



Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica

Tesi di Laurea Triennale

Sintesi della 7-idrossilentiginosina funzionalizzata
con un versatile linker ammino-isocianato per la
coniugazione con sonde molecolari

Synthesis of 7-hydroxylentiginosine decorated
with a versatile amino-isocyanate linker
for its conjugation with molecular markers

Laureando:

Gherardo Cerretelli

Relatore:

Prof. Franca Maria Cordero

Correlatore:

Prof. Alberto Brandi

Alla mamme e al babbo per l'amore e tutta la
pazienza dimostratimi in questi anni

Introduzione:

Tra gli alcaloidi, una classe degna di nota è quella degli azaeterocicli poliossidrilati, composti organici naturali presenti nelle piante o nei batteri, i quali manifestano un'attività biologica di vasto interesse scientifico e farmacologico.¹ Questi alcaloidi constano di uno scheletro pirrolinico (**a**), pirrolidinico (**b**), piperidinico (**c**), pirrolizidinico (**d**), indolizidinico (**e**) o *nortropanico* (**f**) (Figura 1) differentemente ossidrilato.²

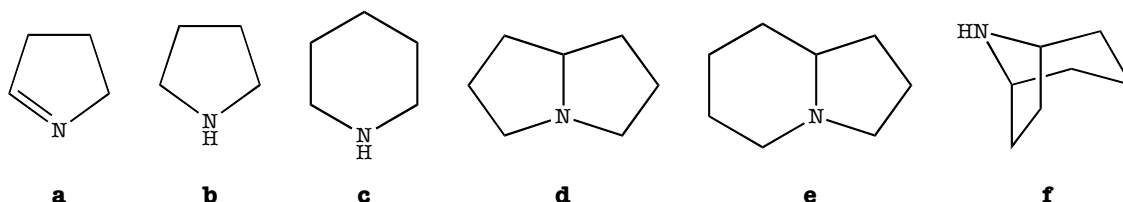


Figura 1

In figura 2 sono riportati alcuni di questi alcaloidi, a titolo di esempio, per ogni scheletro carbonioso.

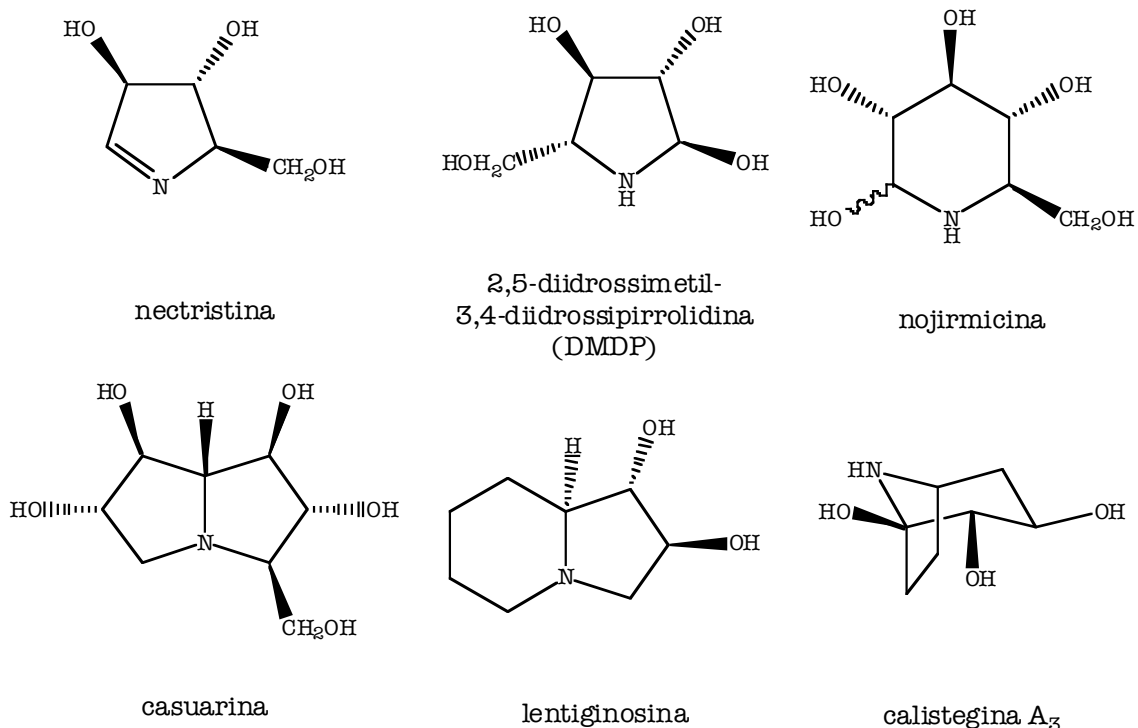


Figura 2

¹ Horne, G.; Wilson, F.X.; Tinsley, J.; Willims, D.H.; Storer, R. *Drug Discovery Today* **2011**, 16, 107

² Asano, N.; Nash, R.J.; Molyneux R.J.; Fleet, G.W.J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 1645

È evidente la stretta correlazione che sussiste tra gli zuccheri e questi composti, nei quali un atomo di azoto sostituisce l'ossigeno furanosidico o piranosidico; è per tale ragione che sono anche definiti imminozuccheri.³ Derivante da questa somiglianza strutturale è il loro ruolo biologico di zucchero-mimetici,⁴ da cui è sorta la crescente attenzione mostrata dai ricercatori per impiegarli come potenti inibitori, competitivi e reversibili, degli enzimi che operano su substrati esosi, pentosi, o polisaccaridici *in generis*.⁵ Tali alcaloidi esplicano un'attività inibitoria nei confronti di una particolare famiglia di enzimi, quella delle glicosidasi, la quale è preposta a degradare, modificare o formare legami glicosidici. Per cogliere appieno l'importanza di questi alcaloidi è opportuno illustrare alcuni processi biologici nei quali sono coinvolti i monosaccaridi di cui, questi alcaloidi, sono mimetici.⁶ Le glicosidasi sono enzimi ubiquitari all'interno di tutti i domini della vita ed esplicano le loro funzionalità nella degradazione di polisaccaridi, nella digestione dei disaccaridi, nel catabolismo lisosomiale dei glicoconiugati e nella glicosilazione delle proteine di membrana; quest'ultima svolge un ruolo cruciale nel raffinato processo di trasmissione delle informazioni e nel riconoscimento self-non self.^{7,8} La glicosilazione è una modificazione post- e co-traduzionale delle proteine nel corso della quale vengono formati legami O-glicosidici ed N-glicosidici tra l'unità saccaridica e specifici residui amminoacidici. Tali catene polisaccaridiche sono in grado, durante il processo di folding, di assistere e indirizzare il corretto ripiegamento della struttura peptidica. Il processo di addizione di saccaridi alle diverse molecole presenti in ogni sistema biologico offre la possibilità di esplicitare le numerose funzioni sopracitate con elevata specificità in virtù dell'abbondanza di possibili variabili quali lunghezza della catena, tipologia di monosaccaridi presenti, differenza di legami che li unisce e possibilità di ramificazioni lungo la struttura.⁹ I carboidrati rivestono quindi un ruolo imprescindibile nei processi biologici, sono infatti numerose le malattie derivanti da un'alterazione del loro metabolismo, anabolismo o catabolismo. Alla luce di ciò appare evidente l'importanza dello studio degli imminozuccheri come potenziali agenti terapeutici nel trattamento di svariate patologie come le metastasi tumorali, le infezioni virali, le tipologie di diabete e disturbi generici.

³ Merino, P.; Delso, I.; Marca, E.; Tejero, T.; Matute, R. *Curr. Chem. Biol.* **2009**, *3*, 253

⁴ Asano, N. *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R

⁵ D'Alonzo, D.; Guaragna, A.; Palumbo, G. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 473

⁶ Rudd, P. M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I.A.; Dwek, R. A. *Science* **2001**, *291*, 2370

⁷ Cipolla L.; La Ferla B.; Gregori M. *Comb. Chem. High T. Scr.* **2006**, *9*: 571

⁸ Asano, N. *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R

⁹ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell 4th ed.*; Garland Science, **2002**

Particolare attenzione è stata rivolta agli alcaloidi naturali poliossidrilati aventi una struttura inolizidinica come la (+)-lentiginosina (**1**), la (-)-swainsonina (**2**) e la (+)-castanospermina (**3**) (Figura 3).

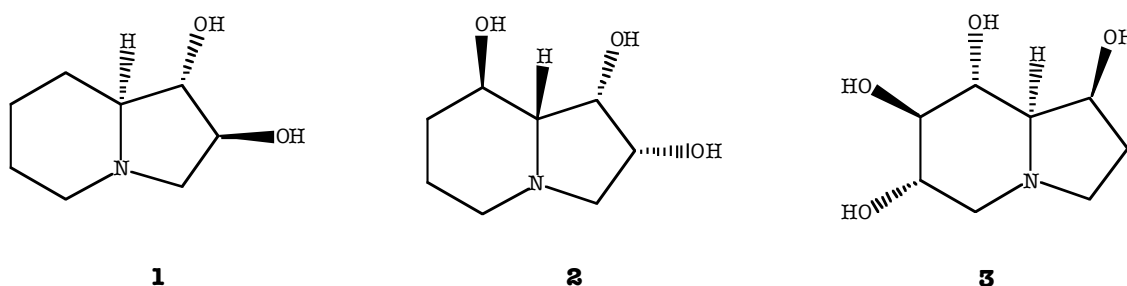


Figura 3

La (-)-swainsonina (**2**),¹⁰ un alcaloide naturale isolato per la prima volta nel 1973 dal fungo *Rhizoctonia leguminicola*, è un immunomodulatore, un potenziale farmaco chemioterapico ed anche un potente inibitore della Golgi- α -mannosidasi II, un enzima fondamentale coinvolto nel processo di N-glicosilazione. La (+)-castanospermina (**3**), un altro alcaloide naturale a struttura indolizidinica, inizialmente isolata dai semi del *Castanospermum australe*,¹¹ presenta un'attività biologica nel trattamento d'infezioni virali, diabete ed inibisce la tendenza delle cellule tumorali a migrare ed invadere i tessuti sani impedendo loro di legarsi alla matrice extracellulare; il Celgosivir, il 6-butanoil derivato della castanospermina è già presente sul mercato come farmaco contro il disturbo di Gaucher.¹²

La (+)-lentiginosina [(1*S*,2*S*,8*aS*)-ottaidroindolizidin-1,2-diolo] (**1**) fu estratta per la prima volta dalle foglie dell'*Astragalus lentiginosus* e caratterizzata da Pastuszak et al. nel 1990;¹³ essa è il composto meno idrossilato della serie ed il più recente ad essere studiato. L'attività biologica della lentiginosina si differenzia tra i due enantiomeri, quello di origine naturale (**1**) e quello d'origine sintetica [(1*R*,2*R*,8*aR*)-ottaidroindolizidin-1,2-diolo] (**4**). Studi enzimatici intrapresi sulla (+)-lentiginosina (**1**) hanno evidenziato un'attività inibitoria nei confronti delle amiloglicosidasi,¹⁴ a livelli comparabili a quelli della (+)-castanospermina (**3**) ed anche una maggiore selettività.¹⁵ Oltre a ciò, in un recente studio condotto presso il Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Firenze e in collaborazione con la Prof.ssa Nunziatina de

¹⁰ Colegate, S. M.; Dorling, P. R.; Huxtable, C. R. *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 2257

¹¹ Hohenschutz, L. D.; Bell, E. A.; Jewess, P. J.; Leworthy, D. P.; Pryce, R. J.; Arnold, E.; Clardy, J. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 811

¹² Sorbera, L.A.; Castaner, J.; Garcia-Capdevila, L. *Drugs of the Future* **2005**, *30*, 545

¹³ Pastuszak, I.; Molyneux, R. J.; James, L. F.; Elbein, A. D. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1886

¹⁴ Cardona, F.; Goti, A.; Brandi, A.; *Eur J Org Chem* **2007**, *8*, 1551

¹⁵ Brandi, A.; Cicchi, S.; Cordero, F.M.; Frignoli, R.; Goti, A.; Picasso, S.; Vogel, P. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6806

Tommasi dell'Università di Salerno, è stato scoperto che la (+)-lentiginosina (**1**) ha una marcata capacità di inibire l'Hsp90 (Heat shock protein 90) e quindi la possibilità di agire come antitumorale. ¹⁶Hsp90, uno chaperone molecolare, è una delle più abbondanti proteine espresse a livello cellulare in tutte le specie ed è un membro della famiglia delle proteine da shock termico le quali sono in grado di proteggere le cellule qualora siano sottoposte ad elevate temperature. ¹⁷

Hsp90 esplica numerose funzioni in tutti i sistemi viventi che spaziano dalla trasduzione del segnale alla replicazione virale; come chaperone è particolarmente implicato nel folding, nella stabilizzazione, nell'attivazione e nella realizzazione della struttura quaternaria di una vasta gamma di proteine. In particolare, recenti studi hanno dimostrato come questo chaperone sia sovraespresso in una varietà di cellule cancerose umane e ciò è in accordo con la caratteristica dell'Hsp90 di avere come substrato molte delle proteine oncogeniche, ed anche come i suoi inibitori si accumulino maggiormente nei tessuti malati rispetto a quelli sani. ¹⁸ Alla luce di tali studi appare evidente la potenzialità degli inibitori dell'Hsp90 come chemioterapici a bassa citotossicità.

L'inibizione dell'Hsp90 consegue nella proliferazione di proteine ripiegate in modo errato all'interno delle cellule tumorali, inducendo così il sistema ubiquitina-proteosoma ad eliminarle provocando di fatto la morte di tali cellule maligne.

