphere*, **2013**

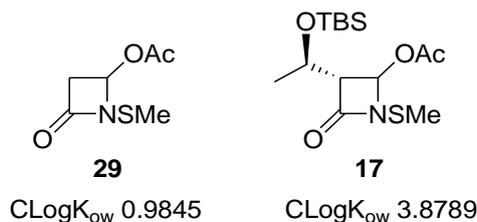
<sup>55</sup> Witte, W., *Science*, **1998**, **279**, 996-997

<sup>56</sup> Bergheim, M., Helland, T., Kallenborn R., Kummerer, K., *Chemosphere*, **2010**, **81**, 1477-1485

<sup>57</sup> Séveno, N.A., Kallifidas, D., Smalla, K., van Elsas, J.D., Collard, J.M., Karagouni, A.D., Wellington, *Rev. Med. Microbiol.*, **2002**, **13**, 15-27

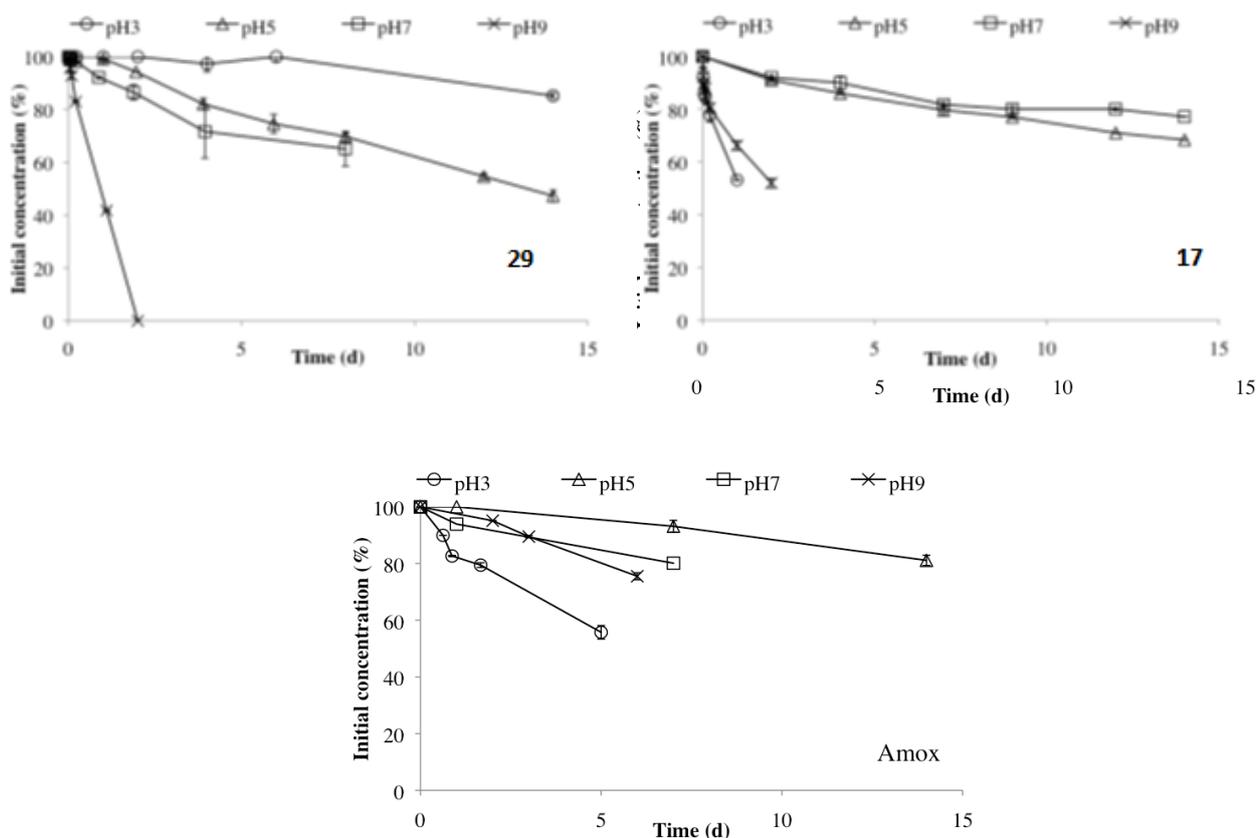
<sup>58</sup> Pandey, S., Musarrat, J., *J. Environ. Biol.*, **1993**, **14**, 267-274

<sup>59</sup> Braschi, I., Gatti, G., Paul, G., Gessa, C.E., Cossi, M., Marchese, *Langmuir* **2010**, **26**(12): 9524-9532



### Biodegradazione in acqua

La prima analisi di biodegradazione è stata effettuata tramite studi cinetici di idrolisi dei β lattami mantenuti in soluzione tampone a pH differenti (3,5,7 e 9) a 25° C al buio seguendo l'andamento della conversione nel tempo (Grafici sottostanti e Tabella 3).



Idrolisi di 29 e 17 in soluzione acquosa a differenti pH di diversi tamponi (20 mM citrato a pH 3 e 5; 20 mM fosfato a pH 7 e 9) a temperatura ambiente. L'idrolisi della Amoxicillina(Amox) è riportata per confronto.

Come ci si aspettava, la degradazione idrolitica a tutti i pH segue una cinetica di ordine pseudo primo come dimostrano i coefficienti di correlazione sempre  $\geq 0.9263$ . La velocità di degradazione di **29** in acqua in funzione del pH sembra essere nell'ordine:  $9 > 7 \geq 5 > 3$ , che appare catalizzata soprattutto in ambiente basico e poco influenzata da quello acido. L'idrolisi di **17** è molto veloce a pH 3 e 9 (rispettivamente) mentre risulta più lenta a pH 5 e 7 ( $t_{1/2}$  di 25.7 e 33.6 giorni).

Ad eccezione della cinetica osservata a pH 3, l'idrolisi di **29** è in generale più veloce rispetto a **17**. La differenza tra le due strutture è unicamente legata alla presenza del gruppo OTBS, che porta **17** ad essere più idrofobo almeno di 4 volte come stimato dal valore di ClogK<sub>w</sub> (CLogK<sub>ow</sub> di 3.8789 e 0.9845, rispettivamente).

In acqua per gli stessi pH segue questo ordine:  $5 > 7 > 9 > 3$  con i relativi  $t_{1/2}$  of 46.1, 19.7, 14.4, and 6.2 d. I risultati sottolineano che sia le condizioni acide che basiche influenzano solo debolmente l'idrolisi. Il

cammino di degradazione acido e basico dell'amoxicillina è noto da tempo<sup>60</sup> e in generale si accetta che la degradazione sia più veloce a pH basico. (e.g.  $t_{1/2} = 1.2$  d pH 9 e a 30°C)<sup>61</sup> che acidi ( $t_{1/2} = 4.7$  d at pH 3 and 30°C, Chada et al., 2003), per via della natura dell'anello  $\beta$  lattamico, particolarmente suscettibile all'apertura da parte dello ione OH<sup>-</sup>. dati osservati da noi sono molto diversi a causa delle diverse condizioni adottate (buffers and temperature adopted, the use of sodium azide to preserve the solutions sterility), anche se il tren generale si idrolisi è comunque in accordo con le idrolisi alcaline e acide riportate da altre studi. Inoltre la GlaxoSmithKline (SDS numero 2211 19-01-2006, versione 13) ha dimostrato come la amoxicillina triidrato sia chimicamente instabile in acqua a pH neutro, con  $t_{1/2}$  a pH neutro nel range dei 50-113 giorni, in buon accordo con il nostro valore di 46.1 giorni.

Questo studio mostra comunque come l'amoxicillina sia molto più persistente di **29** a tutti i pH ad eccezione di 3, dove la sua stabilità ( $t_{1/2} = 6.2$  d) è addirittura un ordine di grandezza inferiore a **29** ( $t_{1/2} = 49.5$  d). Tuttavia nelle acque e nei terreni risulta inusuale la presenza di un pH così acido ma altresì risulta comune un pH 5 dove **29** si degrada molto più velocemente dell'amoxicillina. Si osserva anche che l'amoxicillina è risultta essere più stabile di **17** a tutti i pH ad eccezione del pH neutro.

Tabella 3

pH	$k_{obs}$ (d <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (d)	R <sup>2</sup>
<b>29</b>			
<b>3</b>	0.0140 (0.024)	49.5 (0.1)	0.984 (0.008)
<b>5</b>	0.0506 (0.000)	13.7 (0.06)	0.9820 (0.003)
<b>7</b>	0.0845 (0.031)	8.8 (1.2)	0.9820 (0.012)
<b>9</b>	0.7982 (0.000)	0.87 (0.01)	0.9986 (0.001)
<b>17</b>			
<b>3</b>	0.4567 (0.0143)	1.6 (0.5)	0.9720 (0.0267)
<b>5</b>	0.0270 (0.0017)	25.7 (1.5)	0.9819 (0.0239)
<b>7</b>	0.0207 (0.0016)	33.6 (2.5)	0.9580 (0.0321)
<b>9</b>	0.2950 (0.0076)	2.4 (0.1)	0.9518 (0.0323)
<b>Amoxicillin</b>			
<b>3</b>	0.1106 (0.0094)	6.2 (0.5)	0.9757 (0.0091)
<b>5</b>	0.0151 (0.0018)	46.1 (5.4)	0.9700 (0.0222)
<b>7</b>	0.0353 (0.0023)	19.7 (1.3)	0.9403 (0.0332)
<b>9</b>	0.0481 (0.0028)	14.4 (0.9)	0.9263 (0.0650)

Parametri cinetici ( $k_{obs}$  = costante di degradazione di ordine 1;  $t_{1/2}$  = tempo di dimezzamento) per **29** e **17** l'idrolisi in soluzioni tampone nel range 3-9.

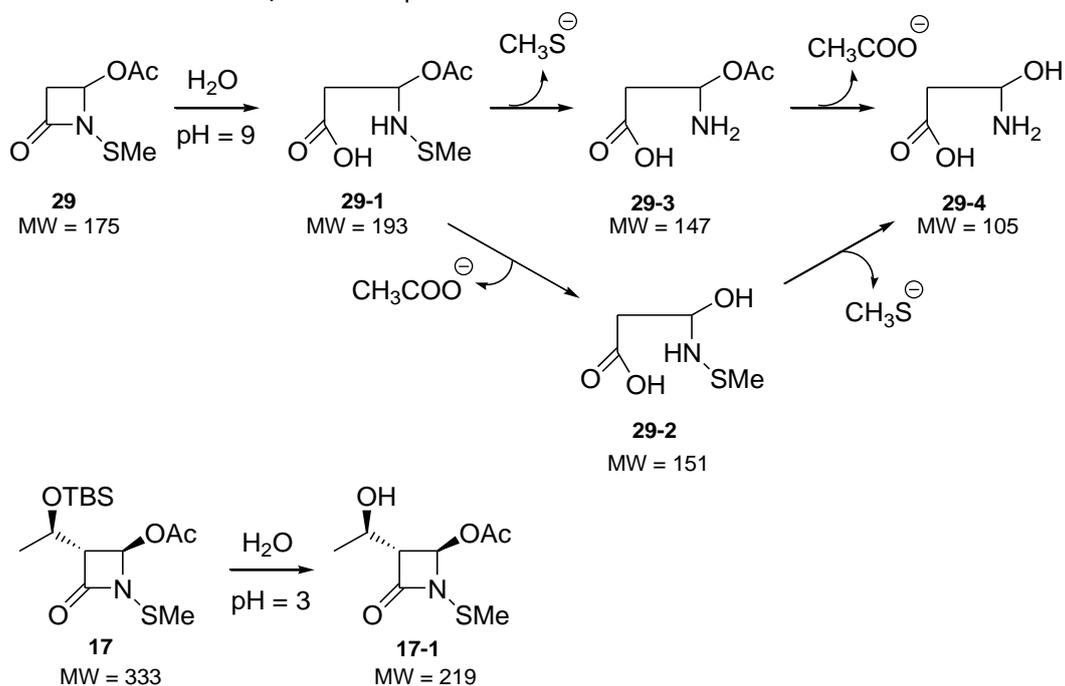
I prodotti di idrolisi di **29** e **17** non sono stati isolati ma ipotizzati sulla base degli spettri di massa. Inoltre non essendo definito il loro coefficiente di estinzione molare non è possibile risalire ad un valore di concentrazione delle soluzioni. Nonostante tutto la cinetica di degradazione è stata monitorata dalle aree dei picchi dell'HPLC. Per quanto riguarda **29**, la formazione del suo prodotto di idrolisi a pH 3 è stato molto lento e non ha portato alla formazione di sottoprodotti in quantità ragionevole. L'idrolisi a pH 9 ha generato invece 4 sottoprodotti chiamati **29-1**, **29-2**, **29-3**, e **29-4**, quest'ultimo presente anche se in piccola scala anche a pH 5 e 7. La struttura proposta in base agli spettri di massa ottenuti è la seguente: acido 3-acetossi-3-((metiltio)ammino)propanoico per **29-1**, acido 3-idrossi-3-(( metiltio)ammino)propanoico per **29-2**, acido 3-acetossi-3-ammino propanoico per **29-3**, e acido 3-ammino-3-idrossipropanoico per **29-4**. In accordo con il pattern di biodegradazione proposto, il primo step idrolitico di **29** consiste nell'apertura del  $\beta$  lattame (**29-1**); seguono poi due potenziali cammini. Il primo prevede la perdita di metiltiolato (**29-3**) e dell'acido acetico a dare **29-4**. Il secondo prevede prima la perdita dell'acetato (**29-2**) e poi la perdita di metiltiolato (**29-4**). Entrambi i pattern portano ad un unico substrato.

Sfortunatamente l'idrolisi di **17** non porta a quantità apprezzabili di prodotti visibili all'UV per ogni pH con l'eccezione della formazione del prodotto **17-1**, osservato a pH 3, che consiste nella perdita del gruppo TBS,

<sup>60</sup> Hou, J.P., Poole, J., *J. Pharm. Sci.*, **1971**, 60, 4, 503-532

<sup>61</sup> Chada, R., Kashid, N., Jain, D.V.S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2003**, 55, 1495-1503

particolarmente sensibile a pH acidi.<sup>62</sup> A causa dell'elevata reattività di **17** in condizioni alcaline non si può escludere la formazione di prodotti di degradazione solo in base alla incapacità di osservarli all'UV: si può anche in questo caso ipotizzare che entri in azione l'apertura del  $\beta$  lattame. Fino ad ora nessuno dei prodotti di idrolisi/degradazione derivanti da **29** o **17** è stato testato dal punto di vista della tossicità nei terreni e/o nelle acque.



#### Biodegradazione in terreno

In seguito alle analisi idrolitiche di **29** e **17**, sono seguiti degli studi di comportamento in terreno.

Tabella 4

Soil	pH		CaCO <sub>3</sub> (g kg <sup>-1</sup> ) (5.9)	Texture (%)			TOC <sup>a</sup> (g kg <sup>-1</sup> ) (0.69)	Water content (% soil DW <sup>b</sup> )	
	H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub>		Sand	Silt	Clay		Wilting point	Field capacity
	<b>S1</b>	8.16	7.87	54.6 (5.9)	37	32	31	7.66 (0.69)	2.3 (0.2)
<b>S2</b>	5.02	4.18	n.d.	40	44	16	21.8 (1.06)	1.5 (0.2)	36.6 (3.4)

Riassunto delle proprietà fisico-chimiche dei suoli analizzati

<sup>a</sup>TOC: total organic carbon

<sup>b</sup>DW: Dry weight

In tabella 4 sono riassunte le caratteristiche chimiche e fisiche dei terreni selezionati per questo studio. S1 è un terreno calcareo sabbioso e argilloso caratterizzato come ci si aspetta da pH alcalino per via del contenuto di 54.6 g kg<sup>-1</sup> di carbonato. S2 è un terreno argilloso, caratterizzato da un pH acido, tipico dei terreni boscosi. Il contenuto di CaCO<sub>3</sub> in S2 non è stato misurato poiché a pH più basso di 7, si considera di quantità minima. Il quantitativo totale di carbonio organico (TOC) è molto alto (21.8 g kg<sup>-1</sup>) per S2, ma molto più basso (7.66 g kg<sup>-1</sup>) in S1. Anche se non sono normalmente presenti antibiotici nei terreni boscosi, S2 è comunque stato scelto per le sue importanti caratteristiche di avere un basso pH e un alto contenuto di carbonio organico.

<sup>62</sup> Wuts, P.G.M., Greene, T.W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, IV edition 2007 Wiley-Interscience Hoboken, New Jersey pages 196-206.

Il comportamento di **29** e **17** è stato studiato nei due terreni in due differenti status di acqua (tabella 5): “wilting point” (minima quantità di umidità che una pianta richiede per non appassire) e “field capacity” (costante idrogeologica di ciascun terreno che ne definisce il contenuto di umidità). Il wilting point è descrittivo dei terreni ai più alti valori di potenziale redox causate da una ossigenazione massimale e aridità severa per le piante (contenuto di acqua del 2.3% e del 1.5% DW per S1 e S2, rispettivamente). Invece la “field capacity” è tipica per le grandi quantità di acqua che possono ritenere i terreni e quindi disponibili per le (contenuto di acqua del 28.0% e del 36.6% DW per S1 e S2 rispettivamente).

La degradazione degli antibiotici in entrambe le situazioni di contenuto di acqua è stata seguita nei terreni dopo la riduzione della attività microbiologica per discriminare il contributo dei fattori abiotici all'intero processo di degradazione; è quindi riportata la persistenza degli antibiotici nei terreni S1 e S2, entrambi non trattati o autoclavati, al wilting point e al field capacity è riportato. Le cinetiche di degradazione nei terreni sono state interpretate, se possibile, usando una legge del primo ordine. (see  $k_{obs}$  and  $t_{1/2}$ , Table 2). Per quelle cinetiche che non hanno seguito il primo ordine, la determinazione del  $t_{1/2}$  è stata fatta con interpolazione visuale dei dati sperimentali.

#### *Wilting point*

Le cinetiche di degradazione di **29** nei terreni non trattati S1 e S2 mantenuti al wilting point hanno seguito una cinetica del primo ordine con un  $t_{1/2}$  di 35.0 e 70.7 d, rispettivamente, come mostrato dai coefficienti di correlazione accettabili ( $R^2 \geq 0.8616$ ). Nei terreni autoclavati, la persistenza di **29** era più alta di quelli non trattati, aspetto imputato alla forte riduzione del contributo microbico che può causare la completa degradazione, con  $t_{1/2}$  leggermente più alti per S1 che per S2 (151.0 e 125.0 d, rispettivamente). Diversamente dalla veloce degradazione di **29** in condizioni alcaline, ( $t_{1/2}$  0.87 d at pH 9, Table 1), il terreno calcareo autoclavato S1 a pH 8.16 è stato in grado di degradare **29** meno rapidamente di quello che è stato osservato nei terreni boscosi acidi autoclavati S2 a pH 5.02. Molto probabilmente, il terreno acido contiene componenti specifici in grado di catalizzare la degradazione di **29**. A questo riguardo, è interessante notare che il terreno S2 è caratterizzato da un maggior contenuto di argilla e carbonio organico totale (TOC), almeno doppio se paragonato a S1: forse questi componenti sono hanno favorito di più la degradazione di **29** rispetto alla catalisi alcalina effettuata dal terreno S1.

La degradazione di **17** nei terreni non trattati al wilting point non ha seguito la cinetica di primo ordine e il suo  $t_{1/2}$  è stato dedotto dalla sua curva di degradazione. La degradazione è stata molto veloce ( $t_{1/2} = 1.7$  e 2.5 d per S1 e S2, rispettivamente), con una persistenza leggermente più bassa in S1 che in S2, come già osservato per **29**. Come previsto, la degradazione di **17** in terreni autoclavati è stata molto più lenta e ha seguito una cinetica del primo ordine ( $R^2 \geq 0.9236$ ) con un  $t_{1/2}$  di 32.2 d nel terreno S1 e 21.7 d in S2; si conferma quindi la più alta attività di degradazione dei  $\beta$  lattami scelti nel terreno acido S1 rispetto al terreno basico S2. In generale, in entrambi i terreni al wilting point, **17** è risultato più degradabile di **29**.

Per quanto riguarda la degradazione della amoxicillina, non è stata osservata alcuna diminuzione della sua concentrazione nelle tre settimane di monitoraggio: questo dimostra come l'amoxicillina sia la molecola  $\beta$  lattamica più persistente tra quelle testate al wilting point.

#### *Field Capacity*

La persistenza di **29** alla field capacity è risultata molto bassa in entrambi i terreni non trattati ( $t_{1/2} = 0.80$  e 1.51 d per S1 e S2, rispettivamente) e autoclavati S1 mentre, nell'autoclavato S2, **29** è stato più persistente ( $t_{1/2}$  of 38.99 d). Ciò dimostra un importante contributo al processo degradativo solo per il terreno acido S2, dovuto alla componente microbiologica a questa water capacity. Al contrario, la bassa persistenza di **29** nei terreni autoclavati calcarei S1 può essere associata alla catalisi basica dello stesso terreno. In paragone al wilting point, i terreni alla field capacity sono risultati più attivi nel degradare **29** indicando che il contenuto acquoso del terreno sembra influenzare notevolmente la degradazione di questo beta lattame; il contributo biotico alla degradazione complessiva appare invece meno importante ad eccezione del terreno acido.

La degradazione di **17** alla field capacity è stata molto veloce in entrambi i suoli calcarei S1 (trattati e autoclavati, con  $t_{1/2} = 0.13$  e 0.79 d, rispettivamente) e suoli boscosi S2 (trattati e autoclavati con  $t_{1/2} = 1.77$  e 3.44 d, rispettivamente). Paragonando questi risultati con quelli ottenuti al wilting point, è chiaro che il contributo abiotico alla degradazione complessiva sia più rilevante a terreni con contenuto di acqua

maggiore. Alla field capacity, il contributo biotico e abiotico alla degradazione complessiva è risultato simile.

La persistenza della amoxicillina nei terreni non trattati e autoclavati alla field capacity è risultata molto bassa con  $t_{1/2}$  nel range 0.43-1.74 d. Sfortunatamente, in letteratura non sono presenti dati relativi alla persistenza e/o degradazione della amoxicillina nei terreni.

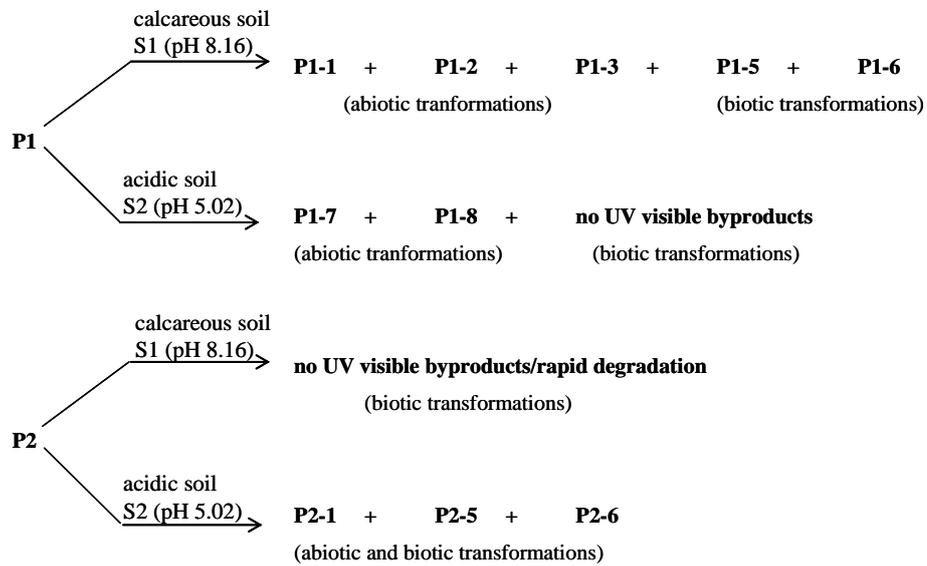
I due prodotti di degradazione di **29** nel suolo calcareo S1 al wilting point sono stati osservati e identificati come **29-A** e **29-C** in base ai tempi di ritenzione all'HPLC, UV e massa (gli stessi prodotti sono stati già trovati in nei suoli alcalini, schema 2). La formazione di questi prodotti può essere sicuramente associata al pH alcalino del suolo S1, essendo loro presenti nei suoli autoclavati. Alla "field capacity" si è osservata subito la formazione di **29-B** e **29-C** nel primo giorno, mentre al secondo giorno si è osservata la presenza di **29-C** all'UV. Sono inoltre stati trovati due sottoprodotti di degradazione chiamati **29-E** ( $\lambda_{max}$  243 nm) e **29-6** ( $\lambda_{max}$  287 nm) non identificabili nemmeno tramite il loro pattern di massa nei terreni non trattati S1 al punto di wilting; si ipotizza una degradazione di natura biologica. Al "field capacity" non è stato trovato alcun prodotto corrispondente a **29**; anche in questo caso si ipotizzano degradazioni di origine microbiologica.

Nel suolo acido S2, non sono stati trovati prodotti di degradazione UV-visibili legati a **29** nè al punto di wilting nè al field capacity. Nonostante tutto, osservando il trend di degradazione del prodotto **29**, è chiaro come sia molto importante il meccanismo biotico di degradazione, mentre le componenti abiotiche sono di una certa importanza solo al "field capacity". Solo nei suoli autoclavati al wilting point, sono stati trovati due sottoprodotti: **29-7** ( $\lambda_{max}$  277 nm) e **29-8** ( $\lambda_{max}$  283 nm), la cui struttura non è stata identificata. La loro assenza nei suoli non trattati può essere indicativa di: i) alta degradabilità in presenza di microorganismi e/o 2) cammini di degradazione alternativi di natura abiotica.

Per quanto riguarda la degradazione di **17** nei suoli calcarei, nonostante la sua scarsa persistenza, ( $t_{1/2}$  0.13-1.77 d), non sono stati trovati sottoprodotti visibili all'UV, molto probabilmente per via delle trasformazioni abiotiche e biotiche molto veloci. Nel suolo boscoso acido, **17-1** è stato trovato da subito assieme a due nuovi sottoprodotti: **17-5** ( $\lambda_{max}$  275 nm) e **17-6** ( $\lambda_{max}$  215 nm). Tutti e 3 i prodotti sono stati trovati anche nei suoli autoclavati e quindi la loro formazione può essere tranquillamente associata a processi del terreno dal punto di vista abiotico. As the presence of all three byproducts was observed also in the autoclaved soil, their formation can be safely ascribed to abiotic processes active in this soil.

Tabella 5

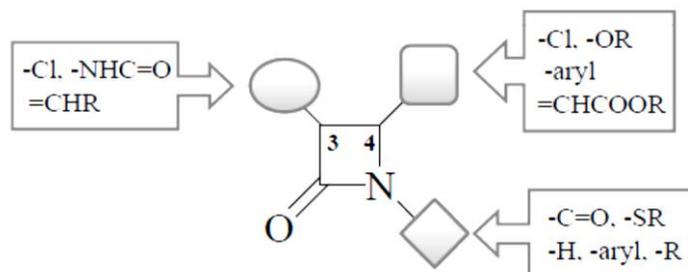
29						
Soil sample	Wilting point			Field capacity		
	$K_{obs}$ (d <sup>-1</sup> )	$T_{1/2}$ (d)	R <sup>2</sup>	$K_{obs}$ (d <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (d)	R <sup>2</sup>
Untreated S1	0.0201 (0.0035)	35.0 (6.2)	0.9779	0.8653 (0.0067)	0.80 (0.01)	0.9941
Autoclaved S1	0.0046 (0.0003)	151.0 (9.3)	0.9487	-	20.52 (0.22)*	
Untreated S2	0.0100 (0.0019)	70.7 (14.0)	0.9772	0.4582 (0.0087)	1.51 (0.03)	0.9192
Autoclaved S2	0.0055 (0.0021)	125.0 (4.8)	0.8616	0.0178 (0.0016)	38.99 (3.55)	0.9908
17						
Untreated S1	-	1.7*	-	5.4610 (0.4059)	0.13 (0.09)	0.9352
Autoclaved S1	0.0215 (0.0021)	32.2 (5.0)	0.9236	0.879 (0.0082)	0.79 (0.01)	0.9498
Untreated S2	-	2.5*	-	0.3927 (0.0062)	1.77 (0.03)	0.9682
Autoclaved S2	0.03195 (0.0022)	21.7 (1.5)	0.9547	0.2050 (0.014)	3.40 (0.24)	0.9880
Amoxicillin						
Untreated S1	n.a.	n.a.	n.a.	1.6046 (0.1485)	0.43 (0.04)	0.9951
Autoclaved S1	n.a.	n.a.	n.a.	0.4101 (0.0953)	1.74 (0.40)	0.9924
Untreated S2	n.a.	n.a.	n.a.	1.2184 (0.0045)	0.57 (0.00)	0.9906
Autoclaved S2	n.a.	n.a.	n.a.	1.4229 (0.0262)	0.49 (0.01)	0.9923



Patway di degradazione nei suoli

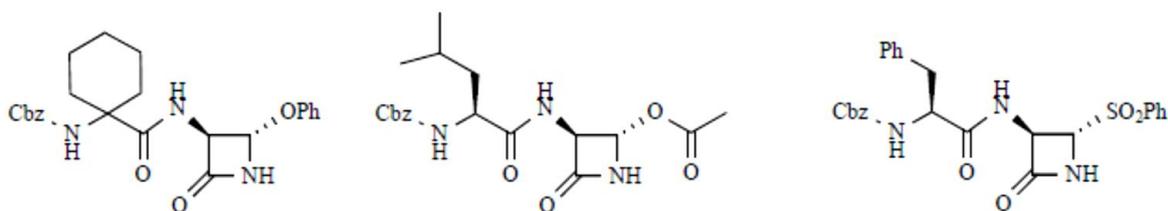
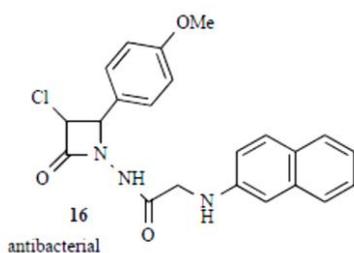
### 1.3 L'anello $\beta$ lattamico nelle molecole biologicamente attive: Inibitore enzimatico e altre attività

L'anello  $\beta$  lattamico soprattutto di specie monocicliche, come si è cominciato ad osservare negli ultimi 20 anni, se opportunamente derivatizzato si è dimostrato essere un farmacoforo in grado di dirigere l'attività biologica verso target diversi e assumere proprietà e funzionalità completamente nuove.



In particolare sono stati sintetizzati diversi  $\beta$  lattami in grado di fungere da inibitori enzimatici per serino-proteasi (l'elastasi leucocitica umana (HLE), l'antigene specifico della prostata, trombina,  $\alpha$ -chymotripsina e  $\gamma$ -amminoacidi transferasi) cui si sommano, altre strutture da utilizzare per la terapia della tubercolosi, del cancro e anche come antiinfiammatori.

Sono uscite diverse review che riassumono le innumerevoli attività biologiche di queste molecole ed è spesso difficile elencarle in maniera razionale. Una recente review<sup>63</sup> riassume l'attività biologica di questi substrati con una chiave di lettura associata alla struttura chimica; elencherò brevemente le strutture  $\beta$  lattamiche più significative. Tra le strutture più famose ci sono di sicuro i derivati alogenati, tra cui i 3 e i 4 cloro monobattami. I 3-cloro vengono facilmente ottenuti tramite reazione di Staudinger<sup>64</sup> e costruiscono una numerosa famiglia di derivati antibatterici, antifungali e antifilarici. Molto attivi come antibatterici sono risultati gli *N*-idrazino derivati,<sup>65</sup> in cui risulta importante per l'attività la presenza di un gruppo elettron attrattore. I 4 cloro monobattami<sup>66</sup> vengono normalmente ottenuti tramite degradazione della penicilline,



con l'apertura dell'anello biciclico e sostituzione dello zolfo con cloro grazie ad agenti clorinanti. Un'altra classe derivante da penicilline e/o cefalosporine è quella dei 3 ammino derivati.<sup>67</sup> Questi derivati sono risultati quasi tutti essere degli antiproteasici. Le prime due molecole qui rappresentate inibiscono la Catepsina K, una cisteino-proteasi, trovata essere sovraespressa soprattutto negli osteoclasti. L'ultima molecola risulta invece essere inibitrice di un'altra cisteino-proteasi, la papaina. I 3 e i 4 alchilidene  $\beta$  lattami, rappresentano strutture in cui sul C3 o sul C4 è presente un doppio legame. La classe dei 4 alchilidene è stata

<sup>63</sup> P. Galletti\* and D. Giacomini, *Current Medicinal Chemistry*, **2011**, *18*, 4265-4283

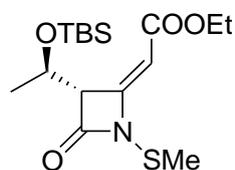
<sup>64</sup> Staudinger, H. Zur Kenntniss der Ketene. Diphenylketen. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1907**, *356*, 51-123

<sup>65</sup> Mishra, S. K.; Mishra, P.; Gupta, C.P.; Kannoja, P.; Garud, N.; Tomar, V., *J. Pharm. Res.*, **2010**, *3*(4), 900-905

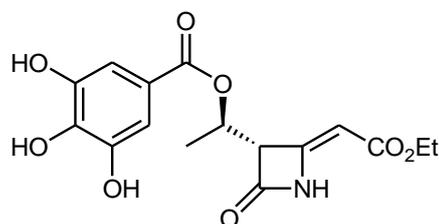
<sup>66</sup> Ceri, H.; Hindler-Kulyk, M.; Kovačević, M.; Peri, M.; Ivkovi, A., *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3053-3058

<sup>67</sup> a) Setti, E.L.; Davis, D.; Chung, T.; Mc Carter, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2051-2053; b) Setti, E.L.; Davis, D.; Janc, J.W.; Jeffery, D.A.; Cheung, H.; Yu, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 1529-1534; c) Zhou, N.E.; Guo, D.; Thomas, G.; Reddy, A.V.N.; Kaleta, J.; Purisima, E.; Menard, R.; Micetich, R.G.; Singh, R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 139-141.

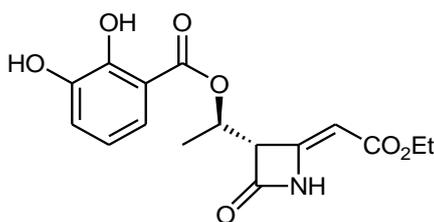
studiata molto dal mio gruppo di ricerca, osservando una moltitudine di attività biologiche. Questa classe di molecole viene facilmente sintetizzata tramite un protocollo messo a punto dal gruppo di ricerca in cui ho svolto la mia tesi di dottorato, come ho già affermato in precedenza.



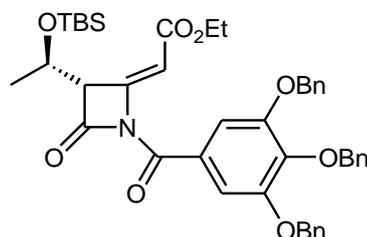
MRSA A931 MIC: 8  
MSSA A625 MIC: 4



MetalloMatrix  
Protease-2 Protease-9  
IC<sub>50</sub> 70 μM IC<sub>50</sub> 50 μM

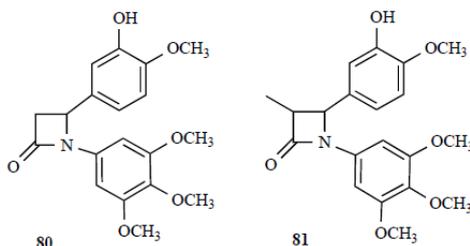


Antioxidant Activity  
Rac: 0.23 μM TEAC: 1.76 nM  
15% ROS inhibition at 10 μM  
on mioblast H9c2 cells



Human Leucocyte Elastase  
IC<sub>50</sub> 0.5 μM

Oltre all'attività antibiotica e l'attività antiossidante che abbiamo già descritto in precedenza queste molecole sono risultate attive come inibitori enzimatici. Sono risultati inibitori di metallo proteasi di matrice, proteine che risultano coinvolte in numerosi processi di rimodellamento tissutale associati alla crescita ed allo sviluppo e in varie patologie; in particolare provocano l'inibizione dei fattori di crescita autologhi, provocando un rallentamento oppure un blocco della riparazione dei tessuti lesionati. Ma i 4 alchilideni, se *N*-acilati, sono risultati attivi sulla Elastasi Leucocitaria Umana (HLE), un insieme di serino proteasi espresse da leucociti polimorfici, in particolare neutrofili, che a livello intracellulare agiscono uccidendo i patogeni e a livello extracellulare si comportano invece da mediatori della coagulazione e riparazione delle ferite.



Un'altra classe molto importante è sicuramente quella degli *N*-Arl, C4-Arl monobattami.<sup>68</sup> Tra i più famosi vi sono questi derivati, risultati particolarmente attivi nell'inibire la crescita di cellule di cancro al seno a concentrazione nanomolare. La prima molecola è in grado di bloccare queste cellule nella fase G2/M e inibire la polimerizzazione della tubulina con grande efficacia, simile a quella della Combretastatina

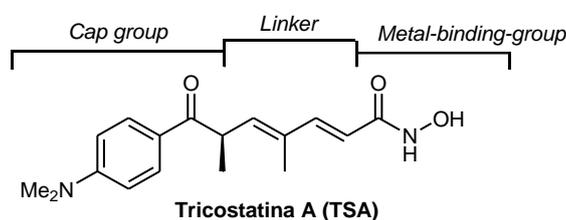
<sup>68</sup> Carr, M.; Greene, L.M.; Knox, A.J.S.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J., *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 5752-5766

## $\beta$ lattami come inibitori di HDAC<sup>69</sup>

L'unicità farmacoforica dell'anello  $\beta$  lattamico lo ha portato anche ad essere studiato come inibitore enzimatico di Histone Deacetylases (HDACs).<sup>70</sup> Gli enzimi HDACs (istoni deacetilasi), insieme con i rispettivi antagonisti HATs (istone acetiltransferasi), ricoprono un ruolo fondamentale nell'equilibrio dello stato acetilato/deacetilato degli istoni, unità proteiche presenti nella cromatina delle cellule eucariote. Gli istoni sono responsabili della regolazione di importanti fenomeni come l'espressione dei geni e l'assemblaggio della cromatina; lo stato acetilato di tali residui provoca un rilassamento della cromatina, aumentando l'accessibilità dei fattori di trascrizione verso i loro geni target,<sup>71</sup> mentre, la deacetilazione determina un impaccamento della cromatina ed una conseguente repressione trascrizionale.<sup>72</sup> Sono stati scoperti 18 diversi istoni-deacetilasi nell'uomo, raggruppabili in quattro famiglie. In particolare, 11 HDAC operano attraverso un meccanismo zinco-dipendente: la I classe (HDAC1, -2, -3 and -8), la II classe (HDAC4, -5, -6, -7, 9, -10) e la IV classe (HDAC11); la III classe, invece, adopera NAD<sup>+</sup> come cofattore. La I e la IV classe di HDACs sono espressi ubiquitariamente in particolar modo nel nucleo e sono correlati a processi di trascrizione o co-repressione della proliferazione e sopravvivenza delle cellule.<sup>73</sup>

Ad oggi sono state riconosciute agli inibitori HDAC importanti proprietà come agenti capaci di modificare la trascrizione genetica, di inibire la proliferazione e di indurre direttamente l'apoptosi di cellule tumorali, sono anti-angiogenici, molti inibitori HDAC, infatti, sono in grado di diminuire o bloccare la formazione di geni angiogenici, anti-invasivi ed immunomodulatori sia *in vitro* che *in vivo*.<sup>74</sup> Da diverse ricerche è emerso che gli inibitori di HDAC sembrano influire su diversi tipi di tumori sia solidi che ematici, fra cui il neuroblastoma, melanoma, leucemie, cancro della mammella, della prostata, dei polmoni, delle ovaie e del colon. Inoltre, sono in grado di interferire con la differenziazione di cellule endoteliali progenitrici.<sup>75</sup>

La determinazione delle interazioni tra gli inibitori ed il sito attivo dell'enzima ha permesso di identificare il modello farmacoforico di un inibitore HDAC prendendo come riferimento la TSA (inibitore di HDACs 1, 3, 4, 6 e 10 con valori di  $IC_{50}$  attorno ai 20 nM). Gli inibitori HDAC sono tipicamente costituiti da un "capping group" che interagisce con i residui ammino acidici presenti all'entrata del sito attivo, da uno "zinc-binding-group" (ZBG) fondamentale per la coordinazione dell'atomo di zinco presente nel sito attivo e un "linker", uno spaziatore di opportuna lunghezza capace di posizionare lo ZBG in un canale idrofobico ed il cap nella giusta posizione.



Il mio gruppo di ricerca si è occupato recentemente della sintesi di derivati monobattamici mimanti la struttura del SAHA (o Vorinostat) dei quali si è valutata l'attività come specifici inibitori di HDAC8 e HDAC6. L'obiettivo era quello di sfruttare l'anello  $\beta$  lattamico come ZBG, viste le proprietà complessanti dell'anello e in particolare si è osservato che la selettività verso una isoforma o l'altra era particolarmente dipendente dalla natura del sostituente sull'azoto  $\beta$  lattamico.

<sup>69</sup> C. Ventrici, Progettazione e sintesi di nuovi intermedi azetidionici, *TESI DI DOTTORATO*, 2009.

<sup>70</sup> S. Oha and J.-C. Jung, *Z. Naturforsch., B: J. Chem. Sci.*, **2007**, 62b, 1459–1464

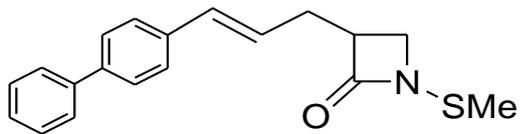
<sup>71</sup> Shahbazian, M. D. and Grunstein, M. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, 76, 75-100

<sup>72</sup> a) Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. and Allis, C. D. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 8, 983-994; b) V.G. Allfrey, R. Faulkner, A.E. Mirsky *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1964**, 51, 786-794.

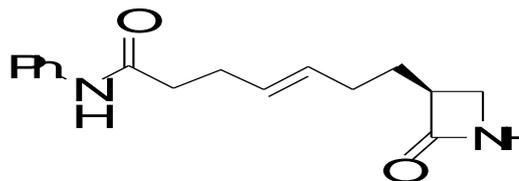
<sup>73</sup> I. Gregoretto, Y.-M. Lee and H. V. Goodson, *J. Mol. Biol.*, **2004**, 338, 17

<sup>74</sup> a) J. Arts, P. Angibaud, A. Marien, W. Floren, B. Janssens, P. King, J. Van Dun, L. Janssen, T. Geerts, R. W. Tuman, D. L. Johnson, L. Andries, M. Jung, M. Janico and K. Van Emelen. *Br. J. Cancer*, **2007**, 97, 1344; b) Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 4389-4394

<sup>75</sup> Qian, D. Z. *et al. Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 634-642.



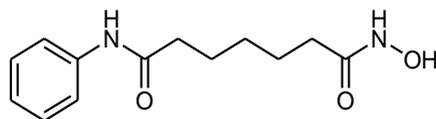
HDAC8 >1000  $\mu\text{M}$   
HDAC6 30.9  $\mu\text{M}$



HDAC8 >64  $\mu\text{M}$   
HDAC6 > 1000  $\mu\text{M}$

I risultati ottenuti sull'interazione selettiva con queste HDAC ci ha portato a progettare strutture monobattamiche in grado di avere effetto sul processo di differenziamento cellulare, aspetto strettamente connesso alla stessa attività delle HDAC.

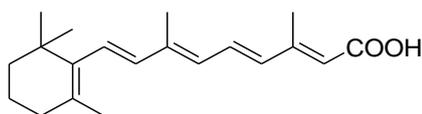
Il differenziamento indica la maturazione di una cellula o di un tessuto da una forma primitiva o indifferenziata a una forma matura o differenziata, con funzioni specializzate; è un processo che le cellule di un organismo pluricellulare complesso subiscono per ripartirsi i compiti. Le molecole note per avere un effetto diretto e importante sul differenziamento cellulare sono i retinoidi, molecole che regolano processi chiave correlati alla vita modulando l'espressione dei geni a livello della proliferazione, migrazione, differenziazione e apoptosi cellulare mediante meccanismi ancora oggi in gran parte sconosciuti.<sup>76</sup> Ma questi derivati sono anche cofattori fondamentali del meccanismo della visione, oltre che coinvolti nella



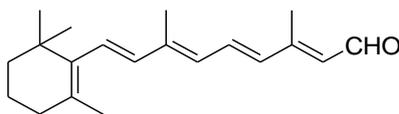
**Vorinostat (SAHA)**

regolazione e riparazione delle cellule epiteliali del derma.

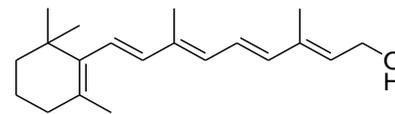
Dal punto di vista strutturale i retinoidi sono tutte quelle molecole riconducibili alla vitamina A (acido retinoico, retinale e retinolo) e al suo scheletro. Sono tutte molecole altamente lipofile e idrofobe dalla struttura polienica coniugata caratterizzate da un'estremità ciclica apolare e un'altra polare. In ambito chimico e farmaceutico sono note 3 generazioni di retinoidi.



Acido Retinoico



Retinale



Retinolo

La prima e la seconda generazione sono molecole molto abili a legare i recettori nucleari retinoici, mentre la terza generazione risulta essere più specifica verso alcune classi di recettori. La seconda e la terza generazione è rappresentata da retinoidi di sintesi sviluppati soprattutto in relazione a problemi della pelle, da semplici irritazioni al cancro, all'invecchiamento.

Il retinoide più importante è sicuramente l'acido retinoico. Gli effetti dell'acido retinoico sono mediati dall'eterodimerizzazione dei RAR (Retinoic Acid Receptor) nucleari, una famiglia di fattori di trascrizione ligando-dipendenti, e dai RXR (Retinoid X Receptors).<sup>77</sup>

Inoltre, i retinoidi in generale sono noti per attivare/inibire la cascata MAPK (Mitogen-activated protein kinases), meccanismo coinvolto nell'arresto della crescita e della proliferazione cellulare. Inoltre alcuni derivati retinoici sintetici sono anche in grado di esercitare effetti di differenziazione piuttosto che fenomeni

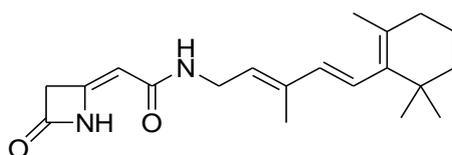
<sup>76</sup> a) Farooqui A.A., Antony P., Hong W.Y., Horrocks L.A., Freys L. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004, **45**, 179-195; b) Tsai F.M., Shyu R.Y., Lin S.C., Wu C.C., Jiang S.Y., *BMC Cell Biol*, 2009,10-15; c) Ueki S., Mahemuti G., Oyamada H., Kato H., Kihara J., Tanabe M., Ito W., Chiba T., Takeda M., Kayaba H., Chihara J. *J Immunol* 2008,**181**,7689-7698.

<sup>77</sup> Mangelsdorf D.J., Evans R.M., *Cell*, 1995 **83**, 841-850

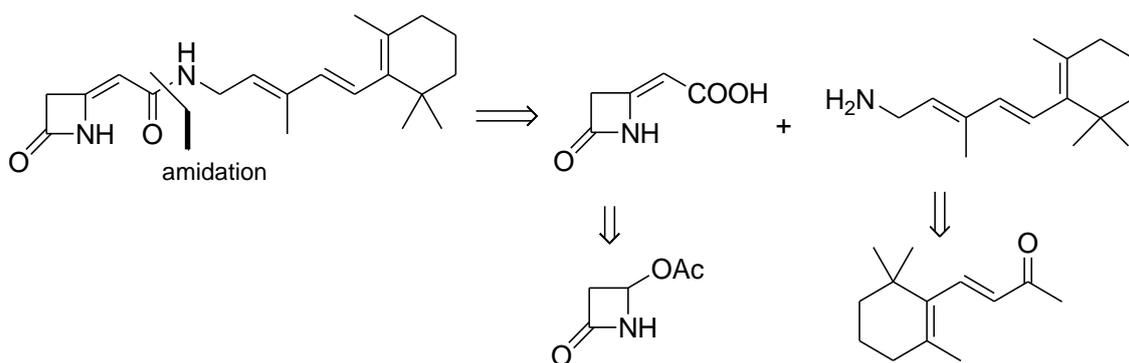
di apoptosi, bloccando lo sviluppo di tumori in linee cellulari cancerose.<sup>78</sup> Proprio per questo alcuni retinoici sono usati anche già adesso come potenziali chemioterapici nel trattamento di numerosi classi di cancro (neuroblastoma, cancro al seno, ai polmoni, rabdomiosarcoma e molti altri).<sup>79</sup>

### 2.3.1 Sintesi e attività di un nuovo ibrido $\beta$ lattame-retinoide

Vista l'importanza dei derivati retinoici nei meccanismi che regolano i processi fondamentali della cellula e la capacità dell'anello  $\beta$  lattamico di interagire con le HDAC, proteine strettamente connesse a questo fenomeno, è stata progettata e messa a punto una sintesi di un ibrido retinoide/ $\beta$ -lattame valutando successivamente la gli effetti di differenziazione su linee cellulari tumorali di neuroblastoma SH-SY5Y. E' in primo luogo importante ricordare che il solo acido retinoico, su queste cellule neurali, porta alla formazione di collegamenti di natura pseudoassonica tra le varie cellule.<sup>80</sup>



Lo scheletro di questa molecola è quello dei 4 alchilidene che come si è visto in precedenza hanno mostrato interessanti attività biologica sia come antibiotici che come inibitori enzimatici. La strategia utilizzata per la sintesi, come si osserva nel seguente schema retrosintetico, consiste in un coupling ammidico tra il l'acido carbossilico del 4 alchilidene  $\beta$  lattame e l'ammina retinoica.



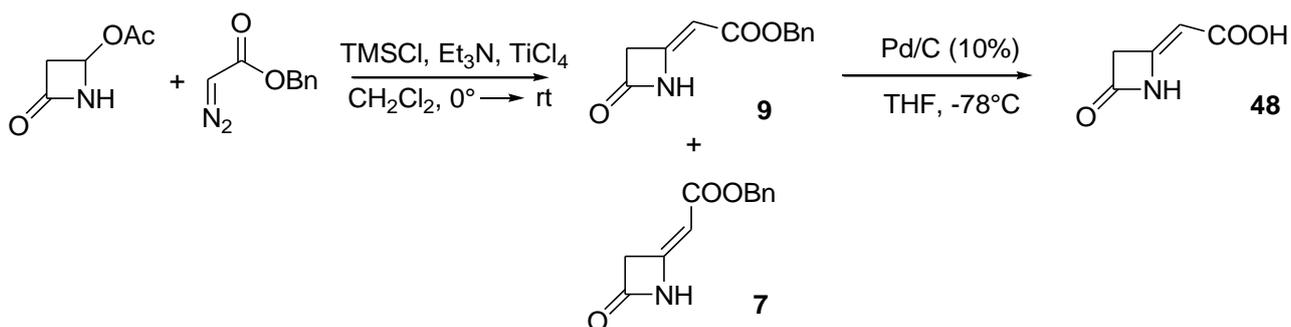
### Sintesi del $\beta$ lattame

I 4 alchilidene 2 azetidioni vengono sintetizzati tramite protocollo noto e sviluppato nel nostro laboratorio a partire dai 4-acetossi azetidioni commerciali e diazoesteri in presenza di un acido di Lewis.

<sup>78</sup> a) Meister B., Fink F.M., Hittmair A., Marth C., Widschwendter M., *Anticancer Res*, 1998, **18**, 1777-1786; b) Maurer B. J., Metelitsa L.S., Seeger R.C., Cabott M.C., Reynolds C.P., *J Natl Cancer Inst*, 1999, **91**, 1138-1146

<sup>79</sup> a) Sabichi A.L., Modiano M.R., Lee J.J., Peng Y.M., Xu M.J., Villar H., *Clin Cancer Res* 2003 **9** 2400-2405; b) Garaventa A., Luksch R., Lo Piccolo M.S., Cavadini E., Montaldo P.G., Pizzitola M.R., *Clin Cancer Res* 2003, **9**, 2032-2039; c) Lotan R., *J Natl Cancer Inst*, 1995, **87**, 1655-1657; d) Hansen L.A., Sigman C.C., Andreola F., Ross S.A., Kelloff G.J., De Luca L.M., *Carcinogenesis*. 2000, **7**, 1271-1279

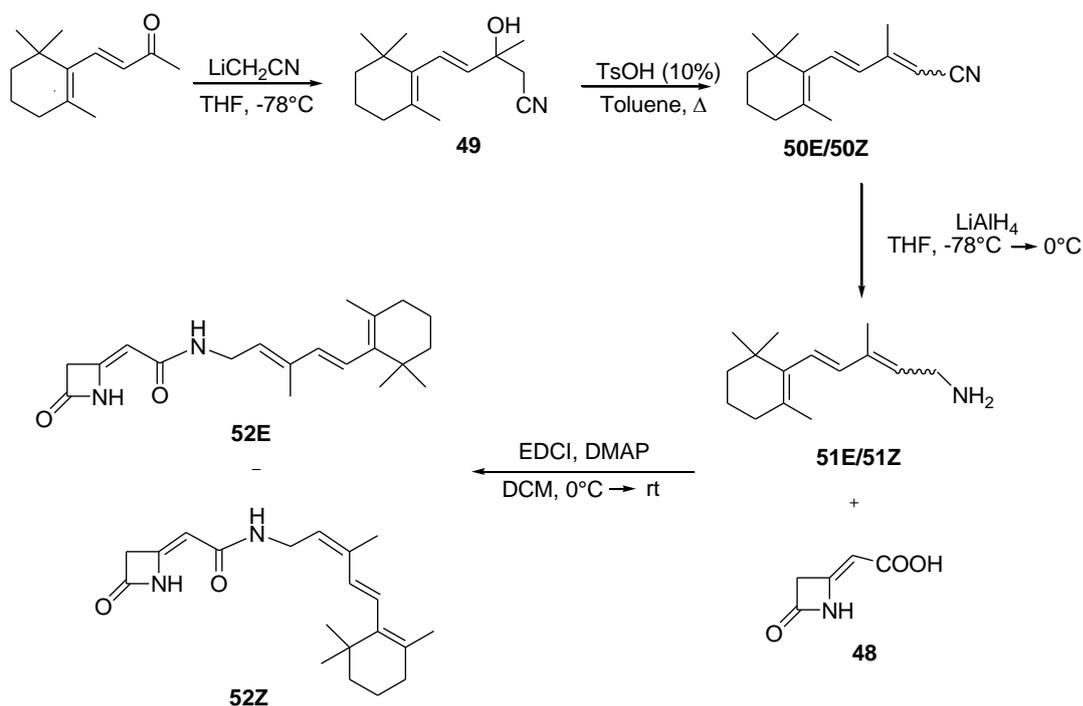
<sup>80</sup> T. Sakuma, K. Uzawa, T. Onda, M. Shiiba, H. Yokoe, T. Shibahara, H. Tanzawa, Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma, *Int. J. Oncol.* 29 (2006) 117-124



Il 4-alchilidene viene ottenuto con una resa del 43% in un rapporto diastereomerico *E/Z* di 41/59 utilizzando benzildiazoacetato e  $\text{TiCl}_4$  come acido di Lewis. Per la sintesi siamo interessati al solo  $\beta$  lattame in conformazione *Z*, il quale si separa facilmente tramite flash cromatografia. Si procede poi all'idrogenolisi con Palladio su Carbone in una miscela 1:1 THF-metanolo ottenendo il  $\beta$  lattame 4 alchilidene acido carbossilico (**48**). E' interessante notare come questa procedura di idrogenolisi non porti alla riduzione del doppio legame.

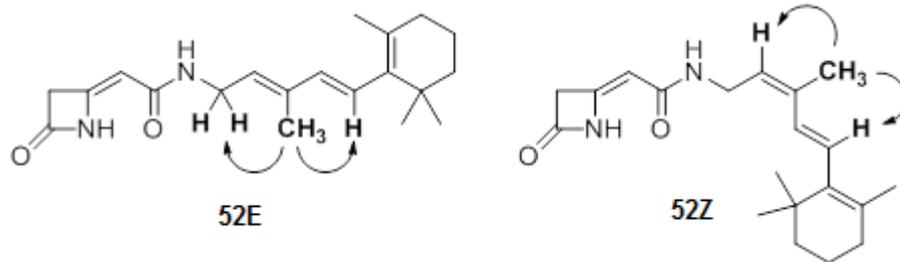
#### Sintesi del retinoide

L'ammina retinoica viene ottenuta facilmente in 3 step partendo dal  $\beta$  ionone, un substrato chetonico commercialmente disponibile. Il primo step corrisponde alla addizione di Litioacetonitrile in THF a  $-78^\circ$  e alla sintesi dell'alcol terziario **49**. Si effettua poi la disidratazione dell'alcol in toluene utilizzando acido *p*-toluen solfonico in quantità catalitica, ottenendo una miscela *cis/trans* del nitrile insaturo.



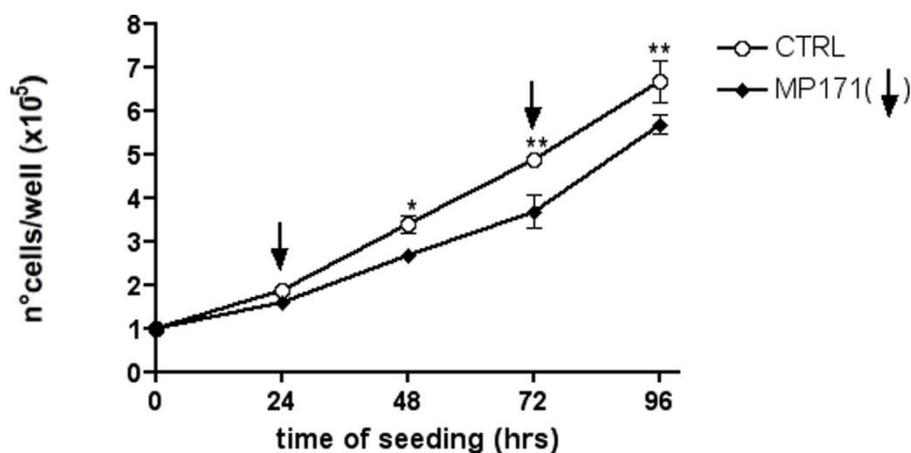
La reazione di disidratazione è risultato essere il passaggio più delicato, strettamente legato alla quantità di acido paratoluensolfonico utilizzato. Quantità maggiori di acido possono portare alla formazione di isomeri e/o a decomposizione dell'acido di partenza. La miscela *E/Z* del nitrile **50** viene poi ridotta all'ammina **51** con  $\text{LiAlH}_4$ ; l'ammina retinoica in miscela *E/Z* così ottenuta viene utilizzata nel successivo processo di coupling senza la separazione dei due diastereoisomeri.

Il processo di coupling tra il  $\beta$  lattame **48** e l'ammina **51** viene svolto facilmente in DCM utilizzando EDCI come attivatore e DMAP in quantità stechiometrica come base. La miscela *E/Z* dei due  $\beta$  lattami **52** viene poi facilmente separata tramite flash cromatografia e le configurazioni assegnati tramite analisi NOE1D.



### Test di proliferazione

I test biologici sono stati effettuati sulla molecola **52E** e sul seguente *N*-tiometil  $\beta$  lattame **MP171** (già precedentemente sintetizzata dal mio gruppo di ricerca e testata), inibitore selettivo in vitro di HDAC8, istone deacetilasi strettamente correlata al neuroblastoma. In particolare l'espressione dell'HDAC8 (class I member) è stata correlate scarsamente con il neuroblastoma,<sup>81</sup> ma in linee cellulari di neuroblastoma gli inibitori selettivi di HDAC8 inducono la differenziazione e l'arresto della proliferazione.<sup>82</sup>



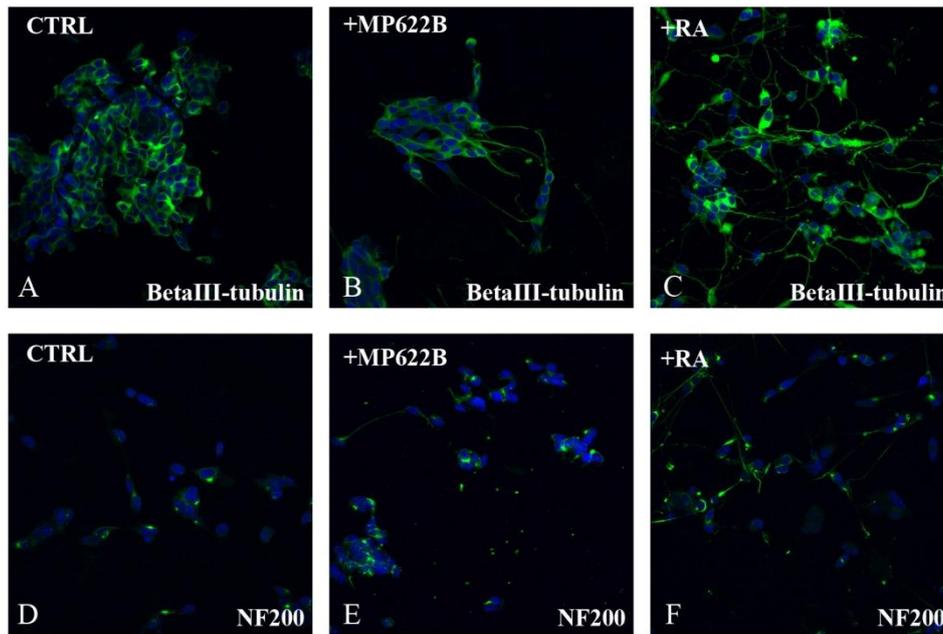
Gli effetti del  $\beta$ -Lattame **MP171** sulla crescita della linea SH-SY5Y. La velocità di crescita cellulare è stata verificata come numero di cellule totali. Le cellule sono state incubate in presenza di **MP171** a concentrazione 7.5 uM e contate alle ore 24,48,72,96.

Le cellule SH-SY5Y sono state esposte per 24, 48, 72 e 96 ore all'*N*-tiometil  $\beta$  lattame (ad una concentrazione inferiore a quella che risulta citotossica) e contate quotidianamente, in modo da costruire un grafico in cui il numero delle cellule viene messo in relazione al tempo di esposizione. Dopo 24 ore di contatto delle cellule, si osserva una riduzione nella proliferazione cellulare per ogni tempo osservato, rispetto al controllo. Anche se la riduzione è stabile, non si hanno grandi effetti sulla proliferazione raddoppiando il tempo di esposizione dopo 24 ore. ( $Td_{CTRL}=39$ . hrs;  $Td_{M2971}= 38.7$  hrs).

Essendo queste cellule derivanti dal neuroblastoma, la linea SH-SY5Y tende spesso a differenziare tramite una reticolazione di natura neurale. L'acido retinoico (RA) è un potente differenziante causando l'inibizione della crescita della cellula, l'allungamento del neurita e la ramificazione. Il trattamento delle cellule con acido retinoico per 6 giorni induce infatti una differenziazione di natura neurale, come mostrato con tubulina-Bill e neurites outgrowth. Paragonando questo effetto a quello ottenuto con il  $\beta$ -lattame 52E non si osserva lo stesso allungamento dei neuriti e lo stesso livello di ramificazione. La marcatura con NF-200 non mostra alcun visibile effetto di differenziamento, mentre la tubulina-Bill mostra in effetti un cambiamento nella morfologia che può indicare un possibile effetto di differenziazione.

<sup>81</sup> S. Balasubramanian, J. Ramos, W. Luo, M. Sirisawad, E. Verner, J.J. Buggy, , Leukemia (2008)

<sup>82</sup> Oehme I., Deubzer E., Wegener D., Pickert D., Linke J.P., Hero B., Kopp-Schneider A., Westermann F., Ulrich S.M., von Deimling A., Fischer M., Witt O. Clin. Cancer Res. (2009)



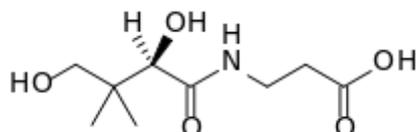
Gli effetti del  $\beta$  lattame **52E** sul “network” citoscheletrico delle cellule SH-SY5Y. Le cellule sono state trattate per 6 giorni con **52E** 10 uMolare e RA 10 uMolare e fissate per verificarne l’immunofluorescenza. La BIII-tubulin (A-C) e I neurofilamenti (D-F) sono stati utilizzati per investigare un possibile microtubulo e filamenti di riarrangiamento intermedio. Il trattamento con l’azetininone **52E** (B, E) induce un piccolo effetto differenziativo, ma ancora minimale se paragonato all’acido retinoico.

## 1.4 L'anello $\beta$ lattamico come sintone: sintesi di $\beta$ amminoacidi<sup>69</sup>

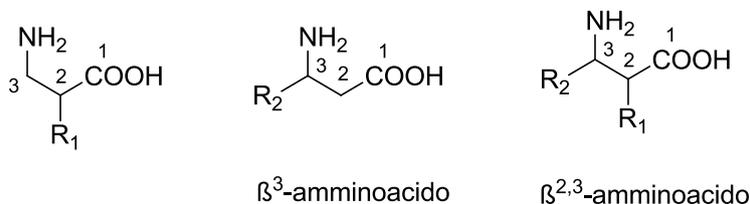
I  $\beta$  lattami, come abbiamo visto, sono molecole importanti in ambito biologico. Essi però possono essere considerati non solo il punto di arrivo ma anche il punto di partenza per la sintesi di molecole più complesse contenenti azoto. Questo concetto è stato ribadito da Ojima, che ha definito il  $\beta$  lattame come sintone,<sup>83</sup> cioè come precursore di altre molecole dotate di un certo interesse.

La natura del  $\beta$ -lattame lo porta ad essere il precursore ideale dei  $\beta$ -amminoacidi: l'anello 2 azetidionico può essere infatti visto come un  $\beta$  amminoacido in cui il gruppo carbossilico e amminico sono simultaneamente protetti.

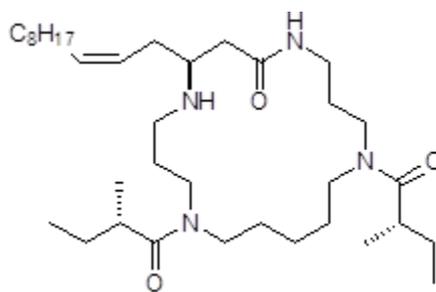
I  $\beta$ -amminoacidi sono molecole naturali molto meno abbondanti dei più comuni  $\alpha$ -amminoacidi e sono presenti in strutture peptidiche ma anche in composti naturali tra cui ad esempio l'acido pantotenico (vitamina B5), il quale contiene una  $\beta$  alanina condensata all'acido pantoico.



In termini di struttura possono essere classificati come  $\beta^2$ -amminoacidi,  $\beta^3$ -amminoacidi e  $\beta^{2,3}$ -amminoacidi in funzione della sostituzione in posizione  $\alpha$  e  $\beta$ .



Il fatto che  $\beta$  amminoacidi siano molecole dotate di grande interesse è da ricercarsi nella loro attività biologica di inibitori enzimatici ed agenti antibatterici<sup>84</sup>, ma, soprattutto, nel loro impiego come building blocks per la sintesi di numerosi derivati naturali e non biologicamente attivi. Alcuni esempi sono la Lipogrammistina A<sup>85</sup>, tossina ittica sintetizzabile a partire dalla  $\beta$  alanina.



Un Schmigbaur<sup>86</sup>, riporta una sintesi cui l'acido  $\beta$ -glutammico viene utilizzato come chelante di  $Mg^{2+}$  ai fini di determinare il meccanismo di azione, a livello molecolare, dei sali di  $Mg^{2+}$ , cofattori di diversi enzimi implicati nella biochimica degli acidi nucleici.

Vista l'importanza sintetica dei  $\beta$  amminoacidi, sono numerose le strategie chimiche e biocatalitiche esplorate per il loro ottenimento, con l'obiettivo di ottenerli in forma enantiomericamente pure. In letteratura sono state esplorate molte metodologie in cui il  $\beta$  lattame è il building block per la sintesi. Sono però note molte strategie di natura biocatalitica che spesso si avvalgono del fenomeno della risoluzione cinetica per opera di idrolasi e/o esterasi.

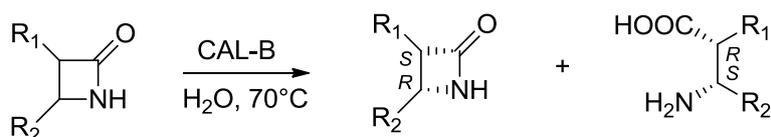
<sup>83</sup> Ojima, I. *Adv. Asym. Synth.* **1995**, *1*, 95

<sup>84</sup> Fulop, F., *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2181-2204.

<sup>85</sup> Fujiwara, Akiko; Kan, Toshiyuki; Fukuyama, Tohru. *Synlett* **2000**, *11*, 1667-1669.

<sup>86</sup> F. Wiesbrock, S. Nogai, A. Schier, and H. Schmidbaur, *Helvetica Chimica Acta*, **2002**, *85*, 1151-1157.

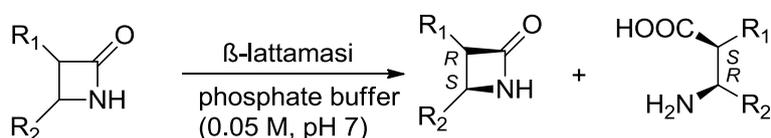
Forrò riporta una reazione di idrolisi stereoselettiva catalizzata dall'enzima CAL-B, una esterasi e la sua selettività.



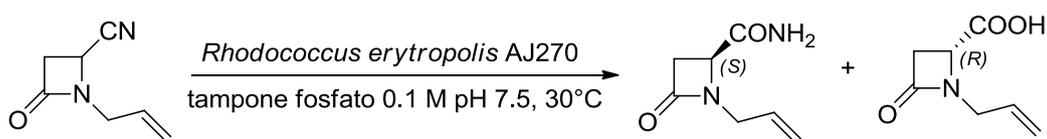
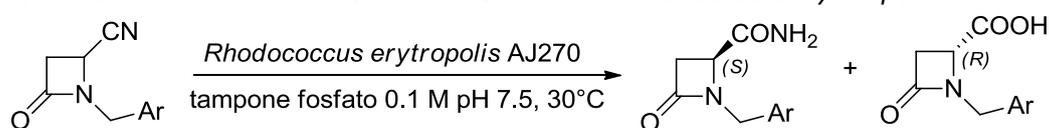
I recenti studi di Forrò hanno dimostrato che due fattori sono importanti per il controllo dell'enantioselettività:

- la temperatura: la reazione deve essere condotta ad elevate temperature (tra i 60°C ed i 70°C)
- l'attività dell'acqua: quando si lavora in solventi organici assoluti l'acqua presente, od addizionata, funge da nucleofilo e quindi influenza la reattività del sistema ed in questo caso un elevato contenuto di acqua riduce sia l'enantioselettività sia la conversione, per questo spesso se ne utilizza 1 equivalente.

Un'altra classe di enzimi utilizzati sono le  $\beta$ -lattamasi. Malgrado il loro impatto negativo sulle terapie con antibiotici  $\beta$ -lattamici, esse sono state usate con successo in risoluzione cinetica di  $\beta$ -lattamici aliciclici utilizzando in questo caso microorganismi della specie *Rhodococcus*.<sup>87</sup>

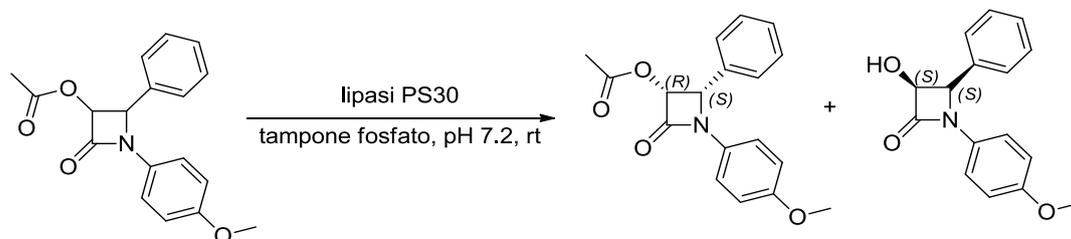


Dong-Hui Leng<sup>88</sup> hanno ottenuto un'ottima risoluzione cinetica 1-arilmetil-e 1-allyl-4-ossazetidina-2-carbonitrili e carbossiammidi utilizzando una nitrile idratasi da *Rhodococcus erythropolis* AJ270.



I  $\beta$  amminoacidi possono poi essere ottenuti tramite apertura chimica dei  $\beta$  lattami corrispondenti.

Un altro importante esempio è quello riportato da Brieva<sup>89</sup> i quali tramite l'utilizzo della lipasi PS30 hanno ottenuto taxani enantiomericamente puri.

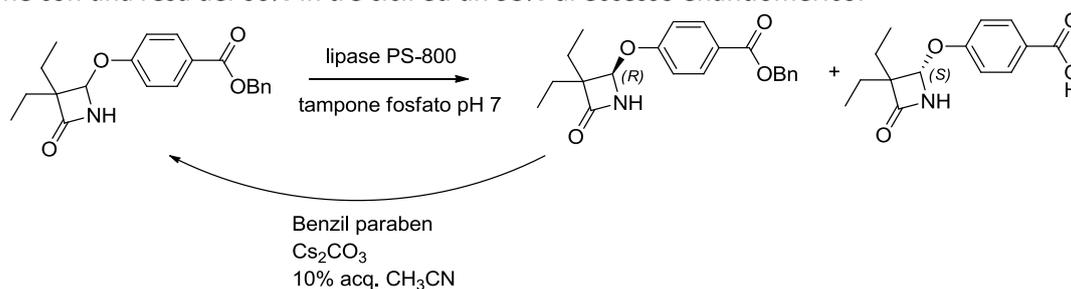


<sup>87</sup> (a) C. Evans, R. McGaughey, S.M. Roberts, A.G. Sutherland R.J. Wisdom, *Chem. Soc., Perkin Trans*, **1991**, 1:2276-2277 (b) R.C. Lloyd, M.C. Lloyd M.E.B. Smith, K.E. Holt, J.E. Swift, P.A. Keene, S.J.C. Taylor, R. McCaughey, *Tetrahedron*, **2004**, 60:717-228

<sup>88</sup> D-H Leng, D-X Wang, Z-T Huang and M-X Wang, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8:4736-4743

<sup>89</sup> R. Brieva, J.Z. Crich, C.J. Sih, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58:1068-1075

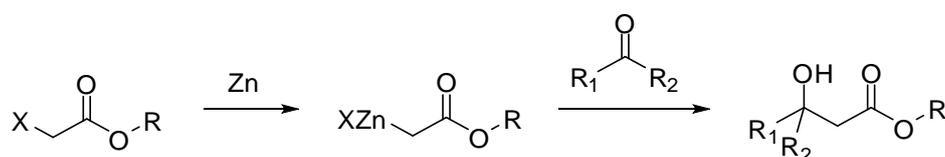
Raymond J. Cvetovich<sup>90</sup> con l'utilizzo di una lipasi hanno prodotto l' (S)-3,3-diethyl-4-(4'-carbossifenossi)-2-azetidione con una resa del 60% in tre cicli ed un 93% di eccesso enantiomerico.



#### 1.4.1. Sintesi di derivati desimmetrizzati dell'acido β glutammico: apertura chemo- e stereo-selettiva di 4-carbonilmetiliden-2 azetidioni

Presso il gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio dottorato abbiamo messo a punto la sintesi di derivati 4-carbonil-2-azetidionici a partire dal substrato commerciale 4-acetossi 2-azetidione utilizzando la reazione di Reformatsky, con l'obiettivo di utilizzarli come sintoni per la sintesi di derivati β amminoacidici tramite strategie biocatalitiche

La reazione di Reformatsky<sup>91</sup> è stata osservata già nel 1887 fra l'acetone e l'estere etilico dell'acido iodoacetico, in presenza di zinco metallico: la reazione di Reformatsky è oggi molto più generale e contempla infatti l'attacco metallo-indotto di α-alocarbonili su un range di elettrofili estremamente vario, con reazioni di sostituzione elettrofila o addizione nucleofila. La reazione avviene generalmente in due step: nel primo viene sintetizzato il reattivo di Reformatsky tramite addizione ossidativa dello zinco ad un α-alocarbone (generalmente un α-Bromo o α-Iodo estere) e nel secondo viene messo a reagire con l'opportuno partner elettrofilo.

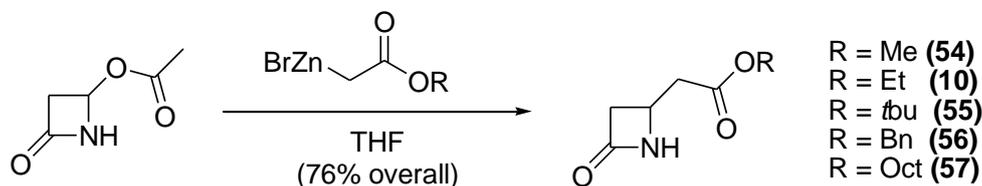
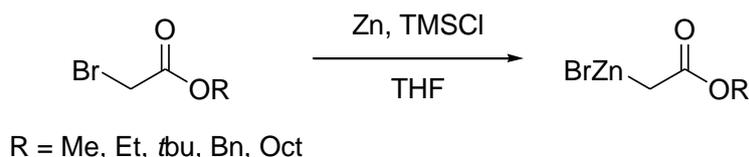


Un fattore importante per ottenere un buon risultato è relativo alla natura dello zinco metallico: deve essere per esempio sempre attivato per rimuovere la patina di ossido presente a livello superficiale, utilizzando generalmente una piccola percentuale di TMSCl, oppure un po' di I<sub>2</sub> o 1,2-dibromoetano. In alcuni casi lo zinco viene preparato in situ per riduzione dei suoi sali metallici.

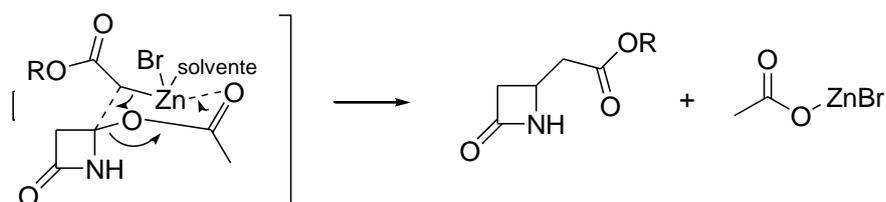
La reazione di Reformatsky sul 4-acetossi-azetidione-2-one è stata ottimizzata e prevede la primaria formazione del reattivo di organozinco partendo da un α-bromo acetato che poi a contatto con il β lattame provoca la sostituzione nucleofila dell'acetato. In particolare in una soluzione di THF, si sospende Zinco metallico e lo si attiva con TMSCl: successivamente si goccola l'α bromo acetato e poi dopo aver decantato e aspettato la formazione dell'organo metallo, lo si trasferisce su di una soluzione di β lattame in THF a 0°.

<sup>90</sup> R.J. Cvetovich, M. Chartrain, F.W. Hartner Jr, C. Roberge, J.S. Amato, and E.J.J. Grabowski, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61:6575-6580

<sup>91</sup> a) Reformatsky, S. (1887)., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 20 (1): 1210-1211; b) Reformatsky, S. (1890). *J. Russ. Phys. Chem. Soc* 22: 44

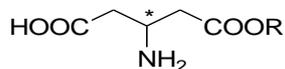


Il meccanismo di reazione ipotizzabile è il seguente :

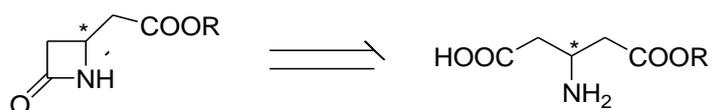


Si ipotizza che lo zinco coadiuvi l'uscita dell'acetato e contemporaneamente favorisca l'attacco nucleofilo del carbanione .

Questi nuovi derivati  $\beta$  lattamici sono considerati ottimi precursori (sintoni) dell'acido  $\beta$  glutammico desimmetrizzato. Questa molecola è particolarmente costosa e non facilmente sintetizzabile in forma desimmetrizzata enantiopura; è nota la sua attività biologica<sup>92</sup> e potenziale la sua attività come chelante asimmetrico di metalli.



Le due funzioni carbossiliche dell'acido  $\beta$  glutammico desimmetrizzato derivano dall'estere e dall'apertura del  $\beta$  lattame.

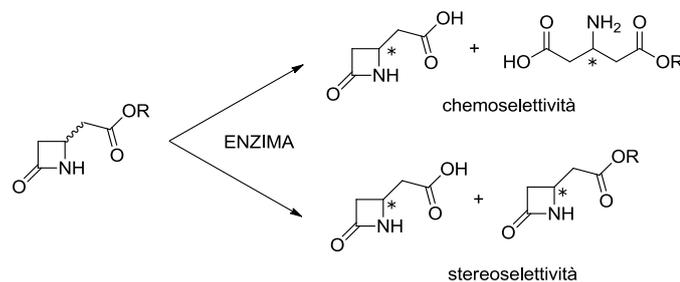


La strategia biocatalitica che abbiamo scelto è quella di utilizzare delle lipasi, esterasi e proteasi per catalizzare l'apertura del  $\beta$  lattame o l'idrolisi della catena esterea in modo chemoselettivo ed enantioselettivo, tramite un processo di risoluzione cinetica. Per quanto riguarda la chemoselettività e la stereoselettività:

- chemoselettività: i substrati presentano due gruppi funzionali: un legame estereo sulla catena in 4 al  $\beta$ -lattame ed il legame ammidico del  $\beta$ -lattame.  
 L'idrolisi selettiva di uno dei due legami porta a prodotti diversi: se gli enzimi funzionano come idrolasi si ottengono i corrispettivi derivati acidi od alcolici, mentre se operano come amidasi si ottengono derivati  $\beta$ -amminoacidici chirali.

<sup>92</sup> Watanabe, K.; Onozuka, M.; Niwa, M.; Pongchaidecha, A., General Pharmacology, Volume 22, issue 6 (1991), p. 1165-1168

- **stereoselettività:** i substrati sono ottenuti come miscela racema in cui il centro stereogenico si trova sul carbonio in 4 al β-lattame. Le idrolasi citate possono essere quindi in grado di discriminare i due enantiomeri idrolizzandone uno rispetto all'altro ottenendo così una risoluzione cinetica.



Sono quindi stati effettuati diversi screening biocatalitici sui seguenti β lattami, scegliendo come enzimi la CAL-A, la CAL-B, la PLE e l'α chimotripsina; la scelta degli enzimi è stata basata sulla recente letteratura riguardante la risoluzione cinetica di β lattami.

La CAL-A e la CAL-B sono delle lipasi (E.C 3.1.1.1) molto versatili estratte dal microrganismo *Candida Antarctica*. Sono enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi e in grado quindi di idrolizzare i trigliceridi. Hanno una struttura "α/β-hydrolase fold" e in generale una specificità differente rispetto alla PLC. Sono enzimi molto stabili ed entrambi sono stati utilizzati in forma immobilizzata. La CAL-A in particolare risulta essere in grado di riconoscere preferenzialmente substrati molto ingombranti al contrario di CAL-B, molto più aspecifica.

La PLE (Porcine o Pig Liver Esterase) classificata come E.C. 3.1.1.1 è un enzima molto versatile ed è stata impiegata intensivamente negli ultimi decenni come biocatalizzatore sia di reazioni di idrolisi sia di sintesi di esteri, dato il suo costo poco elevato. È un esterasi serina-dipendente e appartiene alla classe delle esterasi degli esteri degli acidi carbossilici ed ha una struttura quaternaria trimerica composta dalle subunità α, β e γ di circa 60 kDa di peso molecolare ciascuna, di cui le principali combinazioni sono ααα, ααγ e γγγ, per cui in natura ne esistono diversi isoenzimi.

Il suo ruolo biologico è quello di idrolizzare i vari esteri presenti nella dieta del maiale, da qui probabilmente deriva l'ampia specificità di substrato che caratterizza questo enzima.

Tuttavia sono presenti anche problemi che ne riducono il possibile utilizzo in processi industriali: innanzitutto viene venduta come crudo di un estratto di fegato di maiale, per cui può contenere altre attività enzimatiche diverse da quella esterasica o degli isoenzimi che potrebbero dare problemi di riproducibilità o di "reazioni parassita".

La α-chimotripsina (E.C. 3.4.21.1) è una proteasi, cioè è un enzima che catalizza la rottura del legame peptidico in presenza di aminoacidi idrofobici come la tirosina, il triptofano, la fenilalanina e la leucina in quanto il sito catalitico, molto apolare e profondo, è in grado di alloggiare tali aminoacidi e contiene una triade catalitica.

È un enzima digestivo ed assieme ad altri enzimi completa la digestione delle proteine: viene sintetizzato dal pancreas in forma inattiva, detta chimotripsinogeno, in quanto sarebbe dannoso se si trovasse nella sua forma attiva. Una volta rilasciato nell'intestino la tripsina scinde uno specifico legame peptidico generando così la forma attiva della chimotripsina, detta π-chimotripsina, la quale agisce su se stessa idrolizzando due frammenti peptidici di due aminoacidi, generando così la forma finale dell'enzima (α-chimotripsina) formata da tre catene peptidiche tenute insieme da due ponti disolfuro. In termini applicativi l'utilizzo di proteasi va a compensare lo scarso numero di esterasi in grado di idrolizzare esteri degli acidi carbossilici e agendo su di essi sembrano preferire l'enantiomero che assomiglia di più un L-amminoacido, infatti il requisito principale affinché un substrato sia idrolizzato selettivamente dalla α-chimotripsina è rappresentato dalla presenza di un gruppo polare e di un gruppo idrofobico sul carbonio α, come avviene appunto negli aminoacidi, substrati naturali dell'enzima.

