



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di  
Scienze Matematiche  
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in  
Chimica

# **Nuova breve ed efficiente sintesi della lentiginosina**

# **A new short and efficient synthesis of lentiginosine**

**Relatore**

Franca Maria Cordero

**Correlatore**

Alberto Brandi

**Candidato**

Stefano Magnolfi

Anno Accademico 2013/2014



## Sommario

### Introduzione

Imminozuccheri Pag. 1

La (+)-lentiginosina ed il suo enantiomero non naturale Pag. 4

Sintesi precedenti della lentiginosina Pag. 10

### Discussione

Progettazione della nuova sequenza sintetica Pag. 15

Sintesi del nitrone Pag. 17

Sintesi dell'agente alchilante Pag. 20

Generazione del reattivo di Grignard e addizione al nitrone Pag. 21

Processo domino Pag. 24

Deprotezione Pag. 28

Conclusioni Pag. 28

Materiali e metodi Pag. 30

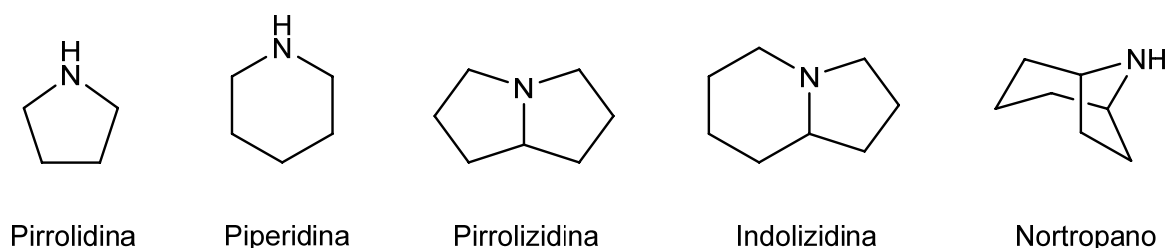
Parte sperimentale Pag. 30

## Introduzione

### Imminozuccheri

Gli imminozuccheri sono una classe di composti analoghi agli zuccheri, nei quali l'atomo di ossigeno endociclico emiacetalico è sostituito da un atomo di azoto. Proprio per questa particolarità molte delle molecole appartenenti a questa classe sono biologicamente attive, possiedono infatti la capacità di legarsi specificatamente ai siti attivi delle glicosidasi, mimandone i corrispondenti substrati naturali. Per tale motivo gli imminozuccheri costituiscono sicuramente la più interessante classe di mimetici dei carboidrati nota fino ad oggi, la loro creazione comporta numerose sfide sintetiche e spiana la strada a numerose proprietà biologiche. La maggior parte degli imminozuccheri agisce come mimetico dello stato di transizione della rottura del legame glicosidico,<sup>1,2</sup> fungendo quindi da inibitore competitivo per le glicosidasi, ma esistono anche esempi di imminozuccheri che interferiscono con gli enzimi di trasformazione dei carboidrati in modo non competitivo.<sup>3</sup>

Gli imminozuccheri possono essere classificati semplicemente secondo la loro struttura di base: le **pirrolidine**, con struttura monociclica a cinque termini; le **piperidine**, sempre a struttura monociclica, ma a sei termini; le **pirrolizidine**, bicicli [3.3.0]; le **indolizidine**, bicicli [4.3.0] e i **nortropani**, bicicli [3.2.1] (**Figure 1 e 2**).<sup>4</sup>



**Figura 1**- Classi strutturali di imminozuccheri

Le glicosidasi, anche note come glicosil idrolasi, costituiscono una classe di enzimi largamente diffusi nel nostro organismo e sono deputate all'idrolisi, la modificazione e la formazione di legami glicosidici. Tali enzimi sembrano avere un ruolo fondamentale anche nella glicosilazione delle proteine di membrana. Le glicoproteine di membrana sono importanti per la trasmissione di informazioni extracellulari e del riconoscimento cellula-cellula o cellula-virus/batterio,<sup>5</sup>

<sup>1</sup> D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11-18

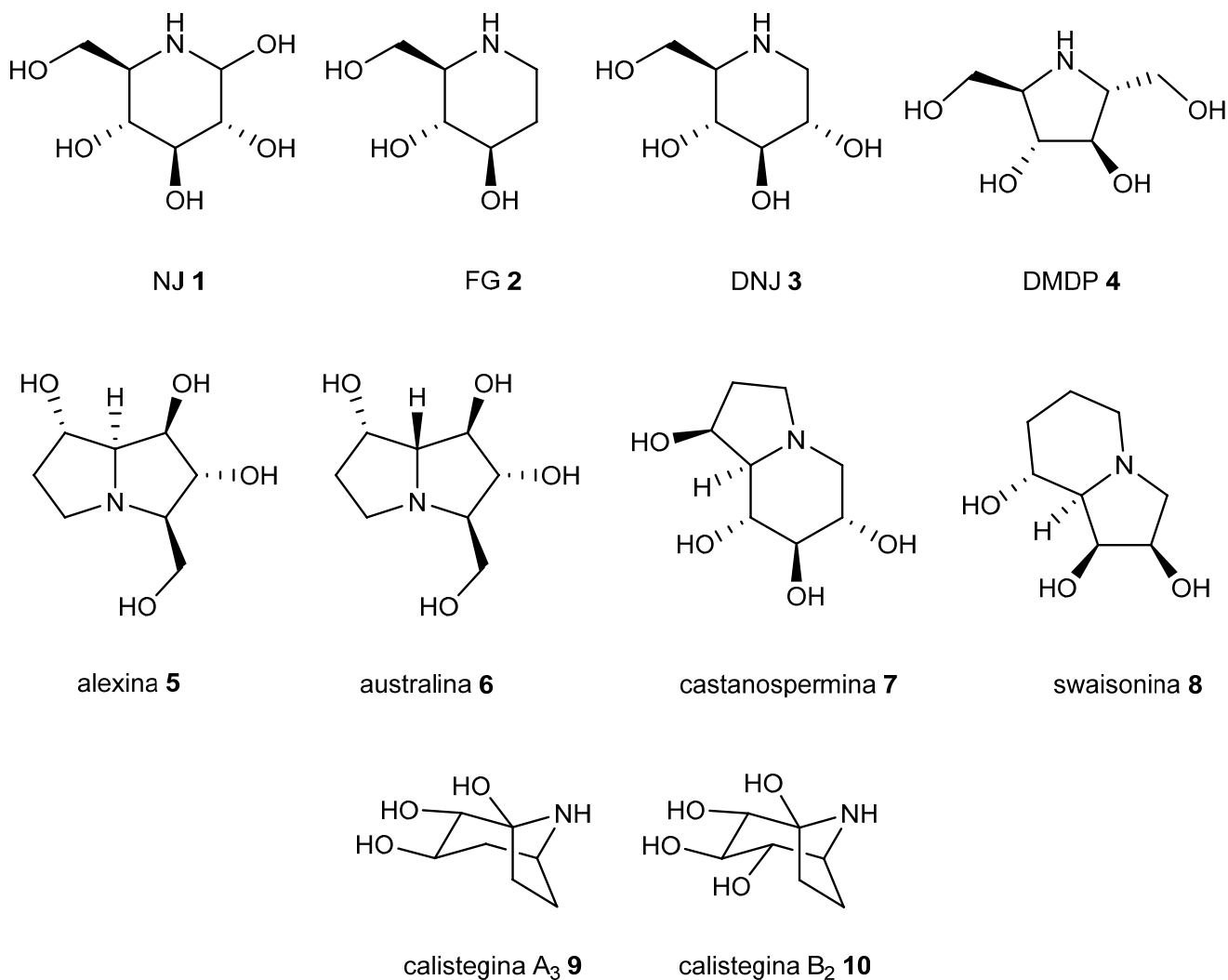
<sup>2</sup> T. D. Heightman, A. T. Vasella, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750-770

<sup>3</sup> D. D'Alonzo, A. Guaragna, G. Palumbo, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 473-505

<sup>4</sup> N. Asano, R. J. Nash, R. J. Molyneux, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645-1680

<sup>5</sup> N. Asano, *Glycobiology* **2003**, *13*, 93-104

fondamentali per l'adesione tissutale e la risposta immunitaria. Glicosilazioni aberranti di glicoproteine o di glicolipidi sono i cambiamenti molecolari che accompagnano le trasformazioni maligne e la crescita di cellule tumorali.<sup>6</sup> Per questi motivi gli inibitori di tali enzimi costituiscono un'attraente classe di composti potenzialmente in grado di curare varie patologie.<sup>7</sup>



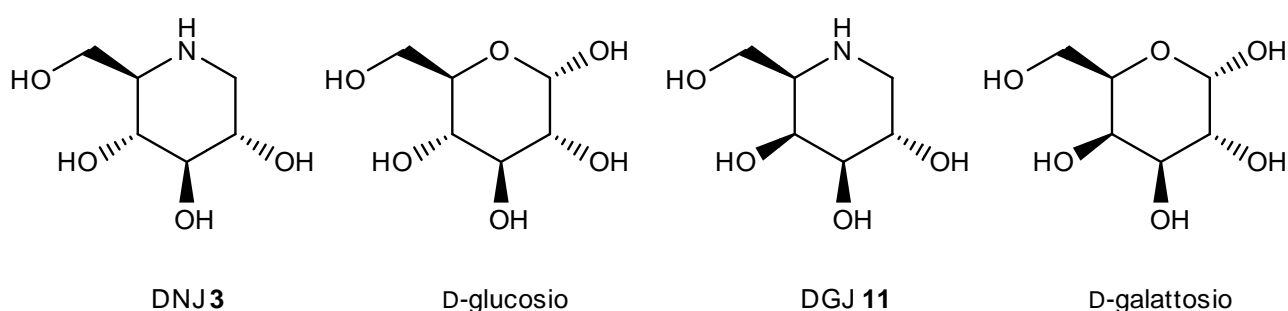
**Figura 2** – esempi di imminozuccheri naturali

Sono state inoltre individuate altre proteine, coinvolte nello sviluppo di svariate patologie, il cui meccanismo non è completamente noto, ma che possono essere interessanti target per nuovi farmaci; tra queste ricordiamo la Hsp90 (Heat Shock Protein), “chaperone” cellulare necessario alla sopravvivenza delle cellule tumorali maligne, quindi un bersaglio ideale per nuovi approcci farmacologici a terapie anticancro.

<sup>6</sup> S. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, 45, 2405-2414

<sup>7</sup> G. Horne, F. X. Wilson, J. Tinsley, D. H. Williams, R. Storer, *Drug Discovery Today* **2011**, 16(3/4), 107-118

La selettività di un imminozucchero come inibitore di differenti enzimi dipende dal numero, dalla posizione e dalla configurazione dei gruppi ossidrilici e di ogni altro sostituente sul ciclo, oltre che dalla distribuzione di carica. Un imminozucchero in cui i gruppi ossidrilici sono distribuiti nello stesso modo od in modo molto simile allo zucchero naturale substrato di un particolare enzima, è spesso inibitore specifico per tale enzima. Tali gruppi ossidrilici devono quindi avere un ruolo nel legame con il sito attivo dell'enzima e devono avere una ben precisa configurazione per essere riconosciuti. Ad esempio la DJN **3** e DGJ **11** sono potenti inibitori rispettivamente di  $\alpha$ -glucosidasi e  $\alpha$ -galattosidasi (**Figura 3**).



**Figura 3** – DNJ 3, DGJ 11 e la loro somiglianza con gli zuccheri naturali

Le applicazioni terapeutiche degli imminozuccheri sono molto vaste<sup>8, 9</sup> ed includono il trattamento di tumori, malattie infettive, malattie neurodegenerative, malattie da accumulo lisomiale, fibrosi cistica e diabete non-insulina-dipendente (tipo II). La straordinaria varietà di enzimi inibiti dagli imminozuccheri promette una nuova generazione di medicine volte alla cura di una vasta gamma di malattie (**Tabella 1**).<sup>10</sup>

**Tabella 1** - bersagli terapeutici e farmacologici degli imminozuccheri

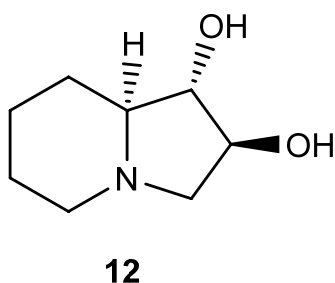
Enzymatic targets	Therapeutic targets
Glycosidases mid-1970s	Diabetes mid-1970s
Glycosyltransferases 1992	Viral diseases 1980s
Nucleoside-processing enzymes 1993	Cancers 1980s
UDP Gal mutase 1997	Lysosomal diseases 1990s
Glycogen phosphorylases 1997	Psoriasis 2000s
Metalloproteinases 2004	Cystic fibrosis 2006

<sup>8</sup> B. G. Winchester, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 645-651

<sup>9</sup> P. Compain, O. R. Martin, Editors *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Application*, John Wiley & Sons Ltd., 2007

<sup>10</sup> O. R. Martin, P. Compain (eds) 2003 *Iminosugars: recent insights into their bioactivity and potential as therapeutic agents*, in *Curr. Top. Med. Chem.*, Bentham, Hilversum, Netherlands, Volume 3, Issue 5, 471-491

## La (+)-lentiginosina ed il suo enantiomero non naturale

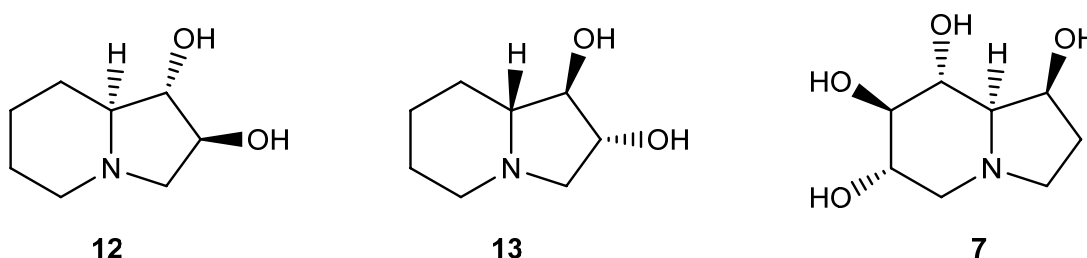


**Figura 4** - (+)-lentiginosina



**Figura 5** - *Astragalus lentiginosus* (Lentiginosae), detta anche Locoweed (“erba che provoca la pazzia”), causa locoismo per la presenza della swainosina

In questo lavoro di tesi ci siamo interessati ad uno specifico imminozucchero, la (+)-lentiginosina (**12**, **Figura 4**), una piccola molecola (PM 157) che ha mostrato delle proprietà molto interessanti. Isolata dalle foglie di *Astragalus lentiginosus* (**Figura 5**) nel 1990,<sup>11</sup> è un alcaloide diidrossiindolizidinico, con due soli gruppi ossidrilici ed è l'imminozucchero meno idrossilato in grado di mimare i substrati naturali delle glucosidasi. La (+)-lentiginosina risulta essere un inibitore selettivo delle amilogucosidasi,<sup>12</sup> ovvero degli enzimi che idrolizzano i legami 1,4 e 1,6- $\alpha$ -glucosidici, ed è il primo imminozucchero a violare la regola empirica secondo la quale sarebbero necessarie almeno tre funzioni ossidriliche in  $\beta$  all'atomo di azoto per avere proprietà inibitorie verso le glucosidasi.



**Figura 6** – (+)-lentiginosina (**12**), (-)-lentiginosina (**13**) e castanospermina(**7**)

<sup>11</sup> I. Pastuszak, R. J. Molyneux, L. F. James, A. D. Elbein, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1886-1891

<sup>12</sup> A. Brandi, S. Cicchi, F. M. Cordero, R. Frignoli, A. Goti, S. Picasso, P. Vogel, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6806-6812

La (+)-lentiginosina ha un potere inibitorio nei confronti dell'amiloglucosidasi due volte maggiore rispetto a quello della castanospermina,<sup>13</sup> questo la rende ad oggi l'imminozucchero con la più potente attività inibitoria verso questo enzima. È stato dimostrato che una componente fondamentale per l'attività biologica dell'imminozucchero **12** è l'atomo di azoto basico, oltre a ciò l'elevata e selettiva inibizione dell'amiloglucosidasi sarebbe strettamente legata all'interazione dei gruppi ossidrilici dell'imminozucchero con i residui amminoacidici dell'enzima fondamentali per l'attività biologica. Risulta quindi evidente che solo la (+)-lentiginosina con configurazione assoluta (1*S*,2*S*) e non il suo enantiomero non naturale **13** (**Figura 6**) può formare questi forti legami ad idrogeno e quindi inibire l'attività dell'enzima.

Inoltre, studi preliminari condotti in collaborazione tra il Dipartimento di Chimica dell'Università di Firenze ed il gruppo di ricerca della Prof.ssa Nunziatina De Tommasi dell'Università di Salerno hanno evidenziato per la (+)-lentiginosina una nuova attività biologica quale inibitore della già citata Hsp90<sup>14</sup>, che svolge un ruolo fondamentale in molti processi cellulari.<sup>15</sup> Il fatto che molte proteine oncogene multiple siano substrato per il processo di folding delle proteine mediato da Hsp90, unito alla scoperta che alcuni inibitori della Hsp90 tendano ad accumularsi nelle cellule tumorali in modo più efficace rispetto ai tessuti sani<sup>16</sup> e all'osservazione che Hsp90 sia iper-espressa in molte neoplasie umane, ha fatto degli inibitori di Hsp90 un attraente approccio per la cura dei tumori.<sup>17</sup>

Alcuni studi recenti, fatti in collaborazione con la Dott.ssa Beatrice Macchi dell'Università di Roma Tor Vergata, hanno dimostrato che l'enantiomero non naturale della lentiginosina, la (-)-lentiginosina (**13**), con minor tendenza all'inibizione dell'amiloglucosidasi e che non è in grado di inibire Hsp90, possiede invece una buona attività proapoptotica nei confronti delle cellule tumorali di origini differenti.<sup>18</sup> L'apoptosi (dal greco  $\alpha\pi\omicron$  «da» e  $\pi\tau\omega\sigma\iota\zeta$  «caduta») è la forma di morte cellulare programmata ed è un processo ben distinto dalla necrosi cellulare. In caso di necrosi, le cellule muoiono come risultato di un danneggiamento acuto, si rigonfiano e scoppiano, versando il loro contenuto sulle cellule vicine ed eventualmente danneggiandole.