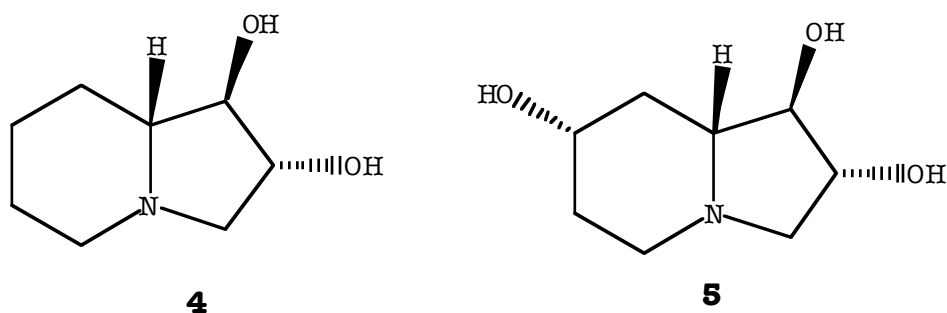


Figura 4

La (-)-lentiginosina (**4**) (Figura 4), composto di origine sintetica, a dispetto del suo enantiomero, non è inibitore di Hsp90 e mostra una minore tendenza nell'inibizione delle amiloglicosidasi ma è stata rivelata da nuovi studi, condotti in collaborazione con la Dott.ssa Beatrice Macchi dell'Università di Roma Tor Vergata, una rimarchevole e importante azione proapoptotica. ¹⁹ L'apoptosi, termine suggerito dal Professor James Cormack del dipartimento di Greco dell'Università di Aberdeen, in analogia alla parola

¹⁶ Del Piazz, F.; Vassallo, A.; Chini, M.G.; Cordero, F.M.; Cardona, F.; Pisano, C.; Bifulco, G.; De Tommasi, N.; Brandi, A. *PLoS One* **2012**, 7, 43316

¹⁷ Mahalingal, D.; Swords, R.; Carew, J.S.; Nawrocki, S.T.; Bhalia, K. et al. *J Cancer* **2009**, 100, 1523

¹⁸ Calderwood, S.K.; Khaleque, M.A.; Sawyer, D.B.; Ciocc, D.R. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, 31, 164

¹⁹ Macchi, B.; Minutolo, A.; Grelli, S.; Cardona, F.; Cordero, F.M.; Mastino, A.; Brandi, A. *Glycobiology* **2010**, 20, 500

ἀπόπτωσης usata in greco per descrivere la caduta delle foglie o dei petali dai fiori, è una forma di morte cellulare programmata.²⁰ L'apoptosi è un processo biologico finemente regolato che viene innescato ogni qualvolta l'interesse dell'organismo nel suo complesso richiede la distruzione sistematica di un certo numero di cellule,²¹ ad esempio allo stadio embrionale mani e piedi umani sono palmati ed affinché le dita si possano formare è necessario che le cellule costituenti le membrane interdigitali muoiano e ciò è regolato da un meccanismo di apoptosi, analogamente anche in caso d'ingente danno, cellule corrotte posso attivare un processo di "autodistruzione".

La morte cellulare derivante da apoptosi viene indirizzata da due vie principali: quella estrinseca, recettore-dipendente, e quella intrinseca, attivata da eventi intracellulari e dipendente dal rilascio, da parte dei mitocondri, di fattori proapoptotici; infatti sulle membrane dei mitocondri delle cellule destinate a morire si viene a creare un poro, detto poro di permeabilità mitocondriale di transizione (mtPTP), formato principalmente da VDAC (traslocatore dei nucleotidi adeninici) ed altre proteine mitocondriali, inclusa la famiglia delle Bcl inizialmente scoperte per il loro ruolo nello sviluppo tumorale. Uno dei più potenti attivatori dell'apoptosi è il Citocromo C che, se presente nel citosol a concentrazioni elevate, attiva una cascata di enzimi proteolitici detti caspasi (cisteina-aspartico-proteasi). La cascata viene innescata dal Citocromo C, e da diverse altre proteine, per attivazione della procaspasi 9 che forma caspasi 9 la quale attiva altre caspasi; questa cascata proteolitica, chiamata anche "morte per mille taglietti", non è una distruzione caotica di materiale proteico ma, invece, è diretta verso precisi e specifici target: per esempio vengono idrolizzate le proteine che mantengono salda la struttura cellulare ed inoltre viene degradata la proteina ICAD (inibitore della DNAsi attivata da caspasi) che mantiene inattivo il CAD (DNAsi attivata da caspasi) il quale è in tal modo attivato per scindere il materiale genetico.²² A differenza dell'apoptosi, la necrosi è un insieme di fenomeni in seguito ai quali la cellula va incontro ad una morte prematura per cause non naturali. Durante la necrosi nell'ambiente cellulare si attua un meccanismo di lisi, che porta alla degradazione totale della cellula: il nucleo viene distrutto, la membrana cellulare viene disgregata e il citoplasma si riversa all'esterno estendendo il danno alle cellule adiacenti. Le cellule necrotiche inoltre non inviano segnalazioni esplicite al sistema immunitario, fatto questo che impedisce ai macrofagi di localizzarle e degradarle portando così ad un accumulo di tessuto necrotico, tale strategia di segnalazione biologica è invece attuata nel caso dell'apoptosi in piena armonia con l'elevato grado di organizzazione del processo.

Recenti studi hanno dimostrato che la (-)-lentiginosina (**4**) è strettamente implicata nel cammino apoptotico intrinseco incrementando l'espressione della caspasi 9 nelle cellule tumorali di differente origine mentre è scarsamente citotossica nei confronti delle cellule

²⁰ Keer, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239

²¹ Okada, H.; Mak, T.W. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 592

²² Berg, J.M.; Tymoczko, J.M.; Stryer, L. *Biochimica*, Bologna, Zanichelli, **2003**

sane.²³ In analogia con l'attività della (+)-lentiginosina (**1**) che sembra dipendere dalla particolare sostituzione sull'anello a cinque termini delle due funzioni ossidriliche rispettivamente in *trans* tra loro, capace di effettuare un'interazione selettiva con la cavità enzimatica,²⁴ è stato ipotizzato che anche nel caso della (-)-lentiginosina (**4**) una sostituzione sull'anello a sei termini non avrebbe interferito con quest'interazione favorevole e quindi con l'attività proapoptotica. Per questo motivo i vari studi effettuati si sono focalizzati sull'utilizzo di derivati sostituiti in posizione 7 della lentiginosina come la (-)-(1*R*,2*R*,7*S*,8*aR*)-1,2,7-tridrossindolizidina ((-)-(7*S*)-7-OH-lentiginosina) (**5**) che, opportunamente protetta, è un intermedio nella sintesi organica della (-)-lentiginosina (**4**) ed è capace di indurre il processo apoptotico in modo analogo ad essa.²⁵ La 7-idrossilentiginosina protetta al C-1 e C-2 (**14**) è in effetti un ottimo building block per la sintesi di una svariata gamma di derivati sfruttando la reattività del gruppo ossidrilico sul C-7. La sintesi di derivati della lentiginosina è importante sia per la ricerca di nuovi proapoptotici, possibilmente più potenti e sempre meno citotossici, sia per studi di correlazione tra struttura e attività, sia per l'indagine metabolica della (-)-lentiginosina (**4**) nella cellula. Lo stesso studio sintetico può essere applicato anche all'enantiomero (+)-lentiginosina (**1**) sempre con gli stessi scopi. Il lavoro di ricerca effettuato apre la strada ad un futuro studio di progettazione molecolare per migliorare l'attività di entrambi gli enantiomeri, pur mantenendo una bassa citotossicità nei confronti delle cellule sane, così da poter concretizzarne la loro potenzialità come nuovi farmaci.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di migliorare la sintesi dei building block 7-idrossilentiginosine, partendo dall'(3*S*,4*S*)-(-)-acido tartarico (**6**) e utilizzando come passaggio chiave la cicloadizione 1,3-dipolare (1,3-DC). Inoltre è stata studiata l'introduzione di un linker in posizione 7 che possa essere utilizzato per coniugare la lentiginosina a molecole diverse. L'intermedio ottenuto è stato poi accoppiato con biotina per ottenere un primo composto che, se attivo, potrà essere utilizzato nello studio del meccanismo del processo apoptotico indotto da **4** e **5**.

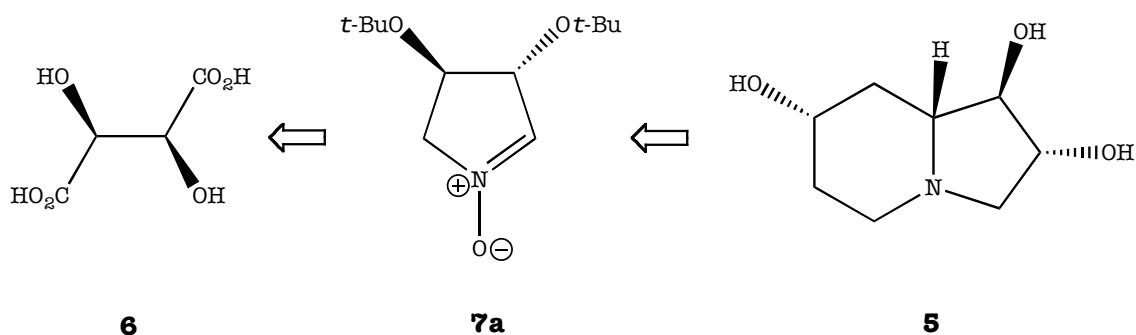
²³ Minutolo, A.; Grelli, S.; Marino-Merlo, F.; Cordero, F.M.; Brandi, A.; Macchi, B.; Mastino, A. *Cell Death and Disease* **2012**, *3*, 358

²⁴ Cardona, F.; Goti, A.; Brandi, A.; Scarselli, M.; Niccolai, N.; Mangani, S. *J. Mol. Model* **1997**, *3*, 249

²⁵ Cordero, F.M.; Bonanno, P.; Khairnar, B. B.; Brandi, A.; Macchi, B.; Minutolo, A.; Grelli, S.; Mastino, A. *ChemPlusChem* **2012**, *7*, 224

Risultati e Discussioni:

Entrambi gli enantiomeri della lentiginosina possono essere sintetizzati a partire dall'acido D- o L-tartarico, il quale presenta già due centri stereogenici nella corretta configurazione. In questo lavoro di ricerca ci siamo interessati alla sintesi dei derivati della (-)-(7*S*)-7-OH-lentiginosina (**5**)²⁶ basata sulla cicloaddizione 1,3-dipolare (1,3-DC) della pirrolidina-*N*-ossido diidrossidrilita (**7a**) enantiopura derivante dall'acido D-tartarico (**6**) (Schema 1).



Schema 1

La sintesi del nitrone enantiopuro diprotetto **7a**, un utile e versatile intermedio sintetico, consta di cinque step, secondo la procedura generale proposta da Petrini *et al.*²⁷ ed in seguito ottimizzata presso il dipartimento di chimica “Ugo Schiff” dell’Università degli Studi di Firenze.^{28, 29, 30} I diidrossipirrolin *N*-ossidi **7** possono infatti essere ottenuti attraverso due vie sintetiche complementari tra loro. La prima comporta la protezione dell'estere D-tartarico **8** e la successiva riduzione al tetrololo diprotetto **9**, l'attivazione dei gruppi alcolici primari via mesilazione o tosilazione seguita dalla ciclizzazione con idrossilammina per ottenere la *N*-idrossipirrolidina **10** che può essere ossidata da reagenti come HgO, NaOCl e MnO₂ (Schema 2, via A) per ottenere il nitrone **7**. Nella seconda via la pirrolidina-*N*-benzilata **11**, derivata dall'immide tartarica **12**, è protetta, debenzilata e in seguito ossidata a **7** (Schema 2, via B). La scelta di una delle due strategie sintetiche è, in generale, influenzata dal tipo di gruppo protettore utilizzato (R): ad esempio sono incompatibili con la via A gruppi protettori che possano facilmente migrare da un gruppo alcolico secondario ad uno primario come i trialkilsilili, mentre l'utilizzo di benzili come gruppi protettori nella via B è inconcludente in quanto non ortogonali alla funzione *N*-benzilica presente nel composto **11**. In questo lavoro di tesi è stata studiata la via B impiegando come gruppo protettore il *ter*-butile.

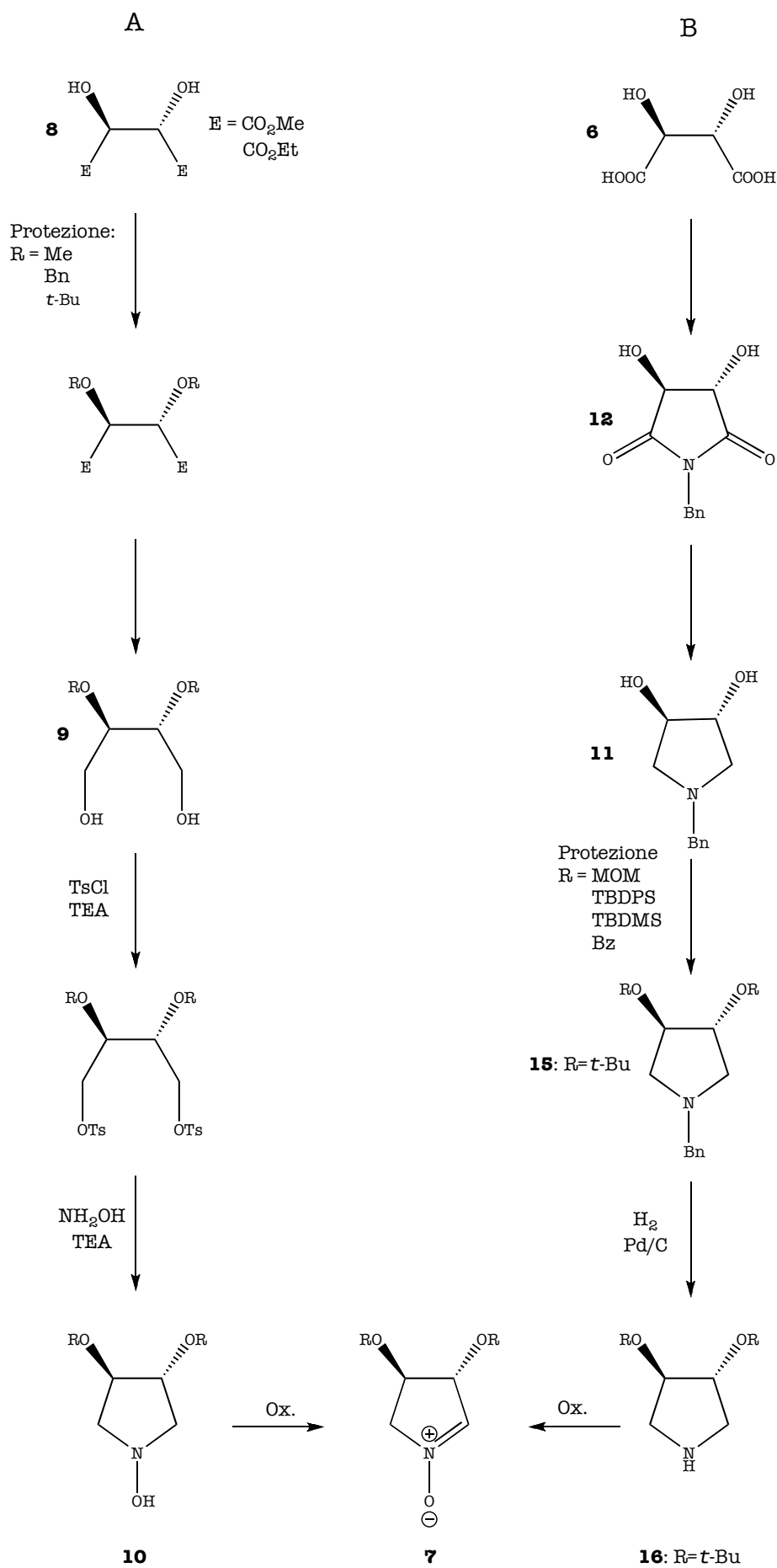
²⁶ Cordero, F.M.; Bonanno, P.; Khairnar, B. B.; Brandi, A.; Macchi, B.; Minutolo, A.; Grelli, S.; Mastino, A. *ChemPlusChem* **2012**, 77, 224

