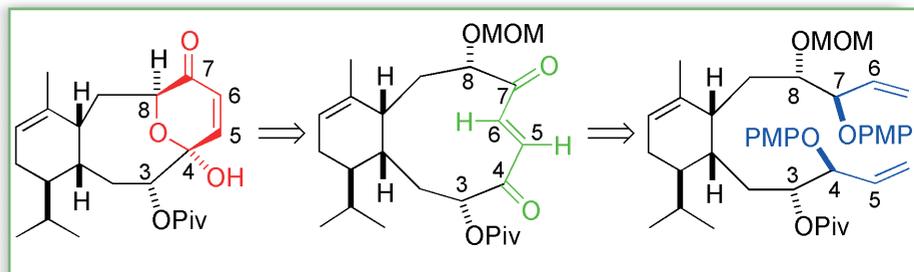


Cesare Gennari
Dipartimento di Chimica Organica
e Industriale
Centro di Eccellenza C.I.S.I.
Università di Milano
e Istituto di Scienze e Tecnologie
Molecolari (ISTM) del CNR
cesare.gennari@unimi.it



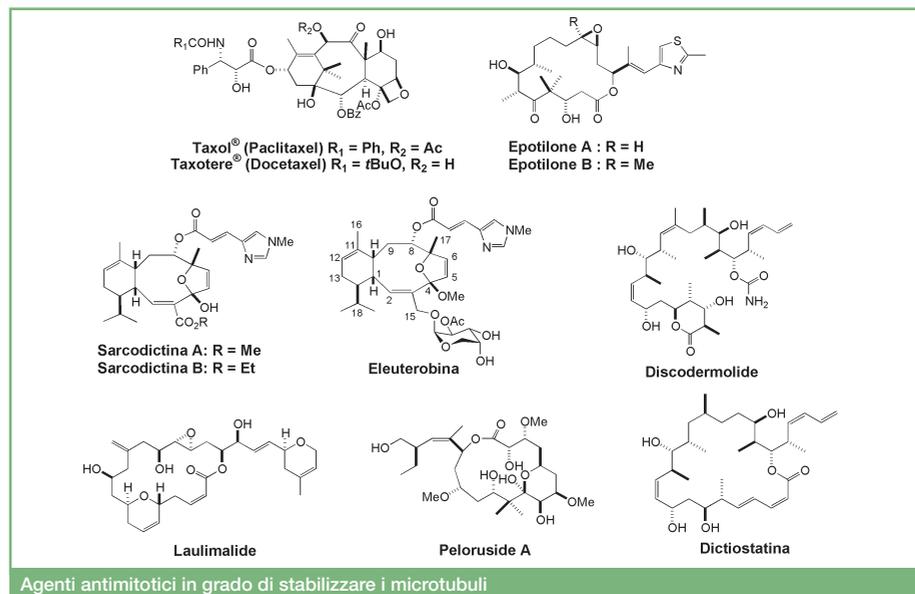
ELEUTEROBINA: UNA SINTESI TOTALE FORMALE

Una sintesi formale dell'eleuterobina è stata realizzata con l'ottenimento di un intermedio-chiave descritto nel 1998 da Danishefsky e collaboratori nella loro sintesi totale del prodotto naturale. Il passaggio-chiave della nostra strategia è una reazione di "Ring Closing Metathesis" (RCM).