Lo screening è stato fatto dissolvendo o sospendendo il  $\beta$  lattame nel solvente all'interno di una provetta, cui è stato successivamente aggiunto l'enzima lasciando in agitazione su un orbital shaker. La reazione è stata poi controllata tramite prelievi precisi e noti tramite HPLC e HPLC/chirale, verificando la conversione e/o resa con retta di taratura.

Le prime prove di attività di questi enzimi nei confronti dei nostri substrati 4-carbonil 2 azetidionici sono state condotte su **54**, **10** e **57**, i  $\beta$  lattami esterificati cioè con alcoli primari. Sfortunatamente tutti questi substrati, sia l'*R* che l'*S*, sono stati sempre idrolizzati ad acido  $\beta$  glutammico fino a completa conversione del  $\beta$  lattame di partenza.

Sul substrato benzilico **56** hanno mostrato una grande attività degli enzimi testati su entrambi gli enantiomeri (Tabella 6).

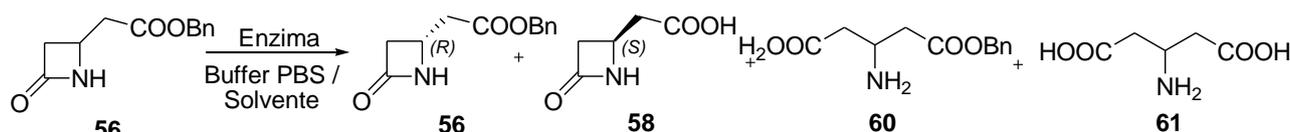


Tabella 6

Entry	Enz.	Q.tà	PBS 0.1 M (pH)	Solvente Organico (%)	Conversione $\beta$ -lattame (h)	S/R	Estratto Acquoso
1	CAL-A	30 (45)	7.5	\	100 (1h)	-	(6)/(8)
2	CAL-A	10 (15)	7.5	\	95 (1h)	-	(6)/(8)
3	CAL-B	15 (150)	7.5	\	97 (24h)	32/68	(6)/(8)
4	CAL-B	15 (150)	7.5	\			
5	CAL-B	15 (150)	7.5	\			
6	PLE	10 (170)	7.5	\	100 (1h)	-	(6)/(8)
7	PLE	2 (34)	7.5	\	101 (1h)	-	-6
8	$\alpha$ -CHI	2 (84)	7.5	\	41 (24h)	13/87	-6
9	$\alpha$ -CHI	2 (84)	7.5	\	41 (24h)	13/87	-6
10	$\alpha$ -CHI	2 (84)	7.5	\	41 (24h)	13/87	-6
11	$\alpha$ -CHI	2 (84)	7.5	\	41 (24h)	13/87	-6
12	$\alpha$ -CHI	2 (84)	7.5	\	41 (24h)	13/87	-6

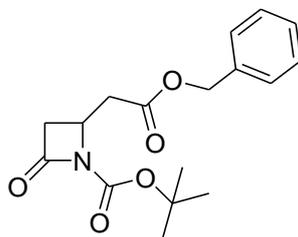
Sia la CAL-A che la PLE si mostrano molto attivi nei confronti del substrato, portando già dopo poche ore il substrato ad una conversione completa, anche se addizionati in minore quantità. L'attività della CAL-B risulta essere invece più ridotta ma comunque poco selettiva in termini di risoluzione cinetica. L'aggiunta di solvente organico, MeCN, aumenta ulteriormente la velocità di risoluzione cinetica dell'enzima peggiorando il risultato (la risoluzione finisce dopo 1 ora). L'enzima che mostra la migliore selettività risulta essere l' $\alpha$  chimotripsina, che in funzione di questo è stata studiata in maggior dettaglio. Le prime prove svolte in tampone fosfato a pH 7,5 e in tampone fosfato addizionato al 10% di MeCN mostrano che la reazione in solvente organico è più enantioselettiva. Abbiamo quindi effettuato altre prove variando il solvente: in un primo caso abbiamo abbassato il pH a 7, osservando però un peggioramento della enantioselettività. Abbiamo poi fatto 4 prove variando il solvente organico, osservando in generale un trend molto simile, ma con i migliori risultati con l'acetone e con la DMF.

La configurazione è stata assegnata in funzione del segno dell' $\alpha$  di rotazione di una miscela enantioarricchita di **56**.<sup>93</sup> Dall'analisi dei risultati ottenuti su **56** si osserva che non si riesce con nessuno di questi enzimi ad arrivare ad una completa risoluzione cinetica, con il migliore valore ottenuto dall'enzima  $\alpha$ chimotripsina. In particolare si osserva che tutti questi enzimi sembrano mostrare una attività esterasica, essendo sempre il prodotto **59** quello recuperato dalla fase acquosa: all'attività esterasica si aggiunge quella amidasica CAL-

<sup>93</sup> N. Ikota, H. Shibata, K. Koga, *Heterocycles*, **1980**, 14:1077-1080

A, CAL-B e PLE, poiché si recupera sempre l'acido  $\beta$  glutammico (61). E' interessante notare come non sia mai stato recuperato il prodotto 60.

Per verificare con più accuratezza l'estere benzilico, abbiamo effettuato uno screening di (CAL-B, PLE e  $\alpha$  chimotripsina) sull'analogo *N*-acilato con un gruppo Boc (per la procedura di acilazione, si veda il paragrafo successivo).



62

I risultati in termini di conversione e resa ottenuti mostrano anche in questo caso la scarsa enantioselettività nei confronti di questo substrato.

Il  $\beta$  lattame estere *t*-butilico 55 ha dato risultati molto interessanti in termini di eccesso enantiomerico.

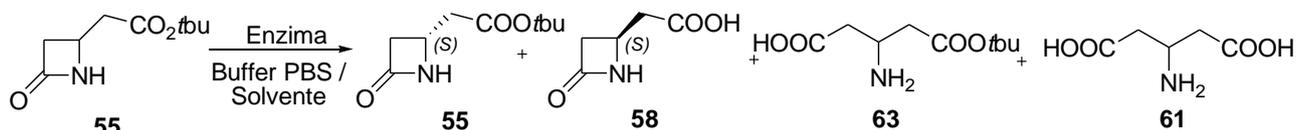
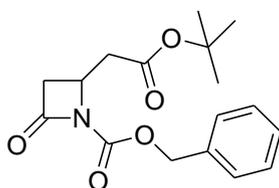


Tabella 7

Anche su questo substrato, sia CAL-A che CAL-B non hanno mostrato alcuna enantioselettività, convertendo il  $\beta$  lattame racemo a 58 e a 61 senza alcuna discriminazione enantiomerica. L' $\alpha$  chimotripsina non ha praticamente mostrato attività, mentre la PLE ha portato ad un ottimo risultato in termini di resa ed eccesso enantiomerico, utilizzando unicamente il tampone fosfato come solvente. In particolare si è osservata la completa risoluzione cinetica della miscela racemica, con un eccesso enantiomerico completo; l'enantiomero non reagito risulta l'*S* da letteratura.<sup>94</sup> Inoltre nella fase acquosa è stato trovato solo 63, il prodotto di apertura del  $\beta$  lattame, la cui configurazione deve essere *R* (ma non è stata verificata). Questo risultato mostra come la PLE, una esterasi, abbia in realtà esercitato una attività amidasica. La stessa reazione provata in presenza di più enzima ha portato a risultati peggiori in termini di eccesso enantiomerico; l'utilizzo di cosolventi al 10%, ha drammaticamente abbassato l'eccesso enantiomerico.

Lo stesso screening enzimatico sull'analogo  $\beta$  lattame *N* acilato con un gruppo CBZ, ha mostrato ottimi valori di eccesso enantiomerico, ma utilizzando l'enzima CAL-B (Conversione = 58% (120h), *S/R* = 96/4). Curiosamente, l'enzima PLE ha convertito tutta la miscela racemica senza enantiodiscriminazione.



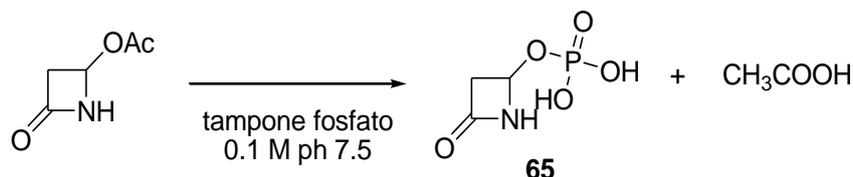
64

Anche in questo caso, la configurazione del  $\beta$  lattame che non ha reagito è *S*, e l'attività esercitata dall'enzima è sempre stata di natura amidasica.

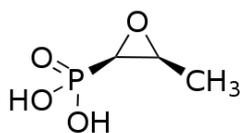
<sup>94</sup> H. Yamashita, *Chem. and Pharma. Bull.*, **1988**, 36:469-480

Si è deciso di testare gli enzimi CAL-B e PLE anche sul 2-acetossi-4-azetidione che si differenzia dai gli esteri precedenti per la mancanza di un CH<sub>2</sub> nella catena laterale in 4 all'anello β-lattamico e per avere un legame diretto C-O con l'anello e quindi presenta un gruppo acilico più corto.

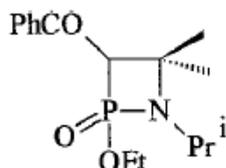
In tutti questi casi si è osservata la scomparsa molto veloce dello starting material e dall'analisi dell'estratto acquoso è stata chiara la presenza e l'ottenimento del fosfo β lattame qua sotto rappresentato. Per verificare se in qualche modo la reazione fosse catalizzata dall'enzima, il β lattame è stato dissolto in tampone fosfato senza enzimi: ma anche in questo caso, è stata osservata la formazione del legame con il gruppo fosfato.



La nostra ipotesi è che subentri una semplice sostituzione nucleofila, con uscita dell'acido acetico/acetato. La verifica della presenza di questo gruppo è stata comunque confermata da analisi NMR al 31P ma soprattutto dalla molteplicità del protone e del carbonio, che accoppiano con nucleo del fosforo (Si veda la parte sperimentale). Questa molecola si caratterizza in effetti come un nuovo β lattame e sono tuttora in corsi studi per razionalizzare la sua sintesi e le sue proprietà biologiche. In letteratura tra gli antibiotici antibiotici contenenti il fosfato è molto famosa la fosfomicina, antibiotico che mimando la struttura del fosfoenolpiruvato (PEP) inibisce l'enzima piruvato UDP-NAG transferasi e quindi del NAM del peptidoglicano dei batteri.<sup>95</sup>



È tuttavia nota anche una peculiare classe di molecole, i β fosfolattami qui rappresentati.<sup>96</sup>

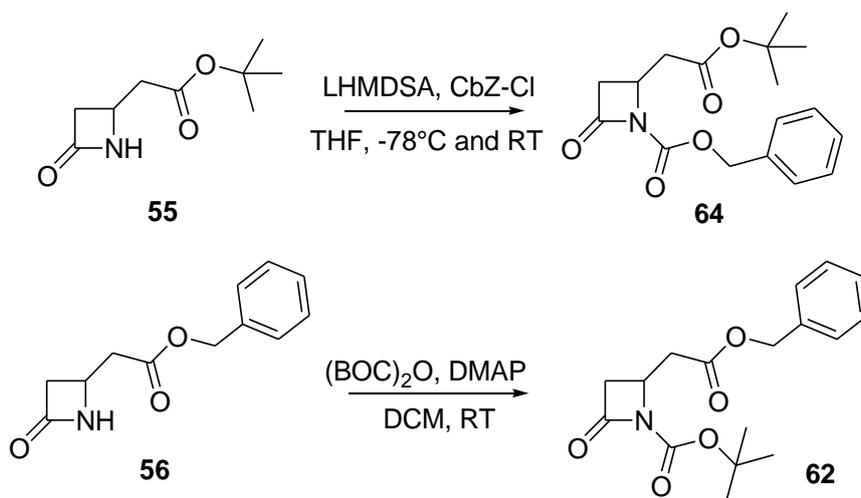


L'approccio enzimatico all'apertura dei 4-carbonil-2-azetidioni l'accesso a prodotti di apertura/idrolisi enantiomericamente puri è stato efficace, come abbiamo appena visto, solo nel caso in cui il β lattame fosse esterificato come estere *t*-butilico. È stato quindi messo a punto un approccio chimico alternativo e generale per l'apertura chemoselettiva dell'anello β lattamico e l'ottenimento del acido β glutammico desimmetrizzato chirale desiderato in forma racema. I 4-carbonil 2-azetidioni prescelti sono stati il benzile (**56**) e il terbutile (**55**).

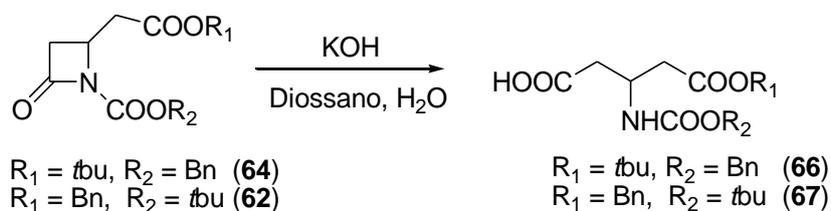
Per rendere più chemoselettiva la reazione di apertura idrolitica del β lattame (idrolisi di una amide) rispetto a quella dell'estere, i 2-azetidioni sono derivatizzati sull'azoto con gruppi uretanici. La prima reazione è stata l'acilazione dell'azoto β lattamico con l'opportuno derivato uretanico ortogonale al gruppo estereo.

<sup>95</sup> a) Patel SS, Balfour JA, Bryson HM, , *Drugs* **1997**, 53 (4): 637–656; b) Grif K, Dierich MP, Pfaller K, Miglioli PA, Allerberger F (August 2001). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **48** (2): 209–17

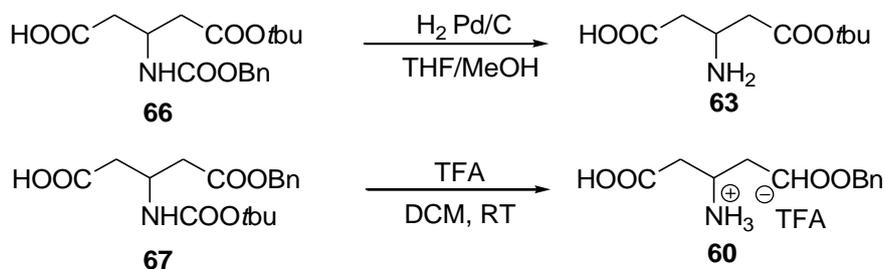
<sup>96</sup> Afarinkia, K.; Cadogan, J. I. G.; Rees, C. W. J. *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 285



L'acilazione risulta essere il punto chiave in quando porta il 2 azetidione ad essere particolarmente tensionato ed elettrofilo e prono alla successiva reazione di apertura. L'apertura di entrambi i  $\beta$  lattami avviene in una miscela diossano/KOH acquoso a temperatura ambiente.



La reazione procede molto bene per entrambi i  $\beta$  lattami. Si ha poi la liberazione della protezione sull'azoto per entrambi grazie a procedure note e si ha l'ottenimento dei mono glutammati.



## 1.5 Parte sperimentale

### Parte Sperimentale relativa al paragrafo 1.2.1

#### Parte Strumentale

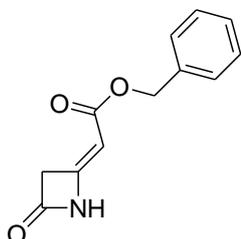
Commercially available reagents were used as received without additional purification.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR values were recorded on Inova 400, 300, or Gemini 200 instruments with a 5 mm probe. All chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm relative to deuterated solvent signals, and coupling constants ( $J$ ) are reported in Hz. FTIR: Thermo Nicolet 380 measured as films between NaCl plates, with wavenumbers reported in  $\text{cm}^{-1}$ . TLC: Merck 60 F254. Column chromatography: Merck silica gel 200–300 mesh. GC–MS: Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, EI voltage: 70 eV, gradient from 50!2808C over 30 min, column HP5 5% Ph-Me silicon. HPLC–MS: Agilent Technologies HP1100, column Zobrax-Eclipse XDB-C8 Agilent Technologies, mobile phase:  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ , gradient from 30!80%  $\text{CH}_3\text{CN}$  over 8 min, 80%  $\text{CH}_3\text{CN}$  until 25 min, flow rate: 0.4 mLmin $^{-1}$  coupled with Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, full-scan mode from  $m/z$  50 to  $m/z$  2600, scan time 0.1 s in positive ion mode, ESI spray voltage: 4500 V,  $\text{N}_2$  gas at 240 kPa, drying gas flow rate: 11.5 mLmin $^{-1}$ , fragmentor voltage: 20 V. Elemental analysis: Thermo Flash 2000 CHNS/O analyzer.

4-Alkyliden-azetidinones **1**, **3**, **5** and **8** are known and were prepared following the reported procedures. Azetidinones **16** and **28** are commercially available. Azetidinones **10**, **20**, **24**, **29**, **30**, and **32**, and **18**, **22**, **26** and **34** are known.

#### Benzyl 2-(4-oxoazetidin-2-ylidene)-acetate (*E*)-**7** and (*Z*)-**9**

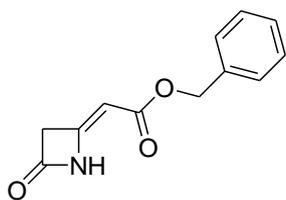
Compounds **7** and **9** were obtained with the same procedure as **1**<sup>[9, 13]</sup> starting from the commercially available 4-acetoxy-azetidinone in 43% yield and in a *E/Z* mixture 41/59. The two isomers were separated by flash-chromatography.

#### (*E*)-benzyl 2-(4-oxoazetidin-2-ylidene)acetate (**7**)



white solid:  $R_f$  = 0.5 (cyclohexane/EtOAc 5:5); mp: 98–103°C;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.80 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 2H), 5.17 (s, 2H), 5.40 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 1H), 7.22 (bs, 1H), 7.30–7.38 ppm (m, 5H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 45.9, 65.9, 91.8, 128.0, 128.1, 128.5, 135.9, 151.6, 166.3, 166.5 ppm; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3193, 1827, 1698, 1639, 1284, 1046  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS, (ESI):  $R_t$  = 6.40 min,  $m/z$  (%): 200 (90), 218 (38) [ $M+H$ ] $^+$ , 240 (100) [ $M+Na$ ] $^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3$  C 66.35, H 5.10, N 6.45, found: C 66.28, H 5.01, N 6.32.

#### (*Z*)-benzyl 2-(4-oxoazetidin-2-ylidene)acetate (**9**)

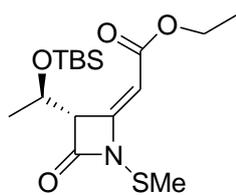


white solid:  $R_f$  = 0.8 (cyclohexane/EtOAc 5:5); mp: 167–165°C;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.55 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 1H), 3.56 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 1H), 5.19 (s, 2H), 5.24 (dd,  $J$  = 0.9 Hz,  $J$  = 0.6 Hz, 1H), 7.30–7.39 (m, 5H), 8.59 ppm (brs, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz):  $\delta$  = 44.9, 66.0, 90.3, 128.1, 128.3, 128.6, 135.9, 150.3, 164.5, 166.8 ppm; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 231, 1825, 1687, 1642, 1251, 1141  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS, (ESI):  $R_t$  = 6.87 min,  $m/z$  (%): 218 (12) [ $M+H$ ] $^+$ , 236 (15) [ $M+H_2O+H$ ] $^+$ , 262 (100), 278 (42); Anal. calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3$  C 66.35, H 5.10, N 6.45, found: C 66.31, H 4.99, N 6.34.

#### General procedure for the *N*-methylthiolation reaction

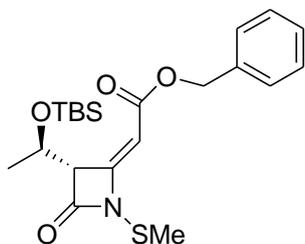
To a solution of  $\beta$ -lactam *N*-1 unsubstituted (1 mmol) in THF (10 mL) at  $-78^\circ\text{C}$  under inert atmosphere was added a freshly prepared LDA 1M solution in THF (or LiHMDSA) 110  $\mu\text{L}$  (1.1 mmol) and then *S*-methyl methanethiosulfonate (236  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol). The solution was allowed to warm at room temperature and monitored by TLC. After 4 hours the reaction was quenched with aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL) and extracted with EtOAc (3x10 mL). The organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated in vacuo. Flash chromatography of the extracts gave the *N*-thiomethyl  $\beta$ -lactams.

(*E*)-ethyl 2-((*S*)-3-((1*R*)-1-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-2-ylidene)acetate (**2**):



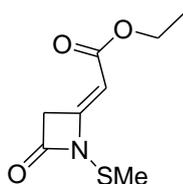
Obtained with LDA. Transparent oil (215 mg, 60% yield):  $R_f=0.8$  (cyclohexane/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_{25}^D=+93.3$  ( $c=0.84$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=0.09$  (s, 3H), 0.11 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 1.18 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H), 1.30 (t,  $J=7.4$  Hz, 3H), 2.48 (s, 3H), 4.20 (q,  $J=7.4$  Hz, 2H), 4.64 (dq,  $J=6.6$ , 4.0 Hz, 1H), 4.22 (m, 1H), 5.62 ppm (d,  $J=1.0$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=-4.8$ , -4.6, 14.4, 18.0, 19.8, 21.6, 25.7, 60.1, 65.1, 65.9, 92.6, 157.0, 165.6, 169.3 ppm; HPLC-MS (ESI),  $R_t=24.35$ ,  $m/z$  (%): 360 (100)  $[M+H]^+$ , 382 (17)  $[M+Na]^+$ ; GC-MS (EI, 70 ev):  $R_t=23.29$ ,  $m/z$  (%): 73 (85), 103 (30), 115 (32) 159 (28), 302 (100), 315 (39); IR (film):  $\tilde{\nu}=2952$ , 2926, 2853, 1825, 1713, 1660, 1255, 1162, 1063, 831  $\text{cm}^{-1}$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{SSi}$ : C 53.45, H 8.13 N 3.90, S 8.92, found: C 53.54, H 8.16, N 3.83, S 8.78.

**(E)-benzyl 2-((1S)-3-((1R)-1-(tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetid-2-ylidene)acetate (4):**



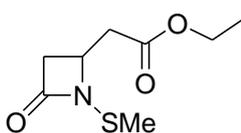
Obtained with LDA. Transparent oil (181 mg, 43% yield):  $R_f=0.9$  (cyclohexane/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_{25}^D=+69.1$  ( $c=0.73$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=0.07$  (s, 3H), 0.08 (s, 3H), 0.89 (s, 9H), 1.17 (d,  $J=6.2$  Hz, 3H), 2.48 (s, 3H), 4.21 (dd,  $J=4.0$ ,  $J=1.0$  Hz, 1H), 4.62 (dq,  $J=6.2$ ,  $J=4.0$  Hz, 1H), 5.19 (s, 2H), 5.68 (d,  $J=1.0$  Hz, 1H), 7.35-7.39 ppm (m, 5H);  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=-5.1$ , -4.9, 17.8, 19.7, 21.4, 25.6, 64.9, 65.8, 65.9, 92.1, 128.0, 128.1, 128.5, 135.9, 157.7, 165.4, 169.1 ppm; IR (film):  $\tilde{\nu}=2955$ , 2929, 2895, 2856, 1825, 1714, 1661, 1256, 1157, 1057, 831  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI),  $R_t=12.87$  min,  $m/z$  (%): 422  $[M+H]^+$ , 440  $[M+Na]^+$ , 460  $[M+K]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_4\text{SSi}$ : C 59.82, H 7.41, N 3.32, S 7.61; found: C 59.69, H 7.38, N 3.24, S 7.49.

**(E)-Ethyl 2-((1S)-3-((1R)-1-(tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetid-2-ylidene)acetate (6):**



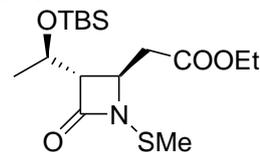
Obtained with LiHMDSA. Transparent oil (66 mg, 33% yield):  $R_f=0.7$  (cyclohexane/EtOAc 5:5);  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=1.30$  (t,  $J=7.2$  Hz, 3H), 2.51 (s, 3H), 3.89 (d,  $J=1.2$  Hz, 2H), 4.20 (q,  $J=7.2$  Hz, 2H), 5.65 ppm (dd,  $J=1.2$ ,  $J=1.4$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz):  $\delta=14.3$ , 21.6, 46.8, 60.2, 92.5, 155.0, 166.0, 168.4 ppm; IR (neat):  $\tilde{\nu}=2958$ , 2923, 1810, 1702, 1660, 1057, 835  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=6.38$  min,  $m/z$  (%): 156 (82)  $[M-\text{OEt}]^+$ , 174 (46), 202 (100)  $[M+H]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$ : C 47.75, H 5.51, N 6.96, S 15.93, found: C 47.67, H 5.48, N 6.84, S 15.78.

**Ethyl 2-((1S)-3-((1R)-1-(tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetid-2-ylidene)acetate (11):**

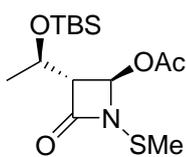


Obtained with LiHMDSA. Transparent oil (67 mg, 33% yield):  $R_f=0.3$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetone 98:2);  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=1.30$  (t,  $J=7.2$  Hz, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.57 (dd,  $J=15.9$ , 7.8 Hz, 1H), 2.85 (dd,  $J=15.0$ ,  $J=2.7$  Hz, 1H), 2.90 (dd,  $J=15.9$ ,  $J=5.4$  Hz, 1H), 3.27 (dd,  $J=15.0$ ,  $J=5.4$  Hz, 1H), 4.07 (m, 1H), 4.20 ppm (q,  $J=7.2$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=14.1$ , 22.4, 38.0, 44.3, 51.8, 61.0, 169.8, 170.1 ppm; IR (neat):  $\tilde{\nu}=2922$ , 2852, 1763, 1735, 1420, 1319, 1260  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=3.73$  min,  $m/z$  (%): 162 (100)  $[M-\text{CH}_2\text{CO}+H]^+$ , 204 (32)  $[M+H]^+$ , 226 (35)  $[M+Na]^+$ ; GC-MS (EI, 70 ev):  $R_t=16.18$  min,  $m/z$  (%): 61 (27), 72 (30), 86 (77), 88 (75), 89 (74), 114 (22), 116 (23), 141 (100), 161 (71)  $[M-\text{COCH}_2]^+$ , 203 (11)  $[M]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$ : C 47.27, H 6.45, N 6.89, S 15.78, found: C 47.16, H 6.36, N 6.70, S 15.69.

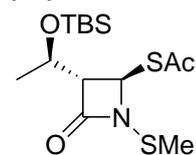
**Ethyl ((3S,2R)-3-((1R)-1-(tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetid-2-ylidene)acetate (12):**



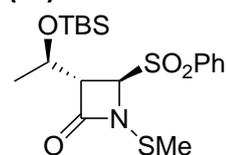
Obtained starting from **34** with LDA. Transparent oil (267 mg, 74% yield):  $R_f=0.8$  (cyclohexane/EtOAc 8:2);  $[\alpha]_{25}^D=+71.3$  ( $c=1.3$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=0.03$  (s, 3H), 0.04 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 1.13 (d,  $J=6.3$  Hz, 3H), 1.26 (t,  $J=7.2$  Hz, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.57 (dd,  $J=15.0$ ,  $J=6.6$  Hz, 1H), 2.77 (dd,  $J=15.0$ ,  $J=6.0$  Hz, 1H), 2.99 (dd,  $J=3.3$ ,  $J=3.0$  Hz, 1H), 4.13-4.20 (m, 1H), 4.15 (q,  $J=7.2$  Hz, 2H), 4.20 ppm (dq,  $J=6.3$ ,  $J=3.3$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=-5.0$ , -4.6, 14.0, 17.8, 22.6, 22.5, 25.6, 37.9, 53.7, 60.8, 64.3, 64.8, 170.2, 170.8 ppm; IR (neat):  $\tilde{\nu}=3019$ , 2956, 2930, 2857, 1763, 1734, 1265, 1216, 838  $\text{cm}^{-1}$ ; GC-MS (EI, 70 ev):  $R_t=23.90$  min,  $m/z$  (%): 73 (90), 75 (100), 103 (35), 143 (35), 304 (100); Anal. calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NO}_4\text{SSi}$ : C 53.15, H 8.64, N 3.87, S 8.87; found: C 53.12, H 8.76, N 3.89, S 8.79.

**(2R,3R)-3-((1R)-1-(tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-2-yl acetate (17):**

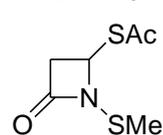
Obtained with LDA. Transparent oil (100 mg, 30% yield):  $R_f=0.9$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$  98:2);  $[\alpha]_{25}^D=+7.0$  ( $c=1.4$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=0.03$  (s, 3H), 0.06 (s, 3H), 0.84 (s, 9H), 1.23 (d,  $J=6.2$  Hz, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 3.18 (dd,  $J=3.0$ ,  $J=1.6$  Hz, 1H), 4.22 (dq,  $J=6.2$ ,  $J=3.0$  Hz, 1H), 6.22 ppm (d,  $J=1.6$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=-5.1$ , -4.5, 17.9, 21.0, 22.2, 22.8, 25.7, 64.0, 66.3, 80.2, 169.3, 169.8 ppm; IR (film):  $\tilde{\nu}=2929$ , 2857, 1793, 1752, 1252, 1066, 838  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=17.69$ ,  $m/z$  (%): 274 (100)  $[M-\text{CH}_3\text{COO}]^+$ , 290 (26)  $[M-\text{CH}_3\text{CO}]^+$ , 356 (9)  $[M+\text{Na}]^+$ ; GC-MS (EI, 70 ev):  $R_t=17.69$ ,  $m/z$  (%): 234 (75), 190 (100), 117 (46), 75 (45); Anal. calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{SSi}$ : C 50.42, H 8.16, N 4.20, S 9.61, found: C 50.29, H 8.09, N 4.18, S 9.47.

**S-(2R,3S)-3-((1R)-1-tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-2-yl ethanethioate (21):** sss

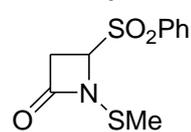
Obtained with LiHMDSA. Transparent oil (230 mg, 66% yield):  $R_f=0.8$  (cyclohexane/EtOAc 7:3);  $[\alpha]_{25}^D=+45.2$  ( $c=1.7$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=0.05$  (s, 3H), 0.07 (s, 3H), 0.86 (s, 9H), 1.17 (d,  $J=6.2$  Hz, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 3.29 (dd,  $J=3.4$ ,  $J=2.6$  Hz, 1H), 4.26 (dq,  $J=6.2$ ,  $J=3.4$  Hz, 1H), 5.62 ppm (d,  $J=2.6$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=-5.1$ , -4.6, 17.8, 22.0, 22.2, 25.6, 30.9, 59.0, 64.4, 65.3, 169.4, 193.5 ppm; IR (film):  $\tilde{\nu}=2929$ , 2986, 2956, 1782, 1707, 1252, 1127, 836  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=10.70$  min,  $m/z$  (%): 372 (100)  $[M+\text{Na}]^+$ , 721 (50)  $[2M+\text{Na}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{S}_2\text{Si}$ : C 48.10, H 7.78, N 4.01, S 18.35, found: C 48.18, H 7.84, N 3.89, S 18.31.

**(3S,4R)-3-((1R)-1-(tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-1-(methylthio)-4-(phenylsulfonyl)-azetidin-2-one (25):**

Obtained with LiHMDSA. Pale yellow oil (365 mg, 88% yield):  $R_f=0.7$  (cyclohexane/EtOAc 7:3);  $[\alpha]_{25}^D=-75.0$  ( $c=1.2$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=0.01$  (s, 3H), 0.03 (s, 3H), 0.84 (s, 9H), 0.90 (d,  $J=6.0$  Hz, 3H), 2.52 (s, 3H), 3.47 (dd,  $J=4.0$ ,  $J=2.4$  Hz, 1H), 4.24 (dq,  $J=6.0$ ,  $J=4.0$  Hz, 1H), 4.83 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 7.62-7.66 (m, 2H), 7.72-7.76 (m, 2H), 7.97-8.00 ppm (m, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=-5.1$ , -4.8, 17.7, 21.9, 22.9, 25.6, 63.0, 63.7, 73.0, 129.1, 129.5, 134.7, 136.3, 169.1 ppm; IR (neat):  $\tilde{\nu}=3066$ , 2955, 2929, 2857, 2481, 1792, 1326, 1153, 835  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=12.24$ ,  $m/z$  (%): 116 (69)  $[M-\text{SO}_2\text{Ph}]^+$ , 309 (30), 372 (69), 433 (100)  $[M+\text{H}_2\text{O}]^+$ , 854 (10)  $[2M+\text{Na}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{S}_2\text{Si}$ : C 52.01, H 7.03, N 3.37, S 15.43, found: C 52.19, H 7.08, N 3.39, S 15.23.

**S-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-2-yl ethanethioate (31):**

Obtained with LiHMDSA. Transparent oil (59 mg, 31% yield):  $R_f=0.8$  (cyclohexane/EtOAc 6:4);  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=2.45$  (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 3.12 (dd,  $J=15.4$ ,  $J=3.0$  Hz, 1H), 3.58 (dd,  $J=15.4$ ,  $J=5.6$  Hz, 1H), 5.50 ppm (dd,  $J=5.6$ ,  $J=3.0$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=22.4$ , 31.0, 45.5, 57.9, 167.2, 193.8 ppm; IR (neat):  $\tilde{\nu}=2918$ , 1773  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=4.03$  min,  $m/z$  (%): 116 (100)  $[M-\text{SAc}]^+$ , 134 (61), 192 (26)  $[M+\text{H}]^+$ , 214 (35)  $[M+\text{Na}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}_2$ : C 37.68, H 4.74, N 7.32, S 33.53, found: C 37.74, H 4.81, N 7.26, S 33.21.

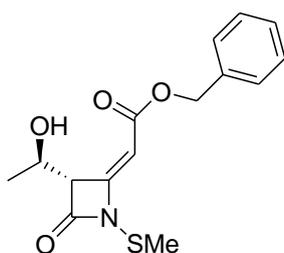
**1-(methylthio)-4-(phenylsulfonyl)azetidin-2-one (33):**

Obtained with LiHMDSA. Pale yellow oil (203 mg, 79% yield):  $R_f=0.6$  (Dichloromethane/acetone 98:2);  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=2.52$  (s, 3H), 3.30 (d,  $J=4.0$  Hz, 2H), 4.74 (t,  $J=4.0$  Hz, 1H), 7.58-7.79 (m, 3H), 7.92-7.98 ppm (m, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=22.8$ , 42.0, 71.0, 129.1, 129.6, 134.9, 135.8, 167.3; IR (neat):  $\tilde{\nu}=3063$ , 2964, 1781, 1584, 1309, 1149, 722  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=4.27$  min,  $m/z$  (%): 116 (67)  $[M-\text{SO}_2\text{Ph}]^+$ , 125 (100)  $[\text{PhSO}]^+$ , 258 (72)  $[M+\text{H}]^+$ , 280 (70)  $[M+\text{Na}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}_2$ : C 46.67, H 4.31, N 5.44, S 24.92, found: C 46.54, H 4.24, N 5.38, S 24.78.

**Deprotection of the tert-butyldimethylsilyloxy group.**

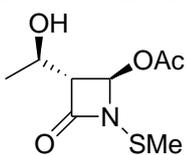
To a solution of  $\beta$ -lactam (1.5 mmol) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (15 mL) at 0° C under inert atmosphere was added  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (226  $\mu\text{L}$ , 1.8 mmol) and the reaction allowed to warm to room temperature and monitored by TLC. The reaction was quenched with a 0.1 M phosphate buffer at pH 6 (15 mL) and extracted 3 times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x15 mL). The organic extracts were dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated in vacuo. Flash chromatography of the extracts gave the deprotected  $\beta$ -lactam.

**(E)-benzyl 2-((S)-3-((R)-1-hydroxyethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-2-ylidene)acetate (13):**



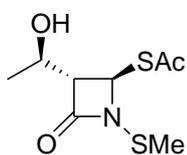
Transparent oil (419 mg, 91% yield):  $R_f=0.4$  (cyclohexane/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_{25}^D=+36.3$  ( $c=0.78$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=1.39$  (d,  $J=6.0$  Hz, 3H), 2.50 (s, 3H), 4.13 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H), 4.25 (m, 1H), 5.13 (brs, 1H), 5.21 (s, 2H), 5.79 (s, 1H), 7.37-7.41 ppm (m, 5H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=20.9, 21.6, 66.2, 66.6, 66.9, 92.7, 128.5, 128.7, 135.4, 159.3, 167.4, 168.5, 834$  ppm; IR (film):  $\tilde{\nu}=3400, 3010, 1820, 1699, 1652, 1274, 1162, 1067$   $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=11.24$ ,  $m/z$  (%): 308 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$ : C 58.61, H 5.57, N 4.56, S 10.43, found: C 58.74, H 5.66, N 5.48, S 10.38.

**(2R,3R)-3-((1R)-1-hydroxyethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-2-yl acetate (19):**



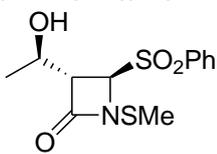
Transparent oil (263 mg, 80% yield):  $R_f=0.3$  (cyclohexane/EtOAc, 5/5);  $[\alpha]_{25}^D=-33.3$  ( $c=1.8$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=1.33$  (d,  $J=6.2$  Hz, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.22 (brs, 1H, OH), 2.51 (s, 3H), 3.21 (dd,  $J=1.6$  Hz,  $J=6.4$  Hz, 1H), 4.18 (quintet,  $J=6.4$  Hz, 1H), 6.01 ppm (d,  $J=6$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=20.9, 21.0, 22.8, 64.2, 66.7, 82.1, 168.5, 170.7$  ppm; IR (film):  $\tilde{\nu}=3458, 2974, 2924, 1781, 1752, 1229, 1040$   $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=\text{min}$  2.45,  $m/z$  (%): 116 (100), 242 (45)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 461 (10)  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ : C 43.82, H 5.98, N 6.39, S 14.92, found: C 43.69, H 5.88, N 6.37, S 14.81.

**S-(2R,3S)-3-((1R)-1-hydroxyethyl)-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-2-yl ethanethioate (23):**



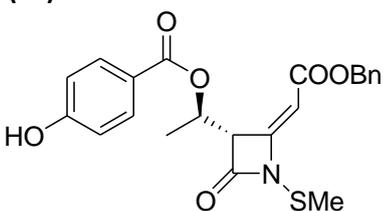
Transparent oil (349 mg, 99% yield):  $R_f=0.3$  (cyclohexane/EtOAc 6/4); mp: 100-103°C;  $[\alpha]_{25}^D=+19.8$  ( $c=2.4$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=1.30$  (d,  $J=6.6$  Hz, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 3.36 (dd,  $J=5.4$  Hz,  $J=2.7$  Hz, 1H), 4.27 (dq,  $J=6.6$  Hz,  $J=5.4$  Hz, 1H), 5.52 ppm (d,  $J=2.7$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=20.9, 22.3, 31.0, 60.1, 64.4, 66.0, 169.5, 194.3$  ppm; IR (film):  $\tilde{\nu}=3402, 1753, 1695, 1130$   $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=2.19$  min,  $m/z$  (%): 116 (100), 192 (20)  $[\text{M}-\text{COCH}_3]^+$ , 236 (15)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 258 (28)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 493 (9)  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}_2$ : C 40.83, H 5.57, N 5.95, S 27.25, found: C 40.89, H 5.68, N 5.91, S 27.18.

**(3S,4R)-3-((1R)-1-hydroxyethyl)-1-(methylthio)-4-(phenylsulfonyl)azetidin-2-one (27):**



White solid (406 mg, 90% yield):  $R_f=0.4$  (cyclohexane/EtOAc 5:5); mp: 167-169°C;  $[\alpha]_{25}^D=-107.4$ , ( $c=1.7$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=1.14$  (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.85 (d,  $J=4.4$  Hz, 1H), 2.48 (s, 3H), 3.59 (dd,  $J=3.2$  Hz,  $J=2.8$  Hz, 1H), 4.30 (ddq,  $J=6.8$  Hz,  $J=4.4$  Hz,  $J=3.2$  Hz, 1H), 4.86 (d,  $J=2.8$  Hz, 1H), 7.62-7.66 (m, 2H), 7.73-7.77 (m, 1H), 7.97-8.00 ppm (m, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=21.4, 22.4, 62.2, 63.4, 72.7, 129.2, 129.6, 134.8, 136.2, 169.7$  ppm; IR (KBr):  $\tilde{\nu}=3433, 2979, 2925, 1763, 1647, 1310, 1147$   $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=4.90$  min,  $m/z$  (%): 116 (15)  $[\text{M}-\text{SO}_2\text{Ph}]^+$ , 319 (100)  $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$ , 625 (72)  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}_2$ : C 47.82, H 5.02, N 4.65, S 21.28; found: C 47.79, H 4.95, N 4.54, S 20.88.

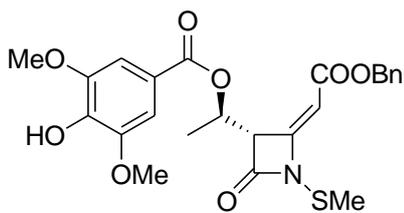
**(R)-1-((S,E)-2-(2-(benzyloxy)-2-oxoethylidene)-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethyl 4-hydroxybenzoate (14):**



To a solution of *p*-hydroxy benzoic acid (54 mg, 0.39 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 mL) under inert atmosphere was added oxalylchloride (66  $\mu\text{L}$ , 0.78 mmol). The solution was refluxed for 2 hours; after removal of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was introduced **13** (58 mg, 0.19 mmol), benzene (4 mL),  $\text{SnCl}_4$  1 M in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (9.7  $\mu\text{L}$ , 0.0097 mmol) and the mixture was refluxed for 2.5 hours and followed by TLC. After completion the reaction was washed with 10 mL of 5%  $\text{NaHCO}_3$ , extracted with ethyl acetate (2x10 mL) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x10 mL), dried on

$\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. Flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 8/2) of the extracts gave **14** (44 mg, 54% yield).  $R_f = 0.7$  (cyclohexane/EtOAc 8:2);  $[\alpha]_{25}^D=+93.0$  ( $c=0.84$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=1.35$  (d,  $J=6.6$  Hz, 3H), 2.52 (s, 3H), 4.55 (dd,  $J=4.8$  Hz,  $J=1.5$  Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.75 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H), 5.87 (dq,  $J=6.6$  Hz,  $J=4.8$  Hz, 1H), 6.34 (bs, 1H, OH), 6.86-6.90 (m, 2H, Ar), 7.27-7.43 (m, 5H, Ar), 7.96-8.00 ppm (m, 2H, Ar);  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=15.5, 21.7, 62.7, 66.4, 66.6, 93.3, 115.2, 122.2, 128.5, 128.6, 132.2, 135.7, 156.1, 160.2, 165.2, 168.8$  ppm; IR (film):  $\tilde{\nu}=3392, 1817, 1702, 1825, 1713, 1668, 1061$   $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI),  $R_t=12.94$ ,  $m/z$  (%): 290 (100)  $[\text{M}-\text{COOPh}(\text{OH})]^+$ , 428 (20)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 450 (20)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 877 (50)  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{S}$ : C 61.81, H 4.95, N 3.28, S 7.50, found: C 61.70, H 4.88, N 3.25, S 7.41.

**(R)-1-((S,E)-2-(2-(benzyloxy)-2-oxoethylidene)-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate (15)**



Compound **15** was obtained with the same procedure as **14** using syringic acid (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid).

(**15**): Transparent oil (6.5 mg, 7% yield):  $R_f=0.8$  (cyclohexane/EtOAc 8:2);  $[\alpha]_{25}^D=+63.3$  ( $c=1.01$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=1.36$  (d,  $J=6.6$  Hz, 3H), 2.52 (s, 3H), 3.97 (s, 6H), 4.55 (dd,  $J=5.2, 1.4$  Hz, 1H), 5.19 (d,  $J_{AB}=12.4$  Hz, 1H), 5.26 (d,  $J_{AB}=12.4$  Hz, 1H), 5.75 (d,  $J=1.4$  Hz, 1H), 5.89 (dd,  $J=6.6$  Hz, 5.2 Hz, 1H), 5.93 (bs, 1H, OH), 7.32-7.42 ppm (m, 7H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=15.5, 21.7, 56.4, 62.7, 66.3, 66.9, 93.3, 106.9,$

120.9, 128.3, 128.5, 128.6, 135.8, 139.3, 146.6, 156.0, 165.0, 165.1, 168.4 ppm; IR (film):  $\tilde{\nu}=3403, 2923, 1819, 1713, 1653, 1335, 1222, 1063$   $\text{cm}^{-1}$  HPLC-MS (ESI):  $R_t=13.05$ ,  $m/z$  (%): 290 (100)  $[\text{M-COOPh}(\text{OCH}_3)_2(\text{OH})]^+$ , 488 (10)  $[\text{M}+1]^+$ , 510 (15)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 998  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ ; Anal. calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_8\text{S}$ : C 59.13, H 5.17, N 2.87, S 6.58, found: C 58.95, H 5.08, N 2.81, S 6.44.

## Analisi Microbiologiche

### Ceppi batterici

A total of 77 clinical isolates were used for the *in vitro* antibacterial activity determination of the studied compounds. The following Gram-positive and Gram-negative bacterial species were included: *S. pyogenes* (7), *S. pneumoniae* (10), *Enterococcus faecalis* (3), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (13), methicillin susceptible *S. aureus* (MSSA) (13), *S. epidermidis* (6), *H. influenzae* (4), *E. coli* (7), *P. mirabilis* (4), *S. marcescens* (2), and *K. pneumoniae* (8).

Ten isolates from each group of MSSA and MRSA strains tested, had been recently isolated from paediatric patients with cystic fibrosis at the Department of Paediatrics, CF Center, Foundation IRCCS CA' GRANDA Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milan.

All the isolates were well characterized for their antibiotic susceptibility pattern. Furthermore, MSSA and MRSA strains isolated from CF patients are presently being evaluated for SCV phenotype, biofilm production and the presence of molecular determinants of resistance.

### Determinazione della MIC

The "in vitro" antibacterial activity of new compounds was studied by determining the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) by means of the broth microdilution method, according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)<sup>[24]</sup>

Briefly, serial two-fold dilutions of each antibiotic stock solution were obtained using Mueller-Hinton broth in 96 wells microtitre plates. An equal volume of bacterial inoculum ( $5 \times 10^5$  CFU/mL) was added to each well of the microtitre plate containing 0.05 mL of serial antibiotic concentrations. The microtitre plate was then incubated at 35 °C for 16-20 h; subsequently each well was analyzed for the presence of visible bacterial growth. MIC was defined as the lowest concentration of the tested compound able to inhibit visible growth of the microorganism, after overnight incubation. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were the concentrations required to inhibit the growth, respectively, of 50% and 90% of the tested microorganisms.

The "in vitro" antibacterial activity of 33 new monocyclic azetidin-2-ones was tested and compared to that of reference  $\beta$ -lactam agents in clinical use: amoxicillin (Sigma-Aldrich) and ceftriaxone (Sigma-Aldrich).

MSSA *S. aureus* ATCC 29213, MRSA *S. aureus* ATCC 43300, *S. pyogenes* ATCC 19615, *E. coli* ATCC 25922 were used as controls for MIC determinations.

## **Parte Sperimentale relativa al paragrafo 1.2.2**

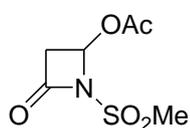
### **Parte Strumentale**

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR values were recorded on a INOVA 400, or a GEMINI 200 instrument with a 5 mm probe. All chemical shifts have been quoted relative to deuterated solvent signals,  $\delta$  in ppm and  $J$  in Hz. FT-IR: Nicolet 380 measured as films between NaCl, plates wavenumbers reported in  $\text{cm}^{-1}$ . TLC: Merck 60 F254. Column chromatography: Merck silica gel 200-300 mesh. GC-MS: Agilent Technologies, column HP5 5% Ph-Me Silicon MS: Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, EI voltage 70 eV, gradient from 50 °C to 280 °C in 30 min. HPLC-MS, HPLC: Agilent Technologies H29100, column ZOBAX-Eclipse XDB-C8 Agilent Technologies, mobile phase:  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ , gradient from 30% to 80% of  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 8 min, 80% of  $\text{CH}_3\text{CN}$  until 25 min, 0.4 mL/min MS: Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, full-scan mode from  $m/z$  50 to  $m/z$  2600, scan time 0.1 s in positive ion mode, ESI spray voltage 4500 V, nitrogen gas

35 psi, drying gas flow 11.5 mL/min, fragmentor voltage 20 V. Elemental analysis were performed on a Thermo Flash 2000 CHNS/O Analyzer, and they were within  $\pm 0.4$  % of the theoretical values. A Shimadzu UV-1601 PC spectrophotometer was used for spectrophotometric measurements.

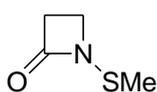
Azetidinones **34**, and **4**, **17**, **19**, **29**, **20**, **22**, **30**, **31**, were prepared as previously reported.

#### 1-(methylsulfonyl)-4-oxoazetidin-2-yl acetate (**36**):



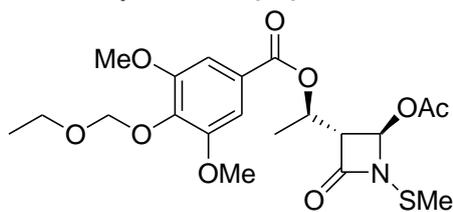
A 1 M solution of LiHMDSA (1.1 mL, 1.1 mmol) was added to a solution of 4-acetoxy-2-azetidinone (129 mg, 1.0 mmol) in THF (10 mL) at  $-78$  °C under inert atmosphere, followed by methansulfonyl chloride (194  $\mu$ L, 2.5 mmol). The solution was allowed to warm to room temperature and was monitored by TLC. After 3 h the reaction was quenched with aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (15 mL) and extracted with EtOAc (3x10 mL). The organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the residue was purified by flash-chromatography (cyclohexane/ethylacetate: 60/40) to afford product **36** (42 mg, 20%) as a pale yellow oil. Found C, 34.92; H, 4.51; N, 6.90; S, 15.32%.  $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_5\text{S}$  requires C, 34.78; H, 4.38; N, 6.76; S, 15.48%;  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2970, 2917, 1757 and 1161.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2.17 (3 H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 3.10 (1 H, dd,  $J=2.0$  and 16.4 Hz, CHCHH), 3.23 (3 H, s,  $\text{SO}_2\text{CH}_3$ ), 3.54 (1 H, dd,  $J=4.8$  and 16.4 Hz, CHCHH), 6.47 (1 H, dd,  $J=2.0$  and 4.8 Hz, CHCHH).  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 20.7, 42.5, 45.7, 75.6, 161.0, 169.3. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 2.47$  min,  $m/z$ : 225  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ , 230  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 246  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , 437  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ .

#### 1-(methylthio)azetidin-2-one (**35**):



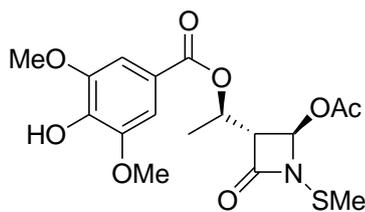
LiHMDSA (2.2 mL 1M solution in THF, 2.2 mmol) was added to a solution of 2-azetidinone (142 mg, 2 mmol) in THF (14 mL) at  $-78$  °C under inert atmosphere, followed shortly by *S*-methyl methanethiosulfonate (514  $\mu$ L, 5 mmol). The solution was allowed to warm to room temperature and was monitored by TLC. After 3 h, the reaction was quenched with aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (15 mL) and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the residue was purified by flash-chromatography (cyclohexane/ethylacetate: 75/25) to afford product **35** (187 mg, 80%) as a pale yellow oil. Found C, 40.83; H, 5.98; N, 11.87; S, 27.15 %;  $\text{C}_4\text{H}_7\text{NOS}$  requires C, 41.00; H, 6.02; N, 11.95; S, 27.37%;  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2970, 2917, 1757 and 1161.  $\delta_{\text{H}}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2.41 (3 H, s, SMe), 3.04 (2 H, t,  $J = 4.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.40 (2 H, t,  $J = 4.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 21.9, 38.7, 43.0, 170.9. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 1.97$  min,  $m/z$ : 118  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 135  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ , 140  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 257  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ . GC-MS (EI, 70eV):  $R_t = 8.04$  min,  $m/z$ : 117 (40%,  $\text{M}^+$ ), 75 (100,  $\text{M} - \text{COCH}_2$ ), 60 (50,  $\text{M} - \text{COCH}_2 - \text{Me}$ ).

#### (*R*)-1-((2*R*,3*R*)-2-acetoxy-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethyl-4-(ethoxymethoxy)-3,5-dimethoxybenzoate (**37**):



To a solution of **19** (117 mg, 0.53 mmol), in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) at  $0^\circ\text{C}$  under inert atmosphere, the acid **44** (216 mg, 0.84 mmol), DMAP (13 mg, 0.11 mmol) and DCC (174 mg, 0.84 mmol) were added. After 10 minutes the mixture was allowed to warm to room temperature. After 70 hours the reaction was washed with cool water and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x15 mL). The collected organic phases were dried on  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated. The residue was treated with EtOAc and filtered. The solid was discarded whereas the solvent was evaporated and purified by flash-chromatography (cyclohexane/EtOAc: 70/30) obtaining product **37** (177 mg, 73%) as a white syrup. Found C, 52.58; H, 5.94; N, 3.11; S, 6.89%;  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_9\text{S}$  requires C, 52.51; H, 5.95; N, 3.06; S, 7.01%;  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -3.25$  (c 1.6 in  $\text{CHCl}_3$ ).  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3323, 2926, 2850, 1789, 1755, 1716 and 1126.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1.17 (3 H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.48 (3 H, d,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOCO}$ ), 2.14 (3 H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.47 (3 H, s, SMe), 3.46 (1 H, dd,  $J = 1.2$  and 6.4 Hz, CHCHO), 3.84 (2 H, q,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 3.87 (6 H, s, 2 x OCH<sub>3</sub>), 5.20 (2 H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.43 (1 H, quintet,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHO}$ ), 6.21 (1 H, d,  $J = 1.2$  Hz, CHOAc), 7.22 (2 H, s, arom.).  $\delta_{\text{C}}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 14.8, 18.2, 20.8, 22.8, 56.1, 64.1, 64.9, 66.9, 81.5, 96.4, 106.7, 125.1, 138.9, 153.0, 164.9, 167.3, 169.6. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 8.62$  min,  $m/z$ : 475  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ .

**(R)-1-((2R,3R)-2-acetoxy-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethyl-4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzoate (38):**

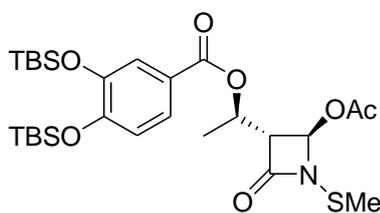


A stirred solution of **37** (76 mg, 0.17 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  under inert atmosphere was treated with aliquots of trifluoroacetic acid (12  $\mu\text{L}$ , 0.17 mmol) every 15 minutes until the disappearing of the starting material.

After the completion of the reaction, the solvent and the trifluoroacetic acid were evaporated to obtain **38** (55 mg, 81%) as a yellow oil. Found C, 51.03; H, 5.37; N, 3.44; S, 7.89%;  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_8\text{S}$  requires C, 51.12; H, 5.30; N, 3.51; S, 8.03%;  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -36.3$  (c 0.52 in  $\text{CHCl}_3$ ).  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3412, 2938, 2850, 1783, 1756,

1711 and 1116.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1.50 (3 H, d,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOCO}$ ), 2.16 (3 H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.49 (3 H, s,  $\text{SCH}_3$ ), 3.48 (1 H, dd,  $J = 1.2$  and 6.0 Hz,  $\text{CHCHOCO}$ ), 3.94 (6 H, s, 2 x  $\text{OCH}_3$ ), 5.44 (1 H, quintet,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHO}$ ), 5.97 (1 H, s, OH), 6.23 (1 H, d,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CHOAc}$ ), 7.26 (2 H, s, arom.).  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 18.3, 20.8, 22.9, 56.4, 64.2, 66.7, 81.5, 106.7, 120.6, 139.5, 146.6, 165.2, 167.5, 169.7. HPLC-MS (ESI):  $R_{\text{t}} = 5.68$  min,  $m/z$ : 417  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ , 422  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 821  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ .

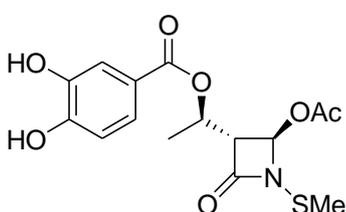
**(R)-1-((2R,3R)-2-acetoxy-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethyl-3,4-bis((tert-butyl)dimethylsilyloxy)benzoate (41):**



To a solution of **19** (121 mg, 0.55 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8.2 mL), compound **47** (210 mg, 0.55 mmol) and DMAP (67 mg, 0.55 mmol) were added. The mixture was then cooled to  $0^\circ\text{C}$ , EDC (105 mg, 0.55 mmol) was added and the system was allowed to reach rt in 10 minutes. After 30h, the reaction was quenched with water and some drops of HCl (1 M), extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried on  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated. The silylated intermediate **41** was obtained after flash-cromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$  99/1) in 23% yield

(73 mg) as an oil.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -13.8$  (c 0.5 in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3427, 2930, 2858, 1793, 1758, 1719 and 1120.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 0.22 (6 H, s,  $\text{Si}t\text{BuMe}_2$ ), 0.23 (6 H, s,  $\text{Si}t\text{BuMe}_2$ ), 0.99 (9 H, s,  $\text{Si}t\text{BuMe}_2$ ), 1.00 (9 H, s,  $\text{Si}t\text{BuMe}_2$ ), 1.47 (3 H, d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOCO}$ ), 2.17 (3 H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.47 (3 H, s,  $\text{SCH}_3$ ), 3.47 (1 H, dd,  $J = 1.6$  and 6.0 Hz;  $\text{CHCHO}$ ), 5.45 (1 H, quintet,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHO}$ ), 6.26 (1 H, d,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CHOAc}$ ), 6.82-6.84 (1 H, m, Ar), 7.46-7.49 (2 H, m, Ar).  $\delta_{\text{C}}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) -4.2, -4.1, -4.1, -4.0, 18.3, 18.4, 18.5, 20.9, 22.8, 25.8, 25.9, 64.1, 66.3, 81.0, 120.4, 122.3, 122.9, 123.6, 146.8, 152.0, 165.0, 167.5, 169.8. HPLC-MS (ESI):  $R_{\text{t}} = 26.6$  min,  $m/z$ : 601  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ , 606  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1190  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ .

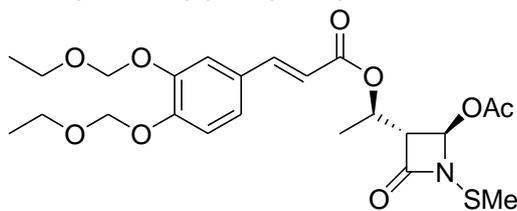
**(R)-1-((2R,3R)-2-acetoxy-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethyl-3,4-dihydroxy benzoate (39):**



To a solution of **41** (47 mg, 0.08 mmol) in anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1.64 mL) under inert atmosphere and at  $0^\circ\text{C}$   $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (23  $\mu\text{L}$ , 0.182 mmol) was added dropwise. After 30 minutes the ice-bath was removed, and after 45 minutes at rt the reaction was quenched with a pH = 6 phosphate buffer solution 0.1M, extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried on  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated. The crude was finally triturated to afford the desired product **39** in 46% yield (13 mg) as a light yellow oil. Found C, 50.96; H, 4.91; N, 3.96; S, 8.95 %.  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_7\text{S}$  requires C, 50.70; H, 4.82; N, 3.94; S, 9.02%.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -13.7$  (c 0.25 in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3371, 2983, 2929, 1781, 1761, 1713,

1602 and 1294.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1.47 (3 H, d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOCO}$ ), 2.18 (3 H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.47 (3 H, s,  $\text{SCH}_3$ ), 3.49 (1 H, dd,  $J = 1.2$  and 4.8 Hz;  $\text{CHCHO}$ ), 5.46 (1 H, quintet,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHO}$ ), 6.28 (1 H, d,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CHOAc}$ ), 6.86 (1 H,  $J = 8.4$  Hz, Ar), 7.44 (1 H, dd,  $J = 2.0$  and 8.4 Hz; Ar), 7.50 (1 H, d,  $J = 2.0$  Hz, Ar).  $\delta_{\text{C}}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 18.3, 20.9, 22.7, 64.0, 66.3, 80.8, 114.8, 116.5, 121.8, 123.5, 143.4, 149.2, 165.3, 168.2, 170.1. HPLC-MS (ESI):  $R_{\text{t}} = 5.0$  min,  $m/z$ : 373  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ , 378  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 733  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ .

**(E)-1-((2R,3R)-2-acetoxy-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethyl-3-(3,4-bis(ethoxymethoxy)phenyl)acrylate (42):**

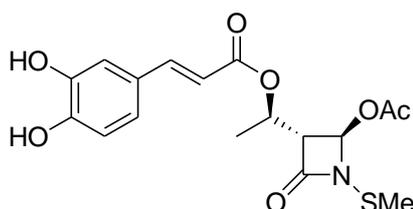


To a solution of **19** (68 mg, 0.31 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (11.6 mL), compound **46** (145 mg, 0.49 mmol) and DMAP (7.6 mg, 0.06 mmol) were added. The mixture was then cooled to  $0^\circ\text{C}$ , DCC (101 mg, 0.49 mmol) was added and the system was allowed to reach r.t. in 15 minutes. After 65 h, the reaction was quenched with water, extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried on  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , evaporated and triturated with  $\text{AcOEt}$  to separate

dicyclohexylurea precipitate. The solution was then evaporated and purified by flash-cromatography (cyclohexane/ethylacetate 90/10 to 80/20) to afford the product in 61% yield (94 mg) as an oil. Found C, 55.78; H, 6.32; N, 2.68; S, 6.30 %;  $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_9\text{S}$  requires C, 55.52; H, 6.28; N, 2.82; S, 6.44%.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -7.4$  (c 0.84

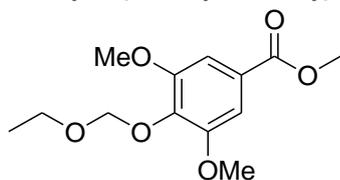
in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3327, 2977, 2930, 1789, 1757, 1711, 1635, 1599, 1510, 1437, 1251 and 1159.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.21-1.28 (6 H, m, 2 x OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.44 (3 H, d,  $J$  = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>CHO), 2.17 (3 H, s, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>), 2.51 (3 H, s, SCH<sub>3</sub>), 3.42 (1 H, dd,  $J$  = 1.6 and 6.0 Hz; CHCHO), 3.74-3.81 (4 H, m, 2 x OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.30 (2 H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.31 (2 H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.37 (1 H, quintet,  $J$  = 6.0 Hz, CH<sub>3</sub>CHO), 6.22 (1 H, d,  $J$  = 1.6 Hz, CHOAc), 6.25 (1 H, d,  $J$  = 16.0 Hz, CH=CHCO), 7.13 (1 H, dd,  $J$  = 2.0 and 8.0 Hz, arom), 7.19 (1 H, d,  $J$  = 8.0 Hz, arom), 7.37 (1 H, d,  $J$  = 2.0 Hz, arom), 7.53 (1 H, d,  $J$  = 16.0 Hz, CH=CHCO).  $\delta_{\text{C}}$  (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 15.0, 15.1, 18.3, 20.9, 22.7, 64.1, 64.5, 64.6, 66.1, 80.9, 93.8, 94.1, 115.5, 115.7, 116.0, 123.4, 128.4, 145.3, 147.5, 149.5, 165.9, 167.5, 169.8. HPLC-MS (ESI):  $R_{\text{t}}$  = 9.9 min,  $m/z$ : 515 [M + H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 520 [M + Na]<sup>+</sup>, 1017 [2M + Na]<sup>+</sup>.

**(E)-(R)-1-((2R,3R)-2-acetoxy-1-(methylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethyl-3-(3,4-dihydroxy phenyl) acrylate (40):**



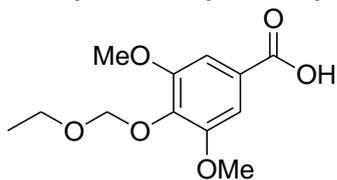
To a solution of **42** (94 mg, 0.19 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (23 mL) under inert atmosphere aliquots of TFA (64.5  $\mu$ L, 0.869 mmol) were added every 15 minutes until the disappearing of the starting material (TLC monitoring). The solution was evaporated and the crude was purified by flash-cromatography (cyclohexane/ethylacetate 40/60). The product obtained from the collected fractions was finally triturated with pentane to afford the desired product **40** as a white solid in 90% yield (65 mg). Found C, 53.89; H, 5.13, N 3.55; S, 8.37 %; C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>7</sub>S requires C, 53.53; H, 5.02; N, 3.67; S, 8.41%; mp: 53-58 °C.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$  -19.3 (c 1.11 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3391, 2933, 1755, 1716, 1605, 1515, 1445, 1397, 1260 and 1056.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.44 (3 H, d,  $J$  = 6.0 Hz, CH<sub>3</sub>CHOCO), 2.19 (3 H, s, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>), 2.52 (3 H, s, SCH<sub>3</sub>), 3.44 (1 H, dd,  $J$  = 1.2 and 5.2 Hz; CHCHO), 5.38 (1 H, quintet,  $J$  = 6.0 Hz, CH<sub>3</sub>CHO), 6.18 (1 H, d,  $J$  = 16.0 Hz; CH=CHCO), 6.23 (1 H, d,  $J$  = 1.2 Hz; 1H, CHOAc), 6.87 (1 H, d,  $J$  = 8.0 Hz, arom), 6.97 (1 H, dd,  $J$  = 2.0 and 8.4 Hz; arom), 7.06 (1 H, d,  $J$  = 1.6 Hz; arom), 7.54 (1 H, d,  $J$  = 16.0 Hz; CH=CHCO).  $\delta_{\text{C}}$  (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 18.2, 20.9, 22.7, 63.8, 65.9, 80.8, 114.1, 114.3, 115.4, 122.4, 126.9, 144.2, 146.1, 147.0, 166.5, 168.5, 170.1. HPLC-MS (ESI):  $R_{\text{t}}$  = 5.6 min,  $m/z$ : 399 [M + H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 404 [M + Na]<sup>+</sup>, 785 [2M + Na]<sup>+</sup>.

**Methyl 4-(ethoxymethoxy)-3,5-dimethoxybenzoate (43):**



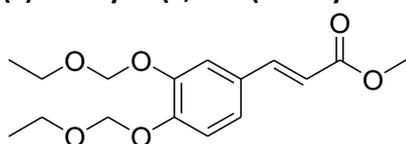
A solution of methyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate (1.24 g, 5.9 mmol) in THF (10 mL) was added dropwise to a suspension of NaH (60% in mineral oil, 306 mg, 7.6 mmol) in THF (20 mL) at 0 °C under inert atmosphere. After 10 minutes a solution of chloromethylethylether (1.1 mL, 11.75 mmol) in THF (7 mL) was added dropwise and the reaction was allowed to warm to room temperature and monitored by TLC. After 2 h the reaction was quenched with aqueous NH<sub>4</sub>Cl (30 mL) and extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to obtain product **43** (1.46 g, 92%) as pale yellow solid. Found C, 57.62; H, 6.80 %; C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub> requires C, 57.77; H, 6.71 %; mp: 52.7-55.6 °C.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2926, 1720, 1592 and 1128.  $\delta_{\text{H}}$  (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.21 (3 H, t,  $J$  = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.88 (2 H, q,  $J$  = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.90 (6 H, s, 2 x OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3 H, s, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.23 (2 H, s, OCH<sub>2</sub>O), 7.31 (2 H, s, arom).  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 14.6, 51.8, 55.8, 64.6, 96.2, 106.4, 125.3, 138.4, 152.8, 166.3. HPLC-MS (ESI):  $R_{\text{t}}$  = 7.81 min,  $m/z$ : 271 [M + H]<sup>+</sup>, 293 [M + Na]<sup>+</sup>, 309 [M + K]<sup>+</sup>.

**Methyl 4-(ethoxymethoxy)-3,5-dimethoxy benzoic acid (44):**



A stirred solution of **43** (730 mg, 2.7 mmol) in 10 mL of a mixture of THF/MeOH: 90/10 was treated with 5 M NaOH (2.7 mL). The reaction was heated at 40 °C for 4 hours and monitored by TLC. At completion, EtOAc (10 mL) was added and the organic phase was separated and discarded. The aqueous phase was then cooled to 0 °C and adjusted to pH 6 with aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The mixture was extracted with EtOAc (3 x 15 mL), dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to afford **44** (432 mg, 63%) as a white solid. Found C, 56.18; H, 6.34 %; C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> requires C, 56.24; H, 6.29 %; mp: 107.7-109.4 °C.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3398, 2924, 1716, 1589 and 1120.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.22 (3 H, t,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.89 (2 H, q,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.92 (6 H, s, 2 x OCH<sub>3</sub>), 5.26 (2 H, s, OCH<sub>2</sub>O), 7.37 (2 H, s, arom).  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 14.8, 56.0, 64.9, 96.3, 107.1, 124.5, 139.3, 153.0, 171.5. HPLC-MS (ESI):  $R_{\text{t}}$  = 1.53 min,  $m/z$ : 279 [M + Na]<sup>+</sup>, 535 [2M + Na]<sup>+</sup>.

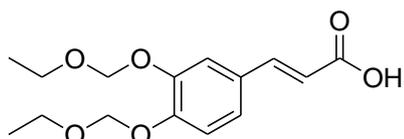
**(E)-methyl 3-(3,4-bis(ethoxymethoxy)phenyl)acrylate (45):**



A solution of caffeic acid methyl ester [37] (540 mg, 2.78 mmol) in THF (6 mL) was added dropwise into a solution of NaH (60% dispersion in oil, 289 mg, 7.2 mmol) in THF (15 mL) under inert atmosphere and at 0 °C. After 10 minutes a solution of chloromethyl ethyl ether (1.01 mL, 11.1

mmol) in THF (7 mL) was added dropwise. After 2 h the solution was allowed to rt and quenched by adding a saturated NH<sub>4</sub>Cl solution, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The product **45** was obtained in 90% yield (776 mg) after flash-cromatography (cyclohexane/ethylacetate 90/10) as a colorless oil. Found C, 62.12; H, 7.38 %; C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> requires C, 61.92; H, 7.15 %;  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2977, 2900, 1717, 1634, 1600, 1582, 1511, 1436, 1393, and 1105.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.21-1.27 (6 H, m, 2 x OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.74-3.81 (4 H m, 2 x OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.81 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>), 5.30 (1 H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.31 (1 H, s, OCH<sub>2</sub>O), 6.33 (1 H, d, *J* = 16.0 Hz, CH=CHCO), 7.15 (1 H, dd, *J* = 2.0 and 8.0 Hz; arom), 7.19 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, arom), 7.39 (1 H d, *J* = 1.6 Hz; arom), 7.63 (1 H, d, *J* = 16.0 Hz, CH=CHCO).  $\delta_{\text{C}}$  (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.9, 15.0, 51.4, 64.3, 64.4, 93.6, 94.0, 115.5, 115.9, 116.0, 123.1, 128.5, 144.4, 147.4, 149.2, 167.4. HPLC-MS (ESI): *R*<sub>t</sub> = 9.2 min, *m/z*: 311 [M + H]<sup>+</sup>, 333 [M + Na]<sup>+</sup>, 349 [M + K]<sup>+</sup>.

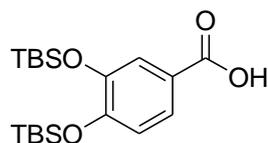
#### (*E*)-3-(3,4-bis(ethoxymethoxy)phenyl)acrylic acid (**46**):



A stirred solution of **45** (310 mg, 1 mmol) in 3.8 mL of a mixture of THF/MeOH 90/10 was treated with 1 mL NaOH 5M, warmed at 40°C and stirred for 4 h. After completion, AcOEt (6 mL) was added and discharged. The aqueous phase was treated with HCl (1M), extracted with AcOEt, the organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to

afford the desired product in 96% yield (284 mg) as a white solid. Found C, 60.52; H, 6.95 %; C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> requires C, 60.80; H, 6.80 %; mp: 101-103 °C.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2976, 1683, 1626, 1596, 1514, 1418, 1244 and 1114.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.22-1.29 (6 H, m, 2 x OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.75-3.85 (4 H, m, 2 x CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 5.31 (1 H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.33 (1 H, s, OCH<sub>2</sub>O), 6.35 (1 H, d, *J* = 16.0 Hz; CH=CHCO), 7.18 (1 H, dd, *J* = 1.6 and 8.8 Hz; 1H, arom), 7.22 (1 H, d, *J* = 8.8 Hz, arom), 7.42 (1 H, d, *J* = 1.6 Hz, arom), 7.73 (1 H, d, *J* = 16.0 Hz, CH=CHCO).  $\delta_{\text{C}}$  (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 15.0, 15.1, 64.5, 64.6, 93.8, 94.2, 115.5, 115.8, 116.0, 123.7, 128.3, 146.8, 147.5, 149.7, 172.1. HPLC-MS (ESI): *R*<sub>t</sub> = 1.90 min, *m/z*: 297 [M + Na]<sup>+</sup>, 319 [2M + Na]<sup>+</sup>, 335 [M+K]<sup>+</sup>.

#### 3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzoic acid (**47**):



To a solution of 3,4-dihydroxy-benzoic acid (500 mg, 3.24 mmol) in DMF (5.8 mL) under inert atmosphere, imidazole (1.983 g, 29.16 mmol) and then TBSCl (2.200 g, 14.6 mmol) were added. After 66 h the reaction was quenched at 0°C by adding water, and then extracted with Et<sub>2</sub>O (10 x 4 mL). The organic phases were washed twice with water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. To the persilylated intermediate (2.049 g, 4.12 mmol) in a 6 mL MeOH/THF 40/60, a solution of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (231 mg, 1.67 mmol) in water (2.2 mL) was added. After 12 h the mixture was quenched a 0°C by adding a

saturated solution of citric acid and extracted with Et<sub>2</sub>O. The organic phases were washed with water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The product was finally obtained by flash-cromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN: 90/10) in 75% yield (930 mg) as a white solid (found C, 59.64; H, 8.96 %). C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> requires C, 60.80; H, 6.80 %; mp: 152-154 °C;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.24 (6 H, s, SitBuMe<sub>2</sub>), 0.25 (6 H, s, SitBuMe<sub>2</sub>), 1.00 (9 H, s, SitBuMe<sub>2</sub>), 1.01 (9 H, s, SitBuMe<sub>2</sub>), 6.88 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz, arom); 7.60 (1 H, d, *J* = 2.0 Hz, arom), 7.63 (1 H, dd, *J* = 1.6 and 8.8 Hz; 1H, arom);  $\delta_{\text{C}}$  (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) -4.1, -4.0, 18.4, 18.5, 25.8, 25.9, 120.5, 122.4, 122.7, 124.4, 146.8, 152.5, 171.2.

### Metodologie di determinazione della attività antiossidante

#### Saggio BR

Relative antioxidant activity (r.a.c.) with respect to a substance chosen as standard, resorcinol (Re) in our case, is determined on the basis of concentrations of sample and resorcinol that give the same *t*<sub>inhib</sub>; r.a.c. is expressed as  $\mu\text{M}$  resorcinol equivalents [18]. Oscillatory behaviours V(Pt) were followed potentiometrically by using the couple bright platinum electrode (Hamilton 238 945) – Ag/AgCl double junction electrode (Ingold 373-90-WTE-ISE-S7) connected to a multimeter (WTW pH 540 GLP), controlled by a PC. Reacting mixtures were thermostated at 25.0 ± 0.1 °C. The straight line of the standard was checked before each series of measurements.

More details on the experimental procedure are reported in refs. [18, 19, 34].

#### Saggio TEAC

The radical cation is preformed by reaction between ABTS and K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> in PBS medium, pH = 7.4. The mixture was kept in the dark until the reaction was complete and absorbance at 734 nm stable. Spectroscopic measurements were performed in triplicate at four concentration of the  $\beta$ -lactams in DMSO. Suitably diluted solutions of the standard (Trolox) were treated in the same way. In brief, 3.0 mL of diluted ABTS<sup>•+</sup> solution and 30  $\mu\text{L}$  of sample were mixed in a photometric cuvette and absorbance was measured at 734 nm at

---

exactly 6 min after the mixing of the reagents ( $T = 30.0 \pm 0.1$  °C). A blank with DMSO was measured in the same way. The difference between the absorbance of the blank and the sample gave  $\Delta E_6$  ( $E_{6\text{blank}} - E_{6\text{sample}} = \Delta E_6$ ). Data ( $\Delta E_6$  vs conc (mM)) are well fitted by straight lines through the origin (following the Lambert-Beer law). Then, the relative antioxidant activity with respect to Trolox (TEAC) was obtained by the ratio:

$$\text{TEAC} = m(\text{sample})/m(\text{Trolox})$$

where  $m(\text{sample})$  and  $m(\text{Trolox})$  are the slopes of the straight lines of the sample and the standard respectively. Standard error of this ratio is calculated in the usual way.

Here also the straight line of the standard was always checked before each series of measurements.

#### Saggio DPPH

The principle of this method is the decolorization of the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) by antioxidants [21, 22]. The DPPH<sup>•</sup> is intensely purple colored ( $\lambda_{\text{max}} = 512\text{-}530$  nm) due to the presence of the picric group (1,3,5-nitrobenzene) and is stabilized by either the steric hindrance of the aromatic substituents and the delocalization of the unpaired electron on the whole structure. The disappearance of this radical due to the addition of an antioxidant H-donor, may be evaluated spectrophotometrically, at its absorption maximum in methanol (515 nm). The measured decrease in absorbance at 515 nm is an expression of the antioxidant capacity of a sample [35]. The extent of the decolorization is a function of concentration and time. Trolox was used as the standard. In practice 2.900 mL of DPPH<sup>•</sup> methanolic solution were placed in a cuvette and the initial absorbance,  $A_0$ , was measured. Then 100  $\mu\text{L}$  were added and mixed; after 15 minutes the final absorbance,  $A_f$ , was measured. The percentage of inhibition was calculated according to the following equation (%) Inhibition =  $(1 - A_f/A_0) \times 100$ . The same procedure was repeated with the standard. Data (%inhib vs conc (mM)) are well fitted by straight lines through the origin (following the Lambert-Beer law). Then, the relative antioxidant activity with respect to Trolox was obtained by the ratio:  $\text{DPPH} = m(\text{sample})/m(\text{Trolox})$ .

#### Saggio FRAP

2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine- $\text{Fe}^{3+}$  (FRAP reagent) was prepared by mixing suitable amounts of TPTZ and  $\text{FeCl}_3$  solutions in aqueous acetate buffer. In brief, 3.0 mL of FRAP reagent and 100  $\mu\text{L}$  of suitably diluted sample were mixed in a photometric cuvette and absorbance was measured after exactly 4 min after the mixing ( $T = 25.0 \pm 0.1$ °). The absorbance of the blue  $\text{Fe}^{2+}$  complex is measured at 593 nm (Shimadzu UV-1601 PC spectrophotometer). Four or five different sample concentration were tested and the straight line Abs vs. conc. was then compared with that of the standard ( $\text{FeSO}_4$ ). The Lambert-Beer law is followed, then the ratio:  $\text{FRAP} = m(\text{sample})/m(\text{Fe}^{2+})$  gives the relative ferric reducing activity (mmol equiv.  $\text{Fe}^{2+}$ ).

#### Voltammetria Ciclica

All electrochemical experiments were conducted in Acetonitrile from Sigma-Aldrich (> 99.5% over molecular sieves) after careful deaeration of the reaction mixture with argon; in all instances a silver wire was used as a pseudo-reference electrode, while a platinum coil was used as a counter electrode. Voltammetric analysis was performed with platinum, gold and glassy carbon working electrodes ( $\varnothing=2\text{mm}$ ) using a function generator AMEL mod 568 equipped with a digital oscilloscope.

#### Attività Biologica

##### Bacterial isolates

A collection of 45 recently isolated and well characterized for the antimicrobial susceptibility phenotype MRSA strains recovered from CF patients was tested. All the strains were isolated at the Department of Pediatrics, CF Center, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milano

##### Determinazione della suscibilità antibatterica

The *in vitro* susceptibility of methicillin-resistant isolates of *S. aureus* to new antimicrobial compounds was evaluated by means of the broth microdilution method for the determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC), in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards) guidelines [38].

Briefly, serial two-fold dilutions were made of the compounds in 96-well plates in order to obtain concentrations ranging from of 0.06–128 mg/L in cation-adjusted Muller-Hinton broth (DIFCO). An equal volume of  $1 \times 10^6$  CFU/mL (Colony Forming Unit/mL) bacterial inoculum was added to each well of the microtitre plate containing 0.05 mL of the serial antibiotic concentrations. The microtitre plate was then incubated overnight at 37°C and subsequently analysed for the presence of visible bacterial growth. MIC was defined as the lowest concentration of the tested compound able to inhibit visible growth of the

---

microorganism after overnight incubation. All the tested compounds were solubilized in 100% DMSO and appropriate dilutions were set up to prevent its toxicity. Positive strain controls without antimicrobial compounds, controls with DMSO and uninoculated media were run parallel to the tested compounds under the same conditions.

*Staphylococcus aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 29213 (MSSA) and ATCC 43300 (MRSA) were used as control strains. Cefotaxime sodium salt was used as the reference antibiotic for MIC experiments validation. Breakpoints for resistance were those recommended by the CLSI [39].

### **Parte sperimentale relativa al capitolo 1.2.3.**

#### **I $\beta$ lattami**

Monocyclic  $\beta$ -lactams **P1** and **P2** were prepared according to procedures previously reported (Galletti et al., 2011) and summarized in Scheme 1. **P1** was prepared from the commercial 4-acetoxy-azetidinone with lithium hexamethyldisilylamide (LiHMDSA) and *S*-methyl-methanethiosulfonate in THF. **P2** was prepared from (3*R*,4*R*)-4-acetoxy-3-[(1*R*)-1-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-ethyl]-azetidin-2-one and *S*-methyl-methanethiosulfonate; in this case the *N*-thiomethylation was more efficiently conducted using  $\text{NEt}_3$  as the base in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  instead of LiHMDSA.

A stock solution of synthesized antibiotics **P1** and **P2**, with an estimated purity of 99%, were prepared dissolving known amount of each drug (both of dense oily appearance) in 5 mL ethyl acetate (RPE ACS grade, Carlo Erba). Amoxicillin trihydrate of 97% purity was furnished by Gellini International srl (Italy). A stock solution at the maximal solubility (1.3 mM) was prepared dissolving amoxicillin trihydrate powder in methanol. Known volumes of antibiotic stock solution were withdrawn and the solvent removed by evaporation. Then each antibiotic was dissolved in water (Millipore Ultra gradient) for hydrolysis experiments, or added with soils for soil degradation trials.

#### **Terreni**

Two soils from northern Italy (Bologna area) were selected for this study: soil 1 (S1) and 2 (S2). After collection of the soil first centimetres, the samples were air dried, sieved at < 2 mm, and stored at room temperature (RT) in the dark. Selected physical and chemical properties of the soils were measured. Soil pH was determined in water or 0.01 M  $\text{CaCl}_2$  aqueous solution with a soil:solution ratio of 1:2.5 w/w.  $\text{CaCO}_3$  content was evaluated by the Dietrich-Freuling calcimeter (Loeppert and Suarez, 1996). Particle size distributions were performed using the hydrometer method (Sheldrick and Wang, 1993). Water content of soils at wilting point (-15 bar) and at field capacity (-15 and -0.33 bar of suction pressure) were determined according to the gravimetric method at 105°C for 24 h. Total organic carbon content (TOC) was determined by CHN analyzer (Model EA 1110 CHNS-O, CE Instruments, UK).

Experiments conducted in soils under reduced microbial activity were performed by autoclaving the soils as reported by Alef (1995) and Trevors (1996) treating small portions of soils: shortly, before use, 50 g of soil were spread out in thin layer (1–2 cm) inside a glass flask, then autoclaved at 121°C and 1.1 atm for 1 h.

#### **Cinetica di idrolisi a diversi pH**

Antibiotic solutions were prepared in buffered media at pH 3 and 5 (20 mM trisodium citrate, Carlo Erba), and pH 7 and 9 (20 mM, dibasic potassium phosphate, Fluka). Sodium azide (0.1%, Carlo Erba) was finally added to the buffered solution in order to ensure the sterility of aqueous media. Buffered solutions, at the antibiotic concentrations of 100  $\mu\text{M}$  for product **P1** and 30  $\mu\text{M}$  for product **P2**, were kept in the dark at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  on a horizontal shaker for the entire duration of the trials. The low concentration for **P2** was due to its low solubility and resulted about 35  $\mu\text{M}$  at RT as determined by HPLC. At specific times, aliquots of buffered antibiotic solutions were withdrawn and directly analyzed in HPLC. The experiments were run in triplicate. Buffered solutions at pH 3, 5, 7, and 9 of amoxicillin (100  $\mu\text{M}$ ) were prepared for comparison.

#### **Cinetica di degradazione nei terreni**

Experiments of antibiotic degradation in soils S1 and S2 (both untreated and autoclaved) at RT were performed at wilting point and at field capacity. Also experiments with soils alone were run as control. All experiments were run in triplicate.