²⁷ Ballini, R.; Marcantoni, E.; Petrini, M. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1316

²⁸ Cicchi, S.; Höld, I.; Brandi, A. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5274

²⁹ (a) Goti, A.; Cardona, F.; Brandi, A.; Picasso, S.; Vogel, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1659; (b) Forcato, M.; Mba, M.; Nugent, W. A.; Licini, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 740; (c) Soldaini, G.; Cardona, F.; Goti, A. *Org. Lett.* **2007**, 9, 473

³⁰ Cordero, F. M.; Bonanno, P.; Neudeck, S.; Vurchio, C.; Brandi, A. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 1155

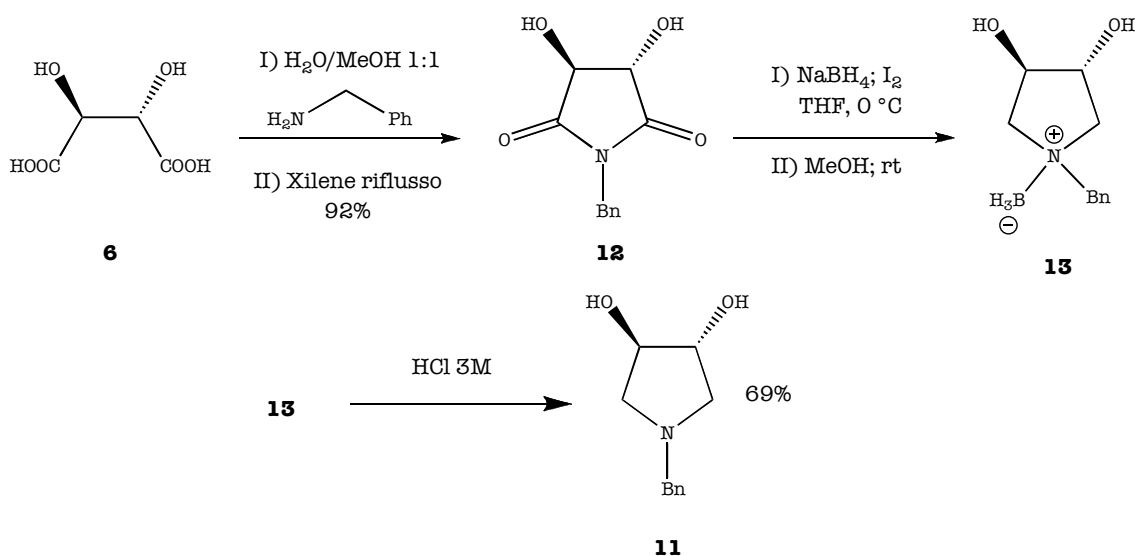


Schema 2

La benzilimmide **12** è stata ottenuta facendo reagire il sale preformato della benzilammina con l'acido D-tartarico a refluxo in xilene,³¹ eseguendo una rimozione azeotropica dell'acqua, come recentemente riportato da Rosenberg *et al.* (resa del 92%);³² in seguito è stata ridotta, in condizioni anidre, utilizzando una soluzione di I₂ e NaBH₄ in THF che è stata aggiunta lentamente nell'arco di due ore mantenendo l'ambiente di reazione a 0 °C. Infine tale reazione è stata portata al completamento riscaldando alla temperatura di refluxo per 6 ore; per compensare l'eccesso di riducente aggiunto, necessario ai fini della reazione, è stato addizionato MeOH, che è in grado di distruggerlo. L'intermedio borazinicco **13** è stato trattato con una soluzione acida ottenendo così la pirrolidina benzilata **11**; in questo step l'estrazione finale della diidrossipirrolidina dalla fase acquosa è stata critica in quanto, a causa dell'alta idrosolubilità, **11** può in parte essere trattenuta in fase acquosa a scapito della resa. Nel caso della nostra reazione la resa è stata del 69% rispetto alla benzilimmide **12** (Schema 3). L'intermedio borazinicco **13** risulta infatti essere il prodotto principale della reazione tra **12** e NaBH₄ con I₂ ed è stato possibile caratterizzarlo tramite ¹H NMR. Dopo il successivo trattamento con HCl 3M, la pirrolidina-*N*-benzilata **11** mostra segnali di risonanza protonica magnetica distinguibili da quelli della borazina, discriminanti dell'avvenuta distruzione dell'addotto **13**; la borazina **13** infatti a differenza di **12** e **11** non possiede elementi di simmetria per cui i protoni carbinolici (3-H e 4-H) risuonano a frequenze diverse tra loro ($\delta = 4.66$ ppm e $\delta = 4.01$ ppm) mentre i quattro protoni dei gruppi metilenici in posizione 2 e 5 danno luogo a quattro segnali diversi [**2-H_b**: 2.85 (dd, $J = 11.5, 6.6$ Hz), **5-H_b**: 3.14 (br d, $J = 12.0$ Hz), **5-H_a**: 3.33 (dd, $J = 12.0, 7.1$ Hz), **2-H_a**: 3.54 (ddd, $J = 11.5; 6.6; 1.2$ Hz)]. Nella pirrolidina **11**, a causa della presenza di un asse di simmetria C₂, i sei idrogeni presenti sull'anello sono a coppie omotopici (3-H e 4-H, 5-H_b e 2-H_a, 5-H_a e 2-H_b) ed ogni coppia dà luogo ad un segnale **3-H/4-HB**: 4.03 - 4.11 (m), **5-H_b/2-H_a**: 2.67 (dd, $J = 10.4; 3.8$ Hz), **5-H_a/2-H_b**: 3.10 (dd, $J = 9.9; 5.5$ Hz).

³¹ (a) D. Rejman, D.; Kočalka, P.; Buděšínský, M.; Pohl, R.; Rosenberg, I. *Tetrahedron* **2007**, 63, 1243; (b) Nagel, U.; Kinzel, E.; Andrade, J.; Prescher, G. *Chem. Ber.* **1986**, 119, 3326

³² D. Rejman, P. Kocalka, M. Budesinsky, R. Pohl, I. Rosenberg, *Tetrahedron* **2007**, 63, 1243



Schema 3

Il successivo step sintetico consta nella protezione dei due gruppi ossidrilici presenti sulla pirrolidina-*N*-benzilata **11** affinché essi non interferiscano durante la sintesi del nitrone **7a** e dell'indolizidina **14** ed anche per rendere più solubili gli intermedi nei solventi organici utilizzati. In letteratura è noto l'utilizzo di diversi gruppi protettori, per le funzioni ossidriliche in relazione *trans* dei diidrossipirrolin-*N*-ossidi, che come precedentemente esposto influenzano la scelta della via sintetica (Me,³ Bn,^{3,33} *t*Bu,^{3,34} MOM,^{2,35,36} TBDPS,³⁷ TBDMS,⁴ Bz¹); tra questi però il gruppo *ter*-butile sembra essere il più conveniente, intrapresa la strategia sintetica B, poiché offre come vantaggi l'alta stabilità in molte condizioni di reazione, l'idrolisi selettiva e quantitativa ed anche un elevato ingombro sterico che può indurre un controllo diastereofacciale più stringente, rispetto a gruppi protettori più piccoli, nella cicloaddizione 1,3-dipolare (1,3-DC) del nitrone. La reazione di *ter*-butilazione della diidrossipirrolidina **11** è stata fatta con *t*-BuOAc in presenza di HClO₄ (Schema 4).

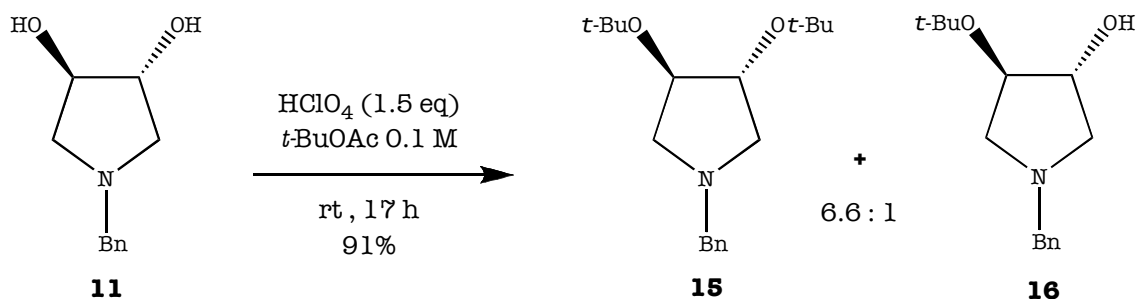
³³ Cicchi, S.; Marradi, M.; Goti, A.; Brandi, A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6503

³⁴ Cicchi, S.; Corsi, M.; Goti, A. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 7243

³⁵ (a) Marcantoni, E.; Petrini, M.; Polimanti, O. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3561; (b) Murray, R.W.; Iyanar, K. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 8099; (c) Chevrier, C.; Defoin, A.; Tarnus, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 4125

³⁶ McCaig, A.E.; Meldrum, K.P.; Wightman, R.H. *Tetrahedron* **1998**, 54, 9429

³⁷ Brandi, A.; Cicchi, S.; Cordero, F.M.; Frignoli, R.; Goti, A.; Picasso, S.; Vogel, P. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6806



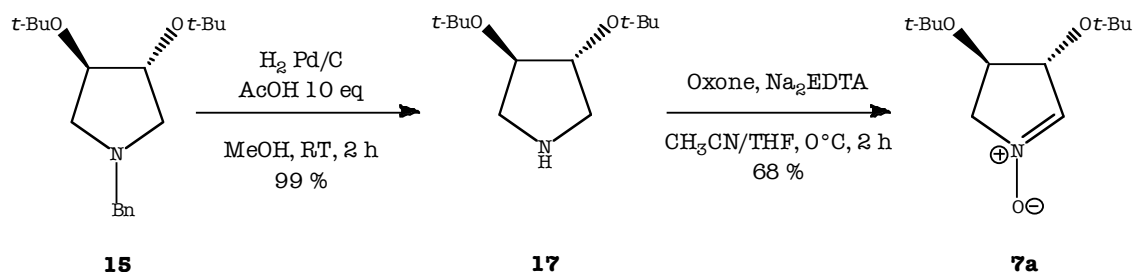
Schema 4

Il trattamento di **11** a temperatura ambiente per 17 ore con *ter*-butilacetato in presenza di HClO_4 , usato in eccesso (1.5 equiv.) a causa della basicità dell'atomo di azoto presente, ha portato alla formazione di una miscela di **15** e **16** in rapporto 6.6:1 con una resa del 91%. In seguito sia il *ter*-butilacetato in eccesso non reagito sia la pirrolidina **16** monoprotetta possono essere recuperati e riutilizzati in successive reazioni. L'utilizzo della tecnica ^1H NMR ha mostrato l'efficienza della separazione cromatografica della miscela essendo discriminante il numero di protoni metilenici presenti nei due differenti prodotti.

In seguito si è operata l'idrolisi del gruppo benzilico di **15** che ha comportato la risoluzione di una problematica, infatti in sola presenza di una quantità catalitica di Pd/C o $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ e H_2 (1 atm) in MeOH, la debenzilazione è lenta e comporta un'inaspettata idrolisi del gruppo *ter*-butile e quindi la conseguente formazione di una quantità significativa di diidrossipirrolidina monoprotetta. Fortunatamente con l'aggiunta di AcOH (10 equiv.) la benzilazione si è completata dopo sole 2.5 ore e non si è verificata nessuna idrolisi dell'etere, portando al prodotto **17** con una resa del 99%; a prova dell'avvenuta reazione si osserva nello spettro ^1H NMR la scomparsa dei segnali aromatici nella zona dei chemical shift compresa tra 7.34 e 7.20 ppm.

Una volta deprotetta la funzione amminica è stato possibile affrontare un'ossidazione specifica a nitrone sfruttando la procedura proposta da Font *et al.*³⁸ che consta nell'utilizzo di un reagente, di nome commerciale Oxone®, costituito da una miscela di perossimonosolfato di potassio (KHSO_5), idrogenosolfato di potassio (KHSO_4) e solfato di potassio (K_2SO_4) in rapporto 2:1:1. La reazione è stata condotta in un sistema bifasico (Na_2EDTA aq. 0.01 M) - CH_3CN - THF in presenza di NaHCO_3 a 0 °C. A seguito di una purificazione cromatografica si è ottenuto il nitrone **7a** con una resa del 68%. (Schema 5)

³⁸ (a) Sánchez-Izquierdo, F.; Blanco, P.; Busqué, F.; Alibés, R.; de March, P.; Figueredo, M.; Font, J.; Parella, T. *Org. Lett.* **2007**, 9, 1769; (b) Gella, C.; Ferrer, È.; Alibés, R.; Busqué, F.; de March, P.; Figueredo, M.; Font, J. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 6365



Schema 5

In lavori precedenti il nitrone **7**, derivante dalla via sintetica A e utilizzando TDBMS come gruppo protettore, veniva ottenuto con una resa del 56% per ossidazione di **10** con H_2O_2 catalizzata da SeO_2 ,^{4a} è quindi evidente come l'Oxone® risulti essere il reagente migliore per la sintesi di pirrolin-N-ossidi da pirrolidine date sia le rese più elevate, sia la minor tossicità dei reagenti.

In conclusione, in questo lavoro di tesi, il nitrone **7a** è stato ottenuto con una resa complessiva del 33% in cinque step a partire dall'acido D-tartarico.