---

<sup>13</sup> Valutata in termini di IC<sub>50</sub> (concentrazione necessaria per avere il 50% di inibizione dell'enzima) verso l'amiloglucosidasi dal *Aspergillus niger*

<sup>14</sup> F. Dal Piaz, A. Vassallo, M. G. Chini, F. M. Cordero, F. Cardona, C. Pisano, G. Bifulco, N. De Tommasi, A. Brandi, *PLoS One* **2012**, *7*, e43316

<sup>15</sup> D. Mahalingal, R. Swords, J. S. Carew, S. T. Nawrocki, K. Bhalla, *Brit. J. Cancer* **2009**, *100*, 1523-1529

<sup>16</sup> S. K. Calderwood, D. R. Ciocca, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *31*, 164-172

<sup>17</sup> a) S. K. Calderwood, D. R. Ciocca, *Int. J. Hyperther* **2008**, *24*, 31-39; b) C. Garrido, M. Brunet, C. Didelot, Y. Zermati, E. Schmitt, *Cell Cycle* **2006**, *5*, 2592-2601; c) M. Rohde, M. Daugaard, M. H. Jensen, K. Helin, J. Nylandsted, *Gene Dev.* **2005**, *19*, 570-582; d) C. Didelot, D. Lanneau, M. Brunet, A. L. Joly, A. De Thonel, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2839-2847; e) K. H. Ji-Sook, *BMB Rep.* **2009**, *42*, 623-630; f) P. Meyer, C. Prodromou, B. Hu, C. Vaughan, S. M. Roe, *Mol. Cell.* **2003**, *11*, 647-658

<sup>18</sup> B. Macchi, A. Minutolo, S. Grelli, F. Cardona, F. M. Cordero, A. Mastino, A. Brandi, *Glycobiology* **2010**, *20*, 500-506



Nell'apoptosi, invece, la cellula si raggrinzisce, il citoscheletro collassa, l'involucro nucleare si scompone e il DNA nucleare si rompe in piccoli frammenti, inoltre la superficie cellulare si altera, mostrando proprietà che causano la rapida fagocitosi della cellula morente, per esempio da parte di un macrofago. In questo caso la cellula muore "silenziosamente", senza danneggiare le cellule vicine.

In condizioni normali, l'apoptosi contribuisce al mantenimento del numero di cellule di un sistema, la quantità di volte che si verifica nei tessuti di un animale adulto in via di sviluppo è stupefacente, in un essere umano sano miliardi di cellule muoiono per apoptosi nell'intestino e nel midollo osseo ogni ora. Il meccanismo di apoptosi si attiva normalmente anche se la cellula subisce un danno grave, portando rapidamente alla sua autodistruzione.<sup>19</sup>

L'apoptosi può essere innescata da una varietà di stimoli fisiologici e patologici, e può avvenire secondo due vie principali: estrinseca od intrinseca.<sup>20</sup> La via estrinseca è ricettore-dipendente, mentre quella intrinseca viene attivata da eventi intracellulari e dipende dal rilascio di fattori proapoptotici da parte dei mitocondri. In questa seconda via, meglio compresa, i mitocondri sono indotti a rilasciare la proteina trasportatrice di elettroni, il Citocromo c, nel citosol, dove si attacca alla proteina adattatrice Apaf-1, attivandola; quest'ultima, a sua volta, trasforma la procaspasi 9 in caspasi 9, la quale attiva altre caspasi. Si genera in questo modo una cascata proteolitica che porta alla distruzione mirata di specifici target.

Inizialmente l'attività proapoptotica della lentiginosina è stata valutata studiando l'effetto di (+)-**12** e (-)-**13** sui linfociti umani. A basse concentrazioni (5 µM) entrambi gli enantiomeri hanno mostrato la capacità di aumentare il numero di cellule in proliferazione, ma a concentrazioni più alte (0.5-1 mM) il comportamento esibito dai due è risultato essere notevolmente differente: entrambi hanno mostrato la capacità di inibizione della proliferazione cellulare, ma l'effetto è stato decisamente più marcato per l'enantiomero non naturale (-)-**13**. Inoltre, mentre l'effetto di (+)-**12** è stato solo quello di rallentare la proliferazione cellulare, (-)-**13** ha mostrato una chiara attività citotossica.

Successivamente è stato studiato il meccanismo che induce l'apoptosi in alcune linee di cellule tumorali come MOLT-3, HT-29 e SH-SY5Y, ed in cellule normali PBMC (cellule sane mononucleate di sangue periferico); i risultati sono stati confrontati con quelli di test effettuati utilizzando un noto agente chemioterapico, la 7-etil-10-idrossicamptotecina (SN38). Nonostante la (-)-lentiginosina abbia mostrato un'attività proapoptotica verso le cellule tumorali inferiore

---

<sup>19</sup> B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Biologia Molecolare della Cellula*, Zanichelli, Bologna, 2009

<sup>20</sup> A. Strasser, S. Cory, J. M. Adams, *EMBO J.* **2011**, *30*, 3667

rispetto a quella di SN38, è apparsa però avere una minore attività citotossica verso le cellule sane. La (+)-lentiginosina non ha mostrato attività inibitoria per nessuna linea cellulare. I risultati sono riportati nella **Tabella 2**,<sup>21</sup> in cui MAIC<sub>50</sub> indica la concentrazione del composto in grado di inibire del 50% l'attività enzimatica mitocondriale.

**Tabella 2** – Comparazione della tossicità di (+)- e (-)-lentiginosina rispetto a SN38 su quattro linee cellulari diverse

Cell lines	Compounds	MAIC <sub>50</sub> ± SD (μM)
MOLT-3	D(-)-Lentiginosine	213.33 ± 96.62
	L(+)-Lentiginosine	>1000
	SN38	14.3 ± 2
SH-SY5Y	D(-)-Lentiginosine	95.5 ± 19.09
	L(+)-Lentiginosine	>1000
	SN38	<0.1
HT-29	D(-)-Lentiginosine	577 ± 101.3
	L(+)-Lentiginosine	>1000
	SN38	<1
PBMC	D(-)-Lentiginosine	384.52 ± 49.02
	L(+)-Lentiginosine	>1000
	SN38	<1

Per caratterizzare più nello specifico l'attività citotossica di (-)-**13**, le stesse linee cellulari considerate precedentemente sono state trattate per 18 ore con (+)-**12** e (-)-**13** a concentrazioni comprese tra 10 μM e 1000 μM e l'apoptosi è stata valutata come percentuale di nuclei ipodiploidi (**Figura 7**).

<sup>21</sup> A. Minutolo, S. Grelli, F. Marino-Merlo, F. M. Cordero, A. Brandi, B. Macchi, A. Mastino, *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e358

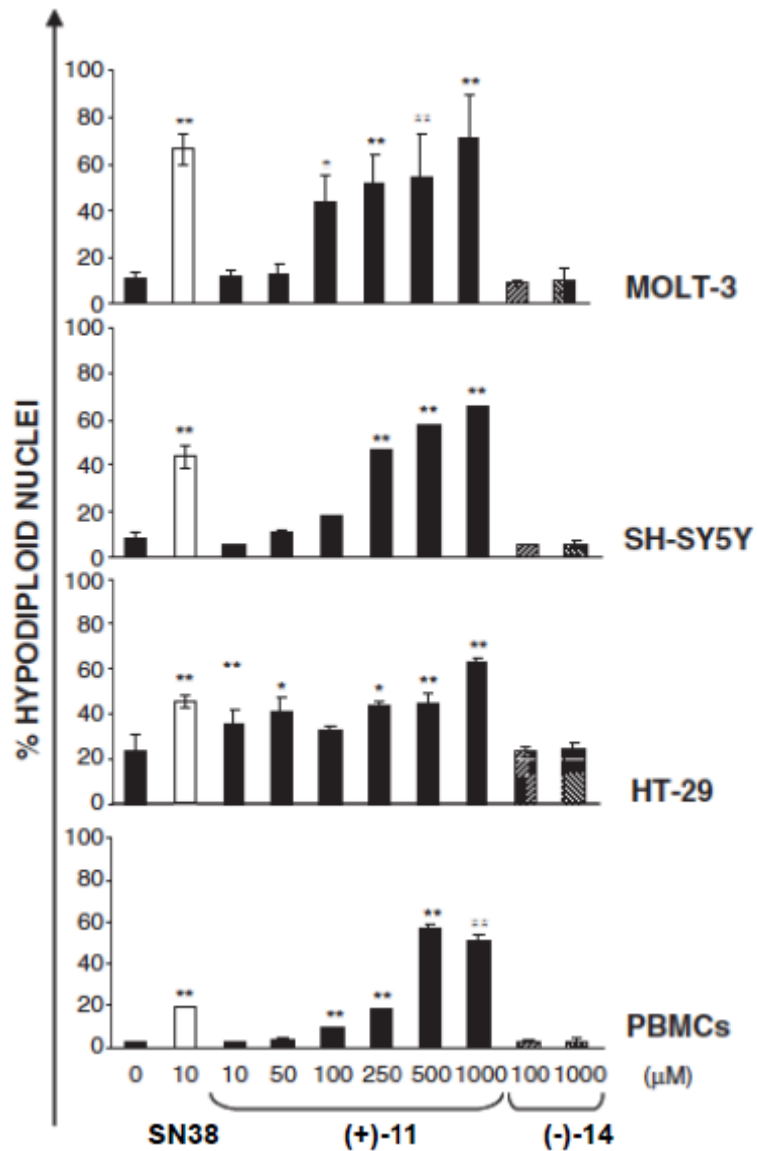
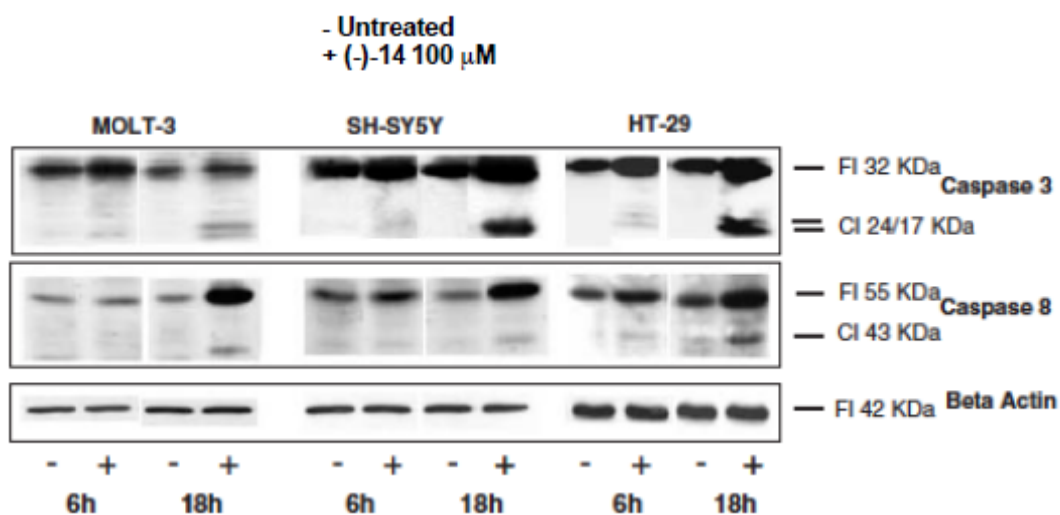


Figura 7 – Effetto di (+)-12 e (-)-13 sull'apoptosi di alcune linee cellulari

È stato inoltre osservato un aumento di Citocromo c nel citoplasma delle cellule trattate con (-)-13 rispetto alle cellule di riferimento, si può quindi dedurre che il fenomeno di apoptosi indotto da (-)-13 sia caspasi-dipendente, come confermato dall'aumentata espressione dell'attività delle caspasi-3 e -8 in cellule trattate a parità di beta-actina (Figura 8).



**Figura 8** – Espressione della caspasi-3 e della caspasi-8 in MOLT-3, SH-SY5Y e HT-29 dopo 6 e 18 ore di incubazione con 100  $\mu$ M di (-)-lentiginosina **13**. Ogni pozzetto è caricato con la stessa quantità di proteina, come dimostrato dall'identico livello di espressione della beta-actina

Questi studi stabiliscono che l'enantiomero non naturale della lentiginosina (-)-**13** è dotato di un possibile effetto anti-oncogeno che potrebbe essere attribuito non solo alla sua capacità di inibire glicosidasi, ma anche ad altri meccanismi attualmente sconosciuti.<sup>21</sup>

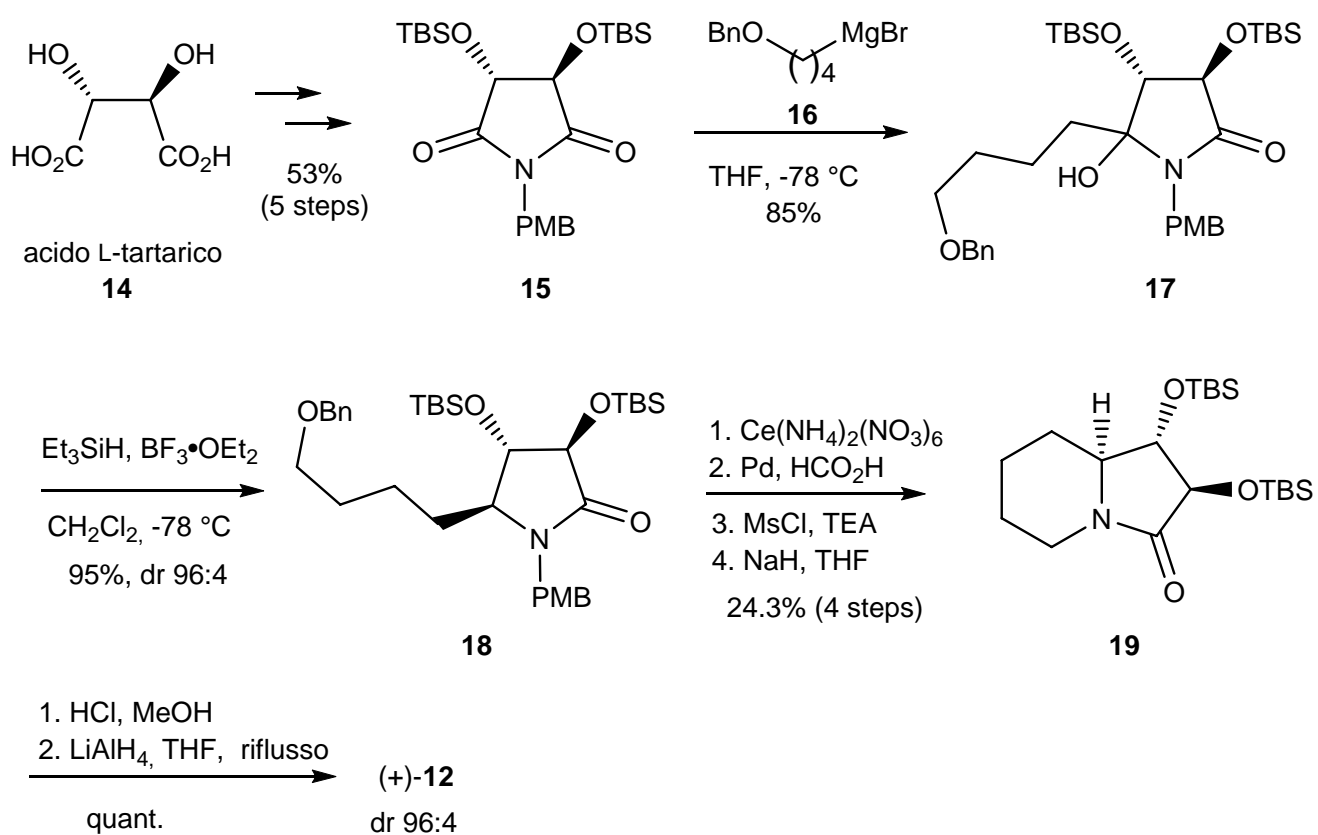
Per la sua importante attività biologica e la sua struttura relativamente semplice, la lentiginosina ha ispirato molteplici lavori di sintesi,<sup>22, 23</sup> la maggior parte di questi sono basati su materiali di partenza appartenenti al chiral pool, mentre solo in alcuni casi si fa ricorso a sintesi enantioselettive. Fra i materiali di partenza otticamente attivi impiegati, quello più largamente utilizzato è l'acido tartarico, per il suo basso costo e per la possibilità di installare direttamente la giusta configurazione assoluta agli stereocentri C-1 e C-2 nella molecola target.

<sup>22</sup> F. Cardona, A. Goti, A. Brandi, *Eur. J. Chem.* **2007**, 1551-1565

<sup>23</sup> F. M. Cordero, D. Giomi, A. Brandi, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 1294-1307

## Sintesi precedenti della lentiginosina

La prima sintesi totale della (+)-lentiginosina è stata realizzata da Yoda e collaboratori nel 1993,<sup>24</sup> utilizzando come materiale di partenza l'acido L-tartarico (**14**) che è stato convertito nell'imide **15** in 5 steps con una resa complessiva del 53% (**Schema 1**).<sup>25</sup> La successiva alchilazione di **15** con il reagente di Grignard **16** seguita da deossigenazione di **17** ha portato alla formazione del lattame **18** che presenta la corretta configurazione del nuovo centro stereogenico. La ciclizzazione di **18** attraverso una sequenza di deprotezione ed attivazione dell'alcol primario e dell'azoto amidico ha dato il lattame **19**. La sintesi della lentiginosina (+)-**12** contenente il 4% dell'epimero al C-8a è stata infine completata via idrolisi dei silil eteri e riduzione del lattame.



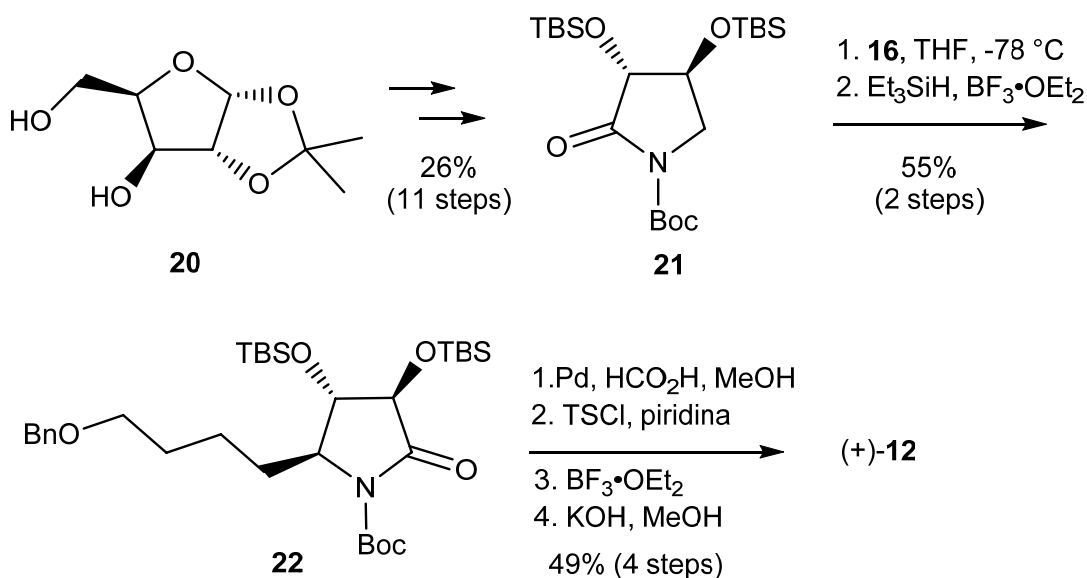
Schema 1

In seguito i medesimi autori hanno riportato una nuova sintesi della lentiginosina, basata su una strategia simile ma utilizzando come materiale di partenza il derivato del D-xilosio **20** (**Schema**

<sup>24</sup> H. Yoda, H. Kitayama, T. Katagiri, K. Takabe, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1455-1456

<sup>25</sup> a) H. Yoda, K. Shirakawa, K. Takabe, *Chem. Lett.* **1991**, 489-490; b) H. Yoda, K. Shirakawa, K. Takabe, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3401-3404

2).<sup>26</sup> In questo caso (+)-**12** è stato ottenuto in forma enantiomericamente pura in 17 steps e con una resa complessiva del 7%.