#### **Punto di Wilting**

Experiments at the wilting point were set preparing a number of trials where 5  $\mu\text{L}$  of **P1** or **P2** stock solutions were placed in polyallomer centrifuge tubes (Nalgene®) and, after removal of the solvent by evaporation,

---

added with 2.5 g of soil S1 or S2 both at the wilting point (2.3% and 1.5% soil dry weight - DW - *vide infra* Table 2). The final concentrations for **P1** and **P2** were 0.5 and 0.14 mmol kg<sup>-1</sup> soil DW, respectively. To follow the degradation in soils at wilting point, at specific time intervals, suitable milliQ water volumes were added to centrifuge tubes in order to reach the final value of 5 mL (4.942 mL in S1 and 4.962 mL in S2) and kept on a horizontal shaker for 15 min. The supernatants were then separated from soil particles by two centrifugation cycles at 15000 g for 15 min each, and directly analyzed by HPLC. To desorb any chemicals possibly adsorbed on soil solid phases, each pellet was shaken for 15 min with a mixture of acetonitrile and methanol 50%:50% v:v (4.3 and 4.085 mL for S1 and S2, respectively, to reach a final volume of 5 mL). The antibiotics amounts in the residual water after centrifugation were then subtracted from the measured concentration. Each trial was used to give one concentration point: after analysis, the extracted soil and supernatant were discarded. The same trials were conducted in soils under reduced microbial activity (soils autoclaved as reported above). The persistence of amoxicillin in untreated and autoclaved soils at the concentration of 0.2 mmol kg<sup>-1</sup> soil DW was also performed at wilting point as comparison test.

### **Field Capacity**

Experiments at field capacity were set placing in polyallomer centrifuge tubes (Nalgene®) 5 µL of **P1** or **P2** stock solutions and, after removal of the solvent by evaporation, adding with 2.5 g of dry soil S1 and S2 both brought at the field capacity (28.0% and 36.6% soil dry weight - DW – *vide infra* Table 2). The final concentration for **P1** and **P2** was 0.5 and 0.14 mmol kg<sup>-1</sup> soil DW, respectively.

At specific times, soils were extracted with suitable milliQ water volumes added to centrifuge tubes in order to reach the final value of 5 mL (4.300 mL in S1 and 4.085 mL in S2) and kept on a horizontal shaker for 15 min. After that, soils were extracted and processed in the same way as described for the wilting point condition. The same experiments were conducted in soils under reduced microbial activity (autoclaved as reported above). The persistence of amoxicillin in untreated and autoclaved soils at the concentration of 0.2 mmol kg<sup>-1</sup> soil DW was also performed as comparison.

### **Analisi Cromatografiche**

#### **HPLC-DAD**

The concentration of **P1** and **P2** and of their degradation products was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The system was assembled with a Jasco 880-PU Intelligent pump, a Jasco AS-2055 plus Intelligent sampler, a Jasco 875-UV Intelligent UV-vis detector at 195 nm, a Jones Chromatography model 7971 column heater set at 35°C, and a Borwin Chromatography Software.

For **P1** the analytical column was a Synergi 4 u Hydro – RP 80A (150x4.60 mm) eluted with 10% acetonitrile (HPLC grade, J.T.Baker) and 90% milliQ water at 1 ml min<sup>-1</sup>. Under these chromatographic conditions **P1** retention time was 12.9 min.

**P2** was monitored with a Kinetex 2.6u PFP 100A (100x4.60 mm) analytical column eluted with 55% acetonitrile and 45% milliQ water at 0.3 ml min<sup>-1</sup> with 7.20 min retention time. **P2** transformation products were followed applying **P1** analytical set up. The different analytical conditions applied to **P2** compared to its degradation products was mainly due to the *tert*-butyldimethyl silyl group contained in the **P1** structure (but not in its degradation products) that renders **P1** extremely hydrophobic (CLog K<sub>ow</sub> = 3.8789, Scheme 1).

The UV spectra of **P1** and **P2** (not reported for brevity) were characterized by an intense absorption at wavelength lower than 195 nm and a weak absorption at 241 and 237 nm, respectively. The absorption was even weaker at wavelength longer than 300 nm. Though the maximal absorption was not centred at 195 nm, the HPLC UV detector was set at this value for both antibiotics due to the low intensity of the signal in the range 241-237 nm. In addition, product **P2** is scarcely soluble in water (ca. 35 µM at RT) owing to its high value of CLogKow (3.8789, Scheme 1) and its signal at 237 nm resulted undetectable in a complex matrix such as soil.

Amoxicillin was quantified at 274 nm with a Waters Spherisorb 5µm C8 (250x4.6 mm) analytical column eluted with 90% milliQ water (pH 5 by formic acid, Riedel-de Haën) and 10% methanol (HPLC grade, J.T.Baker) at 1 ml min<sup>-1</sup>. Amoxicillin retention time under these conditions was 4.7 min.

The quantitative determination of products **P1**, **P2**, and amoxicillin was performed measuring the average value of triplicate injections and was performed by using external standards ( $r_{\text{working line}} = 0.999, 0.994, 0.999$  for product **P1**, product **P2** and amoxicillin, respectively). Calculations were based on the average peak areas of the external standards.

The **P1** hydrolysis at alkaline pH gave rise to a number of primary byproducts named **P1-1**, **P1-2**, **P1-3**, and **P1-4**, whose retention times were 3.2, 1.7, 2.6, and 2.1 min and whose maximal adsorption wavelengths ( $\lambda_{\text{max}}$ ) were 239, 255, 262 and 327 nm, respectively. Product **P2** in water at acidic pH values gave a single UV-visible byproduct, monitored by Kinetex and related elution conditions, named **P2-1** (8.1 min retention time,

$\lambda_{\max} < 195$  nm) along with three additional products, monitored by Synergi analytical column and related elution conditions, which are named **P2-2** ( $\lambda_{\max}$  263, 3.30 min retention time), **P2-3** ( $\lambda_{\max}$  240, 3.65 min retention time), and **P2-4** ( $\lambda_{\max}$  255, 3.10 min retention time).

#### LC-ESI-MS single quadrupole

The LC-MS equipment was assembled as follows: HPLC Agilent Technologies 1100 series, DAD detector (UV lengths 210 nm and 254 nm), Phenomenex Gemini C18 column – 150x4.6 mm 3 i.d., flow 0.4 ml min<sup>-1</sup>; elution conditions: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN from 70/30 to 20/80 in 8 min; Agilent Technologies MS single quadrupole 1100 series mod. G 1946B, drying gas flow: 10.5 l min<sup>-1</sup>, nebulizer pressure 25 psig, drying gas temperature 350°C, capillary voltage 4500 positive scan, scan range: 100-2600 uma. The LC-ESI-MS analysis performed in positive scan gave the following *m/z* (%): 133 (100) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> for **P1-2** and 461 (50) [2M+Na]<sup>+</sup>, 242 (100) [M+Na]<sup>+</sup>, 220 (15) [M+H]<sup>+</sup> for **P2-1**. The [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> mass signal has been already reported to form under similar ionization conditions adopted for other  $\beta$ -lactams whose structures are very similar to **P1-2**.

#### LC-ESI-MS ion trap

The LC-MS equipment was assembled as follows: Agilent Technologies 1100 series HPLC, DAD detector (UV wavelength 210 and 254 nm), Agilent Technologies Eclipse XDB-C18 column - 150x4.6 mm 3 i.d., flow 0.4 ml min<sup>-1</sup>; elution conditions: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN from 70/30 to 20/80 in 8 min; Agilent Technologies MS Ion Trap 1100 series mod. G 2445D, drying gas flow: 11.0 l min<sup>-1</sup>, nebulizer pressure: 25 psig, drying gas temperature 300°C, capillary voltage 4500 in positive scan and 4000 in negative scan, scan 50-2200 uma. The LC-ESI-MS ion trap analysis performed in negative scan gave the following *m/z* (%): 246 (100) [M+2H<sub>2</sub>O+OH]<sup>-</sup> for **P1-1** and 182 (100) [M+H<sub>2</sub>O+OH]<sup>-</sup> for **P1-3**, 311 (90) [2M+H<sub>2</sub>O+NaCO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 293 (100) [2M+NaCO<sub>3</sub>]<sup>-</sup> for **P1-4**.

#### Analisi dei dati

Hydrolysis and, when possible, soil degradation kinetics data were processed according to first order rate law,  $\ln C/C_0 = -k_{\text{obs}} t$ , where *C* is the antibiotic concentration (in  $\mu\text{M}$  units) at *t* time, *C*<sub>0</sub> is the initial antibiotic concentration, and *k*<sub>obs</sub> is the first order rate degradation constant.

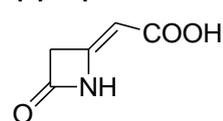
#### Parte Sperimentale relativa al paragrafo 1.3.1

##### Chimica: Parte Strumentale

All reactions were performed under an inert atmosphere (N<sub>2</sub>). Commercial reagents (reagent grade, >99%) were used as received without additional purification. Anhydrous solvents (CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, THF, ) were obtained commercially. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR values were recorded on a INOVA 400, or a GEMINI 200 instrument with a 5 mm probe. All chemical shifts have been quoted relative to deuterated solvent signals,  $\delta$  in ppm and *J* in Hz. FT-IR: Nicolet 380 measured as films between NaCl, plates wavenumbers reported in cm<sup>-1</sup>. TLC: Merck 60 F254. Column chromatography: Merck silica gel 200-300 mesh. GC-MS: Agilent Technologies, column HP5 5% Ph-Me Silicon MS: Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, El voltage 70 eV, gradient from 50 °C to 280 °C in 30 min. HPLC-MS, HPLC: Agilent Technologies H29100, column ZOBAX-Eclipse XDB-C8 Agilent Technologies, mobile phase: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, gradient from 30% to 80% of CH<sub>3</sub>CN in 8 min, 80% of CH<sub>3</sub>CN until 25 min, 0.4 mL/min MS: Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, full-scan mode from *m/z* 50 to *m/z* 2600, scan time 0.1 s in positive ion mode, ESI spray voltage 4500 V, nitrogen gas 35 psi, drying gas flow 11.5 mL/min, fragmentor voltage 20 V. Elemental analysis were performed on a Thermo Flash 2000 CHNS/O Analyzer. A Shimadzu UV-1601 PC spectrophotometer was used for spectrophotometric measurements.

##### Chimica: Sintesi

##### (Z)-2-(4-oxoazetididin-2-ylidene)acetic acid (**48**).

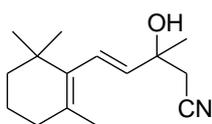


To a solution of **48** (220 mg, 1.01 mmol) in a 10 mL mixture of THF/Methanol 1:1 was added Pd 10% wt on activated Carbon (44 mg). The solution was treated with H<sub>2</sub> (1 atm) and after 2 h was filtered on celite and concentrated to give **48** (100 mg, 78%).

Yellow solid: mp = 162-163; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (DMSO *d*<sub>6</sub>):  $\delta$ =3.57 (s, 2H), 4.98 (s, 1H), 10.47 (brs, 1H), 11.94 (brs, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$ =46.0, 92.2, 153.3, 169.7,

171.0 ppm; IR (neat): 3289, 2919, 1828, 1185; HPLC-MS (ESI): *R*<sub>t</sub>=min 1.66, *m/z* (%): 128 [M+H]<sup>+</sup>, 150 [M+Na]<sup>+</sup>, 679 (70) [2M+Na]<sup>+</sup>; Found C, 47.20; H, 3.88; N, 11.04%; C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub> requires C, 47.25; H, 3.97; N, 11.02%.

**(E)-3-hydroxy-3-methyl-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)pent-4-enitrile (49);**

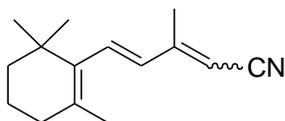


To a stirred solution of acetonitrile (330  $\mu$ L, 6.24 mmol) in dry THF (5 mL) at  $-78^\circ$  C under inert atmosphere were added dropwise *n*Butyllithium 2.5 M in THF (6.86 mmol, 2.74 mL) and thereupon a solution of  $\beta$ -ionone (1 g, 5.2 mmol) in dry THF (4 mL) were added over a period of 10 minutes. The solution was allowed to warm at room temperature and after 3 h the reaction was quenched with aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL) and extracted with EtOAc (3x10 mL). The organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated in vacuo. Flash chromatography (cyclohexane/EtOAc: 80/20) of the extracts gave **49** (1.031 g, 85%).

Pale yellow oil:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.92 (s, 6 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.35-1.38 (m, 2 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.41 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{C}(\text{OH})$ ), 1.49-1.55 (m, 2 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.58 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$ ), 1.88-1.91 (m, 2 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.56 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 3.34 (brs, 1 H, OH), 5.45 (d, 1 H,  $J$  = 16.0 Hz,  $\text{CH}=\text{CHC}(\text{OH})$ ), 6.11 (d, 1 H,  $J$  = 16.0 Hz,  $\text{CH}=\text{CHC}(\text{OH})$ ) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 18.8, 20.9, 27.4, 28.3 (2 x C), 31.6, 32.3, 33.6, 38.9, 70.8, 117.3, 127.1, 128.5, 136.0, 136.6 ppm; IR (neat);  $\nu$  = 3444, 3023, 2925, 2256, 1722, 1651, 1644, 1114  $\text{cm}^{-1}$ ; GC-MS (EI):  $R_t$  = 16.81 min,  $m/z$ : 233 [ $M$ ] $^+$ , 218 [ $M - \text{CH}_3$ ] $^+$ , 193 [ $M - \text{CH}_2\text{CN}$ ] $^+$ , 135, 109, 91, 69; Found C, 77.11; H, 9.90; N, 6.08 %;  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}$  requires C, 77.21; H, 9.93; N, 6.00%.

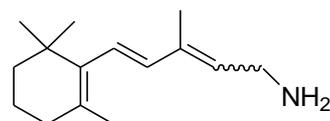
**(2ZE,4E)-3-methyl-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)penta-2,4-dienitrile (50EZ)**

A solution of **49** (400 mg, 1.72 mmol) and *p*Toluensulfonic acid (33 mg, 0.172 mmol) in toluene (17 mL) was refluxed and the reaction was followed by TLC. After the completion of the reaction the solution was cooled at  $0^\circ$  C and washed with a solution of  $\text{NaHCO}_3$  5% and after with water. The organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated in vacuo obtaining 352 mg (95%) of **50** as a *E/Z*: 54/46 mixture. Characterization resulted in agreement with the reported data [16].



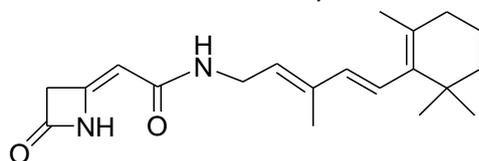
**(2EZ,4E)-3-methyl-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-2,4-dien-1-amine (51EZ):**

Orange oil:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.01 (s, 6 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , trans), 1.02 (s, 6 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , cis), 1.42-1.58 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.58-1.65 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.68 (s, 3 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}$ , trans), 1.71 (s, 3 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}$ , cis), 1.81 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$ , trans), 1.88 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$ , cis), 1.98-2.01 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}$ ), 2.09-2.40 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 4.06 (d, 2 H,  $J$  = 6.8 Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 5.42 (dd, 1 H,  $J$  = 6.4, 7.6 Hz,  $\text{C}=\text{CHCH}_2\text{NH}_2$ , cis), 5.50 (dd, 1 H,  $J$  = 6.4 Hz, 7.2 Hz,  $\text{C}=\text{CHCH}_2\text{NH}_2$ , trans), 5.98-6.09 (m, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ , trans), 6.14 (d, 1 H,  $J$  = 15.6 Hz,  $\text{CH}=\text{CH}$ , cis), 6.36 (d, 1 H,  $J$  = 15.6 Hz,  $\text{CH}=\text{CH}$ , cis) ppm;  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 12.3, 19.2, 21.5, 28.8 (2 x C), 32.8, 34.1, 38.7, 39.5, 125.8, 128.3, 128.5 (cis), 129.0 (cis), 129.5, 129.7 (cis), 131.3, 133.4 (cis), 134.5 (cis), 137.3, 137.6, 137.9 (cis) ppm; IR (neat);  $\nu$  = 3373, 2928, 2866, 1454, 1266  $\text{cm}^{-1}$ ; GC-MS (EI):  $R_t$  = 16.09 (cis), 16.57 (trans) min,  $m/z$ : 219 [ $M$ ] $^+$ , 204 [ $M - \text{CH}_3$ ] $^+$ , 187 [ $M - \text{CH}_2\text{CN}$ ] $^+$ , 162, 131, 119, 91, 83.

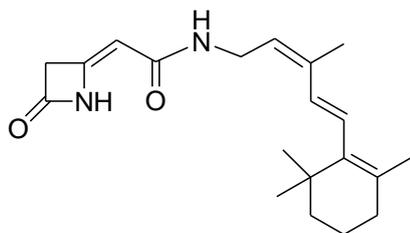


**(2Z)-N-((2ZE,4E)-3-methyl-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)penta-2,4-dienyl)-2-(4-oxoazetid-2-ylidene)acetamide (52EZ).**

To a solution of  $\beta$ -lactam **48** (55 mg, 0.43 mmol) in dry DCM (4.5 mL) under inert atmosphere at  $0^\circ$  C were added amine **52EZ** (94 mg, 0.43 mmol), DMAP (53 mg, 0.43 mmol) and after 10 minutes EDCl (82.5 mg, 0.43 mmol). The solution was stirred at  $0^\circ$  C for 45 minutes and after was allowed to warm at room temperature. The reaction was followed by TLC and after the disappearing of the starting materials was quenched with aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL) and extracted with DCM (3x5 mL). The organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated in vacuo. The *E/Z* mixture was separated by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 70/30) affording **2** (62 mg) and **8** (44 mg) in a overall yield of 75%. Configurations of the two diastereoisomers was assigned by NOE 1D studies.



**52E**: orange syrup:  $R_f$  = 0.4 (cyclohexane/EtOAc, 5/5);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.00 (s, 6H), 1.46 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 2.01 (m, 2H), 3.51 (s, 2H), 4.06 (m, 2H), 5.02 (s, 1H), 5.30 (brs, 1H, NH), 5.43 (m, 1H), 6.01 (d,  $J$  = 16 MHz, 1H), 6.13 (d,  $J$  = 16 MHz, 1H), 8.75 (brs, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 12.5, 19.2, 21.6, 28.8, 29.7, 32.9, 34.2, 37.3, 39.5, 44.9, 92.2, 124.9, 127.0, 129.0, 136.6, 137.5, 137.6, 146.6, 165.3, 166.3 ppm; IR (neat):  $\tilde{\nu}$  = 3367, 3250, 2958, 2922, 2853, 1815, 1692  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = min 12.72,  $m/z$  (%): 329 [ $M+H$ ] $^+$ ; Found C, 73.09; H, 8.63; N, 8.59 %;  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$  requires C, 73.14; H, 8.59; N, 8.53%.



**52Z:** orange syrup;  $R_f=0.5$  (cyclohexane/EtOAc, 5/5);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.26$  (s, 6H), 1.47 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 2.02 (m, 2H), 3.51 (m, 2H), 4.04 (m, 2H), 4.99 (s, 1H), 5.25 (brs, 1H, NH), 5.36 (m, 1H), 6.22 (d,  $J=16$  MHz, 1H), 6.38 (d,  $J=16$  MHz, 1H), 8.72 (brs, 1H, NH);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=19.2, 20.3, 21.7, 28.9, 29.7, 32.9, 34.1, 36.4, 39.5, 44.9, 92.3, 123.1, 129.0, 129.6, 129.7, 136.7, 137.7, 146.4, 165.3, 166.3$  ppm; IR (neat):  $\tilde{\nu}=3327, 2954, 2923, 2853, 1810, 1683$   $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC-MS (ESI):  $R_t=\text{min } 11.21$ ,  $m/z$  (%): 329 (65)  $[M+H]^+$ ,

351 (100)  $[M+Na]^+$ , 679 (70)  $[2M+Na]^+$ ; Found C, 73.07; H, 8.65; N, 8.57 %;  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$  requires C, 73.14; H, 8.59; N, 8.53%.

### **Biologia: Culture cellulari e trattamenti**

Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line were cultured in DMEM/F12 (Gibco-Invitrogen, Milan, Italy) supplemented with 10% fetal bovine serum (Euroclone, Milan, Italy), 1X MEM/NEAA (Gibco-Invitrogen), 1X Penicillin-Streptomycin (Gibco-Invitrogen) and NaOH 10 mM (Carlo Erba) and maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator.

b-Lactams MP171, 2, and all-trans retinoic acid (RA, Sigma Aldrich) were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich) to an intermediate concentration of 100 mM (MP171 and 2), and 16.6 mM (RA). Final dilutions (10 microM for compound 2 and RA, 7.5 microM for compound MP171) were done in the culture medium. A corresponding volume of DMSO was added to control cells (vehicle treated). To evaluate cytotoxic effect exerted by MP171 and 2 on SH-SY5Y cells were seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well in 96 plastic multiwells/dish; 24 hrs after seeding were treated for 24 hrs with compounds 1 and 2 in the concentration range 1 microM-1 mM and MTT assay was performed [33]. Cytotoxicity of compounds 1 and 2 on SHSY5Y ( $\text{IC}_{50}$ ) was assessed in order to define the working concentration ( $\text{IC}_{50}= 10\text{-}28$  microM  $R^2=0.973$ ;  $\text{IC}_{50}2=38\text{-}65$   $R^2=9,988$ )

### **Effetti di Proliferazione di MP171**

To evaluate the effect of **MP171** on proliferation, cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 6 plastic multiwells/ dish and allowed to grow for 24 hrs before treatment. Twenty-four hrs after seeding, the medium was removed and fresh medium containing the drug was added for additional 24, 48, 72 and 96 hrs. Rate of cells growth was determined counting viable cells using trypan blue exclusion assay. Doubling time (Td) was calculated during logarithmic growth phase. The experiment was repeated twice. Statistical analysis were performed with two way anova (\*  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , Bonferroni post test).

### **Effetti di differenziazione del compost 52E**

Indirect immunofluorescence was used in order to investigate possible morphological changes of cytoskeleton due to **52E** exposure. For this experiment, SH-SY5Y were seeded on glass coverslips coated with Cultrex® Basement Membrane Extract (BME) (Trevigen®, Gaithersburg, MD, USA) at a density of  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured in the previously described culture media. After 24 hrs of seeding, the medium was removed and fresh medium containing 10 microM of **52E** was added. Cells were treated for additional 6 days and medium was replaced every 48 hrs. Untreated cells and cells treated with retinoic acid (RA) 10 microM were used respectively as non-differentiated and differentiated controls.

After treatments, cells were washed in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1M Sørensen phosphate buffer for 20 min at RT. Subsequently, fixed cells were blocked in PBS containing 0.3% Triton-X 100 (Merck, Darmstadt, Germany), 5% Donkey Normal Serum (Sigma Aldrich) for 1 h at RT, then incubated overnight at +4°C in humid atmosphere with anti-neurofilament 200 (Sigma Aldrich) and anti-  $\beta$ III-tubulin (R&D) antibodies diluted 1:400 and 1:1000 respectively in blocking solution. After rinsing in PBS (2x10 min), cells were incubated with Dylight 488-labelled secondary antisera (Thermo Scientific) diluted in 0.3% Triton-X 100/ PBS, for 30 min at 37°C. For nuclear staining, cells were first washed in PBS then incubated 15 min with 1 ug/ml Hoechst 33258 in 0.2% Triton-X 100 / PBS. After rinsing in PBS, coverslips containing cells were finally mounted in 1,4-phenylendiamine (Sigma Aldrich) / glycerol 0.1%. Negative controls were performed by primary antibody omission.

---

Multiple images were acquired by using sequential laser excitations at 405 and 488 nm to reduce spectral bleed-through artifacts.

Images from tissues were taken by Nikon Eclipse 600 microscope equipped with motorized z-stage control and F-view II CCD Cameras with 40x objective. Immunofluorescence staining was analyzed using the Nis-Elements Software 3.21.03 (Nikon). Analysis of  $\beta$ III-tubulin and neurofilament 200 immunoreactive areas (IR) were executed applying shepern and detect edges filters. For each image nuclei were counted and IR/ n° of nuclei were calculated. The experiment was repeated twice and 3 sample for each experiment (at least 100 cells) were analyzed. Statistical analysis were performed with one way anova ( \* p<0.05, \*\*\*p<0.001, Tukey post test).

Rapresentative images were collected using a Nikon A1R confocal laser-scanning microscope, equipped with a Nikon PlanApo 60, 1.4-NA oil immersion lens.

## **Parte Sperimentale relativa al capitolo 1.4.1**

### **Parte Strumentale**

Le reazioni di sintesi dei substrati sono state condotte in ambiente anidro e sotto atmosfera di azoto. I solventi come metanolo (CH<sub>3</sub>OH) ed etanolo (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) sono stati distillati su magnesio.

Le cromatografie su strato sottile (TLC) sono state effettuate su fogli di gel di silice pronti per l'uso, Kieselgel 60 F254 Merk, mentre i prodotti sono stati purificati cromatografia flash su gel di silice Merk 230-400 mesh.

Gli spettri <sup>1</sup>HNMR sono stati registrati a 200 MHz su un Varian Gemini 200 oppure a 400 MHz su un Varian Gemini 400, in soluzione di CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD.

Gli spettri <sup>13</sup>CNMR sono stati registrati a 50.3 MHz su un Varian Gemini 200 oppure a 50 MHz su un Varian Gemini 400, in soluzione di CDCl<sub>3</sub> o D<sub>2</sub>O.

Per l'analisi gascromatografica combinata alla spettrometria di massa (GC-MS) si è usato il gascromatografo Hewlett-Packard 5890 Series 2, con colonna capillare HP-5MS (crosslinked 5% fenil-metil silicone, lunghezza 30 m, diametro interno 0.25 mm, spessore del film 0.25 mm), collegato ad uno spettrometro di massa HP-5971 Series (Mass Selective Detector), con potenziale di ionizzazione di 70 eV. (Programmata: 50°C 2 min., 10°C/min. fino a 250°C, 250°C 10 min.)

Le masse delle frammentazioni sono espresse in m/z con t<sub>r</sub>, si intende il tempo di ritenzione.

Per l'analisi gascromatografica su colonna achirale è stato utilizzato un gascromatografo Hewlett-Packard 6890 Series, con colonna capillare con fase stazionaria HP-5MS (crosslinked 5% fenil-metil silicone, lunghezza 30 m, diametro interno 0.25 mm, spessore del film 0.25 mm). (Programmata: 50°C 2 min., 10°C/min. fino a 250°C, 250°C 10 min.)

Le analisi in cromatografia liquida chirale ad alta pressione (chiral-HPLC) per la determinazione degli eccessi enantiomerici sono state fatte utilizzando uno strumento Hewlett Packard 1900 liquid chromatography con colonna chirale tipo Chiralpack IA con le seguenti caratteristiche: lunghezza 25 cm, diametro interno 0.46 cm. L'analisi è stata condotta utilizzando una miscela n-esano/isopropanolo 80/20 come fase mobile, con un flusso costante di 0.5 mL/min. Il rilevatore dello strumento è costituito da una lampada a deuterio-visibile-UV a lunghezza d'onda variabile tra 190 e 900 nm: si è registrata l'intensità del segnale a 210 nm.

La determinazione della conversione è stata eseguita mediante HPLC su uno strumento Hewlett Packard 1100 liquid chromatography utilizzando una colonna a fase inversa ECLIPSE XDB-C18 con le seguenti caratteristiche: lunghezza 15 cm, diametro interno 4.6 cm. L'analisi è stata condotta utilizzando una miscela acqua/acetonitrile 60/40 come fase mobile, con un flusso costante di 0.5 mL/min. Il rilevatore dello strumento è costituito da una lampada a deuterio-visibile-UV a lunghezza d'onda variabile tra 190 e 900 nm, è registrata l'intensità del segnale a 210 nm.

Gli alfa di rotazione sono stati registrati con un polarimetro UniPol L1000 Schmidt+Haensch con le seguenti caratteristiche: lunghezza cella ottica 100 mm, lunghezza d'onda 589,30 nm.

Gli enzimi utilizzati sono: Porcine Liver Esterase (PLE), crudo liofilizzato polvere, 17 U/mg solido, prodotto da Sigma-Aldrich, Candida antarctica lipase A (CAL-A), CLEA (Cross Linked Enzyme Aggregate), ≥15 U/mg, prodotto da Fluka (Sigma-Aldrich), Candida antarctica lipase B (CAL-B) resina acrilica, 10000 U/g solido, prodotta da Sigma-Aldrich e  $\alpha$ -chimotripsina da pancreas di bovino, 42 U/mg, prodotta da Serva.

### **Sintesi di Reformatsky dei $\beta$ lattami 54,55,56,57,10**

#### Sintesi del reattivo organometallico

In un pallone a 3 colli da 50 mL, munito di imbuto gocciolatore e predisposto per lavorare in atmosfera inerte, si aggiungono a temperatura ambiente nell'ordine: 8 mmol di zinco metallico, 2.5 mL di THF anidro

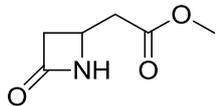
sotto agitazione magnetica. Si aggiungono 0.4 mmol di TMSCl e si lascia in agitazione per 30'. Si porta la sospensione a 30-35°C immergendola in un bagno di olio al silicone e vi si gocciolano 4 mmol di bromoacetato solubilizzati in 5 mL di THF anidro. Si lascia la soluzione sotto agitazione per 30' a 30-35°C e poi la si lascia rinvenire a temperatura ambiente facendo decantare lo zinco.

Il reattivo non viene isolato a causa della sua elevata reattività, me viene lasciato sotto atmosfera inerte fino al suo utilizzo.

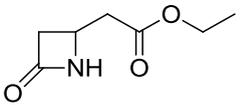
#### Reazione di Reformatsky

In un pallone a 3 colli da 100 mL, munito di imbuto gocciolatore e predisposto a lavorare in atmosfera inerte, a temperatura ambiente si solubilizzano nell'ordine 3.88 mmol del 4-acetossi-azetidina-2-one in 10 mL di THF anidro sotto agitazione magnetica. Si porta la miscela di reazione a 0°C in un bagno di ghiaccio ed acqua e si gocciolano lentamente 13.9 mmol del reattivo di Reformatsky preparato di fresco. Terminato il gocciolamento si porta il pallone a temperatura ambiente e si segue il decorso della reazione mediante TLC. Dopo 3-4 ore si osserva il consumo totale dello starting material. La soluzione viene spenta a freddo, in bagno di ghiaccio ed acqua, con una soluzione satura di tartrato di sodio e potassio, sotto vigorosa agitazione, con aggiunta di AcOEt per 30 min. Successivamente si procede con l'estrazione in imbuto separatore con AcOEt. Le fasi organiche vengono riunite ed anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrate al rotavapor e seccate alla pompa da vuoto. Il prodotto viene purificato mediante flash-cromatografia

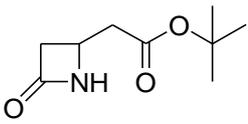
#### 4-metossicarbonilmetil-azetidina-2-one (54) (Y = 60%)

 m. p.: 60-65°C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2.64 (dd, *J* = 16.8 Hz, *J* = 8.8 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 15.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 16.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.05 (bs, 1H), 3.21 (ddd, *J* = 15.2 Hz, *J* = 4.4 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 4.00 (dddd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 1.6 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.78 (bs, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 39.48, 43.29, 43.66, 51.80, 167.24, 171.25. GC-MS (70 ev): *m/z* (%) 112 (13), 100 (100), 70 (60), 59 (87); IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3390, 1760, 1730.

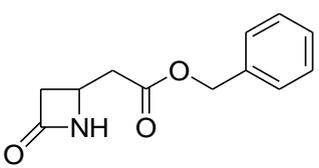
#### 4-etossicarbonilmetil-azetidina-2-one (Y = 66%)

 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.58 (dd, *J* = 16.5 Hz, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.67 (ddd, *J* = 15.0 Hz, *J* = 1.3 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 16.5 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.77 (ddd, *J* = 15.0 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.96 (m, 1H, CHNH), 4.17 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 6.17 (bs, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.0, 39.7, 43.3, 43.7, 60.8, 167.3, 169.9; HPLC-MS, (ES): *m/z* (%) 180 (100) [M + Na<sup>+</sup>], 164 (20), 162 (20), 116 (69); IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3224, 2966, 1725, 1467, 1418, 1381, 1329

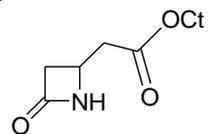
#### (4-tert-butossicarbonilmetil-azetidina-2-one) (55) (Y = 94%)

 m.p.: 83-84°C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1.40 (s, 9H, *t*-Bu), 2.76 (dd, *J* = 16.0 Hz, *J* = 8.8 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H), 2.88 (dd, *J* = 16 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.38 (ddd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.15 (dddd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, CHNH), 6.58 (bs, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): δ 28.0, 41.0, 43.3, 43.9, 81.4, 167.2, 170.1; GC-MS (70 ev): *m/z* (%) = 170 (7), 129 (13), 112 (13), 101 (10), 86 (12), 70 (36), 57 (100); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3238, 2964, 1763, 1735, 1398, 1261.

#### (4-benzilossicarbonilmetil-azetidina-2-one) (56) (Y = 64%)

 m. p.: 92-92.5°C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2.57 (dd, *J* = 16.8 Hz, *J* = 9.2 Hz, 1H), 2.63 (dd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1H), 2.70 (dd, *J* = 16.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.08 (ddd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 5.2 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.89 (dddd, *J* = 9.2 Hz, *J* = 5.2 Hz, *J* = 5.2 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, CHNH), 5.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.15 (bs, 1H, NH), 7.29 (m, 5H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): δ 39.8, 43.4, 43.7, 66.7, 128.3, 128.5, 128.6, 135.3, 166.9, 170.7. HPLC-MS, (ES): *m/z* (%) = 439 (15) [2M + H<sup>+</sup>], 237 (40) [M + H<sub>2</sub>O], 220 (100) [M + H<sup>+</sup>]; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3238, 2961, 1738, 1460, 1372, 1262.

#### (4-ottilossicarbonilmetil-azetidina-2-one) (57) (Y = 54%)

 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.21-1.39 (m, 10H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.60-1.72 (m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.60 (dd, *J* = 8.8, 16.4 Hz, 1 H,

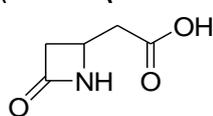
CHCHCO<sub>2</sub>Oct), 2.66 (dd, *J* = 1.2, 14.8 Hz, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Oct), 2.74 (dd, *J* = 4.8, 16.4 Hz, 1 H, CHCHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Oct), 3.17 (ddd, *J* = 2.0, 5.4, 14.8 Hz, 1 H, CHCHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu), 3.93-3.98 (m, 1H, CHCHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu), 6.08 (bs, 1 H, NH)

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): δ 13.9, 22.5, 25.8, 28.5, 29.1 (2XC), 31.7, 39.9, 43.5, 43.8, 65.1, 167.0, 170.9. HPLC-MS (70 ev): *R*<sub>t</sub> = 8.90 min, *m/z* (%) = 242 (M+1), 259 (M+H<sub>2</sub>O), 264 (M+Na+), 483 (2M+1).

#### Idrogenolisi del (4-benzilossicarbonilmetil-azetidina-2-one) (56) a (acido 2-(4-ossazetidina-2-il)acetico) (58)

In un pallone a 3 colli da 50 mL, predisposto per lavorare in atmosfera di azoto ed ambiente inerte, munito di pipa con rubinetto e a temperatura ambiente, si aggiungono nell'ordine 1 mmol di **56** in 10 mL di una miscela 1/1 di THF/MeOH anidri sotto agitazione magnetica. Si aggiunge il 10% in peso di Pd/C e si porta l'ambiente di reazione sotto atmosfera di idrogeno (1atm). Si segue il decorso della reazione con TLC e dopo 3 ore lo starting material è completamente consumato. La soluzione viene filtrata su celite con Gouch, per separare il catalizzatore. La frazione organica viene concertata al rotavapor, fornendo il prodotto in resa quantitativa, come solido cristallino bianco.

#### (acido 2-(4-ossazetidina-2-il)acetico) (58)



m. p. : 120-125°C <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz): δ 2.56 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.58 (dd, *J* = 15.2 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.60 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J* = 15.2 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.86 (dddd, *J* = 5.2 Hz, *J* = 2.4 Hz, *J* = 2.0 Hz, *J* = 6.8 Hz, 1H).

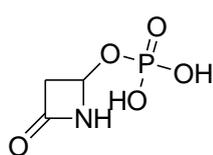
<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 50 MHz): δ 39.081, 42.032, 43.809, 169.214, 173.016. IR (nujol, cm<sup>-1</sup>): 3230, 2700, 1752, 1695.

#### Saggi enzimatici sugli esteri β-lattamici per via enzimatica

In un vial di opportuno volume, sono state aggiunte nell'ordine 0.1 mmol di substrato, 5 mL di tampone fosfato 0.1 M pH 7.5 e un'aliquota dell'enzima. Il vial è stato chiuso e posto sotto agitazione su orbitalshaker orizzontale a circa 700 rpm. Il monitoraggio dell'idrolisi è stato condotto prelevando ogni 0 ore, 1 ora, 2 ore, 5 ore e dopo l'overnight (24 ore) un'aliquota di 0.5 mL. Il prelievo è stato estratto con 0.5 mL di AcOEt, la fase organica è stata svaporata al rotavapor e risospesa in 0.5 mL di isopropanolo per l'analisi in HPLC chirale. Il volume rimanente di tampone è stato estratto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, le fasi organiche sono state riunite e anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate, concentrate al rotavapor e seccate alla pompa da vuoto e risospese in CDCl<sub>3</sub> per l'analisi NMR. La fase acquosa è stata svaporata con azeotropo con cicloesano al rotavapor ed estratta con una soluzione 1/1 di MeOH/CH<sub>3</sub>CN. Gli estratti sono stati riuniti, anidrificati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrati, concentrati al rotavapor e seccati alla pompa da vuoto e risospesi in D<sub>2</sub>O per l'analisi NMR.

#### Sintesi del 4-ossazetidina-2-il-fosfato

##### 4-ossazetidina-2-il fosfato (65)

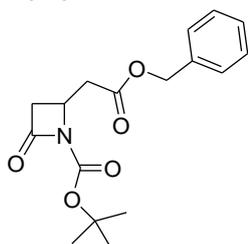


In una provetta da 50 mL, sono state aggiunte nell'ordine 0.5 mmol di 4-acetossiazetidina-2-one e 10 mL di tampone fosfato 0.1 M pH 7.5. Lascio in agitazione magnetica e si segue il decorso della reazione mediante TLC (eluente AcOEt). Dopo 2-3 ore lo starting material è completamente consumato. La soluzione viene versata in un pallone di opportuno volume e l'acqua viene svaporata mediante azeotropo con cicloesano al rotavapor.

Eliminata l'acqua si estrae il prodotto nel pallone con una soluzione 1/1 di MeOH/CH<sub>3</sub>CN. Gli estratti sono stati riuniti, anidrificati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrati, concentrati al rotavapor e seccati alla pompa da vuoto. Si ottiene un solido bianco cristallino molto igroscopico. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ 2.75 (dd, *J* = 15.2 Hz, *J* = 4.0, 1H), δ = 3.07 (dd, *J* = 15.2, *J* = 1.2, 1H), δ = 5.42 (ddd, *J* = 4.0, *J* = 1.2, *J* = 6.0, 1H); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 50 MHz): δ 45.2 (d, *J* = 4.9), δ 72.7 (d, *J* = 3.8) δ 170.4; <sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O, 162 MHz): δ 1.91

#### Acilazione dei 4-carbonil-2-azetidini

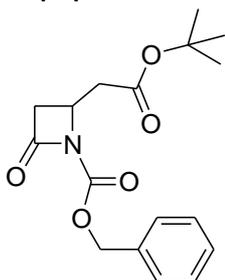
##### α-(4-(1-terbutilossicarbonil-2-ossazetidina-2-il))-acetato di benzile (62)



In un pallone a due colli da 50mL, precedentemente anidrificato e predisposto per lavorare sotto atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), si introducono 117mg (0,53mmol) di **56** in 3 mL di DCM lasciando in agitazione qualche minuto per garantire la solubilizzazione del solido nel solvente. In successione si aggiungono 132mg (0,61mmol) di Boc<sub>2</sub>O e 6,64mg (0,053mmol) di DMAP e si lascia la reazione a temperatura ambiente. Il sistema di reazione vira da giallo tenue a rosso. Si lascia il reattore sotto vigorosa agitazione per 30 minuti. Si verifica il decorso della reazione tramite TLC, con

etilacetato/cicloesano 75/25 come miscela eluente e rivelando per ossidazione con una soluzione di molibdato. Si evapora il solvente a rotavapor fino all'ottenimento di un olio rosso. Si purifica il grezzo per flash-cromatografia su con una miscela etilacetato/cicloesano 25/75. Si isola un solido bianco dalle frazioni 4-14 da 10 mL ciascuna con una resa finale del 83%.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1.47 (s, 9H, *t*-Bu), 2.65 (dd,  $J = 16.0$  Hz,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 2.79 (dd,  $J = 31.25$ ,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 3.20 (dd,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 3.24 (dd,  $J = 7.64$  Hz,  $J = 45.11$  Hz, 1H), 4.24-4.29 (m,  $J = 8.8$  Hz, 1H, CHNH), 5.15 (s, 2H), 7.20-7.30 (m, 5H, Ar);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  28.0, 37.0, 42.7, 47.2, 66.7, 83.6, 128.3, 128.5, 128.6, 135.3, 147.6, 163.7, 169.7. GC-MS-EI (70 ev):  $m/z$  (%) = 235 (10), 177 (8), 149 (6), 103 (15), 91(100), 77(36), 57 (85); HPLC-MS-ESI<sup>+</sup>:  $m/z$  (%) = 661 (60) [ $2\text{M} + \text{Na}^+$ ], 337 (100) [ $\text{M} + \text{H}_2\text{O}$ ]; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3427, 3033, 2979, 1813, 1720

#### $\alpha$ -(4-(1-benzilossicarbonil-2-osso-azetidil))-acetato di *t*-butile (64)



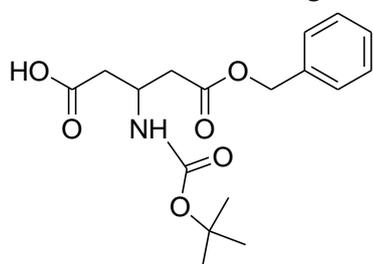
In un pallone a due colli da 50mL, precedentemente anidrificato e predisposto per lavorare sotto atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ), si introducono 50mg (0,27mmol) di **55** in 2mL di THF, lasciando in agitazione qualche minuto per garantire la solubilizzazione del solido nel solvente. Si porta il reattore a  $-78^\circ\text{C}$  procedendo all'aggiunta di 0,29mL (0,29mmol) di LiHMDS. Il sistema di reazione immediatamente passa da incolore a blu intenso. Si lascia in agitazione per 20 minuti, e poi si aggiunge 0,29mL (0,04mmol) di CBZ-Cl, lasciando rinvenire la reazione per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 10 minuti dall'aggiunta del CBZ-Cl la miscela di reazione diventa nera, poi marrone e lentamente evolve a giallo chiaro. Si verifica il decorso della reazione tramite TLC. Si spegne la

reazione con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturo e ghiaccio, estraendo con etilacetato in imbuto separatore per tre volte, si lava l'organico con BRINE e  $\text{NaHCO}_3$  saturo, si essicca su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , si filtra su cotone e si rimuove il solvente al rotavapor e successivamente alla pompa da vuoto. Si purifica il grezzo per flash-cromatografia su silice con una miscela etilacetato/cicloesano 20/80. Si isola un solido bianco dalle frazioni 2-4 da 10 mL ciascuna con una resa finale del 44%.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1.44 (s, 9H, *t*-Bu), 2.58 (dd,  $J = 16.1$  Hz,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 2.87 (dd,  $J = 16.4$ ,  $J = 3.2$ , 1H), 3.08 (dd,  $J = 15.8$  Hz,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 3.25 (dd,  $J = 16.4$  Hz,  $J = 6.0$ , 1H), 4.23-4.28 (m,  $J = 8.8$  Hz, 1H, CHNH), 5.26 (s, 2H), 7.27-7.42 (m, Ar);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz):  $\delta$  28.0, 38.0, 42.9, 47.5, 67.9, 81.5, 128.2, 128.6, 134.9, 148.8, 163.6, 168.8. GC-MS-EI (70 ev):  $m/z$  (%) = 246 (5), 107 (20), 77 (10), 91 (100), 57(67); HPLC-MS-ESI<sup>+</sup>:  $m/z$  (%) = 661 (60) [ $2\text{M} + \text{Na}^+$ ], 337 (100) [ $\text{M} + \text{H}_2\text{O}$ ], 320 (5) [ $\text{M} + \text{H}^+$ ], 264 (8) [ $\text{M} - \text{tBu} + 2\text{H}^+$ ], 91 (4); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3538, 3434, 3034, 2978, 1816, 1272.

#### Procedura di apertura chimica degli *N*-Acil $\beta$ lattami

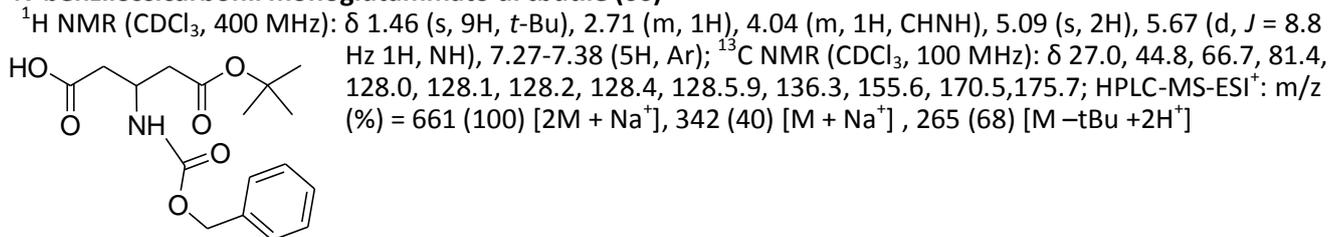
In un pallone a due colli da 50mL, si introducono 0,15mmol di  $\beta$  lattame 5,89 mL di diossano. Si aggiungono esattamente 6,48mL di KOH 0,05M. Si verifica il decorso della reazione tramite TLC. Dopo 2 giorni l'SM scompare: si spegne la reazione con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturo e ghiaccio, appurando di aver raggiunto pH acidi, in caso è possibile aggiungere anche qualche goccia di HCl 1M per raggiungere l'acidità. Si procede all'estrazione con etilacetato in imbuto separatore per tre volte, si essicca su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , si filtra su cotone e si rimuove il solvente al rotavapor e successivamente alla pompa da vuoto. Si purifica il grezzo per triturazione con pentano. Si isola un solido cristallino bianco con una resa finale del 100%.

#### *N*-tbutossicarbonil monoglutamato di benzile (67)



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1.47 (s, 9H, *t*-Bu), 2.75 (m, 1H), 4.33 (bs, 1H, CHNH), 5.13 (s, 2H), 5.39 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, NH), 7.27-7.38 (m, 5H, Ar); HPLC-MS-ESI<sup>+</sup>:  $m/z$  (%) = 661 (100) [ $2\text{M} + \text{Na}^+$ ], 342 (40) [ $\text{M} + \text{Na}^+$ ], 265 (68) [ $\text{M} - \text{tBu} + 2\text{H}^+$ ]

### **N-benzilossicarbonil monoglutammato di tbutile (66)**



### **Deprotezione dell'atomo di azoto Monoglutammato di benzile (60)**

In un pallone a due colli da 50mL, precedentemente anidrificato e predisposto per lavorare sotto atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), si introducono 46mg (0,136mmol) di 67 e 1,36mL di DCM anidro. Si aggiungono 181μL (2,448mmol) di TFA, e si lascia sotto agitazione. Si verifica il decorso della reazione tramite TLC. Dopo 4 ore circa si procede alla lavorazione del grezzo solubilizzandolo in MeOH, si rimuovono i solventi al rotavapor e successivamente alla pompa da vuoto. Si isola un olio giallo con un recupero del grezzo del 86%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2.88 (dd, J = 11.1Hz, J = 4.2Hz, 4H), 3.89 (m, 1H, CHNH), 5.22 (s, 2H), 7.39 (m, 5H, Ar); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 36.5, 36.9, 46.2, 68.1, 129.4, 129.6, 136.9, 171.4, 173.1; HPLC-MS-ESI<sup>+</sup>: m/z (%) = 294 (10) [M + H<sub>2</sub>O + K<sup>+</sup>], 238 (100) [M + H<sup>+</sup>].

### **Monoglutammato di t-butile (63)**

In un pallone a tre colli da 50mL, precedentemente anidrificato e predisposto per lavorare sotto atmosfera inerte vuoto-azoto. Si introducono 43mg (0,127mmol) di 66, 650μL di THF anidro e 650μL di MeOH anidro. Si aggiungono 8,6mg di (0,081mmol) di Pd/C, poi si introduce l'idrogeno in eccesso e si lascia sotto agitazione. Si verifica il decorso della reazione tramite TLC. Dopo 4 ore si procede alla lavorazione filtrando su siringa i residui solidi e rimuovendo i solventi al rotavapor. Si isola un olio giallo con un recupero del grezzo del 30%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1.51 (s, 9H, t-Bu), 2.41 (dd, J = 16.6 Hz, J = 8.6 Hz, 1H), 2.55 (dd, J = 16.8Hz, J = 5.00Hz 1H), 3.75 (m, 1H, CHNH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 29.1, 39.2, 39.6, 48.3, 83.96, 172.2, 177.9; HPLC-MS-ESI<sup>+</sup>: m/z (%) = 242(10) [M + K<sup>+</sup>], 226 (29) [M + Na<sup>+</sup>], 204(100) [M + H<sup>+</sup>], 148(41) [M + tBu + 2H<sup>+</sup>]

### **Tempi di ritenzione HPLC Chirale**

55) IA, 0.5 mL/min, 80/20 n.esano/isopropanolo: 1° enantiomero: 13.6 min; 2° enantiomero: 14.2

56) IA, 0.5 mL/min, 80/20 n.esano/isopropanolo: (S) 15.3 min: (R) 16.3 min.

57) IA, 0.5 mL/min, 80/20 n.esano/isopropanolo: (S) 9.7 min: (R) 10.4 min.

67) IA, 0.5 mL/min, 75/25: n-esano/i-propanolo. 1° enantiomero: 11.67 min: 2° enantiomero 13.64 min.

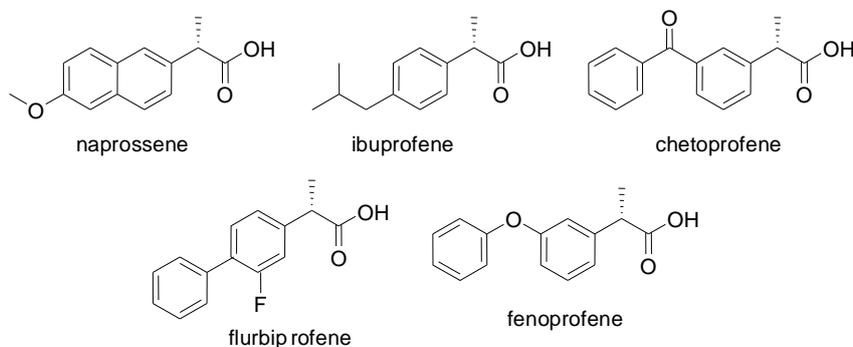
66) IA, 0.5 mL/min, 96/4: n-esano/i-propanolo. S): 23.88 min: R) 24.82 min.

## 2

# I profeni

## 2.1 acidi 2-Aril Propionici

La scoperta dei Profeni risale ai primi anni 60 e si deve agli scienziati Adams, Nicholson and Burrows. gli acidi 2-aril propionici o Profeni sono tra gli agenti antiinfiammatori non steroidei (FANS) più diffusi e utilizzati al mondo.<sup>97</sup>



Tutta la classe dei Profeni è caratterizzata dallo scheletro dell'acido 2-aril propanoico, in cui il secondo carbonio è chirale. Sopra sono rappresentate alcune delle strutture dei Profeni più comuni: ibuprofene, naprossene, chetoprofene, flurbiprofene e fenoprofene.

I Profeni svolgono la loro azione antiinfiammatoria agendo sul metabolismo dell'acido arachidonico e dell'acido eicosapentenoico, precursori di molecole coinvolte nel processo infiammatorio quali prostaglandine, prostaciline, trombossani e leucotrieni. I FANS interagiscono in maniera più o meno reversibile legandosi al sito attivo di un enzima, la cicloossigenasi, di cui esistono due forme: l'enzima COX-1 e il COX-2. Ciascuna classe di antiinfiammatori ha una selettività differente verso COX-1 e COX-2; tale specificità è alla base per la ricerca farmacologica e per la comprensione e la risoluzione dei problemi legati alla tossicità di alcuni di questi farmaci.

La configurazione del centro stereogenico non è indifferente per i Profeni: ciascun enantiomero ha infatti differenti proprietà farmacologiche nonché farmacodinamiche.<sup>98</sup> L'isomero che in effetti esplica proprietà antiinfiammatoria risulta essere quello con configurazione *S*, il quale si qualifica quindi come l'eutomero. L'altro enantiomero, l'*R*, risulta quindi essere il distomero.<sup>99,100</sup>

Queste differenti proprietà dei due enantiomeri sono state però delucidate solo di recente. L'enantiomero *R* sembra infatti non avere alcuna attività specifica anche se studi recenti stanno smentendo questa ipotesi, mostrando che anche questo stereoisomero non è inattivo. La tendenza è quella di vendere e somministrare i Profeni in forma racemica ad eccezione del Naprossene, in cui l'enantiomero *R* provoca gravi danni al fegato.

Gli studi stanno rivelando che la somministrazione di una miscela racemica di ibuprofene in vivo porta all'arricchimento del Profene verso la forma *S*. Il meccanismo<sup>101,102,103</sup> più probabile di tale inversione, proposto per la prima volta da Nakamura e collaboratori<sup>104</sup>, è un processo a tre passaggi che inizia con la formazione di un tioestere, attraverso una catalisi enzimatica enantiospecifica, tra l'enantiomero *R* dell'acido 2-arilpropionico e il coenzima A (CoA). Tale tioestere a sua volta può subire idrolisi e quindi generare nuovamente l'acido *R*, oppure subire epimerizzazione producendo l'estere *S*. Successivamente l'idrolisi del (*S*)-CoA tioestere completa il processo di inversione, dando l'acido *S* (Figura 6.4).

<sup>97</sup> E. Emer, "Acqua: solvente elettivo in organocatalisi e biocatalisi", Tesi di dottorato, 2009.

<sup>98</sup> Adams, S.S.; Bresloff, P.; Mason, C.G. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1976, 28, 256.

<sup>99</sup> Campbell, D.B. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 1990, 5, 109.

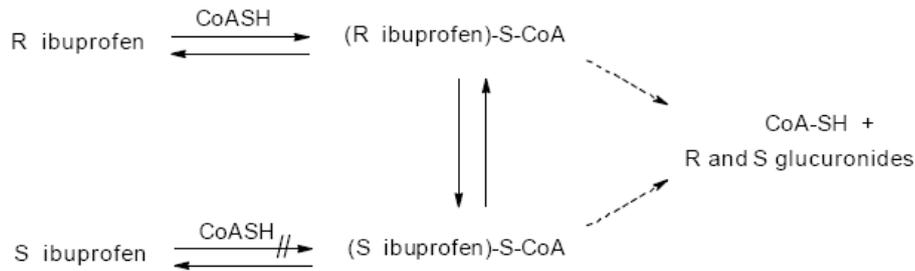
<sup>100</sup> Bye, A. *Round Table Series*, 1990, 18, 9.

<sup>101</sup> Chen, C.S.; Shieh, W.R.; Lu, P.H.; Harriman S, Chen CY, *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1078, (3), 411-7.

<sup>102</sup> Tracy, T.S.; Hall, S.D., *Drug Metab Dispos*, 1992, 20, (2), 322-7.

<sup>103</sup> Reichel C, Brugger R, Bang H, Geisslinger G, Brune K, *Mol Pharmacol*, 1997, 51 (4), 576-82.

<sup>104</sup> Nakamura, Y.; Yamaguchi, T.; Takahashi, S.; Hashimoto, S.; Iwatani, K.; Nakagawa, Y. *J. Pharmacobiodyn.*, 1981, 4, S-1.



Il processo di epimerizzazione può procedere non enzimaticamente, vista la particolare acidità dell'idrogeno legato al carbonio in  $\alpha$  al tioestere. Questo processo è clinicamente importante poiché porta alla formazione dell'inibitore attivo della ciclo-ossigenasi, a partire dal precursore inattivo. Tale meccanismo di risoluzione dinamica, comunque, varia in vivo da specie a specie e da individuo ad individuo e certamente non è tutt'oggi completamente chiarito<sup>105,106</sup>. Inoltre, questa inversione metabolica talvolta avviene dopo la somministrazione, nella fase di eliminazione, quando la concentrazione nel plasma del Profene iniziale S è marcatamente più bassa e il suo effetto terapeutico è ormai nullo. Questo fenomeno di inversione quindi non può essere considerato un 'prodrug principle'<sup>107</sup> e non permette di conoscere la quantità reale di S Profene somministrata. Attraverso la via metabolica vista sopra, gli enantiomeri R possono avere effetti farmacologici e tossicologici verso l'inibizione nella sintesi delle prostaglandine. L'abilità degli enantiomeri R di formare potenziali acilglucuronidi reattivi, tioesteri col coenzima A, ad essere incorporati in triacilgliceroli, e quindi la possibilità di interferire col metabolismo dei lipidi e di interferire nei processi legati alle membrane biologiche, li rende farmacologicamente a rischio.

Sebbene il paziente venga esposto a due diverse "entità" chimiche, nel caso in cui il NSAID venga somministrato in forma racemica, non esistono ancora prove che dimostrino una palese tossicità dell'enantiomero R. In ogni caso i vantaggi nella somministrazione del solo enantiomero S sono i seguenti:

ridurre il carico dello smaltimento del farmaco sul metabolismo e in particolare sui reni;

ridurre al minimo gli effetti collaterali dovuti all'enantiomero R e ai suoi metaboliti;

effetti collaterali e azione coadiuvata con altri farmaci sulla farmacocinetica del NSAID, sarebbero più facili da valutare e come conseguenza può essere valutato meglio il dosaggio;

Ridurre le interazioni del NSAID con altri farmaci;

eliminare le interazioni enantiomero-enantiomero (che possono portare ad effetti non lineari nelle farmacocinetiche dell'enantiomero attivo);

semplificare le proprietà farmacocinetiche e dosi metaboliche del farmaco;

per quegli acidi arilpropionici che subiscono inversione dello stereocentro (es. ibuprofen), la variabilità e il rapporto d'inversione tra individuo ed individuo vengono annullate;

- semplificare i rapporti tra le concentrazioni del farmaco nel plasma o nel fluido sinoviale e la risposta terapeutica: metodi enantioselettivi non hanno bisogno di misurare le concentrazioni di farmaco somministrato e non legato<sup>108</sup>;
- in vivo, l'enantiomero puro degli acidi 2-arilpropionici viene assorbito più velocemente rispetto al composto racemo<sup>109</sup>;
- nel caso dell'ibuprofen racemo c'è bisogno del doppio della dose per avere la stessa concentrazione dell'isomero S nel sangue<sup>110,111</sup>.

<sup>105</sup> Rudy, A.C.; Knight, P.M.; Brater, D.C.; Hall, S.D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1991**, 259, 1133.

<sup>106</sup> Lee, E.J.D.; Williams, K.; Day, R.; Graham, G.; Champion, D. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1985**, 19, 669.

<sup>107</sup> Loew, D.; Rau, G.; Schuster, O. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **1989**, 129, 2505.

<sup>108</sup> Evans, A.M. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1992**, 42, 237 e i riferimenti al suo interno.

<sup>109</sup> Stock, K.P.; Geisslinger, G.; Loew, D.; Beck, W.S.; Bach, G.L.; Brune, K. *Rheumatol. Int.*, **1991**, 11, 199.

<sup>110</sup> Geisslinger, G.; Schuster, O.; Stock, K.P.; Loew, D.; Bach, G.L.; Brune, K. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, 38, 493.

<sup>111</sup> Brown, J.M. *Science* **1992**, 257, 1847.

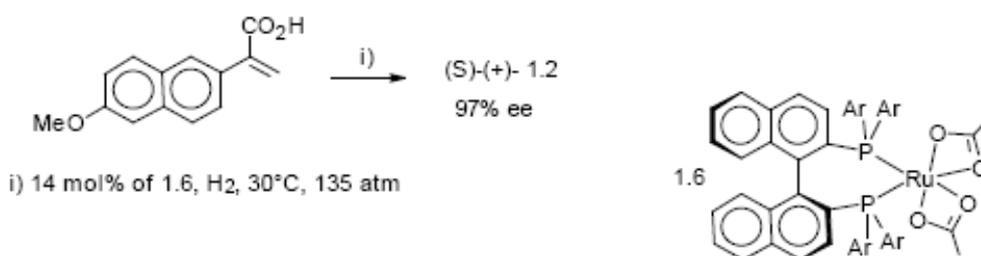
## 2.2 Metodologie di sintesi di (S)-Profeni

Dalla scoperta dei Profeni come importante classe di FANS, si sono susseguiti in quest'ambito numerosi articoli e brevetti che trattano della sintesi di Profeni enantiomericamente arricchiti. In letteratura esistono ormai numerose metodologie sintetiche ma è soprattutto negli ultimi anni che la biocatalisi sta giocando un ruolo molto importante in questo importante ambito.

### Metologie chimiche<sup>19</sup>

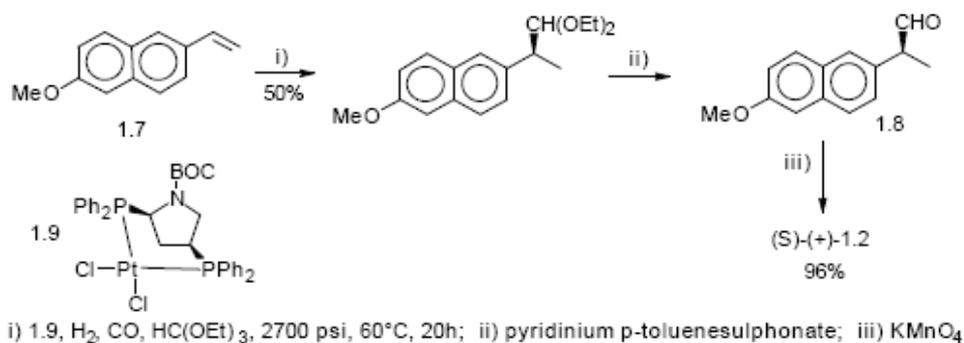
Idrogenazione di acidi 2-arilpropenoici

Acidi saturi otticamente attivi come i profeni possono essere sintetizzati a partire da acidi  $\alpha,\beta$ - insaturi, attraverso una idrogenazione asimmetrica. Complessi del rutenio come il [BINAP-Ru dicarbossilato] idrogenano acidi arilpropenoici prochirali con un'ottima resa e con una purezza ottica del 97%<sup>112</sup>.



Idroformilazione di stireni

L'idroformilazione enantioselectiva della specie stirenica catalizzata da platino, in presenza di stagno dicloruro<sup>113</sup>, porta alla formazione dell'aldeide con un eccesso enantiomerico del 73%. Tale stereosettività può essere portata al 96% nel caso in cui venga utilizzato il trietilortofornato, che previene la racemizzazione dell'aldeide derivante dalla chetalizzazione. L'ossidazione dell'aldeide con KMnO<sub>4</sub> porta alla formazione del naprossene S.

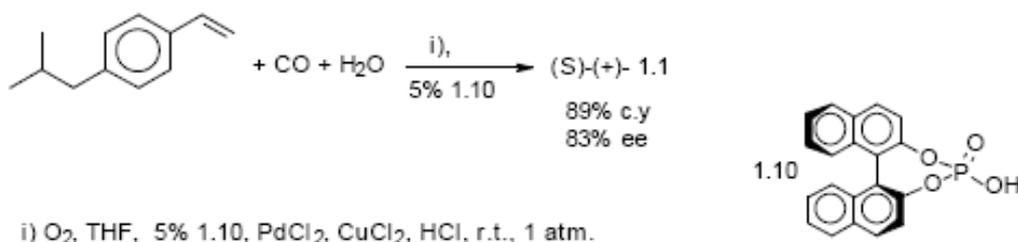


Idrocarbossilazione di olefine

La reazione di idrocarbossilazione in presenza di un catalizzatore chirale porta alla formazione di acidi sostituiti con alte rese, lavorando a temperatura ambiente e a pressione atmosferica.

<sup>112</sup> Noyori, R.; Nagai, K.; Kitamura, M. *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 3176.

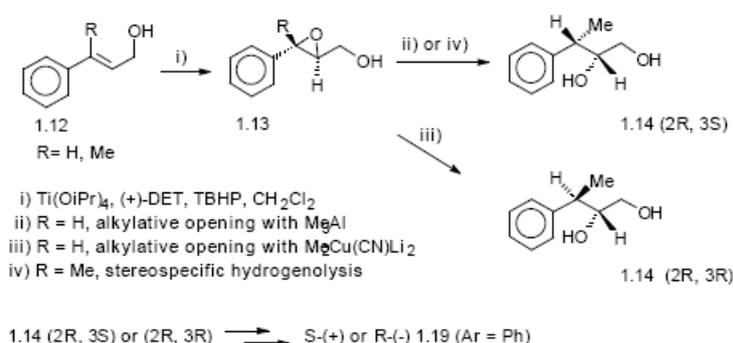
<sup>113</sup> Stille, J.K.; Parinello, G. *J. Mol. Cat.*, **1983**, *21*, 203.



### Epossidazione di Katsuki-Sharpless

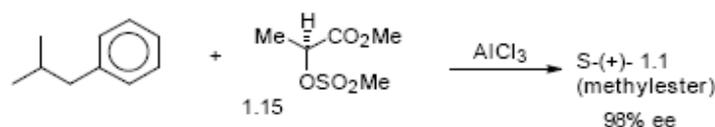
Epossidi-alcoli chirali sono intermedi sintetici versatili. L'epossidazione dell'alcool cinnamico 1.12 (R=H) attraverso il metodo di Katsuki-Sharpless, seguito dall'apertura alchilica tramite MeI, porta alla formazione di un nuovo centro stereogenico benzilico (1.13). Scegliendo il giusto agente alchilante è possibile ottenere entrambi gli enantiomeri a partire dallo stesso precursore epossidico.<sup>114</sup>

Una variante è l'idrogenolisi dell'eossido asimmetrico (R= Me) attraverso l'eossidazione di Sharpless che porta alla formazione solamente del diolo 2R, 3S<sup>115</sup>.



### Acilazione di Friedel-Crafts di composti aromatici

Le condizioni acide della reazione di Friedel-Crafts permettono di associare l'acilazione asimmetrica ad un processo di racemizzazione. Tale reazione, con l'aiuto di  $\text{AlCl}_3$  e in presenza del derivato dell'acido lattico, porta alla formazione dell'estere metilico con un eccesso del 98% ma con una resa del 50%<sup>116</sup>.



### Reazioni di coupling col Grignard

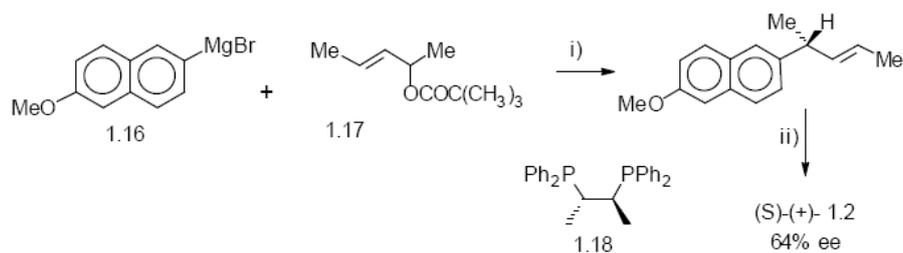
E' possibile ottenere il naprossene S con un ee del 64% facendo reagire il Grignard 1.16 col composto 1.17 enantioselettivamente, attraverso un catalisi organometallica (complesso nickel-chiraphos)<sup>117</sup>.

<sup>114</sup> a) Katsuki, T.; Sharpless, K.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 5974. b) Takano, S.; Yanase, M.; Ogasawara, K. *Heterocycles*, **1989**, *29*, 1849.

<sup>115</sup> Coghlan, D.R.; Hamon, P.G.; Massy-Westropp, R.A.; Slobedman, D. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1990**, *1*, 299.

<sup>116</sup> a) Piccolo, O.; Spreafico, F.; Visentin, G. *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 3946. b) Piccolo, O.; Azzena, U.; Melloni, G.; Delogu, G.; Valoti, E. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 183.

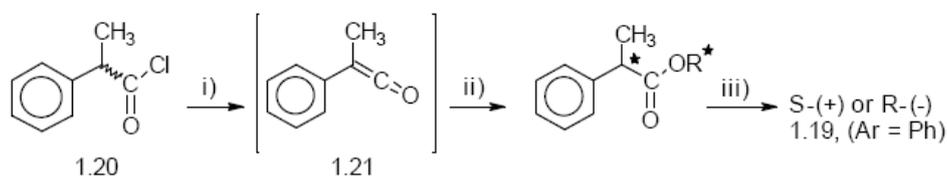
<sup>117</sup> Hiyami, T.; Wasaka, N. *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 3259.



i)  $[\text{NiCl}_2 - 1.18]$ , THF, r.t.; ii) oxidative cleavage ( $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{KMnO}_4$ )

### Protonazione enantioselettiva

L'acil cloruro racemico 1.20 può essere trasformato nel corrispettivo chetene prochirale. L'aggiunta di una specie  $\text{R}^*\text{OH}$  ( $\alpha$ -idrossiacidi o lattoni) al chetene porta alla formazione di un estere del corrispondente acido arilpropionico con un'alta diastereoselettività e successivamente, attraverso l'idrolisi dell'estere, è possibile ottenere l'acido desiderato. Nel caso in cui venga utilizzato l'*R*-pantolattone, si ottiene quasi esclusivamente il naprossene  $R$ <sup>118</sup>.



i)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ; ii)  $\text{R}^*\text{OH}$ , toluene,  $-78^\circ\text{C}$ ;  $\text{AcOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $70^\circ\text{C}$ ; iii)  $\text{AcOH}$ ,  $2\text{N HCl}$ ,  $85^\circ\text{C}$

### Risoluzione di sali diastemerici; risoluzione cinetica ed enzimatica

Nel campo dei composti enantiomericamente puri, la risoluzione di racemi resta sempre una valida alternativa. La formazione diastemerica di un sale tra il naprossene racemo con la (-)-cinconidina permette di ottenere il profen *S* nella forma pura, con una resa del 49%<sup>119</sup>. La miscela diastemerica dell'anidride del naprossene racemo può essere cineticamente risolta facendola reagire con (*R*)-(+)-1-(4-piridil)etanolo, ed ottenendo in questo modo il naprossene *S* con una resa dell'81% e un ee del 55%<sup>120</sup>.

### Metologie biocatalitiche<sup>121</sup>

Le metodologie enzimatiche offrono sicuramente il miglior compromesso tra sostenibilità e purezza enantiomerica dei Profeni sintetizzati. Tuttavia tutte le metodologie proposte fino ad ora, seppure valide, stentano ad affacciarsi sul mercato per ragioni di natura tecnica/economica. Il problema principale è il costo del biocatalizzatore, enzima o cellula viva che sia, associato alla difficoltà nella sua riciclabilità rispetto ad un catalizzatore organico.

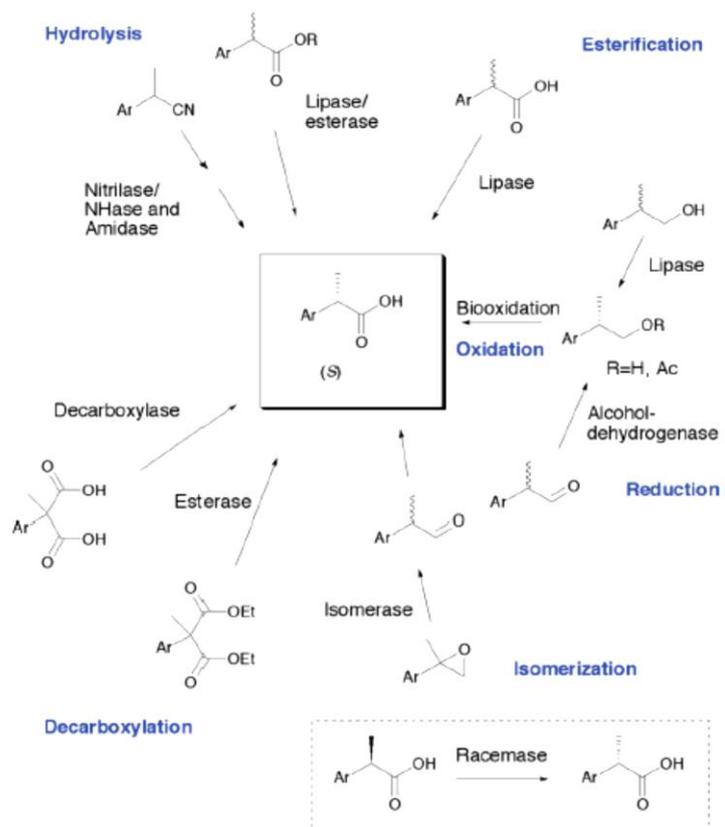
Gli enzimi utilizzati per queste trasformazioni sono molteplici come lo sono gli starting material e svolgono importanti processi di risoluzione cinetica, risoluzione cinetico dinamica, racemizzazione e deracemizzazione.

<sup>118</sup> Larsen R.D.; Corley, E.G.; Davis, P.; Reider, P.J.; Grabowski, E.J.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 7650.

<sup>119</sup> Harrison, I.T.; Lewis, B.; Nelson, P.; Rooks, W.; Ruzkowi, R.; Tomolonis, A.; Fried, J.H. *J. Med. Chem.*, **1970**, *13*, 203.

<sup>120</sup> Frank, A.; Ruchardt, C. *Chemistry Lett.*, **1984**, 1431.

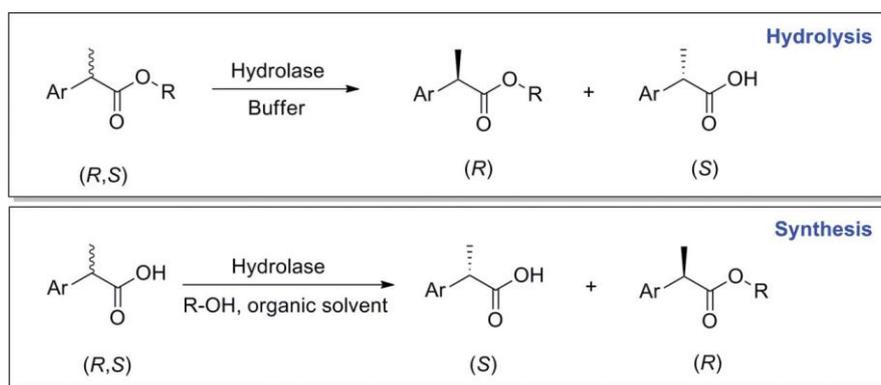
<sup>121</sup> R. Kourist, P. Domiguez de Maria and K. Miyamoto, *Green Chem.*, **2011**, *13*, 2607.



## Idrolasi

### Esterasi

L'approccio che utilizza la risoluzione cinetica delle idrolasi o esterasi è stato uno dei primi metodi biocatalitici per la sintesi degli S-Profeni<sup>122</sup> e ancora oggi mostra grandi potenzialità. Questi processi, molto numerosi, si applicano spesso sugli scheletri Profenici. La reazione può essere fatta in solvente acquoso su una miscela racema di esteri Profenici con l'idrolisi selettiva solo dell'estere S, oppure si può svolgere la reazione sui Profeni racemi ed esterificare solo l'R.

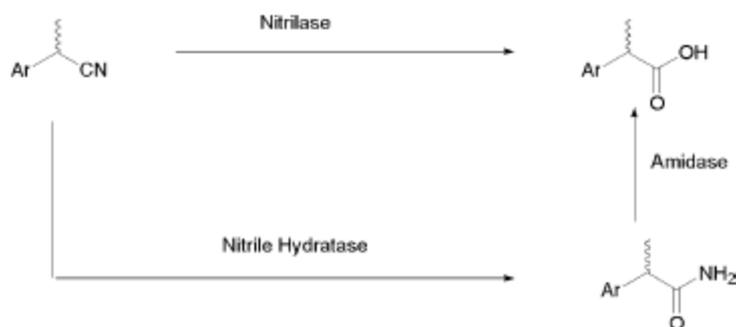


Tra gli enzimi utilizzati, uno dall'organismo *Bacillus* e una da *Serratia Marcescens*

Conversione del gruppo nitrile

<sup>122</sup> W. J. Quax and C. P. Broekhuizen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1994**, 41, 425-431

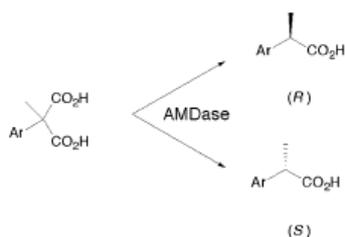
Gli enzimi che agiscono sul gruppo nitrile, considerati sempre delle idrolasi, sono tre e sono rappresentati in questo schema. La loro importanza è relativa alla sintesi di molte molecole bioattive.<sup>123</sup>



Le amidasi di natura microbiologica offrono spesso alti livelli di (*S*)-enantioselettività nei confronti delle profenammidi,<sup>124</sup> e spesso sono riportate sintesi da parte di sistemi di nitrile idratasi/amidasi da parte di cellule intere. D'altra parte però la stereoselettività delle sole nitrile idratasi è davvero poco frequente nell'ambito dei profeni. Ma le nitrilasi, stanno ricevendo sempre più attenzione, a partire dal primo esempio interessante ottenuto utilizzando delle cellule intere di *Acineto Bacter*.<sup>125</sup>

### Liasi

Tra le metodologie che sfruttano le liasi, si annovera l'utilizzo delle aril-malonato carbossilasi da *Bordatella bronchoseptic*. Questi enzimi catalizzano sfruttano la desimmetrizzazione degli acidi  $\alpha$ -aril- $\alpha$ -metil malonici, tramite decarbossilazione, portando teoreticamente a delle rese fino al 100%.<sup>126</sup>



Molte limitazioni all'utilizzo di questi enzimi sono legate alla facilità con cui vengono inibiti e alla più frequente formazione dell'enantiomero non desiderato, l'*R*.

### Isomerasi

Miyamoto and Ohta<sup>127</sup> hanno riportato il riarrangiamento di epossidi con l'utilizzo di una stirene ossido isomerasi ricombinante da *Pseudomonas Putida*.



Il 2-metil-stirene ossido isomerizza infatti alla relativa 2-fenil propanale che poi tramite ossidazione può essere trasformata nell'acido.

### Ossidoreduttasi

<sup>123</sup>a) R. N. Thuku, D. Brady, M. J. Benedik and B. T. Sewell, *J. Appl. Microbiol.*, **2009**, 106, 703–727; b) S. Van Pelt, F. Van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Chim. Oggi-Chem. Today*, 2008, **26**, 2–4; c) M. X. Wang, *Chimia*, **2009**, 63, 331–333.

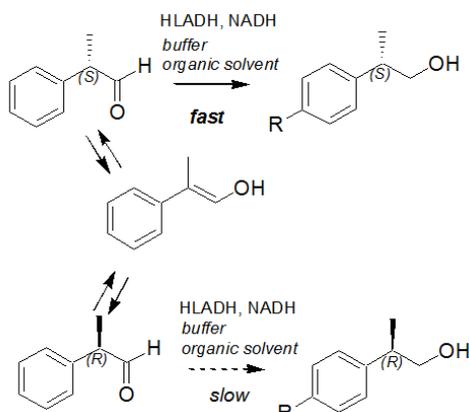
<sup>124</sup> M. X. Wang, G. Lu, G. J. Ji, Z. T. Huang, O. Meth-Cohn and J. Colby, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 1123–1135.

<sup>125</sup> K. Yamamoto, Y. Ueno, K. Otsubo, K. Kawakami and K. I. Komatsu, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1990**, 56, 3125–3129.

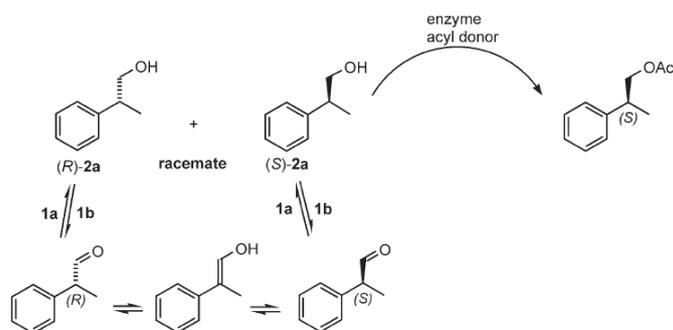
<sup>126</sup> K. Miyamoto and H. Ohta, *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 210, 475–481.

<sup>127</sup> K. Miyamoto, K. Okuro and H. Ohta, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 3255–3257

I metodi che sfruttano le deidrogenasi sono stati ampiamente trattati dal mio gruppo di ricerca, che è stato il primo nel 2007 a proporre una sintesi di 2*S*-profenoli (diretti precursori degli *S* Profeni) a partire dalle relativi 2-profenali raceme tramite una bioriduzione enantioselettiva con risoluzione cinetico dinamica (DKR) utilizzando l'enzima HLADH<sup>128</sup>.

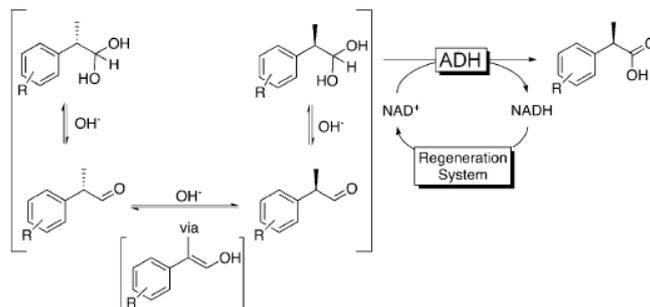


Sono usciti successivamente altri studi che utilizzano la DKR con deidrogenasi; Bakvall<sup>129</sup> sfrutta lo stesso meccanismo di DKR ma partendo dal 2-fenil propanolo racemo.



Una lipasi Amano Lipase PS-D da *Burkholderia cepacia* acila direttamente e selettivamente l'alcol *S*; l'alcol *R* che non reagisce, viene ossidato ad aldeide tramite il catalizzatore si Shvo<sup>130</sup>, la quale racemizza e viene nuovamente ridotta sempre dal catalizzatore si Shvo. Racemizzando e riducendosi si ottiene di nuovo in parte dell'alcol *S*, che viene nuovamente acilato.

Ancora più recentemente è uscito un articolo sull'utilizzo di aldeide deidrogenasi in grado di ossidare solo la 2*R*-fenil propanale ad acido carbossilico, sfruttando sempre la DKR tra l'aldeide *R* e l'aldeide *S*<sup>131</sup>.



Tuttavia la reazione porta all'*R* profene e non all'*S* e non risultano per ora applicazioni ai Profeni.

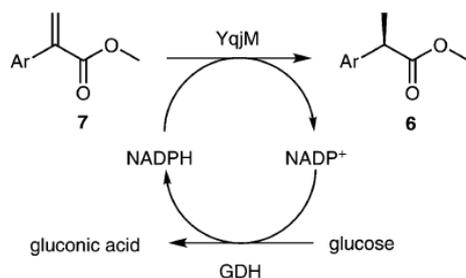
Un'ultima interessante applicazione delle riduttasi è l'utilizzo di una ene-reduttasi da *Bacillus Subtilis* su enoati<sup>132</sup>, che però anche in questo caso porta alla sintesi di derivati *R*-Profenici.

<sup>128</sup> D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo and F. Paradisi, *Chem. Commun.*, **2007**, 403

<sup>129</sup> D. Strubing, P. Krumlinde, J. Piera, and J. Backvall, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1577 – 1581

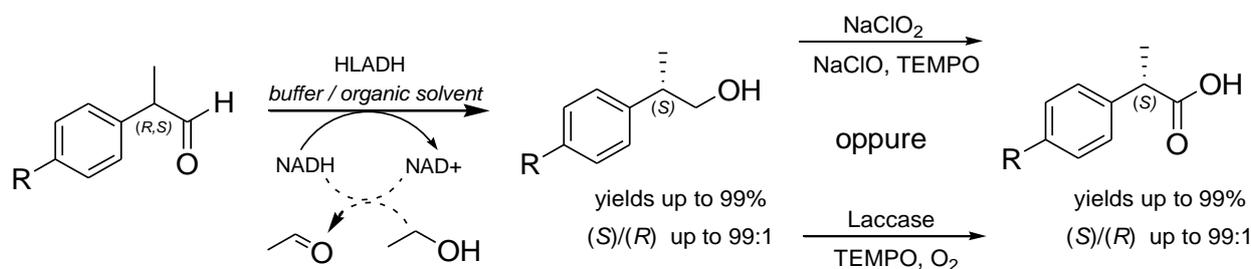
<sup>130</sup> Shvo, Y.; Czarkie, D.; Rahamim, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108 (23) 7400–2.