Ottenuto il nitrone recante le funzionalità ossidriliche protette si è potuto procedere nella sintesi di (1*R*,2*R*,7*S*,8*aR*)-1,2-di-*ter*-butossiottaidroindolizin-7-olo ((-)-(7*S*)-7-OH-lentiginosina diprotetta) (**14**) facendo reagire il nitrone **7a** con il 3-butenil tosilato **18** tra i quali opera un meccanismo di cicloadizione 1,3-dipolare (1,3-DC).³⁹ Le cicloadizioni 1,3-dipolari tra alcheni sostituiti e nitroni sono già note in letteratura dalla fine degli anni Cinquanta^{40, 41, 42} e hanno trovato innumerevoli applicazioni nel campo della sintesi di prodotti naturali in quanto permettono l'introduzione di nuovi centri stereogenici con configurazione prestabilita.⁴³ La cicloadizione può essere descritta ricorrendo alla teoria perturbativa dell'orbitale molecolare di frontiera consistente nell'interazione dell'HOMO e del LUMO delle due molecole; studi computazionali⁴⁴ hanno dimostrato che è il LUMO del nitrone, nel quale è il carbonio a recare il coefficiente orbitalico maggiore, a generare una sovrapposizione favorevole con l'HOMO di alcheni monosostituiti elettronricchi, come il 3-butenil tosilato **18** nel quale è il carbonio non sostituito a recare il coefficiente orbitalico maggiore (Schema 6).⁴⁵

³⁹ (a) Goti, A.; Cicchi, S.; Cordero, F.M.; Fedi, V.; Brandi, A. *Molecules* **1998**, 4, 1; (b) Brandi, A.; Cardona, F.; Cicchi, S.; Cordero, F.M.; Goti, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 7808

⁴⁰ a) Cope, A. C.; LeBel, N. A. *Abstracts of Papers*, 133rd National Meeting, American Chemical Society, San Francisco, CA, April 13-18, 1958, p 62-N; (b) LeBel, N. A.; Whang, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81,6334; (c) Cope, A. C.; LeBel, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4656

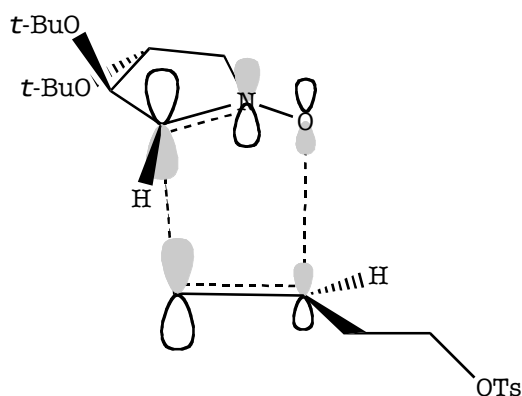
⁴¹ Brown, C. W.; Marsden, K.; Rogers, M. A. T.; Tylor, C. M. B.; Wright, R. *Proc. Chem. Soc., London* **1960**, 254

⁴² Grashey, R.; Huisgen, R.; Leitermann, H. *Tetrahedron Lett.* **1960**, 9

⁴³ Tufariello, J. J. *Acc. Chem. Res.* **1979**, 12, 396

⁴⁴ Kissane, M.; Maguire, A.R. *Chem. Soc. Review* **2010**, 39, 845-883

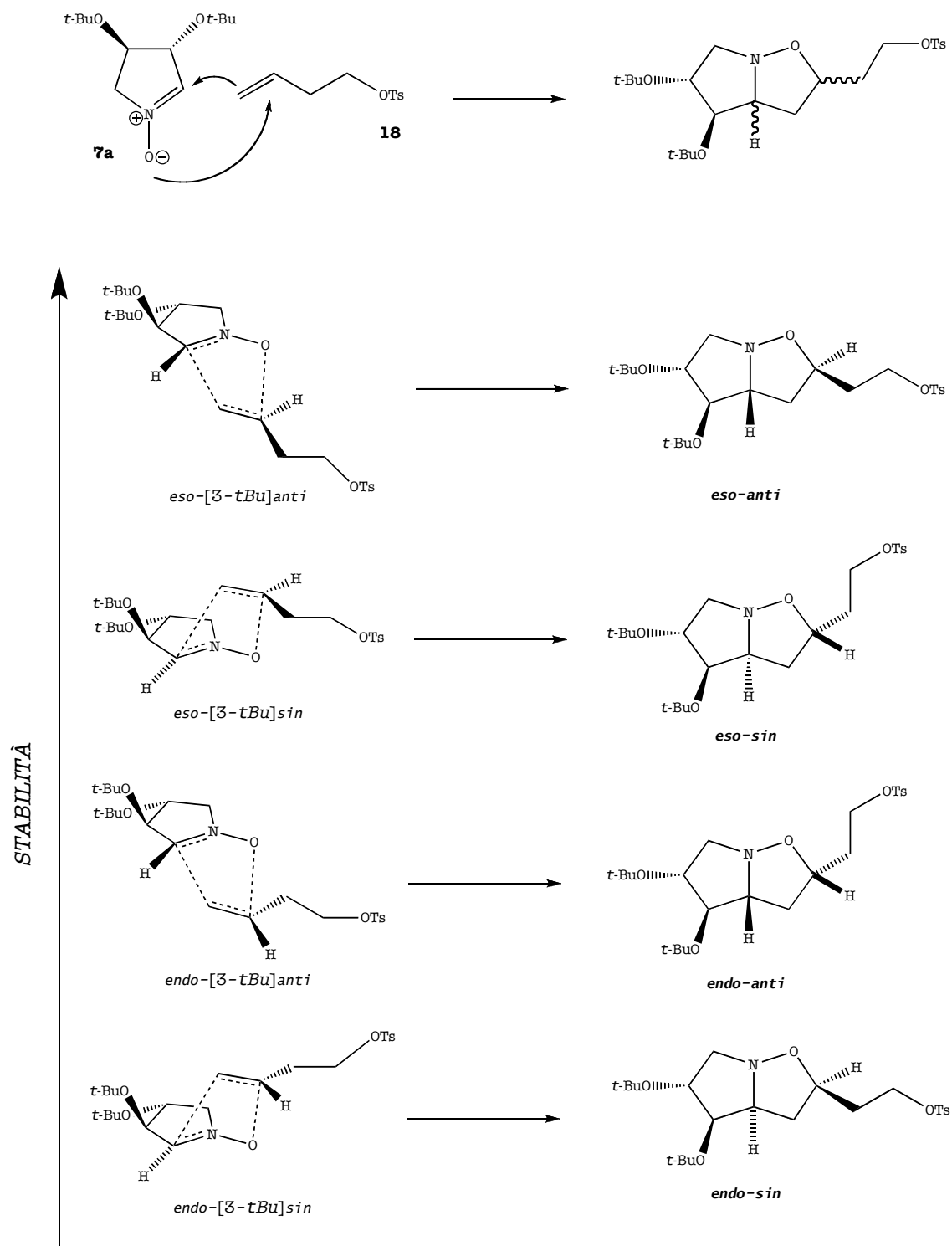
⁴⁵(a) Huisgen, R. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 403; (b) Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed., Engl.* **1963**, 2, 565



Schema 6

Il meccanismo delle 1,3-DC implica una precisa disposizione spaziale degli orbitali molecolari coinvolti, ovvero il dipolarofilo deve mantenere il piano contenente il doppio legame parallelo a quello della funzione nitrone; tale prerogativa comporta la presenza di due possibilità nell'attacco della faccia reattiva, una sopra il piano del nitrone in *sin* rispetto al sostituente sul C-3 e l'altra da sotto in *anti*. È l'ingombro sterico del sostituente legato al C-3, nel nostro caso il *ter*-butilossi, a determinare la faccia preferenziale dell'attacco e sbilanciare il rapporto diastereomerico *sin/anti* verso l'*anti*, la cui formazione consta di uno stato di transizione a minor energia ed è quindi più favorito. Entrambi gli approcci inoltre portano alla formazione di altri due diastereoisomeri a causa dell'introduzione di un nuovo centro stereogenico, la cui configurazione è derivante dalla diversa disposizione del sostituente sul doppio legame rispetto all'anello isossazolidinico incipiente, attacchi che si distinguono in *eso*, quando il sostituente è orientato verso l'anello e *endo* nel caso opposto. In teoria si possono quindi ottenere quattro diastereoisomeri che si formeranno in rapporti variabili a seconda dei vari reagenti e delle condizioni di reazione utilizzati.

Lo Schema 7 illustra i possibili stati di transizione dei vari attacchi, riportati in ordine crescente di stabilità e i cicloaddotti che da essi derivano. Nel nostro caso sono stati ottenuti solo 3 addotti con rapporto 5:1:0,2 con preponderanza del diastereoisomero *eso/anti*.

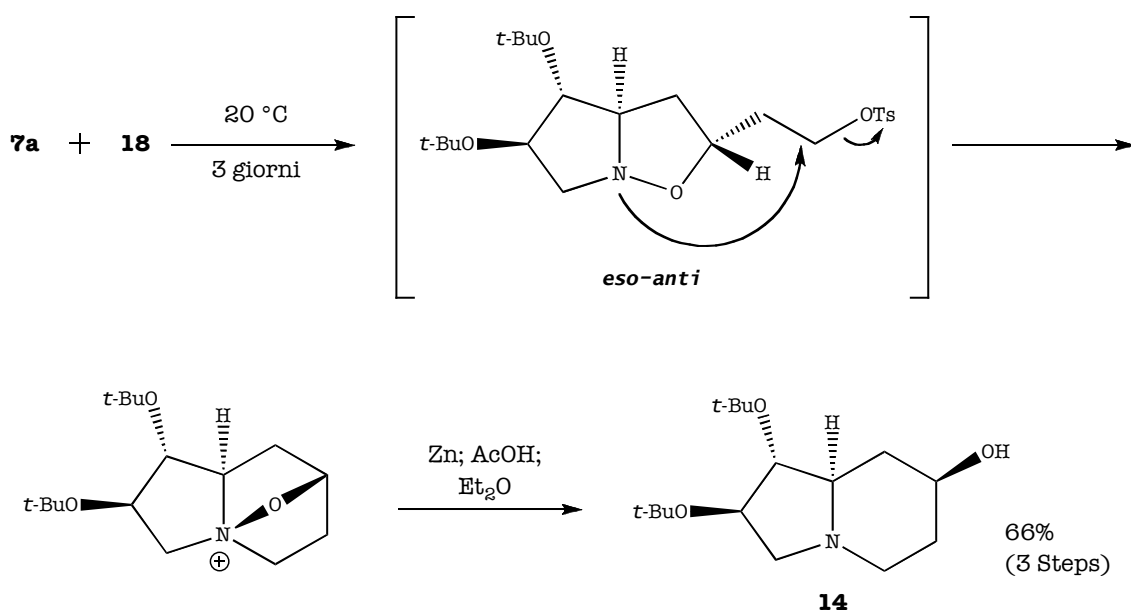


Schema 7

Precipuo delle 1,3-DC di nitroni con dipolarofili che possiedono un buon gruppo uscente sul C-4 è un comportamento domino⁴⁶ in grado d'indirizzarle verso i prodotti finali. Infatti il cicloaddotto primario evolve attraverso una sostituzione nucleofila

⁴⁶ (a) Tufariello, J.J.; Tegeler, J.J. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 4037; (b) Tufariello, J.J. *Acc. Chem. Res.* **1979**, 12, 396; (c) Cordero, F.M.; Machetti, F.; De Sarlo, F.; Brandi, A. *Gazz. Chim. Ital.* **1997**, 127, 25; (d) Cordero, F.M.; Faggi, C.; De Sarlo, F.; Brandi, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3595

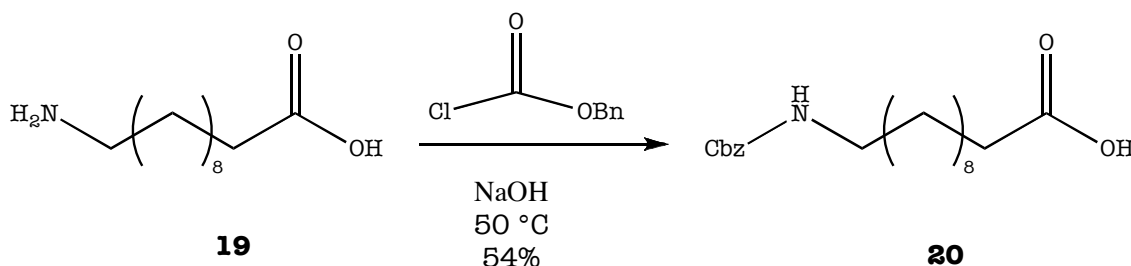
intramolecolare (Schema 8) generando un nuovo ciclo a sei termini. Il sale di isossazolidinio così formato non viene isolato, ma direttamente convertito in 7-idrossiindolizidina attraverso apertura riduttiva dell'anello isossazolidinico. Il nitrone **7a** è stato fatto reagire con un eccesso di 3-butenil tosilato **18** (4 o 5 equiv.) a 20 °C per tre giorni. Dopodiché la miscela di reazione è stata diluita con etere e trattata con Zn attivato e AcOH. In seguito ad una separazione cromatografica si è ottenuta la (-)-(7S)-7-OH-lentiginosina diprotetta **14** enantiomericamente pura con una resa del 66% rispetto a **7a**. Degno di nota in questa procedura rispetto a quelle utilizzate in precedenza nella sintesi della lentiginosina (**4**), è l'utilizzo di Zn in ambiente acido piuttosto che H₂ su Pd/C, per la rottura riduttiva del legame azoto-ossigeno, in modo da non ridurre l'eccesso di tosilato utilizzato, il quale può in seguito alla separazione essere recuperato e riutilizzato per future reazioni.