Schema 2

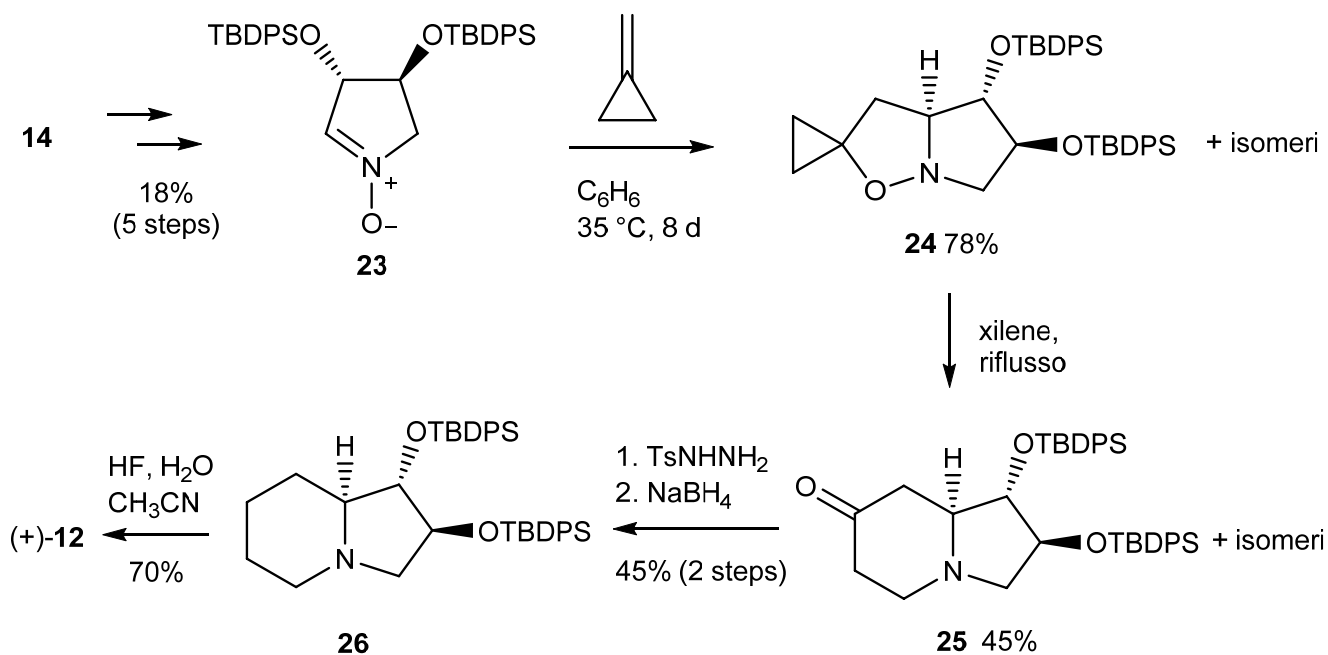
Il primo approccio sintetico della lentiginosina sviluppato dal gruppo di ricerca del Prof. Brandi del Dipartimento di Chimica dell'Università di Firenze prevede una metodologia basata sulla cicloaddizione 1,3-dipolare del metilene-ciclopropano con il nitrone ciclico **23** derivato dall'acido L-tartarico<sup>27</sup> (Schema 3).<sup>28</sup> Il cicloaddotto **24**, ottenuto con buona regio- e diastereoselettività è stato poi trasformato nell'indolizidinone **25** per trasposizione termica.<sup>29</sup> La riduzione del chetone e la deprotezione dei gruppi ossidrilici ha completato la sintesi della (+)-lentiginosina (**12**). Anche l'enantiomero (-)-**13** è stato preparato seguendo la medesima procedura utilizzando il nitrone enantiomerico di **23** derivante dall'acido D-tartarico.

<sup>26</sup> H. Yoda, M. Kawauchi, K. Takabe, *Synlett* **1998**, 137-138

<sup>27</sup> R. Ballini, E. Marcantoni, M. Petrini, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1316-1318

<sup>28</sup> F. M. Cordero, S. Cicchi, A. Goti, A. Brandi, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 949-952

<sup>29</sup> a) A. Brandi, S. Cicchi, F. M. Cordero, A. Goti, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1213-1269; b) A. Brandi, F. M. Cordero, F. De Sarlo, A. Goti, A. Guarna, *Synlett* **1993**, 1-8



Scheme 3

I maggiori inconvenienti della sintesi appena descritta sono la non completa regioselettività della cicloaddizione, la bassa chemoselettività della trasposizione termica e la bassa resa della riduzione del chetone **25** a lentiginosina protetta **26**. Per tali motivi è stata messa a punto una nuova sintesi di (+)-**12** in cui lo step chiave è ancora una cicloaddizione 1,3-dipolare di un pirrolin-*N*-ossido derivato dall'acido tartarico ma con un dipolarofilo diverso. In particolare nel nuovo approccio è stato fatto reagire il nitrone protetto con *t*-butile **26** (generato dall'acido L-tartarico mediante una nuova procedura sviluppata dal medesimo gruppo<sup>30</sup> ed in seguito ulteriormente migliorata<sup>31</sup>) con il 3-buten-1-olo (**27**) come dipolarofilo (Scheme 4).<sup>32, 31</sup> In questo caso, la cicloaddizione è totalmente regioselettiva e anche la diastereoselettività è alta e a favore dell'addotto *anti-exo* **28** (isolato con resa del 79%) che presenta la corretta configurazione all'atomo di carbonio a testa di ponte.

Il cicloaddotto maggioritario **28** è stato trasformato, secondo il protocollo di Tufariello,<sup>33</sup> nel corrispondente mesilato e quindi idrogenato in presenza di Pd su carbone catalitico per dare il triolo protetto **29**. La deprotezione di **29** con acido trifluoroacetico ha dato la (7*R*)-idrossilentiginosina **31** con una buona resa complessiva del 31.6% rispetto all'acido tartarico (9 steps). La sintesi della lentiginosina è stata invece completata attraverso una deossigenazione

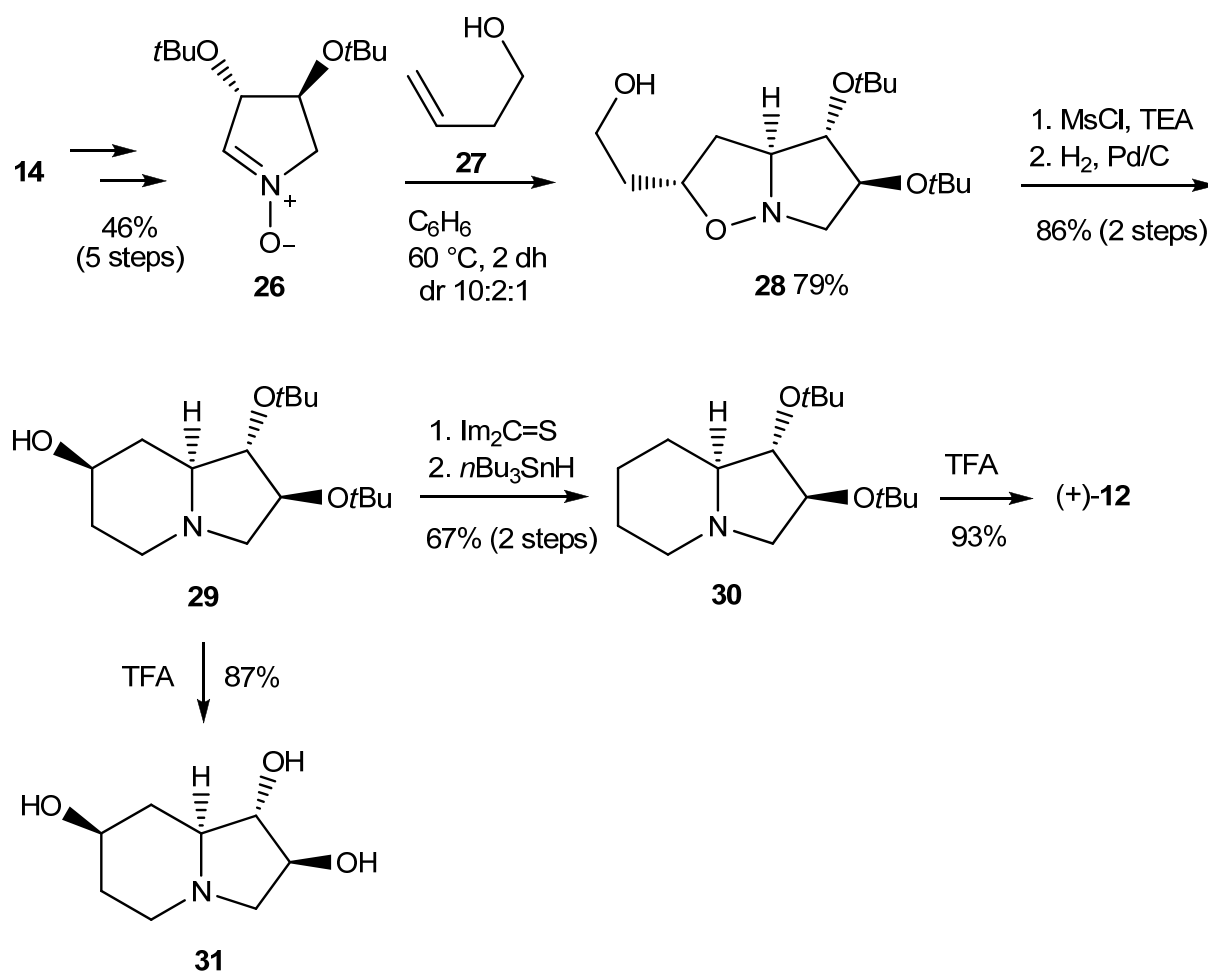
<sup>30</sup> S. Cicchi, I. Höld, A. Brandi, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5274-5275

<sup>31</sup> F. M. Cordero, P. Bonanno, B. B. Khairnar, F. Cardona, A. Brandi, B. Macchi, A. Minutolo, S. Grelli, A. Mastino, *ChemPlusChem* **2012**, *77*, 224-233

<sup>32</sup> A. Goti, F. Cardona, A. Brandi, *Synlett* **1996**, 761-763

<sup>33</sup> a) J. J. Tufariello, *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 396-403; b) J. J. Tufariello, J. P. Tette, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3866-3869; c) J. J. Tufariello, J. J. Tegeler, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *45*, 4037-4040

radicalica<sup>34</sup> in due steps dell'alcol **29**. La indolizidina protetta **30** è stata infine trattata con acido trifluoroacetico per ottenere (+)-**12** in forma enantiopura (**Schema 4**) in 11 steps e resa complessiva del 19.5%, contro i 10 steps e resa complessiva del 2.0% della sintesi precedente.<sup>28</sup> Partendo dall'acido D-tartarico, sono stati ottenuti in modo analogo anche gli enantiomeri (-)-**13** e *ent*-**31**.<sup>35, 31</sup> Test biologici hanno dimostrato che anche *ent*-**31** è un buon agente proapoptotico con un'attività analoga a (-)-**13**.<sup>31</sup>



Schema 4

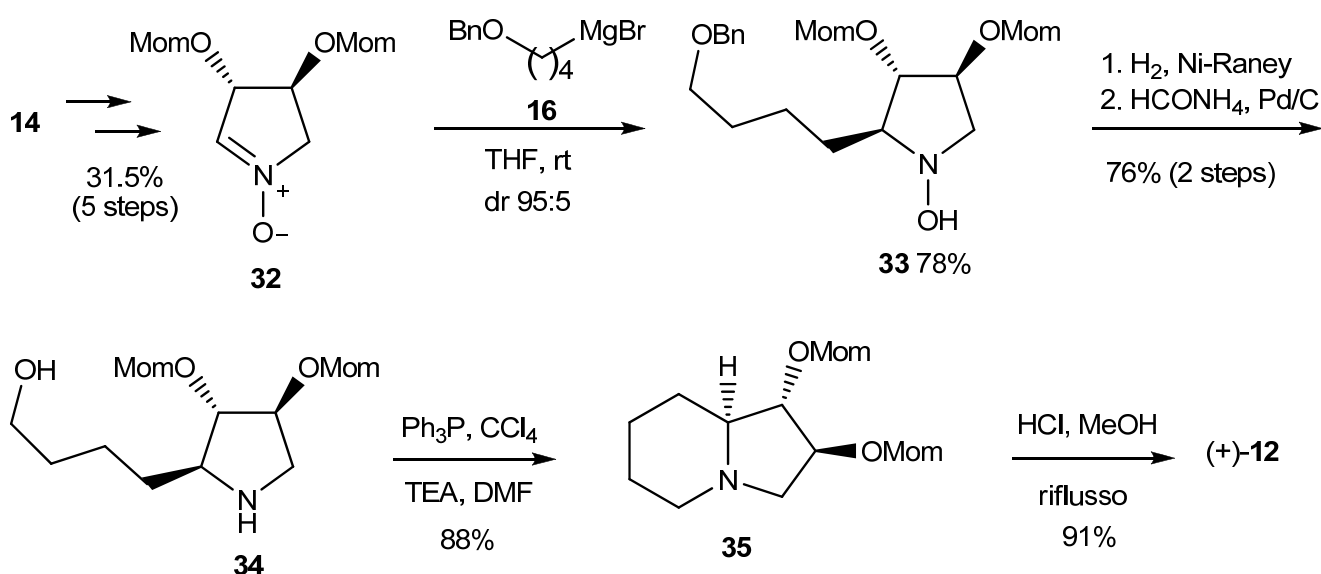
Altri autori hanno sintetizzato la lentiginosina attraverso cicloadizione 1,3-dipolare di pirrolin-*N*-ossidi enantiopuri derivati dall'acido tartarico con vari dipolarofili e successiva elaborazione dei cicloadotti,<sup>22, 23</sup> mentre nella sintesi proposta dal gruppo di Petrini il nitrone non è stato fatto reagire con un dipolarofilo ma con un agente alchilante. In questo protocollo l'addizione a **30** del reagente organometallico **16**, precedentemente utilizzato da Yoda (vedi **Schema 1** e **Schema 2**), è lo step chiave che permette di controllare la configurazione del carbonio a testa di ponte C-8a

<sup>34</sup> D. H. R. Barton, S. W. McCombie, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, 1574-1585

<sup>35</sup> F. Cardona, A. Goti, S. Picasso, P. Vogel, A. Brandi, *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 585-601



dell'indolizidina **12**.<sup>36</sup> L'attacco del (4-benzilossibutil)magnesio bromuro (**16**) a **32** ha prodotto una miscela 95:5 di due diastereoisomeri, con l'isomero *trans*-**33** prevalente (**Schema 5**). La riduzione dell'idrossilammina **33** e debenzilazione dell'alcol primario ha dato l'amminoalcol **34** che in seguito a clorurazione ha ciclizzato spontaneamente ad indolizidina **35**. L'idrolisi acida dei gruppi metossimetil eteri ha infine portato alla formazione di (+)-**12**. In questo caso la lentiginosina è stata ottenuta con una resa complessiva del 14.9% rispetto all'acido tartarico (10 steps).



**Schema 5**

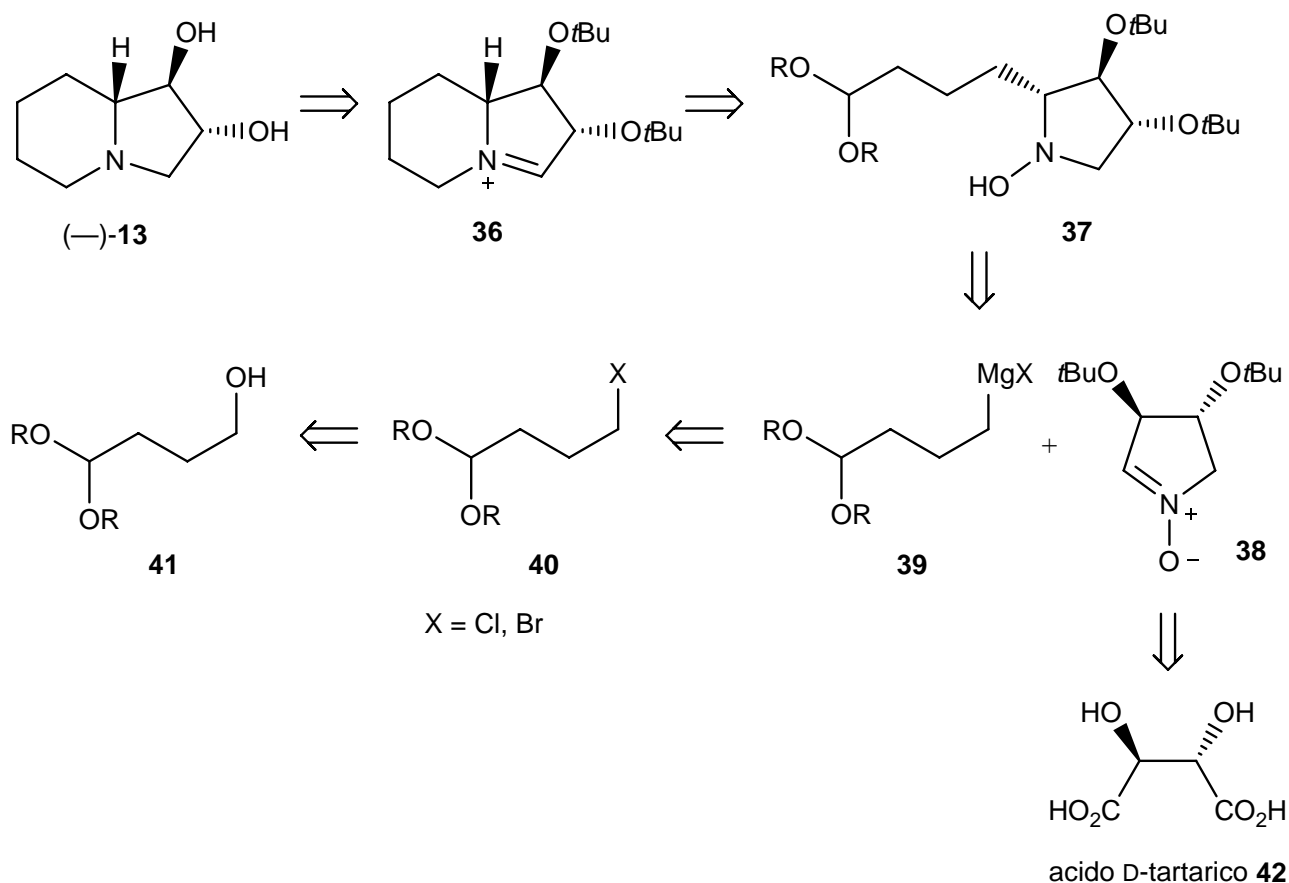
Lo scopo principale di questa tesi è stato quello di trovare un'altra via di sintesi della (–)-lentiginosina più breve e possibilmente più efficiente di quelle attualmente conosciute e che permetta di sintetizzare questo composto in quantità sufficiente per testarne la tossicità e l'attività antitumorale in vivo. La sintesi descritta nello **Schema 4** permette di ottenere la 7-idrossi-lentiginosina **31** con ottima resa (59% a partire dal nitrone **26**) ed è stata largamente utilizzata per sintetizzare vari derivati della lentiginosina 7-sostituiti in entrambe le forme enantiomeriche, tuttavia lo step di deossigenazione di **29** necessario per ottenere la lentiginosina non sostituita non è risultato essere facilmente riproducibile specie su grande scala. Utilizzando il nitrone enantiomerico di **26** come building block chiave abbiamo deciso di rivisitare la sintesi di Petrini<sup>36</sup> (**Schema 5**) nel tentativo di renderla più veloce, efficiente ed economicamente vantaggiosa.