<sup>131</sup> P.I Kçnst, H. Merkens, S. Kara, S. Kochius, A. Vogel, R. Zuhse, D.Holtmann, I. Arends, and F. Hollmann *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 9914 –9917



### 2.3 Metodo chemoenzimatico per la sintesi di (S)-Profeni con alcool deidrogenasi

Il gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio dottorato si occupa da moltissimo tempo della sintesi dei Profeni enantiomericamente puri. L'approccio utilizzato è una sintesi chemoenzimatica che parte dalle aldeidi 2-arilpropioniche raceme, come è stato accennato nel paragrafo precedente. Il primo step prevede una bioriduzione enantioselettiva mediata dall'enzima HLADH (naturale, clonato e modificato) concomitante ad una risoluzione cinetico-dinamica a dare i 2S-aril propanoli; Il secondo step è un'ossidazione, che può essere effettuata chimicamente oppure tramite metodologie biocatalitiche.



#### 2.3.1 Primo Step: Sintesi enantioselettiva di 2(S)-Aril Propanoli mediata dall'enzima HLADH<sup>133</sup>

Questa metodologia sintetica prevede la sintesi di 2(S)-arilpropanoli enantiomericamente puri, a partire da aldeidi 2-arilpropiliche raceme, attraverso a riduzione enantioselettiva

Lo step di riduzione enzimatica per opera di uno specifico enzima alcool deidrogenasi (ADH): l'*Horse Liver Alcohol Dehydrogenase* (HLADH), estratto da fegato di cavallo.

#### Horse Liver Alcohol Dehydrogenase (HLADH)

L'*Horse Liver Alcohol Dehydrogenase* (HLADH) (Figura 7.1) è un importante enzima NADH dipendente appartenente alla classe I delle Alcohol Dehydrogenase. E' composto da due monomeri del peso di 40,000 Da ciascuno<sup>134</sup>.

Ogni subunità può esistere in due forme isomorfe chiamate *S* ed *E*. I monomeri possono formare omodimeri *EE* ed *SS* oppure dar vita l'eterodimero *ES*. In base al tipo di isoenzima formato, l'HLADH risulta più attivo verso substrati come l'etanolo (isoenzima *EE*) o molecole steroidee (isoenzima *SS*)<sup>135</sup>. Questa peculiarità permette all'HLADH di ossidare un vasto spettro di alcoli primari a catena lineare e ramificata, secondari, alcoli ciclici e steroidi. I monomeri *E* ed *S* differiscono tra loro di 10 aminoacidi (l'*E* è composto da 374 aa, mentre l'*S* da 384 aa). Alcuni di questi aminoacidi modificati sono coinvolti nella formazione del sito attivo, e quindi spiegano il motivo per cui l'isoenzima *SS* sia in grado di catalizzare substrati di grosse dimensioni

<sup>132</sup> J. Pietruszka and M. Schölzel, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 751 – 756

<sup>133</sup> P. Galletti, E. Emer, G. Gucciardo, A. Quintavalla, M. Pori, D. Giacomini, *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2010**, 8, 4117–4123

<sup>134</sup> Vedi: *Worthington Enzyme Manual* ([www.worthington-biochem.com](http://www.worthington-biochem.com)) Drum *et al.* 1967; Blomquist *et al.* 1967

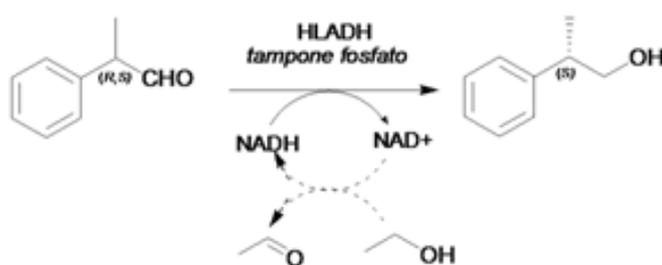
<sup>135</sup> Jörnvall, 1970, Andersson *et al.* 1974

come steroidi. Ogni monomero possiede due atomi di zinco, uno posizionato nel sito attivo e coordinato a due cisteine e una istidina l'altro, coordinato a quattro cisteine ed avente solamente una funzione strutturale.

L'HLADH è un enzima NADH dipendente, se paragonato all'*Yeast Alcohol Dehydrogenase* (YADH) comunemente impiegato nella riduzione dei chetoni, risulta essere più selettivo e più stabile in condizioni di stress biologico come le alte temperature e la presenza di piccole quantità di solventi organici utilizzati come co-solventi

### Prime prove di riduzione: la 2-fenilpropanale (1a)

Per mettere a punto la reazione di riduzione è stato scelto una aldeide arilpropionica come modello, 2-fenilpropanale (**1a**), caratterizzata da un gruppo arilico non sostituito, disponibile commercialmente in forma racemica. Tale aldeide è stata dispersa in una soluzione di tampone fosfato 0.1M (pH 7.5) ad una concentrazione 0.5 mM ed è stata messa a reagire con 0.01 mg/ml di HLADH e con NADH alla concentrazione 1mM.



La reazione è stata seguita nel tempo tramite HPLC e la conversione è stata monitorata tramite retta di taratura dell'alcool racemo puro, mentre l'eccesso enantiomerico è stato determinato tramite HPLC chirale (Tabella 1). I risultati mostrano la conversione in alcool maggiore dell'80% dopo appena 5 ore ed un rapporto enantiomerico S/R del prodotto di 82:18 Tali valori rimangono pressoché invariati anche dopo 24 ore.

Tabella 1

caso	durata (ore)	HLADH (mg/mL)	resa (%)	S%	R%
1 <sup>a</sup>	5	0,01	81,10	82	18
2 <sup>a</sup>	24	0,01	88,5	81	19
3 <sup>a</sup>	5	0,002	75,1	>99	nd
4 <sup>a</sup>	24	0,002	89,1	95	5
5 <sup>b</sup>	5	0,01	88,7	84	16
6 <sup>b</sup>	24	0,01	99,4	83	17

Condizioni di reazione: [a] 2-fenilpropanale 0.5 mM, NADH 1 mM;

[b] 2-fenilpropanale 0.5 mM, NADH 0.01 mM, etanolo 0.5 M

Anche riducendo la quantità di enzima non si osserva un abbassamento delle rese, mentre si riscontra un aumento dell'eccesso enantiomerico a favore dell'alcool S fino alla completa scomparsa dell'altro enantiomero (Tabella 1, casi 3 e 4).

Per rendere il processo economicamente vantaggioso, oltre ad abbassare a 0.002 mg/ml la quantità di enzima, è stato messo a punto un sistema di riciclo del cofattore (Tabella 2). Per fare questo è stato aggiunto all'ambiente di reazione dell'etanolo. Quest'ultimo reagendo con l'HLADH ed il NAD<sup>+</sup> prodotto dal processo di riduzione del fenilpropanale, viene ossidato ad acetaldeide, producendo al contempo NADH. I dati 5 e 6 in tabella mostrano che l'introduzione dell'etanolo oltre a riciclare il cofattore, non modifica la resa e la stereoselettività della riduzione.

Questi dati, sebbene derivino da prove preliminari mostrano che 1) l'HLADH è enzima specifico verso questo tipo di substrati e che la sua catalisi porta alla formazione dell'alcool *S*, precursore dei Profen, 2) il processo è caratterizzato da una risoluzione di tipo *cinetico-dinamico* e non solamente di tipo *cinetico*.

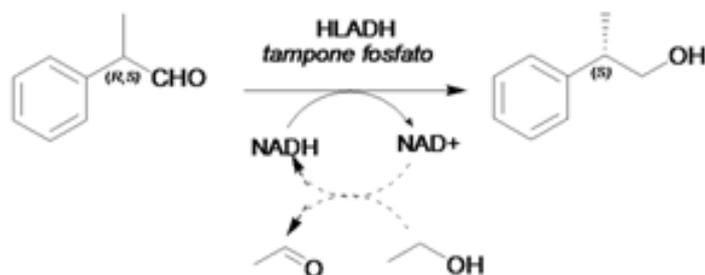


Tabella 2

caso	durata (ore)	HLADH (mg/mL)	resa (%)	S%	R%
1 <sup>a</sup>	27	0,002	96,20	96	4
2 <sup>b</sup>	27	0,002	94,7	95	5

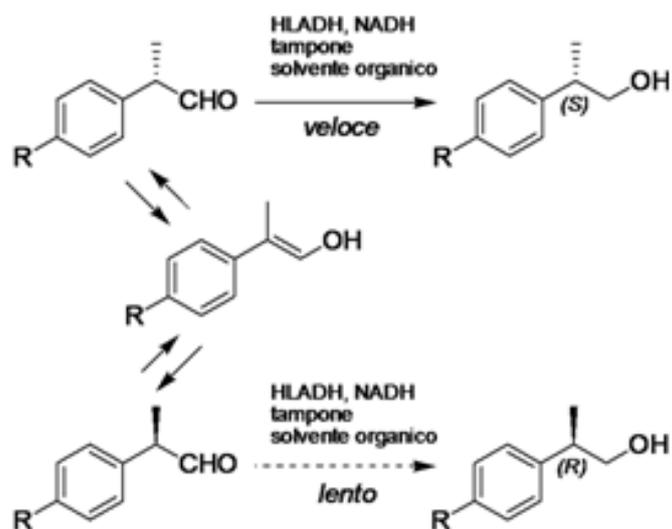
Condizioni di reazione: [a] (*R*)-2-fenilpropanale 0.5 mM, NADH 1 mM; [b] (*R*)-2-fenilpropanale 0.5 mM, NADH 0.01 mM, etanolo 0.5 M

Per valutare la fondatezza delle nostre ipotesi, ovvero di un meccanismo DKR, è stata preparata l'(*2R*)-2-fenilpropanale ed è stata ridotta nelle condizioni di reazione viste sopra.

Anche in questo caso la conversione è quantitativa ed osserviamo l'inversione dello stereocentro e quindi la formazione dell'alcool *S*.

I risultati ottenuti da queste prove ci hanno permesso di ipotizzare di essere nelle condizioni di una risoluzione cinetico-dinamica. Innanzitutto, essendo l'HLADH un enzima specifico verso l'aldeide *S*, la velocità di riduzione di questo enantiomero è molto maggiore rispetto alla specie *R*; e grazie a questo si ottengono ottimi l'eccessi enantiomerici. Poiché dal processo si ottengono rese quantitative e non solamente del 50%, come nel caso di una semplice risoluzione cinetica, si considera la possibilità di una risoluzione cinetico-dinamica. Tutto ciò è possibile poiché in soluzione, l'aldeide subisce un continuo equilibrio di racemizzazione, passando attraverso la forma enolica<sup>136</sup>.

<sup>136</sup> C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber and W. Kroutila, *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, *348*, 1789–1805.



La bassa solubilità del 2-fenilpropanale in soluzione tampone non consente di svolgere tale processo su grosse quantità e tanto meno di ridurre le altre aldeidi 2-arylpropionche, molto più lipofile. Per questo motivo si è voluta provare l'aggiunta di diversi co-solventi organici all'ambiente acquoso: CH<sub>3</sub>CN, THF ed esano. In questo modo si sono testati tre diverse tipologie di solventi: il primo completamente miscibile in acqua, il secondo parzialmente miscibile ed il terzo immiscibile.

L'utilizzo di CH<sub>3</sub>CN e THF al 10% (v/v) rispetto alla soluzione tampone viene ben tollerato dall'enzima (Tabella 3). Gli eccessi enantiomerici sono maggiori col THF (10%) rispetto al CH<sub>3</sub>CN (10%), sebbene le rese ottenute siano inferiori.

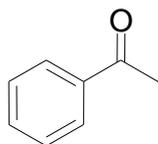
Buoni risultati si sono ottenuti su quantità maggiori di substrato impiegando CH<sub>3</sub>CN al 16% ed utilizzando il riciclo del cofattore (Tabella 3, caso 2). Anche in questo caso, dopo purificazione cromatografica si è ottenuta una resa quantitativa (90%) e una buona enantioselettività (94%) del (2S)-2-fenilpropanolo.

Tabella 3

caso	cosolvente (%)	durata (ore)	HLADH (mg/ml)	resa (%)	S%	R%
1 <sup>a</sup>	CH <sub>3</sub> CN (10)	5	0,01	71,9	89	11
2 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub> CN (16)	96	0,09	90,3	94	6
3 <sup>a</sup>	THF (10)	5	0,01	54,7	96	4
4 <sup>c</sup>	THF (10)	5	0,01	54,1	95	5
5 <sup>a</sup>	esano (90)	5	0,2	69,9	74	26
6 <sup>a</sup>	esano (95)	5	0,2	80,3	64	36
7 <sup>c</sup>	esano (95)	5	0,2	68	72	28
8 <sup>c</sup>	esano (99)	5	0,2	54,6	90	10

Condizioni di reazione: [a] 2-fenilpropanale 0.5 mM, NADH 1 mM; [b] 2-fenilpropanale (1 mmol 0.045 M), NADH (1 mmol), EtOH (5.1 mmol) in 24 mL di tampone-CH<sub>3</sub>CN (16%), resa dopo colonna flash; [c] 2-fenilpropanale 0.5 mM, NADH 0.01 mM, EtOH 0.5 M.

Aggiungendo 10% di esano la reazione non procede, mentre impiegandone una grande quantità (90-99% v/v) e aggiungendo un eccesso di enzima e di NADH direttamente alla miscela di reazione, sotto forte agitazione, la reazione procede bene, dando in alcuni casi rese molto superiori al 50% (Tabella 3, esempio 6). Studi cromatografici hanno mostrato al procedere della reazione di riduzione, la formazione di un sottoprodotto che da analisi HPLC-MS, <sup>1</sup>HNMR e GC-MS, risulta acetofenone.



Studi successivi inoltre, hanno dimostrato che la formazione di tale chetone non è causata dall'enzima, ma dall'ambiente acquoso di reazione ed in particolare dal suo pH. Per questo motivo si è provato ad utilizzare un diverso tampone acquoso (tampone pirofosfato) ad un pH leggermente superiore a quello usato in precedenza (pH 8.0 anziché 7.5).

Visto che la presenza di un co-solvente organico al passare del tempo, denatura la struttura enzimatica, disattivando il catalizzatore e quindi la catalisi, si è deciso di aggiungere una seconda aliquota di enzima dopo 5 ore di reazione.

I risultati raccolti (Tabella 4) dimostrano che a pH 8.0 l'enzima mantiene un'ottima enantioselettività, soprattutto con CH<sub>3</sub>CN e THF al 10% (Tabella 4, esempi 2 e 3), inoltre, l'aggiunta di una seconda aliquota di enzima, consente in presenza di co-solvente di aumentare nettamente la resa (≥80%).

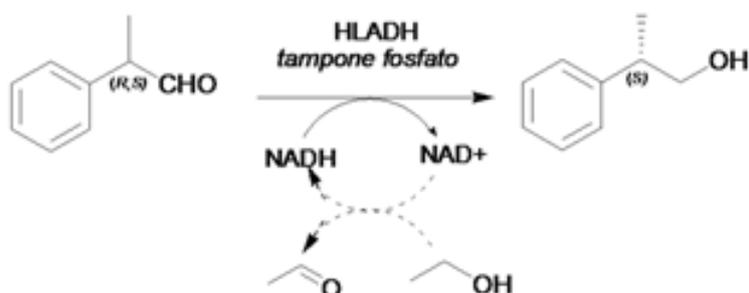


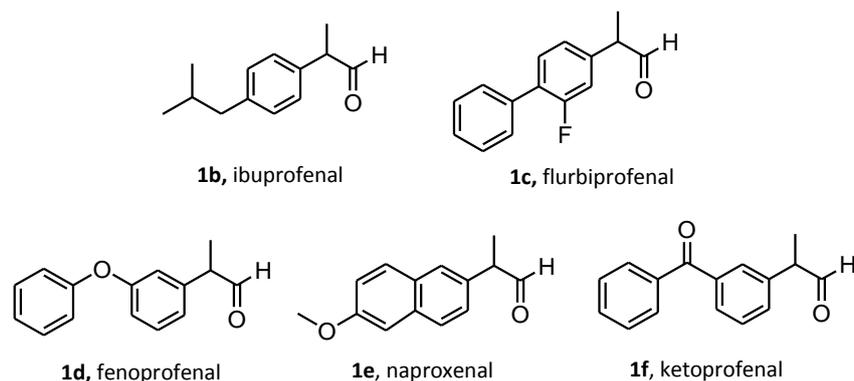
Tabella 4

	cosolvente (%)	durata (ore)	HLADH (mg/ml)	resa (%)	S%	R%
1	-	24	0,01	99	83	17
2	CH <sub>3</sub> CN (10)	24	0,01	84	98	2
3	THF (10)	24	0,01	80	99	1
4	THF (5)	24	0,01	88	95	5

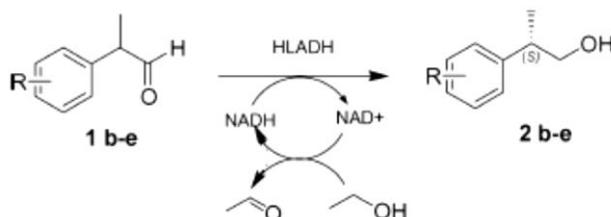
Tampone fosfato pH 8.0, 0.1M, NADH 0.01mM, EtOH 0.5M, T=rt. In tutti i casi aggiunta una seconda aliquota di HLADH dopo 5 ore

### Estensione alle altri aldeidi alrilpropioniche: Ibuprofenale, Flurbiprofenale, Fenoprofenale, Naprossenale e Ketoprofenale

Abbiamo successivamente esteso lo studio di bioriduzione enzimatica con l'HLADH alle altre 2-aril propanali, importanti precursori dei Profeni. Le aldeidi raceme non sono commercialmente disponibili e sono state ottenute in due passaggi (descritti nella parte sperimentale) a partire dagli acidi 2-aril propionici.



Anche in questo caso le reazioni di bioriduzione sono state effettuate utilizzando il NADH in presenza di EtOH utilizzando la metodologia del riciclo del cofattore.



Ent.	Sub.	Enzyme amount (U/mmol)	pH	10% Co-solvent	Yield (%) <sup>a</sup>	S/R
1	<b>1b</b>	25	7.5	—	69	97/3
2	<b>1b</b>	25	7.5	CH <sub>3</sub> CN	93	>99/1
3	<b>1b</b>	25	7.5	THF	46	>99/1
4	<b>1c</b>	25	7.5	—	92	96/4
5	<b>1c</b>	25	7.5	CH <sub>3</sub> CN	98	>99/1
6	<b>1c</b>	25	7.5	THF	49	>99/1
7	<b>1c<sup>d</sup></b>	25	8	CH <sub>3</sub> CN	63	>99/1
8	<b>1d</b>	25	7.5	—	93	66/34
9	<b>1d</b>	25	7.5	CH <sub>3</sub> CN	92	82/18
10	<b>1d</b>	25	7.5	THF	68	>99/1
11	<b>1d</b>	10 <sup>e</sup>	8	—	99	81/19
12	<b>1d</b>	25	8	THF	82	93/7
13	<b>1d</b>	25	8	CH <sub>3</sub> CN	97	82/18
14	<b>1d</b>	10 <sup>e</sup>	8	CH <sub>3</sub> CN	98	93/7
15	<b>1d<sup>d</sup></b>	25	8	CH <sub>3</sub> CN	82	>99/1
16	<b>1e</b>	25	7.5	—	44	92/8
17	<b>1e</b>	25	7.5	THF	42	88/12
18	<b>1e</b>	25	7.5	CH <sub>3</sub> CN	38	90/10
19	<b>1e</b>	25	8.0	—	63	86/14
20	<b>1e</b>	25	8.0	THF	58	98/2
21	<b>1e</b>	25	8.0	CH <sub>3</sub> CN	67	92/8

Tabella 5

I primi risultati osservati hanno mostrato per l'ibuprofenale **1b** e per la flurbiprofenale **1c** ottimi risultati intermini di resa ed enantioselettività utilizzando il 10% di MeCN in tampone fosfato a pH 7.5, 0.1 Molare. (Tabella 5). Per quanto riguarda la fenoprofenale **1d**, il rapporto S/R in queste condizioni non è risultato soddisfacente ma è stato migliorato aumentando il pH e abbassando la quantità di enzima utilizzata; in particolare si è proceduto inserendo l'enzima in due aliquote a tempi differenti. Per quanto riguarda la naprossenale, il rapporto enantiomerico è risultato buono ma non le rese, anche se valori maggiori del 50% ci hanno comunque suggerito che intervenisse il fenomeno della risoluzione cinetico-dinamica. In tutti i casi, tutte e quattro le aldeidi hanno fornito l'S come enantiomero maggioritario.

La determinazione della configurazione è stata fatta con diverse strategie. Per gli alcoli **2b** e **2e**, la configurazione è stata assegnata paragonandoli a campioni di (S)-alcoli ottenuti per riduzione degli (S)-acidi commerciali con BH<sub>3</sub> SME<sub>2</sub>.

Per la determinazione della configurazione di **2c** e **2d** (i cui (*S*)-acidi non sono commerciali), si è effettuata la bioriduzione enzimatica molto in grande (in scala semipreparativa) e gli alcoli ottenuti sono stati ossidati ai corrispondenti (*S*)-Profeni con  $\text{KMnO}_4$  in acetone. E' stata poi misurata la rotazione ottica con i dati presenti in letteratura, confermando la configurazione *S*.

In particolare, l'ossidazione con  $\text{KMnO}_4$  non ha causato la racemizzazione di nessuno dei due alcoli.

Su tutte le prove effettuate, le analisi del grezzo di reazione quando le rese non erano quantitative, non è stata osservata la presenza di aldeidi ma del corrispondente arilchetone. In particolare la naprossenale **1e** ha sempre portato a quantitativi di arilchetone **3e** molto superiori a quelli delle altre aldeidi.

L'ultima aldeide 2-aril propionica studiata è stata la Ketoprofenale (**1f**). L'interesse relativo a questo composto è dovuto alla contemporanea presenza di due gruppi carbonilici, uno aldeidico e uno chetonico.

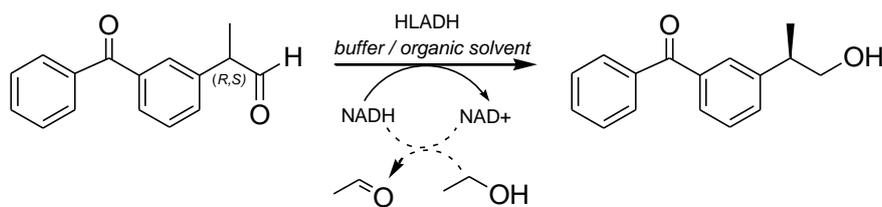


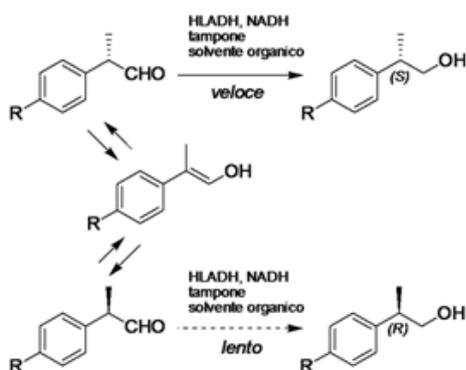
Tabella 6

Entry	Enzyme amount (U/mmol)	pH	10% Co-solvent	<b>2f</b> (yield %) <sup>a</sup>	<i>S</i> / <i>R</i>
1	25	7.5	—	95	75/25
2	10 <sup>c</sup>	7.5	—	99	93/7
3	25	7.5	CH <sub>3</sub> CN	80	94/6
4	10 <sup>c</sup>	7.5	CH <sub>3</sub> CN	54	99/1
5	25	7.5	THF	88	95/5
6	10 <sup>c</sup>	7.5	THF	36	99/1
7	25	8.0	—	37	99/1
8	25	8.0	CH <sub>3</sub> CN	9	99/1

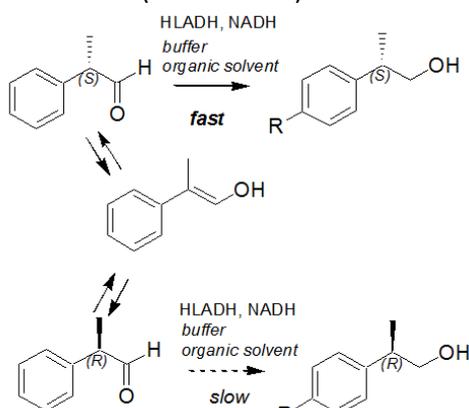
L'HLADH ha dimostrato un elevato grado di chemoselettività producendo come unico composto il chetoalcol **2f** desiderato in alte rese. Non sono state trovate infatti tracce della possibile riduzione del chetone (l'idrossi aldeide o il diolo) e sono state osservate in generale alte rese ed enantioselectività in assenza di un cosolvente; l'utilizzo di un cosolvente come CH<sub>3</sub>CN e THF ha portato a buoni eccessi enantiomerici ma a rese significativamente più basse (Tabella 6).

### Meccanismo della risoluzione cinetico dinamica delle aldeidi arilpropioniche

L'elevata (*S*)-enantioselectività della riduzione enzimatica in termini di costante cinetica, dimostra che la velocità di riduzione delle aldeidi (*S*) ( $k_S$ ) è maggiore delle aldeidi (*R*) ( $k_R$ ), ma l'efficienza dell'intero processo è strettamente connessa alla velocità di racemizzazione ( $k_{inv}$ ).



Noyori<sup>137</sup> ha sviluppato un trattamento quantitativo di un processo DKR tramite un sistema di riduzione accoppiato ad una stereoinversione e ha mostrato che conversioni quantitative e buone enantioselettività possono ancora essere ottenute quando la costante di velocità della racemizzazione ( $k_{inv}$ ) e la costante di velocità di riduzione dell'enantiomero più veloce sono le stesse. Se  $k_{inv}$  diventa più lenta di  $k_{fast}$  si osserva un abbassamento nell'eccesso enantiomerico dell'enantiomero preferito ad alte conversioni, ma un buon processo DKR può essere ancora ottenuto se  $k_{inv}$  è più elevata della velocità costante di riduzione dell'enantiomero che reagisce più lentamente ( $k_{inv} > k_{slow}$ ).

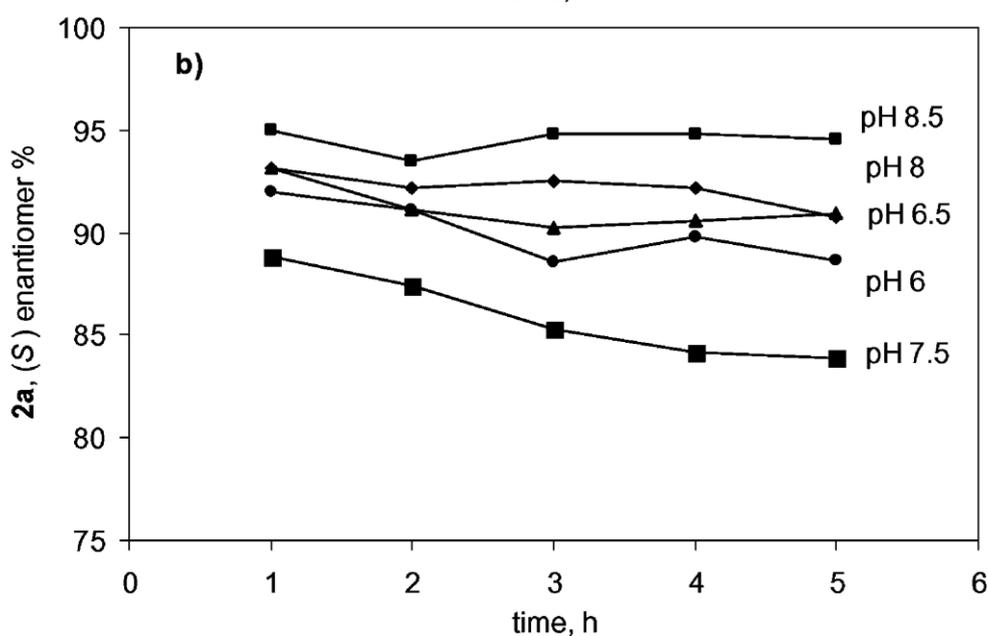
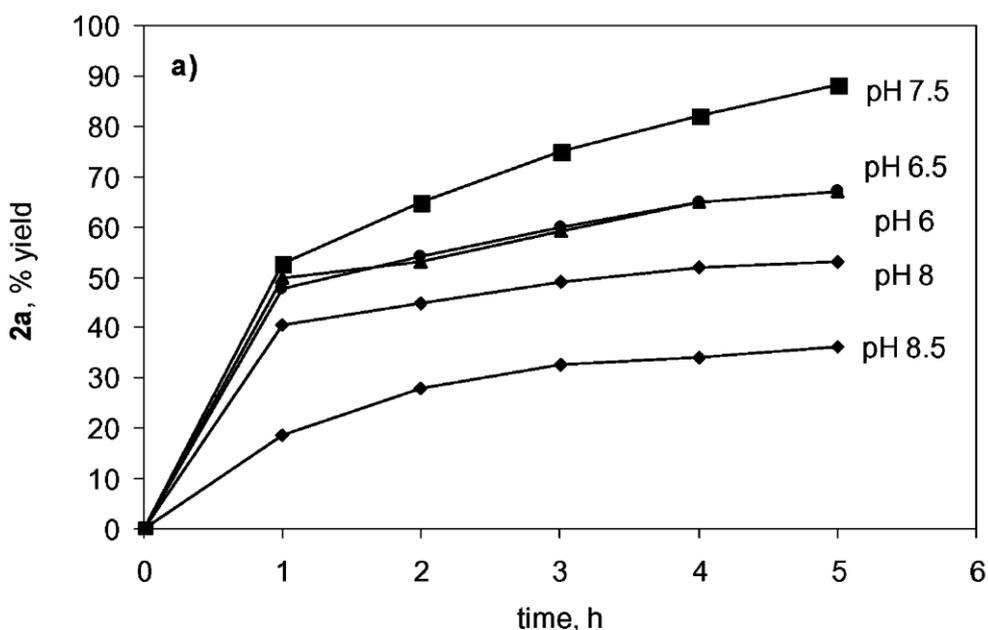


Noi abbiamo osservato in generale una diminuzione nel tempo del rapporto  $S/R$  all'aumentare delle rese di reazione e questo può essere legato ad una  $k_{inv}$  più lenta di  $k_S$ . Inoltre sia la risoluzione che la racemizzazione sono assolutamente pH dipendenti; in particolare la tautomeria cheto-enolica avviene tramite trasferimento di protoni.<sup>138</sup> Abbiamo quindi studiato la bioriduzione della 2-fenilpropanale a diversi valori di pH, nel range tra 6-8.5, tenendo conto soprattutto la sensibilità dell'enzima HLADH. Come ci aspettavamo, le rese sono fortemente influenzate dal pH. A pH 7.5 la resa è stata particolarmente buona, ma non a pH 8.5. Il risultato potrebbe essere dovuto ad una diminuzione della attività dell'enzima e del legame con il cofattore ad alti valori di pH.<sup>139</sup> Comunque, l'enantioselettività migliore è stata raggiunta ai valori di pH più elevati. Inoltre la diminuzione percentuale dell'enantiomero  $S$  aumentando il tempo di reazione e la conversione, confermano che la velocità di racemizzazione  $k_{inv}$  è molto vicina o anche più bassa di  $k_S$ , in accordo con l'analisi cinetica di Noyori.

<sup>137</sup> a) M. Kitamura, M. Tokunaga and R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 144–152; (b) J. Andraos, *J. Phys. Chem. A*, **2003**, **107**, 2374–2387; (c) J. Steinreiber, K. Faber and H. Griengl, *Chem.–Eur. J.*, **2008**, **14**, 8060–8072

<sup>138</sup> E. Iglesias, *J. Org. Chem.*, **2003**, **68**, 2680–2688

<sup>139</sup> L. A. LeBrun and B. V. Plapp, *Biochemistry*, **1999**, **38**, 12387–12393.



Come già sopra sottolineato, il processo di racemizzazione è particolarmente importante per questo processo DKR; abbiamo quindi studiato più in dettaglio la racemizzazione della 2-fenil propanale, ibuprofenale e naprossenale (**1a**, **1b** and **1e**) enantiomericamente pure (*S*) in assenza della riduzione enzimatica. Abbiamo osservato la diminuzione della rotazione ottica nel tempo di soluzioni di queste tre aldeidi in tampone fosfato pH 7.5 e 8.0, 0.1 M in presenza di acetonitrile come cosolvente per assicurare la completa dissoluzione del substrato. Sarebbe stato molto significativo effettuare questo studio tramite HPLC chirale, ma non è stato possibile trovare condizioni di separazione idonee. Se si assume che la racemizzazione non sia niente altro che la formazione di un racemo a partire da un enantiomero puro che segue una reazione irreversibile di ordine 1, deriva che:<sup>140</sup>

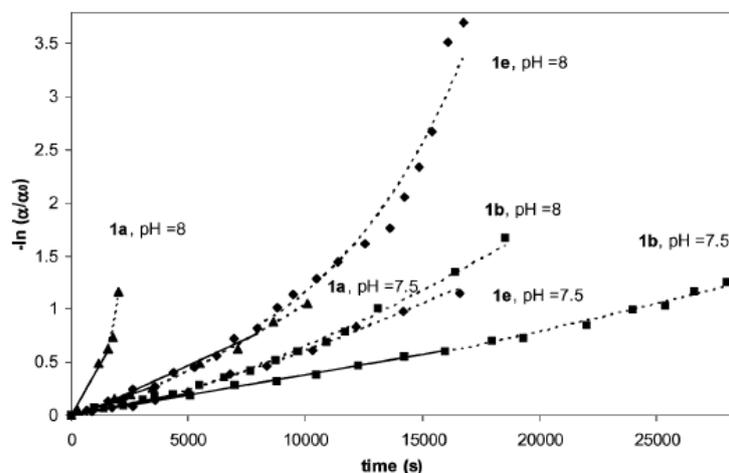
$$-\ln(a_t/a_0) = K_{inv}t \quad (1)$$

E:

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_{inv} \quad (2)$$

<sup>140</sup> E. J. Ebbers, G. J. A. Ariaans, J. P. M. Houbiers, A. Bruggink and B. Zwanenburg, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 9417-9476.

In queste formule,  $a_t$  è la rotazione ottica osservata al tempo  $t$ ,  $a_0$  è la rotazione ottica al tempo  $t=0$ ,  $t_{1/2}$  è il tempo di dimezzamento e  $k_{inv}$  è la costante di racemizzazione.



In accordo all'equazione 1, dovremmo aspettarci una relazione lineare con una pendenza corrispondente ai valori di  $k_{inv}$ . Nei nostri dati, non è mai stata osservata la linearità durante l'intero esperimento perché l'aldeide può formare l'idrato chirale e il sottoprodotto achirale chetonico, come è stato osservato tramite HPLC. Ma comunque nel tempo iniziale si può osservare un range lineare per tutti gli esperimenti e ciò ha permesso di calcolare i valori di  $k_{inv}$ , che sono poi stati riportati in Tabella 7.

Tabella 7

Entry	Aldehyde	pH	$k_{inv}/10^{-6} s^{-1}$	$t_{1/2}$ obs/min	$t_{1/2}$ calc/min
1	1a	7.5	$75 \pm 6$	120	154
2	1a	8	$419 \pm 30$	30	28
3	1b	7.5	$29 \pm 1$	320	397
4	1b	8	$52 \pm 2$	180	224
5	1e	7.5	$41 \pm 2$	180	279
6	1e	8	$95 \pm 3$	115	113

I tempi di dimezzamento ( $t_{1/2}$ ) sono invece stati calcolati tramite  $k_{inv}$  utilizzando l'equazione 2 e paragonati poi con quelli osservati ( $t_{1/2}^{obs}$ ), derivanti della rotazione ottica iniziale ( $a_0/2$ ).

Come ci si aspettava, la racemizzazione risulta particolarmente controllata dal pH per tutte le aldeidi: all'aumentare del pH aumenta la racemizzazione e diminuisce il tempo di dimezzamento  $t_{1/2}$ . La 2-Fenil Propanale è l'aldeide con la più veloce costante di racemizzazione, mentre sia la ibuprofenale che la naprossenale hanno delle  $k_{inv}$  più basse. Sperimentalmente si osserva che buoni rapporti enantiomerici con l'ibuprofenale si ottengono in tempo di reazione lunghi, mentre per la naprossenale c'è un grande limite legato alla sua decomposizione nel corrispondente arilchetone.

### 2.3.2. Supportazione dell'enzima HLADH

Il punto critico di tale catalisi resta l'impossibilità di recuperare a fine processo l'enzima impiegato. Il protocollo sintetico prevede infatti di eliminare l'HLADH sospeso in soluzione acquosa, tramite filtrazione, impedendone il riciclo. Questo svantaggio deriva dalla natura idrofila del catalizzatore che non consente il recupero tramite estrazione.

Un altro svantaggio è la sua sensibilità. Gli enzimi infatti sono macromolecole composte da uno o più siti attivi e uno 'scheletro' aminoacidico particolarmente complesso e delicato. Questo li rende particolarmente instabili in condizioni di stress ambientale come: solventi organici di varia natura, pH e temperatura di reazione.

Per questi motivi negli anni si sono sviluppate diverse tecniche di immobilizzazione enzimatica su fase solida.

---

In linea di principio un enzima immobilizzato è in genere associato, reversibilmente o irreversibilmente ad un supporto solido di varia natura. Le scelte della tecnica di immobilizzazione e del supporto sono condizionate dall'enzima e soprattutto dal tipo di processo che esso dovrà svolgere. L'uso di una tecnica di supportazione inadatta può portare alla completa denaturazione dell'enzima, a modificare la struttura conformazionale di uno o più siti attivi presenti, oppure, nel caso vengano utilizzate condizioni di reazione particolari, il suo completo distacco dal supporto. Quest'ultimo problema, sebbene non comprometta irreversibilmente la funzionalità del catalizzatore, ne impedisce il recupero e quindi il riciclo.

Non esiste una tecnica di immobilizzazione che non comprometta anche minimamente l'attività dell'enzima; per questo motivo è bene scegliere quella che più si adatta al tipo di enzima per cui verrà impiegata. In generale, l'immobilizzazione dovrebbe agire sotto diversi punti di vista.

- aumentare la stabilità dell'enzima, cioè portare la proteina ad essere più stabile rispetto allo stato libero ed essere in grado di sopportare condizioni di reazione più forti;
- permettere il riciclo dell'enzima;
- facile separazione dalla miscela di reazione;
- modulazione delle proprietà catalitiche;
- prevenzione migliore da contaminazioni proteiche (proteasi) e microbiche.

### **Tecniche di immobilizzazione**

Le tecniche di immobilizzazione enzimatica possono essere suddivise in due grandi classi, in base al tipo di interazione enzima-supporto:

- 1- intrappolamento
- 2-coupling

#### **Intrappolamento**

Questa tecnica consente di intrappolare l'enzima in un supporto solido senza che avvenga tra i due una interazione di tipo chimico. In questo modo l'enzima risulta confinato in uno spazio tridimensionale senza essere fisicamente modificato, consentendogli di mantenere inalterata la propria struttura conformazionale. La natura del supporto deve impedire la fuoriuscita dell'enzima ma al contempo consentire il passaggio sia del substrato, che del cofattore. L'intrappolamento può avvenire all'interno di una matrice di tipo polimerico o micellare oppure in membrane o fibre.

#### **Coupling**

Diversamente da quanto visto precedentemente, nel caso di coupling l'enzima viene attaccato fisicamente ad un supporto (*carrier*), oppure interconnesso attraverso cross-linking agli altri enzimi. Le tecniche di coupling, nei casi in cui avvengano tramite legame covalente, bloccano l'enzima rendendo la supportazione più stabile rispetto ai metodi di intrappolamento, permettendo di operare in condizioni di stress ambientale maggiori (agitazione meccanica, solventi organici, temperature elevate, ecc). Lo svantaggio maggiore nell'uso di questa tecnica è che la supportazione avviene tramite reazioni chimiche, spesso aggressive per l'enzima. Questo si traduce spesso in una sua perdita di attività.

### **Immobilizzazione dell'enzima HLADH: tentativi e successo<sup>141</sup>**

Grazie ad una collaborazione con il gruppo di ricerca di Francesca Paradisi all'UCD di Dublino e un periodo del mio dottorato che ho trascorso presso il loro dipartimento ho potuto studiare e realizzare una metodologia di supportazione dell'enzima HLADH. Sono state tentate ma senza successo strategie di immobilizzazione per intrappolamento su sfere di idrogel di chitosano e di idrogel di alginato. Si è quindi passati a immobilizzare l'enzima con metodologie di natura covalente, provando a legare la proteina alla silice o di nuovo al chitosano, ma anche in questo caso senza successo. E' stata tentata un'altra metodologia covalente utilizzando biglie di vetro che per la prima volta ha portato alla supportazione dell'enzima.

---

<sup>141</sup> F. Paradisi, P. Galletti, D. Quaglia, M. Pori, D. Giacomini, "Engineered Horse Liver Alcohol Dehydrogenase: Immobilization and Application in the Enantioselective Synthesis of (S)- Arylpropanols", *ASAP to Process Biochem*, **2013**

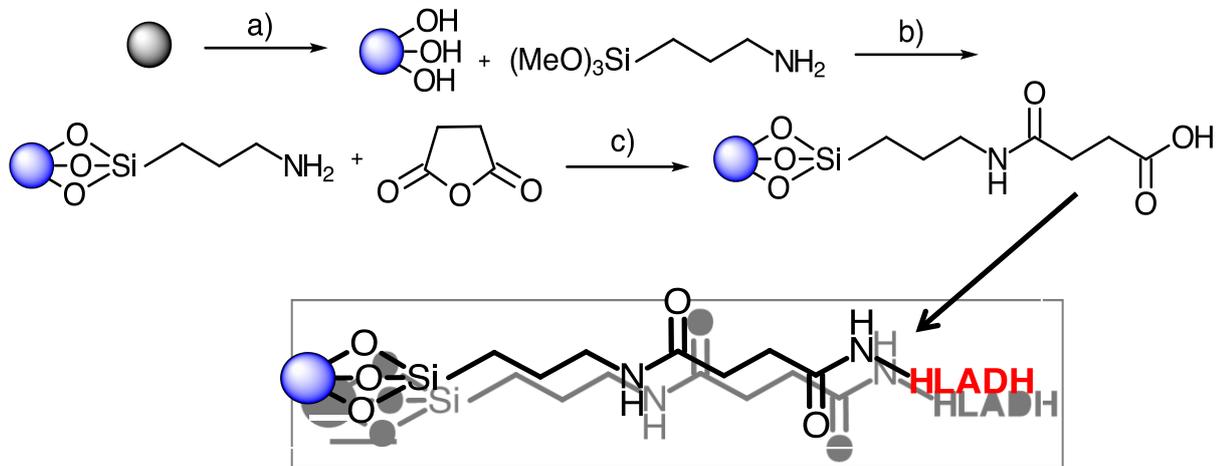
Le biglie di vetro offrono diversi vantaggi in qualità di supporto, quali la stabilità termica e meccanica, la mancanza di tossicità verso le sostanze biologiche e una forte resistenza nei confronti di solventi organici e di agenti microbiologici.

Il processo di supportazione prevede una procedura necessaria di attivazione e derivatizzazione della biglia seguendo questo schema:

- attivazione della superficie delle biglie con un forte trattamento acido/base e ossidante;
- derivatizzazione con uno spaziatore opportuno che permetta alla biglia di legare più enzimi;
- formazione del legame tra enzima e biglia di vetro.

La scelta della dimensione delle biglie di vetro è ricaduta su quelle del diametro di 425-600  $\mu\text{m}$ , dimensioni sufficienti per ottenere un buona superficie di contatto enzima-supporto ed al contempo rendere semplici le operazioni di supporto e di recupero dall'ambiente di reazione.

Il processo studiato ha visto quindi l'attivazione della superficie vetrosa delle sferette tramite un lavaggio acido che ha permesso di liberare gruppi OH<sup>142,143</sup>, consentendo in questo modo di legare covalentemente un *linker* aminico ( $\gamma$ -APTES) alla superficie. Per favorire l'attacco dell'enzima, inoltre, si è allungato lo spaziatore, tramite l'aggiunta di anidride succinica. Le biglie così derivatizzate sono state fatte reagire con l'enzima, attraverso un secondo legame amidico<sup>144,145</sup>.



Lo step più importante in tutto questo processo è sicuramente l'ultimo, ovvero, l'attacco HLADH alla superficie vetrosa derivatizzata. E' noto in letteratura che l'eccessiva immobilizzazione della superficie enzimatica, attraverso numerosi legami covalenti, può portare all'alterazione della sua struttura, disattivando completamente i siti attivi all'interno dell'enzima. Per evitare ciò sono state studiate e ottimizzate con cura le condizioni migliori, tra cui appunto il pH, la temperatura e sopravvivere per essere attive come antibiotici:

<sup>142</sup> *Food Chemistry* 104 (2007) 1385-1392;

<sup>143</sup> *Bull. Korean Chem. Soc.* (2006), 27, 4;

<sup>144</sup> *Synthetic Comm.* 36, (2006), 3591-3597;

<sup>145</sup> *Enzyme and microbial technology* 39 (2006), 1016-1022;

attutto le opportune quantità di EDC e di enzima da utilizzare.

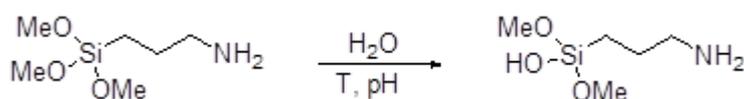
caso	biglie di vetro (mg)	EDC (mg)	HLADH (mg)	T (°C)	tampone (pH)	HLADH supportato (%)	SA (%)
1	350	2,6	0,038	4	5	99,8	1,32
2	396	4	0,0853	25	5	98,6	20,1

Il pH e la temperatura di reazione condizionano sia l'enzima che la carbodiimmide. E' noto in letteratura che la reattività dell'EDC è legata all'acidità dell'ambiente di reazione<sup>146</sup>. Per questo motivo il suo attacco alle funzioni carbossiliche è stato eseguito a pH 5,0, mentre il coupling ammidico dell'enzima a pH 8,0.

Le migliori condizioni relative all'entry 2 mostrano come tutti l'enzima sia supportato e che l'attività specifica sia però diminuita al 20%; la diminuzione dell'attività specifica per opera della supportazione è però peraltro un fenomeno noto.

Le biglie supportate venivano poi conservate a 4°C in un tampone fosfato a pH 7,5 0,1 M e l'attività specifica valutata tramite la velocità di ossidazione dell'etanolo ad acetaldeide. Dopo ogni ciclo catalitico le biglie venivano accuratamente e delicatamente lavate con tampone fosfato e ci si rimetteva nelle condizioni di studiare il ciclo successivo.

L'attività dell'enzima comunque si annullava del tutto dopo 6 cicli catalitici e ciò poteva essere imputato alla degradazione dell'enzima o ad un suo progressivo distacco dalla superficie vetrosa. Tale comportamento può essere imputato anche allo stesso  $\gamma$ -APTES. La molecola non derivatizzata tende a perdere metanolo nel tempo in acqua in funzione del pH e della temperatura.<sup>147</sup>



pH	Emivita (ore)		
	10°	24°	37°
4.7	0,97	0,41	0,22
7.0	56,000	8,4	3,9
9.0	0,780	0,15	0,043

Le modalità di conservazione dell'enzima (4°, pH 7,5) non sembrano provocare problemi alla sua stabilità. Ma la verifica dell'attività nei confronti dell'etanolo, essendo svolta a pH 8,8 e a 25° potrebbero molto facilmente causare progressivamente l'idrolisi del silicio con il conseguente distacco dell'enzima dalla biglia.

Tutti i risultati positivi riguardanti i Profeni ottenuti in precedenza ci hanno spinto a dirigere la ricerca verso la produzione di un nuovo enzima HLADH modificato in maniera opportuna con l'obiettivo di facilitare il processo di supportazione e quello di purificazione. In particolare il gruppo di ricerca di Francesca Paradisi, ha deciso di ingegnerizzare il gene che codifica per la subunità E, essendo la sequenza del DNA nota e disponibile grazie al lavoro del professor Plapp<sup>148</sup> ed essendo questa subunità E la più specifica per l'ossidazione/riduzione degli alcoli primari<sup>149</sup>. La modifica che si è voluta apportare è relativa all'inserimento di 6 istidine aggiuntive sulla parte N-terminale della subunità. Questa modifica è ben nota in ambito biotecnologico ed viene effettuato perché i 6 imidazoli delle 6 istidine adiacenti offrono molti vantaggi. E' importante sottolineare che prima aver proceduto al processo di supportazione è stato necessario stabilire un protocollo affrontando nell'ordine tre diversi step:

- produzione dell'enzima;
- purificazione dell'enzima;

<sup>146</sup> Uptima FT-UP52005

<sup>147</sup> Unep Publications, ID 919-30-2, DATE 08.03.2004

<sup>148</sup> Park D., Plapp, B., J. Biol. Chem., **1991**, 266, 13296-13302

<sup>149</sup> Quaglia, D., Irwin, J. A., Paradisi, F., Mol. Biotechnol., **2012**, 52, 244-250.

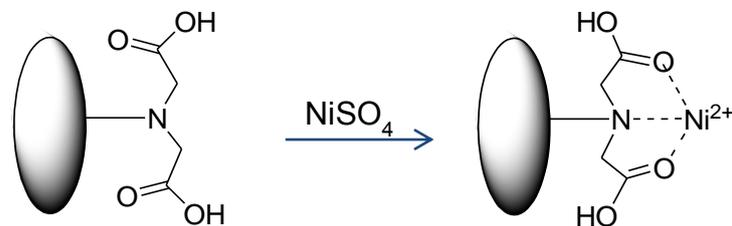
- caratterizzazione dell'enzima (His-HLADH-EE) e verifica della sua attività paragonandolo con l'analogo privo delle istidine (HLADH-EE).

La produzione:

L'enzima è stato prodotto trasformando un ceppo di *E. Coli* che è stato dopo fatto crescere e proliferare per 15-20 ore in un bioreattore 37°C agitando per 250 giri al minuto. A crescita ultimata le cellule sono state trattate con lisozima (da uovo) e accuratamente sonicate a 0° per lisarle completamente; dopodichè si è proceduto alla centrifugazione e successivamente alla filtrazione. Prima di procedere allo step di purificazione della proteina, ci si è assicurati che il lisato stesso avesse l'attività di una deidrogenasi. La verifica dell'attività del Lisato è cruciale per poter procedere, per due motivi: in primo luogo il batterio potrebbe non aver assorbito il DNA e quindi non aver prodotto la proteina; in secondo luogo, la proteina potrebbe essere stata prodotta ma la modifica della catena peptidica potrebbe aver minato la sua attività.

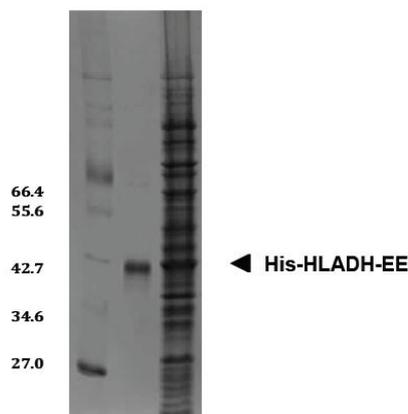
La purificazione:

La purificazione è stata effettuata in un singolo tramite cromatografia per affinità metallica su di una colonna 6B -Sepharose-IMAC pretrattata NiSO<sub>4</sub>.



Questa colonna possiede una struttura polimerica e polisaccaridica di sefarosio (Separation-Pharmacia-Agarose) cui sono legate molecole di acido imino diacetico (IMAC), forti complessanti per metalli. Pretrattando la colonna con Nichel si osserva la sua progressiva colorazione in blu per la formazione del complesso sopra rappresentato. Quando il lisato batterico viene eluito lungo la colonna, solo la proteina derivatizzata con le 6 istidine (His-HLADH-EE) viene legata, tramite la formazione di un complesso tra il nickel e i 6 imidazoli, mentre tutto il resto eluisce indisturbato.

Per "sganciare" la proteina dalla colonna si eluisce una soluzione di EDTA, consapevolmente al fatto che la molecola ha noti effetti inibitori nei confronti delle deidrogenasi zinco-dipendenti, probabilmente per la capacità di complessare il metallo e rimuoverlo. La soluzione di His-HLADH-EE dopo l'uscita dalla colonna conserva la sua attività ma viene comunque rimosso l'EDTA tramite un processo di dialisi, in cui la si sostituisce con un tampone fosfato a pH 7.5.

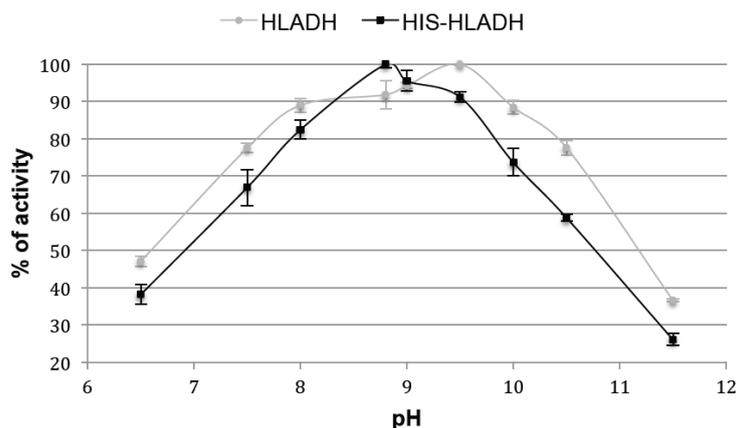


Tramite elettroforesi si osserva l'effettiva efficacia della purificazione della proteina (corsa centrale) soprattutto se confrontata con il lisato (corsa a destra), che appare con una banda sola dal peso molecolare approssimativo di 42-44 KD (come ci si aspetta per la subunità E) per paragone con il riferimento del peso

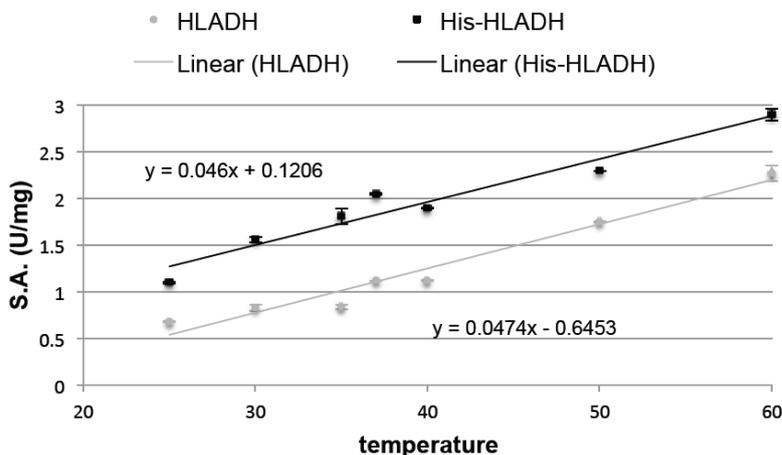
molecolare (corsa a sinistra). Tramite esperimenti di cromatografia ad esclusione di massa è stato dimostrato che la deidrogenasi mantiene la forma dimerica e quindi pare che la presenza delle 6 istidine non influisca sulla struttura quaternaria.

### Caratterizzazione e attività dell'enzima

Il nuovo enzima è stato valutato per quanto riguarda la sua attività a diversi pH e a diverse temperature, paragonandolo all'enzima analogo ma privo delle istidine. L'attività calcolata, in particolare, è stata calcolata nei valutando l'ossidazione dell'etanolo ad acetaldeide. Entrambi gli enzimi mostrano un tipico profilo di attività a campana in funzione del pH, ma in particolare l'enzima His-HLADH ha un pH optimum a 8.8, quasi un'unità di differenza in meno rispetto all'enzima libero.



Per quanto riguarda la temperatura, entrambi gli enzimi hanno osservato un aumento dell'attività all'aumentare della temperatura fino a 60°.

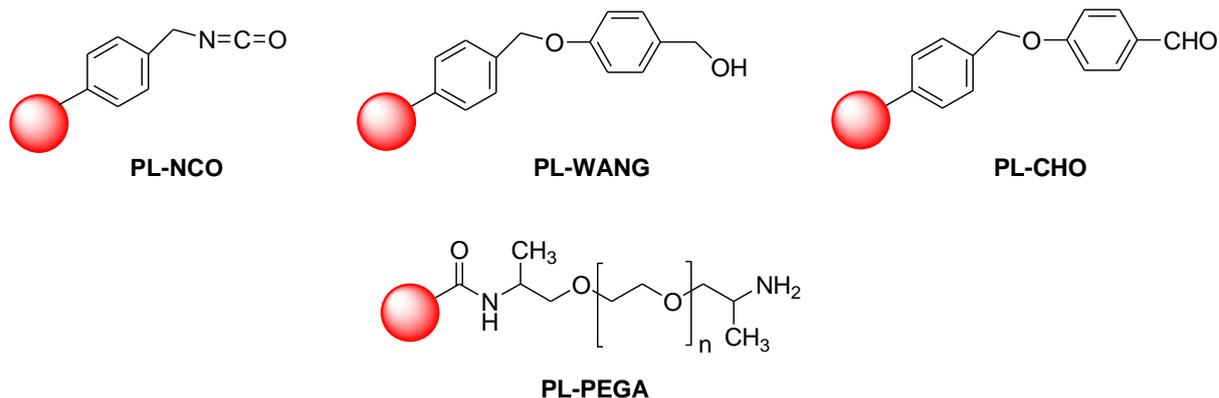


### Immobilizzazione dell'enzima His-HLADH-EE

Sono stati effettuati quindi studi di immobilizzazione di questo enzima modificato sfruttando le caratteristiche indotte dalla presenza delle 6 istidine.

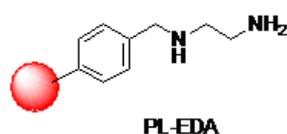
Resine StratoSphere:

Questo tipo di resine consiste in polimeri di polistirene che possiedono diversi gruppi funzionali sulle estremità.



Queste resine sono disponibili commercialmente a diversi gradi di reticolazione polimerica, caratteristica che consente il rigonfiamento o meno in presenza di solventi apolari quali idrocarburi. La reticolazione della resina e la sua natura polimerica conferiscono al supporto un certo grado di resistenza agli urti meccanici, mentre la struttura polistirenica ne consente l'utilizzo in solventi polari e/o acqua senza alcun tipo di degradazione chimica. Quest'ultimo aspetto è di importanza fondamentale, in quanto la proteina supportata sulla resina deve essere conservata (se non liofilizzata) in una soluzione tampone per conservarne l'attività catalitica e prevenire quindi la denaturazione. Un ulteriore vantaggio nell'utilizzo di queste resine è che per loro è noto il dato corrispondente al numero di mmoli presenti, aspetto che facilita il corretto dosaggio dei reagenti chimici necessari per una corretta derivatizzazione.

Prendendo come modello l'interazione fase stazionaria-metallo-proteina sfruttata nella cromatografia ad affinità metallica abbiamo modificato le resine derivatizzandole con metalli per realizzare la supportazione della His-Tag HLADH. In particolare ci siamo focalizzati su un particolare tipo di resine Stratosphere, le PL-EDA (Ethylene diamino).

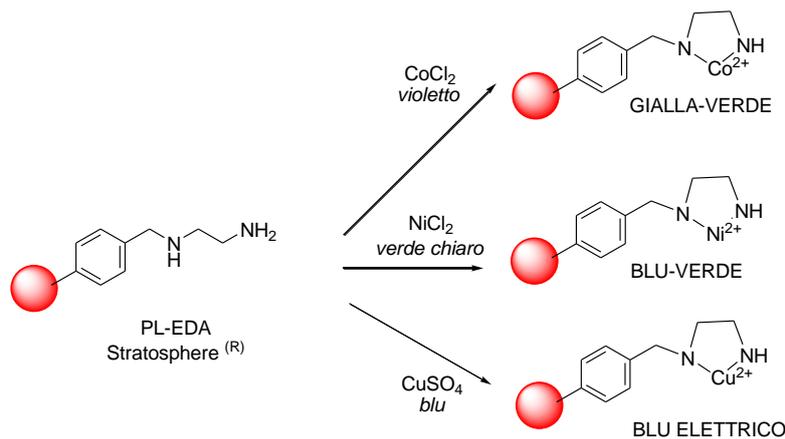


Questo tipo di resina è noto in letteratura per le sue proprietà di "scavenger"<sup>150</sup> per i metalli, ovvero per la capacità di legare ioni metallici in soluzione eliminandoli quindi dal mezzo.

Il nostro obiettivo era quello di realizzare un complesso metallo-resina e poi legare la proteina a questo supporto. Il metallo scelto per formare il legame con la resina è stato il Nickel; abbiamo però esteso la ricerca provando ad utilizzare il anche il Cobalto e il Rame. Per quanto riguarda il cobalto è nota la sua capacità di interagire con la coda di istidine ed è a volte utilizzato al posto del nickel nei processi di purificazione; il rame è stato scelto per affinità al nickel in quanto è l'elemento successivo nella tavola periodica.

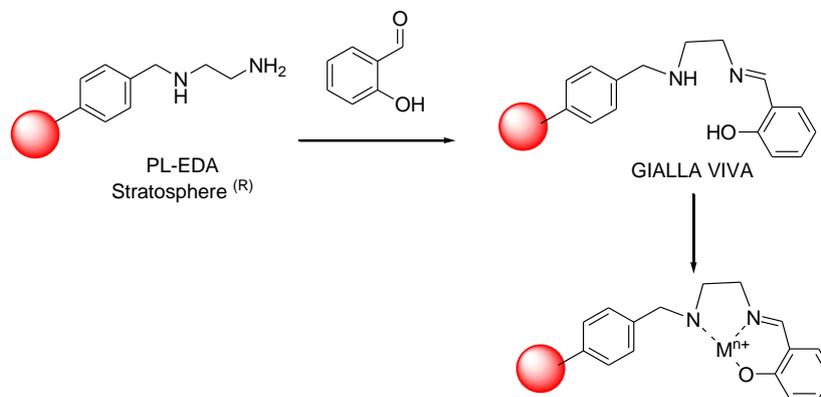
La sintesi della resina è stata effettuata mettendo a reagire la resina con soluzioni saline dei tre metalli.

<sup>150</sup> Gokak, D. T., Kamath, B.V., Ram, R.N., J. Appl. Polym. Sci., **1988**, 35, 1523-1535



Le resine sintetizzate venivano poi accuratamente lavate in modo da eliminare il più possibile ogni traccia di metallo non legato.

Per fortificare il legame della resina al metallo abbiamo sintetizzato un'altra tipologia di resine; quello che abbiamo fatto è stato legare l'aldeide salicilica alla resina tramite un legame imminico.



Il legame ulteriore al metallo proviene dall'OH fenolico.

LA proteina HIS-HLADH-EE è stata messa a contatto con le resine ed è stata valutata la quantità effettiva di resina legate e l'attività della resina al primo ciclo. La valutazione della quantità di proteina legata è stata calcolata misurando tramite il test di Bradford l'ammontare di proteina non legata rimasta in soluzione; il valore ottenuto è stato poi sottratto dalla quantità di proteina iniziale nota. L'attività è stata misurata nel modo consueto misurando la velocità di ossidazione dell'etanolo (Tabella 8).

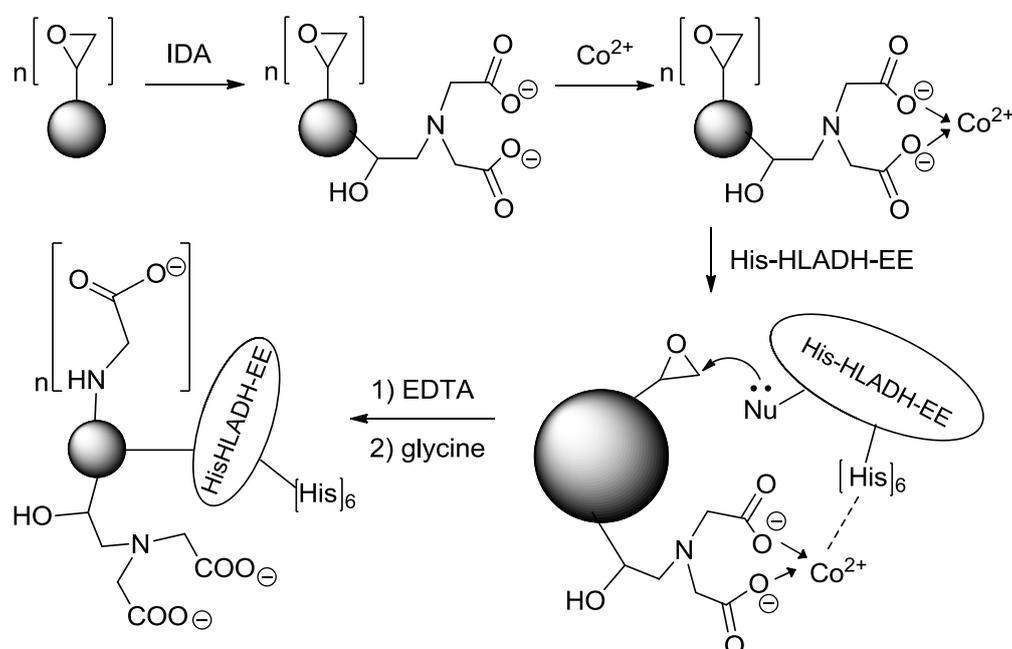
Tabella 8

RESINA	Proteina Legata (%)	Attività della resina al primo ciclo
Nickel	25	50-60%
Nickel+SA	53	0
Cobalt	0	0
Cobalt+SA	61	0
Copper	91	0
Copper + SA	54	0

Tutte le resine ad eccezione del cobalto sono state in grado di legare la proteina con delle percentuali variabili, ma unicamente la resina al Nickel ha mostrato un certo grado di attività al primo ciclo. Tuttavia l'attività della resina al secondo ciclo di reazione è risultata essere nulla. Dai test di Bradford della soluzione in cui è stata valutata la reattività del primo ciclo di reazione è risultato esserci un quantitativo di proteina

molto simile alla percentuale di enzima legato. La proteina quindi si è staccata dalla resina pur conservando l'attività. Il motivo del distacco può essere la presenza di un legame non covalente tra la proteina e la resina, oppure il pH del saggio cinetico (8.8) può aver causato la formazione di specie  $Ni(OH)_x$  che hanno provocato la scissione del legame.

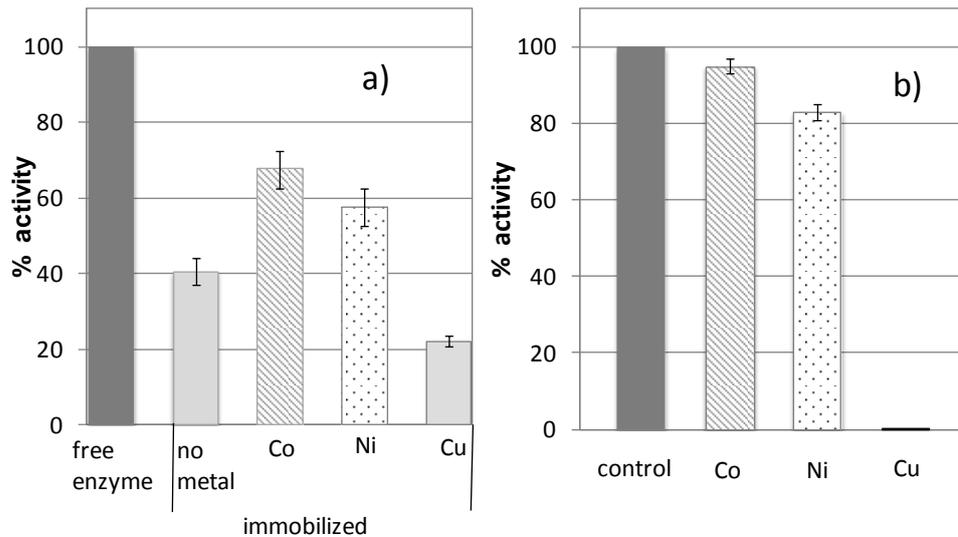
Questo risultato negativo ci ha spinto a cercare in letteratura una metodologia più robusta per portare alla formazione di un legame covalente tra l'enzima e la resina. In particolare abbiamo diretto il nostro interesse verso l'utilizzo di una resina epossidica, un supporto largamente utilizzato nell'ambito dell'immobilizzazione.<sup>151</sup> La strategia utilizzata e su cui ci siamo basati prevede proprio la supportazione di un enzima in cui è presente un "tag" di istidine e porta alla fine alla formazione di un legame covalente tra l'enzima e la resina. La procedura prevede in primo luogo il trattamento della resina epossidica (Sepabeads EC-EP/S, Resindion, Milan) con acido imminodiacetico con lo scopo di far reagire il 5% degli epossidi sulla superficie e successivamente la complessazione con uno ione metallico. A questo punto si mette a contatto l'enzima His-HLADH-EE con la resina con l'obiettivo di creare una complessazione con il metallo da parte delle istidine; l'enzima così complessato reagisce, tramite i residui nucleofili degli amminoacidi presenti sulla superficie (Lys, Cys, Tyr o Ser), con i residui epossidici che non hanno reagito per portare alla formazione di legami covalenti. Si procede dopo alla rimozione dello ione metallico con EDTA e si tratta infine la resina con glicina per "cappare" i gruppi epossidici che non hanno reagito.



Strategia di immobilizzazione dell'enzima HLADH-EE usando la resina epossidica (in grigio) derivatizzata con IDA

Osservando l'efficacia della procedura di immobilizzazione, si è proceduto allo studio della sua ottimizzazione, da molti punti di vista. In primo luogo si è proceduto a verificare il ruolo del metallo nei confronti dell'attività dell'enzima supportato paragonandolo a quello libero. Si è osservato che l'attività dell'enzima era molto sensibile sia al tipo di metallo che al numero di siti derivatizzati dallo stesso metallo. Invece in assenza di trattamento della resina con il metallo, l'immobilizzazione era solo parziale e la percentuale di attività ritenuta solo del 40%.

<sup>151</sup> a) C. Mateo, G. Fernández-Lorente, E. Cortés, J. L. Garcia, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisan, *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 76, 269-276; b) B. C. Pessela, C. Mateo, A. V. Carrascosa, A. Vian, J. L. Garcia, G. Rivas, C. Alfonso, J. M. Guisan and R. Fernández-Lafuente, *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 107-113; c) J. M. Guisan, *Immobilization of enzymes and cells*, Humana Press, Totowa, **2006**



a) Attività dell'enzima immobilizzato His-HLADH-EE quando differenti ioni metallici (oppure no) vengono usati per il processo di immobilizzazione. L'attività del 100% è stata osservata per l'enzima libero prima dell'immobilizzazione; b) Studio della inattivazione dell'enzima His-HLADH-EE per opera dello stesso metallo stato per l'immobilizzazione paragonato all'enzima senza metalli.

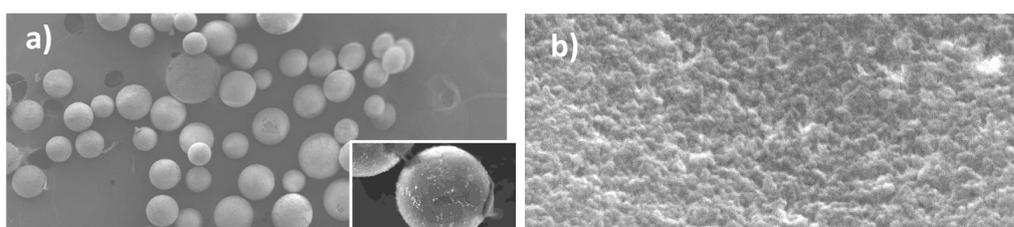
La derivatizzazione con il cobalto (utilizzando  $\text{CoCl}_2$ ) ha portato l'enzima His-HLADH-EE a ritenere il 65% della sua attività originale. Utilizzando gli altri metalli l'enzima aveva un'attività ancora più bassa; 58% per il Nickel e 22% per il Rame. Come si sa la supportazione è causa della diminuzione dell'attività dell'enzima ma per verificare se anche il metallo avesse un effetto tossico sulla proteina è stata valutata l'inattivazione in presenza dei metalli utilizzati liberi in soluzione. Si è quindi proceduto aggiungendo soluzioni dei metalli utilizzati ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) all'enzima libero e si è velocemente valutata l'attività paragonandola a quella dell'enzima senza alcuna aggiunta. Con il cobalto si ha avuto una ritenzione del 96% dell'attività, con il nickel dell'83% mentre con il rame si è osservata la completa e immediata perdita di attività dell'enzima. I risultati sembrano essere in buon accordo con quelli relativi alla percentuale di ritenzione rilevata sulle resine e sembra quindi che il cobalto porti al migliore risultato in termini di capacità di supportare l'enzima oltre che a risultare anche il meno tossico. Per ottimizzare ulteriormente il processo di supportazione/purificazione abbiamo deciso di effettuare direttamente la reazione di immobilizzazione sul lisato batterico, sfruttando la capacità della resina derivatizzata al cobalto di legarsi esclusivamente con il residuo di sei istidine della His-HLADH-EE. Il risultato è stato molto positivo, portando alla supportazione dell'enzima e ad una considerevole ritenzione dell'attività, che si attesta attorno al 60% se confrontata all'enzima libero.

L'ultimo aspetto che è stato studiato è stato l'aumento progressivo di enzima caricato sulla resina epossidica (da 1 a 5 mg di enzima) mantenendo costante la quantità di cobalto e resina (1 g di resina). In particolare si è osservato che l'aumento dell'attività dell'enzima non era proporzionale alla quantità di enzima utilizzato e che oltre i 2 mg di resina caricata si osservava perdita di attività.

#### Caratterizzazione dell'enzima

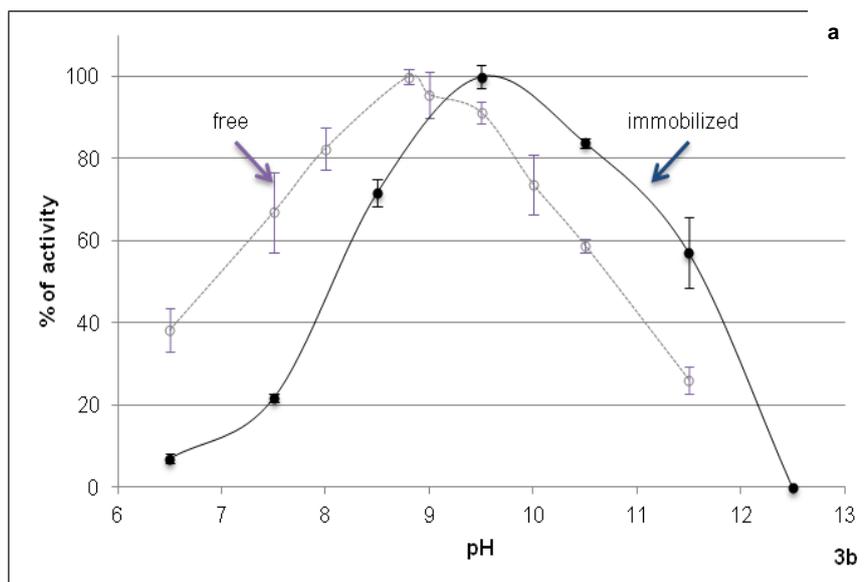
Dopo aver studiato l'ottimizzazione, ci siamo dedicati alla caratterizzazione dell'enzima supportato (s-His-HLADH-EE).

In primo luogo abbiamo voluto verificare la morfologia della resina epossidica tramite microscopia a scansione elettronica (SEM-EDS) prima e dopo la derivatizzazione per investigare possibili cambiamenti sulla superficie e/o fenomeni di aggregazione. Tali fenomeni possono alla lunga minare l'attività della resina, oltre che diminuire in effetti la superficie accessibile al solvente. Dalle analisi si osserva che le biglie supportate hanno una dimensione che va tra i 100 e i 300 nm e mantengono una dimensione sferica. Risultano tutte individualmente separate e non si osservano fortunatamente fenomeni di aggregazione. Sia il campione b che il campione c non mostrano la presenza di cobalto, confermata dalla assenza della linea di assorbimento specifica a 6.92 keV e  $k\beta$  7.65 keV. Il cobalto è invece stato trovato come previsto sul campione d dove infatti sono state trovate le linee di assorbimento specifico  $k\alpha$ .



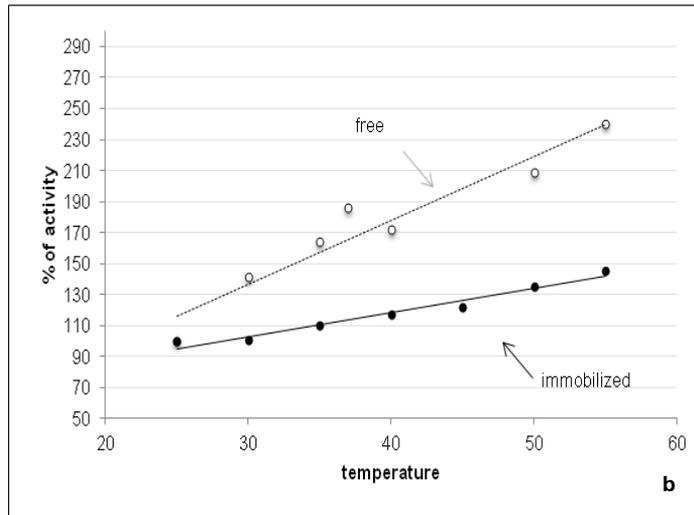
SEM delle resine: a) con His-HLADH-EE; b) con His-HLADH-EE ad un migliore ingrandimento; c) pretrattamento con IDA; d) dopo il trattamento con  $\text{Co}^{2+}$

Si è poi proceduto alla caratterizzazione dell'enzima supportato paragonandolo a quello libero in funzione dei seguenti parametri: pH, temperatura, stabilità nel tempo, riciclo e attività in miscela di solventi organici.



a) Screening per la ricerca dell'ph "Optimum" per l'enzima libero His-HLADH-EE e tra 6.5 e 12.5 tramite l'ossidazione dell'etanolo.

Il pH e la temperatura sono stati studiati con l'obiettivo di caratterizzare l'enzima ma soprattutto di determinare i parametri migliori per la biocatalisi. E' però importante ricordare che lo studio dell'attività dell'enzima in funzione di questi parametri è stato valutato studiando la velocità di ossidazione dell'etanolo. L'attività in funzione del pH è stato studiato tra 6.5 e 12.5, osservando che l'enzima supportato mostrava, come ci si aspettava, la tipica curva a campana ma con uno shift inaspettato di attività a pH 9.5, un'unità di pH più alto dell'enzima libero. L'enzima supportato sembra quindi mostrare l'attività migliore a pH più alcalini.

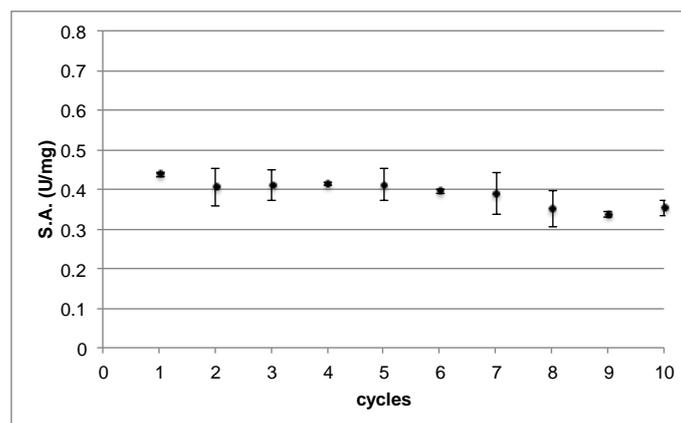


Screening di attività a diverse temperature (25-55°C).

E' stato poi valutato l'effetto della temperatura sull'attività enzima tra i 25°C e i 55°C. Entrambi gli enzimi sembrano migliorare la loro attività linearmente anche se sicuramente l'enzima libero mostra un incremento più marcato. Oltre i 55°C non è più stato possibile effettuare alcuna misura a causa della impossibilità di effettuare misure UV, probabilmente a causa dell'evaporazione dell'etanolo e/o all'inattivazione dell'enzima.

Per verificare la stabilità dell'enzima nel tempo, l'enzima libero e immobilizzato sono stati conservati a 37° per 160 ore a due differenti pH, 8.5 e 6.5. Si è osservato che entrambi gli enzimi a pH 8.5 risultavano ancora essere attivi dopo 160, mentre a pH 6.5 l'enzima immobilizzato ha mostrato la migliore stabilità dove invece l'enzima libero aveva perso il 50% di attività già dopo 15 ore. L'enzima supportato comunque viene conservato a 4°C dove dopo 2 mesi si osserva ancora una attività identica, che è come detto in precedenza il 60% rispetto a quella dell'enzima libero.

La verifica della riciclabilità dell'enzima supportato è stata effettuata monitorando il numero di cicli di ossidazione dell'etanolo che era in grado di portare a termine.

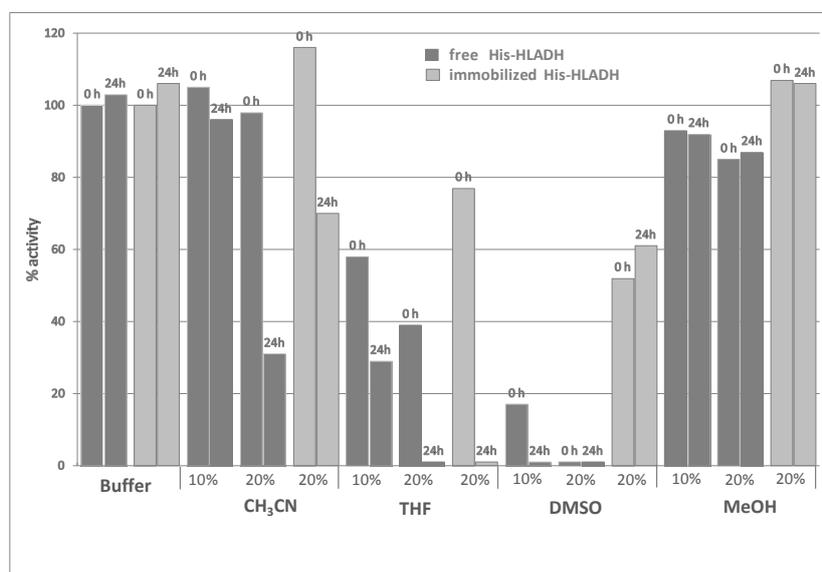


Riciclabilità di un campione immobilizzato di His-HLADH-EE in 10 cicli ossidativi (l'attività di ogni ciclo è stata monitorata per 9 minuti). L'apparente caduta dell'attività è dovuta alla perdita sperimentale di resina durante l'esperimento.

Dopo ogni ciclo catalitico completato, la resina veniva accuratamente e dlicatamente lavata per prepararla al ciclo successivo. Anche dopo 10 cicli catalitici, utilizzando lo stesso campione di enzima immobilizzato, l'attività specifica dell'enzima rimaneva virtualmente identica. Dal grafico si nota in effetti una diminuzione ma il dato è attribuibile alla perdita naturale di resina durante le procedure che portano alla misurazione dell'attività (lavaggio della cuvetta, aderenza alle punte di plastica delle gilson). Questo risultato è molto significativo perché permette il recupero dell'enzima ed è sostanzialmente l'obiettivo della supportazione

enzimatica. Successivamente è stata anche studiata la riciclabilità dell'enzima nelle condizioni di bioriduzione enantioselettiva delle aldeidi 2-aril propioniche, con risultati significativi.

È noto come gli enzimi possano esprimere attività catalitica anche in solventi organici.<sup>152</sup> Spesso l'uso di un solvente organico in biocatalisi è fondamentale soprattutto per favorire la solubilizzazione del substrato che deve essere trasformato; in aggiunta il solvente organico può in alcuni casi alterare le proprietà dell'enzima a volte in maniera inaspettata. Risulta quindi molto importante valutare la tolleranza dell'enzima libero e supportato ai solventi organici utilizzando in particolare piccole quantità di cosolventi quali l' $\text{CH}_3\text{CN}$ , il THF, il DMSO e il MeOH. Può sembrare strano l'utilizzo del metanolo con una deidrogenasi come la HLADH, ma è avvalorato che questo alcol non è substrato per l'HLADH, e può quindi essere considerato a tutti gli effetti un solvente.<sup>153</sup> Il comportamento e l'attività dell'enzima libero e supportato sono stati valutati in presenza del 10% e del 20% di solvente e confrontati con il comportamento in un tampone di Tris a pH = 8.5, 50 mM al tempo zero e dopo 24 ore.



Stabilità dell'enzima in diversi solventi al 10% e al 20% e Tris-HCl 50 mMolare, a pH 8.5

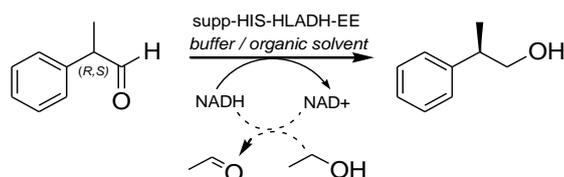
Il risultato generale è che l'enzima supportato sembra tollerare molto bene i cosolventi organici rispetto all'enzima libero, aspetto che dimostra come la supportazione porti in generale ad un effetto stabilizzante. Si osserva che l'enzima libero tollera bene il 10% di MeCN ma al 20% si assiste a una significativa perdita di attività dopo 24 ore; l'enzima supportato invece risulta più attivo. È molto interessante notare che anche in THF, MeOH e DMSO l'enzima supportato in presenza del 20% di questi solventi risulta molto più stabile dell'enzima libero; in particolare poi in DMSO l'enzima libero non è attivo.

Dopo aver caratterizzato completamente l'enzima supportato abbiamo deciso di andare oltre e verificare la sua attività nel compiere la reazione di bioriduzione enantioselettiva delle aldeidi 2-arilpropioniche per ottenere gli *S* 2 arilpropanoli, i precursori degli (*S*)-Profeni.

