

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

*DOTTORATO DI RICERCA IN*

*Scienze Chimiche*

*Ciclo XXII*

**Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: CHIM 06**

TITOLO TESI

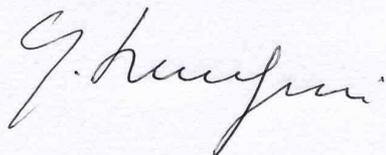
***Progettazione e sintesi di nuovi derivati azetidionici  
biologicamente attivi***

**Presentata da: Dott.ssa CATERINA VENTRICI**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof. GIULIANO LONGONI**



**Prof.ssa DARIA GIACOMINI**



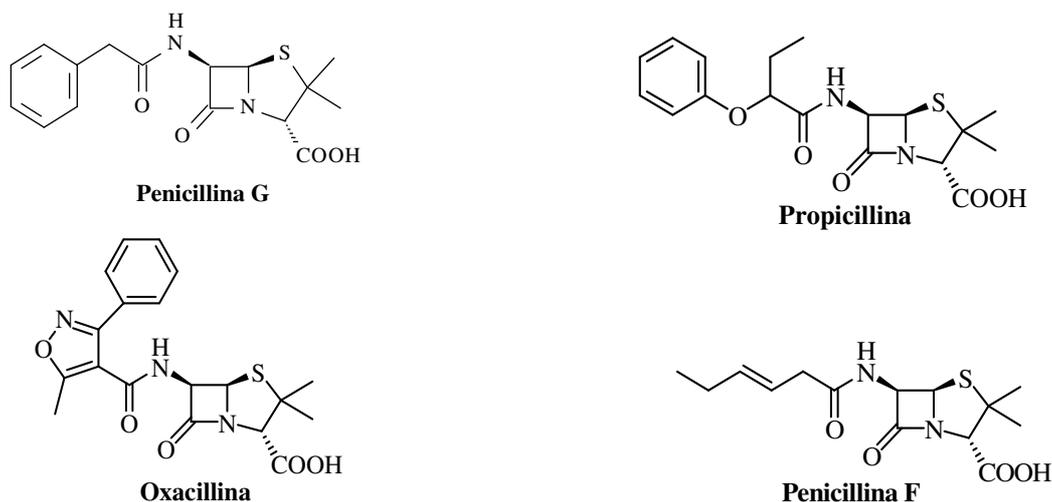
**Esame finale anno 2010**

## Capitolo I Introduzione

### 1.1 I $\beta$ -lattami: antibiotici ed inibitori enzimatici

Fra le sostanze organiche naturali, i  $\beta$ -lattami ricoprono un ruolo fondamentale, sia per le loro ben note proprietà antibatteriche, sia per l'attività inibitoria, di più recente scoperta, esplicitata nei confronti di un elevato numero di enzimi.

Il primo derivato azetidionico biologicamente attivo fu la penicillina G scoperta da Fleming nel 1928<sup>1</sup> e prodotta da una muffa del genere *Penicillium notatum*. La penicillina G, una volta isolata, divenne il primo farmaco ad attività antibatterica ed è la capostipite di una vasta famiglia di penicilline, strutturalmente caratterizzate da un anello tiazolidinico condensato con l'anello  $\beta$ -lattamico e differenziate tra loro dal sostituente sulla funzione ammidica presente sulla catena laterale dell'anello azetidionico (*figura 1*).



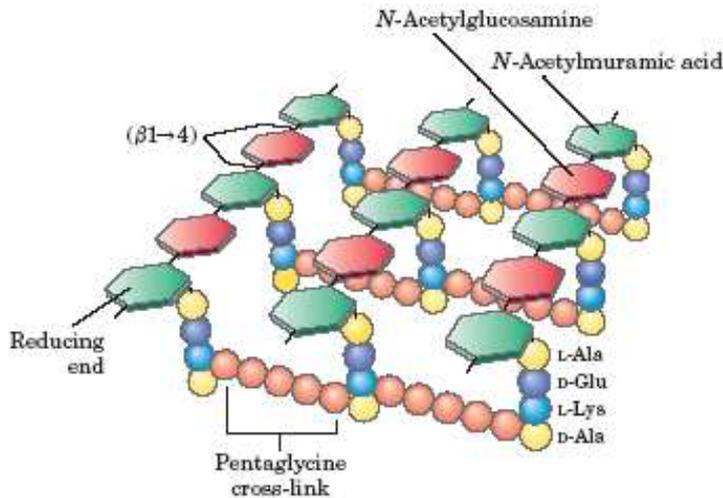
**Figura 1.**

Le penicilline sono state utilizzate per lungo tempo e sono tuttora impiegate in campo medico come antibiotici, grazie alla loro elevata attività biologica, ad esempio contro ceppi batterici Gram-positivi, associata a bassa tossicità verso le cellule eucariote. Questi composti esplicano la loro attività antibatterica interagendo con le transpeptidasi, enzimi serino-dipendenti implicati nella sintesi di un importante costituente della parete cellulare batterica, il peptidoglicano.<sup>2</sup> Il peptidoglicano è un eteropolimero ramificato che conferisce un'elevata resistenza meccanica alla parete cellulare, esso è formato da catene di amminozuccheri alternati di NAG (*N*-acetilglucosammina) e NAM (*N*-acetilmuramico) collegati tra loro da unità tetrapeptidiche, a loro

1 Abraham, E. P. *Le scienze* **1981**, 24.

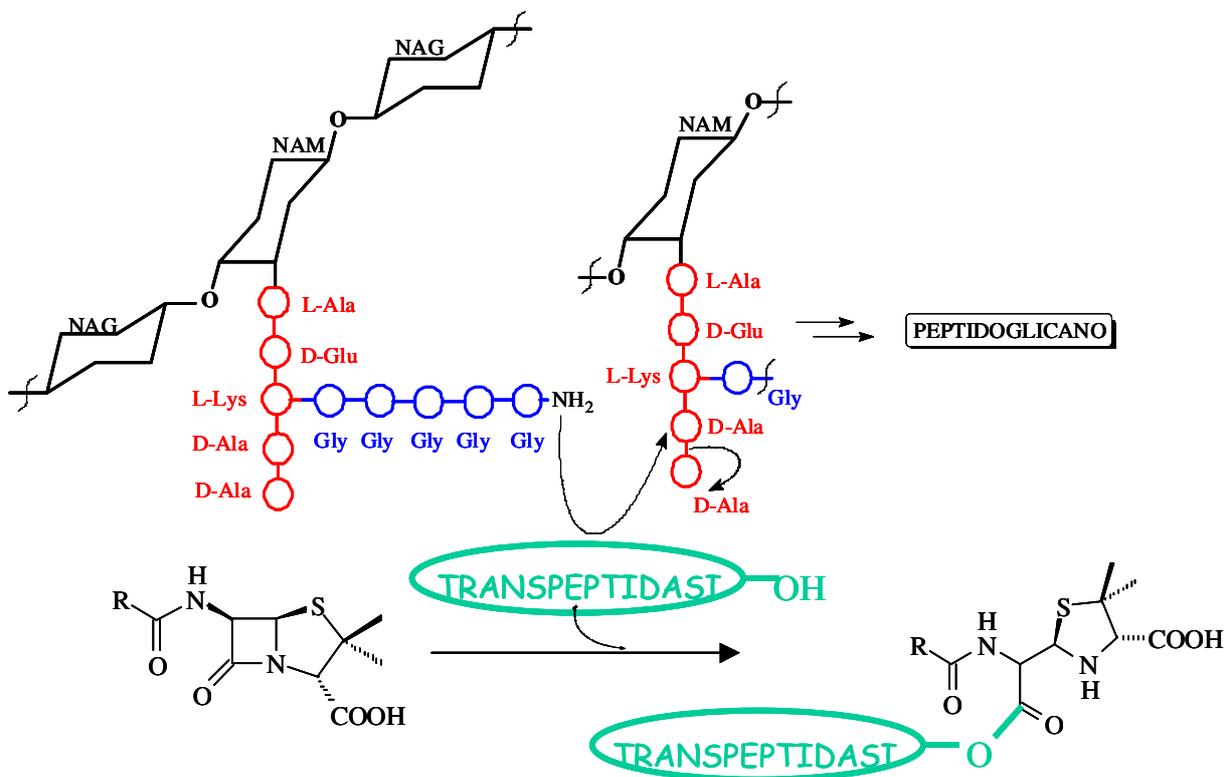
2 Mascaretti, A.O.; Boschetti, C. E.; Danelon, G. O.; Mata, E. G.; Roveri, O. A.; *Current Medicinal Chemistry* **1995**, 1, 441.

volta legate tra loro da catene pentagliciniche. Un passaggio finale della biosintesi di tale polimero è proprio la formazione dei ponti pentaglicinici, catalizzato dalla transpeptidasi, un enzima serino-dipendente e target biologico delle penicilline.



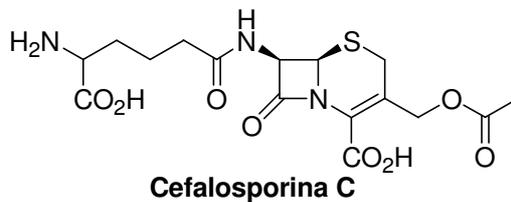
*Struttura del peptidoglicano.*

Il meccanismo di azione delle penicilline prevede l'attacco nucleofilo del residuo serinico della transpeptidasi sul carbonio ammidico dell'anello azetidionico, il quale, aprendosi, porta alla forma irreversibilmente inibita dell'enzima. Viene così impedita la sintesi della parete cellulare del batterio provocandone la morte per lisi della parete stessa.

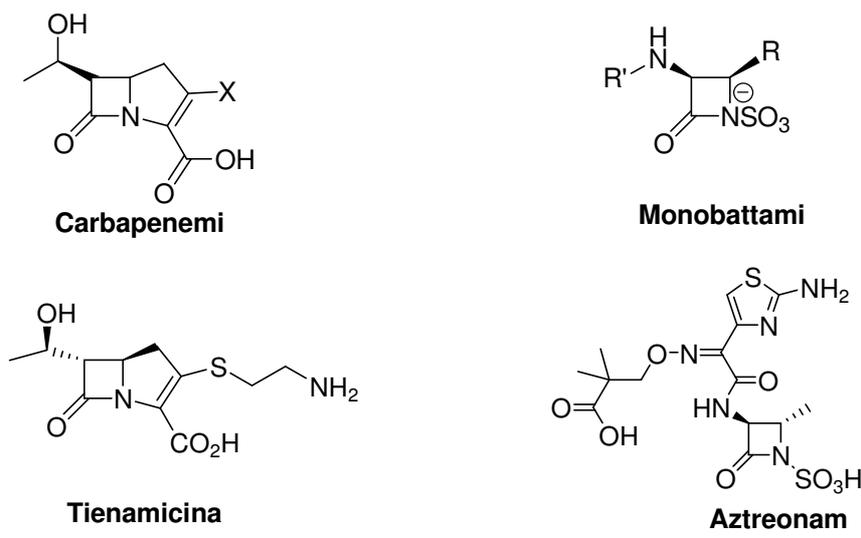


*Figura 2.*

Dopo la scoperta delle penicilline, vennero isolati nuovi derivati  $\beta$ -lattamici ad attività antibatterica, come le cefalosporine, il cui capostipite è la cefalosporina C, isolata dal fungo *Cephalosporium acremonium* da Brotzu<sup>3</sup> nel 1945. Le cefalosporine esplicano la loro attività antibatterica inibendo le transeptidasi come le penicilline, sono meno attive di queste ultime, ma coprono un più ampio spettro d'azione, comprendendo Gram-negativi e Gram-positivi.

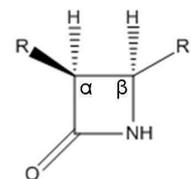


Successivamente la ricerca si è spinta oltre gli antibiotici cosiddetti "classici", tra cui appunto penicilline e cefalosporine, verso quelli definiti "non classici" come monobattami e carbapenemi<sup>4</sup> anch'essi di origine naturale (**figura 3**). Un esempio di monobattame è l'Aztreonam, il cui spettro d'azione è limitato ai soli batteri aerobi Gram negativi, mentre tra i carbapenemi, compare la Tienamicina, antibatterico ad ampio spettro attivo nei confronti di importanti ceppi batterici, quali gli *Pseudomonas* (genere di batteri Gram-negativi) e resistente alle  $\beta$ -lattamasi.

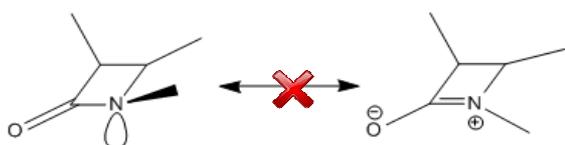


**Figura 3.**

La peculiare reattività di substrati  $\beta$ -lattamici nei confronti dei batteri è da ricercarsi nella struttura molecolare dell'anello azetidionico. Esso è caratterizzato da una elevata tensione angolare, i carboni  $\alpha$  e  $\beta$ , infatti, pur essendo ibridizzati  $sp^3$ , formano angoli di legame inferiori a  $109.5^\circ$ . Ciò conferisce all'anello a



quattro termini un'apprezzabile tensione angolare, impedendo inoltre la delocalizzazione del lone pair dell'atomo di azoto, in seguito alla delocalizzazione elettronica, infatti, si avrebbe un complesso planare



<sup>3</sup> A. G. Brown. *Pure and Appl. Chem.* **1987**, 59, 475.

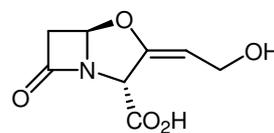
<sup>4</sup> *Drugs* **2007**, 67(7), 1027-1052.

molto impedito. Tutto questo si traduce in un'accentuata elettrofilia dell'atomo di carbonio ammidico, che risulta essere più simile ad un chetone e, quindi, maggiormente suscettibile ad attacchi nucleofili a dare apertura dell'anello. Tale caratteristica sta alla base del meccanismo di azione di antibiotici quali le Penicilline, che, come riportato precedentemente nella *figura 2*, fungono da agenti acilanti per il residuo serinico delle transpeptidasi, portando alla formazione irreversibile di un legame covalente, e, quindi, alla forma aperta dell'ammide, più stabile del corrispondente ciclo.

Grazie alle loro elevate attività battericide ed alla bassa tossicità, la scoperta di questi antibiotici ha rappresentato un enorme passo avanti nel campo nella lotta alle infezioni batteriche. Dal secondo dopoguerra in poi, infatti, tali composti hanno avuto un utilizzo sempre più diffuso, diventando i farmaci più impiegati nei paesi maggiormente industrializzati, secondi solo ai comuni analgesici. Tuttavia, l'abuso di tali composti, l'impiego su animali di allevamento e la loro persistenza negli alimenti ha scaturito nel tempo un importante fenomeno di "resistenza batterica"<sup>5</sup> sviluppata dagli agenti patogeni, che risultano resistenti a molte delle sostanze di prima generazione. I batteri, ad esempio, sono in grado di trasferire geneticamente i caratteri di resistenza, come la produzione di enzimi specifici, chiamati  $\beta$ -lattamasi, in grado di riconoscere ed inattivare l'antibiotico. Tali enzimi, a seconda del substrato su cui agiscono, delle dimensioni e del residuo amminoacidico presente nel sito attivo, sono suddivise in diverse classi,<sup>6</sup> e sono generalmente distinti in serino- e zinco-dipendenti.<sup>7</sup> Si sono, quindi, sviluppati ceppi batterici in grado di disattivare diversi tipi di antibiotici, responsabili di alcune gravi infezioni batteriche ancora oggi mortali.

Per ovviare al problema della resistenza batterica, sono previsti due modalità di azione: l'utilizzo di nuove sostanze non riconosciute dalle  $\beta$ -lattamasi, approccio che, dopo i buoni risultati iniziali, non è attualmente impiegato, in quanto si sono ugualmente sviluppate

resistenze batteriche, ed il concomitante impiego di inibitori specifici di  $\beta$ -lattamasi associati all'antibiotico.<sup>8</sup> Quest'ultimo metodo ha trovato applicazione con la scoperta di un potente inibitore di  $\beta$ -lattamasi,



**Acido clavulanico**

l'acido clavulanico. L'azione inibitoria di tale composto è simile a quella esplicita dagli antibiotici  $\beta$ -lattamici, subisce attacco nucleofilo da parte del residuo serinico dell'enzima  $\beta$ -lattamasi portando alla formazione irreversibile del complesso inattivo acil-enzima. Successivamente sono

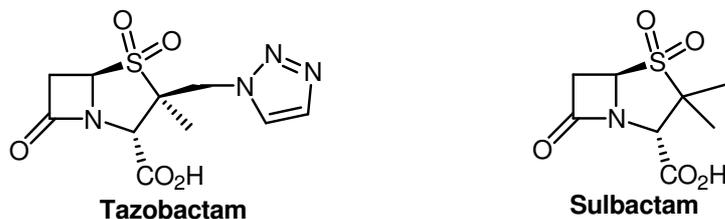
5 (a) Henry, M. C.; *Science / Technology* March 6, **2000**; (b) Knowles, J. R.; *Acc. Chem. Res.* **1995**, *18*, 97.

6 Ellis, G. P.; Luscombe, D. K.; *Progress in Medicinal Chemistry* **1994**, *31*, 297

7 Konaklieva, Curr. Med. Chem.-Anti-Infective Agents **2002**, *1*, 0000.

8 Buynak, J. D.; Doppalaudi, V. R.; Frotan, M.; Kumar, R.; Chambers, A.; *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5709.

stati preparati per via semi-sintetica ulteriori inibitori di  $\beta$ -lattamasi, come il sulbactam ed il tazobactam.

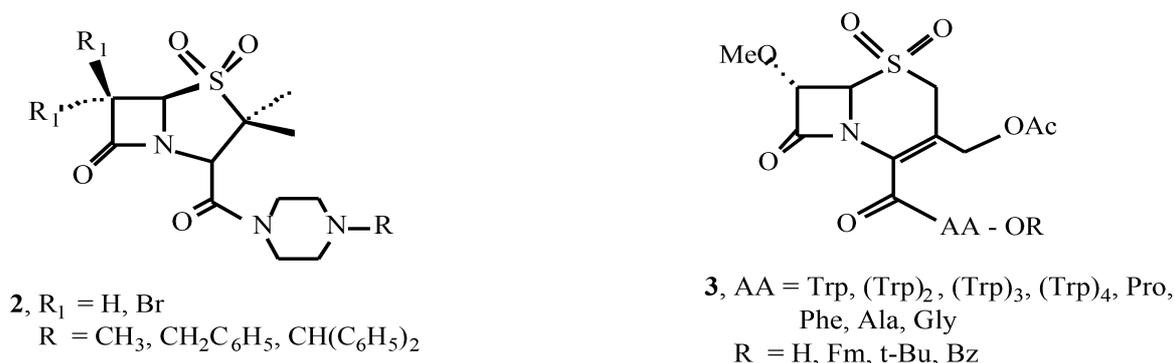


Tali inibitori sono attivi solo su  $\beta$ -lattamasi di classe A, risulta quindi ancora aperta la progettazione di nuovi inibitori di  $\beta$ -lattamasi efficaci nei confronti di ceppi batterici resistenti.<sup>7</sup>

Oltre che per le loro attività antibatteriche, i derivati  $\beta$ -lattamici sono sviluppati anche come inibitori enzimatici, trovando, quindi, un più ampio campo di azione.<sup>7</sup> Diverse specie azetidioniche sono risultate attive nei confronti di numerosi enzimi serino-dipendenti, la cui attività è regolata dallo stato acilato/deacilato del residuo serinico presente nel sito attivo, la specie  $\beta$ -lattamica, quindi, è in grado di inibire tali enzimi legandosi irreversibilmente alla serina.

L'HLE (elastasi leucocitica umana) è un enzima serino-dipendente responsabile della degradazione di proteine strutturali quali l'elastina ed il collagene.<sup>9</sup> Una eccessiva attività di tale enzima provoca un aumento della velocità di degradazione della elastina e del collagene, processo associato a diverse patologie quali l'artrite reumatoide, l'enfisema polmonare e la fibrosi cistica.<sup>10</sup>

Lo sviluppo di potenti inibitori di HLE risulta, quindi, un importante obiettivo. I composti **2** e **3** (*figura 4*) sono un esempio di derivati  $\beta$ -lattamici potenti inibitori di HLE.<sup>7</sup>

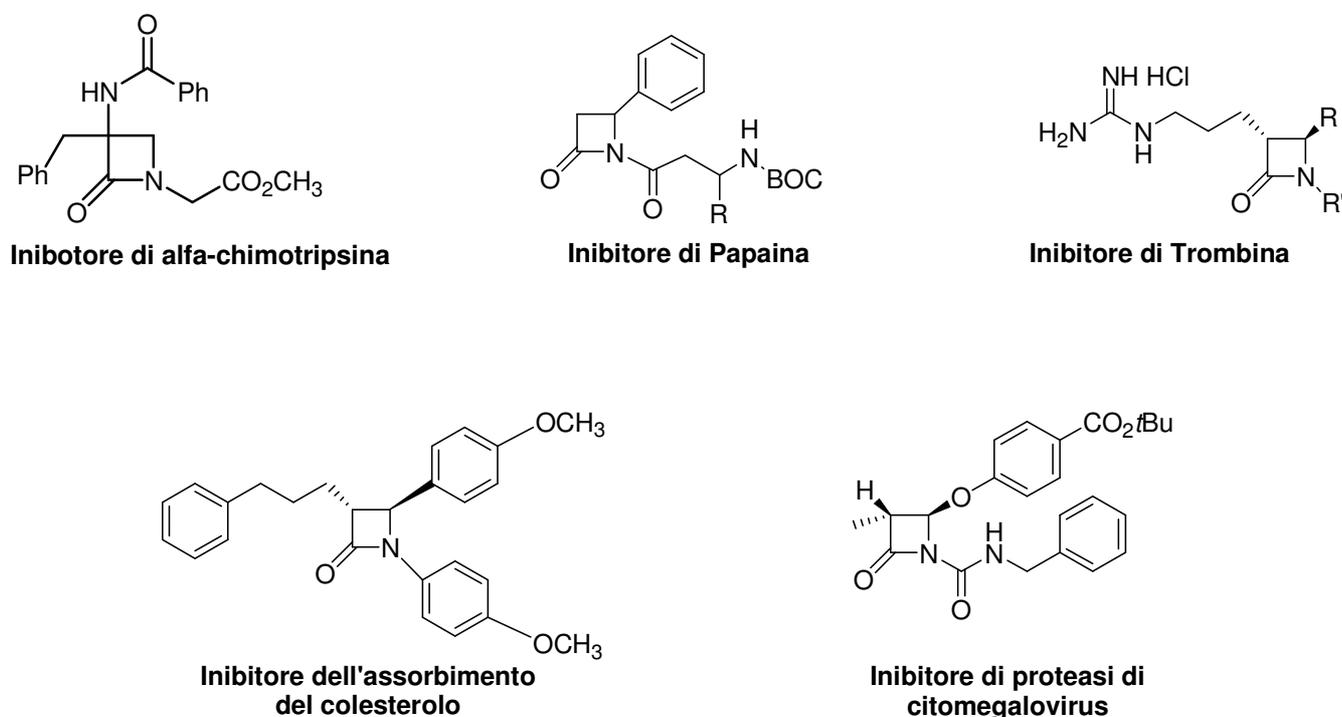


**Figura 4.**

<sup>9</sup> Starkey, P. M. and Barrett, A. *J. Biochem J.*, **1976**, 155, 265.

<sup>10</sup> (a) Crystal, R.G. *J. Clin. Invest.*, **1990**, 85, 1343. (b) Campbell, E.J. and Campbell, M.A. *J. Cell. Biol.*, **1988**, 106, 667. (c) Campbell, E. J.; Semior, R.M.; McDonald, J.A.; Cox, D.J.L. *J. Clin. Invest.*, **1982**, 70, 845.

Vi sono, inoltre, numerosi composti  $\beta$ -lattamici che hanno manifestato buone attività inibitorie nei confronti di altri enzimi serino- dipendenti come  $\alpha$ -chimotripsina,<sup>7</sup> proteasi di citomegalovirus,<sup>7</sup> papaina,<sup>7</sup> trombina<sup>7</sup> e proteasi coinvolte nell'accumulo di colesterolo.<sup>7</sup> Nella **figura 5** sono riportati alcuni esempi.



**Figura 5.**

La determinazione degli elementi strutturali del cuore  $\beta$ -lattamico, fondamentali ai fini dell'attività inibitoria, è di rilevante importanza per la progettazione e la sintesi di nuovi derivati azetidionici biologicamente attivi. Da uno studio di Marchand-Brynaert,<sup>11</sup> infatti, emerge l'importanza di siti specifici di riconoscimento da parte dell'enzima ( $Z_1$ ,  $Z_2$ ) (**figura 6**), fondamentali per l'ingresso della molecola nel sito attivo. Inoltre, è importante la presenza di gruppi elettron-attrattori (EWG) in grado di attivare il legame lattamico verso l'apertura da parte di nucleofili. Può essere, infine, utile un buon gruppo uscente (LG), che faciliti l'eventuale conversione dell'intermedio acil-enzima nella forma irreversibilmente inibita e stabile dell'enzima. Come si può osservare dalle strutture **A-D** (**figura 6**), questi gruppi possono trovarsi in diverse posizioni sull'anello azetidionico.

<sup>11</sup> Beave, C.; Bouchet, M.; Touillaux, R.; Faszler, J.; Marchand-Brynaert, J.; *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13301.

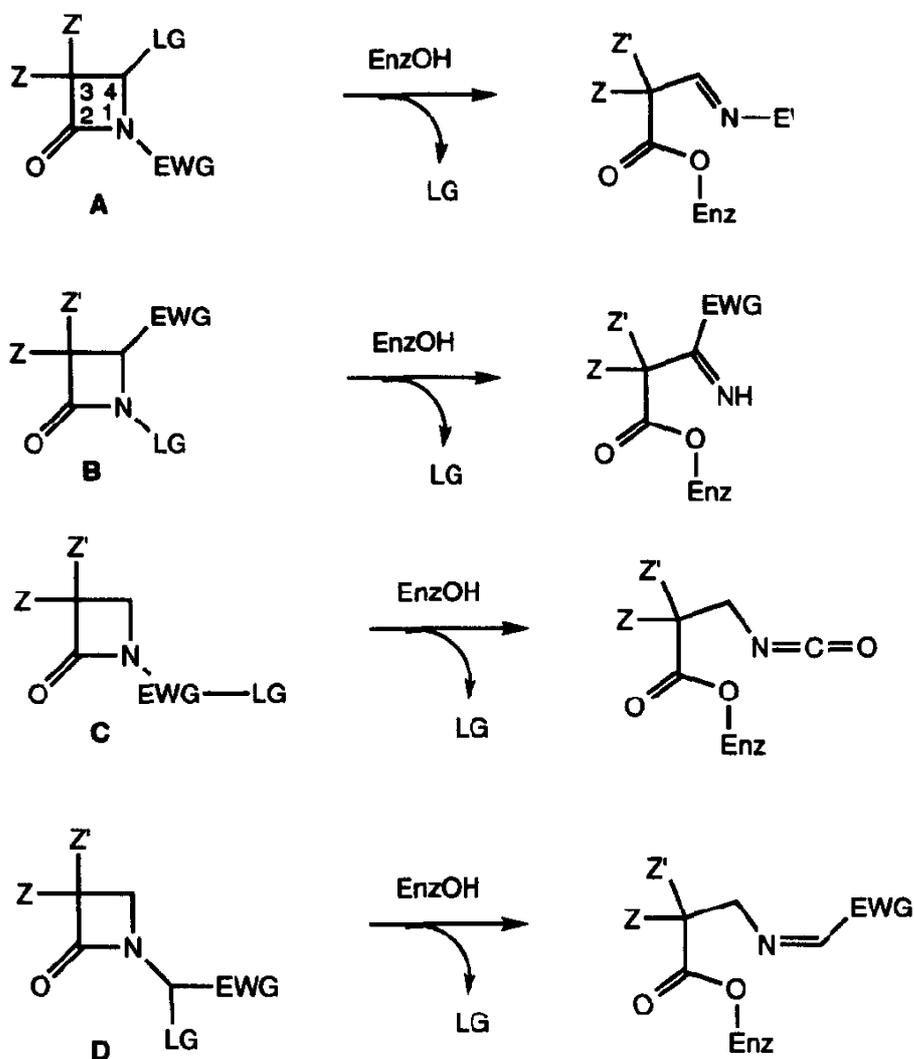


Figura 6.

### I.II Una nuova famiglia di nobattami: i 4-alchiliden- $\beta$ -lattami. Sintesi ed attività biologica

Viste le valide proprietà inibitorie nei confronti di target batterici ed enzimatici dei composti  $\beta$ -lattamici, l'attenzione della comunità scientifica è tuttora rivolta alla scoperta di nuovi derivati azetidionici caratterizzati da una elevata attività biologica e da una bassa tossicità per l'uomo.

Il gruppo di ricerca dove ho condotto il mio lavoro di Dottorato ha messo a punto un protocollo valido per la sintesi di una particolare famiglia di monobattami, i 4-alchiliden-azetidiononi,<sup>12</sup> la cui struttura molecolare possiede gli importanti elementi strutturali evidenziati da Marchand-Brynaert (figura 7). I nuovi substrati sono caratterizzati da un gruppo alchiliden-carbonilico in posizione 4 dell'anello come sostituente elettron-attrattore, che facilita l'attacco del residuo serinico dell'enzima attivando il carbonile azetidionico verso l'apertura e delocalizzando la carica negativa che si forma nell'intermedio aperto stabilizzandolo.

12 G. Cainelli, D. Giacomini, P. Galletti, and A. Quintavalla. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1765-17774.

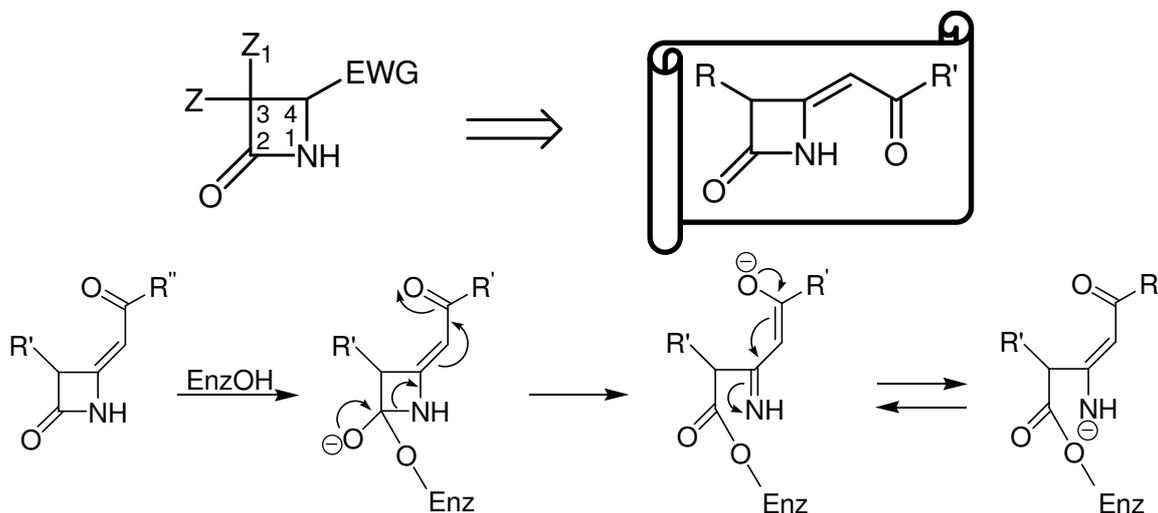
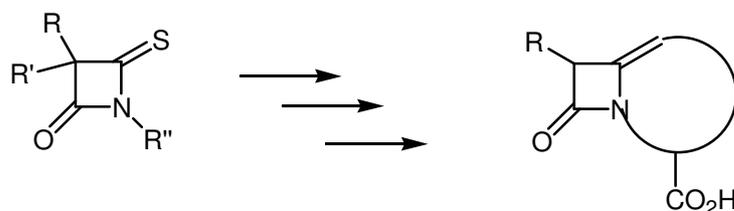


Figura 7.

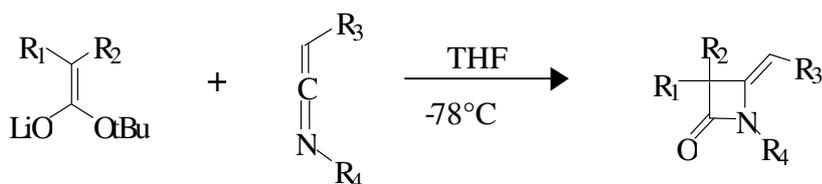
Sono stati progettati e sintetizzati diversi derivati, variamente funzionalizzati in posizione 3 e 4 dell'anello azetidionico, i quali hanno manifestato una promettente attività biologica sia nei confronti di target enzimatici che di natura batterica.

A differenza dei 3-alciliden-azetidionici,<sup>13</sup> i 4-alciliden-β-lattami non sono una famiglia di composti molto studiata. La loro sintesi, infatti, risale agli anni '80, in letteratura sono presenti solo pochi esempi e le specie sintetizzate hanno registrato blande attività biologiche.

Il lavoro di Bachi<sup>14</sup> è un esempio di sintesi di tali composti, in particolare, sono stati ottenuti 4-alciliden-β-lattami sostituiti da 4-tiosso-2-azetidionici e diazocomposti bisostituiti, attraverso catalisi da rodio.



In un precedente lavoro, il gruppo di ricerca dove ho svolto la mia tesi di Dottorato ha riportato la sintesi di 4-alciliden-azetidionici attraverso reazione tra enolati di esteri e chetenimine.<sup>15</sup>

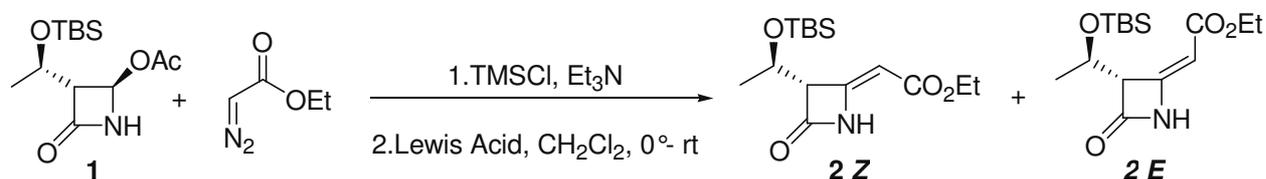


13 (a) W. Adam, P. Groer, H. U. Humpf, C. R. Saha-Moller, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4919. (b) S. R. Fletcher, I. T. Kay, *Chem. Commun.* **1978**, *20*, 903.

14 Bachi, M.D.Goldberg, O.; Grass, A.; Vaja, J. *J. Org.Chem.* **1980**, *45*, 1481.

15 Battaglia, A.; Cainelli, G.; Giacomini, D.; Martelli, G.; Panunzio, M. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4347.

Un nuovo protocollo per l'ottenimento di 4-alciliden- $\beta$ -lattami è stato riportato dal mio gruppo di ricerca. La metodologia sintetica prevede una reazione tra diazo composti e 4-acetossi-azetidioni catalizzata da acidi di Lewis a dare l'estere etilico **2** come miscela diastereoisomerica *Z/E*.<sup>16</sup>



<i>EDA (eq.)</i>	<i>Acido di Lewis (eq.)</i>	<i>Resa (%)</i>	<i>Z/E (%)</i>
4	TiCl <sub>4</sub> (1)	91	80/20
4	AlCl <sub>3</sub> (1)	73	53/47

**Tabella 1.**

È stato utilizzato come materiale di partenza il (3*R*, 4*R*, 1*R'*)-3-[1-(*t*-butildimetilsililossi)etil]-4-acetossiazetidion-2-one **1**, un importante intermedio per la sintesi di una vasta gamma di derivati azetidionici data la presenza di un buon gruppo uscente in posizione 4,<sup>17</sup> identificando la catena idrossi-etilica in posizione 3, presente nella tienamicina ed in altri carbapenemi, come sito di riconoscimento enzimatico. Il diazo composto preso in esame per la messa a punto del protocollo è l'etildiazoacetato (EDA), commercialmente disponibile. I diazo composti giocano un importante ruolo nella sintesi organica, in quanto specie chimiche molto versatili ed ampiamente utilizzate per realizzare  $\alpha$ - $\alpha$  sostituzioni, inserzioni su legami C-H inattivati, cicloaddizioni aromatiche, ciclopropanazioni e riarrangiamenti di Wolf.<sup>18</sup>

È stato condotto un accurato screening circa la natura dell'acido di Lewis, gli equivalenti dei reagenti, la temperatura ed i tempi di reazione.

La procedura sperimentale prevede la protezione dell'azoto lattamico con trimetilsililcloruro e trietilammina del substrato **1**, al quale successivamente viene aggiunto l'acido di Lewis, e, dopo qualche minuto, una soluzione di EDA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.<sup>16</sup> Nella **tabella 1** sono riportate le migliori condizioni di reazione trovate. L'acido di Lewis svolge un ruolo cruciale ai fini della reazione, in assenza di specie acida, infatti, non è stata registrata alcuna traccia dei prodotti. Inoltre, come si può notare dalla tabella, la natura stessa dell'acido influenza il rapporto diastereoisomerico. Ai fini di ottenere rese alte, è necessario lavorare con un eccesso di EDA (4 eq.) e con quantità stechiometriche di acido di Lewis (1 eq.), conducendo, infatti, la reazione con una quantità catalitica di acido si registra una bassa resa.

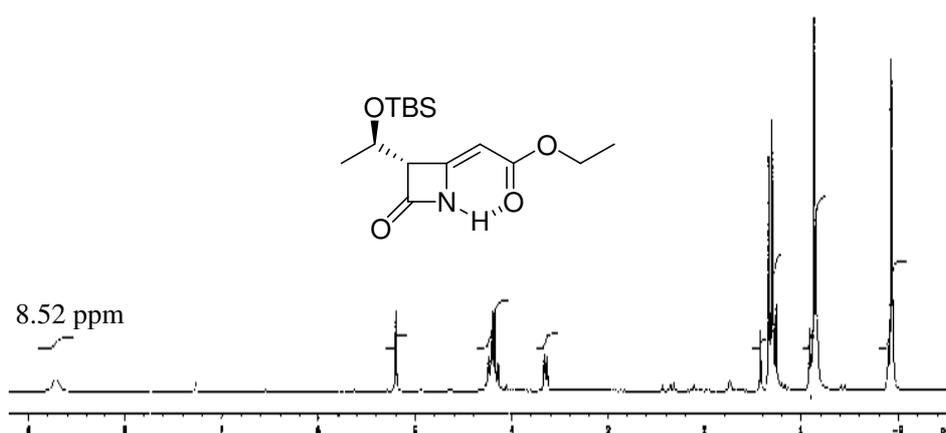
16 G. Cainelli, P. Galletti, M. Gazzano, D. Giacomini, A. Quintavalla, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 233.

17 D. E. Davies, R. C. Storr. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* vol. 7, 237.

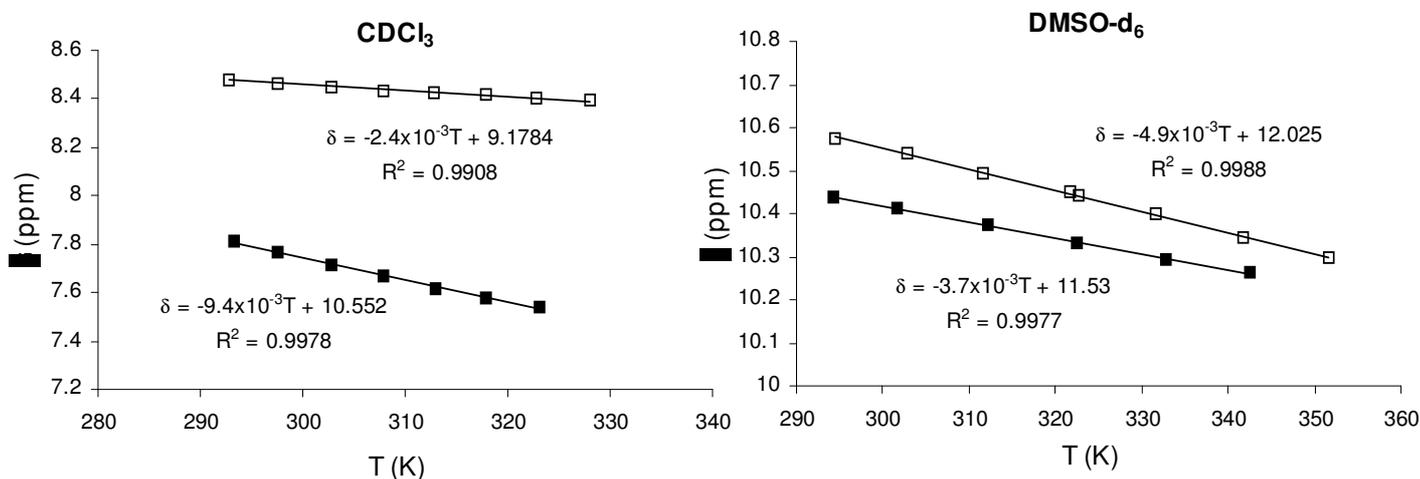
18 Tao Ye; Mc Kevery, M. A.; *Chem. Rev.* **1994**, 94, 1091.

I due diastereoisomeri ottenuti sono facilmente separabili tramite flash-cromatografia e sono stati completamente caratterizzati. Lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  in  $\text{CDCl}_3$  di tali prodotti manifesta un interessante andamento dei chemical shift. In particolare, il segnale di risonanza del protone sull'azoto lattamico cade, per l'isomero *Z*, a circa 8.5 ppm e per il corrispondente isomero *E* a circa 7.2 ppm, molto deschermati rispetto a quello del reagente di partenza (6.5 ppm).

La posizione insolitamente alta di questo segnale suggerisce la presenza, nell'isomero *Z*, di un legame idrogeno intramolecolare tra il protone lattamico ed il carbonile estereo della catena in posizione 4.<sup>12, 15</sup>

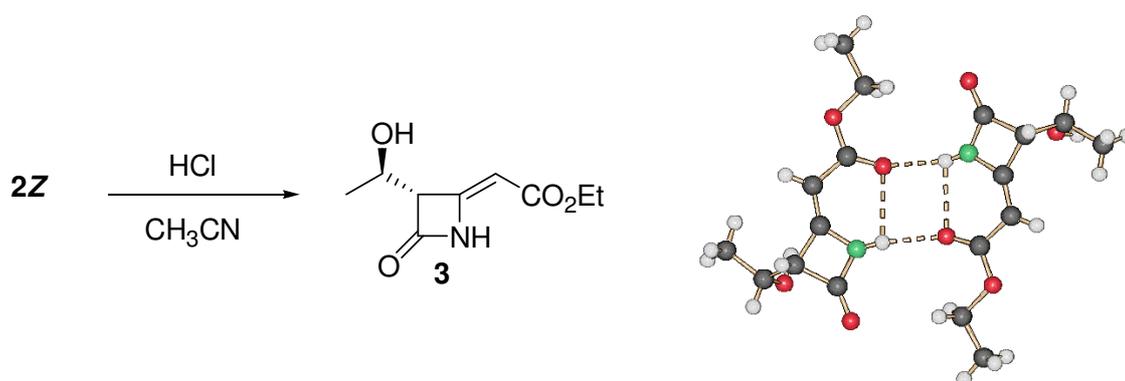


Tale ipotesi è stata confermata da uno studio approfondito condotto mediante esperimenti  $^1\text{H-NMR}$  a temperatura variabile, su entrambi gli isomeri *Z* e *E*.<sup>12</sup> Come dimostrano i seguenti grafici, è stata valutata la variazione del chemical shift ( $\delta$ ) del protone lattamico in funzione della temperatura in due diversi solventi,  $\text{CDCl}_3$ , solvente non competitivo nella formazione di legami a idrogeno e  $\text{DMSO-d}_6$ , solvente competitivo. Gli intervalli di temperatura sono stati scelti in funzione dei punti di ebollizione dei solventi.



La pendenza delle rette, identificabile come  $-d\delta/dT$ , rappresenta l'andamento del chemical shift in funzione della temperatura. Come si può notare, in DMSO- $d_6$  la posizione del segnale per i due isomeri Z e E mostra una scarsa variazione del chemical shift ( $4.9$  e  $3.7 \times 10^{-3}$  ppm  $K^{-1}$ , rispettivamente). In un solvente non competitivo come  $CDCl_3$ , il valore di  $-d\delta/dT$  per l'isomero Z rimane piccolo ( $2.4 \times 10^{-3}$  ppm  $K^{-1}$ ), mentre è più elevato per l'isomero E ( $9.4 \times 10^{-3}$  ppm  $K^{-1}$ ). In un solvente non accettore di legame idrogeno come il  $CDCl_3$ , un basso valore di  $-d\delta/dT$  ( $\leq 6 \times 10^{-3}$  ppm  $K^{-1}$ ) è, in genere, attribuibile a protoni coinvolti in legame idrogeno intramolecolare, in un solvente competitivo come il DMSO- $d_6$ , un basso valore di  $-d\delta/dT$  indica la presenza di legami a idrogeno con il solvente.<sup>19</sup> Questo studio dimostra quindi la presenza di legame a idrogeno intramolecolare nel 4-alchiliden- $\beta$ -lattame a configurazione Z.

Per confermare ulteriormente la stereochimica del prodotto, è stata condotta un'analisi diffrattometrica ai raggi X su cristallo singolo del 4-alchiliden- $\beta$ -lattame Z del composto **3**, ottenuto tramite deprotezione del corrispondente prodotto **2Z**. La necessità di utilizzare il composto **3** nasce dall'impossibilità di ottenere cristalli singoli direttamente dal composto **2Z**.