<sup>36</sup> R. Giovannini, E. Marcantoni, M. Petrini, *J. Org. Chem* **1995**, 60, 5706-5707

## Discussione

### Progettazione della nuova sequenza sintetica

Il gruppo *t*-butilico è stato scelto come gruppo protettore dei diidrossi nitrone **38** poiché a causa del maggiore ingombro sterico rispetto al metossimetile utilizzato da Petrini, dovrebbe essere capace di indurre una maggiore stereoselettività nella reazione di alchilazione del nitrone e di conseguenza aumentare la resa dell'*N*-idrossipirrolidina **37** (Schema 6). In effetti recentemente i gruppi di ricerca di Grigorev,<sup>37</sup> Goti<sup>38</sup> e Tejero<sup>39</sup>, hanno descritto, addizioni completamente diastereoselettive a **26**, enantiomero del nitrone da noi considerato, di alchil-, vinil- e aril-Grignard, rispettivamente. Inoltre, il nitrone **38** può essere facilmente ottenuto con buona resa e riproducibilità a partire dall'acido D-tartarico attraverso una procedura recentemente messa a punto nel nostro gruppo di ricerca.<sup>31</sup>



**Schema 6** - Progetto retrosintetico per la sintesi dell'agente proapoptotico (-)-**13**

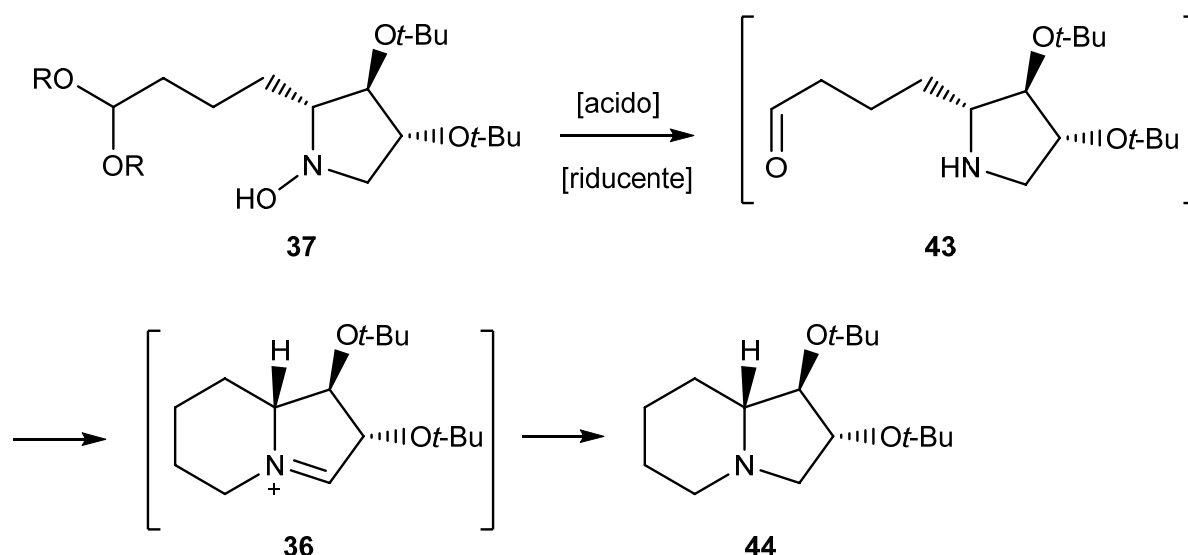
<sup>37</sup> D. A. Morzov, I. A. Kirilyuk, D. A. Komarov, A. Goti, I. Yu. Bagryanskaya, N. Kuratieva, I. A. Grigorev, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10688-10698

<sup>38</sup> F. Cardona, G. Moreno, F. Guarna, P. Vogel, C. Schuetz, P. Merino, A. Goti, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6552-6555

<sup>39</sup> A. Goti, S. Cicchi, V. Mannucci, F. Cardona, F. Guarna, P. Merino, T. Tejero, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4235-4238

Il nostro progetto prevede inoltre di utilizzare un reagente di Grignard funzionalizzato non con un benzil etere ma con un opportuno gruppo funzionale, che una volta deprotetto, possa reagire immediatamente con l'ammina secondaria formando lo scheletro biciclico desiderato. In particolare abbiamo pensato di inserire un gruppo aldeidico protetto come acetale. Questa scelta dovrebbe permettere di formare l'anello indolizidinico di **13** a partire dall'idrossilammina **37** attraverso 4 trasformazioni che possono avvenire nel medesimo ambiente di reazione riduttivo-acido, senza bisogno di cambiare condizioni, di fare aggiunte successive di reagenti o di purificare gli intermedi. La sequenza attesa comprende le due reazioni parallele di riduzione dell'idrossilammina ad ammina e di idrolisi dell'acetale con generazione del gruppo aldeidico, a cui dovrebbe seguire spontaneamente una condensazione intramolecolare con formazione dello ione imminio **36** che può ridursi direttamente nell'ambiente di reazione per dare la lentiginosina protetta (**Schema 7**).

Questa sequenza è un esempio di reazione domino,<sup>40</sup> ossia una trasformazione che avviene in più step e in cui la reazione successiva avviene grazie alle funzionalità prodotte nella reazione che la precede, senza dover effettuare variazioni delle condizioni di reazione o dover aggiungere nuovi reagenti, in una serie di processi che, proprio come accade per la caduta delle tessere nell'omonimo gioco, si susseguono nel tempo.



**Schema 7** – reazione domino

Tali reazioni sono incredibilmente vantaggiose a livello economico, ecologico e pratico rispetto alle sintesi stepwise, dato che non è necessario isolare i vari intermedi si ha una notevole diminuzione del consumo di solventi, reagenti, materiali adsorbenti ed energia, in aggiunta si

<sup>40</sup> L. F. Tietze, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 115-136

ridimensiona la quantità di lavoro necessaria. Questa procedura risulta quindi molto adatta in previsione di un futuro sviluppo su scala ancora maggiore del prodotto desiderato.

Per verificare la fattibilità ed efficienza di questo nuovo approccio sintetico sarà necessario scegliere un opportuno gruppo protettore dell'aldeide che permetta una semplice costruzione del reagente di Grignard **39** e che possa essere rimosso in condizioni in cui gli esteri *t*-butilici sono stabili. Inoltre dovrà essere studiata l'alchilazione del nitrone **38** e quindi messe a punto le condizioni di reazione che possano far avvenire il processo domino sopra illustrato.

### Sintesi del nitrone

Il 3,4-diidrossi-pirrolin-*N*-ossido diprotetto enantiopuro **38** rappresenta uno dei due “building block” di questa sintesi. Può essere prodotto a partire dall'*D*-acido tartarico (**42**), materiale economico e ampiamente presente in natura, che presenta il vantaggio di possedere entrambi gli ossidrili già nella configurazione desiderata. In generale i diidrossi-pirrolin-*N*-ossidi possono essere ottenuti attraverso due strategie complementari<sup>41</sup> che constano entrambe di cinque step con ossidazione finale, e che vengono scelte a seconda del gruppo protettore per gli ossidrili che si intenda inserire. La procedura utilizzata in questo lavoro di tesi è stata inizialmente sviluppata da Petrini,<sup>27</sup> ed in seguito applicata per vari gruppi protettori dal gruppo dell'Università di Firenze.<sup>30, 42</sup> Recentemente questa strategia è stata estesa anche alla sintesi del *t*-butossi-pirrolidin-*N*-ossido (**38**). La presenza dei gruppi *t*-butilici è di fondamentale importanza a causa del loro notevole ingombro sterico che, come detto in precedenza,<sup>37, 38, 39, 41</sup> permette di introdurre un alto controllo diastereofacciale durante la reazione di alchilazione. La stabilità di questi gruppi protettori in presenza di reagenti organometallici li rende perfettamente compatibili con la reazione di alchilazione del nitrone. Al contrario la facilità con cui vengono idrolizzati in ambiente acido può comportare dei problemi di chemoselettività nel processo di deprotezione del gruppo acetalico e di amminazione riduttiva intramolecolare. Per questo motivo le condizioni del processo domino andranno attentamente studiate per evitare la contemporanea deprotezione dei gruppi ossidrilici, anche se, in un secondo momento potrebbe essere interessante valutare anche la possibilità di effettuare la loro deprotezione parallelamente al processo domino, aumentando ulteriormente la “step-economy” della sintesi.

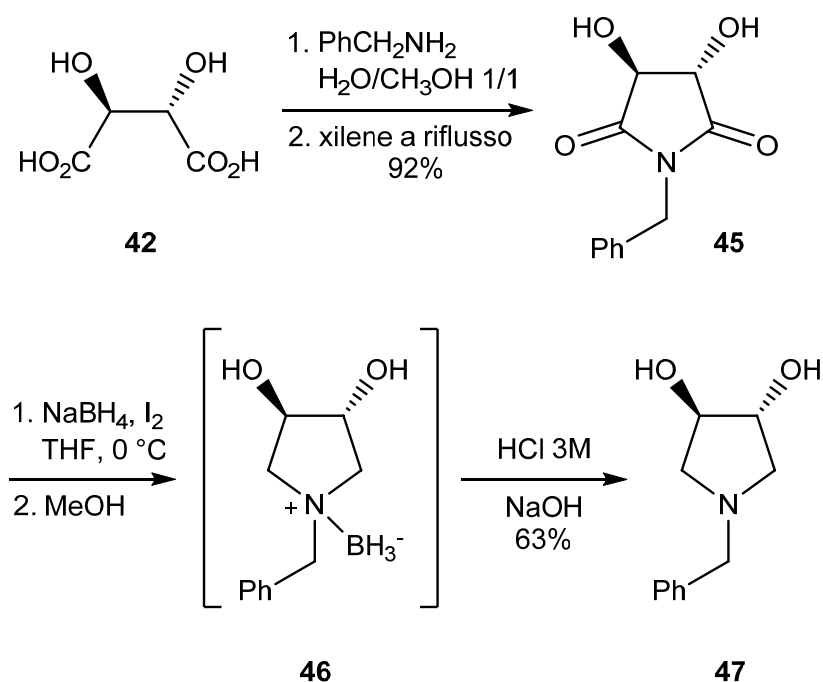
---

<sup>41</sup> J. Revuelta, S. Cicchi, A. Goti, A. Brandi, *Synthesis* **2007**, 4, 485-504

<sup>42</sup> F. M. Cordero, P. Bonanno, S. Neudeck, C. Vurchio, A. Brandi, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 1155-1161

La benzilimide **45** è stata ottenuta con una resa del 92% facendo reagire il sale della benzilammina con l'acido D-tartarico (**42**) in xilene a refluxo, con rimozione azeotropica dell'H<sub>2</sub>O, come recentemente riportato da Rosenberg e colleghi.<sup>43</sup>

In seguito **45** è stata ridotta all'intermedio borazinico **46** con borano generato in situ da NaBH<sub>4</sub> e I<sub>2</sub> in THF a 0 °C. A completamento della reazione occorre aggiungere metanolo per eliminare l'eccesso di riducente, ottenendo così la borazina **46** che può essere isolata e caratterizzata o direttamente trattata con acido cloridrico acquoso per ottenere la pirrolidina benzilata **47** (**Schema 8**). In questo lavoro **47** è stata ottenuta con una resa del 63% rispetto all'imide **45**.

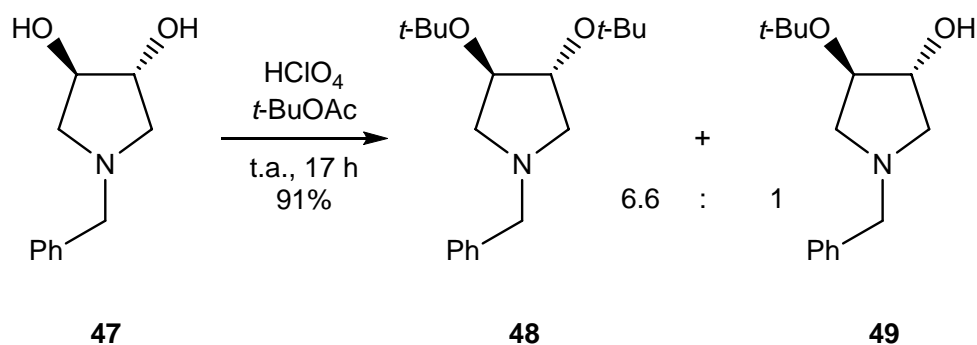


Schema 8

Dopo la neutralizzazione, l'estrazione dalla fase acquosa di **47** deve essere fatta oculatamente a causa dell'elevata idrosolubilità della diidrossipirrolidina, che potrebbe in parte rimanere nella fase acquosa abbassando la resa.

Il passo successivo è stato la protezione dei gruppi ossidrilici *trans* presenti sulla pirrolidina-*N*-benzilata come *t*-butileteri. La protezione è necessaria affinché i gruppi ossidrilici non interferiscano nella reazione di alchilazione e per rendere più solubili gli intermedi nei solventi organici. La *t*-butilazione è stata effettuata a temperatura ambiente con *t*-butilacetato in presenza di acido perclorico in eccesso (1.5 equiv.) in 17 ore. È stata ottenuta una miscela 6.6 : 1 delle pirrolidine di- e monoprotette **48** e **49** con una resa complessiva del 91% (**Schema 9**).

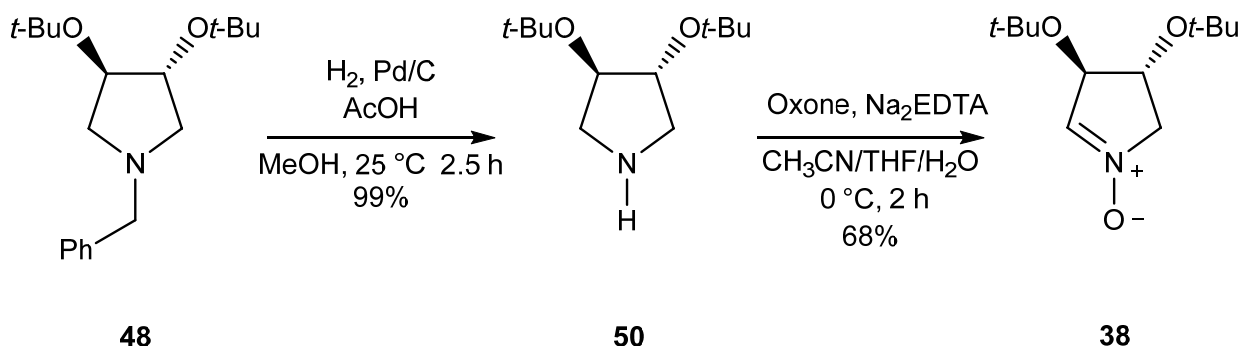
<sup>43</sup> D. Rejman, P. Kočalka, M. Buděšinský, R. Pohl, I. Rosenberg, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1243-1253



Schema 9

La miscela dei prodotti è stata separata mediante colonna cromatografica, recuperando anche la pirrolidina monoprotetta **49**, che può essere riutilizzata nella sintesi di **48**.

La deprotezione dell'atomo di azoto è stata fatta per idrogenazione su Pd/C. Questo è un passaggio delicato, tempi di reazione troppo lunghi possono portare ad una parziale deprotezione dei gruppi ossidrilici, per evitare questo problema bisogna controllare frequentemente il procedere della reazione via TLC e fermarla immediatamente quando il prodotto di partenza ha reagito completamente. Questa reazione avviene in circa 2.5 h a temperatura ambiente, in metanolo in presenza di acido acetico (10 equiv.), con una resa del 99% (Schema 10).



Schema 10

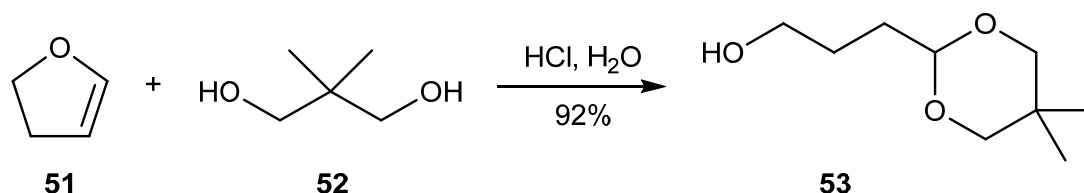
Infine il nitrone **38** è stato ottenuto ossidando la pirrolidina **50** seguendo la procedura messa a punto da Font e colleghi.<sup>44</sup> Come reagente ossidante è stato utilizzato l'Oxone®, una miscela di perossimonosolfato di potassio ( $\text{KHSO}_5$ ), idrogenosolfato di potassio ( $\text{KHSO}_4$ ) e solfato di potassio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) in rapporto 2:1:1. La reazione è condotta in un sistema bifasico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  aq.) –  $\text{CH}_3\text{CN}$  – THF in presenza di  $\text{NaHCO}_3$  a 0 °C. Dopo la purificazione con colonna cromatografica è stato ottenuto il nitrone **38** con una resa del 68%.