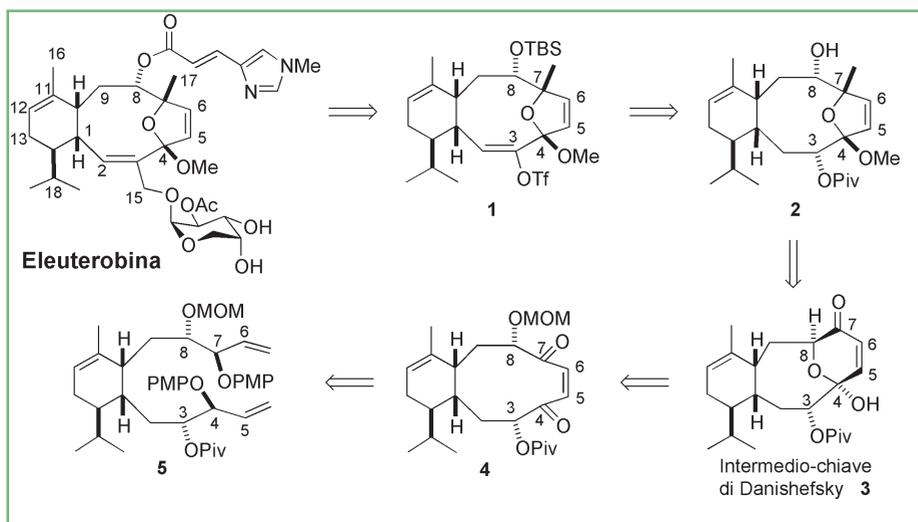
Il cancro è un gruppo di malattie caratterizzate dalla abnorme proliferazione di cellule anomale che invadono ed alterano i tessuti circostanti. Essendo la seconda causa principale di morte (dopo le malattie cardiovascolari) negli Stati Uniti d'America ed in gran parte d'Europa, il suo impatto sociale ed economico è devastante. Sebbene la chirurgia sia ancora il trattamento di prima scelta e più efficace contro il cancro, la chemioterapia è spesso usata come una terapia complementare all'intervento chirurgico, in combinazione con altri tipi di terapia, come la radioterapia e l'immunoterapia. La chemioterapia, inoltre, è l'unico trattamento possibile nel caso di tumori

disseminati e di metastasi. Svariati programmi rivolti all'identificazione di prodotti naturali dotati di attività citotossica e antitumorale hanno portato negli anni passati all'isolamento ed alla caratterizzazione di

interessanti strutture "lead" e candidati farmaci. Il complesso diterpene naturale paclitaxel (Taxol®) è probabilmente il più noto agente chemioterapico di origine naturale ed è stato introdotto sul mercato



Al prof. Cesare Gennari è stato conferito il premio "Chimica organica nei suoi aspetti sintetici" 2006 dalla Divisione di Chimica organica della SCI.



Schema 1 - Analisi retrosintetica dell'eleuterobina

a seguito di un programma di esame e selezione di prodotti naturali promosso dal "National Cancer Institute" (NCI, Stati Uniti d'America) nell'ormai lontano 1962 [1, 2] (Figura). Approvato dalla "Food and Drug Administration" (FDA) nel 1992, il paclitaxel inibisce la proliferazione tumorale attraverso un meccanismo di interferenza con la dinamica dei microtubuli cellulari ed una loro stabilizzazione irreversibile, ed è oggi riconosciuto come l'agente clinico più efficace per il trattamento del carcinoma metastatico della mammella, del carcinoma ovarico metastatico, del sarcoma di Kaposi e, più recentemente, del carcinoma del polmone di tipo "non a piccole cellule" (in combinazione con il cisplatino). Un analogo semisintetico del paclitaxel, il docetaxel (Taxotere®), è usato nel trattamento del carcinoma del polmone e del carcinoma metastatico della mammella. Sfortunatamente, il trattamento con i tassani (paclitaxel e docetaxel) è inefficace nei carcinomi del colon e della prostata ed è inoltre associato a gravi effetti collaterali. Oltre alle cellule tumorali, anche altre cellule che si divi-

dono rapidamente, come i globuli bianchi e le cellule pilifere, sono attaccate dall'azione antimitotica del paclitaxel; la chemioterapia con i tassani è quindi accompagnata dalla soppressione del sistema immunitario (neutropenia), sensibile riduzione del funzionamento dei nervi sensoriali (neuropatia periferica), caduta dei capelli (alopecia), fenomeni di tossicità ematica e cardiaca [3]. La limitazione più severa all'applicazione clinica del paclitaxel consiste nell'emergere di fenotipi tumorali resistenti ai tassani e agli altri agenti chemioterapici comunemente in uso. Infatti, le cellule tumorali si modificano molto velocemente a causa della loro instabilità genetica e dell'alta velocità di mutazione. Questo fenomeno, che va sotto il nome di "Multiple Drug Resistance" (MDR), è causato da due meccanismi distinti:

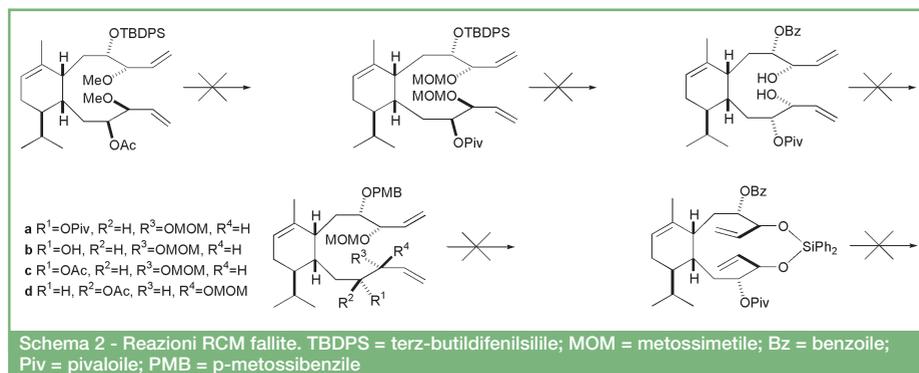
a) sovraespressione sulla superficie delle cellule neoplastiche della glicoproteina-P (PgP), una pompa di flusso ATP-dipendente che è in grado di abbassare sensibilmente la concentrazione intracellulare degli agenti citotossici;

b) sovraespressione di proteine tubuline mutate, meno suscettibili alla polimerizzazione ed alla stabilizzazione irreversibile dei microtubuli indotte dai tassani.

La scoperta di prodotti naturali alternativi, in possesso di un meccanismo di azione simile a quello del paclitaxel, è un risultato relativamente recente [4]. Nella Figura sono mostrati gli elementi più rappresentativi per ciascuna famiglia strutturale. Con l'eccezione del paclitaxel (origine vegetale) e degli epotiloni (origine batterica), sono tutti derivati da fonti marine. Come spesso capita con i prodotti naturali estratti da organismi marini (spugne, coralli, etc.), l'approvvigionamento è un fattore cruciale.

Le quantità disponibili sono infatti normalmente insufficienti per approfonditi studi "in vitro", per la determinazione delle relazioni struttura-attività (SAR), per i successivi studi "in vivo" e in generale per l'espletamento delle prove cliniche. La necessità di un approccio di sintesi parziale o totale è quindi motivato in questo caso dalla scarsità di questi prodotti, piuttosto che (oltre che) dal fascino delle loro architetture molecolari complesse ed intriganti. Il profilo farmacologico complessivo dei tassani mette in luce le enormi potenzialità che gli agenti antimitotici in grado di stabilizzare i microtubuli possono offrire, ed anche la necessità di scoprire e sviluppare composti con minori effetti collaterali e che mantengano efficacia contro i carcinomi divenuti resistenti ai farmaci (MDR).

Idealmente, questi composti dovrebbero mostrare un profilo farmacologico migliore ed essere sintetizzabili su una scala sufficientemente larga da permettere tutti gli studi precedentemente menzionati. È da notare che oltre all'epotilone B, almeno sette derivati epotilonici



ottenuti per sintesi parziale o totale [5] ed il discodermolide [6] sono recentemente entrati in fase clinica.

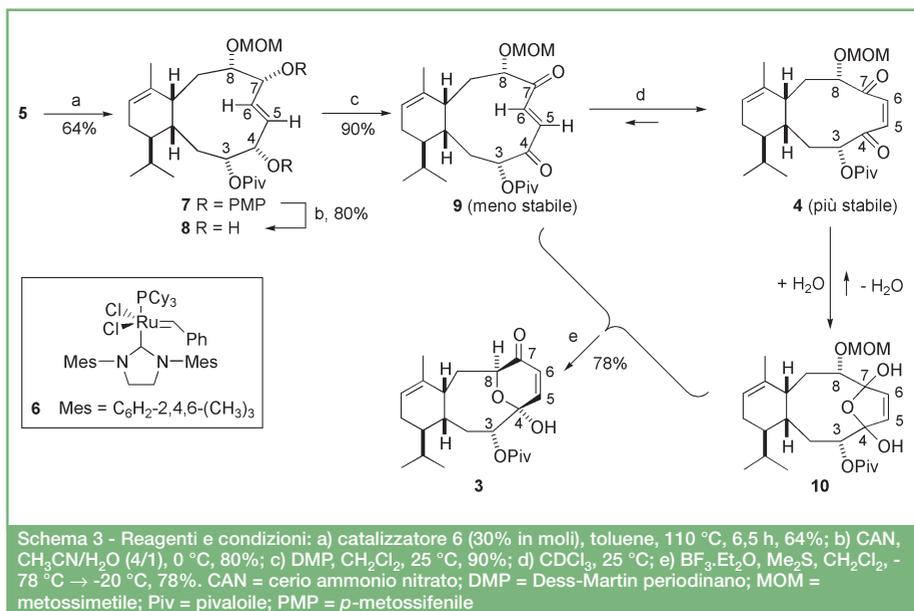
Una sintesi totale formale dell'eleuterobina