Lo studio è stato inizialmente fatto sulla 2-fenil propanale, aldeide considerata modello per tutte le altre aldeidi 2-aril propioniche: abbiamo studiato l'effetto della quantità di enzima supportato utilizzata e del pH sulle rese di reazione, utilizzando le condizioni di partenza migliori che sappiamo fornire i migliori dati di eccesso enantiomerico e resa per l'enzima HLADH. Le rese sono state valutate tramite retta di calibrazione.

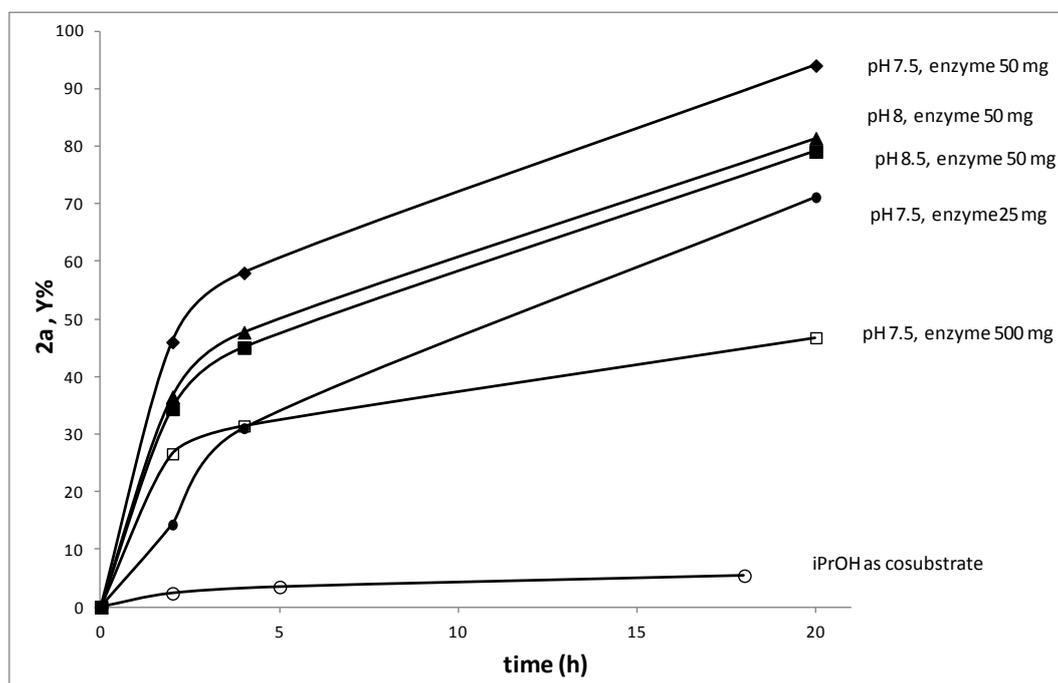
<sup>152</sup> a) A. Klivanov, *Nature*, 2001, **409**, 241-246; G. Carrea and S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 2226-2254

<sup>153</sup> a) C. Wratten and W. W. Cleland, *Biochemistry*, 1965, **4**, 2442-2451; b) F. M. Dickinson and K. Dalziel, *Nature*, 1967, **214**, 31-33; c) H. Sund and H. Theorell, in *The Enzymes*, Academic Press, New York, 1963, vol. 7, pp. 25-83; d) J. B. Jones and H. M. Schwartz, *Can. J. Chem.*, 1982, **60**, 1031



La prova effettuata in tampone fosfato a pH 7.5 con il 10% di MeCN come cosolvente (l'acetonitrile, si ricorda, sembra essere il solvente migliore per l'enzima supportato) ha portato a rese quasi quantitative in alcol; l'aumento del pH fino a 8.5 porta progressivamente alla diminuzione della resa in alcol, forse per l'intervento di fenomeni di autocondensazione aldolica catalizzate dal pH basico. E' interessante notare come lo spostamento del pH di reazione verso quello in cui l'attività (verificata nella reazione di ossidazione dell'etanolo) dell'enzima supportato è migliore, cioè 9.5, non porta complessivamente ad un miglioramento ma va in direzione opposta.

Anche in questo caso si osserva il verificarsi della risoluzione cinetica dinamica, essendo la resa di reazione molto maggiore del 50% (aspetto che esclude la semplice risoluzione cinetica). Successivamente abbiamo studiato gli effetti dovuti alla quantità di enzima utilizzato: a parità di quantitativo di aldeide sono state testate 3 aliquote differenti di enzima: 500, 50 e 25 mg di enzima immobilizzato His-HLADH-EE (che corrispondono a 0.4, 0.04 e 0.02 unità in accordo ai risultati calcolati per l'enzima. Il miglior risultato è stato ottenuto con 50 mg di enzima; con 25 mg la reazione è stata più lenta mentre la prova con 500 mg, sorprendentemente, ha portato ai risultati peggiori. Questo dato può essere legato ad un potenziale "adsorbimento" e/o reattività dell'aldeide con la resina, che porta il substrato carbonilico ad essere progressivamente consumato e sottratto dalla soluzione. Infine è stato valutato l'utilizzo di isopropanolo come cosubstrato al posto dell'etanolo per il riciclo del NADH.



Influenza del pH e della quantità di enzima sulla riduzione enzimatica di 1a (0.5 mM) a dare 2a usando l'enzima immobilizzato His-HLADH-EE in 5 mL di un tampone fosfato a pH 7.5 e al CH<sub>3</sub>CN di 10% con NADH catalitico. ◆, ▲, ■, ●, □ utilizzando etanolo come cosubstrato; ○: a pH 7.5 con 50 mg di enzima, isopropanol come substrato.

L'utilizzo dell'isopropanolo è stato pensato perché il prodotto di ossidazione, cioè l'acetone risulta sicuramente meno tossico dell'acetaldeide nei confronti dell'enzima; tuttavia si è avuto esito negativo probabilmente perché non riesce a lavorare su alcoli secondari.

Dopo questo screening iniziale ci siamo rivolti alla applicazione di s-His-HLADH-EE nella bioriduzione della naprossenale e della ibuprofenale, paragonandola a quella dell'enzima libero His-HLADH-EE e valutando

anche l'enantioselettività. In tutti questi esempi sono state utilizzate le condizioni migliori di reazioni in termini di pH, temperatura, cosolvente, concentrazione di substrato (come osservato dal precedente screening).

L'utilizzo dell'enzima His-HLADH-EE in una miscela al 10% di CH<sub>3</sub>CN in tampone fosfato come solvente, ha portato a rese eccellenti per la 2-fenil propanale e naprossenale e più basse per l'ibuprofenale (Tabella 9). Lo stesso trend è stato osservato con l'enzima immobilizzato His-HLADH-EE, dove si è osservato un rallentamento nella velocità di reazione e non si è ottenuta una resa quantitativa a causa della formazione dei noti sottoprodotti arilchetonici, tipici "derivati" delle aldeidi 2-aril propioniche. Sia l'utilizzo dell'enzima immobilizzato che libero hanno mostrato una enantioselettività totale verso la configurazione *S* e non sono state trovate mai tracce dell'*R*. Questo aspetto sembra peculiare dell'enzima His-HLADH-EE, perchè con l'enzima commerciale HLADH sono stati ottenuti rapporti enantiomerici peggiori fortemente dipendenti dalla natura del cosolvente. Questo può dipendere dalla presenza delle istidine, che in qualche modo possono alterare la stereospecificità nei confronti del substrato; ma è altrettanto vero che ci può essere anche un effetto opposto, che porta la proteina ad essere meno specifica e in altri casi anche meno stabile. Studi recenti messi a punto su due lipasi in cui era stata inserita un "tag" di istidine sul residuo terminale, hanno mostrato come il potere catalitico fosse in effetti inalterato mentre risultava profondamente modificata la stereoselettività e l'enantioselettività.<sup>154</sup> Una possibile spiegazione è che la coda di istidine possa in qualche modo modificare la flessibilità dell'enzima e di conseguenza renderlo più enantioselettivo. Un'altra spiegazione che potrebbe giustificare la migliore enantioselettività, parte dall'ipotesi che la coda di istidine non abbia nessun ruolo: come si ricorda la struttura quaternaria della nostra proteina clonata è fatta solo di subunità E (subunità affine e specifica per alcoli primari e aldeidi), mentre l'enzima commerciale è una miscela ES. Questo significa che per la reazione utilizziamo un catalizzatore più specifico rispetto a quello commerciale e questo potrebbe bastare per spiegare il risultato ottenuto.

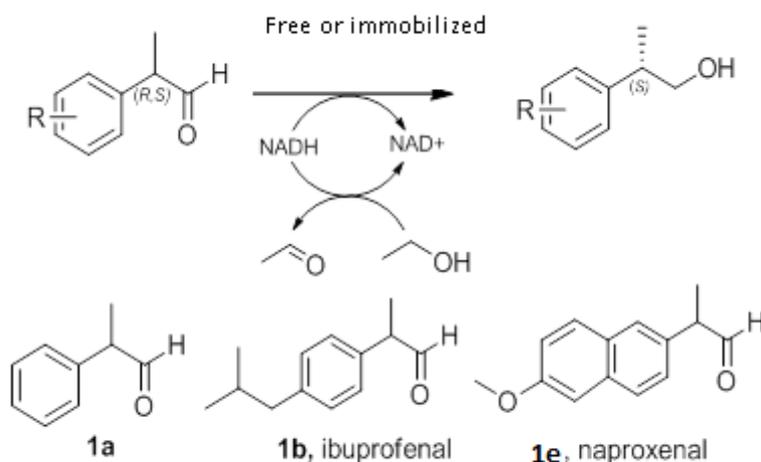


Tabella 9

Ent.	Ald.	enzyme	solvent	2h			final yield (time, h)	(S/R)
				4h	18h	Y%		
1	1a	free	CH <sub>3</sub> CN 10%	56	74	90	100 (42)	>99/1
2	1b	free	CH <sub>3</sub> CN 10%	33	39	64	61 (42)	>99/1
3	1e	free	CH <sub>3</sub> CN 10%	56	65	92	100 (66)	>99/1
4	1a	immobilized	CH <sub>3</sub> CN 10%	46	53	77	88 (42)	>99/1

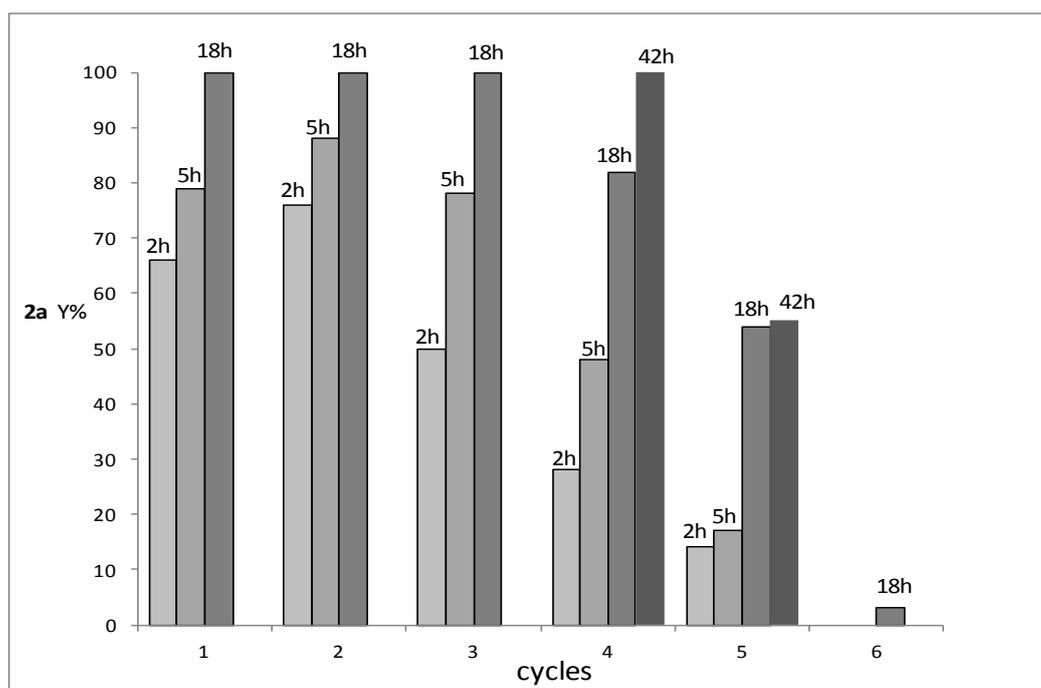
<sup>154</sup> Studier, FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expres Purif 2005; 41:207-234

5	<b>1b</b>	immobilized	CH <sub>3</sub> CN 10%	18	21	37	34 (92)	>99/1
6	<b>1e</b>	immobilized	CH <sub>3</sub> CN 10%	16	20	63	79 (42)	>99/1
7	<b>1a</b> (5mM)	immobilized	MTBE 50%	3	6	54	82 (42)	>99/1
8	<b>1a</b> (5mM)	immobilized	Hexane 50%	10	10	39	84 (72)	>99/1

Attività dell'enzima libero e immobilizzato His-HLADH-EE sulle aldeidi 1a, 1b e 1e. Condizioni: aldeide 0.5 mMolare (entries 1 to 6), NADH 0.01 mM, EtOH 0.5 M, tampone fosfato 0.1 M pH 7.5, 27°C, V = 5 mL, quantità di enzima 50 mg.

Per studiare ulteriormente i vantaggi relativi all'immobilizzazione dell'enzima, abbiamo utilizzato in sistema bifasico utilizzando *tert*-butilmeti etere (MTBE) ed esano per la riduzione della 2-fenil propanale ma a concentrazioni più alte di essa. Abbiamo osservato che la reazione procede con successo, con valori di resa simili e anche in questo caso completa enantioselettività. Se la stessa reazione viene fatta alla stessa concentrazione di aldeide ma non in un sistema bifasico, la reazione si blocca velocemente e l'enzima supportato appare denaturato.

Abbiamo voluto poi studiare la riciclabilità dell'enzima immobilizzato testandolo nella riduzione di una soluzione 0.5 mMolare di aldeide in acetonitrile al 10%. Questo esperimento di riciclabilità deve essere confrontato e associato allo stesso studio fatto quando si è guardata la reazione di ossidazione dell'etanolo ad acetaldeide nel paragrafo.

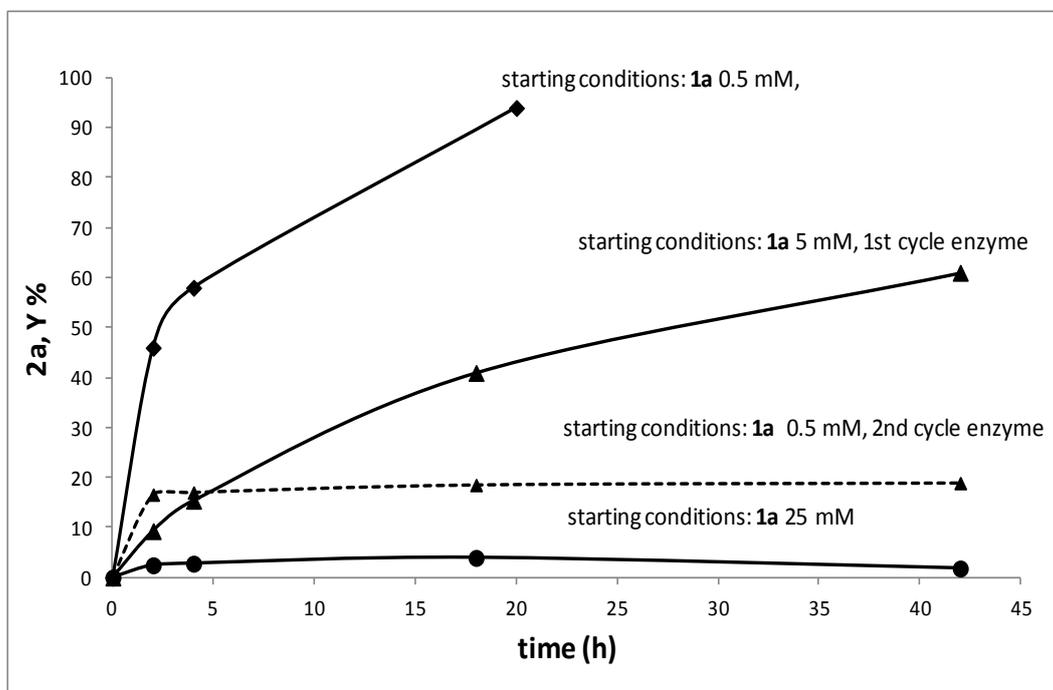


Riciclabilità di un campione di enzima immobilizzato His-HLADH-EE sulla riduzione enzimatica di 1a a 2a.

Dopo ogni ciclo catalitico, l'enzima veniva delicatamente lavato con tampone fosfato e veniva inserita una nuova soluzione di aldeide a concentrazione 0.5 mMolare. Abbiamo osservato che la velocità e la resa della reazione appaiono costanti fino al terzo ciclo; al quarto ciclo si osserva un rallentamento della reazione ma con l'arrivo a completezza della reazione, mentre dal quinto in poi la reazione non riesce più ad arrivare in fondo.

Per far luce sui fattori che possono influenzare l'inattivazione dell'enzima dopo il quarto ciclo, abbiamo verificato gli effetti dell'incremento della concentrazione di aldeide sulla resa di reazione. Aumentando la concentrazione portandola a 5 mMolare (10 volte più concentrata) e 25 mMolare (50 volte più concentrata) si è osservato un abbassamento della resa, suggerendo subito che l'aldeide di partenza potesse inibire l'enzima. Questo effetto di inibizione appare purtroppo irreversibile, perché l'enzima supportato

accuratamente lavato utilizzato la seconda volta (a concentrazione di aldeide 0.5 mMolare) dopo esser stato messo in contatto con l'aldeide 5 mMolare, non mostra un'attività completa con rese molto basse. Combinando assieme il risultato relativo alla bassa resa ottenuta con una concentrazione alta di aldeide è possibile ipotizzare che alcuni residui amminici dell'enzima posano aver reagito con il substrato carbonilico, portando quindi alla denaturazione della proteina.



Influenza della concentrazione di aldeide iniziale sulla riduzione enzimatica di 1a a 2a usando l'enzima immobilizzato in tampone fosfato a pH 7.5, CH<sub>3</sub>CN al 10% con NADH catalitico, usando poi etanolo come cosubstrato.

Abbiamo poi esteso lo studio alla bioriduzione di aldeidi alifatiche e aromatiche da parte dell'enzima immobilizzato s-His-HLADH-EE. Le aldeidi aromatiche sono state trasformate in modo quantitativo nei rispettivi benzil alcoli, osservando in particolare tempi di reazione più lenti per la *p*-metossi benzaldeide se paragonati alla benzaldeide e alla *p*-nitro benzaldeide. Le aldeidi alifatiche sature e insature hanno portato alla formazione dei relativi alcoli tutte in maniera quantitativa (Tabella 10).

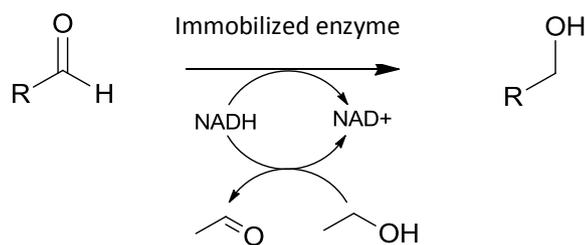
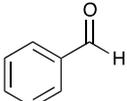
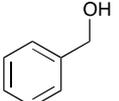
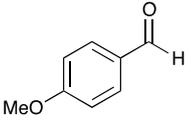
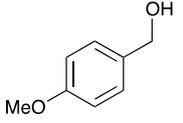
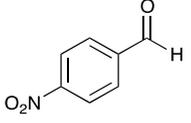
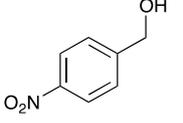
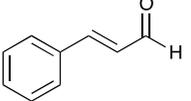
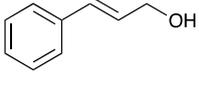
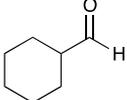
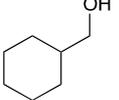
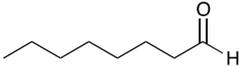
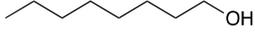
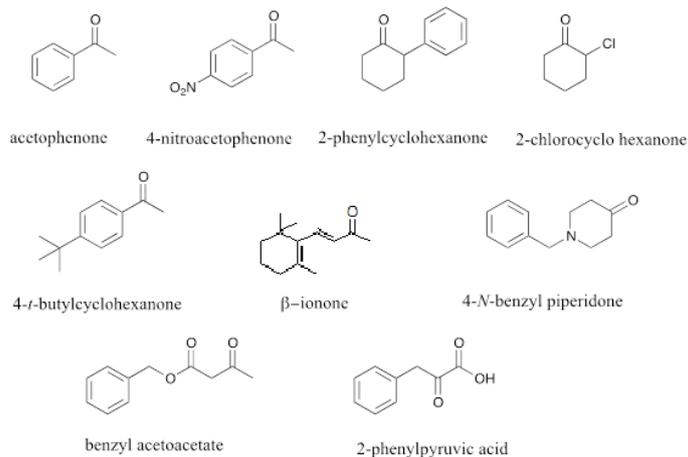


Tabella 10

	Aldehyde	Alcohol	Yield% (time, h)
1)	benzaldehyde 		100 (5)
2)	p-methoxybenzaldehyde 		95 (20)
3)	p-nitrobenzaldehyde 		100 (5)
4)	Cinnamaldehyde 		100 (2)
5)	Cyclohexanecarboxyaldehyde 		100 (20)
6)	Octanal 		100 (5)

Attività dell'enzima immobilizzato His-HLADH-EE su aldeidi aromatiche e alifatiche. Condizioni.: Aldeide 0.5 mM , 0.01 mM NADH, 0.5 M EtOH, 0.1 M tampone fosfato e CH<sub>3</sub>CN al 10%, pH 7.5, 27°C, V=5 mL, quantità di enzima 50 mg.

Visti i risultati positivi ottenuti su altre aldeidi abbiamo deciso di estendere lo studio alla riduzione di chetoni, con l'obiettivo di ottenere eventualmente alcoli secondari chirali. Come substrati chetonici abbiamo scelto tutti quelli qui sotto rappresentati.



Chetoni e chetoesteri usati come substrati di His-HLADH-EE

In nessuno di questi casi abbiamo osservato la formazione del relativo alcol, aspetto che ha confermato la specificità dell'enzima His-HLADH-EE nei confronti delle aldeidi e degli alcoli primari. Si ricorda anche l'inefficienza della reazione quando si utilizza isopropanolo al posto di etanolo nel sistema di riciclo. D'altra parte Klivanov in un articolo riporta la riduzione di chetoni con l'HLADH commerciale, il quale però è presente in più isoforme, aspetto che può allargare il range di chemoselettività dei substrati carbonilici che possono essere ridotti dall'enzima.<sup>155</sup>

<sup>155</sup> Grunwald J, Wirz B, Scollar M, Klivanov M. Asymmetric oxidoreductions catalyzed by alcohol dehydrogenase in organic solvents. *J Am Chem Soc* **1986**; 108:6732-6734.

---

## 2.4 Metodo chemoenzimatico per la sintesi di (S)-Profeni: Ossidazione

La trasformazione dei 2-aril propanoli (alcoli primari) enantiomericamente puri a dare i corrispondenti acidi 2-aril propionici o profeni (acidi carbossilici) è una reazione di ossidazione. Il nostro obiettivo è quello di compiere l'ossidazione con la massima resa lasciando anche inalterato il centro stereogenico chirale.

### Ossidazione degli alcoli primari

La reazione di un alcol primario ad acido carbossilico porta ad incrementare lo stato di ossidazione del carbonio. È una reazione molto studiata in chimica organica ed esistono reagenti che possono portare la reazione direttamente ad acido carbossilico oppure ad aldeide. In letteratura i reagenti più comuni sono generalmente metalli pesanti ad elevati stati di ossidazione (Cr(VI), Mn(VII)) anche se di recente stanno avendo spazio metodologie più ecosostenibili. In particolare anche la biocatalisi sta mostrando la capacità sia di enzimi isolati che di cellule intere di catalizzare il processo ossidativo.

### Ossidazione di alcoli primari ad acidi carbossilici: metodologie chimiche

Una delle metodologie più comuni per l'ossidazione degli alcoli primari ad acidi sfrutta il permanganato di potassio (KMnO<sub>4</sub>) come agente ossidante. È un reagente fortemente ossidante ed è in grado di ossidare molti gruppi funzionali oltre agli alcoli primari: alcheni, ossime, solfuri, tioli, alcoli secondari, dioli e aldeidi. L'ossidazione di alcoli primari ad acidi carbossilici è stata descritta in dettaglio la prima volta da Fournier<sup>156</sup> nel 1907, in cui il KMnO<sub>4</sub> veniva semplicemente inserito in una sospensione dell'alcol in soluzione acquosa alcalina. La reazione è poi stata svolta e sviluppata in miscele di acqua con un solvente organico quale il diossano, la piridina, l'acetone e l*t*-BuOH. Normalmente le ossidazioni vengono svolte in condizioni fortemente alcaline (NaOH/KOH 1N) per avere una miglior velocità di reazione. Ma per molecole sensibili alle basi, si può effettuare la reazione anche a pH più bassi e/o acidi, ottenendo però un rallentamento della reazione.

Un'altra metodologia molto comune è l'ossidazione di alcoli primari con il reagente di Jones, datata 1947<sup>157</sup>. Il reagente si prepara dissolvendo l'anidride cromica (CrO<sub>3</sub>) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con la formazione di una soluzione rossastra contenente acido cromico (H<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) e vari oligomeri. L'ossidazione viene poi svolta dissolvendo l'alcol primario e il reattivo di Jones in acetone; lo stesso protocollo applicato agli alcoli secondari porta ai chetoni corrispondenti. L'utilizzo del cromo, particolarmente tossico per l'uomo e per l'ambiente, ha spinto la ricerca allo sviluppo di una metodologia alternativa del protocollo; Zhao ha sviluppato una procedura in cui si riduce l'anidride cromica al ruolo di catalizzatore (1-2%) utilizzando l'acido periodico (H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>) in eccesso come ossidante.<sup>158</sup>

Un'altra metodologia che coinvolge l'utilizzo di cromo è quella con piridinio clorocromato (PDC), un reagente normalmente utilizzato per ossidare alcoli primari ed e secondari rispettivamente ad aldeidi e chetoni. L'ossidazione ad acido carbossilico degli alcoli primari deriva dalla procedura sviluppata da Corey e Schmidt nel 1979<sup>159</sup>, che è legata unicamente all'utilizzo di DMF come solvente. È interessante notare come la stessa procedura non ossidi ad acidi carbossilici gli alcoli primari allilici e benzilici.

Una procedura più recente risulta essere l'ossidazione di Heyns, che sfrutta l'ossigeno come ossidante e il platino su carbone come catalizzatore. La reazione viene normalmente svolta in ambiente neutro o leggermente basico, con l'utilizzo di bicarbonato.

Un'altra metodologia di ossidazione relativamente recente utilizza il tetraossido di rutenio (RuO<sub>4</sub>) ossidante molto forte in grado di ossidare non solo gli alcoli ma anche gli stessi idrocarburi. In questi utilizzi RuO<sub>4</sub> è preparato in situ in quantità catalitiche da RuO<sub>2</sub> o RuCl<sub>3</sub> e viene rigenerato aggiungendo periodato di sodio; come solvente si usa una miscela di acetonitrile, acqua e tetracloruro di carbonio. Alla fine si può aggiungere etere dietilico per precipitare e recuperare il precursore di rutenio.

---

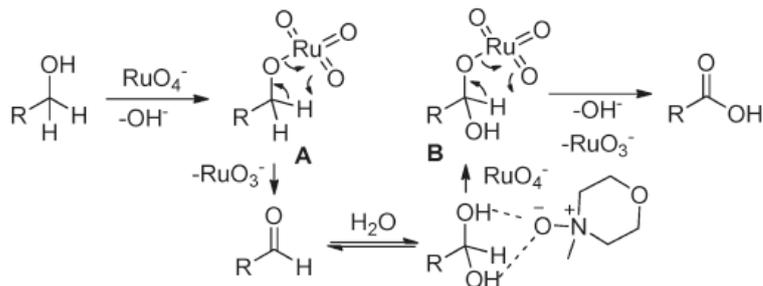
<sup>156</sup> a) Fournier, H.M. (1907). *Compt. Rend. Chimie*: 331; b) Fournier, H.M. (1909). *Bull. Soc. Chim. Fr.*: 920.

<sup>157</sup> Heilbron, I.; Jones, E.R.H.; Sondheimer, F. (1947), 315, *J. Chem. Soc.*: 1586

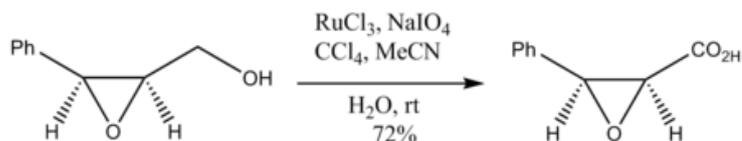
<sup>158</sup> Zhao, M.; Li, J.; Song, Z.; Desmond, R.; Tschaen, D.M.; Grabowski, E.J.J.; Reider, P.J. (1998), *Tetrahedron Lett.*, 39 (30): 5323

<sup>159</sup> Corey, E.J.; Schmidt, G. (1979), *Tetrahedron Lett.* 20 (52): 399

Dato che il  $\text{RuO}_4$  è un ossidante molto aggressivo, le reazioni si possono effettuare in condizioni blande, in genere a temperatura ambiente. L'ossidazione con  $\text{RuO}_4$  non agisce sui centri stereogenici che non vengono ossidati. Questo esempio riporta l'utilizzo di  $\text{RuO}_4$  con *N*-metil morfolina.<sup>160</sup>

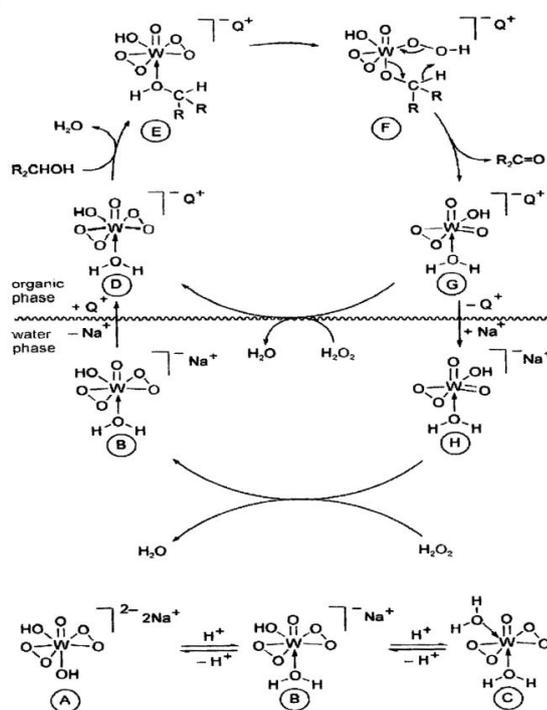


Anche l'ossidazione di alcoli epossidici non coinvolge l'anello epossidico:



### Ossidazioni chimiche di alcoli primari "green"

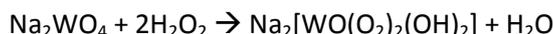
Una nuova procedura di ossidazione di alcol è quella messa a punto da Noyori.<sup>161</sup> Prevede l'uso di acqua ossigenata ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 30% in soluzione acquosa come agente ossidante, accompagnato a sodio tungstato ( $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ed un catalizzatore acido di phase transfer. Questa procedura è diventata molto famosa perché oltre ad essere applicabile all'ossidazione di molti substrati (olefine, solfuri, alcoli primari e secondari), è anche molto vantaggiosa in termini di ecosostenibilità e impatto ambientale. La reazione infatti non utilizza solventi organici e il  $\text{NaWO}_4$  è un sale non tossico che funge da precatalizzatore: il suo ruolo è quello di formare un complesso con l' $\text{H}_2\text{O}_2$  che catalizza il rilascio di  $\text{O}_2$  con la massima efficienza.



<sup>160</sup> A. Schmidt, C. B. W. Stark, **2011**, Vol. 13, No. 16 4164–4167

<sup>161</sup> Noyori, R.; Aoki, M.; Sato, K. *Chem. Commun.* **2003**, 1977.

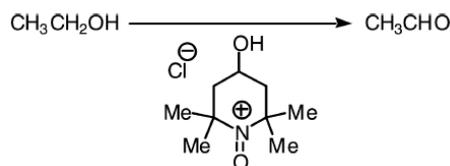
Il meccanismo di reazione può essere così rappresentato come sull'articolo di Noyori: in primo luogo si ha l'ossidazione del  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  per opera della  $\text{H}_2\text{O}_2$  a dare un complesso secondo questa reazione:



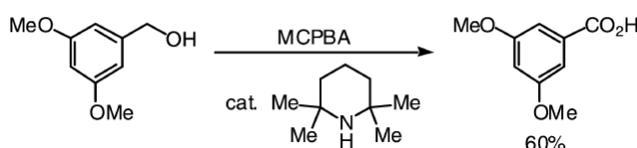
Il perossido risultante **A** risulta in equilibrio con **B** e con **C** in funzione del pH e le specie più reattive sono proprio queste ultime due. Risulta determinante l'acidità dell'intero sistema e in particolare quella indotta dal catalizzatore di trasferimento di fase: **A** prevale fino a pH 4, mentre tra 0.4 e 3 prevale **B**. Quando prevale **B** e si è in condizioni di diluizione, **B** viene trasferito nella fase organica dal catalizzatore di trasferimento di fase. Il complesso **D** subisce poi lo scambio di legante acqua/alcol per formare **E**: l'alcol viene poi ossidato e il composto carbonilico ceduto, mentre il catalizzatore **G** ritorna nella fase acquosa per venire nuovamente riossidato dall'acqua ossigenata. Il composto carbonilico viene poi successivamente e nuovamente ossidato ad acido carbossilico. La procedura risulta quindi applicabile a molti alcoli primari e in particolare si può decidere di fermarla alla formazione di composto carbonilico cambiando la quantità di  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizzata.

Molto recentemente sono apparse diverse metodologie ossidative di alcoli primari ad acidi che utilizzano il TEMPO (2,2,6,6-tetrametil piperidin *N*-ossido), un radicale persistente, come ossidante.<sup>162</sup> L'interesse per queste metodologie risiede sicuramente nell'evitare l'utilizzo di metalli pesanti e la possibilità di svolgere la reazione in condizioni davvero molto blande. Il vantaggio nell'utilizzo del TEMPO è sicuramente il suo basso costo: esso viene sintetizzato facilmente tramite la condensazione dell'ammoniaca con l'acetone, con successiva *N*-ossidazione.

La prima ossidazione con il TEMPO, sottoforma di ossoammonio fu fatta da Golubev, Rozantsev e Neiman nel 1965,<sup>163</sup> dove fu trasformato l'etanolo in etanale.



Successivamente nel 1975 Cella dimostra che un alcol benzilico può essere trasformato nel corrispondente acido benzoico utilizzando acido metacloro perbenzoico (MCPBA) e quantità catalitiche 2,2,6,6-tetrametilpiperidina.<sup>164</sup>



Il meccanismo suggerito è che il MCPBA ossidi l'ammina al relativo ossoammonio il quale poi promuove l'ossidazione dell'alcol.

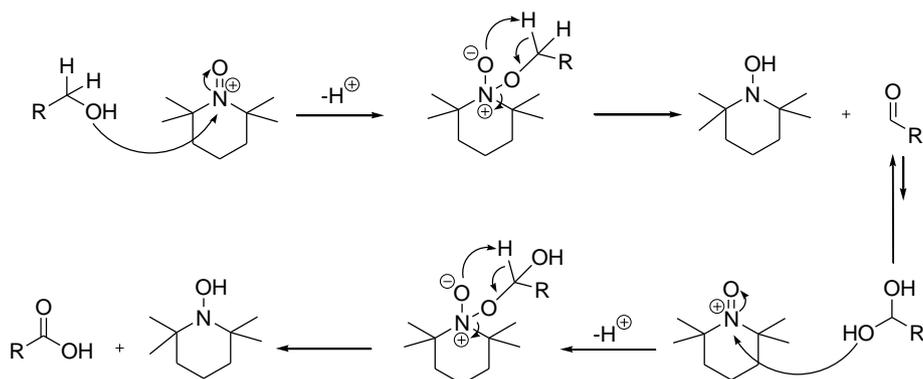


Il meccanismo di ossidazione mediato dal TEMPO sembra essere quindi il seguente:

<sup>162</sup> [http://www.springer.com/cda/content/document/cda\\_downloaddocument/9780387354316-c6.pdf?SGWID=0-0-45-346628-p173663739](http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9780387354316-c6.pdf?SGWID=0-0-45-346628-p173663739) (per tutte le immagini del paragrafo)

<sup>163</sup> Golubev, V, Rozantsev E., Neiman M., *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.*, **1965**, 11, 1927

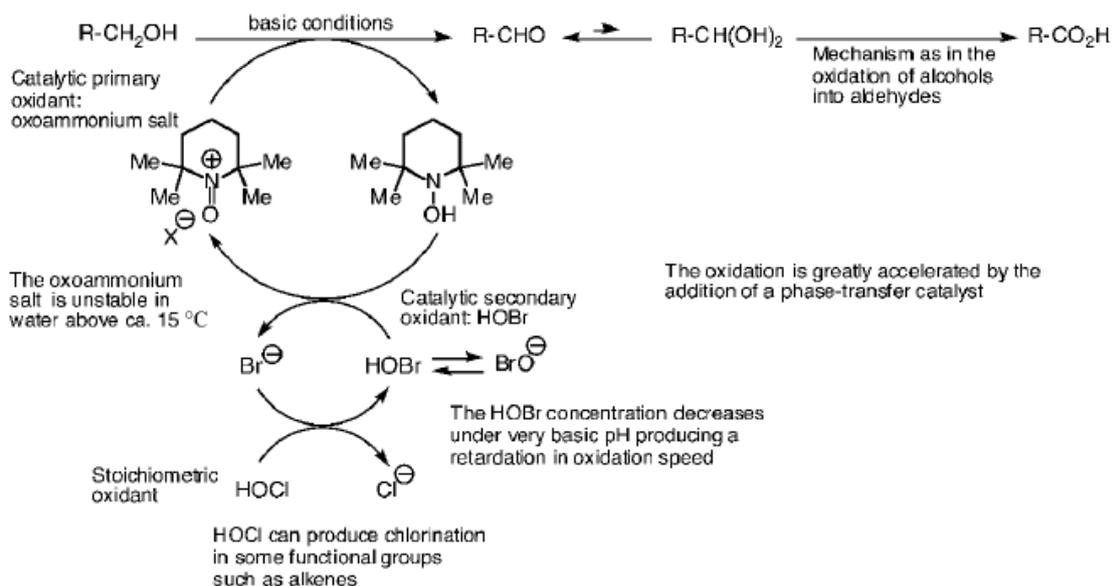
<sup>164</sup> Cella, J., Kelley A., Kenahan E., *J. Org. Chem.*, **1975**, 40, 1860.



Risulta importante osservare che:

- l'ossidazione sia dell'alcol che dell'aldeide avvengono interagendo con la forma di ossoammonio
- l'aldeide viene ossidata nella sua forma idrata (il che avviene in generale nella maggiorparte dei meccanismi di ossidazione)

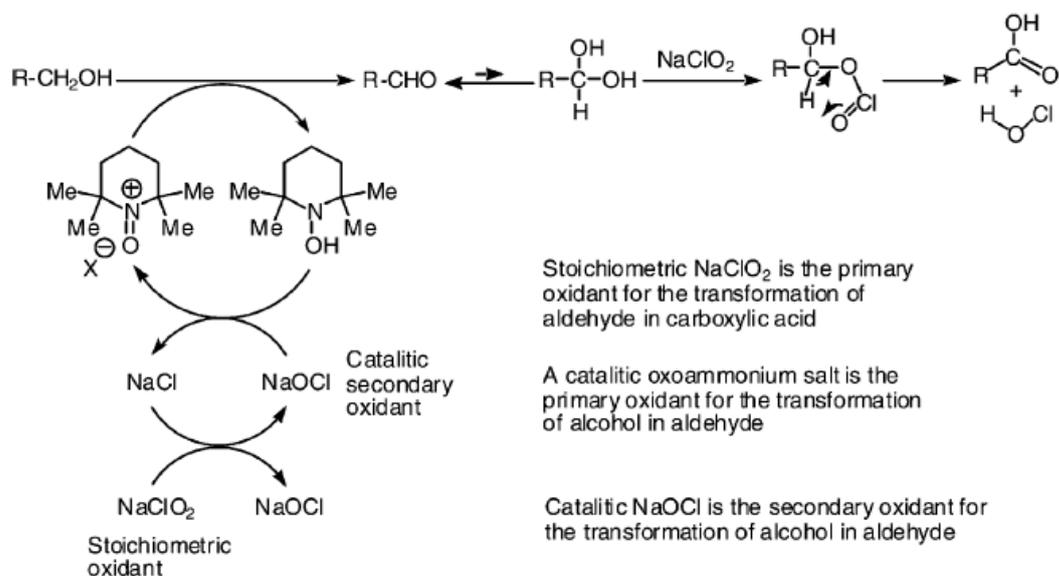
Nel 1987 Anelli pubblicò un importantissimo articolo in cui mostrava come gli alcoli primari potessero essere ossidati ad aldeidi o acidi carbossilici in miscele bifasiche  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acqua}$  con  $\text{NaClO}$  come ossidante stechiometrico, (derivante dalla candeggina di uso comune)  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KBr}$  e 4-metossi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina *N*-ossido (4-OMe-TEMPO) in quantità catalitica.<sup>165</sup> In particolare la reazione poteva essere fermata ad aldeidi interrompendo la reazione o lasciata andare ad acido carbossilico aggiungendo anche un catalizzatore di trasferimento di fase per accelerare l'ossidazione.



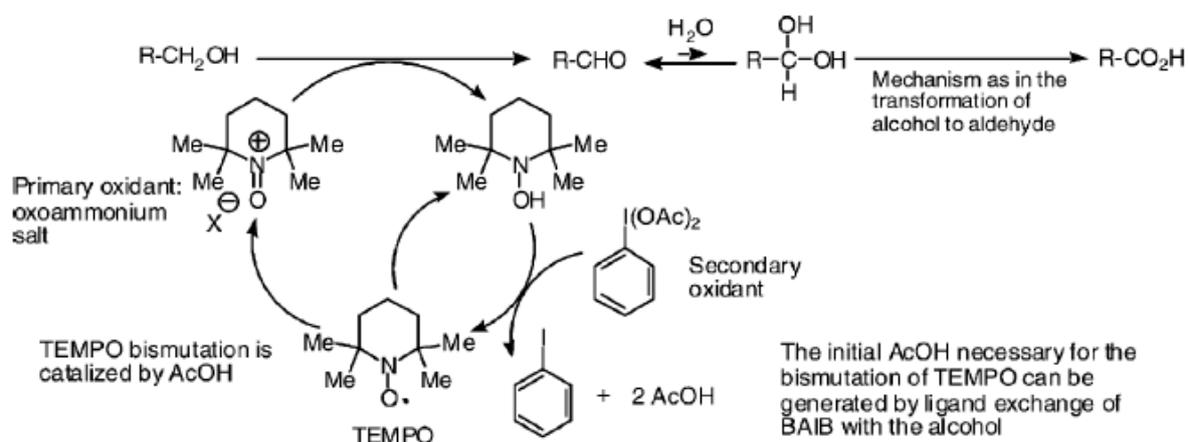
Il TEMPO in forma di ossoammonio è l'ossidante primario, cioè quello che ossida direttamente il substrato. Dopo aver ossidato l'alcol ed essersi ridotto, il TEMPO viene riattivato dall'HOBr (acido ipobromoso), ossidante secondario, la cui continua formazione viene garantita dall'ossidante stechiometrico, l'ipoclorito. L'utilizzo di  $\text{NaClO}$  provocava però clorurazioni su substrati sensibili e Zhao nel 1999 elabora un protocollo in cui l'ossidante è  $\text{NaClO}_2$ , lasciando l'ipoclorito solo in quantità catalitica.<sup>166</sup>

<sup>165</sup> Anelli P., Biffi C., Montanari F., *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 2559.

<sup>166</sup> Zhao M., Mano E., Song Z., Tschäen D., Grabowski E., Reider P. J., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 2564.



In questo protocollo il TEMPO ossoammonio è l'ossidante primario che catalizza la trasformazione di alcoli ad aldeidi, mentre è il clorito ( $\text{ClO}_2^-$ ) l'ossidante primario per le aldeidi. Il ruolo dell'ipoclorito, prodotto continuamente dopo l'ossidazione dell'aldeide da parte del clorito, è solo quello di riossidare il TEMPO. Sempre nel 1999 Epp e Widlanski sostituiscono i sali di cloro inorganici con il bis-acetossi iodobenzene (BAIB) i cui vantaggi sono la formazione di iodo benzene e acido acetico come sottoprodotti, molecole non dotate di tossicità.<sup>167</sup> Un altro vantaggio della procedura è la possibilità di evitare l'utilizzo di sali metallici.



Tutti queste procedure hanno in comune l'utilizzo del TEMPO, che funge sempre da ossidante primario per gli alcoli primari, ma non sempre per le aldeidi; nel protocollo di Zhao infatti, l'aldeide viene ossidata dal clorito. Il TEMPO riesce a ossidare questi gruppi funzionali nella sua forma di sale di ossammonio. E' anche interessante notare che tutte queste procedure necessitano di un sistema di ossidazione stechiometrico secondario o a volte "semi-primario". Recentemente sono usciti molti altri esempi di sistemi compatibili coil TEMPO:  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ,<sup>168</sup>  $t\text{-BuOCl}$ ,<sup>169</sup>  $\text{CuCl-O}_2$ ,<sup>170</sup>  $\text{Br}_2$ <sup>171</sup> e acido tricloroisocianurico.<sup>172</sup>

<sup>167</sup> Epp J. B., Widlanski T. S., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 293.

<sup>168</sup> Ying L., Gervay-Hague J., *Carbohydr. Res.*, **2003**, 338, 835

<sup>169</sup> Li K., Helm R. F., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 273, 249

<sup>170</sup> Semmelhack M. F., Schmid C. R., Cortès D. A, Chou C. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 3374.

<sup>171</sup> Merbouh N., Bobbitt J. M., Bruckner C., *Carbohydr. Res.*, **2002**, 21, 65.

<sup>172</sup> De Luca L., Giacomelli G., Masala S., Porcheddu A., *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 4999

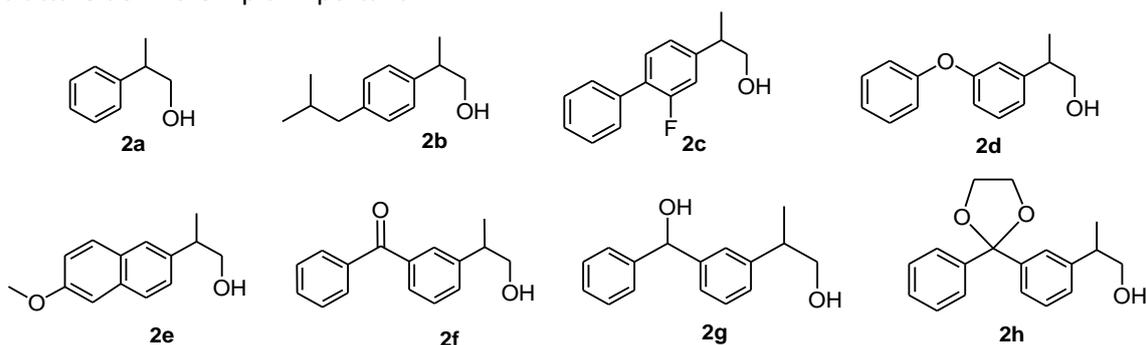
E' interessante notare anche un altro aspetto; nonostante il TEMPO sia in effetti un radicale, tutte le ossidazioni sopracitate avvengono tramite un meccanismo ionico.

#### 2.4.1 Ossidazione chimica dei 2S-aril propanoli<sup>173</sup>

Come si è potuto osservare, le metodologie per l'ossidazione di alcoli primari ad acidi carbossilici sono particolarmente numerose. In accordo con la scelta della metodologia che porti alla resa maggiore e alla ritenzione di configurazione del centro steeogenico, sono state scelte le procedure con il più alto indice di ecosostenibilità, in accordo con i principi della Green Chemistry.

Abbiamo quindi scelto di studiare la reazione di ossidazione con due protocolli: quello di Noyori e quello di Zhao, confrontandoli con una metodologia poco sostenibile che sfrutta il KMnO<sub>4</sub> come ossidante.

Gli alcoli scelti sono i 2-aril propanoli che abbiamo già incontrato nei capitoli precedenti e che fanno parte delle strutture dei Profeni più importanti.



Gli alcoli scelti sono stati rappresentati nella figura soprastante. Tutti gli alcoli del 2-Fenil Propanolo ((*S,R*)-**2a**, (*S*)-**2a**, and (*R*)-**2a**) sono commercialmente disponibili; gli alcoli (**2b-2h**) in forma racema vengono ottenuti tramite riduzione con BH<sub>3</sub>•SMe<sub>2</sub> dei relative acidi commerciali ed enantiomericamente puri (*S*)-**2b-h** tramite il processo di bioriduzione enantioselettiva mediato dall'enzima HLADH.

La procedura di ossidazione dell'(*S*)-Ibuprofenolo ((*S*)-**2b**) con KMnO<sub>4</sub> in condizioni acide è già presente in letteratura <sup>7</sup> (Table 11, entry 1), ma abbiamo deciso di applicarla comunque sui substrati (*S*)-**2a**, (*S*)-**2c**, and (*S*)-**2d** ottenendo dei risultati molto scarsi (Table 11, entries 3-4). Si ricorda che l'ossidazione con KMnO<sub>4</sub> procederebbe meglio con catalisi basica, ma queste condizioni faciliterebbero la racemizzazione dell'aldeide chirale intermedia e quindi la perdita della purezza enantiomerica. In conclusione questa procedura ha portato a rese molto basse in acido carbossilico e alla contemporanea presenza di quantità significative del relativo arilchetone **3 a,c,d** (della cui sintesi è già stato discusso in precedenza). E' stata comunque verificata la ritenzione di configurazione per del prodotto (*S*)-**4a**, ottenuto dall'ossidazione di (*S*)-**2a**.

L'applicazione del protocollo di Noyori con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaW catalitico al 2% e Aliquat 138) come catalizzatore di trasferimento di fase e ha portato in generale a basse rese anche aumentando la quantità di catalizzatore fino al 10% (Table 11, entries 9 and 11). La sostituzione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con acido peracetico e dell'Aliquat con Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub> non ha portato ad alcun miglioramento (Table 11, entries 10-13). Per escludere anche in questo caso il manifestarsi della racemizzazione del centro stereogenico è stata verificata e accertata la purezza enantiomerica di (*S*)-**4a** e (*R*)-**4a** per ossidazione di (*S*)-**2a** or (*R*)-**2a**. (Table 11, entries 7-8).

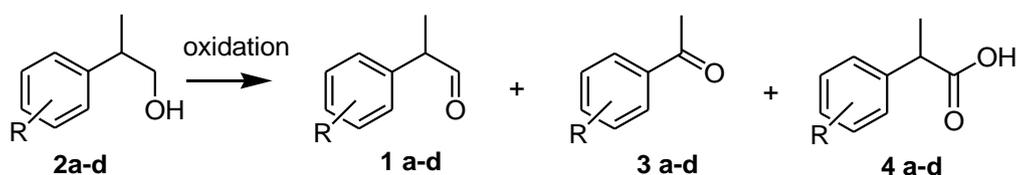


Tabella 11

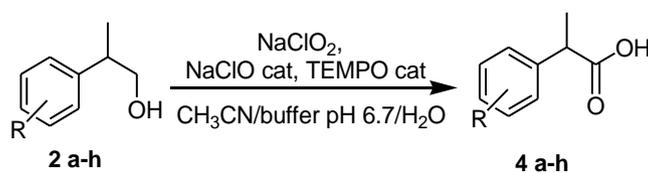
<sup>173</sup> P. Galletti, M. Pori, D. Giacomini, "One-Step Oxidation of 2-Arylpropanols to 2-Arylpropionic Acids: Improving Sustainability in the Synthesis of Profens", *Synlett*, **2010**, 17, 2644-2648

Entry	Alcohol	Oxidation Methodology	Resa 4	S/R (4)	Resa (1)	Resa (3)
1	(S)- <b>2b</b>	KMnO <sub>4</sub> , acetone/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3N, 0 °C	77 <sup>c</sup>			
2	(S)- <b>2a</b>	KMnO <sub>4</sub> , acetone/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3N, 0 °C	36			55
3	(S)- <b>2c</b>	KMnO <sub>4</sub> , acetone/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3N, 0 °C	47	>99/1		50
4	(S)- <b>2d</b>	KMnO <sub>4</sub> , acetone/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3N, 0 °C	51	>99/1		12
5	(S,R)- <b>2a</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 2%, Aliquat 138 2%, KHSO <sub>4</sub> 2%, 90 °C	27	-	10	30
6	(S,R)- <b>2a</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 2%, Aliquat 138 2%, KHSO <sub>4</sub> 2%, rt	12	-		40
7	(S)- <b>2a</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 2%, Aliquat 138 2%, KHSO <sub>4</sub> 2%, 90 °C	20	>99/1	5	17
8	(R)- <b>2a</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 2%, Aliquat 138 2%, KHSO <sub>4</sub> 2%, 90 °C	25	<1/99	2	16
9	(S,R)- <b>2a</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 10%, Aliquat 138 10%, KHSO <sub>4</sub> 10%, 90 °C	40	-	4	28
10	(S,R)- <b>2a</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 2%, Bu <sub>4</sub> NHSO <sub>4</sub> 2%, 90 °C	20	-	2	18
11	(S,R)- <b>2a</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 10%, Bu <sub>4</sub> NHSO <sub>4</sub> 10%, 90 °C	36	-	9	40
12	(S,R)- <b>2a</b>	CH <sub>3</sub> COOH, Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 10%, Bu <sub>4</sub> NHSO <sub>4</sub> 10%, 70 °C	5	-	5	30
13	(S,R)- <b>2b</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 20%, Bu <sub>4</sub> NHSO <sub>4</sub> 20%, 90 °C	15	-	15	44

<sup>a</sup> Resa dei composti isolati.

<sup>b</sup> Resa stimata da GC o HNMR del grezzo.

L'applicazione di questi due protocolli ha portato in conclusione a basse rese seppure con la ritenzione della configurazione dell'alcol di partenza; inoltre sono sempre stati osservati importanti quantitativi di arilchetoni derivanti dalla scissione ossidativa del legame C-C, fenomeno già osservato nell'ossidazione dell'alcol omobenzilico con PCC, nell'ossidazione del cumene con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e complessi di manganese (III) con porfirine.<sup>174</sup> Ma proprio la conversione della 2-fenil propanale ad acetofenone avviene se mediata da catalisi metallica.<sup>175</sup> La catalisi metallica quindi fa convergere sia i 2-aril propanoli che le 2-aril propanali verso la formazione dei sottoprodotti non desiderati, gli arilchetoni, inficiando la resa nei rispettivi acidi carbossilici. Il protocollo di Zhao, che utilizza il TEMPO come ossidante primario, non è legato all'utilizzo di metalli e quindi può essere promettente. La procedura oltre all'utilizzo di TEMPO sfrutta l'NaOCl come catalizzatore e l'NaClO<sub>2</sub> come ossidante in un sistema CH<sub>3</sub>CN-tampone. Le prime prove di ossidazione hanno mostrato ottimi risultati e rivelato quindi l'alta efficienza del protocollo. In tutti i casi gli acidi 2-arilproprionici vengono direttamente isolati tramite work-up acido-base con purezze >99%. L'acido 2-Fenil Propanoico (**4a**), l'Ibuprofene (**4b**), il Flurbiprofene (**4c**) e il Fenoprofene (**4d**) sono stati isolati in rese eccellenti. In alcuni casi la reazione è stata molto lenta ed è stato necessario l'introduzione di altro catalizzatore/ossidante. (Table 12, entries 1, 5, 7, or 12).



<sup>174</sup> a) Baciocchi, E.; Belvedere, S.; Bietti, M., *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4711; b) Tokunaga, M.; Aoyama, H.; Shirogane, Y.; Obora, Y.; Tsuji, Y. *Catal. Today* **2006**, 117, 138

<sup>175</sup> Tokunaga, M.; Aoyama, H.; Shirogane, Y.; Obora, Y.; Tsuji, Y. *Catal. Today* **2006**, 117, 138

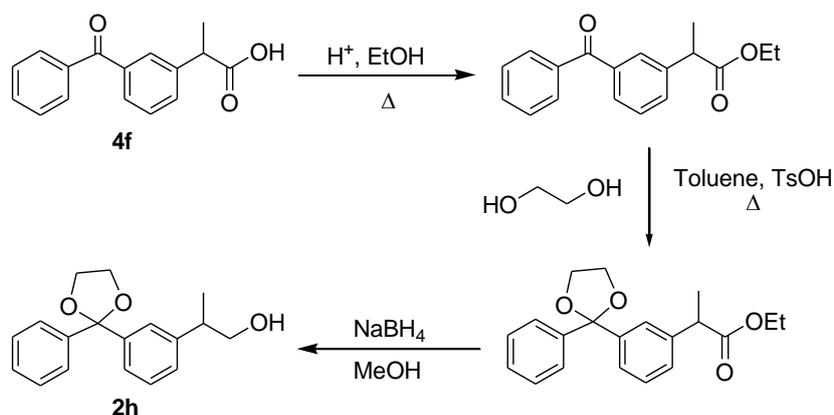
Tabella 12

Entry	alcohol	T (°C)	NaClO <sub>2</sub> (eq)	NaClO (%)	TEMPO (%)	Time (h)	4 Y (%)	(S)/(R)
1	(S,R)- <b>2a</b>	35	2	2	2	6	93	
2	(S)- <b>2a</b>	35	2	2	2	4	88	>99/1
3	(R)- <b>2a</b>	35	2	2	2	4	92	>1/99
4	(S)- <b>2b</b>	35	4	4	4	21	99	>99/1
5	(S,R)- <b>2c</b>	rt	3	4	4	24	88	
6	(S)- <b>2c</b>	rt	3	4	4	24	85	98/2 <sup>b</sup>
7	(S,R)- <b>2d</b>	35	3	4	4	24	97	
8	(S)- <b>2d</b>	35	3	4	4	26	96	98/2 <sup>b</sup>
9	(S,R)- <b>2e</b>	Rt	4	6	6	21	65	
10	(S,R)- <b>2e</b>	35	3	4	4	20	32	
11	(S)- <b>2e</b>	rt	4	6	6	26	59	>99/1
12	(S,R)- <b>2f</b>	Rt	4	6	6	24	25	
13	(S,R)- <b>2f</b>	35	3	4	4	24	40	
14	(S)- <b>2f</b>	35	3	4	4	24	42	97/3 <sup>b</sup>
15	(S,R)- <b>2g</b>	Rt	8	12	12	24	-	
16	(S,R)- <b>2g</b>	35	6	8	8	20	-	
17	(S,R)- <b>2h</b>	rt	3	4	4	20	62	

<sup>a</sup> Resa dei prodotti isolati.

<sup>b</sup> Eccesso enantiomerico degli acidi coerente con quello degli acidi di partenza

Il Naprossene (**4e**) è stato ottenuto in media in rese più basse probabilmente a causa della bassa solubilità nel sistema H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN dell'alcol di partenza (**2e**), oppure per via del potere disattivante della catena metossi naftalenica (Table 12 entries 9-11). Sono state osservate basse rese anche per il Ketoprofene **4f** partendo da **2f** e nulle partendo da **2g** (Table 12 entries 12-17), probabilmente a causa della possibile formazione di un radicale stabile di natura benzofenonica che blocca il ciclo catalitico ossidativo. Per risolvere il problema e verificare la nostra ipotesi abbiamo sintetizzato il derivato **2h**. Il derivato è stato sintetizzato trasformando il ketoprofene acido nell'estere metilico, proseguendo alla sintesi dell'acetale con glicole etilenico sul gruppo chetonico e riducendo poi l'estere ad alcol primario con NaBH<sub>4</sub>.



Come aspettato, l'ossidazione del gruppo alcolico ad acido carbossilico di **1h** è avvenuta con successo; si è poi facilmente proceduto alla rimozione del gruppo acetalico tramite catalisi acida. In tutte le prove effettuate, anche in quelle con bassa resa, la formazione dei relativi arilchetoni è risultata molto bassa come anche la presenza di aldeide non reagita. La formazione e la permanenza dell'aldeide in questo sistema può rappresentare un problema in quanto può intervenire un fenomeno di racemizzazione del centro chirale per tautomeria cheto-enolica. Tuttavia questo fenomeno è risultato essere molto limitato vista la completa ritenzione di configurazione degli acidi 2-arilpropionici ottenuti: ciò probabilmente è dovuto al fatto che in queste condizioni l'aldeide è rapidamente ossidata dall'eccesso di clorito presente e quindi la sua ossidazione è più veloce della racemizzazione (Si veda il meccanismo dell'ossidazione con il metodo di Zhao).

### Ossidazione di alcoli primari ad acidi carbossilici: metodologie biocatalitiche

Oltre alle importanti metodologie chimiche per l'ossidazione di alcoli primari ad acidi carbossilici, esistono anche innovative e interessanti procedure che utilizzano la biocatalisi; in questo ambito ci sono stati spesso buoni risultati con l'utilizzo di cellule intere,<sup>176</sup> in cui l'enzima che in effetti catalizza l'ossidazione non è del tutto indentificato.

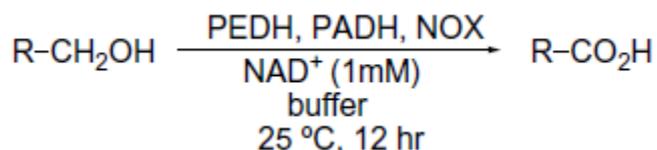
La reazione più famosa e conosciuta da secoli dall'uomo è la sintesi dell'acido acetico per fermentazione ossidativa (aerobica) dell'etanolo per opera di *Acetobacter*. La reazione chimica complessiva facilitata da questi batteri è:



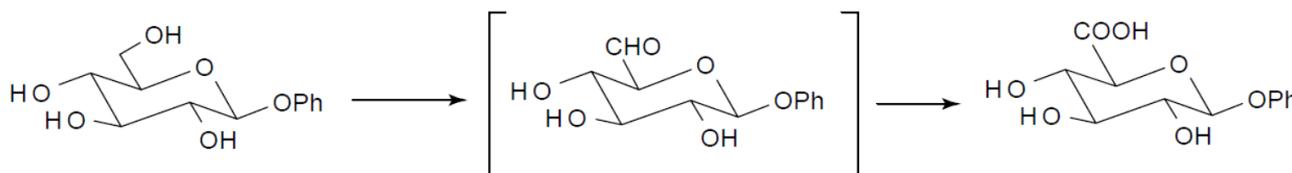
Se una soluzione diluita di alcool viene inoculata con *Acetobacter* viene mantenuta in un luogo caldo e arieggiato, essa diventerà aceto nel giro di pochi mesi. L'industria produttrice di aceto accelera questo processo fornendo un supplemento di ossigeno ai batteri.

Recentemente il gruppo di ricerca del professor Molinari ha riportato l'utilizzo di *Acetobacter aceti* MIM 2000/28 nell'ossidazione del 2-fenil etanolo al relativo acido carbossilico.<sup>177</sup> In particolare l'attività di questo ceppo batterico è anche risultata modulabile: in solvente acquoso viene prodotto l'acido carbossilico, mentre in un sistema bifasico acqua/isooctano viene prodotta la relativa aldeide. Un ulteriore miglioramento è stata la possibilità di immobilizzare le cellule in alginato di calcio, le quali hanno mostrato comunque grandi attività riuscendo a produrre fino a 23g/L di acido fenilacetico in 9 giorni senza formazione di emulsioni.

Un altro esempio messo in luce da Ohta sfrutta due enzimi estratti dal microorganismo *Brevibacterium*: PEDH (feniletanolo deidrogenasi) e PADH (fenilacetaldeide deidrogenasi).<sup>178</sup> Questi enzimi NADH dipendenti catalizzano l'ossidazione di vari alcoli primari ad acidi, accoppiati ad un altro enzima, una NOX (NADH ossidasi) estratta da *Lactobacillus Brevis*<sup>179</sup> che rigenera il NAD<sup>+</sup> grazie all'ossigeno.



Recentemente Riva ha riportato l'ossidazione del CH<sub>2</sub>OH terminale di beta e α-glucosidi monosaccaridici e disaccaridici a COOH con l'ottenimento degli analoghi glucuronosidi, tramite l'utilizzo di una laccasi, una ossidasi estratta dall'organismo *Trametes Pubescens*.<sup>180</sup>



Le laccasi<sup>181</sup> sono note per condurre reazioni di ossidazione, ma normalmente in chimica organica vengono utilizzate per catalizzare l'ossidazione di un alcol primario ad aldeide o alcoli secondari a chetoni<sup>182</sup>. Sono in

<sup>176</sup> W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.*, **2004**, 346, 125 ± 142

<sup>177</sup> R. Gandolfi, K. Cavenago, R. Gualandris, J. Gagob, F. Molinari, *Process Biochemistry*, 39 (**2004**) 747–751

<sup>178</sup> J. Hirano, K. Miyamoto, H. Ohta, *Tetrahedron Letters* 49 (**2008**) 1217–1219

<sup>179</sup> Hummel, W.; Riebel, B. *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25, 51.

<sup>180</sup> a) Marzorati M, Danieli B, Haltrich D, Riva S: *Green Chem* **2005**, 310-315; b) Baratto L, Candido A, Marzorati M, Sagui F, Riva S, Danieli B: *J Mol Cat B: Enzym* **2006**, 39: 3-8

<sup>181</sup> A. Kunamneni, S. Camarero, C. García-Burgos, F. Plou, A. Ballesteros and M. Alcalde, *Microbial Cell Factories* **2008**, 7:32

<sup>182</sup> a) Baiocco P, Barreca AN, Fabbrini M, Galli C, Gentili P, *Org Biomol Chem* **2003**, 1:191-197. 39; b) Fabbrini M, Galli C, Gentili P: *J Mol Catal B Enzym* **2002**, 16:231-240. 40; c) Fritz-Langhals E, Kunath B, *Tetrahedron Lett* **1998**, 39:5955-5956. 41; d) Potthast A, Rosenau T, Chen CL, Gratzl JS, *J Mol Catal A Chem* **1996**, 108:5-9. 42; e) Fabbrini M, Galli C, Gentili P, Macchitella D, *Tetrahedron Lett* **2001**, 42:7551-7553.

grado anche di catalizzare reazioni di accoppiamento con fenoli e steroidi<sup>183</sup>, reazioni di polimerizzazione e costruzione di legami carbonio-azoto<sup>184</sup>.

Le laccasi (EC 1.10.3.2, p-diphenol: dioxygen oxidoreductase)<sup>185</sup> sono delle glicoproteine ubiquitarie in natura e appartengono alla famiglia delle "ossidasi blu", dette così in quanto rame dipendenti. La maggior parte di loro consiste in una struttura monomerica, anche se esistono molte laccasi di natura multimerica.<sup>186</sup> Il peso molecolare medio si aggira attorno a 60-70 kDa e il contenuto medio di carboidrati è tra il 10 e il 20%; si ipotizza che la funzione dei carboidrati (generalmente mannosio, galattosio ed *N*-acetil glucosammina) sia quella di stabilizzare molto queste proteine. Sono presenti in molte piante e sostanzialmente in tutto il regno dei funghi e recentemente la loro presenza è stata riscontrata anche negli insetti.

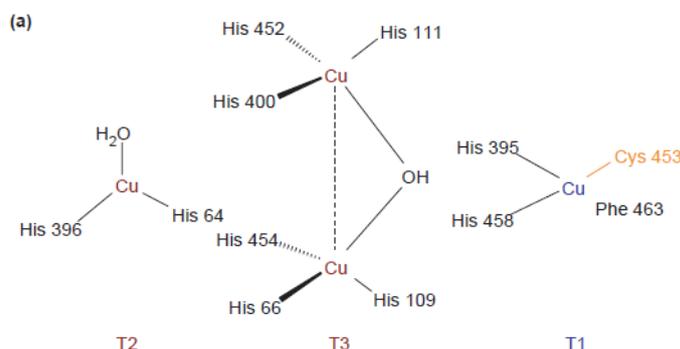
Queste proteine possono essere secrete dai microorganismi o localizzarsi dentro le cellule e ad esse sono attribuite numerose funzioni biologiche: pigmentazione,<sup>187</sup> lignificazione della parete cellulare,<sup>188</sup> biodegradazione della lignina, turn-over dell'humus e processi di detossificazione<sup>189</sup> e regolazione omeostatica del ferro e del rame.<sup>190</sup>

A livello industriale questi enzimi sono usati in maniera massiccia nello sbiancamento della carta,<sup>191</sup> nella modifica dei coloranti tessutali,<sup>192</sup> nel trattamento della lignina o materiali basati su essa tramite processi di cross-linking,<sup>193</sup> nella detossificazione dagli inquinanti e trattamento dei reflui.<sup>194</sup>

Tutti questi processi, sia in ambito biologico che applicativo, sono resi possibili dalle reazioni che è in grado di catalizzare questo enzima: reazioni di polimerizzazione/depimerizzazione e reazioni di ossidoriduzione.

Il meccanismo di azione della laccasi è catalizzato dalla ossidazione mono-elettronica dell'opportuna molecola-substrato (fenolo, molecole aromatiche, ammine alifatiche..) tramite ossigeno, la quale viene trasformata in un radicale reattivo.

Questo processo avviene con l'ausilio di un cluster di quattro atomi di rame, che costituiscono il nucleo catalitico dell'enzima. Gli atomi di rame sono disposti in 3 siti redox (T1, T2 e T3); T1 e T3 contengono un atomo di rame, il sito T2 ne contiene 2. Il sito 1 (T1) è localizzato a 12 Angstrom dal cluster trinucleare T2 e T3, luogo in cui avviene la riduzione dell'ossigeno e la formazione di acqua.<sup>195</sup>



<sup>183</sup> Ponzoni C, Beneventi E, Cramarossa MR, Raimondi S, Trevisi G, Pagnoni UM, Riva S, Forti L, *Adv Synth Catal* **2007**, 349:1497-1506

<sup>184</sup> Mikolasch A, Hammer E, Jonas U, Popowski K, Stielow A, Schauer F, *Tetrahedron* **2002**, 58: 7589-7593

<sup>185</sup> S. Riva, *TRENDS in Biotechnology*, 2006, 24, 5

<sup>186</sup> Marques De Souza CG, Peralta RM. *J Basic Microbiol* **2003**, 43(4):278-286.

<sup>187</sup> Williamson PR, Wakamatsu K, Ito S, *J Bacteriol* **1998**, 180:1570-1572

<sup>188</sup> O' Malley DM, Whetten R, Bao W, Chen CL, Seedorf RR, *Plant J* **1993**, 4:751-757

<sup>189</sup> Baldrian P: *FEMS Microbiol Rev* **2006**, 30:215-242

<sup>190</sup> Stoj C, Kosman DJ: *FEBS Lett* **2003**, 554:422-426

<sup>191</sup> Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S, *Appl Environ Microbiol* **1997**, 63(12):4627-4632.

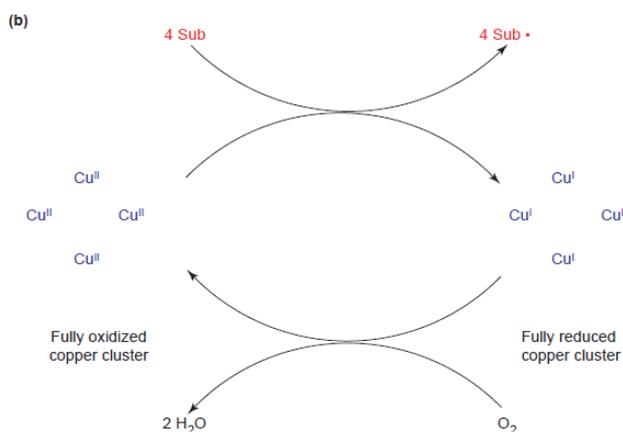
<sup>192</sup> a) Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM: *Appl Environ Microbiol* **2000**, 66:3357-3362; b) Kunamneni A, Ghazi I, Camarero S, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M: *Process Biochem* **2008**, 43:169-178.

<sup>193</sup> Widsten P, Tuominen S, Qvintus-Leino P, Laine JE, *Wood Sci Technol*, **2004**, 38:521-528.

<sup>194</sup> Bergbauer M, Eggert C, Kraepelin G, *Appl Microbiol Biotechnol* **1991**, 35:105-109; b) Berrio J, Plou FJ, Ballesteros A, Martinez AT, Martinez MJ: *Biocatal Biotransform* **2007**, 25:130-134.

<sup>195</sup> Piontek, K. et al. (2002), *J. Biol. Chem.* 277, 37663-37669.

La presenza di questi atomi di rame, spesso gli enzimi isolati assumono la colorazione blu tipica dell'assorbimento del rame. Il processo complessivo consiste quindi nella riduzione di una molecola di ossigeno a due molecole di acqua con la concorrente ossidazione di quattro molecole di substrato e la produzione di quattro radicali; gli atomi di rame passano dallo stato di ossidazione +2 a +1. I quattro radicali che derivano dal substrato possono produrre dimeri, e poi oligomeri e poi polimeri, o possono a loro volta ossidare un altro substrato e quindi dare vita ad un vero e proprio ciclo di elettroni, un ciclo ossidativo.<sup>196</sup>

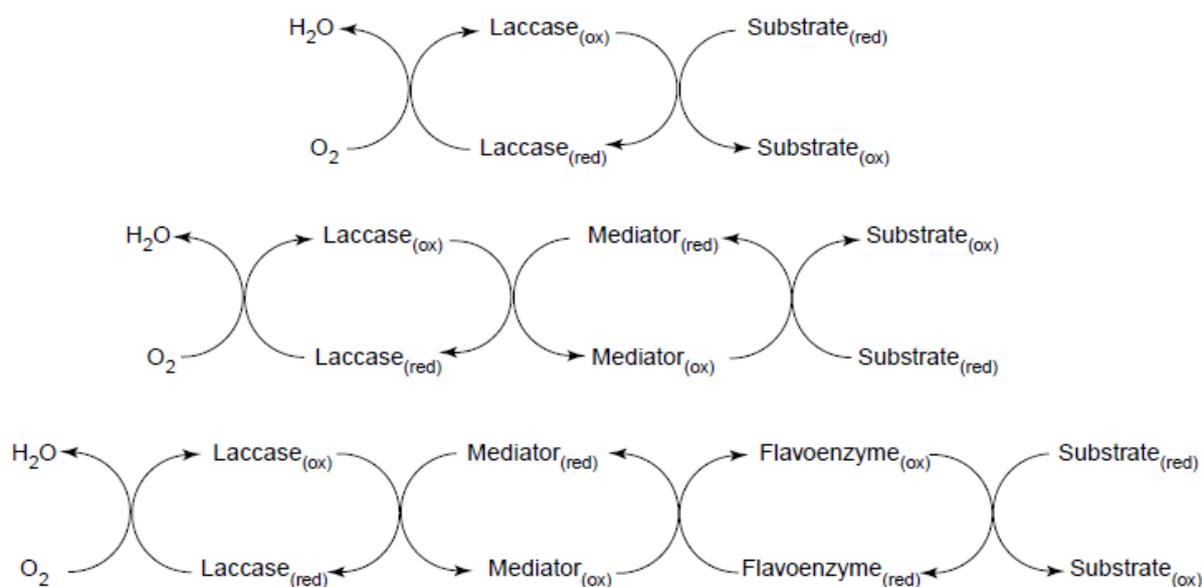


Tutti i potenziali casi cui va incontro il meccanismo di ossidazione della laccasi sono qui rappresentati:

1) Nel primo caso, il più semplice, il substrato è direttamente ossidato dalla laccasi per interazione con il cluster di rame.

2) Spesso però, soprattutto nell'ambito della biocatalisi, può succedere di dover sfruttare le laccasi per ossidare un determinato substrato che però non può essere direttamente ossidato dall'enzima. Questo può succedere per svariati motivi: a) incapacità del substrato di ossidarsi secondo il meccanismo mono elettronico della laccasi; b) il substrato potrebbe non essere in grado di penetrare nel sito attivo dell'enzima; c) l'ossidazione del substrato richiede un potenziale redox più elevato.

Il problema può essere risolto dall'utilizzo di una molecola detta mediatore: la molecola per esserlo deve potersi ossidare secondo il meccanismo della laccasi ma allo stesso tempo ossidare il nostro substrato di interesse. E i mediatori a volte possono essere anche più di uno, come il sistema con la FADH

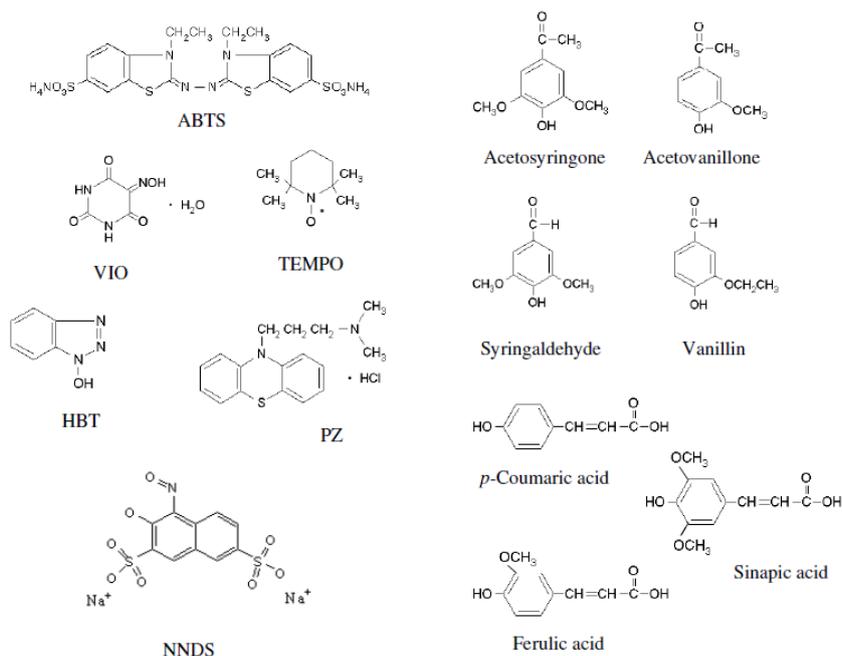


<sup>196</sup> a) Claus, H. **2004**, Micron, 35, 93–968;b) Solomon, E.I. et al. **1996** Chem. Rev. 96, 2563–2605.

Il meccanismo di interazione della laccasi con un mediatore è comune anche in natura. Infatti se i funghi sono in grado di depolimerizzare la lignina tramite le laccasi, è impensabile pensare che un substrato ingombrante come un polimero possa entrare nel sito attivo dell'enzima. E infatti l'incubazione di laccasi con la lignina da sola non porta a nessuna reazione.<sup>197</sup>

L'utilizzo di un mediatore offre quindi molti vantaggi: a) l'allargamento del range del potenziale redox dell'enzima, che può passare da 500-700 mV a oltre 1100 mV; b) l'aumento della velocità e della resa delle reazioni; c) la capacità di ossidare molecole molto diverse dai tipici substrati dell'enzima.

Tra i mediatori più utilizzati qui rappresentati, il primo artificiale è stato l'ABTS, utilizzato proprio per depolimerizzare la lignina.



La scelta del mediatore giusto per la trasformazione chimica è un aspetto veramente cruciale, perché al di là del potenziale redox e dell'aumento della velocità e della resa, risulta importante basarsi sul meccanismo di ossidazione che necessita il substrato. L'ABTS per esempio ossida secondo un meccanismo di trasferimento di elettroni (ET); l'HBT invece effettua un trasferimento dell'atomo di idrogeno (HAT), da parte del radicale nitrossile (N-O•); il TEMPO (e i derivati) seguono invece un meccanismo di natura ionica esplicito dalla struttura del sale di ossammonio (come peraltro si è osservato nei protocolli di ossidazione di Anelli e di Zhao).

Tuttavia anche l'utilizzo dei mediatori ha degli svantaggi: sono molecole molto spesso costose e i sottoprodotti sono tossici. Inoltre a volte lo stesso mediatore potrebbe inattivare l'enzima o essere trasformato in una molecola non più in grado di svolgere il compito di trasferitore di elettroni. Si sta quindi cercando di rivolgersi all'utilizzo di mediatori "low-cost" e soprattutto di origine naturale come fenoli e aniline, laddove possibile compatibilmente al meccanismo di ossidazione richiesto.

Il nostro interesse nel mettere a punto una metodologia biocatalitica di ossidazione dei nostri S 2 aril propanoli a profeni ci ha spinti a studiare una laccasi come catalizzatore. Le prime prove sono state effettuate ispirandoci alle condizioni che Riva utilizza per l'ossidazione dei glucosidi, utilizzando il 2-Fenil propanolo come molecola iniziale su cui iniziare lo studio. Riva utilizza come laccasi quella estratta

<sup>197</sup> Bajpai, P. (1999), *Biotechnol. Prog.* 15, 147-157.

dall'organismo fungino *Trametes Pubescens* ma noi abbiamo deciso di utilizzare l'enzima estratto da *Trametes Versicolor*<sup>198</sup> molto utilizzato in ambito industriale e facilmente reperibile.

Le condizioni iniziali quindi prevedono l'utilizzo di 80 U di enzima (1 U corrisponde alla quantità di enzima che converte 1 micromole di catecolo al minuto a pH 4.5 a 25°C)<sup>199</sup> per millimole di substrato alcolico, il 20% di TEMPO (Riva utilizza quantità di TEMPO che variano tra il 10% e il 20%) rispetto al substrato alcolico da ossidare e come solvente un tampone acetato a pH 4.5. Risulta anche molto importante effettuare la reazione in una beuta all'aria, essendo la laccasi una ossidasi bisognosa di ossigeno. Abbiamo quindi effettuato uno screening iniziale sul 2-Fenil propanolo racemo variando il solvente, il pH, la temperatura, la quantità di TEMPO ed enzima utilizzati rispetto al substrato e in particolare la modalità di ossigenazione.

Tabella 13

Entry	Substrato	Mediatore (%)	Solvente	O <sub>2</sub>	T	Time	Resa Acido	HPLC Chirale
1	Alcol	/	AB pH 4.5, 0.1 M	All'aria/ Aperto	RT	7 gg	0%	
2	Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	All'aria/ Aperto	RT	6 gg	53%	
3	Aldeide	TEMPO (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	All'aria/ Aperto	RT	6 gg		
4	Acido	TEMPO (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	All'aria/ Aperto	RT	6 gg		
5	Chetone	TEMPO (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	All'aria/ Aperto	RT	6 gg		
6	(R)-Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	All'aria/ Aperto	RT	5 gg	traccia	(R)/(S) = 77/23
7	(S)-Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	All'aria/ Aperto	RT	5 gg	traccia	(R)/(S) = 8/92
8	Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	All'aria/ Aperto	RT	5 gg	30%	(R)/(S) = 50/50
9	Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	Bubbled/chiuso	RT	6 gg	60%	
10	Alcol	/	AB pH 4.5, 0.1 M	Bubbled/chiuso	RT	9 gg	0%	
11	Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	Chiuso	RT	9 gg	traccia	
12	Alcol	TEMPO (100%)	AB pH 4.5, 0.1 M	Bubbled/chiuso	RT	2 gg	77%	
13	Alcol	ABTS (20%)	AB pH 4.5, 0.1 M	Bubbled/chiuso	RT	9 gg	0%	
14	Alcol <sup>a</sup>	TEMPO (100%)	AB pH 4.5, 0.1 M	Bubbled/chiuso	RT	7gg	0%	
15	Alcol	TEMPO (20%)	PBS pH 6.5, 0.1 M	Bubbled/chiuso	RT	7gg	0%	

<sup>198</sup> Fu, Jiajia; Nyanhongo, Gibson S.; Guebitz, Georg M., *Biocat and biotrans.*, **2012**, 30, 1, 125-140

<sup>100</sup> <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/51639?lang=it&region=IT>

16	Alcol	TEMPO (20%)	Citrate pH 3.0, 0.1 M	Bubbled/chiuso	RT	8gg	0%	
17	Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5 0.1 M / <b>DCM 50%</b>	Bubbled/chiuso	RT	9 gg	0%	
18	Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5 0.1 M / <b>MTBE 50%</b>	Bubbled/chiuso	RT	9 gg	0%	
19	Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5 0.1 M / <b>tBuOH 10%</b>	Bubbled/chiuso	RT	7gg	15%	
20	Alcol	TEMPO (20%)	AB pH 4.5 0.1 M + <b>MeCN 10%</b>	Bubbled/chiuso	RT	6 gg	5%	

Le prime prove (Tabella 13, entries 1-8) sono state svolte tutte all'aria, utilizzando tampone acetato a pH 4.5 a concentrazione 0.1 Molare, utilizzando 68 U di enzima per millimole di substrato. La entry 2 ha portato ad una resa nell'acido del 53% con la presenza di qualche impurezza non nota dopo 6 giorni e ha mostrato l'importanza del TEMPO come catalizzatore. Infatti se non è presente (Tabella 13, entry 1) la reazione non procede. Per verificare l'effetto dell'enzima laccasi sugli intermedi, i prodotti e i sottoprodotti (Tabella 13, entries 3-5), rispettivamente la 2-fenil propanale, l'acido 2-fenil propanoico e l'acetofenone, abbiamo studiato il comportamento di questi prodotti con laccasi. Questo aspetto risulta molto importante da approfondire perché la laccasi, per via del suo meccanismo di ossidazione monoelettronica, potrebbe avere un'attività ossidante sull'anello aromatico. L'aldeide si è completamente ossidata ad acido, l'acido è rimasto inalterato mentre l'acetofenone ha portato alla formazione di sottoprodotti non identificati. Abbiamo deciso di verificare se la laccasi potesse avere un comportamento differente in funzione dell'enantiomero *R* o *S* (Tabella 13, entries 6-8), verificando tramite HPLC chirale la configurazione dell'acido risultante; abbiamo osservato che in tutti i casi l'ossidazione procedeva ma l'acido risultante da *R* o da *S* non era enantiomericamente puro (rispettivamente  $R/S = 77/23$  partendo dall'alcol *R*,  $R/S = 8/92$  partendo da *S*,  $R/S = 50/50$  partendo dall'alcol racemo). Visto che l'ossidazione del racemo portava ad un acido racemo abbiamo ipotizzato che l'enzima non fosse enantiospecifico e nel caso dell'alcol *R* o *S* la parziale racemizzazione possa essere intervenuta sull'aldeide o sull'acido per via del pH acido tramite l'equilibrio chetoenolico.