<sup>44</sup> a) F. Sánchez-Izquierdo, P. Blanco, F. Busqué, R. Alibés, P. De March, M. Figueredo, J. Font, T. Parella, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1769-1772; b) C. Gella, È. Ferrer, R. Alibés, F. Busqué, P. De March, M. Figueredo, J. Font, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6365-6367

### Sintesi dell'agente alchilante

L'alogeno derivato **40** rappresenta il secondo intermedio chiave per la sintesi della lentiginosina. È proprio questo che, dopo essere trasformato nel corrispondente reagente di Grignard, introduce all'interno dell'idrossilammina **37** la catena di quattro atomi di carbonio contenente un gruppo aldeidico protetto come acetale che, una volta deprotetto, reagisce intramolecolarmente con l'ammina secondaria portando direttamente a **44** attraverso un processo domino. A differenza delle sintesi già citate, che fanno reagire il nitrone con prodotti commercialmente disponibili, noi abbiamo provveduto alla sintesi di **40** in 2 steps. Come gruppo acetalico abbiamo scelto il 5,5-dimetil-1,3-diossolan-2-ile poiché la sintesi del 3-(5,5-dimetil-1,3-diossolan-2-il)propan-1-olo (**53**) e del corrispondente cloruro **54** è già stata descritta da Stowell e Polito<sup>45</sup> e può essere effettuata su scala relativamente grande (10-20 g) a partire da prodotti commercialmente disponibili a basso costo. Una volta verificato sperimentalmente la fattibilità del processo domino precedentemente descritto e l'effettiva convenienza dell'approccio sintetico proposto si potrà valutare se studiare o no altri gruppi acetalici per eventualmente migliorare la sintesi della lentiginosina.

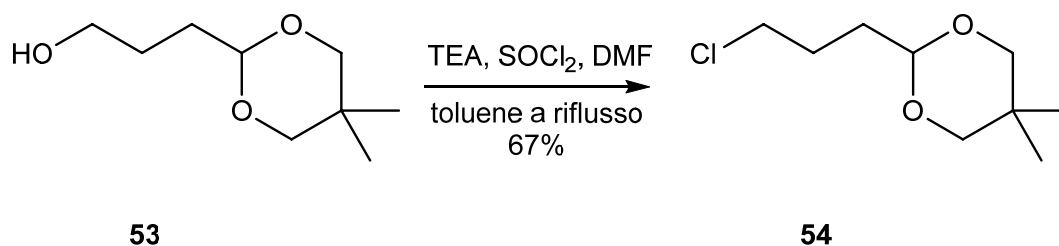
L'alcol **53** è stato sintetizzato a partire dal 2,3-diidrofurano (**51**) con un piccolo eccesso di 2,2-dimetil-1,3-propandiolo (**52**, 1.3 equiv) in presenza di una quantità catalitica di HCl. La reazione avviene in 10-15 h in acqua a temperatura ambiente e dopo neutralizzazione con NaOH l'alcol **53** è stato estratto dalla miscela di reazione con etere dietilico, ottenendo una resa del 92% rispetto al diidrofurano (**Schema 11**). Non è stato necessario distillare **53** come riportato nel lavoro di riferimento,<sup>45</sup> infatti estraendo il prodotto con CHCl<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, come descritto nella procedura, si ottiene una miscela di **53** e del diolo **52** non reagito in rapporto 3:1 (calcolato dallo spettro <sup>1</sup>H NMR), mentre utilizzando Et<sub>2</sub>O, anche se sono necessarie un numero maggiore di estrazioni, è stato ottenuto **53** contenente quantità minori di **52** (rapporto 8:1) e tali da non interferire in maniera sostanziale nella reazione seguente di clorurazione. L'alcol **53**, se non usato immediatamente, deve essere conservato in freezer.



Schema 11

<sup>45</sup> J. C. Stowell, M. A. Polito, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2195-2196

Il passo successivo consiste quindi nella clorurazione dell'alcol **53**, che è stata fatta in condizioni standard con  $\text{SOCl}_2$  e trietilammina (TEA) in presenza di DMF catalitica in toluene alla temperatura di riflusso in 2 h. Dopo distillazione bolla a bolla (apparecchiatura Kugelrohr) a pressione ridotta a  $68\text{ }^\circ\text{C}$  il distillato è stato ulteriormente purificato per cromatografia su colonna di gel di silice ottenendo il cloruro **54** con una resa del 67% (**Schema 12**).



**Schema 12**

Siamo quindi riusciti ad ottenere il prodotto che desideravamo con una resa complessiva del 62%.

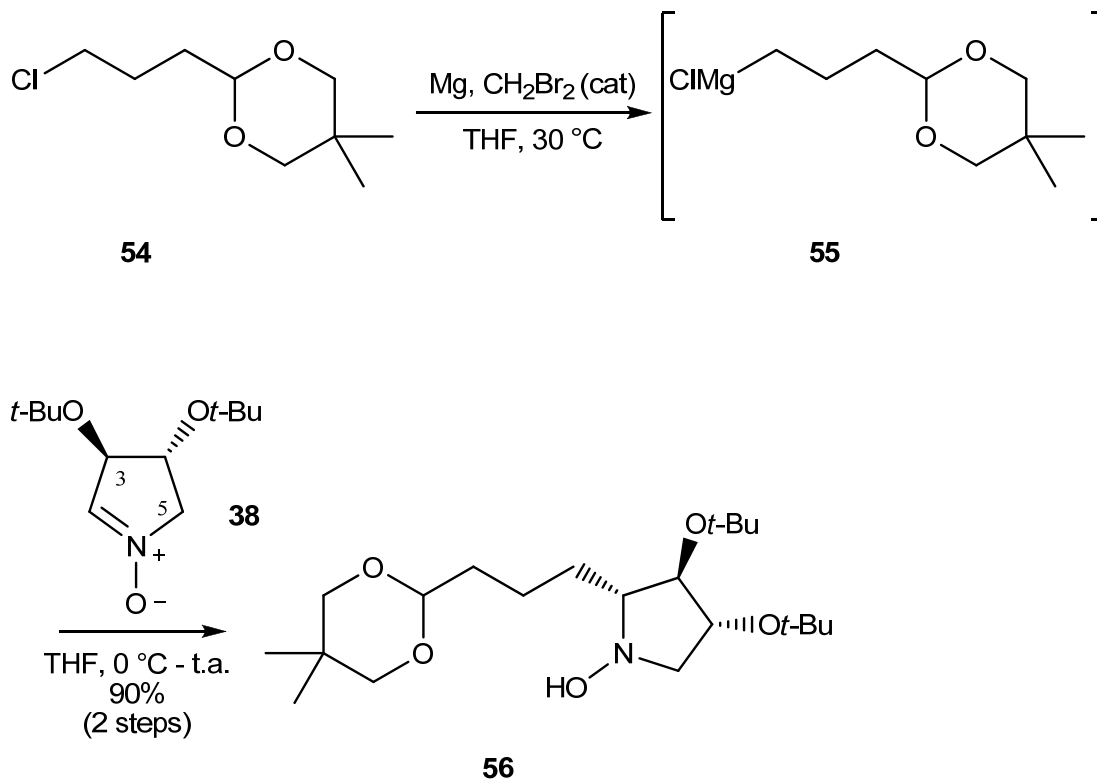
### Generazione del reattivo di Grignard e addizione al nitrone

Nonostante svariati reattivi di Grignard siano stati descritti in letteratura, risulta difficile trovare una procedura univoca applicabile a tutti gli alogenuri alchilici. Il problema principale consiste nella reattività dell'alogenuro organico e allo strato di ossido inerte che si forma sulla superficie del magnesio appena questo entra in contatto con l'ossigeno, questa patina impedisce al magnesio di reagire con l'alogenuro, specie se questo è poco attivo. Il meccanismo di attivazione serve a rimuovere questa patina nell'ambiente di reazione, in modo che la superficie del magnesio rimanga libera e reattiva. Il primo metodo che abbiamo applicato, utilizzato da Gilman e Catlin,<sup>46</sup> prevede di aggiungere un cristallo di  $\text{I}_2$  al magnesio, i vapori che si formano scaldando la miscela aderiscono alla superficie del magnesio formando uno strato bruno-dorato di  $\text{MgI}_2$ , il quale dovrebbe essere solubile in THF, solvente generalmente usato insieme al  $\text{Et}_2\text{O}$  in queste reazioni in virtù delle loro proprietà di complessare e quindi stabilizzare il composto organo-magnesio. Vari tentativi non hanno però portato alla formazione di **55**. Abbiamo ottenuto risultati migliori aggiungendo insieme allo iodio alcune gocce di dibromoetano, che è particolarmente reattivo e con magnesio forma etilene gassoso e  $\text{MgBr}_2$ . In tali condizioni, dopo trattamento con  $\text{H}_2\text{O}$ , lo spettro NMR della miscela di reazione ha mostrato la presenza di 2-

<sup>46</sup> H. Gilman, W. E. Catlin, *Org. Synth, Coll. Vol. 1*, p. 188 (1941); *Vol. 6*, p. 22 (1926)



butil-5,5-dimetil-1,3-diossano derivante dalla reazione di **55** con H<sub>2</sub>O. La formazione del reagente di Grignard non è stata completa e l'osservazione del raffreddamento della miscela di reazione concomitante alla cessazione della formazione delle bolle di etilene ha suggerito che la reazione esotermica di formazione di **55** si interrompe immediatamente una volta consumato tutto il dibromoetano. Seguendo l'idea di utilizzare il dibromoetano, la giusta procedura si è rivelata essere quella di Wiechers e colleghi,<sup>47</sup> che consiste nell'aggiungere goccia a goccia ai trucioli di magnesio una soluzione concentrata del cloruro contenente il 16% di dibromoetano in THF. La velocità dell'aggiunta deve essere tale da mantenere la temperatura della miscela di reazione intorno ai 30 °C. In questo modo la reazione del cloruro **54** procede agevolmente e in modo controllato sostenuta dalla piccola quantità di dibromoetano costantemente presente e dalla reazione di formazione di **55** che è esotermica. Dopo 1.5 h, la miscela del reagente di Grignard **55** appena formato è stata raffreddata a 0 °C e trattata con una soluzione del nitrone **38** in THF a 0 °C. Dopo 2 h a temperatura ambiente l'eccesso del reagente di Grignard è stato neutralizzato e il grezzo di reazione è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice, ottenendo l'idrossilammina **56** pura con una resa del 90% (86% di conversione del nitrone) (Schema 13).



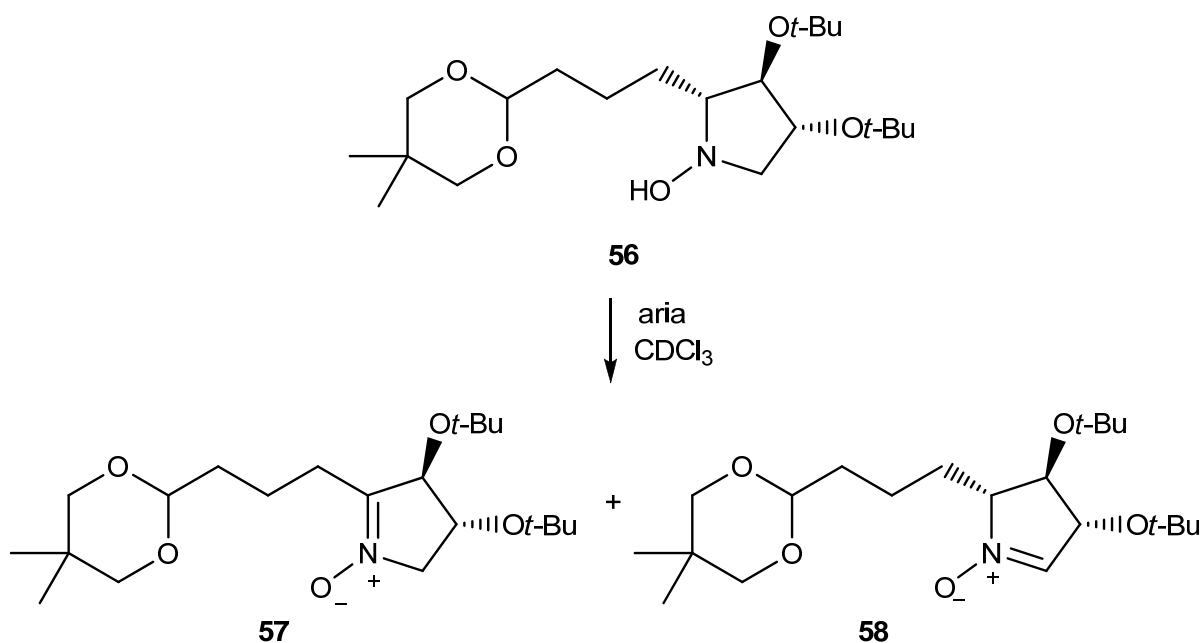
Schema 13

<sup>47</sup> C. P. Forbes, G. L. Wenteler, A. Wiechers, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 2353-2354

Come atteso l'idrossilammina **56** è stata ottenuta con completa diastereoselettività, derivante dall'aggiunta del reagente di Grignard sulla faccia *anti* rispetto al gruppo *t*-butossi presente sul C-3 del nitrone e non sono state trovate tracce evidenti di possibili reazioni collaterali. La configurazione relativa del nuovo centro stereogenico C-2 di **56** è stata poi confermata indirettamente sul prodotto di ciclizzazione **44** (vedi sotto).

Operando nelle condizioni riportate, già al primo tentativo, è stato possibile ottenere l'idrossilammina **56** in scala sufficientemente grande (861 mg) per poter studiare la reazione domino. Questa reazione ha comunque tutte le caratteristiche per poter essere condotta in scala molto maggiore, cosa che sarà fatta dopo aver messo a punto il processo domino di formazione dell'indolizidina **44**.

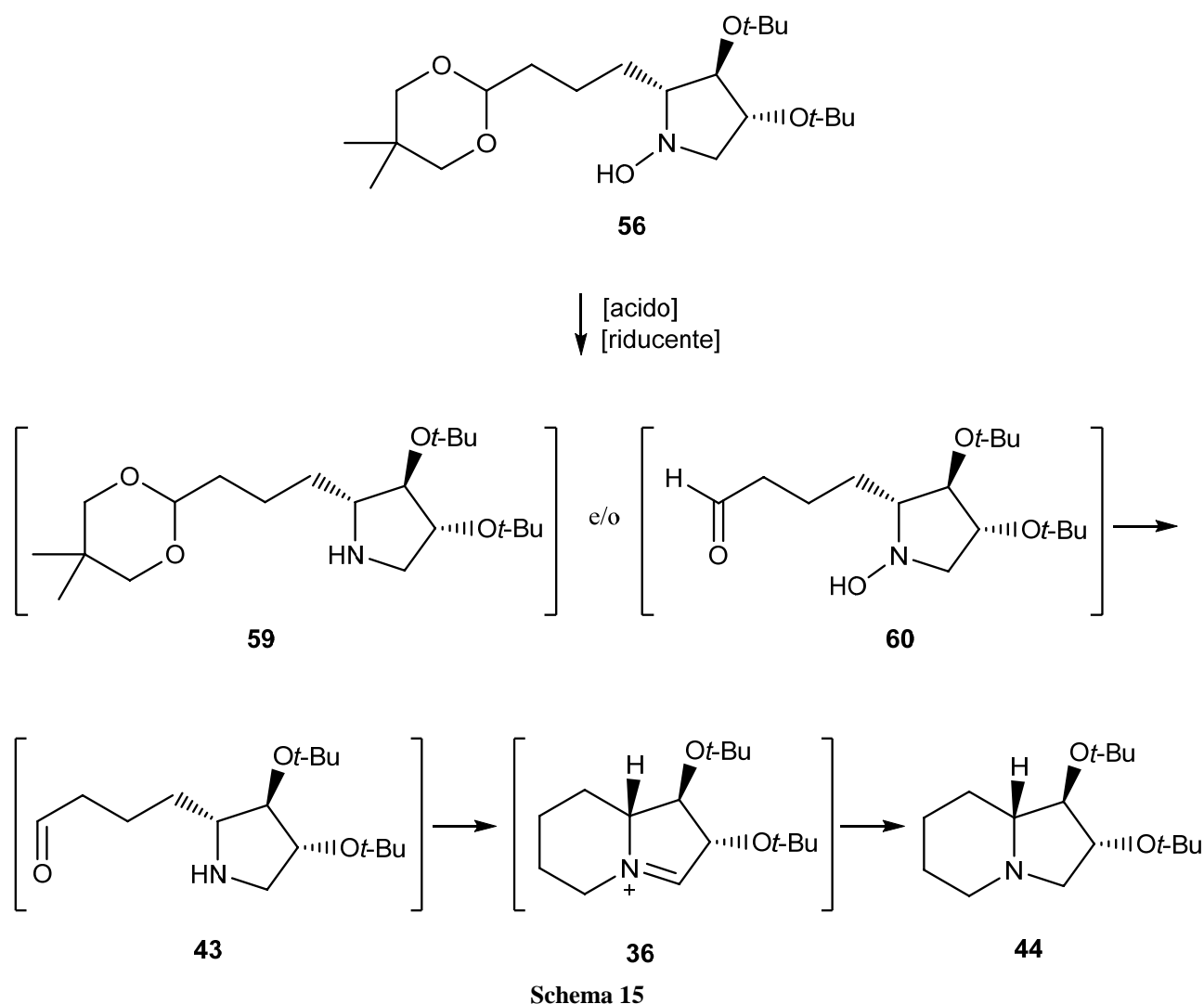
L'idrossilammina **56** tende ad ossidarsi lentamente nei due nitroni regioisomerici **57** e **58** (**Schema 14**) quando è disciolta in  $\text{CDCl}_3$  anche se conservata a bassa temperatura ma può essere mantenuta per alcuni mesi a bassa temperatura se pura.



Schema 14

## Processo domino

Questo è sicuramente il passaggio chiave dell'intera sintesi, ovvero la possibilità di effettuare 4 trasformazioni susseguenti in un unico step, senza dover né cambiare le condizioni di reazione né effettuare aggiunte di reagenti o isolare intermedi. Per avere la possibilità di effettuare la contemporanea deprotezione dell'acetale e riduzione dell'idrossilammina, la ciclizzazione intramolecolare e la successiva riduzione dello ione imminio senza idrolizzare gli eteri *t*-butilici, occorre un particolare ambiente contemporaneamente riduttivo ed acido che ha richiesto molteplici tentativi per essere individuato (**Schema 15 e Tabella 3**).