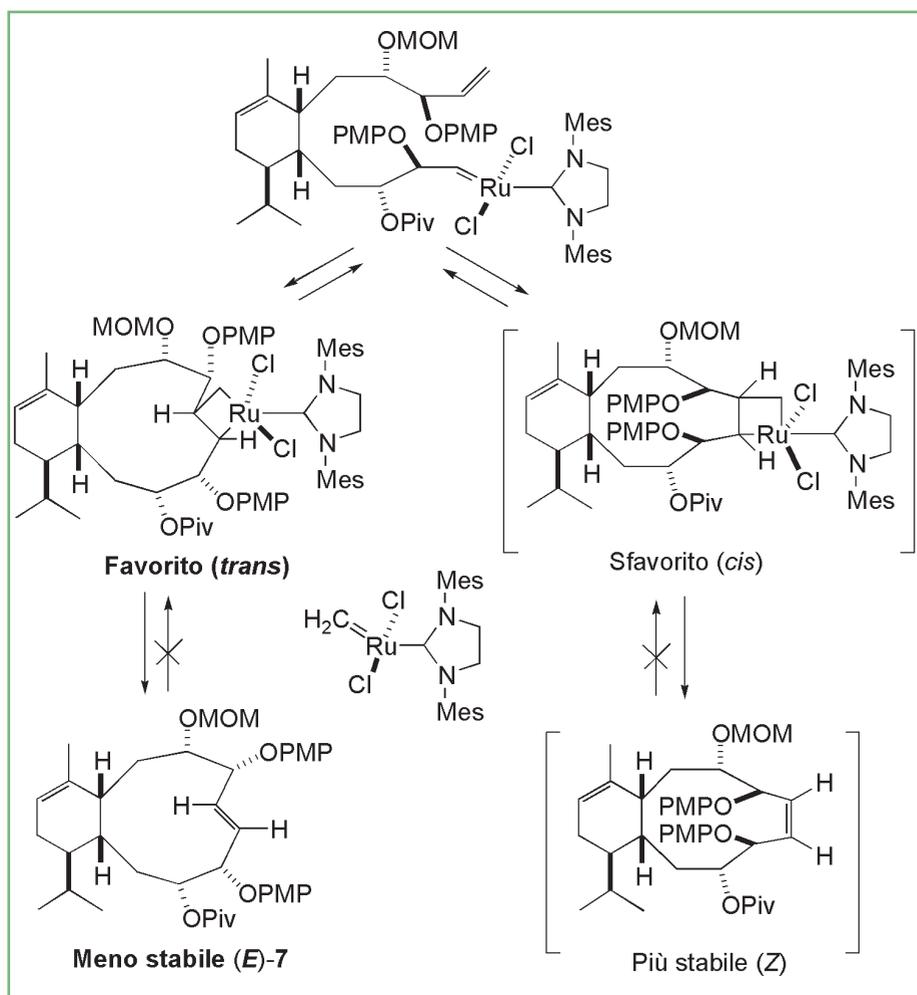
Le sarcodictine A e B (Figura) furono isolate da Francesco Pietra e collaboratori nel 1987 dal corallo stolonifero "Sarcodictyon roseum" nel Mediterraneo [7]. La loro attività antitumorale ed il meccanismo d'azione simile al paclitaxel furono svelati dopo circa una decade, nel 1996 [8]. Nel frattempo, nel 1995, il diterpene glicosidico eleuterobina fu isolato da Fenical e collaboratori da una specie "Eleutherobia" di corallo australiano, e fu descritta la sua potente attività citotossica [9]. Due anni dopo, fu dimostrato che l'eleuterobina possiede un meccanismo d'azione simile alle sarcodictine ed al paclitaxel, e cioè inibisce la mitosi cellulare mediante polimerizzazione della tubulina [10]. Sia le sarcodictine che l'eleuterobina (la famiglia eleutesidica degli agenti antimitotici in grado di stabilizzare i microtubuli) sono caratterizzate da un profilo di attività differente da quello del paclitaxel; in particolare, esse sono attive contro le linee cellulari

tumorali resistenti al paclitaxel e hanno quindi una grande potenzialità come agenti stabilizzanti i microtubuli di seconda generazione [11]. La scarsissima disponibilità da fonti naturali rende la loro sintesi totale vitale per ulteriori studi biologici e farmacologici. Fino ad oggi, le sarcodictine A e B sono state sintetizzate dal gruppo di Nicolaou [12-14], che ha usato una via simile anche per la sintesi dell'eleuterobina [15, 16]. Successivamente, Danishefsky

e collaboratori hanno pubblicato un'elegante via di sintesi alternativa per l'eleuterobina [17-19].