In tutti i casi qui rappresentati abbiamo osservato dei valori di resa molto diversi e bassi per ciascuna prova e abbiamo pensato che i tempi di reazione associati all'utilizzo di un sistema aperto potessero causare una facile volatilizzazione degli intermedi, tra cui l'aldeide. Abbiamo quindi cominciato a svolgere le reazioni in un sistema chiuso gorgogliando ossigeno gassoso ottenendo miglior risultato in termini di resa (60%, Tabella 13, entry 9), dove l'unico sottoprodotto osservato è risultato essere l'acetofenone, dove la sua maggior presenza può essere dovuta alla concentrazione superiore di ossigeno che può causare e facilitare il cleavage ossidativo dell'aldeide. Per verificare che l'eccesso di ossigeno non fosse in grado di catalizzare l'ossidazione del substrato senza l'aiuto di altri ossidanti, abbiamo svolto una prova con enzima e senza TEMPO (Tabella 13, entry 10) e una con il TEMPO ma senza l'enzima (Tabella 13, entry 14), entrambe negative. Questi risultati sembrano dimostrare come l'ossidazione del 2-Fenil propanolo sia fortemente legata alla triade ossidativa O<sub>2</sub>-Laccasi-TEMPO. Osservando i tempo di reazione spesso molto lunghi abbiamo deciso di verificare l'effetto di una maggior quantità di TEMPO sulla velocità di reazione, osservando che il mediatore in quantità equimolare rispetto all'alcol ne provoca l'ossidazione in 2 giorni invece che 6 con una resa del 77%. L'utilizzo di ABTS al 20% alternativamente al TEMPO non ha fatto progredire la reazione, dimostrando che la scelta del mediatore è giusta e che l'ossidazione necessita di un meccanismo di natura ionica. Variazioni di pH del solvente (pH 3 e pH 6.5) hanno bloccato l'attività dell'enzima, che in effetti risulta avere la massima attività tra 4 e 5.5. L'utilizzo di solventi organici e cosolventi con l'obiettivo di facilitare la

solubilità del substrato e velocizzare la reazione ha portato a risultati molto scarsi e insoddisfacenti (Tabella 13, entries 17-20).

Tabella 14

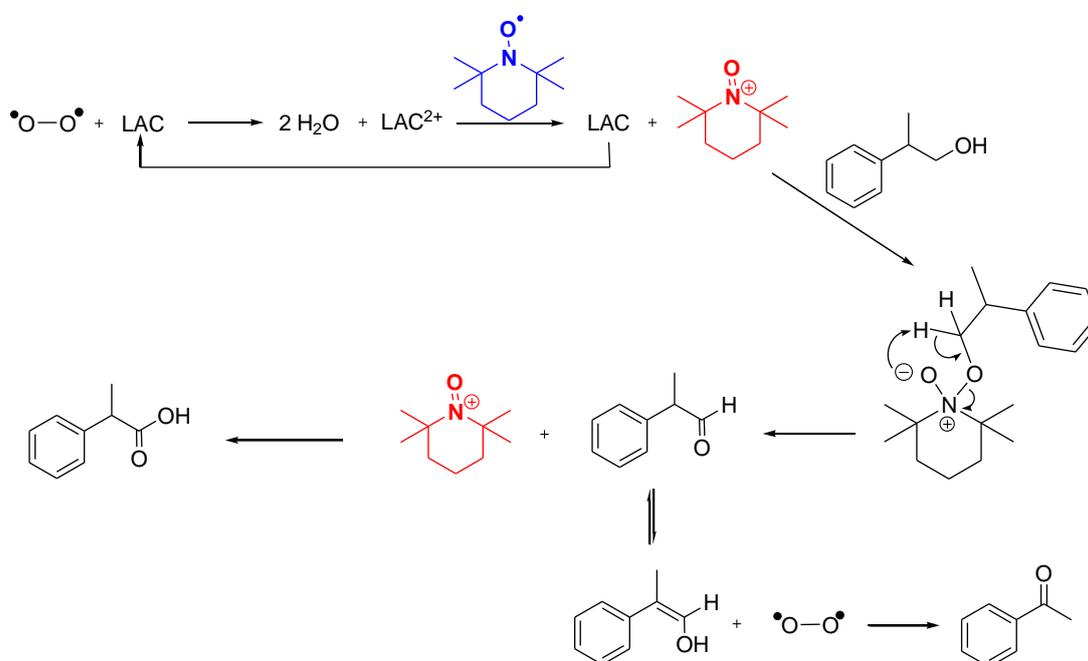
Entry	Sm	Mediat.	Solv.	O <sub>2</sub>	T	Time	Resa Acido (STIMA)	HPLC Chirale
1	Alcol	TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ	Bubbled/chiuso	RT	2 gg	74%	
2	Alcol	TEMPO (20%)	milliQ / NaCl 0.1 M	Bubbled/chiuso	RT	9 gg	traccia	
3 <sup>a</sup>	Alcol	TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ	Bubbled/chiuso	RT	2gg	60%	
4	Alcol	TEMPO (10%)	H <sub>2</sub> O milliQ	Bubbled/chiuso	RT	2gg	45%	
5	(S)-Alcol	TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ	Bubbled/chiuso	RT	2gg	92%	(R)/(S) = 0/100
6	Alcol	TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ / <b>DMSO 10%</b>	Bubbled/chiuso	RT	5 gg	100% ?	
7	Alcol	TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ / <b>DMSO 30%</b>	Bubbled/chiuso	RT	5 gg	0%	
8	Alcol	TEMPO	H <sub>2</sub> O milliQ / Acetone 10%	bubbled/chiuso	RT	6	0%	
9	Alcol	TEMPO	H <sub>2</sub> O milliQ / <b>THF 10%</b>	bubbled/chiuso	RT	7	0%	
10	Alcol	Hobt (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ	Bubbled/chiuso	RT	4 gg	0%	
11	Alcol	HoBt (20%) + TEMPO (2%)	H <sub>2</sub> O milliQ	Bubbled/chiuso	RT	3 gg	traccia	
12	Alcol	metilestere dell'acido siringico	H <sub>2</sub> O milliQ	Bubbled/chiuso	RT	6 gg	0%	
13	Alcol	4-OH TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ	Bubbled/chiuso	RT	3 gg	15%	
14	Alcol	4-NH <sub>2</sub> TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ	Bubbled/chiuso	RT	3 gg	0%	
15	Alcol	TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ + Aliquat (20% in Volume)	Bubbled/chiuso	RT	3 gg	0%	
16	Alcol	TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ + C <sub>10</sub> MimNTf <sub>2</sub> (20% in volume)	Bubbled/chiuso	RT	3 gg	0%	
17	Alcol	TEMPO (20%)	H <sub>2</sub> O milliQ + N(But) <sub>4</sub> HSO <sub>4</sub> (0.02 mmol)	Bubbled/chiuso	RT	3 gg	0%	

<sup>a</sup>Quantità quadrupla di enzima utilizzato

Tuttavia l'utilizzo di acqua milliQ, ha portato a risultati molto buoni in termini di resa 77% (Tabella 14, entry 1) e abbiamo deciso di ottimizzare ed effettuare altre prove con questo solvente Per vedere l'effetto della forza ionica abbiam condotto una reazione in acqua milliQ con aggiunta di NaCl (Tabella 14, entry 2) osservando

solo la formazione di una traccia di prodotto Per velocizzare ulteriormente la reazione abbiamo utilizzato una quantità di enzima quadrupla rispetto all'alcol (Tabella 14, entry 3), ma senza alcun risultato interessante in termini di resa. Abbiamo quindi verificato nuovamente l'effetto dei mediatori. L'utilizzo del 10% di TEMPO porta dopo due giorni al 45% di resa con la presenza di molte impurezze (Tabella 14, entry 4). Questa volta l'utilizzo di 2S-2-Fenil Propanolo ha portato all'acido S come unico enantiomero, mostrando come queste condizioni non favoriscono evidentemente la racemizzazione (Tabella 14, entry 5). Stranamente l'utilizzo di analoghi del TEMPO come il 4-idrossi TEMPO e il 4-ammino TEMPO (Tabella 14, entries 13,14) non portano a risultati soddisfacenti. L'utilizzo di mediatori diversi dal tempo e diversi dall'ABTS, l'HoBT e il metil siringato (che dovrebbero agire secondo un meccanismo HAT) non porta alla formazione di acido; solamente l'utilizzo di Hobt associato al TEMPO, con la formazione di un sistema di doppio mediatore, porta ad una traccia di acido (Tabella 14, entries 10-12). Per quanto riguarda l'utilizzo di cosolventi (Tabella 14, entry 6-10) solo con DMSO al 10% si è avuto una conversione completa ad acido; l'utilizzo però del 30% di DMSO ha bloccato l'attività dell'enzima. L'utilizzo di liquidi ionici e/o surfattanti ha in questo caso bloccato l'attività enzimatica (Tabella 14, entries 15-17).

Questi risultati sul 2- Fenil propanolo ci hanno portato a ipotizzare il seguente meccanismo.



Come si vede, il TEMPO sembra essere fondamentale non solo per ossidare l'alcol ad aldeide, ma anche per ossidare quest'ultima ad acido carbossilico. Il meccanismo di azione del TEMPO sull'aldeide è possibile solo se essa è in forma idratata come d'altra parte prevede la letteratura. E' interessante paragonare questa ossidazione alla metodologia di Zhao che abbiamo precedentemente utilizzato per ossidare il 2-Fenil Propanolo e gli altri propanoli. Con questo meccanismo l'aldeide intermedia è necessariamente ossidata dal TEMPO (dal TEMPO in forma di ossoammonio, possibile solo tramite l'intervento dell'enzima laccasi e dell'ossigeno), mentre Zhao mostra come essa sia ossidata direttamente e velocemente dall' $\text{NaCl}_2\text{O}$ , l'ossidante stechiometrico.

Per verificare comunque questa ipotesi, abbiamo provato a mettere la 2-fenil propanale in acqua milliQ unicamente con ognuno dei tre ossidanti: a) Enzima; b)  $\text{O}_2$ ; c) TEMPO. La reazione come previsto non è andata in nessuno dei tre casi. Questo ha dimostrato che l'enzima da solo non è in grado di ossidare l'aldeide e ha bisogno di un mediatore; il mediatore d'altra parte ossida l'aldeide solo in forma ossidata di ossammonio e comunque essendo presente in forma substechiometrica ha bisogno di essere rigenerato e necessita quindi di far parte di un ciclo catalitico ossidativo.

Successivamente ci siamo concentrati sullo studio dell'ossidazione degli altri 2-aril propanoli (testati in forma racemica) precursori dei Profeni. Tutte le prove sono sempre state effettuate utilizzando il TEMPO al 20%, gorgogliando l'ossigeno e mantenendo chiuso il sistema ma con una quantità di enzima utilizzato doppia rispetto al 2 fenil propanolo unitamente ad una quantità doppia di solvente utilizzato.

L'ibuprofenolo, il fenoprofenolo e il ketoprofenolo e ketoprofendiolo (Tabella 15, entries 1-4) hanno portato ad ottime rese in acido in sola acqua milliQ; il dato è molto interessante se si considerano i tempi relativamente brevi di reazione (3 giorni al massimo per il fenoprofenolo e il ketoprofendiolo) e il fatto che gli alcoli non sono solubili se non in minima parte in acqua. Per il flurbiprofenolo la stessa reazione condotta in acqua ha portato ad una resa del 35% (Tabella 15, entry 13) dopo quattro giorni mentre per il naprossenolo è stato necessario usare cosolventi. L'utilizzo di cosolventi organici e/o surfattanti ha infatti portato a buone rese per entrambi gli alcoli.

Tabella 15

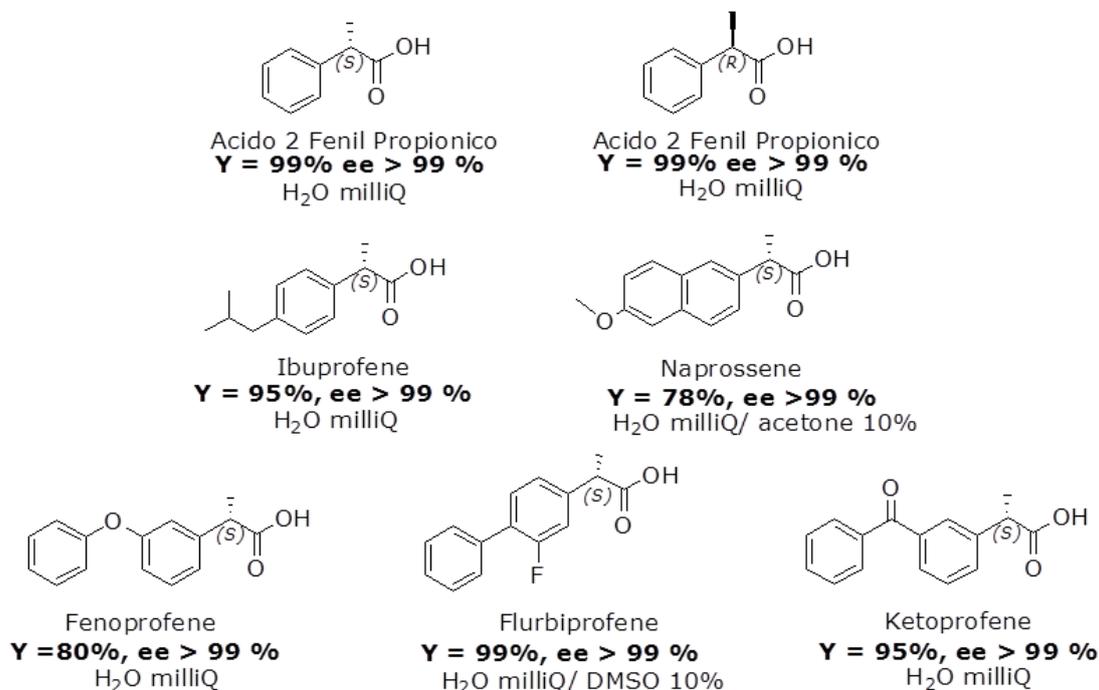
Entry	Alcol	Solv.	T	Time	Rese Acido (STIMA)
1	ibuprofenolo	H <sub>2</sub> O milliQ	RT	2 gg	99%
2	Fenoprofenolo	H <sub>2</sub> O milliQ	RT	3 gg	75%
3	ketoprofenolo	H <sub>2</sub> O milliQ	RT	2 gg	60%
4	ketoprofendiolo	H <sub>2</sub> O milliQ	RT	3 gg	90%
5	Naprossenolo	H <sub>2</sub> O milliQ / MeCN 10%	RT	4 gg	0%
6	Naprossenolo	H <sub>2</sub> O milliQ / DMSO 30%	RT	3 gg	0%
7	Naprossenolo	H <sub>2</sub> O milliQ / DMSO 10%	RT	6 gg	0%
8	Naprossenolo	H <sub>2</sub> O milliQ + N(But) <sub>4</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.02 mmol)	RT	3 gg	0%
9	Naprossenolo	H <sub>2</sub> O milliQ + Triton X	RT	3 gg	90-100%
10	Naprossenolo	H <sub>2</sub> O milliQ / DMF 10%	RT	8 gg	70-80%
11	Naprossenolo	H <sub>2</sub> O milliQ / THF 10%	RT	8 gg	70-80%
12	Naprossenolo	H <sub>2</sub> O milliQ / Acetone 10%	RT	8 gg	70-80%
13	Flurbiprofenolo	H <sub>2</sub> O milliQ	RT	4 gg	35%
14	Flurbiprofenolo	H <sub>2</sub> O milliQ / DMSO 30%	RT	4 gg	80%
15	Flurbiprofenolo	H <sub>2</sub> O milliQ / DMSO 10%	RT	6 gg	90%
16	Flurbiprofenolo	H <sub>2</sub> O milliQ / DMSO 5%	RT	6 gg	70%
17	Flurbiprofenolo	H <sub>2</sub> O milliQ + Triton X	RT	2 gg	99%
18	Flurbiprofenolo	H <sub>2</sub> O milliQ + N(But) <sub>4</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.02 mmol)	RT	3 gg	0%

I migliori cosolventi sono stati la DMF, il THF e l'acetone al 10% per il naprossenolo (Tabella 15, entries 10-12) e il DMSO per il flurbiprofenolo (Tabella 5, entry 15). È interessante notare come il miglior risultato per entrambi sia in effetti stato ottenuto utilizzando il TRITON X-100, un surfattante non ionico (Tabella 15, entries 9 e 18).

Tuttavia gli acidi ottenuti non riuscivano ad essere separati dal surfattante se non probabilmente con una separazione su colonna a scambio ionico (una DOWEX).

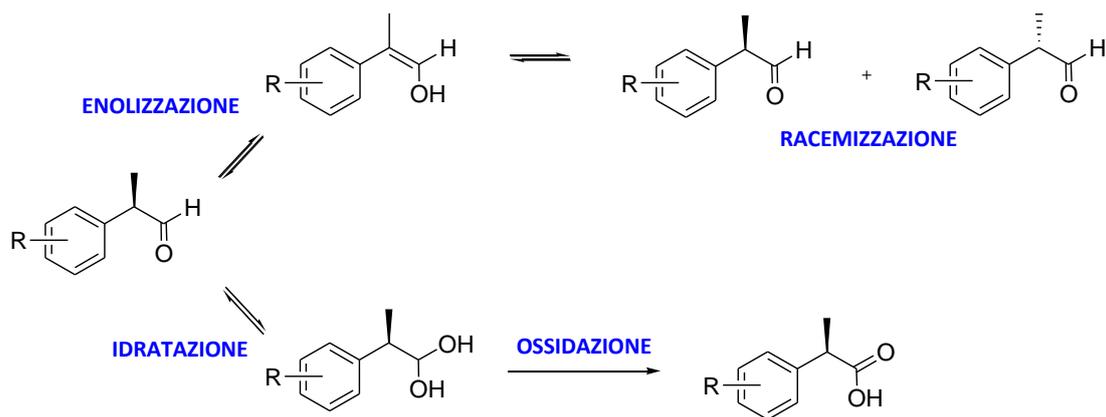
Per verificare la robustezza del protocollo così ottimizzato per ogni alcol aril propanoico, abbiamo deciso di effettuare uno scale up nelle condizioni migliori, partendo però dal profenolo enantiomericamente puro per verificare contemporaneamente la configurazione dell'acido ottenuto.

In tutte le prove effettuate è stato ottenuto l'acido in ottime rese e con eccessi enantiomerici sempre superiori al 99%.



Questo risultato ha dimostrato come il protocollo sia applicabile anche su quantità di alcol maggiore; inoltre soprattutto le condizioni di reazione non portano mai a fenomeni di racemizzazione, avendo l'unico enantiomero dell'acido ottenuto una configurazione identica all'alcol di partenza.

La racemizzazione è tanto più facile quanto più il pK del protone in  $\alpha$  del composto carbonilico è basso, in quanto la deprotonazione porta all'enolo, il quale può essere nuovamente protonato dalla faccia Re e Si. Nel nostro caso l'enolo che si forma è anche molto stabile termodinamicamente, essendo coniugato con l'anello aromatico. Nel nostro sistema sia l'aldeide che l'acido carbossilico possono enolizzare, ma l'aldeide ha un protone in  $\alpha$  più acido e racemizza più velocemente. La racemizzazione è molto più veloce a pH basici ma il pH dell'acqua milliQ è definibile come neutro ma progressivamente tende ad acido per via della formazione dell'acido carbossilico. Visto che l'acido che si forma è enantiomericamente puro sembra sperimentalmente dimostrato che non interviene alcun fenomeno di enolizzazione o avviene solo in una percentuale indeterminabile. L'aldeide intermedia quindi viene subito idratata e successivamente ossidata, invece di equilibrarsi con l'enolo e racemizzare.

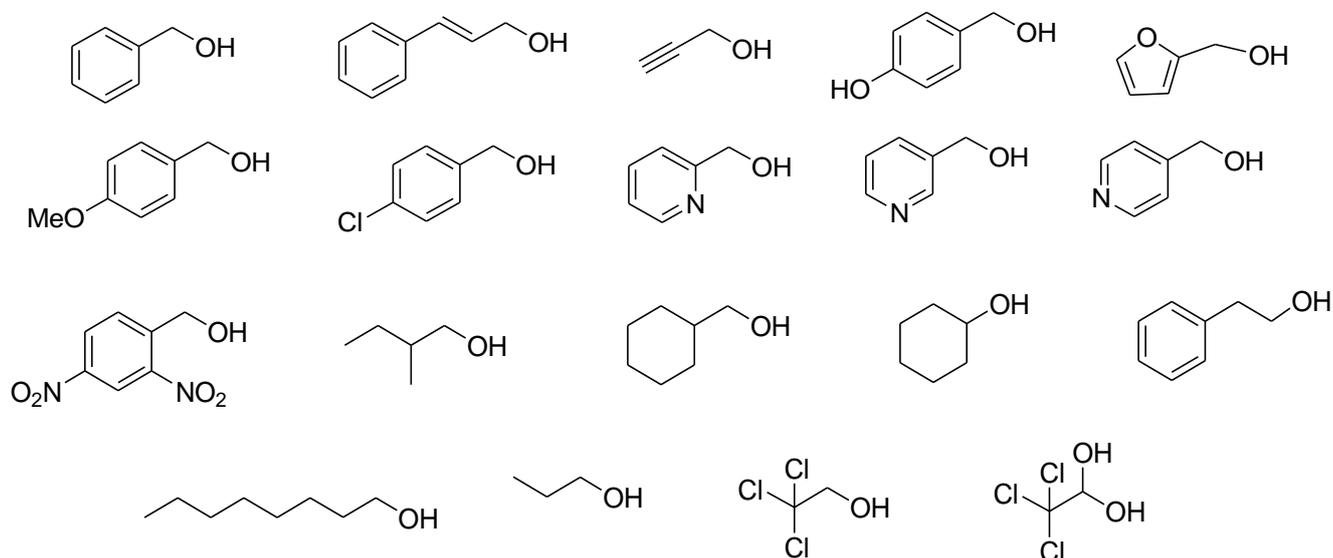


Gli ottimi risultati ottenuti con i Profeni ci hanno spinto ad estendere il protocollo alla ossidazione ad acido carbossilico di altri alcoli. L'utilizzo delle laccasi in letteratura nell'ambito delle ossidazioni, come precedentemente citato, propende per l'ossidazione di alcoli primari ad aldeidi e secondari a chetoni. Tuttavia il nostro protocollo sugli alcoli 2-aril propanoici sembra dimostrare che è possibile per gli alcoli primari anche ossidarsi ad acidi carbossilici. Se come dimostrato l'ossidazione delle aldeidi passa tramite l'idrato, sembra che la facilità con cui un'aldeide si idrati (definibile come  $pK_{HYD}$ ) sia la forza guida.

L'idratabilità di un centro carbonilico dipende da tre fattori:

- solubilità dell'aldeide in acqua (accesso cioè del gruppo carbonilico al "suo reagente");
- elettrofilia del centro carbonilico;
- ingombro sterico dei gruppi carbonilici.

Abbiamo quindi effettuato le nostre prove preliminari sui seguenti alcoli.



Gli unici alcoli che hanno portato alla formazione di acido sono stati il 2-4 dinitrobenzil alcol, i piridin metanoli e il 2-fenil etanolo. Tutti gli altri substrati non hanno reagito o hanno portato solamente alla formazione di aldeide. A tuttora è difficile interpretare e giustificare i risultati ottenuti e gli studi relativi a questo aspetto sono ancora in corso

---

## 2.5 Parte Sperimentale

### Parte sperimentale relativa al paragrafo 2.3.1

#### Procedura Generale per la riduzione enzimatica:

##### Metodo con NADH Stechiometrico

Into a vial equipped with a magnetic stirrer (double spinfin magnetic stirring bar) all reagents were added in the following order: 0.5 mL of a 5 mM solution of the starting aldehyde in CH<sub>3</sub>CN or THF, 0.5 mL of a 10 mM solution of NADH freshly prepared in 0.1M phosphate buffer (pH 7.5), 0.1M phosphate buffer (pH 7.5) to reach a total final volume of 5 mL and the chosen amount of enzyme from a freshly prepared solution in phosphate buffer. In the case of co-solvent absence, the aldehyde was directly added to the reaction mixture. In the case of enzymatic reductions in hexane, data were obtained by adding solid lyophilized cofactor together with lyophilized enzyme into the reaction vessel before adding the solvent mixture and the substrate. Et<sub>2</sub>O

##### Metodo con il riciclo del NADH

Into a vial equipped with a magnetic stirrer (double spinfin magnetic stirring bar) all reagents were added in the following order: 1.5 mL of a 5 mM solution of the starting aldehyde in CH<sub>3</sub>CN or THF, 0.45 mL of EtOH, 1.5 mL of a 0.1 mM solution of NADH freshly prepared in the appropriate 0.1 M buffer, 0.1M buffer to reach a total final volume of 15 mL and the chosen amount of enzyme from a freshly prepared solution in buffer. In the case of co-solvent absence, 2-arylpropanals were diluted in EtOH.

##### Metodo semipreparativo

Into a flask equipped with a magnetic stirrer were added in the following order: 0.5 mmol of the starting aldehyde **1a,c-d** in 10 mL of CH<sub>3</sub>CN, 3.4 mL of EtOH and phosphate buffer 0.1 M (pH = 8) to reach a final total volume of 100 mL. After 15 min NADH (0.01 mmol, 7.1 mg) and the enzyme (1 mg, 0.46 U/mg) were added to the solution. After 96 h the reactions were worked up by adding 1 g of solid NaCl to the aqueous phase and extracting 3 times with EtOAc (3 × 75 mL). The organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. Yields after flash chromatography (80/20 cyclohexane/ethylacetate). Oxidation to 2-arylpropionic acids is reported in the ESI. Formation of arylpropanols was monitored by inverse phase HPLC analysis: at different reaction times, aliquot samples were filtered, diluted and directly injected. Calibration curves obtained with pure arylpropanols (five dilutions, each in triplicate) were used for quantitative analysis. Enantiomeric ratios were determined by HPLC analysis on chiral columns.

#### **Sintesi delle aldeidi aril propioniche (1b-1f)**

##### Metodo 1 (Si considera come esempio generale la sintesi della ibuprofenale **1b**)

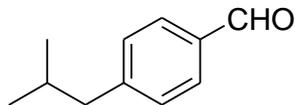
Racemic 2-(4-isobutylphenyl)-propanoic acid, Ibuprofen, (30 mmol, 6.2 g) was refluxed in EtOH (50 mL) in the presence of a catalytic amount of BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (0.5 mL). At disappearance of the starting carboxylic acid, the solvent was concentrated, the crude dissolved in EtOAc (50 mL) and washed with aqueous NaHCO<sub>3</sub>, the organic phase was concentrated furnishing ethyl 2-(4-isobutylphenyl)-propanoate in 80% yield. The ethyl ester (25 mmol, 5.9 g) was then dissolved in Et<sub>2</sub>O (100 mL) at -78°C, then iBu<sub>2</sub>AlH (1M solution in hexane, 36 mL, 36 mmol) was added dropwise. Conversion was followed by GC, at completion the reaction mixture was poured into a 2M aqueous solution of potassium sodium tartrate, diluted with Et<sub>2</sub>O (100 mL), vigorously shaken until phase separation and re-extracted with Et<sub>2</sub>O (3 × 50 mL). The combined organic phases were dried and concentrated under vacuum. **2b** is obtained as over-reduction-by-product in the same reaction. **1b** and **2b** can be easily separated by flash chromatography and were obtained in 65% and 15% yield respectively.

##### Metodo 2: (Si considera come esempio generale la sintesi della ibuprofenale **1b**)

Racemic 2-(4-isobutylphenyl)-propanoic acid, Ibuprofen, (10 mmol, 2.06 g) was dissolved in Et<sub>2</sub>O (50 mL) at 0°C, then the complex BH<sub>3</sub>·Me<sub>2</sub>S (49 mmol, 4.6 mL) was added dropwise. Conversion was followed by TLC, at completion the BH<sub>3</sub>·Me<sub>2</sub>S in excess was carefully quenched with H<sub>2</sub>O, NaOH 2N (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 50 mL) and concentrated affording **2b** in 98% yield. In a flask charged with a solution of oxalyl chloride (12 mmol, 1 mL) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) at -78°C, DMSO (22 mmol, 1.56 mL) was added dropwise. After 10 minutes **2b** (10 mmol, 1.9 g) was added and the mixture is stirred at -78°C for 1h

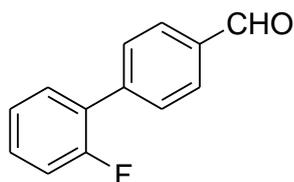
then TEA was added (40 mmol, 5.58 mL). Conversion was followed by TLC, the reaction was quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with NaHCO<sub>3</sub>. The organic phase was concentrated and **1b** was obtained after purification by flash-chromatography in 80% yield.

**2-(4-isobutylphenyl)-propanal (Ibuprofenal) 1b:** Obtained in 80% overall yields following method 1.



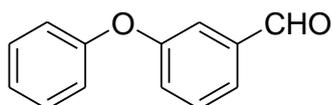
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.94 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 1.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH), 1.89 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 2.50 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.64 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH<sub>3</sub>CH), 7.10-7.21 (m, 4H, arom), 9.73 (s, 1H, CHO); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.3, 22.1, 29.9, 44.8, 52.3, 127.8, 129.5, 134.6, 140.6, 200.8; IR: ν = 3433, 2950, 1722; elemental analysis calcd (%) for C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O: C 82.06, H 9.53; found: C 82.01, H 9.58.

**2-(2-Fluoro-biphenyl-4-yl)-propionaldehyde (Flurbiprofenal) 1c.** Obtained in 70% overall yields following method 1.



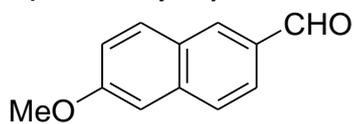
<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.51 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.70 (dq, *J* = 1.4, 7.4 Hz, 1H, CH), 7.01-7.11 (m, 2H, arom), 7.34-7.59 (m, 6H, arom), 9.73 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, CHO); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2, 51.1, 115.8 (d, *J*(C,F) = 27 Hz), 124.1 (d, *J*(C,F) = 3 Hz), 127.7, 127.9, 128.4, 128.7 (d, *J*(C,F) = 3 Hz), 131.1 (d, *J*(C,F) = 4 Hz), 135.1, 139.9 (d, 1C, *J*(C,F) = 8 Hz), 159.8 (d, 1C, *J*(C,F) = 248 Hz), 200.2; IR: ν = 3433, 3080, 3030, 1727; elemental analysis calcd (%) for C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>FO: C 78.93, H 5.74; found: C 78.92, H 5.81.

**2-(3-Phenoxy-phenyl)-propionaldehyde (Fenoprofenal) 1d.** Obtained in 65% overall yields following method



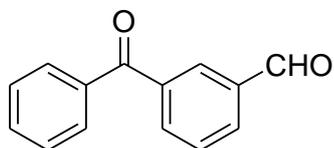
1. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.45 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.62 (dq, *J* = 1.2, 7.2 Hz, 1H, CH), 6.91-6.98 (m, 3H, arom), 7.03-7.06 (m, 2H, arom), 7.12-7.17 (m, 1H, arom), 7.33-7.40 (m, 3H, arom), 9.69 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, CHO); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.4, 52.7, 117.5, 118.5, 119.0, 122.9, 123.5, 129.7, 130.2, 139.6, 156.7, 157.9, 200.6; IR: ν = 3430, 3070, 3034, 1726, 1582, 1250; elemental analysis calcd (%) for C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>: C 79.62, H 6.24; found: C 79.71, H 6.28.

**2-(6-Methoxy-naphthalen-2-yl)-propionaldehyde (Naproxenal) 1e.** Obtained in 80% overall yield following



method 1. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.52 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.75 (dq, *J* = 1.0, 7.0 Hz, 1H, CH), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.14-7.30 (m, 3H, arom), 7.60 (s, 1H, arom), 7.69-7.77 (m, 2H, arom), 9.74 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, CHO); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.5, 52.8, 55.2, 105.6, 119.2, 126.6, 126.9, 127.6, 129.0, 129.1, 132.7, 133.8, 157.8, 201.0; IR: ν = 3350, 1720, 1606; elemental analysis calcd (%) for C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>: C 78.48, H 6.59; found: C 78.35, H 6.70.

**2-(3-Benzoyl-phenyl)-propionaldehyde (Ketoprofenal) 1f:** obtained in overall 50% yield following method 2.



<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.51 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.74 (dq, *J* = 1.0, 7.0 Hz, 1H, CH), 7.28-7.84 (m, 9H, arom), 9.74 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, CHO); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.7, 52.8, 128.4, 128.9, 129.3, 129.7, 130.1, 132.2, 132.7, 137.4, 138.3, 196.4, 200.5; IR: ν = 3400, 3060, 1730, 1658, 1596, 1317, 1281; elemental analysis calcd (%) for C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>: C 80.65, H 5.92; found: C 80.58, H 5.96.

### Ossidazione dei (2S)-arilpropanoli

#### Ossidazione di 2c e 2d

Solid KMnO<sub>4</sub> (0.52 mmol, 82 mg) was added to a solution of (2S) - (2-Fluoro-biphenyl-4-yl)-propan-1-ol **2c** obtained from enzymatic reduction (0.13 mmol, 30 mg) in acetone (1.5 mL) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N (1.5 mL) at 0°C under stirring. The solution was kept at 0°C for 4 more hours and at room temperature for 30 minutes. Conversion was followed by TLC. The reaction was diluted by adding 5 mL of HCl (1N) and solid Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> until the discolouring of the solution. The aqueous phase was extracted twice with EtOAc (2 x 10 mL), the organic phase was then extracted with a 2% NaOH solution (2 x 10 mL). The collected aqueous phase was acidified to pH 1 with HCl (2N) and extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 10 mL). The final organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo obtaining 15 mg of Flurbiprofen as a light yellow oil in 46% yield. [α]<sub>D</sub> = +37.2 (c = 1, CHCl<sub>3</sub>); lit. data of (S)- Flurbiprofen [α]<sub>D</sub>20

D = +42 (c = 1, CHCl<sub>3</sub>)<sup>200</sup>

#### Ossidazione di 2d

Solid KMnO<sub>4</sub> (0.88 mmol, 139 mg) was added to a solution of (2S)-2-(3-phenoxy-phenyl)-propan-1-ol **2d** obtained from enzymatic reduction (0.22 mmol, 50 mg) in acetone (2 mL) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N (2 mL) at 0°C under stirring. The solution was kept at 0°C for 4 more hours and at room temperature for 30 minutes. Conversion was followed by TLC. The reaction was diluted by adding 5 mL of HCl (1N) and solid Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> until the discolouring of the solution. The aqueous phase was extracted twice with EtOAc (2 x 10 mL), the organic phase was then extracted with a 2% NaOH solution (2 x 10 mL). The collected aqueous phase was acidified to pH 1 with HCl (2N) and extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 10 mL). The final organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuum obtaining 25 mg of Fenoprofen as a light yellow oil in 47% yield. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> D = +36.5 (c = 2, CHCl<sub>3</sub>); lit. data of (S)-Fenoprofen [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> D = +46 (c = 1, CHCl<sub>3</sub>)<sup>201</sup>

#### Determinazione dell'eccesso enantiomerico degli alcoli e assegnazione della configurazione del maggior stereoisomero

Enantiomeric ratios were determined by HPLC analysis on chiral columns. In the case of alcohols **2a**, **2b**, **2e** and **2f** the (S) configuration of the major isomer was established by direct comparison with commercial (S)-2-phenylpropanol or (S) alcohols, obtained by reduction with BH<sub>3</sub>.Me<sub>2</sub>S of the commercial (S) acids. For **2c** and **2d** the (S) configuration of the major isomer was established by converting the alcohols obtained in the semipreparative procedure into acids by oxidation with KMnO<sub>4</sub> and comparing the optical rotation with reported data.

#### HPLC chirale degli alcoli: condizioni

**2a-f** on Daicel chiral columns.

Rt(min) Rt (min) Column, hexane/iPrOH (0.5 mL/min)

**2a**) 13.2 (R) 15.6 (S) OF, 93/7 isocratic analysis

**2a**) 38.2 (R) 39.4 (S) OD, 99/1 isocratic analysis

**2b**) 10.6 (R) 11.9 (S) OF, 94/6 isocratic analysis

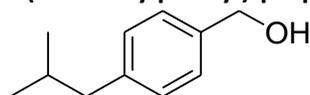
**2c**) 13.9 (S) 16.5 (R) OD, 89/11 isocratic analysis

**2d**) 22.1 (S) 23.9 (R) OF, 95/5 isocratic analysis

**2e**) 16.4 (S) 17.3 (R) OD, 94/6-80/20 in 30 min

**2f**) 43.6 (S) 44.8 (R) OF, 97/3-93/7 in 20 min then 60/40 in 50 min

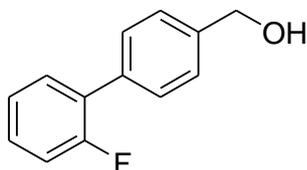
#### 2-(4-Isobutylphenyl)-propanol (Ibuprofenol) 2b.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.92 (d, J = 6.6, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 1.28 (d, J = 7.2, 3H, CH<sub>3</sub>CH), 1.4 (bs, 1H, OH), 1.86 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 2.46 (d, J = 7.2, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.93 (sextet, J = 7.2, 1H, CH), 3.70 (d, J = 7.2, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 7.10–7.17 (m, 4H, arom); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 17.5, 22.2, 30.0, 41.8, 44.8, 68.4, 127.0,

129.0, 139.6, 140.9; IR: ν = 3372, 1684, 1513, 1465; elemental analysis calcd (%) for C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O: C 81.20, H 10.48; found: C 81.15, H 10.52.

#### 2-(2-Fluoro-biphenyl-4-yl)-propan-1-ol (Flurbiprofenol) 2c.



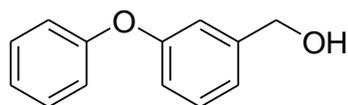
<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.34 (d, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.57 (bs, 1H, OH), 3.02 (sextet, J = 7.0, 1H, CH), 3.77 (d, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.05–7.16 (m, 2H, arom), 7.28–7.61 (m, 6H, arom); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 17.4, 41.9, 68.4, 114.9 (d, J(C,F) = 23), 123.5 (d, J(C,F) = 3), 127.2 (d, 1C, J(C,F) = 18), 127.5, 128.4, 128.9 (d, J(C,F) = 3), 130.7 (d, J(C,F) = 4), 135.7, 145.5 (d, 1C, J(C,F) = 7), 159.9 (d, 1C, J(C,F) = 247); IR: ν = 3373, 1023; elemental analysis calcd (%) for C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>FO: C 78.24,

H 6.57; found: C 78.19, H 6.56. (S)-**2c** obtained from semi-preparative enzymatic reaction: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> D = -11.5, (c = 2.6, CHCl<sub>3</sub>).

#### 2-(3-Phenoxy-phenyl)-propan-1-ol (Fenoprofenol) 2d.

<sup>200</sup> M. Allegretti, R. Bertini, M. C. Cesta, C. Bizzarri, R. Di Bitondo, V. Di Cioccio, E. Galliera, V. Berdini, A. Topai, G. Zampella, V. Russo, N. Di Bello, G. Nano, L. Nicolini, M. Locati, P. Fantucci, S. Florio, F. Colotta, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4312-4331

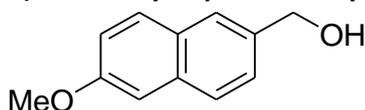
<sup>201</sup> L. Carde, D. H. Davies, M. R. Stanley, *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, **2000**, *15*, 2455 – 2464



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): *d* 1.30 (d, *J* = 7.2, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.4 (bs, 1H, OH), 2.97 (sextet, *J* = 7.2, 1H, CH), 3.72 (d, *J* = 7.2, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.89–7.19 (m, 6H, arom), 7.30–7.42 (m, 3H, arom); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): *d* 17.5, 42.2, 68.4, 116.7, 117.9, 118.8, 122.3, 123.2, 129.7, 145.9, 157.0, 157.4. IR: *n* = 3350, 1584,

1489, 1250; elemental analysis calcd (%) for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>: C 78.92, H 7.06; found: C 79.02, H 7.05. (*S*)-**2d** obtained from semi-preparative enzymatic reaction: [*α*]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -10.0 (*c* = 2.4, CHCl<sub>3</sub>).

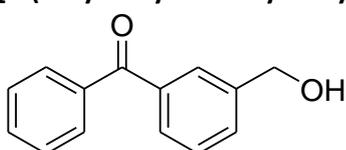
### 2-(6-Methoxy-naphthalen-2-yl)-propan-1-ol (Naproxol) 2e.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): *d* 1.38 (d, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>CH), 1.4 (bs, 1H, OH), 3.11 (sextet, *J* = 7.0, 1H, CH), 3.70 (d, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.14–7.28 (m, 2H, arom), 7.34–7.40 (m, 1H, arom), 7.63–7.76 (m, 3H, arom); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): *d* 17.6, 42.4, 55.3, 68.6, 105.6, 118.9, 125.9,

126.3, 126.2, 127.2, 129.1, 133.5, 138.7, 157.5; IR: *n* = 3300, 1604, 1028; elemental analysis calcd (%) for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>: C 77.75, H 7.46; found: C 77.91, H 7.51.

### [3-(2-Hydroxy-1-methyl-ethyl)-phenyl]-phenyl-methanone (Ketoprofenol) 2f.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): *d* 1.35 (d, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>CH), 1.4 (bs, 1H, OH), 3.07 (m, 1H, CH), 3.79 (d, *J* = 6.6, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.44–7.86 (m, 9H, arom); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): *d* 17.6, 42.3, 68.5, 128.3, 128.4, 128.6, 128.9, 130.0, 131.7, 132.4, 137.6, 137.8, 144.2, 196.8; elemental analysis calcd (%) for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>: C 79.97, H 6.71; found: C 80.05, H 6.69.

## Parte Sperimentale relativa al paragrafo 2.3.2

### Biologia

#### Materials, strains, vectors and culture conditions

All chemical reagents, unless otherwise stated, were purchased as analytical grade from Sigma-Aldrich or TCI and used without further purification. Aldehydes were commercial or prepared as reported. Alcohols were commercial or prepared from the corresponding aldehydes by reduction with NaBH<sub>4</sub> in methanol. All spectra were consistent with reported data. NAD<sup>+</sup> was purchased from Apollo Scientific Ltd, Stockport, U.K. Staining and de-staining was performed using the Stain/DeStain-Xpress protein detection kit (Enzolve Technologies., Ltd., Ireland). *E. coli* BL21 competent cells were purchased from Novagen (Germany). Transformed *E. coli* strains were generally cultured in Luria-Bertani (LB) agar and in LB broth, both containing ampicillin (100 μg/mL) at 37°C, shaking at 250 rpm. *E. coli* strains harbouring a pRSETb-EqADH-E vector were cultured in PG (minimal media) agar and in Auto Induction broth, both containing ampicillin (100 μg/mL) at 37°C, shaking at 250 rpm. 46 Sepabeads EC-EP/S were kindly donated by Resindion SRL (Binasco, Milan, Italy). Morphological investigation was carried out with a Philips XL-20 Scanning Electron Microscope operating at 15kV coupled with Energy-Dispersive X-ray Spectrometer. Samples were air-dried, then sputter-coated with carbon 60s prior to examination.

#### Expression and purification of His-HLADH-EE

His-HLADH-EE gene inserted in vector pRSETb was expressed and the protein purified as previously reported.<sup>202</sup> Crude protein concentration was determined by Bradford protein assay dye reagent (Bio-Rad Laboratories GmbH, Germany) with bovine serum albumin as a standard. Pure protein concentrations were determined by UV absorption at 280 nm using the absorbitivity reported in the literature (0.441 mL/(mg cm) for His-HLADH-EE)<sup>203</sup>

#### Immobilizzazione dell'enzima HLADH su biglie di vetro:

1) Lavaggio biglie: Lavare le biglie di vetro da 0.5 mm di diametro con una soluzione di NH<sub>3</sub> 30% v/v, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v, H<sub>2</sub>O in rapporto 1:1:4 a temperatura ambiente, filtrarle e sciacquarle con acqua Milli-Q. Metterle a reagire con una soluzione di HCl 30% v/v, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v, H<sub>2</sub>O in rapporto 1:1:4, e scaldare la miscela a 85-90°C per 1 ora. Al termine, lasciare raffreddare la miscela, filtrare le biglie, sciacquarle abbondantemente con acqua Mill-Q ed asciugarle a 50°C sotto vuoto. (In caso di stoccaggio tenere le palline in frigo in etanolo). 2) Procedura generale per la sililazione delle biglie. Pesare la quantità di palline desiderate, per es. 2

<sup>203</sup> Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**; 72:248-254.

---

grammi. Sotto azoto, in un pallone a 2 colli mettere 5 ml di toluene anidro ed aggiungere in successione 100 µl di γ-APTES (γ-amminotrimetossisilano) e le biglie. Lasciare sotto agitazione e a riflusso la reazione per 18-24 ore. Al termine, lasciare raffreddare, filtrare le palline e lavarle con toluene. Anidrificare sotto vuoto a 110°C per circa 3 ore per completare la sililazione. In caso di stoccaggio, lasciare le palline in frigo immerse in metanolo (stabili per 15-20 giorni); 3) Procedura generale per l'attacco amidico tra le biglie e l'anidride succinica. Prendere 2 gr di palline di vetro e metterle in un pallone a due colli, sotto azoto. Aggiungere 2 ml di diossano anidro. Sotto agitazione, gocciolare 200 mg di anidride succinica in 2 ml di diossano e scaldare la reazione per 60 minuti a 80°C. Lasciare raffreddare (l'anidride succinica non reagita dovrebbe riprecipitare raffreddando) e filtrare le biglie e lavarle con CH<sub>3</sub>CN per togliere l'anidride non reagita. Lasciare le palline filtrate in frigo (usarle entro pochi giorni); 4) Procedura di coupling enzimatico: Prelevare la quantità voluta di palline (es. 200 mg) e metterle in una fiala. Pesare 2.0 mg di EDC e scioglierla in 1 ml di tampone pH 5, 0.1M. Aggiungere immediatamente la carbodimide alle palline e sonicare la miscela a temperatura ambiente per 30 minuti. Filtrare le palline e lavarle più volte con la soluzione tampone. Mettere le palline in una nuova fiala ed aggiungere la soluzione di enzima in buffer preparato precedentemente (per es. 1 ml di soluzione per 200 mg di palline). Sonicare la reazione per 30 minuti tenendo il bagno sonicante intorno ai 4-10°C. Prelevare la soluzione e travasarla in una eppendorf per le misure successive ed aggiungere una quantità nota di buffer (es. 1 ml) alle palline, sciacquare e travasare il liquido in una nuova eppendorf (per prelevare completamente l'enzima che non si è attaccato).

#### Immobilizzazione su Resina Stratosfere® dell'enzima His-HLADH-EE

100 mg di resina (circa 0.5 mmol) vengono sospesi in 15 mL di acqua milliQ e successivamente vengono aggiunti 3 equivalenti di sale; il tutto viene lasciato ad agitare su orbital shaker a 120 rpm per 24 ore. La resina viene poi accuratamente lavata e si procede al coupling enzimatico mettendola in contatto con una soluzione di His-HLADH-EE.

Resina derivatizzata:

100 mg di resina (circa 0.5 mmol) vengono sospesi in 15 mL di Metanolo e vengono aggiunti 1.1 equivalenti di aldeide salicilica. Dopo 4 ore, il metanolo viene separato, viene aggiunta acqua milliQ (15 mL) e successivamente vengono aggiunti poi 3 equivalenti di sale; il tutto viene lasciato ad agitare su orbital shaker a 120 rpm per 24 ore. La resina viene poi accuratamente lavata e si procede al coupling enzimatico mettendola in contatto con una soluzione di His-HLADH-EE.

#### Immobilizzazione su Resina Epossidica trattata dell'enzima His-HLADH-EE

If not otherwise stated, the following procedure was adopted. Sepabeads EC-EP/S were derivatized with iminodiacetic acid (IDA) and CoCl<sub>2</sub> following the procedure reported in literature by Guisan, allowing a modification of around 5% of the epoxy-groups in the support<sup>204</sup> 211 g of beads was shaken at room temperature for two hours in 2 mL of support modification buffer (0.1 M sodium borate, 2 M iminodiacetic acid, pH 8.5). The derivatized resin, rinsed with double distilled water, was then resuspended in 5 mL of metal containing solution (0.05 M sodium phosphate buffer pH 6.0, 1.0 M NaCl and 5 mg/mL of CoCl<sub>2</sub>) and shaken at room temperature for 2 hours. The resin, rinsed again with double distilled water, was then put in contact with His-HLADH-EE (1 mg of enzyme per 1 g of resin, if not otherwise stated) and the mixture was gently shaken at room temperature over 24 hours. The resin was then thoroughly washed using a desorption buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM EDTA, 0.5 M NaCl, pH 7.4, as per IMAC purification procedure)(Quaglia et al., 2012) and water to achieve complete removal of the cobalt first and of the residual EDTA after. The un-reacted epoxides were neutralised using a blocking buffer (3 M glycine, pH 8.5, 4 mL per g of beads) over 20 hrs at room temperature, with gentle shaking. The immobilized enzyme was thoroughly washed and routinely stored in buffer (Tris-HCl, pH 8.5). To achieve immobilization using different metals the following salts were used: NiCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O (5 mg/mL, 5 mL for 1 g of beads, allowing a 2hrs contact with the derivatized beads). The metal solutions were prepared using buffer 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0. Immobilization has been performed on purified enzyme, if not otherwise stated.

#### Saggi di attività

Spectrophotometric activity measurements were based on the substrate-dependent absorbance change of NADH at 340 nm and routinely done in reaction mixtures (1 mL for the soluble enzyme and 5 mL for the immobilized) at 25 °C, using a Varian Cary 50 Scan UV-visible spectrophotometer equipped with a Cary single cell Peltier temperature controller. For the immobilized enzyme the reaction mixture was shaken at 25 °C,

---

<sup>204</sup> Pessela BCC, Mateo C, Carrascosa AV, Vian A, García JL, Rivas G, Alfonso C, Guisan JM, Fernández-Lafuente., *Biomacromolecules* **2003**; 4:107-113.

---

250 rpm and the absorbance at 340 nm was recorded every minute as single readings. To test the recyclability of the enzyme after each cycle (9 minutes in total duration) the resin was washed thoroughly with buffer and a new reaction was set up. Unless otherwise stated, the reaction mixture for the oxidative step contained NAD<sup>+</sup> (1 mM), ethanol (4 mM), enzyme sample (appropriate amount) and up to 1 mL of 0.1 M sodium pyrophosphate buffer, pH 8.8. The buffer was equilibrated at 25 °C prior to the assay. One unit of HLADH corresponded to the amount of enzyme required to reduce 1 μmol of NAD<sup>+</sup> per min at 25 °C. For the pH stability test the following buffers were used: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer pH 6.5, 50 mM Tris-HCl pH 8.5. To investigate the optimum pH of reaction the following buffers were used: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer pH 6.5, 7.5, 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.5, 0.1 M pyrophosphate buffer or 50 mM Glycine-NaOH buffer pH 8.8, 50 mM Glycine-NaOH buffer pH 9.5, 10.5, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH buffer pH 11.0, 11.5. 50 mM Glycine-NaOH buffer, 50 mM KCl-NaOH buffer pH 12.5.

pH 9.5 was used to investigate the optimum reaction temperature and temperatures between 25 and 55 °C were tested. The pH values of the buffers were always adjusted at the temperature at which the experiment was carried out. To test the stability at different solvents the enzymes were incubated in 10 (free enzyme) and 20 % (free and immobilized enzymes) of solvent (CH<sub>3</sub>CN, THF, DMSO and methanol were used) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 buffer. The activity was recorded at time zero and after 24 hours in the usual conditions. To test the inactivation upon contact with metals, the enzyme was incubated at room temperature for 24 hours in a 3.5 mM metal solution (maximum concentration if total leaching occurred). Samples with different metals (CoCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub> and CuSO<sub>4</sub>) were checked for activity over 24 hours and compared to a control sample.

## **Chimica**

### **General procedure for enzymatic reduction of aldehydes**

#### **Metodo A**

Into a vial stirred on an orbital shaker (140 rpm) all reagents were added in the following order: 0.5 mL of a 5mM solution of the starting aldehyde in CH<sub>3</sub>CN, 0.146 mL of EtOH, 0.5 mL of a 0.1 mM solution of NADH freshly prepared in the appropriate 0.1 M buffer, 0.1 M buffer to reach a total final volume of 5 mL and the chosen amount of enzyme.

#### **Metodo B:**

Biphasic system: into a vial stirred on an orbital shaker (140 rpm) all reagents were added in the following order: 2.5 mL of a 5 mM solution of the starting aldehyde in the organic solvent, 0.146 mL of EtOH, 0.5 mL of a 0.1 mM solution of NADH freshly prepared in the appropriate 0.1 M buffer, 0.1 M buffer to reach a total final volume of 5 mL and the chosen amount of enzyme.

#### **Immobilized enzyme recycling.**

Into a vial stirred on an orbital shaker (140 rpm) all reagents were added in the following order: 0.5 mL of a 5mM solution of the starting aldehyde in CH<sub>3</sub>CN, 0.146 mL of EtOH, 0.5 mL of a 0.1 mM solution of NADH freshly prepared in the appropriate 0.1 M buffer, 0.1 M buffer to reach a total final volume of 5 mL and the chosen amount of enzyme. After the conversion of the starting aldehyde the solution was removed and the enzyme was gently washed with the same buffer (3 x5 mL). The enzyme was reused for the reaction with the same starting conditions.

## **Analisi dei prodotti**

Formation of arylpropanols and alcohols was monitored by reverse phase HPLC or GC-FID analysis: at different reaction times, aliquot samples were filtered, diluted and directly injected.

*Method 1:* reverse phase HPLC on Agilent Technology HP1100, column ZORBAX-Eclipse XDB-C8 5 μm, 4.6 x 150 mm Agilent Technologies. The compounds were eluted with CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O, flux 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Method 1,: 50% of CH<sub>3</sub>CN and 50% of H<sub>2</sub>O in 25 min.

*Method 2:* reverse phase HPLC on Agilent Technology HP1100, column ZORBAX-Eclipse XDB-C8 5 μm, 4.6 x 150 mm Agilent Technologies. Elution program from 70% to 100% of CH<sub>3</sub>CN in 15 min, then 100% of CH<sub>3</sub>CN for 10 min T = 30 °C: *Method 3,* for alcohols **2i** and **2h**, GC-FID Agilent Technologies 6890 using gradient from 50° to 280°C over 30 min, column HP5 5%Ph-Me silicon.

Calibration curves (five dilutions, each in triplicate) were used for quantitative analysis of arylpropanols, while for the other alcohols the reaction was evaluated by the disappearing of the starting aldehyde.

Enantiomeric ratios of 2-arylpropanols were determined by HPLC analysis on chiral columns.

## **Parte Sperimentale relativa al capitolo 2.4.1**

## Procedure Generali per l'ossidazione degli arilpropanoli 2a-h a acidi 4a-f

### Metodo di ossidazione con KMnO<sub>4</sub>

Solid KMnO<sub>4</sub> (0.88 mmol, 139 mg) was added to a solution of (2S)-phenyl-propanol **1a** in acetone (2 mL) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N (2 mL) at 0 °C under stirring. The solution was kept at 0 °C for 4 more hours and at r.t. for 30 min. Conversion was followed by TLC. The reaction was diluted by adding 5 mL of HCl (1 N) and solid Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> until the discoloring of the solution. The aqueous phase was extracted twice with EtOAc (2 × 10 mL), the organic phase was then extracted with a 2% NaOH solution (2 × 10 mL). The collected aqueous phase was acidified to pH 1 with HCl (2 N) and extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 10 mL). The final organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuum obtaining acid **2a** in 36% yield.

### Metodo di ossidazione con la procedura di Noyori

In a round-bottom flask fitted with a water condenser the following reagents were added: alcohol (3.65 mmol, 0.5 mL), Aliquat 138 (2%, 0.07 mmol, 29 mg), KHSO<sub>4</sub> (2%, 0.07 mmol, 20 mg), Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O (2%, 0.07 mmol, 24 mg), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mL, 30% soln). The solution was kept at 90 °C, and the reaction progress was followed by GC. The solution was then cooled to r.t. and 10 mL of a 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq solution were added followed by extraction with EtOAc (2 × 10 mL). After concentration in this organic phase unreacted alcohol and byproducts could be isolated. The aqueous phase were then acidified with diluted HCl until pH 2 and re-extracted with EtOAc (2 × 10 mL). After evaporation pure acid could be obtained.

### Metodo di ossidazione di Zhao

To a stirred solution of alcohol **1a-h** (0.4 mmol) in MeCN (2 mL) the following reagents were added: a solution of NaClO<sub>2</sub> (0.8 mmol, 85 mg) in H<sub>2</sub>O (0.4 mL), TEMPO (0.008 mmol), 0.67 M phosphate buffer pH 6.7 (1.5 mL), and a solution of commercial household bleach (5.25% in NaClO, 10.6 mL) in H<sub>2</sub>O (0.2 mL). The temperature was maintained at the values reported in Table 2 with a silicon oil bath. The conversion was monitored by TLC and further portions of TEMPO/NaClO/NaClO<sub>2</sub> (0.008:0.4:0.008 mmol ratios) were eventually added as reported in the Tables. When the reaction was complete (TLC monitoring) it was quenched at 0 °C by adding H<sub>2</sub>O (3 mL), aq sat. solution of NaHCO<sub>3</sub> till pH 8 and Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (1.4 mmol, 183 mg). After a 30 min stirring, EtOAc (2 mL) was added, and the solution was stirred for further 15 min. The organic layer was separated and discharged. HCl (1 N) was then slowly added at 0 °C till pH 2 to the aq solution which was then extracted with EtOAc (2 × 5 mL). The collected organic phases were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo to afford 2-arylpropionic acids pure by HPLC or NMR analysis.

### **Eccessi enantiomerici degli acidi 4a-f ottenuti**

Enantiomeric ratios of acids **2a-h** were determined by HPLC analysis on chiral columns, configuration of the major isomer was established by direct comparison with commercial products or by comparing the optical rotation with reported data.

**4a)** t<sub>R</sub> = 5.5 min (R), 6.0 min (S), Daicel AD, hexane-*i*-PrOH (92:8), TFA 0.1%, 1 mL/min.

**4b)** t<sub>R</sub> = 7.9 min (R), 8.9 min (S), Daicel OD, hexane-*i*-PrOH (98:2), TFA 0.1%, 1 mL/min.

**4c)** t<sub>R</sub> = 6.2 min (R), 8.0 min (S), Daicel AD, hexane-*i*-PrOH (90:10), TFA 0.1%, 1 mL/min.

**4d)** t<sub>R</sub> = 6.8 min (R), 8.0 min (S), Daicel AD, hexane-*i*-PrOH (90:10), TFA 0.1%, 1 mL/min.

**4e)** t<sub>R</sub> = 10.8 min (R), 11.8 min (S), Daicel AD, hexane-*i*-PrOH (90:10), TFA 0.1%, 1 mL/min.

**4f)** t<sub>R</sub> = 12.9 min (R), 15.3 min (S), Daicel AD, hexane-*i*-PrOH (90:10), TFA 0.1%, 1 mL/min.

### **Parte Sperimentale relativa al capitolo 2.4.2**

#### **Ossidazione del 2-fenilpropanolo 2a ad acido 4a**

To a stirred solution of the chiral alcohol (1 mmol) in the appropriate solvent (10 mL) in a 50 mL flask were added TEMPO (0.2 mmol), and the enzyme (10 mg) and then O<sub>2</sub> was bubbled for 30 seconds. The solution was stirred on an orbital shaker at 150 rpm, kept at room temperature and the reaction was monitored by TLC. When the reaction was complete an aqueous saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> at 0° C was added to the flask and 20 mL of DCM. The organic layer was separated and discharged then HCl (1N) was then slowly added at 0 °C till pH 2 to the aqueous solution which was then extracted with DCM (3x15 mL). The collected organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo to afford 2-arylpropionic acids pure by NMR analysis and chiral HPLC.

#### **Ossidazione degli alcoli 2b-f ad acidi 4b-f**

To a stirred solution of the chiral alcohol (1 mmol) in the appropriate solvent (20 mL) in a 50 mL flask were added TEMPO (0.2 mmol), and the enzyme (20 mg) and then O<sub>2</sub> was bubbled for 30 seconds. The solution

---

was stirred on an orbital shaker at 150 rpm, kept at room temperature and the reaction was monitored by TLC. When the reaction was complete an aqueous saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  at  $0^\circ\text{C}$  was added to the flask and 20 mL of DCM. The organic layer was separated and discarded then HCl (1N) was then slowly added at  $0^\circ\text{C}$  till pH 2 to the aqueous solution which was then extracted with DCM (3x15 mL). The collected organic phases were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated in vacuo to afford 2-arylpropionic acids pure by NMR analysis and chiral HPLC.

## 3

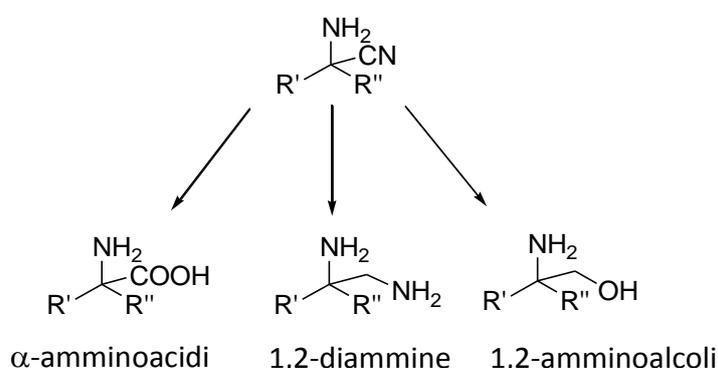
# $\alpha$ -Amminonitrili

### 3.1 $\alpha$ -Amminonitrili: reattività e sintesi

Gli  $\alpha$ -amminonitrili sono precursori versatili per la sintesi di molte molecole tra cui  $\alpha$ -amminoacidi<sup>205</sup>, 1,2-diammine, 1,2-amminoalcoli e molti altri composti contenenti l'atomo di azoto.

L'importanza di questi composti deriva dal loro carattere bifunzionale, la presenza cioè del gruppo amminico e del gruppo ciano. Questa caratteristica ha portato gli  $\alpha$ -amminonitrili ad essere grande oggetto di studio e a classificarsi come intermedi sintetici importanti nella preparazione di diverse tipologie di. L'interesse della ricerca si è quindi focalizzato sulle strategie di sintesi degli  $\alpha$ -amminonitrili, soprattutto però come precursori di nuovi  $\alpha$ -amminoacidi.

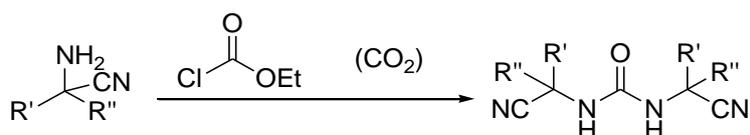
Tali molecole subiscono le reazioni tipiche delle ammine e dei nitrili in generale e qualora entrambi i gruppi funzionali siano suscettibili della stessa reazione è necessario, dove possibile, ricorrere all'ausilio di opportuni gruppi protettori.



#### 3.1.1 Reazioni degli $\alpha$ -amminonitrili

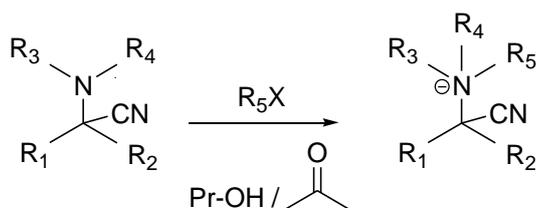
##### a) *N*-acilazione<sup>206</sup>

Gli  $\alpha$ -amminonitrili primari e secondari subiscono la *N*-acilazione in presenza di un agente acilante. Un esempio di impiego è rappresentato dalla sintesi di uree simmetriche per trattamento di un  $\alpha$ -amminonitrile primario con etilcloroformiato o diossido di carbonio:



##### b) *N*-alchilazione

L'atomo di azoto degli  $\alpha$ -amminonitrili può essere alchilato per reazione con gli alogenuri alchilici. Un esempio è la quaternarizzazione di un  $\alpha$ -amminonitrile terziario:



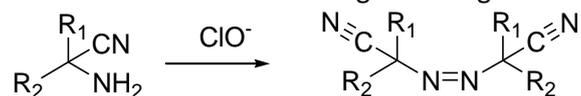
<sup>205</sup> C. Najera, J. M. Sansano, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4584; A. Perdih, M. S. Dolenc, *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 801.

<sup>206</sup> Shafran, Y. M.; Bakulev, V. A.; Mokrushin, V. S. "Synthesis and properties of  $\alpha$ -aminonitriles". *Russ. Chem. Rev.*, **1989**, *58* (2), 148-162; Opatz, T. "The chemistry of Deprotonated  $\alpha$ -Aminonitriles". *Synthesis*, **2009**, *12*, 1941-1959; D. Enders, J. P. Shilvock, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 359-373.

La reazione tra le ammine primarie o secondarie e gli alogenuri alchilici non è utilizzata spesso in quanto il problema della polialchilazione porta alla formazione di miscele di ammine e sali di ammonio con diversi gradi di alchilazione dell'azoto.

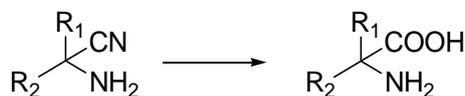
### c) Reazioni con agenti ossidanti

Le ammine primarie trattate con il perossido di idrogeno, i perossiacidi o altri agenti ossidanti, sono ossidate in sequenza ad idrossilammine, a nitroso composti ed a nitro composti. Le ammine secondarie e terziarie sono ossidate rispettivamente ad idrossilammine secondarie ed a ossidi. L'ossidazione degli  $\alpha$ -amminonitrili primari con gli ipocloriti dei metalli alcalini in un solvente organico dà gli azobisnitrili.

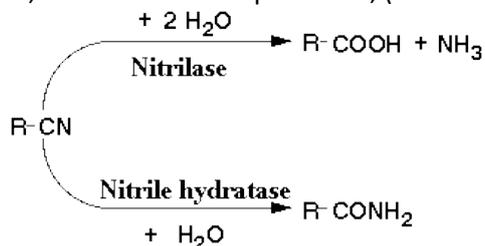


### d) Idrolisi del gruppo CN

La reazione sicuramente più importante degli  $\alpha$ -ammino nitrili è l'idrolisi del gruppo ciano ad acido carbossilico con l'ottenimento di  $\alpha$ -amminoacidi. Questo procedimento rappresenta sicuramente una delle più importanti applicazioni sintetiche di queste molecole.



La reazione è generalmente condotta in soluzione acquosa (sia acida che basica) ma nel caso in cui la molecola contenga altri gruppi suscettibili di idrolisi, si deve optare per una scelta più opportuna. E' possibile inoltre modulare le condizioni di reazione in modo fermare l'idrolisi del gruppo nitrile ad ammine. La biocatalisi offre interessanti soluzioni relative all'idrolisi dei nitrili: l'enzima nitrilasi<sup>207</sup> (EC: 3.5.5.1), idrolizza il nitrile ad acido; la nitrile idratasi<sup>208</sup>, enzima cobalto dipendente, (EC: 4.2.1.84) ad ammine.



Entrambi gli enzimi sono noti in letteratura per le loro applicazioni su molecole contenenti il gruppo CN tra cui appunto gli  $\alpha$ -amminonitrili.

### e) Reazioni con agenti riducenti

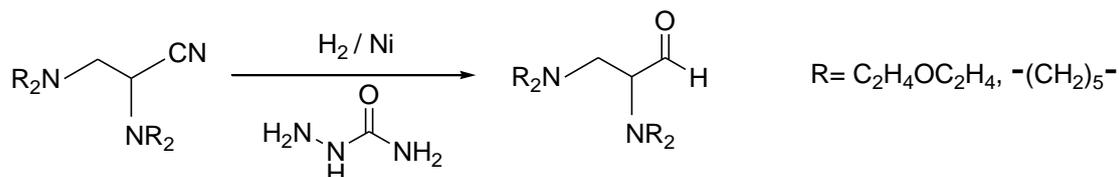
La riduzione di un  $\alpha$ -amminonitrile con idrogeno su nichel Raney, platino o palladio, o con litio alluminio idruro in un solvente etereo anidro dà origine ad una 1,2 diammina:



<sup>207</sup> Singh, R., Sharma, R., Tewari, N., Geetanjali and Rawat, Diwan S. (2006), Nitrilase and Its Application as a 'Green' Catalyst. Chemistry & Biodiversity, 3: 1279-1287.

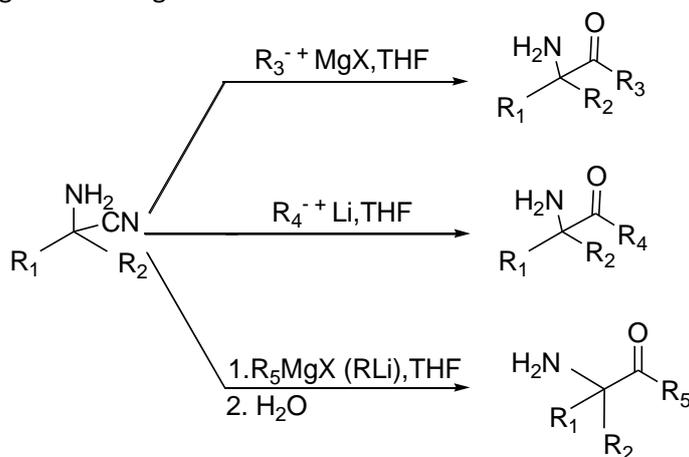
<sup>208</sup> Y. Shen, F. Du, W. Gao, A. Wang and C. Chen, African Journal of Microbiology Research Vol. 2012, 6(32), pp. 6114-6121.

Un'eccezione allo schema generale delle reazioni degli  $\alpha$ -amminonitrili con gli agenti riducenti è rappresentata dall'idrogenazione su nichel Raney dei composti sotto riportati in presenza di semicarbazide che dà  $\alpha$ -amminoaldeidi:



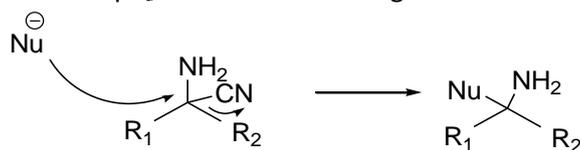
#### f) Reazioni con reagenti organometallici

La reazione degli  $\alpha$ -amminonitrili con composti organometallici quali i reattivi di Grignard e gli organolitio porta alla formazione di  $\alpha$ -amminochetoni tramite un meccanismo di addizione-eliminazione. Il prodotto più comune è però un'ammina ottenuta per sostituzione nucleofila del gruppo ciano da parte del carbanione. Il rapporto tra l' $\alpha$ -amminochetone e l'ammina aumenta, ad esempio, se l' $\alpha$ -amminonitrile è molto sostituito o se presenta sostituenti ingombranti legati all'azoto amminico.



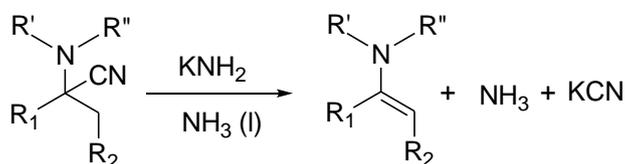
#### g) Sostituzione nucleofila del gruppo ciano

Gli  $\alpha$ -amminonitrili possono subire reazioni di sostituzione nucleofila del gruppo ciano. Il gruppo infatti è un buon gruppo uscente, se considerato il pK<sub>a</sub> del suo acido coniugato



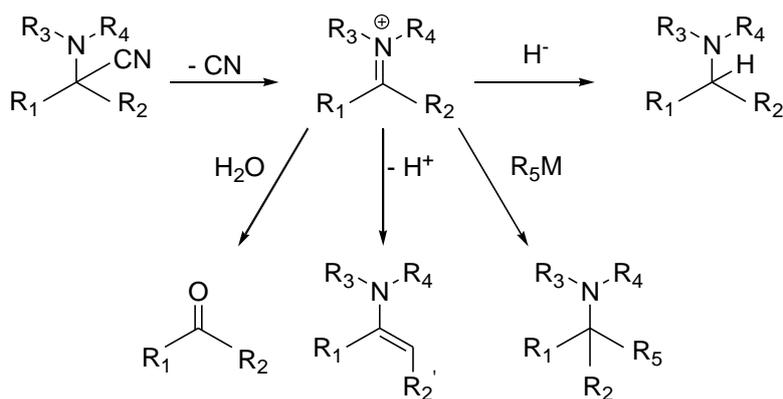
#### h) Reazioni di eliminazione

Gli  $\alpha$ -amminonitrili possono dare reazioni di eliminazione ed un esempio è la  $\beta$ -eliminazione di HCN che dà enammine:



#### f) Mobilizzazione dello ione cianuro

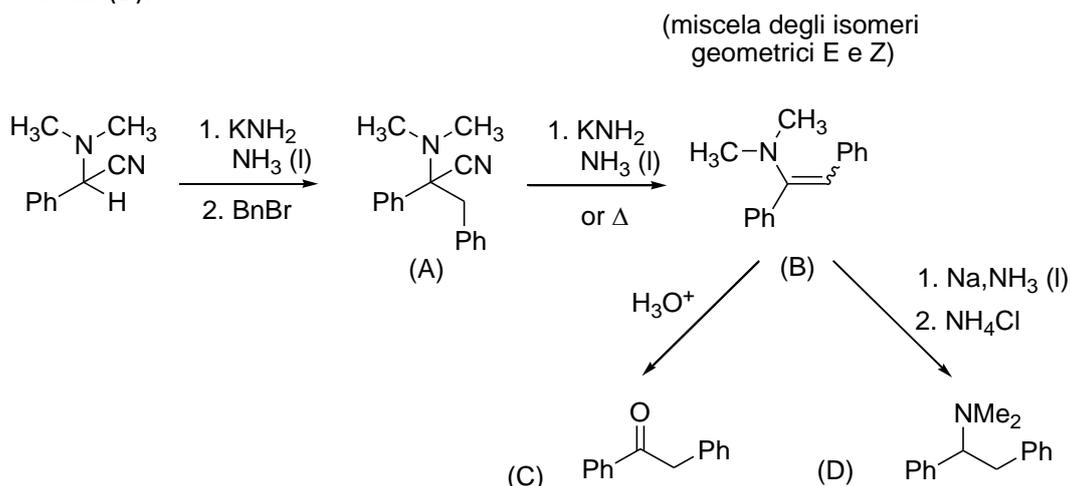
La mobilizzazione dello ione cianuro negli  $\alpha$ -amminonitrili è promosso dalla donazione del doppietto elettronico dell'azoto amminico e dà origine ad uno ione immonio, l'intermedio dal quale è possibile ottenere alcuni tra i diversi prodotti citati in precedenza oltre che i composti carbonilici di origine nei metodi retrosintetici:



f) Acidità degli  $\alpha$ -amminonitrili

Il protone in  $\alpha$  ad un nitrile possiede un certo carattere acido; infatti se gli  $\alpha$ -amminonitrili con almeno un idrogeno in  $\alpha$  sono trattati con basi in grado di strappare il protone si generano i corrispondenti anioni che sono largamente impiegati nella sintesi come equivalenti sintetici di acil anioni ed  $\alpha$ -amminocarbonioni.

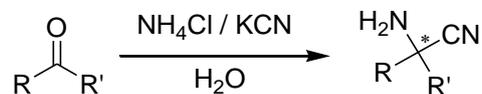
Una possibile applicazione in tale senso risale ad uno studio compiuto sull' $\alpha$ -(dimetilammino)fenilacetone nitrile. L' $\alpha$ -amminonitrile di partenza è  $\alpha$ -alchilata previo trattamento con sodio ammido in ammoniaca seguito da addizione di bromuro di benzile. L'intermedio così ottenuto (A) subisce una eliminazione di HCN base-indotta con formazione dell'enammina (B) che può poi essere ridotta ad ammina (C) o idrolizzata a chetone in ambiente acido (D).



La capacità di donare elettroni del gruppo amminico- $N(CH_3)_2$  favorisce l'allontanamento dello ione cianuro per riscaldamento, motivo per il quale l'enammina può essere anche ottenuta per distillazione dell' $\alpha$ -amminonitrile A.

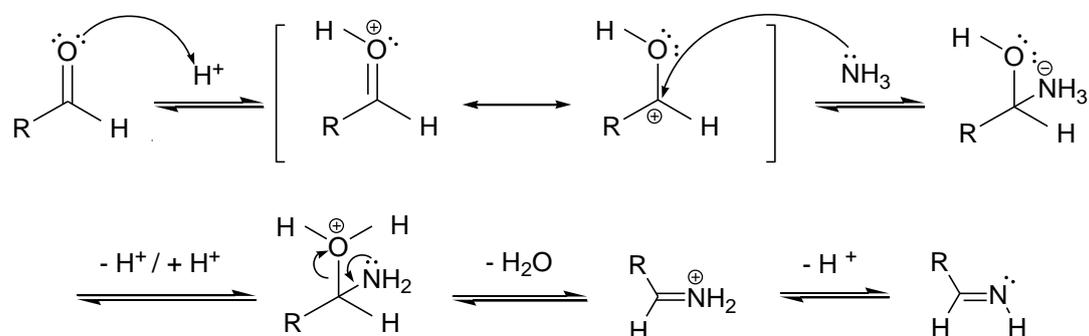
## 3.2 La sintesi di Strecker degli $\alpha$ -amminonitrili

La sintesi di Strecker degli  $\alpha$ -amminonitrili è considerata una delle reazioni più importanti e di grande interesse in chimica organica e la sua scoperta risale al 1850<sup>209</sup>. La sintesi prende il nome da Adolph Strecker, un chimico tedesco vissuto nel diciannovesimo secolo i cui studi furono rivolti ad una varietà di tematiche riguardanti la chimica inorganica ed organica.

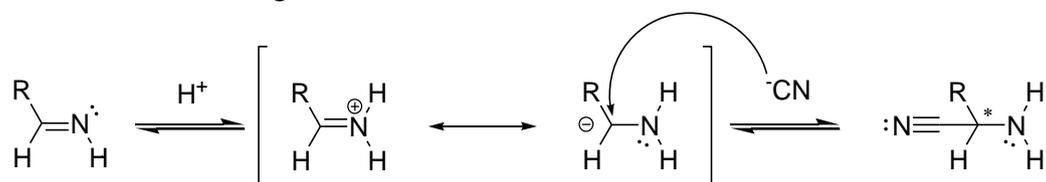


La sintesi degli  $\alpha$ -amminonitrili descritta da Strecker nella letteratura del tempo prevedeva la reazione tra un'aldeide, l'ammoniaca e l'acido cianidrico in ambiente acquoso.

Nel primo passaggio del meccanismo l'aldeide, attivata dal protone dell'acido presente in quantità stechiometrica, subisce l'attacco nucleofilo da parte dell'ammoniaca con formazione della carbinolammina *N*-protonata. L'eliminazione di una molecola di acqua dalla carbinolammina *O*-protonata genera lo ione immonio che perde un protone formando la corrispondente immina:



Nel secondo passaggio l'immina è attivata dalla protonazione e lo ione cianuro agisce da nucleofilo nei confronti del carbonio imminico, generando l' $\alpha$ -amminonitrile:



### 3.2.1 Modificazioni alla sintesi di Strecker

La reazione di Strecker rappresenta senza alcun dubbio il metodo più semplice ed economico per la preparazione degli  $\alpha$ -amminonitrili sia in laboratorio che su larga scala, sicuramente grazie alla disponibilità commerciale ed ai costi generalmente ridotti dei reagenti utilizzati. Il protocollo di Strecker è stato di conseguenza estensivamente studiato e sono state introdotte diverse variazioni rispetto alla procedura originale. La ricerca si è rivolta in particolare alla ottimizzazione dei catalizzatori, del solvente e soprattutto alla scoperta di fonti di cianuro alternative all' $\text{HCN}$  e ai suoi sali. Molto importante risulta anche l'approccio diastereoselettivo ed enantioselectivo con l'ottenimento di  $\alpha$ -amminonitrili chirali. Vediamo ora nei dettagli quali sono le modifiche più significative che sono state apportate recentemente al protocollo di Strecker.

#### Catalizzatori

<sup>209</sup> Strecker, A. "Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocol homologen Körper". *Annalen der Chemie und Pharmazie*, 1850, 75(1), 27-45

Gli  $\alpha$ -amminonitrili sono di solito preparati in presenza di catalizzatori che agiscono da acidi di Brønsted, acidi o basi di Lewis sebbene diverse procedure di sintesi di questi intermedi sintetici non ne prevedano l'uso come nel protocollo originale.

I catalizzatori impiegati sono di natura diversa: possono essere ad esempio metalli o non metalli, molecole inorganiche o organiche, omogenei o eterogenei. Alcuni esempi sono  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{RuCl}_3$ ,  $\text{RhI}_3$ ,  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{BiCl}_3$ , iodio,  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , guanidina idrocloruro.

### Solventi

Il protocollo di reazione originale prevede di condurre la reazione in soluzione acquosa. L'impiego dell'acqua comporta numerosi vantaggi: è un solvente economico, facilmente reperibile, non è tossico e non crea problemi legati al suo smaltimento.

La sintesi di Strecker può essere condotta in presenza di diversi solventi o loro miscele. I più frequenti sono l'acqua, il metanolo, l'etanolo, il toluene, la *N,N*-dimetilformammide, il diclorometano, l'acetonitrile ed il tetraidrofurano. La ricerca di processi più ecosostenibili ha portato all'introduzione dei liquidi ionici come valida alternativa all'uso dei solventi organici convenzionali;<sup>210</sup> è recente una reazione svolta  $[\text{bmim}]\text{PF}_6$  e  $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ . La sintesi one-pot a partire da un'aldeide, un'ammina e TMSCN in presenza di un liquido ionico non richiede l'aggiunta di acidi di Lewis perchè è il mezzo stesso a fungere da catalizzatore promuovendo la formazione dell'immina. La maggiore ecosostenibilità del processo deriva dalla minore volatilità dei solventi ionici rispetto ai comuni solventi organici e dalla possibilità di riciclarli facilmente e quindi riutilizzarli più volte senza perdita di attività catalitica. Alcune metodologie di sintesi degli  $\alpha$ -amminonitrili operano addirittura in assenza di solventi con TMSCN come fonte di cianuro.<sup>211</sup>

### Fonti di cianuro

La reazione di Strecker originale prevede l'uso dell'acido cianidrico come fonte di cianuro in ambiente acquoso. Il suo ruolo è anche quello di catalizzatore l'addizione nucleofila al carbonile agendo da acido di Lewis favorendo la formazione dell'immina. L'estrema tossicità e volatilità di HCN richiedono l'adozione di particolari misure di sicurezza per evitare i danni alla salute causati da una sua eventuale inalazione o contatto con la pelle. La tendenza è quindi quella di sostituire l'HCN con altre fonti di cianuro; tra le più utilizzate KCN, TMSCN<sup>212</sup>,  $\text{Bu}_3\text{SnCN}$ <sup>213</sup>,  $\text{Et}_2\text{AlCN}$ <sup>214</sup>,  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ <sup>215</sup>,  $(\text{Et}_2\text{O})\text{P}(\text{O})\text{CN}$ <sup>216</sup>,  $\text{MeCOCN}$ <sup>217</sup> e l'acetone cianidrina<sup>218</sup>. I cianuri di sodio o potassio in ambiente acquoso sono fonti di cianuro alternative all'HCN. Sono solidi e quindi più facili da maneggiare; sebbene sia comunque necessario adottare misure di sicurezza nella loro manipolazione. Questi sali alcalini a contatto con l'acqua liberano infatti HCN, il promotore della reazione, ma la loro applicazione nella sintesi di Strecker è limitata. Questo è dovuto sia alla scarsa solubilità dei cianuri alcalini nei solventi organici che alla generale incompatibilità dei catalizzatori nei confronti dell'ambiente acquoso.

La tossicità dell'acido cianidrico e dei suoi derivati ha spinto allo studio del trimetilsilil cianuro (TMSCN) come fonte di cianuro nei protocolli di sintesi di Strecker modificata. Il TMSCN è un liquido tossico per inalazione, a contatto con la pelle o per ingestione; è più facile da maneggiare ed è considerata una migliore fonte di ione cianuro per l'addizione nucleofila di immine in condizioni blande se confrontato con l'acido cianidrico o con i cianuri alcalini. Il TMSCN è usato nella sintesi degli  $\alpha$ -amminonitrili ma la sostituzione dell'acqua con i solventi organici come il diclorometano, l'acetonitrile o il toluene (o in assenza di solvente) rende necessaria la presenza di acidi di Brønsted, acidi o basi di Lewis per promuovere la reazione, a meno che non siano il

<sup>210</sup> Yadav, J. S.; Reddy, B. V.; Eshwaraiyah, B.; Srinivas, M.; Vishnumurthy, P., *New J. Chem.*, **2003**, *27*, 462-465

<sup>211</sup> Hajjipour, A. R.; Ghayeb, Y.; Sheikhan, N., *J. Iran. Chem. Soc.*, **2010**, *7*, 447-454; Khan, N. H. et al. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 1640-644; Baeza, A.; Nájera, C.; Sansano, J. M. *Synthesis*, **2007**, *8*, 1230-1234; Mojtabehi, M. M., *Can. J. Chem.*, **2006**, *84*, 429-432.