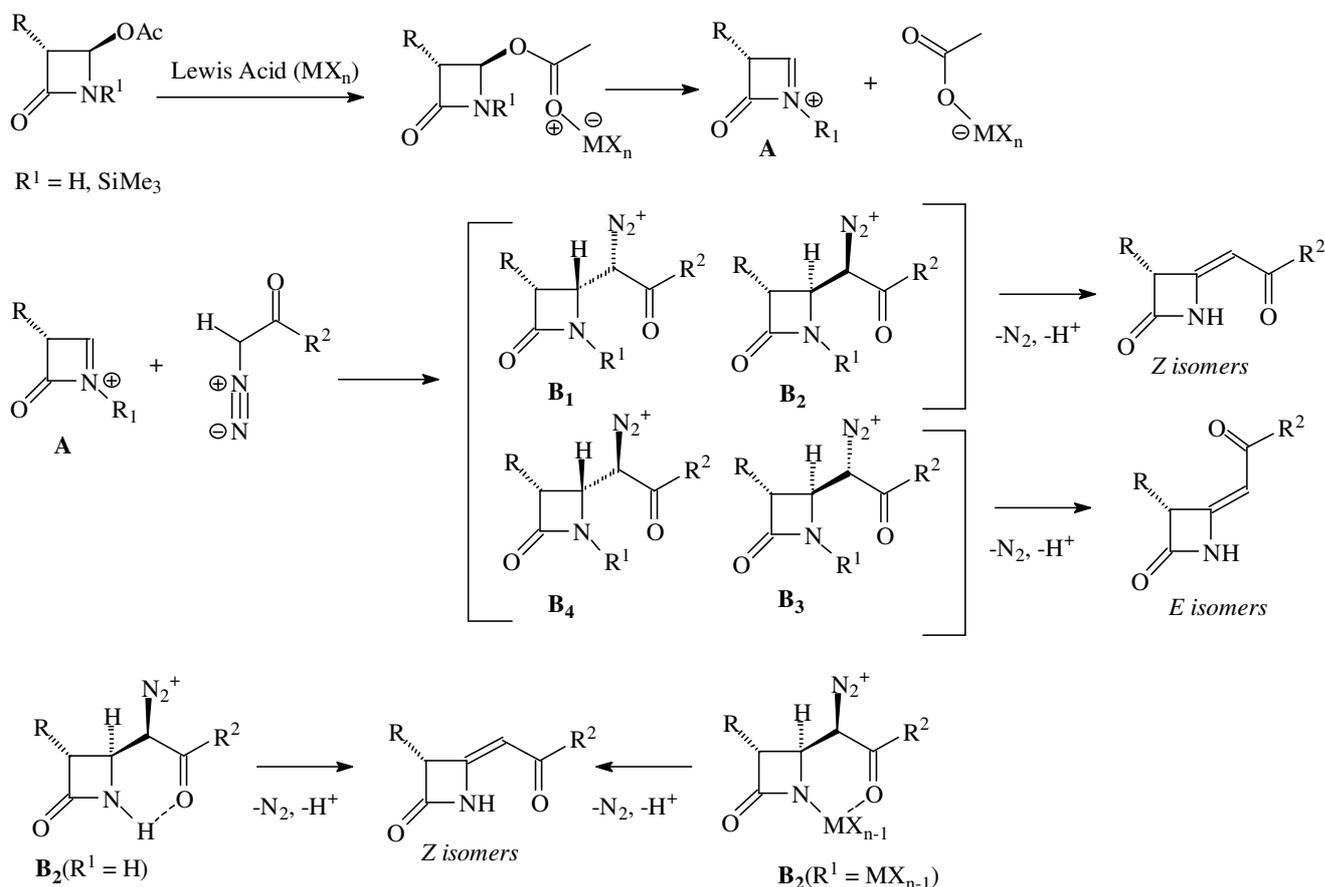
Tale analisi ha confermato la configurazione Z del doppio legame e la presenza del legame idrogeno intramolecolare, ha, inoltre, permesso di identificare la struttura del composto nello stato cristallino: due molecole del prodotto si appaiano interagendo tra loro tramite legame idrogeno intermolecolare. Tramite tale analisi, infine, è stato osservato che l'anello  $\beta$ -lattamico e la catena in posizione 4 sono perfettamente complanari. La presenza del legame idrogeno in questo isomero ne determina una maggiore stabilità rispetto all'isomero E, il quale, nel tempo, subisce una spontanea conversione nello Z.

Infine, l'analisi IR dei 4-alchiliden-azetidioni ha evidenziato un'interessante banda di stretching del carbonile  $\beta$ -lattamico a  $1820\text{ cm}^{-1}$ , superiore rispetto ai classici sistemi  $\beta$ -lattamici ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ), sinonimo di un valore più elevato della costante di forza del legame C-O e, quindi, di una minore

<sup>19</sup> H. Kessler. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512.

lunghezza di legame. Questa caratteristica può essere tradotta in termini di elevata reattività di tali derivati verso reazioni di apertura da parte di nucleofili.

I risultati ottenuti dallo screening condotto per questa nuova via sintetica hanno evidenziato la complessità del processo coinvolto, influenzato da diversi parametri. Cercando di razionalizzare i risultati ottenuti, è stato proposto un possibile meccanismo di reazione:<sup>12</sup>



Nel seguente meccanismo l'acido di Lewis gioca un ruolo fondamentale, in quanto facilita l'uscita del gruppo acetossi, con formazione di un ione imminio di tipo A. L'attivazione preliminare da parte del catalizzatore acido è fondamentale ai fini della reazione, aggiungendo, infatti, l'acido di Lewis dopo il diazocomposto non si ha la formazione dei prodotti. In letteratura sono riportati diversi lavori in cui si dimostra la reazione dei 4-acetossi-azetidioni con specie nucleofile in reazioni tipo  $\text{S}_{\text{N}}1$  attraverso la formazione dello ione imminio intermedio.<sup>20</sup> È inoltre probabile che il composto diazocarbonilico non agisca attraverso una classica reattività di tipo carbenico, ma si comporti da vero e proprio nucleofilo. È noto, infatti che i diazoesteri reagiscano come

20 (a) R. P. Attrill, A. G. M. Barrett, P. Quayle, J. van der Wes-Thuizen, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 1679. (b) F. Gavina, A. M. Costero, M. R. Andreu, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 434.

nucleofili sia in ambiente basico<sup>21</sup> che in ambiente acido.<sup>22</sup> Nelle condizioni di reazione studiate, la resa più elevata si ottiene utilizzando un eccesso (4 equivalenti) di EDA, ciò potrebbe indicare una bassa velocità di reazione per il passaggio di addizione del diazocomposto allo ione imminio intermedio. Dall'attacco nucleofilo si formano 4 possibili intermedi **B**<sub>1</sub>, **B**<sub>2</sub>, **B**<sub>3</sub> e **B**<sub>4</sub> (*Schema 1*), derivanti dall'addizione sulle due differenti facce dello ione imminio. Gli intermedi di tipo *trans* **B**<sub>2</sub> e **B**<sub>3</sub> sono favoriti dalla presenza del gruppo ingombrante CH<sub>3</sub>(CH)OTBS sulla posizione 3 del β-lattame, che scherma una delle due facce dell'anello azetidionico. Successivamente si ha eliminazione antiperiplanare, secondo meccanismo E<sub>2</sub>, di un protone e di azoto molecolare, ad ottenere il 4-alchiliden-β-lattame con configurazione del doppio legame *Z*, derivante dagli intermedi **B**<sub>1</sub> e **B**<sub>2</sub> e con configurazione *E* dagli intermedi **B**<sub>3</sub> e **B**<sub>4</sub>.

Anche la natura dell'acido di Lewis influenza il rapporto diastereomerico del processo. Inoltre, è stato osservato che, utilizzando gruppi protettori per l'azoto lattamico meno labili del -SiMe<sub>3</sub> come -SiMe<sub>2</sub>tBu o -COCH<sub>3</sub>, non si osserva la formazione dei prodotti e non sono mai stati isolati dalla miscela di reazione 4-alchiliden-azetidioni protetti come -NSiMe<sub>3</sub>. Questi risultati indicano che durante la reazione avviene uno scambio di leganti tra l'azoto lattamico protetto e l'acido di Lewis, che porta alla formazione di una specie imminio N-metallata. Questo fenomeno potrebbe anche spiegare la necessità di utilizzare, ai fini di ottenere una buona resa di reazione, una quantità stechiometrica di acido e impiegare il β-lattame di partenza come N-SiMe<sub>3</sub>. Considerando quanto appena detto, gli intermedi diazotati **B**<sub>1</sub> e **B**<sub>2</sub>, precursori dell'isomero *Z*, sarebbero favoriti dalla chelazione che il metallo (TiCl<sub>4</sub>) esercita sul carbossile della catena in 4. Invece, nel caso in cui l'acido di Lewis non dia luogo a chelazione o a scambio di legante (AlCl<sub>3</sub>), si ottiene una miscela in cui si ha una presenza più marcata dell'isomero *E*.

Per determinare la versatilità sintetica del protocollo di reazione, sono stati progettati e sintetizzati ulteriori 4-alchiliden-azetidioni, variamente funzionalizzati in posizione 3 dell'anello β-lattamico e sulla catena 4-alchilidenica.<sup>12, 23</sup>

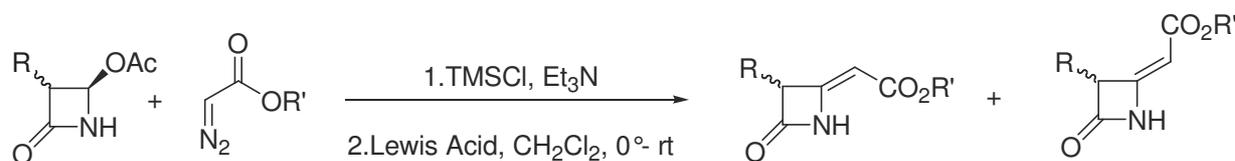
È stato possibile ottenere 3-bromo- e 3-cloro-4-alchiliden-azetidioni esteri etilici e benzilici ed i corrispondenti 4-alchiliden esteri non sostituiti in posizione 3, a partire dai relativi 4-acetossi-azetidioni. A differenza del 4-acetossi-azetidione, i 3-alo-4-acetossi-β-lattami non sono

21 (a) U. Schöllkopf, H. Frasnelli, D. Hoppe, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 1767. (b) E. Wenkert, C. A. McPherson, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 8084. (c) R. Pellicciari, R. Fringuelli, P. Ceccherelli, E. Sisani, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 959.

22 (a) F. J. Lopez-Herrera, M. Fernandez-Valpuesta, S. Garcia-Claros, *Tetrahedron* **1990**, 46, 7165. (b) R. C. Holmquist, E. Roskamp, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 3258. (c) A. Padwa, S. F. Hornbuckle, Z. Zhang, L. Zhi, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5297.

23 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.

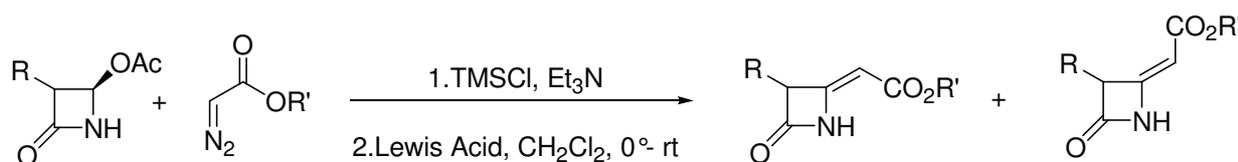
commercialmente disponibili, sono, quindi, stati sintetizzati per degradazione dell'acido 6-β-ammino-penicillanico.<sup>12</sup> Nella **tabella 2** sono riportati i migliori valori di rese e rapporti diastereomerici dei substrati sintetizzati.



<i>R</i>	<i>R'</i> (eq. diazo comp.)	Acido di Lewis (eq.)	Resa (%)	Z/E(%)
H	Et (4)	TiCl <sub>4</sub> (1)	79	3/67
H	Bn (2)	TiCl <sub>4</sub> (1)	43	41/59
Cl (trans)	Et (4)	TiCl <sub>4</sub> (1)	20	86/14
Cl (cis)	Et (4)	TiCl <sub>4</sub> (1)	26	74/26
Cl (trans)	Bn (2)	TiCl <sub>4</sub> (1)	12	80/20
Br (trans)	Et (4)	TiCl <sub>4</sub> (1)	10	99/1
Br (cis)	Et (4)	TiCl <sub>4</sub> (1)	10	99/1

**Tabella 2.**

La funzionalizzazione sulla catena in posizione 4 dell'anello è stata condotta sui substrati 3-idrossietil-4-acetossi-azetidione e 4-acetossi-azetidione, impiegando diversi diazo derivati, come diazochetoni, diazoesteri e diazotioesteri (**tabella 3**).



<i>R</i>	<i>R'</i> (eq. diazo compost.)	Acido di Lewis (eq.)	Resa (%)	Z/E(%)
CH <sub>3</sub> (CH)OTBS	CO <sub>2</sub> tBu (2)	TiCl <sub>4</sub> (1)	55	>99/1
CH <sub>3</sub> (CH)OTBS	CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph (2)	TiCl <sub>4</sub> (1)	60	90/10
CH <sub>3</sub> (CH)OTBS	COSPh (2)	TiCl <sub>4</sub> (1)	35	60/40
CH <sub>3</sub> (CH)OTBS	COPh (4)	TiCl <sub>4</sub> (1)	55	>99/1
CH <sub>3</sub> (CH)OTBS	COCH=CHPh (4)	TiCl <sub>4</sub> (1)	22	>99/1
CH <sub>3</sub> (CH)OTBS	COC(N <sub>2</sub> )CO <sub>2</sub> Et (2)	TiCl <sub>4</sub> (1)	20	>99/1
H	COPh (4)	TiCl <sub>4</sub> (1)	30	>99/1

**Tabella 3.**

I 4-alchiliden- $\beta$ -lattami così sintetizzati sono stati successivamente impiegati come starting material per l'ottenimento di nuovi derivati azetidionici, i quali si sono dimostrati potenziali inibitori enzimatici ed agenti antibatterici. Hanno, infatti, manifestato attività biologica nei confronti di HLE, sia in *vitro*<sup>24</sup> che in *vivo*;<sup>25</sup> di metallo proteasi di matrice (MMPs),<sup>26,24</sup> una famiglia di enzimi implicata in molte patologie infiammatorie, degenerative e tumorali;<sup>7</sup> di importanti ceppi batterici quali lo *Staphilococcus Aureus Meticillino Resistente*;<sup>19</sup> hanno manifestato un'importante attività antiossidante su cellule cardiache<sup>27</sup> e sono risultati essere agenti antiaggreganti.<sup>28</sup>

Nell'ambito di un vasto progetto di sintesi di nuovi derivati  $\beta$ -lattamici biologicamente attivi, il mio gruppo di ricerca ha pensato di valutare l'attività inibitoria su HLE dei 4-alchiliden-azetidioni. L'epigallocatechin-3-gallato (EGCG), il maggior flavonoide contenuto nel tè verde, ha manifestato una buona attività inibitoria su MMP-2 e MMP-9 (rispettivamente IC<sub>50</sub>=15  $\mu$ M e 30  $\mu$ M), enzimi chiamati anche rispettivamente Gelatinasi A e B ed una elevata attività su HLE.<sup>29,30,31</sup> Ai fini di valutare l'attività inibitoria su HLE ed MMP-2 e MMP-9 sono stati sintetizzati derivati  $\beta$ -lattamici in cui la struttura 4-alchiliden-azetidionica è coniugata a residui polifenolici tipici della struttura EGCG.

Come rappresentato in **figura 8** queste nuove strutture hanno manifestato un'ottima attività inibitoria su HLE, sia in *vitro* su cellule umane epiteliali mammarie e cellule di fibrocarcoma, con un valore di IC<sub>50</sub> (concentrazione di substrato che porta al 50% di inibizione del target biologico) pari a 1  $\mu$ M,<sup>24</sup> che in *vivo* su ratti affetti da infiammazione polmonare, con un valore IC<sub>50</sub> pari a 0.5  $\mu$ M.<sup>25</sup> Questi valori identificano i derivati in questione tra i più potenti inibitori di Elastasi Leucocitica Umana, sono infatti attivi al pari dell'epigallocatechin-3-gallato (EGCG, IC<sub>50</sub>=0.4  $\mu$ M).<sup>32</sup> La coniugazione con il residuo polifenolico con protezione dei tre gruppi ossidrilici come *O*-benzili è fondamentale per l'attività biologica.

---

24 Cainelli, G., Galletti, P., Garbisa, S., Giacomini, D., Sartor, L. & Quintavalla, A. *Bioorg. & Med. Chem.* **2005**, 13, 6120-6132.

25 I. Dell'Aica, L. Sartor, P. Galletti, D. Giacomini, A. Quintavalla, F. Calabrese, C. Giacometti, E. Brunetta, F. Piazza, C. Agostini, S. Garbisa. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2006**, 316, 539–546.

26 Cainelli, G., Galletti, P., Garbisa, S., Giacomini, D., Sartor, L. & Quintavalla, A. *Bioorg. & Med. Chem.* **2003**, 11, 5391-5399.

27 G. Cainelli, C. Angeloni, R. Cervellati, P. Galletti, D. Giacomini, S. Hrelia, R. Sinisi. *Chem. & Biodiv.* **2008**, 5, 811- 829.

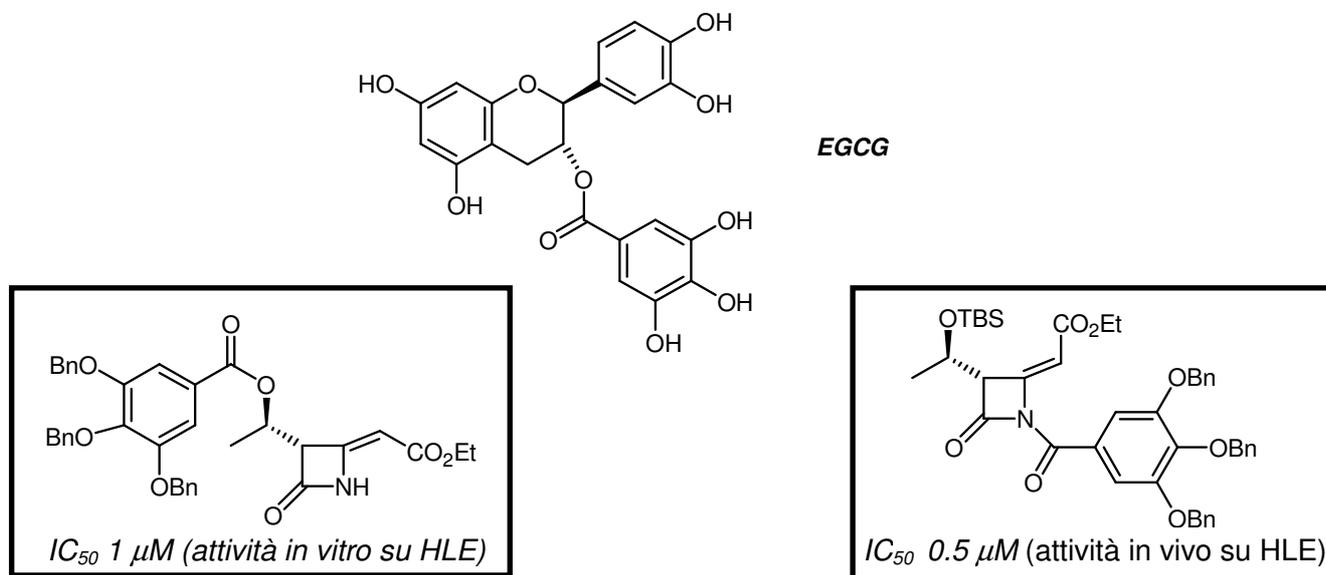
28 M. Pavanetto, A. Zarpellon, D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Cainelli, A. Folda, G. Scutari, R. Deana. *Platelets*, **2007**, 18, 357-364.

29 S. Garbisa, L. Sartor, S. Biggin, B. Salvato, R. Benelli, A. Albini. *Cancer*, **2001**, 91, 822.

30 M. Demeule, M. Brossard, M. Page, D. Gingras, R. Beliveau. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 51, 1478.

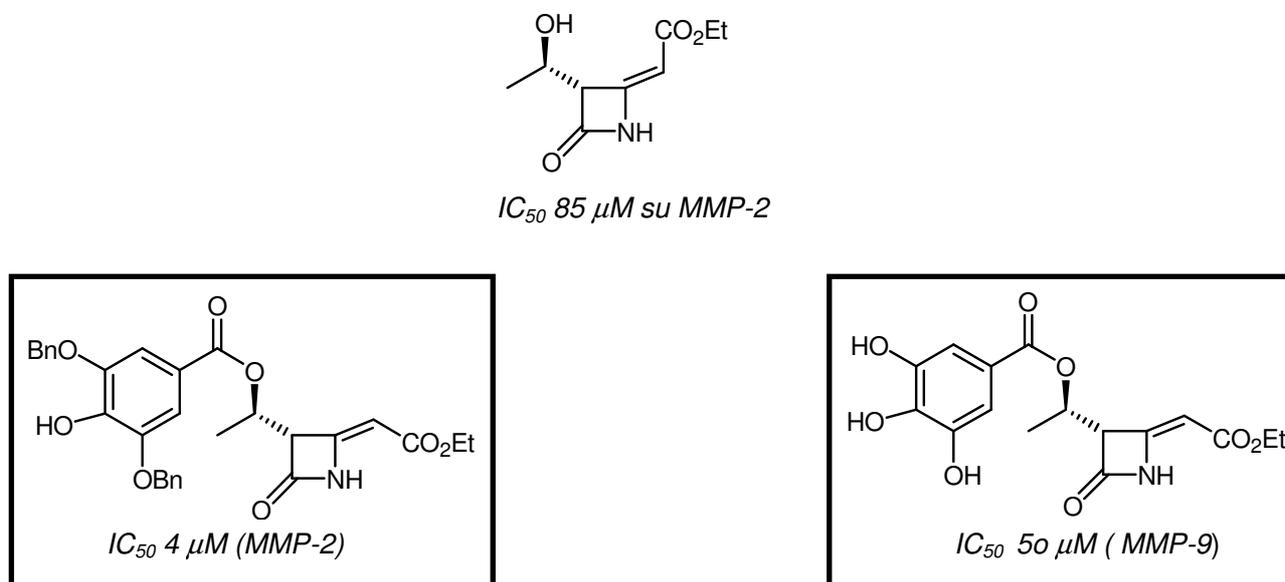
31 L. Sartor, E. Pezzato, S. Garbisa. *J. Leuk. Biol.* **2002**, 71, 73.

32 L. Sartor, E. Pezzato, Dell'Aica, Caniato, S. Biggin, S. Garbisa, *Biochemical Pharmacology* **2002**, 229, 64.



**Figura 8.** Valori di  $IC_{50}$  per l'attività inibitoria di 4-alchiliden- $\beta$ -lattami su HLE.

La coniugazione con residui polifenolici è risultata vincente anche per l'attività nei confronti di metallo proteasi di matrice contenenti zinco MMPs,<sup>33,24</sup> una famiglia di enzimi implicata in diverse patologie degenerative e tumorali.<sup>7</sup> Nella **figura 9** sono riportate le strutture più attive per MMP-2 e MMP-9 comparate con il derivato  $\beta$ -lattamico di partenza; anche in questo caso, la presenza del gruppo polifenolico aumenta l'attività inibitoria, portando ad un valore di  $IC_{50}$  pari a 4  $\mu$ M per MMP-2.

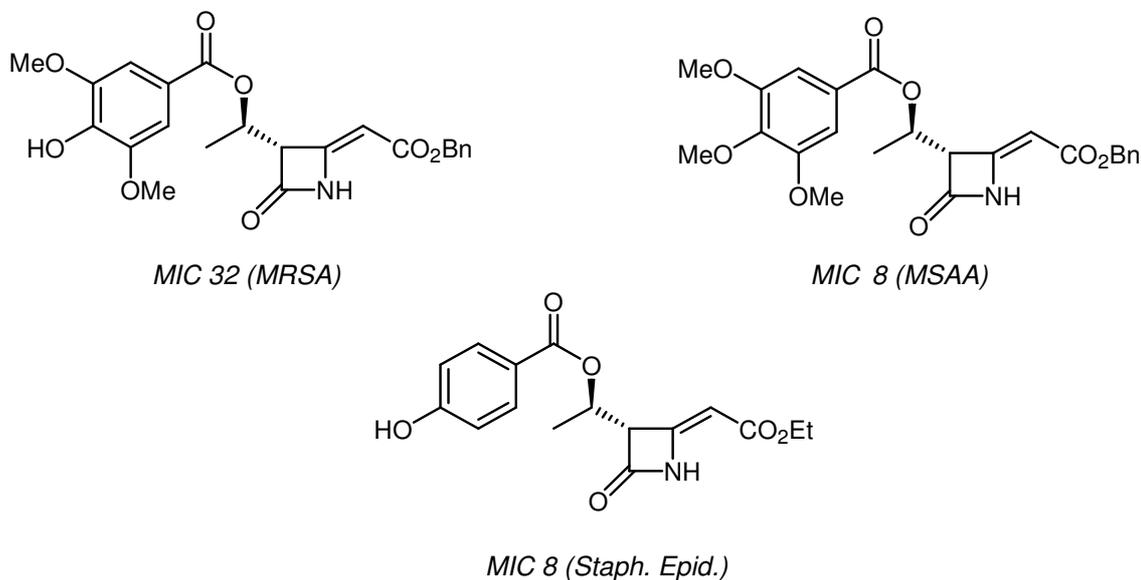


**Figura 9.** Valori di  $IC_{50}$  per l'attività inibitoria di 4-alchiliden- $\beta$ -lattami su MMP-2 e MMP-9.

Questi nuovi substrati  $\beta$ -lattamici hanno anche manifestato attività biologica contro importanti ceppi batterici, quali lo *Staphylococcus Aureus Meticillino Resistente* (MRSA) e *Meticillino*

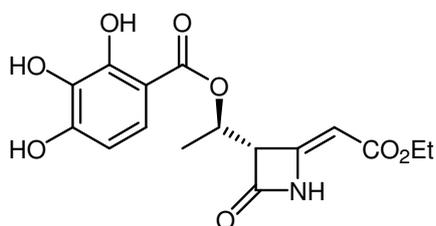
33 Cainelli, G., Galletti, P., Garbisa, S., Giacomini, D., Sartor, L. & Quintavalla, A. *Bioorg. & Med. Chem.* **2003**, 11, 5391-5399.

*Suscetibile* (MSSA) e lo *Staphylococcus Epidermidis*. Nella seguente figura sono riportati alcuni esempi di derivati attivi con i relativi valori di MIC (concentrazione minima inibente) espressi in mg/L.

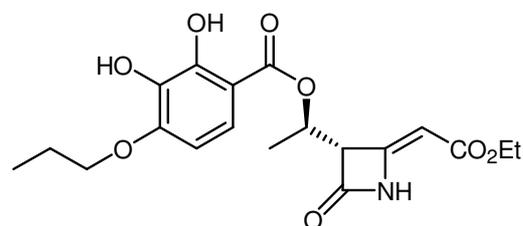


**Figura 10.** Valori di MIC per l'attività antibatterica di 4-alciliden- $\beta$ -lattami.

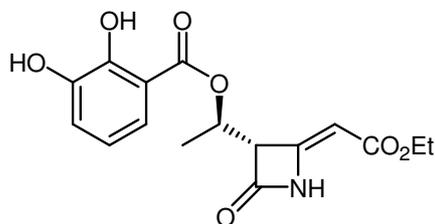
Infine, composti 4-alciliden-azetidionici coniugati a polifenoli hanno manifestato una promettente attività antiossidante *in vitro* (**figura 11**). Nello specifico, è stata testata sia l'attività antiossidante chimica, misurata tramite reazione oscillante Briggs-Rauscher e test TEAC, che biologica, determinata tramite test su cellule cardiache di ratto.<sup>27</sup> Di seguito sono riportati i migliori composti in termini di inibizione ossidativa e le relative concentrazioni in corrispondenza delle quali sono stati registrati i risultati di attività. Questi composti rappresentano un valido punto di partenza per l'impiego in campo clinico di derivati  $\beta$ -lattamici come farmaci antiossidanti associati ad importanti patologie come quelle cardiovascolari.



Antiossidante Rac: 0.06  $\mu\text{M}$  TEAC: 2.0 nM  
15% ROS inhibition at 10  $\mu\text{M}$  on mioblast H9c2 Cells



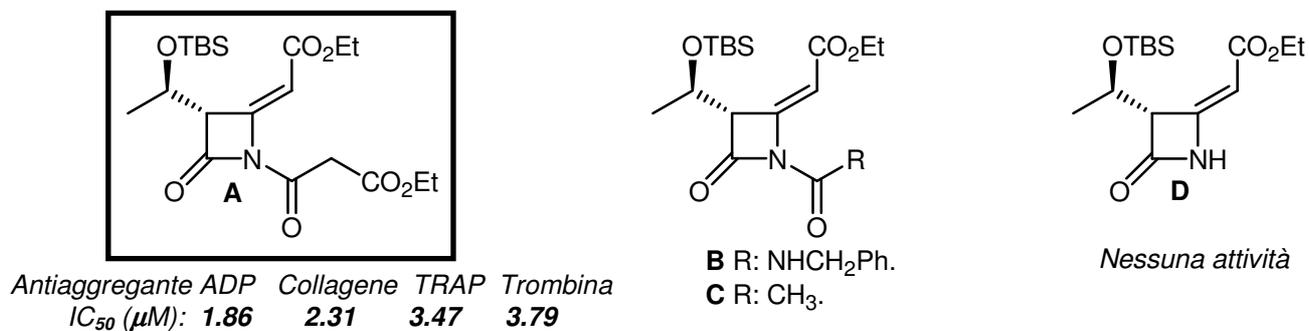
Antiossidante Rac: 0.02  $\mu\text{M}$  TEAC: 1.70 nM  
12% ROS inhibition at 10  $\mu\text{M}$  on mioblast H9c2 Cells



Antiossidante Rac: 0.23  $\mu\text{M}$  TEAC: 1.76 nM  
8% ROS inhibition at 10  $\mu\text{M}$  on mioblast H9c2 Cells

**Figura 11.** Attività antiossidante chimica e biologica di 4-alkiliden- $\beta$ -lattami.

Su alcuni derivati 4-alkiliden-azetidionici sono stati condotti opportuni test per determinarne le proprietà come agenti antiaggreganti. L'attivazione delle piastrine è un meccanismo complesso regolato da una varietà di agonisti che, interagendo con recettori accoppiati alla proteina G di membrana, modulano l'attività degli enzimi specifici coinvolti nel processo aumentando la concentrazione cellulare del  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>28</sup> I composti in **figura 12** sono stati testati *in vitro* su sospensioni di piastrine, determinandone la capacità di aumentare la concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$ , parametro associato all'attivazione dell'aggregazione piastrinica.<sup>28</sup> Il composto **A** ha manifestato una buona attività inibitoria nei confronti degli agonisti responsabili dell'aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  e, quindi, dell'aggregazione piastrinica. In particolare, ad una concentrazione pari a 4  $\mu\text{M}$  di tale composto, si registra una inibizione del 50% dell'attività aggregante nel giro di 1 minuto. I composti **B** e **C** hanno manifestato una attività poco interessante, mentre il derivato **D** è risultato inattivo. In questo caso, quindi, il gruppo funzionale presente sull'atomo di azoto lattamico è fondamentale ai fini dell'attività, in particolare il gruppo etil-2-carbossietanoato è quello in corrispondenza del quale è stata registrata una buona attività. Nella seguente figura sono riportati i valori di  $\text{IC}_{50}$  del composto **D** osservati per agonisti dell'attività aggregante piastrinica quali la trombina, l'ADP (adenosina difosfato), il collagene ed il TRAP, un peptido mimetico della trombina.



**Figura 12.** Valori di  $IC_{50}$  per l'attività antiaggregante di 4-alkiliden- $\beta$ -lattami.

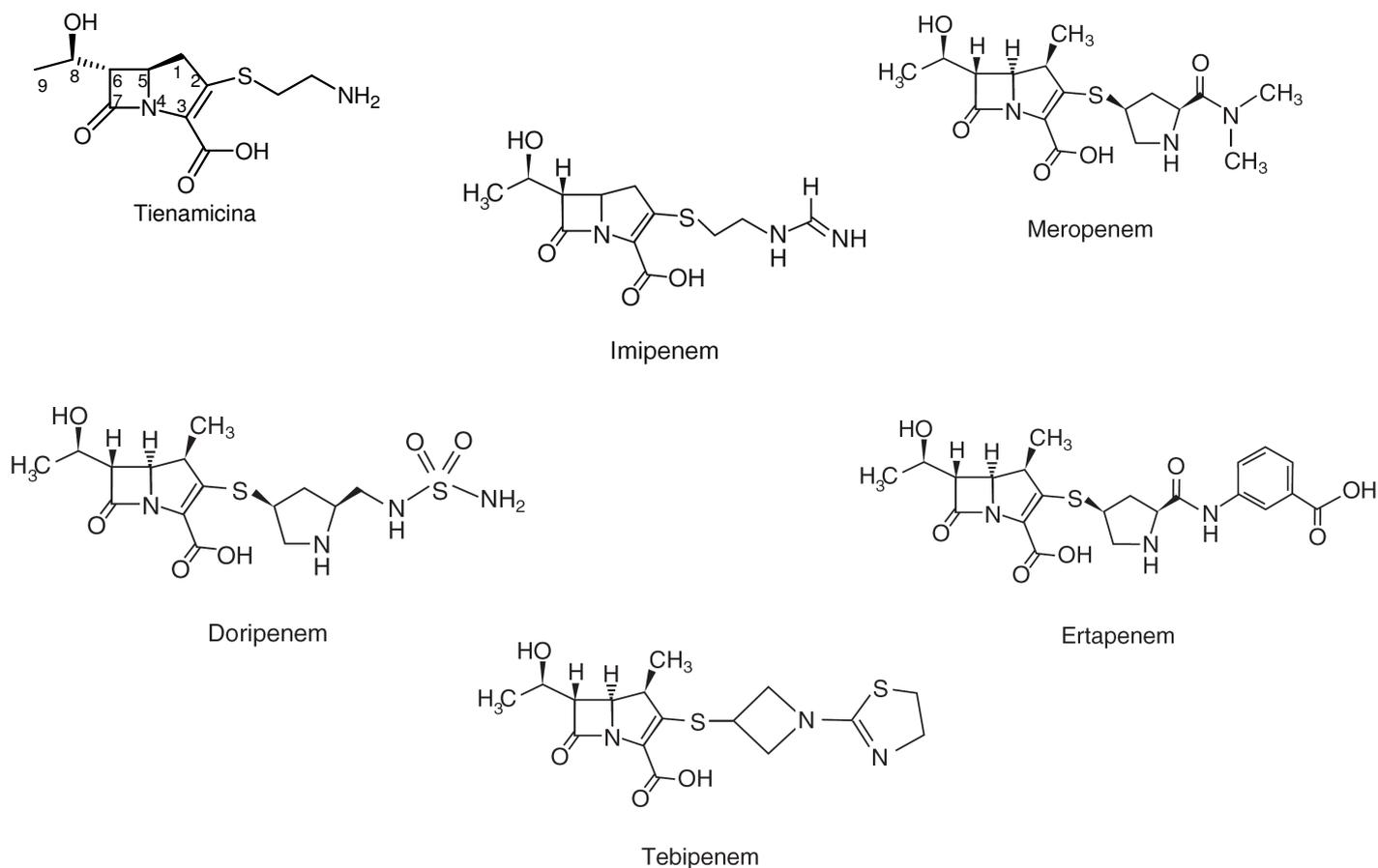
Come dimostrato finora, i 4-alkiliden- $\beta$ -lattami, sintetizzati tramite il protocollo sviluppato dal mio gruppo di ricerca, si sono rivelati ottimi materiali di partenza per la sintesi di nuovi composti  $\beta$ -lattamici.

Durante il mio lavoro di Dottorato, mi sono occupata dell'impiego del cuore 4-alkiliden- $\beta$ -lattamico come sintone per la progettazione e la sintesi di nuovi derivati azetidionici biologicamente attivi.

## Capitolo II I 4-alchiliden- $\beta$ -lattami come sintoni: sintesi dell'Epitenamicina

### II.1 La Tienamicina

Come riportato nel capitolo I, tra gli antibiotici  $\beta$ -lattamici di recente acquisizione si collocano i carbapenemi,<sup>1</sup> strutture bicicliche in cui l'anello beta-lattamico è fuso ad un anello a cinque termini contenente un'insaturazione in posizione 2-3 (**figura 1**). Questi composti hanno mostrato una potenza ed uno spettro d'azione maggiore delle penicilline e cefalosporine, ed inoltre, rispetto a queste, presentano una miglior stabilità nei confronti delle  $\beta$ -lattamasi.



**Fig. 1** Strutture di carbapenemi

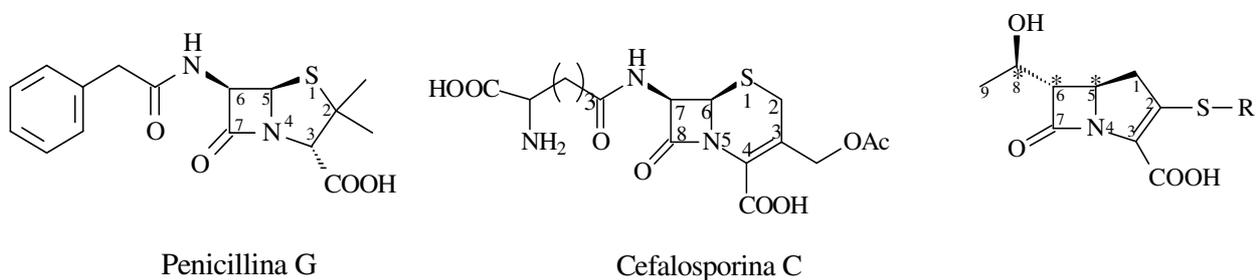
La Tienamicina fu il primo carbapenem ad essere isolato dallo *Streptomyces Cattleya* nel 1975 insieme con la *N*-acetil Tienamicina.<sup>2</sup> È un antibatterico ad ampio spettro, è attivo nei confronti di importanti ceppi batterici, quali gli *Pseudomonas* (genere di batteri Gram-negativi) ed è resistente alle beta-lattamasi. Questa molecola risulta però essere molto instabile, a causa del gruppo

<sup>1</sup> G. S. Singh; *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2004**, *4*, 69

<sup>2</sup> *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sept. **1986**, 343-349

amminico primario presente nella sua catena laterale che, in qualità di nucleofilo, è in grado di promuovere l'apertura intermolecolare dell'anello  $\beta$ -lattamico. Essendo, quindi, l'impiego farmacologico della Tienamicina impedito, attraverso un procedimento semisintetico, è stato ottenuto il corrispondente *N*-formimmidoil derivato più stabile, l'Imipenem<sup>1</sup>. L'Imipenem possiede un ampio spettro d'azione verso molti batteri aerobi ed anaerobi, Gram-positivi e Gram-negativi; resiste all'azione idrolitica della maggior parte delle  $\beta$ -lattamasi ed agisce anche come inibitore di tali enzimi. Tuttavia esso viene parzialmente inattivato dalla deidropeptidasi renale e per questo motivo viene somministrato in associazione con la cilastatina, uno specifico inibitore di questo enzima<sup>3</sup>. Un carbapeneme di più recente scoperta è il Meropenem<sup>4</sup> che resiste all'azione della deidropeptidasi renale grazie al sostituito metilico legato al carbonio chirale in posizione 1 e può essere somministrato senza inibitori. Possiede una buona attività contro organismi aerobi ed anaerobi clinicamente significativi, ma non è attivo nei confronti dello *Staphylococcus Aureus* meticillino-resistente (MRSA). E' stabile alle  $\beta$ -lattamasi seriniche.

Le importanti proprietà biologiche di questa classe  $\beta$ -lattamica è strettamente correlata alla struttura molecolare, che differenzia tali composti dalle penicilline e cefalosprine. Rispetto a queste ultime infatti, nei carbapenemi l'anello fuso a quello  $\beta$ -lattamico presenta una insaturazione in posizione 2-3 ed un atomo di zolfo al quale è legata una catena alchilica in posizione 2, mentre sull'atomo di carbonio 6 dell'anello  $\beta$ -lattamico vi è un sostituito  $\alpha$ -idrossietilico (**figura 2**). Quest'ultimo è probabilmente responsabile della resistenza dei carbapenemi nei confronti delle beta-lattamasi, il gruppo ossidrilico, infatti, renderebbe più difficile il riconoscimento della molecola da parte di questi enzimi. Altre importanti differenze responsabili delle proprietà biologiche risultano essere la posizione eso-ciclica dell'atomo di zolfo e la configurazione relativa *trans* dei due centri chirali 5 e 6.



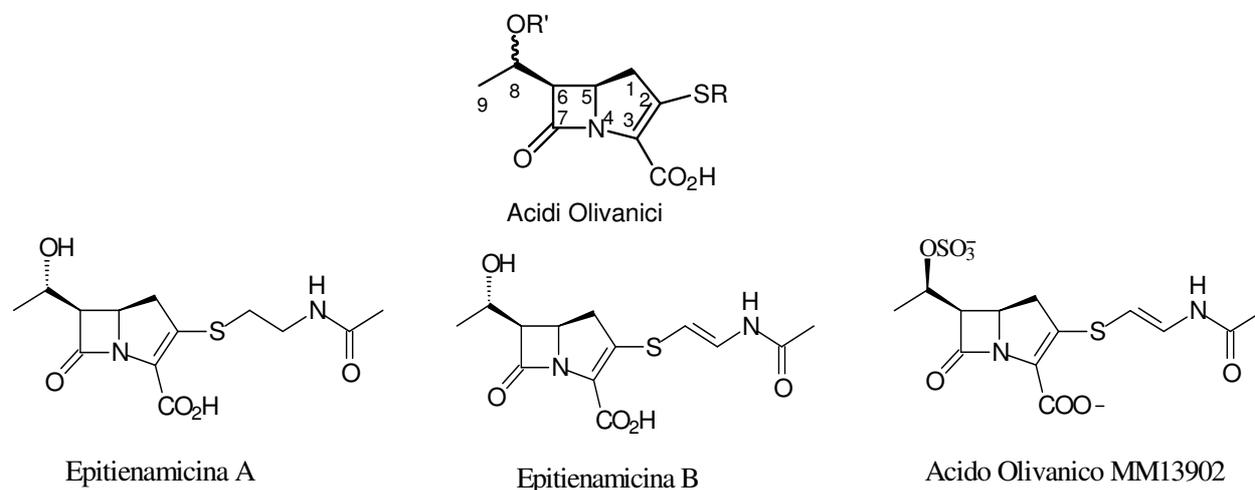
**Figura 2.**

<sup>3</sup> *Drugs* **2007**, 67(7), 1027-1052

<sup>4</sup> Cottagnoud, P.; *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2002**, 59, 1928

La Tienamicina è presente in natura nella configurazione (5*R*, 6*S*, 8*R*), per variazione di un solo centro stereogenico si ottengono i corrispondenti epimeri detti anche Epitienamicine.

Epimeri della Tienamicina molto interessanti, caratterizzati da una configurazione relativa *cis* dei carboni C5-C6 sono gli Acidi Olivanici (**figura 3**), isolati dallo *Streptomyces Olivaceus*<sup>2</sup>.

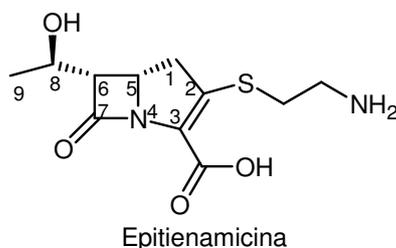


**Figura 3.**

Tali composti, a seconda della natura dei sostituenti, sono caratterizzati da specifiche ed interessanti attività biologiche; le epitienamicine A e B<sup>5</sup> (acidi olivanici MM22380 e MM22382) manifestano importanti proprietà antibatteriche, ma sono suscettibili alle  $\beta$ -lattamasi, a differenza dell' isomero *trans*.

L'acido olivanico MM13902<sup>6</sup> che possiede un gruppo (OSO<sub>3</sub>)<sup>-</sup> più ingombrante dell'ossidrile è decisamente più stabile nei confronti delle beta-lattamasi.

Tra gli otto possibili stereoisomeri l'unico derivato non riportato in letteratura è l'Epitienamicina con configurazione (5*S*, 8*S*, 8*R*) (**figura 4**), che da ora in poi indicherò con il nominativo Epitienamicina, ed il motivo è da ricercarsi nel difficile ottenimento dello stereoisomero con questa configurazione assoluta e con configurazione relativa dei centri C5-C6 *cis*.



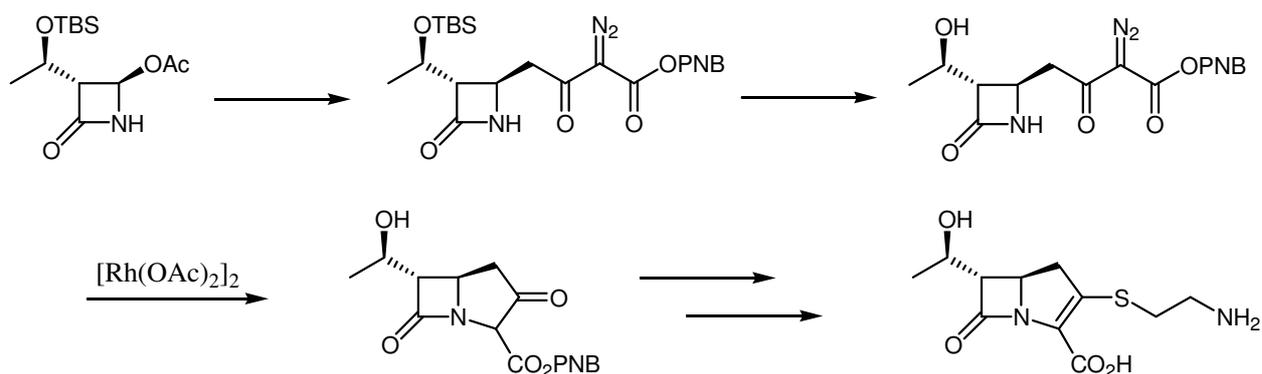
**Figura 4.**

<sup>5</sup> Kametani, T.; Huang, S.; Nagahara, T.; Ihara, M.; *J. C. S. Perkin I*, **1981**, 2282

<sup>6</sup> Easton, C. J.; Knowles, J. R.; *Biochemistry* **1982**, *21*, 2857

I carbapenemi si ottengono per sintesi totale, non è possibile infatti la produzione su larga scala attraverso fermentazione a causa della loro instabilità nel brodo di fermentazione. Generalmente, si utilizza un intermedio contenente il solo anello  $\beta$ -lattamico sul quale si costruisce il secondo anello a cinque termini.

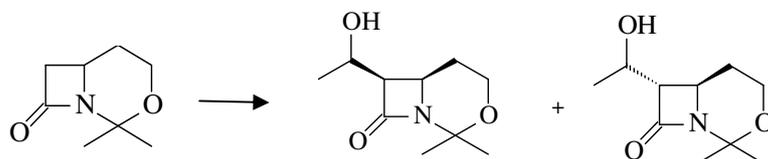
Una delle procedure maggiormente utilizzate per la sintesi e la chiusura del secondo anello è la nota sintesi utilizzata dalla Merck per la Tienamicina<sup>7</sup>, che utilizza una ciclizzazione intramolecolare mediata da rodio di un diazocomposto  $\beta$ -lattamico (*schema 1*). Seguendo questa procedura si ottiene il solo stereoisomero *trans*.



**Schema 1.**

Per strutture  $\beta$ -lattamiche che possiedono sostituenti sulle posizioni C3 e C4 con configurazione relativa *cis* sono presenti pochi esempi in letteratura, caratterizzati prevalentemente dall'ottenimento di una miscela *cis-trans*.

Nel lavoro di Bouffard<sup>8</sup> è riportata l'introduzione della catena idrossietilica sull'anello azetidionico attraverso condensazione aldolica, passaggio sintetico che determina la stereochimica del processo (*schema 2*). Viene ottenuta una miscela diastereoisomerica in cui l'isomero *trans* è il maggioritario.

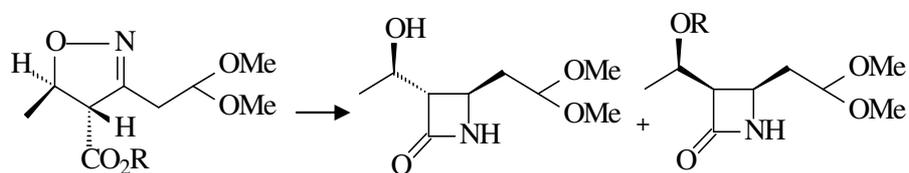


**Schema 2.**

<sup>7</sup> Berks, A.; *Tetrahedron*, **1996**, 331-375

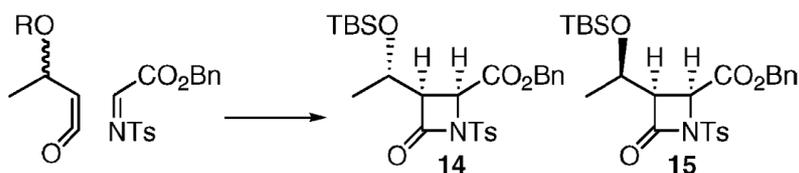
<sup>8</sup> Bouffard, F. A.; Johnston, D. B. R.; Christensen, B. G.; *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1130-1135

Nel lavoro di Kametani<sup>9</sup> la formazione la stereochimica di tipo *cis* viene introdotta durante la sintesi dell'anello azetidionico, attraverso idrogenolisi dell'isoossazolina, seguita da desililazione del corrispondente ammino-alcol e ciclizzazione con reattivo di Grignard (*schema 3*). Anche in tal caso viene ottenuta una miscela *cis-trans*.