Inizialmente abbiamo utilizzato come sistema riducente la coppia Zn/HCl che è capace di ridurre sia il legame N-O che lo ione imminio come mostrato, ad esempio, da Krull e Wünsch,<sup>48</sup> nella sintesi di benzoazepine via riduzione, deprotezione e ciclizzazione riduttiva di nitroacetali. Tuttavia facendo reagire una soluzione di **56** in THF con Zn in polvere e HCl per 4 h a

<sup>48</sup> O. Krull, B. Wünsch, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1439-1451

temperatura ambiente dall'analisi dello spettro  $^1\text{H}$  NMR del grezzo si è osservato solo la completa riduzione dell'idrossilammina **56** ad ammina **59** (Schema 15 e Tabella 3, reazione *a*).

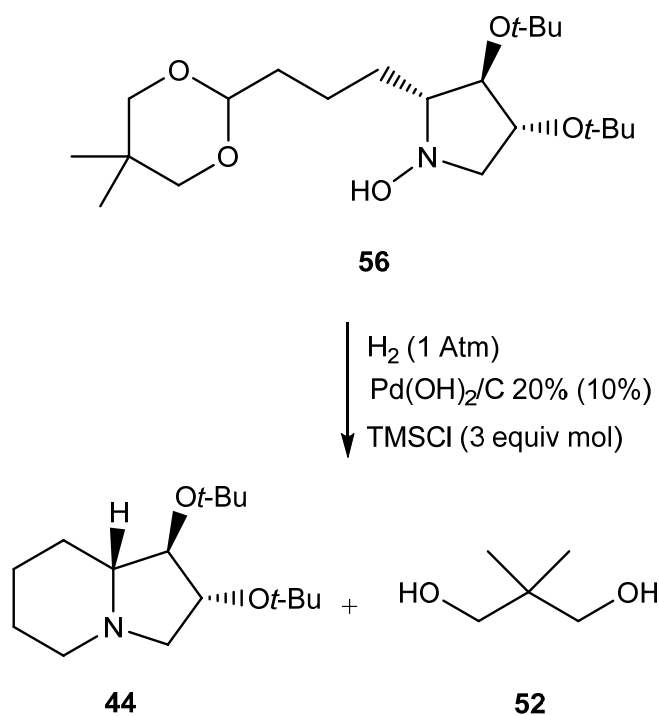
**Tabella 3 - Studio delle condizioni di reazione del processo domino**

	<b>Riducente</b>	<b>Acido</b>	<b>Solvente</b>	<b>Tempo</b>	<b>Prodotto</b>
<i>a</i>	Zn (10 equiv mol)	HCl (10 equiv mol)	THF/H <sub>2</sub> O (1:1; 0.1 M)	4 h <sup>a</sup>	<b>59</b>
<i>b</i>	Zn (6 equiv mol x 4)	HCl (12 equiv mol x 4)	acetone aq. (0.1 M)	11 d <sup>b</sup>	–
<i>c</i>	Zn (6 equiv mol)	TFA/H <sub>2</sub> O (4:2; 0.12 M)		16 h	–
<i>d</i>	H <sub>2</sub> , Pd(OH) <sub>2</sub> /C (10%)	TMSCl (3 equiv mol)	MeOH (0.14 M)	64 h <sup>c</sup>	<b>44</b> (40%)

- a) Dopo altre 19 h a t.a. si è aggiunto un'altra porzione di Zn (2.9 equiv mol) e di HCl (2.9 equiv mol) e la miscela è stata scaldata a 60° per 5.5 h, poi si è aggiunto HCl (1.5 equiv mol) e si è continuato il riscaldamento per altre 18.5 h. Nello spettro  $^1\text{H}$  NMR del grezzo sono presenti i segnali della pirrolidina **59**, del diolo **52** e dei segnali non perfettamente che potrebbero essere dell'indolizidina **44**.
- b) Le quattro aliquote di Zn e HCl sono state aggiunte a t = 0; 149, 166, 173 h.
- c) La reazione è stata condotta a 30 °C.

Prolungando la reazione per 19 h a temperatura ambiente e poi per 24 h a 60 °C si osserva nel grezzo di reazione la presenza, oltre alla pirrolidina **59** che rimane il prodotto principale, il diolo **52** e tracce di un nuovo prodotto che potrebbe essere l'indolizidina **44**. Evidentemente in queste condizioni di reazione la deprotezione dell'acetale e la ciclizzazione sono molto lente. Abbiamo quindi provato ad aumentare il rapporto Zn/HCl, ad usare TFA invece di HCl e solventi che potessero favorire l'idrolisi dell'acetale come acetone ed H<sub>2</sub>O, ma sia la reazione con Zn in polvere (6 equiv mol) e HCl 37% (12 equiv mol) in acetone che con Zn in polvere (6 equiv mol) in TFA/H<sub>2</sub>O (4:1) hanno portato alla decomposizione del prodotto (Tabella 3, reazioni *b* e *c*).

Abbiamo quindi deciso di cambiare il sistema riducente ossia di utilizzare un'idrogenazione eterogenea usando come catalizzatore Pd(OH)<sub>2</sub>/C e come acido il trimetilsililcloruro (TMSCl) in MeOH. Dopo 64 h a 30 °C, l'analisi dello spettro  $^1\text{H}$  NMR della miscela di reazione ha mostrato l'assenza dell'idrossilammina **56** e dell'ammina **59** e la presenza del prodotto desiderato **44**. Dopo purificazione cromatografica l'indolizidina è stata ottenuta con una resa del 40% (Tabella 3, reazione *d*) insieme a una indolizidina monoprotetta (vedi sotto). Abbiamo quindi proceduto ad effettuare alcune variazioni per individuare le condizioni di idrogenazione catalitica migliori (Schema 16 e Schema 4).



Schema 16

**Tabella 4** - Messa a puntodelle condizioni di reazione del processo domino

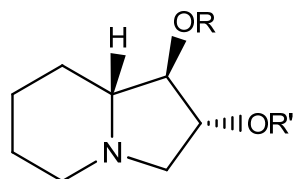
	SM <b>56</b>	Solvente	Conc	Temp.	Tempo	<b>52</b>	<b>44</b>
	(mg) <sup>a</sup>		(M)	(° C)	(h)	(%) <sup>b</sup>	(%) <sup>b</sup>
<i>a</i>	47.3	MeOH	0.14	30	64	71	40 <sup>c</sup>
<i>b</i>	103.9	MeOH	0.027	30	94	70	51
<i>c</i>	52.6	MeOH	0.027	50	64	78	69
<i>d</i>	30.6	EtOH	0.025	65	94	n.d. <sup>d</sup>	38
<i>e</i>	95.4	MeOH	0.025	50	16	92	46
<i>f</i>	30.3	MeOH	0.025	50	16+72	55	62

- a) Reazioni *a-d*: alla miscela di **56** e del catalizzatore in atmosfera di H<sub>2</sub> raffreddata a 0 °C è stato aggiunto goccia a goccia il TMSCl. Reazione *e*: il TMSCl è stato aggiunto a 0 °C prima del cat. e dell'H<sub>2</sub>. Reazione *f*: alla soluzione di **56** a 0 °C è stato aggiunto il TMSCl e la miscela è stata scaldata a 50 °C per 16 h, poi sono stati aggiunti il cat. e l'idrogeno e la miscela è stata scaldata a 50 °C per ulteriori 72 h.
- b) Resa dopo cromatografia su colonna
- c) La lentiginosina monoprotetta **62** è stata ottenuta con una resa del 22%
- d) Non determinato

Nel primo caso il Pd(OH)<sub>2</sub> supportato su carbone al 20% è stato aggiunto in quantità catalitiche (10%) ad una soluzione di **47** in MeOH (0.14 M), e dopo aver lavato il pallone di reazione con un flusso di N<sub>2</sub> per allontanare l'O<sub>2</sub>, la reazione è stata posta in atmosfera di H<sub>2</sub> (1 Atm). Immediatamente dopo la miscela è stata raffreddata a 0 °C, ed è stato aggiunto lentamente il

TMSCl. Finita l'aggiunta la reazione è stata posta in un bagno ad olio termostato a 50 °C per 64 h. Dopo filtrazione su celite e neutralizzazione con la resina a scambio ionico basica Amberlyst® A26, la purificazione cromatografica del grezzo di reazione ha dato la lentiginosina protetta **44** con una resa del 40%, il diolo **52** con una resa del 65% e una minore quantità di lentiginosina monoprotetta **61** (22%) (**Schema 16**, **Tabella 4** reazione *a* e **Figura 9**).

I dati spettroscopici di **44** coincidono con quelli di letteratura<sup>12</sup> confermando che l'aggiunta del reagente di Grignard al nitrone è avvenuta con l'attesa stereochimica.



R, R' = *t*-Bu, H

**61**

**Figura 9**

La reazione è stata ripetuta diminuendo la concentrazione da 0.14 a 0.027 M per favorire la reazione di amminazione riduttiva intramolecolare. Dopo un tempo di reazione di 94 h, la lavorazione usuale della miscela di reazione ha portato ad un aumento della resa di **44** (da 40 a 51%). Il diolo **52** è stato recuperato con una resa del 70% (**Tabella 4**, reazione *b*). In questo caso non è stata osservata la formazione del monoprotetto. Conducendo la reazione a 50 °C è stato possibile diminuire il tempo di reazione a 64 h ed aumentare ulteriormente la resa di **44** (69%) e del diolo **52** (78%) (**Tabella 4**, reazione *c*). Un aumento ulteriore della temperatura di reazione (65 °C) ha portato a rese minori dell'indolizidina (**Tabella 4**, reazione *d*). Infine è stato verificato che invertendo l'ordine di aggiunta dei reagenti ossia aggiungendo prima il TMSCl e subito dopo il sistema riducente o lasciando agire prima l'acido a 50 °C per 16 h e poi idrogenando per 72 h le rese erano inferiori (**Tabella 4**, reazioni *e* e *f*).

In conclusione, questo studio ha permesso di verificare che la riduzione dell'idrossilammina ad ammina, la deprotezione del gruppo aldeidico e la ciclizzazione riduttiva ad indolizidina possono essere effettuate in un unico processo utilizzando opportune condizioni riduttive in ambiente acido. Le condizioni acide utilizzate risultano anche completamente chemoselettive inducendo l'idrolisi dell'acetale ma non dei gruppi *t*-butilici permettendo quindi di ottenere la lentiginosina diprotetta. Inoltre il diolo può essere recuperato con buona resa e riciclato.

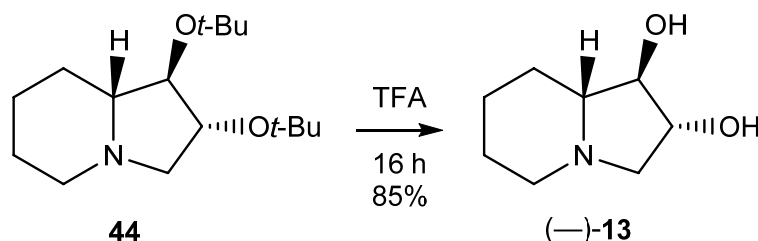
La reazione dovrà essere verificata su scala maggiore, e probabilmente potrà essere conveniente provare ad utilizzare un gruppo acetalico più facilmente idrolizzabile e testare delle condizioni di

reazione in cui anche i gruppi *t*-butilici vengono idrolizzati per verificare se è possibile purificare la lentiginosina deprotetta (–)-**13** ottenuta in un unico step dall'idrossilammina **56**.

### Deprotezione

Lo step finale consiste nel rimuovere i gruppi protettori *t*-butilici dalla lentiginosina protetta **44**, per liberare le funzioni ossidriliche necessarie all'attività biologica. Dato che quest'ultimo intermedio è l'enantiomero di **30** già descritto dal gruppo di ricerca del Prof. Brandi del Dipartimento di Chimica dell'Università di Firenze, per il quale è stato trovato un metodo di deprotezione con alta resa (93%), seguiamo la medesima procedura.<sup>31, 32</sup>

Il prodotto **44** è stato solubilizzato in TFA a 0 °C, e lasciato in agitazione per 16 h a temperatura ambiente. Dopo aver evaporato il solvente a pressione ridotta e deprotonato l'indolizidina con la resina a scambio ionico basica Amberlyst® A26, la purificazione cromatografica del grezzo di reazione ha dato la (–)-lentiginosina (**13**) con una resa del 85% (**Schema 17**).

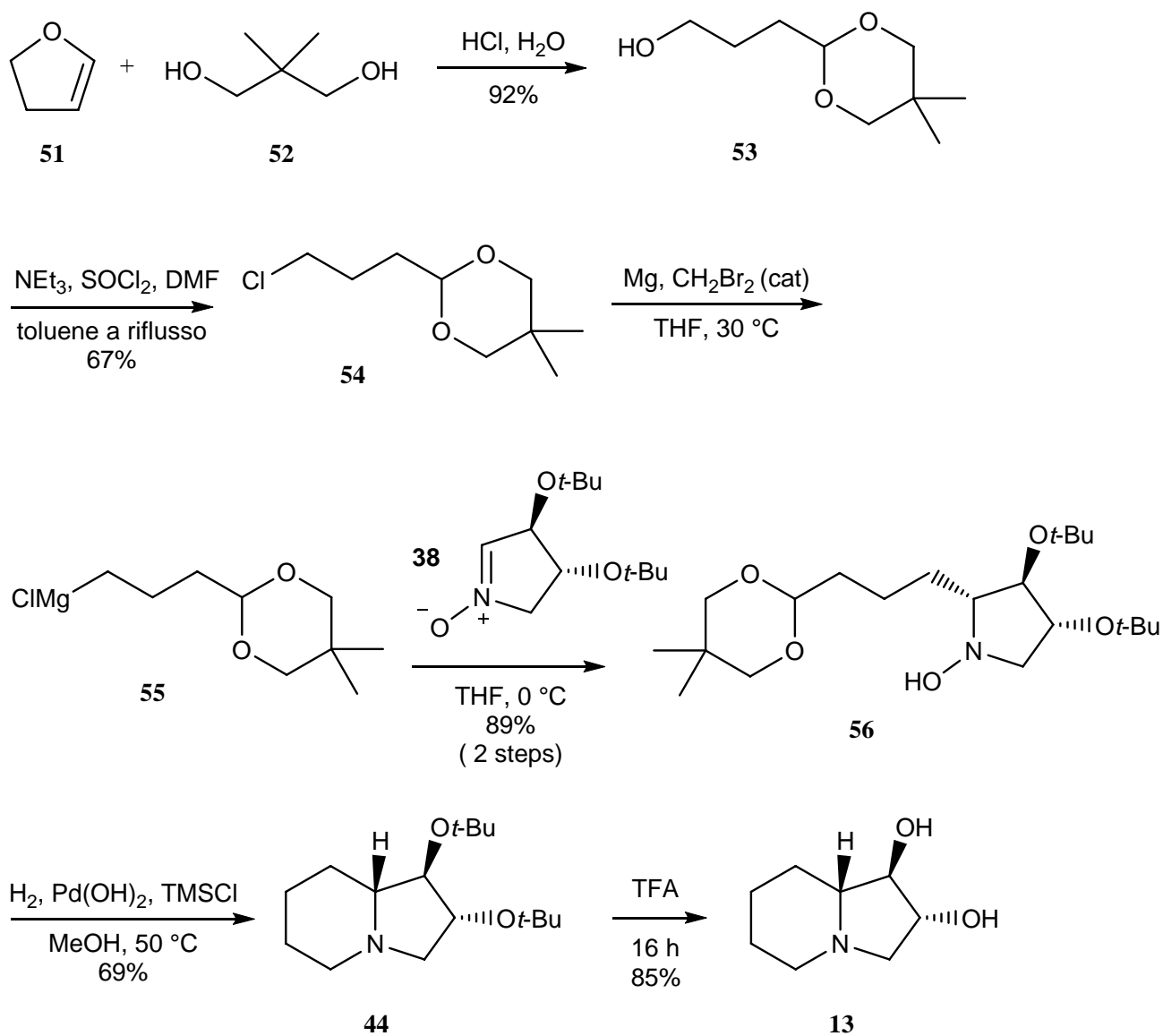


Schema 17

### Conclusioni

Questo studio preliminare dimostra che la nuova procedura descritta in questa tesi permette effettivamente di ottenere la (–)-lentiginosina (**13**), in modo breve ed efficiente e con completa stereoselettività a partire dall'acido D-tartarico. In particolare **13** può essere ottenuta in 9 steps e con una resa complessiva del 24%) (**Schema 18**), ossia con due step in meno ed una resa maggiore rispetto alla sintesi precedente sviluppata in questo dipartimento (11 steps, 19.5%, **Schema 4**). Ulteriori studi saranno necessari per applicare questa nuova metodologia alla sintesi della lentiginosina su grande scala, inoltre possiamo prevedere di poter ottimizzare ulteriormente la resa complessiva ad esempio provando differenti gruppi protettori per l'aldeide, variando le condizioni di reazione del processo domino, e studiando se è possibile includere in esso anche lo

step finale di deprotezione. Una volta ottimizzata, la sintesi potrà essere utilizzata anche per ottenere la lentiginosina naturale (+)-**12** a partire dall'acido L-tartarico.



**Schema 18** - Schema generale della sintesi della (-)-lentiginosina (**13**)

Ricordiamo inoltre che è stato anche possibile recuperare parte del 2,2-dimetil-1,3-propandiolo (**52**) usato per ottenere l'alcol **53** (**Schema 11**), questo risultato ci è sembrato particolarmente significativo in previsione di una sintesi in più larga scala utilizzando la procedura descritta.



## Materiali e metodi

Tutte le reazioni che richiedevano condizioni anidre sono state effettuate in atmosfera di azoto con solventi anidri. I solventi anidri sono stati distillati sugli opportuni agenti essiccanti. I valori di  $R_f$  si riferiscono a TLC costituite da un supporto di alluminio rivestito da uno strato di gel di silice dello spessore di 0.25mm (Merck F254). La cromatografia è stata eseguita in camera di eluizione satura dei vapori della miscela di solventi utilizzata per l'eluizione. I rilevatori utilizzati per le TLC sono: radiazione UV ( $\lambda = 254$  nm), vapori di iodio, soluzione 1.0 M di permanganato di potassio, soluzione di ninidrina, soluzione acida di paranisalaldeide.

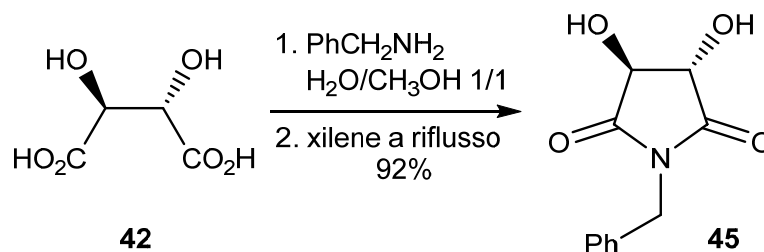
Gli spettri NMR sono stati registrati con gli spettrometri Varian Gemini, ( $^1\text{H}$  200 MHz), Varian VXR-300S ( $^1\text{H}$  300 MHz) e Varian INOVA ( $^1\text{H}$  400 MHz). Il solvente usato per la registrazione degli spettri è stato  $\text{CDCl}_3$ , se non diversamente specificato. I dati NMR vengono riportati in ppm rispetto al segnale del TMS a 25 °C.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrometro Perkin-Elmer BX FT-IR, in soluzione di  $\text{CDCl}_3$ , se non diversamente specificato. I punti di fusione (p.f.) sono stati misurati con un apparecchio ELECTROTHERMAL. Le misure polarimetriche sono state eseguite con polarimetro JASCO DIP-370. Le analisi elementari sono state misurate con un analizzatore Perkin-Elmer 2400.