Schema 8

Avendo a disposizione la 7-idrossilentiginosina **14**, ci siamo proposti di utilizzarla come substrato per la sintesi di lentiginosine-7-sostituite da utilizzare nello studio dell'attività biologica della lentiginosina stessa e dei suoi derivati. A tale scopo è necessario disporre di un linker adeguato che legandosi a **14** dia un composto stabile, il quale possa fungere da building block e quindi essere funzionalizzato con molteplici biomolecole come cromofori, amminoacidi oppure la biotina. L'uso di cromofori è un metodo adeguato per lo studio in vitro del cammino biologico intrapreso dalla lentiginosina e dai suoi derivati e per comprendere le sue interazioni a livello cellulare e mitocondriale. Come linker si è scelto di usare una catena di dieci atomi di carbonio legata al gruppo alcolico in posizione 7 attraverso un legame di tipo carbammico, che risulta essere stabile in condizioni biologiche al contrario di un legame estereo che potrebbe essere idrolizzato dalle

esterasi. In studi precedenti inoltre è stato sintetizzato un derivato coniugato attraverso un anello triazolico i cui test biologici hanno però mostrato come questo tipo di derivatizzazione, che comporta anche inversione di configurazione al C-7, renda il composto inattivo. Al contrario la derivatizzazione con un gruppo *n*-ottilcarbammico sul C-7 non interferisce significativamente con la sua bioattività, infatti il derivato è stato capace di indurre apoptosi. Per queste ragioni abbiamo utilizzato l'acido 11-amminoundecanoico (**19**) come substrato di partenza. Dal punto di vista prettamente sintetico è richiesto l'utilizzo di un gruppo protettore per la funzione amminica dell'amminoacido che sia ortogonale a quello della funzione alcolica del triolo; a questo scopo è stato utilizzato il Cbz. L'acido 11-amminoundecanoico (**19**) è stato solubilizzato in una soluzione di NaOH scaldando fino a 50° C, è stato aggiunto goccia a goccia il benzil cloroformiato agitando per 2 ore ed è stato sottoposto ad un work-up acido ed una ricristallizzazione da MeOH, ottenendo così l'acido protetto **20** puro con una resa del 54% (Schema 9).⁴⁷



Schema 9

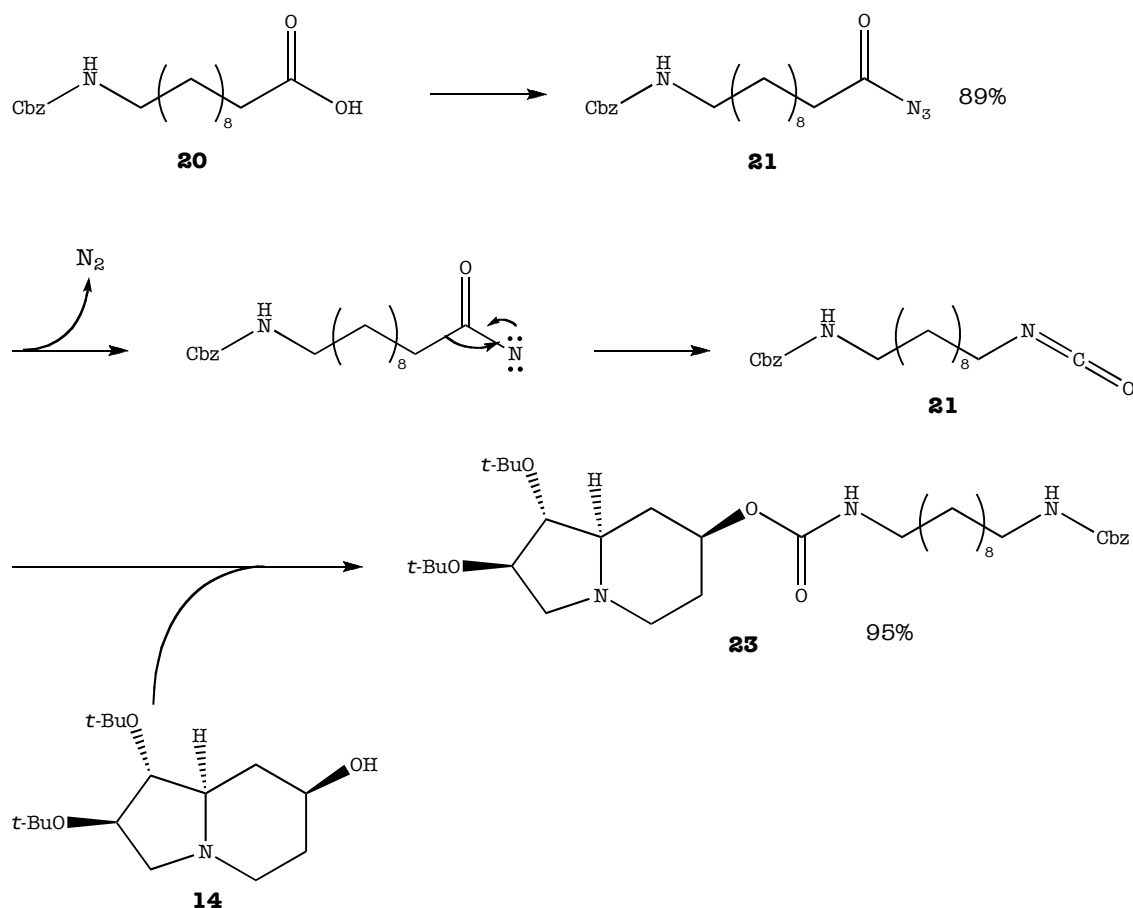
I passaggi implicati nella formazione di un legame carbammico partendo da una funzione ossidrilica ed una carbossilica⁴⁸ sono illustrati nello Schema 10. Tale reazione comporta una prima trasformazione dall'acido carbossilico in acilazide **21**, tramite l'utilizzo di un agente capace di trasferire un azido-gruppo sul carbonio carbonilico. In seguito l'azide, per semplice riscaldamento, evolve in isocianato **22** grazie alla perdita di azoto molecolare e migrazione della catena alchilica sull'atomo di azoto; questa è una reazione ben nota che prende il nome di trasposizione di Curtius. L'isocianato **22** è una specie elettrofila molto reattiva e quindi di difficile isolamento e conservazione, in quanto in presenza di umidità reagisce con l'acqua per dare l'ammina primaria e perdita di CO₂ e in presenza di un alcol, come **14**, reagisce per dare un carbammato stabile, come **23**.

Per la congiunzione del linker alla (-)-(7S)-OH-lentiginosina diprotetta (**14**) tramite un legame carbammico sono state intraprese diverse strategie sintetiche, prendendo spunto dalla letteratura su substrati simili; le prove sono state svolte operando variazioni su più fronti per poter affrontare le diverse problematiche che si sono presentate, tra le

⁴⁷ Fiedler, J. W.; Gugginberg A.; Manfred H. *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 1167

⁴⁸ Sawada, D.; Sasayama, S.; Takahashi, H.; Ikegami, S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7219

quali la reattività dell'isocianato **22**. Inizialmente si è pensato di svolgere la reazione one-pot in cui la formazione dell'acilazide, la trasposizione a isocianato e quindi la reazione con la funzione alcolica libera avvenivano in un unico ambiente di reazione e di questa metodologia sono state condotte due prove parallele. Nella prima prova abbiamo utilizzato difenilfosforilazide (DPPA),⁴⁹ che reagisce con gli ioni carbossilato per dare un'anidride mista che, in seguito ad attacco dello ione azide, porta alla formazione dell'acilazide **21**. L'acido **20** è stato quindi trattato con DPPA, trietilammina (Et₃N o TEA) come base⁴⁹ in CH₃CN come solvente. La miscela di reazione è stata scaldata a 60 °C per 25 ore, in seguito dall'analisi della complessa miscela di reazione si è potuto evincere che il prodotto **23** era presente ma in esigua quantità. Nella seconda prova invece sono stati utilizzati, oltre alla DPPA, K₂CO₃ come base e toluene come solvente ma in queste condizioni non si è osservata la formazione del prodotto desiderato. Una probabile reazione collaterale che può aver invalidato l'esito del metodo one-pot è la formazione di un prodotto tra la (-)-7S-OH-lentiginosina diprotetta (**14**) e l'acido difenilfosfinico presente nell'ambiente di reazione. Abbandonato il metodo one-pot è stato iniziato lo studio del processo stepwise.



Schema 10

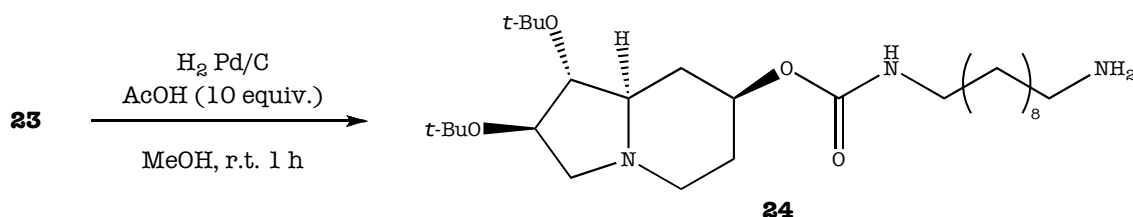
⁴⁹ Shioiri, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6203

Del processo stepwise sono state effettuate più prove con diversi reagenti le quali constavano in una prima reazione di introduzione dell'azido-gruppo ottenendo in tal modo l'acilazide **21** seguita da un secondo step durante il quale si formava l'isocianato *in situ* in presenza della (-)-(7S)-OH-lentiginosina diprotetta (**14**) per formare il legame carbammico. Si è potuto scegliere tra eseguire le reazioni sequenzialmente nello stesso ambiente di reazione oppure di isolare l'acilazide una volta ottenuta e formare *in situ* l'isocianato in una seconda reazione.

Alla luce dell'impossibilità di isolare l'isocianato, stante la sua reattività, è stato pensato di isolare l'acilazide **21**, che è relativamente stabile se mantenuta a basse temperature. Una soluzione dell'acido **20** in CH₂Cl₂ è stata trattata, a 0 °C, con TEA e DPPA, e la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione e atmosfera di azoto per circa un'ora; è stata così ottenuta l'acilazide **21** con una resa dell' 88% comprovata da uno spettro IR nel quale la banda dello stretching asimmetrico del triplo legame azoto-azoto, discriminante delle azidi, è presente a 2137 cm⁻¹. Verificato che in queste condizioni l'acilazide si forma, abbiamo deciso di studiare la reazione sequenziale, considerando la scarsa stabilità e pericolosità delle azidi che debbono essere conservate a basse temperature e utilizzate in breve tempo. Per la prova sequenziale è stata utilizzata una provetta Schlenk nella quale è stato solubilizzato l'acido **20** in toluene e, dopo l'aggiunta di TEA e DPPA, la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione in atmosfera di N₂ per un'ora, e poi portata a riflusso per un'altra ora. Successivamente è stata aggiunta nello stesso ambiente di reazione anche la (-)-7S-OH-lentiginosina diprotetta (**14**) disciolta in toluene. In seguito a due ore di riflusso è stata ottenuta una miscela scura che per trattamento con MeOH è divenuta viola. Dopo purificazione via colonna cromatografica e indagine spettroscopica si è constatato che la reazione non ha portato a nessun risultato, probabilmente sempre a causa dell'eccessiva reattività della DPPA che è stata usata in eccesso (1,8 equiv.) rispetto all'alcol **14**. Dati gli scarsi risultati ottenuti nelle prove precedenti è stato abbandonato l'uso della DPPA quale agente azidante e sostituita con NaN₃; la sodioazide però non reagisce direttamente con gli acidi carbossilici, che vanno pertanto attivati e trasformati in acilcloruri. In condizioni anidre e sotto atmosfera di azoto una soluzione dell'acido carbossilico **20** in acetone e TEA è stata raffreddata a -5 °C ed in seguito trattata con etilcloroformiato goccia a goccia lasciando sotto agitazione per 30 minuti, per poi aggiungere una soluzione acquosa di NaN₃ operando a 0 °C e agitando per un'ora. In queste condizioni si è ottenuta l'acilazide **21** con una resa dell' 89%, la cui effettiva formazione è stata verificata attraverso analisi IR. Ottenuta l'acilazide **21** è stato possibile farla reagire con (-)-(7S)-OH-lentiginosina diprotetta (**14**) per ottenere (1R,2R,7S,8aR)-1,2-di-*ter*-butossioctaidroindolizin-7-il 10-amminodecilcarbamato-10-Cbz (**23**). La reazione è stata condotta portando a riflusso in toluene l'acilazide **21** per 30 minuti, in modo da formare *in situ* l'isocianato **22**, ed in

seguito aggiungendo una soluzione di triolo diprotetto **14** in toluene e mantenendo il refluxo per ulteriori 24 ore. Dopo purificazione via cromatografica si ottiene finalmente il prodotto **23** puro con resa del 95% rispetto al triolo **14**.

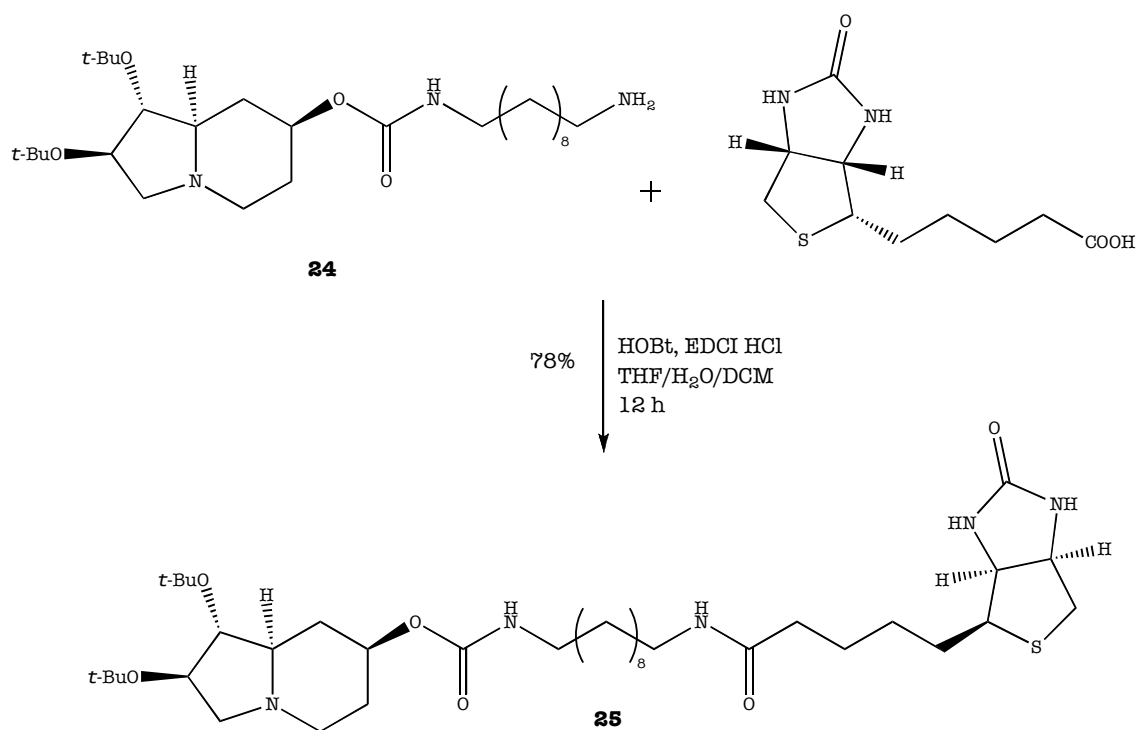
Il successivo passo da compiere è stato quello della deprotezione selettiva della funzione amminica secondo la reazione illustrata nello Schema 11.