**Schema 3.**

Piu recente è l'approccio proposto da Townsend che riporta un esempio di sintesi asimmetrica di carbapenemi a configurazione *cis* (*schema 4*). In particolare, viene riportata la sintesi dell'Epitienamicina A, in cui la stereochimica desiderata viene introdotta durante la formazione dell'anello azetidionico, tramite reazione [2+2] tra un chetene ed un'immina catalizzata da alcoaloidi derivati dalla cincona *o*-benzoilchinina (BQ) o *o*-benzoilchinidina (BQd)<sup>10</sup>. L'isomero *trans* è presente in piccole tracce.



**Schema 4.**

Note le importanti attività biologiche delle Epitienamicine, è stato di mio interesse mettere a punto un protocollo sintetico idoneo per l'ottenimento dell'unico epimero della Tienmicina non ancora riportato in letteratura, caratterizzato da configurazione relativa C5-C6 *cis* e configurazione assoluta C5*S*, C8*S*, C8*R*, con l'obiettivo finale di valutarne le eventuali proprietà biologiche. Tale interesse nasce, infatti, dalla necessità di trovare nuovi antibiotici  $\beta$ -lattamici efficaci su ceppi batterici resistenti.

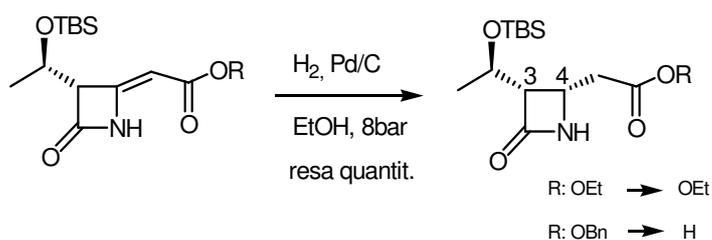
## II.II Epitienamicina: sintesi.

La struttura portante dei 4-alchiliden- $\beta$ -lattami rappresenta un valido sintone per l'ottenimento di

9 Kametani, T.; Huang, S.; Nagahara, T.; Ihara, M.; *J. C. S. Perkin I*, **1981**, 2282-2286.

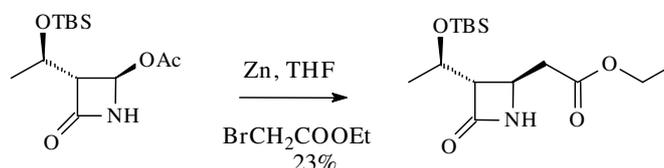
10 Micah J. Bodner, Ryan M. Phelan and Craig A. Townsend *Org. Lett.* **2009**, 11(16), 3606-3609.

ulteriori composti biologicamente attivi. In questa ottica, sono stati effettuati diversi tentativi volti alla funzionalizzazione del doppio legame 4-alchilidenico, il quale ha manifestato un'insolita reattività: è risultato essere non reattivo nei confronti di reazioni di addizione nucleofila di tipo 1,4 catalizzate da acidi e basi di Lewis, di epossidazione, di diidrossilazione di Sharpless. Durante studi rivolti alla riduzione del doppio legame, è stato osservato che, in atmosfera di idrogeno ed in presenza di palladio adsorbito su carbone, il legame 4-alchilidenico subisce idrogenazione a dare il corrispondente derivato saturo. In particolare, tale reazione ha permesso di ottenere l'estere etilico o l'acido carbossilico saturi, a seconda del derivato 4-alchilidenico di partenza (*schema 5*).



**Schema 5.**

Molto interessante risultata essere la configurazione relativa C3-C4 dei prodotti ottenuti: l'idrogenazione procede, in rese quantitative, verso la formazione del solo isomero *cis*. Questo risultato suggerisce che l'attacco, probabilmente di tipo *syn*, dell'idrogeno al doppio legame sulla superficie di palladio è guidata dalla catena idrossietilica, protetta come –OTBS, in posizione 3 dell'anello. Quest'ultima rende maggiormente ingombrata una delle due facce del sistema planare 4-alchiliden-azetidionico, promuovendo l'attacco nella direzione stericamente meno ingombrata. La stereochimica del prodotto è stata determinata tramite analisi  $^1\text{H}$  NMR confrontando i segnali dei protoni 3 e 4 dell'estere etilico saturo con quelli del relativo isomero *trans* ottenuto tramite reazione  $\text{S}_{\text{N}}1$  sul 4-acetossi-azetidione commercialmente disponibile (*schema 6*).<sup>11</sup>



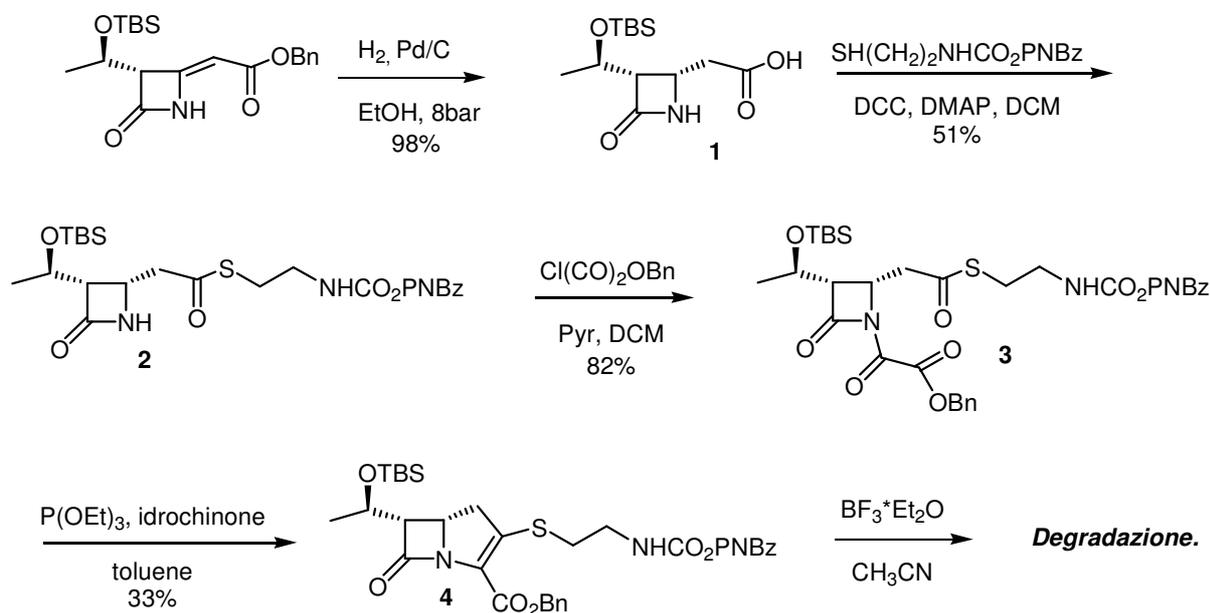
**Schema 6.**

<sup>11</sup> Gianfranco Cainelli, Paola Galletti, Spiridione Garbisa, Daria Giacomini, Luigi Sartor, Arianna Quintavalla. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2003**, *11*, 5391-5399.

L'estere benzilico 4-alchiliden-azetidionico sottoposto ad idrogenazione ha permesso di ottenere il corrispondente acido saturo (*schema 5*), da me utilizzato per la sintesi della Epitienamicina.

La via sintetica individuata per ottenere il prodotto di interesse prevede, quindi, come substrato di partenza il {3-[1-(*t*-butil-dimetil-silanilossi)-etil]-4-osso-azetidion-2-ilidene}-acido acetico benzil estere (*schema 7*), sintetizzato attraverso il protocollo messo a punto per i 4-alchiliden-azetidioni precedentemente citato (capitolo I). Si procede con la riduzione stereoselettiva in presenza di palladio su carbone in atmosfera di idrogeno ad ottenere quantitativamente l'acido saturo **1**. Questo importante step è il passaggio chiave della via sintetica, in quanto definisce la stereochimica del prodotto finale.

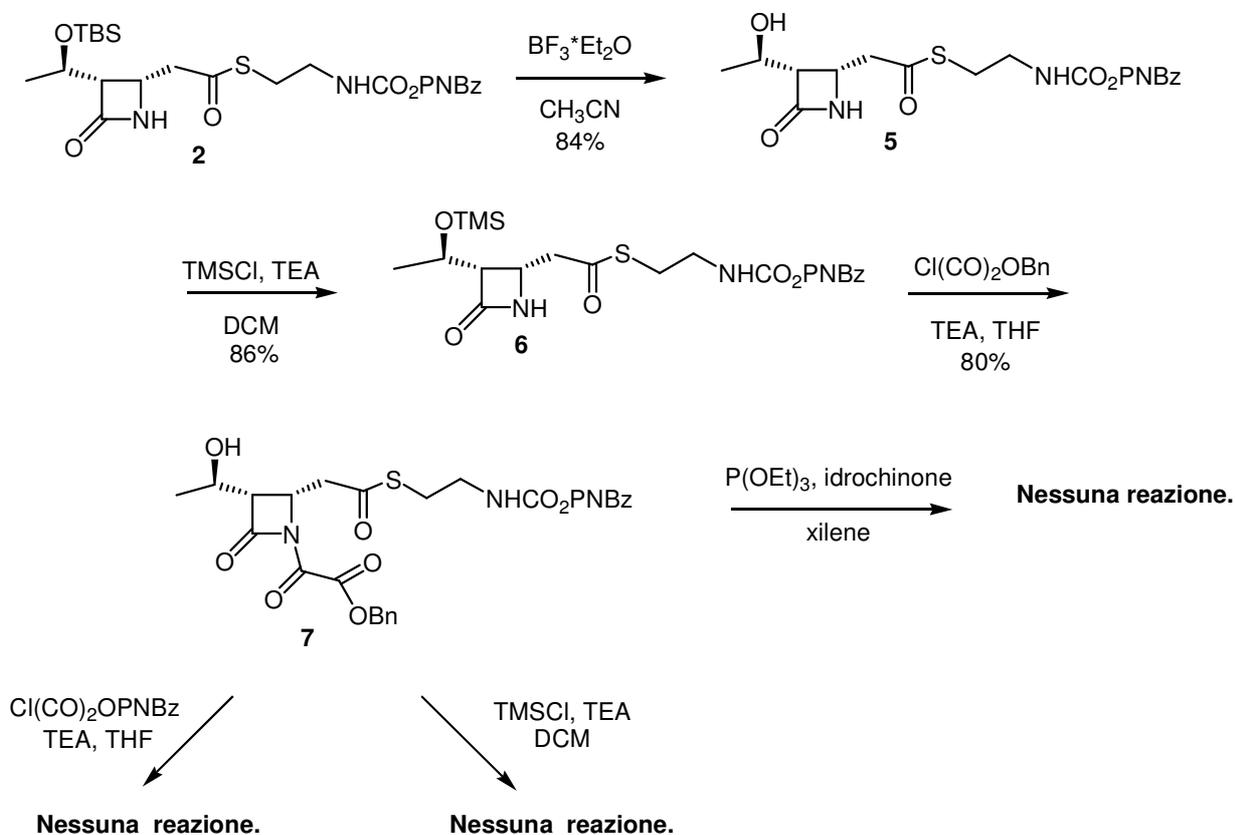
Successivamente, il derivato **1** è stato convertito nel corrispondente tioestere (**2**), il quale possiede la catena laterale presente nel prodotto finale. La funzionalizzazione dell'azoto azetidionico, ad opera dell'ossalilcloruro mono-estere benzilico e piridina, ha portato al derivato **3** con resa dell'82%. La formazione del secondo ciclo è stata condotta tramite ciclizzazione intramolecolare attraverso reazione di Wittig, in presenza di trietil fosfito ed idrochinone catalitico, ottenendo il composto **4** al 33% di resa. La successiva deprotezione dell'ossidrilico, però, porta ad una degradazione della molecola.



*Schema 7.*

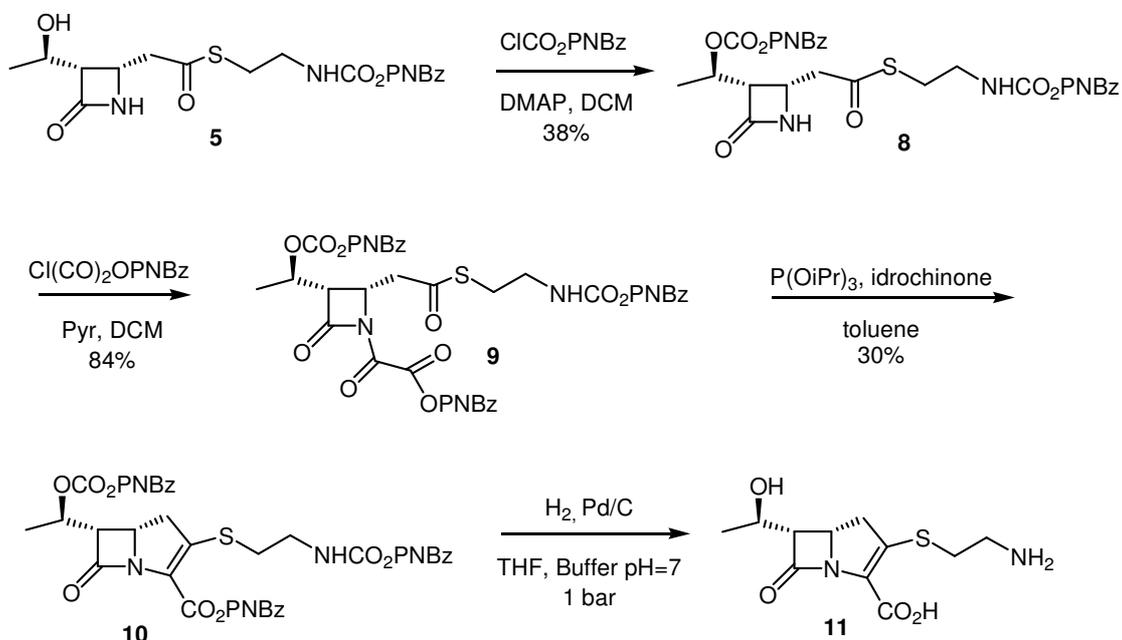
Data l'elevata reattività del sistema biciclico finale, è stata valutata la possibilità di impiegare un gruppo protettore più labile del TBS, il TMS (trimetilsilile) (composto **6**, *schema 8*), introdotto dopo deprotezione del -OTBS sul prodotto **2**. Il nuovo gruppo protettore è stato però perso durante

l'introduzione della funzione ossalilica sull'azoto  $\beta$ -lattamico, recuperando dopo lavorazione il derivato **7**. Su di esso sono stati effettuati tentativi di ciclizzazione e di ulteriore protezione come -OTMS e -O-*p*-nitrobenzilcarbonato, tentativi che non hanno dato esito positivo.



*Schema 8.*

A questo punto, è stato utilizzato un ulteriore gruppo funzionale per la funzione idrossilica, il *p*-nitro benzil carbonato, introdotto sul derivato **5** con resa del 38% (*schema 9*). Anche in questo caso, la funzionalizzazione dell'azoto azetidionico, a dare il derivato **9** e la ciclizzazione intramolecolare attraverso reazione di Wittig, hanno permesso di ottenere il composto biciclico **10** al 30% di resa. Ai fini di ottenere la Epitienamicina di interesse, è stato possibile rimuovere tutti i gruppi protettori in un solo passaggio, tramite reazione di idrogenolisi condotta con palladio su carbone in THF e tampone fosfato a pH 7 ad un bar di atmosfera di idrogeno. Dopo filtrazione del catalizzatore, il composto **11** è stato purificato per flash-cromatografia a fase inversa ed ottenuto dopo processo di liofilizzazione.



**Schema 9.**

Nella strategia sintetica riportata è risultato di fondamentale importanza il gruppo protettore della funzione ossidrilica in catena laterale. Il *p*-nitrobenzilcarbonato si è rivelato un buon gruppo protettore, facile da introdurre e stabile alle condizioni di reazione dei successivi passaggi, è stato poi rimosso insieme con gli altri gruppi protettori in un unico step.

È stato, quindi, possibile sintetizzare per la prima volta l'Epitienamicina caratterizzata da configurazione relativa C5-C6 *cis* e configurazione specifica C5*S*, C8*S*, C8*R*, utilizzando come starting material il derivato estere benzilico 4-alciliden-azetidionico.

Sul composto sintetizzato sono stati effettuati preliminari test biologici, che non hanno ancora però permesso di determinare l'eventuale attività biologica a causa dell'instabilità del composto nel brodo di coltura.

## Parte sperimentale

(1) Ad una soluzione di {3-[1-(*t*-Butil-dimetil-silanilossi)-etil]-4-osso-azetidina-2-ilidene}-acido acetico estere benzilico (1.33 mmol, 501 mg) in EtOH (5 mL) viene aggiunto palladio su carbone al 10% (110.2 mg) e la miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione in atmosfera di idrogeno (8 atm). Dopo 48 h viene filtrata e concentrata, ottenendo il prodotto come solido bianco (361 mg, 98%).

M.p. = 120-125 °C.  $[\alpha]_{25}^D = -54$  ( $c = 0.76$ , CH<sub>3</sub>OH). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.10$  (s, 6H), 0.88 (s, 9H), 1.30 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 2.87 (dd,  $J_1 = 2.7$  Hz,  $J_2 = 17.4$  Hz, 1H), 2.99 (dd,  $J_1 = 10.8$  Hz,  $J_2 = 17.4$  Hz, 1H), 3.26 (dd,  $J = 5.1$  Hz,  $J_2 = 6.3$  Hz, 1 H), 4.04 (ddd,  $J_1 = 2.7$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz,  $J_3 = 10.8$ , 1 H), 4.28 (quint,  $J = 6.3$ , 1H), 7.35 (br s, 2 H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = -4.8, -3.8, 17.9, 22.4, 25.8, 35.1, 48.5, 60.0, 65.05, 170.0, 175.4. GC-MS:  $R_t = 11.1$  min,  $m/z$ : 185(5), 142(100), 100(40). IR (film): 3420, 1636, 1419, 1044 cm<sup>-1</sup>.

(2) Ad una soluzione di (1) (1.4 mmol, 394 mg) in CH<sub>3</sub>CN (15 mL) a 0 °C viene aggiunta dicicloesilcarbodimide (DCC) (1.4 mmol, 282.6 mg). La miscela di reazione viene mantenuta sotto agitazione a 0 °C per 10 min e dopo vengono aggiunti (2-mercapto-etil)-acido carbammico *p*-nitro-benzil estere (1.78 mmol, 455.7 mg) e *N,N*-dimetil-4-amminopiridina (DMAP) (1.37 mmol, 167.4 mg). Dopo 20 min la miscela viene portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione tutta la notte. Dopo filtrazione il grezzo viene concentrato e purificato tramite flash-cromatografia (Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO = 90:10) ottenendo il prodotto come olio giallo (374 mg, 51%).

$[\alpha]_{25}^D = -46$  ( $c = 0.55$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.10$  (s, 6 H), 0.89 (s, 9 H), 1.29 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H), 2.93-3.25 (m, 5 H), 3.34-3.48 (m, 2 H), 4.04-4.05 (m, 1 H), 4.25 (quintet,  $J = 6.3$  Hz, 1 H), 5.19 (s, 2 H), 5.44 (t,  $J = 5.7$ , 1 H), 6.55 (br s, 1 H), 7.51 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H), 8.21 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = -4.8, -3.8, 17.9, 22.4, 25.8, 29.8, 32.7, 40.5, 45.6, 48.3, 60.6, 65.1, 65.3, 123.7, 128.1, 143.8, 147.6, 156.0, 167.8, 197.9. HPLC-MS:  $R_t = 11.4$  min,  $m/z$ : 526 [M + H]<sup>+</sup>, 548 [M + Na]<sup>+</sup>, 1051 [2M + H]<sup>+</sup>, 1073 [2M + Na]<sup>+</sup>. IR (film): 3330, 2930, 2856, 1754, 1728, 1523, 1347, 1256, 837 cm<sup>-1</sup>.

(3) Ad una soluzione di 2 (0.1 mmol, 50 mg) in THF (3 mL) viene aggiunto l'acido cloro-osso-acetico benzil estere (0.76 mmol, 152 mg) e TEA (1 mmol, 140  $\mu$  L). Dopo 3 h, la reazione viene spenta con H<sub>2</sub>O ed etil acetato a 0 °C. Le fasi acquose vengono estratte con etil acetato e le fasi organiche seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO = 90:10) ad ottenere il prodotto come olio incolore (53 mg, 82%).

$[\alpha]_{25}^D = +18$  ( $c = 1.8$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 0.08 (s, 6 H), 0.86 (s, 9H), 1.25 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 2.99 (dt,  $J_1 = 6.3$  Hz,  $J_2 = 13.3$  Hz, 1 H), 3.16-3.28 (m, 1 H), 3.40-3.59 (m, 5 H), 4.40 (dq,  $J_1 = 4.2$  Hz,  $J_2 = 6.6$  Hz, 1 H), 4.81 (dd,  $J_1 = 6.6$  Hz,  $J_2 = 12.3$ , 1 H), 5.19 (s, 2 H), 5.32 (s, 2 H), 5.41 (br t, 1 H), 7.35-7.38 (m, 5 H), 7.50 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2 H), 8.20 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = -5.2, -4.1, 17.8, 22.1, 25.7, 30.3, 40.4, 43.0, 51.7, 60.3, 65.1, 65.4, 68.8, 123.7, 128.0, 128.6,

128.9, 129.0, 133.8, 144.0, 147.5, 155.9, 156.0, 160.0, 164.5, 196.4. IR (film): 3396, 3000, 2940, 2855, 1806, 1753, 1728, 1699, 1522, 1348  $\text{cm}^{-1}$ .

(4) Ad una soluzione di (3) (0.07 mmol, 53 mg) in toluene (2 mL) e benzil cloruro (1 mL) vengono aggiunti trietil fosfito (0.46 mmol, 81  $\mu\text{L}$ ) ed idrochinone (una punta di spatola). Dopo 25 min. alle microonde (700 watt), la miscela viene concentrata. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia ( $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ :  $(\text{CH}_3)_2\text{CO} = 95:5$ ) ad ottenere il prodotto come olio incolore (15 mg, 33%).

$[\alpha]_{25}^{\text{D}} = -12$  ( $c = 1.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.05 (s, 3 H), 0.08 (s, 3 H), 0.82 (s, 9 H), 1.31 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2 H), 2.92 (dt,  $J_1 = 6.6$  Hz,  $J_2 = 13.2$  Hz, 1 H), 3.01-3.10 (m, 2 H), 3.45 (dd,  $J_1 = 6.0$  Hz,  $J_2 = 12.3$  Hz, 2 H), 3.57 (dd,  $J_1 = 5.4$  Hz,  $J_2 = 6.0$  Hz, 1 H), 3.80 (dd,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 17.4$  Hz, 1 H), 4.09-4.18 (m, 1 H), 4.21-4.29 (m, 1 H), 5.19 (s, 2 H), 5.26 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1 H), 5.30 (br s, 1 H), 5.34 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1 H), 7.28-7.37 (m, 3 H), 7.44-7.52 (m, 4 H), 8.22 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = -5.1, -4.2, 17.7, 22.1, 25.6, 32.1, 36.6, 41.0, 53.1, 60.4, 65.3, 65.5, 66.7, 123.8, 124.3, 127.9, 128.0, 128.1, 128.4, 135.7, 143.6, 147.0, 147.6, 155.7, 161.2, 175.7. HPLC-MS:  $R_t = 13.6$  min,  $m/z$ : 656  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 673  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ . IR (film): 3363, 3000, 2930, 2856, 1778, 1726, 1710, 1524, 1347  $\text{cm}^{-1}$ .

(5) Il composto è stato sintetizzato attraverso una procedura nota in letteratura modificata.<sup>12</sup>

Ad una soluzione di (2) (0.6 mmol, 309 mg) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (15 mL) a 0 °C viene aggiunto gocciolando  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.9 mmol, 120  $\mu\text{L}$ ) e dopo 30 min la miscela di reazione viene portata a temperatura ambiente. Dopo 4 ore si procede con lo spegnimento con tampone fosfato (pH 7, 0.5 M, 15 mL) ed etil acetato (20 mL). Le fasi acquose vengono estratte con etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per triturazione in dietil etere ad ottenere il prodotto come solido bianco (207 mg, 84%).

M.p. = 145-147 °C.  $[\alpha]_{25}^{\text{D}} = -24$  ( $c = 1.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.41 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H), 2.78-3.15 (m, 3 H), 3.21-3.27 (m, 2 H), 3.38-3.46 (m, 2 H), 4.06-4.23 (m, 2 H), 5.20 (s, 2 H), 5.24 (br s, 1 H), 6.37 (br s, 1 H), 7.51 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2 H), 8.22 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 29.4, 40.4, 45.3, 48.2, 48.4, 60.3, 64.2, 65.3, 123.8, 128.2, 143.7, 147.6, 156.0, 167.2, 197.9. HPLC-MS:  $R_t = 5.6$  min,  $m/z$ : 412  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . IR (nujol): 3354, 1755, 1739, 1693, 1659, 1521, 1351  $\text{cm}^{-1}$ .

(6) Ad una soluzione di (5) (0.18 mmol, 72 mg) in DCM (2.5 mL) viene aggiunto cloro-trimetil-silano (0.56 mmol, 71  $\mu\text{L}$ ) e TEA (0.54 mmol, 76  $\mu\text{L}$ ). Dopo 3 ore, la miscela viene concentrata, viene aggiunto  $\text{Et}_2\text{O}$  e la miscela viene filtrata. Il grezzo viene concentrato e purificato per flash-cromatografia ( $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ :  $(\text{CH}_3)_2\text{CO} = 90:10$ ) ad ottenere il prodotto come olio incolore (95 mg, 86%).

---

12 Steven A. King, Brenda Pipik, Andrew S. Thompson, Ann DeCamp, Thomas R. Verhoeven *Tetrahedron Letters* **1995**, 36(26), 4563-4566.

$[\alpha]_{25}^D = -59$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.13 (s, 9 H), 1.31 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3 H), 2.87-3.14 (m, 4 H), 3.22 (ddd,  $J_1 = 1.5$  Hz,  $J_2 = 3.6$  Hz,  $J_3 = 6.9$  Hz, 1 H), 3.30-3.45 (m, 2 H), 4.04 (ddd,  $J_1 = 2.7$  Hz,  $J_2 = 5.4$  Hz,  $J_3 = 8.4$  Hz, 1 H), 4.15 (dq,  $J_1 = 6.0$  Hz,  $J_2 = 8.7$  Hz, 1 H), 5.17 (s, 2 H), 5.66 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1 H), 6.80 (br s, 1 H), 7.49 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H), 8.19 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.5, 22.5, 29.2, 40.4, 45.4, 48.2, 60.5, 65.1, 65.2, 123.6, 128.0, 143.9, 147.5, 156.0, 167.9, 198.1. HPLC-MS:  $R_t = 9.8$  min,  $m/z$ : 484  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 506  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 989  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ . IR (film): 3331, 2956, 1754, 1724, 1705, 1523, 1348  $\text{cm}^{-1}$ .

(7) Ad una soluzione di (6) (0.14 mmol, 68 mg) in THF (2.5 mL) viene aggiunto acido cloro-osso-acetico benzil estere (0.4 mmol, 84 mg) e TEA (0.5 mmol, 69  $\mu\text{L}$ ). Dopo 2 ore, la reazione viene spenta con  $\text{H}_2\text{O}$  ed etil acetato a 0 °C. Le fasi acquose vengono estratte con etil acetato e le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene concentrato e purificato per flash-cromatografia ( $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ :  $(\text{CH}_3)_2\text{CO} = 90:10$ ) ad ottenere il prodotto come olio incolore (63 mg, 80%).

$[\alpha]_{25}^D = +16$  ( $c = 1.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.40 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 2.64 (br s, 1 H), 3.07 (dd,  $J_1 = 5.7$  Hz,  $J_2 = 12.0$  Hz, 1 H), 3.24 (dd,  $J_1 = 7.4$  Hz,  $J_2 = 16.2$  Hz, 1 H), 3.39-3.47 (m, 2 H), 3.50 (dd,  $J_1 = 6.6$  Hz,  $J_2 = 9.6$  Hz, 1 H), 4.21 (dq,  $J_1 = 6.3$  Hz,  $J_2 = 10.2$  Hz, 1 H), 4.73-4.80 (m, 1 H), 5.19 (s, 2 H), 5.32 (s, 2 H), 5.36 (br s, 1 H), 7.36-7.41 (m, 5 H), 7.50 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2 H), 8.21 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 22.4, 29.4, 40.3, 42.0, 51.6, 60.3, 63.3, 65.2, 68.8, 123.7, 128.0, 128.7, 128.9, 130.0, 133.7, 143.9, 147.5, 156.0, 156.1, 159.7, 163.4, 196.2. HPLC-MS:  $R_t = 9.6$  min,  $m/z$ : 574  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 596  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1169  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ . IR (film): 3403, 2929, 1805, 1748, 1728, 1522, 1348  $\text{cm}^{-1}$ .

(8) Il composto è stato sintetizzato attraverso una procedura nota in letteratura modificata.<sup>8</sup>

Ad una soluzione di (5) (0.4 mmol, 179 mg) in  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (12 ml) a 0 °C vengono aggiunti *p*-nitrobenzil cloroformiato (1.5 mmol, 312.6 mg) e DMAP (1.5 mmol, 177.1 mg). Dopo 20 min la miscela di reazione viene portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per 6 h. La reazione viene spenta con tampone fosfato (pH 7, 0.5 M, 10 mL) e  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (10 mL). Le fasi acquose vengono estratte con  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ , le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia ( $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ :  $(\text{CH}_3)_2\text{CO} = 95:5$ ) ottenendo il prodotto come solido bianco (90 mg, 38%).

M.p. = 150-152 °C.  $[\alpha]_{25}^D = -39$  ( $c = 0.75$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.51 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H), 2.66-2.80 (m, 2 H), 2.94 (dt,  $J_1 = 5.7$  Hz,  $J_2 = 14.0$  Hz, 1 H), 3.13 (dt,  $J_1 = 5.7$  Hz,  $J_2 = 14.0$  Hz, 1 H), 3.32-3.46 (m, 2 H), 3.49 (ddd,  $J_1 = 1.8$  Hz,  $J_2 = 5.4$  Hz,  $J_3 = 10.8$  Hz, 1 H), 4.06-4.14 (m, 1 H), 5.01 (dq,  $J_1 = 6.3$  Hz,  $J_2 = 10.8$  Hz, 1 H), 5.09 (t,  $J = 6.9$ , 1 H), 5.20 (s, 2 H), 5.23 (d,  $J = 13.5$  Hz, 1 H), 5.31 (d,  $J = 13.5$  Hz, 1 H), 6.44 (br s, 1 H), 7.50-7.57 (m, 4 H), 8.21-8.27 (m, 4 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 18.9, 29.7, 40.2, 44.7, 48.0, 57.6, 65.5, 68.1, 71.6, 123.7, 124.0, 128.2, 128.5, 142.1, 143.6, 147.7, 148.0, 153.7, 156.1, 165.1, 196.8. HPLC-MS:  $R_t = 9.08$  min,  $m/z$ : 591  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 614  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1181  $[2\text{M} + \text{H}]^+$ . IR (nujol): 3322, 1759, 1736, 1686, 1522  $\text{cm}^{-1}$ .

(9) Il composto è stato sintetizzato attraverso una procedura nota in letteratura modificata.<sup>13</sup>

Ad una soluzione di (8) (0.2 mmol, 122 mg) in  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (5 mL) viene aggiunta piridina (1 mmol, 76  $\mu\text{L}$ ) e acido cloro-osso-acetico 4-nitro-benzil estere (0.8 mmol, 204 mg). Dopo 12 ore la miscela di reazione viene concentrata ed il grezzo purificato tramite HPLC semi-preparativa ( $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 0:100$ ) ad ottenere il prodotto come olio incolore (134 mg, 84%).

$[\alpha]_{25}^{\text{D}} = +6$  ( $c = 2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.51 (d,  $J = 5.8$  Hz, 3 H), 2.88 (dt,  $J_1 = 6.6$  Hz,  $J_2 = 13.4$  Hz, 1 H), 3.07-3.43 (m, 6 H), 3.79 (dd,  $J_1 = 7$  Hz,  $J_2 = 10$  Hz, 1 H), 4.66-4.82 (m, 1 H), 5.15-5.26 (m, 5 H), 5.42 (s, 2 H), 7.52-7.61 (m, 6 H), 8.18-8.30 (m, 6 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 18.7, 29.1, 40.2, 41.4, 51.5, 57.4, 65.0, 67.0, 68.2, 70.3, 123.5, 123.7, 127.9, 128.4, 129.0, 140.7, 141.7, 143.9, 147.4, 147.8, 147.9, 153.4, 155.3, 155.7, 159.1, 162.1, 195.0. HPLC-MS:  $R_t = 11.1$  min,  $m/z$ : 820  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . IR (film): 3405, 3082, 2939, 1805, 1752, 1719, 1701, 1607, 1522, 1348  $\text{cm}^{-1}$ .

(10) Il composto è stato sintetizzato attraverso una procedura nota in letteratura modificata.<sup>14</sup>

Ad una soluzione di (9) (0.05 mmol, 37 mg) in toluene (7 mL) vengono aggiunti triisopropil fosfito (0.25 mmol, 30  $\mu\text{L}$ ) ed idrochinone (una punta di spatola). La miscela viene lasciata a riflusso per 30 ore e dopo viene concentrata. Il grezzo viene purificato per triturazione in *n*-pentano ad ottenere il prodotto olio giallo (12 mg, 30%).

$[\alpha]_{25}^{\text{D}} = -15$  ( $c = 1.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.52 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H), 2.90-3.08 (m, 2 H), 3.17 (t,  $J = 9.2$  Hz, 1 H), 3.42 (dd,  $J_1 = 6.2$  Hz,  $J_2 = 12.8$  Hz, 1 H), 3.53 (dd,  $J_1 = 5.8$  Hz,  $J_2 = 12.4$  Hz, 1 H), 3.83 (dd,  $J_1 = 5.4$  Hz,  $J_2 = 9.6$  Hz, 1 H), 4.20-4.36 (m, 1 H), 4.66-4.78 (m, 1 H), 4.61 (dd,  $J_1 = 6.2$  Hz,  $J_2 = 12.4$  Hz, 1 H), 5.06-5.51 (m, 4 H), 5.24 (s, 2 H), 5.84 (br s, 1 H), 7.45-7.64 (m, 6 H), 8.17-8.21 (m, 6 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 18.6, 32.0, 36.3, 41.1, 53.0, 57.6, 65.1, 68.1, 72.2, 73.4, 116.0, 123.5, 123.6, 123.7, 127.9, 128.1, 128.2, 128.3, 142.0, 142.9, 147.5, 147.8, 149.0, 149.7, 153.8, 155.9, 160.5, 173.9. HPLC-MS:  $R_t = 11.1$  min. IR (film): 3350, 3080, 2985, 2928, 1774, 1724, 1707, 1690, 1606, 1549, 1384  $\text{cm}^{-1}$ .

(11) Il composto è stato sintetizzato attraverso una procedura nota in letteratura modificata.<sup>15</sup>

Ad un soluzione di (10) (0.07 mmol, 52 mg) in THF (4 mL) e tampone fosfato (4 mL, pH = 7, 0.25 M) viene aggiunto palladio su carbone al 10% (18.2 mg). La reazione viene lasciata sotto agitazione in atmosfera di idrogeno (1 atm) e seguita per HPLC [UV (water) 298nm]. Dopo 2 ore viene evaporato il THF ed il grezzo viene purificato per flash-cromatografia su MCI GEL CHP20P (tampone fosfato, pH 7, 0.1 M). Il prodotto viene ottenuto dopo liofilizzazione.

13 Kenneth J. Wildonger, William J. Leanza, Ronald W. Ratcliffe, and James P. Springer *Heterocycles* **1995**, 41(9), 1891.

14 *The Journal of Antibiotics* **1989**, Vol XLII (3), 375-381.

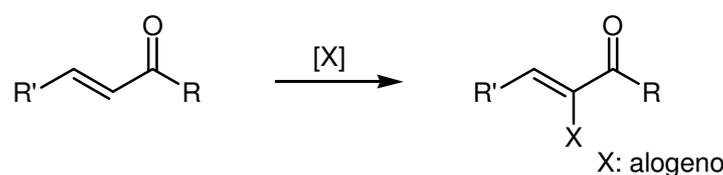
15 Katsumi Fujimoto, Yuji Iwano and Koichi Hirai *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1986**, 1363-1369.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.27 (d,  $J = 3.6$  Hz, 3 H), 3.04-3.25 (m, 5 H), 3.60 (dd,  $J = 9.8$  Hz, 1 H), 4.0-4.30 (m, 3 H).

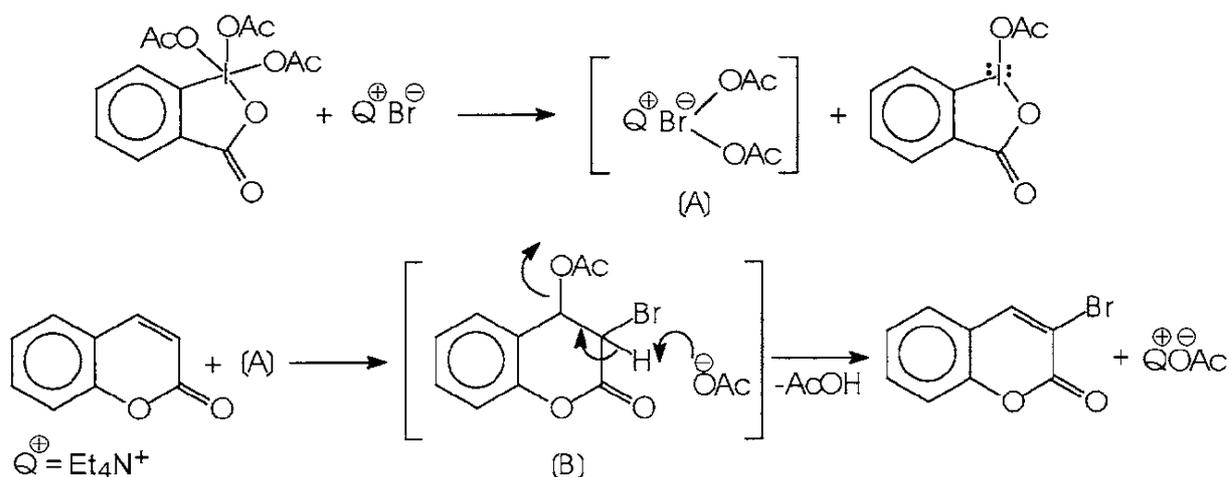
### Capitolo III I 4-alciliden- $\beta$ -lattami come sintoni: reazione di alodecarbossilazione

Come detto nel capitolo II, il gruppo di ricerca dove ho condotto il mio lavoro di Dottorato si è occupato di testare la reattività chimica dei 4-alciliden-azetidionici, in particolare, diversi studi sono stati rivolti alla funzionalizzazione del doppio legame alcilidenico. In passato, è stata studiata la reazione di alogenazione vinilica su derivati esterei 4-alciliden-azetidionici. Tale reazione è molto impiegata in chimica organica, in quanto permette di inserire su sistemi vinilici di varia natura atomi di alogeno tramite sostituzione di un protone vinilico.

La  $\alpha$ -alogenazione di composti carbonilici  $\alpha,\beta$ -insaturi è poco riportata in letteratura.



Alcuni protocolli propongono la sintesi di  $\alpha$ -enoni attraverso di-bromurazione seguita da deidroalogenazione promossa da basi quali la TEA.<sup>1,2</sup> I casi di alogenazione diretta coinvolgono per lo più chetoni  $\alpha,\beta$ -insaturi. Akamanchi riporta la bromurazione diretta di chetoni e lattoni  $\alpha,\beta$ -insaturi impiegando il dispendioso Periodinano di Dess-Martin.<sup>3</sup> L'agente bromurante è il reattivo A, formatosi dalla reazione tra il Periodinano ed il tetraetilammonio bromuro, indicato nel meccanismo riportato come  $Q^+Br^-$ .

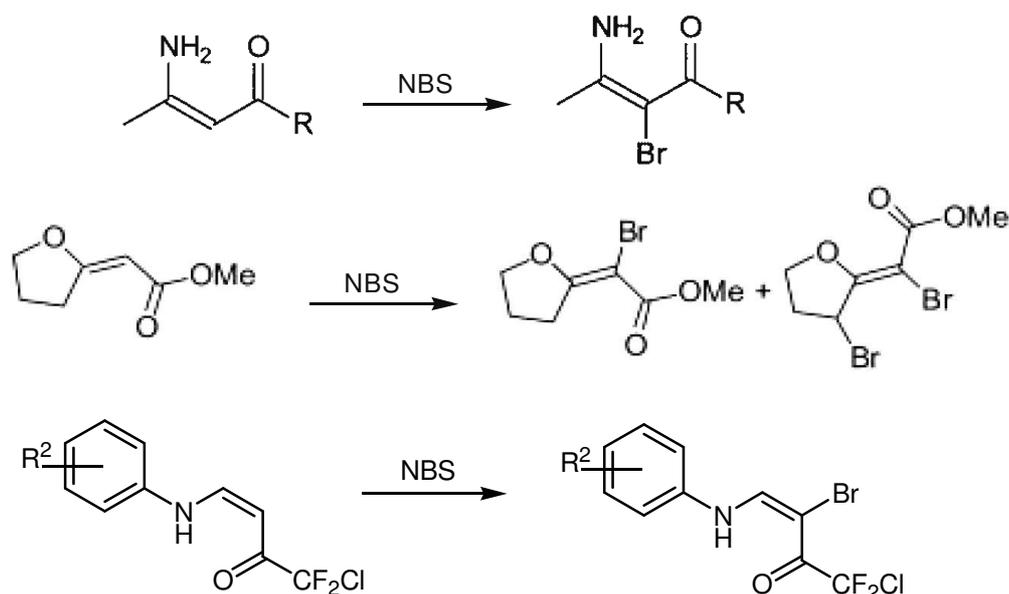


1 G. L. Dunn, V. J. Di Pasquo, and J. R. E. Hoover. *J. Org. Chem.* **1968**, 1454-1459.

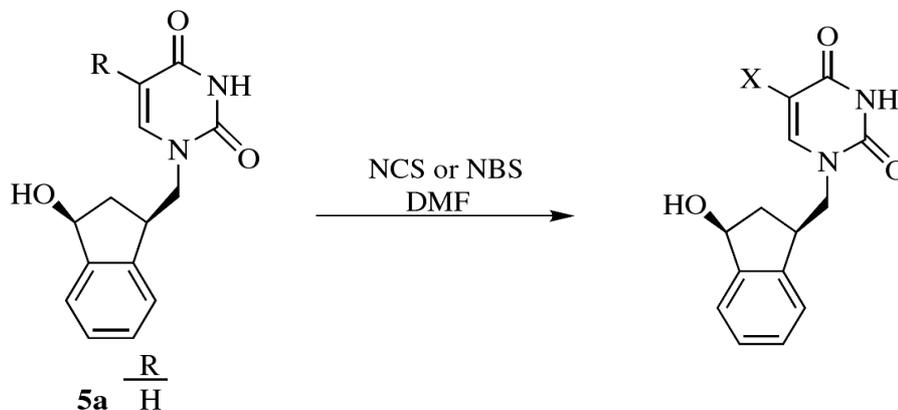
2 C. Ye, J. M. Shreeve. *J. Org. Chem.* **2004**, 8561-8563.

3 G. V. Ramanarayanan, V. G. Shukla, K. G. Akamanchi. *Synlett*, **2002**, 2059-2061.

Molto frequente è anche la bromurazione diretta ad opera di NBS (*N*-bromosuccinimide) di composti  $\beta$ -ammino-  $\alpha,\beta$ -insaturi,<sup>4</sup> 2-alcilidentetraidrofuran<sup>5</sup> e  $\beta$ -amminovinilclorodifluorometil chetoni.<sup>6</sup>



In letteratura sono riportati anche diversi esempi di bromurazione di substrati più complessi, come i carbonucleosidi, analoghi dei nucleosidi noti per esplicare specifiche attività biologiche.<sup>7</sup>



Sostituzione vinilica di esteri- $\beta$ -ammido- $\alpha,\beta$ -insaturi non è presente in letteratura. Questa interessante reazione è stata studiata dal mio gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la mia tesi sui substrati 4-alciliden-azetidionici **a** e **b**. In presenza di fonti alogenanti, è stata osservata una sostituzione ossidativa dell'atomo di idrogeno vinilico del doppio legame, ottenendo i corrispondenti cloro-, bromo- e iodo derivati. Nella *tabella 1* sono riportati i risultati ottenuti per i

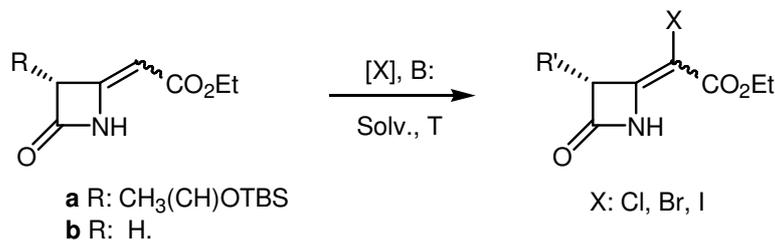
4 M. E. F. Braimante, H. T. S. Braimante, G. B. Rosso, J. K. Da Roza, *Synthesis* **2001**, 1935-1937.

5 E. Bellur, P. Langer, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4815-4828.

6 M. Mèdebiella, O. Onomura, R. Keirouz, E. Okada, H. Yano, T. Terauchi, *Synlett*, **2002**, 2601-2608.

7 F. Fernandez, X. Garcia-Mera, C. Lopez, M. Morales, J. E. Rodriguez-Borges, *Synlett* **2005**, 3549-3554.

composti **a** e **b** dopo un accurato screening condotto sulla natura della fonte alogenante, sul solvente e sulla temperatura.