Gli spettri di massa EI sono stati registrati con uno spettrometro QP5050 Shimadzu equipaggiato con GC e gli spettri di massa ESI con uno spettrometro LCQ Fleet Ion Trap Mass con il sistema Surveyor Plus LC (Thermo Scientific).

## Parte sperimentale

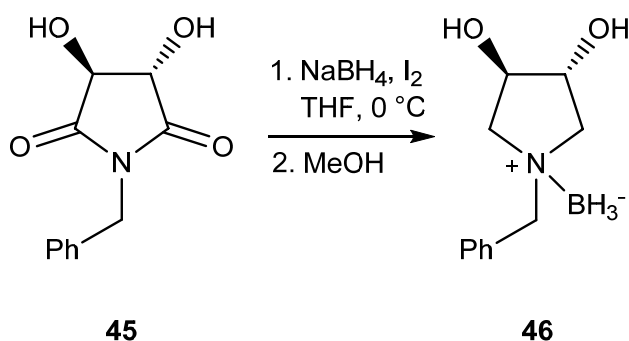
### Sintesi della (3*S*,4*S*)-1-benzil-3,4-diidrossipirrolidina-2,5-dione (**45**)



Ad una sospensione di (3*S*,4*S*)-(-)-acido tartarico (**42**, 25 g, 0.167 mol) in  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1) (34 mL) si aggiunge lentamente la benzilammina (18.25 mL, 0.167 mol), si ha 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-Stark per 11 ore scaldando a 150 °C. Durante il periodo di refluxo 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 **45** con una resa del 92% (34.08 g, 0.154 mol) come un solido giallo pallido e lo si usa per la successiva reazione senza ulteriori purificazioni.

#### Sintesi della [(3*R*,4*R*)-1-benzil-3,4-diidrossipirrolidinio-1-il]triidroborato (**46**)

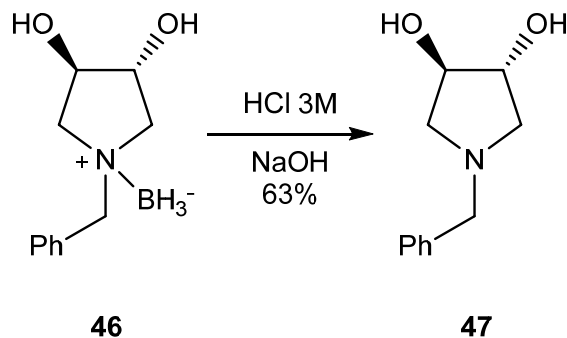


Ad una sospensione di NaBH<sub>4</sub> (6.05 g, 0.16 mol) e **50** (7 g, 0.032 mol) in THF (150 mL), vigorosamente agitata e raffreddata a 0 °C, si aggiunge una soluzione di I<sub>2</sub> (20.3 g, 0.08 mol) in THF (96 mL) goccia a goccia, nell'arco di 2 ore, sotto atmosfera di N<sub>2</sub>. Si fa rifluire la miscela di reazione per 6 ore e poi, 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 che ne deriva in MeOH per poi concentrare 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*Pr<sub>2</sub>O (17 mL). Si aggiunge H<sub>2</sub>O al residuo bianco ottenuto e prima si lava la miscela con etere di petrolio (5x20 mL) poi si estrae con EtOAc (5x30 mL). Le fasi organiche sono riunite, lavate con brine (50 mL), anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e infine filtrate e concentrate a pressione ridotta per ottenere **46** come un solido bianco colloidale, non del tutto secco a causa delle probabili impurezze presenti, e lo si usa per la successiva reazione senza ulteriori purificazioni. Una piccola porzione viene purificata per cromatografia su gel di silice (eluente: etere di petrolio/EtOAc = 2 : 3) per ottenere **46** analiticamente puro.

**46**: R<sub>f</sub> = 0.36; m.p. 98–99 °C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = + 21.2 (c = 0.525, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H 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, CHHPh), 4.05 (parte B di un sistema AB, J = 13.2 Hz, 1H, CHHPh), 4.02 (br d, J = 7.1 Hz, 1H, 4-H), 3.54 (ddd, J = 11.5; 6.6; 1.2 Hz, 1H, 2-Ha), 3.33 (dd, J = 12.0; 7.1 Hz, 1H, 5-Ha), 3.14 (br d, J = 12.0 Hz, 1H, 5-Hb), 2.85 (dd, J = 11.5; 6.3 Hz, 1H, 2-Hb) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (50

MHz):  $\delta = 132.6$  (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, CH<sub>2</sub>Ph), 64.5 (t, C-5), 63.8 (t, C-2) ppm; <sup>11</sup>B NMR (64 MHz)  $\delta = -8.71$  ppm; IR (CDCl<sub>3</sub>):  $\nu = 3610, 3390$  (br), 2955, 2381 (B-H st), 1455 (B-N st), 1169, 1107, 1052 cm<sup>-1</sup>; analisi elementare (%) calcolata per C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>BNO<sub>2</sub> (207.1): C 63.80, H 8.76, N 6.76; trovata: C 63.70, H 9.08, N 6.73.

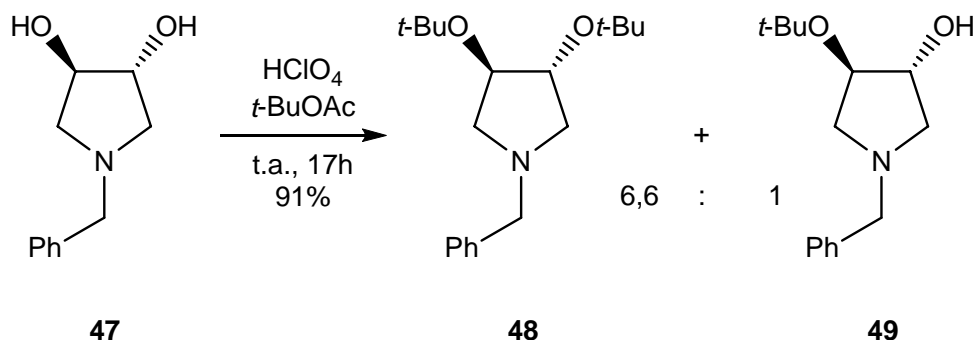
### Sintesi della (3*R*,4*R*)-1-benzilpirrolidina-3,4-diolo (**47**)



Alla sospensione dell'addotto grezzo pirrolidina-borano **46** in Et<sub>2</sub>O (120 mL) raffreddato a 0 °C si aggiunge, sotto agitazione, una soluzione acquosa di HCl 3M (91 mL). Si mantiene la sospensione a temperatura ambiente sotto agitazione finché non sia terminata la produzione di H<sub>2</sub> e sia avvenuta la completa dissoluzione del solido presente in partenza. Si separa la fase acquosa, il cui pH  $\approx 1$ , 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  $\approx 10$ , poi si estrae nuovamente con EtOAc (6x20 mL). Infine le fasi organiche sono riunite, lavate con brine (100 mL) e anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, poi filtrate e concentrate a pressione ridotta. Si ottiene la pirrolidina **47** grezza come un solido bianco (4.25 g, 22 mmol) con una resa del 69% e la si usa nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

**47**: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 7.25-7.35$  (m, 5H, Ph), 4.03-4.11 (m, 2H, 3-H e 4-H) 3.63 (parte A di un sistema AB, J = 12.6, 1H, CHHPh), 3.57 (parte B di un sistema AB, J = 12.6, 1H, CHHPh), 3.06 (br s, 2H, OH), 2.93 (dd, J = 10.2; 5.7, 2H, 2-Hb e 5-Ha) 2.44 (dd, J = 10.2; 3.6, 2H, 2-Ha e 5-Hb) ppm.

Sintesi di (3*R*,4*R*)-1-benzil-3,4-di-*t*-butossipirrolidina (**48**) e (3*R*,4*R*)-1 benzil-4-*t*-butossipirrolidin-3-olo (**49**)



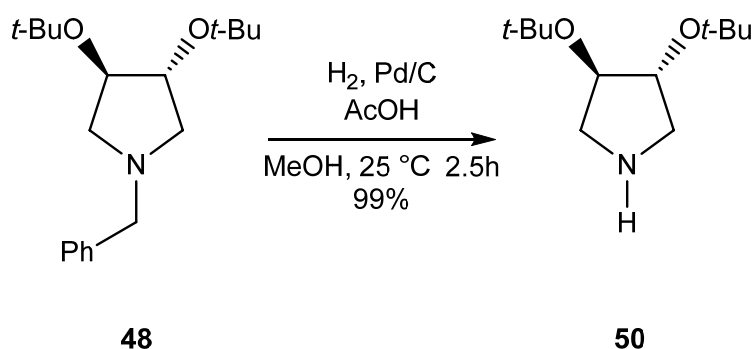
Ad una sospensione di **47** (4.25 g, 22 mmol) in AcOtBu (220 mL) si aggiunge, goccia a goccia a 0 °C, una soluzione di HClO<sub>4</sub> al 60% (3.6 mL, 33 mmol) e si lascia la miscela di reazione per 17 ore sotto agitazione a temperatura ambiente. Si raffredda a 0 °C e si basifica fino a pH 9 aggiungendo lentamente una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> e poi Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solido. Si separano le due fasi e si lava la soluzione di *t*-butil acetato con brine, si anidrifca su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, si filtra e si distilla a pressione ridotta. Il *t*-butilacetato recuperato è poi riutilizzato nuovamente per altre reazioni di protezione. La soluzione acquosa invece si estrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6x30 mL), si lavano le fasi organiche riunite con brine (60 mL) poi sono anidrifcate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta. I due residui ottenuti sono riuniti e purificati su gel di silice [eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (0.1% NH<sub>3</sub>) prima 99:1, poi 97:3 ed infine 95:5] per ottenere **48** come un composto oleoso con resa del 77% (5.17 g) e **49** con resa del 14% (0.78 g).

**48**: R<sub>f</sub> = 0.33 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3); [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -88 (c=0.4, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 7.34-7.20 (m, 5H, HPh), 3.97-3.92 (m, 2H, 3-H e 4-H), 3.63 (parte A di un sistema AB, J=13.1 Hz, 1H, CHHPh), 3.49 (parte B di un sistema AB, J=13.1 Hz, 1H, CHHPh), 2.78 (pseudo dd, J=9.4, 6.4 Hz, 2H, 2-Ha e 5-Ha), 2.39 (pseudo dd, J=9.4, 5.1 Hz, 2H, 2-Hb e 5-Hb), 1.16 (s, 18H, CH<sub>3</sub> x 6) ppm; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 138.3 (s, CPh) 128.9 (d, 2C, CHPh), 128.1 (d, 2C, CHPh), 126.9 (d, CHPh), 78.2 (d, 2C, C-3 e C-4), 73.5 (s, 2C, CMe<sub>3</sub>), 60.6 (t, CH<sub>2</sub>Ph), 60.3 (t, 2C, C-2 e C-5), 28.6 (q, 6C, CH<sub>3</sub> x 3) ppm; IR (CDCl<sub>3</sub>): ν = 2977, 2797, 1391, 1366, 1186 cm<sup>-1</sup>; MS (EI): m/z (%) = 305 ([M<sup>+</sup>], 9), 248 (16), 232 (3), 192 (28), 158 (6), 91 (100), 57 (92); analisi elementare (%) calcolata per C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>2</sub> (305.2) = C 74.71, H 10.23, N 4.59; trovata C 74.37, H 10.24, N 4.95.

**49**: R<sub>f</sub> = 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5); [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -10 (c = 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 7.35-7.24 (m, 5H, HPh) 4.03-3.98 (m, 2H, 3-H e 4-H), 3.70 (parte A di un sistema AB,

$J=12.9$  Hz, 1H, *CHHP*h), 3.66 (parte B di un sistema AB,  $J=12.9$  Hz, 1H, *CHHP*h), 3.26 (dd,  $J=10.1$ , 6.7 Hz, 1H) e 2.82 (br d,  $J=10.4$  Hz, 1H) (2-Ha e 5-Ha), 2.68 (dd,  $J=10.4$ , 5.1 Hz, 1H) e 2.34 (dd,  $J=10.1$ , 5.4 Hz, 1H) (2-Hb e 5-Hb), 1.19 (s, 9H,  $CH_3 \times 3$ ) ppm;  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 50 MHz):  $\delta = 137.3$  (s, CPh) 128.9 (d, 2C, *CHPh*), 128.3 (d, 2C, *CHPh*), 127.4 (d, *CHPh*), 78.6 (d), 78.2 (d, 2C, C-3 e C-4), 74.1 (s,  $CMe_3$ ), 60.6 (t), 60.4 (t, 2C, C-2 e C-5), 60.1 (t,  $CH_2Ph$ ), 28.4 (q, 3C,  $CH_3 \times 3$ ) ppm; IR ( $CDCl_3$ ):  $\nu = 2978$ , 2801, 1392, 1366, 1192, 1090  $cm^{-1}$ ; MS (EI):  $m/z$  (%) = 249 ( $[M^+]$ , 6), 192 (27), 91 (100), 57 (19); analisi elementare (%) calcolata per  $C_{15}H_{23}NO_2$  (249.3) = C 72.25, H 9.30, N 5.26; trovata C 71.99, H 9.18, N 5.54.

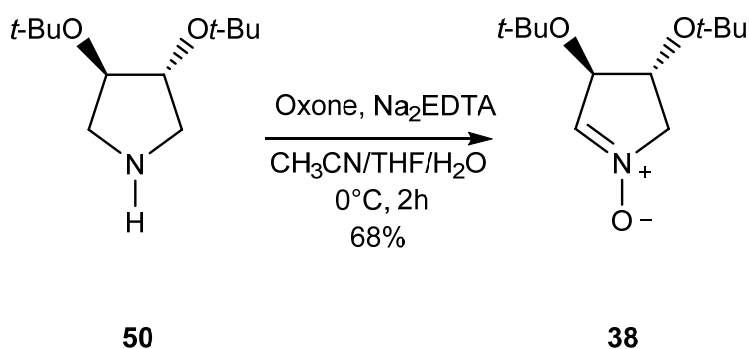
### Sintesi della (3*R*,4*R*)-3,4-di-*t*-butossipirrolidina (**50**)



Ad una soluzione di **48** (5.175 g, 16.94 mmol) in MeOH (120 mL) si aggiunge goccia a goccia a 0 °C AcOH (9.68 mL, 169.4 mmol). Si porta a temperatura ambiente si aggiunge il catalizzatore Pd su C al 10% (13.11 g, 1.047 mmol) poi si lascia la miscela in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di  $H_2$  (1 Atm). Si filtra su celite lavando con MeOH e si concentra a pressione ridotta. Si discioglie l'olio ottenuto in  $CH_2Cl_2$  (50 mL) e si tratta con una soluzione satura di  $NaHCO_3$  (70 mL) a 0 °C fino ad ottenere un pH=9. Si separano le due fasi e si estrae con  $CH_2Cl_2$  (5x30 mL) la fase acquosa. Le fasi organiche riunite sono lavate con brine (80 mL) poi anidificate su  $Na_2SO_4$ , filtrate e concentrate a pressione ridotta. Si ottiene la pirrolidina **50** come un olio marrone (3.59 g, 16.68 mol) con una resa del 99% e lo si utilizza per la reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

**50**:  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta = 3.86$ -3.81 (m, 2H, 3-H e 4-H), 3.09 (dd,  $J=12.0$ , 5.3 Hz, 2H, 2-Ha e 5-Ha), 2.66 (dd,  $J=12.0$ , 3.5 Hz, 2H, 2-Hb e 5-Hb), 2.41 (br s, *NH*), 1.17 (s, 18H,  $CH_3 \times 6$ ) ppm;  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 50 MHz):  $\delta = 79.1$  (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,  $CH_3 \times 3$ ) ppm.

Sintesi della (3*R*,4*R*)-3,4-di-*t*-butossi-3,4-diidro-2H-pirrolo 1-ossido (**38**)



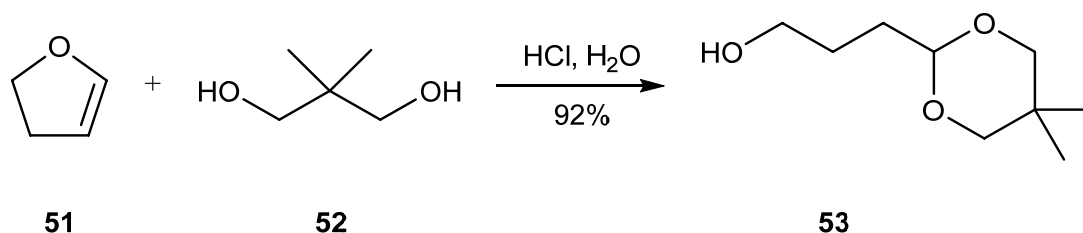
Si aggiunge alla pirrolidina **50** (1g, 4.65 mmol), dissolta in una miscela di acetonitrile (7.15mL) e THF (1.78mL) (4:1), la soluzione di Na<sub>2</sub>EDTA (0.01M, 6.5 mL), NaHCO<sub>3</sub> (1.95 g, 23.25mmol) e l'Oxone® (3.7g, 6 mmol), a 0°C in porzioni frazionate, in un tempo totale di 2 ore e 30 min.

Dopo 30 min. si aggiunge AcOEt (15mL) e H<sub>2</sub>O deionizzata (25 mL). Si separano le fasi e la fase acquosa è estratta con AcOEt (2X15mL) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3X10mL). Le fasi organiche sono riunite, lavate con 40 mL di brine, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, poi filtrate su cotone e concentrate a pressione ridotta.

Il grezzo ottenuto (934 mg) si purifica su gel di silice mediante cromatografia Flash [eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1% NH<sub>4</sub>OH) = 98 : 2], si ottiene il nitrone **38** (0.670 g) pulito come un solido bianco con resa del 63%.

