



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZE CHIMICHE"

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Carlo Alberto Bignozzi

Sintesi di glicopeptidi mediante le reazioni tiol-ene/ino e studio della reattività di Umpolung di α -dichetoni.

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/06

Dottorando

Dott. Pacifico Salvatore

Tutore

Prof. Olga Bortolini

Anni 2009/2012

Al Mio Papà

ABSTRACT

It is well established that protein glycosylation, a bioorthogonal process, is a posttranslational modification that profoundly affects protein folding, stability, immunogenicity, and biological properties and activities. In this regard, while native O- and N-glycosidic bonds of glycopeptides are prone to hydrolytic cleavage by O- and N-glycosidases, synthetic C- and S-analogs are expected to be stable toward such enzymatic degradation. Therefore, much effort has been devoted in the last decades to synthesizing C- and S-glycosyl amino acids and their assembly in glycopeptides. They with these non-native linkages can be used as probes for biochemical studies and leads in drug discovery, such as, for example, vaccines. In the first part of this thesis project we developed two routes to synthesis of S-glycopeptides. One route consists of S-glycosyl amino acid synthesis from photoinduced addition of sugar thiols to alkenyl glycine (TEC) followed by incorporation of this amino acid into a peptide. The second route, that is, specific for a cysteine containing peptide such as glutathione, involves peptide S-homoallylation followed by TEC with sugar thiol. We also demonstrated the selective propargylation of cysteine-containing peptides followed by photoinduced thiol-yne coupling with glycosyl thiols as an effective one-pot two-step platform for the dual glycosylation of peptides. By this strategy, we also performed the sequential glycosylation and biotinylation of peptides.

In recent years, N-heterocyclic carbenes (NHCs) have attracted considerable interest due to their unique features, which allow them to be used as ligands for organometallic catalysis, reagents in the synthesis of heterocycles, and efficient organocatalysts in umpolung transformations. In the latter sub-area of research many efforts have been devoted to the realization of highly stereoselective versions of the classical benzoin and Stetter reactions through optimal pre-catalyst design, to the discovery of new transformations, and to the umpolung of electrophiles alternative to aldehydes and pyruvates, mainly acylsilanes and Michael acceptors. In this thesis, our group has recently demonstrated the capability of linear and cyclic dialkyl α -diketones to undergo polarity reversal under thiazolium carbene catalysis in benzoin-type and Stetter reactions, and thus act as a novel class of acyl anion precursors. Contrarily, it has been observed that diaryl α -diketones do not undergo polarity reversal in the presence of (benzo)thiazolium carbenes but are engaged in a novel multicomponent reaction with

water to efficiently give medicinally relevant 1,4-thiazin-3-one heterocycles. The umpolung reactivity of diaryl 1,2-diones, however, can be effectively triggered by different NHCs.

SOMMARIO

La glicosilazione, processo bioortogonale, è nota come modificazione post traslazionale che produce numerosi effetti sulle proteine, controllandone conformazione, stabilità, immunogenicità, proprietà biologiche ed attività. È da tenere in considerazione che mentre i legami glicosidici naturali dei glicopeptidi O- ed N- possono subire un clivaggio idrolitico da parte di O- ed N- glicosidasi, gli analoghi sintetici S- e C- sembrano essere stabili a tale degradazione. Per questo motivo nell'ultima decade, sono stati fatti numerosi sforzi finalizzati alla sintesi di C- ed S-glicosil amminoacidi ed al loro assemblaggio all'interno di sequenze peptidiche. I glicopeptidi, dotati di un legame non naturale, data la loro stabilità, possono essere usati come sonde in studi biochimici o come molecole farmacologicamente attive (vaccini). Nella prima parte della tesi sono state sviluppate due vie per la sintesi di S-glicopeptidi. La prima consiste nella sintesi di S-glicosil amminoacidi mediante addizione fotoindotta di zuccheri tioli ad alchenil glicine, seguente all'incorporazione di tale amminoacido modificato all'interno di una sequenza peptidica. La seconda via, specifica per i peptidi contenenti un residuo cisteinico come il glutatione, procede attraverso la S-omoallilazione del peptide, seguita da TEC con tiozuccheri. È stata inoltre dimostrata la selettiva propargilazione di peptidi contenenti un residuo cisteinico, seguita da addizione, mediante tiol-ino fotoindotta, di due zuccheri tiolici. Questo approccio può essere visto come un efficace piattaforma per una doppia glicosilazione di peptidi secondo un approccio one-pot two-step. Mediante questa strategia, è stata anche messa a punto la sequenziale glicosilazione e biotinilazione di peptidi.

Recentemente, gli N-eterociclo carbeni (NHCs), hanno attratto un considerevole interesse per le loro caratteristiche peculiari, che consentono a queste molecole di essere utilizzate come ligandi per la catalisi organometallica, come reagenti nella sintesi di eterocicli ed efficienti organocatalizzatori nelle trasformazioni di Umpolung. Proprio in quest'ultima classe di reattività, numerosi sforzi sono stati effettuati al fine di realizzare una versione altamente stereoselettiva delle classiche reazioni di condensazione benzoinica e di Stetter, per la scoperta di nuove trasformazioni e per l'Umpolung di elettrofili alternativi alle aldeidi ed ai piruvati (come ad esempio acilsilani ed accettori di Michael). A tal proposito, come descritto in questa tesi, il nostro gruppo ha recentemente dimostrato la capacità di α -dichetoni ciclici e lineari di procedere mediante inversione della polarità, organocatalizzata da NHCs, in reazioni di condensazione benzoinica e di Stetter, agendo

come nuova classe di sorgenti di acil anioni. Contrariamente è stato osservato come i diaril α -dichetoni non subiscono inversione della polarità in presenza di (benzo)-tiazolilideni ma sono coinvolti con l'acqua in una nuova reazione multicomponente a dare in maniera efficiente 1,4-tiazin-3-oni. Questo tipo di reattività dei diaril 1,2-dioni può essere efficacemente attivata con differenti NHCs.

NOTA DELLO STUDENTE.

Questa tesi di dottorato è il frutto di due progetti di ricerca svolti in due diversi gruppi presso il Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Ferrara.

Nel primo capitolo verrà presentato il progetto svolto sotto la supervisione del Prof. Alberto Marra. In questa sezione verranno descritti i risultati di un lavoro che può essere considerato la base per lo sviluppo futuro di strategie di glicosilazione di biomolecole complesse quali le proteine. In particolare verrà descritto un approccio di S-glicosilazione di amminoacidi e peptidi basato sull'impiego efficiente (condizioni di "click chemistry") delle reazioni di accoppiamento tiol-ene(TEC) e tiol-ino(TYC) fotoindotte.

Il secondo capitolo sarà invece dedicato alla descrizione del lavoro svolto nella seconda parte del dottorato sotto la supervisione della Prof.ssa Olga Bortolini e del Dott. Alessandro Massi. In questa parte della tesi verrà messa in evidenza la particolare reattività dei dialchil 1,2-dichetoni in presenza di sali di tiazolio. Verrà riportato come questi substrati subiscono *Umpolung* (inversione di polarità) comportandosi come nuova sorgente di acil anioni in reazioni di tipo benzoinico e di Stetter. Sarà inoltre descritto come i diaril 1,2-dichetoni non seguono il comportamento della controparte alchilica ma sono interessati da una reattività del tutto nuova e peculiare che coinvolge un processo multicomponente con il tiazolil carbene e acqua.

CAPITOLO 1

INDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | REAZIONI BIOORTOGONALI | 1 |
| 1.1 | <i>Introduzione</i> | 1 |
| 1.2 | <i>Possibili Approcci Bioortogonali</i> | 2 |
| 1.2.1 | <i>Condensazione di Chetoni/Aldeidi con Ammine Nucleofile</i> | 3 |
| 1.2.2 | <i>Bioortogonalità del Gruppo Azidico</i> | 5 |
| | ◆ <i>Reazione di Staudinger</i> | 5 |
| | ◆ <i>Reazione [3+2] Azido-Alchino Catalizzata da Rame (CuAAc)</i> | 6 |
| | ◆ <i>Cicloaddizione [3+2] Azido-Alchino Promossa da Sistemi Ciclici in Tensione</i> | 7 |
| 2 | PROCESSI BIOORTOGONALI DI GLICOSILAZIONE DI PROTEINE | 8 |
| 2.1 | <i>Definizione, Distribuzione e Funzione delle Glicoproteine</i> | 8 |
| 2.2 | <i>Legame Glicosidico in Natura: N- e O- Glicosil Amminoacidi</i> | 10 |
| 2.3 | <i>Sintesi di Glicopeptidi Naturali</i> | 11 |
| 2.4 | <i>Metodi per la sintesi di S-glicosil amminoacidi e S-glicopeptidi</i> | 14 |
| | ◆ <i>Alchilazione in posizione anomerica</i> | 14 |
| | ◆ <i>Condensazione di Mitsunobu</i> | 16 |
| | ◆ <i>Addizione di Michael</i> | 22 |
| | ◆ <i>S-glicosilazione catalizzata da acidi</i> | 17 |
| | ◆ <i>S_N2 di un alogenuro in posizione anomerica</i> | 18 |
| | ◆ <i>S-glicosilazioni attraverso la formazione di un legame disolfuro</i> | 18 |
| 3 | OBIETTIVO DELLA TESI: <i>utilizzo delle reazioni radicaliche tiol-ene e tiol-ino per la sintesi di s-glicosil amminoacidi e S-glicopeptidi</i> | 21 |
| 3.1 | <i>Le reazioni tiol-ene e tiol-ino e loro impiego in studi di glicoconiugazione</i> | 21 |
| 3.2 | <i>Sintesi di S-glicosil amminoacidi e S-glicopeptidi mediante reazioni tiol-ene e tiol-ino fotoindotte</i> | 27 |
| 4 | RISULTATI E DISCUSSIONE | 30 |
| 5 | BIBLIOGRAFIA | 36 |
| 6 | ARTICOLI PUBBLICATI | 84 |

CAPITOLO 2

INDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | REAZIONI DI UMPOLUNG CATALIZZATE DA N-ETEROCICLI CARBENI (NHCs) | 39 |
| 1.1 | <i>Introduzione</i> | 40 |
| 1.2 | <i>Reazione di d-1 nucleofili: condensazione benzoinica catalizzata da NHCs</i> | 43 |
| 1.3 | <i>Reazione di d-1 nucleofili con accettori di Michael: reazione di Stetter catalizzata da NHCs</i> | 51 |
| 1.4 | <i>Umpolung α^3- δ^3: reazione di enoenolati generati da NHCs</i> | 64 |
| 2 | OBIETTIVO DELLA TESI: studio della reattività di Umpolung di 1,2-dichetoni | 64 |
| 2.1 | <i>Reattività dei dialchil 1,2-dichetoni in presenza di NHCs</i> | 64 |
| 2.2 | <i>Reattività dei diaril 1,2-dichetoni in presenza di NHCs</i> | 67 |
| 3 | RISULTATI E DISCUSSIONE | 71 |
| 4 | BIBLIOGRAFIA | 82 |
| 5 | ARTICOLI PUBBLICATI | 84 |

CAPITOLO 1

SINTESI DI GLICOPEPTIDI MEDIANTE LE REAZIONI TIOL-ENE/INO

1 REAZIONI BIOORTOGONALI

1.1 Introduzione

La possibilità di derivatizzare, in maniera covalente e selettiva, biomolecole presenti all'interno della cellula e degli organismi viventi, costituisce motivo di crescente interesse. (1) Questo approccio prevede la possibilità di marcare ('taggare'), ad esempio con fluorofori, macromolecole biologicamente attive (ad es. glicani, proteine, lipidi) così da consentirne il monitoraggio funzionale in tempo reale, senza interferire con i processi biochimici nativi.

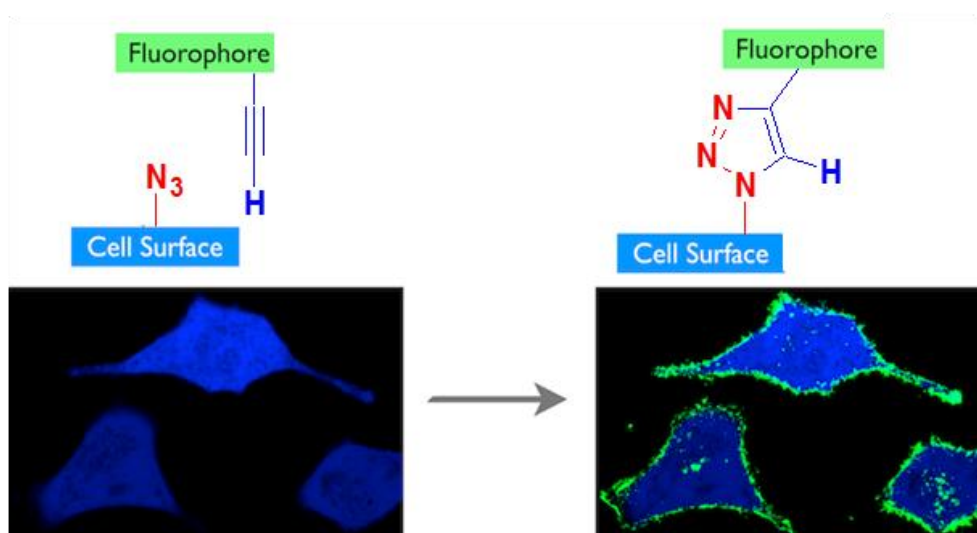


Figura 1. Effetti dell'introduzione di un fluoroforo su biomolecole presenti in sistemi biologici.

Data la complessità dei sistemi biologici, la manipolazione chimica di macromolecole bioattive comporta rilevanti problematiche. È infatti di fondamentale importanza che tutte le modificazioni che si operano su una biomolecola siano *bioortogonali* con essa, cioè compatibili con la sua funzione biologica. L'approccio bioortogonale si suddivide in due fasi. Il substrato biologico viene dapprima modificato con un gruppo funzionale bioortogonale che non ne alteri la struttura e l'attività biologica;

successivamente, la biomolecola viene introdotta in un sistema in *vitro/vivo*. In una seconda fase, una sonda contenente un gruppo funzionale complementare viene sfruttata per tracciare la macromolecola di interesse (figura 1) (2). È pertanto necessario che le reazioni di biomarcatura vengano condotte in modo tale da mimare il più possibile le condizioni fisiologiche in cui i substrati biologici sono portati a svolgere le proprie funzioni, quindi: mezzo acquoso, pH fisiologico, temperatura ambiente e pressione atmosferica. Il concetto di 'click chemistry' costituisce in questo senso una piattaforma ideale da cui sviluppare processi bioortogonali. Tale concetto fu introdotto nel 2001 dal Premio Nobel B. Sharpless per descrivere reazioni strettamente caratterizzate da alcuni criteri tra i quali: la modularità, le alte rese, l'assenza di sottoprodotti, la stereospecificità, la semplicità del metodo, la non tossicità e la facile reperibilità dei reagenti e l'utilizzo di mezzi acquosi facilmente rimovibili.(3)

La selettività e la cinetica di bioconiugazione costituiscono aspetti critici della strategia di marcatura. La selettività di reazione consente il monitoraggio esclusivo di un substrato biologico. Inoltre, per la maggior parte dei meccanismi di derivatizzazione, la velocità di reazione, dipende soprattutto dalla concentrazione dei due componenti, seguendo pertanto una cinetica del secondo ordine. La concentrazione di biomolecole che possono essere isolate dai sistemi *in vivo* è tuttavia spesso limitata. Questo comporta l'impiego di quantitativi elevati del reagente che si intende legare a queste. Per tale ragione la mancanza di tossicità e la solubilità nel mezzo di reazione sono requisiti fondamentali dei reagenti funzionalizzanti.

1.2 Possibili Approcci Bioortogonali

Pochi sono i processi chimici in grado di soddisfare sia i principi di bioortogonalità che di 'click chemistry'. La maggior parte delle reazioni di bioconiugazione, come l'accoppiamento tra tioli e maleimmide o tra ammine ed acidi carbossilici, non possono essere impiegate a causa della scarsa selettività rispetto ai diversi nucleofili od elettrofili presenti nelle biomolecole che potrebbero interferire con le reazioni di coniugazione. In questa sezione saranno prese in considerazione le diverse strategie chimiche di derivatizzazione di macromolecole ad oggi conosciute che rispettano in varia misura i principi di bioortogonalità.

1.2.1 Condensazione di Chetoni/Aldeidi con Ammine Nucleofile

Chetoni ed aldeidi (4-7) sono notoriamente in grado di reagire con ammine nucleofile, ad esempio idrossil-ammine e idrazidi, a formare rispettivamente ossime ed idrazoni in condizioni fisiologiche (figura 2).

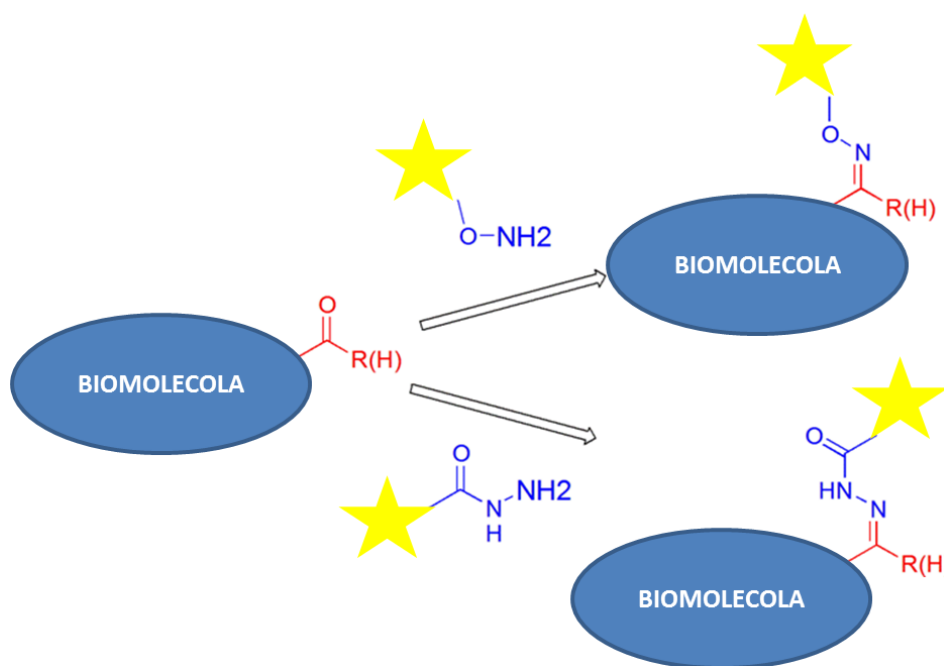


Figura 2. Condensazione di chetoni ed aldeidi con ammine nucleofile

I derivati carbonilici hanno tuttavia un limitato utilizzo nella marcatura di biomolecole presenti all'interno della cellula o degli organismi viventi, in quanto possono legarsi non selettivamente a diversi nucleofili endogeni.(8) Un possibile impiego di questa strategia riguarda la funzionalizzazione di macromolecole espresse sulla superficie cellulare che non è caratterizzata costitutivamente dalla presenza di funzionalità chetoniche reattive. È stato dimostrato infatti che cheto-zuccheri introdotti per via enzimatica all'interno di glicani presenti sulla superficie cellulare possono essere legati da sonde che presentano ossiammine o idrazidi.(9,10) Paulson e collaboratori sono riusciti ad inserire una funzione aldeidica sui residui di acido sialico esposti sulla superficie cellulare. Questi una volta isolati sono stati fatti reagire con la funzione ossiamminica di una molecole di biotina. (11)

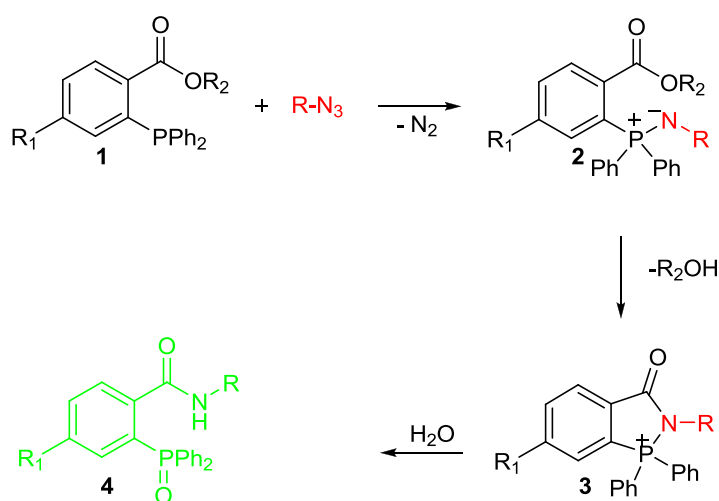
1.2.2 Bioortogonalità del Gruppo Azidico

Una svolta importante nello sviluppo di reazioni bioortogonali è stata l'introduzione dell'azide come gruppo reattivo di diverse molecole target. Il gruppo azidico ha il vantaggio di non essere rappresentato nei sistemi biologici e mostra inoltre reattività ortogonale con la maggior parte dei gruppi funzionali biologici. (12) L'azide è una specie ad elevata energia, reattiva sia come debole elettrofilo, sia come 1,3 dipolo.

Reazione di Staudinger

Target che presentano l'azide come gruppo funzionale sono stati sfruttati per la prima volta nella cosiddetta 'Staudinger ligation' da Bertozzi e collaboratori (13), i quali hanno impiegato una variante della classica reazione di Staudinger di azidi con trifenilfosfina. (14)

Come mostrato nello schema 1, l'inserimento strategico di un gruppo estereo su uno dei sostituenti arilici della trifenilfosfina (**1**), provoca, dopo reazione con l'azide, la formazione di un intermedio azailidico (**2**) che dopo ciclizzazione (**3**), per idrolisi dà vita ad un legame amidico (**4**).



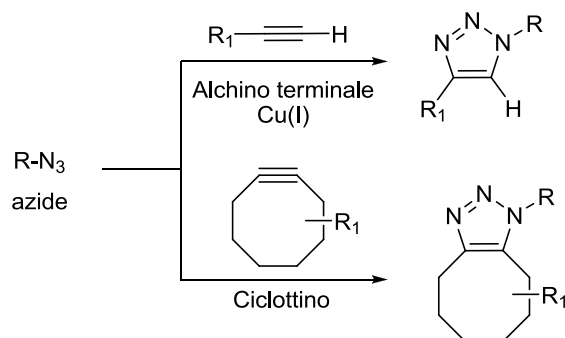
Schema 1. 'Staudinger Ligation'.

Il prodotto formato (4), che include al suo interno un fosfinossido, risulta sufficientemente stabile. La reazione procede a temperatura ambiente, in acqua a pH neutro. Il suo impatto in biochimica è stato immediato tanto è vero che la funzionalizzazione di diverse biomolecole ha sfruttato questa chimica. (15) Un'interessante applicazione nel campo dell'imaging molecolare riguarda la sintesi di apposite sonde fluorescenti che si attivano solo dopo reazione con il gruppo azidico (figura 1). Queste fosfine fluoro-geniche attivano la loro fluorescenza o per idrolisi del gruppo estereo o per ossidazione del gruppo fosfinico. (16) L'approccio, che è stato studiato sia *in vivo* che *in vitro*, ha tuttavia dimostrato limiti di impiego riguardanti soprattutto il monitoraggio in tempo reale di processi cellulari che si verificano a velocità nettamente superiori rispetto ai tempi della reazione di Staudinger. Oltre alle problematiche di carattere cinetico, intrinsecamente legate alla reazione, sembrerebbe limitare l'utilizzo di questo processo anche l'ossidazione all'aria della fosfina che può portare alla degradazione del reattivo. Questo ha portato alla ricerca di metodologie caratterizzate da cinetiche più consone al campo di applicazione.

Reazione [3+2] Azido-Alchino Catalizzata da Rame (CuAAC)

Mentre nella reazione di Staudinger viene sfruttato il carattere elettrofilo del gruppo azidico, l'approccio CuAAC prende in considerazione la reattività di 1,3-dipolo dello stesso gruppo.

Nel 1950 Huisgen e collaboratori hanno osservato che alta temperatura e pressione elevata consentono una classica cicloaddizione [3+2] tra un alchino non attivato ed un'azide. (17) In maniera indipendente, studi più recenti (Sharpless et al. (18) e Medal et al. (19) 2002) descrivono una rivisitazione di tale reazione che prevede una cicloaddizione 1,3-dipolare di un'azide con un alchino terminale per produrre un 1,2,3-triazolo 1,4-disostituito, in un processo catalizzato da Cu(I) (CuAAC) (schema 2). L'attivazione Cu-mediata dell'alchino, consente l'impiego di condizioni di reazione biocompatibili in termini di temperatura e pressione e rende la reazione di diversi ordini di grandezza più veloce della variante non catalizzata. L'impiego di specifici ligandi sul complesso di Cu(I) consente di accelerare ulteriormente la conversione. (20) Questa reazione ha tutte le proprietà di una reazione click (inclusa l'efficienza, la semplicità e la selettività), definite da Sharpless e collaboratori. Il primo lavoro in cui la reazione CuAAC è stata utilizzata come strategia di bioconiugazione è stato pubblicato da Finn e collaboratori, i quali, tramite l'approccio rame catalizzato, legarono dei coloranti a strutture virali. (21)



Schema 2. Reazione [3+2] Azido-Alchimo

Tuttavia, l'imprescindibile presenza di rame(I), metallo pesante tossico per cellule e organismi viventi, comporta ovvi problemi di biocompatibilità del metodo. È stato infatti osservato che, dopo funzionalizzazione di proteine espresse in *E. coli* tramite CuAAC, le cellule anche se sopravvivono alla reazione in fase iniziale perdono successivamente la capacità di dividersi. (22, 23)

Cicloaddizione [3+2] Azido-Alchimo Promossa da Sistemi Ciclici in Tensione

Inspirati dalla capacità del Cu(I) di accelerare la reazione di cicloaddizione [3+2] azido-alchimo, Bertozzi e collaboratori hanno di recente indagato la possibilità di incrementare la reattività delle componenti alchiniche costringendo queste ultime in cicli tensionati (schema 2). L'approccio è stato concepito per ovviare i problemi di biocompatibilità dovuti alla presenza di metalli pesanti. L'elevata reattività di alcheni ed alchini ciclici fu già osservata negli anni 60 da Wittig e Krebs che riportarono come il cicloottino (il più piccolo alchino ciclico stabile) reagisse 'come una esplosione' con fenilazidi. (24)

In figura 3 viene riportata la struttura rappresentativa della prima generazione di cicloottini indagata (**5**). La scarsa solubilità in acqua e la lenta cinetica di reazione con azidi di questa prima classe di alchini tensionati hanno spinto successivamente ad esplorare nuove alternative come **6** e **7**. I derivati rappresentati dalla struttura **6** sono dotati di maggiore solubilità nel mezzo acquoso mentre la terza generazione costituita da cicloottini monofluorurati (**7**) ha mostrato maggiore reattività rispetto alla controparte non

fluorurata. L'aumentata reattività dei derivati fluorurati, si può spiegare con il potere elettron-attrattore dell'alogeno, che abbassa l'energia del LUMO della molecola rendendo più facile l'interazione con le azidi. Infine un'ultima generazione di cicloottini difluorurati (**8**) (DIFO) ha mostrato di reagire con la funzione azidica con una velocità paragonabile a quella della reazione Cu-catalizzata. (25 - 28)

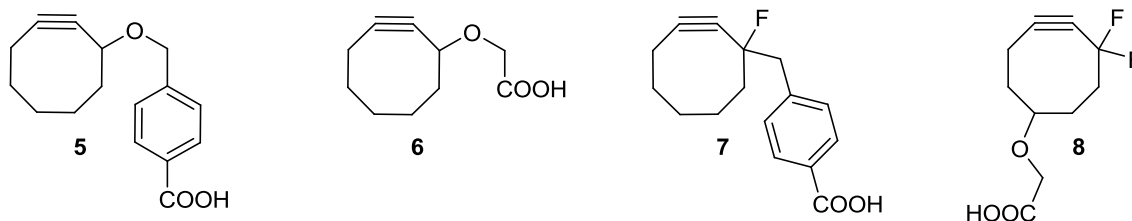


Figura 3. Le quattro generazioni di cicloottini.

Recentemente è stato provato come i DIFO (**8**) legati con dei fluorofori siano eccezionali marker utili per l'imaging. Questi sono stati fatti reagire con gruppi azidici legati a diverse biomolecole incluse in diversi sistemi biologici come in embrioni di zebrafish. (29,30)

2 PROCESSI BIOORTOGONALI PER LA GLICOSILAZIONE DI PROTEINE

Approcci bioortogonali sono estremamente utili nella glicosilazione post-traslazionale di proteine. È stato infatti ben stabilito come la porzione zuccherina presente sulla glicoproteina sia di fondamentale importanza non solo per la stabilità della struttura proteica, ma anche per differenti eventi biologici quali la crescita e la differenziazione cellulare. Dato che le glicoproteine sono isolate come miscele di glicoforme ed in quantità molto basse, esiste un forte interesse nella sintesi di glicopeptidi e glicoproteine con una ben definita struttura e composizione.

2.1

2.2 Definizione, Distribuzione e Funzione delle Glicoproteine

La glicosilazione è il più comune processo di modificazione post-traslazionale che avviene all'interno delle cellule eucariotiche; la glicosilazione origina le glicoproteine (figura 4), macromolecole caratterizzate da una struttura amminoacidica centrale, alla quale si legano covalentemente oligosaccaridi attraverso legami glicosidici. Un'altra classe di biomolecole in cui i carboidrati sono legati covalentemente ad una proteina sono i proteoglicani del tessuto connettivo. In essi la porzione zuccherina è organizzata in lunghe catene non ramificate, con un peso molecolare di 2000 o superiore, costituite soprattutto dalla ripetizione di unità disaccaridiche. Al contrario, una tipica glicoproteina, mostra catene di oligosaccaridi, spesso ramificate, di dimensioni variabili e composte da una singola unità zuccherina o da complessi di questa (è possibile la presenza anche di 30 unità monosaccaridiche). Dei numerosi monosaccaridi naturali, solo 10 sono quelli finora scoperti far parte di una glicoproteina. Questi comprendono monosaccaridi neutri (D-galattosio, D-glucosio, D-mannosio, L-fucosio, L-arabinosio o D-xilosio), monosaccaridi basici *N*-acetilati (2-amino-2-deossi-D-galactosio o 2-amino-2-deossi-D-glucosio) e un monosaccaride acido (acido neuro-amminico), che può essere nella sua forma *N*-acetilata, *N*-glicosilata o *O*-acetilata.

La catena polipeptidica delle glicoproteine viene sintetizzata sotto controllo genetico, mentre le catene zuccherine, sono biosintetizzate e quindi legate covalentemente al polipeptide per via enzimatica, attraverso un processo non rigidamente controllato. Questo comporta che il processo enzimatico porti alla formazione di prodotti non uniformi, detti glicoforme, caratterizzati da una stessa sequenza amminoacidica ma da una composizione zuccherina differente. Tale fenomeno, conosciuto come microeterogenicità delle glicoproteine, è alla base delle difficoltà legate alla purificazione, alla caratterizzazione e quindi allo studio di queste macromolecole.

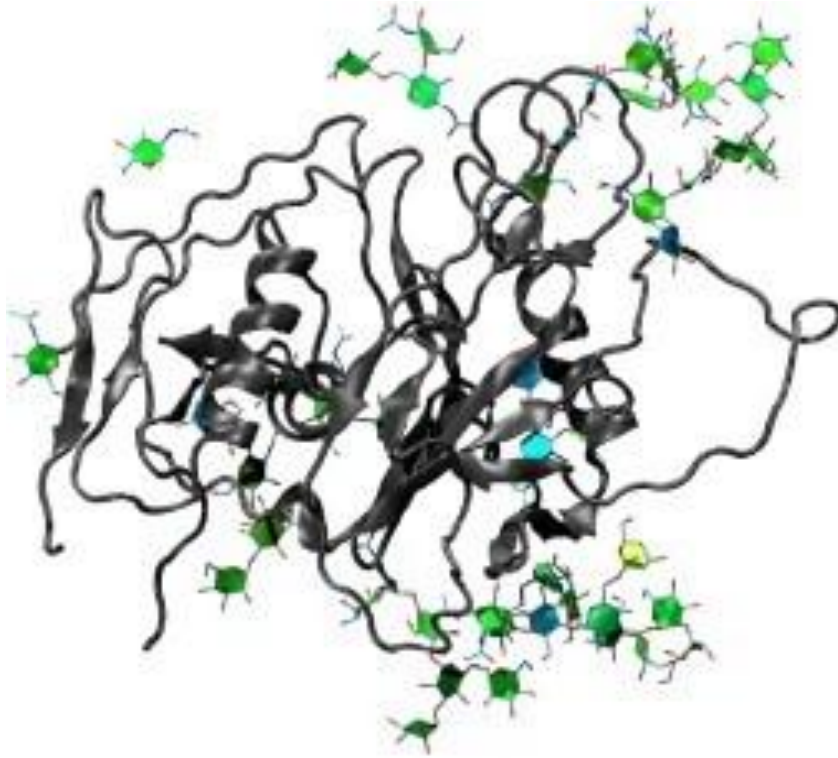


Figura 4. *Porzione di proteina glicosilata.*

Le glicoproteine sono ampiamente distribuite in natura, nel regno animale e vegetale, così come in batteri e virus (29). Praticamente tutte le cellule producono glicoproteine, alcune di queste rimangono all'interno della cellula dove contribuiscono al mantenimento delle strutture subcellulari, altre vengono rilasciate nello spazio extracellulare e mediano molteplici funzioni fisiopatologiche. La maggior parte delle proteine presenti nel sangue (inclusi i fattori necessari a determinare il gruppo sanguigno), molti ormoni, un largo numero di enzimi, il collagene e l'interferone, costituiscono esempi di glicoproteine dalle importanti funzioni biologiche.

Evidenze crescenti suggerirebbero che la porzione zuccherina della glicoproteina non abbia esclusivamente la funzione di protezione dalla degradazione proteolitica e dalla denaturazione, ma potrebbe interagire con dei siti specifici al fine di iniziare o modulare degli importanti eventi biologici. Gli effetti della glicosilazione sulle proprietà biofisiche della proteina dipendono dalla localizzazione del processo, dall'intorno e dal numero dei siti di glicosidazione. La grandezza delle strutture zuccherine ha un'importanza marginale, in quanto frequentemente i primi due o tre monosaccaridi sono i responsabili dei maggiori effetti di stabilizzazione. Gli zuccheri legati ad una proteina, possono essere in grado anche di fornire una sorta di 'controllo qualità' della glicoproteina nascente. (31) Infatti essi

di solito contribuiscono alla solubilità e al mantenimento conformazionale della proteina. Una non corretta glicosilazione produce una macromolecola instabile che pertanto non verrà secreta dal reticolo endoplasmatico e quindi conseguentemente degradata. La porzione zuccherina di una glicoproteina destinata a far parte della membrana plasmatica, oltre a prendere parte alla struttura architettonica della superficie cellulare, modula le interazioni cellula-cellula o cellula matrice extracellulare responsabili della crescita e della differenziazione. (32)

La glicosilazione di proteine risulta alterata in diverse patologie, ad esempio: nell'artrite reumatoide (si osserva un decremento della galattosilazione dell'IgG), nella fibrosi cistica (si osserva un decremento della sialilazione ed un decremento della fucosilazione di glicconiugati di membrana e del plasma), nella sindrome Wiskott-Aldrich e nell'AIDS. In questi casi, è necessario evidenziare che le variazioni nella glicosilazione, si devono considerare come una conseguenza e non la causa primaria della patologia. (34) Infatti, l'alterata struttura proteica ha un significato funzionale, e può servire sia come target diagnostico o prognostico della patologia che come target terapeutico. Rare sono le patologie direttamente collegate ad una alterata glicosilazione e di solito derivano da disordini congeniti della glicosilazione, collegati ad importanti sintomi come: malformazione, ritardo psicomotorio, disfunzione di alcuni organi. Queste patologie dimostrano l'importanza della glicosilazione delle proteine per lo sviluppo ed il funzionamento dell'organismo.

2.2 Legame Glicosidico in Natura: N- e O- Glicosil Amminoacidi

Dei 20 amminoacidi comunemente presenti all'interno di una proteina, solo alcuni sono in grado di formare legami con i carboidrati. In generale, nelle glicoproteine naturali sono stati individuati due tipi di legame zucchero-proteina: il legame N-glicosidico, che lega lo zucchero alla funzione ammidica presente sulla catena laterale dell'asparagina (Asn), e il legame O-glicosidico che può essere α o β e lega la porzione zuccherina alle catene laterali di serina (Ser) e treonina (Thr) (figura 5). Meno comune è il legame O-glicosidico con l'idrossilisina e l'idrossiprolina.

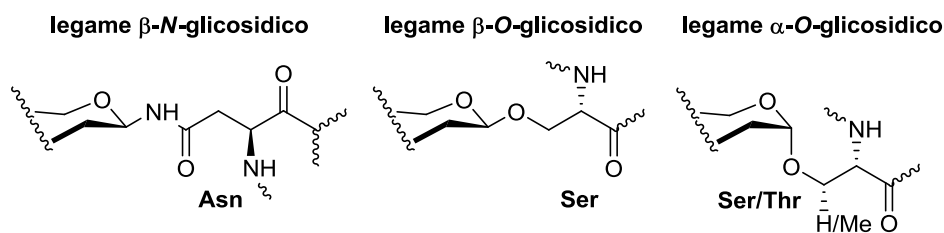


Figura 5. Alcuni legami glicosidici in natura.

In vivo, l' *N*-glicosilazione può avvenire solo sul residuo di asparagina incorporato in una sequenza consenso Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx si riferisce a qualsiasi amminoacido, esclusa la prolina). Durante la *N*-glicosilazione co-traslazionale, l'enzima oligosaccariltrasferasi, trasferisce l'unità oligosaccaridica dal dolicol fosfato (struttura sulla quale si forma il complesso oligosaccaridico prima di essere trasferito alla proteina target) alla proteina. Varie glicosil idrolasi tagliano successivamente l'oligosaccaride in un pentasaccaride, sul quale possono verificarsi le successive glicosilazioni. I residui zuccherini che normalmente sono coinvolti in questa tipologia di legame sono il β -D-glucosio (β -D-Glc), la β -D-*N*-acetilglucosamina (β -D-GlcNac), e la β -D-*N*-acetilgalattosamina.

Al contrario, la biosintesi di *O*-glicosidi non segue una via convenzionale. Il nucleo zuccherino mostra comunemente la presenza del 2-acetamido-2-desossi- D-galattosio (GalNAc) legato alla serina o alla treonina. Differenti glicosiltransferasi tessuto-specifiche lavorano al fine di costruire diversi tipi di *O*-glicosidi che prendono il nome di mucine. Le mucine sono proteine abbondantemente *O*-glicosilate espresse su molteplici tipi di cellule epiteliali. Queste proteine costituiscono inoltre un'importante classe di antigeni legati ai tumori tanto da essere stati suggeriti come potenziali target anticancro.

2.3 Sintesi di Glicopeptidi Naturali

Dato il ruolo fondamentale svolto dalle glicoproteine in processi che regolano la vita cellulare, la possibilità di disporre di tali glicoconjugati al fine di poterli utilizzare anche come farmaci nella cura di differenti patologie, costituisce oggetto di un crescente interesse scientifico. Purtroppo risulta spesso molto difficile isolare queste macromolecole in quanto normalmente sono presenti in basse concentrazioni nei sistemi biologici. Inoltre, come già detto, la natura tende a produrre differenti glicoforme che possono variare per

diversi aspetti, inclusa l'estensione della catena oligosaccaridica. La sintesi organica può fornire un valido contributo allo studio di queste macromolecole attraverso la costruzione di glicopeptidi modello costituiti da una parziale sequenza peptidica a cui si legano una o più catene saccaridiche. I peptidi sintetici hanno il vantaggio di non esser interessati da microeterogenicità essendo possibile variare in modo controllato sia la sequenza peptidica che quella zuccherina. Possono inoltre essere ottenuti in elevata quantità e grado di purezza. Per tali motivi l'utilizzo di modelli sintetici per lo studio biomedico e strutturale di questi glicoconjugati sta rivestendo un'importanza crescente.

La formazione stereoselettiva del legame glicosidico è uno aspetto critico della sintesi di glicopeptidi naturali, che deve essere tenuto in considerazione durante l'intero processo sintetico. Per questa ragione, nell'assemblaggio del glicopeptide risulta importante valutare la compatibilità e la chemoselettività delle reazioni applicate.

La sintesi dei glicopeptidi può essere condotta sia in fase liquida che in fase solida. La porzione zuccherina può inoltre essere introdotta in due momenti differenti: nello step finale della sintesi attraverso una *N*-acilazione selettiva di una glicosilammina o una *O*-glicosilazione del peptide (tale approccio è anche detto di condensazione diretta) oppure sequenzialmente mediante l'utilizzo di amminoacidi glicosilati utilizzati come 'building blocks'. La condensazione diretta può avvenire sia per via enzimatica che per via chimica. Il metodo chimico è stato descritto solo da pochi autori (35-37) con successo parziale nella sintesi di peptidi glicosilati. La metodologia infatti ha scarsa applicazione alla formazione di glicopeptidi contenenti più di 3-5 residui amminoacidici e dotati di molteplici siti di glicosilazione. Per quel che riguarda la via enzimatica invece, è importante mettere in risalto che l'utilizzo dell'enzima è ristretto alla formazione del legame glicosidico tra l'unità zuccherina e la porzione peptidica. Gli enzimi ad oggi a disposizione per mediare la formazione di questo legame sono limitati, tra questi il più studiato è un oligosaccaril transferasi (OT) (38). Probabilmente l'isolamento, la caratterizzazione e quindi lo studio di nuove transferasi potrebbe rendere questo approccio sintetico più versatile.

È necessario evidenziare che la glicosilazione diretta attraverso l'approccio chimico comporta problemi di regio/stereo selettività che possono insorgere al momento della formazione finale del legame glicosidico. Contrariamente, la possibilità dell'utilizzo sequenziale di glicosil amminoacidi come 'building blocks' consente di affrontare in maniera più efficace gli aspetti di regio/stereo selettività prima dell'assemblaggio del peptide. Questo ha permesso di estendere con successo la strategia alla sintesi di una grande varietà di N/O- glicopeptidi e alla costruzione di librerie di glicopeptidi. (39,40) La

problematica riguardante la stereoselettività di formazione dei legami *N*- o *O*- glicosidici, deve tener conto della natura acetalica di tali legami che rende rilevanti diversi aspetti: a) la sensibilità agli acidi (figura 6); questi legami possono rompersi a pH acido e dare quindi de-glicosilazione o, quanto meno, anomerizzazione (gli *N*-glicosidi e i glicosil derivati della 5-idrossilisina risultano essere i più acido stabili); b) la sensibilità alle basi (figura 6) dei derivati *O*-glicosidici della serina e della treonina; questi, trattati con una base, producono, attraverso una β -eliminazione, la liberazione dello zucchero e la formazione di amminoacidi α,β insaturi. Per questi motivi la manipolazione degli amminoacidi glicosilati protetti deve limitarsi all'impiego di condizioni non drastiche, che consentono di ostacolare le reazioni collaterali di anomerizzazione o β -eliminazione.

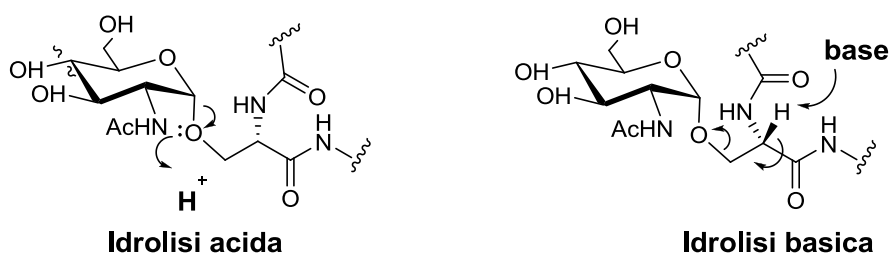


Figura 6. *Idrolisi acida e basica dei legami glicosidici.*

La sensibilità del legame glicosidico non riguarda solo l'aspetto chimico ma anche quello biologico. Infatti, la de-glicosilazione può essere operata anche da un enzima *in vivo*, possibilità assolutamente limitante per tutti quei glicopeptidi che hanno un potenziale effetto terapeutico. Trovare quindi un modo per ridurre il clivaggio enzimatico del legame glicosidico potrebbe voler dire incrementare il tempo di emivita del glicopeptide ad azione terapeutica. Da studi chimici si è osservato che la sostituzione dei legami glicosidici C-O e C-N, rispettivamente con legami C-S e C-C conferisce resistenza all'idrolisi enzimatica. Inoltre i C- e S-ammino-glicosidi hanno dimostrato una conformazione ed un'attività biologica simile alla controparte naturale (concetto di isosteria e bioisosteria) (41). Per questi motivi numerosi sono gli sforzi indirizzati nella sintesi di C- e S glicopeptidi. La sostituzione dell'O con un atomo di S risulta essere teoricamente un approccio lineare nella sintesi di isosteri di O-glicopeptidi naturali.

2.4 Metodi per la sintesi di S-glicosil amminoacidi e S-glicopeptidi

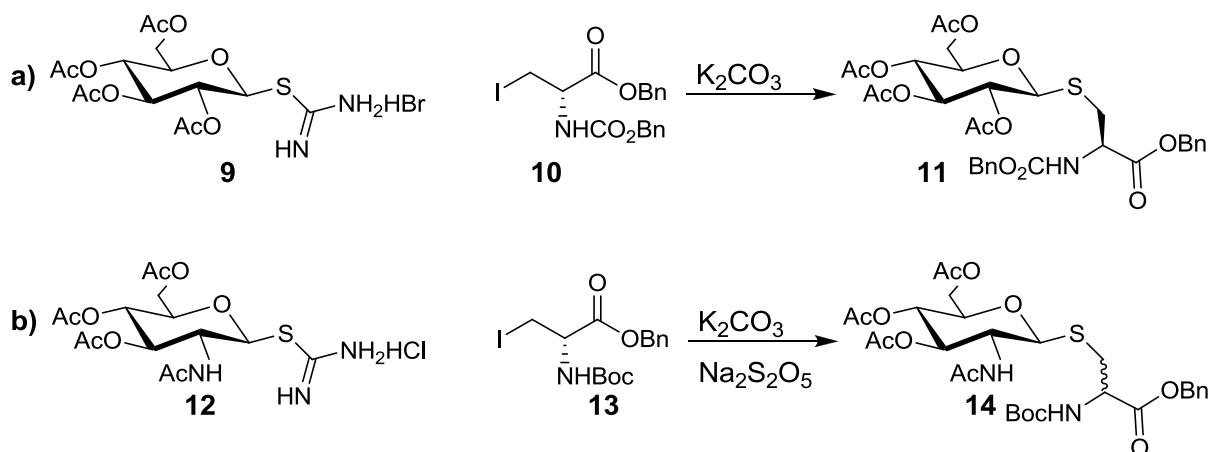
In questa sezione saranno riassunti i metodi conosciuti per la sintesi di S-glicosil amminoacidi e peptidi.

Alchilazione in posizione anomerica

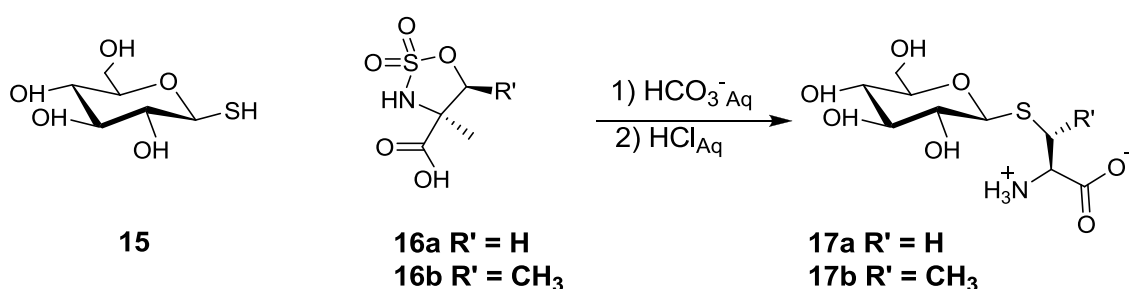
Vaculik e collaboratori nel 1977 hanno riportato come in condizioni basiche (schema 3a) (K_2CO_3 , DMSO/ H_2O) l'accoppiamento tra un 1-tio zucchero protetto (**9**) ed una β -iodoalanina (**10**) proceda con una resa del 72% per dare l' S-glicosil amminoacido (**11**). In condizioni analoghe (schema 3b) (K_2CO_3 , $Na_2S_2O_5$ /acetone/ H_2O) si osserva la β -eliminazione da parte dell'amminoacido coinvolto che porta al corrispondente estere α,β -insaturo. Questo, comportandosi da accettore di Michael, può subire l'attacco nucleofilo da parte del tio-zucchero e produrre quindi una miscela di due dia stereoisomeri (**14**) (L e D in un rapporto di 5:1). L' epimerizzazione viene evitata conducendo la reazione in un sistema bifasico (CH_2Cl_2/H_2O) in 'phase transfer' catalisi con Bu_4NH .

In condizioni molto simili, Schmidt e collaboratori hanno realizzato l'S-alchilazione di glicosiltioli. L'accoppiamento è stato verificato con differenti tio-zuccheri e una β -bromoalanina o una γ -bromo-omoalanina all'interno di una sequenza peptidica. Il processo può essere condotto analogamente al precedente in un sistema bifasico ($H_2O/EtOAc$) in presenza di un sale d'ammonio come 'phase transfer' e di $NaHCO_3$. La reazione, condotta ad un pH di circa 8.5, porta alla formazione dell'S-glicosilamminoacido in buone rese senza racemizzazione.

Halcomb e collaboratori (42) hanno riportato un metodo per la sintesi di S-glicosil amminoacidi in buffer acquoso. Il tio-zucchero (**15**) è stato fatto reagire con una funzione sulfamidica ciclica (schema 4) presente su amminoacidi come serina (**16a**) o treonina (**16b**). Dopo trattamento acido si ottengono i corrispondenti glicosil amminoacidi (**17a, b**) in ottime rese. Tale funzione è stata in seguito introdotta anche su amminoacidi che occupano la posizione terminale di una catena peptidica per ottenere i glicopeptidi corrispondenti con rese quantitative. Il limite di questo approccio sta nel fatto che l'amminoacido può essere glicosilato solo con monosaccaridi in quanto l'utilizzo di un acido forte per eliminare il gruppo solfato può portare al clivaggio del legame glicosidico.

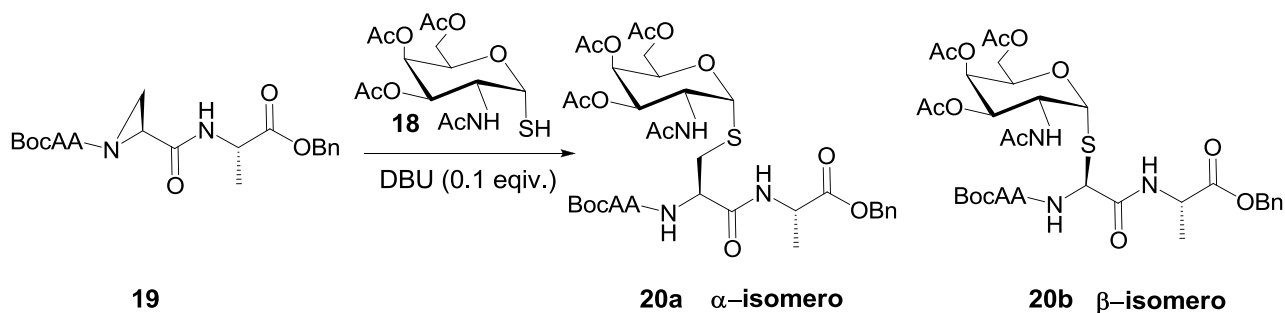


Schema 3. Sintesi di S-glicosil aminoacidi in condizioni basiche.



Schema 4. Sintesi di S-glicosil aminoacidi in buffer acquoso.

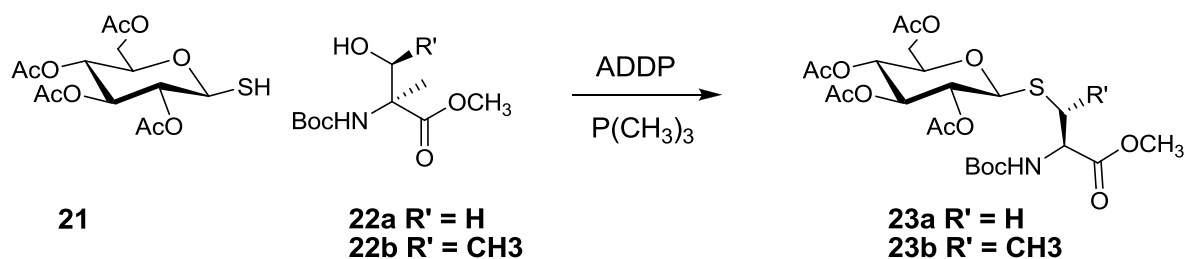
I tio-zuccheri (**18**) possono infine aggiungersi, in presenza di una quantità catalitica di DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene), ad una funzione aziridinica (**19**) (schema 5), e dar vita ad una miscela regioisomerica di S-glicopeptidi in buona resa con un forte eccesso dell'isomero α (**20a**) rispetto al β (**20b**). Per dimostrare la versatilità di tale reazione la funzione aziridinica è stata introdotta anche su di un aminoacido occupante una posizione interna della catena peptidica. L'approccio è efficiente sia in fase liquida che in fase solida. Il grosso limite di questa metodologia è però la formazione dei due regioisomeri. (43,44)



Schema 5. Sintesi di S-glicosil aminoacidi mediante addizione ad una funzione aziridinica.