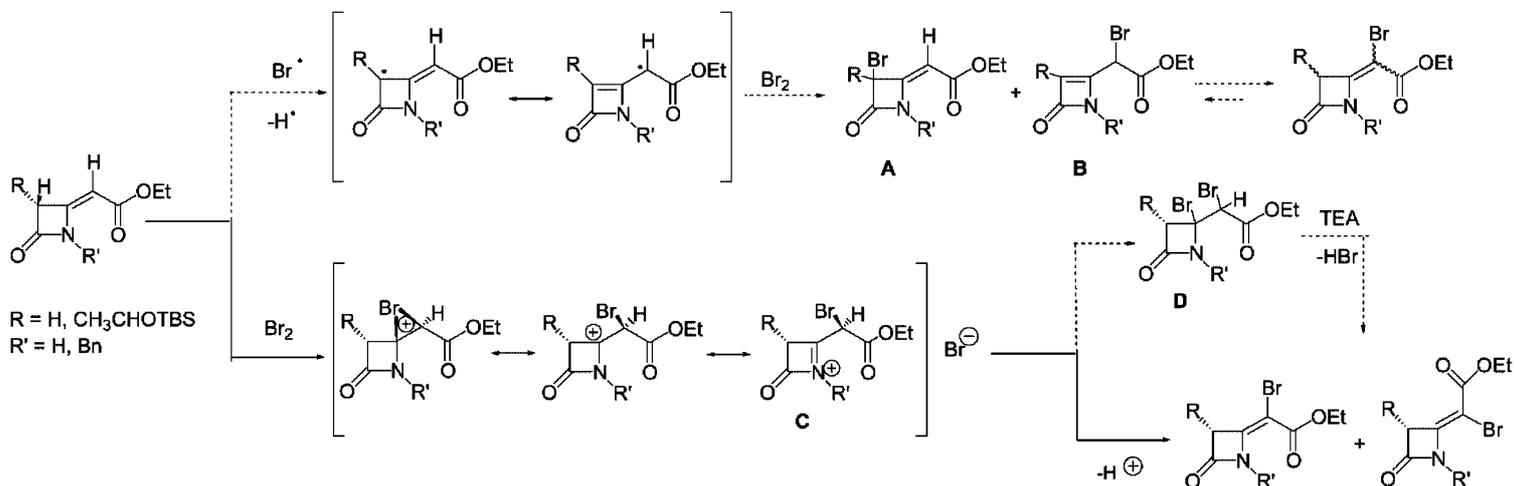


<i>Substrato</i>	<i>X</i>	<i>Fonte di alogeno(eq.)</i>	<i>Condizioni di reazione</i> (TEA eq.)	<i>Y(%)</i>	<i>Z/E</i>
(Z)- <b>a</b>	Br	NBS (1)	TEA (1), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , r.t.	95	40:60
(E)- <b>a</b>	Br	PyrHBr <sub>3</sub> (1.1)	TEA (1.1), CH <sub>3</sub> CN, 0 °C	78	63:37
(Z)- <b>b</b>	Br	PyrHBr <sub>3</sub> (1.1)	TEA (1.1), CH <sub>3</sub> CN, 0 °C	95	80:20
(E)- <b>b</b>	Br	PyrHBr <sub>3</sub> (1.1)	TEA (1.1), CH <sub>3</sub> CN, 0 °C	90	95:5
(Z)- <b>a</b>	Cl	Cl <sub>2</sub> (sat. sol.)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0 °C	67	80:20
(E)- <b>b</b>	Cl	Cl <sub>2</sub> (sat. sol.)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0 °C	64	67:33
(Z)- <b>a</b>	I	I <sub>2</sub> (2.5)	TEA (1.2), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , r.t.	52	44:56
(Z)- <b>b</b>	I	NIS (1.5)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , r.t.	90	75:25
(E)- <b>b</b>	I	NIS (1)	TEA (1), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , r.t.	95	54:46

**Tabella 1.**

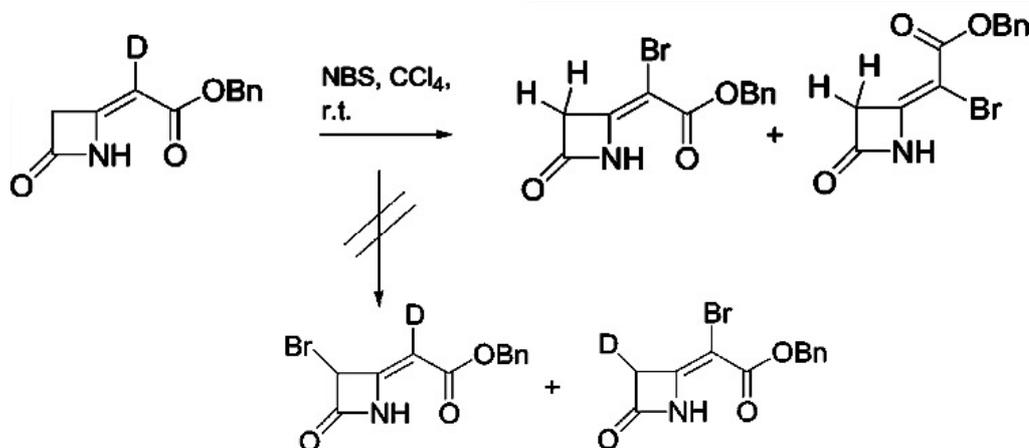
La reazione è stata condotta su entrambi gli stereoisomeri *E* e *Z* degli starting material e, come dimostra la tabella, la stereochimica non viene conservata, i prodotti vengono, infatti, ottenuti come miscela diastereomerica *Z/E*, pur utilizzando il substrato di partenza con configurazione del doppio legame definita. La presenza della TEA come specie basica, nella maggior parte dei casi, si è dimostrata utile ai fini di aumentare la velocità di reazione. Il protocollo messo a punto permette di ottenere bromo-, cloro- e iodo-derivati in ottime rese e in blande condizioni di reazione. I composti **a** e **b** non hanno manifestato reattività nei confronti della fluorurazione.

Dai risultati ottenuti è stato proposto un meccanismo di reazione:<sup>1</sup>



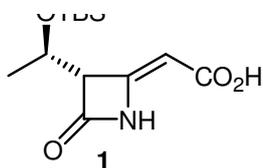
Il meccanismo più probabile è quello di tipo cationico, che prevede una prima formazione dell'intermedio bromonio seguito dal ripristino del doppio legame a dare i prodotti alogenati.

Il meccanismo di tipo allilico radicalico è meno probabile, in quanto, conducendo la reazione di sostituzione vinilica in presenza di un iniziatore radicalico come l'AIBN non si ha incremento della velocità di reazione e non è mai stato osservato il composto **A**, infine, se la reazione procedesse attraverso la formazione del composto **B**, in equilibrio con la sua forma più stabile, si avrebbe racemizzazione sul centro C-3, che non è mai stata osservata. Per escludere ulteriormente il meccanismo radicalico, la reazione è stata condotta sull'estere benzilico deuterato, osservando la formazione del composto atteso, senza registrare alcuna presenza di derivati deuterati, che si avrebbero nel caso di un meccanismo radicalico.



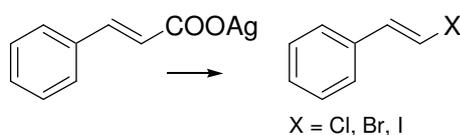
Visti gli interessanti risultati ottenuti in tale studio, è stato mio interesse applicare la reazione di alogenazione vinilica all'acido carbossilico insaturo **1** (*figura 1*), ottenuto in due passaggi attraverso una procedura riportata in letteratura.<sup>8</sup>

8 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.



**Figura 1.**

La reazione di decarbossilazione dei sali di acidi carbossilici accompagnata da un simultaneo rimpiazzamento con un alogeno è nota come reazione di Hunsdiecker-Borodine,<sup>9</sup> molto utilizzata per la sintesi di substrati organici alogenati. La versione classica di tale reazione (**figura 2**) coinvolge sali di argento (I) di acidi  $\alpha,\beta$ -insaturi, generalmente acidi cinnammici che, in presenza di alogeno molecolare tramite reazione radicalica, vengono convertiti esclusivamente nei corrispondenti mono-alogenovinilstireni.



**Figura 2.**

Esistono diverse varianti di questa reazione che impiegano, ad esempio, sali di Hg(II)<sup>10</sup> e Tl(I).<sup>11</sup> Problematiche relative a questo tipo di reazione, quali la necessità di raggiungere alte temperature, rese alquanto basse, la pericolosità e la tossicità di alogeno molecolare e dei sali di metalli pesanti hanno portato alla messa a punto di protocolli di reazione alternativi, che pongono attenzione anche alla sostenibilità ambientale.<sup>12</sup>

### **III.1 Alodecarbossilazione del substrato acido carbossilico 4-allylidene-azetidionico.**

Il derivato **1**, sottoposto alle stesse condizioni di reazione trovate per i 4-allylidene esteri etili, non subisce sostituzione vinilica, ma reazione di alodecarbossilazione.<sup>13</sup> In presenza di alogeni quali F, Br, Cl e I, sono stati ottenuti i corrispondenti mono- ed anche l'inatteso prodotto di di-alogenazione, ulteriore evidenza della particolare reattività del doppio legame del substrato **1**. Come prima esplorazione, volta a testare la reattività del composto nei confronti di una alodecarbossilazione, è stato effettuato uno screening utilizzando il bromo come agente alogenante. Sono stati utilizzati NBS (*N*-bromosuccinimide), piridiniotribromuro (PyrHBr<sub>3</sub>) e

9 C. H. Hunsdiecker, *Ber. Disch. Chem. Ges. B* **1942**, 75, 291–295. R. G. Johnson, R. K. Ingham *Chem. Rev.* **1956**, 56, 219-269. Y-L. Huang, Y-H. Cheng, K-C. Hsien, Y-L. Chen, C-L Kao *Tetrahedron Letters* **2009** 50, 1834–1837. *Russ. Chem. Bull. Int.Ed.* **2008**, 57 118-123.

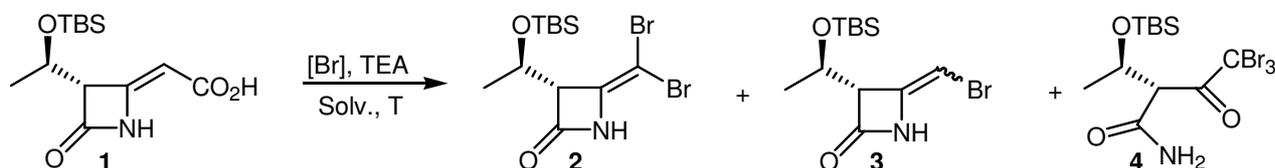
10 Stanley Cristol, William Firth, Jr. *J. Org. Chem.* **1961**, 280.

11 Alexander McKillop, David Bromley, Edward C. Taylor. *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 1172–1173.

12 Dinabandhu Naskar, Sujit Roy. *Tetrahedron* **2000**, 56,1369-1377. H.-W. You, K. J. Lee, *Synlett* **2001**, 105. C. Kuang, Q. Yang, H. Senboku, M. Tokuda *Synthesis* **2005**, 1319–1325. S. Ramgopal, K. Ramesh, A. Chakradhar, N. Maasi Reddy, K. C. Rajanna *Tetrahedron Letters* **2007**, 48, 4043–4045.

13 Paola Galletti, Arianna Quintavalla, Caterina Ventrici, and Daria Giacomini, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 26, 4541-4547.

bromo molecolare come fonte di alogeno e trietilammina (TEA) come base sia in quantità catalitiche che stechiometriche. Lo screening è stato effettuato anche sul tipo di solvente e sulla temperatura (*tabella 2*). Le reazioni sono state seguite tramite TLC ed HPLC a fase inversa e le rese percentuali sono relative ai prodotti dopo purificazione per flash-cromatografia.



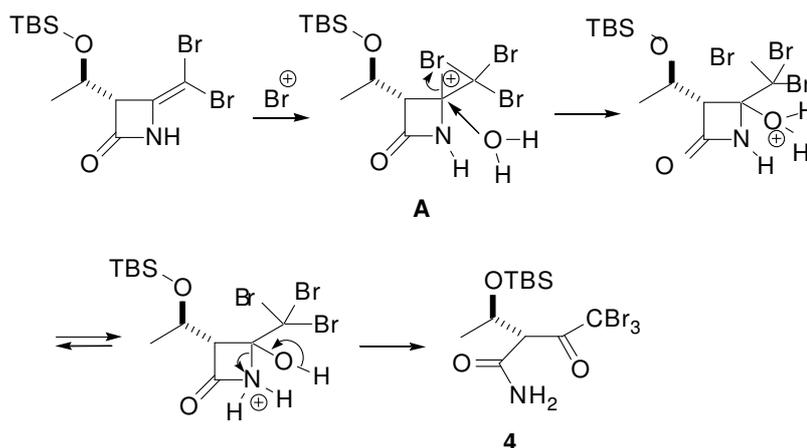
<i>Prova</i>	<i>Reagente (eq)</i>	<i>TEA (eq)</i>	<i>Condizioni</i>	<i>2 (Y%)<sup>a</sup></i>	<i>3 (Y%)<sup>a</sup></i>	<i>4 (Y%)<sup>a</sup></i>
1	NBS (2)	-	DCM, rt, 22 h	13	-	45
2	NBS (1)	0.2	DCM, rt, 5 h	23	-	-
3	NBS (2)	0.2	DCM, rt, 3.5 h	45	4	-
4	NBS (2)	1	DCM, rt, 3 h	51	5	-
5	NBS (5)	1	DCM, rt, 3 h	57	-	12
6	NBS (2)	2	DCM, rt, 3 h	51	-	18
7	Br <sub>2</sub> (2)	1	DCM, rt, 3 h	25	-	21
8	PyrHBr <sub>3</sub> (1.1)	1.1	CH <sub>3</sub> CN, 0°-rt, 5.5 h	36	-	-
9	PyrHBr <sub>3</sub> (2.1)	3.3	CH <sub>3</sub> CN, 0 °C, 1.5 h	68	-	8

**Tabella 2.**

Sorprendentemente, la reazione procede nella maggior parte dei casi verso la formazione del dibromovinil derivato **2** con NBS e TEA (prove 2-6), mentre in assenza di TEA il prodotto principale risulta essere la cheto-ammido **4** (prova 1). La presenza della base, quindi, risulta essere fondamentale ai fini della reazione. Per quanto riguarda il mono-bromovinil derivato **3**, è stato ottenuto in tracce solo in due casi (prove 3 e 4). Tentativi volti ad ottimizzare il protocollo dimostrano che le condizioni migliori per ottenere il composto **2** al 51% di resa prevedono l'impiego di 2-5 equivalenti di NBS ed 1 equivalente di TEA in diclorometano (DCM) (prova 4). Con l'aumentare degli equivalenti di NBS o di TEA, aumenta la quantità del sottoprodotto **4** (prove 5-6).

Esplorando il possibile impiego di ulteriori fonti bromuranti, quale il bromo molecolare, i risultati dimostrano che quest'ultimo non è un valido alogenante (prova 7). Il PyrHBr<sub>3</sub>, invece, permette di ottenere il prodotto **2** al 68% di resa (prova 9) con poco più di 2 equivalenti ed un eccesso di TEA. In nessuna prova è stato registrato il derivato bromo-vinil acido carbossilico; ciò indica che lo step di decarbossilazione è caratterizzato da una elevata reattività.

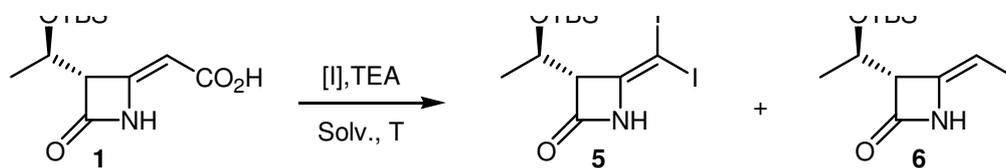
La prevalente formazione del solo prodotto di di-bromurazione può essere imputata alla maggiore reattività del derivato mono-alogenato nei confronti di un'altra reazione di sostituzione, reattività maggiormente manifestata dal composto di-alogenato, il quale, a seconda delle condizioni di reazione, subisce un'ulteriore addizione elettrofila da parte dell'alogeno a dare il sottoprodotto **4**. Come mostrato nello *schema 1*, l'intermedio **A**, derivante da un terzo attacco del bromo, durante il processo acquoso di lavorazione subisce attacco nucleofilo dell'acqua e successiva apertura dell'anello  $\beta$ -lattamico a dare il composto **4**.



*Schema 1.*

Dai risultati ottenuti dall'esplorazione relativa alla bromurazione, la procedura è stata estesa verso la iodo-decarbossilazione, in presenza di *N*-iodosuccinimide (NIS) o iodio molecolare e TEA come base (*tabella 3*). La seguente tabella dimostra che la iododecarbossilazione del composto **1** procede con una cinetica più veloce rispetto alla bromodecarbossilazione e la reazione procede anche in assenza di TEA (prova 1 e 2). In questo caso, con 1 eq. di NIS senza TEA si ottiene una miscela dei derivati di- e monoiodurati **5** e **6**, mentre con 2 eq. di NIS, si ha la sola formazione del composto di-diiodurato **5** con resa del 75% (prova 2). La presenza della TEA provoca in tutte le reazioni studiate l'ottenimento di una miscela di prodotti (prove 3-4).

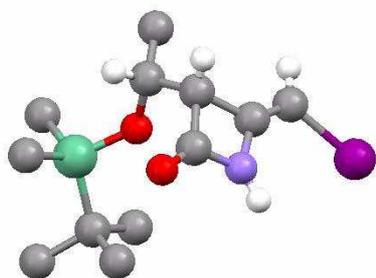
Lo iodio molecolare porta ad iododecarbossilazione solo in presenza di TEA: con 1 eq. di  $\text{I}_2$  e di TEA si ha la sola formazione del derivato monoiodio **6** all'81% di resa, mentre con 2 eq. di  $\text{I}_2$  e di TEA viene ottenuta una miscela di **5** e **6** (prove 6 e 7). Attraverso, quindi, l'ottimizzazione del protocollo sintetico, è possibile ottenere selettivamente il prodotto diiodurato **5** al 75% di resa ed il prodotto monoiodurato con resa dell'81% attraverso blande condizioni di reazione ed in tempi brevi. In nessuna delle prove condotte sono stati osservati prodotti di decomposizione.



<i>Prova</i>	<i>Reagente (eq)</i>	<i>TEA (eq)</i>	<i>Condizioni di reazione</i>	<i>5 (Y%)<sup>a</sup></i>	<i>6 (Y%)<sup>a</sup></i>
1	NIS (1)	-	0 °C- rt, 5.5 h	27	16
2	NIS (2)	-	0 °C, 1 h	75	-
3	NIS (1.1)	2.2	0 °C, 30'	36	19
4	NIS (2.1)	3.2	0 °C, 40'	42	48
5	I <sub>2</sub> (1)	-	0 °C- rt, 5 h	-	-
6	I <sub>2</sub> (1)	1	rt, 1 h	-	81
7	I <sub>2</sub> (2)	2	0 °C- rt, 3 h	12	36

**Tabella 3.**

Lo iodo derivato **6** è sempre stato ottenuto come singolo stereoisomero *Z*. Tale configurazione è stata assegnata tramite analisi di diffrazione ai raggi X su cristallo singolo (**figura 3**).<sup>14</sup> L'isomero *E* non è mai stato osservato nelle analisi <sup>1</sup>H NMR o HPLC-MS condotte sui grezzi di reazione.



**Figura 3.** Struttura molecolare del composto **6**.

Hydrogen atoms of methyl groups are hidden for shake of clarity. *Crystal data:* C<sub>12</sub> H<sub>22</sub> I N O<sub>2</sub> Si, M=367.30, monoclinic, P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, *a* = 7.6742(4), *b*=12.3072(7), *c*=18.1998(12)Å, V= 1718.93(17)Å<sup>3</sup>,

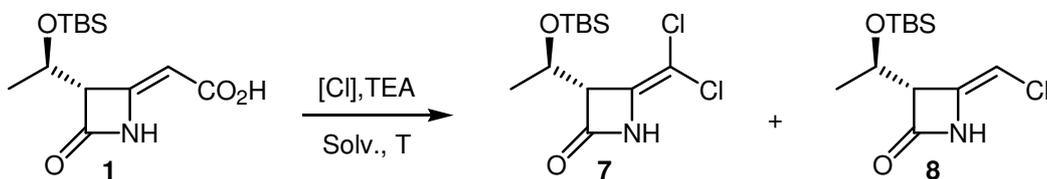
*Z*=4, T=293(2)°C, μ(Mo-Kα)=1.926 mm<sup>-1</sup>, 10161 reflections measured, 4007 unique (R<sub>int</sub>=0.0436), R<sub>1</sub>=0.0905 (I>2σ(I)), wR<sub>2</sub>=0.2276.

L'ottenimento selettivo dell'isomero *Z* potrebbe essere imputabile alla possibile formazione di un legame idrogeno N...H...Alogeno, come dimostrano lavori presenti in letteratura,<sup>15</sup> che spingerebbe verso la formazione dell'isomero termodinamicamente più favorito.

Successivamente, è stata esplorata la reazione di clorodecarbossilazione in presenza di *N*-clorosuccinimide (NCS) (**tabella 4**).

<sup>14</sup> CCDC 731431 contiene i dati cristallografici per il composto **6**. I dati possono essere ricavati dal The Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

<sup>15</sup> *Crystal Growth and Design*, **2008**, 8(4), 1294-1300.

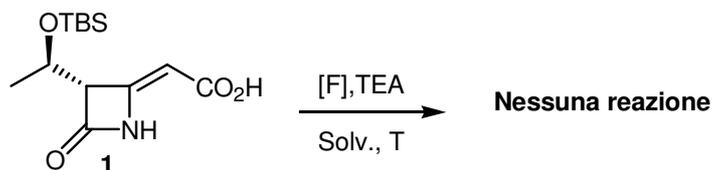


<i>Prova</i>	<i>Reagente (eq)</i>	<i>TEA (eq)</i>	<i>Condizioni di reazione</i>	<i>7(Y%)<sup>a</sup></i>	<i>8(Y%)<sup>a</sup></i>
1	NCS (1)	-	rt, 72 h	-	-
2	NCS (1)	-	AIBN 20%, rt, 24 h	-	-
3	NCS (1)	0.5	rt, 60 h	16	13
4	NCS (2)	3	0 °C, 1 h	22	6
5	NCS (4)	4	t.a. – riflusso 3.5 h	11	3

**Tabella 4.**

La clorodecarbossilazione non avviene come nei casi precedenti: la reazione procede in presenza di TEA portando sempre ad una miscela dei prodotti **7** e **8**, con rese massime rispettive del 22% e del 13% (prove 3-5). La presenza dell'iniziatore radicalico AIBN nella miscela di reazione non favorisce la formazione dei prodotti (prova 2); ciò indica che, molto probabilmente, la reazione non procede attraverso meccanismo radicalico, come evidenziato in un lavoro di Joergensen,<sup>16</sup> meccanismo già escluso per la sostituzione vinilica dei 4-alkiliden-azetidioni esteri etilici<sup>1</sup>.

I tentativi di ottenere i corrispondenti derivati fluorurati sono risultati vani (**tabella 5**).



<i>Prova</i>	<i>Reagente (eq)</i>	<i>TEA (eq)</i>	<i>Condizioni di reazione</i>	<i>Prodotti</i>
1	Selectfluor (2)	TEA (1)	CH <sub>3</sub> CN, 0°C-r.t., 48 h.	-
2	(PhSO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NF (2)	TEA (1)	DCM, r.t., 144 h.	-
3	Bn <sub>4</sub> NF (1)	TEA (1)	THF, 0°C-r.t., 72 h.	-
4	KF (1)	TEA (1)	CH <sub>3</sub> CN, 0°C-r.t., 72 h.	-

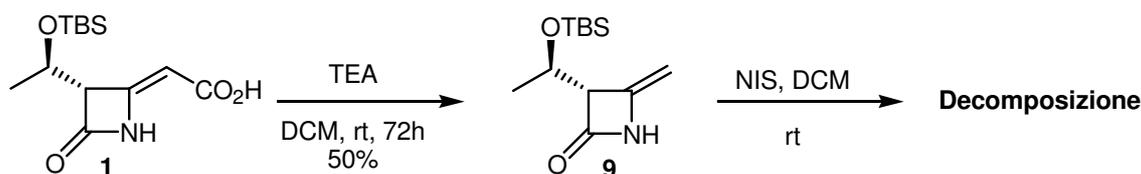
**Tabella 5.**

Utilizzando due diverse fonti di F<sup>+</sup>, come l'1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]ottano bis-(tetrafluoroborato) (Selectfluor) (prova 1) e la bis-solfonilbenzil fluoro ammido (prova 2) in

16 A. Graven, K. A. Joergensen, S. Dahl, A. Stanczak *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 3543-3546.

presenza o assenza di TEA, il reagente non è soggetto ad alcun tipo di reattività. Sono state condotte anche reazioni utilizzando fonti di fluoruro quali  $\text{Bn}_4\text{NF}$  e  $\text{KF}$  per escludere un qualsiasi tipo di meccanismo via  $\text{F}^-$  ed anche in questo caso vi è stato un totale recupero del reagente (prove 3-4).

L'ottenimento di dialovinil composti attraverso reazione di Hunsdiecker-Borodine non ha precedenti e proprio questa peculiare reattività del substrato **1** ha spinto ad investigare il meccanismo di reazione coinvolto. S. Roy e collaboratori<sup>17</sup> propongono un meccanismo ionico per la reazione di alodecarbossilazione, asserendo che l'anione carbossilato del reagente acido risulta essere l'intermedio chiave che promuove con maggior velocità la alodecarbossilazione rispetto all'acido non deprotonato. Ai fini di affermare la stessa teoria per il sistema da me esaminato, è stata condotta una prova di reattività del composto **1** in presenza di sola TEA (*schema 2*). La reazione procede molto lentamente verso la formazione del prodotto decarbossilato **9** al 50% di resa, sul quale, sia in situ che dopo lavorazione, è stata condotta reazione di alogenazione in presenza di NIS, senza ottenere alcun tipo di derivato alogenato, ma una lenta decomposizione del composto **9**.



*Schema 2.*

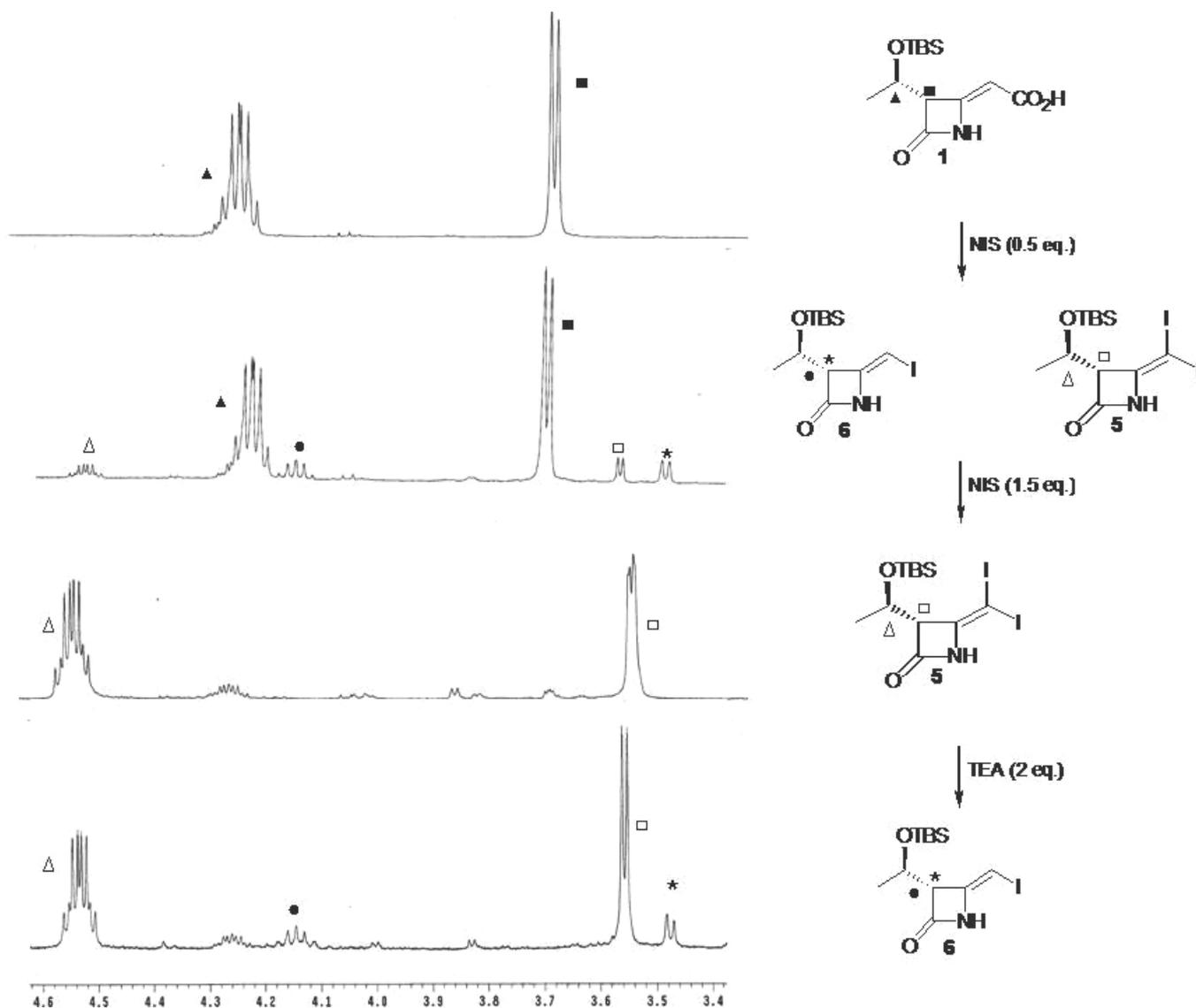
Questo risultato dimostra che il passaggio di alogenazione avviene prima o in concomitanza con la decarbossilazione.

Grazie al semplice protocollo di reazione ed ai distinti segnali di risonanza al  $^1\text{H}$  NMR dei composti **1**, **5**, e **6** è stato possibile seguire il procedere della reazione in corso. In particolare, è stata studiata la reazione di iododecarbossilazione in tubino NMR, a 400 MHz, in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  come solvente di reazione a temperatura ambiente, analizzando i segnali di risonanza al protone.

In un primo esperimento, ad una soluzione di acido **1** (13 mg, 46  $\mu\text{mol}$ ) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  (0.7 mL) è stata aggiunta una prima aliquota di NIS (0.5 eq.), osservando immediatamente la comparsa dei segnali di risonanza dei prodotti **6** e **5** (*figura 4*). La presenza di tali prodotti dimostra l'elevata

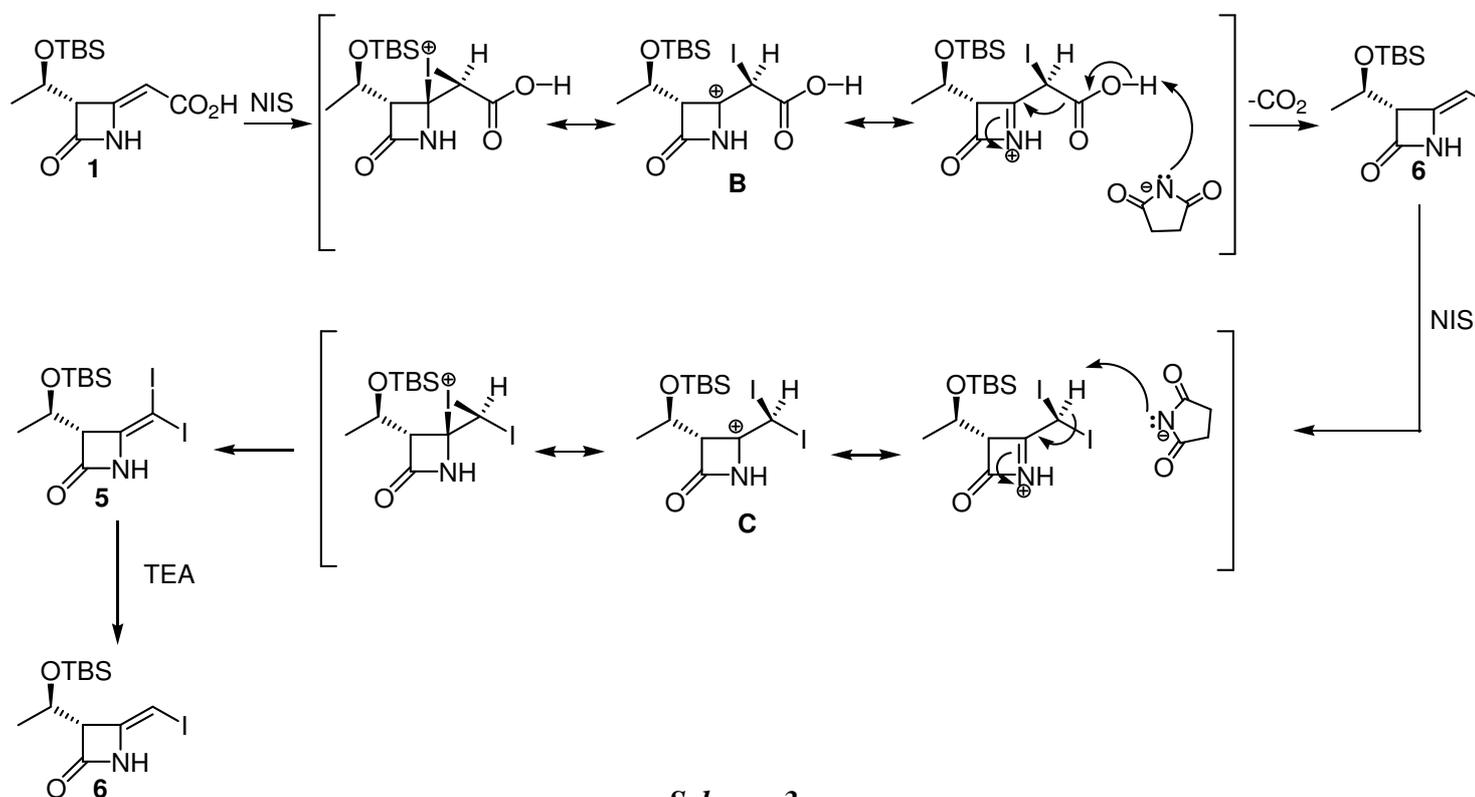
<sup>17</sup> D. Naskar, S. Roy *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1999**, 2435-2436.

reattività del reagente **1** nei confronti di un'ulteriore sostituzione vinilica. Aumentando, infatti, la quantità di NIS (0.5 eq. alla volta), si nota prima la totale conversione dell'acido nei prodotti, seguita dalla conversione del prodotto monoiodurato nel prodotto diiodurato. Con 2 eq. totali di NIS si ha la sola presenza del composto diiodurato. Non è stata osservata la specie iodovinil acido carbossilico, ciò conferma che i passaggi di decarbossilazione e iodurazione procedono in maniera concomitante. A questo punto nell'ambiente di reazione sono stati aggiunti 2 eq. di TEA, che, in maniera inaspettata, fungendo da agente deiodurante, provoca la ricomparsa del prodotto monoiodurato **6**.



**Figura 4.**

I risultati ottenuti da tale esperimento hanno permesso di ipotizzare un meccanismo di reazione (*schema 3*):



L'addizione elettrofila dello ione iodonio sul doppio legame porta alla formazione di un intermedio **B** alogenonio carico positivamente, stabilizzato dal lone pair dell'atomo di azoto. La succinimide formatasi agisce da base, promuovendo la decarbossilazione in concomitanza con il ripristino del doppio legame, e questo spiega il procedere della reazione di iododecarbonylazione anche in assenza di TEA. Una seconda veloce addizione di iodonio porta alla formazione dell'intermedio **C**, che subisce un ulteriore ripristino del doppio legame promossa dalla base. Questa inusuale reattività del prodotto monoiodurato verso la reazione di addizione rappresenta la "driving force" per l'inattesa formazione del composto diiodurato.

In un lavoro in cui Roy e Das studiano la cinetica della alodecarbonylazione di acid  $\alpha$ - $\beta$ , insaturi con N-bromosuccinimide, si asserisce che la reazione è del primo ordine rispetto alla base quale la TEA<sup>18</sup>. Nel mio caso, l'acido **1** reagisce con NIS anche in assenza di TEA.

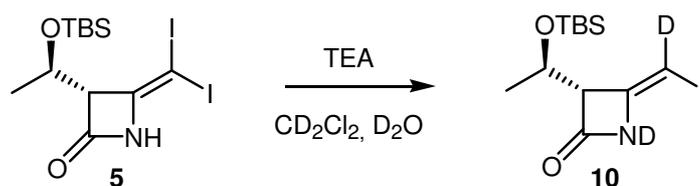
Il ruolo della TEA, però, non è di immediata comprensione. A seconda delle condizioni di reazione, infatti, si hanno dei risultati differenti: la TEA con NIS porta alla formazione di una miscela di prodotti mono- e diiodurati, mentre la TEA con I<sub>2</sub> porta al monoiodurato o ad una miscela (*tabella 3*, prove 3, 4, 6 e 7). In presenza del solo composto diiodurato, la TEA sembra fungere da agente deiodurante ripristinando il composto monoiodurato. Ai fini di determinare l'effettivo ruolo della TEA come agente deiodurante a prescindere dalla miscela di reazione, è

18 P. Das, S. Roy *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 7861-7864.

stata condotta una prova sul composto **5**, precedentemente purificato e TEA in DCM; anche in questo caso, la reazione procede lentamente verso il prodotto **6**.

Per avere maggiori delucidazioni in merito, quest'ultima prova è stata condotta in tubino NMR, registrando i segnali di rilassamento al protone; aggiungendo TEA (2 eq.) al composto **5** (13 mg, 26  $\mu\text{mol}$ ) sciolto in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  (0.7 mL) si osserva istantaneamente la scomparsa del segnale del protone ammidico del reagente. Dopo 2 ore si osservano i segnali del derivato monoiodurato **6** e dopo 12 ore si ha la conversione totale del reagente, risultato che, ancora una volta, dimostra l'effetto deiodurante della TEA.

Per determinare la fonte del protone che va in sostituzione dell'atomo di iodio, lo stesso esperimento è stato condotto in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  (0.7 mL) e qualche goccia di  $\text{D}_2\text{O}$  (20  $\mu\text{L}$ ) (*schema 4*), osservando la formazione del composto deuterato **10**. Ciò dimostra che la TEA provoca una certa mobilità del protone ammidico del  $\beta$ -lattame, che in presenza di acqua deuterata subisce immediato scambio con il deuterio e che la fonte protonica risulta essere il solvente, in particolare l'acqua, comunque presente in traccia come umidità.



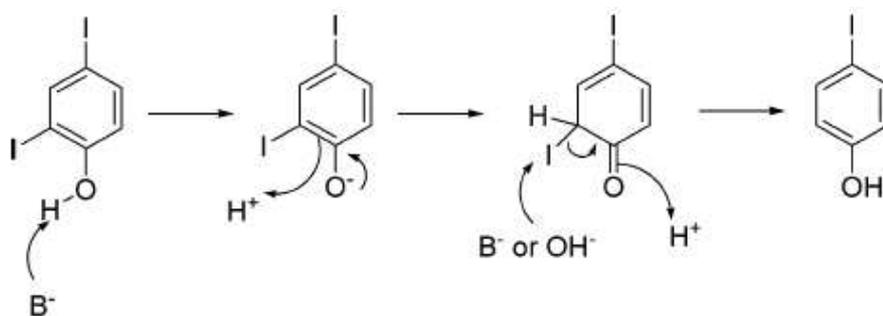
*Schema 4.*

Anche se i risultati sperimentali ottenuti dimostrano che la TEA provoca la riduzione del composto diiodurato a monoiodurato, non si è ancora riusciti a proporre un meccanismo idoneo che possa delucidare l'effettivo ruolo della base.

In letteratura sono presenti alcuni lavori in cui basi azotate promuovono la dealogenazione. Un esempio è il lavoro di Chern che riporta la deiodurazione di areni *o*-iodo-idrossilati ad opera di ammine terziarie quali TEA, piridina ed *N*-metilmorfolina in presenza di acqua.<sup>19</sup>

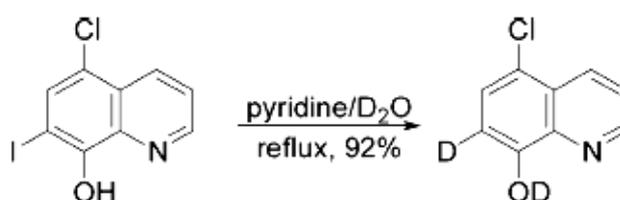
Di seguito è riportato il meccanismo (*schema 5*), che propone una prima deprotonazione della funzione ossidrilica da parte dell'ammina, con conseguente riarrangiamento della carica negativa e protonazione a formare il dienone tautomero. Successivamente un altro equivalente di base o un ione idrossido attaccano nucleofilicamente l'atomo di iodio, portando al prodotto deiodurato.

19 R. S. Talekar, G. S.Chen, S.-Y. Lai., J-W. Chern. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 8590-8593.



**Schema 5.**

Anche in questo caso viene stabilito che la fonte di protoni risulta essere l'acqua; impiegando basi anidre, infatti, non riscontrano la formazione del composto deiodurato, in più, conducendo la reazione in D<sub>2</sub>O ottengono il corrispondente composto deuterato (*schema 6*).



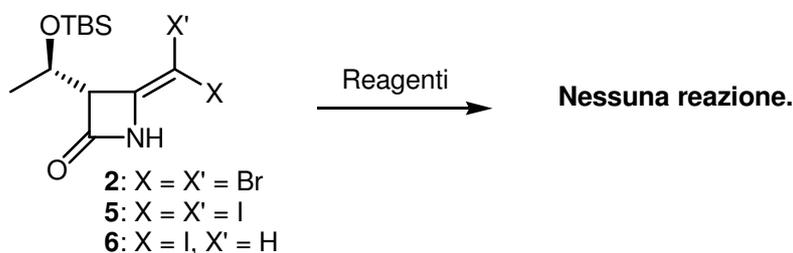
**Schema 6.**

I successi ottenuti sulla alodecarbossilazione dei 4-alciliden- $\beta$ -lattami esaminati rappresentano una buona opportunità di funzionalizzazione della catena insatura laterale di tali substrati per la sintesi di nuovi derivati azetidionici. I vinilalogenuri, infatti, sono importanti precursori in protocolli sintetici che prevedono, ad esempio, reazioni di cross-coupling catalizzate da metalli di transizione.<sup>20</sup>

Ho quindi condotto un preliminare studio circa la reattività degli alo-vinil-azetidionici **2**, **5** e **6** ottenuti nei confronti di reazioni di cross-coupling e reazioni di formazione dei corrispondenti reattivi organometallici, quali organolitio ed organomagnesio.

Così come i derivati carbossilici 4-alciliden-azetidionici hanno da sempre manifestato una particolare reattività, anche sui composti vinilalogenati **2**, **5** e **6** sono stati ottenuti risultati inaspettati. Per quanto riguarda le reazioni di cross-coupling, infatti, quali reazioni di Suzuki (*tabella 6*, prova 1), Sonogashira (prova 2) e Stille (prova 3), nessuno dei substrati ha dimostrato reattività. Anche portando a riflusso la miscela di reazione, i composti hanno dimostrato un'apprezzabile stabilità, in tutti i casi, infatti, è stato totalmente recuperato il derivato di partenza; solo nel caso della reazione di Sonogashira condotta sul derivato diiodurato **5** (prova 2) è stata osservata una parziale formazione del composto monoiodurato **6** a causa della presenza della TEA.

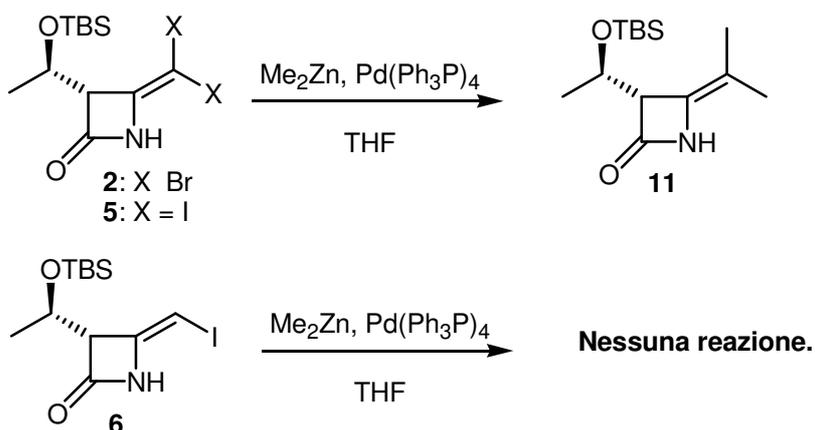
20 A. Rudolph, M. Lautens *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2656 – 2670. D.Ma , Q. Cai *Acc. Chem Res.* **2009**, *41*, 1450-1460.



<i>Prove</i>	<i>Substrato</i>	<i>Reagenti e condizioni di reazione</i>	<i>Prodotti</i>
1	<b>2, 6</b>	PhB(OH) <sub>2</sub> (2.2 eq.), Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> (5%), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.2 eq.), toluene, riflusso.	–
2	<b>5, 6</b>	PhCCH (1.2 eq.), CuI(5%), PdCl <sub>2</sub> (Ph <sub>3</sub> P) <sub>2</sub> (10%), TEA (2.2 eq), CH <sub>3</sub> CN, riflusso	–
3	<b>5</b>	CH <sub>2</sub> CHSnBu <sub>3</sub> (1.6 eq), Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> (10%) THF, riflusso	–

**Tabella 6.**

Risultati interessanti vengono ottenuti dalla reazione con Me<sub>2</sub>Zn, anche qui in presenza di quantità catalitiche di Pd(0) (*tabella 7*). In questo caso, si ha la formazione del prodotto disostituito **11**, sia per il composto dibromurato **2**, con resa del 35%, che per il diiodurato **5** (75%) che è risultato essere più reattivo a parità di condizioni. Per determinare, l'effettivo ruolo del catalizzatore, è stata condotta una prova in assenza di Pd (prova 4), senza osservare la formazione del prodotto. La catalisi metallica risulta, quindi, fondamentale ai fini della reazione. Inoltre, il composto **6** nelle medesime condizioni non reagisce (prova 3), ma viene recuperato dopo lavorazione, il che suggerisce una differente reattività di tale derivato rispetto al composto **5**.

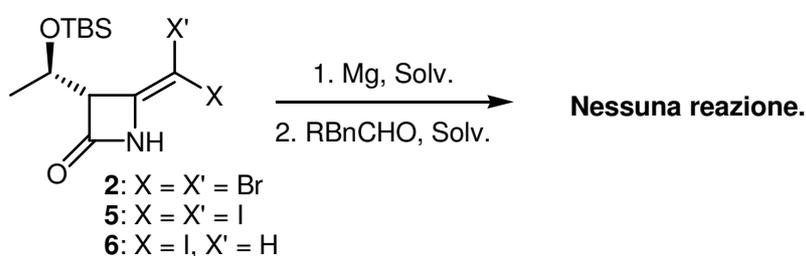


<i>Prove</i>	<i>Substrato</i>	<i>Reagenti e condizioni di reazione</i>	<i>Prodotti (Y%)</i>
1	<b>2</b>	Me <sub>2</sub> Zn (2 eq.), Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> (10%), THF, riflusso.	<b>11</b> (36)
2	<b>5</b>	Me <sub>2</sub> Zn (2 eq.), Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> (10%), THF, riflusso.	<b>11</b> (75)
3	<b>6</b>	Me <sub>2</sub> Zn (2 eq.), Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> (10%), THF, riflusso.	–
4	<b>5</b>	Me <sub>2</sub> Zn (2 eq.), THF, riflusso.	–

**Tabella 7.**

Nel tentativo di rendere i substrati **2**, **5** e **6** più reattivi, sono state effettuate delle prove volte ad ottenere, in presenza di n-BuLi o Mg i corrispondenti organometalli, per poi farli reagire come nucleofili su aldeidi. I primi tentativi sono stati condotti per la formazione dei reattivi di Grignard, in presenza di Mg metallico in THF o Et<sub>2</sub>O a bassa temperatura, impiegati successivamente come nucleofili in presenza di aldeidi aromatiche, benzaldeide o *p*-clorobenzaldeide (*tabella 8*). In nessun caso sono stati osservati i prodotti attesi, probabilmente per il difficile ottenimento del reattivo di Grignard.

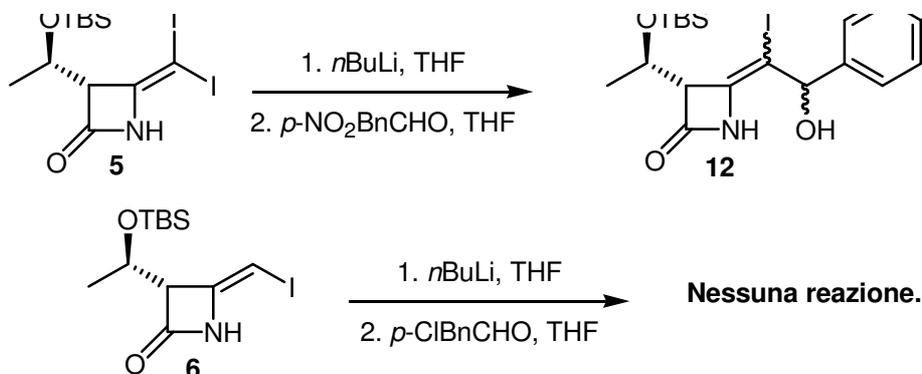
Anche in questo caso, l'inserzione metallica tra i legami C4'-alogeno risulta essere impedita, infatti, anche se il reattivo organometallico si fosse formato e non avesse reagito con l'aldeide, si sarebbero dovuto comunque osservare derivati di decomposizione del reattivo stesso.



<i>Prove</i>	<i>Substrato</i>	<i>Reagenti e condizioni di reazione</i>	<i>Prodotti</i>
1	<b>2</b>	1. Mg (2 eq.), Et <sub>2</sub> O, -78 °C 2. BnCHO (0.9 eq), Et <sub>2</sub> O, t.a.	–
2	<b>5, 6</b>	1. Mg (2 eq.), THF, -78 °C 2. <i>p</i> -ClBnCHO (0.9 eq), THF, t.a.	–

**Tabella 8.**

I tentativi volti alla formazione di organolitio hanno dati risultati differenti. La reazione di scambio alogeno-metallo condotta sul derivato **5** e la successiva reazione sulla *p*-nitrobenzaldeide ha portato all'ottenimento del prodotto di addizione nucleofila **12**, con resa del 20% (*tabella 9*, prova 1). Ancora una volta, il composto monoiodurato **6** non ha mostrato la stessa reattività, ma è stato recuperato a fine reazione (*tabella 8*, prova 2).



<i>Prove</i>	<i>Substrato</i>	<i>Reagenti e condizioni di reazione</i>	<i>Prodotti (Y%)</i>
1	5	1. <i>n</i> BuLi (2 eq.), THF, -78 °C 2. <i>p</i> -NO <sub>2</sub> BnCHO (0.9 eq), THF, t.a.	12 (20)
2	6	1. <i>n</i> BuLi (2 eq.), THF, -78 °C 2. <i>p</i> -ClBnCHO (0.9 eq), THF, t.a.	—

**Tabella 9.**

Infine, testando la possibilità di ottenere il derivato monobromurato **3**, ottenuto solo in tracce, tramite reazione riduttiva sul composto dibromurato **2**, è stato osservato che, in presenza di tributilstagno idruro e AIBN, si ha una completa debromurazione del composto a dare il vinil derivato **9** al 35% (*schema 10*). Questo composto è già stato ottenuto per decarbossilazione dell'acido **1** in presenza di TEA (*schema 5*) ed è caratterizzato da una breve stabilità anche se mantenuto in atmosfera inerte ed a basse temperature.



**Schema 10.**

I risultati relativi a queste preliminari prove condotte sui composti **2**, **5** e **6** evidenziano una particolare reattività dei substrati alogenati, che non subiscono reazioni di cross-coupling tipo Suzuki, Sonogashira e Stille, ma, i composti **2** e **5**, reagiscono nella reazione di cross-coupling palladio-catalizzata con Me<sub>2</sub>Zn a dare il composto di-sostituito **11**. I differenti risultati spingono ad ipotizzare un differente meccanismo coinvolto per i due tipi di coupling.

Inoltre, mentre sono falliti i tentativi di trasformare i substrati nei corrispondenti reattivi di Grignard, è stato possibile ottenere il litoderivato del composto **5**, che ha reagito successivamente con la *p*-nitrobenzaldeide. Anche se con bassa resa, è stato ottenuto il prodotto di addizione nucleofila **12**.

Il composto **6** non ha manifestato alcun tipo di reattività, a differenza del composto **5**.

È stata, quindi, studiata e sviluppata la sintesi di una nuova famiglia di  $\alpha$ - e dialovinil- $\beta$ -lattami, attraverso reazione di alodecarbossilazione sul derivato acido 4-alchiliden-azetidionico **1**. Il protocollo ottimizzato ha permesso di ottenere, in buone rese ed in blande condizioni di reazione, iodo-, diiodo- e dibromo derivati. Inoltre, sono stati condotti studi preliminari circa il possibile impiego di tali prodotti come sintoni per derivati più complessi.

Sono tuttora in corso opportuni test per determinare l'attività biologica dei prodotti ottenuti.

## Parte sperimentale

**Bromodecarbossilazione con NBS:** ad una soluzione di **1** (50 mg, 0.18 mmol) e TEA (0.03 mL, 0.18 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) viene aggiunta NBS (160 mg, 0.9 mmol). La reazione viene monitorata tramite TLC. Dopo conversione la miscela di reazione viene concentrata ed il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 95:5) ad ottenere i prodotti.

**Bromodecarbossilazione con Br<sub>2</sub>:** ad una soluzione di **1** (50 mg, 0.18 mmol) e TEA (0.03 mL, 0.18 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) viene aggiunto Br<sub>2</sub> (58 mg, 0.36 mmol). La reazione viene monitorata tramite TLC. Dopo conversione la miscela di reazione viene concentrata ed il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 95:5) ad ottenere i prodotti.

**Bromodecarbossilazione con PyHBr<sub>3</sub>:** ad una soluzione di **1** (50 mg, 0.18 mmol) e TEA (0.08 ml, 0.6 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (3 mL) viene aggiunto PyrHBr<sub>3</sub> (121 mg, 0.37 mmol) a 0 °C. La reazione viene monitorata tramite TLC. Dopo conversione la miscela di reazione viene concentrata ed il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 95:5) ad ottenere i prodotti.

**(2):** solido bianco; m.p. 125°C.  $R_f = 0.85$  (cicloesano/etil acetato, 8:2).  $[\alpha]_D^{25} = +56$  ( $c = 1$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = 0.09$  (s, 6 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.90 (s, 9 H, Si*t*Bu), 1.37 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CH), 3.67 (dd,  $J = 1.8$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1 H, CHCHOSi), 4.43 (dq,  $J = 3.4$  Hz,  $J = 6.6$  Hz, 1 H, CHCHOSi), 7.15 (br s, 1 H, NH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = -5.1, -4.5, 18.0, 21.3, 25.7, 60.5, 64.0, 64.4, 137.5, 163.7$  ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 13.1$  min,  $m/z$ : 398.3-400.2-402.2 [M + H]<sup>+</sup>, 422.0 [M + Na]<sup>+</sup>. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\tilde{\nu} = 3160, 3080, 2924, 2844, 1808, 1675, 1252, 1141, 963$  cm<sup>-1</sup>. C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>Si (396.97) calcolata: C 36.10, H 5.30, N 3.51; trovata: C 36.21, H 5.33, N 3.58.

**(4):** olio giallo.  $R_f = 0.50$  (cicloesano/etil acetato, 8:2). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = 0.06$  (s, 3 H, SiMe), 0.1 (s, 3 H, SiMe), 0.88 (s, 9H, Si*t*Bu), 1.39 (d,  $J = 5.4$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CH), 4.40-4.50 (m, 2H, CHCHOSi, CHCHOSi), 5.88 (br s, 1 H, NH), 6.32 (br s, 1 H, NH). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = -4.8, 17.8, 21.5, 25.7, 46.0, 60.0, 70.8, 168.2, 186.1$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t = 11.3$  min,  $m/z$ : 521-519-517-515 [M + Na]<sup>+</sup>. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\tilde{\nu} = 3329, 3186, 2927, 2855, 1735, 1686$  cm<sup>-1</sup>.

**Iododecarbossilazione con NIS:** ad una soluzione di **1** (50 mg, 0.18 mmol) e TEA (0.06 mL, 0.4 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) viene aggiunta NIS (45 mg, 0.20 mmol) a 0 °C. La reazione viene monitorata tramite TLC. Dopo conversione la miscela di reazione viene concentrata ed il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 95:5) ad ottenere i prodotti.

**Iododecarbossilazione con I<sub>2</sub>:** ad una soluzione di **1** (50 mg, 0.18 mmol) e TEA (0.05 mL, 0.36 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) viene aggiunto I<sub>2</sub> (91 mg, 0.36 mmol) a 0 °C. La reazione viene monitorata tramite TLC. Dopo conversione la miscela di reazione viene concentrata ed il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 95:5) ad ottenere i prodotti.

**(5):** solido giallo; m.p. 133 °C.  $R_f = 0.83$  (cicloesano/etil acetato, 8:2)  $[\alpha]_D^{25} = +47$  (c = 0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C) :  $\delta = 0.10$  (s, 6 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.91 (s, 9 H, Si*t*Bu), 1.32 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CH), 3.57 (dd,  $J = 1.8$  Hz,  $J = 3.6$  Hz, 1 H, CHCHOSi ), 4.54 (dq, ,  $J = 3.6$  Hz,  $J = 6.2$  Hz, 1 H, CHCHOSi), 7.5 (br s, 1 H, NH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = -4.9, -4.5, 18.0, 20.4, 25.8, 29.7, 63.9, 64.1, 145.1, 162.6$  ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 13.3$  min,  $m/z$ : 494.1 [M + H]<sup>+</sup>, 516.2 [M + Na]<sup>+</sup>. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\tilde{\nu} = 3137, 3066, 2951, 2924, 1798, 1764, 1656, 1256, 837$  cm<sup>-1</sup>. C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>I<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>Si (492.94) calcolata: C 29.22, H 4.29, N 2.84; trovata: C 29.31, H 4.34, N 2.79.

**(6):** solido giallo; m.p. 105 °C.  $R_f = 0.80$  (cicloesano/etil acetato, 8:2).  $[\alpha]_D^{25} = +20.14$  (c = 1.1, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = 0.06$  (s, 3 H, SiMe), 0.08 (s, 3 H, SiMe), 0.88 (s, 9 H, Si*t*Bu), 1.30 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CH), 3.49 (ddd,  $J = 0.6, J = 1.8$  Hz,  $J = 3.6$  Hz, 1 H, CHCHOSi ), 4.17 (dq, ,  $J = 6.0, J = 6.6, 1$  H, CHCHOSi), 5.06 (dd,  $J = 0.6, J = 1.2$  Hz, 1 H, C=CHI), 7.06 (br s, 1 H, NH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = -4.9, -4.2, 17.8, 22.2, 25.6, 42.7, 62.4, 65.4, 142.4, 165.7$  ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 12.1$  min,  $m/z$ : 368.1 [M + H]<sup>+</sup>, 385.2 [M + H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\tilde{\nu} = 3172, 3099, 2852, 2920, 1801, 1760, 1674, 1463, 1258, 956$  cm<sup>-1</sup>. C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>I<sub>1</sub>NO<sub>2</sub>Si (367.05) calcolata: C 39.24, H 6.04, N 3.81; trovata: C 39.28, H 6.06, N 3.84.

**Clorodecarbossilazione con NCS:** ad una soluzione di **1** (50 mg, 0.18 mmol) e TEA (0.04 mL, 0.27 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) viene aggiunta NCS (24 mg, 0.18 mmol). La reazione viene monitorata tramite TLC. Dopo conversione la miscela di reazione viene concentrata ed il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 95:5) ad ottenere la miscela dei prodotti. Gli spettri di **7** e di **8** sono stati registrati su frazioni di colonna arricchite.

**(7):**  $R_f = 0.84$  (cicloesano/etil acetato, 8:2).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = 0.08$  (s, 3 H, SiMe), 0.09 (s, 3 H, SiMe), 0.90 (s, 9 H, Si*t*Bu), 1.37 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 3.72 (dd,  $J = 1.6$  Hz,  $J = 3.2$  Hz, 1 H,  $\text{CHCHOSi}$ ), 4.34 (dq,  $J = 3.62$  Hz,  $J = 6.4$  Hz, 1 H,  $\text{CHCHOSi}$ ), 7.14 (br s, 1 H, NH) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = -5.2, -4.4, 17.9, 21.8, 25.7, 30.9, 63.5, 64.7, 132.8, 164.3$ . HPLC:  $R_t = 12.5$  min. IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\tilde{\nu} = 3182, 2929, 2856, 1803, 1691$   $\text{cm}^{-1}$ .

**(8):**  $R_f = 0.80$  (cicloesano/etil acetato, 8:2).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = 0.07$  (s, 3 H, SiMe), 0.08 (s, 3 H, SiMe), 0.88 (s, 9 H, Si*t*Bu), 1.29 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 3.57 (dd,  $J = 0.8$  Hz,  $J = 6.4$  Hz, 1 H,  $\text{CHCHOSi}$ ), 4.17 (quintet.,  $J = 6.4$  Hz, 1 H,  $\text{CHCHOSi}$ ), 5.35 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1 H,  $\text{CHCl}$ ), 7.23 ((br s, 1 H, NH) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = -4.9, -4.2, 17.9, 22.4, 25.7, 62.8, 65.4, 89.4, 135.6, 165.9$ . HPLC:  $R_t = 11.5$  min. IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\tilde{\nu} = 3182, 2954, 2885, 1803, 1691$   $\text{cm}^{-1}$ .

**(9):** questo prodotto è stato ottenuto attraverso due differenti vie sintetiche: *a*: partendo da **1**: ad una soluzione di **1** (50 mg, 0.18 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) viene aggiunta TEA (0.03 ml, 0.22 mmol). La reazione viene monitorata tramite TLC. Dopo conversione la miscela di reazione viene concentrata ed il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 70:30) ad ottenere il prodotto al 50 % di resa. *b*: partendo da **2**: ad una soluzione di **2** (50 mg, 0.13 mmol) e  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  (0.07 ml, 0.26 mmol) in etil acetato (4 mL) viene aggiunto AIBN (21 mg, 0.13 mmol). La reazione viene monitorata tramite TLC. Dopo conversione la miscela di reazione viene concentrata ed il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 70:30) ad ottenere il prodotto al 35 % di resa.

Olio incolore.  $R_f = 0.70$  (cicloesano/etil acetato, 8:2),  $[\alpha]_D^{25} = +16.20$  ( $c = 1, \text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = 0.08$  (s, 6 H,  $\text{SiMe}_2$ ), 0.90 (s, 9 H, Si*t*Bu), 1.31 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 3.46 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1 H,  $\text{CHCHOSi}$ ), 4.18 (dq,  $J = 5.8, J = 6.2$  Hz, 1 H,  $\text{CHCHOSi}$ ), 4.31 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1 H,  $\text{C=CH}$ ), 4.39 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1 H,  $\text{C=CH}$ ), 7.10 (br s, 1 H, NH) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24 °C):  $\delta = -4.9, -4.2, 18.0, 22.01, 25.7, 62.7, 65.7, 84.3, 140.7, 168.2$  ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 10.9$  min,  $m/z$ : 242  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 259  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ . IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\tilde{\nu} = 3213, 2927, 2856, 1791, 1717$   $\text{cm}^{-1}$

**(11):** ad una soluzione di **(5)** (30 mg, 0.06 mmol) e tetrakis(trifenilfosfina)palladio (7 mg, 0.006 mmol) in THF (1 mL) viene aggiunto  $\text{ZnMe}_2$  (0.06 ml, 2 M in toluene, 0.12 mmol) e la reazione viene portata a riflusso e monitorata tramite TLC. Dopo conversione la reazione viene spenta con una soluzione acquosa di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ed estratta con  $\text{Et}_2\text{O}$ , le fasi organiche vengono seccate su

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate ed il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 95:5) a dare il prodotto al 75 % di resa.

Il prodotto viene anche ottenuto dal dibromocomposto (**2**) nelle stesse condizioni di reazione al 36% di resa.

Olio giallo.  $R_f = 0.80$  (cicloesano/etil acetato, 80:20).  $[\alpha]_D^{25} = +12$  ( $c = 0.8$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24 °C):  $\delta = 0.08$  (s, 6 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9 H, Si*t*Bu), 1.31 (d,  $J = 6$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CH), 1.67 (s, 6 H, C=CMe<sub>2</sub>), 3.50 (m, 1 H, CHCHOSi), 4.21 (quintet.,  $J = 6$  Hz, 1 H, CHCHOSi), 6.80 (br s, 1 H, NH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = -4.7, -4.5, 17.7, 18.1, 19.3, 21.7, 25.8, 61.3, 66.4, 102.3, 126.8, 167.9$  ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 12.2$  min,  $m/z$ : 270 [M + H]<sup>+</sup>; 292 [M + Na]<sup>+</sup>. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\tilde{\nu} = 3241, 2927, 2855, 1795, 1721$  cm<sup>-1</sup>. C<sub>14</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>2</sub>Si (269.18) calcolata: C 62.40, H 10.10, N 5.20; trovata: C 62.56, H 10.14, N 5.15.

**(12)**: ad una soluzione di **(5)** (0.16 mmol, 80 mg) in THF (2 mL) viene aggiunto *n*-BuLi (128  $\mu$ L, 2.5 M in esano) a -78 °C. Dopo 40 minuti viene aggiunta *p*-nitrobenzaldeide (48 mg, 0.32 mmol) sciolta in THF (1 mL). La reazione viene portata lentamente a temperatura ambiente e dopo 26 ore viene spenta con una soluzione acquosa di NH<sub>4</sub>Cl ed estratta con Et<sub>2</sub>O. Le fasi organiche vengono seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate. Il grezzo purificato tramite flash-chromatography (cicloesano/etil acetato, 80:20) a dare il prodotto **(10)** al 18% di resa.

Olio giallo.  $R_f = 0.60$  (cicloesano/etil acetato, 80:20). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, 24 °C):  $\delta = 0.08$  (s, 3 H), 0.09 (s, 3 H), 0.88 (s, 9 H), 1.40 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H), 3.85 (d,  $J = 6$ , 1H), 4.31 (quint,  $J = 6.2$  Hz, 1 H), 6.38 (s, 1 H), 8.09 (dd,  $J_1 = 1.8$  Hz,  $J_2 = 7$  Hz, 2 H), 8.33 (dd,  $J_1 = 1.8$  Hz,  $J_2 = 8.8$  Hz, 2 H), 9.32 (br s, 1 H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz, 24 °C):  $\delta = -4.8, -4.0, 17.9, 22.6, 25.6, 29.7, 65.2, 66.3, 94.5, 123.8, 128.8, 142.9, 150.0, 157.6, 166.7$  ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 12.4$  min,  $m/z$ : 501 [M - H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup>; 540 [M - H<sub>2</sub> + K]<sup>+</sup>. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\tilde{\nu} = 3243, 2955, 2926, 2855, 1818, 1661, 1609, 1524, 1346$  cm<sup>-1</sup>.

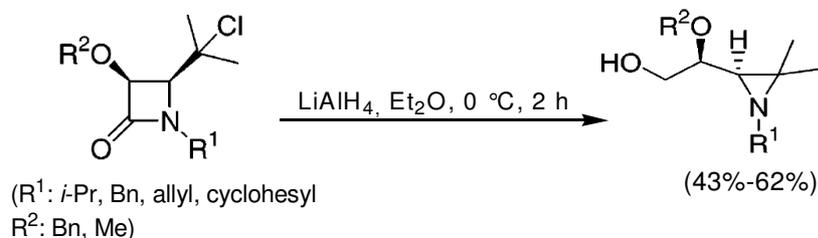
## Capitolo IV I 4-alchiliden- $\beta$ -lattami come sintoni: sintesi di $\beta$ -ammino acidi

### IV.1 I $\beta$ -lattami: versatili building blocks per derivati non $\beta$ -lattamici

Come dimostrato nei capitoli precedenti, l'anello azetidionico rappresenta un ottimo sintone per l'ottenimento di nuove specie  $\beta$ -lattamiche con determinate proprietà biologiche. I  $\beta$ -lattami, però, sono anche versatili precursori sintetici per composti non  $\beta$ -lattamici. Negli ultimi anni, infatti, i 2-azetidioni sono stati impiegati nella sintesi asimmetrica di composti contenenti atomi di azoto di rilevanza biologica, come  $\alpha$ -ammino-acidi non proteinogenici,  $\beta$ -ammino alcoli e  $\beta$ -ammino acidi,<sup>1</sup> alcaloidi,<sup>2</sup>  $\delta$ -lattoni coinvolti nella sintesi totale della lankacidina, antibiotico e antitumorale<sup>3</sup> e come precursori per l'introduzione della catena in posizione C-13 del tassolo e di altri composti anticancro.<sup>4</sup>

L'apertura dell'anello  $\beta$ -lattamico può essere condotta per rottura di ognuno dei singoli legami dell'anello a 4 termini; ma la rottura più utilizzata è quella che coinvolge il legame lattamico, facilmente soggetto ad attacchi nucleofili. La rottura di tale legame, infatti, è altamente sfruttata per la sintesi di numerosi composti di alto interesse biologico e medico quali bis- $\gamma$ -lattami, enamminoni ciclici, piridoni, pirrolidine, indolizidine, piperidine, ecc..<sup>1</sup>

Di seguito è riportato un esempio di sintesi stereospecifica di aziridine tramite apertura dell'anello di derivati  $\beta$ -lattamici, seguita da sostituzione intramolecolare sull'alogeno.<sup>5</sup>



In un lavoro di Kale<sup>6</sup> è riportata la sintesi di composti biciclici quali i 2,3-aziridino- $\gamma$ -lattone, in forma enantiomericamente pura, attraverso l'apertura dell'anello azetidionico e successiva ciclizzazione intramolecolare.

1 B. Alcaide, P. Almendros, and C. Aragoncillo. *Chem. Rev.*, **2007**, *17*, 4437-4492.

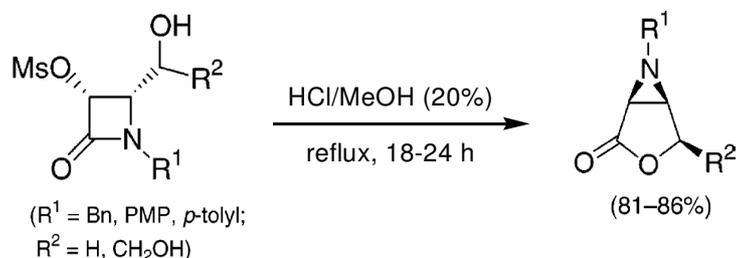
2 (a) *Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins*; Hetch, S., Ed.; Oxford University Press: Oxford, **1998**. (b) Hesse, M. In *Alkaloids: Nature's Curse or Blessing?*; Wiley-VCH: New York, **2000**.

3 Kende, A. S.; Liu, K.; Kaldor, I.; Dorey, G.; Koch, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8258.

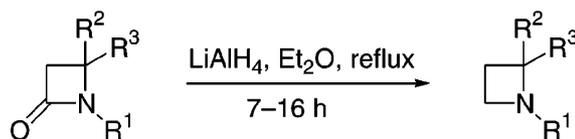
4 Iwao Ojima, Ivan Habus, Mangzhu Zhao, Gunda I. Georg, Lalith R. Jayasinghe, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1681-1683.

5 Van Brabant, w.; Dejaegher, Y.; Van Landeghem, R.; De Kimpe, N. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 1101.

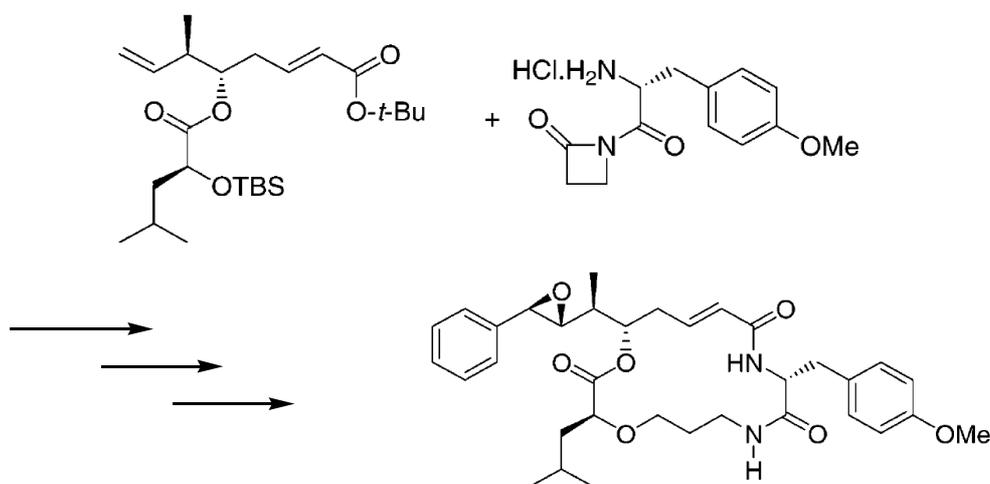
6 Kale, A. S.; Deshmukh, A. R. *Synlett*, **2005**, 2370.



Un ulteriore esempio è la riduzione con  $\text{LiAlH}_4$  di  $\beta$ -lattami ad azetidini,<sup>7</sup> importante classe di azaeterocicli noti per le loro numerose attività tra cui antiinfiammatori e antidepressivi.<sup>8</sup>



I  $\beta$ -lattami sono impiegati come sintoni anche per la progettazione e la sintesi di derivati macrociclici, come le criptoficine, macrolidi aventi potenti e selettive attività verso cellule tumorali resistenti ai classici farmaci anticancro.<sup>1</sup> Per la sintesi del cuore strutturale di tale composto, è stato impiegato un intermedio acil- $\beta$ -lattame, che incorpora il motivo strutturale  $\beta$ -ammino acidico all'interno del macrolide.<sup>9</sup>



#### IV.II I $\beta$ -ammino acidi

Negli ultimi anni i  $\beta$ -ammino acidi sono oggetto di grande interesse ed il motivo è da ricercarsi nella loro attività biologica di inibitori enzimatici ed agenti antibatterici<sup>10</sup>, ma, soprattutto, nel loro impiego come building blocks per la sintesi di numerosi derivati naturali e non biologicamente

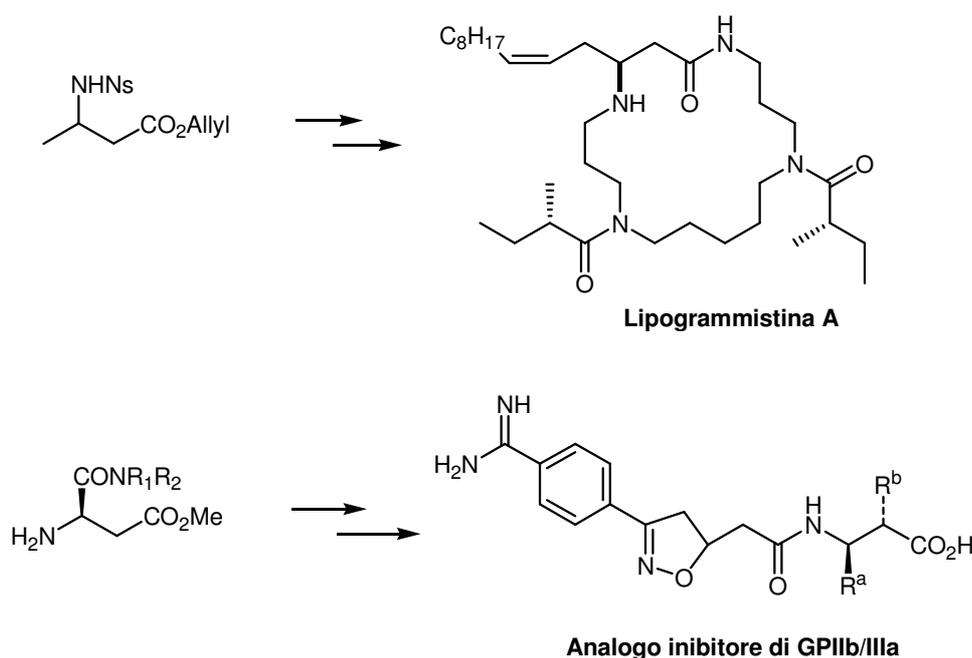
7 De Kimpe, N.; Tehrani, K. A.; Fonck, G. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6500.

8 (a) Davies, D. E.; Starr, R. C. In *Comprehensive Heterocycles Chemistry*; Lwowski, W., Ed.; pergamon: Oxford, **1984**; Vol.7, Part 5, 237-284. (b) Cromwel, N. H.; Phillips, B. *Chem. Rev.* **1979**, 79,331.

9 (a) Vidya, R.; Eggen, M. J.; Nair, S. V.; Georg, G. I.; Himes, R. H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9687. (b) Eggen, M. J.; Nair, S. V.; Georg, G. I. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1813.

10 Fulop, F., *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2181-2204.

attivi, quali la Lipogrammistina A<sup>11</sup>, tossina ittica (**figura 1**), glicosfingolipidi e antibiotici  $\beta$ -lattamici,<sup>12</sup> e peptidi modificati, che manifestano un incremento della loro reattività e stabilità alla degradazione enzimatica<sup>13</sup>. I  $\beta$ -ammino acidi sono inoltre precursori strutturali di segmenti proteici analoghi degli ormoni,<sup>14</sup> di importanti inibitori enzimatici<sup>14</sup> e di antagonisti di GPIIb/IIIa<sup>15</sup> (**figura 1**), glicoproteine appartenenti alla famiglia delle integrine ed associate a patologie quali le trombosi. Un ulteriore impiego dei  $\beta$ -ammino acidi è riportato nel lavoro di Schmigbaur<sup>16</sup>, in 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.



**Figura 1.**

Visto il crescente impiego di  $\beta$ -ammino acidi come sintoni per l'ottenimento di composti strutturalmente più complessi, sono presenti in letteratura diversi approcci per la sintesi di tali precursori in forma enantiomericamente arricchita. Tra questi compaiono l'omologazione di  $\alpha$ -

11 Fujiwara, Akiko; Kan, Toshiyuki; Fukuyama, Tohru. *Synlett* **2000**, 11, 1667-1669.

12 "Chemistry and Biochemistry of Ammino Acids", Barrett, G.C. Ed., Chapman and Hall, New York, **1985**, 227.

13 *J. Aldrichim. Acta*, **1994**, 27, 3-11.

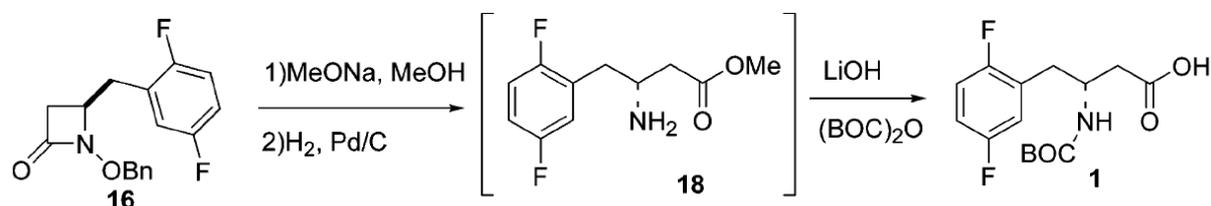
14 "Chemistry and Biochemistry of Ammino Acids", Barrett, G.C. Ed., Chapman and Hall, New York, 1985, 227.

15 Chu-Biao Xue, John Wityak, Thais M. Sielecki, Donald J. Pinto, Douglas G. Batt, Gary A. Cain, Michael Sworin, Arlene L. Rockwell, John J. Roderick, Shuaige Wang, Michael J. Orwat, William E. Frieze, Lori L. Bostrom, Jie Liu, C. Anne Higley, F. Wayne Rankin, A. Ewa Tobin, George Emmett, George K. Lalka, Jean Y. Sze, Susan V. Di Meo, Shaker A. Mousa, Martin J. Thoolen, Adrienne L. Racanelli, Elizabeth A. Hausner, Thomas M. Reilly, William F. DeGrado, Ruth R. Wexler, and Richard E. Olson, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2064-2084.

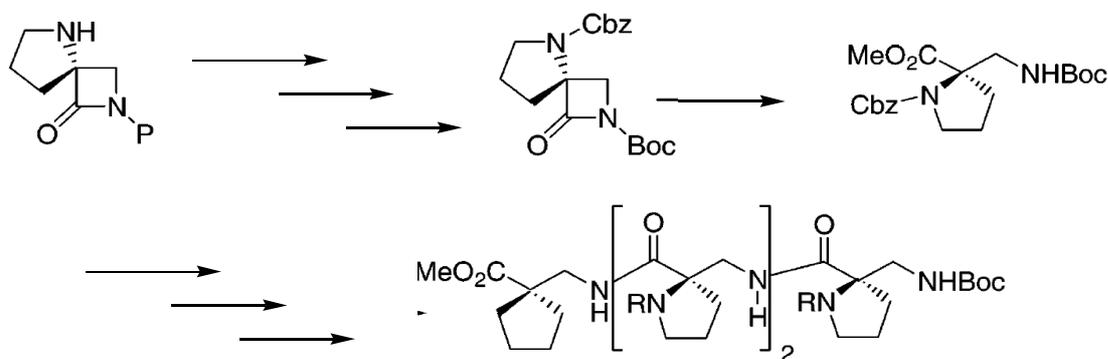
16 F. Wiesbrock, S. Nogai, A. Schier, and H. Schmidbaur, *Helvetica Chimica Acta*, **2002**, 85, 1151-1157.

ammino acidi<sup>17</sup>, la risoluzione enzimatica<sup>18</sup>, reazione di addizione di enolati su immine<sup>19</sup>, addizione di ammine su esteri  $\alpha,\beta$ -insaturi<sup>20</sup> ed impiego di ausiliari chirali, che permettono di ottenere  $\beta$ -ammino acidi enantiomericamente puri dopo opportuno sblocco dell'ausiliare<sup>21</sup>.

Un altro valido approccio per la sintesi di questi composti è l'apertura di derivati  $\beta$ -lattamici. I  $\beta$ -lattami, infatti, sono forme ciclizzate dei  $\beta$ -ammino acidi, in cui il gruppo carbossilico e quello amminico sono simultaneamente protetti.<sup>1</sup> In letteratura sono presenti molti esempi di apertura di anelli 2-azetidioni a dare  $\beta$ -ammino acidi. Angelaud riporta la sintesi di un farmaco  $\beta$ -ammino acido chirale su scala del chilogrammo, tramite apertura del corrispondente  $\beta$ -lattame con sodio metossido; i successivi passaggi sintetici portano all'ottenimento del target voluto.<sup>22</sup>



Molto utile è l'apertura di spiro- $\beta$ -lattami a dare  $\beta$ -peptidi. Nel seguente esempio, il  $\beta$ -ammino acido, ottenuto dopo apertura dell'anello, viene utilizzato per la sintesi dell'omo-tetrapeptide tramite reazione di coupling.<sup>23</sup>



L'impiego di catalisi enzimatica è sempre più utilizzata per la sintesi enantioselettiva di specie  $\beta$ -ammino acido cicliche ed acicliche. Lipasi ed esterasi, infatti, sono largamente applicati per l'apertura stereospecifica di  $\beta$ -lattami tramite idrolisi ed alcolisi, grazie alla loro elevata

17 Gardiner J., Anderson K. H., Downard A., Abell A. D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3375-3382.

18 Lopez-Garcia M., Alfonso I., Gotor V. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 648-651.

19 Chowdari, N., Suri, J. T., Barbas, C. F., III. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2507-2510.

20 Palomo, C., Oiarbide, M., Halder, R., Kelso, M., Gomez-Bengoa, E., Garcia, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *6*, 1861-1864

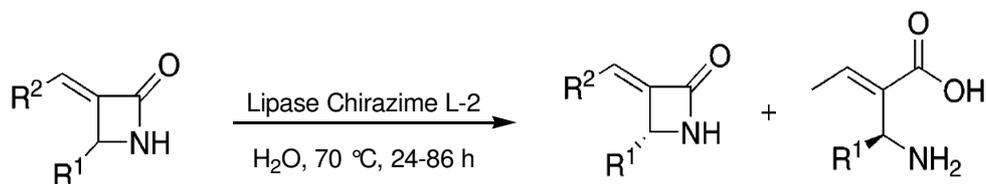
21 J. Alladoum and L. Dechoux. *Tetrahedron Letters* **2005**, 8203-8205.

22 R. Angelaud, R., Zhong, Y.-L.; Maligres, P.; Lee, J.; Askin, D. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1949.

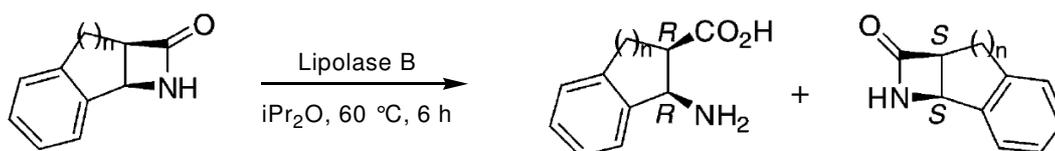
23 Northcote, P. t.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 6411.

enantioselettività.<sup>1</sup> In letteratura sono riportati diversi esempi in merito, i quali dimostrano la validità e la semplicità procedurale di tale approccio sintetico.

La lipasi Chirazime L-2 (da *Candida Antartica*) viene utilizzata nel lavoro di Adam per la risoluzione cinetica di 3-alchiliden- $\beta$ -lattami, portando all'ottenimento dei corrispondenti  $\beta$ -ammino acidi con valori di eccessi enantiomerici tra il 90% ed il 99%.<sup>24</sup>



L'apertura enzimatica di 2-azetidinnoni viene applicata anche alla sintesi di  $\beta$ -ammino acidi ciclici biologicamente attivi, come la cispentacina, agente antibatterico.<sup>10</sup> Un esempio è la sintesi di benzocispentacina ed analoghi.<sup>25</sup> In questo caso la lipolase B (da *Candida Antartica*: CAL-B) catalizza, in solvente organico, l'apertura selettiva dell'enantiomero *R* con elevati eccessi enantiomerici (96% - 99%).



Numerosi esempi riportati in letteratura coinvolgono aperture di  $\beta$ -lattami biciclici.

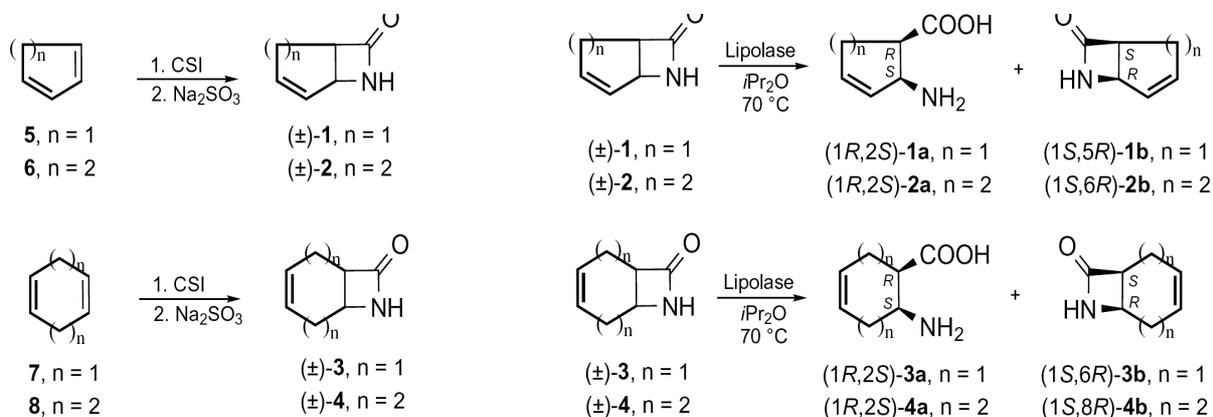
Forrò presenta in diversi lavori, come l'esempio precedentemente citato, l'apertura dell'anello azetidinnico di miscele raceme di  $\beta$ -lattami biciclici ad opera di Cal-B in diisopropil etere.<sup>26</sup> I substrati vengono precedentemente sintetizzati tramite ciclo-addizione di clorosolfonil isocianati con i corrispondenti cicloalchadieni;<sup>27</sup> il protocollo di reazione permette di ottenere, anche in questo caso, i  $\beta$ -ammino acidi corrispondenti con elevata purezza ottica (95% - 99%).

24 Adam, W.; Groer, P.; Humpf, H. U.; Saha-Moller, C. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4919.

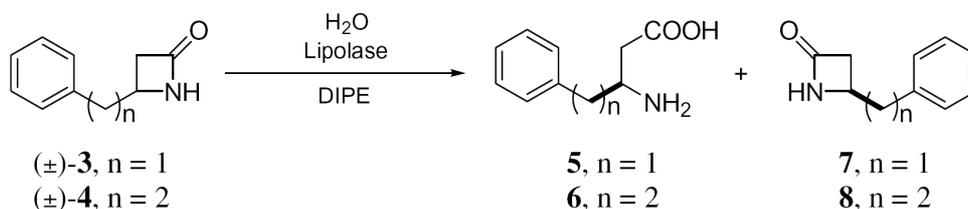
25 Forrò, E.; Fulop, F. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2587.

26 Eniko Forró, Ferenc Fülöp *Tetrahedron: Asymmetry* **15** **2004**, 2875-2880.

27 Besada, P.; Gonzàles-Moa, M. J.; Teràn, C.; Santana, L.; Uriarte, E. *Synthesis*, **2002**, *16*, 2445-2449.



Un altro esempio più recente riguarda  $\beta$ -lattami 4-arilalchil-sostituiti.<sup>28</sup> Anche in questo caso si opera in presenza di Cal-B in un sistema bifasico, con soddisfacenti valori di eccessi enantiomerici (85%-99%).



La reazione di apertura, come nel precedente esempio, procede anche in assenza di acqua, ma in sua presenza i tempi di reazione diminuiscono sensibilmente.

#### IV.III La catalisi enzimatica: le Lipasi

La crescente richiesta di composti enantiomericamente puri, che trovano largo impiego in campo farmacologico, ma anche in settori quali quello agro-alimentare e cosmetico, porta ad una sempre più elevata domanda di protocolli sintetici stereoselettivi, capaci di fornire composti caratterizzati da una elevata purezza ottica. La legislazione mondiale impone rigide restrizioni all'ammissione sul mercato di nuovi prodotti di interesse farmacologico ed agricolo, per i primi, infatti, è richiesta una purezza ottica minima del 95%, per i secondi, una purezza ottica minima dell'85%.

La sintesi asimmetrica rappresenta una valida strategia procedurale per la formazione di unità stereogeniche con configurazioni assolute definite e la catalisi enzimatica è uno degli strumenti utilizzati a tal scopo.

Essa prevede generalmente l'impiego di enzimi isolati, in quantità substechiometriche, i quali promuovono, con elevata selettività e specificità, diverse reazioni chimiche grazie all'interazione tra il substrato ed il sito attivo. Gli enzimi permettono di lavorare in ambiente acquoso ed in condizioni di reazione non drastiche e proprio grazie a tale caratteristica compaiono nei processi

<sup>28</sup> Gábor Tasnádi, Enikő Forró, Ferenc Fülöp. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2841-2844.

ecosostenibili. È possibile inoltre recuperare l'unità enzimatica e riutilizzarla per successivi cicli di reazione, impiegando in questo caso enzimi supportati.

Gli enzimi trovano impiego nell'industria chimica ed in altre applicazioni industriali che richiedono catalizzatori estremamente specifici; si va dall'industria alimentare, a quella cartiera, dalla produzione di detersivi alla biologia molecolare. Le principali limitazioni al loro utilizzo sono la scarsa stabilità in solventi differenti da quello biologico associata alla difficile estrazione dei prodotti di reazione solubili in ambiente acquoso o, al contrario, alla scarsa solubilità dei reagenti in acqua e, ovviamente, all'elevata specificità nei confronti dei substrati impiegati.

Le lipasi, enzimi appartenenti alla classe 3 delle idrolasi, sono capaci di idrolizzare legami esterei, sono infatti coinvolti nell'idrolisi dei lipidi e legami ammidici. Grazie alle loro caratteristiche, trovano largo impiego in sintesi organica, come tutte le idrolasi, infatti, non richiedono l'utilizzo di cofattori, sono largamente ottenibili da fonti diverse, mostrano una importante chemo-, regio- e stereoselettività nei confronti di una grande varietà di substrati, permettono di lavorare anche in solventi organici, ovviando così allo svantaggio tipico delle specie enzimatiche relativo al necessario impiego di ambiente acquoso, inoltre, catalizzano sia l'idrolisi di legami esterei ed ammidici che la loro formazione. Oltre che per le aperture enantiocontrollate di  $\beta$ -lattami, come esposto nel precedente paragrafo, il loro impiego si espande dalla sintesi di  $\beta$ -lattami otticamente attivi, tramite risoluzione cinetica,<sup>29</sup> alle risoluzioni e preparazione di alcoli, acidi carbossilici, esteri ed ammidi chirali, attraverso reazioni di idrolisi, alcolisi, acidolisi o reazioni di transesterificazioni.<sup>30</sup>

#### ***IV.IV Apertura di $\beta$ -lattami catalizzata da lipasi***

Oltre che per il loro utilizzo come sintoni per nuovi derivati  $\beta$ -lattamici biologicamente attivi, i 4-alchiliden-azetidionici sono stati mio oggetto di studio anche per quanto concerne il loro possibile impiego come precursori di derivati non  $\beta$ -lattamici, quali i  $\beta$ -ammino acidi, utilizzando la catalisi enzimatica.

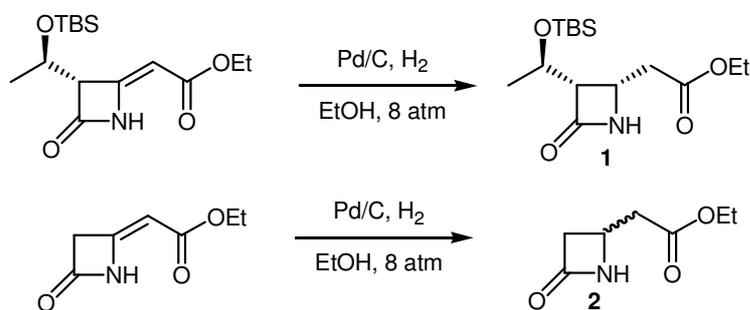
In particolare, ho condotto studi preliminari sulla reazione di apertura dei substrati **1** e **2** (*schema I*) in presenza di lipasi *Candida Antartica B* (Cal-B) supportata su resina acrilica. Tale enzima, espresso in *Aspergillus oryzae* mediante processo di fermentazione e successivamente supportato

---

29 W. Adam, P. Groer, H.-U. Humpf, and, C. R. Saha-Moller *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4919-4922.

30 *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, 1999.

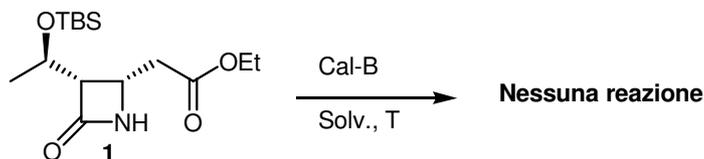
su resina acrilica, è stato impiegato, come riportato nei precedenti esempi, in numerosi lavori di apertura enantioselettiva miscela raceme  $\beta$ -lattamiche.



**Schema 1.**

I substrati **1** e **2** presi in esame sono stati ottenuti per idrogenazione dei rispettivi 4-alciliden- $\beta$ -lattami esteri etilici, condotta in presenza di palladio al 10% supportato su carbone ad una pressione di idrogeno di 8 atm in etanolo. La sintesi degli esteri insaturi è stata riportata nel capitolo I.

Sul derivato **1** sono stati effettuate delle prove preliminari di reattività. Le reazioni sono state condotte utilizzando un rapporto in peso substrato/Cal-B pari a 2/1 ed una concentrazione del substrato di 0.15 M, variando le condizioni di reazione quali solvente e temperatura. Nella **tabella I** sono riportati i risultati delle prove effettuate.



<i>Prova</i>	<i>Solvente</i>	<i>Temp., tempo</i>	<i>Recupero</i>
1	H <sub>2</sub> O	30 °C, 120 h	<b>1</b>
2	H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN (5%)	40 °C-70 °C, 120 h	<b>1</b>
3	Tampone fosf. pH:7.5	40 °C-70 °C, 120 h	<b>1</b>
4	Tampone fosf. pH:7.5	60 °C, 24 h	<b>1</b>
5	(iPr) <sub>2</sub> O/ H <sub>2</sub> O (0.5%)	60 °C, 24 h	<b>1</b>

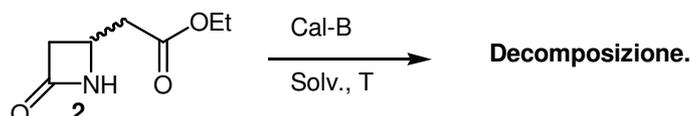
**Tabella 1.**

Tutte le prove sono state seguite tramite HPLC a fase inversa.

La prova 1, nella quale è stata osservata l'insolubilità del substrato in acqua ed un recupero quantitativo dello stesso, ha spinto ad utilizzare una miscela acqua/acetonitrile per migliorare la solubilità ed una temperatura più elevata (prova 2). Anche in tal caso, però, è stato recuperato il substrato di partenza.

Visti il recupero dello starting material e l'assenza di sottoprodotti dovuti a decomposizione, sono state effettuate delle prove in tampone fosfato pH 7.5 (0.1 M), imputando l'insuccesso delle prove precedenti ad una eventuale decomposizione dell'enzima in ambiente non tamponato. Le prove 3-4 non hanno condotto a risultati differenti, si è quindi passati ad un sistema bifasico didisopropile/acqua (prova 5), tipico dei lavori riportati in letteratura. Anche in questo caso, vi è stato un totale recupero del reagente. I risultati ottenuti per il substrato **1** dimostrano che, nelle condizioni di reazione impiegate, il derivato  $\beta$ -lattamico non è soggetto ad apertura enzimatica.

Reazioni condotte sul substrato **2** hanno portato a risultati diversi. In questo caso il reagente risulta essere solubile in acqua e non è stato osservato recupero dello stesso se non in sporadici casi. Sono state effettuate numerose prove, variando il rapporto substrato/enzima, il solvente e la temperatura.



<i>Prova</i>	<i>Substrato/Cal-B (m/m)</i>	<i>Solvente</i>	<i>Temp., tempo</i>	<i>Recupero</i>
1	4/1	Tamp. Fosfato pH:7.5	30 °C, 72 h	Prodotti non identificati
2	4/1	H <sub>2</sub> O	30 °C, 120 h	Prodotti non identificati
3	4/1	Tamp. Fosfato pH:7.5	30 °C, 2 h	Prodotti non identificati
4	1/1	Tamp. Fosfato pH:7.5	37 °C, 72 h	Prodotti non identificati
5	1/1	H <sub>2</sub> O	37 °C, 72 h	Prodotti non identificati
6	4/1	H <sub>2</sub> O	60 °C, 24 h	Prodotti non identificati
7	4/1	(iPr) <sub>2</sub> O/ H <sub>2</sub> O (0.5%)	60 °C, 24 h	S.M. (60%)

**Tabella 2.**

La scomparsa del reagente viene seguita tramite HPLC in fase inversa. Come dimostra la **tabella 2**, l'aumento della quantità di enzima, della temperatura e la natura dei solventi impiegati non permettono di ottenere il prodotto atteso, ma vengono osservati dei prodotti non identificati con totale scomparsa del reagente.

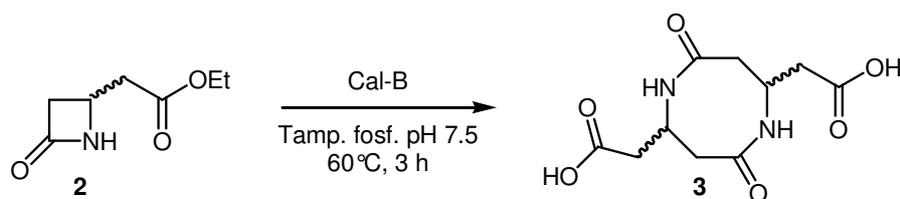
Per determinare la presenza della formazione del prodotto e facilitarne l'estrazione dalla fase acquosa, sulle prove 1, 2, 4 e 5, è stata eseguita una reazione di funzionalizzazione direttamente sulla miscela di reazione, ai fini di trasformare, in condizioni tipo Schotten-Baumann, la funzione amminica libera in ammidine.

I tentativi di funzionalizzazione sono stati effettuati direttamente sulle miscele acquose di reazione dopo semplice filtrazione dell'enzima, impiegando benzilcloroformiato in acetonitrile o

benzoylchloruro in THF in ambiente basico, carbonato di sodio in entrambi i casi. Dopo lavorazione in nessuna prova sono stati osservati i prodotti attesi.

Sui grezzi delle restanti prove, dopo filtrazione dell'enzima ed estrazione basica ed acida, effettuate per determinare l'eventuale presenza di starting material, è stato condotto il processo di liofilizzazione, senza però ottenere alcun tipo di derivato. Oltre all'acqua Milli Q e al tampone fosfato, è stata condotta una prova in didisopropiletere come solvente in presenza dello 0.5% di acqua (prova 7); in questo caso, a parità di temperatura e quantità di enzima, la scomparsa dello starting procede con tempi più lunghi, dopo 24 h, infatti, è ancora presenta una elevata percentuale di reagente, recuperato dopo lavorazione.

Conducendo la reazione in tampone fosfato, con rapporto in peso substrato/enzima 4/1, a 60 °C, è stato ottenuto, dopo liofilizzazione delle acque, il composto **3** (*schema 2*). Tale prodotto è il dimero formato dalla reazione tra due unità  $\beta$ -ammino diacide in presenza dell'enzima, che ha promosso la formazione dei due nuovi legami ammidici.



*Schema 2.*

L'attribuzione della struttura molecolare del composto **3** è stata condotta tramite analisi  $^1\text{H-NMR}$ . Sono attualmente in corso studi volti a determinare l'esatta stereochimica del prodotto ottenuto.

Tale risultato dimostra che la temperatura gioca un ruolo fondamentale sulla reattività del sistema e che l'enzima, in tali condizioni, effettua apertura dell'anello azetidionico ed idrolisi della funzione esterea del  $\beta$ -lattame, promuovendo in seguito la formazione del dimero.

Per determinare l'effettiva azione della Cal-B, la reazione è stata condotta in assenza di enzima nelle stesse condizioni; dopo 72 h non è stato ottenuto il composto dimerico ma è stato recuperato il reagente di partenza.

Questo preliminare screening sui substrati presi in esame ha portato all'ottenimento del prodotto **3** ottenuto per apertura del derivato  $\beta$ -lattamico di partenza e ciclizzazione promossa dalla stessa Cal-B. Tale risultato rappresenta una base di partenza per ulteriori approfondimenti circa la reattività del sistema in presenza di altre specie  $\beta$ -lattamiche e sul possibile impiego in sintesi organica del composto dimerico ottenuto.

## Parte sperimentale

Il composto **1** è noto in letteratura,<sup>31</sup> ma è stato sintetizzato con la seguente procedura:

**(1):** ad una soluzione di {3-[1-(*t*-Butil-dimetil-silanilossi)-etil]-4-osso-azetidina-2-ilidene}-acido acetico estere etilico (3.2 mmol, 1000 mg) in EtOH anidro (10 mL) viene aggiunto palladio su carbone al 10% (20 mg). La reazione viene lasciata sotto agitazione in atmosfera di idrogeno (8 atm) per 24 h e dopo viene filtrata e concentrata, ottenendo il prodotto come solido bianco (988 mg, 98%).

**(2):** ad una soluzione di 4-osso-azetidina-2-ilidene}-acido acetico estere etilico (13 mmol, 2000 mg) in EtOH (20 mL) viene aggiunto palladio su carbone al 10% (40 mg). La reazione viene lasciata sotto agitazione in atmosfera di idrogeno (8 atm) per 48 h e dopo viene filtrata e concentrata, ottenendo il prodotto come olio giallo (1160 mg, 56%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H), 2.58 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 16.5 Hz, 1 H), 2.67 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 1.2 Hz, *J* = 1.3, *J*<sub>2</sub> = 15.0 Hz, 1 H), 2.74 (dd, *J* = 4.8 Hz, *J* = 16.5 Hz, 1 H), 3.77 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 2.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8, *J*<sub>3</sub> = 15.0 Hz, 1 H), 3.96 (m, 1 H), 4.17 (q, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 6.17 (br s, 1 H), ppm. <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, ppm. HPLC-MS (ESI): *R*<sub>t</sub> = 2.8 min, *m/z*: 180 [M + Na<sup>+</sup>]. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\tilde{\nu}$  = 3224, 2966, 1725, 1467, 1418, 1381, 1329 cm<sup>-1</sup>

Tutte le reazioni enzimatiche sono state condotte a temperatura controllata in termostato, utilizzando acqua MilliQ, tampone fosfato a pH 7.5, 0.1 M e *Candida Antartica B* (Sigma-Aldrich n L4777 ≥ 10000 U/g).

**(3):** al substrato **2** (0.17 mmol, 27 mg) vengono aggiunti tampone fosfato (5.2 mL) e Cal-B (7 mg). La miscela viene mantenuta sotto agitazione a 60 °C. Dopo 3 h, viene filtrata ed estratta con acetato di etile. Le fasi organiche vengono anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrate ed analizzate tramite H<sup>1</sup> NMR. Le fasi acquose vengono acidificate con una soluzione di HCl 0.1 M ed estratte nuovamente con acetato di etile. Le fasi organiche vengono anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrate ed analizzate tramite H<sup>1</sup> NMR. La liofilizzazione delle acque porta all'ottenimento del prodotto (4 mg, 12%).

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 2.47-2.51 (m, 4 H), 2.60 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 15.0 Hz, 2 H), 3.07 (dd, *J*<sub>1</sub> = 4.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 15.0 Hz, 2 H), 3.86-3.97 (m, 2 H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) = 43.5, 44.6, 46.7, 171.0, 179.0. HPLC-MS (ESI): *R*<sub>t</sub> = 1.2 min, *m/z*: 281 [M + Na]<sup>+</sup>.

*Procedura generale di derivatizzazione:* al substrato **2** (0.17 mmol, 26 mg) vengono aggiunti tampone fosfato (5.2 mL) e Cal-B (26 mg) e la miscela viene mantenuta sotto agitazione a 37 °C. Dopo 72 h, la miscela viene filtrata e ad essa vengono aggiunti CH<sub>3</sub>CN (3 mL), CbzCl (0.51 mmol, 86.7 mg) e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.54 mmol, 57.2 mg). Dopo 24 h a temperatura ambiente sotto agitazione, la miscela di reazione viene estratta con acetato di etile e le fasi organiche vengono anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrate ed analizzate

---

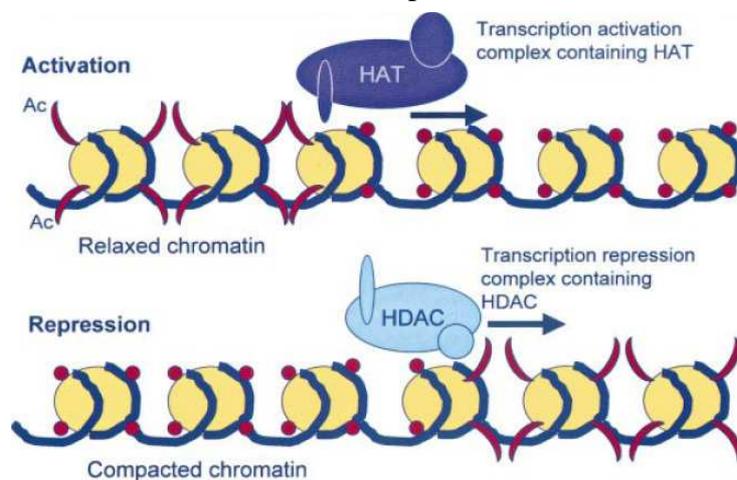
31 Gianfranco Cainelli, Paola Galletti, Spiridione Garbisa, Daria Giacomini, Luigi Sartor, Arianna Quintavalla. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2003**, *11*, 5391-5399.

tramite  $^1\text{H}$  NMR. Le fasi acquose vengono acidificate con una soluzione di HCl 0.1 M ed estratte nuovamente con acetato di etile. Le fasi organiche vengono anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , concentrate ed analizzate tramite  $^1\text{H}$  NMR.

## Capitolo V Azetidioni: una nuova classe di inibitori HDACs

### V.1 Gli Istoni Deacetilasi (HDACs)

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. Quest'ultima, in cui viene impacchettato il genoma, è costituita da una molecola lineare di DNA che avvolge un octamero di istone contenente una elevata quantità di residui ammino-acidici carichi positivamente, come la Lisina (Lys). L'istone subisce modificazioni post-trasduzionali come acetilazione/deacetilazione dei residui N-terminali di Lys, responsabili della regolazione di importanti fenomeni come l'espressione dei geni e l'assemblaggio della cromatina (**figura 1**); lo stato acetilato di tali residui provoca un rilassamento della cromatina, aumentando l'accessibilità dei fattori di trascrizione verso i loro geni target,<sup>1</sup> mentre, la deacetilazione determina un



**Figura 1 .**

impaccamento della cromatina ed una conseguente repressione trascrizionale.<sup>2</sup> Un'alterazione di questo equilibrio acetilazione/deacetilazione è responsabile dello sviluppo e della crescita di cellule tumorali. Dall'importante scoperta effettuata sul ruolo della reversibile acetilazione delle proteine istoniche nella regolazione dell'espressione genetica,<sup>3</sup> sono stati scoperti 18 istoni-deacetilasi umana divisi 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  $NAD^+$  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>4</sup>

1 Shahbazian, M. D. and Grunstein, M. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, 76, 75-100.

2 Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. And Allis, C. D. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 8, 983-994.

3 V.G. Allfrey, R. Faulkner, A.E. Mirsky *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1964**, 51, 786-794.

4 I. Gregoret, Y.-M. Lee and H. V. Goodson, *J. Mol. Biol.*, **2004**, 338, 17.

Inoltre, distinti HDAC appartenenti alle classi I e II sono sovra-espressi in diversi tipi di cancro, come quello alle ovaie (HDAC1-3),<sup>5</sup> gastrico (HDAC2)<sup>6</sup> ed il cancro alla gamba (HDAC 1 e 3).<sup>7</sup>

Data la loro associazione a diverse forme di tumori, le proteine istoniche deacetilasi, in particolar modo quelle di I e II classe,<sup>8</sup> sono diventate negli ultimi anni importanti target biologici per le terapie anti-cancro. La comunità scientifica, quindi, sta rivolgendo grande attenzione verso la progettazione di efficaci e selettivi inibitori di HDAC.

Tra gli inibitori noti di HDAC compaiono molecole semplici, quali l'acido valproico ed il butirrato di sodio, ma anche molecole più complesse, quali l'acido idrossammico suberoilamide (SAHA, Merck)<sup>9</sup>, attivo nell'ordine del nM ed approvato dal FDA nel 2006 come trattamento per il linfoma cutaneo T-cell<sup>10</sup> e la Tricostaina A (TSA), anch'essa attiva ad una concentrazione nM (**figura 2**). La Tricostaina A è il primo inibitore HDACs ad essere stato scoperto: fu isolato negli anni '70 dallo *Streptomyces Hygroscopicus* come antibiotico fungistatico<sup>11</sup> e solo dopo dieci anni ne fu dimostrata l'elevata l'attività differenziante ed inibitoria sulla crescita di cellule leucemiche.<sup>12</sup> Le molecole che contengono residui idrossammici, come il TSA ed il SAHA, hanno una elevata affinità per il sito catalitico degli HDAC zinco-dipendenti ed esplicano la loro attività legandosi irreversibilmente al sito attivo con una efficace inibizione competitiva.<sup>13</sup> La TSA è in grado di bloccare la proliferazione e di provocare l'apoptosi di cellule tumorali epatiche, bloccare il meccanismo del ciclo cellulare delle cellule HeLa (particolari tipi di cellule coltivate in laboratorio) e di promuovere differenziazione in cellule tumorali ovariche, attraverso modificazione del gene p21.<sup>13</sup>

La TSA, il SAHA come anche l'acido valproico ed il butirrato, sono attivi su tutte le isoforme di HDAC umana, sono per questo detti pan-inibitori.<sup>14</sup>

---

5 D. Khaebele, D. S. Son, A. K. Parl, G. L. Goldberg, L. H. Augenlicht, J. M. Mariadason and V. M. Rice. *Cancer Biol. Ther.*, **2007**, *6*, 795.

6 J. Song, J. H. Noh, J. H. Lee, J. W. Eun, Y. M. Ahn, S. Y. Kim, S. H. Lee, W. S. Park, N. J. Yoo, J. Y. Lee and S. W. Nam. *APMIS*, **2005**, *113*, 264.

7 B. Bartling, H. S. Hofmann, T. Boettger, G. Hansen, S. Burdach, R. E. Silber and A. Simm. *Lung Cancer*, **2005**, *49*, 145.

8 A. V. Bieliauskas and M. K. H. Pflum. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1402-1413.

9 *Patent Applicatio US 6511990 B1*, **2003**.

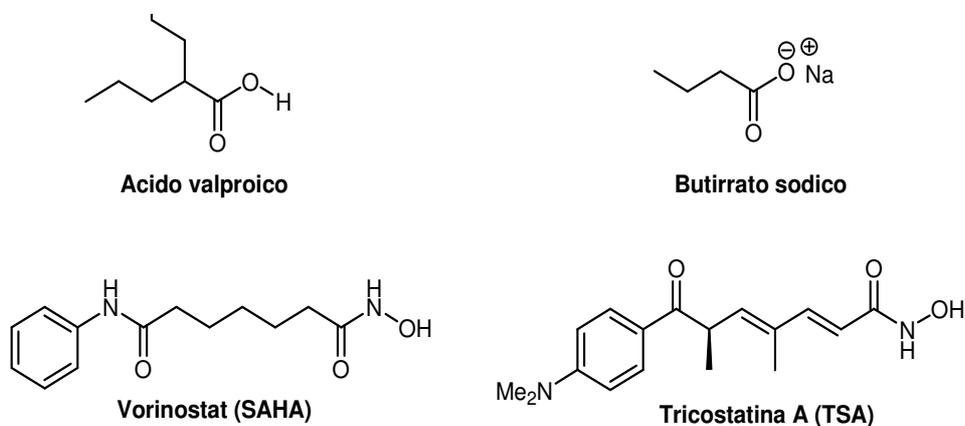
10 S. Grant, C. Easley and P. Kirkpatrick. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2007**, *6*, 21.

11 N. Tsuji, M. Kobayashi, K. Nagashima, Y. Wakisaka, E. Suzuki, Y. Komoda, et al.. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 1.

12 M. Yioshida, M. Kijima, M. Akita, T. Beppu. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17174.

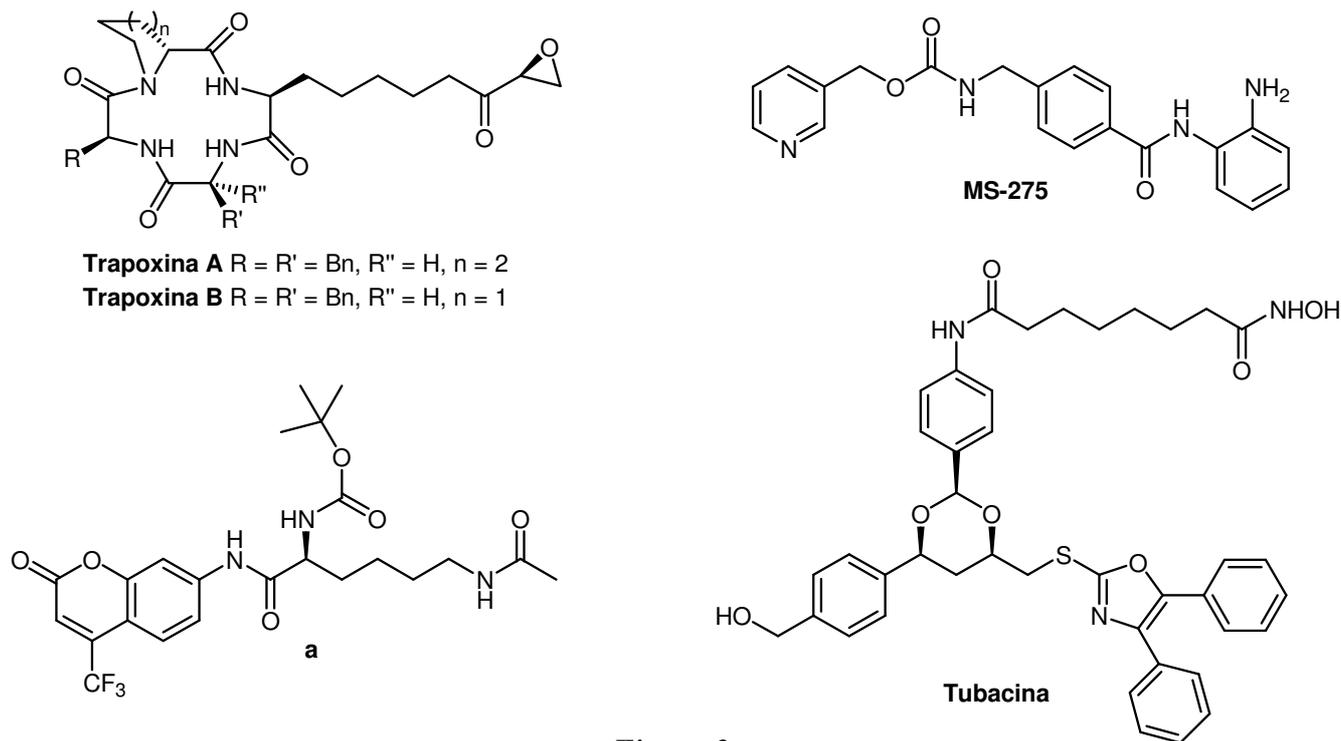
13 M. A. Acharya, A. Sparreboom, J. Venitz, and W. D. Figg. *Mol. Pharmacol* **2005**, *68*, 917-932.

14 W.K. Kelly, V.M. Richon, O. O'Connor, T. Curley, B. MacGregor-Curtelli, W. Tong, M. Klang, L. Schwartz, S. Richardson, E. Rosa, M. Drobnjak, C. Cordon-Cordo, J.H. Chiao, R. Rifkind, P.A. Marks, H. Scher, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 3578.



**Figura 2.**

Vi sono inibitori HDAC che esplicano un'attività selettiva nei confronti di singole classi o isoforme; ad esempio peptidi ciclici, come la Trapoxina A e B e *o*-amminoanilidi derivati, come il composto MS-275 (Syndax Pharmaceuticals/Schering AG),<sup>15</sup> anch'esso in fase clinica, sono inibitori selettivi di HDAC appartenenti alla I classe;<sup>8</sup> la Tubacina<sup>16</sup> ed il composto **a**<sup>17</sup> sono inibitori selettivi per la II classe (**figura 3**). In particolare, la Tubacina, inibitore specifico per HDAC6, induce l'iperacetilazione della  $\alpha$ -tubulina, proteina globulare non istonica il cui stato acetilato è regolato da HDAC6.<sup>18</sup>



**Figura 3.**

15 U. S. Patent 6174905, **2001**.

16 A. Mai, S. Massa, R. Pezzi, S. Simeoni, D. Rotili, A. Nebbioso, A. Scognamiglio, L. Altucci, P. Loidl and G. Brosh. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 3344.

17 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

18 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.

Come si può notare, gli inibitori HDAC fin ora scoperti sono caratterizzati da una variegata struttura molecolare, si va da semplici strutture quali l'acido butirrico a strutture più complesse quali la Tubacina. Il meccanismo di azione di tali inibitori è tuttora in fase di studio, non sono, infatti, ancora noti gli esatti processi implicati. La relazione tra l'impedimento della crescita e della sopravvivenza di cellule tumorali e l'inibizione dell'attività degli HDAC fu stabilita solo negli anni '90,<sup>19</sup>. Il butirrato, ad esempio, fu inizialmente catalogato come agente anti-cancro in base alla sua capacità di indurre differenziazione cellulare.<sup>20</sup> Fu in seguito scoperto che induceva iperacetilazione degli istoni senza ancora identificare gli HDAC come suo target.<sup>21</sup>

Alcuni studi riportano il meccanismo di azione di alcuni inibitori quali il SAHA,<sup>22</sup> secondo cui tale composto provoca la permeabilità mitocondriale di molecole pro-apoptiche, come il citocromo *c*, le quali, una volta arrivate nel citosol della cellula, provocano una cascata apoptotica responsabile della morte cellulare.<sup>19</sup>

Gli inibitori HDAC, oltre a regolare l'espressione genetica tramite la iperacetilazione degli istoni, sono in grado di agire sulla biologia delle cellule tumorali attraverso meccanismi che non coinvolgono direttamente gli istoni, ma target di diversa natura.<sup>23</sup> Quasi tutti gli inibitori di natura idrossammica, ad esempio, inibiscono la deacetilazione, oltre che degli istoni H3/H4, anche della  $\alpha$ -tubulina,<sup>19</sup> che, come già introdotto precedentemente, non è una proteina istonica, ma il cui stato acetilato/deacetilato viene controllato dall'HDAC6. Ciò dimostra la versatilità di tali inibitori, per i quali gli HDAC non sono gli unici target biologici. Risulta, quindi, di elevata importanza lo studio che si sta svolgendo nei confronti dei vari meccanismi di azione degli inibitori HDAC per valutarne le potenzialità ed il loro ulteriore impiego in campo clinico.

Nelle ricerche volte a determinare i siti di interazione tra l'inibitore e l'enzima e, quindi, i meccanismi coinvolti nel processo inibitorio, il lavoro di Somoza e collaboratori ha rappresentato un importante passo avanti. Nel lavoro citato viene riportata e descritta la struttura di HDAC8 umano complessato con quattro diversi inibitori idrossammici, tra cui il SAHA e la TSA, ottenuta tramite analisi cristallografica.<sup>24</sup> Ciò ha permesso di identificare l'interazione tra i composti presi in esame ed il sito attivo dell'enzima e, quindi, di formulare il modello farmacoforo di un inibitore HDAC. Nella **figura 4** è riportata la struttura tridimensionale trovata per il complesso HDAC8/TSA, in giallo è riportato l'atomo di zinco ed in blu e rosa l'inibitore.

---

19 J. E. Bolden, M. J. Peart, and R. W. Johnstone. *Nature Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 769-784.

20 Leder A., Orkin S., and Leder P. *Science* **1975**, 190, 893-894.

21 Riggs, M. G., Wthittaker, R. G., Neumann, J. R., and Ingram, V. M.. *Nature*, **1977**, 268, 462-464.

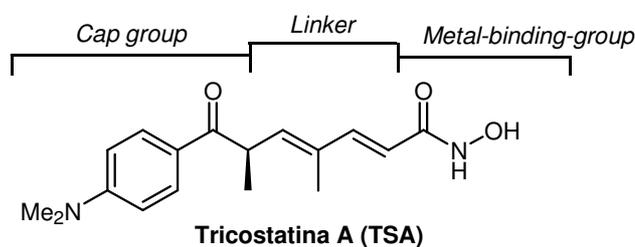
22 Rosato R. R., Wang z., Gopalkrishnan R. V., Fisher P. B. and Grant S. *Int.J. Oncol.* **2001**, 19, 181-191.

23 Johnstone, R. W. and Licht, J. D. *Cancer cell.*, **2003**, 13-18.

24 J.R. Somoza, R.J. Skene, B.A. Katz, C. Mol, J.D. Ho, A.J. Jennings, C.Luong, A. Arvai, J.J. Buggy, E. Chi, J. Tang, B.C. Sang, E. Verner, R. Wynands, E.M. Leahy, D.R. Dougan, G. Snell, M. Navre, M.W. Knuth, R.V. Swanson, D.E. McRee, and L.W. Tari. *Structure* **2004**, 1325-1334.

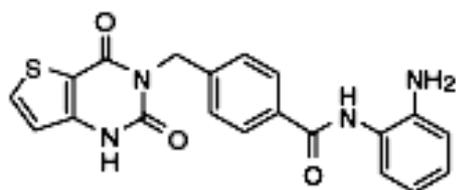


interagisce con i residui ammino acidici presenti all'entrata del sito attivo, da uno "zinc-binding-group" (ZBG) fondamentale per la coordinazione dell'atomo di zinco presente nel sito attivo e un "linker", uno spaziatore di opportuna lunghezza capace di posizionare lo ZBG in un canale idrofobico ed il cap nella giusta posizione.



**Figura 7.**

La corrispondenza tra alcune isoforme HDAC e la fisiopatologia è ancora oggetto di numerosi studi; questo sottolinea la necessità di trovare nuovi inibitori specifici e selettivi per una classe o una isoforma di HDAC, con effetti collaterale minimi e bassa tossicità, elemento caratteristico, ad esempio, del SAHA e del TSA, che rilasciano acido idrossamico. A tal scopo, infatti, sono rivolte modifiche condotte sul cap, sul linker e sullo ZBG. In letteratura esistono numerosi esempi di inibitori HDAC, progettati tramite modifiche oculte condotte sulla struttura molecolare di composti già noti come inibitori *in vitro*, per aumentarne l'attività *in vivo*. Un esempio è riportato dal lavoro di Vaisburg, che riporta *o*-amminoanilidi derivati come inibitori HDAC con interessante attività *in vivo*, in particolare il composto in **figura 8** ha manifestato avere potere inibitorio sulla crescita di cellule tumorali umane trapiantati nel ratto.<sup>25</sup> Lo ZBG è rappresentato dal classico residuo benzammidico tipico del MS-275, mentre la modifica strutturale riguarda il cap.



**Figura 8.**

I vari studi condotti in questo campo evidenziano che, mentre significativi risultati sulla selettività nei confronti delle classi HDAC sono stati raggiunti tramite modifiche effettuate sul cap, come dimostrano il precedente esempio e le strutture riportate in **figura 3**, più difficile risultano essere i tentativi di ottenere aumento di selettività tramite modifiche allo ZBG; infatti, a differenza della varia natura dei cap, gli ZBG più ricorrenti sono residui idrossammici, *o*-amminoanilidi o benzammidi in generale.

25 A. Vaisburg, I. Paquin, N. Bernstein, S. Frechette, F. Gaudette, S. Leit, O. Moradei, S. Raeppl, N. Zhou, G. Bouchain, S. H. Woo, Z. Jin, J. Gillespie, J. Wang, M. Fournel, P. T. Yan, M.-C. Trachy-Bourget, M.-F. Robert, A. Lu, J. Yuk, J. Rahil, A. R. MacLeod, J. M. Besterman, Z. Li and D. Delormè. *Bioorg. And Medicinal Chem.* **2007**, 6729-6733.

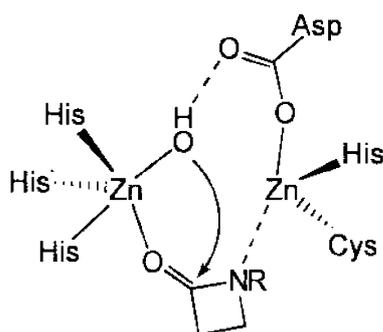
La sintesi di nuovi inibitori HDAC caratterizzati da una elevata specificità, nei confronti di selettive classi o isoforme, e da bassa tossicità rappresenta un attraente ed importante campo di studio.

## V.II I $\beta$ -lattami come inibitori di HDAC

Durante il mio lavoro di dottorato, tramite una collaborazione con l'azienda farmaceutica Sigma-Tau, mi sono dedicata allo studio di nuovi inibitori selettivi di HDAC, ed in particolare, impiegando la struttura modulare del SAHA, abbiamo progettato e sintetizzato derivati  $\beta$ -lattamici biologicamente attivi nei confronti di tali importanti target, in cui il fondamentale elemento di innovazione è risultato essere l'anello azetidionico come Zinc-binding group.<sup>26</sup>

La scelta di utilizzare l'anello  $\beta$ -lattamico come zinc-binding-group per la progettazione di nuovi inibitori HDAC è stata dettata dalla proprietà complessante dell'anello  $\beta$ -lattamico verso metalli quali lo zinco. Tale caratteristica sta alla base dell'azione di alcune  $\beta$ -lattamasi, gli enzimi sviluppati dai batteri per inibire l'attività degli antibiotici  $\beta$ -lattamici, chiamate metallo- $\beta$ -lattamasi e caratterizzate da uno o due ioni di zinco(II) nel loro sito attivo ( $\beta$ -lattamasi di classe B). Lo ione Zn(II) viene coordinato dal  $\beta$ -lattame e catalizza l'idrolisi dell'anello azetidionico.<sup>27</sup>

Il meccanismo di azione previsto (*figura 9*) rappresenta l'interazione dell'ossigeno carbossilico del  $\beta$ -lattame con lo zinco, che determina una polarizzazione del legame C-O, più soggetto ad attacco nucleofilo da parte di uno ione idrossido legato al metallo. L'attacco nucleofilo sul legame ammidico porta alla forma inattiva del  $\beta$ -lattame.



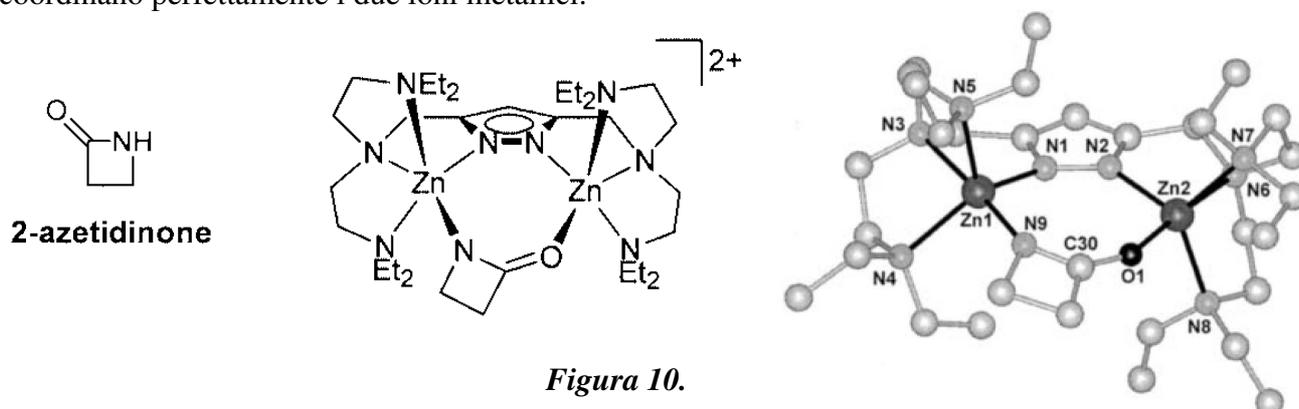
*Figura 9.*

Sono diversi i lavori che riportano la capacità complessante dell'anello azetidionico nei confronti dello ione Zn(II). Meyer, ad esempio, descrive la struttura cristallina dell'addotto tra il 2-

26 Paola Galletti, Arianna Quintavalla, Caterina Ventrici, Giuseppe Giannini, Walter Cabri, Sergio Penco, Grazia Gallo, Silvia Vincenti, and Daria Giacomini. *ChemMedChem*, **2009**, *4*(12), 1991-2001.

27 J. A. Cricco, A. J. Vila. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, *5*, 915-927.

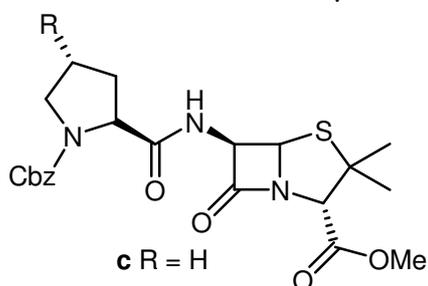
azetidione e complessi dizinco (**figura 10**).<sup>28</sup> Come dimostra la struttura ai raggi-X il  $\beta$ -lattame viene incorporato all'interno del complesso e l'ossigeno carbossilico e l'azoto amidico coordinano perfettamente i due ioni metallici.



**Figura 10.**

Grazie, quindi, alla capacità di coordinare lo ione Zn(II), l'anello azetidionico rappresenta un valido Zn-binding-group per la realizzazione di nuovi inibitori HDAC Zn-dipendenti.

In letteratura è presente un solo esempio di derivati  $\beta$ -lattamici come inibitori HDAC. Nel lavoro di Oh e Jung sono riportati i risultati di attività biologica di derivati 6-acilamminopenicillanati, (**figura 11**) sintetizzati a partire dall'acido 6-amminopenicillanico.<sup>29</sup> I composti sintetizzati hanno manifestato attività biologica *in vitro* su linee di cellule tumorali umane, in particolare, il composto **c** ha evidenziato un valore di IC<sub>50</sub> nell'ordine del  $\mu$ M.



**Figura 11.**

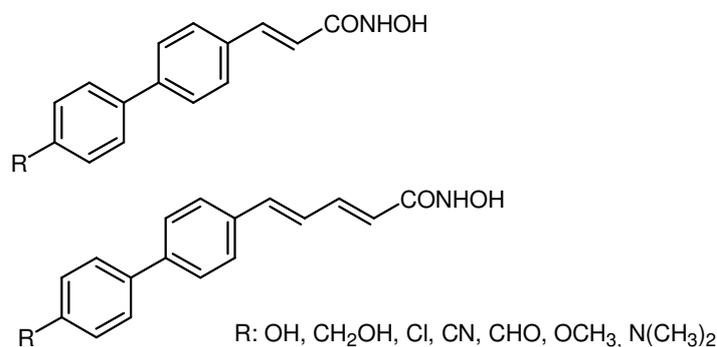
Nell'ottica di sintetizzare nuovi inibitori HDAC aventi come nuovo ZBG l'anello  $\beta$ -lattamico, è stato impiegato come modello la struttura del SAHA, utilizzando come linker catene carboniose sature ed insature e come capping group quello tipico del SAHA, cap *p*-fenilcinnammici e 3,3'-bisindolilmetano. La scelta di utilizzare gli ultimi due cap citati è da ricercarsi nelle attività biologiche esplicate *in vitro* da derivati carbossilici aventi cap bifenilici e linker cinnammici e da bis-indolil-acidi idrossammici; in particolare, i primi, hanno manifestato attività inibitoria su HDAC2 ed inducono antiproliferazione di cellule ovariche tumorali (IGROV)<sup>30a-b</sup> (**figura 12**), i

28 F. Meyer, and Hans Pritzkow. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 2346-2351.

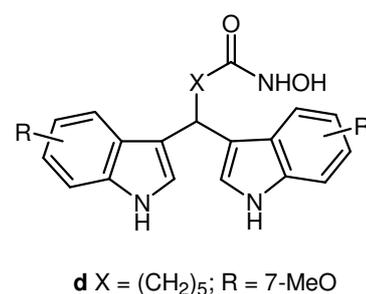
29 S. Oha, J-C. Jung. *Z. Naturforsch. B* **2007**, 62b, 1459 – 1464.

30 a) S. Dallavalle, R. Cincinelli, R. Nannei, L. Merlini, G. Morini, S. Penco, C. Pisano, L. Vesci, M. Barbarino, V. Zuco, M. De Cesare, F. Zunino, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 1900–1912 b) R. Cincinelli, S. Dallavalle, R. Nannei,

secondi, sono risultati inibitori HDAC fino all'ordine del nM, in particolare il composto **d** (*figura 13*) ha manifestato una buona attività su HDAC1, 3 e 6.<sup>31</sup>

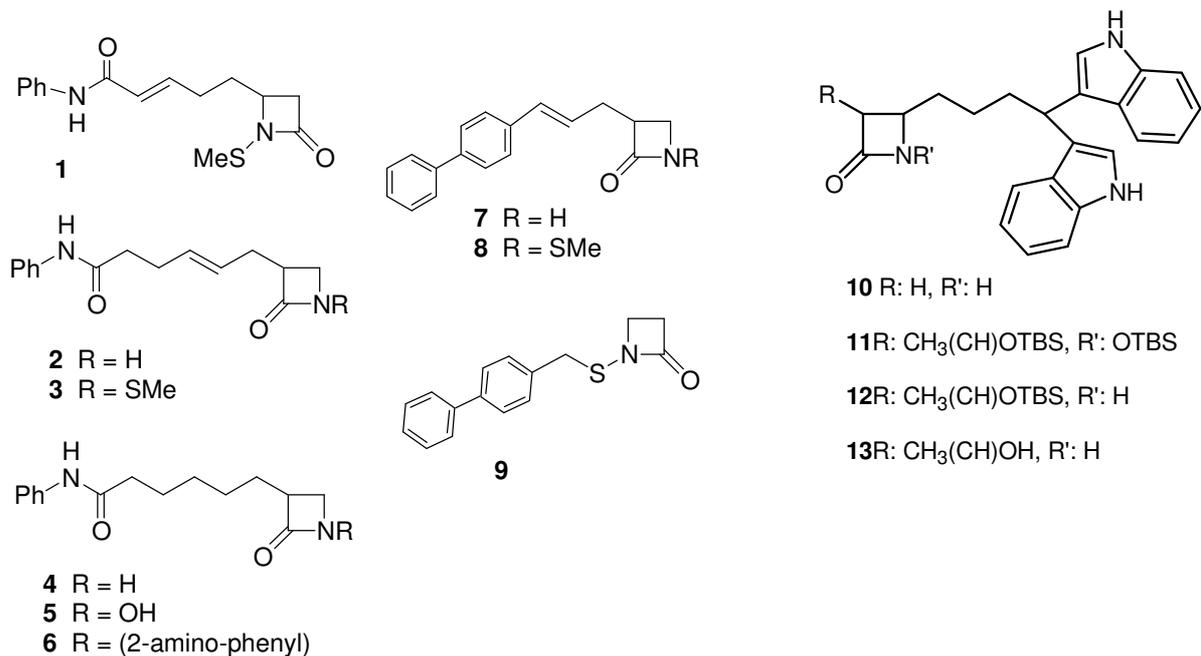


**Figura 12.**



**Figura 13.**

Nella *figura 14* sono riportate le molecole sintetizzate. Il modulo cap-linker è stato ancorato sia in posizione C3 che C4 dell'anello azetidionico e, elemento di notevole importanza ai fini di determinare la validità dell'anello β-lattamico come ZBG, sono stati sintetizzati NH, NOH, NSMe e *N-o*-aminnofenil derivati.



**Figura 14.**

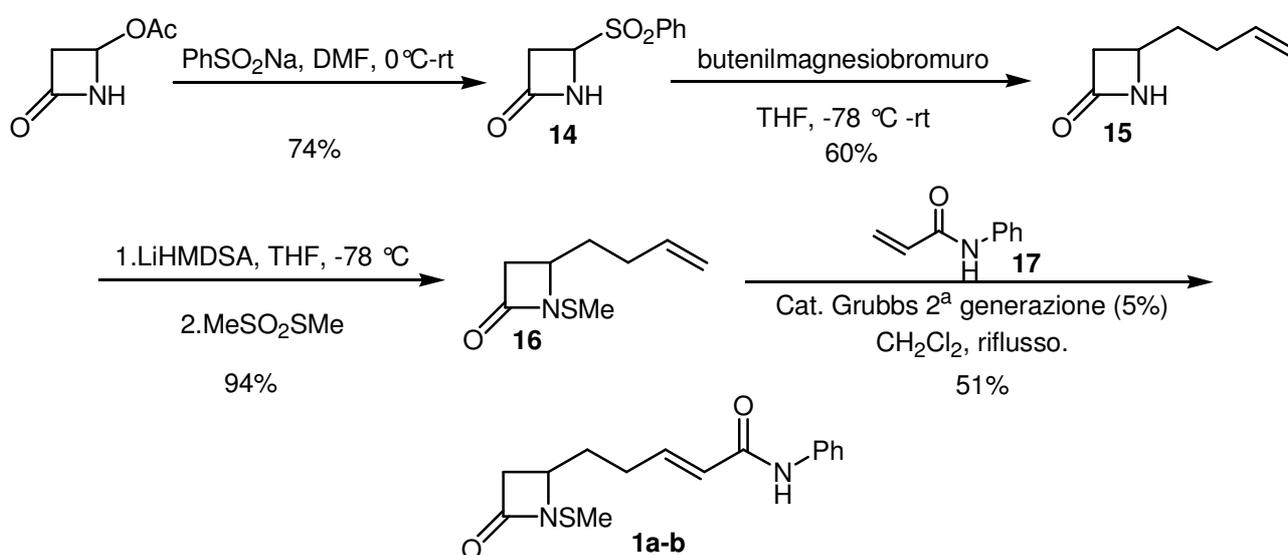
S. Carella, D. De Zani, L. Merlini, S. Penco, E. Garattini, G. Giannini, C. Pisano, L. Vescei, P. Carminati, V. Zuco, C. Zanchi, F. Zunino *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4931-4946

31 G. Giannini, M. Marzi, M. Di Marzo, G. Battistuzzi, R. Pezzi, T. Brunetti, W. Cabri, L. Vescei, C. Pisano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 2840-2843.

La sintesi di tali substrati ha richiesto un'accurata strategia, a causa della reattività dell'anello azetidionico in condizioni di reazione particolarmente spinte e di problemi di regio- e chemoselettività dovuti alla presenza di peculiari gruppi funzionali.

Per quanto riguarda le molecole contenenti cap di tipo SAHA-like o bifenile, solo per i composti **1**, **7**, **8** e **9** è stato possibile utilizzare sintoni che contenevano già l'anello azetidionico, per i restanti composti, non essendo previsti protocolli sintetici adatti, è stato necessario impiegare prodotti di partenza aciclici, lo step di ciclizzazione è risultato, quindi, essere il passaggio chiave.

Di seguito è riportato il protocollo studiato per il composto **1**:

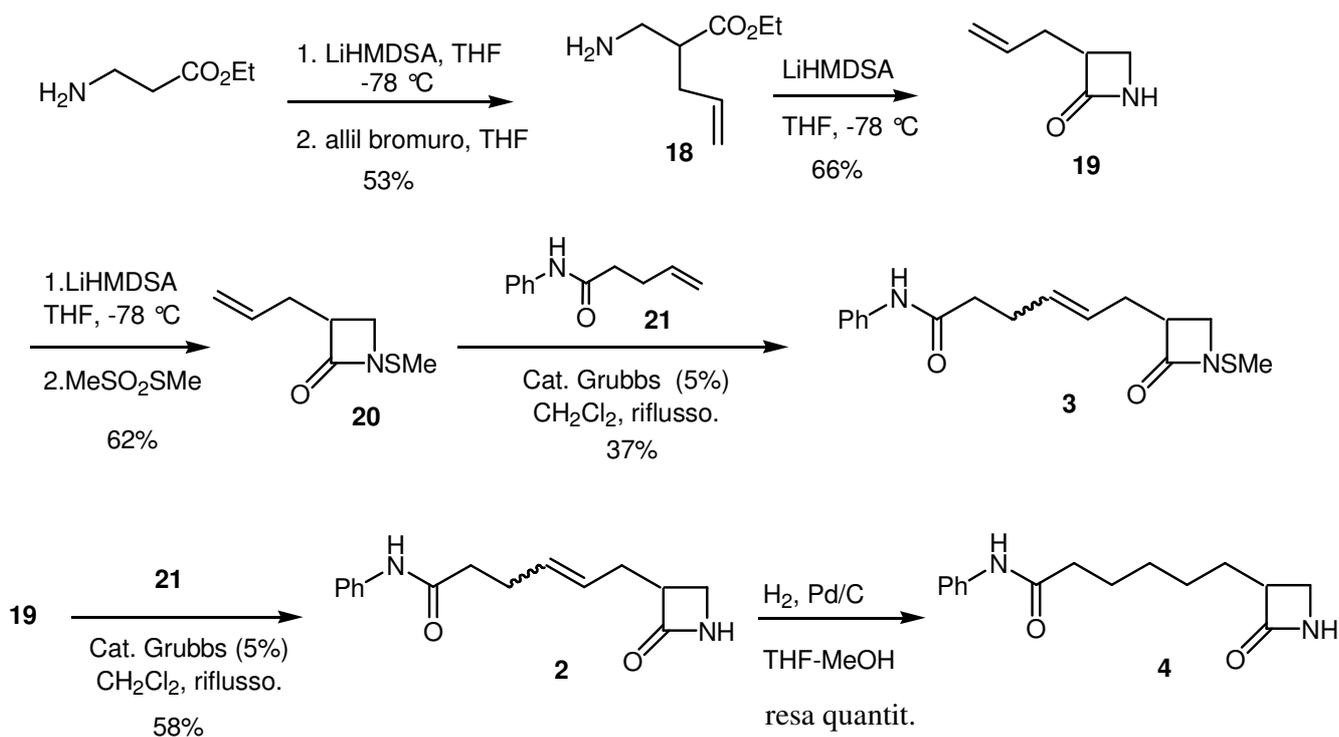


**Schema 1.**

Utilizzando il 4-acetossi-azetidion-2-one commercialmente disponibile come starting material, è stato possibile ottenere, tramite reazione di sostituzione nucleofila in presenza del sale sodico dell'acido benzen sulfonico, il corrispondente 4-benzensolfonil-derivato **14** con resa del 77%. Successiva sostituzione nucleofila ad opera del but-3-enil-magnesio bromuro porta alla formazione del 4-butenil-azetidione **15**. A questo punto è stato introdotta la funzione tiometilica sull'atomo di azoto  $\beta$ -lattamico attraverso *N*-tiometilazione condotta in ambiente basico (LiHMDSA) in presenza di MeSO<sub>2</sub>SMe, ottenendo il prodotto **16** al 94% di resa. L'ultimo passaggio sintetico è quello relativo all'introduzione del cap tipico del SAHA in posizione C4 dell'anello, condotta attraverso reazione di cross-metatesi con *N*-fenil-acrilammide **17** catalizzata dal catalizzatore di Grubbs di 2<sup>nda</sup> generazione. Dal lavoro di Grubbs<sup>32</sup> circa la stretta relazione tra

32 A K. Chatterjee, T.-L- choi, D. P. Sanders, and R. H. Grubbs. *JACS*, **2003**, *125*, 11360-11370.

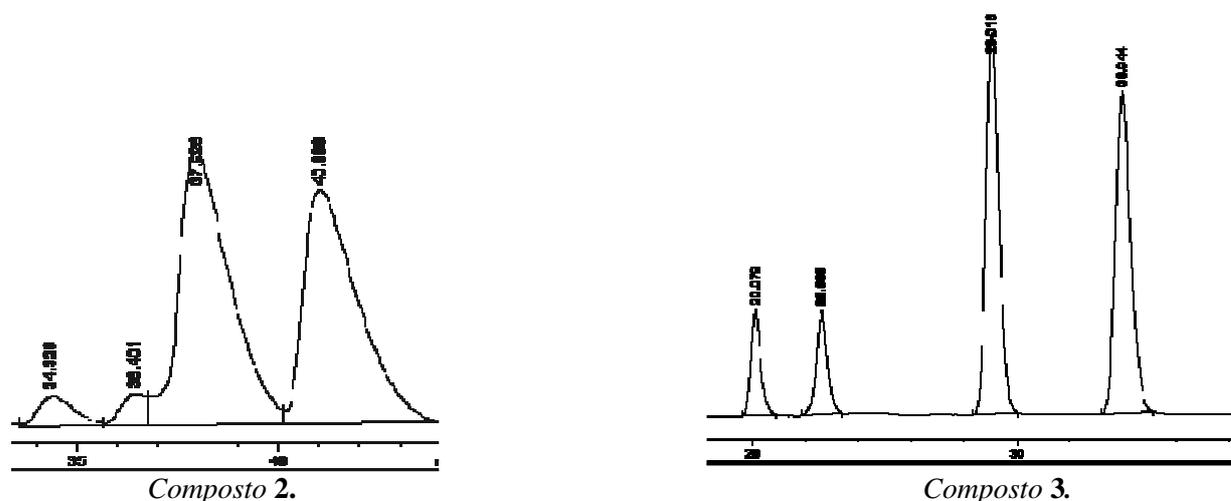
le caratteristiche strutturali delle olefine e la loro reattività verso la cross-metatesi, è noto che la reazione tra olefine dette del I tipo, quali olefine terminali, stireni ed alogenuri allilici, e quelle di II tipo, quali le acrilammidi e vinil chetoni, catalizzata dal catalizzatore di Grubbs di 2<sup>nda</sup> generazione è caratterizzata da una elevata stereoselettività verso la formazione del prodotto con configurazione *E* (*E/Z* > 20:1). Questa selettività è stata riscontrata nella reazione tra il residuo olefinico terminale del composto **16** (olefina del I tipo) e l'acrilammide **17** (olefina del II tipo) a dare il prodotto **1**, ottenuto come unico diastereoisomero *E*. Tale prodotto è stato ottenuto in miscela racema con resa del 51% sulla quale è stata effettuata separazione tramite HPLC semi-preparativa a fase inversa su colonna chirale, ottenendo i due enantiomeri separati **1a** e **1b**. Per l'introduzione del modulo cap-linker "SAHA-like" in posizione C3 è stato necessario utilizzare come materiale di partenza derivati aciclici. Per i composti **2-4** è stata impiegata la β-alanina estere etilico commercialmente disponibile. Nello *schema 2* è riportato il protocollo seguito.



*Schema 2.*

In presenza di allil bromuro e di un eccesso di LiHMDSA è stata effettuata allilazione in α alla funzione esterea della β-alanina, ottenendo il derivato **18**. A questo punto, la reazione di ciclizzazione base-catalizzata ha permesso di ottenere il corrispondente 3-allil-azetidin-2-one **19** al 66% di resa. Successivamente, è stata condotta reazione di N-tiometilazione, ottenendo il derivato **20** al 62%. Sui composti **19** e **20**, tramite cross-metatesi con la N-fenil amide dell'acido

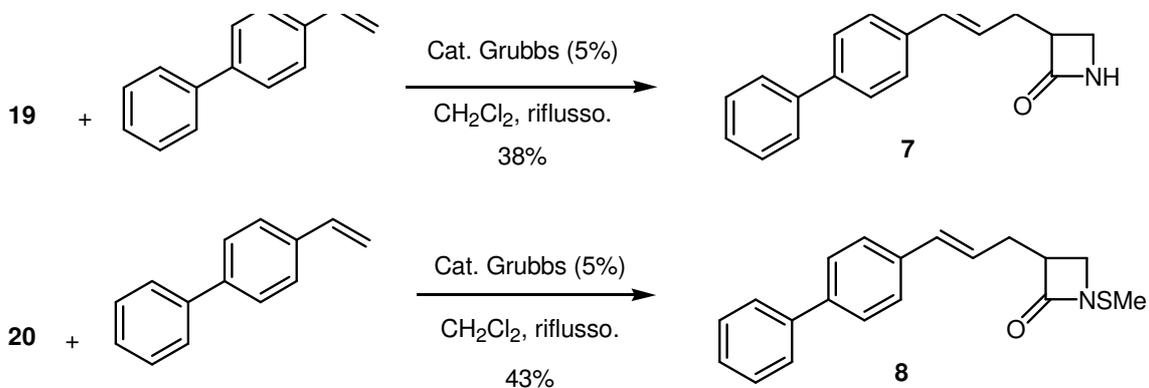
pentenoico **21**, sono stati introdotti il cap ed il linker di interesse ottenendo, rispettivamente, i prodotti **2** e **3**, con rese del 58% e 37%. In questo caso, le olefine in questione sono di tipo I e per tale coppia, secondo il lavoro di Grubbs,<sup>32</sup> è prevista una stereoselettività quasi nulla. Invece, sia il prodotto **2** che il **3** sono stati ottenuti prevalentemente come stereoisomero *E*, per il composto **2** in particolare, la presenza dell'oisomero *Z* è stata rilevata solo in tracce tramite analisi HPLC (*figura 15*). Anche in questo caso, è stato possibile la separazione nei rispettivi enantiomeri **2a** e **2b**, e nei quattro isomeri **3a**, **3b**, **3c** e **3d** dei racemi ottenuti, tramite HPLC semi-preparativa su colonna chirale.



*Figura 15. Cromatogrammi relativi ad analisi HPLC su colonna chirale dei composti 2 e 3.*

L'azetidione **4** è stato ottenuto quantitativamente tramite idrogenazione del doppio legame del substrato **2**. Non è stato possibile ottenere la variante *N*-tiometilata del derivato **4**, a causa della competitività tra l'ammide del  $\beta$ -lattame e l'ammide presente in catena laterale, mentre, conducendo la reazione di idrogenazione sul derivato **3** si ha la concomitante riduzione del gruppo *N*-tiometile ad NH.

Per quanto riguarda i derivati con un modulo cap-linker di natura *p*-fenilcinnammica, che, come precedentemente detto, si è rivelato un valido cap-linker per composti inibitori di HDAC2 (*figura 12*), sono stati sintetizzati i composti **7** e **8**, impiegando come derivati di partenza gli intermedi **19** e **20** (*schema 3*). Per valutare il ruolo della funzionalizzazione dell'azoto  $\beta$ -lattamico, è stato sintetizzato il corrispondente NH- ed NSMe-derivato. La reazione di cross-metatesi con *p*-fenilstirene ha portato alla formazione dei prodotti con rese del 38% per il **7** e 43% per l'**8**, anche questa volta con un completo stereo controllo verso la formazione dell'isomero *E*. Separazione su HPLC semi-preparativa su colonna chirale ha permesso di ottenere separatamente gli enantiomeri **7a**, **7b** e **8a** e **8b**.

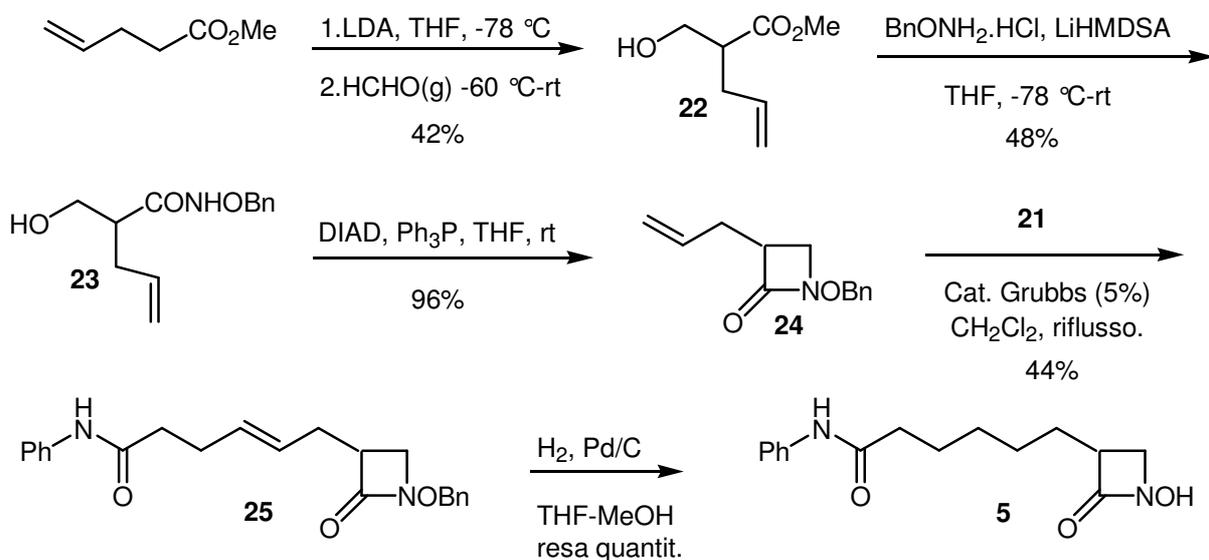


**Schema 3.**

Per quanto riguarda la varietà strutturale dello zinc-binding-group, intesa come funzionalizzazione dell'atomo di azoto lattamico, sono stati sintetizzati NOH ed N-*o*-amminofenil derivati, aventi cap di tipo SAHA.

Lo **schema 4** illustra la sintesi dell'*N*-idrossi azetidinone **5**. Questo composto, oltre ad avere un cap di tipo SAHA, possiede un motivo acido idrossamico come zinc-binding-group, tipico di tutti gli inibitori HDAC idrossammici come lo stesso SAHA. La progettazione di tale prodotto nasce dalla volontà di potenziare il carattere complessante dell'anello azetidionico verso lo zinco, introducendo un gruppo funzionale ossidrilico sull'atomo di azoto.

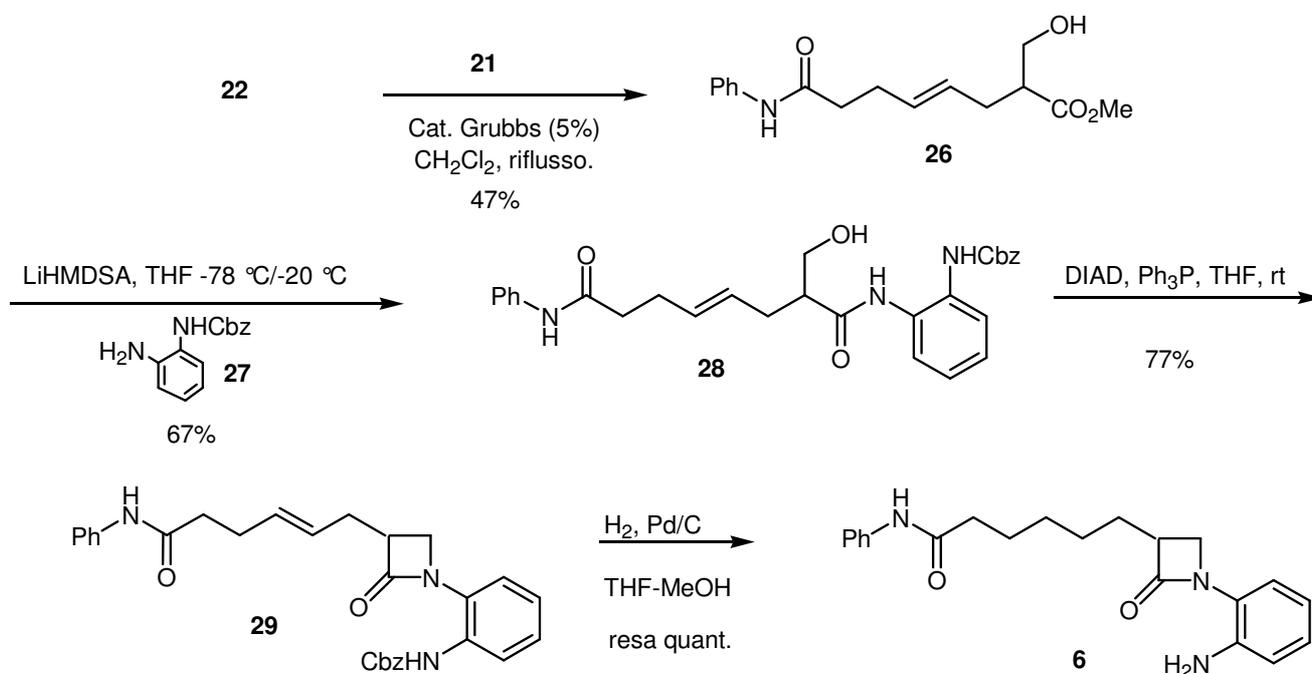
Come reagente di partenza è stato utilizzato il metil-4-pentenoato: enolizzazione e successiva idrossimetilazione in presenza di formaldeide hanno permesso di ottenere il derivato **22** al 42% di resa. Dopo formazione del derivato **23** (48%) per sostituzione acilica con *o*-benzil-idrossil ammina, la reazione di Mitsunobu ha portato alla formazione quantitativa del prodotto ciclizzato **24**, in presenza di diisopropilazodicarbossilato (DIAD) e trifenilfosfina. Cross-metatesi con l'acido fenilammide pent-4-enoico **21** e successiva idrogenolisi con Pd/C portano all'*N*-idrossiazetidinone **5**. È stato possibile ottenere separatamente gli enantiomeri **5a** e **5b** dopo separazione con HPLC semi-preparativa.



**Schema 4.**

Gli inibitori HDAC come il composto MS-275 (*figura 3*) e il CI-994<sup>33</sup> entrambi in fase clinica, detti benzammidi, sono caratterizzati da un residuo *o*-amminoanilide come ZBG. Tali composti sono generalmente meno attivi degli inibitori idrossammici, ma manifestano buona attività antiproliferativa su diverse linee cellulari tumorali umane, l'MS-275 è in grado di sopprimere la crescita di cellule tumorali pediatriche.<sup>13</sup> L'attività inibitoria è dovuta alla capacità di coordinare lo zinco del diamminofenil gruppo presente in tali composti.

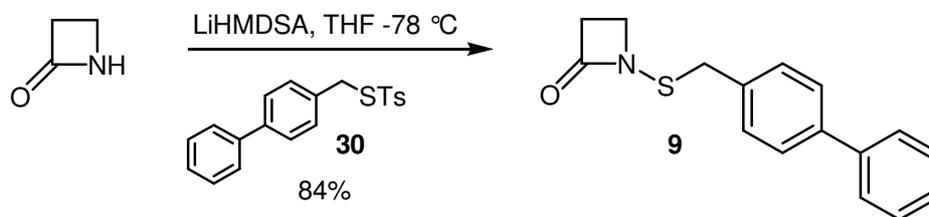
Con lo scopo, quindi, di associare il motivo strutturale dello ZBG delle benzammidi all'anello  $\beta$ -lattamico, è stato messo a punto un protocollo sintetico per l'ottenimento del composto **6**. Quest'ultimo è stato preparato in quattro passaggi a partire dall'idrossiestere **22** (*schema 5*). Cross-metatesi con la fenilammide **21** a dare il composto **26** (47%), seguita da sostituzione acilica con l'anilina **27**, porta al composto **28** al 67% di resa. Ciclizzazione tipo Mitsunobu ed idrogenolisi (Pd/C) portano quantitativamente al prodotto N-*o*-amminofenil-azetidina-2-one **6**.



*Schema 5.*

In fine, il composto **9** rappresenta una particolare variante rispetto ai prodotti finora riportati, in quanto presenta il cap bifenile sull'atomo di azoto del  $\beta$ -lattame tiometilato. Il prodotto è stato ottenuto per reazione tra il 2-azetidione commercialmente disponibile ed il composto **30** in ambiente basico all'84% di resa (*schema 6*).

<sup>33</sup> Seeling, M. H.; Berger, M. R. *Eur. J. Cancer*, **1996**, *32A*, 1968-1976.



**Schema 6.**

I composti  $\beta$ -lattamici **1-9** sono stati sottoposti a test biologici presso il laboratorio di analisi del Reaction Biology Corp. per determinarne l'attività inibitoria *in vitro* nei confronti delle 11 isoforme di HDAC isolate. L'attività è stata determinata tramite test di fluorescenza utilizzando un peptide fluorogenico (p53 379-382 ArgHisLysLys(Ac)), e la Tricostatina A (TSA) come composto di riferimento.<sup>34</sup> I test per i composti **1-3**, **5** e **7-8** sono stati effettuati sui singoli isomeri isolati.

Le molecole **1-9** hanno manifestato un'inaspettata e promettente selettività nei confronti delle isoforme, con una rilevante attività verso HDAC6 e HDAC8 (**Tabella 1**), senza registrare attività verso HDACs ( $IC_{50} > 1000 \mu M$  in tutti i casi). Nella **tabella 1** sono riportati i risultati di  $IC_{50}$  ottenuti per HDAC6 e HDAC8.

I dati ottenuti dimostrano che la selettività non varia al variare del cap o del linker, ma cambia drammaticamente al variare del gruppo funzionale presente sull'azoto  $\beta$ -lattamico. La presenza del gruppo *N*-tiometil determina l'attività verso HDAC8: il composto più attivo è risultato essere l'**1b** con un valore di  $IC_{50}$  di  $4.53 \mu M$ . I composti contenenti il cap *N*-fenilammide sono più potenti rispetto a quelli aventi il *p*-fenil-gruppo (**3b** vs **8b**). La geometria E o Z del doppio legame sul linker è abbastanza indifferente, mentre la posizione della catena *N*-fenilammidica in posizione C3 o C4 influenza lievemente la reattività: la catena laterale in posizione C4 è un po' più efficace ai fine dell'attività (**1a-b** vs **3a-b**). Inoltre, i singoli enantiomeri ha differente attività inibitoria verso HDAC8 (**3d** vs. **3c**). Gli MH- o NOHderivati, al contrario degli *N*-tiometil composti, non hanno manifestato attività verso HDAC8, ma una certa attività verso HDAC6: significativo è il confronto fra **2a/2b** vs **3a/3b**. La presenza del doppio legame in catena laterale non ha influenza sull'inibizione su HDAC6 (**2a-b** vs **4**). I derivati *N*-*o*-amminofenilici non hanno attività verso nessun target. L'azetidione **9**, che non presenta catena laterale ma un *N*-tio-*p*-fenil gruppo, conferma l'efficacia esplicita dall'atomo di zolfo per l'incremento dell'attività su HDAC8, ma perde la sua selettività sulle isoforme.

34. G. Giannini, T. Brunetti, R. Pezzi, G. Battistuzzi, M. Di Marzo, M. Marzi, W. Cabri, L. Vesci, C. Pisano *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009, 19, 2346–2349 c) G. Giannini, M. Marzi, M. DiMarzo, G. Battistuzzi, R. Pezzi, T. Brunetti, W. Cabri, L. Vesci, C. Pisano *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 2840–2843.

Comp.	Structure <sup>[b]</sup>	HDAC6 ( $\mu\text{M}$ )	HDAC8 ( $\mu\text{M}$ )	Comp.	Structure <sup>[b]</sup>	HDAC6 ( $\mu\text{M}$ )	HDAC8 ( $\mu\text{M}$ )
<b>TSA</b>		0.00042	0.089	<b>2a</b>		132.0	> 1000
<b>3a</b>		> 1000	34.3	<b>2b</b>		64.1	> 1000
<b>3b</b>		> 1000	11.6	<b>2c</b>		76.0	> 1000
<b>3c</b>		> 1000	33.1	<b>2d</b>		90.0	> 1000
<b>3d</b>		> 1000	9.56	<b>5a</b>		132	> 1000
<b>1a</b>		> 1000	10.1	<b>5b</b>		174	> 1000
<b>1b</b>		> 1000	4.5	<b>7a</b>		93.3	> 1000
<b>8a</b>		138	47.1	<b>7b</b>		> 1000	> 1000
<b>8b</b>		> 1000	30.9	<b>4</b>		74.5	> 1000
<b>9</b>		32.2	24.7	<b>6</b>		> 1000	> 1000

[a] Assay condition was started with a 50  $\mu\text{M}$  solution, 10 doses with 1:3 dilution. Trichostatin A (TSA) was used as reference compound. [b] Absolute configuration here depicted have been just tentatively assigned on the basis of the computational analysis (see text for details)

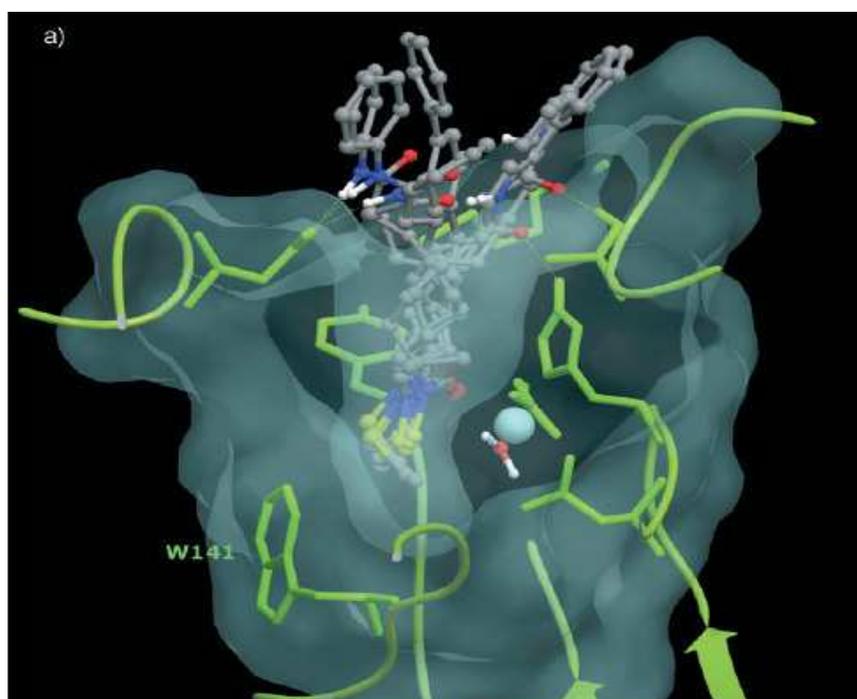
**Tabella 1.**

Per determinare la selettività dei derivati **1a-b**, **3a-d**, e **8a-b** verso HDAC8, è stato effettuato uno studio strutturale comparativo tramite analisi computazionale di docking, condotta presso l'azienda Sigma-Tau, utilizzando tre isoforme; HDAC2, HDAC7 e HDAC8 rappresentative per la classe I e II. È stato ipotizzato che la selettività dovrebbe essere esplicita, all'interno della tasca enzimatica, nel canale contenente la regione dello Zn-binding-group. In questa regione molti degli

ammino acidi sono gli stessi per la I e la II classe HDACs, ma l'attenzione è stata posta su due ammino acidi, Trp141 e Met274, peculiari per HDAC8. Successivamente, sugli HDAC scelti, è stato studiato il modo di interazione degli *N*-tiometil-azetidion-2-oni derivati verso la I e la II classe HDACs. All'inizio, sono state calcolate la geometria e l'energia del complesso  $Zn^{2+}$  con i substrati  $\beta$ -lattamici presi in esame; i valori di minimizzazione dell'energia coinvolta nei complessi, dimostrano che la coordinazione che coinvolge i derivati  $\beta$ -lattamici e lo ione  $Zn^{2+}$  è di tipo mono-dentato: tale risultato è stato ottenuto utilizzando un modello in cui il substrato azetidionico **3c**, scelto come modello, compare come ligando mono-dentato con in aggiunta una molecola d'acqua, come secondo ligando per lo zinco.

Il modello messo a punto per il complesso **3c**/HDAC8 è stato impiegato per determinare l'orientamento degli altri substrati azetidionici all'interno della tasca enzimatica.

La **figura 16** dimostra che i composti presi in esame fittano all'interno della tasca enzimatica di HDAC8, che il linker interagisce positivamente con i residui ammino acidici presenti all'entrata della tasca e che è di adeguata lunghezza ai fini di posizionare correttamente lo ZBG nel canale; il gruppo NSMe, interagendo in maniera adeguata con residui ammino acidici presenti nel canale, orienta il gruppo CO dell'anello  $\beta$ -lattamico verso l'atomo di zinco. Tutto ciò dimostra la validità dell'anello *N*-tiometil azetidionico come ligando mono-coordinante dello zinco.



**Figura 16.**

I risultati di attività biologica, condotti su 11 isoforme di HDAC isolate ed avvalorati dagli studi di analisi computazionale, rappresentano il primo esempio di substrati  $\beta$ -lattamici come selettivi inibitori di HDAC8 e HDAC6 e dimostrano la validità del nuovo ZBG N-tiometil azetidione.

Un ulteriore cap su cui è ricaduta la scelta per la progettazione di inibitori di HDAC a base  $\beta$ -lattamica è il gruppo bis-indolilmetano. Come introdotto all'inizio del paragrafo, la scelta di questo cap è stata dettata dall'attività biologica esplicata da bis-indolilmetan-derivati, che sono risultati inibitori HDAC a concentrazioni nM, (*figura 13*). Il residuo indolico, inoltre, è presente in diversi composti biologicamente e farmacologicamente attivi. Bis-indolilalcani ed i loro derivati, ad esempio, sono stati trovati in metaboliti bioattivi di origine terrestre e marina.<sup>35</sup> Infine, bis-indolilmetan-derivati manifestano attività in linee multiple di cellule cancerogene, come l'inibizione della crescita, apoptosi ed attività antiangiogenica.<sup>36</sup> Risulta, quindi, di grande interesse la sintesi di tali composti.<sup>37</sup>

Fra i vari metodi studiati per l'ottenimento di questi substrati, compaiono protocolli che si avvalgono dell'uso di acidi di Lewis o di Brønsted per promuovere la reazione tra indoli e aldeidi e chetoni aromatici o alifatici. Recentemente, bis(indolil)metani (3,3'-BIMs) vengono sintetizzati in acetonitrile in presenza di catalizzatori come  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{PPh}_3 \cdot \text{HClO}_4$  ed altri. Molti di questi acidi di Lewis, però, vengono disattivati o decomposti dall'azoto contenuto nei reagenti. Proprio per questo, la sintesi di  $\beta$ -lattami contenenti residui bisindolici presenta diverse intrinseche difficoltà.

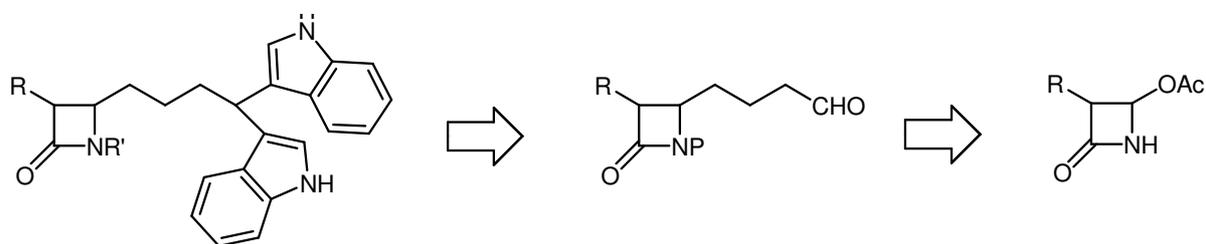
La sintesi dei bis-indolilmetan derivati ai quali ci siamo dedicati, ha richiesto, come per i composti finora esaminati, un'adeguata strategia di sintesi, a causa della reattività dell'anello azetidionico verso apertura nucleofila e per preservare contemporaneamente tutti i gruppi NH liberi. Con lo scopo di limitare al minimo l'utilizzo di gruppi protettori, è stata esplorata la possibilità di introdurre il motivo bisindolico alla fine della via sintetica, sull'azetidion-aldeide ottenuta in pochi passaggi sintetici partendo dagli intermedi 4-acetossi-azetidioni commercialmente disponibili. L'approccio retrosintetico è riportato nello *schema 7*.

---

35 M. Shiri, M.A.Zolfigol, H. G.Kruger, Z. Tanbakouchian, *Chem.Rev.* **2010**, ASAP.

36 S. Safe, S. Papineni, S. Chintharlapalli, *Cancer Lett.* **2008**, 269, 326-338.

37 M. Bandini, A. Eichholzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9608 – 9644.



**10** R: H, R': H

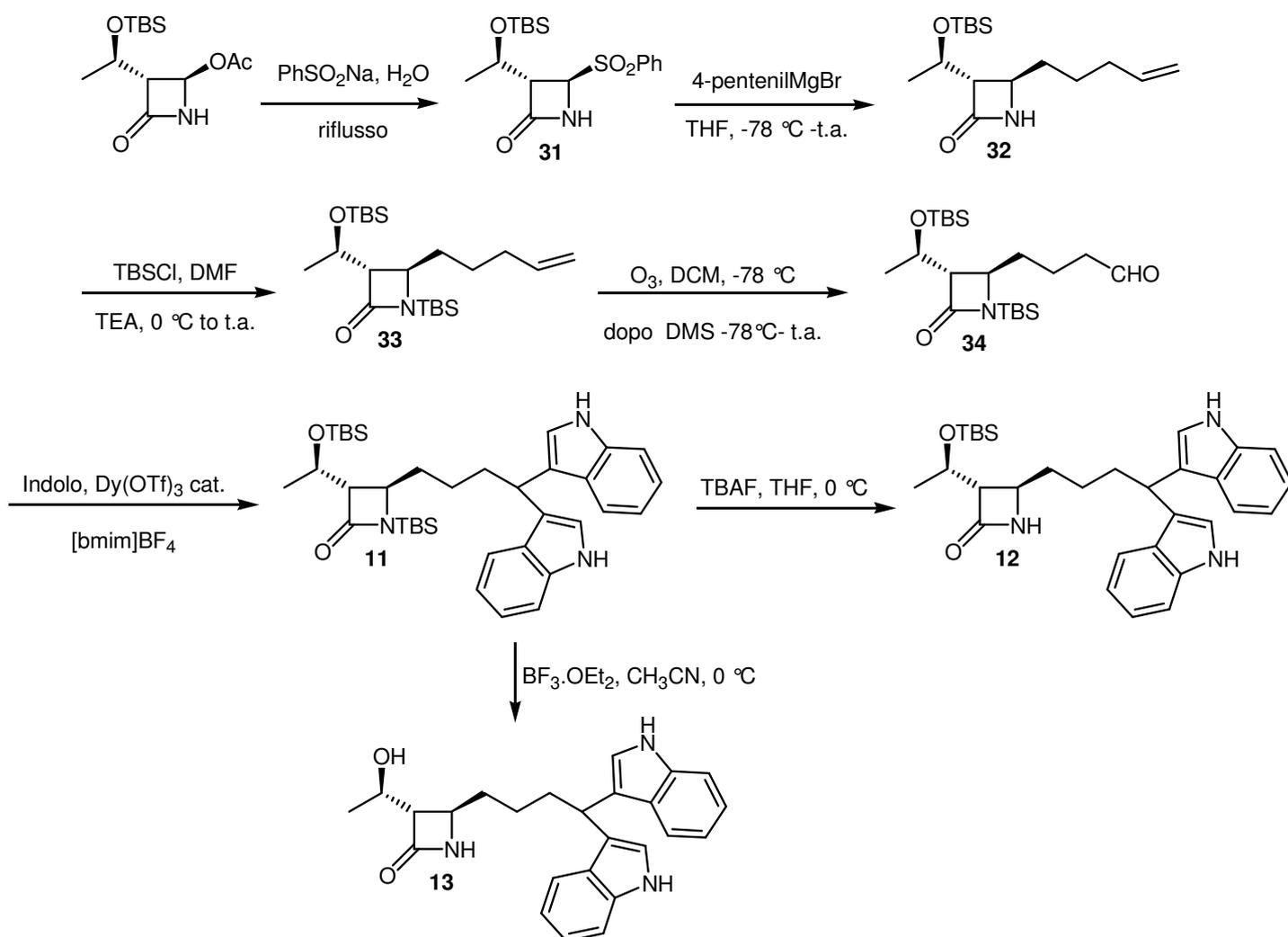
**11**R: CH<sub>3</sub>(CH)OTBS, R': OTBS

**12**R: CH<sub>3</sub>(CH)OTBS, R': H

**13**R: CH<sub>3</sub>(CH)OH, R': H

**Schema 7.**

Il protocollo sintetico messo a punto per la sintesi dei composti **11-13** è riportato nello *schema 8*.



**Schema 8.**

Il composto 3-(2-tert-butildimetilsililossietil)-4-acetossi-azetidina-2-one commercialmente disponibile è stato convertito quantitativamente nel solfone **31** sul quale è stata eseguita reazione di sostituzione in presenza di 4-pentenil magnesio bromuro ad ottenere il derivato **32** al 43% di

resa. La formazione selettiva dell'isomero *trans* dei sostituenti in posizione 3,4 dell'anello  $\beta$ -lattamico è stato confermato da analisi  $^1\text{H}$  NMR che dimostra un basso valore di costante di accoppiamento  $J$  (2.2 Hz per **32**, vedere parte sperimentale). L'ozonolisi del doppio legame a dare l'aldeide corrispondente ha richiesto la preliminare protezione dell'azoto  $\beta$ -lattamico del **32** a dare in resa quantitativa l'*N*-*t*butildimetilsilil-derivato **33**, successivamente, l'ozonolisi, condotta a bassa temperatura e seguita da riduzione del reattivo ozonuro in presenza di dimetilsolfuro ha dato l'aldeide **34** (resa del 40%).

Sono riportati vari approcci di sintesi di bisindolimetani da aldeidi alifatiche e aromatiche.<sup>21</sup> Sono stati sviluppati protocolli "green" per la sintesi di 3,3'BIMs, ad esempio, in liquidi ionici, solventi caratterizzati da una bassa tensione di vapore.<sup>38</sup>

La necessità di impiegare condizioni di reazioni e reagenti che non provocassero apertura dell'anello azetidionico, ha focalizzato l'attenzione sul possibile impiego di lantanidi triflati come catalizzatori acidi di Lewis per la reazione di addizione dell'indolo sull'aldeide **34**. Dopo attenta valutazione delle condizioni di reazione, è stato possibile ottenere il prodotto di addizione **11** in presenza di 2 equivalenti di indolo e  $\text{Dy}(\text{OTf})_3$  in liquido ionico (1-*n*-butil-3-metil-imidazolo tetrafluoroborato, [bmim] $\text{BF}_4$  a temperatura ambiente.<sup>15</sup> L'impiego del liquido ionico si è rivelato strategico per utilizzare quantità catalitiche di  $\text{Dy}(\text{OTf})_3$  e recuperare il prodotto di addizione attraverso semplice estrazione in etere etilico, lasciando il catalizzatore nel [bmim] $\text{BF}_4$ , pronto, quindi, per ulteriori cicli catalitici.

La selettiva deprotezione, in presenza di tetrabutylammoniofluoruro (TBAF), del gruppo TBS dell'azoto  $\beta$ -lattamico sul prodotto **11** ha permesso di ottenere il composto **12**, con resa del 59%. Per totale deprotezione dei gruppi funzionali in  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  è stato ottenuto il composto **13** al 57% di resa.

Un'analoga sequenza sintetica è stata sviluppata per la sintesi del composto bisindolil-azetidione **10** (*schema 9*). Anche in questo caso, sull'intermedio solfonato **14** è stata effettuata sostituzione nucleofila per introdurre la catena C5 insatura (**35**). L'ozonolisi del composto N-protetto **36** ha portato all'aldeide **37**, trattamento con indolo e  $\text{Dy}(\text{OTf})_3$  in [bmim] $\text{BF}_4$  ha permesso di ottenere il composto target **14** in forma racemica con resa del 77%.

---

38 J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, S. Sunitha, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 349-352.



## Parte sperimentale

Il  $\beta$ -lattame **14** è stato preparato dal 4-acetossi-azetidina-2-one seguendo una procedura nota.<sup>39</sup> Il composto **15** è un prodotto noto,<sup>40</sup> ma è stato preparato seguendo una nota procedura sotto riportata. Il prodotto **17** è stato sintetizzato tramite procedura nota.<sup>41</sup> Il prodotto **19** è noto.<sup>42</sup> Il prodotto **21** è stato preparato seguendo una nota procedura.

Il prodotto **22** è noto.<sup>43</sup> Il composto **27** è noto,<sup>44</sup> ma è stato preparato seguendo un'ulteriore procedura nota in letteratura.

**(15)** Il prodotto **15** è già noto. È stato sintetizzato seguendo una procedura modificata.<sup>45</sup> 3-Butenil-magnesio bromuro, preparato al momento da Mg (114 mg, 4.7 mmol) e 3-butenil bromuro (0.5 mL, 4.6 mmol) in THF (2 mL), è aggiunto goccia a goccia ad una soluzione di **14** (323 mg, 1.5 mmol) in THF (10 mL) a -78 °C. Dopo la miscela viene portata a t.a. e monitorizzata tramite TLC. Dopo 12 ore la reazione viene spenta con una soluzione acquosa di NH<sub>4</sub>Cl ed estratta con etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-chromatografia (cicloesano/etil acetato, 50:50) ad ottenere il prodotto come olio incolore (113 mg, 60 % di resa). Gli spettri NMR risultano in accordo con quelli riportati in letteratura.

**(16):** ad una soluzione di **15** (223 mg, 2.0 mmol) in THF (20 mL) viene aggiunta LiHMDSA (2.2 mmol, 1 M in THF) a -78 °C e dopo *S*-metil metantiosolfonato (0.5 mL, 5 mmol). La soluzione viene portata a t.a. Dopo 3 ore la reazione viene spenta con una soluzione acquosa di NH<sub>4</sub>Cl ed estratta con etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-chromatografia (cicloesano/etil acetato, 50:50) ad ottenere il prodotto come olio giallo (134 mg, 94 % yield):  $R_f = 0.50$  (cicloesano/etil acetato, 50:50).

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = 1.44-1.62$  (m, 1 H), 1.93-2.05 (m, 1 H), 2.07-2.20 (m, 2 H), 2.40 (s, 3H), 2.64 (dd,  $J = 3$  Hz,  $J = 15$  Hz, 1 H), 3.06 (dd,  $J = 5$ ,  $J = 15$  Hz, 1 H), 3.64 (m, 1 H), 4.94-5.07 (m, 2 H), 5.67-5.87 (m, 1 H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24 °C):  $\delta = 22.5, 29.5, 32.2, 43.6, 55.2, 115.5, 136.9, 170.3$  ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 6.4$  min,  $m/z$ : 172 [M + H]<sup>+</sup>, 189 [M + H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

**(1):** ad una soluzione di **16** (94 mg, 0.55 mmol) e *N*-fenilacrilammide **17** (162 mg, 1.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.8 mL) precedentemente degasato tramite procedura freeze-pump-thaw viene aggiunto il catalizzatore di Grubbs di 2<sup>a</sup> Generazione, 1,3-Bis-(2,4,6-trimetilfenil)-2-

39 Sebastien Meiries and Rodolfo Marquez. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 5015–5021.

40 T. Aida, R. Legault, D. Dugat, T. Durst, *Tetrahedron Lett* **1979**, 4993-4994.

41 J. Eriksson, O. Åberg, B. Långström, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 455–461.

42 A. Urbach, G.G. Muccioli, E. Stern, D. M. Lambert, J. Marchand-Brynaert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 4163-4167.

43 J. L. Herrmann, R. H. Schlessinger *Tetrahedron Lett.* **1973**, 2429-2432.

44 R. Varala, R. Enugala, S. R. Adapa *J. Ir. Chem. Soc.* **2007**, 370-374.

45 Y. Kozawa, M. Mori, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 3064-3067.

(imidazolidinilidene)(diclorofenilmetilene)(tricicloesilfosfina)rutenio, (23 mg, 5 %). La reazione viene monitorizzata tramite TLC. Dopo 14 ore a riflusso la reazione viene bloccata filtrando il catalizzatore. Il solvente viene allontanato ed il grezzo viene purificato per flash-chromatografia (cicloesano/etil acetato, 90:10) ad ottenere il prodotto come olio incolore (81 mg, 51 %).  $R_f = 0.47$  (cicloesano/etil acetato, 50:50).  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = 1.58\text{-}1.74$  (m, 1 H), 2.01-2.18 (m, 1 H), 2.26-2.37 (m, 2 H), 2.41 (s, 3 H), 2.66 (dd,  $J = 3$ ,  $J = 15$  Hz, 1 H), 3.10 (dd,  $J = 5$ ,  $J = 15$  Hz, 1 H), 3.62-3.74 (m, 1 H), 6.06 (d,  $J = 15$  Hz, 1 H), 6.87-7.06 (m, 1 H), 7.10-7.13 (m, 1 H), 7.27-7.35 (m, 2 H), 7.58-7.62 (m, 2 H), 8.00 (brs, 1 H) ppm.).  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24 °C):  $\delta = 22.7$ , 28.0, 31.8, 43.6, 55.0, 119.9, 124.4, 125.1, 129.0, 129.1, 138.0, 144.0, 170.3. IR (film):  $\tilde{\nu} = 3312$ , 2922, 1752, 1676  $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t = 5.9$  min,  $m/z$ : 291  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 313  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 603  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$  calcolata per  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : 290.1089, trovata: 290.1089.

HPLC semi-preparativa su colonna chirale Daicel Chiralcel AD (0.46 cm  $\phi$  x 25 cm) (0.5 mL/min, n-esano/iPrOH = 75:25) ha portato alla separazione dei 2 enantiomeri con i seguenti tempi di ritenzione: **1a** ( $R_t = 20.4$  min); **1b** ( $R_t = 24.3$  min).

**(18)**: Il prodotto **18** è stato preparato seguendo la procedura riportata in letteratura:<sup>46</sup> ad una soluzione di LiHMDSA (31.5 mmol, 1 M in THF) in THF (100 mL) a -78 °C è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di  $\beta$ -Alanina cloridrata (2.3 g, 15 mmol) in THF (15 mL). Dopo 2 ore viene aggiunto allil bromuro (1.3 mL, 15 mmol) goccia a goccia. Dopo 10 ore a t.a. la reazione viene spenta con una soluzione acquosa di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ed estratta con etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-chromatografia ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 30:10:1) ad ottenere il prodotto come olio giallo (1.2 g, 53 %).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = 1.26$  (t,  $J = 7.2$  Hz, 3 H), 1.61 (brs, 2 H), 2.22-2.44 (m, 2 H), 2.48-2.57 (m, 1 H), 2.84 (dd,  $J = 5.1$ ,  $J = 13.2$  Hz, 1 H), 2.94 (dd,  $J = 7.8$ ,  $J = 13.2$  Hz, 1 H), 4.16 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2 H), 5.01-5.11 (m, 2 H), 5.68-5.82 (m, 1 H) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = 14.28$ , 34.0, 43.3, 48.4, 60.4, 117.0, 135.0, 174.5 ppm. GC-MS:  $R_t = 10.3$  min,  $m/z$ : 157 (10)  $[\text{M}]^+$ , 141 (8)  $[\text{M} - \text{NH}_2]^+$ , 128 (90)  $[\text{M} - \text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ , 116 (55)  $[\text{M} - \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2]^+$ , 100 (60), 82 (70), 70 (100), 55 (90).

**(19)**: Il prodotto **19** è già noto. È stato preparato tramite una procedura modificata<sup>31</sup>: ad una soluzione di **18** (1.3 g, 7.2 mmol) viene aggiunta una soluzione di LiHMDSA (21.5 mmol, 1M in THF) goccia a goccia a -78 °C. Dopo 12 ore a t.a. la reazione viene spenta con una soluzione acquosa di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ed estratta con etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-chromatografia ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 30:10:1) ad ottenere il prodotto come olio giallo (160 mg, 66 %). Gli spettri NMR risultano in accordo con quelli riportati in letteratura.

---

46 A. J. McNeil, G. E. S. Toombes, S. M. Gruner, E. Lobkovsky, D. B. Collum, S. V. Chandramouli, B. J. Vanasse, T. A. Ayers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16559-16568.