**38**: R<sub>f</sub> = 0.32; m.p. 75.4–77.2 °C; [α]<sub>D</sub><sup>27</sup> = -166 (c = 0.7, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 6.78–6.76 (m, 1H, 2-H), 4.59–4.56 (m, 1H, 3-H), 4.20–4.12 (m, 2H, 5-Ha e 4-H), 3.71–3.64 (m, 1H, 5-Hb), 1.21 (s, 9H, CH<sub>3</sub> x 3), 1.19 (s, 9H, CH<sub>3</sub> x 3) ppm; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): δ = 134.9 (d, C-2), 79.0 (d, C-3), 74.8 (s, CMe<sub>3</sub>), 74.7 (s, CMe<sub>3</sub>), 74.2 (d, C-4), 68.3 (t, C-5), 28.2 (q, 6C, CH<sub>3</sub> x 3) ppm; IR (CDCl<sub>3</sub>): ν = 298, 1588, 1392, 1367, 1260, 1187, 1086 cm<sup>-1</sup>; MS (EI): m/z (%) = 229 ([M+], 1), 173 (16), 117(39), 100 (18), 88 (31), 70 (43), 57 (100), 41 (42); analisi elementare (%) calcolata per C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub> (229.3) = C 62.85, H 10.11, N 6.11; trovata C 63.14, H 10.06, N 6.31.

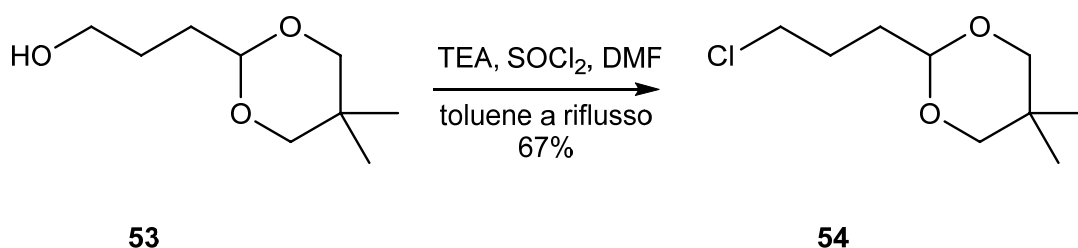
### Sintesi della 3-(5,5-dimetil-1,3-diossan-2-il)propan-1-olo (**53**)



Ad una soluzione del diolo **52** (8.94 g, 85.8 mmol) e HCl al 37% (1.5 mL) in H<sub>2</sub>O (15 mL) si aggiunge, a 0 °C, goccia a goccia il diidrofurano **51** (5 mL, 66 mmol), poi si lascia la miscela sotto agitazione per 15 ore. Si aggiunge alla miscela una goccia di una soluzione di 1% fenolftaleina in EtOH, poi si raffredda a 0 °C e si aggiunge goccia a goccia una soluzione acquosa di NaOH 4 M (4.9 mL) finché non si osserva il viraggio al rosa della colorazione. Si separa la fase organica e la fase acquosa è estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5X15 mL). Si anidrifca su K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> le fasi organiche riunite, si filtra su celite e si concentra a pressione ridotta. Per purificare il prodotto ed eliminare in parte il diolo in eccesso sono stati aggiunti 25 mL di H<sub>2</sub>O, e la fase acquosa estratta nuovamente con Et<sub>2</sub>O (4X25 mL). La fase organica è anidrificata su K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, filtrata su celite ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene l'alcol **53** contenente tracce del diolo **52** (rapporto 8:1 da <sup>1</sup>H NMR) come un olio giallo chiaro (10.57g, 60.7 mmol) con resa del 92%. L'alcol **53** è stato utilizzato come tale nella reazione successiva.

**53**: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ = 4.53-4.44 (m, 1H, CHO<sub>2</sub>), 3.73-3.62 (m, 6H, CH<sub>2</sub>O x 3), 1.98 (br s, 1H, OH), 1.83-1.61 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH), 1.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

### Sintesi della 2-(3-cloropropil)-5,5-dimetil-1,3-diossano (**54**)

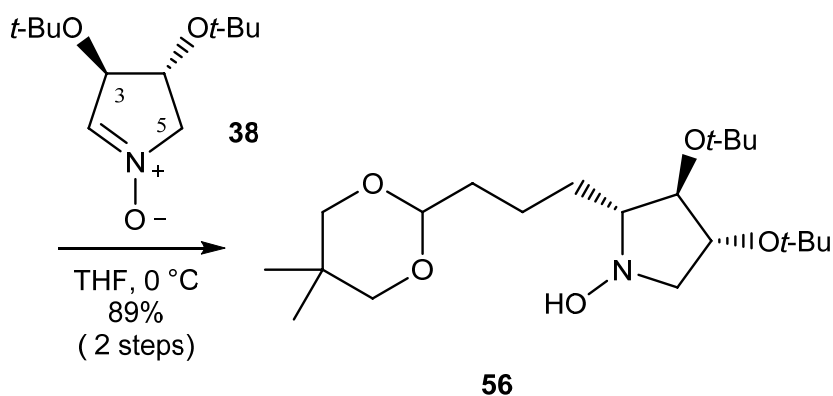
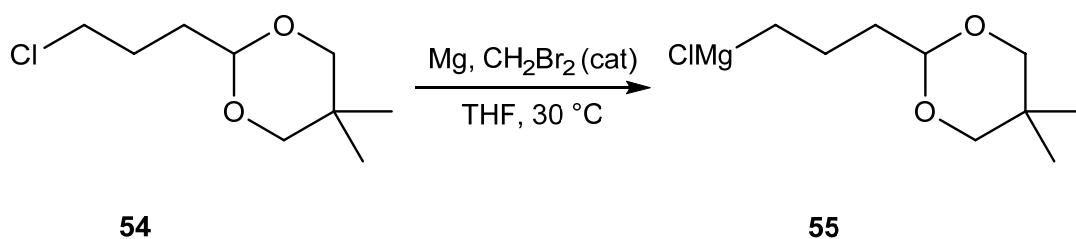


La seguente reazione deve essere effettuata in atmosfera inerte di N<sub>2</sub>, utilizzando vetreria e solventi anidri. All'alcol **44** (3.54 g, 20.32 mmol) impuro del diolo **52** (0.46 g, 4.42 mmol), si aggiunge toluene (40 mL), una goccia di DMF e trietilammina (TEA) distillata di recente (4.88 mL, 34.99 mmol). Successivamente a 0 °C si aggiunge lentamente goccia a goccia SOCl<sub>2</sub> (2.4 mL, 32.90 mmol), in 10 minuti, poi si lascia andare la reazione a refluxo sotto agitazione per 1 ora e 20 minuti. La soluzione diviene gialla, poi sempre più scura fino a diventare nera e molto

vischiosa. Si filtra su imbuto gooch con carta da filtro la grande quantità di solido che si è formata, lavando con toluene. La fase acquosa è lavata in successione con: H<sub>2</sub>O (2X50 mL), HCl 10% (1X50 mL), H<sub>2</sub>O (3X50 mL), una soluzione acquosa satura di NaHCO<sub>3</sub> (1X50 mL), H<sub>2</sub>O (3X50 mL) ed infine con brine (20+10+10+5 mL). Le fasi organiche sono riunite, anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate su cotone rilavando con MeOH ed evaporate a pressione ridotta. Per eliminare il residuo nero ancora presente la miscela è distillata bolla a bolla (apparecchiatura Kugelrohr) a pressione ridotta, innalzando progressivamente la temperatura, il prodotto inizia a distillare quando la temperatura del forno è di circa 68 °C. Il distillato è ulteriormente purificato su gel di silice mediante cromatografia Flash (eluente etere di petrolio/Et<sub>2</sub>O = 33 : 1), ottenendo il cloruro **54** come un olio giallo-arancio (2.62 g, 13.59 mmol) con resa del 67%.

**54**: R<sub>f</sub> = 0.31 (etere di petrolio/Et<sub>2</sub>O = 33 : 1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ = 4.53-4.42 (m, 1H, CHO<sub>2</sub>), 3.66-3.52 (m, 4H, CHHO x 2 e CH<sub>2</sub>Cl), 3.42 (parte B di un sistema AB, J=10.8 Hz, 2H, CHHO x 2), 2.01-1.70 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH), 1.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

Sintesi di (3-(5,5-dimetil-1,3-diossan-2-il)propil)magnesio cloruro (**55**) e (2*R*,3*R*,4*R*)-3,4-di-*t*-butossi-2-(3-(5,5-dimetil-1,3-diossan-2-il)propil)pirrolidin-1-olo (**56**)



La seguente reazione deve essere effettuata in atmosfera inerte di N<sub>2</sub>, utilizzando vetreria e solventi anidri. In un pallone contenente scaglie di magnesio (354 mg, 14.57 mmol) tenuto sotto agitazione magnetica e posto in un bagno ad olio termostato a 30 °C si sgocciola lentamente

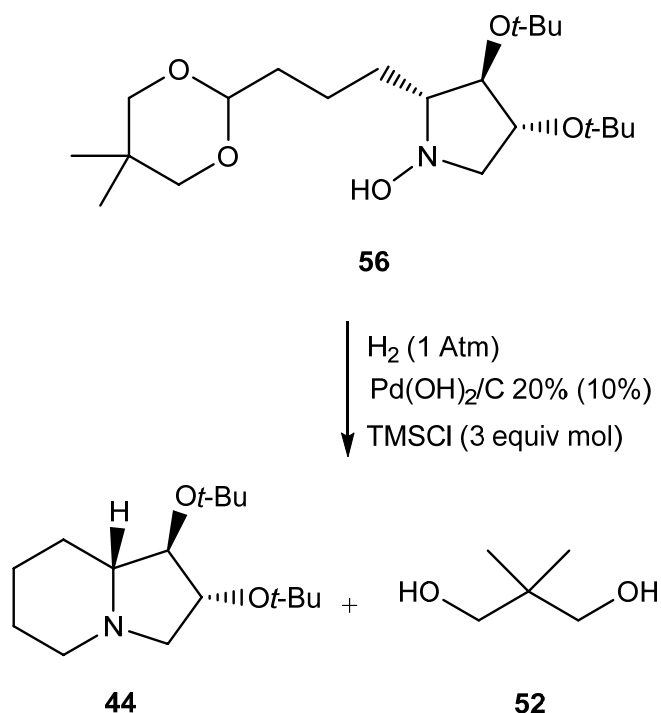


una soluzione del cloruro **54** (999.5 mg, 5.19 mmol) e dibromoetano (156 mg, 0.83 mmol) in THF (1 mL). Appena iniziata la reazione il bagno caldo deve essere allontanato perché la temperatura di reazione non superi i 30 °C a causa della reazione esotermica. La miscela di reazione diviene inizialmente torbida, poi incominciano a formarsi alcune bollicine sulla superficie del magnesio, infine la soluzione diventa nuovamente limpida. A questo punto il pallone viene tolto dal bagno caldo e la miscela di reazione è raffreddata al bisogno con un bagno ad acqua cercando di mantenere sempre la temperatura intorno a 30 °C. Dopo 1.5 h la miscela del reagente di Grignard è diluita con THF (3 mL) e raffreddata a 0 °C con un bagno di ghiaccio. Si aggiunge goccia a goccia una soluzione del nitrone **38** (662.5 mg, 2.89 mmol) in THF (7 mL) in 20 min a 0 °C. La miscela di reazione è poi lasciata a temperatura ambiente per 2 h sotto agitazione. Si neutralizza a 0 °C l'eventuale eccesso di reagente di Grignard con una soluzione acquosa satura di NH<sub>4</sub>Cl (tre aggiunte successive di 5+2+2 mL). Una volta terminato lo sviluppo di gas si filtra su cotone la miscela. Si separa la fase organica, il cotone ed il pallone sono lavati con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e la fase acquosa è estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4X8 mL). Le fasi organiche sono riunite, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto (1.57 g) si purifica su gel di silice mediante cromatografia Flash usando un eluente a polarità crescente [eluente etere di petrolio/ AcOEt = 3 : 1; etere di petrolio/ AcOEt = 3 : 2; AcOEt; AcOEt/MeOH = 25 : 1; AcOEt/MeOH (NH<sub>3</sub> 1%) = 10 : 1 ].

Si ottiene l'idrossilammina **56** come un olio trasparente molto viscoso (861 mg, 2.22 mmol) con resa del 77%, e si recupera il nitrone **38** (93.3 mg, 14%) ed il cloruro **54** (302 mg, 30%) che non hanno reagito. La resa di **56** rispetto al nitrone convertito è quindi del 90% (conversione 86%).

**56**: R<sub>f</sub> = 0.18 (etere di petrolio/ AcOEt = 3 : 1); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -23.8 (c = 0.71, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 4.43-4.38 (m, 1H, CHO), 3.95-3.89 (m, 1H, 4-H), 3.69-3.62 (m, 1H, 3-H), 3.58 (parte A di un sistema AB, J=11.0 Hz, 2H, OCHH x 2), 3.39 (parte B di un sistema AB, J=11.0 Hz, 2H, OCHH x 2), 3.22-3.12 (m, 2H, 5-H), 2.79-2.72 (m, 1H, 2-H), 1.72-1.51 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.19 (s, 9H, CH<sub>3</sub> x 3), 1.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.16 (s, 9H, CH<sub>3</sub> x 3), 0.70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  = 102.1 (d, CHO), 81.6 (d, C-3), 77.2 (d, C-4), 77.2 (t, 2C, CHO x 2), 74.1 (s, Me<sub>3</sub>CO), 73.8 (s, Me<sub>3</sub>CO), 73.3 (d, C-2), 64.5 (t, C-5), 34.8 (t), 30.1 (t), 29.0 (q, 3C, CH<sub>3</sub> x 2), 28.6 (q, 3C, CH<sub>3</sub> x 2), 23.0 (q, CH<sub>3</sub>), 21.8 (q, CH<sub>3</sub>), 20.9 (t) ppm; IR (CDCl<sub>3</sub>):  $\nu$  = 3690, 3580, 3378, 2978, 2960, 2853, 1472, 1463, 1394, 1366, 1190 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): m/z = 388 ([M<sup>+</sup>]); analisi elementare (%) calcolata per C<sub>21</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>5</sub> (387.5) = C 65.08, H 10.66, N 3.61; trovata C 65.09, H 10.38, N 3.28.

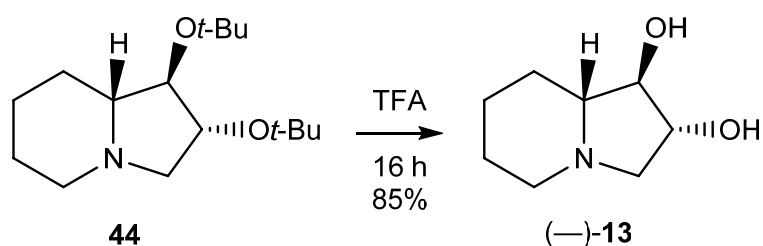
Sintesi della (1*R*,2*R*,8*aR*)-1,2-di-*t*-butossiottaidroindolizidina (**44**)



Ad una soluzione dell'idrossilammina **56** (52.6 mg, 0.136 mmol) in MeOH (5 mL) si aggiunge Pd(OH)<sub>2</sub> supportato su carbone al 20% (9.53 mg, Pd: 1.91 mg, 0.0136 mmol). Dopo aver lavato il pallone con N<sub>2</sub> per alcuni minuti, la reazione è posta in atmosfera di H<sub>2</sub> (1 Atm) ed a 0°C si aggiunge lentamente il TMSCl (0.052 mL, 0.408 mmol). La reazione è poi lasciata sotto agitazione in un bagno ad olio termostato a 50 °C per 64 h. Dopo aver rimosso l'atmosfera di H<sub>2</sub> la miscela è filtrata su celite lavando con MeOH, poi neutralizzata passandola su una colonna di resina a scambio ionico basica Amberlyst® A26 (la resina viene preventivamente preattivata con un lavaggio con NaOH 1M seguito da numerosi lavaggi con H<sub>2</sub>O fino a pH≈8 e infine con MeOH). Il grezzo ottenuto (62.6 mg) si purifica su gel di silice mediante cromatografia Flash [eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 20 : 1; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 5 : 1; MeOH (NH<sub>3</sub> 1%)], ottenendo la lentiginosina protetta **44** (25.1 mg) con resa del 69% e il propandiolo **52** (11.1 mg) con resa del 78% .

**44**: R<sub>f</sub> = 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 20 : 1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 3.77 (ddd, J=7.1; 4.0; 1.6 Hz, 1H, 2-H), 3.62 (dd, J=8.7; 4.0 Hz, 1H, 1-H), 2.95-2.88 (m, 1H, 5-Ha), 2.90 (dd, J=9.9; 1.6 Hz, 1H, 3-Ha), 2.41 (dd, J=9.9;7.1 Hz, 1H, 3-Hb), 1.94-1.50 (m, 7H, 5-Hb e 6-H e 7-H e 8a-H e 8-Ha), 1.27-1.18 (m, 1H, 8-Hb), 1.20 (s, 9H, CH<sub>3</sub> x 3), 1.16 (s, 9H, CH<sub>3</sub> x 3) ppm; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 83.7 (d, C-1), 76.8 (d, C-2), 73.7 (s, CO), 73.5 (s, CO), 67.0 (d, C-8a), 62.2 (t, C-3), 53.6 (t, C-5), 29.2 (q, 9C, Me<sub>3</sub>CO), 28.7 (q, 9C, Me<sub>3</sub>CO), 28.6 (t, CH<sub>2</sub>), 24.8 (t, CH<sub>2</sub>), 24.1 (t, CH<sub>2</sub>) ppm.

### Sintesi della (1*R*,2*R*,8*aR*)-ottaidroindolizidina-1,2-diolo (**13**)



La lentiginosina protetta **44** (164.3 mg, 0.610 mmol) è solubilizzata, a 0 °C, in TFA (1.9 mL) e lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 h. Il TFA in eccesso è eliminato il più possibile evaporando a pressione ridotta, poi la miscela di reazione è lavata con MeOH e successivamente neutralizzata passandola su una colonna di resina a scambio ionico basica Amberlyst® A26. Il grezzo ottenuto (103.3 mg) si purifica su gel di silice mediante cromatografia Flash [eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> (33%) = 41 : 8 : 1], ottenendo la (-)-lentiginosina protetta (**13**, 81.9 mg) con resa del 85%.

**13**: R<sub>f</sub> = 0.33 [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> (33%) = 41 : 8 : 1]; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -1.6 (c = 0.92, CH<sub>3</sub>OH) [lit. [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -1.6 (c = 0.24, CH<sub>3</sub>OH)<sup>12</sup>]; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz): δ = 3.94 (ddd, J=7.2; 3.5; 1.5 Hz, 1H, 2-H), 3.60 (dd, J=8.4; 3.5 Hz, 1H, 1-H), 2.96 (dm, J=10.8 Hz, 1H, 5-Ha), 2.85 (dd, J=10.5, 1.5 Hz, 1H, 3-Ha), 2.52 (dd, J=10.5; 7.2 Hz, 1H, 3-Hb), 2.10-1.08 (m, 8H, 5-Hb e 6-H e 7-H e 8-H e 8a-H) ppm.