Condensazione di Mitsunobu

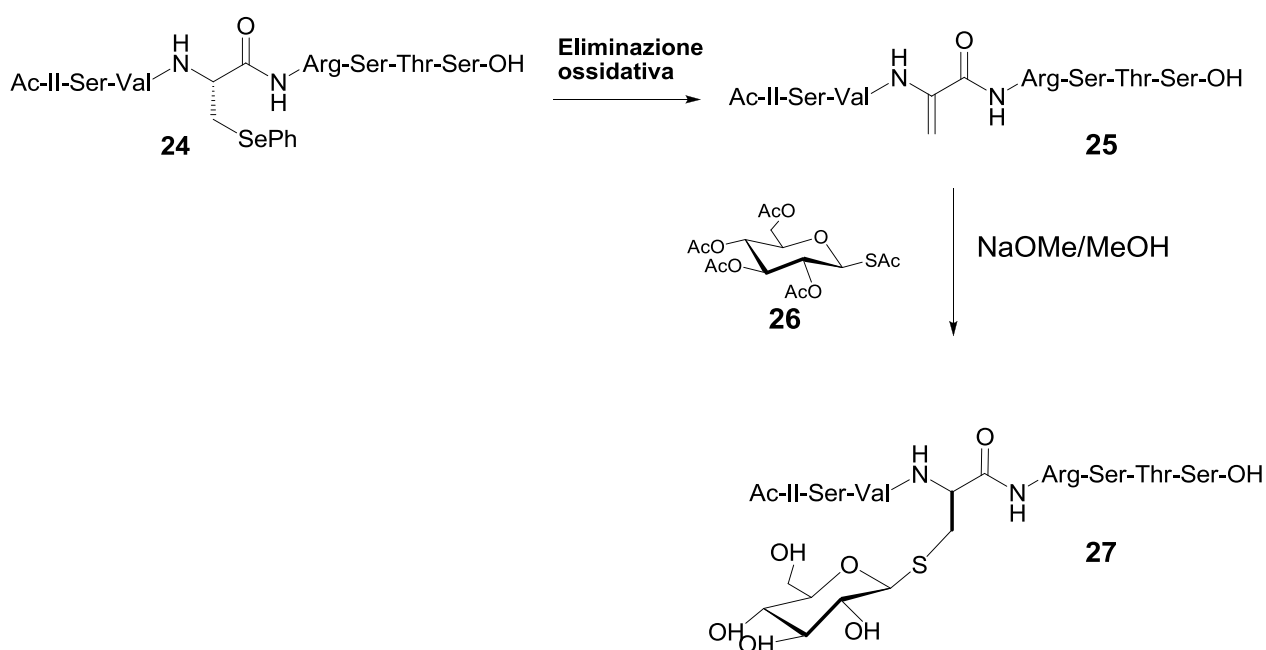
La reazione di Mitsunobu è stata utilizzata come variante dell'alchilazione del tio-gruppo in posizione anomERICA. L'approccio, applicato sia in soluzione che su supporto solido per sostituire il gruppo idrossilico di un aminoacido (N-Boc-treonina metilestere **22a** o N-Boc-serina metilestere **22b**) con un tio-zucchero (**21**) in presenza di 1,1'-azodicarbonil-dipiperidina (ADDP), porta ad ottenere i corrispettivi tioglicosil aminoacidicorrispondenti (**23a, b**) con rese moderate (schema 6). (44)



Schema 6. Sintesi di S-glicosil aminoacidi mediante condensazione di Mitsunobu.

Addizione di Michael

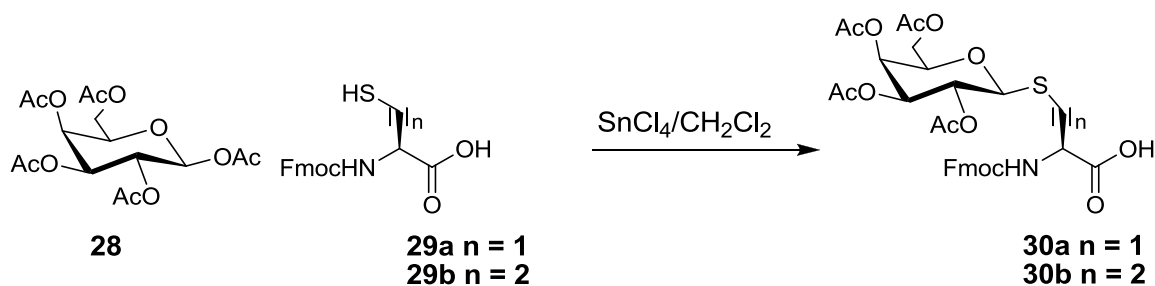
È stata recentemente descritta la possibilità di ottenere degli S-glicosil amminoacidi attraverso un'addizione di Michael (schema 7) della funzione tiolica di uno zucchero **26** ad una deidroalanina posta all'interno di una catena peptidica (**25**). Il processo, che avviene in condizioni basiche, risulta compatibile anche con zuccheri non protetti e porta alla formazione di una miscela di diastereoisomeri (**27**) in buone rese (62-74%). Il deidropeptide si ottiene a partire dal selenide (**24**) corrispondente mediante ossidazione in condizioni blande. (45)



Schema 7. Sintesi di S-glicosil peptidi mediante addizione di Michael.

S-glicosilazione catalizzata da acidi

Gli acidi di Lewis possono promuovere la sintesi di diversi prodotti glicosilati. È stata indagata la glicosilazione di *N*-Cbz e *N*-Fmoc-cisteine (**29a**) e omocisteine (**29b**) con un β -D-galattosio penta acetilato (**28**) utilizzando come promotori della reazione $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ e SnCl_4 in diclorometano; questa strategia ha fornito ottime rese degli S-glicosil amminoacidi (**30a**, **30b**) corrispondenti (schema 8).



Schema 8. Sintesi di S-glicosil amminoacidi catalizzata da acidi.

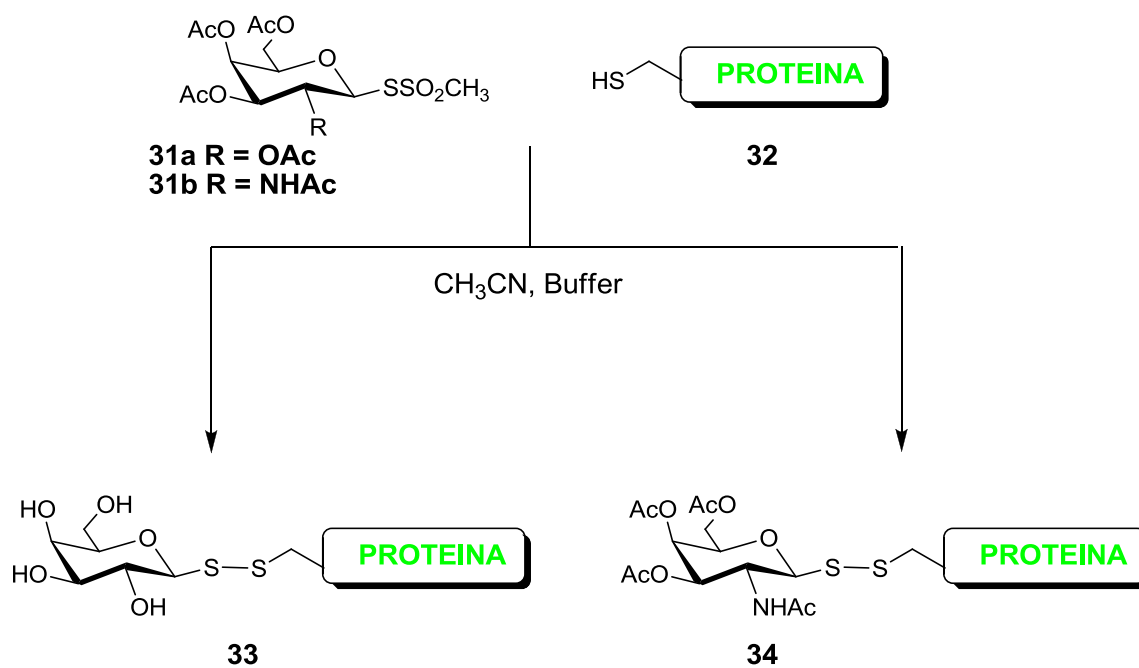
S_N2 di un alogenuro in posizione anomERICA

La sintesi di S-glicosil amminoacidi è stata condotta anche attraverso la sostituzione nucleofila S_N2 di un alogenuro in posizione anomERICA dello zucchero con il gruppo solfidrilico di una cisteina. Kessler(46) ha utilizzato le condizioni di Koenigs-Knorr per glicosilare il gruppo tiolico di una cisteina con cellobiosil bromuro O-acetilato, ottenendo così l'S-glicosil amminoacido con una resa dell'85%. Un approccio che sfrutta una reazione di sostituzione nucleofila ha diversi vantaggi anche legati alla preparazione dei reattivi di partenza; infatti sia i peptidi contenenti un residuo di cisteina come del resto i glicosilalogenuri sono facilmente sintetizzabili. Recentemente, (47) sono stati glicosilati per la prima volta peptidi contenenti cisteine ed omocisteine con un'ampia varietà di glicosil bromuri in condizioni acquose basiche ottenendo i corrispondenti glicopeptidi in ottime rese (52-95%).

S-glicosilazioni attraverso la formazione di un legame disolfuro

Davis e collaboratori hanno descritto (48-51) una strategia che prevede inizialmente l'introduzione di una cisteina come sito di glicosidazione chemoselettiva in una posizione prelezionata all'interno di una data proteina (**32**). In un secondo momento, viene fatto reagire il suo residuo tiolico con un glicosil metantiosolfonato (**31a,b**), preparato molto facilmente per sostituzione nucleofila dell'alozucchero con il sodio metantiosolfonato. Queste reazioni sono rapide ed avvengono in maniera quantitativa. Potrebbe tuttavia

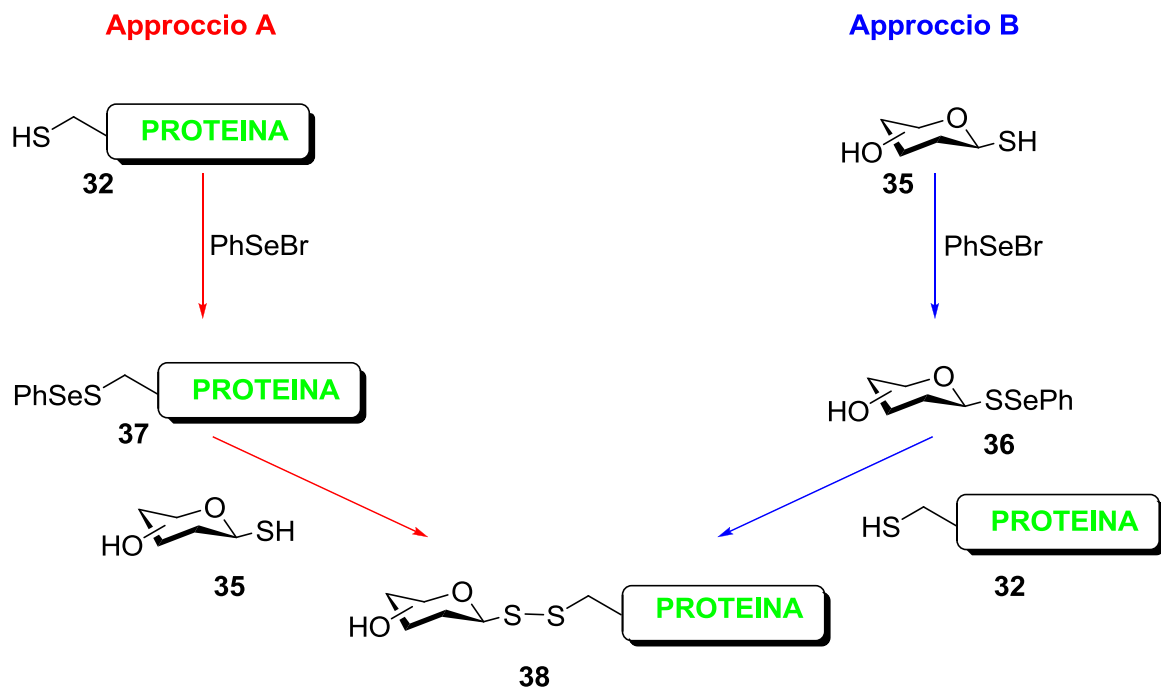
verificarsi una totale o parziale deacetilazione del substrato a seconda del pH a cui viene condotto il processo (schema 9).



Schema 9. Sintesi di S-glicosil proteine mediante formazione di un ponte disolfuro.

Lo stesso Davis ha anche riportato una sintesi di S-glicosil peptidi in cui mono od oligo saccaridi (con più di sette unità zuccherine) si legano ad uno o più siti all'interno della stessa proteina. Sono state investigate a tal proposito due strategie parallele (schema 10) in cui il gruppo solfidrilico della cisteina contenuta nella proteina svolge i ruoli contrastanti di elettrofilo e nucleofilo. Nel primo caso (schema 10 approccio A) la cisteina viene convertita nel corrispondente fenilselenil solfuro (**37**); l'atomo di zolfo elettrofilo sarà suscettibile di attacco da parte di un 1-tio-monosaccaride o oligosaccaride (**35**). Nel secondo caso (schema 10 approccio B) è il tio gruppo in posizione anomeric al mono o all'oligosaccaride (**35**) ad essere convertito nel fenilselenilsolfuro **36** corrispondente che potrà quindi accoppiarsi con la cisteina contenuta all'interno della proteina (**32**). Studi biologici hanno inoltre dimostrato la stabilità del legame disolfuro neoformato. Data la possibilità di formare disolfuri mediante ossidazione all'aria, alcuni glicopeptidi sono stati sintetizzati a partire da 1-tiozuccheri e peptidi contenenti un residuo di cisteina

semplicemente in condizioni basiche. È stato riportato che in presenza di un largo eccesso di tio-zucchero si osserva la formazione esclusiva del disolfuro fra zucchero e peptide corrispondente e non la forma ossidata disolfurica del peptide. Attraverso questo approccio residui liberi di cisteina presenti nell'albumina del siero bovino (BSA) sono stati glicosilati con 1-tiozuccheri.

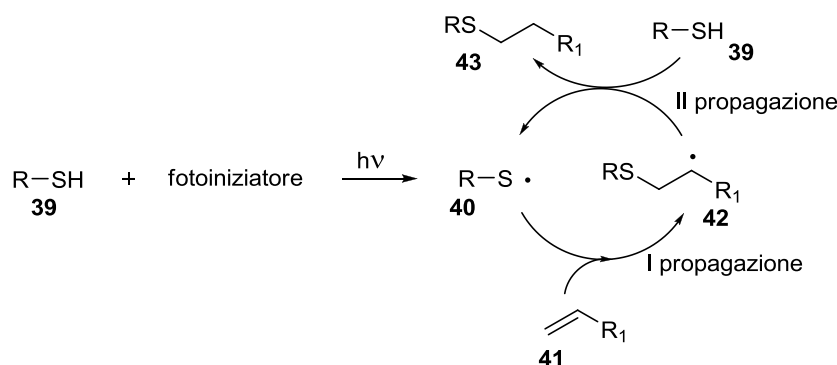


Schema 10. Sintesi di S-glicosil proteine mediante ponte disolfuro.

3 OBIETTIVO DELLA TESI: *utilizzo delle reazioni radicaliche tiol-ene e tiol-ino per la sintesi di S-glicosil amminoacidi ed s-glicopeptidi.*

3.1 *Le reazioni tiol-ene e tiol-ino e loro impiego in studi di glicoconiugazione*

L'addizione di zolfo elementare a polimeri insaturi, è un processo chiamato di "vulcanizzazione" scoperto casualmente nel 1839 da Goodyear (52) ed applicato fino ai nostri giorni nell' industria. L'addizione di tioli ad olefine (reazione tiol-ene) fu riportata successivamente da Posner nel 1905. (53) Le applicazioni di questa reazione sono molteplici interessando in una prima fase la sintesi polimerica per poi estendersi a vari campi della sintesi organica e, più recentemente, a modificazioni di sistemi biologici. (54) Nel 1938 Kharhasch e collaboratori dimostrarono che tale reazione procede attraverso un meccanismo radicalico (55) (schema 11) che consta di una fase di iniziazione, di due step di propagazione e di una comune terminazione.



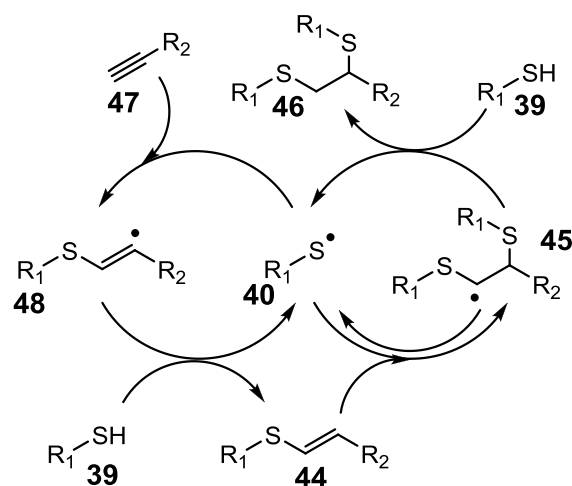
Schema 11. *Ciclo radicalico della reazione tiol-ene fotoindotta.*

Il vantaggio della reazione tiol-ene rispetto ad una normale polimerizzazione mediante radicali liberi sta nella labilità del legame tra H e S e quindi nella facilità con cui un atomo di idrogeno può essere estratto dal gruppo tiolico. Questo è dovuto al fatto che l'H, elettrone povero, è legato ad un atomo di S che è meno elettronegativo se comparato per esempio con l'O di un gruppo alcolico. Ciò viene confermato se si confrontano le forze

dei due legami in esame, S-H (BDE, MeS-H = 368.44KJ/mol)(56) e O-H (BDE, MeO-H=435.43 KJ/mol).

Il ciclo radicalico ha inizio con la formazione di un tiol radicale (**40**) per eccitazione diretta della stessa molecola mediante luce ultravioletta o per eccitazione indiretta di un fotoiniziatore, che darà vita a specie radicaliche le quali genereranno a propria volta il sulfanil radicale (schema 11). Tipicamente la reazione tiol-ene richiede l'utilizzo di alcuni fotoiniziatori come il benzofenone (BP) o il dimetossifenil acetofenone (DPAP)(57). Anche l'AIBN (2,2'-azobis(2-metilpropionitrile) può essere utilizzato come iniziatore radicalico. Sono fondamentali però, per l'attivazione di questo, temperature elevate che non sono compatibili con le condizioni fisiologiche alle quali avvengono gli studi di bioconiugazione. Cramer e collaboratori hanno dimostrato che è possibile promuovere l'omolisi del legame SH attraverso l'irradiazione diretta della miscela di reazione con una luce ultravioletta ad una λ specifica di 254 nm . La reazione senza l'utilizzo di fotoiniziatore risulta molto lenta, per la ridotta formazione di specie radicaliche dello S. Il radicale sulfanilico (**40**) si lega quindi all'alchene (**41**) secondo un andamento anti-Markovnikov, per formare una nuova specie radicalica al carbonio (**42**). Nel successivo step di propagazione, il secondo radicale formato dal processo reagisce con una seconda molecola di tiolo (**39**) (a cui strappa un idrogeno radicalico) per dare un tioetere (**43**) come prodotto ed un nuovo radicale sulfanilico, che dà inizio ad un nuovo ciclo radicalico. Una varietà di terminazioni sono possibili per questa reazione; esse sono poco indagate, ma potrebbero avvenire per ricombinazione di derivati radicalici del C o dello S.

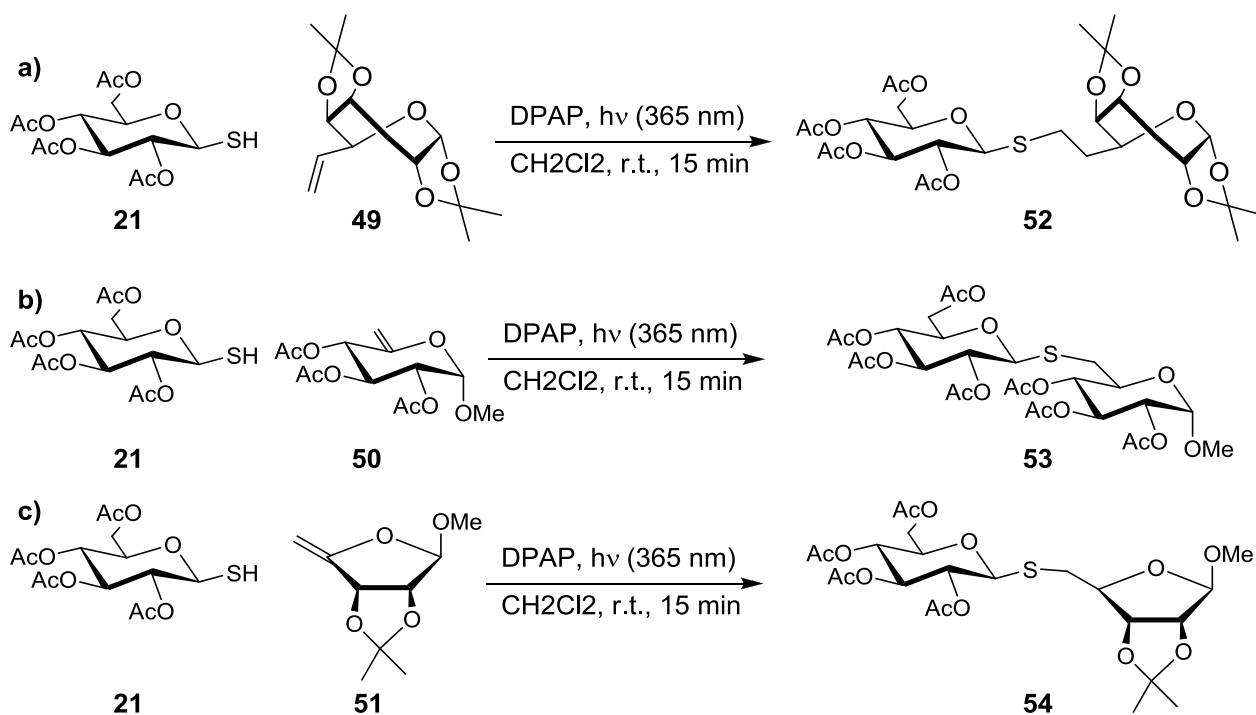
La reazione tiol-ino, considerata reazione sorella della tiol-ene, fu riportata per la prima volta nel 1930 da Finzi (58) e Kohler (59) in studi non finalizzati ad un'interpretazione meccanicistica della reazione stessa. Solo due decenni dopo Bader (60, 61) descrisse di aver osservato quella che definì un'"anormale" addizione di acido tioacetico ad un acetilene monosostituito per dare un vinil derivato. Come per la tiol-ene anche questa reazione risulta promossa da perossidi organici o dalla luce. La reazione tiol-ino fotoindotta rispecchia in generale il comportamento dell'accoppiamento tiolo-alchene (TEC, thiol-ene coupling). Essa è caratterizzata da un primo step (schema 12) che coinvolge l'attacco anti-Markovnikov di un tiol radicale (**40**) alla funzione alchilica (**47**) a dare un intermedio tioetereo vinilico (**44**), al cui doppio legame, in un secondo step, si può aggiungere una seconda molecola di tiol radicale (**40**) portando così alla formazione di un 1,2 ditioetere (**46**).



Schema 12. Ciclo radicalico della reazione tiol-ino.

Nel 2008 il concetto di reazione ‘click’ fu accostato per la prima volta alla reazione TEC. Di contro, in una recente review (62) sono state evidenziate differenze tra la TEC e l’accoppiamento tiolo-alchino (thiol-yne coupling, TYC) ed è stato inoltre considerato che le caratteristiche dei due processi non fittano con i criteri dettati da Sharpless per la chimica ‘click’. Gli autori suggeriscono che la idrotiolazione di un alchino, in modo particolare la formazione del vinil-monoaddotto, possa essere una valida alternativa alle reazioni tiol-ene per realizzare glicoconiugazioni in condizioni ‘click’. Non è da sottovalutare inoltre la possibilità di poter legare all’alchino due molecole di tiolo differenti, attraverso processi sequenziali di TYC e di TEC.

La sintesi di S-disaccaridi è un esempio tipico di applicazione della reazione tiol-ene fotoindotta nel campo della glicoconiugazione. Diverse sono le procedure chimiche conosciute per la sintesi di queste molecole. La tiol-ene è stata a tal fine impiegata per la prima volta nel 2009 (63) dal gruppo del Prof. Dondoni. Le condizioni di sintesi sono state ottimizzate attraverso l’impiego di un 1-tio- β -D- glucosio (**21**) e di un galattosio protetto portante un alchene al C6 (**49**) (Schema 13a). Il processo ha portato alla formazione del disaccaride (**52**) corrispondente con una resa dell’80%. Ottimi risultati sono stati ottenuti dalla reazione del tio-glucosio anomero (**21**) con l’ esa-5-enopiranoside (**50**) e con il penta-4-enofuranoside (**51**). Il punto importante di questa sintesi è che con questo approccio sono state ottenuti isosteri rispettivamente dell’1,6 (**53**) e dell’1,5 (**54**) O-disaccaride (schema 13b,c). Sono stati valutati con successo anche il comportamento di altri substrati nonché la compatibilità del processo con differenti mezzi di reazione.



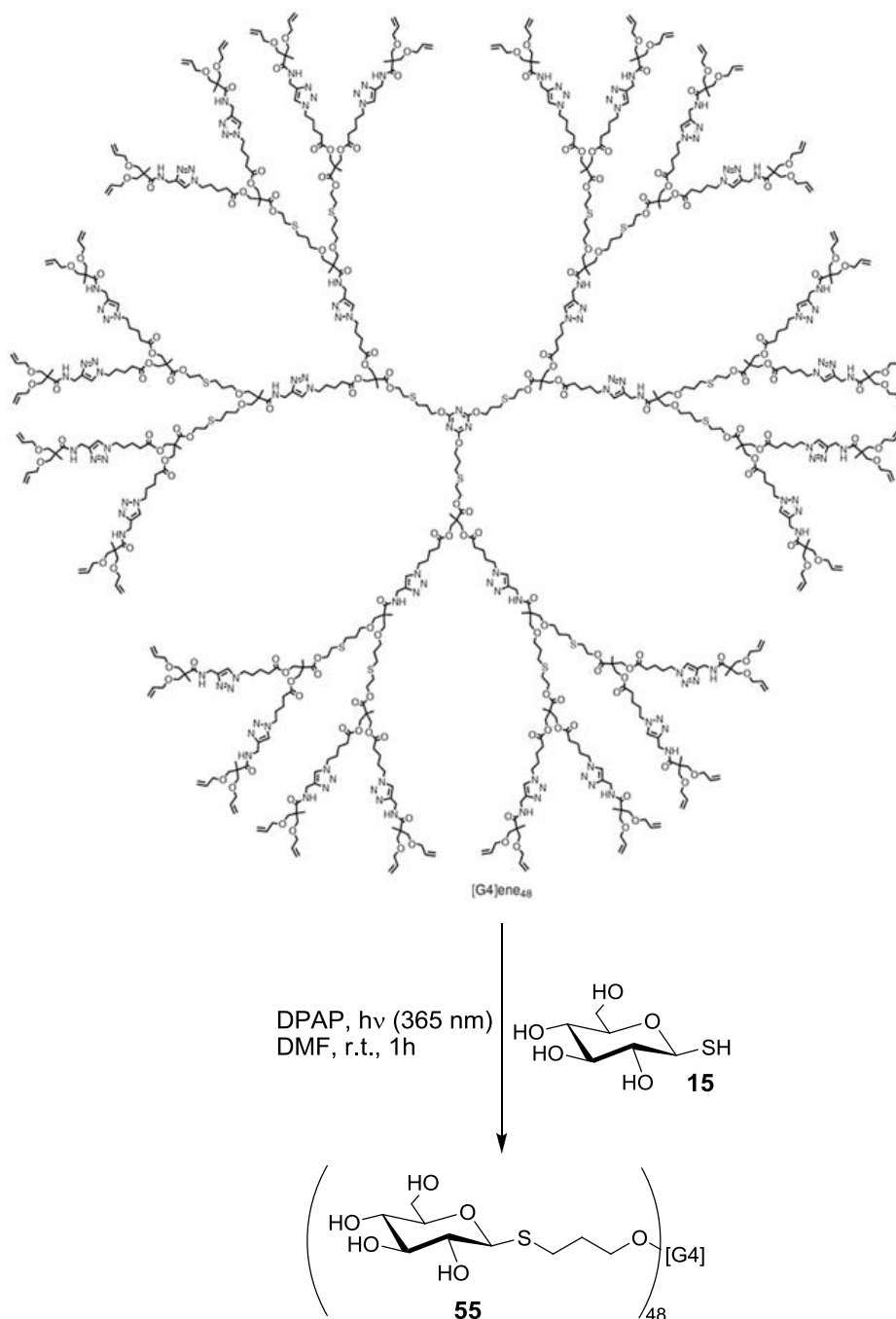
Schema 13. Sintesi di S-disaccaridi.

Importanti risultati ottenuti applicando le reazioni TEC fotoindotte hanno coinvolto la formazione di glicocluster su differenti scaffold. L'utilità di macromolecole che iper-spongono unità zuccherine sta nella possibilità che esse hanno di mimare l'effetto di multivalenza intrinseco nelle cellule.

Nel 1997 Lindhorst e collaboratori (64) hanno descritto per primi la costruzione di glicodendroni utilizzando in sequenza la TEC e un'addizione isotiocianato-ammina. Un'ulteriore applicazione della TEC nella sintesi di glicodendrimeri è stata riportata in un lavoro di collaborazione condotto dai gruppi di Dondoni, Hawker e Malkoch. (65) In questo studio sono stati glicosilati dendrimeri di quarta generazione ([G4]ene) funzionalizzando 48 siti presenti nella stessa macromolecola con un identico tio-zucchero (**55**) (schema 14).

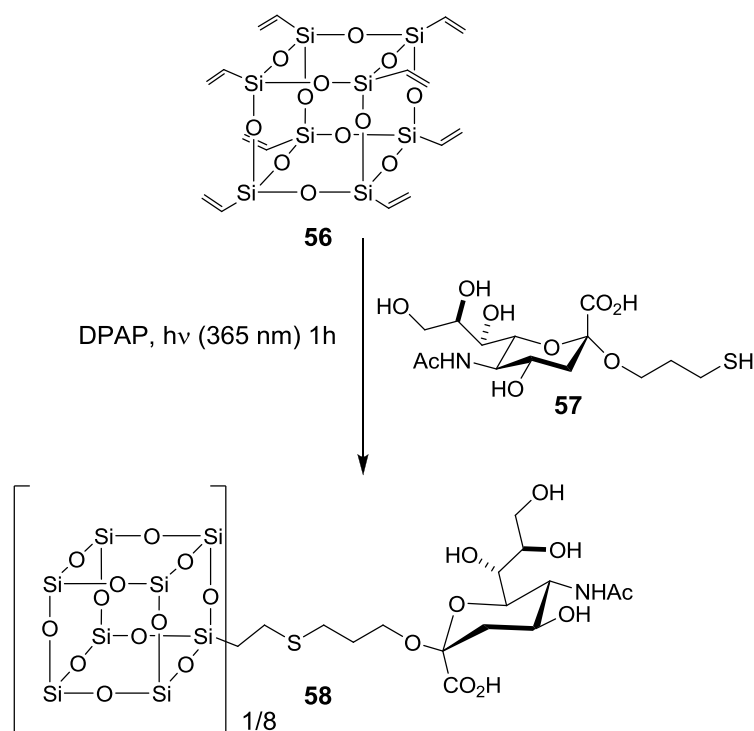
Il sililsesquiossano, comunemente conosciuto come POSS (oligosililsesquiossano poliedrico), ha recentemente suscitato l'interesse di molti chimici per la sintesi di glicocluster ottavalenti globulari. Nel 2010, in modo indipendentemente, Fessner (66) e Chiara (67) hanno riportato la prima sintesi di POSS glicoconiugati ottenuti mediante CuAAC. Lee (68) e collaboratori hanno descritto un processo fotoindotto (λ_{MAX} 254 nm) per l'addizione alla struttura poliedrica di mannosil e lattosil tiobutiramidi a dare i

corrispondenti ottavinil POSS glicocongiugati attraverso ponti tioeterei. Il gruppo di Dondoni ha descritto l'accoppiamento, via classica TEC (λ_{\max} 365 nm), tra il POSS modificato con funzionalità alliliche (**56**) e molecole di acido sialico (**57**) in cui era stata preventivamente inserita una funzione tiolo. Questo sialocluster (**58**) (schema 15) ha suscitato un particolare interesse data la potenziale attività antivirale.



Schema 14. Glicosilazione di dendrimeri mediante TEC fotoindotta

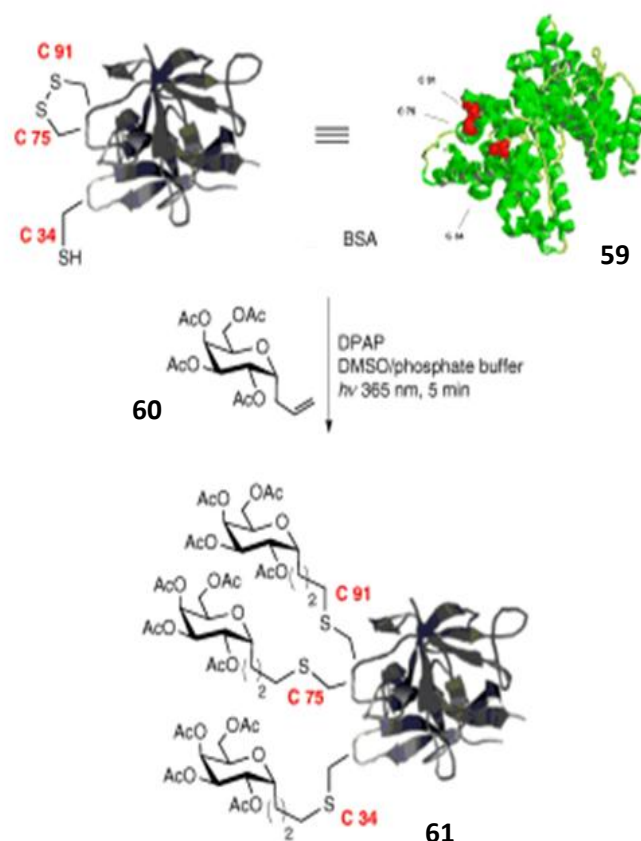
Ai fini della ricerca oggetto della presente tesi è importante sottolineare come sia stata valutata e confermata la compatibilità degli approcci fotoindotti sopradescritti (reazioni TEC e TYC), con le condizioni fisiologiche (pH = 7.4). In un lavoro del 2009 (69), il gruppo nel quale ho svolto le ricerche che hanno interessato parte del mio dottorato, ha riportato uno studio di glicosilazione, mediante TEC fotoindotto, di una proteina globulare del siero bovino (BSA)(59 schema 16) contenente in posizione 34 un residuo di cisteina libera. L'obiettivo degli autori era quello di coniugare selettivamente il residuo cisteinico contenuto nel target proteico con dei C-allil galattosidi (60). Tuttavia, la reazione, condotta in condizioni fisiologiche, non ha coinvolto unicamente il sito target ma anche due gruppi solfidrilici prodotti dalla rottura di un ponte disolfuro tra i residui di cisteina 75-91(61). Questa scissione è stata ipoteticamente ascritta ad un trasferimento elettronico dovuto al foto eccitamento di un residuo di triptofano prossimo al residuo cistinico.



Schema 15. Sintesi del sialoclaster mediante TEC fotoindotto.

Gli stessi autori, nell'ambito di uno studio condotto in collaborazione con il gruppo di Davis, hanno applicato la reazione tiol-ino fotoindotta (70), al fine di introdurre una molecola di C-glicoside e/o di un marcatore (tag) sul residuo cisteinico in posizione 34 della BSA. Anche in questo caso si è osservata la funzionalizzazione in tre posizioni della

proteina. Sebbene sia necessario osservare che l'integrità dei ponti disolfuro sia difficile da preservare in questo tipo di approccio, è da evidenziare che la proteina continua a mantenere una stabilità sia strutturale che funzionale.



Schema 16. Glicoconiugazione via TEC di una proteina naturale.

3.2 Sintesi di S-glicosil aminoacidi e S-glicopeptidi mediante reazioni tiol-ene e tiol-ino foto indotte

È stato ampiamente discusso come la glicosilazione di proteine sia un processo che influenza profondamente la struttura, la funzione e la stabilità di queste biomolecole. Date le difficoltà con cui è possibile isolare proteine naturali, sono in continua evoluzione approcci indirizzati verso la sintesi di glicoproteine e glicopeptidi dotati di caratteristiche e strutture ben definite.

L'obiettivo principale della prima parte del mio lavoro di dottorato è stato quello di dimostrare che le reazioni di idrotiolazione possono essere sfruttate come reazioni bioortogonali per la sintesi di S-glicoconiugati.

L'introduzione di un atomo di S in sostituzione ad un atomo di O nel legame glicosidico è da molto tempo considerato un'ottima strategia per eludere l'azione di O-glicosidasi e di processi chimici che inducono la scissione della porzione zuccherina dall'amminoacido a cui è ancorata. Per la loro stabilità questi derivati non naturali possono essere impiegati in studi biochimici come sonde o come potenziali farmaci, ad esempio vaccini anticancro.

Come descritto in precedenza, le strategie per ottenere modificazioni bioortogonali necessitano di un inserimento all'interno della struttura che si intende derivatizzare di una funzione che si andrà successivamente a combinare in maniera selettiva con una molecola fluorescente o, in caso di glicosilazione, con uno zucchero.

Un metodo ad oggi conosciuto, e molto sfruttato per l'introduzione di gruppi funzionali reattivi all'interno di una proteina, si basa sull'impiego di un processo biochimico catalizzato da specifici enzimi quali l'amminoacil tRNA sintasi (aaRSs). Mediante questo approccio numerosi gruppi funzionali sono stati incorporati in proteine, sia in E. coli che in cellule di mammifero. Per esempio, residui di omo-propargilglicina, omo-allilglicina e azido-omoalanina sono stati utilizzati per veicolare rispettivamente alchini, alcheni ed azidi in proteine in maniera estremamente efficiente.

Il lavoro di ricerca oggetto della presente tesi si è focalizzato in prima istanza sull'introduzione per via chimica, e nel rispetto dei noti criteri di ortogonalità, di specifici gruppi funzionali (alcheni ed alchini) su un residuo di cisteina isolato o incorporato in catene peptidiche costituite da un numero variabile di unità amminoacidiche. Sebbene il processo abbia come limite intrinseco problematiche di estensione a sistemi complessi come proteine funzionali, esso ha dimostrato comunque efficacia e riproducibilità quando applicato a peptidi di varia lunghezza (ad esempio ottapeptidi).

Obiettivo successivo è stato quello di realizzare una reazione di idrotiolazione fotoindotta che sfruttasse le funzionalità precedentemente introdotte per derivatizzare il substrato(poli)amminoacidico con residui tiolici zuccherini.

Infine è stata presa in considerazione per la prima volta la possibilità di inserire in corrispondenza della funzionalità alchonica introdotta in un substrato (poli)peptidico due differenti derivati tiolici. Attraverso una sequenza TYC/TEC su di un peptide possono

essere infatti introdotte in maniera sequenziale uno zucchero ed una molecola di biotina, che costituisce un importante tag biologico per il riconoscimento molecolare.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Per investigare la sintesi di S-glicosil amminoacidi, sono stati selezionati come substrati, due derivati amminoacidici protetti (un'allil glicina (**64**) ed il suo omologo inferiore **65**) e tre differenti tiol-zuccheri (due monosaccaridi **21**, **62** ed un disaccaride **63**) (figura 7).

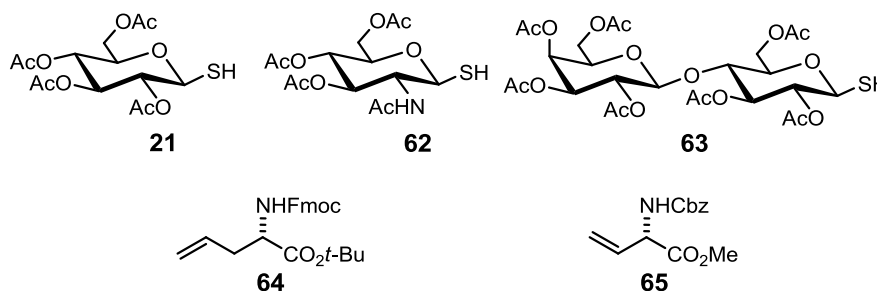


Figura 7. Carboidrati ed amminoacidi coinvolti nella reazione TEC.

Le reazioni di TEC fotoindotto sono state condotte in condizioni precedentemente ottimizzate presso i laboratori in cui è stato svolto il lavoro oggetto della presente tesi. Queste prevedono l'impiego di un piccolo eccesso di tiolo rispetto al derivato alchenico e l'irradiazione della miscela di reazione con luce UV ad una λ_{MAX} di 365 nm in presenza di 2,2-dimetossi-fenil-acetofenone (DPAP) come fotoiniziatore. Non sono state adottate misure particolari per la rimozione dell'ossigeno e dell'umidità dall'ambiente di reazione. Dopo un'ora di irradiazione della miscela di reazione, l'analisi ¹H NMR ha mostrato la completa scomparsa dei segnali alchenici, mostrando la formazione dei derivati S-glicosil amminoacidici (**66a-f**) con rese importanti (fino al 90%) (figura 8).

È da notare che durante il coupling non avviene l'epimerizzazione dell' α stereocentro del residuo amminoacidico e che l'unico sottoprodotto osservato è stato il disolfuro derivante da un accoppiamento omologo tra le specie tioliche introdotte in eccesso. Successivamente è stata anche dimostrata l'ortogonalità dei gruppi protettori presenti sugli S-glicosil amminoacidi preparati, attraverso il loro utilizzo come 'building blocks' per la sintesi co-traslazionale in soluzione di un tripeptide.

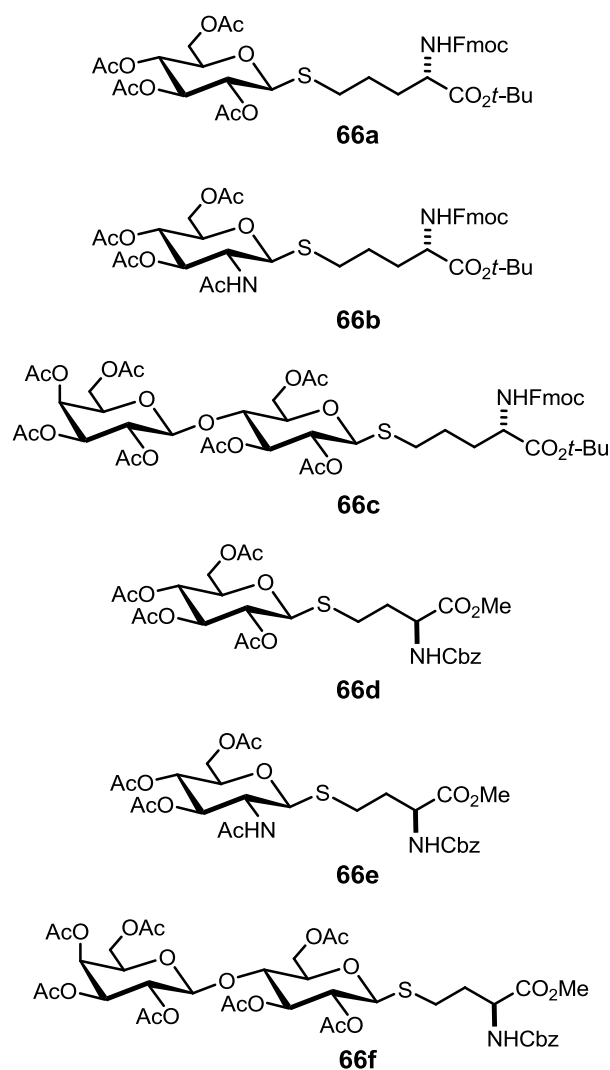
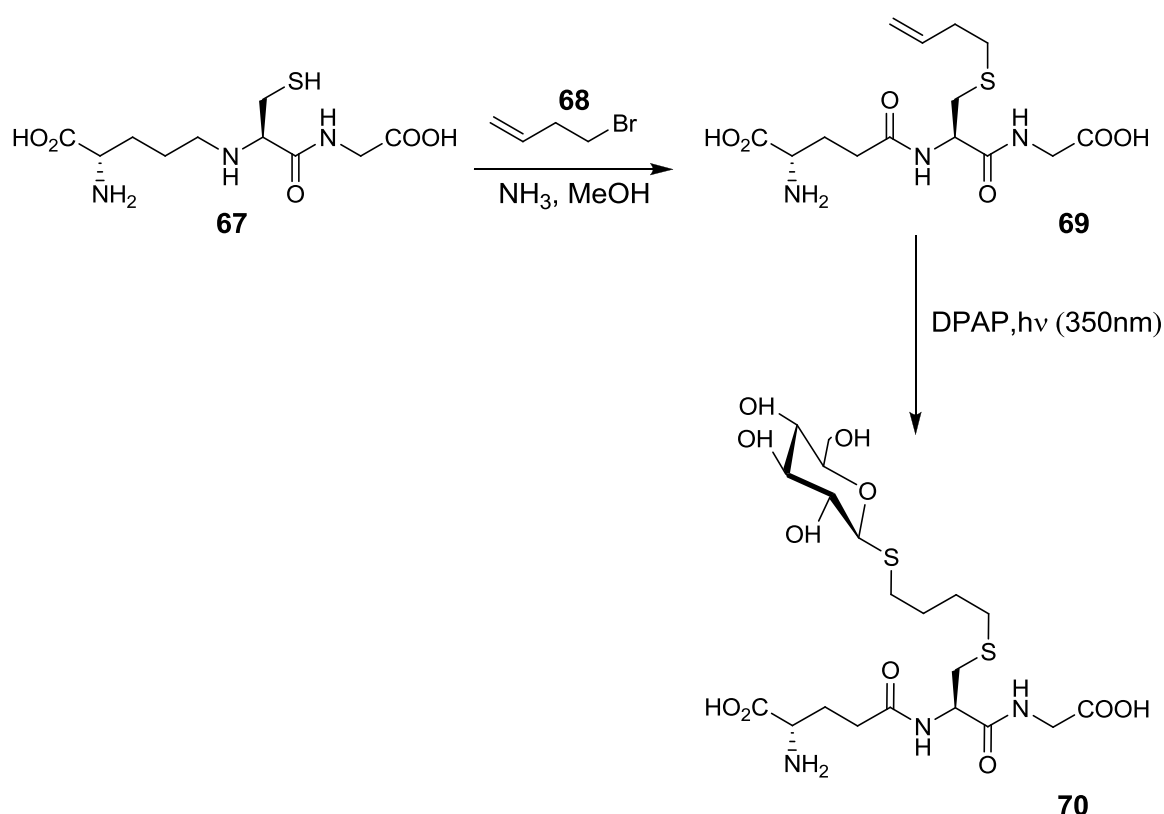


Figura 8. S-glicosil aminoacidi ottenuti via TEC fotoindotto.

Il lavoro è stato quindi esteso allo sviluppo di un approccio post-traslazione che consentisse una diretta glicosilazione via TEC del peptide. Pertanto, si è ipotizzato di introdurre una funzione alchenica sul residuo cisteinico di un peptide. A questo scopo è stata dapprima utilizzata come modello una singola unità di cisteina protetta al fine di verificare la fattibilità del progetto. È stata quindi introdotta una catena omo-allilica sulla L-cisteina attraverso una semplice alchilazione della funzione tiolica dell'amminoacido con 4-bromo-1-butene in presenza di Et_3N . La butenil cisteina così formata è stata sottoposta ad idrotiolazione con un tio-zucchero mediante TEC ed ha portato, dopo irradiazione della miscela di reazione per soli 15 minuti, al glicosil derivato corrispondente, con rese

superiori al 90%. Incoraggiati da questi risultati preliminari è stata effettuata una omo-allilazione del gruppo solfidrilico di un residuo cisteinico contenuto all'interno di un tripeptide, il glutatione (**67**) (Glu-Cys-Glc, GSH, schema 17), utilizzando butenil bromuro (**68**) in una soluzione di ammoniaca in metanolo. Nonostante il peptide non portasse alcuna protezione nella terminazione amminica e carbossilica, l'alchilazione sul gruppo tiolico è risultata preferenziale. L'omo-allilglutatione (**69**) formato con rese quantitative, è stato glicosilato via TEC con diversi glicosil tioli deprotetti (1.2 equiv.) in una soluzione di MeOH/H₂O fornendo ottime rese del corrispondente glicopeptide **70**.

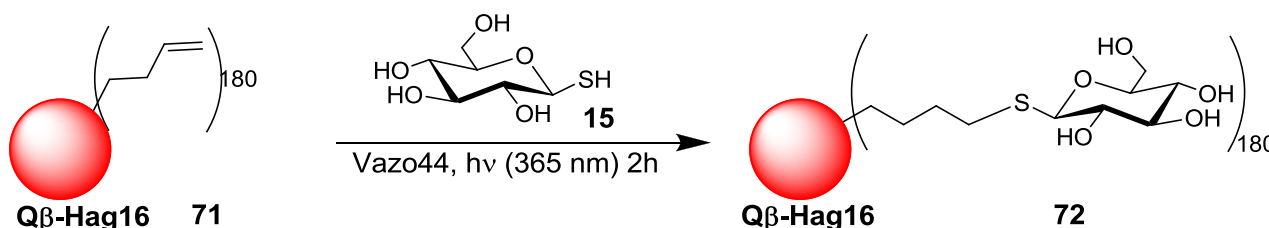


Schema 17. Alchilazione e glicosilazione di GSH.

Con un esperimento aggiuntivo è stato dimostrato che le reazioni TEC possono avvenire anche per semplice irradiazione della miscela di reazione con luce solare.

È necessario far presente che, mentre questo lavoro era in corso di svolgimento, Davis e collaboratori (71) riportavano l'accoppiamento fotoindotto di diversi tioli con una omo-allilglicina (L-Hag) per dare S-glicosil aminoacidi. Nello stesso studio di Davis l' L-Hag è stata anche introdotta all'interno della sequenza aminoacidica della proteina **71** mediante un processo di ingegneria genetica (Schema 18). La proteina così modificata è

stata fatta reagire attraverso TEC fotoindotto con un tio-zucchero **15**. La reazione condotta in soluzioni acquose ed a temperatura ambiente porta ad una coniugazione completa (superiore al 95%) e sito specifica della proteina ingegnerizzata (**72**) senza alterarne la stabilità. Il lavoro di Davis dimostra quindi che l'approccio da noi descritto può considerarsi un valido modello con possibilità di estensione a glicosilazioni di sistemi biologici più complessi come peptidi di maggiori dimensioni e proteine.



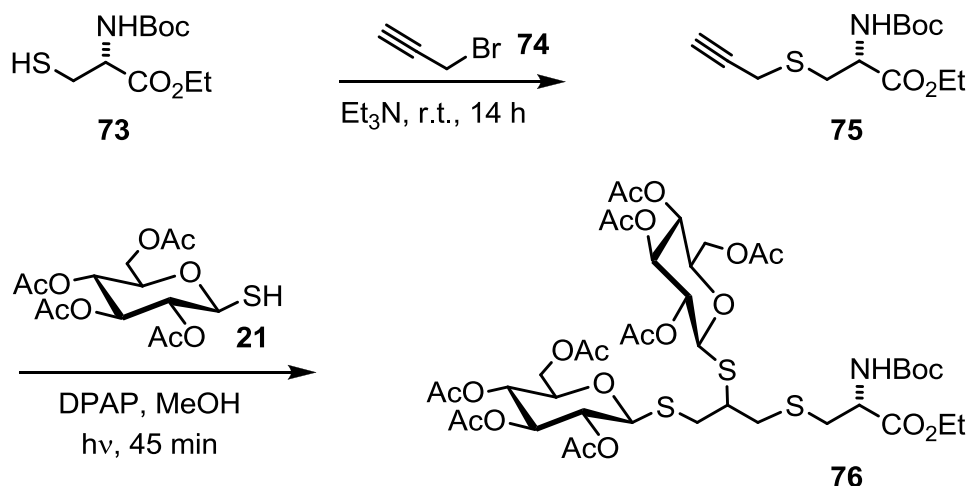
Schema 18. Glicosilazione di proteine ingegnerizzate descritta da Davis e collaboratori.

Il nostro studio sulla sintesi di S-glicosil amminoacidi e glicopeptidi mediante TEC fotoindotto è stato oggetto di una pubblicazione (**Synthesis of S-glycosyl amino acids and S-glycopeptides via photoinduced click thiol–ene coupling**. Fiore, M.; Lo Conte, M.; Pacifico, S.; Marra, A.; Dondoni, A. *Tetrahedron Letters*, **2011**, *52*, 444–447) allegata nella sezione V della presente tesi e a cui si rimanda per maggiori dettagli sperimentali.

Valutato il potenziale della reazione tiol-ene fotoindotta nelle reazioni di bioconiugazione il lavoro di ricerca è stato esteso allo studio dell'utilità della reazione tiolino nella glicosilazione multipla di amminoacidi e peptidi. Mentre l'applicazione di tale reazione era nota nella chimica dei polimeri e dei materiali, la sua utilità ed il suo comportamento nelle bioconiugazioni era ancora da valutare. Così, il processo di doppia glicoconiugazione è stato inizialmente standardizzato utilizzando una cisteina protetta (**73**, schema 19) come modello. Su tale amminoacido è stata introdotta, nelle stesse condizioni messe a punto per la variante allilica, una funzione alchenica tramite alchilazione del gruppo tiolico con propargil bromuro (**74**).

È stata quindi esaminata la reazione fotoindotta dell'amminoacido funzionalizzato con diversi tio-zuccheri (ad esempio il **21**). Dopo alcuni esperimenti, è stato osservato che per una completa conversione dell'alchino derivato è necessario l'utilizzo di 4 equivalenti

di tiolo e di un tempo di reazione non inferiore ai 45 minuti. Il progredire della reazione può essere valutato attraverso l'analisi del grezzo di reazione via ^1H NMR. Dallo spettro NMR viene monitorata la scomparsa dei segnali relativi all'alchino (2.26 ppm) e dei segnali relativi all'alchene intermedio (5.75-6.30). Il bis-tioetere **76** prodotto viene isolato con buone rese come una miscela circa 1:1 di diastereoisomeri.