La preparazione del composto 3, un intermedio chiave nella sintesi pubblicata da Danishefsky e collaboratori, è stata recentemente realizzata a partire dal *R*-(-)-carvone nel Dipartimento di Chimica Organica e Industriale dell'Università di Milano e costituisce quindi una sintesi totale formale dell'eleuterobina (Schema 1) [20-22]. Il passaggio chiave della nostra strategia sintetica, usato per ottenere il composto biciclico [8.4.0] 4, è una reazione di "Ring Closing Metathesis" (RCM) del diene densamente funzionalizzato 5. La reazione RCM di numerosi precursori dienici densamente funzionalizzati simili a 5 (con funzionalità alcoliche protette e/o libere sia nelle posizioni alliliche che omoalliliche) era stata precedentemente investigata con una varietà di catalizzatori di metatesi, ma non aveva mai fornito le strutture cicli-





Schema 4 - Reazione RCM sotto controllo cinetico

che attese (Schema 2) [23]. È noto infatti che la reazione RCM è particolarmente sensibile all'ingombro sterico, specialmente in posizione allilica [24]. Tuttavia, nessuno dei precursori dieni pre-

cedentemente esaminati aveva gli alcoli allilici protetti come etere *p*-metossifenilico (PMP), un gruppo in grado di facilitare la reazione RCM in paragone ad altri gruppi protettivi ed ai corrisponden-

ti alcoli liberi. Sulla base di queste premesse, il diene 5 fu trattato con il catalizzatore di Grubbs di "seconda generazione" 6 [25] (Schema 3). Usando condizioni piuttosto drastiche (aggiunta lenta di una soluzione toluenica del catalizzatore di RCM 6 [30% in moli] ad una soluzione toluenica all'ebollizione del diene 5, e successivo riscaldamento per 4 ore a 110 °C), il composto bicyclico 7, con stereochimica *E* al doppio legame, fu formato e isolato con una resa del 64%. Questo risultato stereochimico (*E*) è in stridente contrasto con numerose altre reazioni RCM completamente *Z*-selettive di dieni meno densamente funzionalizzati di 5, e cioè contenenti funzionalità alcoliche protette e/o libere in entrambe le posizioni omoalliliche ma in una sola delle posizioni alliliche (otto differenti esempi provenienti dai nostri laboratori [26-29]). In presenza del catalizzatore di Grubbs di "seconda generazione", in condizioni di controllo termodinamico, questi dieni forniscono immancabilmente i prodotti di ciclizzazione con stereochimica *Z*, più stabili. D'altronde, è noto che i catalizzatori RCM di "seconda generazione" favoriscono la formazione degli stereoisomeri risultanti dal controllo termodinamico nella sintesi di cicli medi [30]. Confidando che la maggiore stabilità del carbociclo *Z* a 10 membri sarebbe prima o poi finita a prevalere, abbiamo continuato la nostra sintesi

A Formal Total Synthesis of Eleutherobin

Eleutherobin is a cytotoxic agent with microtubule stabilising properties. A formal total synthesis of eleutherobin was accomplished by accessing a key-intermediate reported by Danishefsky and co-workers in their 1998 synthesis of the natural product. The key-step of our strategy, used for obtaining the [8.4.0] fused bicyclic ring system, is a ring-closing metathesis (RCM) reaction of a densely functionalized diene under forcing conditions, using Grubbs' second-generation catalyst.

ABSTRACT 

come precedentemente pianificato, e cioè rimuovendo i gruppi PMP (CAN, 80%) ed ossidando il diolo allilico (DMP, 90%). L'enedione 9 così ottenuto mostrò proprietà rimarchevoli: durante la registrazione del suo spettro ¹H-NMR in CDCl₃ isomerizzò allo stereoisomero Z 4, più stabile termodinamicamente (t_{1/2} = 63 ore). Mediante addizione di una quantità catalitica di iodio fu osservata un'isomerizzazione completa in un tempo più breve (24 ore). L'isolamento dello Z enedione 4 attraverso cromatografia diede come unico prodotto il bis-emiacetale 10, dimostrando così la propensione di 4 a mettersi in equilibrio con la sua forma idrata, aggiungendo una molecola d'acqua. Finalmente, il gruppo protettivo MOM della miscela 9/4/10 fu