Schema 11

L'ammina protetta **23** è stata solubilizzata a 0 °C in MeOH e poi trattata con Pd/C 10% e AcOH. In seguito la miscela di reazione è stata portata a temperatura ambiente e posta sotto atmosfera di H₂ per un'ora sotto agitazione magnetica fino a completamento. Il (1*R*, 2*R*, 7*S*, 8*aR*)-1,2-di-*ter*-butossi-ottaidoindolizin-7-il 10-aminodecilcarbammati (**24**) è stato ottenuto con una resa quantitativa. Tale prodotto è un traguardo importante in quanto, come già accennato, è il diretto precursore della (-)-(7*S*)-OH-lentiginosina legata stabilmente ad un linker alchilico che presenta, in posizione ω, una funzione amminica facilmente utilizzabile in reazioni di coupling con una molteplice serie di molecole e biomolecole. In questo lavoro di tesi è stata scelta la biotina come biomolecola, in quanto, l'elevata stabilità di legame tra biotina e avidina o streptavidina è molto utilizzata in vari test biologici; un tipo di test utilizza la biotina coniugata alla molecola da analizzare come marker indiretto, infatti la molecola biotinilata può essere studiata al microscopio confocale dopo trattamento con streptavidina legata ad un fluorocromo. In questo modo è possibile localizzare la molecola bioattiva nella matrice biologica, studiarne i tempi di entrata e relativa distribuzione intracellulare.

La biotina è stata legata tramite un legame ammidico, utilizzando le strategie sintetiche precipue della chimica dei legami peptidici, che prevedono l'impiego d'idrossibenzotriazolo (HOBT) e il cloridrato della *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarboimmide (EDCI HCl) entrambi utilizzati come attivanti della funzione carbossilica libera presente sulla biotina.



Schema **12**

Come solvente per la reazione è stata scelta una miscela di THF/H₂O/DCM in rapporto 1:1:0.5, ottimale per solubilizzare tutti i reagenti, i quali sono stati posti sotto agitazione magnetica per 12 ore a temperatura ambiente; in seguito a purificazione cromatografica si è ottenuto il prodotto **25** puro con una resa del 78% (Schema 12).

Per poter essere disponibile a test biologici il prodotto **25** necessita solamente della deprotezione dei gruppi ossidrilici.

Conclusioni:

In questo lavoro di tesi è stata ottimizzata la sintesi di derivati della lentiginosina al fine di disporre di una gamma di molecole marcate per la ricerca medico-biologica che siano analoghe per attività alla lentiginosina nativa. Passaggio chiave di tale strategia di funzionalizzazione è senza dubbio la cicloadizione 1,3-dipolare che permette di controllare la stereochimica del target sintetico, la quale si rivela fondamentale nell'attività biologica della maggior parte delle biomolecole, e in special modo proprio della lentiginosina. La lentiginosina naturale infatti mostra, tra le altre, un'attività inibitoria nei confronti dell'Hsp90, mentre l'enantiomero sintetico (-)-lentiginosina mostra attività proapoptotica; la sintesi del prodotto in forma enantiopura è stata attuata mediante la scelta dell'acido tartarico, prodotto del chiral-pool, come reagente iniziale, il quale, essendo facilmente disponibile in entrambe le forme enantiomeriche, permette di ottenerle entrambe attraverso la stessa metodologia.

Un importante risultato raggiunto in questo lavoro di tesi è stato la sintesi della lentiginosina diprotetta recante in posizione 7 un linker, stabile in ambiente biologico, il quale presenti una funzione atta a dare reazione di coupling. Sono evidenti la potenzialità e la versatilità di una molecola di lentiginosina così modificata in quanto la varietà di possibili partner di coupling è tale da consentirne la scelta unicamente in base alle necessità della ricerca quali: *in primis* la rivelabilità *in situ* necessaria per comprendere la natura dell'interazione con la cellula, e in secondo luogo che il derivato scelto non comprometta significativamente la permeabilità attraverso le membrane cellulari e l'attività. I dati raccolti da tali ricerche potranno fornire una solida base per studi struttura/attività e per chiarificare il meccanismo d'azione a livello recettoriale. La finalità ultima, nei lunghi tempi della ricerca farmacologica, sarà quella d'individuare nuovi possibili chemioterapici strutturalmente semplici e facilmente sintetizzabili anche su scala industriale.

Metodi e materiali:

I solventi ed i prodotti commerciali sono stati utilizzati tal quali dove non espressamente indicato altrimenti. I solventi anidri su setacci molecolari da 3Å sono stati conservati in essiccatore a cloruro di calcio dopo l'apertura ed utilizzati tal quali dove non espressamente indicato altrimenti. Le cromatografie su strato sottile (TLC) sono state condotte su lastrine in alluminio ricoperte da silice (Merck F254). La cromatografia è stata eseguita in camera di eluizione satura dei vapori della miscela di solventi utilizzata per l'eluizione. Lo sviluppo delle lastrine è stato effettuato utilizzando, in serie, radiazione UV ($\lambda = 254$ nm), vapori di iodio e soluzione 1.0 M di permanganato di potassio. Le purificazioni mediante cromatografia flash sono state condotte utilizzando gel di silice (Merck) con dimensione delle particelle compresa tra 32 e 63 μm , operando nelle condizioni descritte in letteratura. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati a 25 °C con gli spettrometri Varian Gemini, operante a 200 MHz, Varian VXR-300S, operante a 300 MHz e Varian Mercuryplus, operante a 400 MHz. Gli spettri $^{13}\text{C-NMR}$ sono stati registrati a t.a. con lo spettrometro Varian Gemini operante a 200 MHz o con il Varian Mercuryplus, operante a 400 MHz.

Negli spettri NMR, i chemical shift (δ) sono riportati rispetto al segnale del TMS, determinato dal valore del picco del solvente non deuterato, presente come impurezza nel solvente deuterato; le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hz. La molteplicità dei segnali è stata indicata in accordo a quanto segue:

s: singoletto; d: doppietto; t: tripletto; q: quartetto; q': quintetto; dd: doppietto di doppietto; ddd: doppietto di doppietti di doppietti; m: multipletto; br: banda allargata.

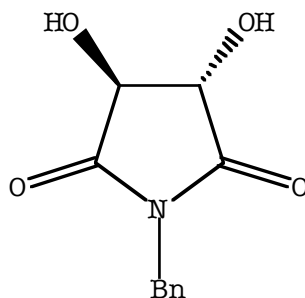
Gli spettri di caratterizzazione IR sono stati registrati con uno spettrometro Perkin-Elmer 881. L'attività ottica specifica è stata valutata tramite un polarimetro Perkin-Elmer 343. I punti di fusione (m.p.) dei prodotti ottenuti sono stati determinati tramite un apparecchio per punti di fusione RCH Kofler con rampa di riscaldamento di 5 °C/min.

Le analisi elementari sono state effettuate tramite un analizzatore Perkin Elmer 2400.

Gli spettri di massa sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Finnigan MAT 95 per infusione di soluzioni del campione 0.1 mg/mL in CH_3OH , con ionizzazione ad elettrospray ed analizzatore di massa a quadrupolo.

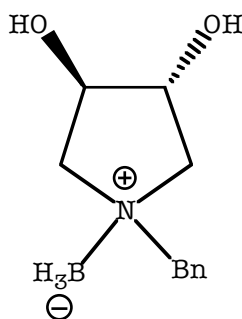
Parte sperimentale:

Sintesi del (3*S*,4*S*)-1-benzil-3,4-diidrossipirrolidina-2,5-dione (**12**)



Si aggiunge lentamente la benzilammina (18,25 mL, 0,167 mol) ad una sospensione di (3*S*,4*S*)-(-)-acido tartarico (**6**) (25 g, 0,167 mol) in MeOH/H₂O (1:1) (34 mL), osservando la precipitazione di un solido bianco. Si concentra la miscela viscosa a pressione ridotta. Si aggiunge xilene (450 mL), non osservando alcuna dissoluzione, e si fa rifluire in un apparato di Dean-Strark per 11 h scaldando a 150 °C. Durante il periodo di riflusso si aggiunge un'addizionale aliquota di xilene (4x50 mL) per compensare quello evaporato e si raccoglie l'acqua formata durante la reazione (18 mL). Infine si raffredda la miscela, si filtra sotto vuoto e si lava il solido risultante con etere di petrolio. Si ottiene l'immina grezza **12** con una resa del 92% (34,085 g, 0,154 mol) come un solido giallo pallido e lo si usa per la prossima reazione senza ulteriori purificazioni. I dati degli spettri NMR sono identici a quelli riportati in letteratura.^{31a}

Sintesi del ((3*R*,4*R*)-1-benzil-3,4-diidrossipirrolidinio-1-il)triidrobato (**13**)

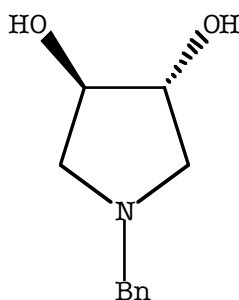


Si aggiunge una soluzione di I₂ (20,3 g, 0,08 mol) in THF (96 mL) goccia a goccia ad una sospensione di NaBH₄ (6,05 g, 0,16 mol) e **12** (7 g, 0,032 mol) in THF (150 mL), vigorosamente agitata e raffreddata a 0 °C, nell'arco di 2 h sotto atmosfera di N₂. Si fa rifluire la miscela di reazione per 6 h a 90 °C, si distrugge a 0 °C l'eccesso di borano con MeOH (40 mL) fino a quando non si osserva più effervescenza. Si concentra a pressione ridotta la soluzione limpida ottenuta e si dissolve la miscela bianca in MeOH per poi

concentrarla a pressione ridotta ripetendo l'operazione tre volte (3x50 mL). Infine, per eliminare definitivamente le ultime tracce di MeOH, si tratta e si concentra a pressione ridotta il prodotto in sequenza con EtOAc (17 mL) e con *i*Pr₂O (17 mL). Si aggiunge H₂O al residuo bianco ottenuto e prima si lava la miscela con etere di petrolio (5x20 mL) poi si estrae con EtOAc (5x30 mL). Si lava con brine (50 mL), si secca con Na₂SO₄ anidro le fasi di EtOAc riunite, si filtra e si concentra a pressione ridotta per ottenere **13** come un solido bianco colloidale, non del tutto secco a causa delle probabili impurezze presenti, e lo si usa per la prossima reazione senza ulteriori purificazioni. Una piccola porzione viene purificata per cromatografia su gel di silice (eluente: etere di petrolio/EtOAc 2:3) per ottenere **13** analiticamente puro.

13: R_f = 0.36; m.p. 98-99 °C; [α]_D²⁵ = + 21.2 (c = 0.525, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz): δ = 7.43-7.35 (m, 5H, Ph), 4.67 (dt, J = 1.7; 6.5 Hz, 1H, 3-H), 4.09 (parte A di un sistema AB, J = 13.2 Hz, 1H, C_HHP_h), 4.05 (parte B di un sistema AB, J = 13.2 Hz, 1H, C_HHP_h), 4.02 (br d, J = 7.1 Hz, 1H, 4-H), 3.54 (ddd, J = 11.5; 6.6; 1.2 Hz, 1H, 2-H_a), 3.33 (dd, J = 12.0, 7.1 Hz, 1H, 5-H_a), 3.14 (br d, J = 12.0 Hz, 1H, 5-H_b), 2.85 (dd, J = 11.5, 6.3 Hz, 1H, 2-H_b) ppm; ¹³C-NMR (50 MHz): δ = 132.6 (d; 2C, Ph), 130.7 (s; Ph), 129.3 (d; Ph), 128.4 (d; 2C, Ph), 78.8 (d; C-4), 78.5 (d; C-3), 67.2 (t; CH₂Ph), 64.5 (t; C-5), 63.8 (t; C-2) ppm; ¹¹B NMR (64 MHz) δ = -8.71 ppm; IR (CDCl₃): ν = 3610, 3390 (br), 2955, 2381 (B-H st), 1455 (B-N st), 1169, 1107, 1052 cm⁻¹; analisi elementare (%) calcolata per C₁₁H₁₈BNO₂ (207.1): C 63.80, H 8.76, N 6.76; trovata: C 63.70, H 9.08, N 6.73.

Sintesi del (3*R*,4*R*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diolo (**11**)

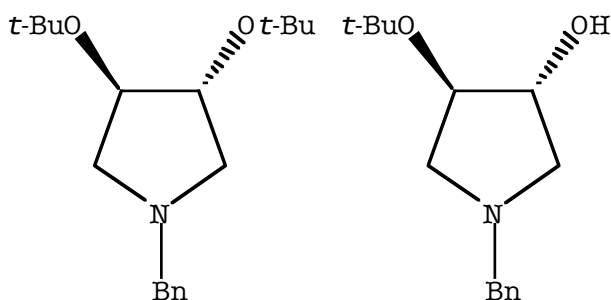


Si aggiunge una soluzione acquosa di HCl 3M (91 mL) alla sospensione dell'addotto grezzo pirrolidina-borano **13** in Et₂O (120 mL) raffreddato a 0 °C sotto agitazione. Si mantiene la sospensione a temperatura ambiente sotto agitazione finché non sia terminata la produzione di H₂ e sia avvenuta la completa dissoluzione, osservando la scomparsa del colore giallo dalla fase organica, probabilmente attribuibile alla presenza d'impurezze. Si separa la fase acquosa, che si trova a pH = 1, si lava con EtOAc (6x20 mL) e si basifica con una soluzione NaOH 3M (260 mL) mantenendo la soluzione a 0 °C sotto agitazione fino a pH=10, poi si estrae con EtOAc (6x20 mL). Si tratta infine le fasi

organiche riunite con brine (100 mL) e si secca su Na₂SO₄ anidro per poi filtrarle e concentrarle a pressione ridotta. Si ottiene la pirrolidina grezza come un solido bianco (4,255 g, 22 mmol) con una resa del 69% e la si usa nella prossima reazione senza ulteriori purificazioni.

11: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.25 - 7.35 (m, 5H, Ph), 4.03 - 4.11 (m, 2H, 3-H + 4-H), 3.63 (parte A di un sistema AB, 1H, C_HHPh, J = 12.6), 3.57 (parte B di un sistema AB, 1H, C_HHPh, J = 12.6), 3.06 (br s, 2H, OH), 2.93 (dd, 2H, 2-H_b + 5-H_a, J = 10.2, J = 5.7) 2.44 (dd, 2H, 2-H_a + 5-H_b, J = 10.2, J = 3.6) ppm

Sintesi di (3*R*,4*R*)-1-benzil-3,4-di-*ter*-butossipirrolidina (**15**) e (3*R*,4*R*)-1-benzil-4-*ter*-butossipirrolidin-3-olo (**16**)



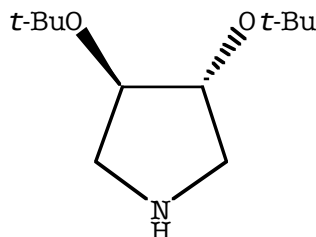
Si aggiunge goccia a goccia una soluzione di HClO₄ al 60% (3,6 mL, 33 mmol) a una sospensione di **11** (4,255 g, 22 mmol) in AcOtBu (220 mL) a 0 °C e si lascia la miscela di reazione per 17 h sotto agitazione. Si raffredda a 0 °C e si basifica fino a pH 9 aggiungendo lentamente una soluzione satura di NaHCO₃ e Na₂CO₃ solido, osservando lo sviluppo di CO₂. Si separano le due fasi e si trattano come descritto di seguito. Si lava la soluzione di *ter*-butil acetato con brine, si secca con Na₂SO₄ anidro, si filtra e si distilla a pressione ridotta per recuperare la frazione di solvente (circa 60%) che può essere riutilizzato per ulteriori reazioni. Si estrae la soluzione acquosa con CH₂Cl₂ (6x30 mL), si lavano le fasi organiche riunite con brine (60 mL) per poi seccarle su Na₂SO₄ anidro, filtrarle e concentrarle a pressione ridotta. Si purifica il prodotto grezzo su gel di silice [eluente CH₂Cl₂/MeOH (0.1% NH₃) prima 99:1, poi 97:3 ed infine 95:5] per ottenere **15** come un composto oleoso con resa del 77% (5,175 g, 16,9 mmol) e **16** con resa del 14% (0,78 g, 3,13 mmol).