**(2):** ad una soluzione di **19** (76 mg, 0.7 mmol) e *N*-fenilpent-4-enamide **21** (257 mg, 1.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) precedentemente degasato tramite procedura freeze-pump-thaw viene aggiunto il catalizzatore di Grubbs di 2<sup>a</sup> Generazione (29 mg, 5 %). Dopo 12 ore a riflusso la reazione viene bloccata filtrando il catalizzatore. Il solvente viene allontanato ed il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 60:40) ad ottenere il prodotto come olio incolore (101 mg, 58 %). *R*<sub>f</sub> = 0.25 (cicloesano/etil acetato, 40:60).

*N*-fenilpent-4-enamide viene preparata tramite una procedura nota in letteratura.<sup>26</sup>

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 22 °C): δ = 2.22-2.45 (m, 6 H), 2.93 (dd, *J* = 2.4, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 3.14-3.22 (m, 1 H), 3.27 (dd, *J* = 5.1, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 5.50-5.66 (m, 2 H), 6.80 (brs, 1 H), 7.0-7.05 (m, 1 H), 7.24-7.30 (m, 2 H), 7.64-7.67 (m, 2 H), 9.12 (brs, 1 H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 24 °C): δ = 29.3, 32.5, 37.8, 41.1, 51.9, 120.1, 124.0, 128.1, 130.0, 132.1, 140.6, 170.9, 171.4 ppm. IR (film): ν̄ = 3301, 2923, 1736, 1664 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS (ESI): *R*<sub>t</sub> = 2.2 min, *m/z*: 259 [M + H]<sup>+</sup>, 539 [2M + Na]<sup>+</sup>. HRMS (EI): *m/z* [M]<sup>+</sup> calcolata per C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 258.1368, trovata: 258.1371.

Su frazioni arricchite dell'isomero *Z*, HPLC semi-preparativa su colonna chirale Daicel Chiralcel OD (0.46 cm ø x 25 cm) (0.5 mL/min, *n*-esano/ *i*PrOH = 85:15) ha permesso di separare i 4 stereoisomeri con i seguenti tempi di ritenzione: **2c**(*Z*) (*R*<sub>t</sub> = 36.6 min); **2d**(*Z*) (*R*<sub>t</sub> = 38.9 min); **2a**(*E*) (*R*<sub>t</sub> = 40.8 min); **2b**(*E*) (*R*<sub>t</sub> = 44.0 min):;

**(4):** ad una soluzione di **2** (10.5 mg, 0.04 mmol) in THF (1.5 mL) e metanolo (1.5 mL) viene aggiunto palladio su carbone (10 %) (2.1 mg, 20 %) e la miscela viene portata a 8 bar. Dopo conversione la miscela viene filtrata e concentrata ad ottenere il prodotto come sciroppo incolore (10 mg, quantitative yield). *R*<sub>f</sub> = 0.20 (cicloesano/etil acetato, 30:70).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 22 °C): δ = 1.33-1.50 (m, 4 H), 1.59-1.74 (m, 4 H), 2.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 2.94 (dd, *J* = 2.7, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 3.11-3.19 (m, 1 H), 3.35 (dd, *J* = 5.4, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 6.83 (brs, 1 H), 6.99-7.05 (m, 1 H), 7.23-7.30 (m, 2 H), 7.65-7.68 (m, 2 H), 9.13 (brs, 1 H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 24 °C): δ = 26.2, 27.6, 29.8, 29.9, 37.7, 42.0, 52.4, 120.1, 124.0, 129.5, 140.7, 171.5, 172.0 ppm. IR (film): ν̄ = 3301, 2960, 2926, 1736, 1664 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS (ESI): *R*<sub>t</sub> = 7.0 min, *m/z*: 261 [M + H]<sup>+</sup>, 543 [2M + Na]<sup>+</sup>. HRMS (EI): *m/z* [M]<sup>+</sup> calcolata per C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 260.1525, trovata: 260.1527.

**(20):** ad una soluzione di **19** (80 mg, 0.7 mmol) in THF (4 mL) viene aggiunta LiHMDA (0.8 mmol, 1M in THF) a -78 °C e dopo *S*-metil metantiosolfonato (0.2 mL, 1.8 mmol). La soluzione viene portata a t.a.. Dopo 3 ore, la reazione viene spenta con una soluzione acquosa di NH<sub>4</sub>Cl ed estratta con etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 80:20) per ottenere il prodotto come olio giallo (70 mg, 62 %). *R*<sub>f</sub> = 0.75 (cicloesano/etil acetato, 50:50).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta$  = 2.34-2.58 (m, 2 H), 2.42 (s, 3 H), 3.18 (dd,  $J$  = 3.3,  $J$  = 6.6 Hz, 1 H), 3.35-3.44 (m, 1 H), 3.52 (dd,  $J$  = 5,  $J$  = 6.6 Hz, 1 H), 5.10-5.16 (m, 2 H), 5.72-5.86 (m, 1 H) ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 4.3 min,  $m/z$ : 158  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 337  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ .

**(3)**: ad una soluzione di **20** (63 mg, 0.4 mmol) e *N*-fenilpent-4-enamide (176 mg, 1 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) precedentemente degasato tramite procedura freeze-pump-thaw viene aggiunto il catalizzatore di Grubbs di 2<sup>a</sup> Generazione (17 mg, 5 %). Dopo 4 ore a riflusso la reazione viene bloccata filtrando il catalizzatore. Il solvente viene allontanato ed il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 70:30) per ottenere il prodotto come sciroppo incolore (45 mg, 37 %).  $R_f$  = 0.35 (cicloesano/etil acetato, 50:50).

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 22 °C):  $\delta$  = 2.22-2.46 (m, 6 H), 2.37 (s, 3 H), 3.10 (dd,  $J$  = 3 Hz,  $J$  = 5.4 Hz, 1 H), 3.23-3.33 (m, 1 H), 3.40 (dd,  $J$  = 5.2,  $J$  = 5.4 Hz, 1 H), 5.40-5.64 (m, 2 H), 7.03-7.10 (m, 1 H), 7.26-7.34 (m, 2 H), 7.53-7.58 (m, 2 H), 8.28 (brs, 1 H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 24 °C):  $\delta$  = 21.4, 28.5, 31.3, 36.9, 48.5, 51.3, 119.8, 123.9, 126.8, 129.1, 132.1, 139.5, 171.2, 173.4 ppm. IR (film):  $\tilde{\nu}$  = 3320, 2922, 1736, 1655  $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 7.1 min,  $m/z$ : 305  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 327  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 631  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$  calcolata per  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  : 304.1245, trovata: 304.1244.

Su frazioni arricchite dell'isomero *Z*, HPLC semi-preparativa su colonna chirale Daicel Chiralcel OD (0.46 cm  $\phi$  x 25 cm) (0.5 mL/min, n-esano/ iPrOH da 82:18 a 70:30 in 25 min) ha permesso di separare i 4 stereoisomeri con i seguenti tempi di ritenzione: **3c**(*Z*) ( $R_t$  = 20.1 min); **3d**(*Z*) ( $R_t$  = 22.6 min); **3a**(*E*) ( $R_t$  = 29.0 min); **3b**(*E*) ( $R_t$  = 34.0 min).

**(7)**: ad una soluzione di **19** (22 mg, 0.2 mmol) e 4-fenil stirene (90 mg, 0.5 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL) precedentemente degasato tramite procedura freeze-pump-thaw viene aggiunto il catalizzatore di Grubbs di 2<sup>a</sup> Generazione (8.5 mg, 5 %). Dopo 14 la reazione viene bloccata filtrando il catalizzatore. Il solvente viene allontanato ed il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 70:30) ad ottenere il prodotto come sciroppo incolore (20 mg, 38 %).  $R_f$  = 0.34 (cicloesano/etil acetato, 50:50).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta$  = 2.58-2.60 (m, 1 H), 2.70-2.79 (m, 1 H), 3.08-3.16 (m, 1 H), 3.40-3.50 (m, 2 H), 5.66 (brs, 1 H), 6.28 (dt,  $J$  = 6.9,  $J$  = 15.6 Hz, 1 H), 6.52 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1 H), 7.27-7.64 (m, 9 H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24 °C):  $\delta$  = 31.9, 41.0, 51.0, 125.9, 126.6, 126.9, 127.2, 127.3, 128.8, 131.9, 136.1, 140.1, 140.7, 170.7 ppm. IR (Nujol):  $\tilde{\nu}$  = 3190, 1736, 1704  $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 9.1 min,  $m/z$ : 264  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 281  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ , 527  $[2\text{M} + \text{H}]^+$ , 549  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$  calcolata per  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}$ : 263.1310, trovata: 263.1311.

HPLC semi-preparativa su colonna chirale Daicel Chiralcel OD (0.46 cm  $\phi$  x 25 cm) (0.5 mL/min, n-esano/ iPrOH = 88:12) ha permesso di separare i 2 enantiomeri con i seguenti tempi di ritenzione **7a** ( $R_t$  = 28.3 min); **7b** ( $R_t$  = 31.8 min).

**(8)**: ad una soluzione di **20** (40 mg, 0.3 mmol) e 4-fenil stirene (90 mg, 0.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) precedentemente degasato tramite procedura freeze-pump-thaw viene aggiunto il catalizzatore di Grubbs di 2<sup>a</sup> Generazione (8.5 mg, 5 %). Dopo 14 ore di riflusso la reazione viene bloccata filtrando il catalizzatore. Il solvente viene allontanato ed il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 90:10) ad ottenere il prodotto come olio incolore (33 mg, 43 %).  $R_f = 0.20$  (cicloesano/etil acetato, 80:20). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta = 2.45$  (s, 3 H), 2.56-2.67 (m, 1 H), 2.71-2.79 (m, 1 H), 3.28 (dd,  $J = 2.7$  Hz,  $J = 5.7$  Hz, 1 H), 3.48-3.55 (m, 1 H), 3.59 (dd,  $J = 5.1$ ,  $J = 5.7$  Hz, 1 H), 6.26 (dt,  $J = 7.2$ ,  $J = 15.6$  Hz, 1 H), 6.54 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1 H), 7.29-7.68 (m, 9 H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24 °C):  $\delta = 21.9, 31.8, 48.6, 51.1, 125.1, 126.5, 126.8, 127.2, 127.3, 128.7, 132.3, 135.8, 140.2, 140.6, 173.2$  ppm. IR (film):  $\tilde{\nu} = 2920, 2850, 1750$  cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 11.1$  min,  $m/z$ : 310 [M + H]<sup>+</sup>, 327 [M + H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 619 [2M + H]<sup>+</sup>, 641 [2M + Na]<sup>+</sup>. HRMS (EI):  $m/z$  [M]<sup>+</sup> calcolata per C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NOS : 309.1187, trovata: 309.1186.

HPLC semi-preparativa su colonna chirale Daicel Chiralcel OD (0.46 cm  $\phi$  x 25 cm) (0.5 mL/min, n-esano/iPrOH = 58:42) ha permesso di separare i 2 enantiomeri con i seguenti tempi di ritenzione: **8a** ( $R_t = 15.9$  min); **8b** ( $R_t = 19.0$  min).

**(22)**: Il prodotto **22** è già noto.<sup>28</sup> È stato sintetizzato una procedura modificata: ad una soluzione di diisopropilammina (847  $\mu$ L, 6.00 mmol) in THF (30 mL) viene aggiunto goccia a goccia n-BuLi (6.50 mmol, 1.6 M in esano) a 0 °C. La reazione viene mantenuta sotto agitazione per 15 min. a t.a. e dopo viene portata a -60 °C e viene aggiunta una soluzione di metil 4-pentenoate (5.00 mmol, 631  $\mu$ L) in THF (2 mL). Dopo 5 minuti a -60 °C viene fatta gorgogliare formaldeide gassosa in per 10 min. La formaldeide gassosa viene preparata scaldando la paraformaldeide fino a sublimazione. La miscela gialla viene portata a t.a. e monitorata con TLC fino a conversione. la reazione viene spenta con una soluzione acquosa di NH<sub>4</sub>Cl ed estratta con etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-chromatografia (cicloesano/etil acetato, 90:10) ad ottenere il prodotto come olio giallo (260 mg, 42 %).  $R_f = 0.45$  (cicloesano/etil acetato, 80:20). Gli spettri NMR risultano in accordo con quelli riportati in letteratura.

**(23)**: ad una soluzione di esametildisililammina (417  $\mu$ L, 2.00 mmol) in THF (2 mL) viene aggiunto goccia a goccia n-BuLi (2.20 mmol, 1.6 M in esano) a 0 °C. La reazione viene mantenuta sotto agitazione per 30 min. a t.a. la miscela viene aggiunta goccia a goccia via cannula ad una sospensione di di BnONH<sub>2</sub> HCl (64 mg, 0.40 mmol) in THF (5 mL) a -78 °C. Finalmente, una soluzione del composto **22** (50 mg, 0.35 mmol) in THF (2 mL) viene gocciolata alla miscela a -78 °C. La reazione viene monitorata con TLC fino a conversione e viene spenta con una soluzione acquosa di NH<sub>4</sub>Cl ed estratta con etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 50:50) ad ottenere il prodotto come olio giallo.  $R_f =$  (cicloesano/etil acetato, 20:80).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta$  = 2.11-2.37 (m, 3 H), 3.62 (dd,  $J$  = 7.5,  $J$  = 21.3 Hz, 2 H), 4.91 (AB,  $J$  = 11.1 Hz, 2 H), 5.01-5.10 (m, 2 H), 5.61-5.75 (m, 1 H), 7.35-7.41 (m, 5 H) 9.44 (brs, 1 H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24 °C):  $\delta$  = 32.6, 45.6, 62.9, 78.2, 117.2, 128.5, 128.7, 129.2, 134.8, 135.2, 172.3 ppm. IR (film):  $\tilde{\nu}$  = 3433, 3200, 1655, 1640, 1490 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 3.38 min,  $m/z$ : 236 [M + H]<sup>+</sup>, 258 [M + Na]<sup>+</sup>, 493 [2M + Na]<sup>+</sup>.

**(24)**: ad una soluzione di **22** (40 mg, 0.17 mmol) in THF (10 mL) viene aggiunta PPh<sub>3</sub> (50 mg, 0.19 mmol) e dopo DIAD (37  $\mu$ L, 0.19 mmol). La reazione viene mantenuta sotto agitazione a t.a. monitorata con TLC. Dopo 4.5 h la miscela viene concentrata ed il grezzo viene purificato per flash-chromatografia (cicloesano/etil acetato, 90:10) ad ottenere il prodotto come olio giallo (36 mg, 96 %).  $R_f$  = 0.60 (cicloesano/etil acetato, 70:30).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta$  = 2.18-2.30 (m, 1 H), 2.41-2.50 (m, 1 H), 2.91-2.98 (m, 2 H), 3.35 (dd,  $J$  = 4.8,  $J$  = 5.1 Hz, 1 H), 4.95 (s, 2H), 5.00-5.07 (m, 2H), 5.65-5.79 (m, 1H), 7.36-7.45 (m, 5H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24 °C):  $\delta$  = 32.3, 44.1, 50.6, 77.7, 117.3, 128.6, 128.9, 129.2, 133.8, 135.2, 166.0 ppm. IR (film):  $\tilde{\nu}$  = 1772, 1636, 1451 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 7.76 min,  $m/z$ : 218 [M + H]<sup>+</sup>, 240 [M + Na]<sup>+</sup>, 457 [2M + Na]<sup>+</sup>.

**(25)**: ad una soluzione di **24** (26 mg, 0.12 mmol) e N-fenilpent-4-enamide (52 mg, 0.30 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.8 mL) precedentemente degasato tramite procedura freeze-pump-thaw viene aggiunto il catalizzatore di Grubbs 2<sup>a</sup> Generazione (5 mg, 5 mol %). La reazione viene seguita tramite TLC. Dopo 20 ore di riflusso la reazione viene bloccata filtrando il catalizzatore. Il solvente viene allontanato ed il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato 80:20) ad ottenere il prodotto come olio incolore (20 mg, 44 %).  $R_f$  = 0.30 (cicloesano/etil acetato, 70:30).

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta$  = 2.45-2.59 (m, 6H), 3.14-3.32 (m, 2 H), 3.45-3.60 (m, 1 H), 3.48 (m, 1 H), 4.97 (s, 2 H), 5.56-5.81 (m, 2 H), 7.14-7.68 (m, 10 H), 8.4 (brs, 1 H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24 °C):  $\delta$  28.4, 31.3, 37.7, 44.4, 50.7, 77.7, 119.8, 124.1, 126.7, 128.6, 128.9, 129.0, 129.1, 131.7, 135.1, 138.0, 166.3, 170.7 ppm. IR (film):  $\tilde{\nu}$  = 3327, 1763, 1683 cm<sup>-1</sup>. HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 8.57 min,  $m/z$ : 365 [M + H]<sup>+</sup>.

**(5)**: ad una soluzione di **25** (30.0 mg, 0.08 mmol) in THF-MeOH (2 mL/0.5 mL) viene aggiunto palladio su carbone (10 %) (3.0 mg, 20 %) e la miscela viene mantenuta sotto agitazione sotto pressione di H<sub>2</sub> (1 bar). La reazione viene seguita tramite TLC. Dopo conversione la miscela viene filtrata e concentrata. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 70:30) ad ottenere il prodotto come sciroppo incolore (22 mg, resa quantitativa).  $R_f$  = 0.40 (cicloesano/etil acetato, 50:50).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, d<sub>6</sub>-acetone, 22 °C):  $\delta$  = 1.27-1.72 (m, 8H), 2.35 (t, 2H,  $J$  = 7.5 Hz), 2.83-2.88 (m, 1H), 3.17 (dd, 1 H,  $J$  = 2.4 Hz,  $J$  = 4.5 Hz), 3.58 (dd, 1H,  $J$  = 4.5 Hz,  $J$  = 5.1 Hz), 6.98-7.04 (m, 1H), 7.23-7.29 (m, 2H), 7.63-7.66 (m, 2H), 9.02 (brs, 1H), 9.09 (brs, 1H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, d<sub>6</sub>-acetone, 24 °C):  $\delta$

26.0, 27.5, 27.7, 29.7, 37.5, 45.6, 52.6, 119.9, 123.8, 129.4, 140.5, 167.4, 171.9 ppm. IR (film):  $\tilde{\nu}$  = 3450, 1740, 1710, 1660  $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 4.8 min,  $m/z$ : 277 [M + H]<sup>+</sup>, 575 [2M + Na]<sup>+</sup>. HRMS (EI):  $m/z$  [M]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : 276.1474, found: 276.1474.

HPLC semi-preparativa su colonna chirale Daicel ChiralpaK IC (0.46 cm  $\phi$  x 25 cm) (0.6 mL/min, n-esano/ iPrOH = 70:30) ha permesso di separare i 2 enantiomeri con i seguenti tempi di ritenzione: **5a** ( $R_t$  = 20.5 min); **5b** ( $R_t$  = 21.4 min).

**(26)**: ad una soluzione di **20** (60 mg, 0.42 mmol) e N-fenilpent-4-enammide (182 mg, 1.04 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) precedentemente degasato tramite procedura freeze-pump-thaw viene aggiunto il catalizzatore di Grubbs 2<sup>a</sup> Generazione (18 mg, 5 mol %). La reazione viene seguita tramite TLC. Dopo 20 ore di riflusso la reazione viene bloccata filtrando il catalizzatore. Il solvente viene allontanato ed il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 75:25) ad ottenere il prodotto come olio incolore (58 mg, 47 %).  $R_f$  = 0.30 (cicloesano/etil acetato, 60:40).

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 22 °C):  $\delta$  = 2.26-2.60 (m, 7 H), 2.82 (brs, 1 H), 3.60 (s, 3 H), 3.59-3.81 (m, 2 H), 5.38-5.61 (m, 2 H), 6.98-7.06 (m, 1 H), 7.23-7.31 (m, 2 H), 7.62-7.67 (m, 2 H), 9.07 (brs, 1 H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, d<sub>6</sub>-acetone, 24 °C):  $\delta$  = 30.6, 32.2, 37.6, 49.3, 51.5, 63.1, 120.0, 123.9, 128.5, 129.4, 132.1, 140.4, 171.2, 174.9 ppm. IR (film):  $\tilde{\nu}$  = 3317, 1735, 1718  $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 5.3 min,  $m/z$ : 292 [M + H]<sup>+</sup>, 314 [M + Na]<sup>+</sup>.

**(27)**: n-BuLi (0.75 mmol, 1.6 M in esano) viene aggiunto goccia goccia ad una soluzione di LiHMDSA (140  $\mu$ L, 0.67 mmol) in THF (1 mL) a 0 °C. La reazione viene mantenuta a t.a. sotto agitazione per 30 min. La miscela viene poi gocciolata via cannula ad una sospensione di acid (2-ammino-fenil)-carbammico benzil estere (24 mg, 0.10 mmol) in THF (0.8 mL) a -78 °C. Finalmente, alla miscela viene gocciolata ad una soluzione di **26** (28 mg, 0.10 mmol) in THF (1.5 mL) a -78 °C. La miscela viene portata a t.a. e monitorata tramite TLC. Dopo conversione la reazione viene spenta con una soluzione acquosa di NH<sub>4</sub>Cl ed estratta con etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 50:50) ad ottenere il prodotto come olio giallo (104 mg, 67 %).  $R_f$  = 0.35 (cicloesano/etil acetato, 30:70).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 22 °C):  $\delta$  = 2.24-2.80 (m, 7 H), 3.70-3.90 (m, 3 H), 5.21 (s, 2 H), 5.38-5.60 (m, 2 H), 7.0-7.60 (m, 17 H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24 °C):  $\delta$  = 28.1, 32.0, 37.0, 49.0, 63.4, 67.3, 119.7, 124.2, 125.5, 126.7, 127.9, 128.3, 128.6, 128.9, 130.9, 131.6, 137.8, 154.7, 170.9, 173.8. ppm. IR (film):  $\tilde{\nu}$  = 3317, 1735, 1718, 1654  $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 8.5 min,  $m/z$ : 502 [M + H]<sup>+</sup>, 524 [M + Na]<sup>+</sup>.

**(28)**: ad una soluzione di **27** (100 mg, 0.20 mmol) in THF (11 mL) viene aggiunta PPh<sub>3</sub> (58 mg, 0.22 mmol) e dopo DIAD (43  $\mu$ L, 0.22 mmol). La miscela viene portata a t.a. e monitorata tramite TLC. Dopo conversione la reazione viene concentrata. Il grezzo viene purificato per flash-chromatografia

(cicloesano/etil acetato, 50:50) ad ottenere il prodotto come olio giallo (75 mg, 77 %).  $R_f = 0.70$  (cicloesano/etil acetato, 30:70).

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = 2.12\text{-}2.56$  (m, 6 H), 3.50 (d, 2 H,  $J = 6.6$  Hz), 3.78 (m, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.42-5.75 (m, 2H), 6.81-6.87 (m, 1H), 7.01-7.68 (m, 13H), 7.85-7.94 (m, 1H), 9.48 (brs, 1H) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24 °C):  $\delta = 28.0, 30.8, 37.1, 44.1, 45.6, 66.7, 118.2, 119.6, 123.6, 123.9, 124.1, 125.4, 125.9, 128.0, 128.4, 128.8, 129.3, 129.4, 132.7, 136.2, 138.2, 150.9, 154.4, 167.9, 170.5$  ppm. IR (film):  $\tilde{\nu} = 3322, 1730, 1716, 1684, 1600$   $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t = 10.6$  min,  $m/z$ : 484  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 506  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

**(6)**: ad una soluzione di **28** (63 mg, 0.13 mmol) in THF-MeOH (1.5 mL/1 mL) viene aggiunto palladio su carbone (10 %) (14 mg, 20 %) e la reazione viene mantenuta sotto pressione di  $\text{H}_2$  (1 bar). La reazione viene monitorata tramite TLC e dopo conversione viene filtrata e concentrata ad ottenere il prodotto come sciroppo incolore (45 mg, resa quantitativa).  $R_f = 0.48$  (cicloesano/etil acetato, 30:70).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = 1.43\text{-}1.93$  (m, 8H), 2.37 (t, 2 H,  $J = 7.5$  Hz), 3.25 (m, 1H), 3.38 (dd, 1H,  $J = 2.7$  Hz,  $J = 5.7$  Hz), 3.78 (dd, 1H,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 5.7$  Hz), 4.81(brs, 2H), 6.69-6.74 (m, 2H), 6.81-6.84 (m, 1H), 6.98-7.04 (m, 1H), 7.07-7.12 (m, 1H), 7.29-7.34 (m, 2 H), 7.37 (brs, 1 H), 7.51-7.54 (m, 2H) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24 °C):  $\delta = 25.2, 26.5, 28.6, 28.8, 37.4, 45.5, 46.4, 117.5, 118.0, 119.0, 119.7, 124.1, 125.4, 126.5, 128.9, 138.0, 139.2, 167.6, 171.2$  ppm. IR (film):  $\tilde{\nu} = 3450, 3300, 1710, 1696, 1663$   $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t = 8.2$  min,  $m/z$ : 352  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 374  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 725  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$  calcolata per  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$  : 351.1947, trovata: 351.1945.

**(30)**: ad una soluzione di potassio tiotosilato (113 mg, 0.5 mmol) in DMF (2 mL) viene aggiunto 4-fenilbenzil cloruro (101 mg, 05 mmol). Dopo 48 ore la reazione viene spenta con HCl 0.1 M ed estratta con etil etere, le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 90:10) ad ottenere il prodotto come sciroppo incolore (150 mg, 85 %).  $R_f = 0.40$  (cicloesano/etil acetato, 90:10).

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta = 2.44$  (s, 3 H), 4.34 (s, 2 H), 7.28-7.79 (m, 13 H) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24 °C):  $\delta = 21.6, 40.0, 126.9, 127.4, 127.5, 127.6, 128.8, 129.5, 129.7, 132.7, 140.3, 140.9, 142.1, 144.6$  ppm. IR (film):  $\tilde{\nu} = 3060, 3036, 1604, 1484, 1333, 1130$   $\text{cm}^{-1}$ .

**(9)**: ad una soluzione di azetidina-2-one (14 mg, 0.2 mmol) in THF (5 mL) viene aggiunta LiHMDSA (0.22 mmol, 1M in THF) a -78 °C seguita da *S*-[(4-fenil)-benzil] 4-metilbenzenesolfonato (90 mg, 0.25 mmol). La reazione viene portata a t-a- e dopo 2 ore, viene spenta con una soluzione acquosa di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 0 °C ed estratta con etil etere. Le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 80:20) ad ottenere il prodotto come olio giallo (45 mg, 84 % yield).  $R_f = 0.44$  (cicloesano/etil acetato, 80:20).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C):  $\delta$  = 2.87-2.95 (m, 4 H), 3.94-3.99 (m, 2 H), 7.28-7.56 (m, 9 H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24 °C):  $\delta$  = 38.6, 42.5, 44.3, 126.9, 127.3, 127.4, 128.8, 129.7, 135.1, 140.3, 140.5, 170.9 ppm. IR (film):  $\tilde{\nu}$  = 3050, 3000, 1757  $\text{cm}^{-1}$ . HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 9.5 min,  $m/z$ : 270  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 287  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ , 292  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 561  $[\text{2M} + \text{Na}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$  calcolata per  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NOS}$  : 269.0874, trovata: 269.0873.

**(31)**: il composto è stato preparato seguendo una procedura riportata in letteratura.<sup>25</sup>

Al 3-(2-tert-butildimetilsilossil)-4-acetosi-azetidina-2-one (300 mg, 1.1 mmol) in acqua (3 mL) viene aggiunto sodio fenil solfonato (189 mg, 1.15 mmol). La reazione viene portata a riflusso e dopo 20 min. viene estratta con diclorometano. Le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate, ad ottenere il prodotto come solido bianco (400 mg, resa quantitativa).

$[\alpha]_D^{25}$  = -16 ( $c$  = 1.1,  $\text{CHCl}_3$ ),  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.01 (s, 3 H), 0.04 (s, 3 H), 0.82 (s, 9 H), 1.10 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3 H), 3.42 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1 H), 4.25 (dq,  $J_1$  = 2.2 Hz,  $J_2$  = 6.2 Hz, 1 H), 4.80 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1 H), 6.61 (br s, 1 H), 7.57-7.76 (m, 3 H), 7.92-7.96 (m, 2 H).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = -5.3, -4.5, 17.8, 22.2, 25.6, 63.0, 63.4, 66.7, 129.3, 129.6, 134.7, 135.3, 166.2 ppm. IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\tilde{\nu}$  = 3166, 2954, 2921, 2848, 1781, 1446, 1262, 1148, 727  $\text{cm}^{-1}$ .

**(32)**: ad una soluzione di **31** (1.9 g, 5.14 mmol) in THF (40 mL) viene gocciolato a -78 °C 4-pentenil magnesio bromuro, preparato al momento da Mg (300 mg, 12.3 mmol) e 4-pentenil bromuro (2.3 g, 15.4 mmol) in THF (12 mL). La miscela viene mantenuta sotto agitazione a 0 °C for 5 ore e dopo viene spenta con una soluzione acquosa di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ed estratta con etil etere. Le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 80:20) ad ottenere il prodotto come olio incolore (671 mg, 45%).

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.07 (s, 6 H), 0.88 (s, 9 H), 1.24 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3 H), 1.36-1.71 (m, 4 H), 2.05-2.16 (m, 2 H), 2.72 (ddd,  $J_1$  = 1.2 Hz,  $J_2$  = 2.2 Hz,  $J_3$  = 5.2 Hz, 1 H), 3.63 (dt,  $J_1$  = 2.2 Hz,  $J_2$  = 6.6 Hz, 1 H), 4.16 (dq,  $J_1$  = 5.2 Hz,  $J_2$  = 6.2 Hz, 1 H), 4.96-5.07 (m, 2 H), 5.68-5.90 (m, 1 H), 6.00 (br s, 1H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = -5.0, -4.3, 17.9, 22.7, 25.7, 25.8, 33.5, 34.5, 51.2, 64.3, 65.6, 115.0, 138.0, 169.0 ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t$  = 12.70 min,  $m/z$ : 298.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 320.1  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 595.5  $[\text{2M} + \text{H}]^+$ , 617.3  $[\text{2M} + \text{Na}]^+$ . IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\tilde{\nu}$  = 3161, 2922, 1756, 1704, 1586  $\text{cm}^{-1}$ .

**(33)**: ad una soluzione di **32** (470 mg, 1.57 mmol) in DMF (10 mL) vengono aggiunti  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.657 mL, 4.72 mmol) e TBDMSCl (283 mg, 1.9 mmol) a 0 °C e la miscela viene mantenuta sotto agitazione a t.a. tutta la notte. La reazione viene spenta con una soluzione acquosa di  $\text{NaHCO}_3$ , le fasi acquose vengono estratte con  $\text{Et}_2\text{O}$ , le fasi organiche vengono lavate con  $\text{H}_2\text{O}$  e brine, seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 90:10) ad ottenere il prodotto come olio incolore (600 mg, 95%).

$[\alpha]_D^{25} = -41$  ( $c = 1.3$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.06$  (s, 3 H), 0.08 (s, 3 H), 0.21 (s, 3 H), 0.23 (s, 3 H), 0.89 (s, 9 H), 0.96 (s, 9 H), 1.22 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H), 1.36-1.51 (m, 3 H), 1.76-1.90 (m, 1 H), 2.04-2.14 (m, 2 H), 2.71 (dd,  $J_1 = 2.6$  Hz,  $J_2 = 5.8$  Hz, 1 H), 3.46-3.53 (m, 1 H), 4.10 (quintet,  $J = 6.2$  Hz, 1 H), 4.90-5.07 (m, 2 H), 5.68-5.90 (m, 1 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -5.8$ , -5.1, -4.6, -4.4, 17.9, 18.2, 23.0, 25.3, 25.9, 26.3, 33.7, 35.4, 52.8, 64.6, 66.2, 114.9, 138.1, 173.5 ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 9.9$  min,  $m/z$ : 412  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\tilde{\nu} = 2928, 2860, 1740, 1642, 1471, 1258$   $\text{cm}^{-1}$ .

**(34)** : una soluzione di **33** (301 mg, 2 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL) viene portata a  $-78$  °C e trattata con un flusso di  $\text{O}_3$  fino a conversione totale. La miscela viene trattata con un flusso di  $\text{O}_2$  per irrimuovere l'eccesso di  $\text{O}_3$ . successivamente viene aggiunto  $\text{Me}_2\text{S}$  (3 mL) e la miscela viene portata a t.a., lasciata sotto agitazione tutta la notte e concentrata. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 80:20) ad ottenere il prodotto come olio giallo (117 mg, 40%).

$[\alpha]_D^{25} = -42$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.05$  (s, 3 H), 0.08 (s, 3 H), 0.20 (s, 3H), 0.22 (s, 3 H), 0.88 (s, 9 H), 0.94 (s, 9 H), 1.23 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H), 1.38-1.90 (m, 4 H), 2.50 (dt,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 2 H), 2.75 (dd,  $J_1 = 2.6$  Hz,  $J_2 = 6.2$  Hz, 1 H), 3.50 (dt,  $J_1 = 2.6$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz, 1 H), 4.10 (dq,  $J_1 = 5.6$  Hz,  $J_2 = 6.2$  Hz, 1 H), 9.78 (t,  $J = 1.0$  Hz, 1 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -5.9$ , -5.1, -4.6, -4.4, 17.9, 18.1, 18.6, 23.0, 25.8, 26.2, 35.3, 43.6, 52.7, 64.7, 66.4, 173.1, 198.0 ppm. GC-MS:  $R_t = 22.3$  min,  $m/z$ : 284 (2), 242 (90), 224 (50), 75 (100). IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\tilde{\nu} = 2954, 2926, 2855, 1742, 1475, 1258$   $\text{cm}^{-1}$ .

**(11)**: ad una soluzione di disproso triflato (3.3 mg, 2% mol) in  $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$  (0.5 mL) vengono aggiunti indolo (63 mg, 0.54 mmol) e l'aldeide **34** (113 mg, 0.27 mmol). La miscela viene lasciata sotto agitazione a t.a. tutta la notte, dopo viene estratta con  $\text{Et}_2\text{O}$  e concentrata. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 70:30) ad ottenere il prodotto come olio marrone (100 mg, 59%).

$[\alpha]_D^{25} = -29$  ( $c = 0.9$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -0.01$  (s, 3 H), 0.03 (s, 3 H), 0.14 (s, 3 H), 0.18 (s, 3 H), 0.84 (s, 9 H), 0.92 (s, 9 H), 1.03 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H), 1.35-1.90 (m, 4 H), 2.20-2.36 (m, 2 H), 2.60 (dd,  $J_1 = 2.6$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, 1 H), 3.42-3.52 (m, 1 H), 4.04 (dq,  $J_1 = 5.4$  Hz,  $J_2 = 6.2$  Hz, 1 H), 4.48 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1 H), 7.03 (s, 2 H), 7.03 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 7.34 (d,  $J = 7.2$  Hz), 7.58 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 7.94 (br s, 2 H) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -5.6$ , -4.8, -4.3, -4.2, 18.2, 18.4, 23.1, 25.0, 26.2, 26.6, 34.3, 36.1, 36.3, 52.7, 64.6, 66.0, 111.4, 119.3, 119.8, 119.9, 120.2, 121.6, 121.7, 122.0, 127.2, 127.3, 136.9, 174.0 ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 27.7$  min,  $m/z$ : 630  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 652  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\tilde{\nu} = 3414, 3330, 2919, 2854, 1734, 1462, 1269$ .  $\text{cm}^{-1}$ .

**(12)**: ad una soluzione di **11** (35 mg, 0.06 mmol) in THF (2 mL) viene aggiunto TBAF (1M in THF, 0.185 mL, 0.185 mmol) a 0°C. La miscela viene lasciata sotto agitazione tutta la notte a 0 °C. Dopo l'aggiunta di tampone fosfato (0.1 M, pH 6.5) a 0°C, la miscela viene estratta con EtOAc. Le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 60:40) ad ottenere il prodotto come olio giallo (17 mg, 60%).

$[\alpha]_D^{25} = -2$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.05$  (s, 3 H), 0.07 (s, 3 H), 0.87 (s, 9H), 1.14 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 1.40-1.76 (m, 4 H), 2.24-2.36 (m, 2 H), 2.67 (dd,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, 1H), 3.60 (dt,  $J_1 = 4.8$  Hz,  $J_2 = 6.6$  Hz, 1H), 4.13 (quintet,  $J = 6.6$  Hz, 1 H), 4.51 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 5.68 (br s, 1 H), 7.00-7.21 (m, 6 H), 7.37 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2 H), 7.61 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2 H), 7.98 (br s, 2 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -4.9, -4.2, 18.0, 22.7, 25.4, 25.9, 34.1, 35.3, 35.6, 51.1, 64.4, 65.5, 111.3, 119.2, 119.6, 120.0, 120.1, 121.4, 121.5, 122.0, 127.1, 127.2, 136.7, 169.0$  ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 12.83$  min,  $m/z$ : 538  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\nu = 3421, 3300, 3055, 2929, 2852, 1740, 1617, 1455, 1255$   $\text{cm}^{-1}$

**(13)**: ad una soluzione di **11** (22 mg, 0.035 mmol) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1 mL) viene aggiunto  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (8.9  $\mu\text{L}$ , 0.07 mmol) a 0 °C. La miscela viene lasciata sotto agitazione a 0 °C per 3 giorni. Dopo l'aggiunta di tampone fosfato (0.1 M, pH 6) ed etil acetato, le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 20:80) ad ottenere il prodotto come solido bianco (8 mg, 57%).

$[\alpha]_D^{25} = +12$  ( $c = 0.5$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.25$  (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H), 1.26-1.78 (m, 4 H), 2.20-2.34 (m, 2 H), 2.74-2.78 (m, 1 H), 3.56-3.64 (m, 1 H), 4.10-4.20 (m, 1 H), 4.41 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 5.81 (br s, 1 H), 6.50 (s, 1 H), 7.01-7.61 (m, 10 H), 7.86 (br s, 1 H), 8.14 (br s, 1 H).  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 25.6, 29.4, 34.1, 34.9, 36.4, 51.5, 63.8, 65.2, 111.3, 119.4, 119.8, 121.1, 121.9, 122.5, 126.5, 128.6, 135.8, 136.6, 168.4$  ppm. HPLC-MS (ESI):  $R_t = 8.0$  min,  $m/z$ : 402  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 424  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 440  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , 825  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ . IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\nu = 3346, 2921, 1736, 1703, 1458$   $\text{cm}^{-1}$ .

**(35)**: 4-pentenil magnesio bromuro, preparato al momento da Mg (0.042 g, 1.74 mmol) e 4-pentenil bromuro (0.277 g, 1.86 mmol) in THF (5 mL), viene aggiunto goccia a goccia ad una soluzione di **14** (0.131 g, 0.62 mmol) in THF (3 mL) a -78 °C. La miscela viene lasciata sotto agitazione a 0 °C per 5 ore e dopo viene spenta con una soluzione acquosa di  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . La miscela viene estratta con  $\text{Et}_2\text{O}$ , le fasi organiche vengono seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 80:20) ad ottenere il prodotto come olio incolore (91 mg, 66%). Gli spettri NMR risultano inaccordo con quelli riportati in letteratura.<sup>47</sup>

**(36)**: ad una soluzione di **35** (104 mg, 0.75 mmol) in DMF (6 mL) vengono aggiunti  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.31 mL, 2.25 mmol) e TBDMSCl (148 mg, 1 mmol) a 0 °C e la miscela viene lasciata sotto agitazione a t.a. tutta la notte. La reazione viene spenta con una soluzione acquosa di  $\text{NaHCO}_3$ , estratta con  $\text{Et}_2\text{O}$ , le fasi organiche vengono lavate con  $\text{H}_2\text{O}$  e brine, seccate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 90:10) ad ottenere il prodotto come olio incolore (138 mg, 95). Gli spettri NMR risultano inaccordo con quelli riportati in letteratura.<sup>33</sup>

---

47 Anthony G. M. Barrett, Gregory G. Graboski, Michal Sabat, and Sven J. Taylor *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4693-4702.

**(37)** : una soluzione di **36** (138 mg, 0.54 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) viene portata a -78 °C e trattata con un flusso di O<sub>3</sub> fino a completa conversione. La miscela viene trattata con un flusso di O<sub>2</sub> per rimuovere l'eccesso di O<sub>3</sub>. successivamente viene aggiunto Me<sub>2</sub>S (2.5 mL) e la miscela viene portata a t.a., lasciata sotto agitazione tutta la notte e concentrata. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 80:20) ad ottenere il prodotto come olio giallo (70 mg, 51%). Gli spettri NMR risultano inaccordo con quelli riportati in letteratura.<sup>33</sup>

**(38)**: ad una soluzione di dysprosio triflato (3.3 mg, 2% mol) in [BMIM]BF<sub>4</sub> (0.5 mL) vengono aggiunti indolo (63 mg, 0.54 mmol) e l'aldeide **37** (70 mg, 0.27 mmol). La miscela viene lasciata sotto agitazione tutta la notte a t.a., estratta con Et<sub>2</sub>O e concentrata. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 70:30) ad ottenere il prodotto come olio marrone (53 mg, 42%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.20 (s, 6 H), 0.95 (s, 9 H), 1.30-1.50 (m, 3 H), 1.80-1.95 (m, 1 H), 2.19-2.32 (m, 2 H), 2.49 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 15.0 Hz, 1 H), 3.00 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 15.0 Hz, 1 H), 3.40-3.50 (m, 1 H), 4.48 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.00-7.62 (m, 10 H), 8.02 (br s, 2 H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = -5.8, -5.3, 18.3, 24.3, 26.2, 34.1, 35.5, 36.3, 43.7, 49.4, 111.1, 119.1, 119.5, 120.0, 121.3, 121.4, 121.9, 127.0, 136.6, 170.1 ppm. HPLC-MS (ESI): *R*<sub>t</sub> = 12.3 min, *m/z*: 489 [M + H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 494 [M + Na]<sup>+</sup>, 961 [2MH<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ν̄ = 3406, 3323, 2926, 2848, 1720, 1464 cm<sup>-1</sup>.

**(10)**: ad una soluzione di **38** (53 mg, 0.11 mmol) in THF (1.5 mL) viene aggiunto TBAF (1M in THF, 0.250 mL, 0.25 mmol) a 0°C. La miscela viene lasciata sotto agitazione tutta la notte a 0 °C. Dopo l'aggiunta di tampone fosfato (0.1 M, pH 6.5) a 0 °C, le fasi acquose vengono estratte con EtOAc. le fasi organiche vengono seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrate. Il grezzo viene purificato per flash-cromatografia (cicloesano/etil acetato, 60:40) ad ottenere il prodotto come olio giallo (30 mg, 77%).

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.34-1.73 (m, 4 H), 2.18-2.23 (m, 2 H), 2.49 (d, *J* = 14.8 Hz, 1 H), 2.98 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 1.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 14.8 Hz, 1 H), 3.48-3.57 (m, 1 H), 4.48 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 5.75 (br s, 1 H), 6.98-7.62 (m, 10 H), 7.99 (br s, 2 H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 24.9, 33.9, 35.2, 35.3, 43.4, 48.1, 111.2, 119.0, 119.4, 119.8, 121.4, 121.8, 126.9, 136.6, 168.2 ppm. HPLC-MS (ESI): *R*<sub>t</sub> = 8.0 min, *m/z*: 380 [M+Na]<sup>+</sup>, 737 [2M+Na]<sup>+</sup>. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ν̄ = 3406, 2927, 2855, 1736, 1592, 1459 cm<sup>-1</sup>.

## Generale sulla strumentazione utilizzata

Le reazioni sono state condotte in ambiente anidro, sotto atmosfera inerte di azoto. I solventi sono stati distillati e conservati su setacci molecolari (MS 4 Å). La trietilammina (TEA) è stata distillata su KOH. Il 3-[1-(*t*-butildimetilsilossi)etil]-4-acetossiazetidina-2-one, disponibile commercialmente, è stato purificato per cristallizzazione da pentano. Se non specificato tutti i prodotti sono stati acquistati ed utilizzati senza ulteriori purificazioni. Le cromatografie su strato sottile (TLC) sono state effettuate su fogli di gel di silice pronti per l'uso Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merk, mentre i composti sono stati purificati per flash-cromatografia su gel di silice Merk 230-400 mesh. Gli spettri <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR sono stati registrati su strumenti INOVA 400, Varian INOVA 300 o GEMINI 200 con un probe di 5 mm. I chemical shifts  $\delta$  sono dati rispetto ai segnali dei solventi deuterati in ppm e le costanti di accoppiamento  $J$  in Hz. Gli spettri IR sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Nicolet 210 FT, in film di sostanza pura tra pasticche di NaCl registrando le frequenze in cm<sup>-1</sup>. I punti di fusione sono stati determinati tramite lo strumento Büchi B-540. I valori di potere ottico rotatorio  $[\alpha]_D^{25}$  sono stati determinati con un polarimetro Perkin Elmer 343. Per l'analisi HPLC-MS è stato utilizzato lo strumento Agilent Technologies HP1100, con colonna ZOBRA-X-Eclipse XDB-C8 Agilent Technologies, fase mobile H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN con gradiente da 30% a 80% di CH<sub>3</sub>CN in 8 min, 80% di CH<sub>3</sub>CN fino a 25 min, flusso 0.4 mL/min accoppiato ad uno spettrometro di massa a singolo-quadrupolo Agilent Technologies MSD1100, full-scan mode da 50  $m/z$  a 2600  $m/z$ , tempo di scansione 0.1 s in modalità ioni positivi, ionizzazione ESI spray con potenziale di 4500 V, flusso di gas di azoto con pressione di 35 psi e flusso di 11.5 mL/min, potenziale di frammentazione di 20 V. Le analisi elementari sono state eseguite su strumento Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O Analyzer. Per l'analisi gas-cromatografica combinata alla spettrometria di massa è stato usato un gas-cromatografo Agilent Technologies, con colonna HP5 5% Ph-Me Silicon, collegato ad uno spettrometro di massa Agilent Technologies MSD1100 a singolo-quadrupolo, ionizzazione EI con potenziale di 70 eV, gradiente di temperatura da 50 °C a 280 °C in 30 min.

# *Indice*

## *Capitolo I Introduzione*

*I.I I  $\beta$ -lattami: antibiotici ed inibitori enzimatici* 1

*I.II Una nuova famiglia di nomobattami: i 4-alchiliden- $\beta$ -lattami.  
Sintesi ed attività biologica* 7

## *Capitolo II I 4-alchiliden- $\beta$ -lattami come sintoni: sintesi dell'Epitienamicina*

*II.I La Tienamicina* 20

*II.II Epitienamicina: sintesi.* 24

## *Capitolo III I 4-alchiliden- $\beta$ -lattami come sintoni: reazione di alodecarbossilazione* 34

*III.I Alodecarbossilazione del substrato acido carbossilico 4-alchiliden-azetidionico.* 38

## *Capitolo IV I 4-alchiliden- $\beta$ -lattami come sintoni: sintesi di $\beta$ -ammino acidi*

*IV.I I  $\beta$ -lattami: versatili building blocks per derivati non  $\beta$ -lattamici* 56

*IV.II I  $\beta$ -ammino acidi* 57

*IV.III La catalisi enzimatica: le Lipasi* 61

*IV.IV Apertura di  $\beta$ -lattami catalizzata da lipasi* 62

## *Capitolo V Azetidiononi: una nuova classe di inibitori HDACs*

*V.I Gli Istoni Deacetilasi (HDACs)* 68

*V.II I  $\beta$ -lattami come inibitori di HDAC* 74