rimosso (BF₃·Et₂O, Me₂S) a dare il composto 3 (78%), che diede dati analitici e spettroscopici identici a quelli precedentemente pubblicati da Danishefsky e collaboratori (¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRMS, IR, R_f, [α]_D). La nostra ipotesi di lavoro, suffragata da studi computazionali, per spiegare la formazione nella reazione RCM dello stereoisomero E meno stabile è la seguente (Schema 4): l'intermedio *trans*-rutenaciclobutanico è più stabile e si forma preferenzialmente rispetto all'isomero *cis*, con conseguente formazione dello stereoisomero E meno stabile, sotto controllo cinetico (calcoli DFT). Una volta formato, il doppio legame E di 7, affiancato dai due gruppi ingombranti -OPMP, è troppo impedito stericamente per reagire ancora con il complesso

rutenio-metilidenico attraverso una cicloaddizione [2+2] e successiva cicloversione (in accordo con il meccanismo Hérisson-Chauvin della RCM [31]). Quindi, l'equilibrio tra i prodotti chiusi e aperti è arrestato ed il normale controllo termodinamico è in questo caso inibito.

Ringraziamenti: Ringrazio la Commissione Europea per il supporto finanziario (IHP Network grant "Design and synthesis of microtubule-stabilising anti-cancer agents" HPRN-CT-2000-00018) e per le posizioni postdoctorali "Marie Curie" di O. Sharon, L. Caggiano, R. Beumer, P. Bayón, J. Telser. Ringrazio inoltre sentitamente Merck Research Laboratories (Academic Development Program Award a C. Gennari) e Università di Milano per il supporto finanziario e per la borsa di dottorato di D. Castoldi.

Bibliografia

- [1] M.C. Wani *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 2325.
- [2] Per un approfondimento sugli studi chimici e biologici riguardanti il paclitaxel, è consigliata la lettura della seguente rassegna: K.C. Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, **33**, 15.
- [3] E.K. Rowinsky, *Ann. Rev. Med.*, 1997, **48**, 353.
- [4] D.C. Myles, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 2002, **37**, 125.
- [5] F. Cachoux *et al.*, *Synlett.*, 2006, 1384.
- [6] Il discodermolide è stato successivamente ritirato dallo sviluppo clinico: Novartis AG, Annual Report, file n. 1-15024, Form 20-F, Jan. 28, 2005, p. 42.
- [7] M. D'Ambrosio *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1987, **70**, 2019.
- [8] C. Battistini *et al.* (Pharmacia SpA), *PCT Int. Appl. WO* 9636335, 1996; *Chem. Abstr.* 1997, **126**, P54863x.
- [9] W. Fenical *et al.* (University of California), US 5,473,057, 1995; *Chem. Abstr.* 1996, **124**, P194297z.
- [10] T. Lindel *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 8744.
- [11] Per un approfondimento sugli studi chimici e biologici riguardanti gli eleutesidi, è consigliata la lettura della seguente rassegna: K.C. Nicolaou *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1999, **47**, 1199.
- [12] K.C. Nicolaou *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 11353.
- [13] K.C. Nicolaou *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8661.
- [14] K.C. Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 1418.
- [15] K.C. Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1997, **36**, 2520.
- [16] K.C. Nicolaou *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8674.
- [17] X.-T. Chen *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 185.
- [18] X.-T. Chen *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 789.
- [19] X.-T. Chen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6563.
- [20] D. Castoldi *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 588.
- [21] D. Castoldi *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 51.
- [22] C. Gennari, in *Seminars in Organic Synthesis*, a cura di E. Marcantoni, G. Renzi, Società Chimica Italiana, Roma, ISBN 88-86208-30-8, 2005, 189.
- [23] L. Caggiano *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 7913.
- [24] A. Fürstner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 3012 e riferimenti citati.
- [25] R.H. Grubbs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 3760 e riferimenti citati (lezione in occasione del premio Nobel).
- [26] J. Telser *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 9187.
- [27] R. Beumer *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 681.
- [28] R. Beumer *et al.*, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 8803.
- [29] D. Castoldi *et al.*, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 2123.
- [30] A. Fürstner *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 7061.
- [31] Y. Chauvin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 3741 e riferimenti citati (lezione in occasione del premio Nobel).