15: R_f = 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH 97:3); [α]_D²⁵ = -88 (c=0.4, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.34-7.20 (m, 5H, H_{Ph}), 3.97-3.92 (m, 2H, 3-H + 4-H), 3.63 (parte A di un sistema AB, J=13.1 Hz, 1H, C_HHPh), 3.49 (parte B di un sistema AB, J=13.1 Hz, 1H, C_HHPh), 2.78 (pseudo dd, J=9.4, 6.4 Hz, 2H, 2-H_a + 5-H_a), 2.39 (pseudo dd, J=9.4, 5.1 Hz, 2H, 2-H_b + 5-H_b), 1.16 (s, 18H, CH₃ x 6) ppm; ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 138.3 (s; C_{Ph}) 128.9 (d ;

2C, CH_{Ph}), 128.1 (d ; 2C, CH_{Ph}), 126.9 (d ; CH_{Ph}), 78.2 (d ; 2C, C-3 e C-4), 73.5 (s ; 2C, CMe₃), 60.6 (t ; CH₂Ph), 60.3 (t; 2C, C-2 e C-5), 28.6 (q; 6C, CH₃) ppm; IR (CDCl₃): ν =2977, 2797, 1391, 1366, 1186 cm⁻¹; MS (EI): m/z (%) = 305 ([M⁺],9), 248 (16), 232 (3), 192 (28), 158 (6), 91 (100), 57 (92); analisi elementare (%) calcolata per C₁₉H₃₁NO₂ (305.2) = C 74.71, H 10.23, N 4.59; trovata C 74.37, H 10.24, N 4.95.

16: R_f = 0.23 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5); [α]_D²⁵ = -10 (c=0.5, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.35-7.24 (m, 5H, H_{Ph}) 4.03-3.98 (m, 2H, 3-H + 4-H), 3.70 (parte A di un sistema AB, J=12.9 Hz, 1H, C#HPh), 3.66 (parte B di un sistema AB, J=12.9 Hz, 1H, C#HPh), 3.26 (dd, J=10.1, 6.7 Hz, 1H) e 2.82 (br d, J=10.4 Hz, 1H) (2-H_a e 5-H_a), 2.68 (dd, J=10.4, 5.1 Hz, 1H) e 2.34 (dd, J=10.1, 5.4 Hz, 1H) (2-H_b e 5-H_b), 1.19 (s, 9H, CH₃ x 3) ppm; ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 137.3 (s; C_{Ph}) 128.9 (d ; 2C, CH_{Ph}), 128.3 (d ; 2C, CH_{Ph}), 127.4 (d ; CH_{Ph}), 78.6 (d), 78.2 (d; 2C, C-3 e C-4), 74.1 (s; CMe₃), 60.6 (t), 60.4 (t; 2C, C-2 e C-5), 60.1 (t; CH₂Ph), 28.4 (q; 3C, CH₃) ppm; IR (CDCl₃): ν = 2978, 2801, 1392, 1366, 1192, 1090 cm⁻¹; MS (EI): m/z (%) = 249 ([M⁺],6), 192 (27), 91 (100), 57 (19); analisi elementare (%) calcolata per C₁₅H₂₃NO₂ (249.3) = C 72.25, H 9.30, N 5.26; trovata C 71.99, H 9.18, N 5.54.

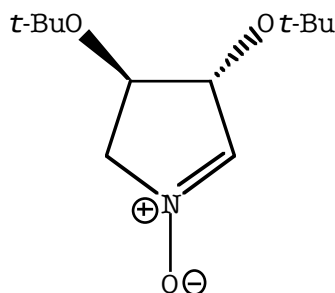
Sintesi di (3*R*,4*R*)-3,4-di-*ter*-butossipirrolidina (**17**)



Si aggiunge goccia a goccia AcOH (9.68 mL, 169,4 mmol) a una soluzione di **15** (5,175 g, 16.94 mmol) in MeOH (120 mL) mantenuta a 0 °C e sotto agitazione. Si aggiunge, sempre sotto agitazione, a temperatura ambiente il catalizzatore Pd/C (10%) (1.11 g, 1,047 mmol) e si lascia reagire per 2 h sotto atmosfera di H₂ (1 atm). Si filtra su uno strato di Celite e si lava con MeOH. Si concentra il filtrato sotto pressione ridotta, si discioglie l'olio residuo in CH₂Cl₂ (50 mL) e si tratta con una soluzione satura di NaHCO₃ (70 mL) a 0 °C fino ad ottenere un pH=9. Si separa le due fasi e si estrae con CH₂Cl₂ (5x30 mL) la fase acquosa. Si lava le fasi organiche riunite con brine (80 mL) per poi seccarle su Na₂SO₄ anidro, filtrarle e concentrarle a pressione ridotta. Si ottiene **17** come un olio bruno chiaro (3.589 g, 16,68 mol) con una resa del 99% e lo si utilizza per la prossima reazione senza ulteriori purificazioni.

17: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 3.86-3.81 (m, 2H, 3-H e 4-H), 3.09 (dd, $J=12.0$, 5.3 Hz, 2H, 2- H_a e 5- H_a), 2.66 (dd, $J=12.0$, 3.5 Hz, 2H, 2- H_b e 5- H_b), 2.41 (br s, NH), 1.17 (s, 18H, $\text{CH}_3 \times 6$) ppm; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 79.1 (d; 2C, C-3 e C-4), 73.5 (s; 2C, CMe_3), 53.9 (t; 2C, C-2 e C-5), 28.6 (q; 6C, CH_3) ppm.

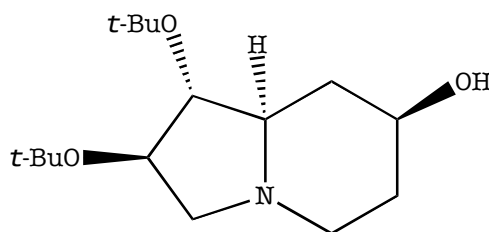
Sintesi di (3*R*,4*R*)-3,4-di-*ter*-butossi-3,4-diidro-2H-pirrolo 1-ossido (**7a**)



Si aggiunge NaHCO_3 (7 g, 83.5 mmol) a una soluzione di **17** grezzo (3.589 g, 16,7 mmol) in una miscela 4:1 di $\text{CH}_3\text{CN}/\text{THF}$ (30,5 mL) e Na_2EDTA acquoso (0,01 M, 24 mL) sotto agitazione. Si aggiunge dilazionato in 2 h Oxone[®] (11,8 g, 19,19 mmol) raffreddando a 0 °C. Si mantiene la soluzione sotto agitazione e infine si aggiunge AcOEt (30 mL). Si separa le due fasi e si estrae la fase acquosa con AcOEt (6x20 mL), si tratta le fasi organiche riunite con brine (70 mL), si secca su Na_2SO_4 anidro, si filtra e si concentra a pressione ridotta. Si ottiene un grezzo di reazione (3.439 g) e se ne purifica una parte (1,08 g) via cromatografica su gel di silice (eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}(0.1\% \text{NH}_3)$ 98:2) ottenendo **7a** puro (809 mg, 3,52 mmol), come un solido bianco, con una resa complessiva della reazione del 67%.

7a: R_f = 0.32 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}(0.1\% \text{NH}_3)$ 98:2); m.p. 75.4-77.2 °C; $[\alpha]_D^{27}$ = -166 ($c=0.7$, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 6.78-6.76 (m, 1 H, 2-H), 4.59-4.56 (m, 1H, 3-H), 4.20-4.12 (m, 2H, 5- H_a e 4-H), 3.71-3.64 (m, 1H, 5- H_b), 1.21 (s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 1.19 (s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$) ppm; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 134.9 (d; C-2), 79.0 (d; C-3), 74.8 (s; CMe_3), 74.7 (s; CMe_3), 74.2 (d; C-4), 68.3 (t; C-5), 28.2 (q; 6C, CH_3) ppm; IR (CDCl_3): ν = 2978, 1588, 1392, 1367, 1260, 1187, 1086 cm^{-1} ; MS (EI): m/z (%) = 229 ($[\text{M}^+]$, 1), 173 (16), 117 (39), 100 (18), 88 (31), 70 (43), 57 (100), 41 (42); analisi elementare (%) calcolata per $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ (229.3) = C 62.85, H 10.11, N 6.11; trovata C 63.14, H 10.06, N 6.31.

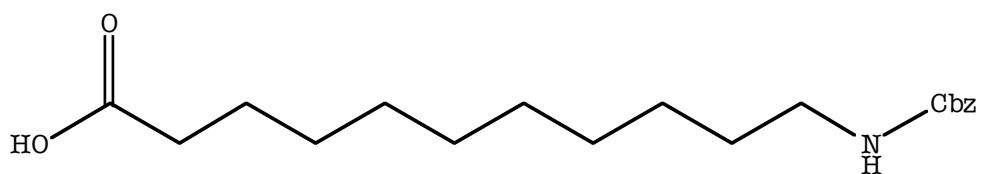
Sintesi di (1*R*,2*R*,7*S*,8*aR*)-1,2-di-*ter*-butossiottaidroindolizin-7-olo (**14**)



Si mantiene sotto agitazione a 20 °C una miscela di nitrone **7a** (100 mg, 0,44 mmol) e 3-butenil tosilato **18** (489 mg, 5 eq) per 3 giorni. Si aggiunge alla miscela di reazione Et₂O (3,9 mL) raffreddando a 0 °C, si tratta con AcOH glaciale (0,872 mL) e con polvere di Zn attivata (431 mg, 6,6 mmol); si agita infine a temperatura ambiente per 24 h. Si filtra l'eccesso di polvere di Zn e si tratta la soluzione risultante con una soluzione di NaOH 3M a 0 °C fino ad ottenere un pH=9. Si separa le due fasi e si estrae quella acquosa con CH₂Cl₂ (3x20 mL). Si tratta le fasi organiche riunite con brine, si secca su Na₂SO₄ anidro, si filtra e si concentra a pressione ridotta per ottenere una miscela diastomerica di indolizidine in rapporto 5:1:0,2. Si purifica operando una colonna cromatografica su gel di silice [eluente: CH₂Cl₂/MeOH(0.1% NH₃) inizialmente 97:3 e in seguito 95:5] per ottenere **14** pura (82,9 mg) come un solido bianco con una resa di reazione del 66%. L'eccesso di dipolarofilo **18** può essere recuperato nelle prime frazioni della separazione cromatografica e riutilizzato.

14: R_f = 0.11 (CH₂Cl₂/MeOH (1% NH₄OH) 97:3); m.p. 117.5-119.5; [α]_D²⁶ = -45 (c=0.6, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 3.83 (ddd, J=7.1, 4.0, 1.7 Hz, 1H; 2-H), 3.67 (dd, J=8.5, 4.0 Hz, 1H; 1-H), 3.58 (pseudo tt, J=10.9, 4.6 Hz, 1H; 7-H), 2.93 (ddd, J=11.2, 4.5, 2.5 Hz, 1H; 5-H_a), 2.89 (dd, J=10.1, 1.7 Hz, 1H; 3-H_a), 2.42 (dd, J=10.1, 7.1 Hz, 1H; 3-H_b), 2.21-2.15 (m, 1H; 8-H_a), 1.96 (pseudo dt, J=2.6, 11.8 Hz, 1H; 5-H_b) 1.90-1.77 (m, 2H; 6-H_b e 8a-H), 1.61 (pseudo ddt, J=11.2, 4.5, 12.3 Hz, 1H; 6-H_b) 1.27 (pseudo q, J= 11.2 Hz, 1H; 8-H_b), 1.20 (s, 9H, CH₃ x 3), 1.16 (s, 9H, CH₃ x 3) ppm; ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 82.2 (d; C-1), 77.9 (d; C-2) 73.8 (s; CMe₃), 73.7 (s; CMe₃), 69.7 (d; C-7), 65.4 (d; C-8a), 61.1 (t; C-3), 50.5 (t; C-5), 37.9 (t; C-8), 34.2 (t; C-6), 29.2 (q; 3C, CH₃), 28.7 (q; 3C, CH₃) ppm; IR (CDCl₃): ν = 3689, 3608, 2978, 2257, 1602, 1391, 1367, 1216, 1190, 1067 cm⁻¹; MS (EI): m/z (%)=285 ([M⁺], 2), 228 (51), 172 (18), 128 (9), 113 (46), 100 (16), 57 (100), 41 (54); analisi elementare (%) calcolata per C₁₆H₃₁NO₃ (285.42) = C 67.33, H 10.95, N 4.91; trovata C 67.29, H 11.21, N 4.77.

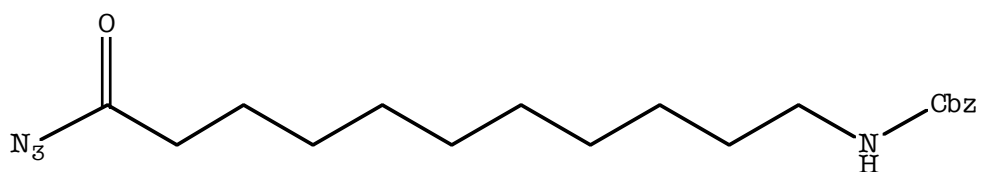
Sintesi dell'acido 11-(benzilossicarbonilammino)undecanoico (**20**)



Si aggiunge **19** (200 mg, 0,99 mmol) ad una soluzione acquosa di NaOH (2 M, 3,3 mL) sotto agitazione e si riscalda a 50 °C fino ad osservare la completa dissoluzione. Si aggiunge goccia a goccia benzil cloroformiato (0,169 mL, 1.188 mmol) con formazione di un solido bianco. Si agita vigorosamente la miscela di reazione per 2 h. Si raffredda a 0 °C e si aggiunge HCl (3 M, 2,2 mL) fino ad arrivare a pH=2. Si estrae con AcOEt (30 mL), si lava con H₂O (3x30 mL), si anidrifca su Na₂SO₄ anidro, si filtra e si concentra a pressione ridotta. Si purifica operando una ricristallizzazione da MeOH (1,25 mL) per ottenere **20** analiticamente puro con una resa del 54%.