<sup>212</sup> a) B. A. Bhanu Prasad, A. Bisai, V. K. Singh, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 9565-9567; b) K. Shen, X. H. Liu, Y. F. Cai, L. L. Lin, X. M.

Feng, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6008-6014; c) S. Ramesh, K. Sivakuma, C. Panja, P. N. Arunachalam, A. Lalitha, *Synth. Commun.* **2010**, *40*, 3544-3551.

<sup>213</sup> a) P. Vachal, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10012-10014; b) Z. F. Xie, G. L. Li, G. Zhao, J. D. Wang, *Synthesis* **2009**, 2035-2039.

<sup>214</sup> S. Nakamura, N. Sato, M. Sugimoto, T. Toru, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1513-1516.

<sup>215</sup> Z. Li, Y. Ma, J. Xu, J. Shi, H. Cai, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3922-3926.

<sup>216</sup> S. Harusawa, Y. Hamada, T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4663-4666.

<sup>217</sup> F. Cruz-Acosta, A. Santos-Exposito, P. Armas, F. Garcia-Tellado, *Chem. Commun.* **2009**, 6839-6841.

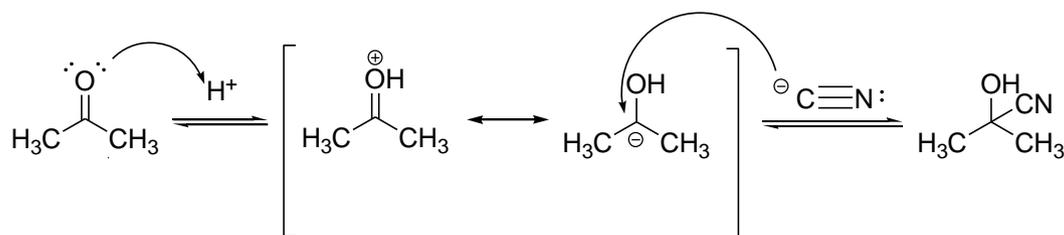
<sup>218</sup> S. Sipos, I. Jablonkai, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1844-1846.

solvente stesso o l'ammina a fungere da catalizzatori.<sup>219</sup> Il costo elevato di TMSCN (39 €/5 g) non preclude il suo utilizzo nella sintesi degli  $\alpha$ -amminonitrili ed esso rimane attualmente la fonte di cianuro alternativa più utilizzata in letteratura nonostante la ricerca sia orientata all'introduzione di composti più economici. Lo svantaggio dal punto di vista economico può però limitare l'applicazione di questa fonte di cianuro nell'uso della reazione di Strecker su larga scala per la sintesi degli amminoacidi chirali, in favore di fonti più economiche.

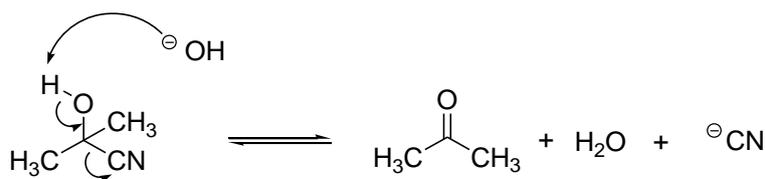
Il tributilstagno cianuro ( $\text{Bu}_3\text{SnCN}$ ) è un solido ed è quindi più facile da maneggiare in laboratorio rispetto all'acido cianidrico. Il suo utilizzo richiede comunque l'adozione di misure di sicurezza dato che è tossico per inalazione, per contatto con la pelle e per ingestione oltre all'essere irritante per gli occhi, la pelle e le vie respiratorie. Il  $\text{Bu}_3\text{SnCN}$  è considerato più efficace nelle reazioni di addizione nucleofila in condizioni basiche rispetto all'acido cianidrico o ai suoi sali alcalini. Il composto è un reagente stabile in acqua, al contrario di TMSCN che subisce facilmente l'idrolisi per formare HCN anche in presenza di una piccola quantità di acqua.

### 3.2.2 L'acetone cianidrina come fonte di cianuro

L'acetone cianidrina (2-idrossiisobutirronitrile,  $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}$ ) è un reagente liquido, solubile in acqua e facilmente maneggiabile; è considerata una delle fonti di cianuro più stabili ed economiche (31.35 \$/100g), anche se tuttavia pericolosa in quanto comunque potenziale fonte di HCN; in acqua il rilascio di HCN avviene molto lentamente e non in maniera quantitativa, raggiungendo uno stato di equilibrio dopo 18 ore. L'acetone cianidrina viene ottenuta per reazione tra l'acetone e un cianuro alcalino, ad esempio KCN, in presenza di un acido:

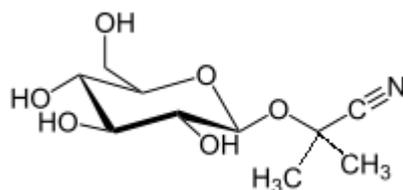


È una molecola molto utilizzata in ambito industriale<sup>220</sup> in quanto è precursore del metilmetacrilato, il monomero del polimetilmetacrilato (PMMA). È un reagente comune per la formilazione degli areni e un'altra caratteristica è quella di generare LiCN particolarmente anidro per reazione con LiH. L'acetone cianidrina è utilizzata in laboratorio soprattutto nelle reazioni di addizione nucleofila di a pH basico, in quanto rilascia HCN per deidrocianazione.



Il vantaggio è sicuramente la formazione di acetone facilmente eliminabile dalla miscela di reazione.

In laboratorio la reattività dell'acetone cianidrina come fonte di cianuro viene sfruttata per la sintesi di altre cianidrine, cosa che avviene peraltro anche in natura.

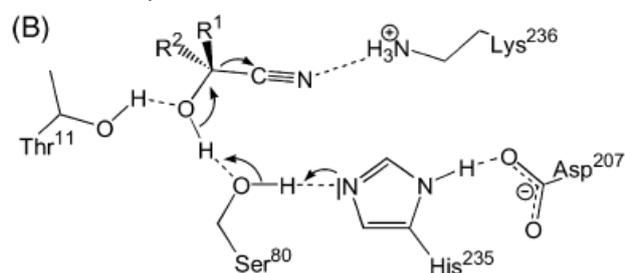


Linamarina

<sup>219</sup> Martínez, R.; Ramón, D. J.; Yus, M., *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 8471-8474.

<sup>220</sup> a) R. J. H. Gregory, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3649-3682; b) T. S. A. Heugebaert, B. I. Roman, A. De Blicq, C. V. Stevens, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4189-4191; c) Heugebaert, T. S. A. et al. "A safe production method for acetone cyanohydrin". *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 4189-4191

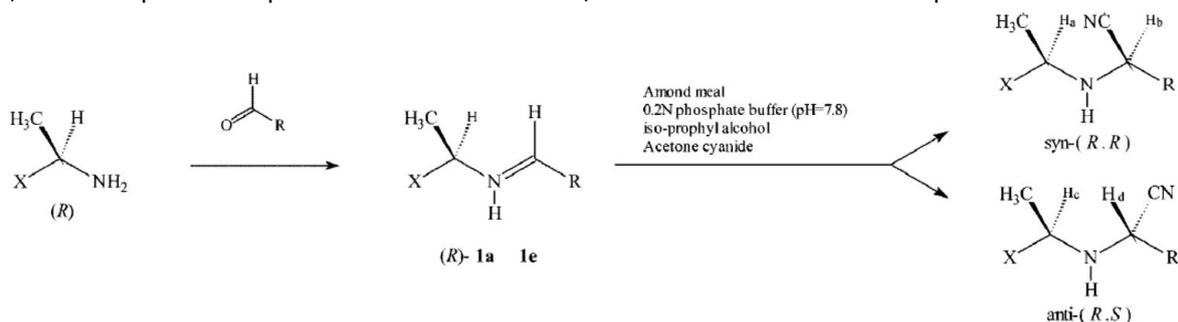
In natura l'acetone cianidrina è presente come aglicone su glicosidi cianogenici quali ad esempio la linamarina (presente nella cassava, nei fagioli di Lima e nel lino) con lo scopo di agire da meccanismo di difesa contro specie microbiche ed erbivori tramite il rilascio di HCN. Sono noti molti altri agliconi



diversi quali il mandelonitrile (presente sull'amigdalina), l'idrossi mandelonitrile e altre cianidrine alifatiche. In tutti questi glicosidi cianogenici il meccanismo di rilascio di HCN è mediato da liasi dette Idrossi nitrilasi (HNL, 4.2.1). In figura è riportato il meccanismo per la idrossi nitrilasi da *Hevea Brasiliensis* (HbHNL)<sup>221</sup> nella formazione di HCN da acetone cianidrina. L'utilizzo delle

HNL in chimica organica ha dato facile accesso alla sintesi di cianidrine chirali<sup>222</sup> col vantaggio di evitare l'utilizzo di HCN, sostituito con le cianidrine che compongono i glicosidi naturali, tra cui appunto l'acetone cianidrina.

Nel 2002 è stato ipotizzato che le HNL potessero riconoscere le immine come substrati e rilasciare HCN in modo da ottenere  $\alpha$ -ammino nitrili chirali<sup>223</sup>; nell'articolo immine enantiomericamente pure ottenute dalla condensazione di aldeidi e (*R*)- $\alpha$  meilaril ammine, venivano fatte reagire a pH 7-8 con acetone cianidrina e un estratto di mandorla contenente *R*-HNL, con l'ottenimento di rapporti diastereomerici in media 75/25. Tuttavia, se la stessa reazione viene effettuata nelle stesse condizioni ma senza l'enzima, si ottengono gli stessi rapporti diastereomerici a causa dell'induzione chirale derivante dalla (*R*)-ammina. L'acetone cianidrina infatti a pH basici rilascia l'HCN per deidrocianazione a prescindere dalla presenza dell'enzima o meno; l'enzima quindi non può catalizzare la reazione, essendo la reazione stessa spontanea.



### 3.2.3 L'acetone cianidrina come fonte di cianuro per la reazione di Strecker

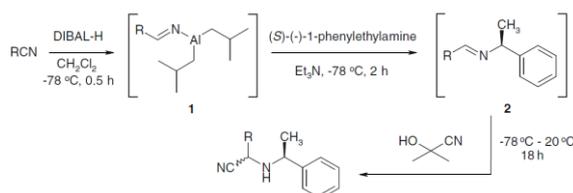
L'utilizzo dell'acetone cianidrina come fonte di cianuro nell'ambito della reazione di Strecker è rintracciabile solamente in alcuni sporadici articoli.

<sup>221</sup> G. Gartler, C. Kratky, K. Gruber, *Journal of Biotech.*, 129, **2007**, 87-97.

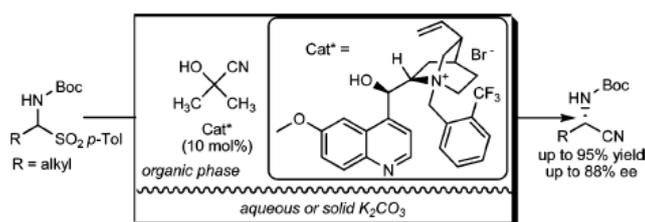
<sup>222</sup> J. Andexer, J. Langermann, A. Mell, M. Bocola, U. Kragl, T. Eggert, M. Pohl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8679–8681.

<sup>223</sup> T. Lee and Y. Ahn, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2002**, 23, 10

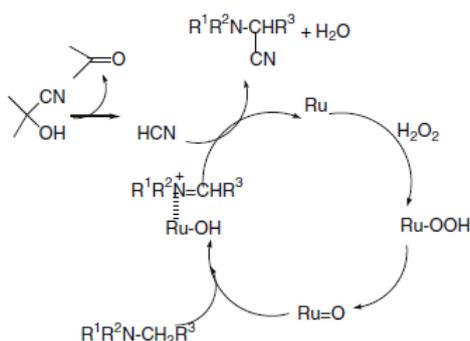
Una recente applicazione riguarda la cianazione di alano aldimmine generate in situ con acetone cianidrina<sup>224</sup>.



Paraskar and Sudalai hanno riportato l'utilizzo di acetone cianidrina per una sintesi one-pot in solventi organici utilizzando  $\text{Et}_3\text{N}$  come catalizzatore basico<sup>225</sup>. Ricci ha riportato un interessante articolo in cui l'acetone cianidrina reagisce con *N*-Boc  $\alpha$ -ammidosolfoni sintetizzando  $\alpha$ -amminonitrili enantiomericamente arricchiti in presenza un catalizzatore di trasferimento di fase chirale.<sup>226</sup>



Verma, Jain e Sain riportano nel 2012 una sintesi di  $\alpha$ -amminonitrili a partire da ammine terziarie con un processo di cianazione ossidativa tramite l'utilizzo di  $\text{RuCl}_3$  catalitico e acqua ossigenata in metanolo.<sup>227</sup>



### 3.2.4 Sintesi one-pot non catalizzata di Strecker con acetone cianidrina<sup>228</sup>

Osservando come in letteratura fosse relativamente scarso l'impiego dell'acetone cianidrina nella reazione di Strecker, abbiamo deciso di studiare un altro e nuovo protocollo di sintesi di  $\alpha$ -amminonitrili utilizzando l'acqua come solvente. Inoltre abbiamo in primo luogo deciso di effettuare uno screening esplorativo su tre aldeidi modello e benzilammina come ammina primaria, per poi evolvere all'utilizzo di altre specie carboniliche e amminiche.

In particolare il protocollo prevede la preformazione della specie imminica tramite il mescolamento dell'aldeide e della benzilammina e l'inserimento solo successivo dell'acetone cianidrina e dell'acqua.

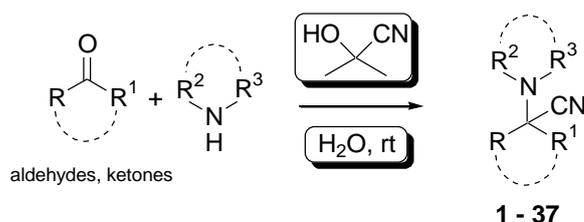
<sup>224</sup> S. Sipos, I. Jablonkai, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1844–1846.

<sup>225</sup> A. S. Paraskar, A. Sudalai, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5759–5762.

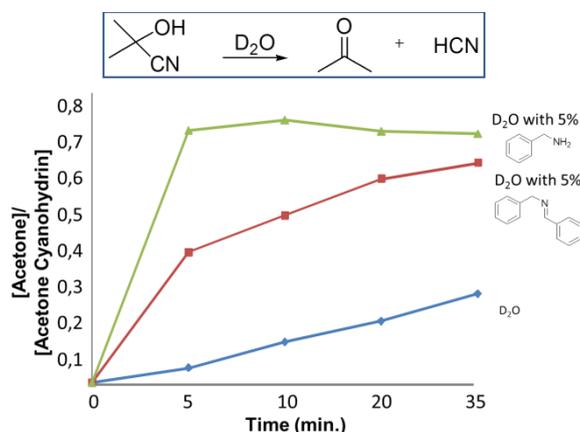
<sup>226</sup> R. P. Herrera, V Sgarzani, L. Bernardi, F. Fini, D. Pettersen, A. Ricci, *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 11642 – 11659.

<sup>227</sup> S. Verma, S. Jain, S. Sain, *Catalysis Letters*, **2011**, 141, 6, 882.

<sup>228</sup> P. Galletti, M. Pori, D. Giacomini, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3896–3903



Prima di tutto abbiamo studiato il comportamento dell'acetone cianidrina; in acqua la molecola raggiunge molto lentamente l'equilibrio con l'acido cianidrico<sup>229</sup> mentre, in presenza di un equivalente di ammina o immina, il processo è istantaneo<sup>230</sup>. Con l'obiettivo di riprodurre le esatte condizioni del nostro protocollo di reazione, per cui l'acetone cianidrina si trova in acqua in presenza di un equivalente di immina dell'aldeide preformata, si è deciso di monitorare la reazione di deidrocianazione a dare acetone in D<sub>2</sub>O via <sup>1</sup>H-NMR, introducendo quantità catalitiche di benzilammina in un caso e successivamente della sua immina con la benzaldeide.



Effetto dei catalizzatori basici sulla decomposizione dell'acetone cianidrina in D<sub>2</sub>O. E' rappresentato il rapporto tra l'integrale del segnale ..... dell'acetone  $I_a$  su quello dell'acetone cianidrina  $I_{ac}$  in funzione del tempo.

Nel primo esperimento in un tubo NMR si aggiunge acetone cianidrina (10  $\mu$ L), D<sub>2</sub>O (0.7 mL) e <sup>1</sup>H NMR e si registra velocemente uno spettro 1H ogni 5 minuti per 35 minuti (riga blu). Lo stesso esperimento viene poi condotto inserendo 5 mol% di benzilammina (riga verde) e l'immina *N*-benzilidene-1-feniletanamina (riga rossa). I tre esperimenti vengono rappresentati come il rapporto ( $I_a/I_{ac}$ ) tra l'integrale digitale del segnale dell'acetone ( $I_a$  a 2.11 ppm) rispetto a quello dell'acetone cianidrina ( $I_{ac}$  a 1.51 ppm) in funzione del tempo. Il grafico mostra chiaramente un raggiungimento più rapido delle condizioni di equilibrio quando vi è all'interno una base. In particolare quindi la benzilammina e la sua immina già solo al 5% sono in grado di catalizzare la decomposizione dell'acetone cianidrina ad acetone e acido cianidrico/ione cianuro dimostrando quindi come queste siano condizioni adatte all'utilizzo di acetonecianidrina in acqua nella reazione di Strecker

A questo punto abbiamo condotto uno studio teorico di metrica green; abbiamo studiato l'atom economy (AE)<sup>231</sup> e l'environmental impact factor (EI) della formazione del prodotto 1, nella condizione di resa quantitativa (condizione necessaria affinché questi parametri abbiano senso) del prodotto. Queste due grandezze come si sa sono legate dalla seguente relazione:

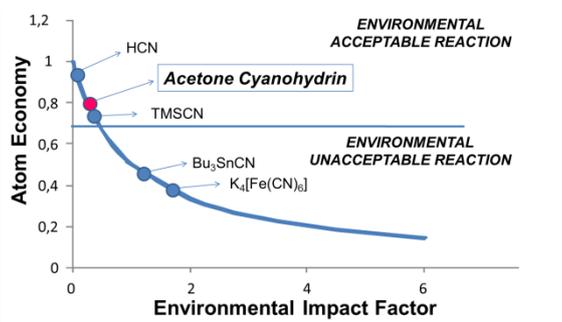
$$AE = \frac{1}{1 + E_{MW}}$$

<sup>229</sup> C. H. Li, T. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 2596–2599

<sup>230</sup> T. D. Stewart, B. J. Fontana, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 3281–3285.

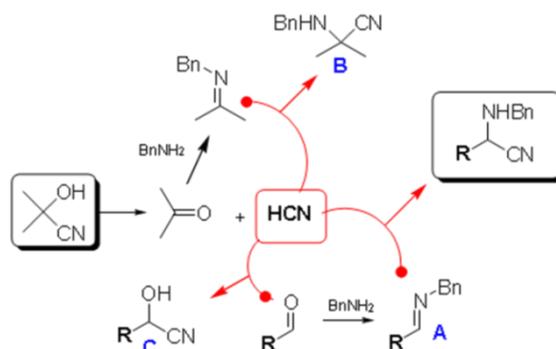
<sup>231</sup> Trost, B. M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34* (3), 259–281

In particolare si definiscono reazioni a basso impatto ambientale quelle per cui  $AE > 0.67$  contemporaneamente ad un valore di  $EI < 0.67$ . Abbiamo inserito nel grafico lo studio della reazione utilizzando acetone cianidrina, paragonandolo all'utilizzo di altre fonti di cianuro.



Come si osserva, l'acetone cianidrina oltre che ad essere il migliore (ad eccezione dell'acido cianidrico) è anche classificabile come reagente che porta la reazione ad avere complessivamente un basso impatto ambientale.

La decomposizione dell'acetone cianidrina in una procedura one-pot può andare incontro a tre destini differenti: *i*) può reagire con l'immina intermedia **A** dando l'amminonitrile di Strecker desiderato; *ii*) può reagire con la chetimmina derivante dall'acetone e dall'ammina presente dando l'amminonitrile dell'acetone **B**; *iii*) può reagire direttamente con l'aldeide di partenza fornendo la corrispondente cianidrina **C** (quest'ultima reazione può essere visto come un processo competitivo di transcianazione tra l'acetone cianidrina e l'aldeide).



Reazioni possibili nella procedura one pot di Strecker con l'acetone cianidrina in acqua

Dopo aver osservato il comportamento dell'acetone cianidrina utilizzando il nostro protocollo, e avendo previsto i prodotti possibili, abbiamo iniziato il nostro studio, senza l'utilizzo di alcun catalizzatore, utilizzando benzilammina su tre aldeidi differenti: benzaldeide, butanale e 2-fenil propanale.

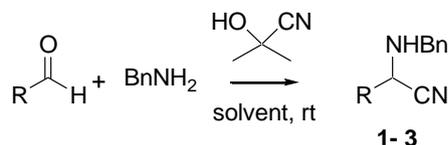


Tabella 1

Ent.	R	solvent	Time (h)	Product (Y %)	By-products (%)
1	Ph	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20	<b>1</b> (76)	<b>A</b> (24)
2	Bu	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20	<b>2</b> (76)	<b>B</b> (20)
3	CH(CH <sub>3</sub> )Ph	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20	<b>3</b> (76) <sup>[a]</sup>	<b>B</b> (10)
4	Ph	<i>t</i> BuOMe	20	<b>1</b> (0)	<b>A</b> (99)
5	Bu	<i>t</i> BuOMe	20	<b>2</b> (33)	<b>B</b> (33), <b>C</b> (33)
6	CH(CH <sub>3</sub> )Ph	<i>t</i> BuOMe	20	<b>3</b> (20)	n.d.
7	Ph	CH <sub>3</sub> CN	20	<b>1</b> (36)	<b>A</b> (64)
8	Bu	CH <sub>3</sub> CN	20	<b>2</b> (67)	<b>B</b> (33)
9	CH(CH <sub>3</sub> )Ph	CH <sub>3</sub> CN	20	<b>3</b> (68) <sup>[a]</sup>	<b>B</b> (11), <b>C</b> (12)
10	Ph	Neat	0.5	<b>1</b> (54)	<b>A</b> (46)
11	Bu	Neat	0.5	<b>2</b> (30)	n.d.
12	CH(CH <sub>3</sub> )Ph	Neat	0.5	<b>3</b> (99)	-
13	Ph	<i>t</i> BuOMe /H <sub>2</sub> O	2	<b>1</b> (67)	<b>A</b> (12), <b>B</b> (8), <b>C</b> (12)
14	Bu	<i>t</i> BuOMe /H <sub>2</sub> O	2	<b>2</b> (90)	<b>B</b> (5)
15	CH(CH <sub>3</sub> )Ph	<i>t</i> BuOMe /H <sub>2</sub> O	2	<b>3</b> (87)	<b>B</b> (4), <b>C</b> (9)
16	Ph	CH <sub>3</sub> CN /H <sub>2</sub> O	0.5	<b>1</b> (99)	-
17	Bu	CH <sub>3</sub> CN /H <sub>2</sub> O	0.5	<b>2</b> (93)	<b>B</b> (7)
18	CH(CH <sub>3</sub> )Ph	CH <sub>3</sub> CN /H <sub>2</sub> O	0.5	<b>3</b> (99)	-
19	Ph	H <sub>2</sub> O	2	<b>1</b> (96)	-
20	Bu	H <sub>2</sub> O	0.5	<b>2</b> (90)	<b>B</b> (10)
21	CH(CH <sub>3</sub> )Ph	H <sub>2</sub> O	20	<b>3</b> (90) <sup>[a]</sup>	-
22	Ph	H <sub>2</sub> O <sup>[b]</sup>	2	<b>1</b> (99)	-
23	Bu	H <sub>2</sub> O <sup>[b]</sup>	20	<b>2</b> (99)	-
24	CH(CH <sub>3</sub> )Ph	H <sub>2</sub> O <sup>[b]</sup>	20	<b>3</b> (99) <sup>[c]</sup>	-

Condizioni: aldeide (1 mmol), benilamina (1 mmol), acetone cianidrina (1.5 mmol), solvente (4 mL), rt.

<sup>a</sup> tracce di acetofenone derivanti dalla decomposizione dell'aldeide

<sup>b</sup> 1 mmole di acetone cianidrina.

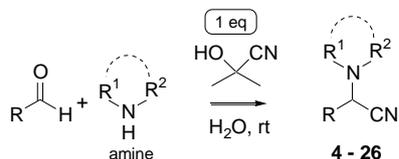
<sup>c</sup> eccesso diastereomerico 65/35 determinato da HPLC chirale delle relative N-trifluoroacetammidi (IC, hexane / *i*PrOH 85/15).

La reazione è stata effettuata in diversi solventi: miscele binarie acqua/solvente organico, acqua e senza solvente. Le reazioni sono state effettuate in vial chiusi per evitare la fuoriuscita di prodotti volatili, messi in agitazione su un oscillatore orbitale. Le reazioni effettuate direttamente nei solventi organici e senza solvente sono state direttamente concentrate e analizzate; quelle in acqua sono state prima estratte in solvente organico. In Tabella 1 per le entry 1-20 sono stati usati 1.5 equivalenti di acetone cianidrina rispetto all'aldeide, mentre per le entry 21-24, un solo equivalente. Le reazioni sono state controllate tramite analisi HPLC e NMR e la loro durata riportata è relativa al dato ottenuto che mostra la migliore conversione dell'aldeide di partenza.

Nei solventi organici CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, *t*BuOMe e CH<sub>3</sub>CN le rese negli amminonitrili **1-3** sono state scarse e/o modeste (Tabella 1, entries 1-9). Con benzaldeide l'immina intermedia **A** (see figure 2) è stata sempre recuperata in quantità significativa e in particolare in *t*BuOMe era l'unico prodotto (Tabella 1, entry 4). Le prove con butanale e 2-fenil propanale hanno dato anche i prodotti **B** e **C** (Tabella 1, entries 2, 3, 5, 8, e 9). Senza solvente la reazione è risultata in generale molto più veloce ma solo la 2-fenil propanale ha portato all' $\alpha$ -amminonitrile **3** in modo quantitativo. La benzaldeide ha portato ad **1** con una resa del 53% e un 46% di immina non reagita; la butanale ha portato a **2** con una resa del 30% assieme a numerosi sottoprodotti non identificati, probabilmente associati a processi di polimerizzazione dell'aldeide. (Tabella 1, entries 10-12). I migliori risultati sono stati ottenuti in solventi omogenei o miscele bifasiche solvente organico/acqua. La miscela *t*BuOMe/H<sub>2</sub>O 1:1 ha dato buoni risultati con un numero molto basso di sottoprodotti ad eccezione della benzaldeide (Tabella 1, entries 13-15). I sottoprodotti **A**, **B** e **C** sono ulteriormente diminuiti usando miscele omogenee CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1:1 e la reazione è risultata anche più veloce (0.5 h per una conversione completa) (Tabella 1, entries 16-18). Infine abbiamo testato la reazione in sola acqua e nonostante la formazione di un sistema eterogeneo, abbiamo ottenuto  $\alpha$ -amminonitrili in alte rese. La benzaldeide e la 2-fenil propanale hanno dato buoni risultati mentre solo per la butanale è stata osservata la presenza residua

dell'*N*-benzilammino nitrile dell'acetone, il sottoprodotto **B** (Tabella 1 entries 19-21). Abbassando la quantità di acetone cianidrina utilizzata ad 1 solo equivalente, tutte le tre aldeidi in acqua hanno portato alla formazione dei corrispondenti  $\alpha$ -amminonitrili **1-3** in alte rese con la soppressione del sottoprodotto **B**. (Tabella 1, entries 22-24).

Da questi risultati preliminari molto positivi utilizzando l'acetone cianidrina abbiamo standardizzato e definito il protocollo in acqua con i seguenti rapporti molari tra le specie utilizzate: composto carbonilico/ammina/acetone cianidrina in rapporto molare 1/1/1. E' quindi stato esteso il protocollo ad altre aldeidi, ammine (Tabella 2) e chetoni (Tabella 3).



**Tabella 2**

Ent.	R	amine	product	Y%	Ent.	R	amine	product	Y%
1	Ph	PhNH <sub>2</sub>		58	14	4-NO <sub>2</sub> Ph	BnNH <sub>2</sub>	<b>15</b>	-
2	Ph	1,2 benzenediamine		33	15	4-NO <sub>2</sub> Ph	BnNH <sub>2</sub>		5
3	Ph	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>		99	16	2-pyridyl	BnNH <sub>2</sub>		98
4	Ph	Morpholine		80	17	Bu	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>		65
5	Ph	piperidine		99	18	Bu	AllylNH <sub>2</sub>		99
6	Ph	piperazine		70	19	Bu	PhNH <sub>2</sub>		-
7	2-OHPh	BnNH <sub>2</sub>		-	20	Bu	1,2 benzenediamine		-
8	2-OHPh	BnNH <sub>2</sub>	<b>10</b>	65 <sup>[a]</sup>	21	Bu	Morpholine		30
9	2-OCH <sub>3</sub> Ph	BnNH <sub>2</sub>		86	22	Bu	Piperidine		99
10	4-OHPh	BnNH <sub>2</sub>		traces	23	Bu	Piperazine		50
11	4-OHPh	BnNH <sub>2</sub>	<b>12</b>	75 <sup>[a]</sup>	24	<i>i</i> Pr	BnNH <sub>2</sub>		92
12	4-OCH <sub>3</sub> Ph	BnNH <sub>2</sub>		68	25	<i>t</i> Bu	BnNH <sub>2</sub>		99
13	4-ClPh	BnNH <sub>2</sub>		83	26	Bu	4-piperidinone		30

Condizioni: aldeide (1 mmol), ammina (1 mmol) o diammina (0.5 mmol), acetone cianidrina (1 mmol), acqua (4 mL), 20h, rt.

<sup>a</sup> Senza solvente, 2 equivalenti di acetone cianidrina.

La benzilammina e l'allilammina hanno dato risultati eccellenti sia con la benzaldeide che con le aldeidi alifatiche (Tabella 2 entries 22 e 23, Tabella 2 entries 18, 24, e 25), tra cui la pivalaldeide (entry 25, molto importante perché l'idrolisi del suo nitrile porta alla *tert*-leucina). La *p*-Nitrobenzaldeide, spesso usata come aldeide modello nelle reazioni di addizione nucleofila, ha portato a rese molto basse; ma in generale le altre aldeidi aromatiche con gruppi elettron-donatori hanno portato a risultati migliori (Tabella 2 entries 14, 15 vs entries 9, 11, e 12). L'aldeide salicilica e la 4-OH-benzaldeide hanno dato interessanti risultati, anche se il risultato migliore è stato ottenuto senza acqua e con 2 equivalenti di acetone cianidrina (entries 8 e 10). I migliori risultati sono stati comunque ottenuti con il gruppo fenolico protetto come etere metilico. (Tabella 2, entry 9). L'anilina e la 1,2-benzenediammina porta a rese modeste e a nessuna reazione con la butanale (Tabella 2, entries 1, 2, e 20).

La 1,2-etilendiammina è stata impiegata con successo sia con la benzaldeide che con la butanale fornendo i di-amminonitrili corrispondenti come miscela diastereomerica 1:1 (Tabella 2, entries 3 e 17). La piperidina, modello per le ammine secondarie, ha portato a risultati eccellenti (entries 5 e 22), al contrario di morfolina e piperazina (entries 4, 6, 21, e 23). È da notare che nel caso in cui sono state utilizzate le diammine, non sono mai state trovate tracce del mono  $\alpha$ -amminonitrile.

È altresì importante osservare che la maggior parte dei reagenti e dei prodotti sino a qui utilizzati non è solubile in acqua. Ma le conversioni complete degli starting material e le ottime rese fanno capire come il processo non necessiti in effetti di avere una solubilità completa. Ha invece un ruolo di sicuro importante l'effetto idrofobico e l'energia coesiva.<sup>232</sup>

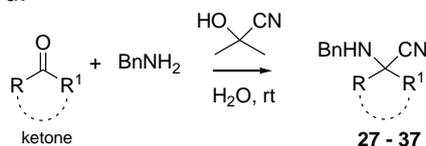
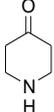
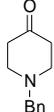


Tabella 3

Ent.	ketone	Time, h	temperatura	prodotto	y%
1	acetophenone	96	rt	<b>27<sup>a</sup></b>	0
2	acetophenone	48	65	<b>27<sup>a</sup></b>	13
3	acetophenone	72	65	<b>27</b>	35
4	acetophenone	20	90	<b>27</b>	35
5	3-pentanone	20	rt	<b>28<sup>a</sup></b>	20
6	3-pentanone	20	rt	<b>28<sup>a</sup></b>	35
7	3-pentanone	20	rt	<b>28</b>	48
8	2-hexanone	20	rt	<b>29</b>	47
9		20	rt	<b>30</b>	95
10		20	rt	<b>31</b>	99
11		20	rt	<b>32</b>	-
12		20	rt	<b>33</b>	99
13		20	rt	<b>34</b>	99
14		20	rt	<b>35</b>	61

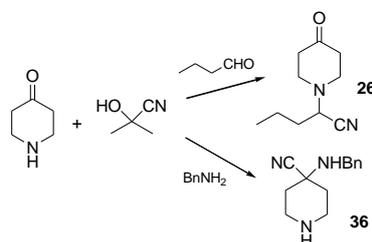
<sup>232</sup> a) J. B. F. N. Engberts in *Organic Reaction in Water* (Ed.: U. M. Lindström), Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2007, p. 29; b) S. Otto, J. B. F. N. Engberts, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2809–2820.

15		20	rt	<b>36</b>	50
16		20	rt	<b>37</b>	86

Condizioni: chetone (1 mmole), benzilammina (1 mmole), acetone cianidrina (1 mmole), H<sub>2</sub>O (4 mL).

I chetoni arilici e alchilici aciclici danno in generale risultati insoddisfacenti (Tabella 3 entries 1-8), ma quelli ciclici portano ad eccellenti rese in linea con la migliore reattività dovuta alla I-strain dei chetoni ciclici (Tabella 3, entries 9, 10 e 12-14).<sup>233</sup> Il cicloesenone non ha reagito con il nostro protocollo e non sono stati ritrovati nemmeno prodotti di addizione 1,2 o 1,4 (Tabella 3, entry 11).

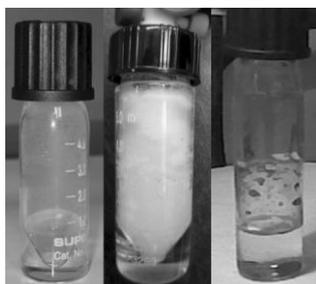
Il piperidin-4-one è un composto bifunzionale molto interessante e in una procedura one-pot si è comportato come il componente amminico con la butanale e porta all' $\alpha$ -amminonitrile **26**, o come il componente carbonilico con la benzilammina porteo a **36** come si osserva in Tabella 2 entry 26, e Tabella 3 entry 15.



Dal punto di vista ambientale il bisogno di metodologie sintetiche sostenibili diventa via via di grande importanza dall'industria al mondo accademico per ogni scala di reazione. Senza dubbio tutte le fonti di cianuro sono potenzialmente nocive e devono essere usate con estrema precauzione dovuta all'alta tossicità dell'acido cianidrico ma il protocollo sviluppato ha alcuni vantaggi innegabili: l'atom economy, l'assenza di catalizzatori, l'utilizzo di acqua e la semplicità della procedura in generale.

L'uso in particolare di 1 equivalente di acetone cianidrina per ottenere l' $\alpha$ -amminonitrile in media in alte rese e la formazione unica di acetone come sottoprodotto porta il nostro protocollo molto competitivo dal punto di vista dell'atom economy, soprattutto se confrontato con l'utilizzo di TMSCN, che oltretutto è anche molto costoso. In più le condizioni di reazione in fase eterogenea del nostro protocollo, hanno il vantaggio aggiuntivo di poter rimuovere per semplice separazione dalla fase acquosa il prodotto finale.

Abbiamo quindi aumentato la scala della reazione a 4 mmoli e abbiamo appunto osservato che non era più necessario estrarre il prodotto con un solvente organico, poiché il prodotto si era separato da solo dall'acqua e una volta separato o filtrato è stato seccato a pressione (Figure 2). Abbiamo quindi aumentato la scala della reazione senza effettuare alcun work-up con solvente organico per i casi della Tabella 1 entry 24, Tabella 2 entries 2, 17, 20, 21, 23, e Tabella 3 entry 13, ottenendo sempre le stesse rese.



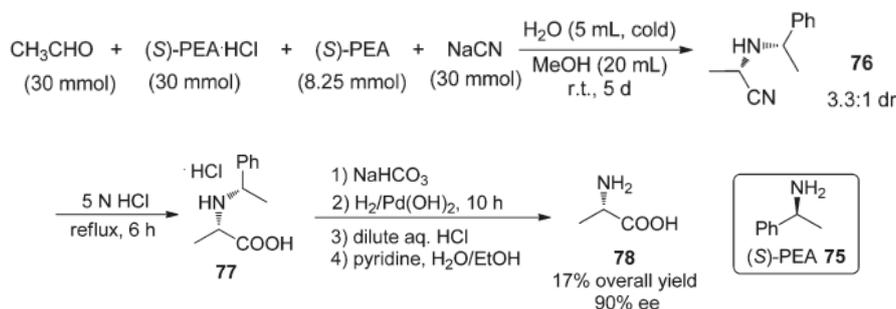
<sup>233</sup> For the internal strain effect, see: E. L. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, **1994**, p. 769.

### 3.3 La sintesi di Strecker asimmetrica

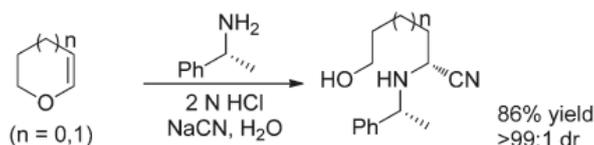
La sintesi di Strecker si sta evolvendo sempre di più verso varianti asimmetriche a causa della richiesta di nuovi aminoacidi chirali enantiopuri, molecole che possono trovare largo impiego in ambito farmaceutico come in sintesi organica. Negli ultimi 40 anni sono stati fatti numerosi progressi in quest'area e generalmente l'approccio a nuovi  $\alpha$ -amminonitrili chirali avviene due differenti strategie: la prima è l'addizione nucleofila di cianuro a immine chirali non raceme e la seconda è la cianiazione enantioselectiva di immine prochirali.

#### Induzione asimmetrica

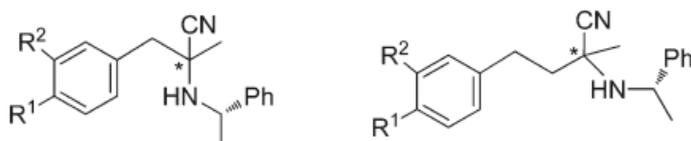
La prima metodologia, cioè l'induzione asimmetrica, può essere associata ad una chiralità presente nell'ammina oppure nel composto carbonilico di partenza: in genere si osserva l'utilizzo di ammine chirali e solo pochi esempi sono presenti per i composti carbonilici. L'utilizzo di ammine chirali come ausiliari chirali è quindi diventato molto diffuso e la reazione di Strecker si è evoluta in metodologie molto robuste che portano all'ottenimento di numerosi  $\alpha$ -amminonitrili. Questa strategia ovviamente richiede quantità equimolari di ausiliare chirale, il quale dopo la reazione può essere rimosso e riutilizzato, oppure mantenuto all'interno della struttura. Il primo esempio in assoluto di reazione di Strecker asimmetrica è stato effettuato da Harada nel 1963,<sup>234</sup> ben più di 110 anni dopo la scoperta dello stesso protocollo di Strecker. L'ausiliario chirale utilizzato, l'*(S)*- $\alpha$ -fenilettilammina enantiopura (*(S)*-PEA), è stato utilizzato al posto dell'ammoniaca sull'acetaldeide; il risultato della modifica è stato l'ottenimento del corrispondente  $\alpha$ -amminonitrile in un rapporto diastereomerico 3.3/1. Dopo la rimozione dell'ausiliario e l'idrolisi ad acido carbossilico del diastereoisomero maggioritario, è stata ottenuta l'*L* alanina con una resa del 17% ed un eccesso enantiomerico del 90%.



Di conseguenza sono stati preparati altri  $\alpha$ -amminonitrili utilizzando la stessa strategia. E' il caso dell'utilizzo dell'*(R)*-PEA su enoli ciclici, con successivo trattamento con NaCN.<sup>235</sup>



Interessanti risultati sono stati ottenuti nella sintesi diastereoselettiva a partire da Aril Metil ketenimine.<sup>236</sup>

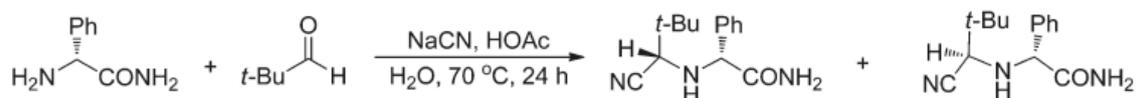


<sup>234</sup> K. Harada, *Nature* **1963**, 200, 1201

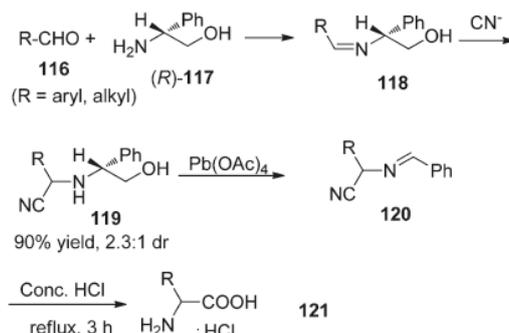
<sup>235</sup> Fadel, A.; Lahrache, N., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 1780

<sup>236</sup> Weinges, K.; Gries, K.; Stemmler, B.; Schrank, W. *Chem. Ber.*, **1977**, 110, 2098

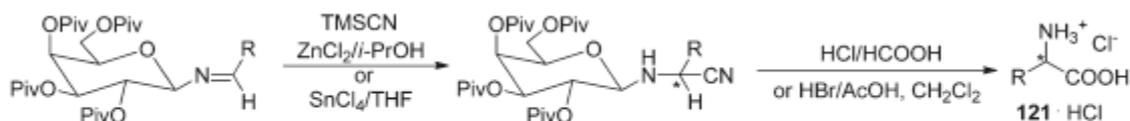
Successivamente come induttori chirali sono stati utilizzati amminoli<sup>237</sup> e amminoammidi.<sup>238</sup>



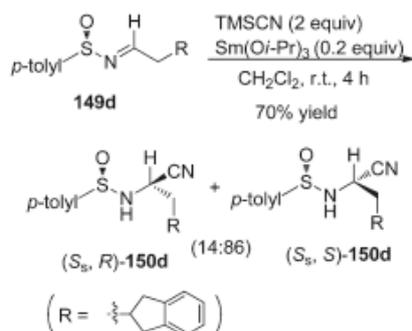
Un importante esempio utilizza l'*R* Fenil Glicinolo; in figura è mostrata la rimozione dell'induttore per opera di  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ , con successiva idrolisi acida.



In 1987, Kunz<sup>239</sup> ha sviluppato una reazione asimmetrica di Strecker utilizzando una galattosilammina (*O*-pivaloyl- $\beta$ -D-galactopyranose); come si osserva, si effettua la reazione con  $\text{TMSCN}$  come fonte di cianuro in presenza di un acido di Lewis e successivamente si idrolizza l'amminale e si idrolizza il nitrile in un passaggio solo.



Più recente è l'utilizzo da parte di Mukujama<sup>240</sup> di sulfinimine chirali generate dalla (*S*)-para toluen sulfonammide



Nel 1996 è stata utilizzata come induttore chirale la (*S*)-1-amino-2-metoxymethylindoline (SAMI) da KIM, ottenendo *R* idrazino nitrili diastereomericamente puri; questo è stato il primo esempio di addizione di

<sup>237</sup> a) Dave, R. H.; Hosangadi, B. D. *Tetrahedron* **1999**, 55, 11295; b) Wang, X.-J.; Zhang, F.; Liu, J.-T. *Tetrahedron* **2008**, 64, 1731; c) Ma, D.; Tian, H.; Zou, G. J. *Org. Chem.* **1999**, 64, 120; d) Warmuth, R.; Munsch, T. E.; Stalker, R. A.; Li, B.; Beatty, A. *Tetrahedron* **2001**, 57, 6383; e) Tang, G.; Tian, H.; Ma, D. *Tetrahedron* **2004**, 60, 10547; f) Huguenot, F.; Brigaud, T. J. *Org. Chem.* **2006**, 71, 7075

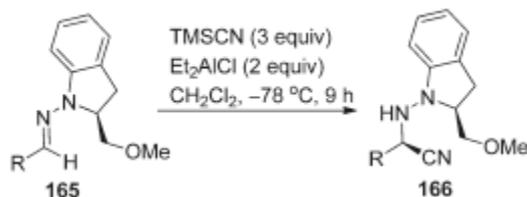
<sup>238</sup> Boesten, W. H. J.; Seerden, J.-P. G.; de Lange, B.; Dielemans, H. J. A.; Elsenberg, H. L. M.; Kaptein, B.; Moody, H. M.; Kellogg, R. M.; Broxterman, Q. B.

*Org. Lett.* **2001**, 3, 1121.

<sup>239</sup> (a) Kunz, H.; Sager, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1987**, 26, 557; (b) Kunz, H.; Sager, W.; Schanzenbach, D.; Decker, M., *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 649

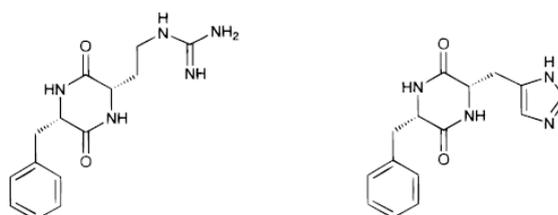
<sup>240</sup> Takahashi, E.; Fujisawa, H.; Yanai, T.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.*, **2005**, 34, 604.

cianuro a idrazoni chirali. La reazione necessita di temperature molto basse e almeno 2 equivalenti di acido di Lewis.

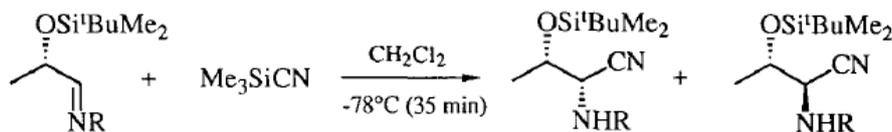


### Catalisi enantioselettiva

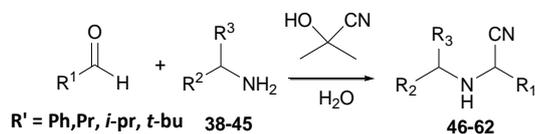
L'altro approccio alla sintesi di  $\alpha$ -amminonitrili chirali enantiopuri tramite la reazione di Strecker è la catalisi enantioselettiva. In generale si utilizzano substrati prochirali e quantità substechiometriche di catalizzatore chirale. La chiave è la scelta del giusto catalizzatore che si adatti natura dell' $\alpha$ -amminonitrile target. La ricerca nell'ambito della catalisi si sta sviluppando molto velocemente pure essendo relativamente nuova, con il primo articolo pubblicato solo nel 1996 da Lipton,<sup>241</sup> il quale riporta l'utilizzo di un dipeptide ciclico.



La nostra ricerca si è direzionata però verso l'utilizzo dell'induzione asimmetrica, utilizzando le conoscenze pregresse del mio gruppo di ricerca verso questa tematica. In passato infatti è stata accuratamente studiata l'addizione asimmetrica di cianuro su immine sostituite dell'aldeide lattica in presenza di acidi di Lewis.<sup>242</sup>



Utilizzando quindi il nostro protocollo di Strecker di sintesi racema di  $\alpha$ -amminonitrili in acqua con acetone cianidrina, abbiamo studiato la versione asimmetrica tramite induzione chirale data da ammine primarie e secondarie otticamente attive.



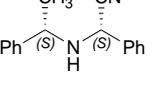
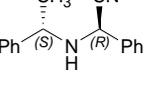
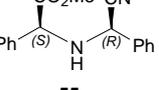
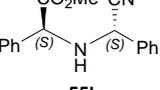
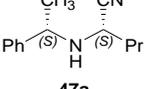
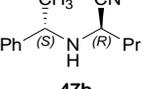
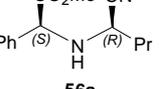
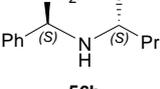
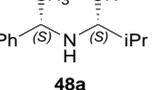
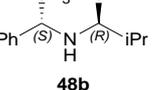
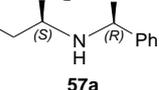
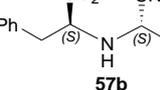
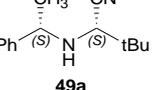
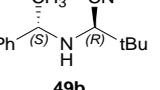
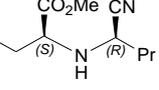
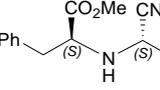
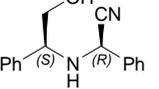
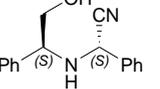
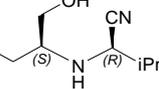
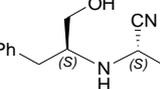
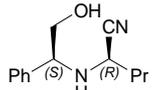
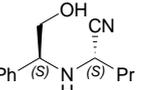
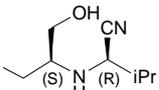
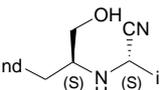
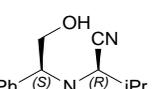
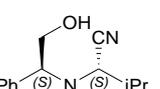
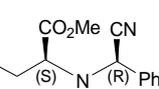
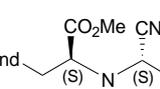
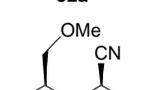
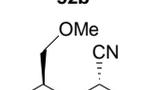
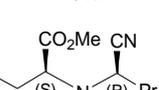
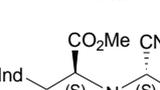
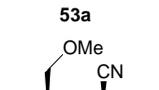
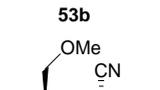
### 3.3.1 Sintesi asimmetrica one-pot non catalizzata di Strecker con acetone cianidrina<sup>243</sup>

Tabella 4

<sup>241</sup> Iyer, M. S.; Gigstad, K. M.; Namdev, N. D.; Lipton, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 4910

<sup>242</sup> Cainelli, G.; Giacomini, D.; Trer\_e, A.; Galletti, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1593

<sup>243</sup> M. Pori, P. Galletti, R. Soldati, D. Giacomini, *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, accepted

Ent.	Ald., (R <sup>1</sup> )	Amine	Products	Y% <sup>[a]</sup> dr (a/b)	Ent. Ald., R <sup>1</sup>	Amine	Products	Y% <sup>[a]</sup> dr (a/b)		
1	Ph		 <b>46a</b>	 <b>46b</b>	99 69/31	10	Ph	 <b>55a</b>	 <b>55b</b>	73 68/32
2	Pr	<b>38</b>	 <b>47a</b>	 <b>47b</b>	99 74/26	11	Pr	 <b>56a</b>	 <b>56b</b>	41 77/23
3	<i>i</i> Pr	<b>38</b>	 <b>48a</b>	 <b>48b</b>	99 67/33	12	Ph	 <b>57a</b>	 <b>57b</b>	64 67/33
4	<i>t</i> Bu	<b>38</b>	 <b>49a</b>	 <b>49b</b>	99 65/35	13	Pr	 <b>58a</b>	 <b>58b</b>	25 63/37
5	Ph		 <b>50a</b>	 <b>50b</b>	85 81/19	14	<i>i</i> Pr	 <b>59a</b>	 <b>59b</b>	80 53/47
6	Pr	<b>39</b>	 <b>51a</b>	 <b>51b</b>	99 80/20	15	<i>i</i> Pr	 <b>60a</b>	 <b>60b</b>	62 57/43
7	<i>i</i> Pr	<b>39</b>	 <b>52a</b>	 <b>52b</b>	97 83/17	16	Ph	 <b>61a</b>	 <b>61b</b>	31 63/37
8	Ph		 <b>53a</b>	 <b>53b</b>	78 64/36	17	Pr	 <b>62a</b>	 <b>62b</b>	40 57/43
9	Pr	<b>40</b>	 <b>54a</b>	 <b>54b</b>	98 71/29					

<sup>a</sup>resa comprendente entrambi gli stereoisomeri

<sup>b</sup>ammina usata come cloridrato e trattata in situ con un equivalente di TEA

Le prime prove sono state svolte con le ammine primarie: come aldeidi modello abbiamo scelto la benzaldeide, la butanale, la isobutirraldeide e la pivalaldeide (Tabella 4); come ammine chirali abbiamo testato l'induttore chirale di Harada, l'(*S*)-1-fenilettilammina (**38**),  $\alpha$ -amminoli,  $\alpha$ -amminoeteri tra cui l'(*S*)-2-ammino-2-feniletanolo (**39**), l'(*S*)-2-metossi-1-fenilettilammina (**40**), (*S*)-2-ammino-3-fenilpropan-1-ol (**43**), l'(*S*)-2-ammino-3-(1H-indol-2-il)propan-1-ol (**44**), e gli esteri metilici della L-fenilglicina (**41**), of L-fenilalanina (**42**), e L-triptofano (**45**). Abbiamo testato anche gli  $\alpha$ -ammino acidi liberi ma senza risultato.

Il protocollo, come in precedenza, consiste nel "pre-mixing" a temperatura ambiente dell'aldeide e dell'ammina chirale a formare l'immina, per poi aggiungere un equivalente di acetone cianidrina e acqua e lasciare la reazione in agitazione su di un oscillatore orbitale. Le reazioni in generale sono avvenute con facilità e il migliore risultato in termini di resa è stato ottenuto con l'ammina **38** e gli  $\alpha$ -amminoli **39**, e **43**. Utilizzando gli esteri metilici di  $\alpha$ -amminoacidi **41**, **42**, e **45** abbiamo osservato la presenza di sottoprodotti

tra cui la cianidrina dell'aldeide; l' $\alpha$ -amminonitrile puro è stato purificato solo tramite flash cromatografia ottenendo rese più basse. Per quanto riguarda la diastereoselettività, l'ammina **38** ha portato ad una miscela di stereoisomeri 2:1 (i diastereoisomeri **a** e **b**). (Tabella 4, entries 1-4, prodotti **46-49**). Gli amminonitrili **46**,<sup>244</sup> **47**<sup>245</sup>, **48**,<sup>246</sup> e **49**<sup>247</sup> sono composti noti e la configurazione assoluta dei diastereoisomeri maggioritari **46a-49a** è stata assegnata essere (*S,S*) (1,3 "syn") dagli <sup>1</sup>H NMR della letteratura.

L'(*S*)-Fenilglicinolo **39** ha in generale portato ad un aumento dei rapporti diastereomerici con tutte le aldeidi (Tabella 4, entries 5-7, composti **50-52**), fino al valore migliore 83/17 per i composti **52a-b**. La configurazione assoluta dei diastereoisomeri maggioritari **50a** e **52a** è stata assegnata essere (*S,R*) per confronto con gli <sup>1</sup>H NMR degli stessi prodotti da letteratura.<sup>248</sup> Per i composti **51a-b** la configurazione è stata assegnata paragonandoli agli spettri <sup>1</sup>H NMR degli amminonitrili **50a-b** e **52a-b**. In particolare abbiamo osservato un trend simile e costante dei chemical shift del protone sul carbonio in alfa al gruppo CN: il segnale del protone *CHCN* nei diastereoisomeri maggioritari **50a** e **52a** è più schermato rispetto a quello dei diastereoisomeri minoritari (**50b** e **52b**). Lo stesso trend è stato osservato per **51a** e **51b** permettendo quindi anche in questo caso l'attribuzione della configurazione. Nonostante la differenza dei descrittori stereochimici del diastereoisomero maggioritario (*S,S*) per gli amminonitrili **46a-49a** e (*S,R*) per **50a-52a**, la stereoinduzione esercitata dall'ammina **39** è stata la medesima dell'ammina di Harada **38**, essendo sempre dominante lo stereoisomero 1,3 "syn" in tutti i casi.

Il ruolo chiave del gruppo OH nell'*L* fenil alaninolo nel migliorare il rapporto diastereomerico è stato dimostrato usando come ammina l'analogo *O*-metiltere **40**. Sono infatti stati ottenuti rapporti diastereomerici più bassi per gli amminonitrili **53a-b** e **54a-b**: 64/36 e 71/29 rispettivamente.

L'assegnazione della configurazione (*S,R*) per **53a** e **54a** è stata fatta in base allo stesso trend del chemical shift di *CHCN* osservato per i composti **50** e **52**, come discusso sopra. Per verificare ulteriormente e definitivamente l'attribuzione della configurazione, il composto **50a** è stato direttamente trasformato nel composto **53a** tramite una semplice *O*-metilazione. Per quanto riguarda l'induzione chirale dei metil esteri, (Tabella 4, entries 10-13 e 16-17), si è osservato che i rapporti diastereomerici non erano elevati con il valore migliore di 77/23 per **56a-b** ottenuto con il metil estere della *L*-fenilglicina **41** e la butanale. La configurazione dei composti **55a-b** è stata attribuita essere (*S,R*) dalla trasformazione di una miscela 2/1 di **55a/55b** in una miscela 2/1 di **50a/50b** tramite riduzione dell'estere metilico con NaBH<sub>4</sub>. La configurazione degli amminonitrili **56a-b**, **57a-b**, **58a-b**, **59a-b**, e **60a-b** è stata assegnata in funzione del trend all' <sup>1</sup>H NMR per l'intera serie. Gli amminonitrili **61a-b** sono noti e la configurazione è stata assegnata da NMR della letteratura.<sup>249</sup>

Da questi screening preliminari si è osservato che le ammine che presentavano maggiore flessibilità sul carbonio beta, ad esempio le ammine **43** e **44**, portavano ad una scarsa diastereoselettività (Tabella 4, entries 12 e 17). Le aldeidi sostituite in alfa invece sembra possano influenzare leggermente il rapporto diastereomerico (Tabella 4, entries 2, 7, 9, e 11) con poche eccezioni (entries 2 e 13).

Il nostro protocollo di Strecker, come si è visto in precedenza, si è dimostrato valido anche con l'utilizzo di ammine secondarie. Abbiamo quindi deciso di estendere lo studio agli esteri della *L*-prolina **63-65**, i derivati dell'*L*-prolinolo, **66-67**, gli esteri della *L*-(4*R*)-idrossi-prolina **68**, l'*L*-(4*R*)-idrossi-*L*-prolinolo **69** (Tabella 5) utilizzando come aldeidi modello la benzaldeide e la butanale.

Dal punto di vista delle rese di reazione, il difenilprolinolo **67** con la butanale ha portato all'amminonitrile **78a-b** in modo quantitativo, ma in tutti gli altri casi sono stati osservati quantitativi variabili di cianidrine delle aldeidi e reagenti di partenza; è stato quindi spesso necessario purificare il prodotto con colonna cromatografica, portando ad un abbassamento della resa. Gli esteri della *L*-Prolina **63**, **64** e **65** come induttori chirali hanno fornito sempre gli stessi valori di eccesso diastereomerico (valore medio osservato:

<sup>244</sup> A. Kazemeini, N. Azizi, M. R. Saidi, *Russ. J. Org. Chem.* **11412006**, *42*, 46–49

<sup>245</sup> M. C. Daga, M. Taddei, G. Varchi, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5191–5194

<sup>246</sup> a) L. Royer, S. K. De, R. A. Gibbs, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4595–4597; b) T. Inaba, M. Fujita, K. Ogura, *J. Org. Chem.* **1146 1991**, *56*, 1274–1279

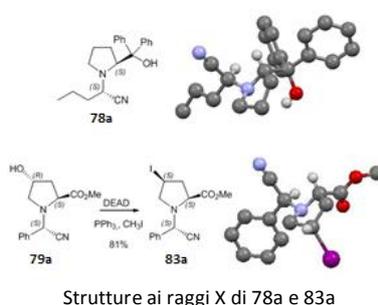
<sup>247</sup> J.-L. Fauchère, C. Petermann, *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 824–31

<sup>248</sup> a) R. H. Dave, B. D. Hosangadi, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11295–11308; b) D. Leung, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1151, 12328–12333; c)

T. K. Chakraborty, K. A. Hussain, G. V. Reddy, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9179–9190.

<sup>249</sup> J. A. Gonzalez-Vera, M. T. Garcia-Lopez, R. Herranz, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8971–8976

75/25) indipendentemente dal gruppo estereo (metilico, *t*butilico o benzilico) o dall'aldeide utilizzata (Tabella 5, entries 1-5 10, e 11). Con l'(*S*)-Prolinolo **66** sono stati ottenuti risultati migliori ottenendo **75** e **76** con rapporti diastereomerici 82/18 con benzaldeide e butanale (entries 6 e 7). L'(*S*)- $\alpha,\alpha$ -Difenilprolinolo **67** ha dato il miglior risultato portando ad un solo diastereoisomero, generando un solo amminonitrile sia con la benzaldeide che con la butanale (Tabella 5, entries 8, e 9). Inoltre, l'amminonitrile enantipuro **78a** è stato ottenuto in resa quantitativa senza alcuna purificazione. Per quanto riguarda gli amminonitrili derivanti dalla prolina, la configurazione assoluta è stata assegnata essere (*S,S*) per il diastereoisomero maggioritario tramite raggi X del cristallo singolo e  $^1\text{H}$  NMR. I prodotti **70-76** e **79-82** hanno mostrato lo stesso trend all' $^1\text{H}$  NMR per il chemical shift del protone *CHCN*, essendo il maggior diastereoisomero sempre più deschermato del minore per tutta la serie. Sul composto **78a** è stata fatta la diffrazione a raggi X del cristallo singolo e la struttura risolta è rappresentata sotto. L'attribuzione della configurazione assoluta al composto **79a** è stata fatta trasformandolo nello iodo derivato **83a** tramite reazione di Mitsunobu<sup>250</sup> che ha portato all'ottenimento di un prodotto cristallino adatto per le analisi di diffrazione ai raggi X. I dati di diffrazione a raggi X per entrambe le strutture ha inequivocabilmente confermato la configurazione *S* del nuovo stereocentro.



La stereochimica e il trend dei segnali all' $^1\text{H}$  NMR sono stati avvalorati da numerose trasformazioni chimiche. Il prodotto **79a** è stato trasformato nel **81a** tramite riduzione dell'estere con  $\text{NaBH}_4$ ; **80a** è stato trasformato in **82a** in maniera analoga e così **70a** nel composto **75a**. Infine il prodotto **70a** è stato convertito nel composto **77a** tramite reazione di Grignard con il  $\text{PhMgBr}$ .

Abbiamo tentato di dare una interpretazione meccanicistica alla reazione one-pot di Strecker proponendo due differenti meccanismi: il primo tramite la formazione di un'immina (o ione immino) intermedia, il secondo tramite un amminolo intermedio.<sup>251</sup> La via che passa per immina appare la più plausibile per quei casi in cui la reazione di Strecker viene effettuata in solventi organici e in presenza di agenti disidratanti, fattori che promuovono la formazione della base di Schiff a causa della eliminazione di acqua. In ogni caso Tanaka e i suoi collaboratori hanno dimostrato che la formazione di immine è efficiente anche in acqua miscelando aldeidi aromatiche e ammine, separando poi le immine ottenute dal solvente acquoso come prodotti cristallini in buone rese.<sup>252</sup>

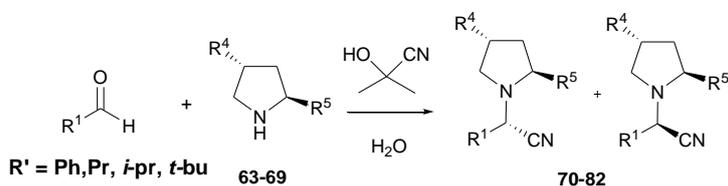


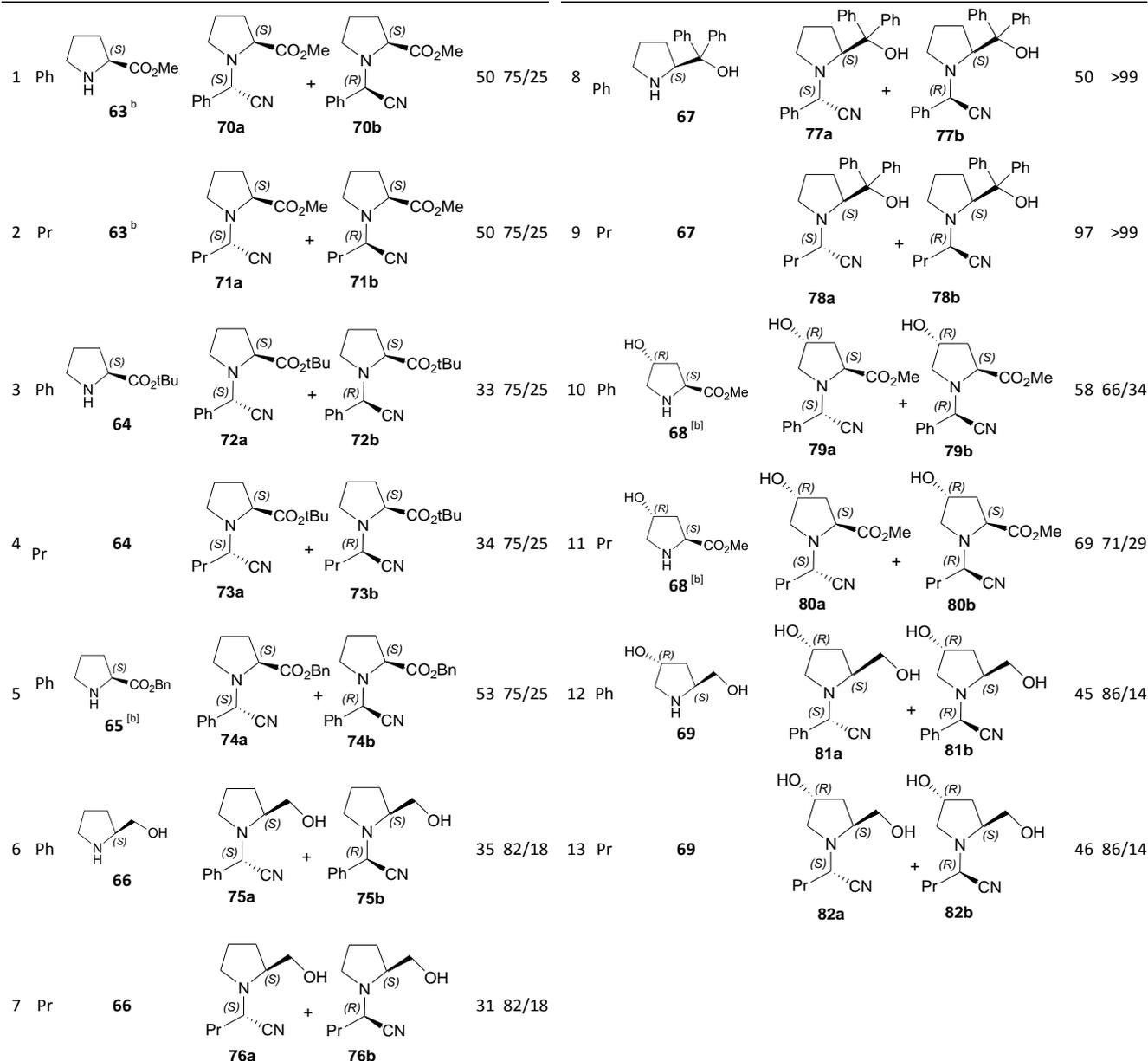
Tabella 5

Ent. $\text{R}^1$	Amine	Products	Y% <sup>[a]</sup> dr (a/b)	Ent. $\text{R}^1$	Amine	Products	Y% <sup>[a]</sup> dr (a/b)
-------------------	-------	----------	----------------------------	-------------------	-------	----------	----------------------------

<sup>250</sup> N. Shangguan, M. Joullie, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6748–6750

<sup>251</sup> G. W. Zhang, D. H. Zheng, J. Nie, T. Wang, J. A. Ma, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1399–1405; M. Barbero, S. Cadamuro, S. Dughera, G. Ghigo, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4058–4068.

<sup>252</sup> K. Tanaka, R. Shiraishi, *Green Chem.* **2000**, *2*, 272–273



<sup>a</sup>resa comprendente entrambi gli stereoisomeri

<sup>b</sup>ammina usata come cloridrato e trattata in situ con un equivalente di TEA

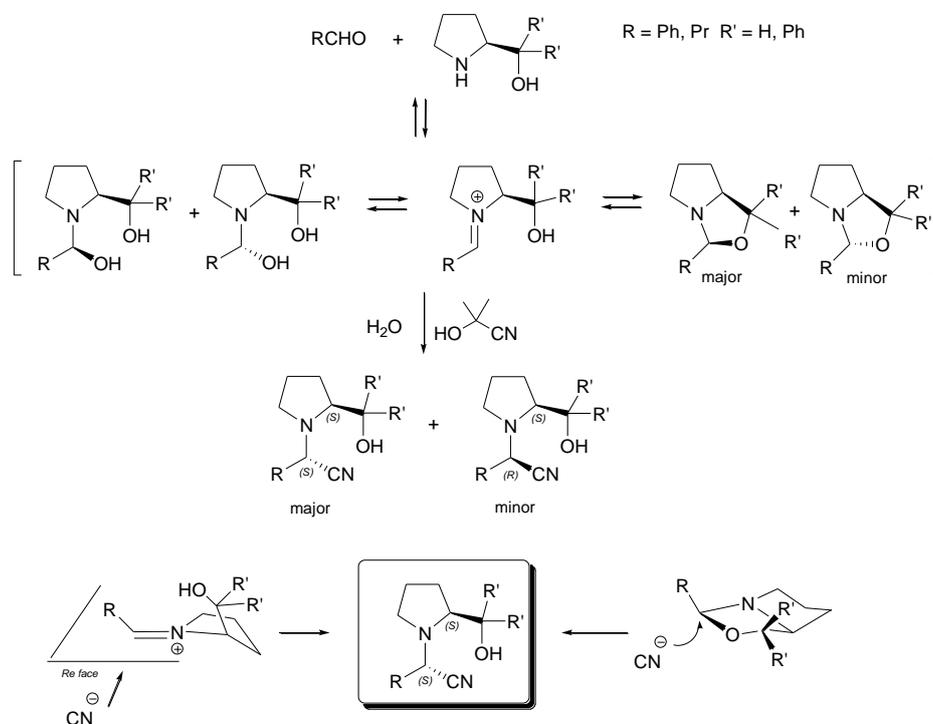
Studi computazionali sull'effetto della struttura dell'ammina sulla formazione dell'imminio intermedio con aldeidi in acqua evidenziano la formazione di amminoli e specie imminio come punti stazionari con un'alta barriera, specialmente nel caso di ammine cicliche secondarie come il metil estere della prolina e la pirrolidina.<sup>253</sup> Per quanto riguarda gli L-prolinoli e la presenza del gruppo alcolico primario, è possibile la formazione di 1,3-ossazolidinoni biciclici assieme alla formazione di intermedi immina/imminio e amminoli.<sup>254</sup>

Per ottenere un'evidenza degli intermedi che si formano nel nostro processo non catalizzato in acqua, abbiamo effettuato analisi NMR con benzaldeide, butanale, L-prolinolo **66** e L-difenilprolinolo **67**. In particolare abbiamo miscelato una quantità equimolare di aldeide e ammina a temperatura ambiente in tubo NMR e in due solventi, D<sub>2</sub>O e CDCl<sub>3</sub>, e abbiamo velocemente analizzato le due soluzioni. Gli spettri ottenuti, a volte molto complessi, hanno mostrato la presenza di diverse specie in soluzione. Nel caso dell'L-prolinolo **66** miscelato con benzaldeide in CDCl<sub>3</sub> e D<sub>2</sub>O sono state ottenute due nuove specie distinte con

<sup>253</sup> G. J. S. Evans, K. White, J. A. Platts, N. C. O. Tomkinson, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2616–2627

<sup>254</sup> M. B. Schmid, K. Zeitler, R. M. Gschwind, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7065–7074

segnali specifici nel range 5.4-5.5 ppm assieme a quantità di reagenti di partenza. Gli stessi spettri osservati con butanale e il prolinolo **66** hanno mostrato la formazione di specie simili a 4.0-4.5 ppm in D<sub>2</sub>O, assieme a piccole tracce dell'aldeide idrata e della specie immonio. Dopo addizione di acetone cianidrina, i segnali delle due specie nei range di chemical shift assegnati sono scomparse per dare luogo ai segnali dei corrispondenti nitrili.



Il rapido consumo delle specie è in accordo con la nostra osservazione per cui l'acetone cianidrina in acqua si decompone rapidamente in presenza di ammina o specie imminiche.

Le analisi attente degli spettri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR unite al confronto con spettri reali delle 1,3-ossazolidine riportate in letteratura,<sup>255</sup> ci hanno portato ad attribuire i chemical shift delle due specie intermedie proprio alla struttura delle 1,3-ossazolidine, che si classificano quindi come due specie intermedie. In ogni caso il rapporto diastereomerico osservato per le due specie ossazolidiniche intermedie è 7:3 da NMR, valore che non corrisponde al rapporto tra il diastereoisomero maggioritario e minoritario degli ammino nitrili finali (**42a/ 42b** è infatti 82/18, Tabella 5). Questo può voler dire che la situazione è ancora più complessa e che sussiste un equilibrio tra le specie ossazolidiniche.

Per quanto riguarda invece gli <sup>1</sup>H NMR del difenilprolinolo **67** (a contatto con la benzaldeide e la butanale) in CDCl<sub>3</sub>, sono stati osservati grandi quantitativi di reagente di partenza ma la presenza di un solo isomero 1,3-ossazolidinico<sup>256</sup> che in questo caso concorda con la formazione finale di un solo α-amminonitrile (Tabella 5 entries 8 e 9).

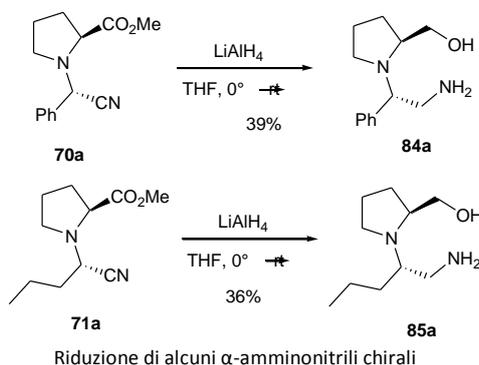
Ma la presenza di un intermedio biciclico potrebbe essere anche la prova di una elevata reattività della specie imminio che molto probabilmente ha un tempo di vita breve in soluzione acquosa e ciclizza molto rapidamente a livello intramolecolare. In ogni caso, nonostante la presenza di numerosi intermedi anche non identificabili, dopo l'addizione di acetone cianidrina in acqua tutti gli equilibri si spostano in maniera produttiva verso la sintesi degli α-amminonitrili. Per quanto riguarda la costruzione di un modello per l'induzione asimmetrica esercitata dagli L-prolinoli, la formazione esclusiva degli (S,S)-amminonitrili potrebbe derivare dalla addizione sulla faccia Re dell'imminio o da sostituzione bimolecolare diretta dalla parte opposta delle relative 1,3-ossazolidine.

<sup>255</sup> a) M. Dali, H. Boudiaf, A. Boukhari, *Res. J. Appl. Sci.* **2007**, 2, 759–762; b) V. I. Tararov, R. Kadyrov, T. H. Riermeier, A. Börner, *Synthesis* **2002**, 375–380

<sup>256</sup> G. Zuo, Q. Zhang, J. Xu, *Heteroat. Chem.* **2003**, 14, 42–45

Tutti i derivati di natura prolinica non sono mai stati sintetizzati e considerando l'importanza e l'utilità dei derivati prolinici in chimica organometallica e organocatalisi, la conservazione dello scheletro della L-prolina e della 4(R)-idrossi-(5)-prolina nella molecola finale permette l'ottenimento di interessanti prodotti bifunzionali, eventualmente utilizzabili per la sintesi di nuovi leganti chirali. Abbiamo quindi analizzato la reattività di alcuni ammino nitrili a base prolinica per quanto riguarda la reazione di riduzione e idrolisi per esplorare la loro trasformazione in nuovi amminoli o amminoacidi chirali. Abbiamo quindi trattato i nitrili isolati **70a** e **71a** con  $\text{LiAlH}_4$  ottenendo gli 1,5-amminoli chirali **84a** e **85a** rispettivamente per contemporanea riduzione del gruppo estereo e ciano.

Per quanto riguarda la letteratura, le reazioni di idrolisi del nitrile dovrebbe avere un carattere di "reazione ordinaria". Noi abbiamo comunque osservato che l'idrolisi dell'amminonitrile **70a** (isomero isolato) avviene solo in condizioni drastiche in HCl 37% per 24 ore a refluxo portando ad una miscela 75/25 dei due diastereoisomeri **86a** e **86b** con una resa totale dell'88%. Per evitare il fenomeno di epimerizzazione abbiamo provato diverse procedure più "soft" note in letteratura tra cui HCl al 5% in diossano,<sup>257</sup>  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in



$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  at  $0^\circ\text{C}$  or  $1\text{M NaHCO}_3$ <sup>258</sup>. Nessuna di queste procedure ha portato all'acido dicarbossilico, ma solo a fenomeni di epimerizzazione del reagente di partenza, all'ottenimento di prodotti della reazione di retro-Strecker e in alcuni casi nessuna reazione. E' stata provata senza successo anche una procedura di alcolisi con HCl in metanolo per trasformare il nitrile in estere metilico.<sup>259</sup>

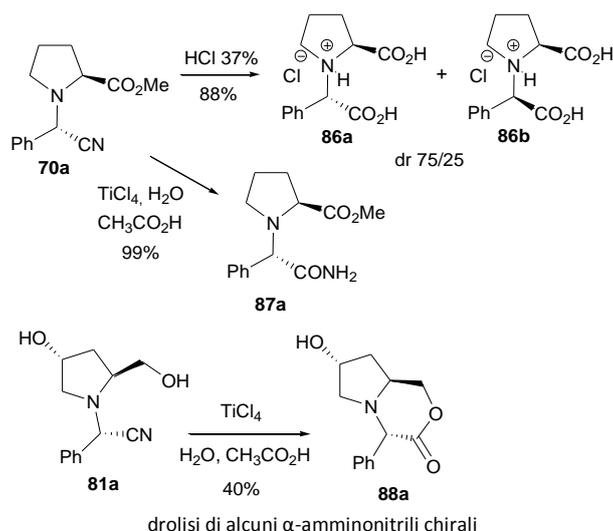
D'altra parte è stato ottenuto un buon risultato idrolizzando il nitrile **70a** all'ammide **87a** con una resa quantitativa e senza epimerizzazione, utilizzando una quantità stechiometrica di  $\text{TiCl}_4$  in acido acetico e 4 equivalenti of acqua.<sup>260</sup> E' interessante notare come la stessa procedura applicata al 4-idrossiprolinolo nitrile **81a** ha portato al lattone biciclico **88a** per opera di uan ciclizzazione intramolecolare.

<sup>257</sup> P. Vongvilai, O. Ramström, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*,14419–14425

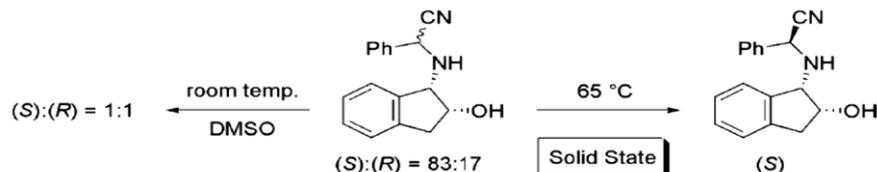
<sup>258</sup> F. Fringuelli, O. Piermatti, F. Pizzo, *J. Chem. Educ.* **2004**, *81*, 874–876

<sup>259</sup> G. R. Lee, J. A. Crayston, *Polyhedron* **1996**, *15*, 1817

<sup>260</sup> T. Mukaiyama, K. Kamio, S. Kobayashi, H. Takei, *Chem. Lett.*, **1973**, 357



Il risultato riportato sopra per quanto riguarda il fenomeno di epimerizzazione durante la reazione di idrolisi e i fenomeni sperimentali di epimerizzazioni spontanee e inaspettate di vecchi campioni di nitrili ci ha portato a riflettere e ad affrontare il problema della stabilità configurazionale degli alfa-amminonitrili. Per esempio abbiamo osservato che l'isomero minoritario isolato **70b** nel tempo si è convertito spontaneamente nel maggioritario **70a**, ma non il maggioritario **70a**; inoltre in una miscela 86/14 del composto **81**, il diastereoisomero minoritario **81b** si è convertito completamente nel maggioritario **81a** in un mese. L'epimerizzazione degli  $\alpha$ -amminonitrili è già riportata in letteratura. Sakurai, ad esempio, ha osservato l'epimerizzazione di  $\alpha$ -aril amminonitrili stereoisomericamente puri se dissolti DMSO o scaldati.<sup>261</sup>



Abbiamo quindi preparato soluzioni di DMSO- $d_6$  degli amminonitrili puri e isolati **70a** e **70b** e li abbiamo scaldati a 80 °C per 24 ore. Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR di entrambi i nitrili registrati dopo hanno mostrato tracce di benzaldeide e del metil estere della *L*-prolina, oltre a prodotti di epimerizzazione con un rapporto diastereomerico finale di 68/32 (**70a/70b**) partendo da **70a**, e 65/35 (**70a/70b**) partendo da **70b**, rispettivamente. In un secondo esperimento abbiamo scaldato senza solvente i due amminonitrili **79a** e **79b** per 24 ore a 80 °C osservando alla fine identici spettri  $^1\text{HNMR}$  in  $\text{CDCl}_3$  mostrando epimerizzazione con lo stesso valore di eccesso diastereomerico: **79a/79b** pari a 72/28. Anche in questi casi abbiamo osservato tracce del reagente di partenza, benzaldeide e del metil estere della *trans* 4-idrossi-(*S*)-prolina assieme ad altri due diastereoisomeri derivati da una parziale racemizzazione (circa il 15%) sul carbonio in  $\alpha$  dell'estere. Nel caso dei derivati della butanale **80a-b**, gli stessi esperimenti hanno portato ad una miscela complessa di prodotti e a spettri non interpretabili.

La presenza di reagenti di partenza e l'osservazione che i rapporti diastereomerici ottenuti negli esperimenti di isomerizzazione sono consistenti con quelli ottenuti dal protocollo di Strecker, suggeriscono che l'epimerizzazione abbia luogo tramite un protocollo di retro-Strecker secondo un meccanismo di cianazione/deidrocianazione (Tabella 5 entries 1 e 10,).

<sup>261</sup> R. Sakurai, S. Suzuki, J. Hashimoto, M. Baba, O. Itoh, A. Uchida, T. Hattori, S. Miyano, M. Yamaura, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2241–2244

## 3.4 Parte Sperimentale

### Parte sperimentale relativa al paragrafo 3.2.4

#### Parte strumentale

Commercial reagents were used as received without additional purification.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded with an INOVA 400 or a GEMINI 200 instrument with a 5 mm probe. All chemical shifts are quoted relative to deuterated solvent signals ( $\delta$  in ppm and  $J$  in Hz). FTIR spectra were recorded with a Thermo Nicolet 380 instrument and measured as films between NaCl plates; wave numbers are reported in  $\text{cm}^{-1}$ . TLC was conducted with Merck 60 F254 plates. Column chromatography was conducted with Merck silica gel 200–300 mesh. GC-MS was conducted with an Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, EI voltage 70 eV, gradient from 50 to 280 °C in 30 min, column HP5 5% Ph-Me Silicon. HPLC-MS was conducted with an Agilent Technologies HP1100 instrument, with a ZOBRA-X-Eclipse XDB-C8 Agilent Technologies column; mobile phase:  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ , gradient from 30 to 80% of  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 8 min, 80% of  $\text{CH}_3\text{CN}$  until 25 min, 0.4 mL/min, coupled with an Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, fullscan mode from  $m/z = 50$  to 2600, scan time 0.1 s in positive ion mode, ESI spray voltage 4500 V, nitrogen gas 35 psi, drying gas flow 11.5 mL/min, fragmentor voltage 20 V. Elemental analyses were carried out with a Thermo Flash 2000 CHNS/O Analyzer.

#### Procedura generale per la sintesi dei nitrili 1-37

The chosen aldehyde (or ketone) (1 mmol) and amine (1 mmol, 0.5 mmol in the case of diamines) were mixed in an orbital shaker at room temp. in a 5 mL vial equipped with a screw cap. After 10 min, water (4 mL) and acetone cyanohydrin (1 mmol) were added, and the cap was closed. The mixture was stirred in an orbital shaker for 20 h or until the reaction was complete (TLC monitoring). The reaction mixture was poured into brine (5 mL) and extracted with EtOAc (2\_10 mL), dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated. When necessary, products were purified by flash chromatography. When the reaction was performed on a higher scale, the workup was not necessary; the product separated from the aqueous phase when liquid or could be recovered by filtration when solid.

Spectra of amminonitrili **1**, **2**, **3**, **4**, **7**, **8**, **11**, **13**, **14**, **19**, **24**, **25**, **27**, **30**, **31**, **34** (trans/cis 88/12) e **37** were consistent con those reported in the literature.

#### {2-[(Ciano-fenil-metil)-ammino]-fenilammino}-fenil-acetonitrile (**5**):

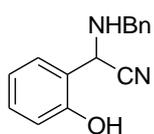
Mixture of diastereoisomers, dr 95/5 determined by NMR on crude. Major stereoisomer: pale yellow solid, mp: 98 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.07$  (bs, 2H, NH), 5.39 (s, 2H, CHCN), 7.02-7.05 (m, 2H, arom), 7.13-7.29 (m, 6H, arom), 7.36-7.42 (m, 3H arom), 7.60-7.63 (m, 2H, arom), 7.80-7.82 (m, 1H, arom);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 48.1, 110.5, 119.3, 122.8, 123.1, 125.7, 127.6, 128.6, 128.8, 129.2, 130.0, 135.4, 135.9, 142.1, 153.9$ ; IR:  $\nu = 3400, 2232, 1605, 1453$ ; anal. calc. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4$ : C 78.08, H 5.36, N 16.56; found: C 77.92, H 5.32, N 16.41.

#### {2-[(Ciano-fenil-metil)-ammino]-etilammino}-fenil-acetonitrile (**6**):

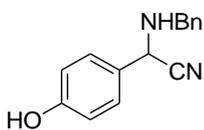
Mixture of diastereoisomers, dr 50/50 determined by GC-MS analysis on trifluoroacetamide derivatives: oil,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.80$  (bs, 2H, 2xNH), 2.83-2.98 (m, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.76 (s, 2H, 2xCHCN), 7.33-7.45 (m, 10H, arom);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 46.0$  (46.2 2<sup>nd</sup> diastereoisomer), 54.1 (54.2, 2<sup>nd</sup> diastereoisomer), 118.7, 127.2, 129.0, 129.1, 134.5; IR:  $\nu = 3330, 2223$ ; anal. calc. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4$ : C 74.46, H 6.25, N 19.30; found: C 74.41, H 6.20, N 19.20.

#### {4-(Ciano-fenil-metil)-piperazin-1-yl}-fenil-acetonitrile (**9**):

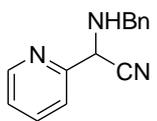
Oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.60$ -2.70 (m, 8H, 2x  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.88 (s, 1H, CHCN); 4.90 (s, 1H, CHCN), 7.35-7.45 (m, 6H, arom), 7.52-7.57 (m, 4H, arom);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 49.3$  (broad signal), 61.9, 115.2, 127.7, 127.8, 127.9, 128.8, 128.9, 129.0, 129.1, 132.6, 132.7; IR:  $\nu = 2224, 1600$ ; GC-MS: rt 25.6 min,  $\text{M}^+$  316,  $[\text{M}^+-\text{CN}]$  290, 200, 116. HPLC-MS: rt 10.55 min,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  339,  $[\text{M} + 1]^+$  317; anal. calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4$ : C 75.92, H 6.37, N 17.71; found: C 76.03, H 6.44, N 17.74.

**Benzylammino-(2-idrossi-fenil)-acetonitrile (10):**

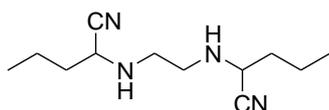
Oil,  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.78 (bs, 1H, NH), 3.94 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.8 Hz, 1H, CHHPh), 4.12 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.8 Hz, 1H, CHHPh), 5.02(s, 1H, CHCN), 6.83-6.89 (m, 2H, arom), 7.19-7.37 (m, 7H, arom);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 50.6, 51.5, 117.6, 120.2, 125.7, 127.5, 128.2, 128.5, 128.6, 131.0, 156.3; IR:  $\nu$  = 3350, 2221, 1620; anal. calc. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ : C 75.61, H 5.92, N 11.76; found: C 75.58, H 5.86, N 11.83.

**Benzylammino-(4-idrossi-fenil)-acetonitrile (12):**

Orange solid, mp: 79 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.82 (bs, 1H, NH), 3.86 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.8 Hz, 1H, CHHPh), 3.97 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.8 Hz, 1H, CHHPh), 4.61(s, 1H, CHCN), 6.76 (m, 2H, arom), 7.26-7.33 (m, 7H, arom);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 50.9, 52.6, 115.8, 118.9, 125.7, 127.5, 128.2, 128.5, 128.6, 137.6, 156.7; IR:  $\nu$  = 3300, 2200, 1654, 1612, 1465; anal. calc. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ : C 75.61, H 5.92, N 11.76; found: C 75.48, H 5.83, N 11.72.

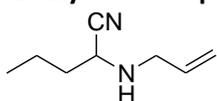
**Benzylammino-pyridin-2-yl-acetonitrile (16):**

Oil;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.75 (bs, 1H, NH), 3.97 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.8 Hz, 1H, CHHPh), 4.04 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.8 Hz, 1H, CHHPh), 4.79(s, 1H, CHCN), 7.25-7.48 (m, 7H, arom), 7.76 (dd, 1H,  $J$  = 10.0 Hz,  $J$  = 10 Hz, arom), 8.60 (d, 1H,  $J$  = 8.0 Hz, arom);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 51.4, 54.9, 122.0, 123.9, 127.7, 128.5, 128.6, 128.8, 137.4, 138.0, 149.9, 153.7; IR:  $\nu$  = 3300, 2228, 1673; anal. calc. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3$ : C 75.31, H 5.87, N 18.82; found: C 75.44, H 5.94, N 18.98. HPLC-MS: rt 7.1 min,  $[\text{M}+1]^+$  224.

**2-[2-(2-Cyano-butylammino)-etilammino]-pentanenitrile (17):**

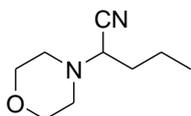
Mixture of diastereoisomers, dr 50/50 determined by GC-MS analysis on trifluoroacetamide derivatives, diastereoisomer separated by flashchromatography. First stereoisomer: oil,  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.97 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.47-1.59 (m, 6H, NH,  $\text{CH}_2$ ), 1.70-1.76 (m, 4H,  $\text{CHCH}_2$ ), 2.72-2.81 (m, 2H, NCHHCHHN), 2.97-3.05 (m, 2H, NCHHCHHN), 3.51-

3.56 (m, 2H, CHCN);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.4, 18.9, 35.3, 35.4, 46.2, 46.8, 50.0, 50.4, 120.1, 120.2; IR:  $\nu$  = 3316, 2225, 1464; HPLC-MS: rt 7.02 min,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  245,  $[\text{M}+1]^+$  223,  $[\text{M}-\text{HCN}]^+$  196. anal. calc. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_4$ : C, 64.83; H, 9.97; N, 25.20; found: C 64.91, H 10.02, N 25.28. Second diastereoisomer: oil,  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.98 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.51-1.64 (m, 6H, NH,  $\text{CH}_2$ ), 1.72-1.78 (m, 4H,  $\text{CHCH}_2$ ), 2.74-2.82 (m, 2H, NCHHCHHN), 3.07-3.00 (m, 2H, NCHHCHHN), 3.53-3.60 (m, 2H, CHCN);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.5, 19.0, 35.4, 35.5, 46.3, 46.9, 50.1, 50.5, 120.2, 120.3; IR:  $\nu$  = 3312, 2224, 1464; anal. calc. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_4$ : C, 64.83; H, 9.97; N, 25.20; found: C 64.76, H 9.92, N 25.18. HPLC-MS: rt 7.05 min,  $[\text{M}+1]^+$  223,  $[\text{M}-\text{HCN}]^+$  196.

**2-Allylammino-pentanenitrile (18):**

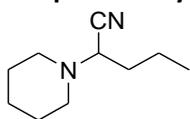
Yellow oil,  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.90 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.40 (bs, 1H, NH), 1.44-1.51 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.68 (dt,  $J$  = 7.2 Hz,  $J$  = 7.6 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 3.23 (ddt,  $J$  = 1.2 Hz,  $J$  = 6.4 Hz,  $J$  = 13.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCN}$ ), 3.43-3.49 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 5.10 (m, 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.21 (m, 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.79 (m, 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  =

13.3, 18.8, 35.3, 49.3, 50.1, 117.3, 120.1, 134.9; IR:  $\nu$  = 3321, 2220, 1644, 1465; anal. calc. for  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2$ : C 69.52, H 10.21, N 20.27; found: C 69.44, H 10.16, N 20.26.

**2-Morpholin-4-yl-pentanenitrile (21):**

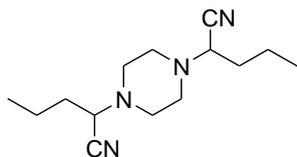
Yellow solid, mp: 159 °C,  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.94 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.41-1.56 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.65-1.79 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.43-2.48 (m, 2H, 2 x NCHH), 2.62-2.68 (m, 2H, NCHH), 3.37 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, CHCN), 3.66-3.76 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{OCH}_2$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.4, 19.2, 32.5, 50.0, 33.0, 57.9, 66.6, 116.9; IR:  $\nu$  = 2223, 1455; anal. calc. for  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ : C 64.25, H 9.59, N 16.65; found: C, H, N. GC-MS: rt 11.7 min,  $\text{M}^+$  168 (2),  $[\text{M}-15]^+$

153 (1),  $[\text{M}-43]^+$ , 125 (100).

**2-Piperidin-1-yl-pentanenitrile (22):**

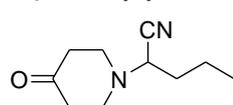
Oil,  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.89 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.36-1.76 (m, 10H, 5 x  $\text{CH}_2$ ), 2.29-2.34 (m, 2H, 2 x NCHH), 2.53-2.59 (m, 2H, NCHH), 3.37 (dd,  $J$  = 6.8 Hz,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, CHCN);  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.3, 19.2, 23.9, 25.7, 33.0, 50.8, 58.3, 117.3; IR:  $\nu$  = 2220, 1465; HPLC-MS: rt 8.8 min,  $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$  189,  $[\text{M}+1]^+$  167,  $[\text{M}-\text{HCN}]^+$  140. anal. calc. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2$ : C 72.24, H 10.91, N 16.85; found: C 72.35, H 10.96, N 16.80.

### 2-[4-(1-Cyano-butyl)-piperazin-1-yl]-pentanenitrile (23):



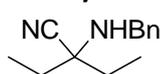
Mixture of diastereoisomers, dr 80/20. Diastereoisomers were separated by flashchromatography. Major diastereoisomer: white solid, mp: 153°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.94 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ ), 1.41-1.54 (m, 4H, 2x  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.65-1.80 (m, 4H, 2x  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.50-2.55 (m, 4H, 2x  $\text{NCHHCHHN}$ ), 2.62-2.72 (m, 4H, 2x  $\text{NCHHCHHN}$ ), 3.49 (t, 2H,  $J$  = 7.6 Hz, 2x  $\text{CHCN}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.4, 19.2, 32.8, 49.2, 57.3, 116.9; IR:  $\nu$  = 3344, 2222; anal. calc. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_4$ : C, 67.70; H, 9.74; N, 22.56; found: C 67.82, H 9.77, N 22.58. HPLC-MS: rt 9.4 min,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  271,  $[\text{M}+1]^+$  249,  $[\text{M}-\text{HCN}]^+$  222. GC-MS (rt 18.9 min)  $\text{M}^+$  248,  $[\text{M}-\text{HCN}]^+$  221. Minor diastereoisomer:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.94 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ ), 1.44-1.52 (m, 4H, 2x  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.69-1.74 (m, 4H, 2x  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.50-2.55 (m, 4H, 2x  $\text{NCHHCHHN}$ ), 2.65-2.72 (m, 4H, 2 x  $\text{NCHHCHHN}$ ), 3.48 (t, 2H,  $J$  = 7.6 Hz, 2x  $\text{CHCN}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.4, 19.1, 32.8, 49.3, 57.3, 116.9. HPLC-MS: rt 9.2 min,  $[\text{M}+1]^+$  249.

### 2-(4-Oxo-piperidin-1-yl)-pentanenitrile (26):



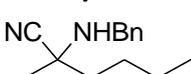
Oil,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.93 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.44-1.51 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.71-1.78 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.38-2.51 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{COCH}_2$ ), 2.66-2.72 (m, 2H,  $\text{CHHNCHH}$ ), 2.89-2.95 (m, 2H,  $\text{CHHNCHH}$ ), 3.58 (t, 1H,  $J$  = 7.6 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.3, 19.2, 33.3, 40.8, 49.4, 56.9, 116.6, 207.2; IR:  $\nu$  = 2223, 1780, 1720; GC-MS: rt 14.0 min,  $\text{M}^+$  180 (5),  $[\text{M}-\text{HCN}]^+$  153 (100), 137. anal. calc. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ : C 66.63, H 8.95, N 15.54; found: C 66.58, H 8.94, N 15.67.

### 2-Benzylammino-2-etil-butyronitrile (28):



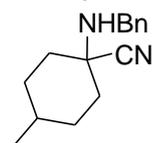
Oil,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.04 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.43 (bs, 1H, NH), 1.77 (nonet,  $J$  = 7.2 Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.81 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 7.19-7.33 (m, 5H, arom);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.6, 29.0, 48.9, 60.5, 121.8, 127.3, 128.3, 128.5, 139.4; IR:  $\nu$  = 3320, 2218, 1457; anal. calc. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2$ : C 77.18, H 8.97, N 13.85; found: C 77.17, H 8.91, N 13.78. HPLC-MS: rt 9.8 min,  $[\text{M}+1]^+$  203,  $[\text{M}-\text{HCN}]^+$  176.

### 2-Benzylammino-2-metil-hexanenitrile (29):



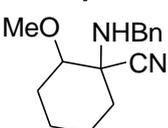
Oil,  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.95 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.32-1.60 (m, 6H, NH,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.70-1.80 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.90 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 7.27-7.40 (m, 5H, arom);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.7, 22.5, 24.6, 25.8, 39.5, 49.0, 55.6, 122.1, 127.2, 18.1, 128.3, 139.1; IR:  $\nu$  = 3318, 2219, 1455; anal. calc. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2$ : C, 77.73; H, 9.32; N, 12.95; found: C 77.82, H 9.41, N 12.91.

### 1-Benzylammino-4-metil-cyclohexanecarbonitrile (33):



Mixture of diastereoisomers, dr 72/38 determined from HPLC analysis on crude. Major diastereoisomer:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.86 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ , minor diast.), 0.88 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ , major diast), 1.23-1.50 (m, 6H, NH, CH,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 1.66-1.69 (m, 2H,  $\text{CHH}$ ,  $\text{CHH}$ , major diast), 1.69-1.79 (m, 2H,  $\text{CHH}$ ,  $\text{CHH}$ , minor diast), 1.86-1.93 (m, 2H,  $\text{CHH}$ ,  $\text{CHH}$ , minor diast), 2.01-2.01 (m, 2H,  $\text{CHH}$ ,  $\text{CHH}$ ), 3.76 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ , minor diast), 3.84 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ , major diast), 7.19-7.28 (m, 5H, arom);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 21.7, 28.0 (minor diast.), 31.1 (major diast), 31.8, 34.0 (minor diast.), 36.2 (major diast.), 48.5 (minor diast.), 48.7 (major diast), 57.7, 121.9 (major diast.), 123.0 (minor diast.), 127.2, 128.3, 128.4, 139.3; IR:  $\nu$  = 3313, 2218, 1453. HPLC-MS: rt 10.4 min (major), rt 11.1 min (minor)  $[\text{M}+1]^+$  229,  $[\text{M}-\text{HCN}]^+$  202.

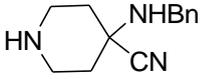
### 1-Benzylammino-2-metossi-cyclohexanecarbonitrile (35):



Mixture of diastereoisomers, dr 57/43. Diastereoisomers were separated by flashchromatography. Major diastereoisomer: oil,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.20-1.30 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHH}$ ), 1.35-1.38 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHH}$ ), 1.48 (bs, 1H, NH), 1.53-1.76 (m, 5H,  $\text{CHHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.10-2.14 (m, 1H,  $\text{CHCHH}$ ), 3.38 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.39 (dd, 1H,  $J$  = 4.4 Hz,  $J$  = 9.6 Hz,  $\text{CHOCH}_3$ ), 3.73 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.0 Hz, 1H,  $\text{CHHPh}$ ), 3.79 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.0 Hz, 1H,  $\text{CHHPh}$ ), 7.18-7.32 (m, 5H, arom);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 19.2, 23.0, 24.8, 32.3, 48.0, 57.5, 59.4, 81.8, 121.9, 127.2, 128.3, 128.4, 139.5; IR:  $\nu$  = 3334, 2210, 1454; HPLC-MS: rt 10.6 min,  $[\text{M}+1]^+$  245,  $[\text{M}-\text{HCN}]^+$  218. anal. calc. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ : C 73.74, H 8.25, N 11.47; found: C 73.64, H 8.12, N 11.31. Minor diastereoisomer: white solid, mp: 69°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.15-1.27 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHH}$ ), 1.29-1.42 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHH}$ ), 1.53-1.76 (m, 2H,  $\text{CHHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.64-1.70 (m, 1H,  $\text{CHCHH}$ ), 1.76-1.81 (m, 1H,  $\text{CHCHH}$ ), 2.08-2.13 (m, 1H,  $\text{CHCHH}$ ), 2.18-2.22 (m, 1H,  $\text{CHCHH}$ ), 2.48 (bs, 1H, NH), 3.08 (dd, 1H,  $J$  = 4.4 Hz,  $J$  = 10.8 Hz,  $\text{CHOCH}_3$ ), 3.31 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.77 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.0 Hz, 1H,  $\text{CHHPh}$ ), 3.84 (d,  $J_{\text{AB}}$  = 12.0 Hz, 1H,  $\text{CHHPh}$ ), 7.19-7.32 (m, 5H, arom);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 22.0, 23.3, 26.5, 33.6, 48.4, 56.7, 62.8, 83.4, 120.0, 127.3, 128.4, 128.5, 139.5; IR:  $\nu$  = 3319,

2219, 1456; HPLC-MS: rt 9.5 min,  $[M+Na]^+$  267,  $[M+1]^+$  245. anal. calc. for  $C_{15}H_{20}N_2O$ : C 73.74, H 8.25, N 11.47; found: C 73.58, H 8.14, N 11.27.

#### 4-Benzylammino-piperidine-4-carbonitrile (36):

 mp: 70°C;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.61 (ddd, 2H,  $J$  = 4.0 Hz,  $J$  = 11.2 Hz,  $J$  = 13.2 Hz, 2xCHHCH<sub>2</sub>N), 1.72 (bs, 2H, 2xNH), 1.94-2.00 (m, 2H, 2xCHHCH<sub>2</sub>N), 2.82 (ddd, 2H,  $J$  = 2.8 Hz,  $J$  = 10.8 Hz,  $J$  = 13.6 Hz, NCHHCH<sub>2</sub>), 3.04 (ddd, 2H,  $J$  = 4.0 Hz,  $J$  = 4.4 Hz,  $J$  = 13.6 Hz, NCHHCH<sub>2</sub>), 3.85 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 7.23-7.37 (m, 5H, arom);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 36.4, 42.6, 48.2, 56.3, 121.5, 127.4, 128.3, 128.5, 139.1; IR:  $\nu$  = 3313, 2218; anal. calc. for  $C_{13}H_{17}N_3$ : C, 72.52; H, 7.96; N, 19.52; found: C 72.61, H 8.04, N 19.41.

### Parte Sperimentale relativa al paragrafo 3.3.1

#### Parte strumentale

Commercial reagents were used as received without additional purification.  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra were recorded with an INOVA 400 or a GEMINI 200 instrument with a 5 mm probe. All chemical shifts were calibrated to deuterated sol- 416 vent signals;  $\delta$  values are quoted in ppm units, and  $J$  values are quoted in Hz. Polarimetric Analyses were conducted with a Unipol L 1000 "Schmidt-Haensch" Polarimeter at 598 nm. FTIR spectra: Thermo Nicolet 380 instrument, measured as films between NaCl plates; wavenumbers are reported in  $cm^{-1}$ . TLC: Merck 60 F254 421 plates. Column chromatography: Merck silica gel 200-300 mesh. GC-MS: Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, EI voltage 70 eV, gradient from 50 to 280 °C in 30 min, column HP5 5% Ph-Me Silicone. HPLC-MS: Agilent Technologies HP1100 instrument, equipped with a ZOBRA-X 426 Eclipse XDB-C8 Agilent Technologies column; mobile phase: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, 0.4 mL/min, gradient from 30 to 80% of CH<sub>3</sub>CN in 8 min, 80% CH<sub>3</sub>CN until 25 min, coupled with an Agilent Technologies MSD1100 single-quadrupole mass spectrometer, full scan mode from  $m/z$  = 50 to 2600, scan time 0.1 s in positive-ion mode, ESI 431 spray voltage 4500 V, nitrogen gas 35 psi, drying gas flow 11.5 mL/min, fragmentor voltage 20 V. Elemental analyses: Thermo Flash 2000 CHNS/O Analyzer. Single-crystal X-ray diffraction data were collected at room temperature with an Oxford Diffraction Xcalibur diffractometer equipped with a Mo-K $\alpha$  radiation source ( $\lambda$  = 436 0.71073 Å) and a Sapphire3 CCD detector. The structure was solved using SHELXS-97 (altro) or SIR-92 (iodioderiv) programs; SHELXL-97 was used for structural refinement.

#### Dati relativi alle strutture a raggi X

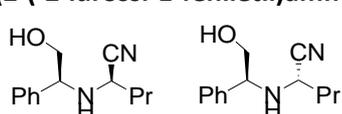
**Crystal Data for 78a:**  $C_{22}H_{26}N_2O$ ,  $M$  = 334.45, space group:  $C2$  (monoclinic),  $a$  = 19.665(4),  $b$  = 6.4176(13),  $c$  = 16.037(5) Å,  $\beta$  = 441 102.86°(3),  $V$  = 1973.2(8) Å<sup>3</sup>,  $Z$  = 4,  $D_c$  = 1.126  $gcm^{-3}$ ,  $\lambda$  (Mo-K $\alpha$ ) = 0.069  $mm^{-1}$ ,  $T$  = 293(2) K, 6912 reflections collected, 1914 unique ( $R_{int}$  = 0.0757), 1010 reflections with  $I \geq 2s(I)$ , 231 parameters,  $R_1$  = 0.0575,  $wR_2$  (all data) = 0.1721. CCDC reference number: 894335. 446

**Crystal Data for 83a:**  $C_{14}H_{15}N_2O_2$ ,  $M$  = 370.18, space group:  $P21$  (monoclinic),  $a$  = 5.7970(15),  $b$  = 15.367(5),  $c$  = 8.313(3) Å,  $\beta$  = 90.950°(3),  $V$  = 740.4(4) Å<sup>3</sup>,  $Z$  = 2,  $D_c$  = 1.660  $gcm^{-3}$ ,  $\lambda$  (Mo-K $\alpha$ ) = 2.162  $mm^{-1}$ ,  $T$  = 293(2) K, 2682 reflections collected, 1885 unique ( $R_{int}$  = 0.0312), 1597 reflections with  $I \geq 2s(I)$ , 161 parameters,  $R_1$  = 0.0505,  $wR_2$  (all data) = 0.1378. CCDC reference number: 894334.

#### Procedura generale per la sintesi dei nitrili:

The chosen aldehyde (1 mmol) and amine (1 mmol) were mixed in an orbital shaker at room temp. in a 5 mL vial equipped with a screw cap. After 10 min, water (4 mL) and acetone cyanohydrin 461 (1 mmol) were added, and the cap was closed. If the amine was used as its hydrochloride, triethylamine (1 mmol) was added prior to the addition of the aldehyde. The mixture was stirred in an orbital shaker for 20 h. The reaction mixture was poured into brine (5 mL) and extracted with  $CH_2Cl_2$  (2\_ 10 mL), then the combined extracts were dried with  $Na_2SO_4$  and concentrated. If necessary, the products were purified by flash chromatography. Diastereomeric ratios were determined from  $^1H$  NMR spectra or HPLC data of the crude material.

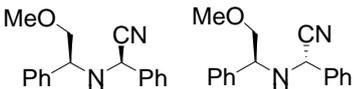
#### (2-(-2-idrossi-1-feniletil)ammino)pentanenitrile (51):



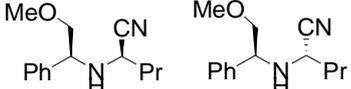
Major diastereoisomer separated by flash-chromatography, minor isomer characterized in the crude. **51a** (2*R*, 2'*S*) major isomer: yellow syrup;  $[\alpha]_D^{25}$

+157.37 (c 0.64, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.48-1.58 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.74-1.79 (dt, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.34 (brs, 2 H, OH e NH), 3.30 (t, *J* = 7.2, 1 H, CHCN), 3.61 (dd, *J* = 9.6, 11.2 Hz, 1 H, CHHOH), 3.80 (dd, *J* = 4.0, 11.2 Hz, 1 H, CHHOH), 4.13 (dd, *J* = 4.0, 9.6 Hz, 1 H, CHPh), 7.28-7.39 (m, 5 H, ArH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 13.4, 18.9, 35.6, 47.7, 63.1, 67.2, 120.1, 127.7, 128.3, 128.8, 138.1 ppm; IR 3415, 3325, 2962, 2932, 2227, 1065 cm<sup>-1</sup>. C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O (218.29): calcd. C 71.53, H 8.31, N 12.83; found C 71.99, H 8.45, N 12.72. HPLC-MS: *R*<sub>t</sub> = 7.35 min, *m/z* = 219 [M + H]<sup>+</sup>, 241 [M + Na]<sup>+</sup>. **(51b)** (2*S*,2'*S*) minor isomer: yellow syrup; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.48-1.58 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.69-1.78 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.46 (brs, 2 H, OH e NH), 3.55-3.88 (m, 3 H, CHCN, CH<sub>2</sub>OH), 3.99 (dd, *J* = 4.4, 7.6 Hz, 1 H, CHPh), 7.28-7.39 (m, 5 H, ArH) ppm. HPLC-MS: *R*<sub>t</sub> = 6.51 min, *m/z* = 219 [M + H]<sup>+</sup>, 241 [M + Na]<sup>+</sup>.

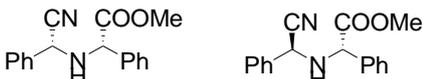
### 2-((-2-metossi-1-fenilettil)ammino)-2-fenilacetoneitrile (53):

 Characterized as diastereomeric mixture, signals refer to major diastereoisomer, only main signals of minor one are reported. **53a** (2*R*, 2'*S*) major isomer + **53b** (2*S*, 2'*S*) minor isomer. Orange oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.33 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub> minor isomer), 3.40 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.46-3.54 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>OMe), 3.96 (dd, 1 H, *J* = 3.2, 8.8 Hz, PhCHCH<sub>2</sub>O, minor) 4.40 (dd, *J* = 5.6, 8.0 Hz, 1 H, PhCHCH<sub>2</sub>O), 4.49 (s, 1 H, CHCN), 4.71 (s, 1 H, CHCN, minor), 7.27-7.43 (m, 6 H, ArH), 7.50-7.54 (m, 4 H, ArH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 51.8, 58.6, 60.6, 76.9, 118.6, 127.2, 127.8, 128.4, 128.7, 128.8, 128.9, 135.1, 138.1 ppm. IR: ν̃ = 3325, 2890, 2228, 1108 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS: *R*<sub>t</sub> = 9.68 min, minor isomer, *m/z* = 240 [M - CN]<sup>+</sup>, 267 [M + 1]<sup>+</sup>; *R*<sub>t</sub> = 10.19 min, major isomer, *m/z* = 240 [M - CN]<sup>+</sup>, 267 [M + 1]<sup>+</sup>.

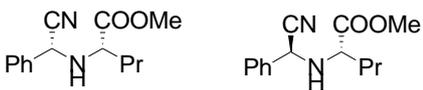
### 2-((2-metossi-1-fenilettil)ammino)pentanenitrile (54):

 Characterized as diastereomeric mixture, signals refer to major diastereoisomer, only main signals of minor one are reported. **54a** (2*R*,2'*S*) major isomer + **54b** (2*S*, 2'*S*) minor isomer. Orange oil <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub> minor) 1.49-1.55 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.63-1.69 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, minor), 1.71-1.78 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H, CHCN), 3.36-3.44 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>OMe), 3.41 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.76 (t, *J* = 6.8 Hz, 1 H, CHCN), 4.13 (dd, *J* = 3.6, 7.6 Hz, 1 H, CHPh), 4.25 (dd, *J* = 5.2, 8.0 Hz, 1 H, CHPh), 7.28-7.39 (m, 5 H, ArH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 13.5, 18.9, 35.8, 47.5, 58.6, 60.2, 77.0, 120.3, 127.7, 128.2, 128.7, 138.4 ppm. IR: ν̃ = 3326, 2962, 2930, 2225, 1689, 1455, 1118 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS: *R*<sub>t</sub> = 9.13 min, minor isomer, *m/z* = 233[M + H]<sup>+</sup>, 438 [2M - CN]<sup>+</sup>; *R*<sub>t</sub> = 9.68 min, major isomer, *m/z* = 233[M + H]<sup>+</sup>, 438 [2M - CN]<sup>+</sup>.

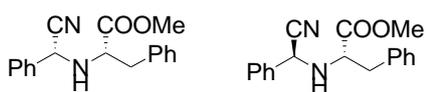
### Metil 2-((cyano(fenil)metil)ammino)-2-fenilacetate (55):

 Characterized as diastereomeric mixture. Yellow oil. **55a** (2*R*,*S*) major isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.78 (dd, *J* = 3.6, 10.4 Hz, 1 H, NH), 3.71 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.50 (d, *J* = 10.4, 1 H, PhCHCO<sub>2</sub>), 4.77 (d, *J* = 3.6, 1 H, CHCN), 7.35-7.55 (m, 5 H, ArH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 51.7, 52.7, 63.2, 118.2, 127.3, 128.1, 128.8, 128.9, 129.0, 129.2, 134.2, 136.1, 171.7 ppm. IR: ν̃ = 3327, 2252, 1739, 1453 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS: *R*<sub>t</sub> = 9.00 min, *m/z* = 254 [M - CN]<sup>+</sup>, 276 [M - HCN + Na]<sup>+</sup>, 281 [M + H]<sup>+</sup>, 303 [M + Na]<sup>+</sup>, 319 [M + K]<sup>+</sup>. **55b** (2*S*, *S*) minor isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.54 (dd, *J* = 6.4, 6.8 Hz, 1 H, NH), 3.74 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.62 (d, *J* = 6.8 Hz, 1 H, PhCHCO<sub>2</sub>), 4.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 1 H, CHCN), 7.35-7.55 (m, 5 H, ArH) ppm. IR: ν̃ = 3327, 2252, 1453 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS: *R*<sub>t</sub> = 8.83 min, *m/z* = 254 [M - CN]<sup>+</sup>, 276 [M - HCN + Na]<sup>+</sup>, 281 [M + H]<sup>+</sup>, 303 [M + Na]<sup>+</sup>, 319 [M + K]<sup>+</sup>.

### Metil 2-((1-cyanobutyl)ammino)-2-fenilacetate (56):

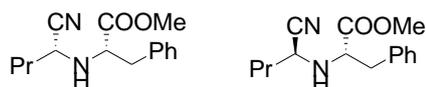
 Characterized as diastereomeric mixture. Yellow oil. **56a** (2*R*,*S*) major isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.47-1.62 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.74-1.80 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.45 (d, *J* = 11.6 Hz, 1 H, NH), 3.25 (dt, *J* = 6.8, 11.6 Hz, 1 H, CHCN), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.64 (s, CHPh, 1 H), 7.33-7.43 (m, 5 H, ArH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 13.3, 18.8, 35.4, 47.4, 52.7, 63.2, 119.7, 128.1, 128.8, 128.9, 137.1, 171.9 ppm. IR: ν̃ = 3331, 3031, 2960, 2875, 2253, 2226, 1739, 1455, 1436 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS: *R*<sub>t</sub> 8.62 min, *m/z* = 220 [M - CN]<sup>+</sup>, 247 [M + 1]<sup>+</sup>, 269 [M + Na]<sup>+</sup>, 285 [M + K]<sup>+</sup>. **56b** (2*R*, *S*) minor isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.47-1.62 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.74-1.80 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.04 (br s, 1 H, NH, minor diast.), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.68-3.76 (m, 1 H, CHCN), 4.65 (s, PhCH, 1 H), 7.33-7.43 (m, 5 H, ArH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 13.4, 18.8, 35.5, 48.8, 52.7, 63.3, 119.8, 127.6, 128.6, 128.7, 136.3, 172.3 ppm. HPLC-MS: *R*<sub>t</sub> 8.32 min *m/z* = 220 [M - CN]<sup>+</sup>, 247 [M + H]<sup>+</sup>, 269 [M + Na]<sup>+</sup>, 285 [M + K]<sup>+</sup>.

### Metil 2-((cyano(fenil)metil)ammino)-3-fenilpropanoate (57).



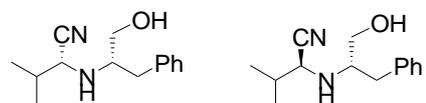
Characterized as diastereomeric mixture. Pale yellow oil. HPLC-MS:  $R_t$  9.40 min (major + minor)  $m/z$  268  $[M - CN]^+$ , 290, 295  $[M + H]^+$ , 317  $[M + Na]^+$ , 333  $[M + K]^+$ . **57a** (2*R*, *S*) major isomer:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 2.42 (bs, 1 H, NH), 2.96 (dd,  $J$  = 8.4, 13.6 Hz, 1 H, PhCHHCH), 3.12 (dd,  $J$  = 5.2, 13.6 Hz, 1 H, PhCHHCH), 3.70 (dd,  $J$  = 5.2, 8.4 Hz, 1 H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.75 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.58 (s, 1 H, CHCN), 7.19-7.56 (m, 10 H, ArH) ppm.  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 39.7, 52.2, 52.9, 60.4, 118.6, 126.9, 127.4, 128.5, 128.9, 129.1, 129.3, 134.3, 136.8, 173.6. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3328, 2952, 2925, 2293, 2229, 1736  $cm^{-1}$ . **57b** (2*S*, *S*) minor isomer:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 2.10 (bs, 1 H, NH), 2.93-3.00 (m, 1H, PhCHH), 3.14 (dd,  $J$  = 5.6, 14.0 Hz, 1 H, PhCHH), 3.79 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3.88 (dd,  $J$  = 5.6, 8.0 Hz, 1 H, CHCH<sub>2</sub>), 4.88 (s 1 H, CHCN), 7.19-7.56 (m, 10 H, ArH.) ppm.  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 39.4, 52.1, 53.3, 59.6, 118.4, 127.1, 127.5, 128.6, 129.0, 129.1, 129.2, 134.2, 136.2, 173.6.

### Metil 2-((1-cyanobutil)ammino)-3-fenilpropanoate (58):



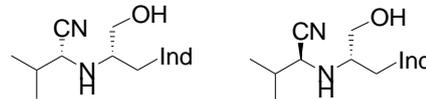
Diastereoisomers separated by flash-chromatography. **58a** (1'*R*, *S*) major isomer: pale yellow oil;  $[\alpha]_D^{20}$  = +292.6 ( $c$  = 1.25,  $CHCl_3$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 0.89 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.40-1.49 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.57-1.69 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.03 (dd,  $J$  = 7.7, 10.4 Hz, 1 H, NH), 2.86 (dd,  $J$  = 7.6, 13.6 Hz, 1 H, CHHPh), 3.02 (dd,  $J$  = 5.6, 13.6 Hz 1 H, CHHPh), 3.27 (dt,  $J$  = 7.2, 10.4 Hz, 1 H, CHCN), 3.62 (ddd,  $J$  = 5.6, 7.6, 7.7 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CHNHCO<sub>2</sub>Me), 3.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.17-7.31 (m, 5 H, ArH) ppm.  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 13.3, 18.7, 35.7, 39.8, 49.4, 52.1, 61.2, 119.9, 126.8, 128.4, 129.3, 136.9, 173.7 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3328, 3002, 2874, 2225, 1956, 1888, 1737, 1205  $cm^{-1}$ . C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (260.33): calcd. C 69.20; H 7.74; N 10.76; found C 69.25, H 7.81, N 10.68. HPLC-MS:  $R_t$  = 9.16 min,  $m/z$  = 261  $[M + 1]^+$ , 283  $[M + Na]^+$ . **58b** (1'*S*, *S*) minor isomer:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 0.91 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.40-1.49 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.57-1.69 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.18 (brs, 1 H, NH), 2.92 (dd,  $J$  = 8.0, 14.0 Hz, 1 H, CHHPh), 3.12 (dd,  $J$  = 5.6, 14.0 Hz 1 H, CHHPh), 3.70-3.76 (m, 1 H, CHCN), 3.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.81-3.86 (m 1 H, CH<sub>2</sub>CHNHCO<sub>2</sub>Me), 7.17-7.31 (m, 5 H, ArH) ppm. HPLC-MS:  $R_t$  = 8.90 min,  $m/z$  = 261  $[M + 1]^+$ , 283  $[M + Na]^+$

### 2-((1-idrossi-3-fenilpropan-2-yl)ammino)-3-metilbutanenitrile (59):



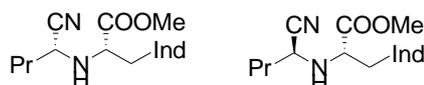
Characterized as diastereomeric mixture enriched in the minor stereoisomer after flashchromatography. Pale yellow oil. **59a** (2*R*, 1'*S*) major isomer:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 0.98-1.03 (m, 6 H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.90-1.96 (m, 1 H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.65 (dd,  $J$  = 7.2, 13.2 Hz, 1 H, CHCHHPh), 2.77 (dd,  $J$  = 6.0, 13.2 Hz, 1 H, CHCHHPh), 3.09-3.16 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.30 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 1 H, CHCHCN), 3.42 (dd,  $J$  = 7.2, 11.2 Hz, 1 H, CHCHHOH), 3.74 (dd,  $J$  = 4.0, 11.2 Hz, 1 H, CHCHHOH), 7.24-7.39 (m, 5 H, ArH) ppm. HPLC-MS:  $R_t$  = 7.22 min, major isomer,  $m/z$  = 206  $[M - CN]^+$ , 233  $[M + H]^+$ , 255  $[M + Na]^+$ . **59b** (2*S*, 1'*S*) minor isomer:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.00 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CHCH<sub>3</sub>), 1.05 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CHCH<sub>3</sub>), 1.61 (bs, 1 H, OH), 1.88-1.99 (m, 1 H, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.14 (bs, 1 H, NH), 2.80 (dd,  $J$  = 8.4, 13.6 Hz, 1 H, CHCHHPh), 2.94 (dd,  $J$  = 6.0, 13.6 Hz, 1 H, CHCHHPh), 3.17-3.22 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.43-3.47 (m, 2 H, CHCHHOH + CHCHCN), 3.66 (dd,  $J$  = 3.2, 11.2 Hz, 1 H, CHCHHOH), 7.24-7.39 (m, 5 H, ArH) ppm.  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 17.9, 19.1, 31.7, 38.0, 54.9, 58.1, 61.9, 119.1, 126.9, 128.8, 129.2, 137.2 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3442, 3338.7, 2963, 2929, 2227, 1120  $cm^{-1}$ . HPLC-MS:  $R_t$  = 6.87 min,  $m/z$  = 206  $[M - CN]^+$ , 233  $[M + H]^+$ , 255  $[M + Na]^+$ .

### 2-((1-idrossi-3-(1H-indol-2-yl)propan-2-yl)ammino)-3-metilbutanenitrile (60):



Characterized as diastereomeric mixture. Pale yellow oil. **60a** (2*R*, 1'*S*) major isomer:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 0.98-1.00 (m, 6 H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.68-2.04 (bs, 2 H, OH + NHCHCN), 1.86-1.97 (m, 1 H, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.01 (ddd,  $J$  = 0.8, 8.0, 14.4 Hz, 1 H, IndCHHCH), 3.07 (ddd,  $J$  = 0.8, 8.4, 14.4 Hz, 1 H, IndCHHCH), 3.28-3.34 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.46-3.53 (m, 2 H, CHCHCN + CHCHHOH), 3.70 (dd,  $J$  = 3.6, 10.8 Hz, 1 H, CHCHHOH), 7.06-7.25 (m, 3 H, ArH), 7.37-7.40 (m, 1 H, ArH), 7.62-7.66 (m, 1 H, ArH), 8.09 (bs, 1 H, NHInd, minor), 8.14 (bs, 1 H, NHInd).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 17.8, 19.1, 26.8, 31.8, 55.2, 57.6, 62.4, 111.2, 111.4, 118.7, 119.5, 119.6, 122.2, 122.5, 127.4, 136.2. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3412, 3057, 2228, 1457, 1031  $cm^{-1}$ . HPLC-MS:  $R_t$  = 7.66 min,  $m/z$  = 245  $[M - CN]^+$ , 294  $[M + Na]^+$ . **60b** (2*S*, 1'*S*) minor isomer:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 0.98-1.00 (m, 6 H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.68-2.04 (bs, 2 H, OH + NHCHCN), 1.86-1.97 (m, 1 H, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.81(ddd,  $J$  = 0.8, 3.6, 14.4 Hz, 1 H, IndCHHCH), 2.96 (ddd,  $J$  = 0.8, 6.0, 14.4 Hz, 1 H, IndCHHCH), 3.23-3.29 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.46-3.53 (m, 2 H, CHCHCN + CHCHHOH), 3.77 (dd,  $J$  = 3.6, 10.8 Hz, 1 H, CHCHHOH), 7.06-7.25 (m, 3 H, ArH), 7.37-7.40 (m, 1 H, ArH), 7.62-7.66 (m, 1 H, ArH), 8.09 (bs, 1 H, NHInd)  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 17.9, 19.2, 27.4, 31.7, 55.3, 58.4, 64.3, 111.2, 111.8, 118.7, 119.5, 119.8, 122.3, 122.6, 127.6, 136.3. HPLC-MS:  $R_t$  = 7.35 min,  $m/z$  = 245  $[M - CN]^+$ , 294  $[M + Na]^+$ .

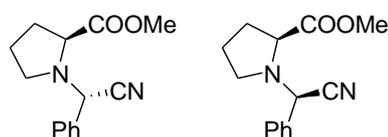
### Metil 2-(1-cyanobutyl)ammino)-3-(1H-indol-2-yl)propanoate (62):



Characterized as diastereomeric mixture. Pale yellow oil. **62a** (1'R, S) major isomer:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.87 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.39-1.53 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.64-1.70 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.74 (bs, 1 H,  $\text{CHNHCHCN}$ ), 3.10 (ddd,  $J$  = 0.8, 7.2, 14.8 Hz,

1 H,  $\text{IndCHHCH}$ ), 3.21 (ddd,  $J$  = 0.8, 5.2, 14.8 Hz, 1 H,  $\text{IndCHHCH}$ ), 3.41 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCN}$ ), 3.71-3.76 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOME}$ ), 3.71 (s, 3 H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 7.07-7.24 (m, 3 H, ArH), 7.35-7.39 (m, 1 H, ArH), 7.61-7.64 (m, 1 H, ArH), 8.08 (bs, 1 H,  $\text{NHInd}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.2, 18.6, 28.9, 35.3, 48.9, 52.1, 60.5, 110.8, 111.1, 118.6, 119.6, 119.9, 122.1, 122.8, 127.3, 136.0, 174.1. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3445, 2977, 2227, 1736, 1494, 1155. HPLC-MS:  $R_t$  = 8.78 min,  $m/z$  = 273 [ $\text{M} - \text{CN}$ ] $^+$ , 300 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , 322 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ . **62b** (1'R, S) minor isomer:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.90 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.39-1.53 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.64-1.70 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 2.09 (bs, 1 H,  $\text{CHNHCHCN}$ ), 3.15 (ddd,  $J$  = 0.8, 8.4, 14.4 Hz, 1 H,  $\text{IndCHHCH}$ ), 3.31 (ddd,  $J$  = 0.8, 4.8, 14.8 Hz, 1 H,  $\text{IndCHHCH}$ ), 3.66 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCN}$ ), 3.73 (s, 3 H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.96 (dd,  $J$  = 5.2, 8.4 Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOME}$ ), 7.07-7.24 (m, 3 H, ArH), 7.35-7.39 (m, 1 H, ArH), 7.61-7.64 (m, 1 H, ArH), 8.12 (bs, 1 H,  $\text{NHInd}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.3, 18.7, 29.2, 35.7, 49.3, 52.1, 59.4, 110.3, 111.2, 118.6, 119.5, 119.9, 122.3, 122.7, 127.3, 136.2, 173.8. HPLC-MS:  $R_t$  = 8.63 min,  $m/z$  = 273 [ $\text{M} - \text{CN}$ ] $^+$ , 300 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , 322 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ .

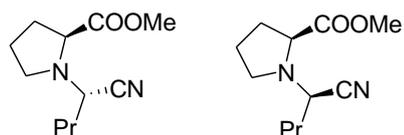
### Metil 1-(cyano(fenil)metil)pyrrolidine-2-carboxylate (70):



Diastereoisomers separated by flash-chromatography. **70a** (S, 1S) major isomer: yellow oil;  $[\alpha]_D^{20}$  = -94.06 ( $c$  = 0.64,  $\text{CHCl}_3$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.79-1.87 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.06-2.14 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.21-2.31 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.55 (dt,  $J$  = 8.8, 8.8 Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 2.72-2.76 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 3.61 (dd,  $J$  = 7.2, 9.2 Hz, 1 H,

$\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 3.80 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 5.37 (s, 1H,  $\text{CHCN}$ ), 7.35-7.43 (m, 3 H, ArH), 7.57-7.60 (m, 2 H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 22.8, 28.8, 48.2, 52.1, 58.1, 63.0, 116.0, 127.6, 128.7, 128.8, 133.8, 173.3 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 2953, 2227, 1743, 1206  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$  (244.29): calcd. C, 68.83; H, 6.60; N, 11.47; found C 69.02, H 6.71, N 11.57. HPLC-MS:  $R_t$  = 8.37 min,  $m/z$  = 245 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , 267 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ . **70b** (S, 1R) minor isomer: yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.58-1.98 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.00-2.09 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.12-2.22 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.91-2.99 (m, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 3.32 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.33-3.38 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 3.48 (dd,  $J$  = 4.0, 9.2 Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCO}_2\text{Me}$ ), 5.17 (s, 1H,  $\text{CHCN}$ ), 7.35-7.41 (m, 3 H, ArH), 7.45-7.52 (m, 2 H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 23.9, 30.4, 51.6, 53.1, 58.7, 61.0, 116.6, 128.3, 128.6, 129.1, 132.9, 174.0 ppm. HPLC-MS:  $R_t$  = 7.27 min,  $m/z$  = 245 [ $\text{M} + 1$ ] $^+$ , 267 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ .

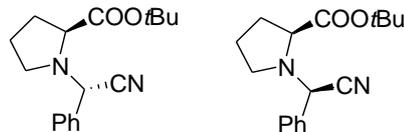
### Metil 1-(1-cyanobutyl)metil)pyrrolidine-2-carboxylate (71):



Major diastereoisomer separated by flash-chromatography, minor one characterized in the crude. **71a** (S, 1S) major isomer: pale yellow oil;  $[\alpha]_D^{20}$  = -64.37 ( $c$  = 1.4,  $\text{CHCl}_3$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.97 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.43-1.60 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.70-1.82 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.87-1.94 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.99-2.07 (m, 1 H,

$\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.12-2.22 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.59 (dt,  $J$  = 8.8, 8.4 Hz, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 3.11 (ddd,  $J$  = 4.4, 6.4, 8.8 Hz, 1H,  $\text{CHHN}$ ), 3.43 (dd,  $J$  = 6.4, 8.4 Hz, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{Me}$ ), 3.73 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.97 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1 H,  $\text{CHCN}$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.3, 19.2, 23.0, 28.6, 34.4, 47.9, 52.0, 54.0, 63.5, 117.8, 173.3 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 2960, 2876, 2223, 1747, 1175  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  (210.14): calcd. C, 62.83; H, 8.63; N, 13.32; found C 62.78, H 8.71, N 13.48. HPLC-MS:  $R_t$  = 7.49 min,  $m/z$  = 130 [ $\text{M} - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CHCN} + 2$ ] $^+$ , 211 [ $\text{M} + 1$ ] $^+$ . **71b** (S, 1R) minor isomer:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.94 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.43-1.60 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.70-1.82 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.87-1.94 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.99-2.07 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.12-2.22 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.80-2.87 (m, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 3.19-3.24 (m, 1H,  $\text{CHHN}$ ), 3.56 (dd,  $J$  = 4.0, 12.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{Me}$ ), 3.76-3.81 (m, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 3.82 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.4, 19.3, 24.1, 29.2, 34.7, 47.9, 51.9, 3.7, 63.5, 118.2, 175.0 ppm. HPLC-MS:  $R_t$  = 6.92 min,  $m/z$  = 211 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ .

### Tert-butyl 1-(cyano(fenil)metil)pyrrolidine-2-carboxylate (72). Diastereoisomers separated by flash-

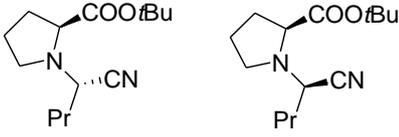


chromatography. **72a** (S, 1S) major isomer: pale yellow oil;  $[\alpha]_D^{20}$  = -54.53 ( $c$  = 0.27,  $\text{CHCl}_3$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.52 (s, 9 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.78-1.84 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.02-2.10 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.16-2.25 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.54 (dt,  $J$  = 7.6, 9.2 Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 2.71 (ddd,  $J$  = 4.4, 6.0, 9.2 Hz, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 3.48 (dd,  $J$  = 6.8, 8.8 Hz, 1 H,

$\text{CHCO}_2\text{tBu}$ ), 5.39 (s, 1H,  $\text{CHCN}$ ), 7.34-7.43 (m, 3 H, ArH), 7.58-7.61 (m, 2 H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 22.7, 28.1, 28.8, 48.2, 58.2, 63.6, 81.4, 116.2, 127.6, 128.7 (2xC), 134.1, 171.9 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 2959,

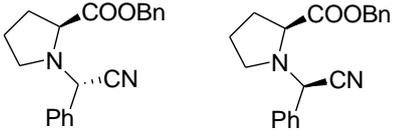
2874, 2227, 1735, 1010  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$  (286.37): calcd. C, 71.30; H, 7.74; N, 9.78; found C, 71.53, H 7.86, N 9.84. HPLC-MS:  $R_t = 10.88$  min,  $m/z = 172$   $[\text{M} - \text{tBu} - \text{CN} + 3]^+$ , 260  $[\text{M} - \text{CN}]^+$ , 287  $[\text{M} + 1]^+$ , 309  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 325  $[\text{M} + \text{K}]^+$ . **72b** (*S*, *1R*) minor isomer: pale yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.57$  (s, 9 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.82-1.89 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHCH}_2$ ), 1.92-1.98 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHCH}_2$ ), 1.99-2.07 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.09-2.18 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.54 (dt,  $J = 6.4, 9.2$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 3.35-3.40 (m, 2 H,  $\text{CHHN}$ ,  $\text{CHCO}_2\text{tBu}$ ), 5.16 (s, 1H,  $\text{CHCN}$ ), 7.35-7.39 (m, 3 H, ArH), 7.52-7.54 (m, 2 H, ArH) ppm. HPLC-MS:  $R_t = 10.09$  min,  $m/z = 172$   $[\text{M} - \text{tBu} - \text{CN} + 3]^+$ , 260  $[\text{M} - \text{CN}]^+$ , 287  $[\text{M} + 1]^+$ , 309  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 325  $[\text{M} + \text{K}]^+$ .

#### Tert-butyl 1-(1-cyanobutyl)pyrrolidine-2-carboxylate (73):



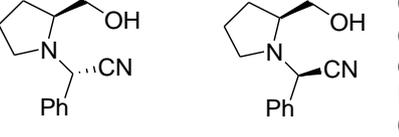
Characterized as diastereomeric mixture. Pale yellow oil. IR:  $\tilde{\nu} = 2964, 2933, 2223, 1739, 1150, 1100$   $\text{cm}^{-1}$ . **73a** (*S*, *1S*) major isomer:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.98$  (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.47 (s, 9 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.49-1.59 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.74-1.81 (m, 1 H,  $\text{CHHCH}_2\text{N}$ ), 1.82-1.91 (m, 1 H,  $\text{CHHCH}_2\text{N}$ ), 1.94-2.02 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCOOCH}_3$ ), 2.07-2.15 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.57 (dt,  $J = 8.0, 8.8$  Hz, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 3.07-3.12 (m, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 3.29 (dd,  $J = 6.8, 8.8$  Hz, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{CH}_3$ ), 3.99 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H,  $\text{CHCN}$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 13.4, 19.3, 22.9, 28.1, 28.6, 34.5, 47.9, 54.1, 64.2, 81.2, 118.1, 171.9$  ppm. HPLC-MS:  $R_t = 10.26$  min,  $m/z = 275$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . **73b** (*S*, *1R*) minor isomer:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.94$  (t,  $J = 7.2$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.46 (s, 9 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.49-1.59 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.74-1.81 (m, 1 H,  $\text{CHHCH}_2\text{N}$ ), 1.82-1.91 (m, 1 H,  $\text{CHHCH}_2\text{N}$ ), 1.94-2.02 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCOOCH}_3$ ), 2.07-2.15 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{CH}_3$ ), 2.77-2.83 (m, 8.8 Hz, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 3.18-3.22 (m, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 3.39 (dd,  $J = 3.2, 9.6$  Hz, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{CH}_3$ ), 3.78 (dd,  $J = 6.4, 9.6$  Hz, 1 H,  $\text{CHCN}$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 13.4, 19.4, 24.3, 27.9, 29.7, 35.0, 47.9, 55.7, 64.2, 80.8, 118.5, 174.0$  ppm. HPLC-MS:  $R_t = 9.68$  min,  $m/z = 275$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

#### Benzyl 1-(cyano(fenil)metil)pyrrolidine-2-carboxylate (74):



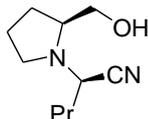
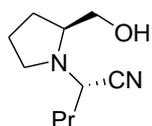
Diastereoisomers separated by flash-chromatography. **74a** (*S*, *1S*) major isomer: pale yellow oil;  $[\alpha]_D^{20} = -65.20$  ( $c = 1.19$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.58-1.87$  (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.09-2.18 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Bn}$ ), 2.21-2.31 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.59 (dt,  $J = 8.0, 8.4$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 2.70-2.75 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 3.65 (dd,  $J = 6.8, 8.8$  Hz, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Bn}$ ), 5.21 (d,  $J_{AB} = 12.4$ , 1 H,  $\text{CHHPh}$ ), 5.26 (d,  $J_{AB} = 12.4$ , 1 H,  $\text{CHHPh}$ ), 5.35 (s, 1H,  $\text{CHCN}$ ), 7.35-7.41 (m, 8 H, ArH), 7.50-7.52 (m, 2H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 22.8, 28.6, 48.1, 58.0, 62.9, 66.6, 115.9, 127.4, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6, 128.7, 133.7, 135.5, 172.4$  ppm. IR:  $\tilde{\nu} = 3064, 3033, 2926, 2850, 2227, 1956, 1888, 1743, 1175$   $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$  (320.38): calcd. C 74.98, H 6.29, N 8.74; found C 75.07, H 6.34, N 8.69. HPLC-MS:  $R_t = 10.86$  min,  $m/z = 321$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 343  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . **74b** (*S*, *1R*) minor isomer: pale yellow oil;  $[\alpha]_D^{20} = -17.93$  ( $c = 0.99$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.88-1.99$  (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.01-2.08 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Bn}$ ), 2.10-2.22 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Bn}$ ), 2.98 (dt,  $J = 6.8, 8.8$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 3.37 (dt,  $J = 2.8, 8.8$  Hz, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 3.52 (dd,  $J = 4.0, 9.6$  Hz, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Bn}$ ), 4.71 (d,  $J_{AB} = 12.0$  Hz, 1 H,  $\text{CHHPh}$ ), 4.80 (d,  $J_{AB} = 12.4$  Hz, 1 H,  $\text{CHHPh}$ ), 5.17 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 7.18-7.20 (m, 2 H, ArH), 7.31-7.39 (m, 6 H, ArH), 7.46-7.51 (m, 2 H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 23.8, 30.4, 52.8, 58.4, 60.9, 66.1, 116.7, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.9, 132.9, 135.4, 173.3$  ppm. IR:  $\tilde{\nu} = 3064, 3033, 2952, 2828, 2226, 1743, 1166$   $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$  (320.38): calcd. C 74.98, H 6.29, N 8.74; found C 75.21, H 6.44, N 8.61. HPLC-MS:  $R_t = 9.98$  min,  $m/z = 321$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 343  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 359  $[\text{M} + \text{K}]^+$ .

#### 2-(2-(idrossimetil)pyrrolidin-1-yl)-2-fenilacetoneitrile (75):



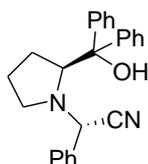
Characterized as diastereomeric mixture. Signals refer to major diastereoisomer, only main signals of minor one are reported. Pale yellow oil **75a** (*2S*, *2'S*) major isomer + **75b** (*2R*, *2'S*) minor isomer:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.67-1.74$  (m, 1 H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CHHCH}$ ), 1.76-1.87 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CHHCH}_2$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CHHCH}$ ), 1.99-2.04 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHCH}_2$ ), 2.15 (bs, 1 H, OH), 2.62 (dt,  $J = 8.8, 9.6$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 2.68-2.73 (m, 1 H,  $\text{CHHN}$ ), 2.88-2.95 (m, 1H, minor), 3.00-3.04 (m, 1H, minor), 3.11-3.16 (m, 1 H,  $\text{CHCH}_2\text{OH}$ ), 3.61 (dd,  $J = 3.6, 11.2$  Hz, 1 H,  $\text{CHCHHOH}$ ), 3.82 (dd,  $J = 3.2, 11.2$  Hz, 1 H,  $\text{CHCHHOH}$ ), 5.11 (s, 1H,  $\text{CHCN}$  minor), 5.27 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 7.37-7.42 (m, 3 H, ArH), 7.43-7.52 (m, 2 H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 23.1, 27.5, 49.2, 57.9, 62.6, 63.2, 116.3, 127.5, 128.7, 128.8, 134.1$  ppm. IR:  $\tilde{\nu} = 3424, 3063, 3033, 2924, 2875, 2227, 1602, 1452, 1077$   $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS:  $R_t = 5.36$  min, minor isomer,  $m/z = 190$   $[\text{M} - \text{CN}]^+$ ;  $R_t = 6.38$  min, major isomer,  $m/z = 217$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 190  $[\text{2M} - \text{CN}]^+$ . Compound **75a** was obtained also starting from **70a** through reduction of ester function con  $\text{NaBH}_4$  (see electronic supplementary information for details).

#### 2-(2-(idrossimetil)pyrrolidin-1-yl)pentanenitrile (76).



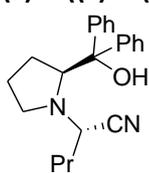
Characterized as diastereomeric mixture. Signals refer to major diastereoisomer, only main signals of minor one are reported. Pale yellow oil. **76a** (2*S*, 2'*S*) major isomer + **76b** (2*R*, 2'*S*) minor isomer:  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.98 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.46-1.56 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.71-1.87 (m, 4 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.92-1.98 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 2.63 (dt,  $J$  = 6.8, 8.8 Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 2.7-2.83 (m, 1H, minor), 2.92-2.97 (m, 1 H,  $\text{CHCH}_2\text{OH}$ ), 3.03-3.08 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 3.11-3.17 (m, 1H, minor), 3.46 (ddd,  $J$  = 3.6, 8.8, 12.0, 1 H,  $\text{CHCHHOH}$ ), 3.63 (ddd,  $J$  = 2.8, 2.8, 12.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHOH}$ ), 3.72 (dd,  $J$  = 6.0, 9.2 Hz 1H,  $\text{CHCN}$  minor), 3.83 (dd,  $J$  = 7.6, 8.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCN}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.4, 19.3, 23.4, 27.2, 34.7, 48.7, 53.5, 62.5, 62.8, 118.0 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3423, 2962, 2960, 2875, 2224, 1640, 1043  $\text{cm}^{-1}$

**(S)-2-((S)-2-(idrossidifenilmetil)pyrrolidin-1-yl)-2-fenilacetoneitrile (77a):**



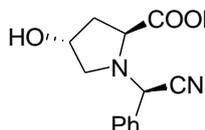
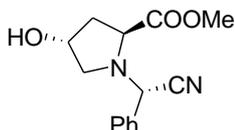
White solid. m.p. 105-112 °C.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = +21.39 ( $c$  = 0.38,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.55-1.79 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.84-1.91 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHCHC}(\text{Ph})_2\text{OH}$ ), 2.04-2.14 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHCHC}(\text{Ph})_2\text{OH}$ ), 2.67-2.76 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.03 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 4.15 (bs, 1H, OH), 4.33 (dd,  $J$  = 4.4, 9.2 Hz, 1 H,  $\text{CHHCHC}(\text{Ph})_2\text{OH}$ ), 7.17-7.23 (m, 3 H, ArH), 7.29-7.38 (m, 8 H, ArH) 7.60-7.62 (m, 2 H, ArH), 7.78-7.80 (m, 2 H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 23.8, 29.4, 50.7, 59.1, 68.9, 78.2, 116.6, 125.2, 125.4, 126.7, 127.1, 127.4, 128.3, 128.7, 128.8, 128.9, 133.9, 145.5, 147.1 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3500, 2970, 1682, 1596  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$  (368.47): calcd. C 81.49, H 6.57, N 7.60; found C 81.62, H 6.68, N 7.51 HPLC-MS:  $R_t$  = 12.07 min,  $m/z$  = 342  $[\text{M} - \text{CN}]^+$ , 369  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 391  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

**(S)-2-((S)-2-(idrossidifenilmetil)pyrrolidin-1-yl)pentanenitrile (78a):**



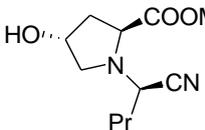
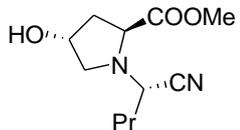
White solid; m.p. 107-114 °C.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = -36.21 ( $c$  = 0.62,  $\text{CHCl}_3$ ),  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.66 (t,  $J$  = 6.8, 1 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.06-1.16 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.37-1.46 (m, 1 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHH}$ ), 1.48-1.58 (m, 1 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHH}$ ), 1.73-1.84 (m, 3 H,  $\text{CHHCHHCHC}(\text{CPh}_2\text{OH})$ ), 1.93-2.06 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHCH}(\text{CPh}_2\text{OH})$ ), 2.71-2.79 (m, 2H,  $\text{CHCN} + \text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 3.09-3.14 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHHN}$ ), 3.96 (bs, 1 H, OH), 4.10 (dd,  $J$  = 3.6, 9.2 Hz,  $\text{CH}(\text{CPh}_2\text{OH})$ ), 7.16-7.21 (m, 2 H, ArH), 7.27-7.34 (m, 4 H, ArH) 7.53-7.56 (m, 2 H, ArH), 7.61-7.63 (m, 2 H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.0, 18.9, 24.0, 28.9, 34.5, 50.1, 54.7, 69.6, 77.9, 118.4, 125.1, 125.4, 126.5, 126.8, 128.1, 128.5, 145.4, 147.1. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3411, 3066, 3023, 2923, 2224, 1141  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$  (334.45): calcd. C 79.00, H 7.84, N 8.38; found C 79.28, H 7.92, N 8.44. HPLC-MS:  $R_t$  = 11.78 min,  $m/z$  = 308  $[\text{M} - \text{CN}]^+$ , 335  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

**Metil 1-(cyano(fenil)metil)-4-idrossipyrrolidina-2-carboxylate (79):**



Diastereoisomers separated by flash-chromatography. **79a** (2*S*,4*R*,1'*S*) major isomer: white solid; m.p. 88-92 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = -74.20 ( $c$  = 1.5,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.77 (bs, 1 H, OH), 2.23-2.27 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CHCO}_2\text{Me}$ ), 2.57 (dd,  $J$  = 4.0, 10.4 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 3.08 (dd,  $J$  = 5.2, 10.4 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 3.80 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.92 (dd,  $J$  = 7.6, 8.8 Hz, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 4.37-4.42 (m, 1 H,  $\text{CHOH}$ ), 5.38 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 7.37-7.43 (m, 3 H, ArH), 7.57-7.59 (m, 2 H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 38.7, 52.2, 56.7, 57.9, 61.6, 69.2, 116.2, 127.5, 128.8, 128.9, 133.5, 172.8 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3178, 2227, 1740, 1207  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$  (260.29): calcd. C 64.60, H 6.20, N 10.76; found C 65.02, H 6.18, N 10.68. HPLC-MS:  $R_t$  = 5.41 min,  $m/z$  = 234  $[\text{M} - \text{CN}]^+$ , 261  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 283  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . **79b** (2*S*,4*R*,1'*R*) minor isomer: white solid; m.p. 103-104 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = -13.10 ( $c$  = 1.5,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.99 (bs, 1 H, OH), 2.11 (dddd,  $J$  = 0.8, 4.8, 8.4, 9.2 Hz 1 H,  $\text{CHCHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.18-2.25 (m, 1H,  $\text{CHCHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.89 (ddd,  $J$  = 0.8, 4.0, 9.6 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 3.38 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.55 (dd,  $J$  = 4.8, 9.6 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 3.75 (dd,  $J$  = 6.4, 8.4 Hz, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 4.55-4.60 (m, 1 H,  $\text{CHOH}$ ), 5.16 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 7.37-7.41 (m, 3 H, ArH), 7.47-7.50 (m, 2 H, ArH) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 39.4, 51.7, 57.9, 59.6, 60.6, 69.8, 116.6, 128.3, 128.7, 129.2, 132.4, 173.2 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3377, 2943, 2230, 1739, 1207  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$  (260.29): calcd. C 64.60, H 6.20, N 10.76; found C 64.81, H 6.29, N 10.64. HPLC-MS:  $R_t$  = 3.99 min,  $m/z$  = 234  $[\text{M} - \text{CN}]^+$ , 261  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 283  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 543  $[\text{2M} + \text{Na}]^+$ .

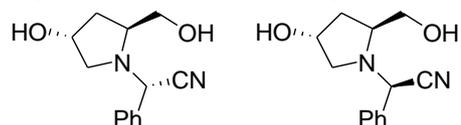
**Metil 1-(1-cyanobutil)-4-idrossipyrrolidina-2-carboxylate (80):**



Diastereoisomers separated by flash-chromatography. **80a** (2*S*,4*R*,1'*S*) major isomer: pale yellow oil;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = -103.90 ( $c$  = 0.6,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.97 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.48-1.60 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.73-1.79 (m, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ , OH), 2.12-2.24 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CHCO}_2\text{Me}$ ), 2.63 (dd,  $J$  = 3.6, 10.4, 1 H,  $\text{CHHCHHN}$ ), 3.43 (dd,  $J$  = 5.2, 10.4, 1 H,  $\text{CHHCHHN}$ ), 3.73-3.78 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 3.75 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.99 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1 H,  $\text{CHHCHCN}$ ), 4.45-4.51 (m, 1 H,  $\text{CHOH}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 12.9,

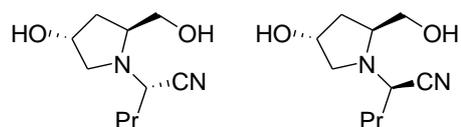
18.7, 34.0, 38.1, 51.8, 53.5, 56.0, 61.7, 68.6, 117.5, 172.7 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3450, 2959, 2874, 2226, 1743, 1438, 1090  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$  (226.27): calcd. C 58.39, H 8.02, N 12.38; found C 58.48, H 8.11, N 12.21. HPLC-MS:  $R_t$  = 3.99 min,  $m/z$  = 200 [M - CN]<sup>+</sup>, 227 [M + H]<sup>+</sup>, 249 [M + Na]<sup>+</sup>. **80b** (2*S*,4*R*,1'*R*) minor isomer: 0.94 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.42-1.57 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.59-1.72 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.87 (bs, 1 H, OH), 2.14 (dddd,  $J$  = 0.8, 5.6, 8.4, 14.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.22-2.28 (m, 1 H,  $\text{CHCHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.82 (ddd,  $J$  = 0.8, 4.4, 10.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 3.42 (dd,  $J$  = 5.6, 10 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 3.75 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.76-3.82 (m, 2 H,  $\text{CHCO}_2\text{Me}$  +  $\text{CHCN}$ ), 4.52-4.58 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ ). HPLC-MS:  $R_t$  = 3.31 min,  $m/z$  = 200 [M - CN]<sup>+</sup>, 227 [M + H]<sup>+</sup>, 249 [M + Na]<sup>+</sup>.

### 2-(4-idrossi-2-(idrossimetil)pyrrolidin-1-yl)-2-fenilacetoneitrile (**81**):



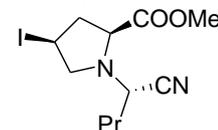
**81a** (2*S*, 4*R*, 1'*S*, major) Obtained pure e characterized after spontaneous isomerization of a **81a/81b** mixture. Pale yellow solid; m.p. 105.2-107.1 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  = -110.91 ( $c$  = 0.66, MeOH). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.95 (ddd,  $J$  = 4.4, 8.0 e 13.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHCH}$ ), 1.92-2.11 (bs, 2H, OH), 2.06 (ddd,  $J$  = 6.8, 8.4 e 13.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHCH}$ ), 2.59 (dd,  $J$  = 4.8, 10.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 3.01 (dd,  $J$  = 6.0, 10.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 3.39-3.45 (m, 1 H,  $\text{CHHCHCH}_2\text{OH}$ ), 3.62 (dd,  $J$  = 4.0, 12.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHOH}$ ), 3.85 (dd,  $J$  = 3.2, 12.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHOH}$ ), 4.31-4.36 (m, 1 H,  $\text{CHOH}$ ), 5.32 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 7.37-7.42 (m, 3 H, ArH), 7.48-7.51 (m, 2 H, ArH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 37.1, 57.4, 57.7, 61.5, 62.7, 69.4, 116.4, 127.4, 128.9 (2xC), 133.7 ppm. IR (nujol):  $\tilde{\nu}$  = 3334, 2229  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$  (232.28): calcd. C 67.22, H 6.94, N 12.06; found C 66.89, H 6.98, N 11.99. HPLC-MS:  $R_t$  = 2.49 min (major + minor),  $m/z$  = 206 [M - CN]<sup>+</sup>, 233 [M + H]<sup>+</sup>, 255 [M + Na]<sup>+</sup>, 487 [2M + Na]<sup>+</sup>. **81b** (2*S*, 4*R*, 1'*R*) minor isomer: obtained only as a diastereomeric mixture, only main signals are reported <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.85 (dd,  $J$  = 5.2, 11.6 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHOH}$ ), 4.40-4.50 (m, 1 H,  $\text{CHOH}$ ), 5.16 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ) ppm. Product **81a** was also obtained starting from **79a** through reduction of ester function con  $\text{NaBH}_4$  (see electronic supplementary information for details)

### 2-(4-idrossi-2-(idrossimetil)pyrrolidin-1-yl)pentanenitrile (**82**):



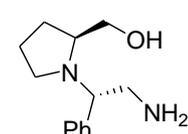
Characterized as diastereomeric mixture, signals refer to major diastereoisomer, only main signals of minor one are reported. **82a** (2*S*,4*R*, 2'*S*) major isomer + **82b** (2*S*, 4*R*, 2'*S*) minor isomer. pale yellow oil; H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.97 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 0.98 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ , minor) 1.45-1.68 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.66-1.79 (m, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.89 (ddd,  $J$  = 4.0, 7.6 e 13.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHCH}$ ), 1.96-2.07 (m, 1 H,  $\text{CHCHHCH}$ ), 2.63 (dd,  $J$  = 4.0, 9.6 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 2.77 (dd,  $J$  = 5.6, 9.6 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ , minor), 3.20-3.26 (m, 1 H,  $\text{CHCHCH}_2\text{OH}$ ), 3.34 (dd,  $J$  = 5.6, 10.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHN}$ ), 3.48 (dd,  $J$  = 3.2, 12.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHOH}$ ), 3.55-3.59 (m, 1H, ,  $\text{CHCHHOH}$  minor), 3.68 (dd,  $J$  = 3.2, 12.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCHHOH}$ ), 3.77 (dd,  $J$  = 6.4, 10.0 Hz, 1H,  $\text{CHCN}$ , minor), 3.87 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 4.40 (m, 1 H,  $\text{CHOH}$ ) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.3, 19.2, 34.6, 36.9, 53.2, 57.0, 61.5, 61.7, 69.7, 118.1 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3406, 2961, 2874, 2226, 1097  $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS:  $R_t$  = 1.79 min (major + minor)  $m/z$  = 172 [M - CN]<sup>+</sup>, 199 [M + 1]<sup>+</sup>, 221 [M + Na]<sup>+</sup>. Product **82a** was also obtained starting from **75a** through reduction of ester function con  $\text{NaBH}_4$  (see electronic supplementary information for details)

### (2*S*,4*S*)-metil-1-((*S*)-ciano(fenil)metil)-4-iodopyrrolidine-2-carboxylate (**83a**):



To a stirred solution of **79a** (134 mg, 0.51 mmol) e trifenil phosphine (161 mg, 0.61 mmol) in 1.5 mL of THF at 0 °C a 40% solution of DEAD in toluene (107 mg, 0.61 mmol) was added dropwise followed by addition of metil iodide (38  $\mu\text{L}$ , 0.61 mmol). After 20 min, the solution was allowed to warm to room temperature e stirred for 5 h until completion (TLC control). The reaction mixture was concentrated to dryness under reduced pressure e the residue was purified by flash chromatography obtaining **83a** (153 mg, 0.41 mmol) in 81% yield as a white solid. M.p. 80-85 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  = -28.55 ( $c$  = 0.20,  $\text{CHCl}_3$ ), <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.66 (ddd,  $J$  = 6.0, 6.4, 14.4 Hz, 1 H,  $\text{CHICHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.91 (ddd,  $J$  = 6.8, 9.2, 14.4 Hz, 1 H,  $\text{CHICHHCHCO}_2\text{Me}$ ), 2.99 (dd,  $J$  = 4.0, 11.2 Hz, 1 H,  $\text{NCHHCHI}$ ), 3.05 (dd,  $J$  = 6.0, 11.2 Hz, 1 H,  $\text{NCHHCHI}$ ), 3.76 (dd,  $J$  = 6.8, 8.8 Hz,  $\text{CH}_2\text{CHCO}_2\text{Me}$ ), 3.84 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 4.32 (m, 1 H,  $\text{CHI}$ ), 5.49 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 7.37-7.46 (m, 3 H, ArH), 7.64-7.66 (m, 2 H, ArH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 15.3, 41.8, 52.5, 57.8, 59.1, 62.2, 116.4, 127.3, 128.9, 129.0, 133.2, 171.8 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3028, 2950, 2230, 1746, 1493, 1130  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{IN}_2\text{O}_2$  (370.19): calcd. C 45.52, H 4.08, N 7.57; found C 45.62, H 4.11, N 7.42. HPLC-MS,  $R_t$  = 9.93 min,  $m/z$  371 [M + H]<sup>+</sup>, 393 [M + Na]<sup>+</sup>.

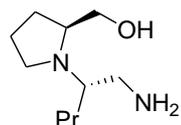
### ((*S*)-1-((*S*)-2-ammino-1-feniletil)pyrrolidin-2-yl)methanol (**84a**):



To a stirred solution of cyano ester **70a** (0.2 mmol) in THF (1.7 mL) at 0° under inert

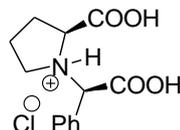
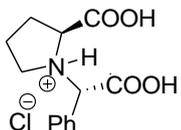
atmosphere a solution of 2 M LiAlH<sub>4</sub> (500 μL) dropwise. After 15 minutes, the solution was allowed to warm to room temperature. The reaction course was monitored by TLC e at completion after 4 hours a saturated solution of Na-K tartrate salt was added con vigorous stirring to favor phase separation. The separated organic phases were dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated e purified by flash chromatography (eluent CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 60/30/1) to yield product **84a** in 39% yield.  $[\alpha]_D^{20} = +1.68$  (*c* = 0.31, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400MHz): δ 1.62-1.71 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.78-1.87 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.66 (m, 1H, NCHHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.91 (m, 1H, NCHHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.15 (m, 2H, CHN + CH<sub>2</sub>OH), 3.35 (dd, *J* = 4.4Hz, 12.4Hz; 1H, CH<sub>2</sub>OH), 3.74 (dd, *J* = 4.8Hz, 10.8Hz, 1H, PhCHN), 7.40-7.53 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 50.3MHz): δ 24.4, 28.7, 43.6, 52.9, 60.6, 64.9, 68.0, 127.7, 127.9, 128.3, 128.6, 128.8, 139.2; IR (neat,  $\tilde{\nu}$  = 3358, 2924, 1599, 1493, 1453, 1379, 1074, 1040, 766, 735, 704. cm<sup>-1</sup>). HPLC-MS: *m/z* (*t<sub>r</sub>* = 1.26 min; 221 [M + H]<sup>+</sup>).

**((S)-1-((S)-1-amminopentan-2-yl)pyrrolidin-2-yl)methanol (85a):**



Same procedure as above starting from **71a**. Yield 36%. orange oil;  $[\alpha]_D^{20} = +68.0$  (*c* = 1.50, CHCl<sub>3</sub>), <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.31-1.46 (m, 4 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.63-1.82 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.61-2.82 (m, 4 H, CHCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> + NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.97-3.13 (m, 5 H, NCHCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> + CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>OH + OH + NH<sub>2</sub>), 3.30 (dd, *J* = 4.8, 10.8 Hz, 1 H, CHHOH), 3.48 (dd, *J* = 3.6, 10.8 Hz, 1 H, CHHOH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.3, 20.4, 24.5, 29.0, 31.7, 42.4, 50.0, 58.8, 60.9, 64.4 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3280, 2957, 2927, 2870, 1660, 1106 cm<sup>-1</sup>. C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O (186.29): calcd. C 64.47, H 11.90, N 15.04; found C 64.58, H 11.99, N 14.78.

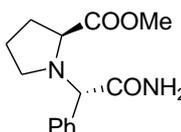
**2-Carboxy-1-(carboxy(fenil)metil)pyrrolidin-1-ium hydrogen chloride (86):**



A solution of **70a** (2.75 mmol, 670 mg) in HCl 37% (12 mL) was refluxed for 24 h e after completion the water was removed. The crude was washed con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to obtain **86** as a mixture of diastereoisomers in 88% yield (de 78/22).

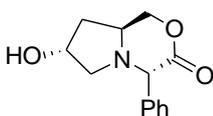
Characterized as diastereomeric mixture. Signals refer to major diastereoisomer, only main signals of the minor one are reported. White solid. **86a** (2*S*, *S*) major isomer + **86b** (2*S*, *R*) minor isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 2.02-2.31 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> + CH<sub>2</sub>CHHCHCO<sub>2</sub>H), 2.39-2.46 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHHCHCO<sub>2</sub>H), 2.54-2.64 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHHCHCO<sub>2</sub>H, minor), 3.36-3.46 (m, 1 H, NCHHCH<sub>2</sub>, minor), 3.56-3.62 (m, 1 H, NCHHCH<sub>2</sub>), 3.59-3.67 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHHN, minor), 3.95-4.01 (m, 1 H, NCHHCH<sub>2</sub>), 4.39-4.43 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCO<sub>2</sub>H, minor), 4.49 (dd, *J* = 6.4, 9.2 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCO<sub>2</sub>H), 5.45 (s, 1H, PhCH, minor), 7.51-7.62 (m, 5H, Ph). **53a**, <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 25.2, 31.4, 57.9, 67.7, 72.3, 131.3, 131.5, 132.2, 132.9, 170.7, 171.8 ppm. HPLC-MS: *R<sub>t</sub>* = 1.48 min, *m/z* = 250.

**(S)-metil-1-((S)-2-ammino-2-oxo-1-feniletil)pyrrolidine-2-carboxylate (87a):**



In a 5 mL vial equipped con a screw cap the metilester **70a** (1.64 mmol, 400 mg) was added con acetic acid (9.84 mmol, 637 μL), water (6.56 mmol, 118 μL), TiCl<sub>4</sub> (3.28 mmol, 360 μL) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) in this order. The solution was stirred overnight on an orbital shaker e the reaction was monitored by TLC. When the reaction was complete, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added e the organic phase was separated e discharged. The aqueous solution was treated con saturated NaHCO<sub>3</sub> till basic pH e then extracted 3 times con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The collected organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrated in vacuo to afford **87a** in quantitative yield. White solid m.p. 149.2-153.9°C;  $[\alpha]_D^{20} = +2.83$  (*c* = 1.20, CHCl<sub>3</sub>), <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.81-1.96 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> + CH<sub>2</sub>CHHCHCO<sub>2</sub>Me), 2.00-2.08 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHHCHCO<sub>2</sub>Me), 2.71-2.77 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHHN), 3.27-3.32 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHHN), 3.36 (dd, *J* = 4.0, 9.6 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCO<sub>2</sub>Me), 3.50 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.24 (s, 1H, PhCHCONH<sub>2</sub>), 5.73 (bs, 1H, CONHH), 7.29-7.33 (m, 5 H, ArH), 7.66 (br. s, 1 H, CONHH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 24.2, 30.6, 51.7, 54.4, 61.7, 73.2, 128.5, 128.6, 129.2, 136.5, 174.8, 175.9 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3397, 2919, 1725, 1667, 1129 cm<sup>-1</sup>. C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (262.30): calcd. C 64.10, H 6.92, N 10.68; found C 63.99, H 6.94, N 10.72. HPLC-MS: *R<sub>t</sub>* = 3.41 min, *m/z* = 263 [M + H]<sup>+</sup>, 285 [M + Na]<sup>+</sup>, 547 [2M + Na]<sup>+</sup>.

**(4*S*,7*R*,8*aS*)-7-idrossi-4-feniltetrahydro-1H-pyrrolo[2,1-*c*][1,4]oxazin-3(4H)-one (88a).**



The product was obtained in 40% yield after flash chromatography con the same procedure reported for the obtainment of amide **87a** starting from amminol **81a**. Pale yellow oil:  $[\alpha]_D^{20} = -2.47$  (*c* = 0.15, CHCl<sub>3</sub>), <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.92 (ddd, *J* = 4.8, 9.6, 14.0 Hz, 1 H, CHOHCHHCH), 2.09-2.17 (m, 1 H, CHOHCHHCH), 2.91 (dd, *J* = 3.6, 10.0 Hz, 1 H, NCHHCHOH), 3.12-1.15 (d, *J* = 10.0 Hz, 1 H, NCHHCHOH), 3.84-3.92 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>OCO), 4.14 (dd, *J* = 4.8, 11.6 Hz CHCHHOCO), 4.17 (dd, *J* = 4.4, 11.6 Hz, CHCHHOCO), 4.49-4.51 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>), 4.60 (s, 1 H, CHPh), 7.37-7.40 (m, 3 H, ArH), 7.64-7.66 (m, 2 H, ArH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 37.6, 52.9, 62.2, 65.8, 68.4, 71.3, 127.1, 128.2, 128.7, 135.5, 170.9 ppm. IR:  $\tilde{\nu}$  = 3362, 2924,

2853, 1737, 1042  $\text{cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3$  (233.26): calcd. C 66.94, H 6.48, N 6.00; found C 66.88, H 6.53, N 6.09. HPLC-MS,  $R_t = 2.44$  min,  $m/z = 234$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 256  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 272  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , 489  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ .

### **Correlazione chimica**

#### Chemical shift protoni in alfa ai nitrili

Chemical shift of the proton on the carbon  $\alpha$  to the CN group and HPLC retention times of major and minor isomer of products **46-62** and **70-82**.

Product	$\alpha$ - $R_1$ CHCN (ppm) major isomer (a)	$\alpha$ - $R_1$ CHCN (ppm) minor isomer (b)	HPLC $R_t$ (min) major isomer (a)	HPLC $R_t$ (min) minor isomer (b)
<b>46</b>	4.42	4.77	9.95	9.66
<b>47</b>	3.18	3.74	8.12	8.89
<b>48</b>	2.83	3.32	10.76	10.55
<b>49</b>	3.00	3.45	9.64	9.31
<b>50</b>	4.50	4.71	7.46	8.01
<b>51</b>	3.30	3.88	7.35	6.51
<b>52</b>	3.08	3.44	-	-
<b>53</b>	4.49	4.71	10.19	9.68
<b>54</b>	3.25	3.76	9.62	9.13
<b>55</b>	4.77	4.87	9.00	8.83
<b>56</b>	3.25	3.73	8.62	8.32
<b>57</b>	4.58	4.88	-	-
<b>58</b>	3.27	3.73	9.16	8.90
<b>59</b>	3.30	3.47	7.22	6.87
<b>60</b>	3.46-3.53	3.46-3.53	7.66	7.35
<b>61</b>	4.60	4.80	-	-
<b>62</b>	3.41	3.66	8.78	8.63
<b>70</b>	5.37	5.17	8.37	7.27
<b>71</b>	3.97	3.80	7.49	6.92
<b>72</b>	5.39	5.16	10.88	10.09
<b>73</b>	3.99	3.78	10.26	9.68
<b>74</b>	5.35	5.17	10.86	9.98
<b>75</b>	5.27	5.11	6.38	5.36
<b>76</b>	3.83	3.72	-	-
<b>77</b>	4.03	-	12.07	-
<b>78</b>	2.71	-	11.78	-
<b>79</b>	5.38	5.16	5.41	3.99
<b>80</b>	3.99	3.76	3.99	3.31
<b>81</b>	5.32	5.16	-	-
<b>82</b>	3.87	3.77	-	-

---