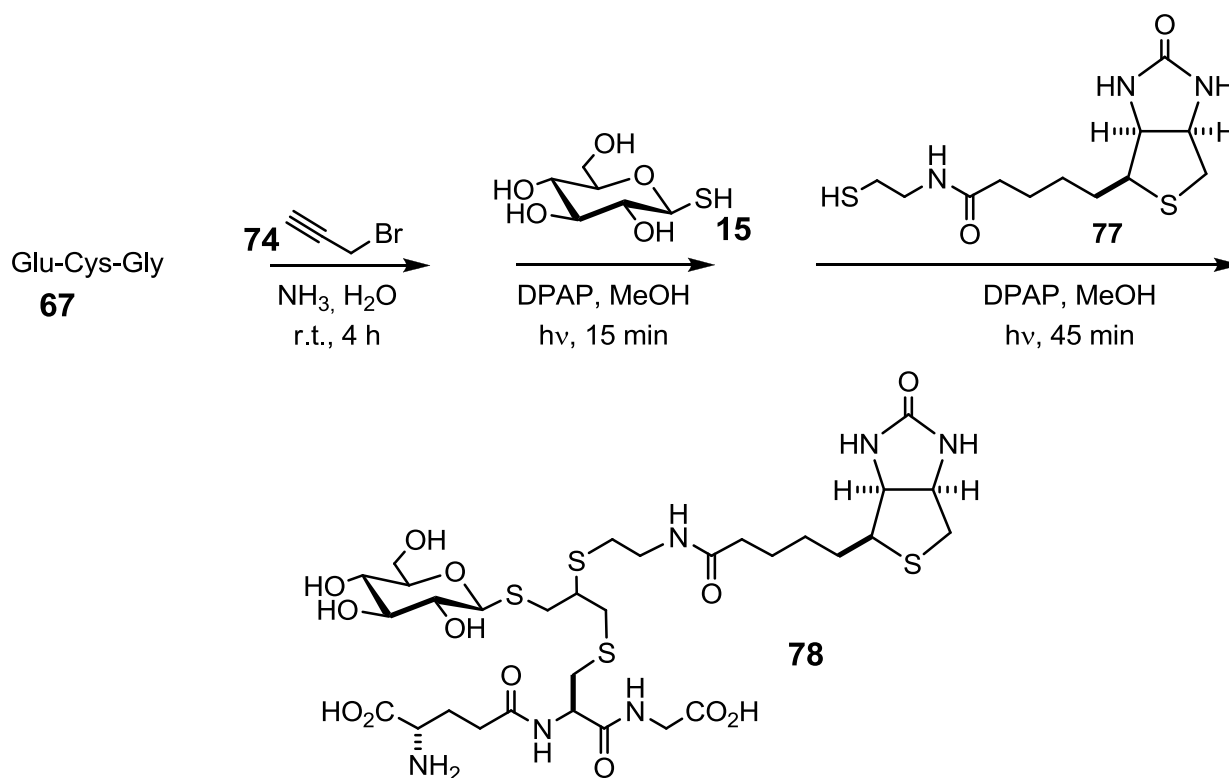
Schema 19. Alchilazione e doppia glicosilazione di un residuo cisteinico mediante TYC fotoindotta.

Successivamente, si è passati a valutare la doppia glicosilazione del tripeptide naturale Glu-Cys-Glc (GSH, glutatione) e di un tetra peptide di sintesi Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC), entrambi derivatizzati a livello del residuo cisteinico con una catena propargilica. In questo caso la reazione di alchilazione è stata condotta in una soluzione di ammoniaca acquosa a 0 °C. La doppia idrotiolazione fotoindotta dei due peptidi è stata poi prodotta nelle condizioni standard, con differenti tioli, in una miscela 1:1 di $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quindi ampliato allo studio della glicosilazione multipla di peptidi più lunghi come un otta- ed un nona-peptide contenenti un residuo cisteinico, il cui residuo tiolico era stato precedentemente funzionalizzato nelle condizioni standard con un gruppo alchिनico. Sia la propargilazione che la glicosilazione dei peptidi è stata certificata attraverso analisi ESI-QTOF MS/MS.

Avendo osservato l'efficacia della glicosidazione di alchinil peptidi via TYC, abbiamo infine voluto indagare la possibilità di condurre una idrotiolazione sequenziale di alchinil peptidi mediante due sulfanil radicali generati da differenti molecole di tiolo (schema 20).

Una soluzione di S-propargil glutatione in MeOH, in presenza di 1.1 equivalenti di un tio-zucchero e del fotoinziatore, è stata quindi irradiata ad una λ_{MAX} di 365 nm per 15 minuti. L'analisi 1H NMR della miscela di reazione ha mostrato la totale conversione dell'alchinil derivato nel vinil-tioetere corrispondente. Quindi una soluzione di un biotin-tiolo (**77**) in MeOH (2 equiv.) è stata aggiunta e la miscela nuovamente irradiata per ulteriori 45 minuti. per dare il bis-addotto **78** desiderato con una resa del 90%, come stimato mediante analisi NMR..



Schema 20. Sequenziale glicosilazione e biotinilazione di un tripeptide.

Dopo purificazione il prodotto è stato recuperato con una resa del 34%. Con lo stesso approccio è stato sintetizzato un regio isomero della molecola appena descritta mediante l'introduzione iniziale di biotina-SH e successiva aggiunta del tio-zucchero

Questo studio sulla sintesi di S-glicosil amminoacidi e glicopeptidi mediante TYC fotoindotto è stato oggetto di una pubblicazione (**Photoinduced Addition of Glycosyl Thiols to Alkynyl Peptides: Use of Free-Radical Thiol-Yne Coupling for Post-translational Bis-glycosylation of Peptides**. Lo Conte, M.; Pacifico, S.; Chambery, A.; Marra, A.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4644-4647) allegata nella sezione V della presente tesi e a cui si rimanda per maggiori dettagli sperimentali.

BIBLIOGRAFIA

1. J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13.
2. E. W. Voss, *J. Mol. Recognit.* **1993**, 6, 51.
3. H. C. Kolb, K. B. Sharpless. *Drug Discovery Today* **2003**, 3, 20
4. I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 321.
5. D. J. Oshannessy, M. J. Dobersen, R. H. Quarles, *Immunol. Lett.* **1984**, 8, 273.
6. V. W. Cornish, K. M. Hahn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8150.
7. K. Rose, J. Vizzavona, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7034.
8. Z. W. Zhang, B. A. C. Smith, L. Wang, A. Brock, C. Cho, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, 42, 6735.
9. L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, 276, 1125.
10. H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1242.
11. W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 475.
12. R. J. Griffin, *Prog. Med. Chem.* **1994**, 31, 121.
13. E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007.
14. H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635.
15. M. Kohn, R. Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3106.
16. G. A. Lemieux, C. L. De Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4708
17. R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 75, 604.
18. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
19. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057
20. V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. D. Diaz, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12705.
21. Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3192.
22. A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11164.
23. A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10598.
24. G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, 94, 3260.
25. J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11486.

-
26. N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 644.
27. J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 16793.
28. E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3097
29. J. Montreuil, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* Vol. 37, Academic, New York, **1980**, 225
30. Glycoproteins; Their Composition, Structure and Function, Elsevier, Amsterdam, 2nd Ed.
31. A. Varky, *Glycobiology* **1993**, 3, 97.
32. R. J. Wieser, F. Oesech, *J. Cell. Biol.* **1986**, 103, 36.
33. J. Jaeken, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2010**, 1214, 190.
34. J. Jaeken, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **2011**, 34, 853.
35. H. Paulsen, M. Brenken, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 694
36. S. Rio, J. M. Beau, J. C. Jacquinet, *Carbohydr. Res.* **1993**, 244, 295
37. M. Hollosi, E. Kollat, I. Laczko, L. Otvos. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1531
38. B. Imperiali. *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 452
39. P. M. St. Hilaire, T. Lowary, M. Medal, K. Bock, *Peptides* **1996**, Mayflower Worldwide: Kingswinford, UK, **1998**, 817.
40. P. M. St. Hilaire, T. Lowary, M. Medal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 13312
41. J. R. Rich, A. Szpacenko, M. M. Palcic, D. R. Bundle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 613
42. Monsigny, M. L. P.; Vaculik, D. D. M. *Carbohydr. Res.* **1977**, 59, 589.
43. Cohen, S. B.; Halcomb, R. L. *Org. Lett.* **2001**, 3, 405. Galonic, D. P.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12712
44. Galonic, D. P.; Ide, N. D.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7359
45. Falconer, R. A.; Jablonkai, I.; Toth, I. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 8663.
46. Zhu, Y.; van der Donk, W. A. *Org. Lett.* **2001**, 3, 1189
47. S Gerz, M.; Matter, H.; Kessler, H. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 43, 248.
48. Zhu, X.; Pachamuthu, K.; Schmidt, R. R. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5641.
49. S Davis, B. G.; Maughan, M. A. T.; Green, M. P.; Ullman, A.; Jones, J. B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 245.

-
50. Davis, B. G.; Ward, S. J.; Rendle, P. M. *Chem. Commun.* **2001**, 189.
51. Davis, B. G.; Lloyd, R. C.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9614
52. Gamblin, D. P.; Garnier, P.; Ward, S. J.; Oldham, N. J.; Fairbanks, A. J.; Davis, B. G. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3642..
53. Odian, G., Principles of Polymerization. 4th Ed., **2004**: Johan Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J. 768.
54. Chanda, M., Introduction to Polymer Science: a problem solving approach, ed. T.F. Group, **2006**, New York: CRC Press. 640.
55. Samuelsson, J., et al., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2004**. 42(24): p. 6346-6352.
56. Kharasch, M.S., A.T. Read, and F.R. Mayo, *Chem. and Ind.*, **1938**(57): p.752.
57. J. Fossey, D. Leffort, and J. Sorba, *Free Radical in Organic Chemistry*, **1995**, John Wiley & Sons.
58. Desroches, M., et al., *Macromolecules*, **2011**. 44(8): p. 2489
59. C. Finzi, G. Venturini and L. Santini, *Gazz. Chim. Ital.* , **1930**, 60, 798
60. E. P. Kohler and H. Potter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, 57, 1316
61. H. Bader, L. C. Cross, I. Heilbron and E. R. H. Jones, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1949**, 619
62. A. Massi and D. Nanni, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 3791
63. M. Fiore, A. Marra and A. Dondoni, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 4422
64. C. Kieburg, M. Dubber and T. K. Lindhorst, *Synlett*, **1997**, 1447
65. G. Chen, J. Kumar, A. Gregory and M. H. Stenzel, *Chem. Commun.*, **2009**, 6291.
66. D. Heyl, E. Rikowski, R. C. Hoffmann, J. J. Schneider and W. D. Fessner, *Chem.-Eur. J.*, **2010**, 16, 5544
67. B. Trastoy, M. E. Perez-Ojeda, R. Sastre and J. L. Chiara, *Chem.-Eur.*, **2010**, 16, 3833
68. Y. Gao, A. Eguchi, K. Kakehi and Y. C. Lee, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 3457
69. A. Dondoni, A. Massi, P. Nanni and A. Roda, *Chem.-Eur. J.*, **2009**, 15, 11444
70. M. Lo Conte, S. Staderini, A. Marra, B. G. Davis and A. Dondoni, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 4644
71. N. Floyd, B. Vijayakrishnan, J. R. Koeppe and B. G. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, 48, 7798

CAPITOLO 2

STUDIO DELLA REATTIVITA' DI UMPOLUNG DI α -DICETONI

1 REAZIONI DI *UMPOLUNG* CATALIZZATE DA NHCs

1.1 *Introduzione*

Il termine organocatalisi è stato coniato per la prima volta nel 2000 da David MacMillan per descrivere quell'area della catalisi già nota come "metal-free catalysis"(1,2) Gli organocatalizzatori sono molecole organiche caratterizzate da basso peso molecolare, la cui attività catalitica, essendo intrinseca alla molecola e svincolata dalla presenza di metalli, presenta notevoli vantaggi.(3) Gli organocatalizzatori si distinguono per altre caratteristiche importanti quali la facile reperibilità, il basso costo, la stabilità e il blando impatto ambientale.(4)

Gli *N*-eterociclocarbeni (NHCs) sono le molecole più investigate dell'ultimo decennio nel campo dell'organocatalisi. Queste sono state inizialmente utilizzate in organometallica, ad esempio nelle reazioni di cross-metatesi sviluppate da Grubbs e collaboratori. Negli ultimi anni è aumentato il numero di NHCs sviluppati come ligandi (5) per un'ampia varietà di catalizzatori basati su metalli di transizione (6) ed impiegati in un vasto numero di reazioni (7). Il merito del crescente interesse nei confronti di tali molecole, deve imputarsi soprattutto alle loro caratteristiche elettroniche peculiari che ne hanno permesso l'impiego nel campo della catalisi 'metal-free' e come reagenti in processi multicomponente.

Le principali classi di NHCs comprendono: gli imidazolideni **1**, imidazolilideni **2**, triazolideni **3**, ed i tiazolideni **4** (figura 1). (8)

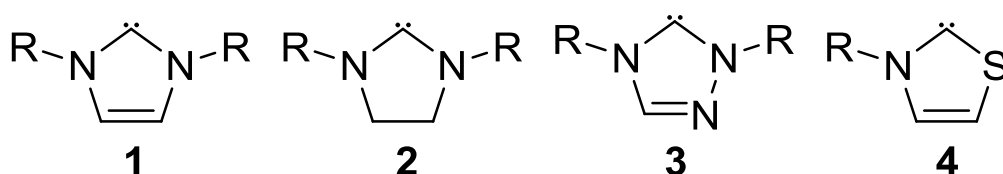


Figura 1. *Struttura generale delle principali classi di NHCs.*

La struttura degli NHCs è conosciuta grazie ai lavori condotti da Arduengo e collaboratori (9), che nel 1991 sono riusciti ad isolare la prima forma stabile di questa classe di composti. Il primo NHC è stato quindi ottenuto mediante deprotonazione con

potassio idruro di un sale di imidazolio cloruro sostituito in posizione 1 e 3 con un adamantile (**5**, figura 2). L'esatta struttura è stata determinata tramite analisi ai raggi X che ha fornito importanti informazioni sull'enorme stabilità di questa classe di composti.

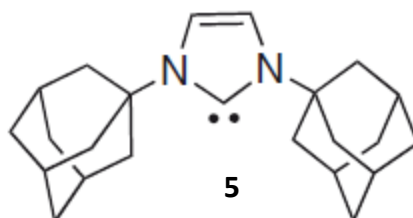


Figura 2. Primo NHC isolato da Arduengo e collaboratori.

La stabilità dei NHCs è dovuta ad un fattore sterico, che ne impedisce o ritarda la dimerizzazione, e ad un fattore elettronico. Quest'ultimo si manifesta attraverso un effetto 'push-pull' in cui il doppietto di elettroni non condiviso sugli eteroatomi (figura 3a) (ad esempio un atomo di azoto) conferisce densità elettronica all'orbitale p vuoto del carbonio divalente (stabilizzazione π della reattività elettrofila del carbene), perpendicolare al piano dell'anello. Inoltre, l'elettronegatività degli eteroatomi adiacenti al C-2 porta ad una stabilità addizionale attraverso il legame σ che risulta in una reattività nucleofila più moderata (figura 3b) (10).

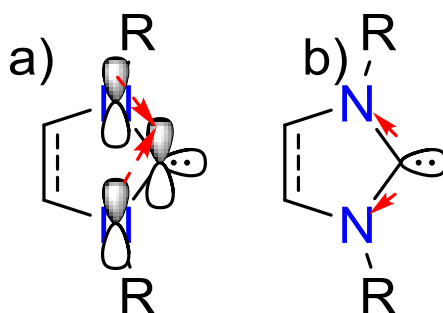


Figura 3. Effetto push-pull degli eteroatomi nella stabilizzazione di NHC.

Le proprietà elettroniche degli NHCs risultano una chiave di lettura importante per comprendere l'unicità della reattività di questi catalizzatori che si differenziano dalle comuni basi di Lewis. Infatti mentre queste ultime donano una coppia di elettroni, i carbeni

mostrano contemporaneamente una basicità σ ed una acidità π . Questi sono i motivi per cui gli NHCs sono ad oggi le molecole più sfruttate per indurre inversione di polarità, reazione di *Umpolung*, in differenti substrati, al fine di ottenere la formazione di nuovi legami C-C in modalità non convenzionale.

Il concetto di *Umpolung* si riferisce ad una modificazione chimica prodotta con lo scopo di invertire la polarità del gruppo funzionale. Questa modificazione porta alla formazione di legami C-C non ottenibili con metodiche convenzionali. Il primo esempio di reattività di *Umpolung* è rappresentato da una reazione di condensazione benzoinica risalente al 1830 (11). Solo successivamente, nel 1970, Seebach (12) ha razionalizzato per la prima volta il concetto di *Umpolung*. Secondo l'autore la presenza di un eteroatomo all'interno di un qualsiasi substrato chimico, impone un'alternanza di reattività donatore/accettore nei carboni presenti lungo lo scheletro carbonioso della molecola in esame. Se quest'alternanza, a causa di una modificazione del substrato, viene invertita, si parla di reattività inversa, dove il carbonio in α all'eteroatomo, e di conseguenza tutti i carboni della struttura carboniosa, avranno una reattività opposta alla precedente.

Un esempio, a delucidazione di questo concetto, è riportato nella figura 4 in cui è rappresentato un modello di molecola-substrato usata in sintesi organica. Indicando con X un eteroatomo (come azoto o ossigeno), si avrà, lungo lo scheletro carbonioso a seguire, l'alternanza di atomi di carbonio con proprietà di donatore (*d*) o accettore (*a*). Se si assegna ad X in posizione 0 la proprietà di donatore *d* (indicata all'apice), si andranno ad indicare gli atomi di carbonio in posizione dispari con $a^{(2n+1)}$ e quelli in posizione pari con $d^{(2n)}$ (Figura 4a). Se questa alternanza è invertita ci si trova nel caso di reattività inversa, in cui l'eteroatomo X, in posizione 0, sarà l'accettore (*a*) e di conseguenza, gli altri atomi di C verranno nominati $d^{(2n+1)}$ o $a^{(2n)}$ a seconda che ricoprano posizioni dispari o pari rispetto a X (Figura 4b)

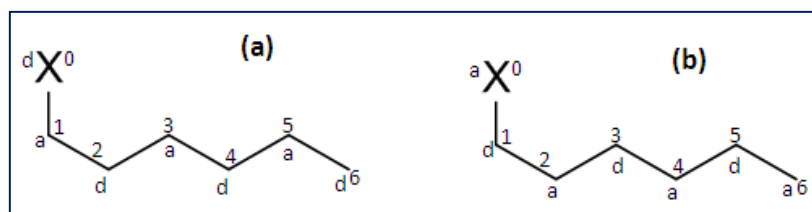


Figura 4. Rappresentazione generale di una molecola con reattività diretta (a) ed inversa (b) secondo Seebach.

Tre tipi di *Umpolung* sono associati ad una catalisi mediata da NHCs: l'*Umpolung* di aldeidi ad acil nucleofili (detto a^1-d^1), l'*Umpolung* coniugato (detto a^3-d^3) e l'*Umpolung* esteso (tabella 1). Anche se il meccanismo di queste reazioni non è stato ancora completamente verificato, come si vedrà in seguito, è stato possibile postulare alcuni aspetti meccanicistici per tutti e tre i tipi di *Umpolung*. (13).

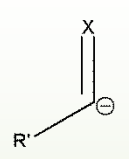
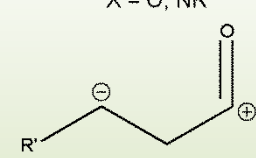
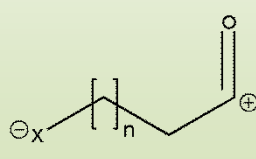
| SINTONI | RAZIONI TIPICHE |
|---|---|
|  <p>X = O, NR'</p> | <p>$a^1 - d^1$ - <i>Umpolung</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Condensazione Benzoinica - Reazione di Stetter - Idroacilazione |
|  | <p>$a^3 - d^3$ - <i>Umpolung</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reazione degli omoenolati - 'Michael <i>Umpolung</i>' |
|  <p>n = 1 X = CR₂, O, NR n = 2, 3 X = NR</p> | <p><i>Umpolung</i> Esteso:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aperura d'anello - Esterificazione Redox - Ammidazione Redox |

Tabella 1. Classificazioni dei sintoni di reazioni catalizzate da NHCs.

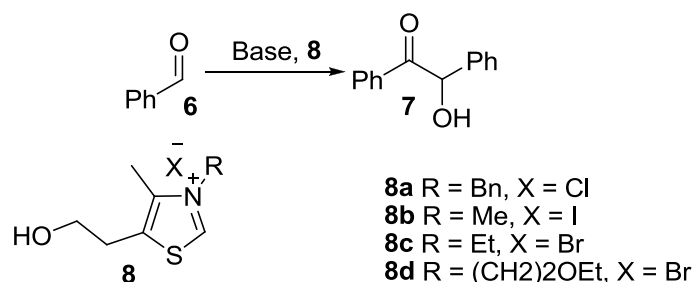
La modificazione prodotta nel substrato da parte dell'NHC produce un sintone, che è stato definito da Corey come un'unità strutturale che contiene una molecola associata a possibili operazioni sintetiche. Il concetto di sintone è stato ripreso da Seebach per differenziare molecole con reattività classica da molecole dotate di reattività di *Umpolung*.

1.2 Reazione di d^1 nucleofili: condensazione benzoinica catalizzata da NHCs

Questa reazione è stata il primo esempio in cui si è osservata l'inversione della polarità di un gruppo funzionale.

Il primo studio di reazione di *Umpolung* catalizzata da NHCs risale al 1943, quando Ugai et al. (14) hanno dimostrato come differenti sali di tiazolio **8 a-d** (schema 1) possono

indurre una reazione di condensazione tra due aldeidi aromatiche **6**, a dare il corrispondente α -idrossi chetone **7**, in un processo che prende il nome di condensazione benzoinica.



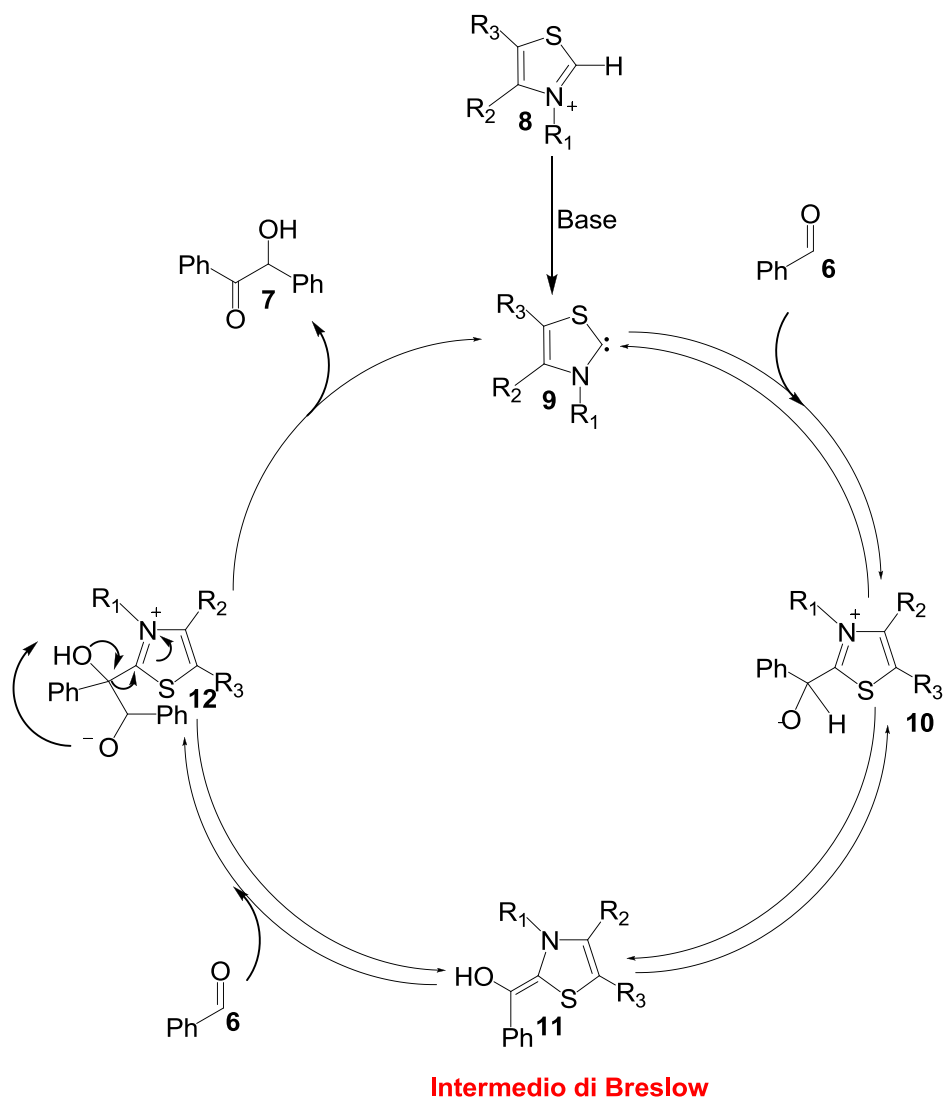
Schema 1. Reazione benzoinica tra due aldeidi catalizzata da un sale di tiazolio.

Nel 1958 Breslow, basandosi sul meccanismo postulato precedentemente da Lapwort per la condensazione benzoinica ciano-catalizzata, (15) propose un'ipotesi meccanicistica secondo la quale anche i sali di tiazolo si dimostrerebbero in grado di catalizzare la suddetta condensazione (schema 2). (16)

Dallo schema riportato si può notare come il ciclo catalitico abbia inizio con l'attacco nucleofilo del doppietto elettronico σ -donatore del tiazolin-2-ilidene **9** al gruppo carbonilico aldeidico. La specie carbenica viene prodotta per deprotonazione in posizione C2 del sale di tiazolio corrispondente **8**. Per l'*a*¹-*d*¹umpolung, è accettato che l'addotto aldeide/NHC porti all'intermedio di Breslow **11** per deprotonazione dell'addotto mediante una base esterna e π retro donazione dell'orbitale σ_{CH} all'orbitale p_z vuoto vicino del carbene (figura 5). Questo intermedio può reagire con un'altra molecola di aldeide. Il ciclo catalitico si completa con l'eliminazione del prodotto di condensazione dalla specie intermedia **12** e la rigenerazione della molecola di ilidene **9** che riattiva il ciclo catalitico. La reazione di condensazione benzoinica, sia essa promossa da ione cianuro o da NHCs, risulta sempre reversibile fino alla liberazione del benzoino.

Il meccanismo proposto da Breslow ha stimolato lo sviluppo di catalizzatori tiazolici chirali da utilizzare nella variante asimmetrica della condensazione benzoinica al fine di sintetizzare benzoini enantiopuri. Per questo motivo, una larga varietà di sali di tiazolio chirali sono stati sintetizzati ed applicati alla reazione di condensazione benzoinica sia nella sua variante intramolecolare che in quella intermolecolare. Sheehan ed Hunneman hanno riportato, nel 1966 il primo esempio di reazione benzoinica asimmetrica, (17) utilizzando un sale di tiazolio chirale **13** (figura 6) come pre-catalizzatore per ottenere il

benzoino in rese basse ma con un 22% di eccesso enantiomerico. Successivamente, diversi sforzi sono stati fatti per costruire dei sali di tiazolio chirali in grado di aumentare l'induzione asimmetrica nella formazione del prodotto di condensazione.



Schema 2 . Meccanismo proposto da Breslow per la Condensazione Benzoinica catalizzata da un sale di tiazolio.

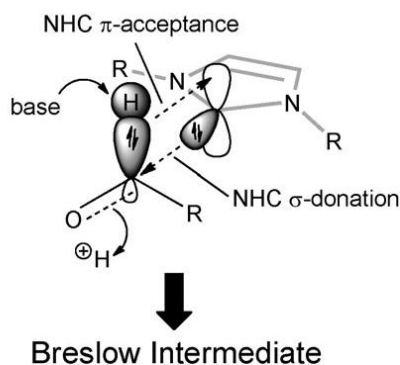


Figura 5. Formazione dell'intermedio di Breslow.

Nel 1974 Sheehan e Hara (18) hanno pensato di aumentare l'ingombro sterico attorno al sito reattivo del catalizzatore (**14**, figura 6), ottenendo il prodotto di condensazione sempre in basse rese ma con un eccesso enantiomerico del 52%. Alcuni sali di tiazolio (**15**, figura 6) sono stati costruiti per ottenere la reazione benzoinica in un mezzo bifasico micellare. In questo modo è stato riscontrato un eccesso enantiomerico del 35% e rese di poco superiori alle precedenti.

Un importante traguardo nel campo delle reazioni benzoiniche asimmetriche è stato raggiunto da Enders e collaboratori che hanno pensato di sostituire lo scaffold tiazolico con quello triazolico (Schema 3) notando che con il pre-catalizzatore **17** si potevano ottenere benzoini **18** con elevate enantioselettività e rese (93%). Da notare il basso loading catalitico (1.25 mol%) richiesto per promuovere in maniera efficiente la reazione (Schema 3).

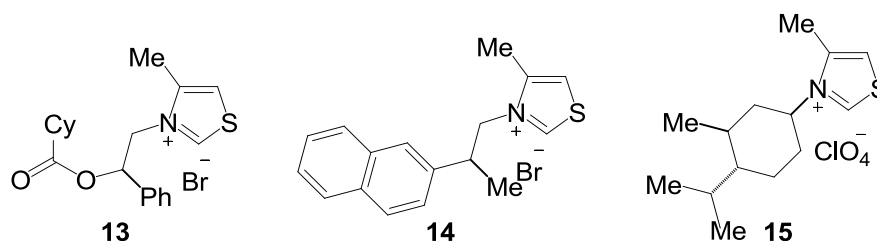
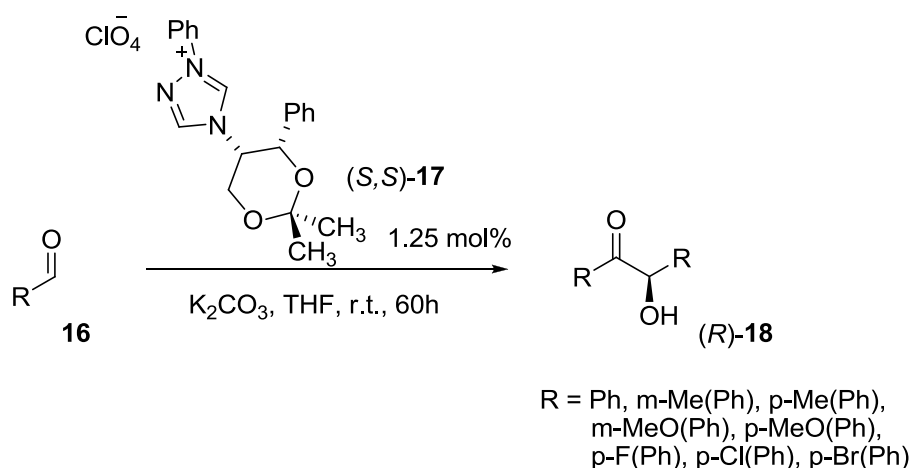
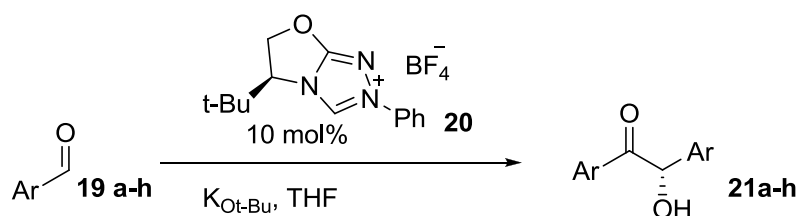


Figura 6. Primi pre-catalizzatori utilizzati per la reazione benzoinica asimmetrica.



Schema 3. Condensazione benzoinica asimmetrica classica.

Lo stesso Enders, (19) riferendosi ad un lavoro effettuato precedentemente da Leeper e collaboratori, pensò di bloccare il core triazolico del catalizzatore all'interno di una struttura biciclica (Tabella 2). Figlio di questi studi è stato il catalizzatore **20** di cui è stata valutata, oltre che l'efficienza nel catalizzare il processo di condensazione benzoinica con differenti aldeidi, anche la capacità di indurre enantioselettività. Come è possibile dedurre dagli esempi riportati in tabella 2, la natura elettronica dei sostituenti presenti sulle aldeidi aromatiche e le temperature di reazione possono influenzare la resa e l'eccesso enantiomerico del processo.



| Rif. | 21 | Ar | Temp (°C) | Resa (%) | ee (%) |
|------|----------|------------------------------------|-----------|----------|--------|
| 1 | a | Ph | 18 | 83 | 0 |
| 2 | b | 4-FC ₆ H ₄ | 18 | 81 | 83 |
| 3 | c | 4-FC ₆ H ₄ | 0 | 61 | 91 |
| 4 | d | 3-ClC ₆ H ₆ | 0 | 85 | 86 |
| 5 | e | 4-MeC ₆ H ₄ | 18 | 16 | 93 |
| 6 | f | 4-MeOC ₆ H ₄ | 18 | 8 | 95 |
| 7 | g | 2-Furil | 0 | 100 | 64 |
| 8 | h | 2-Furil | -78 | 41 | 88 |

Tabella 2. Differenti substrati nella condensazione benzoinica catalizzata da 20.

Per spiegare come procede la condensazione benzoinica asimmetrica, Enders ha proposto l'esistenza dello stato di transizione riportato in figura 7.

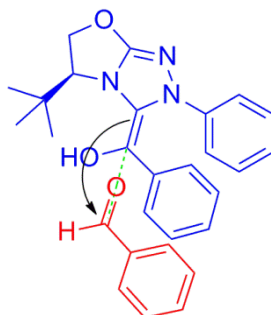


Figura 7. Geometria dello stato di transizione.

Secondo l'autore la faccia *Si* dell'intermedio di Breslow (**TS 1**, figura 8) risulta stericamente impedita dalla presenza del gruppo *t*-butilico del catalizzatore. Questo costringe l'approccio della seconda molecola di aldeide dalla faccia *Re*, stericamente accessibile, portando quindi alla formazione di un prodotto con configurazione (*S*), che coincide con ciò che è stato osservato. È inoltre da considerare che un attacco *Re-Re* può essere favorito sia dall'interazione tra il fenile dell'aldeide e dell'intermedio (π -stacking) che dalla formazione di ponti idrogeno intramolecolari tra la funzione aldeidica e il gruppo ossidrilico legato all'intermedio. La geometria *E-Z* dell'intermedio risulta altresì determinante per l'approccio della seconda molecola di aldeide all'intermedio di Breslow. Se la geometria fosse *E* (**TS2**, figura 8) e non *Z* come nel caso precedente, allora verrebbe preferito l'attacco *Si-Si*, che porterebbe ad un prodotto di condensazione con configurazione assoluta *R*. Questo non si verifica in quanto verrebbe meno il π -stacking tra i due fenili che inoltre creano un importante ingombro sterico.

Lo stato di transizione ad oggi ritenuto il più probabile si basa su dei calcoli computazionali prodotti da Dubbing ed Houk. Lo studio suggerisce lo stato di transizione **TS3**, (figura 8). (20) Sebbene anche in questo caso non si verifichi alcun tipo di stabilizzazione π -stacking, l'aldeide si viene a trovare nell'interazione con l'intermedio di Breslow in una zona aperta in cui subisce minime repulsioni steriche, il che giustifica la formazione preferenziale dell'enantiomero *S*.

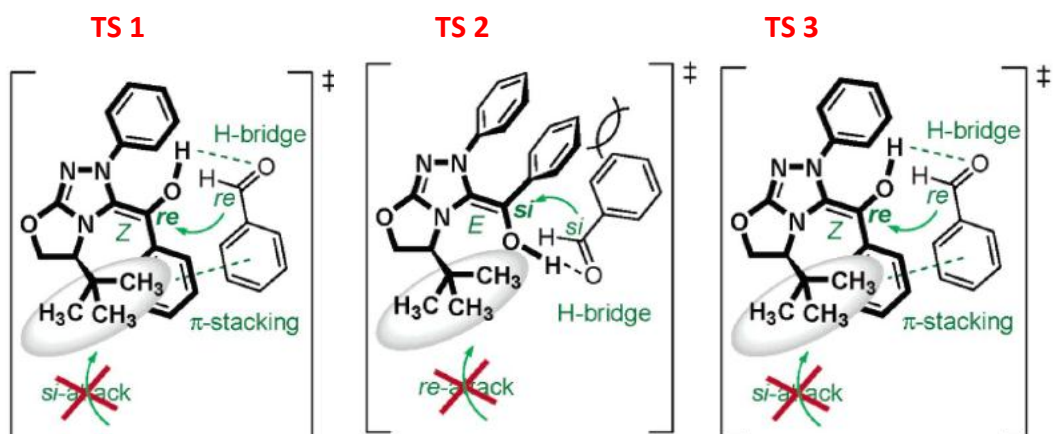
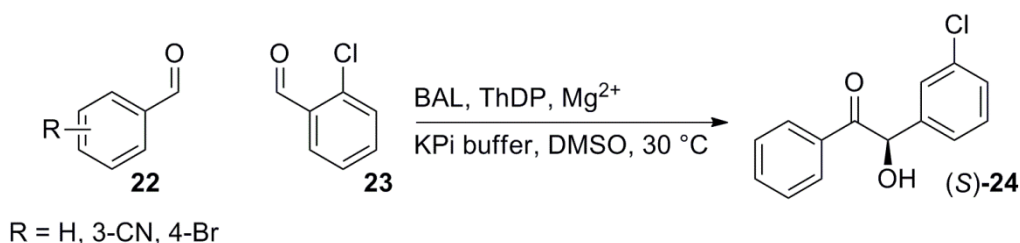


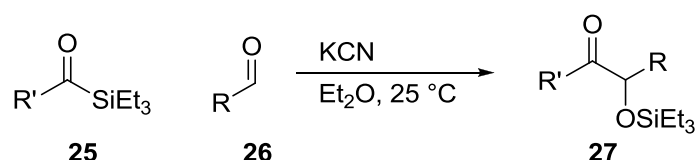
Figura 8. Stati di transizione TS 1, TS 2, TS 3 proposti da Enders per la condensazione benzoinica asimmetrica.

La reazione benzoinica consiste tipicamente nella reazione di homo-coupling tra due aldeidi. Tuttavia questo approccio può essere anche esteso a reazioni di cross-coupling tra due differenti aldeidi o tra aldeidi e chetoni. Tale approccio porta normalmente alla formazione di quattro prodotti, due derivanti dalla condensazione di aldeidi omologhe e due che derivano dalle reazioni tra aldeidi differenti. Inoltre, poiché le aldeidi alifatiche danno vita ad un intermedio di Breslow instabile, l'accoppiamento incrociato con queste molecole rimane problematico. (21) Molti sforzi sono stati effettuati al fine di migliorare la selettività di questa reazione. Muller e collaboratori (22,23) hanno messo a punto un processo enzimatico (schema 4) catalizzato da un enzima tiammina-dipendente, che produce con elevate rese (superiori al 90%) il prodotto (**S-24**) di condensazione incrociata tra due aldeidi aromatiche differenti. Gli autori hanno strategicamente sfruttato in queste reazioni 2-clorobenzaldeide (**23**) che in processi enzimatici non produce prodotti di addizione omologa.



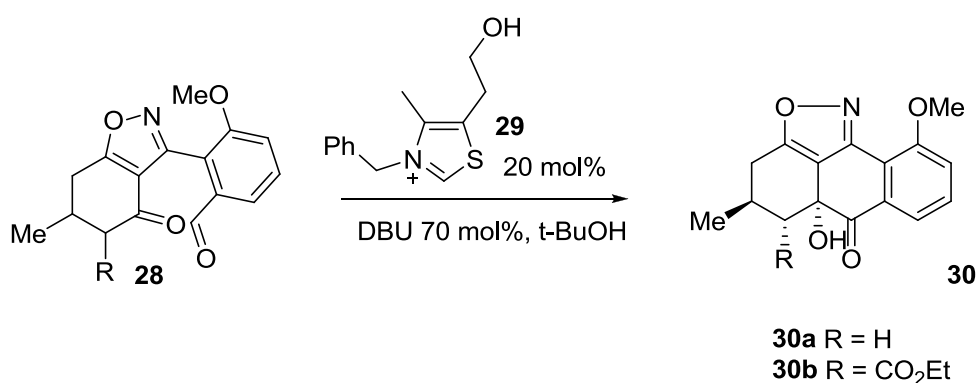
Schema 4. Reazione cross-benzoinica enzimatica e asimmetrica.

Anche i derivati silanici (**25** schema 5) sono stati sfruttati per eludere la formazione dei prodotti di condensazione non desiderati. Johnson e collaboratori (24-26) sono stati i primi a riportare l'utilizzo di un silil derivato in una reazione di condensazione benzoinica incrociata catalizzata da ioni cianuro.



Schema 5. Esempio di reazione di condensazione cross-benzoinica con silil derivati.

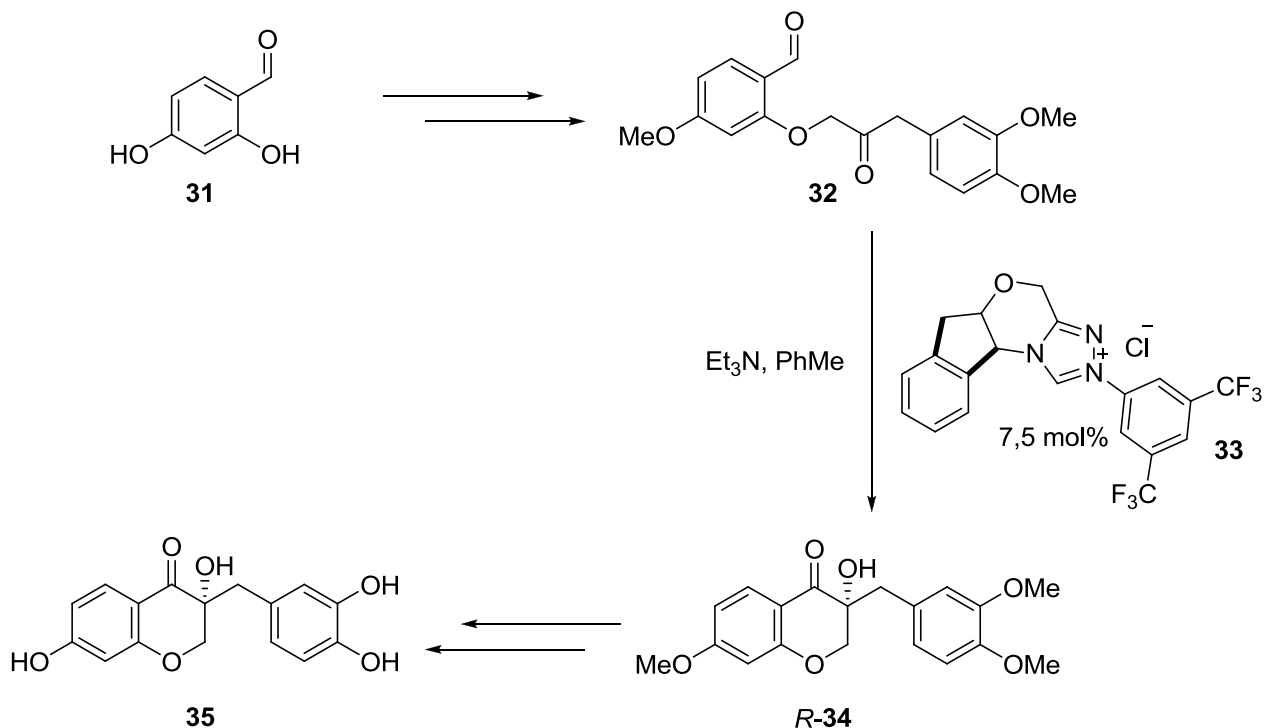
Un altro approccio per rendere efficiente il processo di condensazione benzoinica incrociata, è quello di inserire nella stessa molecola i due gruppi funzionali protagonisti del processo (condensazioni intramolecolari). A tal proposito Suzuki e collaboratori hanno riportato una reazione di condensazione benzoinica incrociata intramolecolare (**27**) tra una funzione aldeidica ed una funzione chetonica presenti all'interno della stessa molecola **28**, in presenza di **29** come catalizzatore. I prodotti tricyclici **30a-b**, sono stati ottenuti in ottime rese (90%) e con buoni livelli di diastereoselettività (schema 6).



Schema 6. Reazione cross-benzoinica intramolecolare.

Suzuki e collaboratori hanno sfruttato questa metodologia nella sintesi del (+)-sappanone B (**35** schema 7). Dopo aver valutato l'attività di diversi catalizzatori, gli autori hanno identificato il triazolio (**33**) come quello più utile sia per la reattività sia per la capacità di indurre enantioselettività. Pertanto, la 2-idrossi-4-metossibenzaldeide (**31**) è stata convertita nell'aldeide (**32**) che in presenza del pre-catalizzatore (**33**) e di una base è

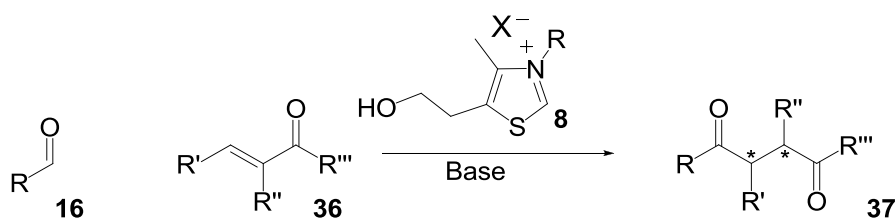
stata ciclizzata per dare l' (*R*)-**34** con una resa del 92% ed un enantioselettività del 95%. Il prodotto **34** è stato poi trasformato nel (+)-sappanone **35** mediante deprotezione dei gruppi ossidrilici presenti sulle porzioni aromatiche.



Schema 7. Suzuki e collaboratori, sintesi del (+)-sappanone B (**35**).

1.3 Reazione di *d*-1 nucleofili con accettori di Michael: reazione di Stetter catalizzata da NHCs

Nel 1976, Stetter è stato il primo ad estendere la reattività di *Umpolung* facendo reagire sorgenti di acil anioni con accettori di Michael utilizzando NHCs come catalizzatori. La reazione di Stetter (28) risulta oggi un potente approccio per la sintesi di composti 1,4-dicarbonilici (**37**, schema 8) che possono contenere fino a due nuovi centri stereogenici. La sintesi di tali molecole con altre metodologie sintetiche risulta spesso difficile. Utilizzando cianuri o tiazolilidene come catalizzatori (**8**), Stetter ha mostrato come una varietà di aldeidi aromatiche ed alifatiche sono in grado di agire da sorgenti di acil anioni addizionandosi ad un'ampia varietà di composti α,β -insaturi (**36**) come chetoni, esteri e nitrili.



Schema 8. Reazione di Stetter intermolecolare.

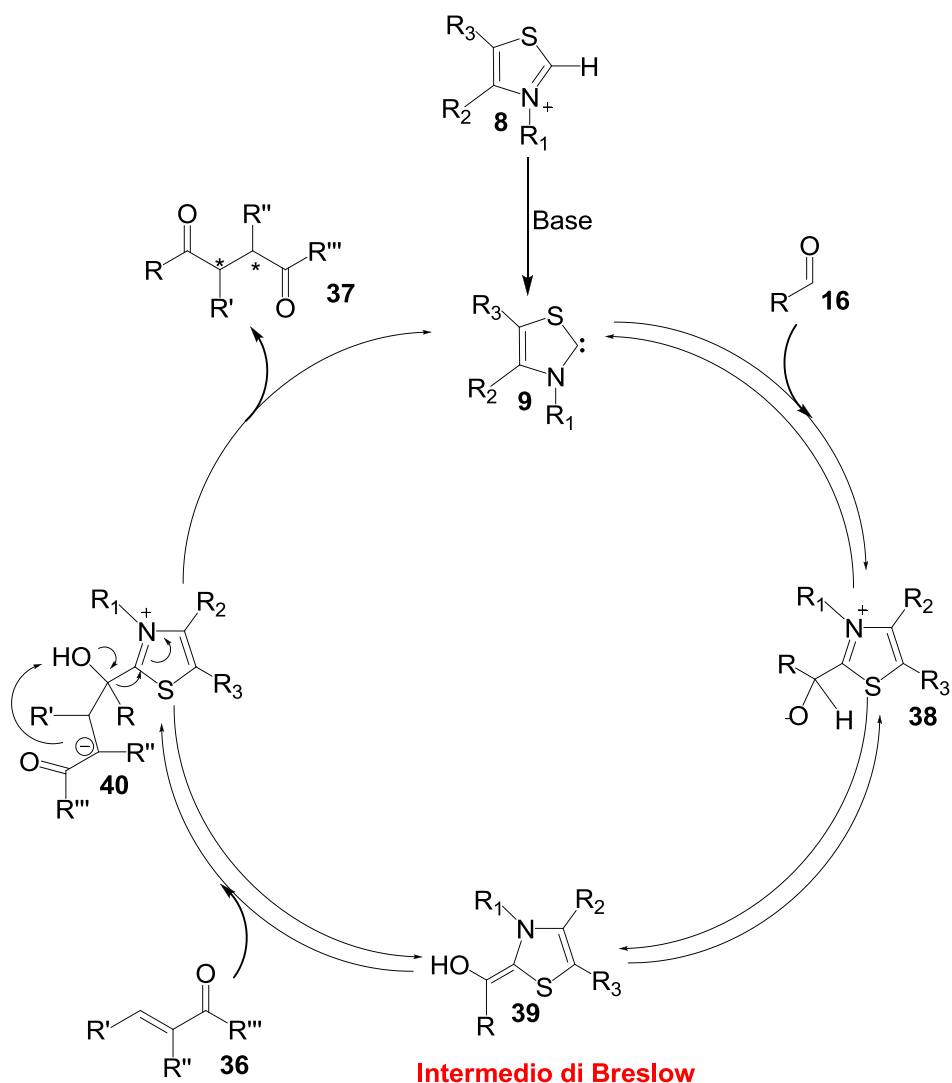
La possibilità di far reagire due elettrofili per formare un nuovo legame C-C ha stimolato diversi studi sull'applicabilità di tale reazione. Approfondimenti condotti su questo processo hanno rivelato che la presenza di un sostituito in posizione β all'accettore di Michael risulta essere una delle maggiori limitazioni del processo di accoppiamento. In generale solo gli accettori più attivati risultano estremamente utili al processo. È stata in ultimo provata la compatibilità di questa reazione con le microonde; questa forma alternativa di riscaldamento riduce sensibilmente i tempi di reazione. (29)

La reazione di Stetter (schema 9) procede attraverso la formazione dell'intermedio di Breslow (**39**) che si forma per attacco nucleofilo del carbene (**9**) all'aldeide **16**. Questo agirà come nucleofilo attaccando il composto α,β -insaturo (**36**) e formando l'intermedio tetraedrico (**40**). Dopo tautomerismo di questa specie verrà rilasciato l'addotto della Stetter **37** per eliminazione del catalizzatore nella sua forma attiva.

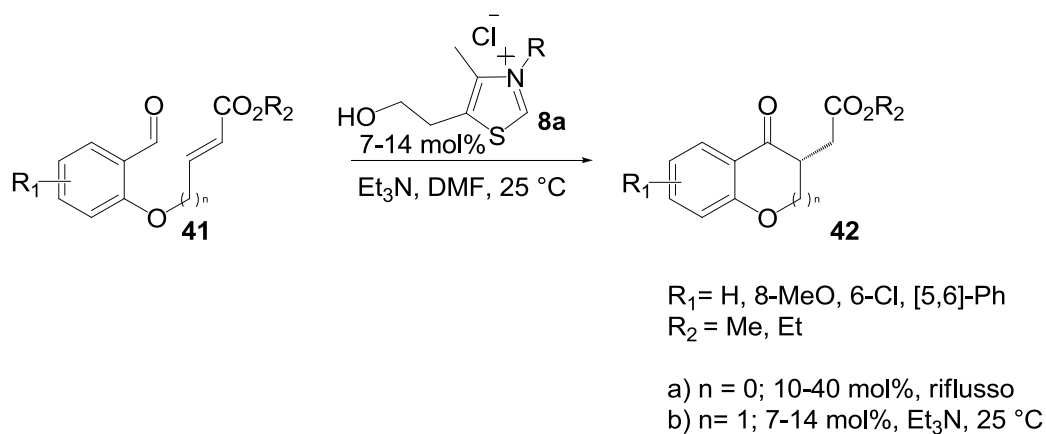
Venti anni dopo la prima reazione di Stetter, Ciganec (30) riportò una variante intramolecolare di tale approccio. Utilizzando un sale di tiazolio (**8a**) come pre-catalizzatore ottenne, come mostrato nello schema 10, il cromanone (**42**) in alte rese da un formilfenossi crotonato (**41**).

Interessanti sviluppi in questa reazione sono stati ottenuti da Rovis e collaboratori che hanno studiato il comportamento di alcuni NHCs ed hanno riportato una reazione di Stetter intramolecolare altamente enantioselectiva (schema 11). (31) Usando 20 mol% di sali come (*R, S*)-**45** o (*R*)-**46** è stato possibile ottenere, oltre a numerosi cromanoni, anche i loro -aza, -tio ed -ossa analoghi.

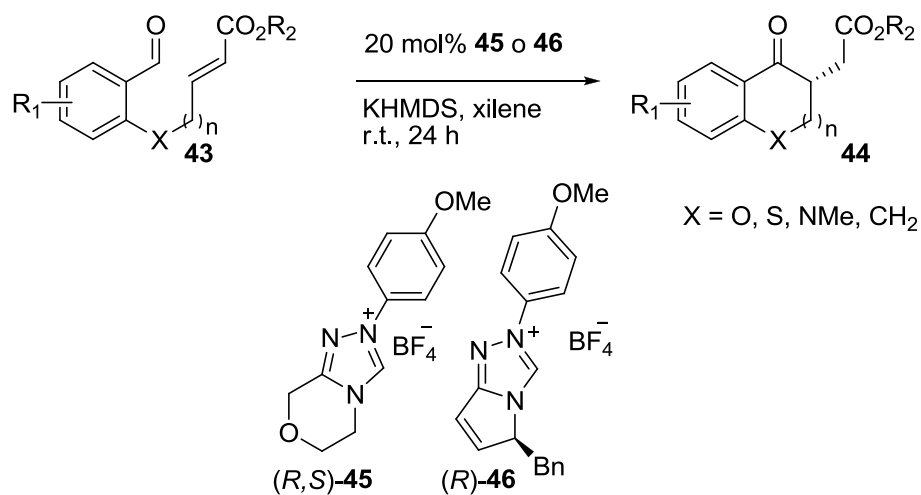
I cromanoni sono stati ottenuti con eccessi enantiomerici fino al 97% e con rese variabili dal 63 al 95% (tabella 4). Questo processo rimane tuttavia limitato dall'utilizzo dei soli (*E*)-alcheni come accettori di Michael in quanto questa configurazione risulta essere la più attiva.



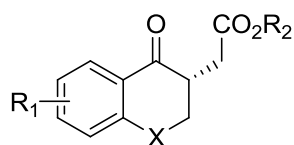
Schema 9. Ciclo catalitico della reazione di Stetter Intermolecolare.



Schema 10. Reazione di Stetter Intramolecolare sviluppata da Ciganek.



Schema 11. Reazione di Stetter Intramolecolare sviluppata da Ciganek.



| Rif. | R ₁ | R ₂ | X | Precat. | Resa (%) | ee (%) |
|------|----------------|----------------|-----------------|----------|-----------------|--------|
| 1 | H | Et | O | (R,S)-45 | 94 | 94 |
| 2 | 6-Me | Et | O | (R,S)-45 | 80 ^a | 97 |
| 3 | 8-Me | Et | O | (R,S)-45 | 90 | 84 |
| 4 | 8-MeO | Et | O | (R,S)-45 | 95 ^a | 87 |
| 5 | H | Me | S | (R,S)-45 | 63 | 96 |
| 6 | H | Me | NMe | (R,S)-45 | 64 | 82 |
| 7 | H | Et | CH ₂ | (R,S)-45 | 35 | 94 |
| 8 | H | Et | CH ₂ | (R)-46 | 90 | 92 |

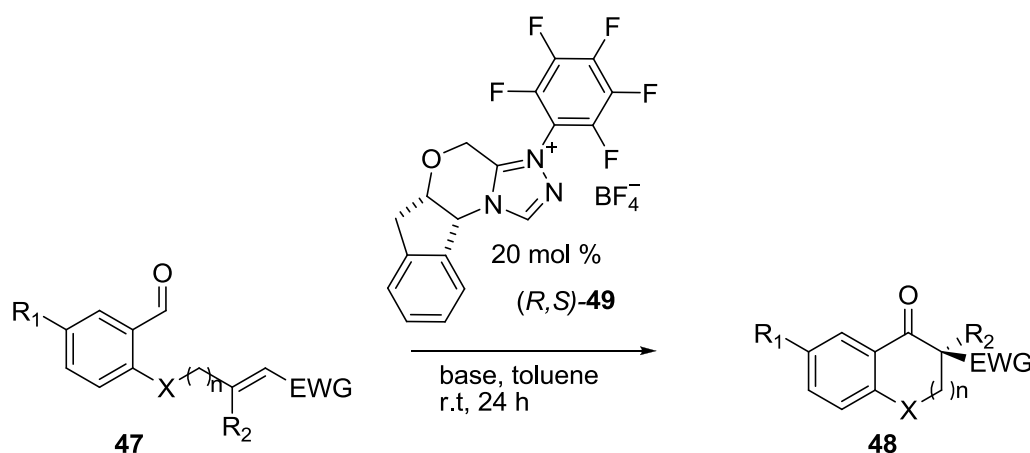
^aReazione con 10 mol % pre-cat. E 10 mol % KHMDS

Tabella 4. Risultati della reazione di Stetter intramolecolare asimmetrica ottenuti da Rovis.

Anche i derivati alifatici privi di un eteroatomo in posizione γ rispetto all'accettore possono essere utilizzati come substrati in presenza del catalizzatore (R)-46. In questo caso è necessario aumentare l'elettrofilia dell'accettore α,β insaturo per bilanciare la maggiore libertà conformazionale che viene introdotta nella molecola. Per ottenere

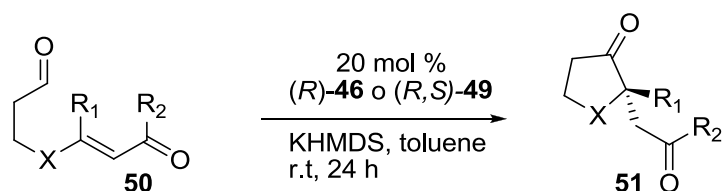
strutture cicliche a cinque o sei membri con derivati alifatici è quindi importante attivare l'accettore di Michael mediante una sostituzione del doppio legame rispettivamente con uno o due sostituenti esterei. Con questo approccio si possono ottenere i prodotti desiderati con rese fino al 97% ed un enantioselettività fino al 95%.

Rovis ed Hamada hanno esteso questa metodologia sintetica per ottenere stereocentri quaternari. La natura dei sostituenti dell'anello fenilico è risultata un fattore chiave. Il pre-catalizzatore N-pentafluorofenil-sostituito (R,S)-**49** (schema 12) si è dimostrato il più efficace nella conversione di substrati β,β -disostituiti (51, $n=0$) nei corrispondenti cicli a cinque termini fornendo eccessi enantiomerici fino al 99%. Anche in questo caso sono stati ottenuti risultati più soddisfacenti con l'isomero (*E*) dell'accettore rispetto all'isomero (*Z*). La sintesi degli analoghi anelli a sei termini si è rivelata complessa poiché solo substrati fortemente attivati, come gli accettori di Michael chetonici, portano a risultati importanti, fornendo eccessi enantiomerici fino al 99% ma rese moderate.



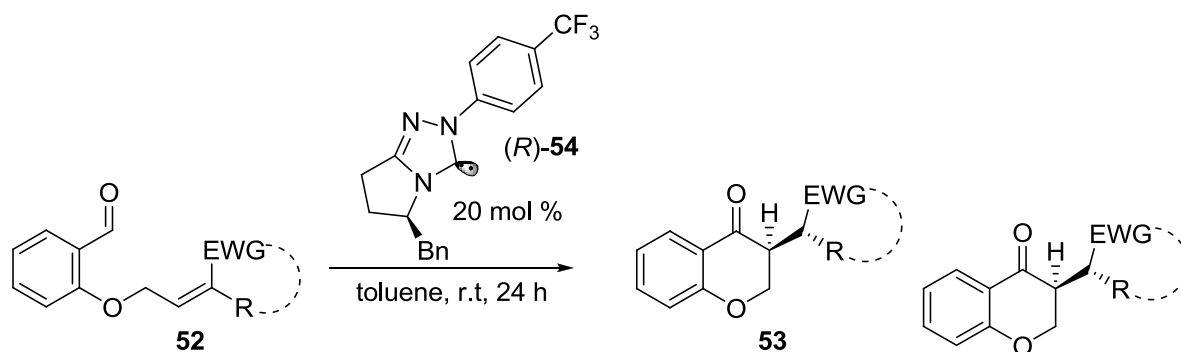
Schema 12. Generazione di stereocentri quaternari sviluppata da Rovis.

Il metodo è stato poi esteso a catene alifatiche (schema 13). Anche in questo caso l'isomero dell'alchene (*E*)-**50** risulta più reattivo. Utilizzando un solfene al posto di un solfuro come spaziatore è possibile sintetizzare il prodotto **51** con una resa del 98% e un eccesso enantiomerico dell'80%. Inoltre, con substrati contenenti azoto, si ottiene il relativo prodotto con ottima enantioselettività ma con rese inferiori rispetto ai substrati contenenti altri eteroatomi.



Schema 13. Reazione di Stetter Intramolecolare asimmetrica con substrati alifatici.

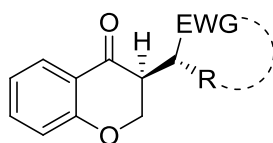
Recentemente Rovis ha riportato la reazione di Stetter enantio- e diastereo selettiva anche con accettori α,β -disostituiti come **52** (schema 14).(32) In questo caso è stata promossa la diastereoselettività del trasferimento protonico intramolecolare sull'intermedio enolato, che è alterata dalla potassio-bis(trimetilsilil)ammide (KHMDS) utilizzata per l'attivazione del pre-catalizzatore. Questo problema è stato superato attraverso l'utilizzo di carbeni stabili come il derivato (*R*)-**54**. In questo caso il carbene si mantiene nella sua forma attiva anche in assenza della base che pertanto può essere rimossa dall'ambiente di reazione prima dell'aggiunta dei reattivi (schema 15).



Schema 14. Reazione di Stetter Intramolecolare enantio- e diastereoselettiva sviluppata da Rovis.

La metodologia ottimizzata ha permesso la sintesi di diversi cromanoni (**53**) con eccessi enantiomerici fino al 95% e rapporti diastereomerici fino a 35:1 (tabella 4).

La specifica formazione del prodotto *sin* è stata spiegata studiando il trasferimento protonico che può interessare i due rotameri **TS4** e **TS5** dell'intermedio enolato (schema 15). L'ipotesi dell'importanza di questo trasferimento protonico sull'andamento stereochimico è suffragata dal fatto che gli isomeri del doppio legame portano alla diastereoselettività complementare.



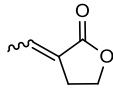
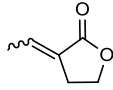
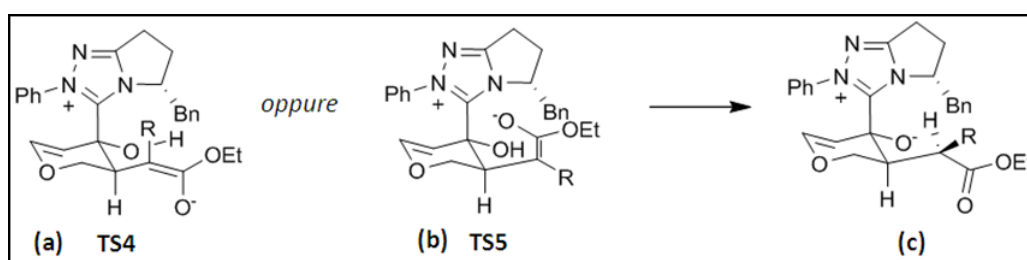
| Rif. | EWG | R | Resa (%) | ee (%) | dr (%) |
|------|---|---------------|----------|--------|--------|
| 1 | CO ₂ Me | Me | 94 | 90 | 30:1 |
| 2 | CO ₂ Et | Et | 95 | 92 | 35:1 |
| 3 | CO ₂ Et | <i>n</i> -But | 53 | 94 | 12:1 |
| 4 | CO ₂ Et | Bn | 80 | 84 | 20:1 |
| 5 | CO ₂ Me | allile | 95 | 83 | 13:1 |
| 6 |  | | 95 | 94 | 10:1 |
| 7 |  | | 80 | 95 | 18:1 |
| 8 | CO ₂ Me | Me | 85 | 55 | 10:1 |

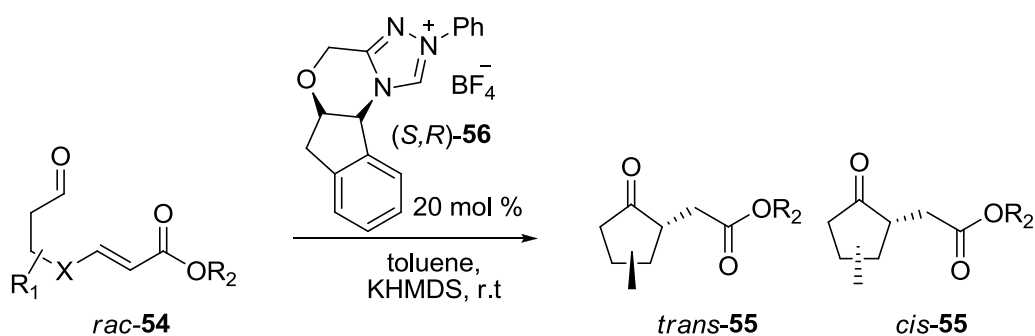
Tabella 5. Risultati ottenuti da Rovis della reazione di Stetter su accettori α,β disostituiti.



Schema 15. Stati di transizione proposti per la reazione di Stetter Diastereo- ed Enantioselettiva.

Con ricerche successive Rovis ha esaminato la reazione intramolecolare asimmetrica di Stetter su substrati contenenti stereocentri preesistenti utilizzando il pre-catalizzatore (*R,S*)-**56** (schema 16) (33).

Il substrato racemico **54**, contenente un centro stereogenico nel gruppo R₁, è stato utilizzato per la sintesi di 2,3 e 2,4 ciclopentanoni di-sostituiti (**55**); i diastereoisomeri *cis* e *trans*, inseparabili per via cromatografica, sono stati ottenuti come miscela equimolare con un alto eccesso enantiomerico. I corrispondenti 2,5 pentadioni di-sostituiti sono stati ottenuti con una preferenza del diastereoisomero *cis* ma con basso eccesso enantiomerico, questo a dimostrazione del fatto che la risoluzione è influenzata dalla struttura della molecola sulla quale avviene la catalisi.

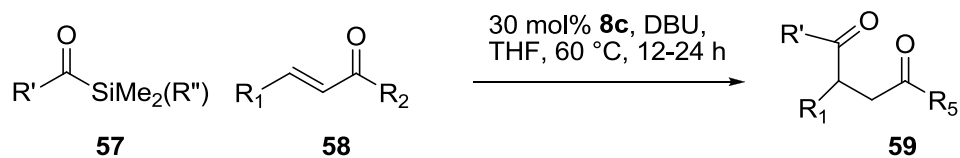


Schema 16. Reazione di Stetter Intramolecolare con accettori contenenti stereocentri pre-esistenti.

Mentre la metodologia sintetica per le reazioni di Stetter enantioselettive intramolecolari appare ben consolidata, esistono difficoltà sintetiche per quel che riguarda la variante intermolecolare. Enders e collaboratori hanno studiato per la prima volta questo tipo di reazione utilizzando come substrati un *n*-butanale ed un calcone (**34**). Il processo è stato valutato utilizzando come pre-catalizzatori sia sali di tiazolio che sali di triazolio. In entrambi i casi non si sono ottenuti buoni risultati in termini di efficienza e di enantioselettività. Il problema alla base delle scarse rese è probabilmente da imputarsi alla preferenza dell'acilanione equivalente (l'intermedio di Breslow) di reagire prima con un'altra molecola di aldeide, in quanto più elettrofila, piuttosto che con il substrato α,β insaturo.

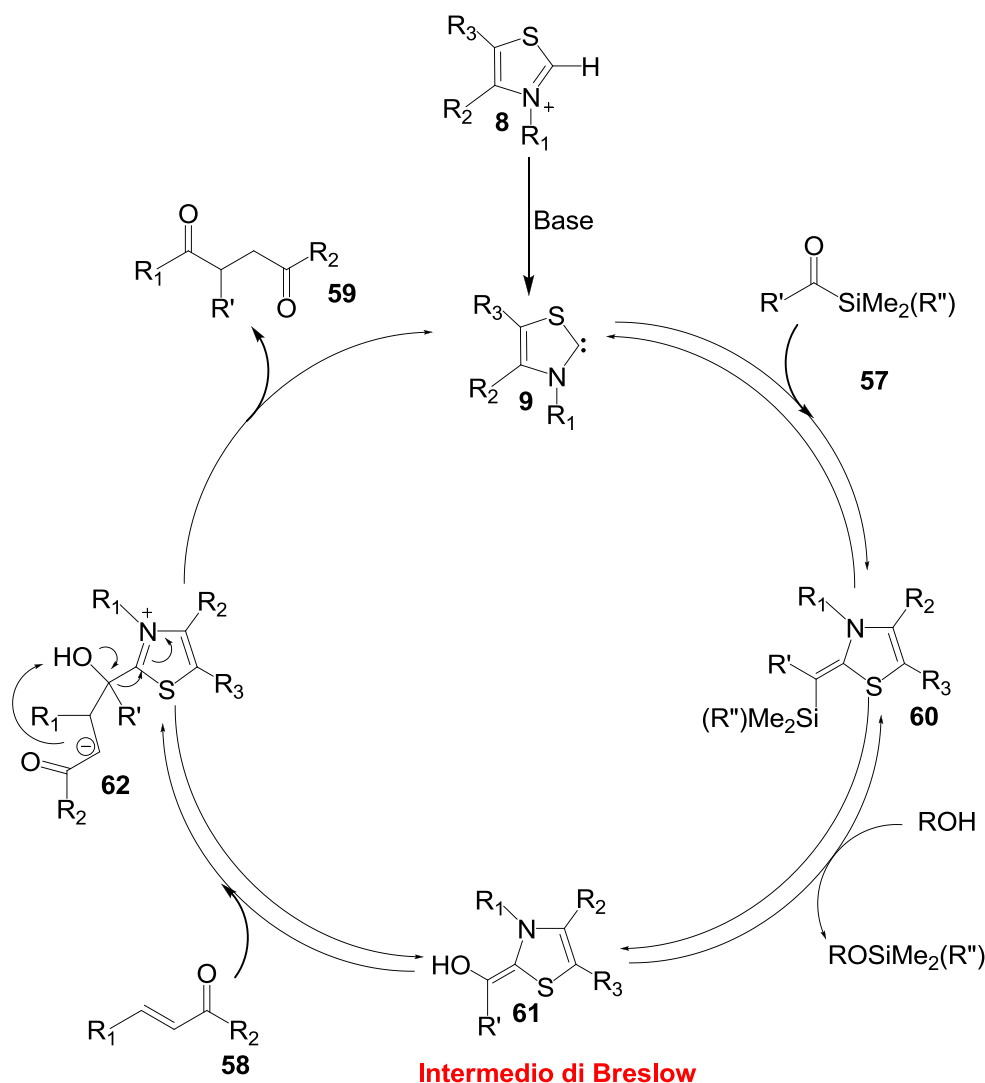
Si è pensato di superare questo inconveniente usando precursori di anioni carbonilici non convenzionali, primi fra tutti gli acilsilani (**57**) i quali, grazie alla natura stericamente ingombrata del silil gruppo, prevengono reazioni collaterali di dimerizzazione (e, quindi, la condensazione benzoinica). (**35**) Anche in questo caso, si arriva alla formazione dell'1,4 dichetone (**59**) facendo reagire l'acilsilano (**57**) con il substrato coniugato (**58**) utilizzando come pre-catalizzatore un sale di tiazolio **8c** (schema 17). (**36**)

Tale reazione procede facilmente e con buone rese. Gruppi elettron-donatori ed elettron accettori presenti su entrambi i lati del sistema α,β insaturo non influiscono in modo rilevante sull'efficienza del processo.



Schema 17. *Reazione di Stetter con acil silani.*

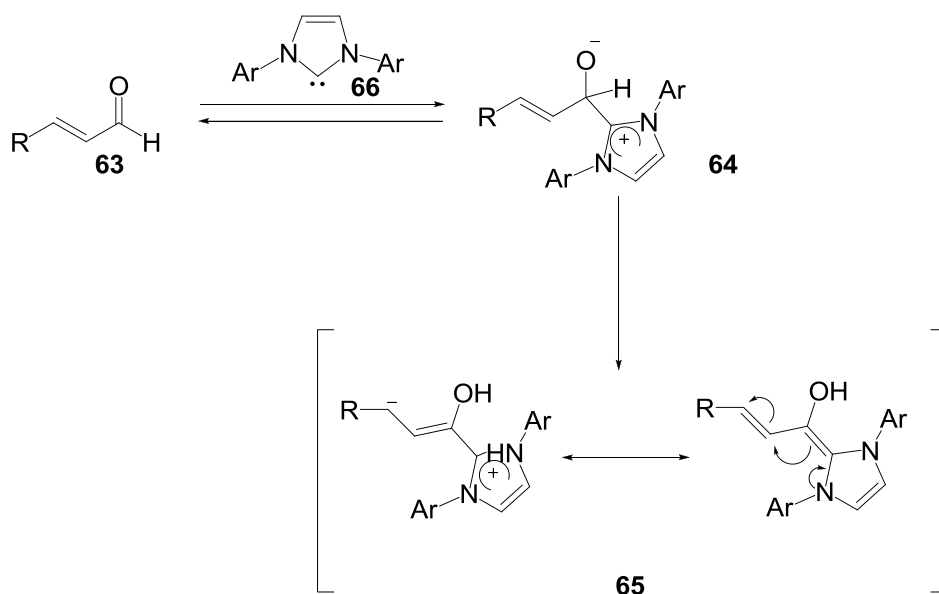
Il ciclo catalitico (schema 18) prevede l'attacco del carbene **9** all'acilsilano **57**. L'addotto che si forma, subisce un riarrangiamento 1,2 di Brook che produce la migrazione del gruppo silile sull'ossigeno formando il sililetere in equilibrio con la sua forma protonata (**60**). Per aggiunta di un alcol e di una base si ottiene la desililazione dell'intermedio **60** e la formazione dell'intermedio di Breslow **61**. Questo reagirà preferenzialmente con l'accettore α,β insaturo **58** più elettrofilo del surrogato aldeidico, per dare così il prodotto atteso **59** e il carbene nella sua forma attiva.



Schema 18. Ciclo catalitico della reazione di Stetter con acil-silani.

1.4 *Umpolung* a^3 - d^3 : reazione di enoenolati generati da NHCs

Nella reazione benzoinica e nella reazione di Stetter, l'inversione di polarità avviene sulla posizione C1. Come risultato di ciò, le reazioni benzoinica e la reazione di Stetter possono essere considerate come un *Umpolung* a^1 - d^1 , dove la posizione C1 elettrone accettrice viene convertita in posizione elettrone donatrice. Teoricamente, il processo di *Umpolung* a^3 - d^3 procede secondo un meccanismo molto simile a quello dei processi a^1 - d^1 . La differenza sta nel fatto che dopo la formazione dell'intermedio di Breslow, la posizione della carica negativa formale può essere trasferita mediante il doppio legame permettendo l'attacco dell'elettrofilo in posizione 3. (schema19).



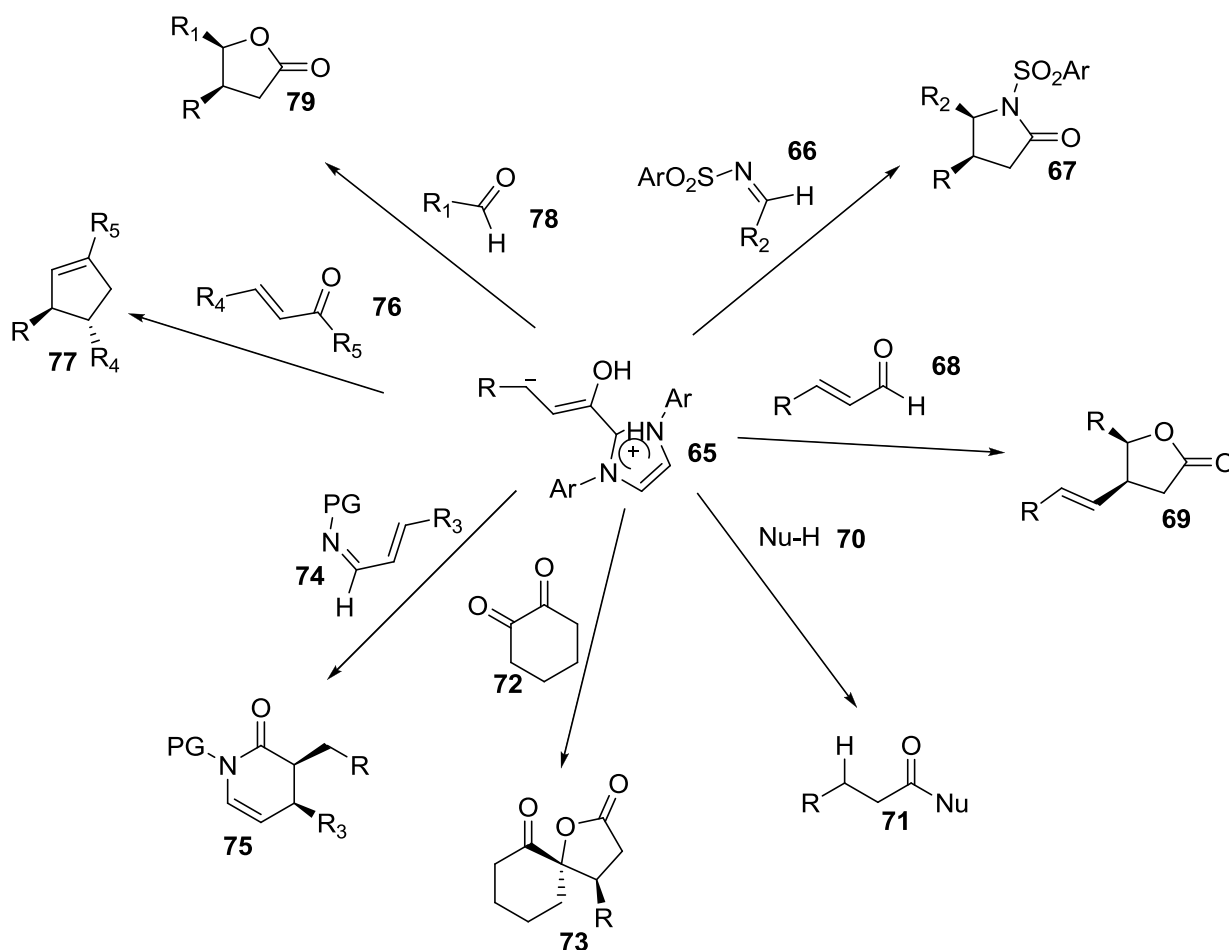
Schema 19. Generazione di omoenolati promossa da NHCs.

Inoltre, contrariamente all' *Umpolung* a^1-d^1 , dove il carbene viene liberato spontaneamente alla fine del ciclo catalitico, le reazioni di omoenolati sono seguite dalla formazione di un surrogato carbossilico attivato. Per chiudere il ciclo catalitico diventa quindi necessario introdurre una quantità stechiometrica di un altro nucleofilo, come un alcol o un'ammina. Quindi queste reazioni sono costituite da due step, il primo necessario a formare il nuovo legame, l'altro per liberare il prodotto formato e il catalizzatore. In reazioni catalizzate da NHCs le aldeidi α,β insature possono mostrare reattività di *Umpolung* sia a^1-d^1 che a^3-d^3 durante il corso della stessa reazione

Glorius e Bode hanno riportato in lavori indipendenti la formazione del γ -butirrolattone **79** mediante condensazione incrociata enale-aldeide aromatica (schema 20). (37,38) Entrambi gli autori, inoltre, sostengono l'importanza della natura dei sostituenti dell'NHC per l'efficienza della reazione. Infatti, i precursori dell'imidazolil carbene, in cui solo un lato dell'anello è sostituito, conducono a risultati meno soddisfacenti rispetto ai sali di imidazolio stericamente ingombriati.

Conseguentemente a questi studi, Bode ha introdotto l'uso di un diverso elettrofilo, ossia l'*N*-sulfonilimmina **66** (schema 20), che reagendo con l'omoenolato **65** porta al *cis* γ -lattame **67**. (39) Un'altra reazione basata sulla formazione di enolati è quella che conduce al prodotto **71** mediante transfer di un protone che trasforma l'omoenolato in un carbossilato attivato che successivamente reagisce con un nucleofilo. Bode e Sohn hanno osservato che la scelta della base è critica in questo tipo di reazioni; infatti la di-isopropil

etilammina (DIPEA) porta all'estere saturo **71** mentre il *tert*-BuOK conduce al γ -butirrolattone **69**. (40)



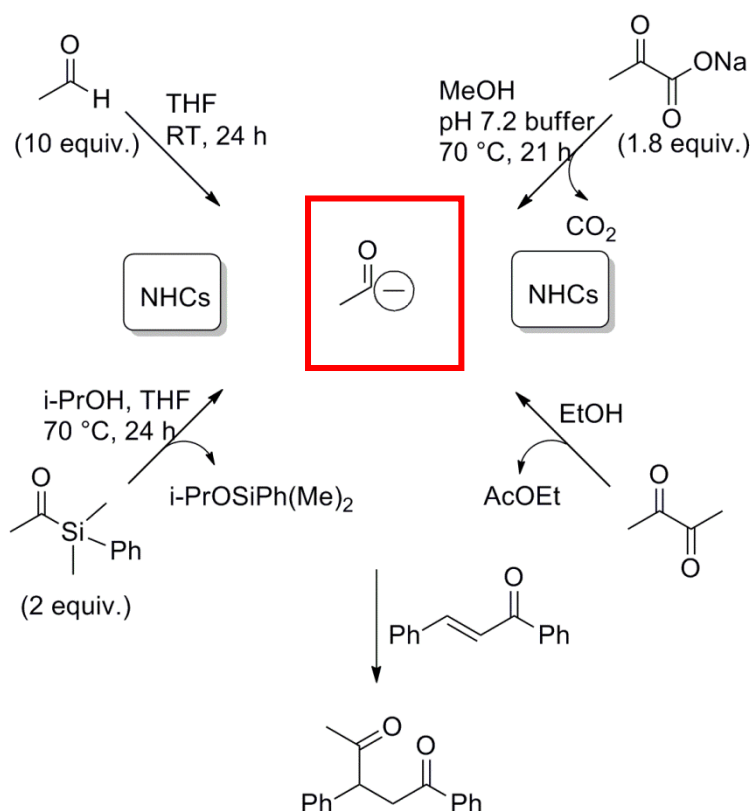
Schema 19. Applicazione degli omoenolati generati da NHCs.

Nel 2006 Bode ampliò il ventaglio di applicazioni degli omoenolati estendendolo anche alle reazioni di Diels-Alder. (41) Nel meccanismo proposto l'omoenolato subisce un trasferimento di protoni per generare un triazolico enolato che in seguito funge da dienofilo nella reazione di Diels-Alder con un'immina α,β -insatura di tipo **74** (schema 20). La protonazione corrisponde allo step critico, in quanto avviene con minor o maggior successo in base all'uso di omoenolati derivanti, rispettivamente, da sali di imidazolio o di triazolico. Tuttavia questi ultimi mostrano una tendenza maggiore a reagire con l'ene-immina piuttosto che con l'enale. Una successiva ottimizzazione ha mostrato che un enale maggiormente attivato, per esempio grazie ad una funzione esterea in *trans* all'aldeide e coniugata con un triazolico ingombrato, è necessario per evitare la formazione di γ -lattami **67** e portare invece alla formazione del prodotto desiderato **75**.

Nair ha preso in esame l'uso di un carbonile attivato come un dione vicinale mostrando come un imidazolil carbene catalizzi la "spiro-annulation" di 1,2-cicloesandioni **72** con una vasta quantità di cinnamaldeidi. (42) Sebbene la reazione sia limitata a 1,2-cicloesandioni e a cinnamaldeidi sostituite, questa costituisce una delle poche reazioni che conduce in maniera diretta a spiro γ -butirrolattoni **73** (schema 20). (43)

2 OBIETTIVI DELLA TESI: studio della reattività di Umpolung di 1,2-dichetoni.

Le molecole ad oggi più utilizzate come sorgenti di acil anioni si dividono sostanzialmente in tre classi: le aldeidi, gli acil silani ed i piruvati. Recentemente il nostro gruppo di ricerca si è interessato ad investigare la reattività di α -dichetoni alifatici ed aromatici con NHCs al fine di individuare questi composti come una nuova classe di acil anioni equivalenti (schema 21).



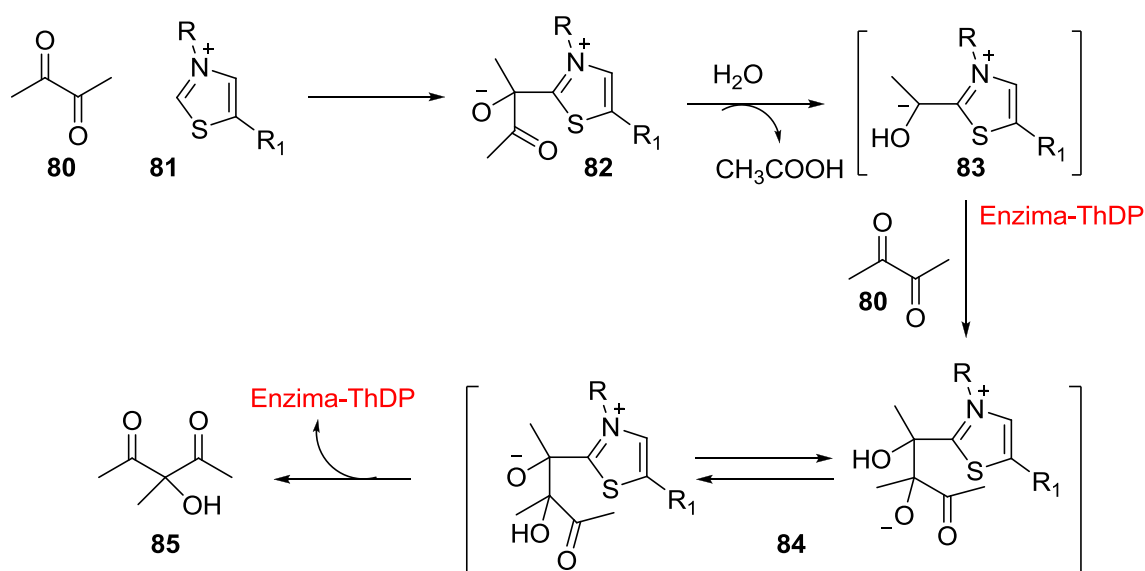
Schema 21. Metodi diretti per la generazione dell' acil anione.

2.1 Reattività di dialchil 1,2-dichetoni in presenza di NHCs

Sebbene non siano stati soggetti di approfonditi studi, gli α -dichetoni possiedono un enorme potenziale sintetico, che deriva dalla presenza nella loro struttura della doppia funzionalità chetonica. Essi infatti possono reagire come elettrofili, come nucleofili o da

entrambi in processi domino. La reattività di *Umpolung* dei dialchil 1,2-dichetoni è stata evidenziata da Mizuhara and Handler (44) nel 1954. Gli autori hanno infatti osservato che il biacetile è in grado di reagire con l'acetaldeide ^{14}C in un processo catalizzato da tiamina. Gli autori descrivono questo processo come una scissione del composto dichetonico in due funzionalità: una (l'acilanione) che reagisce con l'aldeide a dare l'acetoino, l'altra che si trasforma in acetato. In questo lavoro è stato anche evidenziato che la reazione non è compatibile con ambiente acido o neutro ma solo con un pH sufficientemente basico da permettere la deprotonazione del pre-catalizzatore tiazolico. Questi risultati costituiscono quindi la base per considerare gli α -dichetoni come molecole sorgenti di acil anioni in quanto in grado di subire, per attacco nucleofilo da parte di un NHC ad una delle due funzionalità carboniliche, inversione di polarità.

In un recente lavoro del nostro gruppo (45), è stato messo in luce come l'enzima *B. stearothermophilus* Acetilacetoin sintasi (AAS) sia in grado di promuovere una reazione di homo-coupling tra due dialchil α -dichetoni simmetrici e/o asimmetrici a dare i corrispondenti 1,3 α -idrossi dichetoni in buona resa ed induzione asimmetrica. Secondo quanto ipotizzato in questo lavoro, il residuo tiamminico localizzato nel core catalitico dell'enzima, è in grado di legare l' α -dichetone (**80** schema 22), inducendo nella molecola inversione della polarità. A questo punto si ha trasferimento della specie acil anionica su una nuova molecola di dichetone (accettore) per ottenere l'idrossidichetone desiderato.



Schema 22. Reazione di homo-coupling di α -dichetoni catalizzata da *B. stearothermophilus* Acetilacetoin sintasi (AAS).

La tabella 5 riporta i risultati ottenuti in questo studio enzimatico. È da notare come nel caso del dichetone asimmetrico (**86d**) si abbia il preferenziale trasferimento alla molecola substrato dell'acil anione che possiede la porzione alchilica più piccola. Inoltre nel caso dell'aril-alchil dichetone (**86e**) si nota il trasferimento selettivo dell'acil anione con la porzione alifatica.

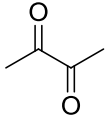
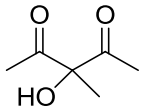
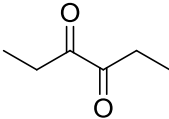
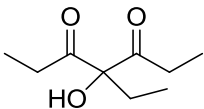
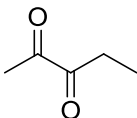
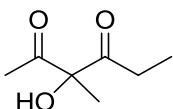
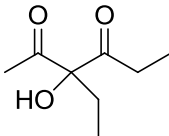
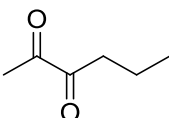
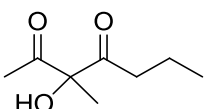
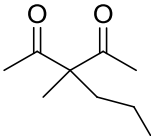
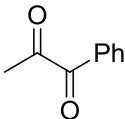
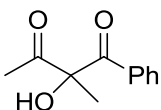
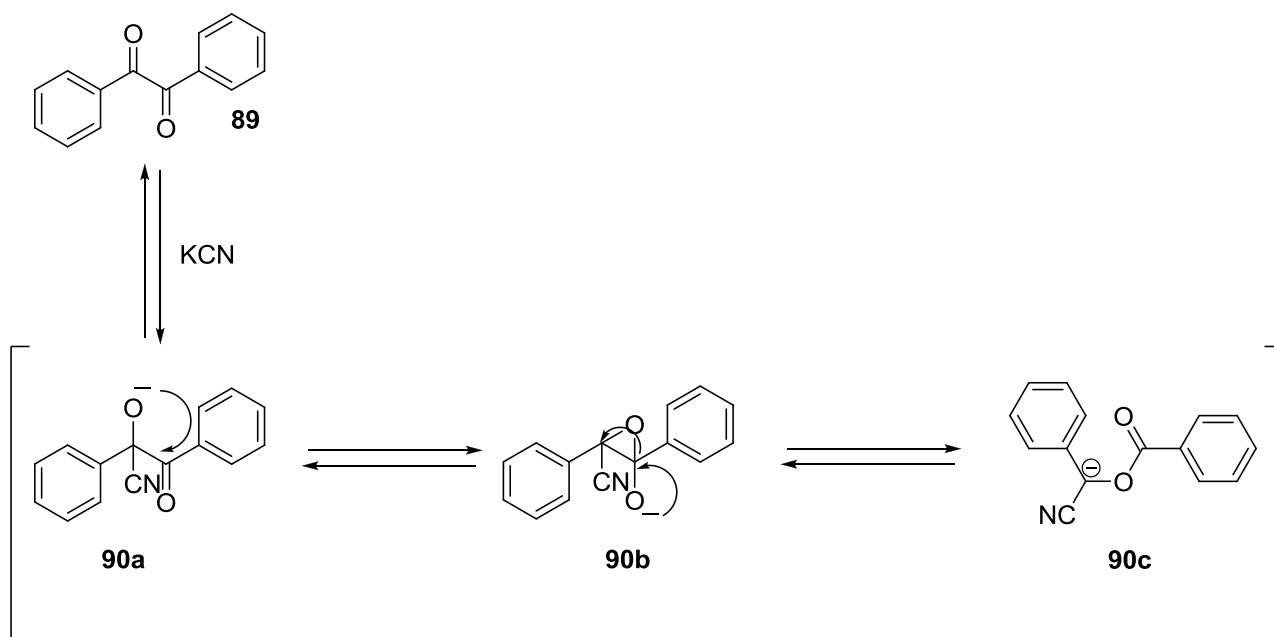
| 1,2-dichetoni | α -idrossi-1,3-dichetoni (rese) | α -idrossi-1,3- dichetoni secondari (rese) |
|---|---|---|
|  86a |  87a (57%) | |
|  86b |  87b (60%) | |
|  86c |  87c (30%, ee 70%) |  88c (25%) |
|  86d |  87d (42%, ee 67%) |  88d (19%) |
|  86e |  87e (45%, ee 76%) | |

Tabella 5. Risultati della reazione di homo-coupling di α -dichetoni catalizzata da Acetilacetoin sintasi (AAS).

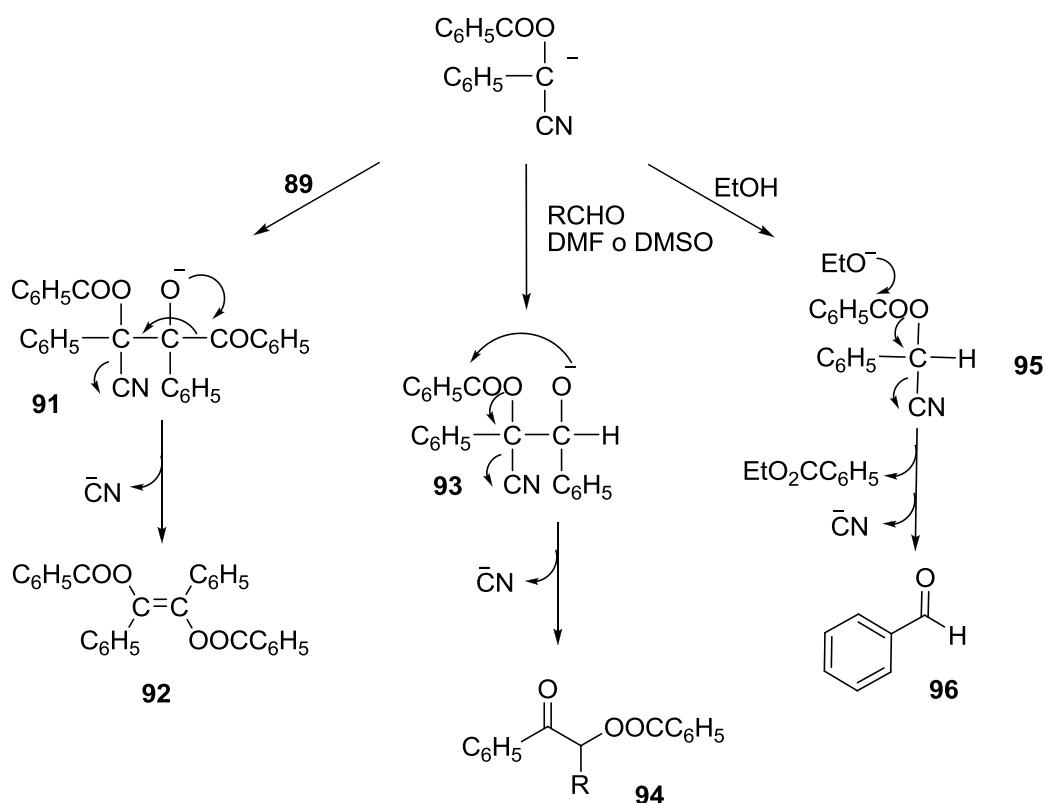
I risultati ottenuti con l'enzima ci hanno spinto a valutare se anche un organocatalizzatore (NHC) fosse in grado di promuovere l'*Umpolung* di 1,2-dichetoni. Per effettuare tale confronto, è stato selezionato come NHC dapprima la tiammina (coenzima del microorganismo), quindi un sale di tiazolio analogo. È stata valutata la reattività degli alfa-dichetoni alifatici non solo nella reazione di tipo benzoinico ma anche nella reazione di Stetter. Inoltre gli ottimi risultati ci hanno spinto, come sarà possibile notare nella discussione dei dati, a valutare il comportamento degli 1,2-dichetoni alifatici ciclici.

2.2 Reattività di diaril 1,2-dichetoni in presenza di NHCs

Per quanto riguarda la reattività dei diaril 1,2-dichetoni, il primo lavoro che ne mette in risalto la reattività di *Umpolung* risale al 1970. Infatti, Kuberich e Schowen (46) osservarono che uno ione cianuro era in grado di produrre inversione della polarità in una molecola di benzil (**89**) andando a catalizzare reazioni tipo-benzoinica omologa (tra due benzil) o incrociata (tra un benzil e la benzaldeide). Come è possibile osservare dallo schema 23, tale inversione di polarità si ottiene in un momento successivo all'attacco dello ione cianuro mediante riarrangiamento per via epossidica della specie (**90b**). Si viene a formare così un intermedio anionico (**90c**) che può reagire con una nuova molecola di benzil (homo-coupling) o con una molecola di aldeide aromatica (cross-coupling).



Schema 23. Inversione della polarità in un diaril dichetone da parte di uno ione cianuro.



Schema 24. Meccanismo di condensazione omo benzoinica, cross benzoinica e di lisi dei diaril 1,2-dichetoni in presenza di un solvente polare-protico

Il prodotto della condensazione omologa è una molecola di α,α' -stilbendiolo di-benzoato (**92**, **schema 24**) preferenzialmente con configurazione *trans*. Il prodotto della reazione benzoinica incrociata è un α -idrossi diaril dichetone (**94**) nella sua forma benzoilata. Nel lavoro di Kuberich e Schowen è stata anche stressata l'importanza del solvente in queste reazioni. È stato osservato che le reazioni di condensazione benzoinica omologa ed incrociata risultano possibili solo se condotte in un solvente polare aprotico, ad esempio in DMF o DMSO. In un solvente polare protico come EtOH si ottiene, al contrario, la lisi mediata dal solvente dell'intermedio **95**, con la liberazione di una molecola di aldeide e di etil benzoato. Nel 2004 il gruppo di Demir ha ripreso questa metodologia e l'ha estesa con successo (tabella 6) a differenti aldeidi e dichetoni aromatici (47).

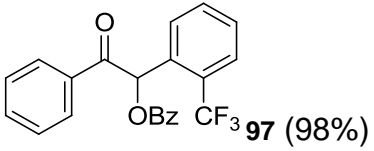
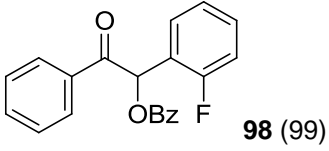
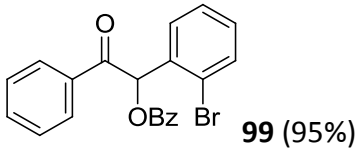
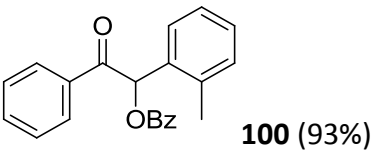
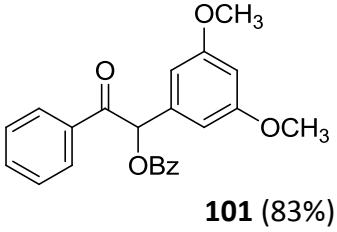
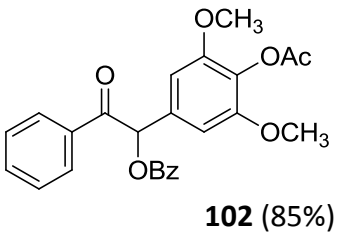
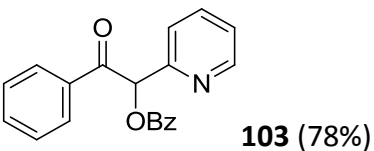
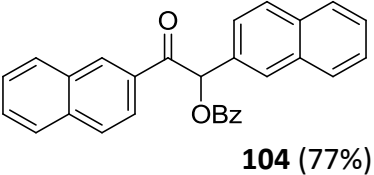
| Benzil (Ar) | Aldeide (Ar) | Prodotto (rese) |
|-------------|---|---|
| Ph | 2-CF ₃ -Ph |  97 (98%) |
| Ph | 2-F-Ph |  98 (99) |
| Ph | 2-Br-Ph |  99 (95%) |
| Ph | 2-CH ₃ -Ph |  100 (93%) |
| Ph | 3,5-(OCH ₃) ₂ Ph |  101 (83%) |
| Ph | 3,5-(OCH ₃) ₂ -4-OAcPh |  102 (85%) |
| Ph | 2-Pyridyl |  103 (78%) |
| 2-Naphthyl | 2-Naphthyl |  104 (77%) |

Tabella 6. Estensione della reazione benzoinica incrociata tra diverse aldeidi e diaril-dichetoni.

Nelle ricerche successivamente condotte dal nostro gruppo è stato interessante scoprire che i diaril 1,2-dichetoni non sono coinvolti in reazioni di homo- o di cross-coupling in presenza di un sale di tiazolio. Essi invece, come verrà descritto successivamente in dettaglio, risultano partecipare ad una nuova reazione multicomponente (MCR). Questa classe di reazioni coinvolge la condensazione di almeno tre substrati di partenza, i quali si combinano per formare un prodotto contenente porzioni molecolari di tutti i composti iniziali. (48) I numerosi vantaggi associati alle reazioni multicomponente (bassi costi, ristretti tempi di sintesi, elevata possibilità di diversificare i prodotti) hanno garantito un loro ampio utilizzo in diversi campi della chimica, dalla scoperta di nuovi materiali all'identificazione di composti biologicamente attivi. Infatti, è soprattutto in ambito farmacologico che le MCR hanno dimostrato il loro grande potenziale sintetico, grazie alla loro capacità di soddisfare la sempre più incalzante richiesta di creazione di librerie il più possibile complesse e diversificate da sottoporre a test biologici.

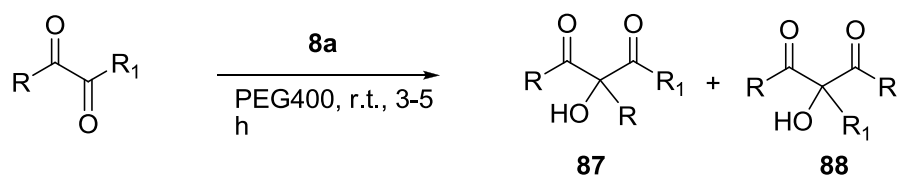
3 RISULTATI E DISCUSSIONE

La prima parte della ricerca è stata condotta in analogia agli studi enzimatici effettuati precedentemente dal nostro gruppo, al fine di valutare se anche organocatalizzatori fossero in grado di promuovere il processo di condensazione tipo benzoinica fra dialchil 1,2-dichetoni. A tal proposito, è stata inizialmente impiegata la tiammina cloridrata come promotore della reazione. Infatti, questa è in grado di catalizzare il processo solo se utilizzata in quantità stechiometriche, mentre perde di efficienza se impiegata in quantità catalitiche. Per ovviare a questi problemi è stato preso in considerazione un sale di tiazolio differente, analogo della tiammina. È stata inoltre valutata l'importanza del solvente in tale metodologia. Il polietilenglicole PEG₄₀₀ si è rivelato il miglior mezzo in cui condurre la reazione in quanto, oltre a partecipare in modo efficiente come solvente anfiprotico nel ciclo catalitico, permette il riciclo del catalizzatore. È stata inoltre valutata la compatibilità della procedura con diversi substrati dichetonici (tabella 7). Com'è possibile notare dai dati riportati in tabella 8, quando vengono utilizzati dichetoni asimmetrici, si verifica il trasferimento preferenziale dell'acilazione con la catena carboniosa più piccola, in analogia a quanto osservato nello studio enzimatico.

Anche per il processo organocatalizzato è stato ipotizzato un meccanismo di reazione che viene riportato nello schema 25.

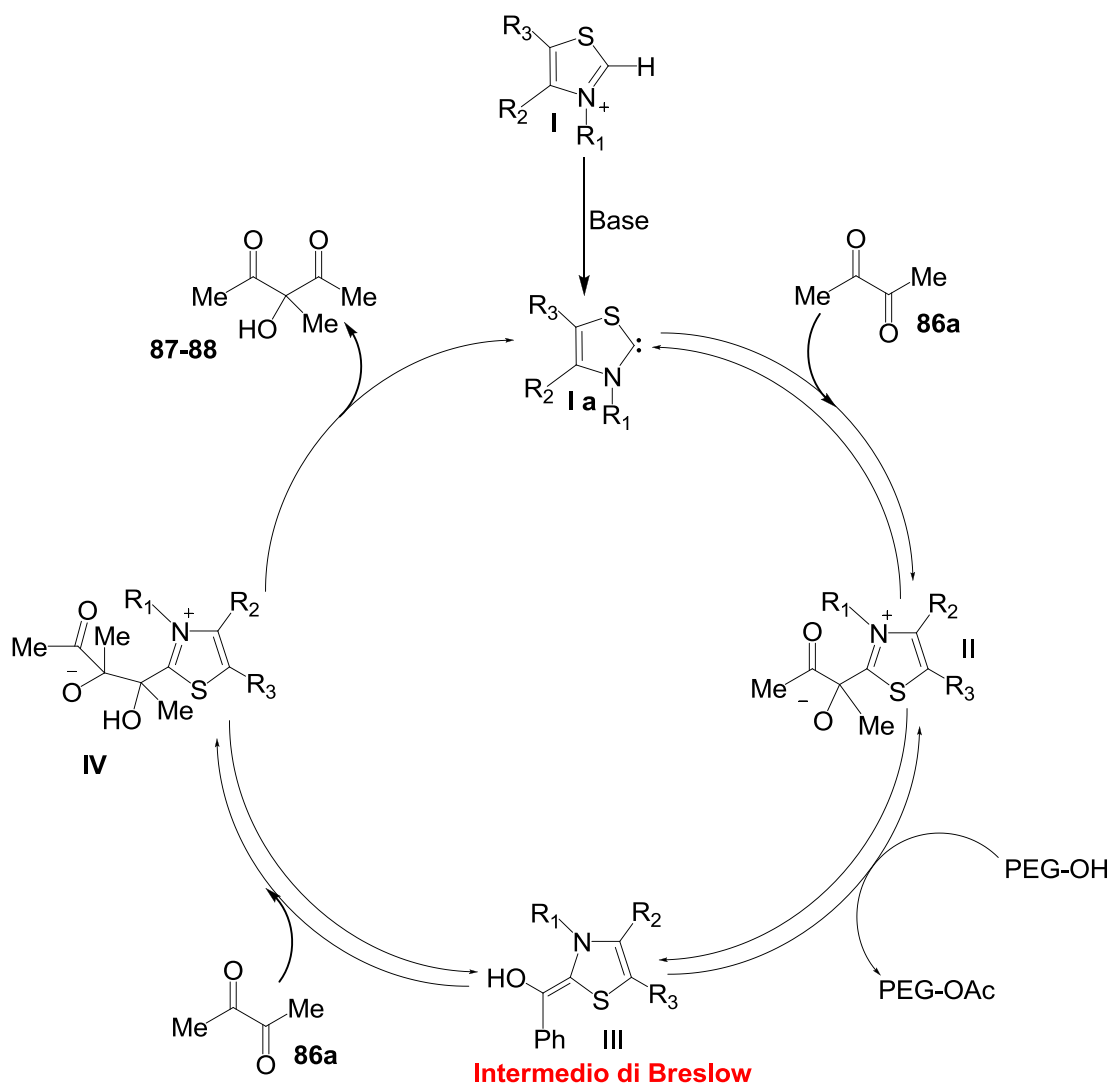
Il lavoro condotto con i sali di tiazolio si differenzia sostanzialmente in un punto rispetto al lavoro enzimatico. È stato infatti sorprendente appurare che l'aril-alchil 1,2-dichetone **86e**, non fornisce il prodotto di condensazione nel processo NHC-catalizzato, bensì un prodotto di riduzione (tabella 7). Questo particolare comportamento degli aril-alchil dichetoni è stato spiegato secondo un meccanismo di reazione differente (schema 26) secondo il quale l'intermedio di Breslow subisce un riarrangiamento prototropico per dare la specie (VI) in grado di donare ioni idruo.

Per dimostrare la flessibilità di questa procedura sintetica, gli stessi sali di tiazolio sono stati impiegati per promuovere reazioni di condensazione incrociata tra un 1,2-dichetone (**86**) ed un α -chetoestere (**90a-d**). Gli α -idrossi 1,3 chetoesteri risultanti (**91-94**) sono stati ottenuti in buone rese (tabella 8) anche se non è stato possibile sopprimere la reazione collaterale di condensazione omo-benzoinica dell'alfa-dichetone.



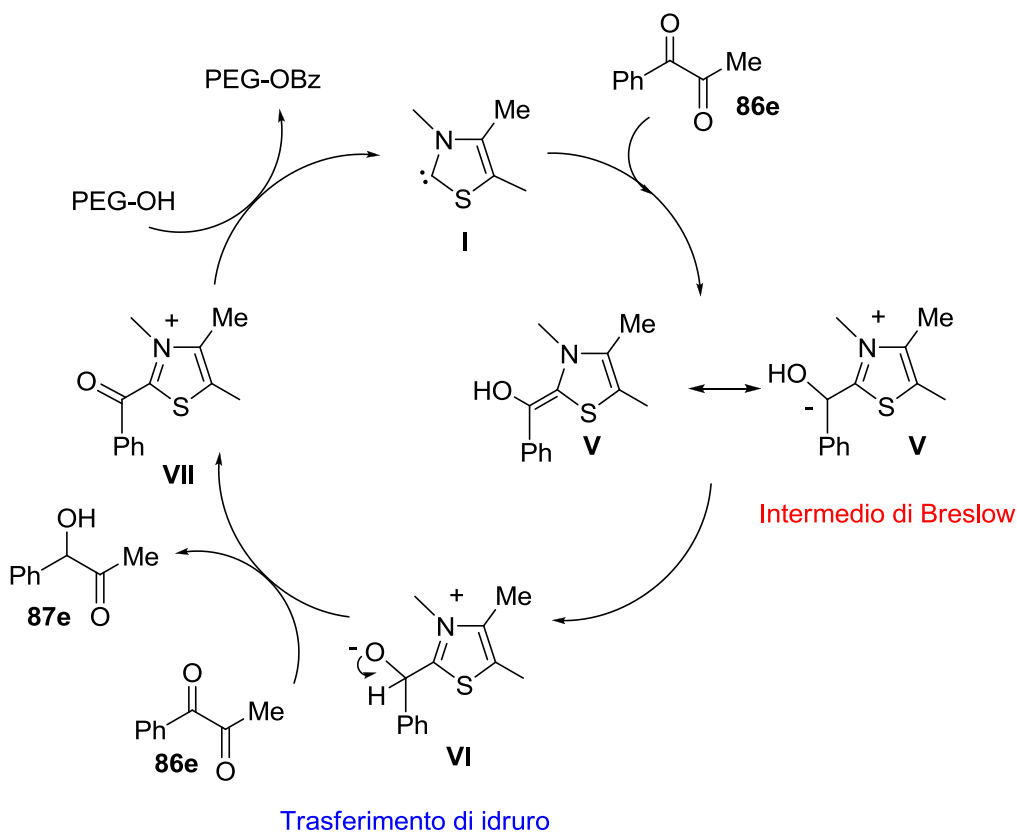
| Rif. | α -dichetone | α -idrossichetone(%) |
|------|---|---|
| 1 | <p style="text-align: center;">86b</p> | <p style="text-align: center;">87b (88%)</p> |
| 2 | <p style="text-align: center;">86c</p> | <p style="text-align: center;">87c (71%)</p> <p style="text-align: center;">88c (11%)</p> |
| 3 | <p style="text-align: center;">86d</p> | <p style="text-align: center;">87d (65%)</p> <p style="text-align: center;">88d (24%)</p> |
| 4 | <p style="text-align: center;">86e</p> | <p style="text-align: center;">87e (78%)</p> |
| 5 | <p style="text-align: center;">89</p> | no reaction |
| 6 | <p style="text-align: center;">86f</p> | <p style="text-align: center;">87f (67%)</p> <p style="text-align: center;">88f (17%)</p> |

Tabella 8. Applicazione del processo a differenti dichetoni.



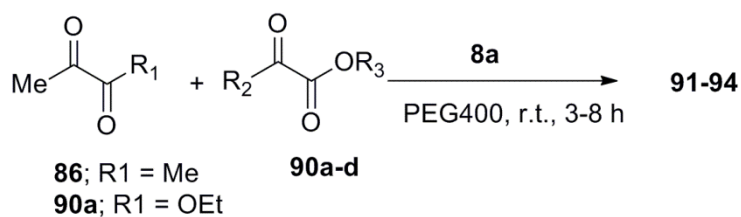
Schema 25. Meccanismo di reazione ipotizzato per l'homo-coupling tra due α -dichetoni per dare α -idrossi-1,3-dichetoni.

Lo studio della reattività di dialchil dichetoni in condensazioni di tipo benzoinico è stato oggetto di una pubblicazione (**α -Diketones as acyl anion equivalents: a non-enzymatic thiamine-promoted route to aldehyde-ketone coupling in PEG400 as recyclable medium.** G. Fantin, M. Fogagnolo, P. P. Giovannini, S. Pacifico, V. Venturi, A. Massi, and O. Bortolini, *Tetrahedron*, **2011**, 67 (42), 8110-8115) allegata nella sezione V del presente capitolo a cui si rimanda per maggiori dettagli.



Schema 26. Meccanismo proposto per la riduzione del dichetone **1g**.

Per validare ulteriormente l'importanza dei dialchil-dichetoni come sorgenti di acilanioni, questi composti sono anche stati impiegati nella reazione di Stetter per condurre l'acilazione nucleofila di sistemi α,β -insaturi. In questo studio sono stati testati diversi NHCs, anche se il sale di tiazolio **8a**, utilizzato nel precedente lavoro è risultato il più efficiente. La reazione è stata condotta in EtOH e sono state ottimizzate due vie sintetiche: la prima ha comportato il riscaldamento della miscela di reazione a 50 °C, la seconda ha certificato la compatibilità del processo con un riscaldamento non convenzionale mediante microonde. Sono stati testati differenti dichetoni e diversi accettori di Michael più o meno attivati (tabella 9) permettendo l'isolamento degli 1,4 dichetoni (**95-96**) corrispondenti con rese variabili dal 60 al 90%.



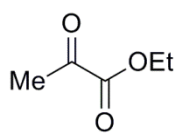
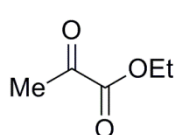
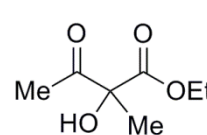
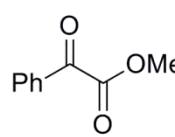
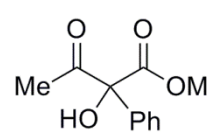
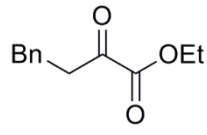
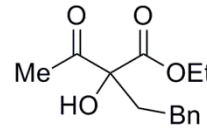
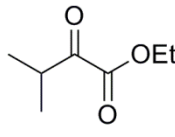
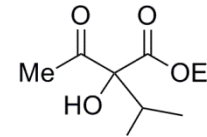
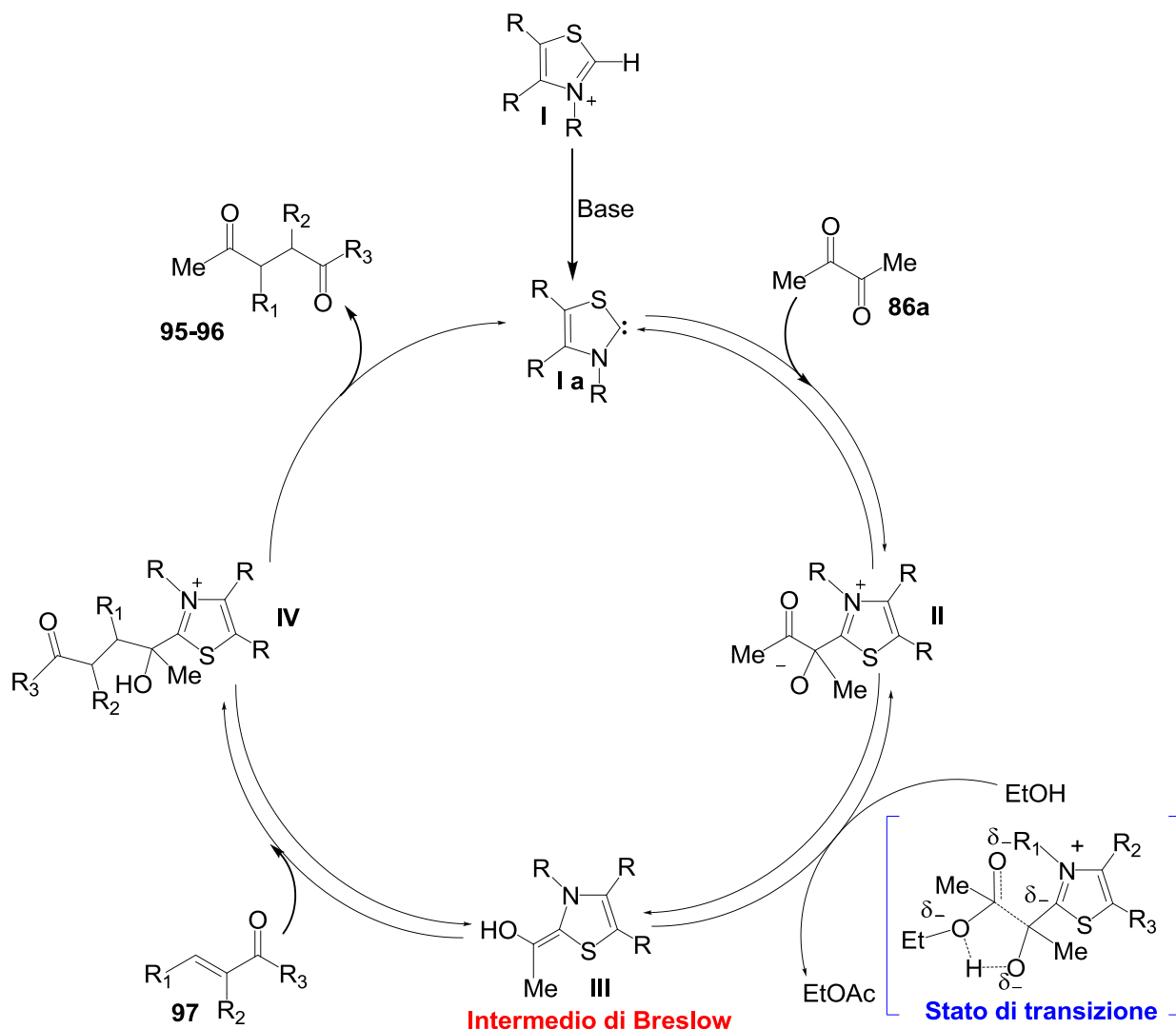
| Rif. | Donatore | Accettore | Prodotto(%) |
|------|------------|---|---|
| 1 | 90a |  90a | no reaction |
| 2 | 86 |  90a |  91 (55%) |
| 3 | 86 |  90b |  92(42%) |
| 4 | 86 |  90c |  93 (50%) |
| 5 | 86 |  90d |  94 (51%) |

Tabella 8. Applicazione della condensazione benzoinica incrociata tra dichetoni e α -chetoesteri.

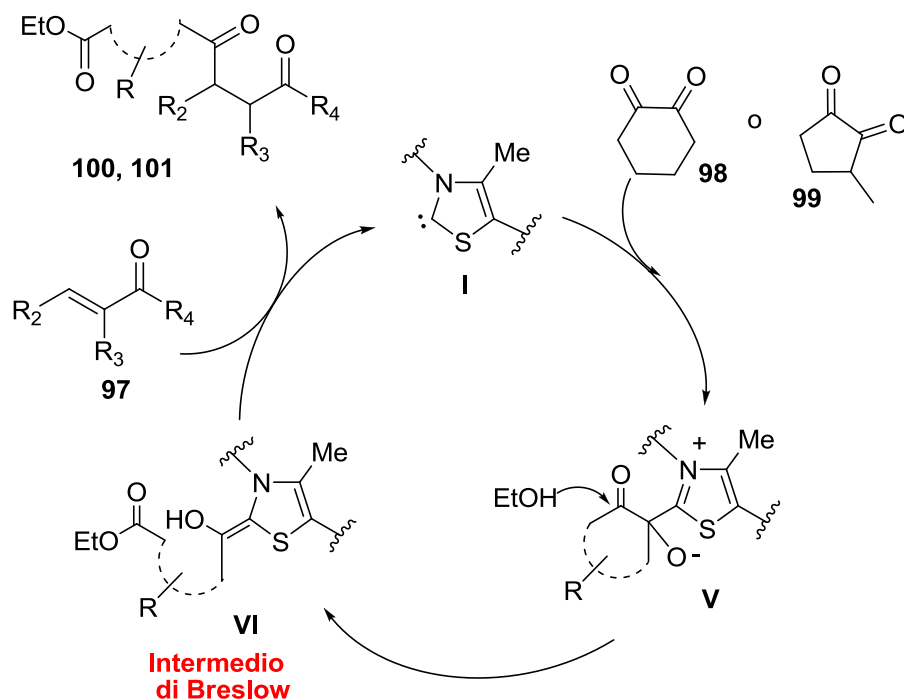
Dallo stato di transizione si passa quindi alla la formazione dell'intermedio di Breslow (**III**) (schema 27) che si addiziona poi alla posizione β del composto accettore **97** per dare, dopo riarrangiamento dell'intermedio **IV**, il prodotto **95-96** e il catalizzatore (**I**).



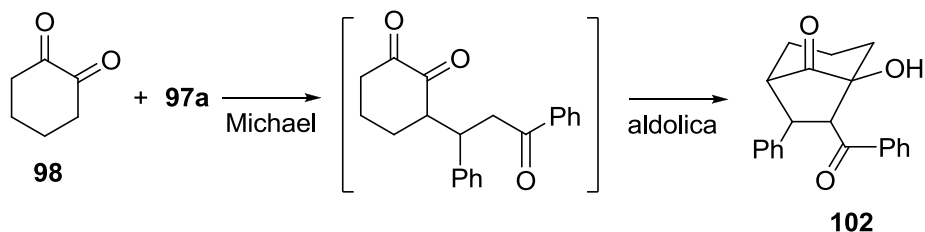
Schema 26. Meccanismo proposto per la reazione di Stetter intermolecolare di α -dichetoni lineari catalizzata da sali di tiazolio.

È stata valutata l'estensione metodologica di questo approccio anche ad 1,2-dichetoni ciclici (**98** e **99** schema 28). Nelle stesse condizioni ottimizzate per la controparte lineare è stata osservata la formazione preferenziale di un composto biciclico ottenuto per addizione di Michael del dichetone ciclico al calcione, seguita da una reazione aldolica intramolecolare. Un'ulteriore ottimizzazione del processo è stata quindi necessaria per poter sopprimere la formazione del prodotto collaterale e ottenere i prodotti attesi con

buona efficienza chimica. Anche in questo caso è stato proposto un meccanismo di reazione analogo a quello riportato per i 1,2-dioni lineari (schema 28).



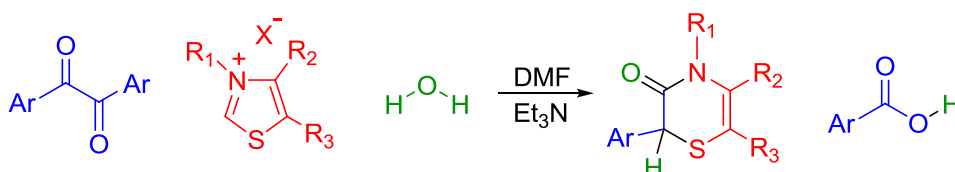
Prodotti collaterali



Schema 28. Meccanismo proposto per la reazione di Stetter con dichetoni ciclici e possibile formazione del prodotto collaterale.

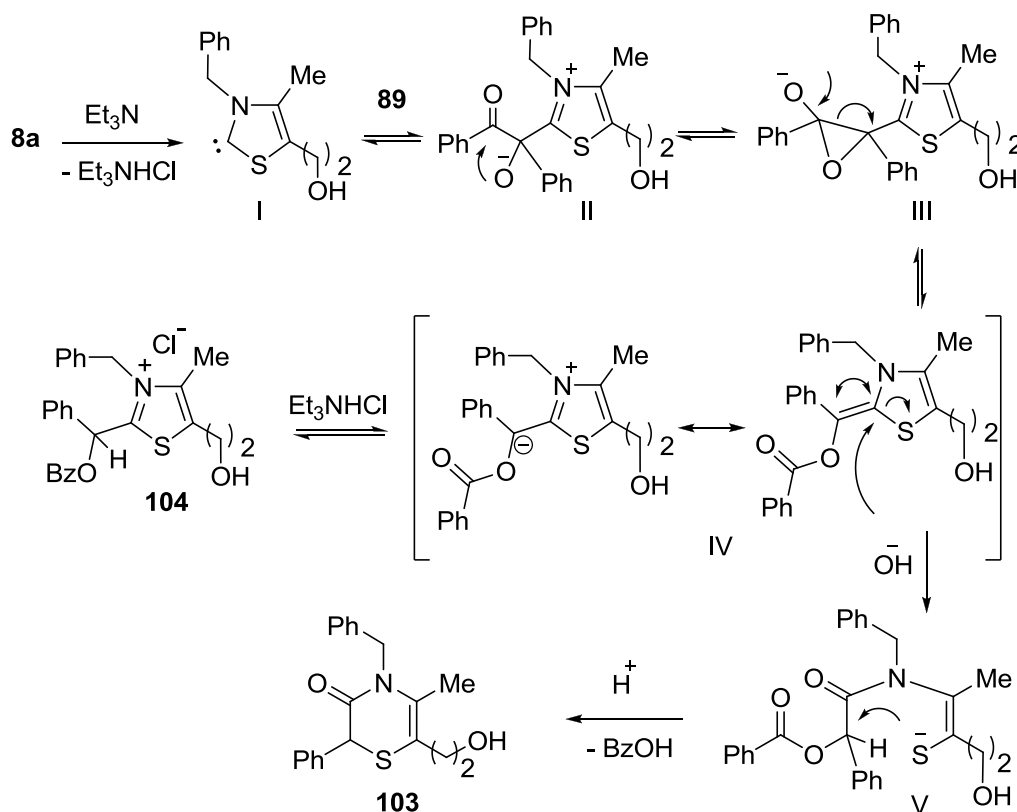
Lo studio della reattività dei dialchil 1,2-dichetoni in reazioni di Stetter è stato oggetto di una pubblicazione (**Thiazolium-Catalyzed Intermolecular Stetter Reaction of linear and cyclic alkyl alpha-diketones**. O. Bortolini, G. Fantin, M. Fogagnolo, P. P. Giovannini, A. Massi, and S. Pacifico. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2011**, 9 (24), 8437-8444.) allegata nella sezione V del presente capitolo a cui si rimanda per maggiori dettagli.

Alla luce di queste evidenze sperimentali è stata inizialmente valutata la possibilità di utilizzare anche gli α -dichetoni di-aromatici come equivalenti di acil anioni nelle reazioni di tipo benzoinico e di Stetter. Tuttavia, dopo un lungo lavoro esplorativo, si è osservato che gli α -dichetoni di-aromatici presentano una reattività completamente differente in presenza di sali di tiazolio. Infatti essi vengono intercettati da quantità stechiometriche di *N*-eterociclo carbene e di acqua (generalmente presente nel solvente di reazione) per dare 2,3-diidro-1,4-tiazin-3(4H)-oni come prodotti di una nuova reazione multicomponente (Schema 29).



Schema 29. Scoperta di una nuova reazione a tre componenti (3-CR).

Per la nuova reazione multicomponente identificata è stato ipotizzato il meccanismo di reazione descritto nello schema 30.



Schema 30. Meccanismo proposto per la reazione multicomponente 3-CR

Si può notare che l'addotto dichetone-tiazolilidene (**II**) subisce un riarrangiamento epossidico che genera la specie **III** in equilibrio con l'intermedio di Breslow (**IV**) in una sua forma benzoilata. L'intermedio **IV** può quindi subire o una protonazione a dare il sale di tiazolio **104** (isolato e caratterizzato), oppure reagire con lo ione idrossido a dare il tiolato **V**; questo procede poi in una ciclizzazione a dare l'eterociclo **103** mediante eliminazione di una molecola di acido benzoico.

A supporto dell'ipotesi meccanicistica proposta è stato l'isolamento e la caratterizzazione del sale di tiazolio **104**. La partecipazione dell'acqua a questa reazione multicomponente invece è stata dimostrata attraverso l'impiego di H_2O^{18} che ha portato alla formazione del prodotto di reazione marcato all'ossigeno carbonilico.

Infine, sono state ottimizzate tre procedure sperimentali per la sintesi degli 2,3-diidro-1,4-tiazin-3-(4H)-oni. La prima (procedura A) consta di un unico step termico ed è risultata la migliore in termini di efficienza chimica (one-step, 3-CR). La seconda procedura prevede due step: nel primo si ha la formazione del sale di tiazolio intermedio (**104**), mentre nel secondo avviene l'espansione d'anello a dare il prodotto atteso (procedura B, two-step, 3-CR). Anche il terzo approccio sintetico si sviluppa in due step: inizialmente si ha la quaternizzazione del tiazolio che in una seconda fase prende parte al processo multicomponente (procedura C, two-step 4-CR).

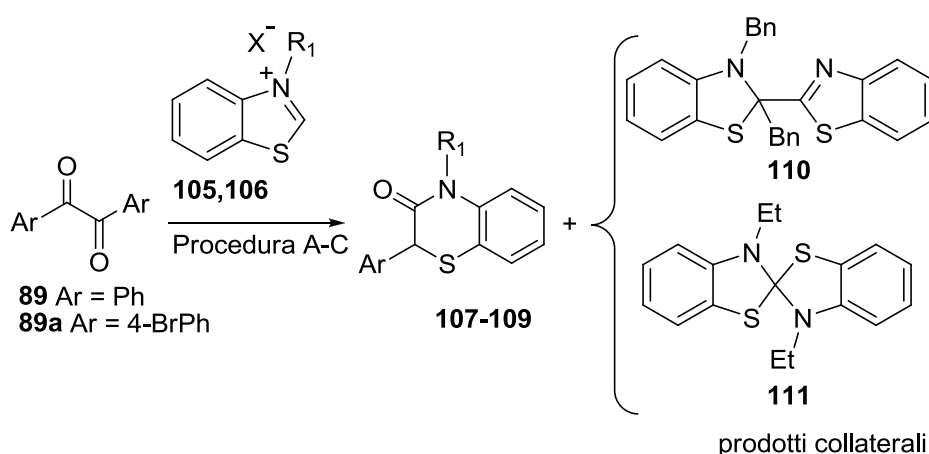
Attraverso le tre procedure è stato anche valutato come la natura elettronica dei sostituenti presenti sui diaril-dichetoni può modificare l'efficienza del processo. E' risultato che sostituenti elettron-attrattori risultano essere di gran lunga i migliori.

A questo punto della nostra ricerca, si è deciso di espandere ulteriormente lo scopo della metodologia sintetica considerando la condensazione di α -dichetoni di-aromatici e carbeni generati da sali di benzotiazolio.

Come si evince dalla Tabella 10 non è stato possibile isolare alcun prodotto di reazione impiegando il sale di benzotiazolio **105** funzionalizzato all'azoto con un gruppo benzilico. Tuttavia, un'attenta analisi dei lavori riportati in letteratura ci ha permesso di capire che ciò che inficiava la buona riuscita del processo multicomponente era la forte tendenza dei carbeni benzotiazolici a dimerizzare quando generati a caldo. (49)

A fronte di questo risultato, si è pensato di eliminare, o inibire almeno in parte il processo di dimerizzazione attraverso l'utilizzo del sale di benzotiazolio **106** funzionalizzato all'azoto con un etile. Fortunatamente, con l'impiego di un eccesso di questo sale (3 equivalenti) è stato possibile isolare (attraverso le procedure A e C) quantità accettabili (18-42%) dei benzotiazinoni attesi **108** e **109**.

Lo studio del processo multicomponente che ha portato alla sintesi di tiazinoni e benzotiazinoni è stato oggetto di una pubblicazione (**Unexpected reactivity of diaryl α -diketones with thiazolium carbenes: discovery of a novel multicomponent reaction for the facile synthesis of 1,4-thiazin-3-ones**. V. Bertolasi, O. Bortolini, A. Donvito, G. Fantin, M. Fogagnolo, P. P. Giovannini, A. Massi, and S. Pacifico. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 6579.) allegata nella sezione V del presente capitolo a cui si rimanda per maggiori dettagli



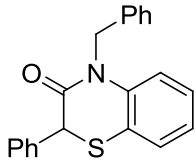
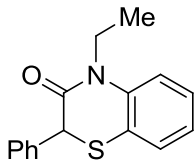
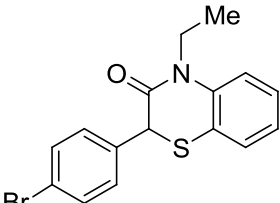
| Rif. | Dichetone | Benzotiazolio | Prodotto(%) Procedura A/B/C |
|------|------------|-------------------------|--|
| 1 | 89 | 105 (R1 = Bn) |  107 (- / - / -) |
| 2 | 89 | 106 (R1 = Et) |  108 (20 / - / 42) |
| 3 | 89a | 106 (R1 = Et) |  109 (18 / - / 45) |

Tabella 10. Reazioni multicomponente con sali di benzotiazoli.

Bibliografia.

1. Eder, U., Sauer, G. e Wiechert, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1971**, Vol. 10, p. 496.
2. Ahrendt, K., Borths, C. J. e MacMillan, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, Vol. 122, p. 4243.
3. Berkessel, A e Groger, H. Asymmetric organocatalysis-From Biomimetic Concepts to *Applications in Asymmetric Synthesis. Acc. Chem. res.* **2004**, Vol. 37, 8.
4. W.C.MacMillan, David. The advent and development of organocatalysis. *Nature.* **2008**, p. 304-308.
5. Lee, H. M.; Lee, C.; Cheng, P. *Curr. Org. Chem.* **2007**, 11, 1491- 1524.
6. Busetto, L.; Cassani, M. C.; Femoni, C.; Macchioni, A.; Mazzoni, R.; Zuccaccia, D. J. *Organometallic Chem.* **2008**, 693, 2579- 2591
7. Herrmann, W. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1290- 1390.
8. N., Marion, S., Diez-Gondalez e P., Nolan S. N-Heterocyclic Carbene as Organocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, Vol. 46.
9. Arduengo, A. J. e Harlow, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, Vol. 113, p. 361-363
10. Saito, S., Hatanaka, K. e Yamamoto, H. *Tetrahedron.* **2001**, Vol. 57, p. 875.
11. Wöhler, L. *Annalen der Pharmacie*, **1832**, 3, 249-282.
12. Seebach, D. Methods of Reactivity Umpolung. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* April **1979**, Vol. 18, p. 239-336.
13. Matsuoka S., Ichioka K., Takagi K., Suzuki M., *Org.Lett.* **2011**,14,3722
14. Ugai, T.; Tanaka, S.; Dokawa, S. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1943**, 63, 296.
15. Lapworth R., *J. Chem. Soc. Trans.* **1903**, 83, 995
16. Joly G. D., Jacobsen E. N., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, Vol. 126, p. 4102.
17. Sheehan J. C., Hunneman D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, Vol.88, p. 3666
18. Sheehan J. C., Hara T., *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 1196
19. Enders D, Kallfass U (2002) *Angew Chem Int Ed Engl* 41:1743
20. Dudding, T. e Houk, K. N. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2004, Vol. 101, p. 5770.
21. (a) Stetter, H.; Dämbkes, G. *Synthesis*, 1977, 403. (b) Stetter, H.; Dämbkes, G. *Synthesis*, **1980**, 309.
22. Dunkelmann P., Demir A., Muller M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 12084
23. Iding H, Dunnwald T., Muller M., Pohl M., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 1483
24. Bausch C., Johnson J., *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 4283
25. Linghu X., Bausch C., Johnson J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1833
26. Linghu X., Johnson J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2003**, 42, 2534

-
27. Hachisu Y., Bode J., Suzuki K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 8432
28. Stetter, H. *Angew. Chem.* 1976, 88, 695; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1976**, 15, 639.
29. Yadav J., Anuradhya K., Reddy B., Eeshwaraiah B., *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 8959
30. Ciganek, E. *Synthesis*. **1995**, p. 1311.
31. Kerr, M. S. e Rovis, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, Vol. 124, p. 10298
32. Read de Alaniz, J. e Rovis, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, Vol. 127.
33. Reynolds, N. T. e Rovis, T. *Tetrahedron*. **2005**, Vol. 61
34. Enders D., Balensiefer T, *Acc. Chem. Res.*, **2004**, 37, 534
35. Linghu, X. e Johnson, J.S. *Angew. Chem.* **2003**, Vol. 115, p. 2638
36. Mattson, A. e K., Scheidt. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, Vol. 126, p. 2314-2315.
37. Burstein, C., Glorious, F. *Angew. Chem.* **2004**, Vol. 116.
38. Sohn, S. S., Rosen, E. L. e Bode, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**.
39. Bode, J.W. e He, M. *Org. Lett.* **2005**, Vol. 7
40. Sohn, S. S. e Bode, J. W. *Org. Lett.* **2005**, p. 905-908.
41. He, M., Strubble, J. R. e Bode, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, Vol. 128.
42. Nair, V., Vellalath, S. e Suresh, E. *Org. Lett.* **2006**, Vol. 8.
43. Orduna, A., Zepeda, L. G. e Tamariz, J. *Synthesis*. **1993**, p. 375-377.
44. Mizuhara, S., Handler, P., *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 571.
45. Giovannini, P. P., Pedrini, P. e Venturi, V. *J. Mol. Catal.* **2010**, Vol. 64, p. 113-117.
46. Kuebrich J. and Schowen L. , *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 1220
47. Demir S. and Reis O., *Tetrahedron*, **2004**, 60, 3803
48. Poster, G. H. *Chem. Res.* **1986**, p. 831.
49. Baldwin, J. E. e Branz, S. E. *J. Org. Chem.* **1977**.

ARTICOLI PUBBLICATI



Synthesis of *S*-glycosyl amino acids and *S*-glycopeptides via photoinduced click thiol–ene coupling

Michele Fiore, Mauro Lo Conte, Salvatore Pacifico, Alberto Marra, Alessandro Dondoni*

Dipartimento di Chimica, Laboratorio di Chimica Organica, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, 44100 Ferrara, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2010

Revised 11 November 2010

Accepted 17 November 2010

Available online 23 November 2010

Keywords:

Carbohydrates

Glycosides

Peptides

Radical reactions

Thiols

ABSTRACT

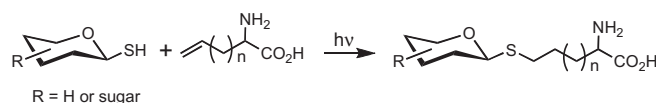
We report on the photoinduced addition of glycosyl thiols to alkenyl glycines (thiol–ene coupling) to give *S*-glycosyl amino acids in high yields (53–90%). One of the amino acids thus prepared was used in the construction of a tripeptide via solution phase chemistry. Moreover, a one-pot two-step approach to an *S*-glycopeptide was developed using glutathione (GSH) as model starting material. This approach involved GSH *S*-alkenylation followed by photoinduced hydrothiolation by a glycosyl thiol.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

While native *O*- and *N*-glycosidic bonds of glycopeptides are prone to hydrolytic cleavage by *O*- and *N*-glycosidases, synthetic *C*- and *S*-analogs are expected to be stable toward such enzymatic degradation. Therefore, much effort has been devoted in the last decades to synthesizing *C*- and *S*-glycosyl amino acids and their assembly in glycopeptides.^{1,2} Glycopeptides with these non-native linkages can be used as probes for biochemical studies and leads in drug discovery, such as, for example, vaccines. It has to be noticed, however, that the replacement of the oxygen atom of an *O*-linked glycopeptide with a sulfur atom is the most straightforward way for isosteric mimicry because the differences existing between the *C*-*S* and *C*-*O* bond lengths as well as the *C*-*S*-*C* and *C*-*O*-*C* bond angles result in small variation between the positions of carbon atoms in *C*-*O* and *C*-*S* glycosidic linkages.³ Nevertheless, the longer *C*-*S* bond and the weaker stereoelectronic effect in *S*-linked derivatives allow greater flexibility. Among the various methods for *S*-glycosyl amino acid and peptide synthesis,^{1c} the coupling of an activated sugar derivative with a protected cysteine residue is most widely exploited.⁴ Cyclic *S*-glycopeptide, however, have been preferentially prepared by peptide synthesis with *S*-glycosylated amino acid building blocks.⁵ Substantial advancements have been made in very recent years. A method reported by Davis and coworkers involves coupling of a carbohydrate thiosulfonate with a cysteine residue to give a disulfide glycosyl amino acid that in turn is desulfurized by a phosphine.⁶ This approach was applied to a protein containing a single cysteine residue to give the thio-

ether-linked glycoprotein. Reported from Davis laboratory is also another method that appeared in a very recent publication⁷ when our work described below was in progress.⁸ It involves thermally or photochemically induced free-radical addition of glycosyl thiols to homoallylglycine in a protected and unprotected form to give alkyl-tethered *S*-glycosyl glycines. Also this work was propaedeutic to the synthesis of *S*-linked protein glycoconjugates.

The recent disclosures from the Davis group prompted us to report here on a similar approach to *S*-glycosyl amino acids, that is, based on the photoinduced hydrothiolation of alkenyl glycines by glycosyl thiols (Scheme 1). This photoreaction, currently referred to as thiol–ene coupling (TEC),⁹ is known to proceed by a radical mechanism and, therefore, allows to add thiols to non-activated alkenes in an anti-Markownikov fashion.¹⁰ Main features of photoinduced TEC include the occurrence by irradiation at close to visible light under aerobic conditions at room temperature in aqueous solvents and orthogonality to a wide range of functional groups. Owing to its efficiency and specificity, TEC has been recently exploited by us for the glycosylation of natural cysteine containing peptide such as glutathione (GSH) and the protein bovine serum albumin (BSA).¹¹



Scheme 1. General equation for *S*-glycosyl amino acid synthesis via photoinduced TEC.

* Corresponding author. Tel.: +39 0532 455176; fax: +39 0532 240709.
E-mail address: adn@unife.it (A. Dondoni).

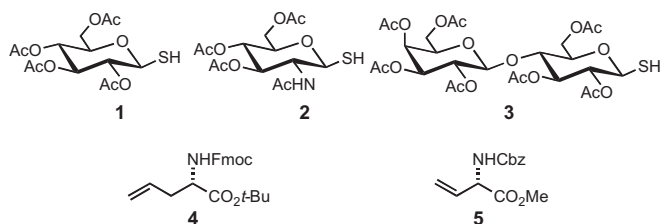


Figure 1.

To perform the reaction shown in Scheme 1, we selected the model glycosyl thiols **1–3** and allyl and vinyl glycines **4** and **5**, respectively, as substrates (Fig. 1). Carbohydrates **1–3** and amino acids **4** and **5** were known compounds and, therefore, were prepared by literature methods (see Supplementary data). *O*-Acetyl protecting groups in the sugar thiols were used because of their compatibility with the planned photoreaction.¹² Moreover orthogonal protective groups in the glycyl moiety were employed in order to obtain target *S*-glycosyl amino acids suitable for peptide synthesis.

Taking advantage of the optimized conditions established in our recent works in which TEC was conveniently exploited for *S*-disaccharide synthesis,¹² peptide and protein glycosylation,¹¹ and calixarene glycoclustering,¹³ we performed the photoreactions of a slight excess of thiols **1–3** (1.2 equiv) with alkenes **4** and **5** by irradiation at λ_{\max} 365 nm in the presence of 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DPAP) as the photoinitiator (0.1 equiv).

Reactions were carried out in dichloromethane as a solvent at room temperature in glass vials using a hand-held UVA generating apparatus. No care was taken to exclude air and moisture. Much to

our delight all reactions went to completion in 1 h as shown by the total disappearance of the alkene proton signal at $\delta = 5.7$ ppm in the ¹H NMR spectrum of the crude reaction mixture. Yields of isolated *S*-glycosyl amino acids **6–11** that are presented in Table 1 demonstrate the high efficiency of TEC in each reaction. Noteworthy is the fact that no epimerization occurred in all cases being the sugar disulfide the only observed side-product that arised from the thiyl radical homocoupling. Thus it appeared quite reasonable to conclude that the configuration of all asymmetric carbons of both reagents was preserved under the photochemical conditions and consequently assign the stereochemistry of isolated products as identical to that of the reactants.

In order to demonstrate the viability of the approach to *S*-glycopeptides by the use of the *S*-glycosyl amino acids thus prepared, the synthesis of a tripeptide was performed by solution phase chemistry (Scheme 2). To this end, the amino ester **6** was transformed into the free carboxylic acid by selective removal of *tert*-butyl group and the crude product was coupled with phenyl alaninate **12** under basic conditions (*i*-Pr₂EtN) and in the presence of (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) as a condensing agent. The *N*-Fmoc protected dipeptide **13** thus obtained was liberated of the Fmoc protective group by basic treatment and the free amine was condensed with *N*-Boc alanine **14** under basic conditions in the presence of PyBOP. The pure final tripeptide **15** featuring a pendant glucoside residue linked through a robust thioether linkage was isolated by chromatography in 75% yield. This compound turned out to be a single diastereomer by NMR analysis, thus indicating that all stereocenters of the reactants employed remained unaltered throughout the whole synthetic sequence.

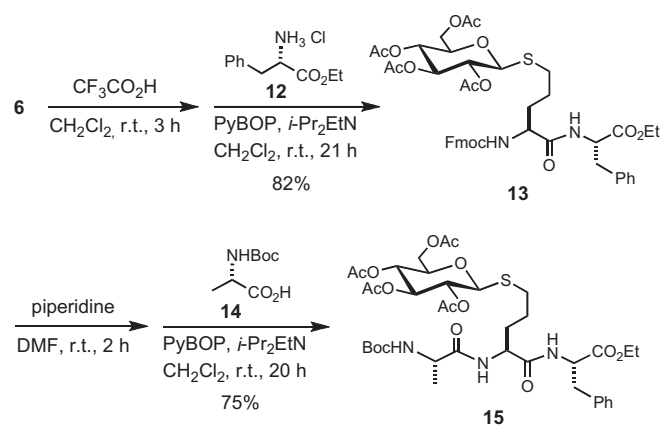
In a second instance we set out to develop a TEC-based post-synthetic approach to *S*-glycopeptides. To this end we envisaged introducing a chemical handle bearing an ene tag on a cysteine free sulfhydryl group and then performing the photoinduced TEC with

Table 1
Photoinduced reactions^a of sugar thiols **1–3** with alkenyl glycines **4** and **5**

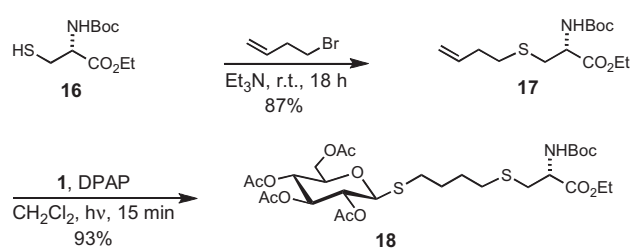
| Thiol | Alkene | Product (yield) ^b |
|----------|----------|------------------------------|
| 1 | 4 | 6 (73%) |
| 2 | 4 | 7 (53%) |
| 3 | 4 | 8 (80%) |
| 1 | 5 | 9 (90%) |
| 2 | 5 | 10 (89%) |
| 3 | 5 | 11 (89%) |

^a All reactions were carried out with 1.2 equiv of thiol and 0.1 equiv of DPAP in CH₂Cl₂ under irradiation at 365 nm for 30 min.

^b The products were isolated by column chromatography on silica gel.



Scheme 2.



Scheme 3.

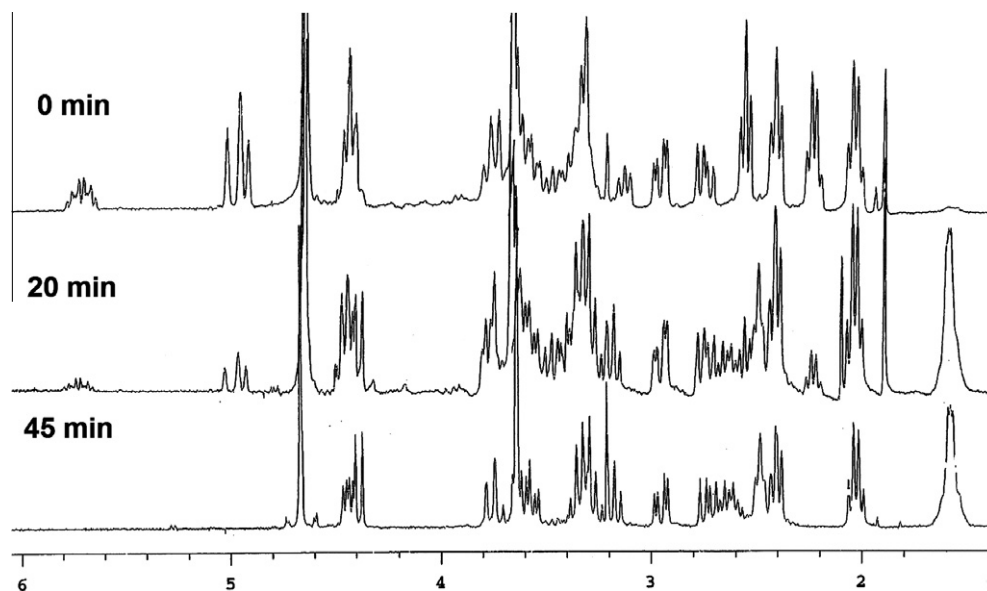
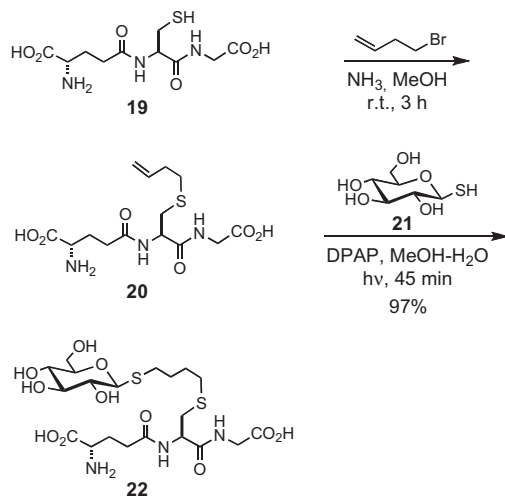


Figure 2. ^1H NMR spectra of the reaction mixture between **20** and **21** (Scheme 4) monitored at different times.



Scheme 4.

a glycosyl thiol. In a model study serving to validate this idea, we introduced a homoallyl chain in L-cysteine **16** by reaction with 4-bromo-1-butene in the presence of Et_3N . Then, the S-butenyl cysteine **17** thus formed was submitted to the photoinduced reaction (λ_{max} 365 nm) with glycosyl thiol **1** in the presence of DPAP (Scheme 3). The TEC reaction worked beautifully as it afforded in only 15 min irradiation the S-thioglycosylbutyl cysteine **18** in excellent isolated yield (93%). It has to be noted that the choice of the butenyl as a chemical handle was made after having carried out some experimentation with the use of the allyl group. In fact the photoinduced reaction of **1** with S-allyl cysteine gave the expected thioether in very low yield together with by-products derived from coupling of various thiyl radicals (see Fig. S1 in Supplementary data).

Encouraged by this result we extended the approach to the S-glycosylation of glutathione **19** (Scheme 4). The selective S-homoallylation of **19** by butenyl bromide in NH_3/MeOH proceeded readily and specifically due to the superior nucleophilicity of the free sulfhydryl group with respect to terminal amino group of glutamic acid.¹⁴ Thus, the S-homoallyl glutathione **20** formed in almost

quantitative yield. Then, this crude product was coupled with excess of unprotected sugar thiol **21** (1.2 equiv) under the above photoinduced conditions with the only change that a mixture of $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ was employed as the solvent.

The NMR spectrum of the reaction mixture recorded after 20 min irradiation revealed the presence of unreacted alkene **20** while this was completely consumed after 45 min (Fig. 2).

Thus, to our satisfaction, the target S-glycopeptide **22** was isolated by chromatography in 97% yield. It is noteworthy that the coupling of **20** with **21** gave **22** in similar yield upon exposure (8 h) to unfocused sunlight. This and our earlier finding¹² on the use of sunlight for performing TEC reactions, demonstrate the ability of this click process to proceed under very mild and benign conditions with the need of minor amounts of energy.

In summary, two routes have been paved to S-glycopeptides. One route consists of S-glycosyl amino acid synthesis from photoinduced addition of sugar thiols to alkenyl glycine followed by incorporation of the amino acid into a peptide. The second route, that is, specific for a cysteine containing peptide such as glutathione, involves peptide S-homoallylation followed by TEC with sugar thiol. Thus, extension of this process to larger peptides and proteins now becomes of interest. Finally, the observation that TEC can proceed under ambient processing conditions and upon sunlight irradiation, opens up the way for future applications particularly for bioconjugation.

Acknowledgments

We thank Dr. Stefano Gotta (MET Profiling Unit, Siena Biotech SpA, Italy) for the HRMS analyses.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.tetlet.2010.11.097.

References and notes

- (a) Marcaurelle, L. A.; Bertozzi, C. R. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1384–1390; (b) Dondoni, A.; Marra, A. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4395–4421; (c) Pachamuthu, K.; Schmidt, R. R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 160–187.
- For a list of references on recent syntheses of C-glycosyl amino acids, see: Barghash, R. F.; Massi, A.; Dondoni, A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3310–3319.

3. Rich, J. R.; Szpacenko, A.; Palcic, M. M.; Bundle, D. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 613–615.
4. (a) Käsbeck, L.; Kessler, H. *Liebigs Ann.* **1997**, 165–167; (b) Elofsson, M.; Walse, B.; Kihlberg, J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7613–7616.
5. Gerz, M.; Matter, H.; Kessler, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 269–271.
6. Bernardes, G. J. L.; Grayson, E. J.; Thompson, S.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; El Oualid, F.; Claridge, T. D. W.; Davis, B. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2244–2247.
7. Floyd, N.; Vijayakrishnan, B.; Koeppe, J. R.; Davis, B. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7798–7802.
8. For a preliminary report of these results see: Dondoni, A. *Polym. Prepr.* **2010**, *51*, 709–710.
9. For a brief commentary on the potential of this reaction in synthesis, see: Dondoni, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8995–8997.
10. Griesbaum, K. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 273–287.
11. Dondoni, A.; Massi, A.; Nanni, P.; Roda, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11444–11449.
12. Fiore, M.; Marra, A.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4422–4425.
13. Fiore, M.; Chambery, A.; Marra, A.; Dondoni, A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3910–3913.
14. Lo Conte, M.; Pacifico, S.; Chambery, A.; Marra, A.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4644–4647.

Photoinduced Addition of Glycosyl Thiols to Alkynyl Peptides: Use of Free-Radical Thiol–Yne Coupling for Post-Translational Double-Glycosylation of Peptides

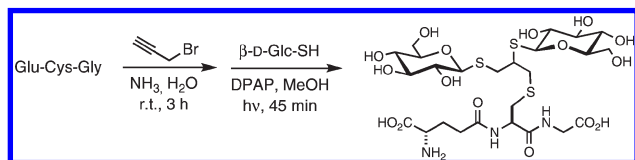
Mauro Lo Conte,[†] Salvatore Pacifico,[†] Angela Chambery,[‡] Alberto Marra,[†] and Alessandro Dondoni^{*†}

[†]Dipartimento di Chimica, Laboratorio di Chimica Organica, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, 44100 Ferrara, Italy,

and [‡]Dipartimento di Scienze della Vita, II Università di Napoli, Via Vivaldi 43, I-81100 Caserta, Italy

adn@unife.it

Received April 26, 2010



Double glycosylation of cysteine-containing peptides has been carried out by a one-pot two-step sequence comprising selective *S*-propargylation followed by photoinduced (λ_{\max} 365 nm) free-radical hydrothiolation with glycosyl thiols. Conditions were established for the sequential introduction of two different thiol residues such as a glycosyl and a biotinyl derivative.

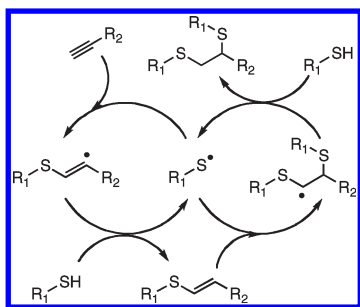
It is well established that protein glycosylation is a post-translational modification that profoundly affects protein folding, stability, immunogenicity, and biological properties and activities.¹ As native glycoproteins are isolated as mixtures of glycoforms, there is a pressing need for synthetic glycopeptides and glycoproteins with a well-defined structure and composition.² These compounds may serve as probes for studies in glycobiology as well as leads toward the development of pharmaceutical agents, such as carbo-

hydrate-based anticancer vaccines.^{3,4} Hence, the development of methods for peptide and protein glycosylation by efficient and site-specific ligation tools is at the forefront in biotechnology and proteomics. Synthetic glycopeptides and glycoproteins containing unnatural linkages between the carbohydrate and aglycone moieties have been reported in recent years.⁵ One of the most used of these unnatural linkages is the 1,4-disubstituted triazole ring^{3b,6,7} due to its robustness⁸ and ease of formation by the Huisgen Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition.⁹ Furthermore, *S*-linked glycoproteins, i.e. compounds featuring an *S*-glycosidic bond, have been prepared by Michael addition of glycosyl thiols to synthetic dehydroalanine-containing proteins¹⁰ and by phosphine-mediated dechalcogenation of a disulfide protein.¹¹ Very recently Davis and co-workers reported on free-radical addition of glycosyl thiols to genetically modified proteins in which an homoallylglycine tag was introduced.¹² Almost at the same time we reported a complementary method leading to *C*-linked glycopeptides and a glycoprotein, i.e. compounds featuring a *C*-glycosidic bond. To this end, we employed the photoinduced coupling between allyl *C*-glycosides and cysteine-containing peptides and the natural protein bovine serum albumine (BSA).¹³ Both Davis and our method demonstrated how the free-radical thiol–ene coupling can be exploited as a click ligation tool for bioconjugation. Indeed, while the potential of thiol–ene reaction is amply documented in polymer and material synthesis,^{14,15} its use as a metal-free ligation process in bioorganic chemistry is relatively scanty.¹⁶ Nevertheless, the assembly of biomolecules under mild and neutral reaction conditions through the specific formation of robust sulfide bridges is an attractive target due to convenient features of the C–S bond.¹⁷ In this context we would like to report here on the application of a sister reaction to the thiol–ene, that is the radical-mediated hydrothiolation of terminal alkyne (thiol–yne process). This reaction, whose

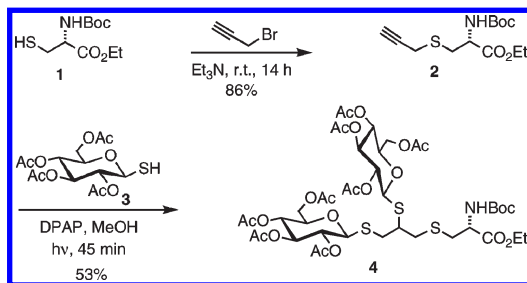
- (1) (a) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130. (b) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720. (c) Seitz, O. *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214–246. (d) *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Hart, G. W., Marth, J., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1999.
- (2) (a) Hang, H. C.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727–736. (b) Davis, B. G. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579–601. (c) Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4219–4225. (d) Hackenberger, C. P. R.; Schwarzer, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074. (e) Gamblin, D. P.; Scanlan, E. M.; Davis, B. G. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131–163. (f) Kent, S. B. H. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338–351. (g) Davis, B. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4674–4678. (h) Payne, R. J.; Wong, C.-H. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 21–43.
- (3) (a) Danishefsky, S. J.; Allen, J. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 836–863. (b) Wan, Q.; Chen, J.; Chen, G.; Danishefsky, S. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8244–8249.
- (4) Buskas, T.; Thompson, P.; Boons, G.-J. *Chem. Commun.* **2009**, 5335–5349.

- (5) (a) Specker, D.; Wittmann, V. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *267*, 65–107. (b) Nicotra, F.; Cipolla, L.; Peri, F.; La Ferla, B.; Redaelli, C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2007**, *61*, 353–398.
- (6) (a) van Kasteren, S. I.; Kramer, H. B.; Jensen, H. H.; Campbell, S. J.; Kirkpatrick, J.; Oldham, N. J.; Anthony, D. C.; Davis, B. G. *Nature* **2007**, *446*, 1105–1109. (b) Gamblin, D. P.; van Kasteren, S. I.; Chalker, J. M.; Davis, B. G. *FEBS J.* **2008**, *275*, 1949–1959.
- (7) Lee, D. J.; Mandal, K.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Kent, S. B. H. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5270–5273 and references cited therein.
- (8) Dondoni, A. *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 700–708.
- (9) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- (10) (a) Wang, J.; Schiller, S. M.; Schultz, P. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6849–6851. (b) Bernardes, G. J. L.; Calker, J. M.; Errey, J. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052–5053.
- (11) Bernardes, G. J. L.; Grayson, E. J.; Thompson, S.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; El Oualid, F.; Claridge, T. D. W.; Davis, B. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2244–2247.
- (12) Floyd, N.; Vijayakrishnan, B.; Koeppe, J. R.; Davis, B. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7798–7802.
- (13) Dondoni, A.; Massi, A.; Nanni, P.; Roda, A. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 11444–11449.
- (14) (a) Lowe, A. B. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17–36. (b) Kade, M. J.; Burke, D. J.; Hawker, C. J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 743–750.
- (15) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540–1573.
- (16) Dondoni, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8995–8997.
- (17) Fiore, M.; Marra, A.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4422–4425.

SCHEME 1



SCHEME 2



discovery dates back to the mid-1900s,¹⁸ serves to introduce two thiol fragments across a carbon–carbon triple bond via a multistep mechanism as depicted in Scheme 1.

The first, slower, step involves the anti-Markovnikov-like addition of a thiyl radical to the C≡C bond to yield an intermediate vinyl thioether that is capable of undergoing a second, faster, thiyl radical addition, a formal thiol–ene reaction, leading to the dithioether with exclusive 1,2-addition mode.¹⁹ Notably, the thiol–yne reaction can be photo-initiated in the UV–visible range (254–470 nm) and proceeds at room temperature with high efficiency in the presence of oxygen/water. Finally, the tolerance to a wide range of functional groups and orthogonality to various types of chemistry make this reaction an ideal and broadly applicable tool for multiple bioconjugation. However, while recent work highlighted thiol–yne chemistry as a valuable tool in polymer and material science,²⁰ its use in organic synthesis is limited to a few cases such as for example the synthesis of small vinyl sulfides and dithioether adducts.²¹ Thus, the potential of this process as a chemoselective and bioorthogonal ligation tool²² for multiple hydrothiolation of biologically relevant molecules remains to be established. Considering the above attributes, we envisioned the fabrication of dually glycosylated peptides using the photoinduced thiol–yne reaction between glycosyl thiols and alkynyl peptides. It is conceivable that the peptide double glycosylation can affect much more substantially than monoglycosylation the peptide structure and biological activity. Thus, at first a method for introducing into peptides a chemical handle

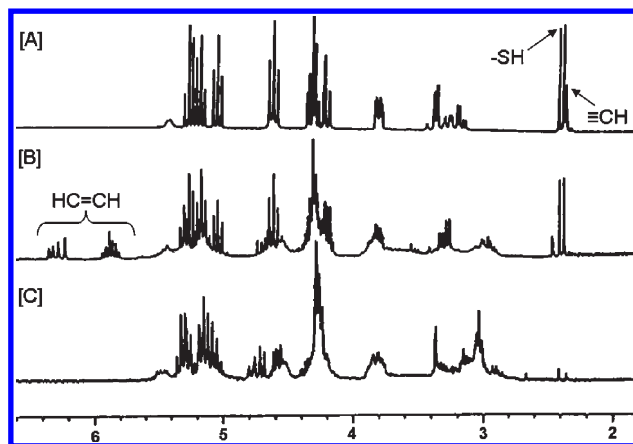


FIGURE 1. Partial ¹H NMR spectra of the reaction mixtures between *S*-propargyl cysteine **2** and glucosyl thiol **3** (4 equiv): initial reaction mixture (spectrum A); after 20 min irradiation at λ_{\max} 365 nm (spectrum B); after 45 min irradiation at λ_{\max} 365 nm (spectrum C).

bearing a propargylic tag was established by exploiting the unique reactivity of the cysteine side chain thiol.²³ As shown in Scheme 2 the model reaction of protected cysteine **1** with a slight excess of propargyl bromide (1.2 equiv) and triethylamine (2 equiv) in CH₂Cl₂ at room temperature afforded the *S*-propargyl derivative **2** in 86% yield.

Then, the photoinduced reaction of **2** with the peracetylated glucosyl thiol **3** was examined. Taking advantage of the expertise acquired from our recent work on thiol–ene coupling,¹³ the reaction was carried out in methanol as the solvent by irradiation at λ_{\max} 365 nm in the presence (10 mol %) of 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DPAP) as the sensitizer. No effort was made to exclude air and moisture. After some experimentation, the use of excess thiol **3** (4 equiv) with respect to alkyne **2** was optimized. Within 45 min at room temperature, NMR analysis of the reaction mixture showed the complete consumption of starting alkyne and vinyl thioether intermediate as judged by the absence of signals at 2.26 (C≡C–H) and 5.75–6.30 ppm (HC=CH) (Figure 1). Also the doublet at 2.4 ppm corresponding to the thiol proton was not any more detectable as the excess of this reagent was transformed into the corresponding disulfide by homocoupling. The glycosylated bithioether **4** was isolated by chromatography (53%) as a ca. 1:1 mixture of diastereomers.

The glycosylation of small peptides by the strategy outlined above was examined by using the natural tripeptide Glu-Cys-Glc (glutathione, GSH, **5**) and the synthetic tetrapeptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC, **6**) as substrates. The main difference between **5** and **6** was that the former contained an internal cysteine residue while the latter was a *C*-terminal cysteine derivative. A one-pot two-step sequence comprising peptide alkylation and thiol–yne coupling was planned in order to avoid intermediate isolation. Notably, the use of unprotected peptides GSH **5** and RGDC **6** allowed the alkylation to be performed under very mild conditions, that is with propargyl bromide (1.1 equiv) and

(18) Bader, H.; Cross, L. C.; Heilbron, I.; Jones, E. R. H. *J. Chem. Soc.* **1949**, 619–623.

(19) Yu, B.; Chan, J. W.; Hoyle, C. E.; Lowe, A. B. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2009**, *47*, 3544–3557.

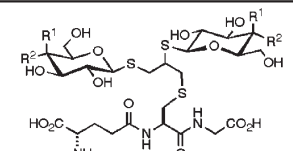

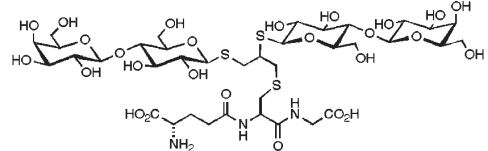
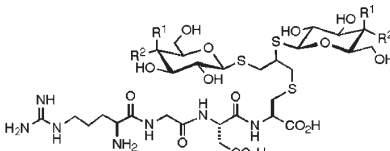

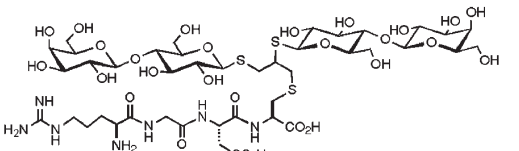
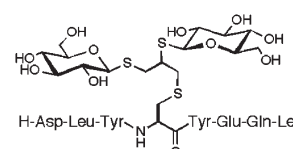
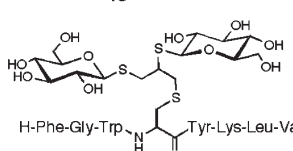
(20) Lowe, A. B.; Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 4745–4750.

(21) Benati, L.; Capella, L.; Montevocchi, P. C.; Spagnolo, P. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7941–7946.

(22) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.

(23) (a) Chalker, J. M.; Lin, Y. A.; Boutureira, O.; Davis, B. G. *Chem. Commun.* **2009**, 3714–3716. (b) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Lin, Y. A.; Davis, B. G. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 630–640. (c) Hong, V.; Kislukhin, A. A.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9986–9994.

TABLE 1. Synthesis of Bis-Glycosylated Peptides via One-Pot Propargylation and Photoinduced Thiol–Yne Coupling

| Entry | Peptide | Sugar Thiol | Product | Yield ^a (%) |
|-------|---|------------------------|---|------------------------|
| 1 | Glu-Cys-Gly (5) | β -D-Glc-SH (9) |  | 77 (>95) ^b |
| 2 | Glu-Cys-Gly (5) | β -D-Gal-SH (10) |  | 74 (>95) ^b |
| 3 | Glu-Cys-Gly (5) | β -D-Lac-SH (11) |  | 51 (>95) ^b |
| 4 | Arg-Gly-Asp-Cys (6) | β -D-Glc-SH (9) |  | 36 (>95) ^b |
| 5 | Arg-Gly-Asp-Cys (6) | β -D-Gal-SH (10) |  | 27 (>95) ^b |
| 6 | Arg-Gly-Asp-Cys (6) | β -D-Lac-SH (11) |  | 55 (>95) ^b |
| 7 | H-Asp-Leu-Tyr-Cys-Tyr-Glu-Gln-Leu-NH ₂ (7) | β -D-Glc-SH (9) |  | (>95) ^b |
| 8 | H-Phe-Gly-Trp-Cys-Tyr-Lys-Leu-Val-OH (8) | β -D-Glc-SH (9) |  | (>95) ^b |

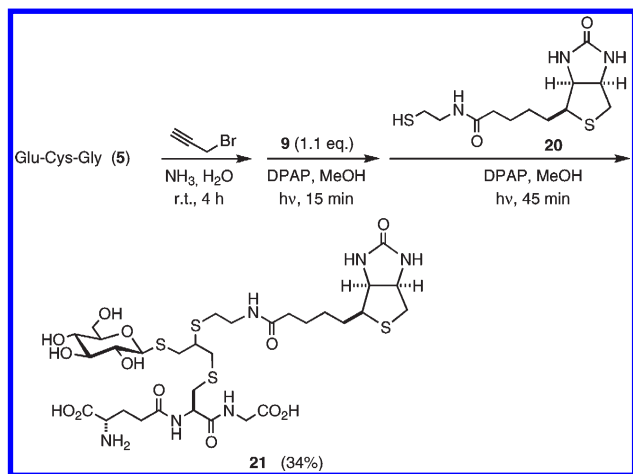
^aIsolated yields after chromatography on Sephadex LH20 column. ^bConversion determined from the reacted alkyne as estimated by ¹H NMR analysis of the crude reaction mixture.

NH₃ in water at 0 °C for 1 h and then at room temperature (ca. 22 °C) for 2 h. From the NMR and MS spectra of the crude reaction mixtures the purity of the alkynyl peptides thus formed was estimated to be 80–85%. Hence, the photoinduced double hydrothiolation was carried out by using 4 equiv of the unprotected glucosyl thiol¹² **9** under the conditions outlined above with the only change being that the solvent was a 1:1 H₂O/MeOH mixture. We were pleased to observe that thiol–yne reactions took place with great efficiency with conversion >95% into the corresponding *S*-glucosyl peptides **12** and **15** as determined by ¹H NMR analysis of the crude reaction mixtures (Table 1). The same approach was carried out with galactosyl thiol¹² **10** and lactosyl thiol¹² **11** to give the corresponding *S*-glycopeptides

13, **14**, **16**, and **17**. All glycopeptides **12**–**17** were isolated by chromatography on a Sephadex LH20 column as ca. 1:1 mixtures of diastereomers as established by ¹³C NMR analysis (multiple signals for anomeric carbons at ca. δ 85 ppm). Unfortunately, attempts to separate the isomers were unsuccessful. It has to be noted that isolated yields quoted in Table 1 largely reflect difficulties handling amphiphilic products.

The scope of the one-pot two-step glycosylation strategy was broadened by using higher peptides such as the synthetic cysteine-containing octapeptides **7** and **8** (Table 1). Adopting the above procedure and conditions employed for propargylation of GSH **5** and RGDC **6** followed by thiol–yne coupling with thiol **9**, these peptides were transformed into

SCHEME 3



the corresponding *S*-glycosides **18** and **19**. In each case almost total conversion was registered by NMR analysis while chromatography over the Sephadex LH20 column allowed for isolating small samples of pure compounds for analytical purposes. That the propargylation and subsequent glycosylation involved only the peptide cysteine residue was confirmed by ESI-QTOF MS/MS analysis of **15** and **19**. The clear fragmentation pattern revealed both the *y* and *b* fragment ions, easily allowing the sequence deconvolution (see Figures S1 and S2 in the Supporting Information). Within the derived sequence, the Cys* assignment corresponded to the cysteine residue derivatized with the glycosylated thioether linker. This is noteworthy because the peptides **6** and **8** contained a basic arginine and lysine residue, respectively, and therefore there was the possibility of nonselective propargylation. Evidently this event did not occur due to the superior nucleophilicity of the cysteine sulfhydryl group with respect to the basic nitrogen atoms of other amino acid residues.

Having observed in earlier coupling experiments of alkynyl cysteine **2** with sugar thiol **3** that the use of 2–2.5 equiv of the latter afforded a considerable amount of vinyl thioether after short irradiation time, it appeared that the thiyl radical addition to the internal alkene was slow presumably due to steric considerations. In contrast to the mechanism established for the thiol–yne coupling in model systems,¹⁹ the kinetics of the above reaction suggested the possibility to perform the sequential hydrothiolation of alkynyl peptides by two thiyl radicals generated from different thiols. The feasibility of this approach was demonstrated by using GSH **5** as the starting material. Thus, a solution of crude *S*-propargyl GSH in MeOH was treated with glucosyl thiol **9** (1.1 equiv) and sensitizer DPAP (0.1 equiv), and the mixture was irradiated at λ_{\max} 365 nm for 15 min (Scheme 3). The ¹H NMR spectrum showed the total consumption of the alkynyl derivative. Then, a solution of biotin thiol **20** (2 equiv) in MeOH was added and the mixture was again irradiated at λ_{\max} 365 nm for 45 min. The NMR spectrum of the crude reaction mixture showed the presence of vinyl proton signals at ca. 6.3 and ca. 5.6 ppm, which corresponded to 5–10% of unreacted glycosylated vinylthioether intermediate. Nevertheless, chromatography over the Sephadex LH20 column

allowed the dithioether **21** to be isolated in 34% yield. The same procedure was employed for the preparation of the regioisomer of **21** with use of a reversal order of hydrothiolation, i.e. biotinylation first and then glycosylation (see the Supporting Information). As biotin is an important biological tag²⁴ that is typically conjugated to peptides and proteins via primary amines (e.g., lysines), this method constitutes an alternative approach that can be employed for the selective biotin labeling of cysteine-containing compounds.

In summary, we have demonstrated the selective propargylation of cysteine-containing peptides followed by coupling with glycosyl thiols as a one-pot two-step platform for post-translational dual glycosylation of peptides. Single glycosylation and conjugation with biotin also have been performed. Although demonstrated here for peptides, this approach is certainly extendable to proteins exposing a cysteine SH. As a support to this expectation are the mild reaction conditions under which the photoinduced thiol–yne coupling takes place (water as a solvent, room temperature, no metal-based catalyst) as well as irradiation at wavelengths compatible with protein stability. The lack of diastereoselectivity observed with peptides can be inconsequential when only one protein diastereomer interacts stereospecifically with enzyme or receptors.^{10b} Furthermore, the relatively low abundance of natural proteins displaying cysteine residues should be compensated by the approach to proteins incorporating a single cysteine via site-synthetic mutagenesis. Research on these topics is underway in our group.

Experimental Section

Glycopeptide 12. To a cooled (0 °C), stirred solution of glutathione **5** (13 mg, 0.042 mmol) in MeOH (0.25 mL) were added NH₄OH (0.25 mL of a 28% solution in H₂O) and propargyl bromide (3.3 μ L, 0.046 mmol). The solution was stirred at 0 °C for 1 h, then warmed to rt, stirred for an additional 2 h, and then concentrated. A stirred solution of the crude product, glucosyl thiol **9** (33 mg, 0.168 mmol), and DPAP (4 mg, 0.017 mmol) in 2:1 MeOH–H₂O (1.2 mL) was irradiated (λ_{\max} 365 nm) at rt for 45 min and then concentrated. The residue was eluted from a column of Sephadex LH20 with MeOH to give **12** (24 mg, 77%) as an amorphous solid. ¹H NMR (300 MHz, D₂O) selected data: δ 4.46 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 9.5 Hz, H-1 Glc), 3.70 (s, 2H), 2.79 (ddd, 1H, J = 5.0, 8.6, 14.2 Hz), 2.44 and 2.38 (2 ddd, 2H, J = 7.5, 7.5, 15.0 Hz), 2.03 (ddd, 2H, J = 7.0, 7.5, 7.5 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ 175.4 (C), 174.8 (C), 173.8 (C), 171.9 (C), 86.4 (CH), 85.1 (CH), 85.0 (CH), 84.6 (CH), 79.8 (CH), 77.1 (CH), 72.4 (CH), 72.2 (CH), 69.4 (CH), 60.8 (CH₂), 54.0 (CH), 53.1 (CH), 48.8 (CH), 45.6 (CH), 44.9 (CH), 42.8 (CH₂), 36.0 (CH₂), 35.8 (CH₂), 35.2 (CH₂), 34.1 (CH₂), 33.5 (CH₂), 31.3 (CH₂), 26.1 (CH₂). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for C₂₅H₄₄N₃O₁₆S₃ (M + H)⁺ 738.1884, found 738.1874.

Acknowledgment. We thank Dr. Claudio Trapella (UFPeptides s.r.l., Ferrara, Italy) for a generous gift of peptides **7** and **8**.

Supporting Information Available: Experimental procedures, physical data, ESI-QTOF MS/MS analyses, and copies of the NMR spectra of the new compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

(24) (a) Chapman-Smith, A.; Cronan, J. E. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 359–363. (b) Yeo, D. S. Y.; Srinivasan, R.; Chen, G. Y. J.; Yao, S. Q. *Chem.—Eur. J.* **2004**, *10*, 4664–4672.



α -Diketones as acyl anion equivalents: a non-enzymatic thiamine-promoted route to aldehyde–ketone coupling in PEG₄₀₀ as recyclable medium

Olga Bortolini^a, Giancarlo Fantin^{a,*}, Marco Fogagnolo^a, Pier Paolo Giovannini^b, Valentina Venturi^b, Salvatore Pacifico^a, Alessandro Massi^{a,*}

^aDipartimento di Chimica, Laboratorio di Chimica Organica, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, I-44121 Ferrara, Italy

^bDipartimento di Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara, Corso Ercole I D'Este, 32, I-44121 Ferrara, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2011

Received in revised form 2 August 2011

Accepted 22 August 2011

Available online 27 August 2011

Keywords:

α -Diketones

α -Hydroxyketones

Polyethylene glycol

Thiazolium salts

N-Heterocyclic carbenes

ABSTRACT

By mimicking the peculiar behavior of thiamine diphosphate-dependent acetylacetoin synthase, it has been demonstrated that thiamine hydrochloride **2a** and its simple analogue thiazolium salt **2b** are able to activate α -diketones as acyl anion equivalents in nucleophilic acylations, such as the homo-coupling of α -diketones and the hitherto unreported cross-coupling between α -diketones and α -ketoesters. These carboligation reactions were optimized under stoichiometric (**2a**) and catalytic conditions (**2b**) by using eco-friendly PEG₄₀₀ as the reaction medium, thus allowing both solvent and thiazolium salt recycling.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymes, such as pyruvate decarboxylase (PDC), benzaldehyde lyase (BAL), and benzoylformate decarboxylase (BDF), are a group of biocatalysts involved in a variety of reactions including the formation and cleavage of carbon–carbon bonds.¹ These enzymes have in common the capability to generate an ‘active aldehyde’ species,² that is, a ThDP-bound carbanion–enamine intermediate, which reacts with an aldehyde acceptor to form a α -hydroxyketone in an acyloin-type condensation.² Within this area of research, a recent study from our group demonstrated that 1,2-diketones may serve as acyl anion equivalents when ThDP-dependent acetylacetoin synthase (AAS) is utilized as catalyst in the homo-coupling of 1,2-diketones to form chiral α -hydroxyketones (Fig. 1).^{3,4} This finding triggered us to investigate a possible biomimetic route, reminiscent of ThDP activity,⁵ to nucleophilic acylations involving α -diketones as acyl anion donors. By considering the peculiar mechanism of action of AAS,³ it was envisaged that the sole thiamine coenzyme (pre-catalyst) in the presence of a suitable base could display the same ability to activate α -diketones as acyl anion sources.⁶ Hence, the optimization of an organocatalytic (racemic) version of the

already disclosed enzymatic homo-coupling of 1,2-diketones³ (virtually an intermolecular aldehyde–ketone coupling) was initially considered. Subsequently, the more challenging thiamine-catalyzed direct cross-coupling reaction between diketone donors and α -ketoester acceptors was also investigated to explore the potential of the proposed carboligation methodology (Fig. 1). Indeed, while significant advances have been recently made in *N*-heterocyclic carbene (NHC) catalysis⁷ to promote intramolecular aldehyde–ketone couplings,⁸ examples of the non-enzymatic intermolecular variant are limited to the study by Enders and Henseler,⁹ which described the cross-coupling between aldehydes and

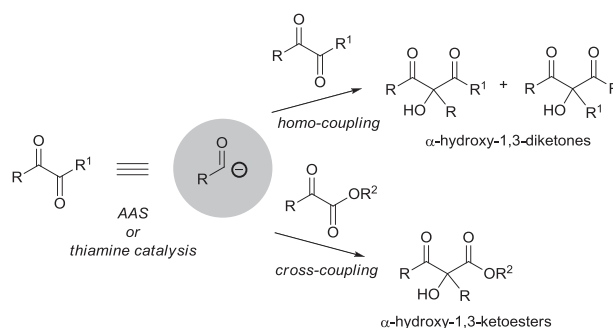


Fig. 1. Synthesis of α -hydroxy-1,3-diketones and α -hydroxy-1,3-ketoesters using α -diketones as acyl anion equivalents.

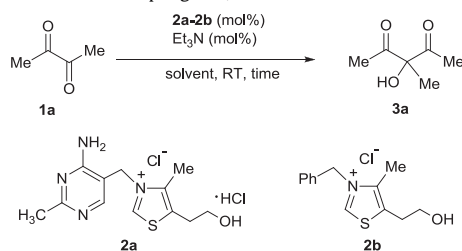
* Corresponding authors. E-mail addresses: giancarlo.fantin@unife.it (G. Fantin), mssl@unife.it (A. Massi).

highly electrophilic trifluoromethyl ketones using a bicyclic thiazolium salt as the pre-catalyst.¹⁰

2. Results and discussion

In analogy with our previous enzymatic study,³ we initially investigated the activity of the thiamine hydrochloride **2a**-Et₃N couple in water using 2,3-butanedione (biacetyl) **1a** as donor–acceptor substrate (Table 1, entry 1). Triethylamine was chosen as the base to reproduce the basic strength of active sites in the catalytic pocket of ThDP-dependent enzymes.¹¹ Against the almost complete consumption of **1a** as determined by TLC and ¹H NMR analyses, only small amounts of the expected product **3a** survived to these conditions, in agreement with an old report of Mizuhara and Handler⁶ asserting that biacetyl **1a**, in aqueous alkaline medium and in the presence of thiamine, is cleaved to acetaldehyde and 2-(1-hydroxyethyl)-thiamine. On the other hand, the α -hydroxy-1,3-diketone **3a** product has been reported to be unstable under basic and thermal conditions due to a complex sequence of equilibria involving the corresponding oxy-anions.¹² These multiple rearrangements are also active in the presence of mild bases as sodium bicarbonate. Our findings, however, suggest that the instability of **3**-like products is related not only to the presence of a base but, and more importantly, to the concomitant use of an aqueous medium, as demonstrated by the results found for the condensation of **1a** promoted by the thiamine hydrochloride **2a**-Et₃N couple in EtOH (entry 2). In this case, the expected product **3a** was in fact obtained in 75% isolated yield. It is worth stressing that crucial for a successful work-up was the purification of **3a** by distillation. Encouraged by these promising results, we decided to widen the selection of protic solvents with polyethylene glycol (PEG₄₀₀), a non-toxic and eco-friendly medium that should allow for both solvent and pre-catalyst recycling.¹³ Hence, when the mixture of **1a** (0.5 M), thiamine hydrochloride **2a** (1 equiv), and Et₃N (2 equiv) in PEG₄₀₀ was stirred for 3 h, the target α -hydroxyketone **3a** was recovered in almost quantitative yield (95%) after extraction with Et₂O and subsequent product distillation (entry 3). Rewardingly, the PEG solution containing the thiamine promoter could be reloaded with fresh diketone **1a** and Et₃N to afford **3a** in 90% isolated yield (entry 4). Additional recycles (up to five) resulted equally effective with minimal loss of product yield. No change in the reaction outcome occurred on moving from stoichiometric to

Table 1
Optimization of the homo-coupling of 2,3-butanedione **1a**^a



| Entry | Catalyst (mol %) | Solvent | Time (h) | 3a Yield (%) ^b |
|------------------|------------------|--------------------|----------|----------------------------------|
| 1 ^c | 2a (100) | H ₂ O | 5 | <5 |
| 2 ^c | 2a (100) | EtOH | 5 | 75 |
| 3 ^c | 2a (100) | PEG ₄₀₀ | 3 | 95 |
| 4 ^{c,d} | 2a (100) | PEG ₄₀₀ | 3 | 90 |
| 5 ^e | 2a (20) | PEG ₄₀₀ | 48 | 45 |
| 6 ^e | 2b (20) | PEG ₄₀₀ | 12 | 95 |
| 7 ^{d,e} | 2b (20) | PEG ₄₀₀ | 12 | 91 |

^a Reactions performed with 2.0 mmol of **1a** (0.5 M).

^b Isolated yield.

^c Et₃N: 200 mol %.

^d Reaction performed with recycled **2** and PEG₄₀₀ after addition of fresh Et₃N.

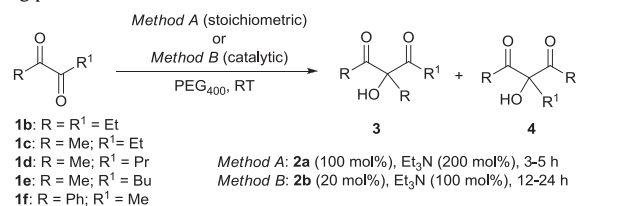
^e Et₃N: 100 mol %.

catalytic conditions (**2a**, 20 mol %), although a modest conversion (45%) was achieved within a reasonable reaction time (48 h, entry 5). Fortunately, the use of the commercially available thiazolium salt **2b**, that is, a simplified analogue of thiamine **2a**, greatly increased the reaction rate and **3a** was recovered in almost quantitative yield after 12 h stirring and standard work-up (entry 6). The recyclability of **2b** in PEG₄₀₀ was finally demonstrated as before (entry 7).

We then examined the tolerance of the procedure for different donor–acceptor substrates with stoichiometric thiamine **2a** (Method A, Table 2) and found that 3,4-hexanedione **1b** was successfully converted to the expected product **3b** (88%, entry 1). When the protocol was extended to the unsymmetrically substituted dialkyl α -diketones **1c–e** (entries 2–4), it was observed that acetyl anion transfer (MeCO⁻) was predominant over migration of its higher carbanion counterparts, in full agreement with the

Table 2

Short study on the applicability of the optimized stoichiometric and catalytic homo-coupling procedures to selected α -diketones^a



| Entry | α -Diketone | α -Hydroxy-1,3-diketone (Method A (%); Method B (%)) ^b | |
|-------|--------------------|---|--|
| 1 | | 3b (88%; 82%) | |
| 2 | | 3c (71%; 74%) ^c | 4c (11%; 7%) ^{c,d} |
| 3 | | 3d (65%; 61%) ^e | 4d (24%; 27%) ^{d,e} |
| 4 | | 3e (67%; 63%) ^f | 4e (17%; 19%) ^{d,f} |
| 5 | | 5f (78%; 75%) | |

^a Reactions performed with 2.0 mmol of diketone (0.5 M).

^b Isolated yield.

^c Lower amounts (<10%) of coupling products arising from propionyl anion transfer were also detected (GC–MS and ¹H NMR analyses).

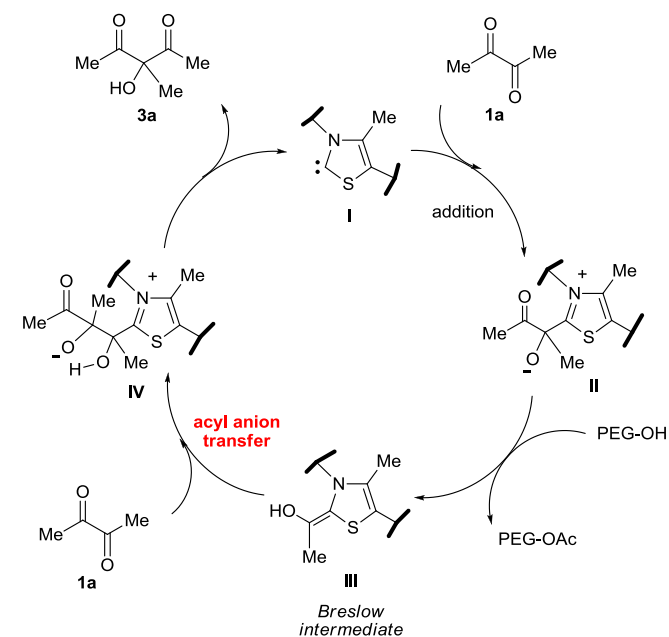
^d Yield determined by ¹H NMR analysis of the crude reaction mixture using bromoform as internal standard.

^e Lower amounts (<10%) of coupling products arising from butyryl anion transfer were also detected.

^f Lower amounts (<10%) of coupling products arising from pentanoyl anion transfer were also detected.

reactivity pertaining to the AAS enzymatic system.³ Accordingly, the corresponding α -hydroxyketones **3c–e** (65–71%) were isolated together with lower amounts (11–24%) of the isomeric derivatives **4c–e** (entries 2–4). As previously observed, the results obtained in the above transformations with catalytic **2b** (Method B) closely paralleled those detected with stoichiometric thiazolium **2a** although with a longer reaction time (12–24 h).

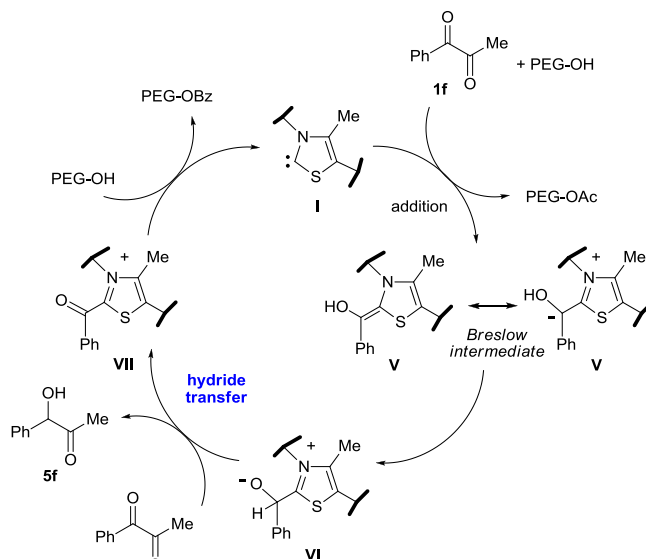
The mechanism that accounts for all these findings may invoke the formation of the intermediate **II** resulting from the addition of the thiazolin-2-ylidene **I** to the α -diketone **1**, and its evolution to the Breslow intermediate **III** by attack of the PEG solvent to the carbonyl of **II**. Subsequent addition of the Breslow intermediate to the acceptor, that is, a second molecule of α -diketone **1**, leads to the formation of the product **3** and regeneration of the catalyst **I** (Scheme 1).¹⁴ It is worth noting that formation of the key intermediate **III** by the above postulated mechanism seems to be confirmed by the isolation of 1 equiv of acetylated PEG solvent (PEG-OAc) from the crude reaction mixture.¹⁵



Scheme 1. Proposed reaction pathway for the homo-coupling of alkyl diketones **1a–e** (substrate **1a** as representative example).

The overall reactivity of the thiazolium-promoted homo-coupling of α -diketones **1** can be fully explained by Scheme 1, except when the formation of a phenyl-substituted Breslow intermediate of type **V** occurs (Scheme 2). This is demonstrated by the results observed in the homo-coupling of 1-phenyl-1,2-propanedione **1f** (Table 2, entry 5). In that case, the fate of intermediate **V** seems to be different with generation, through prototropic rearrangement to **VI**,¹⁶ of a hydride equivalent, that is, transferred to the acceptor **1f**. Once the α -diketone undergoes reduction to **5f**,¹⁷ the thiazolin-2-ylidene **I** is regenerated by transfer of the benzoyl group from the acyl thiazolium intermediate **VII** to PEG (Scheme 2).^{15,18}

In a next set of experiments we investigated the donor–acceptor attitudes of α -ketoesters toward the thiazolium–Et₃N system. In a control experiment (Table 3, entry 1), ethyl pyruvate **6** was not reactive under the previously optimized homo-coupling conditions (Methods A and B). This finding, however, may be exploited to perform cross-coupling reactions between α -ketoester acceptors and a suitable acyl anion donor, such as **1a**. To explore this hitherto unreported carbonylation reaction, the commercially available α -ketoester esters **6–9** (3 equiv) were coupled with **1a** under optimal stoichiometric and catalytic conditions (entries 2–5). Gratifyingly,



Scheme 2. Proposed reaction pathway for the reduction of **1f**.

Table 3

Homo-coupling of ethyl pyruvate **6** and cross-couplings between **1a** and selected α -ketoesters **6–9**^a

| $\text{Me-C(=O)-R}^1 + \text{R}^2\text{-C(=O)-OR}^3 \xrightarrow[\text{PEG}_{400}, \text{RT}]{\text{Method A or Method B}} \alpha\text{-hydroxy-1,3-ketoesters } \mathbf{10-13}$ | | | |
|--|-----------|----------|---|
| <p>1a: R¹ = Me 6: R¹ = OEt</p> | | | |
| <p>Method A: 2a (100 mol%), Et₃N (200 mol%), 3–8 h Method B: 2b (20 mol%), Et₃N (100 mol%), 12–48 h</p> | | | |
| Entry | Donor | Acceptor | α -Hydroxy-1,3-ketoesters (Method A(%); Method B (%)) ^b |
| 1 | 6 | | No reaction |
| 2 | 1a | | 10 (55%; 52%) |
| 3 | 1a | | 11 (42%; 51%) |
| 4 | 1a | | 12 (50%; 58%) |
| 5 | 1a | | 13 (51%; 48%) |

^a All reactions performed with 3 equiv of α -ketoester acceptor.

^b Isolated yield.

the corresponding α -hydroxy-1,3-ketoesters **10–13** were obtained in fair yields (around 50%), thus demonstrating the feasibility of this approach. While the side homo-coupling reaction of **1a** could not be suppressed under these conditions, the isolation of the target products **10–13** was facilitated by the volatile nature of the homo-coupling by-product **3a**.

3. Conclusion

In summary, we have demonstrated that 1,2-diketones may serve as acyl anion equivalents in thiamine-promoted α -diketone homo-couplings in analogy with a previously reported ThDP-dependent enzymatic system. In addition, a novel substrate combination, that is, α -diketone to α -ketoester, has been investigated by using the same thiamine promoter. The setup of a catalytic procedure for the above transformations has also been optimized by employing a more active analogue of thiamine as the pre-catalyst. Polyethylene glycol (PEG₄₀₀) has been shown to be an effective and reusable reaction medium for the above transformations. Further investigations of the generality of the disclosed mode of acyl anion generation and the development of NHC-promoted asymmetric variants are currently underway in our laboratories.

4. Experimental section

4.1. General remarks

Reactions were monitored by TLC on silica gel 60 F₂₅₄ with detection by charring with phosphomolybdic acid. Flash column chromatography was performed on silica gel 60 (230–400 mesh). Bulb-to-bulb distillation was performed with a Büchi Glass Oven B-580 apparatus. ¹H (300 MHz) and ¹³C (75 MHz) NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions at room temperature. Peaks assignments were aided by ¹H–¹H COSY and gradient-HMQC experiments. GC–MS spectra were recorded using a Varian 4000 GC/MS/MS system equipped with a fused capillary column Megadex 5 (25m×0.25 mm) containing dimethyl-*n*-pentyl- β -cyclodextrin on OV 1701. Analyses were carried out with a gradient of 1.5 °C/min (from 80 °C up to 200 °C); retention times (*t_R*) are given in minutes. ESI MS analyses were performed in positive ion mode with samples dissolved in 10 mM solution of ammonium formate in 1:1 MeCN/H₂O. For accurate mass measurements the compounds were analyzed in positive ion mode by electrospray ionization (ESI) hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF MS) fitted with a Z-spray electrospray ion source (Waters, Manchester, UK). The capillary source voltage and the cone voltage were set at 3200 V and 45 V, respectively; the source temperature was kept at 120 °C; nitrogen was used as a drying gas at a flow rate of ca. 80 L/h. The time-of-flight analyzer was externally calibrated with NaI from *m/z* 300 to 2000 to yield accuracy near to 5 ppm. Accurate mass data were collected by directly infusing samples (10 pmol/ μ L in 1:1 MeCN/H₂O+0.1% ammonium formate) into the system at a flow rate of 5 μ L/min. Spectroscopic data of compounds **3a**,^{3,19} **3b**,^{3,20} **3c,d**,^{3,21} **3e**,²¹ **4c**,³ **4d**,³ **5f**,²² **10**,²³ and **13**²⁴ were identical to those reported in the literature. Copies of the ¹H spectra of **3a–e**, **4d**, **5f**, **10**, and **13** are reported as purity and identity documentation.

4.2. Optimized procedure for the homo-coupling of α -diketones **1a–e**

Method A. To a vigorously stirred mixture of thiamine hydrochloride **2a** (337 mg, 1.00 mmol), Et₃N (279 μ L, 2.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) α -diketone **1** (2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature until TLC analysis revealed the disappearance of the starting α -diketone (3–5 h). The reaction medium was then diluted with Et₂O (5 mL), vigorously

stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice to obtain the crude α -hydroxyketone **3** in Et₂O, whereas the mother liquor (PEG₄₀₀-thiamine hydrochloride **2a**) was kept aside for further runs. The extraction solvent was then removed under a nitrogen stream and the residue containing the target α -hydroxyketone purified by either bulb-to-bulb distillation (compounds **3a** and **3b**) or flash chromatography (compounds **3c–e**). Product yields are reported in the next paragraphs for Method A.

Method B. To a vigorously stirred mixture of 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **2b** (54 mg, 0.20 mmol), Et₃N (140 μ L, 1.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) α -diketone **1** (2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature until TLC analysis revealed the disappearance of the starting α -diketone (12–24 h). The reaction medium was then diluted with Et₂O (5 mL), vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice to obtain the crude α -hydroxyketone **3** in Et₂O, whereas the mother liquor (PEG₄₀₀-methylthiazolium **2b**) was kept aside for further runs. The extraction solvent was then removed under a nitrogen stream and the residue containing the target α -hydroxyketone purified as described above. Product yields for Method B are reported in Table 2.

4.2.1. 3-Hydroxy-3-methylpentane-2,4-dione (3a). The crude reaction mixture was bulb-to-bulb distilled (50 °C, 5 mmHg) to give **3a**^{3,19} (124 mg, 95%) as a colorless liquid. Lit.:^{19b} bp 43–44 °C (4 mmHg). ESI MS (130.1): 153.5 (M+Na⁺). Compound **3a** partially decomposes on silica gel.

4.2.2. 4-Ethyl-4-hydroxyheptane-3,5-dione (3b). The crude reaction mixture was bulb-to-bulb distilled (84 °C, 5 mmHg) to give **3b**^{3,20} (151 mg, 88%) as a colorless liquid. ESI MS (172.1): 195.8 (M+Na⁺). Compound **3b** partially decomposes on silica gel.

4.2.3. (R/S)-3-Hydroxy-3-methylhexane-2,4-dione (3c). Column chromatography with 12:1 cyclohexane/AcOEt afforded **3c**^{3,21} (102 mg, 71%) as a colorless oil. ESI MS (144.1): 145.1 (M+H⁺). A chromatographic fraction containing **4c** but slightly contaminated by **3c** was collected for **4c**³ identification (¹H NMR analysis). Compound **4c** partially decomposes on silica gel.

4.2.4. (R/S)-3-Hydroxy-3-methylheptane-2,4-dione (3d). Column chromatography with 12:1 cyclohexane/AcOEt afforded **3d**^{3,21} (102 mg, 65%) as a colorless oil. ESI MS (158.1): 181.7 (M+Na⁺). A chromatographic fraction containing **4d** was collected for **4d**³ identification (¹H NMR analysis). Compound **4d** partially decomposes on silica gel.

4.2.5. (R/S)-3-Hydroxy-3-methyloctane-2,4-dione (3e). Column chromatography with 12:1 cyclohexane/AcOEt afforded **3e**²¹ (115 mg, 67%) as a colorless oil. GC–MS (70 eV, EI): *t_R* 23.65 (first enantiomer); 23.84 (second enantiomer), *m/z* 172 (M⁺, <1%), 130 (20), 88 (100), 43 (45). ESI MS (172.1): 195.5 (M+Na⁺). A chromatographic fraction containing **4e** was collected for **4e** identification. 3-Butyl-3-hydroxypentane-2,4-dione **4e**: GC–MS (70 eV, EI): *t_R* 20.90, *m/z* 172 (M⁺, <1%), 130 (100), 43 (68). ¹H NMR: δ =4.65 (br s, 1H, OH), 2.25 (s, 6H, CH₃(CO)), 2.04–1.95 (m, 2H, 2 H-4'), 1.40–1.19 (m, 4H, 2 H-2', 2 H-3'), 0.90 (t, 3H, J=7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR: δ =207.6 (2C), 91.0 (C), 36.1 (CH₂), 25.3 (CH₂), 25.2 (2 CH₃), 22.7 (CH₂), 13.8 (CH₃). ESI MS (172.1): 173.4 (M+H⁺). HRMS (ESI/Q-TOF): calcd *m/z* for C₉H₁₇O₃ [M+H]⁺, 173.1178; found, 173.1170. Compound **4e** partially decomposes on silica gel.

4.2.6. (R/S)-1-Hydroxy-1-phenylpropan-2-one (5f). **Method A.** To a vigorously stirred mixture of thiamine hydrochloride **2** (337 mg,

1.00 mmol), Et₃N (279 μ L, 2.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) α -diketone **1f** (293 μ L, 2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature for 3 h and then diluted with Et₂O (5 mL). The resulting mixture was vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice. The collected ethereal fractions were concentrated and the resulting residue was eluted from a column of silica gel with 4:1 cyclohexane/AcOEt to give **5f**²² (234 mg, 78%) as a white amorphous solid. ESI MS (150.1): 173.7 (M+Na⁺).

The subsequent elution with AcOEt afforded a mixture of PEG-OBz and PEG-OAc. PEG-OBz: ¹H NMR: δ =8.20–8.05, 7.60–7.50, and 7.48–7.40 (3m, Ph), 4.50–4.40 and 3.90–3.80 (2m, OCH₂CH₂OBz), 3.70–3.50 (m, OCH₂CH₂O–). PEG-OAc: ¹H NMR: δ =4.30–4.20 and 3.60–3.50 (2m, OCH₂CH₂OAc), 3.70–3.50 (m, OCH₂CH₂O–), 2.08 (s, CH₃).

Method B. To a vigorously stirred mixture of 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **2b** (54 mg, 0.20 mmol), Et₃N (279 μ L, 2.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) α -diketone **1f** (293 μ L, 2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature for 12 h and then diluted with Et₂O (5 mL). The resulting mixture was vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice. The collected ethereal fractions were concentrated and the resulting residue was eluted from a column of silica gel with 4:1 cyclohexane/AcOEt to give **5f**²² (225 mg, 75%) as a white amorphous solid.

4.3. General procedure for the cross-couplings of **1a** with α -ketoesters **6–9**

Method A. To a vigorously stirred mixture of thiamine hydrochloride **2** (337 mg, 1.00 mmol), Et₃N (279 μ L, 2.00 mmol), α -ketoester **6–9** (3.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) 2,3-butanedione **1a** (84 μ L, 1.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature until TLC analysis revealed the disappearance of **1a** (3–8 h). The reaction medium was then diluted with Et₂O (5 mL), vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice. The collected ethereal fractions were concentrated and the resulting residue was eluted from a column of silica gel with the suitable elution system to give the corresponding α -hydroxy-1,3-ketoester **10–13**. Product yields are reported in the next paragraphs for Method A.

Method B. To a vigorously stirred mixture of 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **2b** (54 mg, 0.20 mmol), α -ketoester **6–9** (3.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) 2,3-butanedione **1a** (84 μ L, 1.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature until TLC analysis revealed the disappearance of **1a** (12–48 h). The reaction medium was then diluted with Et₂O (5 mL), vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice. The collected ethereal fractions were concentrated and the resulting residue was eluted from a column of silica gel with the suitable elution system to give the corresponding α -hydroxy-1,3-ketoester **10–13**. Product yields are reported in Table 3.

4.3.1. (R/S)-Ethyl 2-hydroxy-2-methyl-3-oxobutanoate (10). Column chromatography with 3:1 cyclohexane/AcOEt afforded **10**²³ (88 mg, 55%) as a yellow oil. ESI MS (160.1): 183.5 (M+Na⁺).

4.3.2. (R/S)-Methyl 2-hydroxy-3-oxo-2-phenylbutanoate (11). Column chromatography with 8:1 cyclohexane/AcOEt afforded **11** (87 mg, 42%) as a yellow foam. ¹H NMR: δ =7.60–7.50 and 7.48–7.35 (2m, 5H, Ph), 4.78 (br s, 1H, OH), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 2.26

(s, 3H, CH₃). ¹³C NMR: δ =203.6 (C), 170.8 (C), 130.1 (C), 128.8 (2 CH), 128.6 (2 CH), 126.3 (CH), 84.6 (C), 53.6 (CH₃), 26.9 (CH₃). ESI MS (208.1): 209.7 (M+H⁺). HRMS (ESI/Q-TOF): calcd *m/z* for C₁₁H₁₃O₄ [M+H]⁺, 209.0814; found, 209.0821.

4.3.3. (R/S)-Ethyl 2-acetyl-2-hydroxy-4-phenylbutanoate (12). Column chromatography with 8:1 cyclohexane/AcOEt afforded **12** (125 mg, 50%) as a yellow foam. ¹H NMR: δ =7.38–7.15 (m, 5H, Ph), 4.28 (br s, 1H, OH), 4.25 (q, 2H, *J*=7.0 Hz, OCH₂CH₃), 2.70–2.60 (m, 2H, 2 H-4), 2.45 (ddd, 1H, *J*_{3a,4a}=8.0 Hz, *J*_{3a,4b}=8.5 Hz, *J*_{3a,3b}=14.0 Hz, H-3a), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.24 (ddd, 1H, *J*_{3b,4a}=7.5 Hz, *J*_{3b,4b}=8.0 Hz, *J*_{3a,3b}=14.0 Hz, H-3b), 1.27 (t, 3H, *J*=7.0 Hz, OCH₂CH₃). ¹³C NMR: δ =204.9 (C), 171.0 (C), 141.1 (C), 128.7 (4 CH), 126.4 (CH), 84.1 (C), 63.0 (CH₂), 37.2 (CH₂), 29.8 (CH₂), 24.8 (CH₃), 14.3 (CH₃). ESI MS (250.1): 251.6 (M+H⁺). HRMS (ESI/Q-TOF): calcd *m/z* for C₁₄H₁₈O₄ [M+H]⁺, 251.1283; found, 251.1277.

4.3.4. (R/S)-Ethyl 2-acetyl-2-hydroxy-3-methylbutanoate (13). Column chromatography with 8:1 cyclohexane/AcOEt afforded **13**²⁴ (96 mg, 51%) as a yellow foam. ESI MS (188.1): 189.3 (M+H⁺).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the University of Ferrara (Progetto FAR 2010) and the Italian Ministry of University and Scientific Research (Progetto FIRB Chem-Profarma-Net Grant RBPR05NWWC 008) for financial supports. Thanks are also given to Mr. Paolo Formaglio for NMR experiments.

Supplementary data

¹H and ¹³C spectra for new compounds. Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.tet.2011.08.056. These data include MOL files and InChIKeys of the most important compounds described in this article.

References and notes

- (a) Sprenger, G. A.; Pohl, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 145–159; (b) Pohl, M.; Linggen, B.; Müller, M. *Chem.—Eur. J.* **2002**, *8*, 5288–5295.
- Enders, D.; Balensiefer, T. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 534–541.
- Giovannini, P. P.; Pedrini, P.; Venturi, V.; Fantin, G.; Medici, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 113–117.
- In a parallel investigation, Müller and co-workers demonstrated that α -hydroxy methyl ketones can be obtained by using a different ThDP-dependent enzyme catalyst and pyruvate as acetyl anion equivalent. Lehwald, P.; Richter, M.; Röhr, C.; Liu, H.-W.; Müller, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 2389–2392.
- Kluger, R.; Tittmann, K. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1797–1833.
- Pioneering observations by Mizuhara and Handler established that the thiamine-promoted reaction of biacetyl and acetaldehyde involved scission of the biacetyl into two moieties to form acetoin and acetate. Mizuhara, S.; Handler, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 571–573.
- For recent reviews, see: (a) Moore, J. L.; Rovis, T. *Top. Curr. Chem.* **2010**, *291*, 77–144; (b) Enders, D. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7857–7870; (c) Rovis, T. *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 2–7; (d) Enders, D.; Niemeier, O.; Henseler, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5606–5655.
- For representative examples, see: (a) Enders, D.; Niemeier, O.; Balensiefer, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1463–1467; (b) Takikawa, H.; Hachisu, Y.; Bode, J. W.; Suzuki, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 3492–3494; (c) Enders, D.; Niemeier, O.; Raabe, G. *Synlett* **2006**, 2431–2434; (d) Li, Y.; Feng, Z.; You, S.-L. *Chem. Commun.* **2008**, 2263–2265.
- Enders, D.; Henseler, A. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1749–1752.
- For a recent study on highly chemoselective crossed condensations between aliphatic and *ortho*-substituted aromatic aldehydes, see: O'Toole, S. E.; Rose, C. A.; Gundala, S.; Zeitler, K.; Connon, S. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 347–357.
- (a) Sheehan, J. C.; Hunneman, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3666–3667; (b) For a recent review, see: Nemeria, N. S.; Chakraborty, S.; Balakrishnan, A.; Jordan, F. *FEBS J.* **2009**, *276*, 2432–2446.
- (a) Rubin, M. B.; Inbar, S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3355–3558; (b) Rubin, M. B.; Inbar, S. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 5021–5024.
- Chen, J.; Spear, S. K.; Huddleston, J. G.; Rogers, R. D. *Green Chem.* **2005**, *7*, 64–82.

14. Formation of the Breslow intermediate **III** may also be explained by release from **II** of a putative ketene, which in turn is entrapped by the PEG solvent. A similar mechanism was proposed by Mizuhara and Handler for the thiamine-promoted reaction of biacetyl **1a** with acetaldehyde, though no evidence of ketene expulsion was provided (see Ref. 6).
15. The extractability with Et₂O of acylated PEG byproducts (PEG-OAc, Schemes 1 and 2; PEG-OBz, Scheme 2) results in a partial loss of PEG solvent after each run, thus limiting its reuse in repeated experiments.
16. For a detailed study on the 1,2-proton shift involved in this type of intermediate species, see: Gronert, S. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3065–3068.
17. For a previous study on the preferential reduction of the benzoyl group of **1f**, see: Toukoniitty, E.; Franceschini, S.; Vaccari, A.; Murzin, D.-Y. *Appl. Catal., A* **2006**, *300*, 147–154 and references therein.
18. The mechanism of Scheme 2 is reminiscent of the reaction pathway proposed by Scheidt and co-workers for NHC-catalyzed hydroacylation of activated ketones: (a) Chan, A.; Scheidt, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4558–4559; (b) Phillips, E. P.; Chan, A.; Scheidt, K. A. *Aldrichimica Acta* **2009**, *42*, 55–66; Other possible mechanisms of forming **5f** are: (i) release of benzaldehyde from intermediate **VI** followed by attack of this by an acetyl anion equivalent, or (ii) formation of a product of type **3** or **4** followed by a retro-aldol reaction to lose the extra acyl group. In order to gain a more detailed view of the reaction mechanism, devoted studies are currently underway in our laboratories.
19. (a) Christoffers, J.; Kauf, T.; Werner, T.; Rössle, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2601–2608; (b) Ramirez, F.; Bhatia, S. B.; Bigler, A. J.; Smith, C. P. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 1192–1196.
20. Clausen, C.; Weidner, I.; Butenschön, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3799–3806.
21. Naef, R.; Jaquier, A. PCT Int. Appl. 2006, WO 2006092749 A1 20060908.
22. Zhang, W.; Shi, M. *Chem. Commun.* **2006**, 1218–1220.
23. Baucherel, X.; Levoirier, E.; Uziel, J.; Juge, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1385–1387.
24. Christoffers, J.; Werner, T.; Unger, S.; Frey, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 425–431.

Thiazolium-catalyzed intermolecular Stetter reaction of linear and cyclic alkyl α -diketones†

Olga Bortolini, Giancarlo Fantin, Marco Fogagnolo, Pier Paolo Giovannini, Alessandro Massi* and Salvatore Pacifico

Received 29th August 2011, Accepted 14th September 2011

DOI: 10.1039/c1ob06480k

An efficient method for the *N*-heterocyclic carbene (NHC)-catalyzed conjugate addition of acetyl anions to various α,β -unsaturated acceptors (Stetter reaction) has been optimized by using 2,3-butanedione (biacetyl) as an alternative surrogate of acetaldehyde. The disclosed procedure proved to be compatible with microwave dielectric heating for reaction time reduction and with the use of different linear α -diketones as acyl anion donors (e.g. 3,4-hexanedione for propionyl anion additions). Moreover, the unprecedented *umpolung* reactivity of cyclic α -diketones in the atom economic nucleophilic acylation of chalcones is herein presented. Mechanistic aspects of the thiazolium-based catalysis involving linear and cyclic α -diketone substrates are also discussed.

Introduction

The formation of new carbon–carbon bonds by organocatalyzed reactions of carbonyl compounds is today a cornerstone of modern catalysis.¹ Surprisingly, however, the number of reports dealing with the use of α -diketones in organocatalytic approaches is quite scant in the literature,² despite the great potential of this class of substrates.³ α -Diketones are, in fact, highly reactive compounds bearing a double carbonyl functionality, which allows them to behave either as an electrophile,^{2a,b} a nucleophile,^{2c} or both an electrophile and a nucleophile in domino reactions.^{2d–f} The versatility of α -diketones in organocatalytic strategies is further demonstrated by their ability to undergo polarity reversal, or *umpolung*,⁴ of the carbonyl functionality under *N*-heterocyclic carbene (NHC) catalysis,⁵ and thus act as acyl anion precursors. This peculiar behavior of α -diketones was observed in the early fifties by Mizuhara and Handler, who established that the thiamine-promoted reaction of 2,3-butanedione (biacetyl) **1** and acetaldehyde involved scission of biacetyl into two moieties to form acetoin and acetate.⁶ This finding, however, was almost ignored for the next six decades. Recently, we took advantage of Mizuhara and Handler's observation and reported the enzymatic^{7a} and thiazolium-catalyzed^{7b} synthesis of a number of chiral and achiral α -hydroxyketones by benzoin-type reactions of linear dialkyl α -diketones. In continuation of our ongoing research in this field, we present herein our results on the use of alkyl α -diketones as acyl anion equivalents in a mechanistically related nucleophilic acylation, that is, the Stetter reaction, which employs conjugate

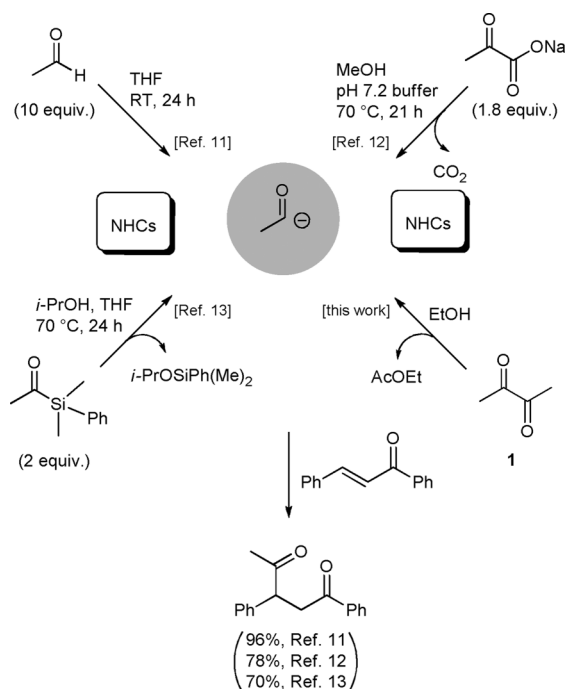
acceptors and produces valuable 1,4-dicarbonyl compounds.⁸ Particular attention has been paid in this work to the conjugate addition of the acetyl anion (MeCO[−]) due to the relevance of this simple nucleophile in organocatalytic strategies⁵ and the continuous need for improving its generation.⁹ In the case of the Stetter reaction, existing methods for the non-enzymatic,¹⁰ NHC-catalyzed generation of acetyl anions comprise the use of acetaldehyde,¹¹ sodium pyruvate¹² or acetyldimethylphenylsilane¹³ as its surrogates (Scheme 1).¹⁴ Though operative in both racemic and asymmetric versions, the first method requires the utilization of a large excess (10 equiv.) of the volatile acetaldehyde. The second biomimetic strategy is effective under neutral aqueous conditions and it has been optimized for the particular class of unsaturated 2-acyl imidazoles as acceptors. The sila-Stetter reaction by Scheidt and co-workers is, perhaps, the most effective and versatile method for the conjugate addition of carbonyl anions, but in the case of the acetyl anion it requires the synthesis of its precursor acetyldimethylphenylsilane.¹⁵ Herein, we present the commercially available, inexpensive (ca. € 4/1 g) biacetyl **1** as a bench stable (bp 88 °C), alternative acetyl anion equivalent for intermolecular Stetter reactions. The unprecedented *umpolung* reactivity of cyclic alkyl α -diketones in conjugate additions is also described to further demonstrate the potential of the proposed diketone-based carbonylation methodology.

Results and discussion

The optimization study of the model reaction of biacetyl **1** with *trans*-chalcone started by applying the conditions previously disclosed for the benzoin-type reactions of **1**.^{7b} Accordingly, a 1:2 mixture of **1** and **2a** was suspended in the eco-friendly polyethylene glycol (PEG₄₀₀) and treated at room temperature with a stoichiometric thiamine hydrochloride **3**–Et₃N couple (Table 1, entry 1). Disappointingly, the target adduct **7a** was isolated

Dipartimento di Chimica, Laboratorio di Chimica Organica, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, I-44121, Ferrara, Italy. E-mail: alessandro.massi@unife.it; Fax: +39 0532 455183; Tel: +39 0532 455183

† Electronic supplementary information (ESI) available: copies of ¹H and ¹³C NMR spectra for new compounds. See DOI: 10.1039/c1ob06480k



Scheme 1 Direct methods for acetyl anion generation in Stetter reactions (addition to *trans*-chalcone as the benchmark).

in poor yield (10%), very likely because of the heterogeneous reaction conditions. Indeed, the application of the above procedure to a homogeneous ethanolic reaction solution resulted in a higher yield of **7a** (55%, entry 2). Notably, formation of acetyl acetoin (**1** self-condensation product) and compounds arising from conjugate addition of either the nucleophilic thiazolium species or EtOH were not observed (GC-MS and ^1H NMR analyses) under these conditions. We next focused on developing a catalytic procedure; thiazolium **4** and **5**, and triazolium **6** pre-catalysts (20 mol%) were screened in combination with suitable bases (Et_3N , DBU, and Cs_2CO_3) in alcoholic (EtOH, *i*-PrOH, and *t*-BuOH) and aprotic (THF) solvents (entries 3–9; only diagnostic experiments are reported).¹⁶ A higher product yield (58%) was achieved with a thiazolium **4**- Et_3N couple in EtOH (entry 3). The thiazolium derivative **5** was less effective than **4** (entry 4), while the triazolium **6** pre-catalyst failed to produce the desired product **7a** (entry 5), thus showing the strict dependence of process efficiency on the stereoelectronic features of the heteroazolium-derived carbene.¹⁷ With regard to the effect of solvent, the results shown in Table 1 (entries 6–9) demonstrate that utilization of an amphiprotic solvent is crucial for a successful procedure, in full agreement with the proposed reaction mechanism (*vide infra*). For further optimization, the **1/2a** ratio and temperature were varied (entries 10–11) and the best yield (91%) was achieved with an excess of diketone **1** (2 equiv.) at 50 °C for 24 h (entry 11). Aiming at decreasing the reaction time, we finally considered the use of microwave (MW) dielectric heating¹⁸ and found the optimal compromise between product yield (75%) and selectivity (formation of side-products was detected at temperatures higher than 70 °C) by irradiating the reaction mixture at 100 °C for 2 h (entry 12).

Under the optimized thermal and MW conditions (methods A and B, Table 2), the substrate scope of the proposed system

Table 1 Optimization of the Stetter reaction of biacetyl **1** with *trans*-chalcone^a


| Entry | Cat. (mol%) | Base (mol%) | Solv. | Temp. (°C) | Time (h) | Yield (%) ^b |
|-------------------|----------------|-------------------------------|--------------------|------------|----------|------------------------|
| 1 | 3 (100) | Et_3N (200) | PEG_{400} | 25 | 5 | 10 |
| 2 | 3 (100) | Et_3N (200) | EtOH | 25 | 24 | 55 |
| 3 | 4 (20) | Et_3N (100) | EtOH | 25 | 24 | 58 |
| 4 | 5 (20) | Et_3N (100) | EtOH | 25 | 24 | 38 |
| 5 | 6 (20) | DBU (20) | EtOH | 25 | 24 | < 5 |
| 6 | 4 (20) | Et_3N (20) | THF | 25 | 24 | < 5 |
| 7 | 5 (20) | Cs_2CO_3 (20) | THF | 25 | 24 | < 5 |
| 8 | 4 (20) | Et_3N (100) | <i>i</i> -PrOH | 25 | 24 | 20 |
| 9 | 4 (20) | Et_3N (100) | <i>t</i> -BuOH | 30 | 24 | < 5 |
| 10 ^c | 4 (20) | Et_3N (100) | EtOH | 25 | 24 | 69 |
| 11 ^c | 4 (20) | Et_3N (100) | EtOH | 50 | 24 | 91 |
| 12 ^{c,d} | 4 (20) | Et_3N (100) | EtOH | 100 | 2 | 75 |

^a Reactions performed with 1.00 mmol of **2a** (0.5 M) and 0.50 mmol of **1**.

^b Isolated yield. ^c Reactions performed with 0.50 mmol of **2a** and 1.00 mmol of **1** (0.5 M). ^d Microwave-assisted reaction performed with a single-mode cavity dedicated reactor (Biotage Initiator).

Table 2 Catalytic Stetter reactions of linear dialkyl α -diketones **1** and **8** with different α,β -unsaturated acceptors^a

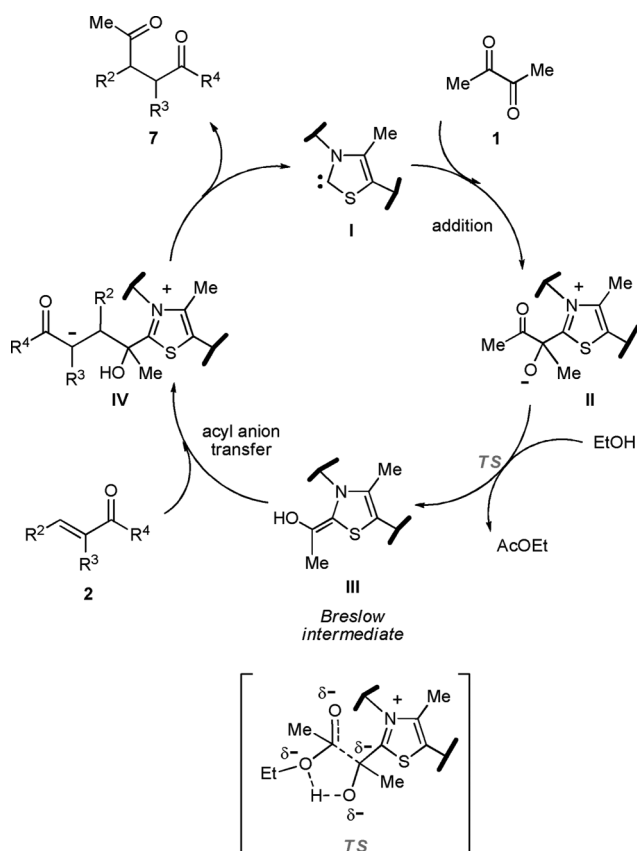
| Entry | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | Prod. | Yield (%) ^b |
|------------------|----------------|---------------------|------------------------|----------------|-----------|------------------------|
| 1 | Me | Ph | H | Ph | 7a | 91/75 |
| 2 | Me | 4-BrPh | H | Ph | 7b | 88/72 |
| 3 | Me | 4-MePh | H | Ph | 7c | 71/62 |
| 4 | Me | Me | H | Ph | 7d | 82/65 |
| 5 ^c | Me | H | H | Me | 7e | 80/— |
| 6 ^c | Me | Me | EtO_2C | OEt | 7f | 68/— |
| 7 ^{d,e} | Me | $-(\text{CH}_2)_3-$ | H | ^d | 7g | 58/42 |
| 8 | Et | Ph | H | Ph | 9a | 65/51 |
| 9 | Et | 4-BrPh | H | Ph | 9b | 62/50 |
| 10 | Et | 4-ClPh | H | Ph | 9h | 55/47 |

^a Reactions performed with 1.00 mmol of α -diketone (0.5 M) and 0.50 mmol of **2**. ^b Isolated yields (method A/method B). ^c Reaction performed at 25 °C. ^d Structure of **2g**:  ^e Reaction performed with 4 equiv. of **1**.

was examined by reacting **1** with various α,β -unsaturated carbonyl electrophiles **2**. Chalcone derivatives having both electron-withdrawing and electron-donating substituents on the aromatic ring gave the corresponding adducts in comparable yields

(88–71%) to those previously reported (entries 2–3).^{11–13} Notably, the unprecedented addition to the less reactive alkyl chalcone **2d** resulted almost equally effective (82%, entry 4). Highly activated substrates such as methyl vinyl ketone **2e** and diethyl ethylidene-malonate **2f** could also be used in this transformation by reducing the reaction temperature (25 °C) to minimize the competitive EtOH addition (entries 5–6). Cyclohexenone **2g** was a competent coupling partner as well, but a higher excess of biacetyl **1** (4 equiv.) was required to reach a satisfactory reaction conversion (entry 7). To further validate the versatility of the proposed methodology, the bis-homologue of **1**, that is 3,4-hexanedione **8**, was tested as a propionyl anion equivalent in the nucleophilic acylation of chalcones **2a,b** and **2h**. Gratifyingly, the corresponding addition products **9a,b** and **9h** were recovered in similar yields (65–55%) to those obtained by using propionaldehyde as the acyl anion source.^{19a}

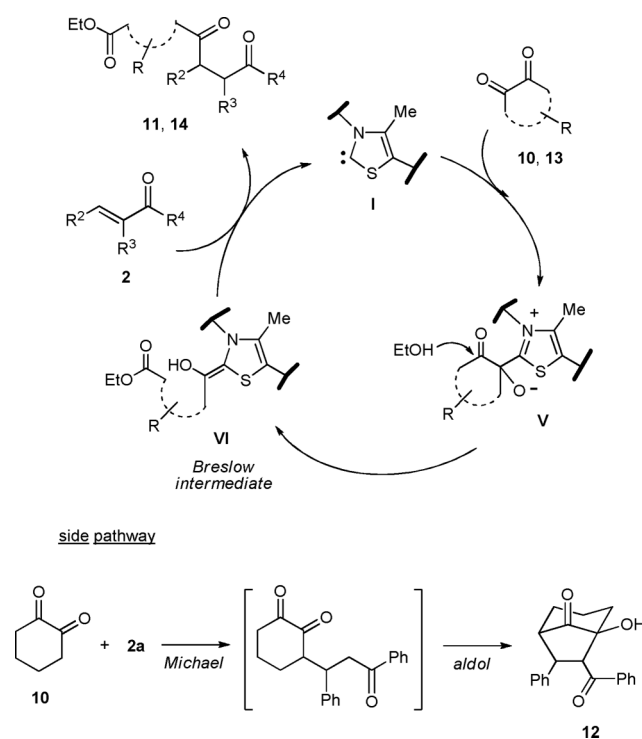
Mechanistically we propose that the nucleophilic acylation of α,β -unsaturated acceptors **2** proceeds through the formation of the intermediate **II** resulting from the addition of the thiazolin-2-ylidene **I** to the α -diketone **1**, and its evolution to the Breslow intermediate **III** by attack of EtOH to the carbonyl of **II** with elimination of ethyl acetate (Scheme 2). Subsequent addition of the Breslow intermediate to the β -position of the conjugate acceptor **2** leads to the formation of product **7** and regeneration of the catalyst **I**. For the key step of the catalytic cycle (C–C bond breaking) we postulate an alkoxide-assisted nucleophilic attack of the amphiprotic solvent involving a proton transfer from



Scheme 2 Proposed reaction pathway for the thiazolium-catalyzed Stetter reaction of linear α -diketones **1** and **8** (substrate **1** as representative example).

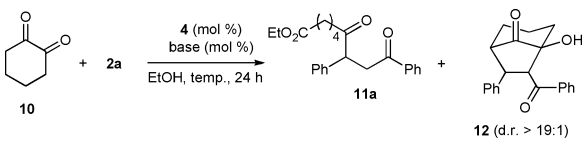
EtOH to the alkoxide **II** as shown in the transition state **TS**. In support of our hypothesis we found that the utilization of the bulkier and less acidic *t*-BuOH solvent in the model **1/2a** coupling resulted in no formation of the expected **7a** adduct (Table 1, entry 9).

From the analysis of the proposed reaction mechanism involving linear α -diketones (Scheme 2), the interest of utilizing their cyclic counterparts in the Stetter reaction becomes apparent since both carbonyl functionalities of the α -diketone donor can be maintained. As depicted in Scheme 3, the nucleophilic attack of EtOH on thiazolium intermediate **V** would in fact result in the formation of the Breslow intermediate **VI** bearing an ester group ready for subsequent product elaboration.²⁰ Hence, the atom economic nucleophilic acylation of *trans*-chalcone with 1,2-cyclohexanedione **10** was next investigated (Table 3).



Scheme 3 Proposed reaction pathway for the thiazolium-catalyzed Stetter reaction of cyclic α -diketones and side tandem Michael–aldol reaction affording bicycle **12** by-product.

An initial experiment was performed with a 1:2 mixture of **10** and **2a** in EtOH at room temperature using the optimal catalytic 4-Et₃N couple (entry 1). Under these conditions, the expected adduct **11a** was isolated in poor yield (10%) along with a major product (38%), which was identified as the diastereomeric bicyclo[3.2.1]octan-8-one derivative **12** (d.r. > 19:1).²¹ We supposed that this compound was formed under the basic reaction conditions through a tandem sequence involving the initial Michael addition of **10** to chalcone **2a** followed by an intramolecular aldol reaction (Scheme 3).²² Indeed, the above nucleophilic acylation conducted in the absence of pre-catalyst **4** afforded the bicycle **12** (88%) as the sole reaction product (entry 2).²¹ After some experimentation (entries 3–6), we could almost suppress this side-reaction and obtain the target adduct **11a** in

Table 3 Optimization of the Stetter reaction of 1,2-cyclohexanedione **10** with *trans*-chalcone^a


| Entry | 10/2a | 4 (mol%) | Base (mol%) | Temp. (°C) | 11a + 12 (%) ^b |
|----------------|--------------|-----------------|-------------------------|------------|----------------------------------|
| 1 | 1 : 2 | 20 | Et ₃ N (100) | 25 | 10/38 |
| 2 | 1 : 2 | 0 | Et ₃ N (100) | 25 | —/88 |
| 3 | 1 : 2 | 30 | DBU (30) | 25 | 12/39 |
| 4 | 1 : 2 | 20 | Et ₃ N (50) | 25 | 10/32 |
| 5 | 1 : 2 | 20 | Et ₃ N (50) | 50 | 67/5 |
| 6 | 2 : 1 | 20 | Et ₃ N (50) | 50 | 20/32 |
| 7 ^c | 1 : 2 | 100 | Et ₃ N (50) | 100 | 51/5 |

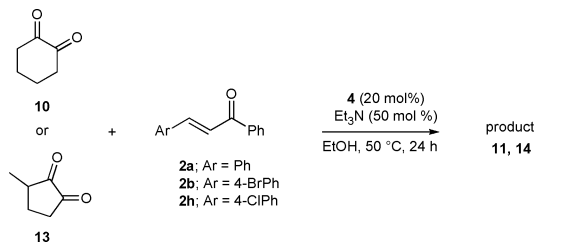
^a Reactions performed with 1.00 mmol of **2a** (0.5 M). ^b Isolated yield. ^c Microwave-assisted reaction performed with Biotage Initiator (reaction time: 2 h).

satisfactory 67% yield by warming (50 °C) for 24 h a 1 : 2 mixture of **10** and **2a** in the presence of catalytic **4** (20 mol%) and a diminished amount (50 mol%) of Et₃N (entry 5). As previously observed, the use of MW irradiation in the **10/2a** coupling shortened the reaction time (2 h) but slightly lowered the product yield (51%, entry 7).

Next, the scope and limitations of the Stetter reaction with cyclic alkyl α -diketones was briefly investigated (Table 4). Satisfactory yields were obtained under the optimized conditions for the reaction of 1,2-cyclohexanedione **10** with chalcones **2b** and **2h** (entries 2–3). 3-Methylcyclopentane-1,2-dione **13** was also tested as acyl donor in the addition to chalcone **2a** (entry 4). Diketone **13** appeared to be less reactive than **10** as a satisfactory yield (48%) of the diastereomeric adduct **14a** (d.r. 1 : 1) could only be achieved by means of MW irradiation (100 °C, 2 h). It is worth noting, however, that the **13/2a** coupling proceeded regioselectively by a putative preferential attack of thiazolium **4**-derived carbene to the less hindered carbonyl of unsymmetrical diketone **13** (Scheme 3).

Conclusions

In summary, we have demonstrated that biacetyl **1** may be employed as an effective, bench-stable, inexpensive acetyl anion equivalent in thiazolium **4**-catalyzed Stetter reactions with different α,β -unsaturated acceptors. Detected yields of the corresponding adducts were comparable to those obtained for the same transformations by known NHC-based methods. In some cases, the application to our procedure of microwave dielectric heating significantly increased the chemical efficiency of the addition process in virtue of a substantial reduction of reaction time. The method optimized for biacetyl **1** proved to be successful for 3,4-hexanedione **8** as well, thus offering a novel strategy for propionyl anion conjugate additions. The unprecedented atom economic nucleophilic acylation of chalcones with cyclic α -diketones was finally optimized to furnish 1,4-diketone derivatives displaying a suitably spaced ester functionality in their structure. Investigations to disclose an asymmetric variant of the described carboligation reaction are currently underway in our laboratories.

Table 4 Intermolecular Stetter reactions of cyclic α -diketones **10** and **13** with chalcones^a


| Entry | Diketone | Chalcone | Product (%) ^b |
|----------------|-----------|-----------|----------------------------------|
| 1 | 10 | 2a | 11a (67%) |
| 2 | 10 | 2b | 11b (61%) |
| 3 | 10 | 2h | 11h (69%) |
| 4 ^c | 13 | 2a | 14a (48%) (d.r. 1 : 1) |

^a Reactions performed with 1.00 mmol of **2** (0.5 M) and 0.50 mmol of diketone. ^b Isolated yield. ^c Microwave-assisted reaction performed with Biotage Initiator (100 °C, 2 h).

Experimental

Reactions were monitored by TLC on silica gel 60 F₂₅₄ with detection by charring with phosphomolybdic acid. Flash column chromatography was performed on silica gel 60 (230–400 mesh). Bulb-to-bulb distillation was performed with a Büchi Glass Oven B-580 apparatus. ¹H (300 MHz) and ¹³C (75 MHz) NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions at room temperature. Peaks assignments were aided by ¹H-¹H COSY and gradient-HMQC experiments. GC-MS spectra were recorded using a Varian 4000 GC-MS/MS system equipped with a fused capillary column Megadex 5 (25 m × 0.25 mm) containing dimethyl-*n*-pentyl- β -cyclodextrin on OV 1701. Analyses were carried out with a gradient of 1.5 °C min⁻¹ (from 80 °C up to 200 °C). ESI-MS analyses were performed in positive ion mode with samples dissolved in 10 mM solution of ammonium formate in 1 : 1 MeCN/H₂O. Elemental analyses were performed with FLASH 2000 Series CHNS/O analyzer (ThermoFisher Scientific). Microwave-assisted reactions were carried out using a single-mode cavity dedicated reactor (Biotage Initiator™). Reactions were performed with temperature-controlled programs in glass vials (0.5–2 mL or 2–5 mL depending on the scale) sealed with a Teflon septum. Temperatures were measured externally by an IR sensor. The reaction time was counted when the reaction mixture

reached the stated temperature. Pressure was measured by a non-invasive sensor integrated into the cavity lid. α -Diketones **1**, **8**, **10**, and **13**, heteroazolium salts **3–6**, and unsaturated acceptors **2a** and **2d–g** are commercially available (Sigma-Aldrich). *trans*-Chalcones **2b–c** and **2h** were prepared according to a known procedure.²³ Spectroscopic data of compounds **7a**,^{11–13} **7b**,¹¹ **7c**,¹¹ **7e**,^{11,24} **7f**,²⁵ **7g**,²⁶ and **9a**¹⁹ were identical to those reported in the literature.

Optimized procedures for the Stetter reaction of linear α -diketones **1** and **8** with conjugate acceptors **2a–h**

Method A. To a vigorously stirred mixture of α -diketone **1** or **8** (1.00 mmol), α,β -unsaturated acceptor **2** (0.50 mmol), 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **4** (54 mg, 0.20 mmol), in absolute EtOH (2 mL), was added Et₃N (139 μ L, 1.00 mmol) in one portion. The mixture was warmed at 50 °C, stirred at that temperature for 24 h, and then cooled to room temperature and concentrated. The residue containing the target adduct **7** or **9** was purified by either flash chromatography or bulb-to-bulb distillation. When chalcones **2b** and **2h** were used as acceptors, the addition to the reaction mixture of a few drops of THF was required to obtain a fully homogeneous solution.

Method B. A 2.0–5.0 mL process vial was filled with α -diketone **1** or **8** (1.00 mmol), α,β -unsaturated acceptor **2** (0.50 mmol), 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **4** (54 mg, 0.20 mmol), and absolute EtOH (2 mL). Then, Et₃N (139 μ L, 1.00 mmol) was added in one portion. The vial was sealed with the Teflon septum and aluminium crimp by using an appropriate crimping tool. The vial was then placed in its correct position in the Biotage Initiator cavity where irradiation for 2 h at 100 °C was performed. After the full irradiation sequence was completed, the vial was cooled to room temperature and then opened. The mixture was concentrated and the residue containing the target adduct **7** or **9** was purified by either flash chromatography or bulb-to-bulb distillation. Product yields for Method B are reported in Table 2.

1,3-Diphenylpentane-1,4-dione (**7a**)

Column chromatography with 12 : 1 cyclohexane–AcOEt afforded **7a**¹¹ (229 mg, 91%; method A) as a pale yellow oil. ¹H NMR: δ = 7.99–7.92 (m, 2 H, Ar), 7.58–7.50 (m, 1 H, Ar), 7.49–7.45 (m, 2 H, Ar), 7.42–7.23 (m, 5 H, Ar), 4.42 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,3}$ = 10.0, Hz, H-3), 4.00 (dd, 1 H, $J_{2a,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2a), 3.16 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2b), 2.22 (s, 3 H, CH₃). ¹³C NMR: δ = 207.6, 198.5, 138.3, 136.8, 133.6, 129.5, 128.9, 128.7, 128.4, 128.0, 54.2, 42.6, 29.5. ESI MS (252.1): 275.5 (M + Na⁺). Found: C, 80.75; H, 6.22. C₁₇H₁₆O₂ requires C, 80.93; H, 6.39%.

3-(4-Bromophenyl)-1-phenylpentane-1,4-dione (**7b**)

Column chromatography with 12 : 1 cyclohexane–AcOEt afforded **7b**¹¹ (291 mg, 88%; method A) as a yellow amorphous solid. ¹H NMR: δ = 7.95–7.90 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.51 (m, 1 H, Ar), 7.50–7.40 (m, 4 H, Ar), 7.20–7.15 (m, 2 H, Ar), 4.38 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,3}$ = 10.0, Hz, H-3), 3.95 (dd, 1 H, $J_{2a,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2a), 3.12 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2b), 2.20 (s, 3 H, CH₃). ¹³C NMR: δ = 207.1, 198.1, 137.2, 136.5, 133.7,

132.6, 130.3, 128.9, 128.4, 122.0, 53.5, 42.5, 29.6. ESI MS (330.0): 353.9 (M + Na⁺). Found: C, 61.78; H, 4.44. C₁₇H₁₅BrO₂ requires C, 61.65; H, 4.56%.

1-Phenyl-3-*p*-tolylpentane-1,4-dione (**7c**)

Column chromatography with 12 : 1 cyclohexane–AcOEt afforded **7c**¹¹ (189 mg, 71%; method A) as a white amorphous solid. ¹H NMR: δ = 8.00–7.90 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.50 (m, 1 H, Ar), 7.45–7.40 (m, 2 H, Ar), 7.18 (s, 4 H, Ar), 4.36 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,3}$ = 10.0, Hz, H-3), 3.98 (dd, 1 H, $J_{2a,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2a), 3.12 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2b), 2.33 (s, 3 H, CH₃), 2.21 (s, 3 H, CH₃). ¹³C NMR: δ = 207.8, 198.6, 137.7, 136.8, 135.2, 133.5, 130.1, 128.9, 128.5, 128.4, 53.8, 42.6, 29.5, 21.4. ESI MS (266.1): 305.4 (M + K⁺). Found: C, 81.29; H, 6.63. C₁₇H₁₈O₂ requires C, 81.17; H, 6.81%.

3-Methyl-1-phenylpentane-1,4-dione (**7d**)

Column chromatography with 12 : 1 cyclohexane–AcOEt afforded **7d** (156 mg, 82%; method A) as a white foam. IR (film) ν_{\max} : 2969, 1712, 1680, 1449, 1355, 1209, 1003, 689 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 8.00–7.95 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.52 (m, 1 H, Ar), 7.50–7.40 (m, 2 H, Ar), 3.54 (dd, 1 H, $J_{2a,3}$ = 8.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2a), 3.32–3.18 (m, 1 H, H-3), 2.94 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2b), 2.24 (s, 3 H, CH₃), 1.20 (d, 3 H, $J_{3,Me}$ = 5.5 Hz, CH₃). ¹³C NMR: δ = 211.4, 198.5, 136.7, 133.1, 128.5, 128.0, 41.7, 41.6, 28.6, 16.7. ESI MS (190.0): 213.5 (M + Na⁺). Found: C, 75.98; H, 6.43. C₁₂H₁₄O₂ requires C, 75.76; H, 7.42%.

Hexane-2,5-dione (**7e**)

The crude reaction mixture was bulb-to-bulb distilled (90 °C, 25 mmHg) to give **7e**^{11,24} (91 mg, 80%) as a colorless liquid. Lit:²³ bp 88–89 °C (25 mmHg). IR (film) ν_{\max} : 2915, 1715, 768 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 2.68 (s, 4 H, 2 H-2, 2 H-3), 2.20 (s, 6 H, 2 CH₃). ¹³C NMR: δ = 207.4, 37.0, 30.0.

Diethyl 2-(3-oxobutan-2-yl)malonate (**7f**)

The crude reaction mixture was bulb-to-bulb distilled (112 °C, 5 mmHg) to give **7f**²⁵ (156 mg, 68%) as a colorless liquid. Lit:²⁵ bp 110–120 °C (3 mmHg). IR (film) ν_{\max} : 2930, 1745, 1720 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 4.20 (q, 2 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 4.15 (q, 2 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 3.74 (d, 1 H, $J_{2,2'}$ = 10.0 Hz, H-2), 3.28 (dq, 1 H, $J_{1,2'}$ = 7.0 Hz, $J_{2,2'}$ = 10.0 Hz, H-2'), 2.28 (s, 3 H, CH₃), 1.28 (t, 3 H, OCH₂CH₃), 1.25 (t, 3 H, OCH₂CH₃), 1.14 (d, 1 H, $J_{1,2'}$ = 7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR: δ = 209.6, 168.5, 61.2, 54.4, 45.2, 28.4, 14.0, 13.9, 13.8.

3-Acetylcyclohexanone (**7g**)

The crude reaction mixture was bulb-to-bulb distilled (118 °C, 0.1 mmHg) to give **7g**²⁶ (81 mg, 58%) as a colorless liquid. Lit:²⁶ bp 130 °C (0.2 mmHg). IR (film) ν_{\max} : 2850, 1710 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 2.94–2.80 (m, 1 H, H-3), 2.54–2.24 (m, 4 H, 2 H-2, 2 H-6), 2.19 (s, 3 H, CH₃), 2.14–2.04 and 1.80–1.60 (2 m, 4 H, 2 H-4, 2 H-5). ¹³C NMR: δ = 209.8, 208.1, 50.5, 42.0, 40.5, 28.2, 27.1, 24.5.

1,3-Diphenylhexane-1,4-dione (9a)

Column chromatography with 15:1 cyclohexane–AcOEt afforded **9a**¹⁹ (173 mg, 65%; method A) as a colorless oil. ¹H NMR: δ = 7.98–7.90 (m, 2 H, Ar), 7.58–7.50 (m, 1 H, Ar), 7.46–7.38 (m, 2 H, Ar), 7.35–7.30 (m, 2 H, Ar), 7.28–7.20 (m, 2 H, Ar), 4.43 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 3.5 Hz, $J_{2a,3}$ = 10.0 Hz, H-3), 4.05 (dd, 1 H, $J_{2a,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2a), 3.12 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 3.5 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2b), 2.78–2.60 and 2.58–2.42 (2 m, 2 H, 2 H-5); 1.02 (t, 1 H, J = 7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR: δ = 210.2, 198.5, 138.6, 136.9, 133.0, 129.1, 129.0, 128.8, 128.5, 127.1, 53.2, 42.2, 35.0, 7.8. ESI MS (266.1): 289.4 (M + Na⁺). Found: C, 81.02; H, 6.01. C₁₈H₁₈O₂ requires C, 81.17; H, 6.81%.

3-(4-Bromophenyl)-1-phenylhexane-1,4-dione (9b)

Column chromatography with 15:1 cyclohexane–AcOEt afforded **9b** (213 mg, 62%; method A) as a white foam. IR (film) ν_{\max} : 2920, 1708, 1676, 1487, 1200, 1010, 747, 675 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.98–7.90 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.40 (m, 5 H, Ar), 7.20–7.10 (m, 2 H, Ar), 4.40 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,3}$ = 10.0 Hz, H-3), 4.00 (dd, 1 H, $J_{2a,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2a), 3.13 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2b), 2.73–2.58 and 2.56–2.42 (2 m, 2 H, 2 H-5); 1.02 (t, 1 H, J = 7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR: δ = 209.5, 197.9, 137.2, 136.3, 133.3, 132.2, 129.9, 128.5, 128.1, 122.6, 52.3, 42.4, 35.1, 7.8. ESI MS (344.0): 283.9 (M + K⁺). Found: C, 62.85; H, 5.15. C₁₈H₁₇BrO₂ requires C, 62.62; H, 4.96%.

3-(4-Chlorophenyl)-1-phenylhexane-1,4-dione (9h)

Column chromatography with 15:1 cyclohexane–AcOEt afforded **9c** (165 mg, 55%; method A) as a white foam. IR (film) ν_{\max} : 2978, 1708, 1676, 1490, 1201, 1015, 748, 661 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.98–7.90 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.20 (m, 7 H, Ar), 4.41 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,3}$ = 10.0 Hz, H-3), 4.00 (dd, 1 H, $J_{2a,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2a), 3.14 (dd, 1 H, $J_{2b,3}$ = 4.0 Hz, $J_{2a,2b}$ = 18.0 Hz, H-2b), 2.74–2.58 and 2.57–2.42 (2 m, 2 H, 2 H-5); 1.00 (t, 1 H, J = 7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR: δ = 209.6, 197.9, 136.7, 133.5, 133.3, 132.9, 130.8, 129.6, 129.2, 128.9, 128.6, 128.1, 52.3, 42.4, 35.1, 7.8. ESI MS (300.0): 223.6 (M + Na⁺). Found: C, 71.59; H, 5.98. C₁₈H₁₇ClO₂ requires C, 71.88; H, 5.70%.

Optimized procedure for the Stetter reaction of cyclic α -diketone **10** with chalcones **2a,b** and **2h**

To a vigorously stirred mixture of α -diketone **10** (56 mg, 0.50 mmol), chalcone **2** (1.00 mmol), 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **4** (27 mg, 0.10 mmol), in absolute EtOH (2 mL), was added Et₃N (35 μ L, 0.25 mmol) in one portion. The mixture was warmed to 50 °C, stirred at that temperature for 24 h, and then cooled to room temperature and concentrated. The residue containing the target adduct **11** was purified by flash chromatography. When chalcones **2b** and **2h** were used as acceptors, the addition to the reaction mixture of a few drops of THF was required to obtain a fully homogeneous solution.

Ethyl 6,9-dioxo-7,9-diphenylnonanoate (11a)

Column chromatography with 15:1 cyclohexane–AcOEt (containing 5% of dichloromethane) afforded **11a** (123 mg, 67%) as a white foam. IR (film) ν_{\max} : 2931, 1748, 1672, 1447, 1227, 746,

661 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.96–7.90 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.50 (m, 1 H, Ar), 7.47–7.40 (m, 2 H, Ar), 7.38–7.20 (m, 5 H, Ar), 4.40 (dd, 1 H, $J_{7,8b}$ = 3.5 Hz, $J_{7,8a}$ = 10.0 Hz, H-7), 4.08 (q, 2 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 4.03 (dd, 1 H, $J_{7,8a}$ = 10.0 Hz, $J_{8a,8b}$ = 18.0 Hz, H-8a), 3.13 (dd, 1 H, $J_{7,8b}$ = 3.5 Hz, $J_{8a,8b}$ = 18.0 Hz, H-8b), 2.70–2.60 and 2.54–2.44 (2 m, 2 H, 2 H-5), 2.25–2.17 (m, 2 H, 2 H-2), 1.65–1.45 (m, 4 H, 2 H-3, 2 H-4), 1.22 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃). ¹³C NMR: δ = 208.8, 198.2, 173.4, 138.1, 135.6, 133.2, 129.1, 128.6, 128.3, 128.1, 127.6, 60.2, 53.3, 42.4, 41.3, 34.0, 24.3, 23.1, 14.2. ESI MS (366.1): 384.7 (M + NH₄⁺). Found: C, 75.53; H, 7.39. C₂₃H₂₆O₄ requires C, 75.38; H, 7.15%.

Ethyl 7-(4-bromophenyl)-6,9-dioxo-9-phenylnonanoate (11b)

Column chromatography with 15:1 cyclohexane–AcOEt (containing 5% of dichloromethane) afforded **11b** (135 mg, 61%) as a white foam. IR (film) ν_{\max} : 2932, 1729, 1710, 1682, 1486, 1178, 1010, 753, 685 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.96–7.90 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.40 (m, 5 H, Ar), 7.20–7.10 (m, 2 H, Ar), 4.36 (dd, 1 H, $J_{7,8b}$ = 3.5 Hz, $J_{7,8a}$ = 10.0 Hz, H-7), 4.10 (q, 2 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 4.01 (dd, 1 H, $J_{7,8a}$ = 10.0 Hz, $J_{8a,8b}$ = 18.0 Hz, H-8a), 3.12 (dd, 1 H, $J_{7,8b}$ = 3.5 Hz, $J_{8a,8b}$ = 18.0 Hz, H-8b), 2.70–2.60 and 2.52–2.40 (2 m, 2 H, 2 H-5), 2.34–2.19 (m, 2 H, 2 H-2), 1.70–1.48 (m, 4 H, 2 H-3, 2 H-4), 1.24 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃). ¹³C NMR: δ = 208.4, 197.8, 173.4, 137.0, 136.3, 133.4, 130.0, 19.4, 128.6, 128.4, 128.1, 60.2, 52.6, 42.3, 41.4, 34.0, 24.3, 23.0, 14.2. ESI MS (444.1): 462.4 (M + NH₄⁺). Found: C, 62.29; H, 5.38. C₂₃H₂₅BrO₄ requires C, 62.03; H, 5.66%.

Ethyl 7-(4-chlorophenyl)-6,9-dioxo-9-phenylnonanoate (11h)

Column chromatography with 15:1 cyclohexane–AcOEt (containing 5% of dichloromethane) afforded **11h** (138 mg, 69%) as a white foam. IR (film) ν_{\max} : 2939, 1729, 1716, 1682, 1489, 1179, 1014, 755, 685 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.98–7.90 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.52 (m, 1 H, Ar), 7.50–7.40 (m, 2 H, Ar), 7.35–7.25 (m, 2 H, Ar), 7.22–7.15 (m, 2 H, Ar), 4.38 (dd, 1 H, $J_{7,8b}$ = 3.5 Hz, $J_{7,8a}$ = 10.0 Hz, H-7), 4.10 (q, 2 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 3.98 (dd, 1 H, $J_{7,8a}$ = 10.0 Hz, $J_{8a,8b}$ = 18.0 Hz, H-8a), 3.12 (dd, 1 H, $J_{7,8b}$ = 3.5 Hz, $J_{8a,8b}$ = 18.0 Hz, H-8b), 2.72–2.60 and 2.52–2.40 (2 m, 2 H, 2 H-5), 2.35–2.18 (m, 2 H, 2 H-2), 1.70–1.45 (m, 4 H, 2 H-3, 2 H-4), 1.23 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃). ¹³C NMR: δ = 209.8, 199.1, 174.7, 137.8, 137.6, 134.9, 134.6, 130.9, 130.6, 129.9, 129.3, 61.5, 53.9, 43.6, 42.7, 35.2, 25.5, 24.2, 15.4. ESI MS (401.1): 419.8 (M + NH₄⁺). Found: C, 68.77; H, 6.45. C₂₃H₂₅ClO₄ requires C, 68.91; H, 6.29%.

7-Benzoyl-1-hydroxy-6-phenylbicyclo[3.2.1]octan-8-one (12)

A mixture of α -diketone **10** (56 mg, 0.50 mmol), chalcone **2a** (208 mg, 1.00 mmol), Et₃N (70 μ L, 0.50 mmol), and absolute EtOH (2 mL) was vigorously stirred at room temperature for 24 h and then concentrated. The resulting residue was eluted from a column of silica gel with 12:1 cyclohexane–AcOEt (containing 5% of dichloromethane) to give **12** (141 mg, 88%) as a single diastereoisomer. IR (film) ν_{\max} : 2928, 1749, 1671, 1447, 1227, 1130, 747, 682 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 8.10–8.00 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.50 (m, 1 H, Ar), 7.45–7.38 (m, 2 H, Ar), 7.35–7.15 (m, 5 H, Ar), 4.26 (d, 1 H, $J_{6,7}$ = 7.0 Hz, H-6), 3.77 (dd, 1 H, $J_{2a,7}$ = 1.5 Hz, $J_{6,7}$ = 7.0 Hz, H-7), 3.28 (s, 1 H, OH), 2.80–2.75 (m, 1 H, H-5), 2.45–2.30

(m, 2 H, H-3a, H-4a), 2.10–1.80 (m, 2 H, H-3b, H-4b), 1.78–1.45 (m, 2 H, 2 H-2). ^{13}C NMR: δ = 197.5, 133.5, 129.5, 129.0, 128.6, 128.3, 126.8, 126.7, 81.2, 59.8, 49.8, 40.8, 40.5, 35.9, 17.2. ESI MS (320.1): 343.8 (M + Na⁺). Found: C, 78.49; H, 6.01. C₂₁H₂₀O₃ requires C, 78.73; H, 6.29%.

Ethyl 2-methyl-5,8-dioxo-6,8-diphenyloctanoate (14a)

A 2.0–5.0 mL process vial was filled with α -diketone **13** (56 mg, 0.50 mmol), chalcone **2a** (208 mg, 1.00 mmol), 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **4** (27 mg, 0.10 mmol), and absolute EtOH (2 mL). Then, Et₃N (35 μ L, 0.25 mmol) was added in one portion. The vial was sealed with the Teflon septum and aluminium crimp by using an appropriate crimping tool. The vial was then placed in its correct position in the Biotage Initiator cavity where irradiation for 2 h at 100 °C was performed. After the full irradiation sequence was completed, the vial was cooled to room temperature and then opened. The mixture was concentrated and the resulting residue was eluted from a column of silica gel with 15 : 1 cyclohexane–AcOEt (containing 5% of dichloromethane) to give **14a** (88 mg, 48%) as a 1 : 1 mixture of diastereoisomers. IR (film) ν_{max} : 2935, 1747, 1712, 1673, 1447, 1250, 689 cm⁻¹; ^1H NMR: δ = 7.98–7.90 (m, 2 H, Ar), 7.60–7.50 (m, 1 H, Ar), 7.48–7.40 (m, 2 H, Ar), 7.38–7.20 (m, 5 H, Ar), 4.40 (dd, 1 H, $J_{6,7b}$ = 3.5 Hz, $J_{6,7a}$ = 10.0 Hz, H-6), 4.15–3.95 (m, 3 H, H-7a, OCH₂CH₃), 3.14 (dd, 0.5 H, $J_{6,7b}$ = 3.5 Hz, $J_{7a,7b}$ = 18.0 Hz, H-7b(1)), 3.13 (dd, 0.5 H, $J_{6,7b}$ = 3.5 Hz, $J_{7a,7b}$ = 18.0 Hz, H-7b(2)), 2.72–2.60 and 2.57–2.44 (2 m, 2 H, 2 H-4), 2.40–2.30 (m, 1 H, H-2), 1.98–1.62 (m, 2 H, 2 H-3), 1.19 (t, 1.5 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 1.15 (t, 1.5 H, J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 1.10 (d, 1.5 H, $J_{2,\text{Me}}$ = 7.0 Hz, CH₃), 1.04 (d, 1.5 H, $J_{2,\text{Me}}$ = 7.0 Hz, CH₃). ^{13}C NMR: δ = 208.6, 198.1, 176.2, 176.1, 137.9, 136.4, 133.2, 129.1, 128.6, 128.3, 128.1, 127.6, 127.7, 60.2, 60.1, 53.3, 53.2, 42.4, 39.2, 39.1, 38.6, 38.5, 27.9, 17.1, 16.8, 14.2. ESI MS (366.2): 384.5 (M + NH₄⁺). Found: C, 75.45; H, 7.01. C₂₃H₂₆O₄ requires C, 75.38; H, 7.15%.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the University of Ferrara (Progetto FAR 2010) and the Italian Ministry of University and Scientific Research (Progetto FIRB Chem-Profarma-Net Grant RBPR05NWWC 008) for financial support. Thanks are also given to Mr. Paolo Formaglio for NMR experiments and to Mrs. Ercolina Bianchini for elemental analyses.

Notes and references

- (a) A. Berkessel and H. Gröger, in *Asymmetric Organocatalysis: From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005; (b) A. Dondoni and A. Massi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 4638–4660; (c) D. Enders and A. A. Narine, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 7857–7870; (d) E. N. Jacobsen and D. W. C. MacMillan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 20618–20619.
- For representative examples, see: (a) S. Samanta and C.-G. Zhao, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 3383–3386; (b) V. Nair, S. Vellalath, M. Poonoth, R. Mohan and E. Suresh, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 507–509; (c) D. Ding and C.-G. Zhao, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 1322e–1325; (d) M. Rueping, A. Kuenkel, F. Tato and J. W. Bats, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 3699–3702; (e) D. Ding, C.-G. Zhao, Q. Guo and H. Arman, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 4423–4427; (f) M. Rueping, A. Kuenkel and R. Fröhlich, *Chem.–Eur. J.*, 2010, **16**, 4173–4176.
- Selected examples for the application of α -diketones in organic synthesis: (a) S. Liu and C. Wolf, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 2965–2968; (b) A. Svennebring, P. Nilsson and M. Larhed, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 5851–5854; (c) S. Wu, A. Fluxe, J. M. Janusz, J. B. Sheffer, G. Browning, B. Blass, K. Coburn, R. Hedges, M. Murawsky, B. Fang, G. M. Fadayeel, M. Hare and L. Djandjighian, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 5859–5863; (d) C. Wolf and S. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10996–10997; (e) B. M. Trost and G. M. Schroeder, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 3785–3786.
- D. Seebach, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1979, **18**, 239–258.
- For recent reviews, see: (a) K. Hirano, I. Piel and F. Glorius, *Chem. Lett.*, 2011, **40**, 786–791; (b) A. T. Biju, N. Kuhl and F. Glorius, *Acc. Chem. Res.*, 2011, DOI: 10.1021/ar2000716; (c) V. Nair, R. S. Menon, A. T. Biju, C. R. Sinu, R. R. Paul, A. Jose and V. Sree Kumar, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, DOI: 10.1039/C1CS15139H; (d) H. U. Vora and T. Rovis, *Aldrichim. Acta*, 2011, **44**, 3–11; (e) J. L. Moore and T. Rovis, *Top. Curr. Chem.*, 2010, **291**, 77–144; (f) E. P. Phillips, A. Chan and K. A. Scheidt, *Aldrichim. Acta*, 2009, **42**, 55–66; (g) D. Enders, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 7857–7870; (h) D. Enders, O. Niemeier and A. Henseler, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 5606–5655; (i) N. Marion, S. Díez-González and S. P. Nolan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 2988–3000; (j) For a recent book, see: P.-C. Chiang and J. W. Bode, “N-Heterocyclic Carbenes as Organic Catalysts”, in *N-Heterocyclic Carbenes: From Laboratory Curiosities to Efficient Synthetic Tools*, S. Díez-González, Ed., RSC Catalysis Series No. 6, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010; pp 399–435.
- S. Mizuhara and P. Handler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 571–573.
- (a) P. P. Giovannini, P. Pedrini, V. Venturi, G. Fantin and A. Medici, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **64**, 113–117; (b) O. Bortolini, G. Fantin, M. Fogagnolo, P. P. Giovannini, V. Venturi, S. Pacifico and A. Massi, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 8110–8115; For useful elaboration of synthesized α -hydroxyketones, see: (c) P. P. Giovannini, G. Fantin, A. Massi, V. Venturi, A. Medici and P. Pedrini, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, DOI: 10.1039/C1OB05928A.
- (a) H. Stetter, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1976, **15**, 639–647; (b) H. Stetter and H. Kuhlmann, *Chem. Ber.*, 1976, **109**, 2890–2896; (c) H. Stetter and H. Kuhlmann, *Org. React.*, 1991, **40**, 407–496. For recent leading references on intermolecular Stetter reactions, see: (d) T. Jousseau, N. E. Wurz and F. Glorius, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 1410–1414; (e) D. A. DiRocco and T. Rovis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 10402–10405; (f) J. M. Um, D. A. DiRocco, E. L. Noey, T. Rovis and K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 11249–11254 and references therein.
- For a recent study, see: M. Y. Jin, S. M. Kim, H. Han, D. H. Ryu and J. W. Yang, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 880–883.
- For an enzymatic study on the 1,4-addition activity of pyruvate and for leading references on this topic, see: C. Dresen, M. Richter, M. Pohl, S. Lüdeke and M. Müller, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6600–6603.
- S. M. Kim, M. Y. Jin, M. J. Kim, Y. Cui, Y. S. Kim, L. Zhang, C. E. Song, D. H. Ryu and J. W. Yang, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 2069–2071.
- M. C. Myers, A. R. Bharadwaj, B. C. Milgram and K. A. Scheidt, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 14675–14680.
- A. E. Mattson, A. R. Bharadwaj, A. M. Zuhl and K. A. Scheidt, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 5715–5724.
- In general, known classes of acyl anion sources are aldehydes, pyruvates, acylsilanes, and benzoin themselves. Very recently, the *umpolung* reactivity of Michael acceptors has also been reported: (a) A. T. Biju, M. Padmanaban, N. E. Wurz and F. Glorius, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 4812–4815; (b) B.-C. Hong, N. S. Dange, C.-S. Hsu, J.-H. Liao and G.-H. Lee, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 1338–1341.
- Acetyldimethylphenylsilane is also commercially available from Olymchemical Ltd (Chunquan Rd. Pudong, Shanghai, 201203–People’s Republic of China).
- As previously observed (see ref. 7b), the use of catalytic thiamine–hydrochloride **3** (20 mol%) resulted in a sluggish nucleophilic addition.
- The stereoelectronic preference for thiazolium-derived carbenes (in contrast to triazolium or imidazolium derived carbenes) has been observed several times when alkyl acyl anion equivalents are used. For a discussion on this topic, see: (a) C. S. P. McErlean and A. C. Willis, *Synlett*, 2009, 233–236 and Ref. 8a,c and 11. The stereoelectronic differences between thiazolium, triazolium and imidazolium derived carbenes have recently been reviewed: (b) T. Dröge and F. Glorius, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6940–6952.
- For a previous study on the MW-accelerated addition of aldehydes to α,β -unsaturated ketones, see: J. S. Yadav, K. Anuradha, B. V. S. Reddy and B. Eeshwaraiah, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 8959–8962.

- 19 (a) W. S. Weiner, R. M. Slade, Y. I. Klimova, R. J. Walton and M. B. Anderson, *U.S. Pat. Appl. Publ.*, 20080249158, 2008; (b) D. W. Custar, H. Le and J. P. Morken, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 3760–3763.
- 20 In a similar vein, the asymmetric intermolecular Stetter reaction of glyoxamides with alkylidenemalonates reported by Rovis and co-workers produces α -ketoamide products, which can be further functionalized to give useful intermediates. Q. Liu, S. Perreault and T. Rovis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 14066–14067.
- 21 The assignment of the relative stereochemistry of bicyclo **12** and its enantioselective synthesis are currently under investigation in our laboratories and they will be the object of a forthcoming publication.
- 22 For the asymmetric Lewis base-catalyzed domino Michael/aldol reaction of 1,2-cyclohexanedione with α,β -unsaturated aldehydes, see Ref. 2d.
- 23 W. S. Murphy and S. Wattansin, *Synthesis*, 1980, 647–650.
- 24 A. Treibs and K. Hintermeier, *Chem. Ber.*, 1954, **87**, 1163–1166.
- 25 T. Sakai, T. Katayama and A. Takeda, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 2924–2931.
- 26 R. Ballini, M. Petrini, E. Marcantoni and G. Rosini, *Synthesis*, 1988, 231–233.

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 6579

www.rsc.org/obc

PAPER

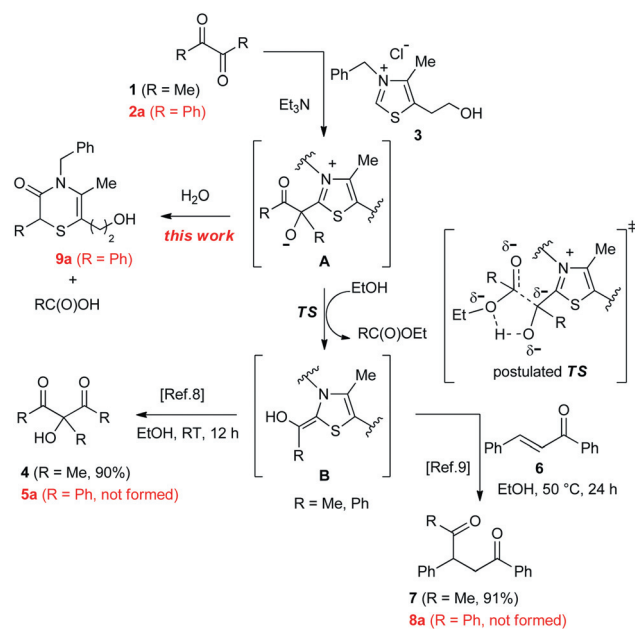
Unexpected reactivity of diaryl α -diketones with thiazolium carbenes:
discovery of a novel multicomponent reaction for the facile synthesis of
1,4-thiazin-3-ones[†]Valerio Bertolasi, Olga Bortolini, Adelaide Donvito, Giancarlo Fantin,* Marco Fogagnolo,
Pier Paolo Giovannini, Alessandro Massi* and Salvatore Pacifico

Received 14th May 2012, Accepted 15th June 2012

DOI: 10.1039/c2ob25928a

Diaryl α -diketones do not undergo polarity reversal in the presence of (benzo)thiazolium carbenes but are engaged in a novel multicomponent reaction with water to efficiently give medicinally relevant 1,4-thiazin-3-one heterocycles. Three different sets of conditions have been optimized to furnish the title compounds in fair to excellent yields depending on the electronic properties of α -diketone aromatic substituents and thiazolium or benzothiazolium substrate. A plausible reaction mechanism is also proposed based on the isolation and characterization of the postulated key intermediate and isotopic labeling experiments.

In recent years, *N*-heterocyclic carbenes (NHCs) have attracted considerable interest due to their unique features (amphiphilicity, moderate nucleophilicity, or strong basicity),¹ which allow them to be used as ligands for organometallic catalysis,² as reagents in the synthesis of heterocycles,³ and as efficient organocatalysts in *umpolung* transformations.⁴ In the latter sub-area of research many efforts have been devoted to the realization of highly stereoselective versions of the classical benzoin and Stetter reactions through optimal pre-catalyst design,^{4a,c-e} to the discovery of new transformations^{4b,f} (including domino processes),^{1b} and to the *umpolung* of electrophiles alternative to aldehydes and pyruvates, mainly acylsilanes^{4f,5} and Michael acceptors.⁶ In this regard, our group has recently demonstrated the capability of linear and cyclic dialkyl α -diketones to undergo polarity reversal under thiazolium carbene catalysis in benzoin-type^{7,8} and Stetter reactions,⁹ and thus act as a novel class of acyl anion precursors (Scheme 1). Crucial for the successful generation of the reactive Breslow intermediate **B** from dialkyl 1,2-diones of type **1** is the cleavage of the relatively weak 1,2 C–C bond that we postulated to occur through an alkoxide-assisted nucleophilic attack of the amphiprotic solvent EtOH to the adduct **A**.⁹ As part of our research on the reactivity of 1,2-dicarbonyls with NHCs and thiamine-dependent enzymes, we present herein the results of a parallel study with diaryl 1,2-diones **2** (benzils) showing that



Scheme 1 Reactions of dialkyl and diaryl α -diketones promoted by thiazolium-derived carbenes.

they cannot serve as surrogates of aromatic aldehydes by thiazolin-2-ylidene catalysis. This investigation, however, culminated with the identification and optimization of a novel multicomponent reaction (MCR), in which benzils are intercepted by equimolar amounts of a thiazolium/benzothiazolium carbene and water to generate 4*H*-1,4-thiazin-3-one derivatives of type **9** in a straightforward manner (one-pot procedures). Notably, these heterocyclic systems are endowed with a broad range of

Dipartimento di Chimica, Laboratorio di Chimica Organica, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, I-44121 Ferrara, Italy.
E-mail: alessandro.massi@unife.it

[†]Electronic supplementary information (ESI) available: copies of ¹H and ¹³C NMR spectra for new compounds and HRMS (ESI/Q-TOF) spectrum of ¹⁸O-labelled **9a**. CCDC 875932. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c2ob25928a

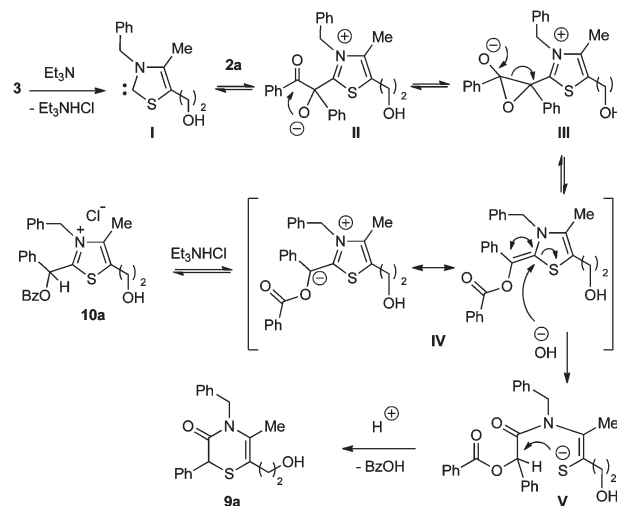
Table 1 Discovery of the novel 3CR of benzil **2a**, thiazolium salt **3**, and water and its optimization *via* the one-step thermal procedure (Method A)^a

| Entry | Solv. | Temp. (°C) | Time (h) | 9a + 9a' ^b | 9a' ^c |
|-----------------|------------------|------------|----------|-----------------------|------------------|
| 1 ^d | EtOH | 25 | 24 | — | — |
| 2 | EtOH | 50 | 24 | 8 + — | — |
| 3 | DMF ^e | 50 | 16 | 52 + 5 | 47 |
| 4 | DMF ^e | 70 | 16 | 58 + 5 | 50 |
| 5 | DMF ^e | 80 | 16 | 64 + 8 | 63 |
| 6 | DMF ^f | 80 | 16 | 47 + 8 | 42 |
| 7 | DMF ^g | 80 | 16 | 58 + 10 | 58 |
| 8 | DMF ^g | 25 | 96 | 37 + 15 | 40 |
| 9 ^h | DMF | 100 | 2 | 63 + — | 53 |
| 10 ^h | DMF | 100 | 3 | 40 + 5 | 32 |

^a Reactions performed with 1.00 mmol of **2a** (0.5 M). ^b Determined by ¹H NMR analysis of the crude reaction mixture (mol%). ^c Isolated yield after treatment of crude reaction mixture with BzCl and pyridine (see Experimental section). ^d Reaction performed with 20 mol% of **3**. A similar result was obtained in PEG₄₀₀. ^e Wet DMF (water content *ca.* 10–20%). ^f Anhyd. DMF + 5 equiv. of H₂O. ^g Anhyd. DMF + 10 equiv. of H₂O. ^h Microwave-assisted reaction performed with a single-mode cavity dedicated reactor (Biotage Initiator).

pharmacological activities,¹⁰ and are typically prepared by multi-step synthetic sequences.¹¹ Moreover, since the first report of Nair and co-workers on carbene-triggered MCRs,¹² the utility of this class of reactions has been amply demonstrated by the synthesis of a number of heterocyclic scaffolds only accessible with difficulty by other procedures.¹³ Nevertheless, as most of the known NHC-based MCRs involve an activated alkyne and a carbonyl compound or ketene as NHC reaction partners, the relative studies are limited to the production of furan derivatives.^{12,13b,d,f-i,q,r}

As anticipated, our investigation on the conceptually novel 3CR of diaryl 1,2-diones, thiazolium salts, and water commenced with the observation that benzil **2a** was not reactive under the conditions previously optimized for the homo-coupling of biacetyl **1** (Scheme 1 and Table 1, entry 1). Thus, it was envisaged that both reaction temperature and pre-catalyst **3** loading could play a significant role in the generation of the acyl anion from **2a**. Surprisingly, an experiment (entry 2) conducted in EtOH at 50 °C with equimolar **2a/3** and in the presence of Et₃N (2 equiv.) produced the 2,3-dihydro-4*H*-1,4-thiazin-3-one **9a** (8%) and benzoic acid (BzOH) as the sole isolable reaction products (**2a** conversion: 15%).¹⁴ The realization that compound **9a** was the 1/1/1 adduct of **2a**, water, and thiazolium **3**-derived carbene, as well as the recognition of the pharmaceutical relevance of the 1,4-thiazine scaffold,¹⁰ prompted us to further investigate the synthetic potential of this hitherto unreported 3CR. Hence, on the basis of a tentative mechanistic hypothesis (see below), the effect on reaction outcome of the change from an amphiprotic to a polar aprotic solvent such as DMF was first evaluated. Indeed, this choice proved to be successful furnishing

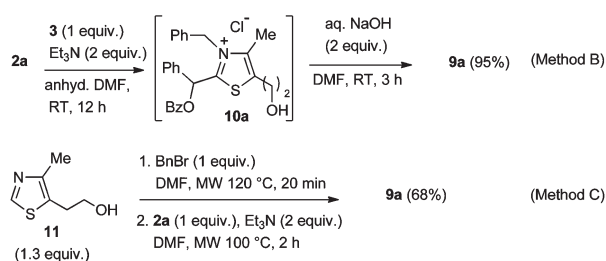


Scheme 2 Proposed reaction pathway for the 3CR of thiazolium carbenes, diaryl α -diketones, and water.

a much higher yield (52%) of **9a**, which was formed together with its benzoyl derivative **9a'** (5%; entry 3).¹⁴ Further experimentation was next carried out to determine the optimal reaction temperature ($T = 80$ °C, entries 4–5), and to better establish the influence of water amount on reaction efficiency (entries 6–8). These latter experiments were conducted in anhydrous DMF under inert atmosphere with increasing quantities of added water (up to 10 equiv.), but no significant improvements were observed in comparison with the run performed in wet DMF (entry 5). Aiming at decreasing the reaction time of the optimized one-step thermal procedure (Method A; entry 5), the use of microwave (MW) dielectric heating was finally considered (entries 9–10). Thus, the better compromise between product yield (63%) and selectivity was found by irradiating the reaction mixture at 100 °C for 2 h (entry 9).¹⁴

A mechanistic rationalization for the observed reactivity of diaryl α -diketones is proposed as shown in Scheme 2. Thus, the *in situ* generated thiazolin-2-ylidene **I** initially attacks benzil **2a** to give the alkoxide **II**, which then rearranges to form the zwitterion **IV** through the epoxide intermediate **III**. In the basic reaction medium, the ring opening of **III** by nucleophilic addition of the hydroxyl anion produces a reactive thiolate **V**, which subsequently undergoes cyclization to produce the 4*H*-1,4-thiazin-3-one ring by elimination of benzoate. Notably, the involvement of epoxide intermediates in the nucleophilic addition of carbenes to 1,2-diones has precedent in studies from Schowen¹⁵ and Nair,^{13i,16} groups. Also, the NHC-promoted thiazolium ring expansion has been previously reported by Takamizawa,¹⁷ Ma^{13f,h} and their co-workers. Thus, given the above reasoning, it can be speculated that the effective stabilization of electron density at the exocyclic C1 atom of **IV** by the aromatic and benzoyl groups is responsible for the preferential formation of **IV** over the Breslow intermediate **B** (Scheme 1, R = Ph).

An experimental result in support of our mechanistic hypothesis was the isolation and characterization (NMR and MS) of thiazolium salt **10a** bearing a benzoyl group at the *exo*-C1 position. This salt was quantitatively recovered from an experiment conducted at room temperature under strictly anhydrous



Scheme 3 One-pot two-step 3CR (Method B) and one-pot two-step 4CR (Method C) leading to 1,4-thiazin-3-one **9a**.

conditions with equimolar **2a/3** in DMF as the solvent (Scheme 3). This outcome prompted us to set up an alternative procedure for the model 3CR, which consisted in simply adding 10% aqueous NaOH (2 equiv.) to the solution of crude **10a** (Method B). This novel protocol furnished the thiazin-3-one **9a** under milder conditions (RT) and in almost quantitative yield.¹⁴ Significantly, addition of H₂¹⁸O (10 equiv.) to the intermediate **10a** (anhydr. DMF, RT, 72 h) smoothly led to ¹⁸O-labelled **9a** (see Table 2, entry 1),¹⁸ thus providing further evidence for the proposed MCR mechanism.

The 4CR of thiazole **11**, BnBr, benzil **2a**, and water was finally considered (Method C, Scheme 3). A two-step sequence entailing generation of the thiazolium salt **3** and subsequent completion of the Et₃N-promoted MCR was made necessary because of the incompatibility in the same pot and basic medium of the alkylating agent and the 1,2-dione substrate. The whole one-pot procedure, however, was accelerated by the use of MW irradiation and gave **9a** in 68% yield.¹⁴

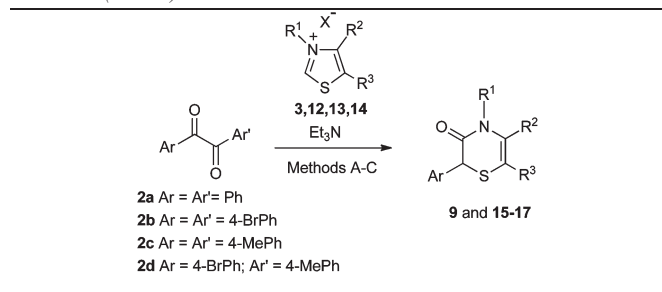
With three sets of optimized conditions in hand (Methods A–C), the generality of the MCR was next explored (Tables 2 and 3). Utilization of thiazolium salts **12–14** with different *N*-substituents and groups at 4- and 5-positions had no significant impact on reaction yields (entries 3–5). By contrast, and in full agreement with our mechanistic hypothesis, diketone **2b** with an electron-withdrawing group (4-Br) on the aromatic ring performed much better (entries 6–7) than its counterpart **2c** having an electron-donating aromatic group (4-Me). In particular, thermal procedures (Methods A and C) with **2c** were quite sluggish furnishing low yields of thiazin-3-ones **16c** and **17c** (entries 8–9). The unfavorable effect of aromatic electron-withdrawing groups on reaction efficiency was further confirmed by an experiment conducted with the unsymmetrical diaryl diketone **2d** that yielded (Method B) the thiazin-3-one **16b** as the sole reaction product (entry 10). To our satisfaction, however, compound **16b** gave crystals suitable for X-ray analysis,¹⁸ thus providing an unambiguous structural assignment of thiazin-3-ones prepared (Fig. 1).

The reactivity of benzothiazolium carbenes was also investigated (Table 3). When *N*-benzyl benzothiazolium salt **18** was engaged in the MCR with benzyl **2a**, no desired benzothiazin-3-one product **20** was obtained (entry 1), while significant amounts (40–65%) of the by-product **23** were recovered. This was formed under thermal conditions (Methods A and C) by [1,3] sigmatropic rearrangement of the *in situ* generated benzothiazolin-2-ylidene dimer (not shown) through formation of the stable benzyl radical.¹⁹ Thus, it was envisaged that replacement

Table 2 Scope of the MCR with diaryl α -diketones **2a–d** and thiazolium salts **3, 12–14**^a

| Entry | Diketone | Thiazolium salts (R ¹ , R ² , R ³) | Product ^b (%) |
|----------------|-----------|--|--|
| 1 ^c | 2a | 3 (Bn, Me, -(CH ₂) ₂ OH) | ¹⁸ O-labelled 9a (-/90/-) ^d |
| 2 | 2a | 3 (Bn, Me, -(CH ₂) ₂ OH) | 9a (63/88/53) |
| 3 | 2a | 12 (Et, Me, -(CH ₂) ₂ OH) | 15a (60/82/55) |
| 4 | 2a | 13 (Bn, Me, H) | 16a (61/85/56) |
| 5 | 2a | 14 (Et, Me, H) | 17a (57/80/51) |
| 6 | 2b | 13 (Bn, Me, H) | 16b (70/89/61) |
| 7 | 2b | 14 (Et, Me, H) | 17b (64/80/58) |
| 8 | 2c | 13 (Bn, Me, H) | 16c (5/34/8) |

Table 2 (Contd.)



| Entry | Diketone | Thiazolium salts (R ¹ , R ² , R ³) | Product ^b (%) |
|-------|-----------|--|--------------------------|
| 9 | 2c | 14 (Et, Me, H) | 17c (10/52/15) |
| 10 | 2d | 13 (Bn, Me, H) | 16b (-/45/-) |

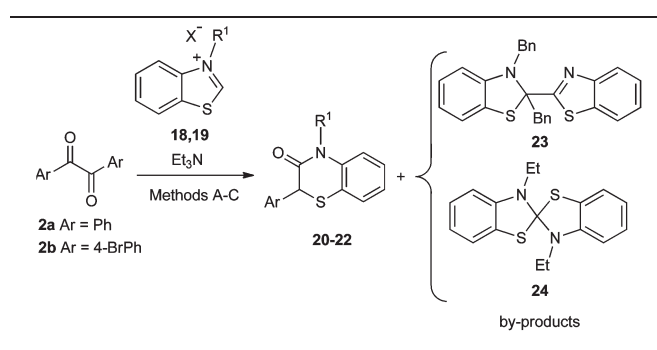
^a Reactions performed with 1.00 mmol of diketone (0.5 M) and 1.00 mmol of thiazolium salt. ^b Isolated yields (Method A/Method B/Method C). In the case of derivatives **9a'** and **15a'** the reported values refer to the isolated yields after treatment of the crude MCR mixture with BzCl and pyridine (see Experimental section). ^c Reaction performed with H₂¹⁸O. ^d Determined by ¹H NMR (isolated yield: 45%).

of the *N*-Bn substituent on benzothiazolium salt could be crucial for succeeding in the planned MCR with benzils **2a,b**. Quite gratifyingly, although production of the spiro-benzothiazole side-product **24**²⁰ could not be suppressed (30–40%), it was possible to isolate the target benzothiazin-3-ones **21–22** in acceptable yields (40–45%) by the MW-assisted Method C (entries 2 and 3).

In conclusion, the unexpected reactivity of diaryl α -diketones with (benzo)thiazolium carbenes has been exploited to optimize a novel multicomponent reaction leading to pharmaceutically relevant (benzo)thiazin-3-one derivatives. Research on the *umpo-lung* reactivity of diaryl 1,2-diones by different NHC organocatalysts and the set-up of a diastereoselective version of the disclosed MCR are currently underway.

Experimental

Reactions were monitored by TLC on silica gel 60 F254 with detection by charring with phosphomolybdic acid. Flash column chromatography was performed on silica gel 60 (230–400 mesh). ¹H (400 MHz) and ¹³C (75 MHz) NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions at room temperature. Peak assignments were aided by ¹H–¹H COSY and gradient-HMQC/HMBC experiments. ESI-MS analyses were performed in positive ion mode with samples dissolved in 10 mM solution of ammonium formate in 1 : 1 MeCN–H₂O. For accurate mass measurements, the compounds were analyzed in positive ion mode by Agilent 6520 HPLC-Chip Q/TOF-MS (nanospray) using a quadrupole, a hexapole, and a time-of-flight unit to produce spectra. The capillary source voltage was set at 1700 V; the gas temperature and drying gas were kept at 350 °C and

Table 3 Scope of the MCR with diaryl α -diketones **2a,b** and benzothiazolium salts **18–19**^d

| Entry | Diketone | Thiazolium salts (R ¹ , R ² , R ³) | Product ^b (%) |
|-------|-----------|--|--------------------------|
| 1 | 2a | 18 (R ¹ = Bn) | 20 (-/-/-) |
| 2 | 2a | 19 (R ¹ = Et) | 21 (20/-/42) |
| 3 | 2b | 19 (R ¹ = Et) | 22 (18/-/45) |

^a Reactions performed with 1.00 mmol of diketone (0.5 M) and 3.00 mmol of benzothiazolium salt. ^b Isolated yields (Method A/Method B/Method C).

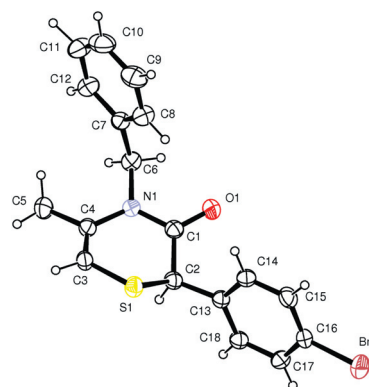


Fig. 1 ORTEP view of **16b** showing the thermal ellipsoids at 30% level of probability.

5 L min⁻¹, respectively. The MS analyzer was externally calibrated with ESI-L low concentration tuning mix from *m/z* 118 to 2700 to yield accuracy below 5 ppm. Accurate mass data were collected by directly infusing samples in 40/60 H₂O/ACN 0.1% TFA into the system at a flow rate of 0.4 μ L min⁻¹. Elemental analyses were performed with FLASH 2000 Series CHNS/O

analyzer (ThermoFisher Scientific). Microwave-assisted reactions were carried out using a single-mode cavity dedicated reactor (Biotage Initiator™). Reactions were performed with temperature-controlled programs in glass vials (0.5–2 or 2–5 mL depending on the scale) sealed with a Teflon septum. Temperatures were measured externally by an IR sensor. The reaction time was counted when the reaction mixture reached the stated temperature. Pressure was measured by a non-invasive sensor integrated into the cavity lid. α -Diketones **2a–c**, thiazolium salts **3**, **12**, and (benzo)thiazole precursors of (benzo)thiazolium salts **3**, **12–14**, **18**, and **19** are commercially available (Sigma-Aldrich). 1,4-Thiazin-3-one **9a**¹⁷ and benzothiazoline derivative **23**¹⁹ are known compounds. Thiazolium salts **13**, **14**, and benzothiazolium salts **18**, **19** were prepared according to known procedures.^{21,22} Unsymmetrical 4-bromo-4'-methylbenzil was prepared as described.²³

Optimized one-pot one-step procedure (Method A) for the three-component synthesis of 1,4-thiazin-3-one derivatives **9**, **15**, **16**, **17**, **21**, and **22**

To a stirred solution of thiazolium salt (1.00 mmol) or benzo-thiazolium salt (3.00 mmol) and α -diketone (1.00 mmol) in DMF (2 mL), was added Et₃N (279 μ L, 2.00 mmol) in one portion. The mixture was warmed to 80 °C, stirred at that temperature for 14 h, and then cooled to room temperature and concentrated. The resulting residue was diluted with AcOEt (150 mL) and then washed with H₂O (2 \times 20 mL). The organic phase was dried (Na₂SO₄), concentrated, and eluted from a column of silica gel with the appropriate elution system to give the corresponding 1,4-thiazin-3-one derivative (Tables 2 and 3). When 4,4'-dibromo benzil **2b** was used, the addition to the reaction mixture of a few drops of 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP) was required to obtain a fully homogeneous solution. The crude MCR mixtures containing compounds **9a** and **15a** were dissolved in pyridine (2 mL) and treated with benzoyl chloride (232 μ L, 2.00 mmol) for 14 h to give the corresponding benzoylated derivatives **9a'** and **15a'**, which were purified by column chromatography.

4-Benzyl-6-(2-hydroxyethyl)-5-methyl-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-3-one (9a). Column chromatography with 3 : 1 cyclohexane–AcOEt of the crude MCR mixture afforded **9a** (142 mg, 42%) as a white amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1655, 1270, 1115, 712, 695 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.37–7.20 (m, 10 H, Ar), 5.56 and 4.72 (2 d, 2 H, J = 16.0 Hz, PhCH₂), 4.66 (s, 1 H, H-2), 3.47–3.38 and 3.60–3.28 (2 m, 2 H, 2 H-2'), 2.52 (ddd, 1 H, $J_{1'a,2'a}$ = 5.0 Hz, $J_{1'a,2'b}$ = 8.5 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.5 Hz, H-1'a), 2.04 (ddd, 1 H, $J_{1'b,2'a}$ = 4.0 Hz, $J_{1'b,2'b}$ = 4.5 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.5 Hz, H-1'b), 1.91 (s, 3 H, CH₃). ¹³C NMR: δ = 164.8, 137.0, 135.7, 132.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 127.4, 127.3, 127.2, 126.5, 126.5, 111.6, 61.0, 46.7, 45.8, 35.7, 15.8. ESI-MS (339.1): 362.5 (M + Na⁺). Found: C, 70.77; N, 4.13; S, 9.45; H, 6.24. C₂₀H₂₁NO₂S requires C, 70.89; N, 4.01; S, 9.71; H, 6.45%.

2-(4-Benzyl-5-methyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-6-yl)ethyl benzoate (9a'). Column chromatography with 9 : 1 cyclohexane–AcOEt afforded **9a'** (279 mg, 63%) as a white

amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1715, 1656, 1269, 1111, 709, 694 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.86–7.80, 7.60–7.50, and 7.40–7.10 (3 m, 15 H, Ar), 5.39 and 4.85 (2 d, 2 H, J = 16.0 Hz, PhCH₂), 4.62 (s, 1 H, H-2), 4.22 (ddd, 1 H, $J_{1'b,2'a}$ = 5.5 Hz, $J_{1'a,2'a}$ = 6.0 Hz, $J_{2'a,2'b}$ = 12.5 Hz, H-2'a), 4.04 (ddd, 1 H, $J_{1'b,2'b}$ = 6.0 Hz, $J_{1'a,2'b}$ = 7.5 Hz, $J_{2'a,2'b}$ = 12.5 Hz, H-2'b), 2.67 (ddd, 1 H, $J_{1'a,2'a}$ = 6.0 Hz, $J_{1'b,2'b}$ = 7.5 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 15.0 Hz, H-1'a), 2.45 (ddd, 1 H, $J_{1'b,2'a}$ = 5.5 Hz, $J_{1'b,2'b}$ = 6.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 15.0 Hz, H-1'b), 1.83 (s, 3 H, CH₃). ¹³C NMR: δ = 166.3, 165.0, 137.0, 135.0, 132.9, 132.3, 129.9, 129.5–126.4 (15 C), 111.4, 62.9, 47.0, 45.9, 32.3, 15.8. ESI-MS (443.1): 466.8 (M + Na⁺). Found: C, 73.11; N, 3.16; S, 7.23; H, 5.68. C₂₇H₂₅NO₃S requires C, 73.34; N, 3.35; S, 7.03; H, 5.42%.

4-Ethyl-6-(2-hydroxyethyl)-5-methyl-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-3-one (15a). Column chromatography with 3 : 1 cyclohexane–AcOEt of the crude MCR afforded **15a** (111 mg, 40%) as a white amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1657, 1270, 1112, 710, 690 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.37–7.25 (m, 5 H, Ar), 4.53 (s, 1 H, H-2), 4.06 (dq, 1 H, $J_{1'a,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.5 Hz, H-1'a), 3.71 (dq, 1 H, $J_{1'b,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.5 Hz, H-1'b), 3.50–3.40 (m, 1 H, H-2'a), 3.39–3.28 (m, 1 H, H-2'b), 2.62 (ddd, 1 H, $J_{1'a,2'a}$ = 5.5 Hz, $J_{1'a,2'b}$ = 9.5 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 15.0 Hz, H-1'a), 2.04 (ddd, 1 H, $J_{1'b,2'a}$ = 4.5 Hz, $J_{1'b,2'b}$ = 5.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 15.0 Hz, H-1'b), 2.02 (s, 3 H, CH₃), 1.24 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, CH₃), 0.36 (bdd, $J_{2'a,OH}$ = 5.2 Hz, $J_{2'b,OH}$ = 8.1 Hz, OH). ¹³C NMR: δ = 163.9, 136.1, 132.6, 128.5, 128.4, 128.1, 128.0, 127.2, 110.4, 61.2, 46.5, 38.3, 35.7, 15.5, 13.8. ESI-MS (277.1): 278.8 (M + H⁺). Found: C, 64.95; N, 5.05; S, 11.56; H, 6.90. C₁₅H₁₉NO₂S requires C, 64.77; N, 5.32; S, 11.39; H, 6.75%.

2-(4-Ethyl-5-methyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-6-yl)ethyl benzoate (15a'). Column chromatography with 9 : 1 cyclohexane–AcOEt afforded **15a'** (229 mg, 60%) as a yellow amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1715, 1655, 1269, 1111, 709, 694 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.90–7.80, 7.60–7.50, and 7.40–7.10 (3 m, 10 H, Ar), 4.49 (s, 1 H, H-2), 4.21 (ddd, 1 H, $J_{1'b,2'a}$ = 5.5 Hz, $J_{1'a,2'a}$ = 6.5 Hz, $J_{2'a,2'b}$ = 12.5 Hz, H-2'a), 4.08–4.02 (m, 1 H, H-2'b), 3.97 (dq, 1 H, $J_{1'a,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 15.0 Hz, H-1'a), 3.74 (dq, 1 H, $J_{1'b,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 15.0 Hz, H-1'b), 2.74 (ddd, 1 H, $J_{1'a,2'a}$ = 6.5 Hz, $J_{1'a,2'b}$ = 7.5 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 15.0 Hz, H-1'a), 2.46 (ddd, 1 H, $J_{1'b,2'a}$ = 5.5 Hz, $J_{1'b,2'b}$ = 5.8 Hz, $J_{1'b,1'a}$ = 15.0 Hz, H-1'b), 2.03 (s, 3 H, CH₃), 1.20 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR: δ = 166.3, 164.0, 135.3, 132.9, 131.9, 129.9, 129.5, 128.2–127.4 (8 C), 110.4, 62.8, 46.7, 38.3, 32.2, 15.4, 13.7. ESI-MS (381.1): 382.4 (M + H⁺). Found: C, 69.26; N, 3.67; S, 8.41; H, 6.08. C₂₂H₂₃NO₃S requires C, 69.42; N, 3.55; S, 8.56; H, 6.24%.

4-Benzyl-5-methyl-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-3-one (16a). Column chromatography with 9 : 1 cyclohexane–AcOEt afforded **16a** (180 mg, 61%) as a yellow amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1654, 1310, 1177, 746, 693 cm⁻¹; ¹H NMR: δ = 7.42–7.18 (m, 10 H, Ar), 5.49 (s, 1 H, H-6), 5.23 and 4.88 (2 d, 2 H, J = 16.0 Hz, PhCH₂), 4.60 (s, 1 H, H-2), 1.90 (s, 3 H, CH₃). ¹³C NMR: δ = 164.7, 137.1, 136.0, 135.1, 128.6–126.2 (10 C), 99.3, 46.3, 46.0, 20.1. ESI-MS (295.1): 334.4 (M + K⁺). Found: C, 73.19; N, 4.74; S, 10.85; H, 5.80. C₁₈H₁₇NOS requires C, 73.01; N, 4.55; S, 10.59; H, 5.53%.

4-Ethyl-5-methyl-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-3-one (17a). Column chromatography with 9:1 cyclohexane–AcOEt afforded **17a** (132 mg, 57%) as a white amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1654, 1310, 1245, 733, 696 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$: δ = 7.35–7.25 (m, 5 H, Ar), 5.43 (s, 1 H, H-6), 4.46 (s, 1 H, H-2), 3.88 (dq, 1 H, $J_{1'a,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz), 3.74 (dq, 1 H, $J_{1'b,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz), 2.01 (s, 3 H, CH₃), 1.21 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$: δ = 163.8, 135.6, 135.5, 128.3–127.7 (5 C), 98.4, 46.0, 38.2, 19.8, 13.9. ESI-MS (233.1): 234.3 (M + H⁺). Found: C, 66.92; N, 6.00; S, 13.74; H, 6.48. C₁₃H₁₅NOS requires C, 66.77; N, 6.26; S, 13.59; H, 6.31%.

4-Benzyl-2-(4-bromophenyl)-5-methyl-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-3-one (16b). Column chromatography with 9:1 cyclohexane–AcOEt afforded **16b** (261 mg, 70%) as a white solid (MeOH). IR (film) ν_{\max} : 1716, 1660, 1071, 1110, 730, 697 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$: δ = 7.48–7.40 and 7.37–7.15 (2 m, 9 H, Ar), 5.49 (s, 1 H, H-6), 5.19 and 4.88 (2 d, 2 H, J = 16.0 Hz, PhCH₂), 4.53 (s, 1 H, H-2), 1.90 (s, 3 H, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$: δ = 164.3, 136.9, 136.1, 134.1, 131.5–126.2 (9 C), 121.9, 99.1, 46.0, 45.8, 20.1. ESI-MS (373.03): 412.9 (M + K⁺). Found: C, 57.76; N, 3.74; S, 8.57; H, 4.31. C₁₈H₁₆BrNOS requires C, 57.92; N, 3.57; S, 8.76; H, 4.50%.

2-(4-Bromophenyl)-4-ethyl-5-methyl-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-3-one (17b). Column chromatography with 9:1 cyclohexane–AcOEt afforded **17b** (199 mg, 64%) as a yellow amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1658, 1611, 1303, 1108, 791, 733 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$: δ = 7.45–7.18 (m, 4 H, Ar), 5.43 (s, 1 H, H-6), 4.40 (s, 1 H, H-2), 3.87 (dq, 1 H, $J_{1'a,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz), 3.74 (dq, 1 H, $J_{1'b,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz), 2.00 (s, 3 H, CH₃), 1.19 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$: δ = 163.3, 135.7, 134.4, 131.4 (2 C), 129.5 (2 C), 121.8, 98.2, 45.6, 38.3, 19.8, 13.9. ESI-MS (311.0): 312.3 (M + H⁺). Found: C, 50.01; N, 4.49; S, 10.27; H, 4.52. C₁₃H₁₄BrNOS requires C, 50.29; N, 4.67; S, 10.05; H, 4.72%.

4-Benzyl-5-methyl-2-(p-tolyl)-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-3-one (16c). Column chromatography with 9:1 cyclohexane–AcOEt afforded **16c** (15 mg, 5%) as a yellow amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1662, 1090, 1112, 734, 691 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$: δ = 7.38–7.17 (m, 9 H, Ar), 5.43 (s, 1 H, H-6), 5.21 and 4.88 (2 d, 2 H, J = 16.0 Hz, PhCH₂), 4.53 (s, 1 H, H-2), 2.38 (s, 3 H, CH₃), 1.90 (s, 3 H, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$: δ = 165.1, 137.8, 137.3, 136.1, 132.2, 129.6–126.4 (9C), 99.5, 46.2, 46.1, 21.2, 20.3. ESI-MS (309.1): 332.3 (M + Na⁺). Found: C, 73.75; N, 4.53; S, 10.35; H, 6.19. C₁₉H₁₉NOS requires C, 73.93; N, 4.29; S, 10.51; H, 6.01%.

4-Ethyl-5-methyl-2-(p-tolyl)-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazin-3-one (17c). Column chromatography with 9:1 cyclohexane–AcOEt afforded **17c** (24 mg, 10%) as a yellow amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1653, 1375, 1311, 1125, 759 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$: δ = 7.18 and 7.21 (2 d, 4 H, Ar), 5.41 (s, 1 H, H-6), 4.41 (s, 1 H, H-2), 3.87 (dq, 1 H, $J_{1'a,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz, H-1'a), 3.75 (dq, 1 H, $J_{1'b,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz, H-1'b), 2.27 (s, 3 H, CH₃), 2.01 (s, 3 H, CH₃), 1.21 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$: δ = 164.2, 137.5, 135.5, 132.5, 129.1 (2 C), 127.6 (2 C), 98.4, 45.8, 38.3, 21.1, 19.9, 13.9. ESI-MS (247.1): 286.9

(M + K⁺). Found: C, 67.98; N, 5.66; S, 12.96; H, 6.93. C₁₄H₁₇NOS requires C, 67.79; N, 5.81; S, 12.77; H, 6.78%.

4-Ethyl-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-benzo[b][1,4]thiazin-3-one (21). Column chromatography with 9:1 cyclohexane–AcOEt afforded **21** (53 mg, 20%) as a white amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1660, 1575, 1482, 1391, 1010, 745 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$: δ = 7.38–7.19, 7.09–7.11, and 6.81–7.00 (3 m, 9 H, Ar), 4.65 (s, 1 H, H-2), 4.18 (dq, 1 H, $J_{1'a,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz), 4.04 (dq, 1 H, $J_{1'b,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz), 1.34 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$: δ = 165.3, 139.0, 134.7, 128.7–127.2 (7 C), 123.4, 122.1, 116.9, 46.8, 40.8, 12.9. ESI-MS (269.1): 292.7 (M + Na⁺). Found: C, 71.34; N, 5.20; S, 11.90; H, 5.61. C₁₆H₁₅NOS requires C, 71.26; N, 5.45; S, 11.74; H, 5.48%.

2-(4-Bromophenyl)-4-ethyl-2,3-dihydro-4H-benzo[b][1,4]thiazin-3-one (22). Column chromatography with 9:1 cyclohexane–0AcOEt afforded **22** (62 mg, 18%) as a yellow amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1659, 1584, 1478, 1375, 1009, 747 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$: δ = 7.40–6.95 (m, 8 H, Ar), 4.59 (s, 1 H, H-2), 4.16 (dq, 1 H, $J_{1'a,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz), 4.04 (dq, 1 H, $J_{1'b,Me}$ = 7.0 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 14.0 Hz), 1.35 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$: δ = 164.9, 138.9, 133.8, 132.5–127.5 (6 C), 123.6, 122.0, 117.1, 46.4, 40.9, 13.0. ESI-MS (347.0): 348.9 (M + Na⁺). Found: C, 55.18; N, 4.02; S, 9.21; H, 4.05. C₁₆H₁₄BrNOS requires C, 55.01; N, 4.21; S, 9.04; H, 4.22%.

2,3-Dibenzyl-2,3-dihydro-2,2'-bibenzo[d]thiazole (23). Column chromatography of the crude 3CR (**18/2a**/H₂O; Method A) mixture with 15:1 cyclohexane–AcOEt afforded **23**¹⁹ (180 mg, 40%) as a solid.

3,3'-Diethyl-3H,3'H-2,2'-spirobi[benzo[d]thiazole] (24). Column chromatography of the crude 3CR (**19/2a**/H₂O; Method A) mixture with 15:1 cyclohexane–AcOEt afforded **24** (125 mg, 40%) as a white amorphous solid. IR (film) ν_{\max} : 1583, 1469, 1174, 1031, 727, 698 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$: δ = 7.10–7.02 (m, 2 H, Ar), 6.78 (t, 1 H, Ar), 6.42 (d, 1 H, Ar), 3.45–3.20 (m, 2 H, CH₂CH₃), 1.21 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$: δ = 141.1, 125.4, 122.9, 120.4, 118.6, 115.6, 106.5, 38.2, 12.6. ESI-MS (314.1): 337.5 (M + Na⁺). Found: C, 64.93; N, 8.91; S, 20.39; H, 5.77. C₁₇H₁₈N₂S₂ requires C, 64.81; N, 8.77; S, 20.59; H, 5.55%.

Optimized one-pot two-step procedure (Method B) for the three-component synthesis of 1,4-thiazin-3-one derivatives **9**, **15**, **16**, and **17**

A solution of thiazolium salt (1.00 mmol) and α -diketone (1.00 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) was vigorously stirred, degassed under vacuum, and saturated with argon (by an Ar-filled balloon) three times, then Et₃N (279 μL , 2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature for 12 h, cooled to 0 °C and then diluted with ethanolic (75 vol%) 10% aqueous NaOH (0.80 mL, 2.00 mmol). The resulting mixture was stirred at 0 °C for 1 h and at room temperature for 2 h and then neutralized with 10% aqueous NH₄Cl and concentrated. The resulting residue was diluted with AcOEt (150 mL) and then washed with H₂O (2 × 20 mL). The organic

phase was dried (Na_2SO_4), concentrated, and eluted from a column of silica gel with the appropriate elution system to give the corresponding 1,4-thiazin-3-one derivative (Table 2). When 4,4'-dibromo benzil **2b** was used, the addition to the reaction mixture of a few drops of 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP) was required to obtain a fully homogeneous solution. The crude MCR mixtures containing compounds **9a** and **15a** were dissolved in pyridine (2 mL) and treated with benzoyl chloride (232 μL , 2.00 mmol) for 14 h to give the corresponding benzoylated derivatives **9a'** and **15a'**, which were purified by column chromatography.

9a: (244 mg, 72%); **9a'**: (389 mg, 88%); **15a**: (180 mg, 65%); **15a'**: (312 mg, 82%); **16a** (250 mg, 85%); **17a** (186 mg, 80%); **16b**: (335 mg, 90%); **17b**: (248 mg, 80%); **16c**: (105 mg, 34%); **17c**: **17c** (128 mg, 52%).

2-((Benzoyloxy)(phenyl)methyl)-3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazol-3-ium chloride (10a). A solution of thiazolium salt **3** (269 mg, 1.00 mmol) and α -diketone **2a** (210 mg, 1.00 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) was vigorously stirred, degassed under vacuum, and saturated with argon (by an Ar-filled balloon) three times, then Et_3N (279 μL , 2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature for 12 h and then concentrated to give **10a** (510 mg) at least 80% pure as established by ^1H NMR analysis. ^1H NMR (D_2O): δ = 7.60–7.00 (m, 13 H, Ar), 6.80–6.60 (m, 2 H, Ar), 5.70 and 5.59 (2d, 2 H, J = 16.0 Hz, PhCH_2), 5.52 (s, 1 H, H-1'), 3.76–3.68 (m, 2 H, H-2''), 3.05–2.60 (m, 2 H, H-1''), 2.24 (s, 3 H, CH_3). ^{13}C NMR: δ = 163.9, 144.4, 136.0, 134.1, 133.3, 132.5, 131.2, 130.6, 129.9–127.5 (13 C), 125.3, 70.9, 59.8, 54.6, 30.5, 12.9. ESI-MS (444.2): 444.2 (M^+).

^{18}O -Isotope labeling experiment. A solution of thiazolium salt **3** (54 mg, 0.20 mmol) and α -diketone **2a** (42 mg, 0.20 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL) was vigorously stirred, degassed under vacuum, and saturated with argon (by an Ar-filled balloon) three times, then Et_3N (55 μL , 0.40 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature for 12 h and then diluted with H_2^{18}O (32 μL , 2.00 mmol). The resulting mixture was stirred for an additional 72 h, concentrated, and eluted from a column of silica gel with 3 : 1 cyclohexane–AcOEt to give ^{18}O -labelled **9a** (30 mg, 45%). HRMS (ESI/Q-TOF): calcd m/z for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}^{18}\text{OS}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 342.1408; found: 342.1420 (see Fig. S1†).

Optimized one-pot two-step procedure (Method C) for the four-component synthesis of 1,4-thian-3-one derivatives **9**, **15**, **16**, **17**, **21**, and **22**

A 0.5–2.0 mL process vial was filled with thiazole (1.30 mmol), alkyl bromide (1.00 mmol), and DMF (1 mL). The vial was sealed with a Teflon septum and aluminum crimp by using an appropriate crimping tool. The vial was then placed in its correct position in the Biotage Initiator cavity where irradiation for 20–30 min at 120 °C was performed. After the full irradiation sequence was completed, the vial was cooled to room temperature. The reaction mixture was diluted with a solution of α -diketone (1.00 mmol), Et_3N (279 μL , 2.00 mmol) in DMF (1 mL). The vial was irradiated again in the Biotage Initiator for 2 h at

100 °C, then cooled to room temperature, and concentrated. The resulting residue was diluted with AcOEt (150 mL) and then washed with H_2O (2×20 mL). The organic phase was dried (Na_2SO_4), concentrated, and eluted from a column of silica gel with the appropriate elution system to give the corresponding 1,4-thiazin-3-one derivative (Table 2). When 4,4'-dibromo benzil **2b** was used, the addition to the reaction mixture of a few drops of 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP) was required to obtain a fully homogeneous solution. The crude MCR mixtures containing compounds **9a** and **15a** were dissolved in pyridine (2 mL) and treated with benzoyl chloride (232 μL , 2.00 mmol) for 14 h to give the corresponding benzoylated derivatives **9a'** and **15a'**, which were purified by column chromatography. Benzothiazin-3-one derivatives **21** and **22** were prepared under the previously described conditions starting from benzothiazole (425 μL , 3.90 mmol), alkyl bromide (357 μL , 3.00 mmol), and DMF (1 mL).

9a: (122 mg, 36%); **9a'**: (234 mg, 53%); **15a**: (105 mg, 38%); **15a'**: (209 mg, 55%); **16a**: (165 mg, 56%); **17a**: (119 mg, 51%); **16b**: (227 mg, 61%); **17b**: (180 mg, 58%); **16c**: (24 mg, 8%); **17c**: (37 mg, 15%); **21**: (113 mg, 42%); **22**: (156 mg, 45%).

Crystal data for compound **16b**

X-Ray diffraction data for compound **16b** were collected on a Nonius Kappa CCD diffractometer, at room temperature (T = 295 K), with graphite monochromated Mo $\text{K}\alpha$ radiation (λ = 0.7107 Å). The data sets were integrated with the Denzo-SMN package²⁴ and corrected for Lorentz, polarization and absorption effects (SORTAV).²⁵ The structure was solved by direct methods (SIR97)²⁶ and refined (SHELXL-97)²⁷ by full matrix least squares with anisotropic non-H and isotropic H atoms. ORTEP²⁸ view of the molecule is shown in Fig. 1. $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrNOS}$; monoclinic, space group $P2_1/c$, a = 12.0158(5), b = 9.3261(4), c = 14.7056(6) Å, β = 98.300(3)°, V = 1630.7(1) Å³, Z = 4, D_c = 1.525 g cm⁻³. Intensity data collected with $\theta \leq 26.0^\circ$; 3147 independent reflections measured; 2242 reflections observed [$I > 2\sigma(I)$]. Final R = 0.0438 (observed reflections) and R_w = 0.1098 (all reflections), N . Parameters = 263, GOF = 1.051. CCDC 875932.†

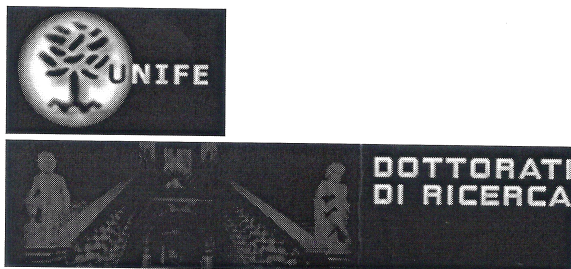
Acknowledgements

We gratefully acknowledge the University of Ferrara (Progetto FAR 2010) and the Italian Ministry of University and Scientific Research (Progetto PRIN Grant 2009ZSC5K2 004) for financial support. Thanks are also given to Mr Paolo Formaglio for NMR experiments and to Mrs Ercolina Bianchini for elemental analyses.

Notes and references

- (a) T. Dröge and F. Glorius, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6940. For a rational classification of NHC-based synthons based on major attributes of NHCs, see: (b) A. Grossmann and D. Enders, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 314.
- For reviews, see: (a) S. P. Nolan, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 91; (b) W. A. Herrmann, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 1290.

- 3 For reviews, see: (a) Y. Cheng and O. Meth-Cohn, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 2507; (b) V. Nair, S. Bindu and V. Sreekumar, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 5130.
- 4 For recent reviews, see: (a) K. Hirano, I. Piel and F. Glorius, *Chem. Lett.*, 2011, **40**, 786; (b) A. T. Biju, N. Kuhl and F. Glorius, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 1182; (c) V. Nair, R. S. Menon, A. T. Biju, C. R. Sinu, R. R. Paul, A. Jose and V. Sreekumar, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5336; (d) H. U. Vora and T. Rovis, *Aldrichim. Acta*, 2011, **44**, 3; (e) J. L. Moore and T. Rovis, *Top. Curr. Chem.*, 2010, **291**, 77; (f) E. P. Phillips, A. Chan and K. A. Scheidt, *Aldrichim. Acta*, 2009, **42**, 55; (g) D. Enders, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 7857; (h) D. Enders, O. Niemeier and A. Henseler, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 5606; (i) N. Marion, S. Diez-González and S. P. Nolan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 2988. For a recent book, see: (j) P.-C. Chiang and J. W. Bode, *N-Heterocyclic carbenes as organic catalysts in N-Heterocyclic Carbenes: From Laboratory Curiosities to Efficient Synthetic Tools*, ed., S. Diez-González, RSC Catalysis Series No. 6, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010; pp. 399–435.
- 5 A. E. Mattson, A. R. Bharadwaj, A. M. Zuhl and K. A. Scheidt, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 5715.
- 6 (a) A. T. Biju, M. Padmanaban, N. E. Wurz and F. Glorius, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 4812; (b) S.-i. Matsuo, Y. Ota, A. Washio, A. Katada, K. Ichioka, K. Takagi and M. Suzuki, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 3722; (c) C. Fischer, S. W. Smith, D. A. Powell and G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 1472.
- 7 An enzymatic study: P. P. Giovannini, P. Pedrini, V. Venturi, G. Fantin and A. Medici, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **64**, 113.
- 8 O. Bortolini, G. Fantin, M. Fogagnolo, P. P. Giovannini, V. Venturi, S. Pacifico and A. Massi, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 8110.
- 9 O. Bortolini, G. Fantin, M. Fogagnolo, P. P. Giovannini, A. Massi and S. Pacifico, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 8437.
- 10 Examples of commercial drugs displaying the 1,4-thiazin-3-one scaffold are Ipratium (vasodilator) and Levosimoladil (antiarrhythmic). The thiazin-3-one compound NS-6180 is in preclinical phase for the treatment of inflammatory bowel disease. (a) H. Yang, L. Fang, Z.-B. Li, F.-K. Ren, L.-Y. Wang, X. Tian, D.-S. Shin and H. Zuo, *Med. Chem. Res.*, 2011, **20**, 93; (b) A. N. Matralis, M. G. Katselou, A. Nikitakis and A. P. Kourounakis, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 5583; (c) WO 2010116270 A1, 2010; (d) H. Yamazaki, H. Harada, K. Matsuzaki, T. Watanabe and H. Saito, *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, **40**, 1025; (e) WO 9118893, 1992; (f) JP 02275869, 1991.
- 11 (a) V. L. de M. Guarda, M. Perrissin, F. Thomasson, E. A. Ximenes, S. L. Galdino, I. R. Pitta and C. Luu-Duc, *Il Farmaco*, 2001, **56**, 689; (b) K. Woydowski, J. Fleischhauer, J. Schiffer and J. Liebscher, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1999, 149; (c) H.-G. Hahn, K. Dal Nam, H. Mah and J. Jung Lee, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 3894.
- 12 V. Nair, S. Bindu and L. Balagopal, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 2043.
- 13 (a) D. Du, Z. Hu, J. Jin, Y. Lu, W. Tang, B. Wang and T. Lu, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 1274; (b) H.-R. Pan, X.-R. Wang, C.-X. Yan, Z.-X. Sun and Y. Cheng, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 2166; (c) Y. Cheng, J.-H. Peng and J.-Q. Li, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 2382; (d) H.-R. Pan, Y.-J. Li, C.-X. Yan, J. Xing and Y. Cheng, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 6644; (e) B. Wang, J.-Q. Li and Y. Cheng, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 485; (f) H. Ding, Y. Zhang, M. Bian, W. Yao and C. Ma, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 578; (g) V. Nair, S. C. Mathew, S. Vellalath, A. N. Pillai and E. Suresh, *Synthesis*, 2008, 551; (h) C. Ma, H. Ding, Y. Zhang and M. Bian, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 7793; (i) V. Nair, A. Deepthi, M. Poonoth and B. Santhamma, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 2313; (j) C. Ma, H. Ding, G. Wu and Y. Yang, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 8919; (k) C. Ma and Y. Yang, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 1343; (l) V. Nair, V. Sreekumar, S. Bindu and E. Suresh, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 2297; (m) V. Nair, P. B. Beneesh, V. Sreekumar, S. Bindu, R. S. Menon and A. Deepthi, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 201; (n) V. Nair, R. S. Menon and V. Sreekumar, *Pure Appl. Chem.*, 2005, **77**, 1191; (o) Y. Cheng and O. Meth-Cohn, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 2507; (p) V. Nair, C. Rajesh, A. U. Vinod, S. Bindu, A. R. Sreekanth, J. S. Mathen and L. Balagopal, *Acc. Chem. Res.*, 2003, **36**, 899; (q) V. Nair, S. Bindu, V. Sreekumar and L. Balagopal, *Synthesis*, 2003, 1446; (r) V. Nair, S. Bindu, V. Sreekumar and A. Chiaroni, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 2821.
- 14 Because of the difficult purification of **9a/15a** by column chromatography on silica gel, isolated yields were evaluated on recovered **9a/15a'** after treatment of crude MCR mixtures with BzCl and pyridine (see Experimental section).
- 15 J. P. Kuebrich and R. L. Schowen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 1220.
- 16 V. Nair, A. Pillai, R. S. Menon and E. Suresh, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 1189.
- 17 A similar mechanism for the synthesis of thiazin-3-ones from thiazolium salts and acylphosphonates was described. A. Takamizawa, Y. Hamashima and H. Sato, *J. Org. Chem.*, 1968, **33**, 4038.
- 18 See Experimental section for details.
- 19 (a) J. E. Baldwin, S. E. Branz and J. A. Walker, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 4143; (b) J. E. Baldwin and J. A. Walker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 596.
- 20 (a) G. V. Tormos, M. G. Bakker, P. Wang, M. V. Lakshmikantham, M. P. Cava and R. M. Metzger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 8528; (b) H.-W. Wanzlick, H.-J. Kleiner, I. Lasch, H. U. Füdner and H. Steinmaus, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1967, **708**, 155.
- 21 F. Bordwell and A. V. Satish, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 985.
- 22 S. K. Yen, L. L. Koh, F. E. Hahn, H. V. Huynh and T. S. A. Hor, *Organometallics*, 2006, **25**, 5105.
- 23 Md. R. Rohman, I. Kharkongor, M. Rajbangshi, H. Mecadon, B. M. Laloo, P. R. Sahu, I. Kharbangar and B. Myrboh, *Eur. J. Org. Chem.*, 2012, 320.
- 24 Z. Otwinowski and W. Minor, in *Methods in Enzymology*, ed. C. W. Carter and R. M. Sweet, Academic Press, London, 1997, vol. 276 (Part A), pp. 307–326.
- 25 R. H. Blessing, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, 1995, **51**, 33.
- 26 A. Altomare, M. C. Burla, M. Camalli, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. G. G. Moliterni, G. Polidori and R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.*, 1999, **32**, 115.
- 27 G. M. Sheldrick, *SHELXL-97, Program for Crystal Structures Refinement*, University of Göttingen, Germany, 1997.
- 28 M. N. Burnett and C. K. Johnson, ORTEPIII, Report ORNL-6895, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge TN, 1996.



Il tuo indirizzo e-mail

salvatore.pacifico@unife.it

Oggetto:

Dichiarazione di conformità della tesi di Dottorato

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Pacifico Salvatore

Nato a:

Grottaglie

Provincia:

Taranto

Il giorno:

29/08/1982

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:

Scienze Chimiche

Ciclo di Dottorato

25

Titolo della tesi:

Sintesi di glicopeptidi mediante le reazioni tiol-ene/ino e studio della reattività di Umpolung di α -dichetoni.

Titolo della tesi (traduzione):

Synthesis of glycopeptides by thiol-ene/yne couplings and study on the Umpolung reactivity of α -diketones

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)

Bortolini Olga

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)

CHIM/06

Parole chiave della tesi (max 10):

Tiol-ene,thiol-ene; tiol-ino,thiol-yne; reazioni di bioconiugazione, bioconjugation; S-glicosilazione, S-glycosylation; α -dichetoni, α -diKetones; NHCs; reattività di Umpolung, Umpolung reactivity; reazione benzoica, benzoin reaction; Reazione di Stetter, Stetter reaction; reazione multicomponente, multicomponent reaction.

Consapevole, dichiara

CONSAPEVOLE: (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 2 copie di cui una in formato cartaceo e una in formato pdf non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito: <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università, sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo

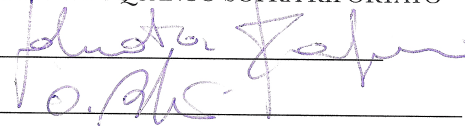
della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze; DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITA': (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo è del tutto identica a quella presentata in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrò in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie; (3) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non compromette in alcun modo i diritti di terzi, ivi compresi quelli relativi alla sicurezza dei dati personali; che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà da me tenuta indenne da qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi; (4) che la tesi di dottorato non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata prodotta nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazioni di tipo brevettale o di tutela. PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Firma del dottorando

Ferrara, li 5/03/2013 Firma del Dottorando

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore

The image shows two handwritten signatures in blue ink. The first signature is written over a horizontal line and appears to be 'Luca Zaffarano'. The second signature is also written over a horizontal line and appears to be 'O. P. C.'.