20: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): segnali derivanti dal conformero maggiore δ = 7.39-7.28 (m, 5H; Ph), 5.09 (br s, 2H, CH₂Ph), 4.76 (br s, 1H, NH), 3.22-3.14 (m, 2H, CH₂N), 2.34 (t, J=7.5 Hz, 2H; CH₂CO₂H), 1.63 (pseudo qui, J=7.4 Hz, 2H; CH₂CH₂CO₂H), 1.53-1.42 (m, 2H; CH₂CH₂N), 1.38-1.22 (m, 12H; CH₂(CH₂)₆CH₂N) ppm; ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): selezione di segnali δ = 128.5 (d; 2C, C-meta x 2), 128.1 (d; 1C, C-para), 128.0 (d; 2C, C-orto x 2), 66.6 (t; 1C, CH₂Ph), 44.1 (t; 1C, CH₂N), 33.9 (t; 1C, CH₂CO₂H), 29.9 (t; 1C, CH₂CH₂N), 24.6 (t; 1C, CH₂CH₂CO₂H) ppm; MS (EI): m/z (%)=335 ([M⁺], 11), 317 (19), 228 (20), 220 (22), 211 (13), 210 (88), 209 (13), 208 (41), 120(19), 113 (II), 112(16), 109(11), 108 (81), 107(83), 91 (83), 84(10), 81 (11), 79(39), 77 (25), 74 (36), 73 (32), 71 (12), 70 (28), 69 (73), 68 (27), 67 (45), 63 (16), 60 (42). analisi elementare (%) calcolata per C₁₉H₂₉NO₄ (285.42) = C 68.03, H 8.71, N 4.18; trovata C 68.29, H 8.93, N 4.27.

Sintesi di benzil 11-azido-11-ossoundecilcarbamato (**21**)



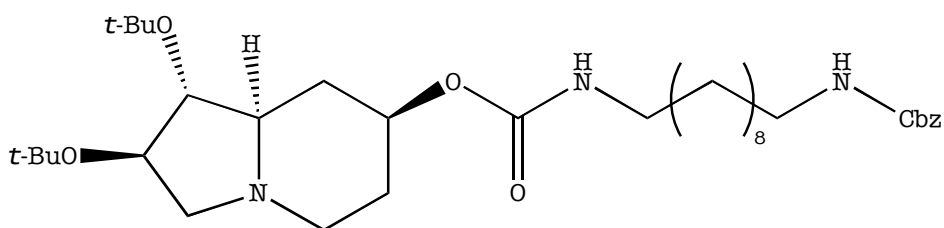
I) Metodologia: Si discioglie **20** (566 mg, 1,7 mmol) in CH₂Cl₂ (5,7 mL), si aggiunge, a 0 °C e sotto agitazione, TEA (206 mg, 2,04 mmol) e DPPA (561 mg, 2,04 mmol); si lascia la miscela di reazione a temperatura ambiente, sotto atmosfera di N₂, agitando per un'ora. Si lava prima con H₂O (4x3 mL), poi con brine (3 mL) si secca su Na₂SO₄ anidro, si filtra

e concentra a pressione ridotta. Si ottiene il prodotto **21** grezzo come un solido bianco leggermente peccioso, con una resa dell' 88% (95,04 mg, 0,26 mmol) e lo si usa nella prossima reazione senza ulteriori purificazioni.

II) Metodologia: Si distilla acetone e TEA per il primo passaggio, si discioglie **20**, sotto atmosfera di N₂ e agitazione, in acetone (2,7 mL) senza osservare la completa solubilizzazione, si raffredda a -5 °C aggiungendo TEA (0,067 mL, 0,477 mmol) e si solubilizza completamente l'acido. Si aggiunge etilcloroformiato (0,067 mL, 0,477 mmol) goccia a goccia e si lascia sotto agitazione per 30 minuti. Si prepara una soluzione acquosa di NaN₃ (3,4 M, 0,175 mL) e si aggiunge lentamente con una siringa all'ambiente di reazione. Si lascia sotto agitazione per 1 h. Si aggiunge circa 5 mL di H₂O e ghiaccio ed Et₂O (5 mL). Si estrae con Et₂O (2x5 mL). Si lava le fasi organiche riunite con brine (5 mL), si anidrifca con Na₂SO₄ anidro, si filtra e si concentra a pressione ridotta. Si ottiene il prodotto **21** grezzo con una resa dell' 89% (96,2 mg, 0,27 mmol) e lo si usa nella prossima reazione senza ulteriori purificazioni.

21: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): segnali derivanti dal conformero maggiore δ = 7.39-7.28 (m, 5H; Ph), 5.09 (br s, 2H, CH₂Ph), 4.76 (br s, 1H, NH), 3.22-3.14 (m, 2H, CH₂N), 2.34 (t, J=7.5 Hz, 2H; CH₂CO₂H), 1.63 (pseudo qui, J=7.4 Hz, 2H; CH₂CH₂CO₂H), 1.53-1.42 (m, 2H; CH₂CH₂N), 1.38-1.22 (m, 12H; CH₂(CH₂)₆CH₂N) 1.63-1.22 (m, 16H, CH₂CH₂CH) ppm; IR (CDCl₃): ν = 3452, 2930, 2857, 2258, 2137, 1714, 1515, 1455, 1358, 1227, 1156, 1079 cm⁻¹

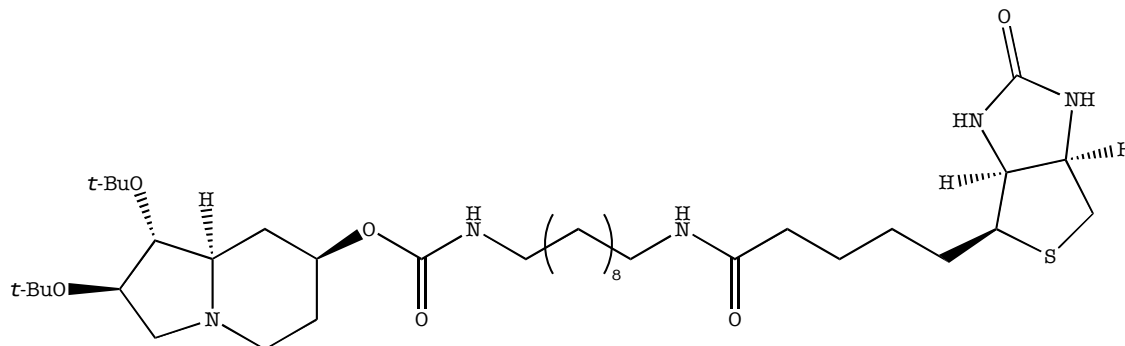
Sintesi di (1*R*,2*R*,7*S*,8*aR*)-1,2-di-*ter*-butossioctaidoindolizin-7-il 10-aminodecilcarbamato-10-Cbz (**23**)



Si discioglie l'acilazide **21** (59,1 mg, 0,167 mmol) in THF distillato (6,8 mL) in pallone a due colli sotto atmosfera di N₂ e si porta a refluxo per 30 minuti, si aggiunge una soluzione del triolo **14** sempre in THF distillato (0,11 M, 1,3 mL) e si lascia a refluxo per 24 h. Si interrompe la reazione facendo tornare la miscela di reazione a temperatura ambiente e in seguito si aggiunge MeOH (1 mL). Si purifica operando una colonna cromatografica su gel di silice (eluente: etere di petrolio/AcOEt inizialmente 2:1, in seguito 3:2 ed infine 1:1), per ottenere il prodotto **23** puro con una resa del 95% (87,2 mg, 0,141 mmol)

23: $[\alpha]_D^{29} = -25$ ($c=0.905$, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.37\text{--}7.28$ (m, 5H; Ph), 5.09 (s, 2H; CH_2Ph), 4.75 (br s, 1H; NH), 4.67–4.53 (m, 2H; NH e 7-H), 3.83(ddd, $J=6.9$, 3.9, 1.6 Hz, 1H; 2-H), 3.65 (dd, $J=8.5$, 3.9 Hz, 1H; 1-H), 3.21–3.10 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{N} \times 2$), 2.96–2.89 (m, 1H; 5- H_a), 2.88 (br d, $J=10.0$ Hz, 1H; 3- H_b), 2.44 (dd, $J=10.0$, 7.1 Hz, 1H; 3- H_a), 2.23–2.16 (m, 1H; 8- H_b), 2.07–1.97 (m, 1H; 5- H_b), 1.96–1.82(m, 2H; 6- H_b e 8- H_a), 1.64 (pseudo dq, $J=3.5$, 11.5 Hz, 1H; 6- H_a), 1.53–1.40 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N} \times 2$), 1.39–1.21 (m, 13H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ e 8- H_b), 1.18 (s, 9H; $\text{CH}_3 \times 3$), 1.16 (s, 9H; $\text{CH}_3 \times 3$) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 136.6$ (s; C=O), 128.4 (d; 2C, C-meta $\times 2$), 128.3 (d; 1C, C-para), 128.0 (d; 2C, C-orto $\times 2$) 83.3 (d; 1-C), 77.9 (d; 2-C), 73.8 (s; CMe_3), 73.7 (s; CMe_3), 72.0 (d; 7-C), 66.5 (t; CH_2Ph), 65.2 (d; C-8a), 61.1 (t; C-3), 50.3 (t; C-5), 41.1 (t; CH_2N), 40.9 (t; CH_2N), 34.5 (t; C-8), 30.7 (t; C-6), 30.0 (t; 3C, $\text{CH}_2 \times 3$) 29.4 (q; 3C, CH_3), 29.2 (q; 3C, CH_3), 29.2 (t; CH_2) 28.8 (t; 4C, $\text{CH}_2 \times 4$) ppm; IR (CDCl_3): $\nu = 3688$, 3452, 2977, 2932, 2857, 2798, 2247, 1714, 1603, 1515, 1467, 1456, 1391, 1368, 1326, 1234, 1192, 1137, 1104, 1066, 1026 cm^{-1} . MS (EI): m/z (%) = 618 ($[\text{M}^+]$, 7), 529 (3), 455 (2), 308 (3), 156 (1). analisi elementare (%) calcolata per $\text{C}_{35}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_6$ (617,86) = C 68.04, H 9.62, N 6.80; trovata C 67.74, H 9.39, N 7.03.

Sintesi di (1*R*,2*R*,7*S*,8*aR*)-1,2-di-*ter*-butossiottaidroindolizin-7-il 10-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-ossoesaidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanammido)decilcarbammato (**25**)



Si discioglie **23** (41 mg, 0,066 mmol) in MeOH (0,623 mL), si raffredda a 0 °C e si aggiunge Pd/C 10% (4,4 mg, 0,004 mmol) e AcOH (0,038 mL, 0,663 mmol), si porta la miscela di reazione a temperatura ambiente e si pone sotto atmosfera di H_2 per 1 h. Si filtra su Celite con MeOH e si concentra a pressione ridotta. Si riprende prima con toluene (3 mL) e si concentra a pressione ridotta per portar via l'AcOH, e poi con MeOH (5 mL) per evaporare il toluene rimasto. Si ottiene così il prodotto **24** con resa quantitativa e lo si usa per la prossima reazione senza ulteriori purificazioni.

Si sciogliono **24** grezzo e la biotina (17,74 mg, 0,073 mmol) in una miscela di solventi THF/ H_2O / CH_2Cl_2 in rapporto 1:1:0,5 (2,5 mL). Si aggiunge goccia a goccia a 0 °C HOBt (13,44 mg, 0,099 mmol) e EDCI HCl (18,9 mg, 0,099 mmol) e infine si lascia tornare la miscela di reazione a temperatura ambiente. Dopo 12 ore si interrompe la reazione e

operando una colonna cromatografica su gel di silice [eluente: CH₂Cl₂/MeOH(5% NH₄OH) inizialmente 10:1 in seguito 9:1], si ottiene il prodotto **25** puro con una resa del 78% (37,3 mg, 0,052 mmol)

25: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 6.33-6.14 (m, 1H; CONH), 6.04-5.86 (m, 1H; CONH), 5.56-5.36 (m, 1H; NH_{bio}) 4.79-4.70 (m, 1H; NH_{bio}), 4.63-4.51 (m, 1H; 7-H), 4.50 (dd J=7.6, 5.0 Hz, 1H; 6a-H_{bio}) 4.30 (dd J=7.6, 4.5 Hz, 1H; 3a-H_{bio}), 3.85-3.80 (m, 1H; 2-H), 3.65 (dd J=8.2, 3.8 Hz, 1H; 1-H), 3.25-3.08 (m, 5H; CH₂N x 2 e 4-H_{bio}), 2.96-2.85 (m, 3H; 3-H_a e 5-H_a e 6-H_{a bio}), 2.73 (d J=12.8 Hz, 1H; 6-H_{b bio}), 2.43 (dd J=9.8, 7.3 Hz, 1H; 3-H_b), 2.23-2.14 (m, 3H; 10-H_{bio} e 8-H_a), 2.08-1.81 (m, 3H; 5-H_b e 6-H_a e 8a-H), 1.80-1.56 (m, 5H; 6-H_b e CH₂ x 2), 1.52-1.39 (m, 6H; CH₂ x 3), 1.34-1.22 (m, 13H; 8-H_b e CH₂ x 3), 1.18 (s, 9H; CH₃ x 3), 1.16 (s, 9H; CH₃ x 3) ppm; ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 173.1 (s; C=O), 164.0 (s; C=O), 156.0 (s; C=O), 83.1 (d; C-1), 77.8 (d; C-2), 73.8 (s; CMe₃), 73.7 (s; CMe₃), 71.8 (d; C-7), 65.2 (d; C-8a), 61.7 (d; C-3a_{bio}), 60.9 (t; C-3), 60.1 (d; C-6a_{bio}), 55.6 (d; C-4_{bio}), 50.2 (t; C-5), 40.9 (t; CH₂N), 40.5 (t; C-6_{bio}), 39.4 (t; CH₂N), 36.0 (t; C-10_{bio}), 34.3 (t; C-8), 30.6 (t; C-6), 29.9, 29.5 (t; CH₂), 29.2 (t; 2C, CH₂ x 2), 29.1 (q; 3C, CH₃), 29.1 (t; 2C, CH₂ x 2), 28.6 (q; 3C, CH₃), 28.1 (t; CH₂), 28.0 (t; CH₂), 28.8 (t; CH₂), 26.6 (t; CH₂), 25.7 (t; CH₂) ppm.

Spettri:

