



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. STEFANO MANFREDINI

PROGETTAZIONE E SINTESI DI POTENZIALI AGENTI ANTITUMORALI
INIBITORI DEL CHAPERONE MITOCONDRIALE "TUMOR NECROSIS
FACTOR-RECEPTOR ASSOCIATED PROTEIN 1" (TRAP1)

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

Dottorando

Dott. Costantini Cristiana

Tutore

Prof. Rondanin Riccardo

Cotutore

Prof. Simoni Daniele

Anni 2012/2014

INDICE

INTRODUZIONE:	1-18
<i>1. I chaperoni molecolari</i>	1-3
<i>1.1 Hsp90</i>	3-6
<i>1.2 Ruolo di Hsp90 nel processo di apoptosi</i>	6-7
<i>1.3 Hsp90 a livello mitocondriale</i>	7-9
<i>1.4 TRAP1</i>	9-10
<i>1.5 Meccanismo di TRAP1</i>	11-12
<i>1.6 Inibitori di Hsp90</i>	12-15
<i>1.7 Inibitori di Hsp90 e TRAP1 a livello mitocondriale</i>	15-18
SCOPO DEL LAVORO	19-23
PERCORSO SINTETICO	24-49
<i>I: Derivati con veicolo cationico legato ad un farmacoforo attivo su Hsp90</i>	25-26
<i>II: Primo obiettivo: scelta di un linker adatto</i>	26-31
<i>III: Derivati contenenti catene poliamminiche:</i>	32-33
<i>IV: Derivati contenenti catene portanti cariche cationiche permanenti</i>	34-36
<i>V: Derivati guanidinici</i>	37-38
<i>VI: Secondo obiettivo: modifica delle sostituzioni all'anello resorcinolico</i>	39-40
<i>VII: Primo approccio sintetico teorizzato: ciclizzazione di un intermedio acetammidico</i>	41-42
<i>VIII: Secondo approccio: cicloaddizione su un cianoacetofenone</i>	42-44
<i>IX: Terzo approccio: sintesi di analoghi ossadiazolici</i>	45-49
RISULTATI BIOLOGICI E DISCUSSIONE	49-53
PARTE SPERIMENTALE	54-92
BIBLIOGRAFIA	93-94

INTRODUZIONE

1. I chaperoni molecolari

La conformazione nativa di una proteina si può descrivere come una struttura tridimensionale stabile e funzionale, caratterizzata da una particolare conformazione, unica, e da un minimo di energia potenziale che consente alla proteina di svolgere adeguatamente la funzione a cui è deputata.

Il processo tramite il quale una proteina neo sintetizzata acquista la sua conformazione nativa prende il nome di "folding", o ripiegamento, ed è un processo reversibile (Fig.1).

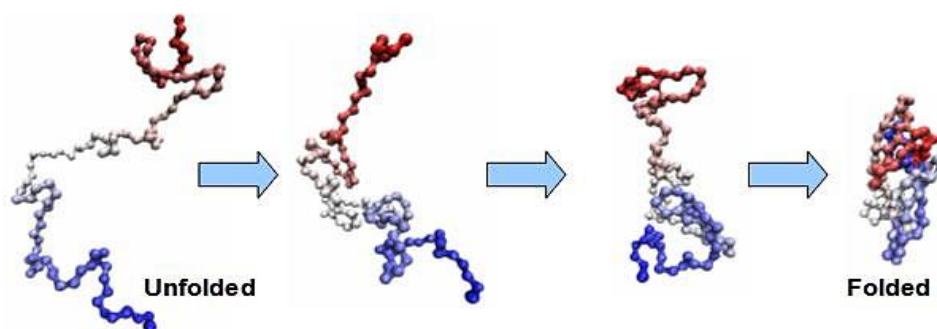


Figura 1. Il meccanismo del folding è probabilmente un processo progressivo. Le strutture secondarie (α -eliche e strutture β) si formano piuttosto rapidamente, dato che devono sottostare a "costrizioni" più rigide e a breve distanza. Le regioni flessibili iniziano poi a ripiegarsi per effetto delle interazioni a lungo raggio e delle interazioni con il solvente. I residui polari tenderanno a rimanere esposti alla superficie, mentre quelli apolari tenderanno ad essere "sepolti" all'interno della proteina.

Infatti, esponendo la stessa ad alcuni agenti chimico-fisici (pH, sostanze chimiche, radiazioni, calore), si può provocare la denaturazione (unfolding) della proteina, e quindi la perdita della funzionalità, e proprio attraverso l'uso di tali agenti è possibile studiare *in vitro* i meccanismi del folding. *In vitro*, infatti, un buon numero di proteine denaturate tende a riacquistare spontaneamente la forma nativa (refolding o rinaturazione) per semplice rimozione delle cause che ne hanno provocato l'unfolding. Il fenomeno del refolding dimostra che la sequenza amminoacidica di una proteina contiene in sé tutta l'informazione necessaria per la corretta strutturazione tridimensionale. *In vivo* però, pur essendo questo un processo stabile da un punto di vista termodinamico, il folding viene spesso

facilitato da un gruppo di proteine particolari chiamate chaperoni molecolari. Per definizione questi sono delle proteine che legano e stabilizzano i conformeri instabili di altre proteine e ne facilitano la corretta funzione in vivo tramite il folding, l'assemblaggio oligomerico, il trasporto verso specifici compartimenti della cellula e l'eliminazione in seguito ad un processo di degradazione.^{1,2} Nello specifico la funzione principale di questi chaperoni è quella di assistere alcune proteine, definite come proteine clienti, nel folding e mantenerne la conformazione nativa; contribuiscono inoltre al mantenimento dell'omeostasi cellulare in modo da evitare l'aggregazione ed il misfolding (errato ripiegamento).

I chaperoni molecolari sono di vitale importanza per le nostre cellule durante il loro intero ciclo di vita e sono ancor più necessari dopo eventi quali avvelenamento, brusco cambiamento nell'ambiente cellulare e stress dato da shock termico (da cui il nome Heat Shock Protein, o Hsp).³ D'altra parte, svolgono un ruolo essenziale nell'eziologia di numerose patologie come il cancro, malattie autoimmuni, diabete ed ischemie; di conseguenza, rappresentano un target molto importante nella cura di tali patologie.

Le principali attività della normale vita cellulare in cui sono coinvolte queste proteine riguardano:

- il raggiungimento e il mantenimento del corretto stato conformazionale delle catene polipeptidiche appena sintetizzate;
- il mantenimento e la creazione di uno stato parzialmente unfolded delle proteine, favorendone così il trasporto attraverso la membrana mitocondriale;
- la stabilizzazione di proteine danneggiate formatesi a seguito di stress chimici o fisici facilitandone la rinaturazione e/o degradazione.

I fattori che determinano la specifica attività delle Hsp sono rappresentati dalla struttura del chaperone ma anche dalla dimensione e localizzazione della proteina cliente.

È stato dimostrato che il ruolo dei chaperoni ha un costo in termini di energia. Essi, infatti, possiedono una specifica proprietà enzimatica: sono ATP-asi, cioè scindono ATP, che è consumato, in ultima analisi, per assistere il corretto ripiegamento delle proteine. Inoltre, ai fini del loro funzionamento, spesso la loro attività è accompagnata da quella di un co-chaperone, la cui natura è varia.

Le conseguenze di un folding errato potrebbero portare a condizioni patologiche come, ad esempio, l'aggregazione proteica, lo sfaldamento di complessi regolativi o l'inopportuna attivazione di vie di segnalazione; le Hsp, quindi, sono anche in

grado di rimediare a danni dovuti a stress di carattere chimico-fisico che potrebbero portare alla morte cellulare.

1.1 Hsp90

Esistono diverse famiglie di chaperoni molecolari, la cui classificazione è stata fatta sulla base dei loro pesi molecolari, espressi in KDa.

Su questa base le Hsp sono state classificate in 6 famiglie: Hsp 100 (100 - 110 KDa), Hsp 90 (83 - 90 KDa), Hsp 70 (66 - 78 KDa), Hsp 60, Hsp 40 e le small Hsp (15 - 30 KDa). Alcune di queste sono espresse costitutivamente; altre vengono trascritte solo in condizioni di stress e si collocano all'interno di diversi compartimenti cellulari quali nucleo, citosol, mitocondrio, reticolo endoplasmatico.

Il principale membro della famiglia delle Heat shock proteins è Hsp90, uno dei chaperoni molecolari più conservati e presente in moltissimi organismi dal batterio all'uomo. Ha suscitato notevole interesse dal punto di vista scientifico poiché partecipa alla regolazione di molte proteine clienti coinvolte nei processi di segnalazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare

Hsp90 si trova ubiquitariamente espresso in tutte le cellule normali ed è overespresso in quelle tumorali; si trova in numero abbondante nel citosol di cellule procariotiche ed eucariotiche (1-2% delle proteine totali in condizioni fisiologiche, valore che può arrivare al 4-6% in condizioni di stress cellulare);⁴ ma è presente anche nel nucleoplasma, nel reticolo endoplasmatico e nel mitocondrio.⁵

Hsp90 esiste sotto forma di omodimero composto da 4 parti:

- la parte N- terminale contiene un sito di legame per l'ATP ed è in grado di legare anche sostanze come la Geldanamicina (GA) e il Radicicolo (RDC);
- un "dominio di carica" che funge da linker tra la regione N-terminale e la regione intermedia;⁶
- il dominio intermedio
- il dominio C-terminale dove è stato trovato un secondo sito ATPasico in grado di legare la Novobiocina; è questa la regione deputata alla formazione del dimero.⁷ (Fig. 2)

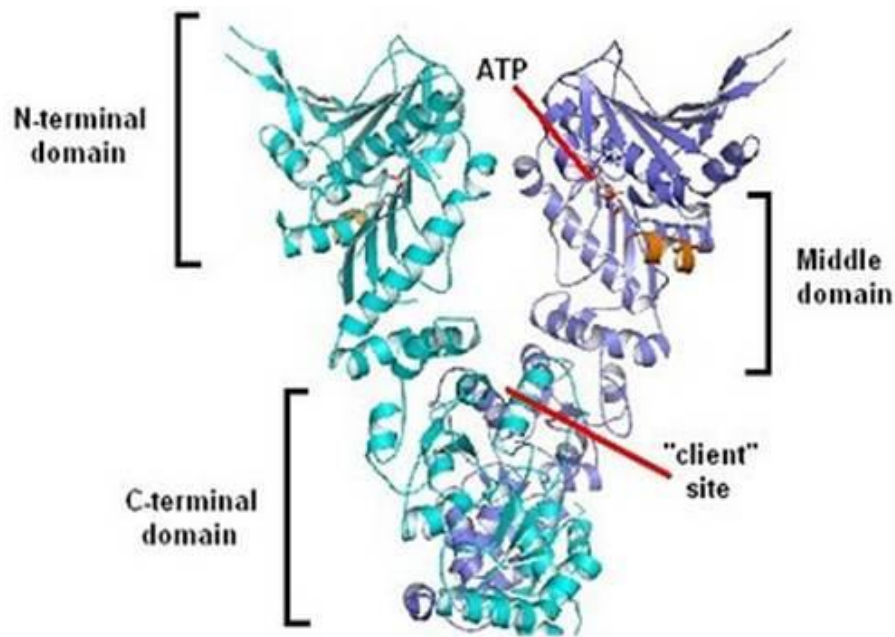


Figura 2: Struttura di Hsp90, divisa nelle tre regioni principali: dominio N-terminale, dominio centrale e dominio C-terminale.

Sono state identificate cinque isoforme di Hsp90, che differiscono per la localizzazione cellulare. Le due maggior isoforme citoplasmatiche sono Hsp90 α (inducibile) e Hsp90 β (costitutiva), che condividono circa l'85% dell'identità di sequenza a livello proteico. Altre isoforme includono GRP94, nel reticolo endoplasmatico e TRAP1, nella matrice mitocondriale.

L'azione chaperonica di Hsp90 è in parte dovuta all'interazione ed all'idrolisi dell'ATP ed in parte all'azione combinata di co-chaperoni.

Studi biochimici hanno approfondito i riarrangiamenti strutturali dovuti al legame ed all'idrolisi dell'ATP:⁸

Il legame dell'ATP crea un coperchio molecolare che provoca la chiusura del sito di legame del nucleotide, seguito da una lenta transizione ad uno stato chiuso in cui i domini N terminali di ogni monomero interagiscono.

L'idrolisi dell'ATP porta ad un secondo stato ancora strutturalmente ambiguo.

La dissociazione dell'ADP riporta Hsp90 all'originale conformazione aperta.

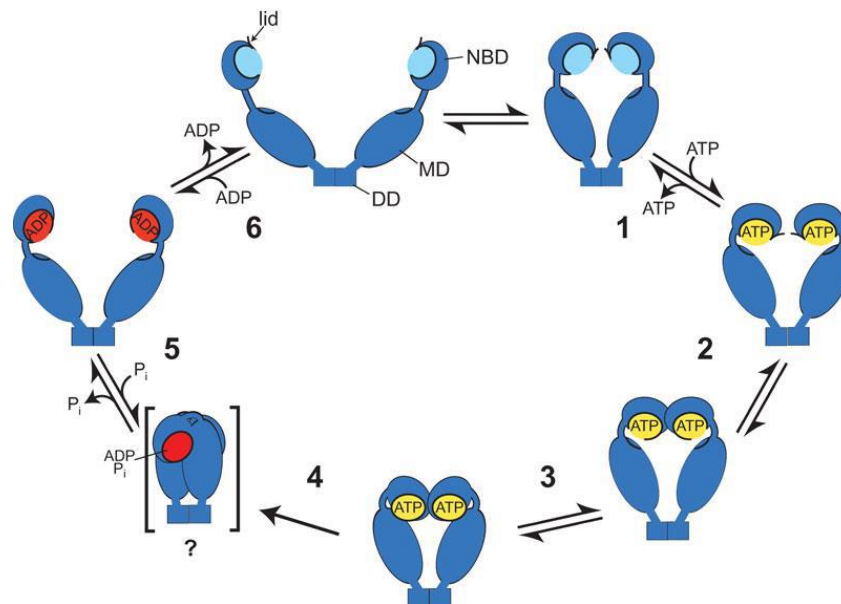


Figura 3 Ciclo ATPasico. Valutazione del legame dell'ATP e delle modifiche conformazionali in Hsp82, GRP94 e TRAP-1 eseguita mediante analisi cinetiche. Lo stato ottenuto dopo l'idrolisi del nucleotide sembra essere transiente e non isolabile, le velocità variano a seconda dell'isoforma valutata.

Questi cambiamenti strutturali costituiscono il fattore limitante del ciclo ATPasico e si verificano molto più lentamente rispetto all'idrolisi dell'ATP stesso.

Autonomamente Hsp90 non è in grado di promuovere il folding e/o l'attivazione di nessuna di queste proteine clienti ma in aggiunta al legame e all'idrolisi dell'ATP, contribuiscono al ciclo chaperonico anche le interazioni con diversi co-chaperoni.⁹

Il ciclo inizia da un peptide di nuova sintesi affine al complesso Hsp70/Hsp40, associato con Hsp90 in conformazione aperta; la proteina Hop (Hsp organization proteins) interagisce sia con Hsp90 che con Hsp70, non si lega solo al dominio C terminale MEEVD di Hsp90 grazie al dominio TRP, ma è attivo anche sulla regione N terminale impedendone la dimerizzazione.

Inibisce così l'attività ATPasica e promuove il trasferimento dei clienti da Hsp70 a Hsp90. Quando questa si associa all'ATP subisce una modifica conformazionale che permette l'interazione con altri co-chaperoni come p23.

Un ulteriore co-chaperone, AHA 1 (attivatore ATPasico di Hsp90) connesso con il dominio centrale di Hsp90, facilita gli adeguamenti conformazionali stimolando l'attività ATPasica del chaperone, in seguito all'idrolisi dell'ATP, la proteina cliente correttamente piegata viene rilasciata dalla heat shock protein. L'inibizione di Hsp90 tramite agenti che si legano al sito N-terminale non permettono la maturazione di queste proteine clienti, ciò comporta la degradazione di queste proteine oncogeniche da parte del sistema ubiquitina-proteasoma.

Molte proteine responsabili della progressione maligna nelle cellule tumorali sono proteine clienti di Hsp90, il quale è overespresso nelle linee cellulari maligne e la sua overespressione è correlata con la proliferazione di questo tipo di cellule.

Fino ad oggi sono stati individuati più di 40 substrati oncogeni di Hsp90, ed è interessante notare come queste proteine clienti siano implicate in ciascuno dei processi chiave che conducono alla proliferazione neoplastica maligna. Infatti, Hsp90, ha un ruolo critico per le cellule tumorali; in quanto permette di mantenere le funzioni di proteine mutanti costituite durante il processo di cancerogenesi e sembra anche essere attivamente coinvolto nella protezione delle cellule dal processo di apoptosi.

1.2 Ruolo di Hsp90 nel processo di apoptosi

L'apoptosi è un meccanismo che si attiva in varie fasi della vita di un organismo, come ad esempio durante l'embriogenesi, quando è necessario che alcune cellule muoiano per conferire al tessuto o all'organo una forma finale. Essa è presente anche negli organismi adulti per permettere una corretta omeostasi cellulare: ogni giorno muoiono tra i 50 e i 70 miliardi di cellule nel nostro organismo grazie al processo apoptotico, e vengono rimpiazzate da nuove cellule che si formano grazie alla mitosi.

Una non corretta regolazione dei meccanismi che coinvolgono l'apoptosi può avere diverse conseguenze: ad esempio se le cellule che si riproducono sono in numero maggiore rispetto a quelle che muoiono, si può andare incontro alla formazione di un tumore; oppure se le cellule che muoiono non sono compensate da un numero sufficiente di nuove unità, si hanno disordini da perdita delle cellule. Talvolta però il suicidio cellulare non è programmato, ma avviene in risposta a segnali biologici attivati in seguito ad un potenziale danno o pericolo per l'organismo. In generale l'apoptosi non è causata da agenti patogeni esterni, anche se, alcune particolari condizioni come l'esposizione alle radiazioni o ad agenti chimici, possono provocarla.

Di fatto, l'elevata espressione di Hsp90 nelle cellule tumorali gioca un ruolo chiave nella protezione dall'apoptosi, che sia essa spontanea, quindi associata alla manifestazione maligna, o che venga indotta da terapia; così alla overespressione di Hsp90 corrisponde, purtroppo, in molti tipi di cancro, una prognosi negativa in termini di sopravvivenza del paziente e di risposta alla terapia. I meccanismi

molecolari che vedono coinvolto questo chaperone nella resistenza alle terapie antitumorali riguardano, in realtà, differenti aspetti: Hsp90 assicura citoprotezione riparando efficientemente i danni causati dalla somministrazione di farmaci citotossici; inoltre protegge le cellule cancerose dall'apoptosi spontanea, preserva il microcircolo interno al tumore e ancora migliora la riparazione dei danni al DNA. Si capisce quindi come mai i livelli di Hsp siano elevati in diverse tipologie di cancro ed essendo molte le proteine nelle cellule tumorali che dipendono dalla loro attività per la propria stabilità, conformazione terziaria e maturazione, Hsp90 emerge come promettente target nel trattamento del cancro.

Quando la cellula si trova in situazioni di stress non sempre innesca il processo di apoptosi, ma al suo interno possono attivarsi una serie di meccanismi che permettono la riparazione del danno subito; questo è un fattore non sempre positivo perchè in certe condizioni patologiche, come ad esempio i tumori, l'apoptosi potrebbe essere un meccanismo favorevole per impedire la moltiplicazione e la diffusione delle cellule cancerogene.

1.3 Hsp90 a livello mitocondriale

Studi recenti hanno dimostrato la presenza di Hsp90 all'interno del compartimento mitocondriale e spiegato l'implicazione di questa proteina nel meccanismo di induzione dell'apoptosi.

Il processo apoptotico può essere attivato attraverso due vie: una estrinseca e una intrinseca e nello specifico il mitocondrio gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'apoptosi tramite la via intrinseca.

Infatti, è stato dimostrato che le Hsp intervengono nella regolazione del processo di apoptosi a più livelli della via di segnalazione.

La maggior parte delle Hsp ricopre un proprio ruolo nei pathway apoptotici e promuove la sopravvivenza cellulare impedendo che la membrana esterna del mitocondrio diventi permeabile: ciò avviene operando a livello dell' MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*), situato nella membrana interna mitocondriale e coinvolto nella regolazione della concentrazione di ioni calcio (Ca^{2+}), del pH e del voltaggio della matrice mitocondriale; si inibisce così il rilascio di citocromo c, l'attivazione delle caspasi e l'assemblaggio dell'apoptosoma.

Il canale MPTP è costituito da diverse proteine trans membrana:¹⁰

- Il canale anionico voltaggio dipendente (VDAC) localizzato sulla membrana mitocondriale esterna;
- Il traslocatore di adenin-nucleotide (ANT) che si trova sulla membrana mitocondriale interna che funge da porta d'ingresso del poro;
- La ciclofillina D (Cyp D), una proteina solubile della matrice mitocondriale che agisce come regolatore positivo nell'apertura dell' MPTP con conseguente incremento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna.¹¹ (Fig. 4)

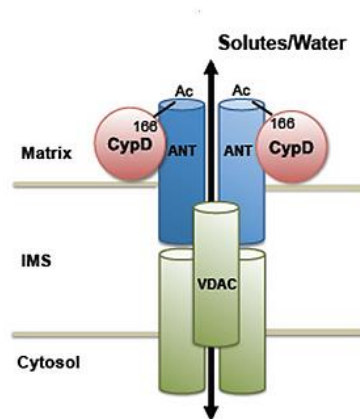


Figura 4: Mitochondrial Permeability Transition Pore

Il primo fattore ad essere rilasciato come segnale proapoptotico è il citocromo c (cyt c) che è l'inziatore della cascata apoptotica.

Quindi, all'interno del mitocondrio si verifica un'interazione tra Hsp90 ed altre proteine, TRAP1 (TNF receptor-associated protein 1) e la ciclofillina D (CypD), che limita la permeabilità della membrana esterna del mitocondrio, considerata responsabile dell'innesco della cascata apoptotica in numerose vie di morte cellulare.

Nello specifico TRAP1, Hsp90 e la chaperonina Hsp60 agiscono mediante interazione con CypD, si costituisce un complesso multichaperonico in cui i tre componenti si legano simultaneamente a CypD a livello di diversi siti di riconoscimento non sovrapposti tra di loro. Ne consegue che il complesso così costituito antagonizza l'apertura dell' MPTP e blocca nelle fasi iniziali il processo apoptotico a livello delle cellule tumorali.

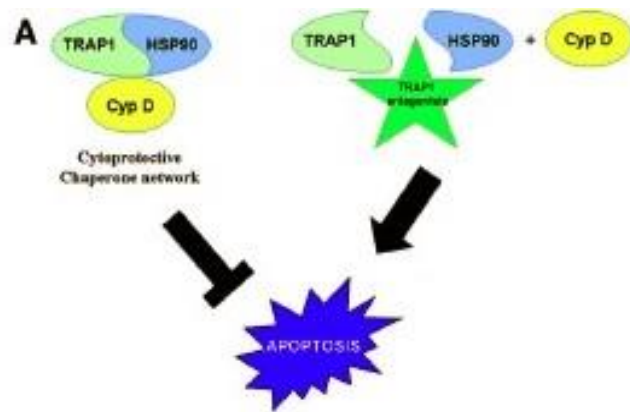


Figura 5: Schema del meccanismo pro-apoptotico degli antagonisti di TRAP1

E' stato così dimostrato che anche TRAP1 (un Hsp75 mitocondriale con funzione antiossidante ed anti-apoptotica) assieme ad Hsp90 fa parte di una stessa via mitocondriale selettivamente stimolata nelle cellule tumorali, che antagonizza l'attività pro-apoptotica della Ciclofillina D.

1.4 TRAP1

TRAP1 è stato inizialmente identificato come un omologo di Hsp90 (34% identità e 60% omologia rispetto alla Hsp di 90 kDa) che può interagire con il recettore TNF (da cui deriva il nome) e la proteina del retinoblastoma (Rb).¹² Successive analisi riguardo TRAP1 hanno dimostrato che si accumula in preferenza nella matrice mitocondriale, con una frazione che si può localizzare anche a livello dello spazio intermembrana; si è poi provata l'esistenza di una serie di 59 amminoacidi nella porzione N-terminale contenente la Mitochondrial Targeting-sequence (MTS), che permette alla proteina di accumularsi all'interno del compartimento mitocondriale e che viene scissa subito dopo la traslocazione all'interno dell'organulo, permettendo la maturazione della proteina stessa.¹³

Nel dominio N-terminale (che è la regione maggiormente conservata) sia Hsp90 che TRAP1 possiedono un sito di legame per l'ATP; entrambe, inoltre, sono inibite dalla Geldanamicina, un inibitore di Hsp90 con azione a livello della tasca ATPasica ("ATP pocket"), alle medesime concentrazioni.

Questo indica che i farmaci che si legano al dominio N-terminale di Hsp90 potrebbero inibire anche l'attività di TRAP1 in vitro.

L'inibizione di TRAP1 avviene però solo in vitro in quanto i comuni farmaci usati per antagonizzare Hsp90 non possono alterare in vivo la funzionalità di TRAP1 a causa proprio della sua localizzazione mitocondriale.

Bisogna ricordare che Hsp90 e TRAP1 sono abbondantemente presenti nel compartimento mitocondriale di cellule tumorali mentre , nello stesso organulo, si ritrovano a bassi livelli in cellule normali; questa riduzione dell'espressione dei chaperoni avviene in parte anche per le isoforme citoplasmatiche di Hsp90, ma in questo caso il chaperone è essenziale per la normale vitalità cellulare e ciò permette una minore selettività.¹⁴

Proprietà struttura-funzione	TRAP-1	Hsp90
ATP pocket nella porzione N-terminale con i domini "Bergerat fold"	Si	Si
Struttura omodimerica compatta	Si	Si
Modifiche post-traslazionali (fosforilazione, acetilazione)	Potenziale	Si
Sequenza MEEVD nella porzione C-terminale	No	Si
Legame ai co-chaperoni (p23,Hop)	No	Si
Inibizione da parte di Geldanamicina e Radicicolo (in vitro)	Si	Si
Localizzazione mitocondriale	Si	Si (solo nei tumori)

1.5 Meccanismo di TRAP1

Quando in una cellula vi è una eccessiva produzione di radicali liberi dell'ossigeno si va incontro a stress ossidativo con conseguente disfunzione mitocondriale e morte cellulare. Pertanto, la prima funzione attribuita a TRAP1 è stata la protezione del mitocondrio contro lo stress ossidativo indotto da ROS (reactive oxygen species), questi radicali possono essere la causa di molte patologie come ad esempio la neurodegenerazione ed hanno un ruolo fondamentale nel promuovere l'apoptosi. Conducono alla morte cellulare mediante l'apertura dell'MPTP a livello della membrana interna del mitocondrio, con conseguente perdita del potenziale di membrana, rigonfiamento del mitocondrio e rottura della membrana esterna.

Quando sono presenti considerevoli livelli di ROS o una elevata $[Ca^{++}]$, la CypD, che ricordiamo essere un costituente dell' MPTP, cambia la sua conformazione e consente l'apertura del canale in maniera non selettiva.

Sia Hsp90 che TRAP1 impediscono questo meccanismo: essi interagiscono con la CypD modulandone la sua azione ed impedendo così l'apertura del canale.

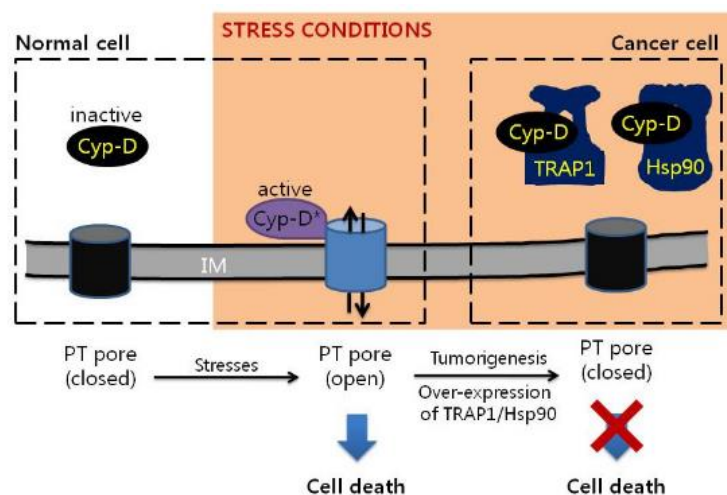


Figura 6:Regolazione dell' M PTP a livello della membrana mitocondriale

TRAP1 viene così a rappresentare un fattore che protegge la cellula dall'apoptosi. Senza l'apertura dell' MPTP non è possibile innescare la cascata apoptotica perchè è impedito il rilascio di citocromo c che è l'iniziatore del processo.

TRAP1 si vede quindi direttamente coinvolto nella protezione da danni al DNA causati da agenti ossidanti e nell'apoptosi; in più dati preliminari suggeriscono che TRAP1 potrebbe rappresentare un valido biomarker del cancro alle ovaie: difatti i

suoi livelli sono significativamente più alti nelle cellule tumorali cisplatino-resistenti e nelle linee cellulari del carcinoma ovarico.

1.6 Inibitori di Hsp90

In base a studi effettuati sulle cellule, è stato osservato che l'uso di farmaci inibitori del meccanismo di Hsp90 citoplasmatico porta ad un blocco nella proliferazione cellulare maligna; questi composti hanno anche scarsa tossicità nei confronti delle cellule dei tessuti normali. Questa selettività può essere spiegata dal fatto che le proteine che si sviluppano nei tessuti cancerogeni sono altamente destabilizzate da fattori quali ipossia, pH basico e un cattivo stato nutrizionale; tutti questi fattori rendono le proteine particolarmente dipendenti dall'attività di Hsp90 che, infatti, viene overespresso in queste condizioni.

Gli studi in vivo inoltre hanno confermato questa inibizione e in alcuni casi hanno mostrato anche una regressione della neoplasia.

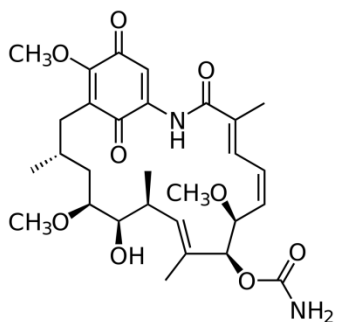
Gli inibitori di Hsp90 sono così diventati una promettente classe di farmaci antitumorali per il trattamento di diversi tipi di cancro.

Queste molecole impediscono ad Hsp90 di ripiegare e stabilizzare le proteine clienti, le quali si associano in un complesso non funzionale e per questo vengono degradate mediante ubiquitinizzazione e proteolisi proteasoma dipendente. Il capostipite di questi composti è di origine naturale ed è un antibiotico di tipo benzochinonico isolato da *Streptomyces Higroscopicus* nel 1970: la Geldanamicina. Questa molecola si lega al sito ATPasico sul dominio N-terminale di Hsp90, impedendo quindi il legame con l'ATP e distruggendo la conformazione ATP dipendente di una serie di proteine-clienti.

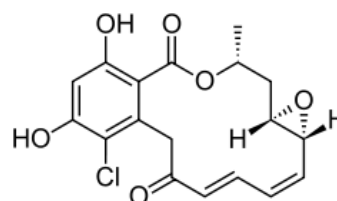
Nonostante la Geldanamicina presenti un'ottima attività antitumorale, si è visto che causa gravi effetti epatotossici; studi preclinici hanno inoltre evidenziato scarsa solubilità in acqua.

Oltre alla Geldanamicina, un altro composto naturale di notevole importanza è il Radicicolo, un macrolide isolato per la prima volta dal *Monosporium Bonorden* nel 1953; esso provoca l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 e G2, mimando l'azione nucleotidica e inserendosi nella tasca di legame ATP/ADP dipendente. È risultato attivo negli studi condotti in vitro mostrando una potente attività antiproliferativa, ma è risultato inattivo negli studi in vivo a causa della sua rapida conversione in un metabolita inattivo.

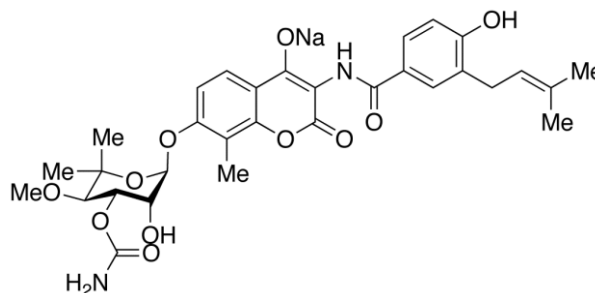
Un altro composto studiato è stata la Novobiocina, un antibiotico di tipo cumarinico, isolato dallo *Streptomyces Spheroids*, in grado di legare la tasca di legame dell'ATP della DNA girasi. La particolarità di questo composto risiede nel fatto che è l'unico inibitore di Hsp90 a legarsi al sito C-terminale, a differenza della Geldanamicina e del Radicicolo.



Geldanamicina (I)

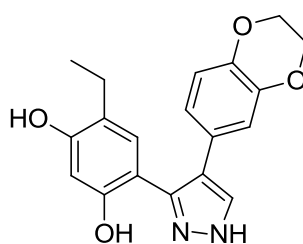


Radicicolo(II)



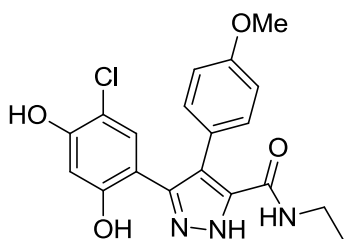
Novobiocina (III)

Per quanto riguarda gli inibitori di tipo sintetico, dalla letteratura è noto che, mantenendo il nucleo resorcinolico del Radicicolo, si possono sviluppare una nuova classe di composti. Il primo tra questi è CCT18159, che ha mostrato una potente attività antitumorale in vitro.

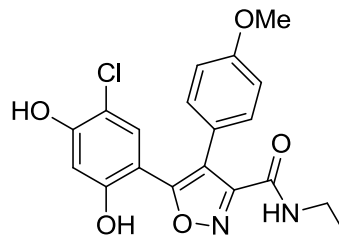


CCT18159 (IV)

In base alla struttura cristallografica di questo composto e alla sua capacità di legarsi alla tasca ATPasica di Hsp90, l'azienda farmaceutica Vernalis ha proposto una nuova classe di molecole, il cui capostipite è VER-49009, che mantiene l'anello pirazolico. Successivamente è stato ottenuto un analogo di tipo isossazolico: VER-50589.



VER49009 (V)

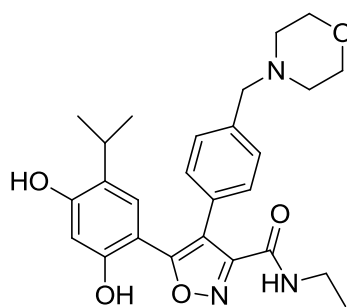


VER50589 (VI)

I derivati che contengono il nucleo isossazolico si sono rivelati la classe con maggiore attività antiproliferativa, addirittura venti volte superiore ai precedenti derivati diarilpirazolici.

Notevole importanza ricopre la posizione 3 dell'isossazolo e la posizione 5 del pirazolo; analisi cristallografiche hanno mostrato che una sostituzione ammidica in questa posizione consente legami idrogeno con un residuo di Gly97 ed è proprio questa interazione a conferire potenza al legame della molecola con la tasca di Hsp90.

Il composto NVP-AUY922, ceduto da Vernalis a Novartis, è risultato quello con maggiore affinità per il sito di legame pur mostrando gli stessi legami idrogeno del composto VER505989.



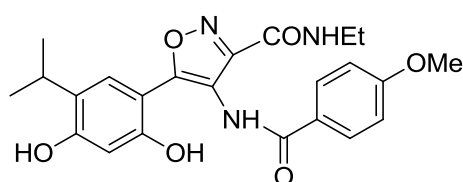
NVP-AUY922 (VII)

La sostituzione del cloro con l'isopropile consente un'ulteriore interazione idrofobica con la Leu107 e con altri aminoacidi della tasca lipofila. Tale composto

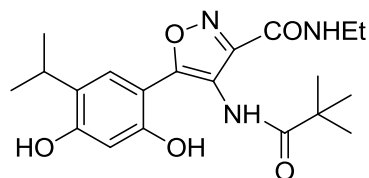
è già in fase clinica I e II dal momento che ha dimostrato i risultati migliori in termini di attività rispetto ai precedenti.

Dopo numerosi anni di ricerche condotte nei laboratori del gruppo del Prof. Simoni dell'Università degli Studi di Ferrara, si sono ottenuti altri derivati attivi nell'inibire Hsp90 modificati chimicamente rispetto alle strutture Vernalis.

Tra le molecole più attive possiamo ricordare le seguenti:



(VIII)



(IX)

L'introduzione di un azoto in posizione 4 del nucleo isossazolico ha consentito di apportare un cambiamento alle molecole di riferimento, senza però modificarne l'attività o la capacità di binding del sito recettoriale.

1.7 Inibitori di Hsp90 e TRAP1 a livello mitocondriale

I composti appena descritti sono stati principalmente investigati riguardo l'inibizione di Hsp90 citoplasmatico, e quindi riferendosi alla interferenza con il corretto folding e conseguente funzionalità di importanti oncoproteine.

Passando però, ad analizzare gli inibitori di Hsp90 a livello mitocondriale; ricordiamo che nelle cellule cancerogene i livelli di TRAP1 e Hsp90 sono particolarmente elevati data la condizione di stress ossidativo in cui si trovano e qui svolgono un ruolo importante nell'impedire l'avvio del processo apoptotico segnalato dalla via intrinseca. In questa situazione, infatti, le proteine clienti sono ancor più dipendenti dall'azione dei chaperoni in quanto la loro struttura è destabilizzata dall'ambiente circostante.

Una delle strategie applicabili per ristabilire un normale processo apoptotico sarebbe quindi quella di sintetizzare inibitori di Hsp90 e TRAP1 che vadano ad agire a livello mitocondriale per impedire l'azione di questi chaperoni e permettere l'attivazione della cascata apoptotica nelle cellule cancerogene, con conseguente morte cellulare.

Per questo tipo di strategia, può esistere un problema pratico nel veicolare ed accumulare i farmaci all'interno del compartimento mitocondriale.

Fin'ora la maggior parte degli sforzi compiuti nello sviluppo di molecole volte a raggiungere il mitocondrio si sono basati su due distinte caratteristiche mitocondriali:

- il meccanismo di trasporto di proteine all'interno dell'organello;
- l'elevato potenziale di membrana presente a cavallo della membrana interna.

In particolare, questa seconda strada offre un'opportunità per colpire selettivamente il mitocondrio, come dimostra il fatto che numerosi cationi lipofili si accumulano all'interno di questo compartimento cellulare grazie ad un meccanismo di gradiente non ancora conosciuto.

I farmaci usati convenzionalmente come inibitori di Hsp90 possono essere efficaci anche nell'inibire la funzione dell'omologo presente a livello mitocondriale, ciò avviene in vitro per la loro somiglianza strutturale. Molto spesso però l'inibizione non si ripresenta in vivo poiché il fattore limitante è il passaggio dei farmaci stessi all'interno del compartimento mitocondriale. In pratica questi inibitori sono incapaci di attraversare la membrana mitocondriale interna a causa della sua elevata selettività. Infatti questa vera e propria "barriera" risulta impermeabile a quasi tutti gli ioni e a piccole molecole, compresi i protoni; le sole specie chimiche che possono attraversarla sono quelle che possiedono uno specifico trasportatore inserito nella membrana stessa.

Per rendere appunto capaci queste molecole di penetrare attraverso il mitocondrio è necessario utilizzare un sistema di "drug delivery" specifico per questo sito.

Le prime molecole sintetizzate per agire sul target mitocondriale ed inibire così i chaperoni TRAP-1 e Hsp90 situati in questo organulo sono state definite come Gamittrinibs¹⁵ (GA mitochondrial matrix inhibitors); queste inibiscono l'attività ATPasica di TRAP1 inducendo direttamente l'aumento di permeabilità mitocondriale portando così alla perdita del potenziale di membrana ed al rilascio nel citosol di citocromo c.

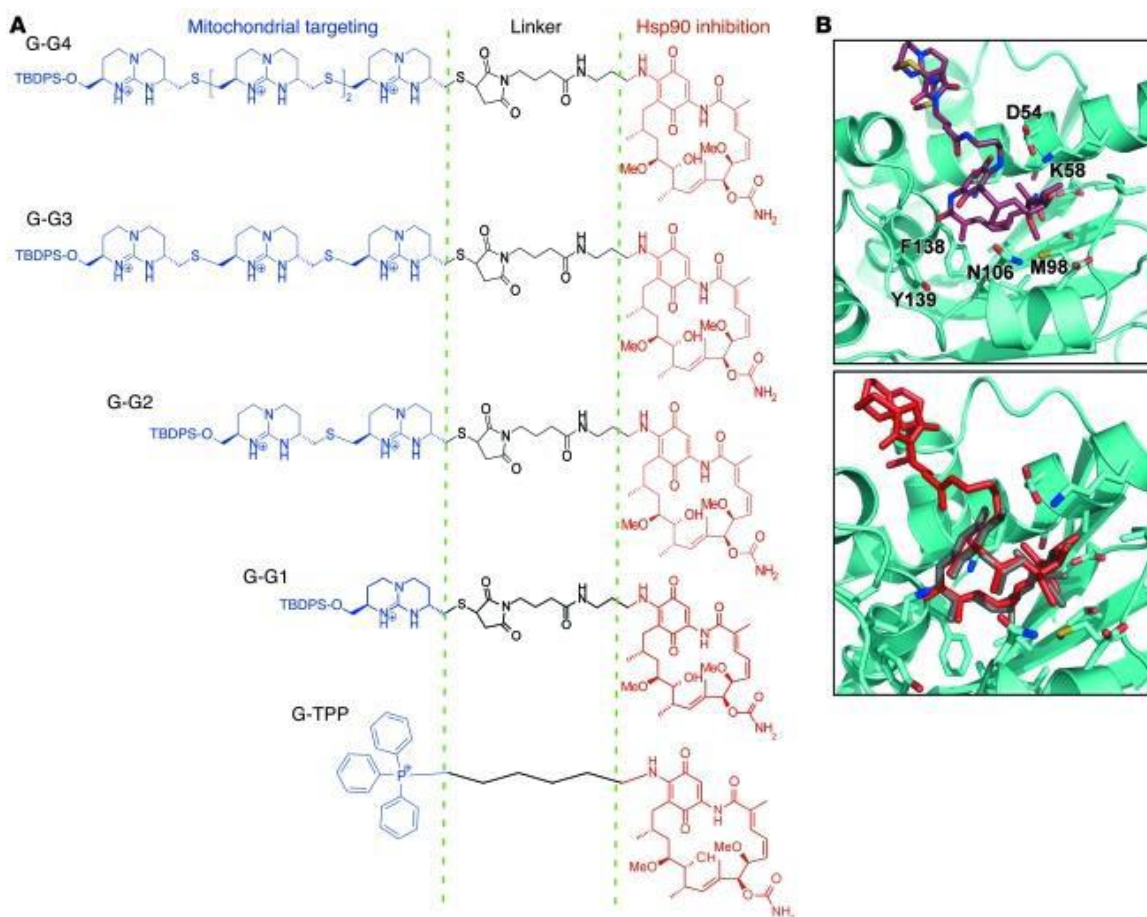


Figura 7. Struttura dei composti Gamitrinibs. (A) Il disegno strutturale deriva dalla combinazione di tre parti con diversa funzione (inibitore di Hsp90, linker e "mitochondrial targeting") G-G1, Gamitrinib-G1; G-TPP, Gamitrinib-TPP-OH; TBDPS, tert-butyldiphenylsilyl. (B). (in alto) Modello 3D di docking tra Gamitrinib-G1 ed il dominio N terminale di Hsp90 (in basso) Sovrapposizione tra Gamitrinib G-1 (rosso) e Geldanamicina GA (grigio) nel sito ATPasico di Hsp90.

Queste strutture derivano da una combinazione di tre parti:

1. Il capostipite degli inibitori di Hsp90, la *Geldanamicina* (GA) (**I**) o meglio il suo derivato 17-allilamino-17-demetossigeldanamicina (17-AAG), che risulta meno epatotossico. La geldanamicina è un antibiotico naturale che appartiene alla classe dei benzochinoni ansamicina e compete con l'ATP per il dominio N-terminale di Hsp90.
2. Un modulo che consente di raggiungere selettivamente il sito mitocondriale, costituito da una struttura ripetuta (da 1 a 4 volte) di sali di guanidinio (Gamitrinib G1-G4) oppure sali di trifenilfosfonio (Gamitrinib TPP-OH).
3. Un linker legato al C17 di 17-AAG che collega ed unisce le due porzioni sopra citate. (Fig. 7)

L'accumulo nel mitocondrio causa una rapida perdita di potenziale della membrana interna e, solamente nel citosol della cellula tumorale, ripristina il

rilascio di citocromo *c*. Le Gamitrinibs mostrano, infatti, una modesta o addirittura assente citotossicità sulle cellule sane, testate ad una dose sufficiente da causare la morte delle cellule tumorali; da notare che questo avviene nonostante l'accumulo si verifichi nei mitocondri di tutti i tipi di cellule, sia cancerose che non. Grazie a studi di docking si è visto che la porzione costituita da 17-AAG si lega alla tasca ATPasica portando quindi all'inibizione dell'attività di idrolisi del nucleotide, mentre la catena con le cariche positive non interagisce con il sito catalitico trovandosi all'esterno.

In generale tutte le strutture capaci di direzionare l'accumulo a livello mitocondriale sono accomunate dal fatto di possedere nella struttura una componente basica oppure un catione lipofilo capaci di attraversare le membrane biologiche e sfruttano a tal fine la presenza di un gradiente elettrico transmembrana dovuto alla differente concentrazione di protoni presente ai due lati della membrana interna. Questa carica elettrica negativa presente nel lato interno della membrana sopra citata fa sì che ogni catione capace di permeare attraverso le membrane biologiche possa così accumularsi a livello della matrice mitocondriale. Inoltre questi composti che hanno come target il mitocondrio si accumulano preferenzialmente nelle cellule cancerose, ciò indica che queste mantengono un potenziale negativo significativamente più elevato (20-60 mV) rispetto alle cellule prive di caratteristiche maligne.¹⁶

Per queste peculiarità i Gamitrinibs sono stati presi come riferimento nello sviluppo di questo lavoro.

Un simile approccio può essere visto, infatti, come spunto per creare nuove molecole che possano interagire con TRAP1 cercando di abbinare una parte farmacoforica ad un veicolo adatto ad indirizzarle nell'ambiente di interesse.

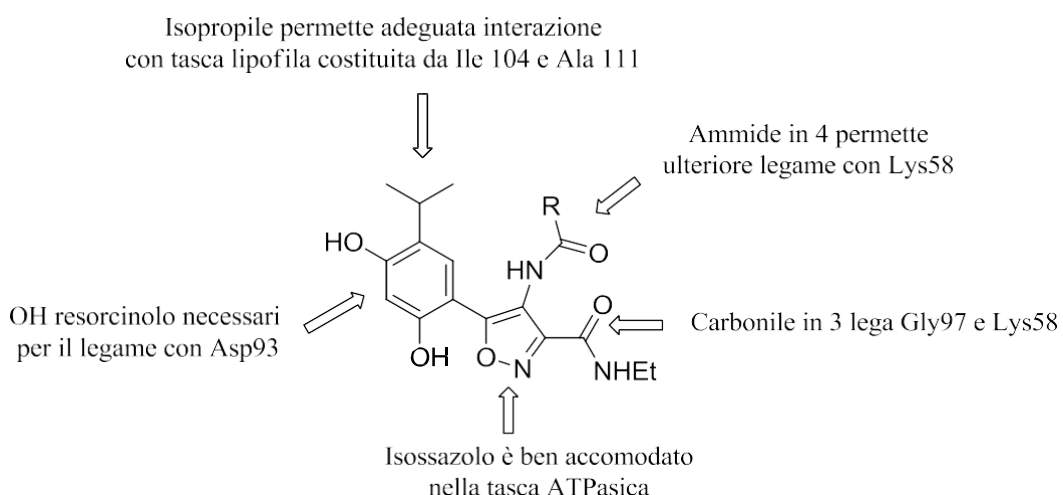
SCOPO DEL LAVORO

Da diversi anni il gruppo di ricerca del Prof. Simoni, presso il quale è stato svolto tutto il lavoro di dottorato, si è impegnato in un progetto finalizzato a sviluppare nuove molecole che agiscano da inibitori nei confronti di Hsp90 e quindi potenzialmente utilizzabili nella terapia antitumorale. Riprendendo come riferimento la molecola (VIII) descritta nell'introduzione, è stata quindi sviluppata una classe di derivati 3,4-isossazol-diammidici, i quali hanno dimostrato una buona attività inibitoria nei confronti di Hsp90 e il derivato sopra citato è stato considerato come il migliore della serie.

Questi presentano una buona interazione con il sito ATPasico di Hsp90, confermando come l'aggiunta della seconda funzione ammidica in posizione 4 dell'isossazolo sia in grado di creare una ulteriore interazione con la tasca ATPasica.

E' stato così possibile comprendere quali siano i gruppi farmacoforici importanti per il binding con il sito ATPasico e quindi per l'attività citotossica.

Grazie a queste valutazioni si è anche potuto individuare i possibili siti dove apportare eventuali modifiche, così da mantenere inalterata l'interazione della molecola stessa con il sito recettoriale.



Visti gli ottimi risultati biologici ottenuti dai derivati isossazol-3,4-diammidici, analizzandone gli studi SAR e considerando quanto riportato in letteratura in merito ai derivati Gamitrinibs, è emersa la possibilità di costruire una nuova serie

di scaffold che dimostrasse selettività nei confronti dell'isoforma mitocondriale di Hsp90 e cioè nei confronti dell'omologo TRAP1.

Come già detto, infatti, TRAP1 possiede delle omologie nella sequenza aminoacidica con Hsp90, ma la sua tasca recettoriale non è ancora nota. Date le somiglianze strutturali tra le due proteine, è comunque ipotizzabile che i composti risultati attivi su Hsp90 possano esplicare la loro azione anche su TRAP1.

Come scopo di questa tesi si è pensato di sviluppare alcune serie di composti potenzialmente in grado di interferire con l'attività dei chaperoni mitocondriali Hsp90 ma soprattutto TRAP1 e di operare su due diversi fronti strategici:

Per un primo approccio sintetico è stato progettato uno scaffold costituito da tre componenti:

1) la struttura 3,4-isossazoldiammidica con attività inibitoria sulla componente mitocondriale di Hsp90, considerato che il dominio N-terminale dove risiede il sito ATPasico è la porzione più conservata tra Hsp90 ed il suo omologo;

2) una "testa cationica" che agisca da sistema di trasporto per raggiungere in modo selettivo il mitocondrio. Valutati gli studi di binding e gli studi SAR si è giunti alla conclusione che l'unica porzione nella struttura molecolare che non dà interazioni con il sito ATPasico è la catena laterale legata al gruppo ammidico in posizione 4 dell'isossazolo.

3) uno spacer che unisca le due porzioni sopra citate. Sono stati scelti diversi tipi di spacer tra i quali uno in cui è presente unicamente una catena alchilica satura a 4, 5 o 6 atomi di carbonio, oppure un altro costituito da un gruppo fenolico o catecolico in cui l'ossigeno è legato con funzione eterea ad una catena butilica; entrambi legati direttamente al gruppo ammidico in 4 all'isossazolo.

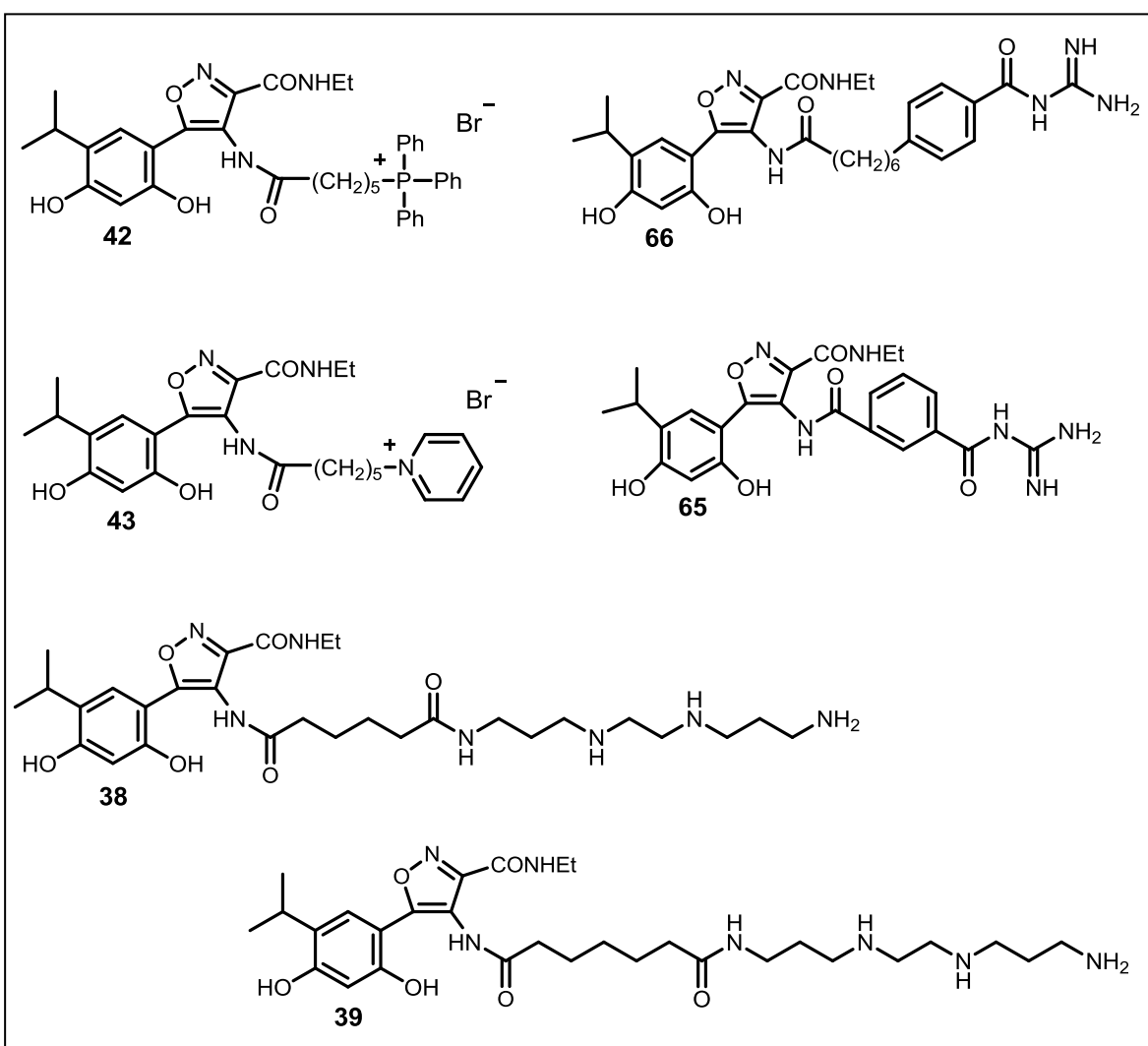
Per quanto riguarda, invece, la scelta delle teste cationiche utilizzate, sulla base dei dati di letteratura sono stati scelti diversi tipi di veicoli allo scopo di direzionare la molecola nello specifico all'interno del compartimento mitocondriale. Questi infatti hanno la capacità di protonarsi a pH fisiologico, in questo modo la membrana mitocondriale, la quale presenta una complessiva carica negativa, si andrebbe a complessare con le code policationiche inserite sui composti fungendo così da ottimo pendaglio di veicolazione. Alcuni esempi di teste cationiche utilizzate sono i sali di trifenilfosfonio, i sali di piridinio oppure i sali di guanidinio.

Oltre alle catene lipofile appena citate in letteratura è descritto un altro tipo di veicolo policationico, rappresentato dalle poliammine, le quali sono un efficace mezzo di veicolazione delle molecole all'interno del mitocondrio.

Le poliammine, infatti, si protonano a pH fisiologico e sono in grado di attraversare la membrana mitocondriale.¹⁷

La sintesi di questi derivati ha permesso quindi di valutare se questo tipo di struttura possa consentire una localizzazione selettiva nell'organo mitocondriale e, nel caso questo avvenga, se l'azione a livello del complesso multichaperonico Hsp90/TRAP1 possa effettivamente dare risultati migliori in termini di citotossicità ed inibizione della proliferazione tumorale, senza causare effetti di tossicità sulle altre cellule non maligne.

Di seguito alcuni esempi di molecole sintetizzate durante tutto il periodo di questo lavoro di tesi.



Questi composti a pH fisiologico si protonano con il compito di veicolare il farmaco sul target mitocondriale. I composti sintetizzati non hanno dato

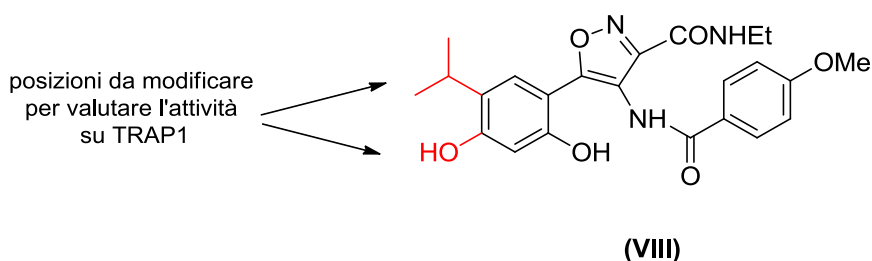
risultati molto soddisfacenti, con IC_{50} su diverse linee tumorali oltre i 10 Mm, comunque in linea con quelli di composti noti come i Gamitrinibs.

Un secondo approccio sintetico, invece, è stato realizzato agendo direttamente sul farmacoforo, cioè sulla struttura resorcinolica, apportando delle modifiche su alcuni siti fondamentali per il binding su Hsp90, allo scopo ancora una volta di agire e quindi inibire selettivamente TRAP1.

Per questo ci si è avvalsi di un supporto di molecular modeling effettuato allo scopo di costruire un modello di sito recettoriale di TRAP1 che tenesse conto delle variazioni nelle sequenze aminoacidiche conosciute.

Si è quindi visto che, provando ad effettuare un docking molecolare tra il composto **VIII** (attivo su Hsp90) ed una ricostruzione virtuale del sito ATPasico di TRAP1, la molecola risulta avere delle difficoltà di natura sterica nell'accomodarsi efficacemente all'interno del sito; deve infatti distorcere la propria conformazione e così facendo perde un importante legame idrogeno con un residuo di Glicina.

In questo caso, sempre partendo dalla certa attività biologica di molecole inibitrici di Hsp90 citosolico come VIII, si è pensato di apportare delle modifiche per vedere se l'interazione tra questi e il sito recettoriale di TRAP1 possa essere migliorata. Nello specifico si sono proposte le seguenti modificazioni:



1) la sostituzione in 5 del nucleo resorcinolico costituita dall'isopropile nei composti più attivi su Hsp90 potrebbe rappresentare un ingombro sterico per l'interazione con il sito recettoriale di TRAP1 quindi si potrebbe omettere;

2) la posizione 4 del nucleo aromatico occupata da uno dei due ossidrilici sembra rappresentare anch'essa un motivo di ingombro sterico per il binding recettoriale, quindi si è proposto di non introdurre neppure questa.

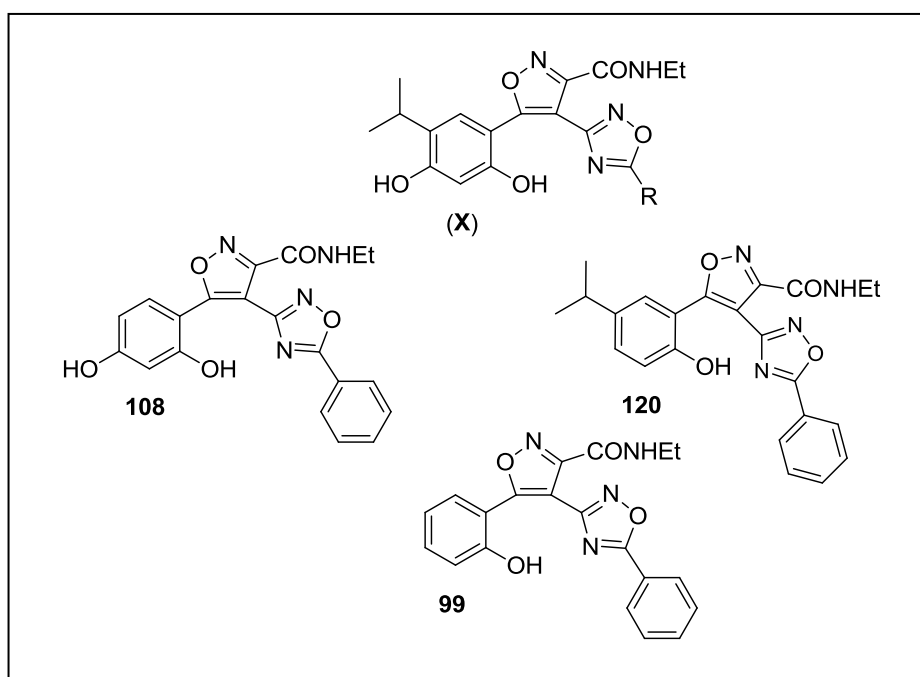
La strategia sintetica generale per ottenere tali molecole, ben nota per i composti come VIII oppure per altri descritti in letteratura, teoricamente utilizzabile anche per la sintesi di questi nuovi derivati, passa però per un intermedio isossazolico in cui si funzionalizza la posizione 4 tramite una nitrurazione o una algenazione, la cui

regiochimica in questo caso è fortemente sfavorita dalle posizioni libere aggiuntive presenti sull'anello ex resorcinolico.

Le prevedibili difficoltà nella utilizzazione di questo vecchio percorso sintetico si sono comunque riscontrate nella realtà di un primo tentativo impedendone la prosecuzione.

Ci si è quindi avvalsi del supporto di un lavoro presente in letteratura,¹⁸ in cui sono state sintetizzate e testate alcune molecole su Hsp90 aventi una sostituzione in 4 all'anello isossazolico costituita da un ossadiazolo variamente sostituito (**X**); questi composti sono stati descritti con elevata attività anche se dipendente in base ai sostituenti presenti.

Si è deciso di provare a sintetizzare derivati aventi questo stesso tipo di scheletro, con le opportune modifiche ipotizzate dagli studi di molecular design, in quanto l'introduzione della porzione ossadiazolica poteva essere condotta con una strategia immune da problematiche dipendenti dal set di sostituenti all'anello ex resorcinolico, e inoltre si potevano potenzialmente ottenere comunque le stesse informazioni riguardo la validità della teoria elaborata. Tutto questo comparando le attività delle diverse molecole su TRAP1 anziché su Hsp90 e con un procedimento sintetico nuovo e versatile. Di seguito le molecole sintetizzate durante questo lavoro di tesi.



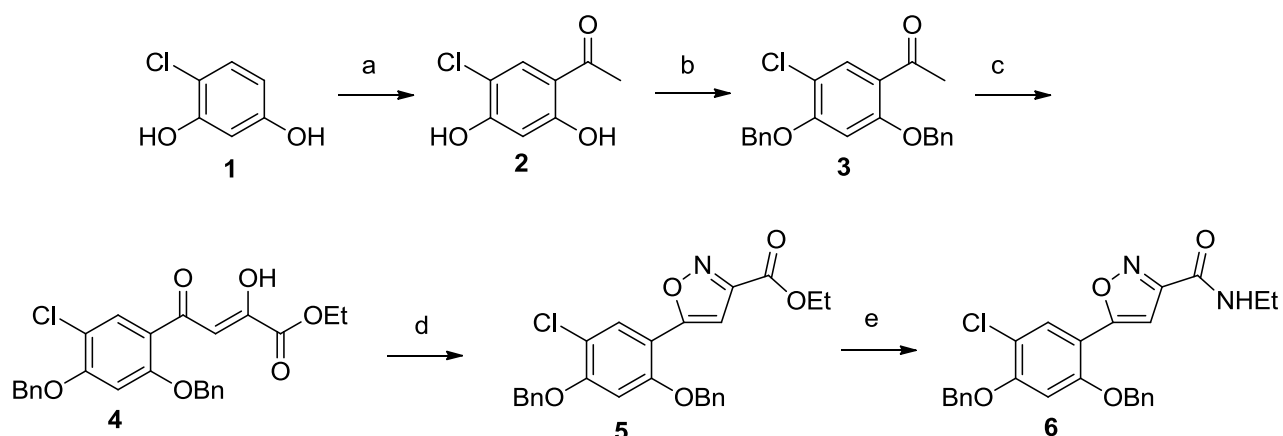
PERCORSO SINTETICO

Per raggiungere i diversi obiettivi proposti nello scopo, la strategia sintetica si è sviluppata in modo da ottenere due tipi di derivati. Nel primo caso, un farmacoforo noto legato ad un veicolo cationico; nel secondo, si è puntato a modificare strutture attive su Hsp90 per verificare la possibilità di interagire selettivamente con l'analogo chaperone TRAP1. Le due diverse strategie sono qui di seguito riportate.

I: Derivati con veicolo cationico legato ad un farmacoforo attivo su Hsp90

Per la formazione del primo derivato, si è scelto di partire dall'intermedio **8**. Tra i composti noti attivi su Hsp90 il gruppo isopropilico ha sostituito il cloro nella struttura resorcinolica favorendo un miglioramento di attività, ma per un primo approccio sintetico si è deciso comunque di partire proprio dall'intermedio col cloro, più semplice da ottenere dal punto di vista sintetico attraverso una serie di reazioni riportate in letteratura. Quindi, a partire dal 4-clororesorcinolo **1**, reperibile in commercio, è stato ottenuto il composto **2** mediante una reazione di acilazione, utilizzando come acido di Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in presenza di acidoacetico. Il prodotto **3**, dopo reazione di benzilazione con benzil bromuro, è stato fatto reagire con dietilossalato in presenza di sodio etossido per ottenere l'ossallil derivato **4**. La successiva reazione con idrossilammina cloridrato in etanolo ha permesso di ottenere l'isossazolo estere **5**. Da qui attraverso l'utilizzo di etilammina in metanolo si è arrivati ad ottenere l'intermedio **6**.

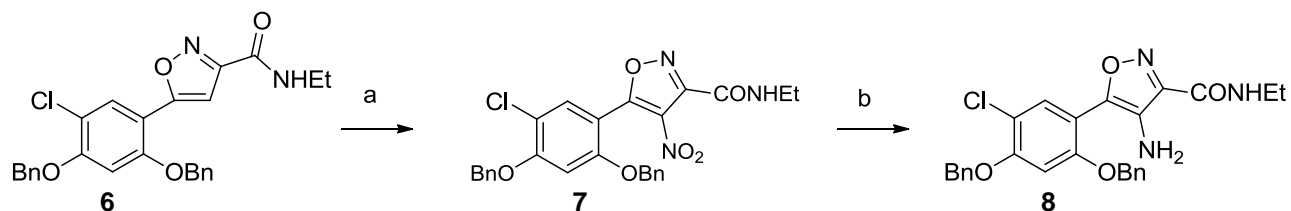
Schema I



Reagenti e condizioni: (a) AcOH, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (b) BnBr, K_2CO_3 , CH_3CN (c) Dietil ossalato, Na/EtOH (d) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, EtOH (e) EtNH_2 , MeOH, Rfx

Utilizzando l'intermedio **6**, attraverso una reazione di nitratura con l'utilizzo di Ac_2O e HNO_3 70%, è stato ottenuto il composto **7**, il quale, successivamente, è stato ridotto con Zn e cloruro ammonico per dare l'intermedio **8** con elevate rese.

Schema II

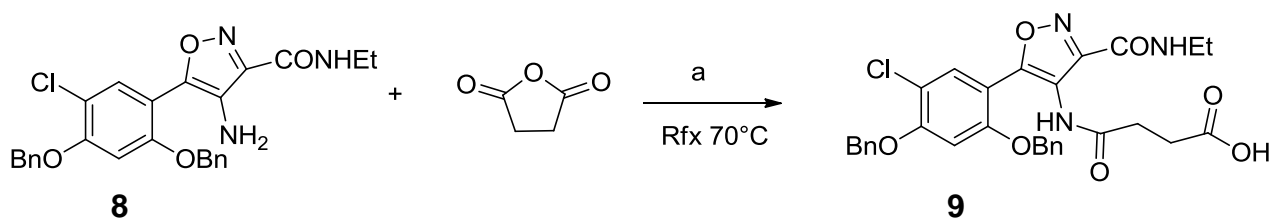


Reagenti e condizioni: (a) HNO_3 conc., Ac_2O , -5°C ; 70h, $5-10^\circ\text{C}$; (b) NH_4Cl , Zn, H_2O , THF, 0°C

II: Primo obiettivo: scelta di un linker adatto

A partire dall'intermedio **8** la reazione successiva comporta l'inserimento di un linker recante all'estremità una funzionalità carbossilica. Si è utilizzata quindi anidride succinica ottenendo il derivato **9** con una resa dell'80%.

Schema III

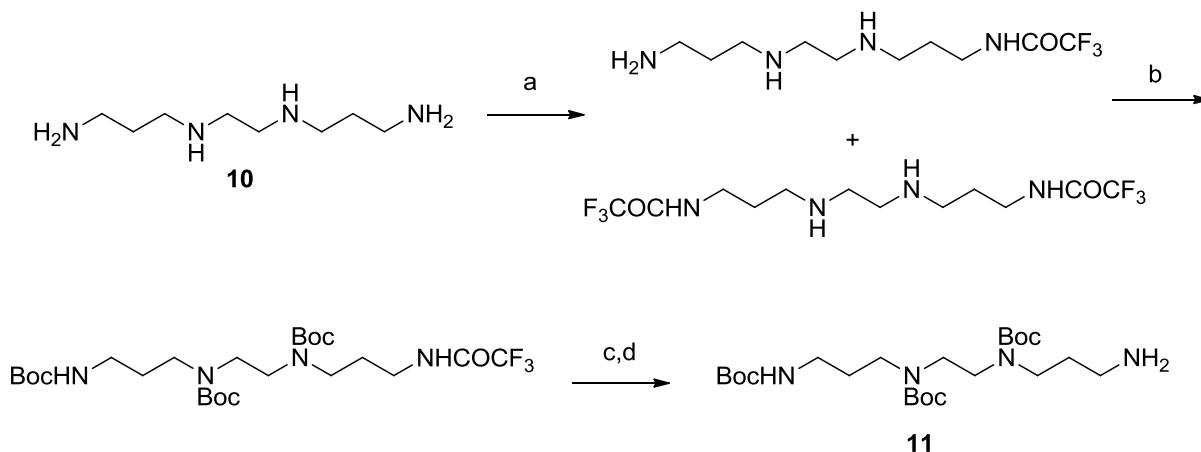


Reagenti e condizioni: (a) CH_3Cl , Rfx

Quindi, lo step successivo prevede il coupling di tale intermedio con una poliammina opportunamente protetta.

Sulla base dei dati di letteratura, la strategia utilizzata per ottenere un unico gruppo amminico non protetto sulla poliammina, prevede l'iniziale protezione di una sola ammina (ottenibile attraverso un'adeguata stechiometria di reazione) per mezzo di un gruppo protettore labile in condizioni basiche, la trifluoroacetamide; successivamente si procede con la protezione degli altri residui amminici per mezzo di un gruppo protettore sensibile all'ambiente acido, il gruppo tertbutossicarbammato (Boc_2O). Creando infine un ambiente basico con l'utilizzo di litio idrossido è possibile ottenere l'ammina libera desiderata, senza rischiare di deproteggere anche le altre funzioni.

Schema IV

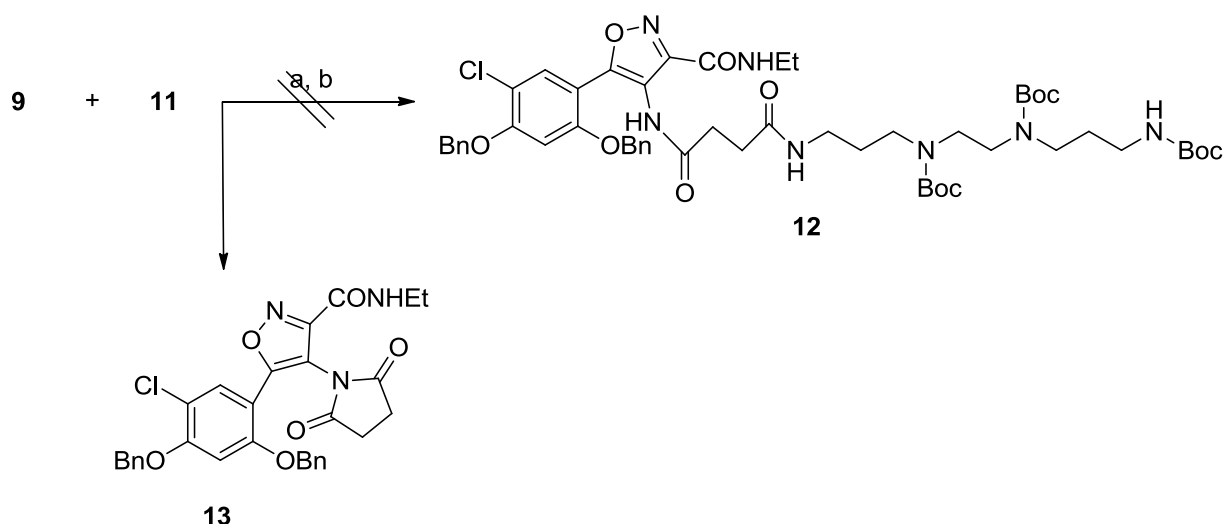


Reagenti e condizioni: (a) EtOCOCF_3 , -78°C ; (b) Boc_2O ; (c) NH_3 , MeOH; (d) $\text{LiOH} \cdot x \text{H}_2\text{O}$

Successivamente il gruppo amminico della poliammina è stato fatto reagire con l'intermedio **9** da noi precedentemente sintetizzato, utilizzando come reattivi 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide (EDC) e 1-idrossibenzotriazolo (HOBT). Sorprendentemente, anziché ottenere solamente il sito di condensazione, **12**,

peraltro con rese molto basse; si verifica anche un' autocondensazione che porta alla formazione di un derivato succinimmidico, **13**, come riportato nello schema V. Lo stesso risultato è stato ottenuto utilizzando come reattivi l'anidride propilfosfonica (PPAA), TEA in DMF dry.

Schema V

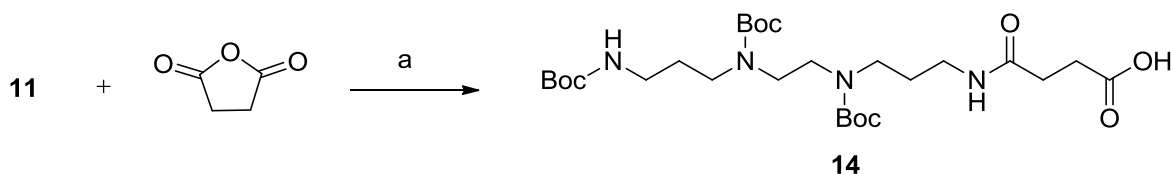


Reazione e condizioni: (a) TEA, EDC, HOBT, CH₂Cl₂, (b) PPAA, TEA in DMF dry.

Nel tentativo, quindi, di realizzare un percorso sintetico di maggiore efficacia si è provato ad utilizzare una strategia diversa.

Si è tentato di funzionalizzare un'estremità della poliammina in modo da ottenerne un gruppo carbossilico, mediante reazione con anidride succinica. Questa prima reazione è stata portata a termine con una resa dell'80%.

Schema VI

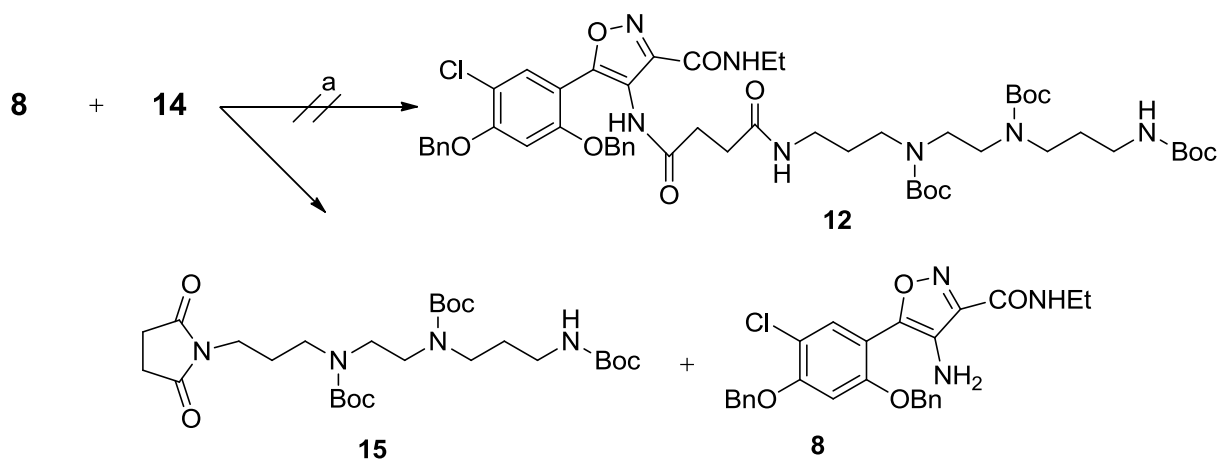


Reagenti e condizioni: (a) TEA, DCM

Lo step successivo prevede, quindi, la reazione tra i composti **8** e **14**; ma questa, pur provata con diversi agenti condensanti, non ha portato al prodotto desiderato, dando origine ad un sottoprodotto derivante dall' autocondensazione dell'acido

carbossilico presente sulla poliammina. Si forma così una succinimide, e si recupera la sostanza di partenza **8**. Dalle analisi effettuate si rivelano i composti ottenuti nello schema VII.

Schema VII

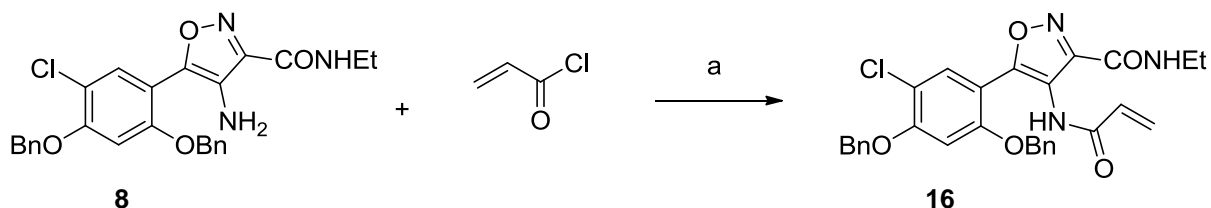


Reagenti e condizioni: (a) DIPEA, DMAP, PyBROP, oppure DIPEA, HATU, DMF, oppure PCl_3 , Piridina Dry, oppure PPAA, TEA

Come messo in evidenza nei precedenti schemi, la strategia sintetica fin' ora utilizzata ha sempre dato risultati non soddisfacenti. Per questa ragione si è deciso di cambiare strategia e tentare la formazione di un intermedio acrilico che non desse luogo a reazioni secondarie come quelle viste in precedenza.

Dallo schema VIII si evidenzia la sostituzione della natura del linker, con un' acrilamide, nella prospettiva di ottenere un attacco della poliammina attraverso un' addizione di Michael. Il composto **8** è stato quindi fatto reagire con acriloil cloruro per ottenere l'acrilammide **16**, con resa del 70%.

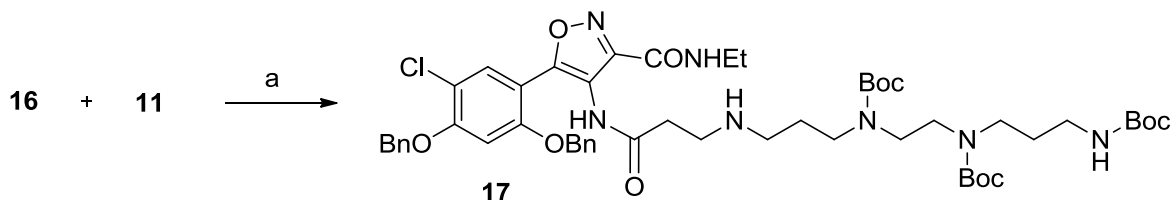
Schema VIII



Reagenti e condizioni: (a) DIPEA, CH_2Cl_2 dry, 0°C

Successivamente **16** è stato fatto reagire con la poliammina **11** in THF a 100°C e si è ottenuto il prodotto di addizione **17**, con una resa del 50%, come riportato nello schema IX.

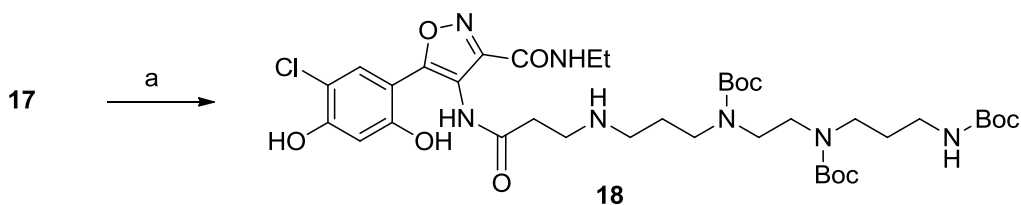
Schema IX



Reagenti e condizioni: (a) THF, 100°C

Infine, la reazione di deprotezione contemporanea dei residui amminici e ossidrilici, mediante l'impiego di BCl_3 in quantità stechiometriche; si è rivelata efficace per ottenere one-step la completa deprotezione del prodotto finale **18**.

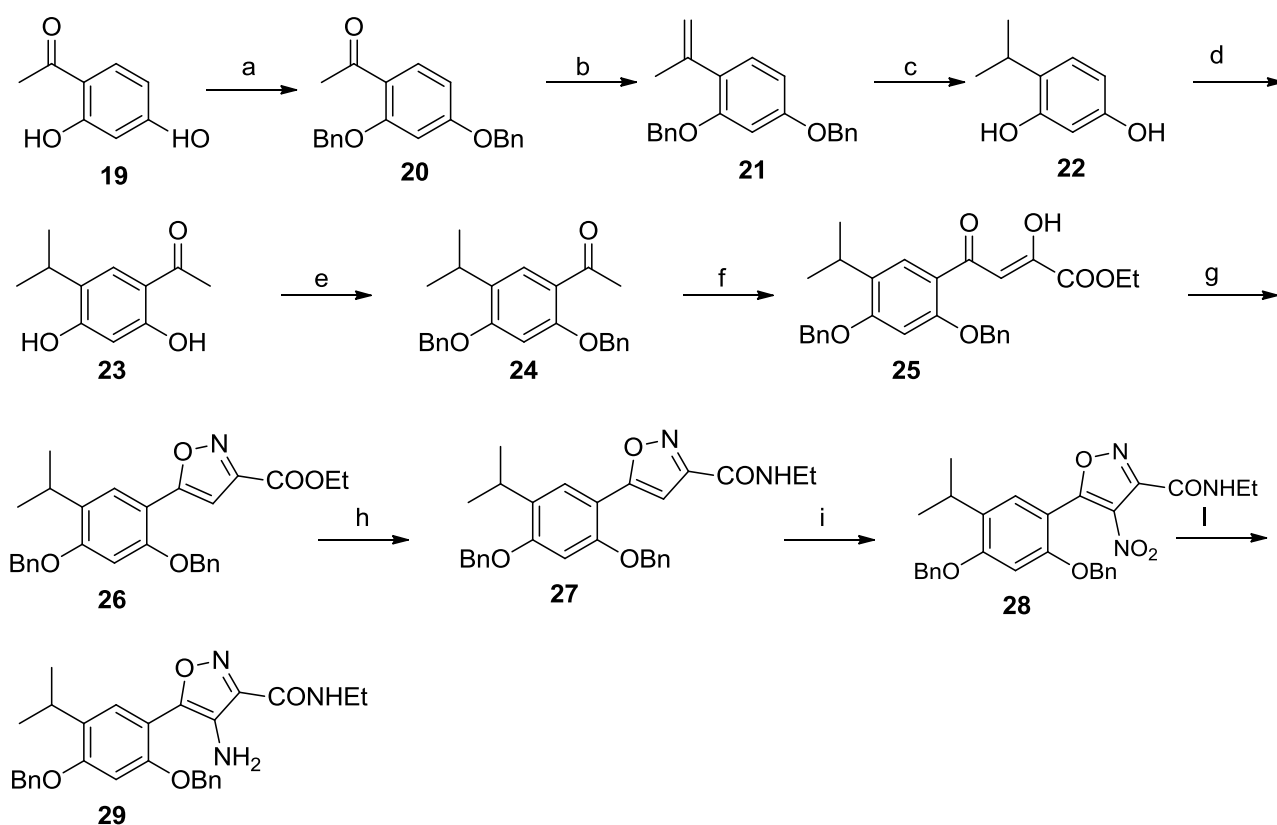
Schema X



Reagenti e condizioni: (a) BCl_3 , DCM, -78°C

Una volta verificata la buona riuscita di questo percorso sintetico, al fine di ottenere un composto che fosse più attivo, si è proceduto con la sintesi del derivato recante un isopropile al posto del cloro; come detto in precedenza infatti, è stata evidenziata una notevole differenza di attività tra i composti recanti un cloro e quelli recanti l'isopropile in posizione 5' del resorcinolo. Questo percorso prevede alcuni passaggi in più all'inizio e, per questo, presenta un maggiore impegno sintetico, ma permette di ottenere comunque i prodotti finali con rese soddisfacenti. Il percorso sintetico fino all'intermedio **29** è già noto.

Schema XI



Reagenti e condizioni: a) BnBr, K₂CO₃, CH₃CN, 6h, Reflux; b) MTPBr, NaH 60%, Tol, 100°C, 5h; c) Pd/C, H₂, EtOH, 16h, RT; d) BF₃.OEt₂, Ac₂O, 5h, Reflux; e) BnBr, K₂CO₃, CH₃CN, 6h, Reflux; f) Na, EtOH, dietilossalato, 4h, Reflux; g) NH₂OH.H₂O, EtOH, 4h, 90°C; h) EtNH₂ 2M in MeOH, 1h, 90°C; i) Ac₂O, HNO₃ 70%, 70h, 5°C; l) NH₄Cl in H₂O, THF, Zn, 2h, RT.

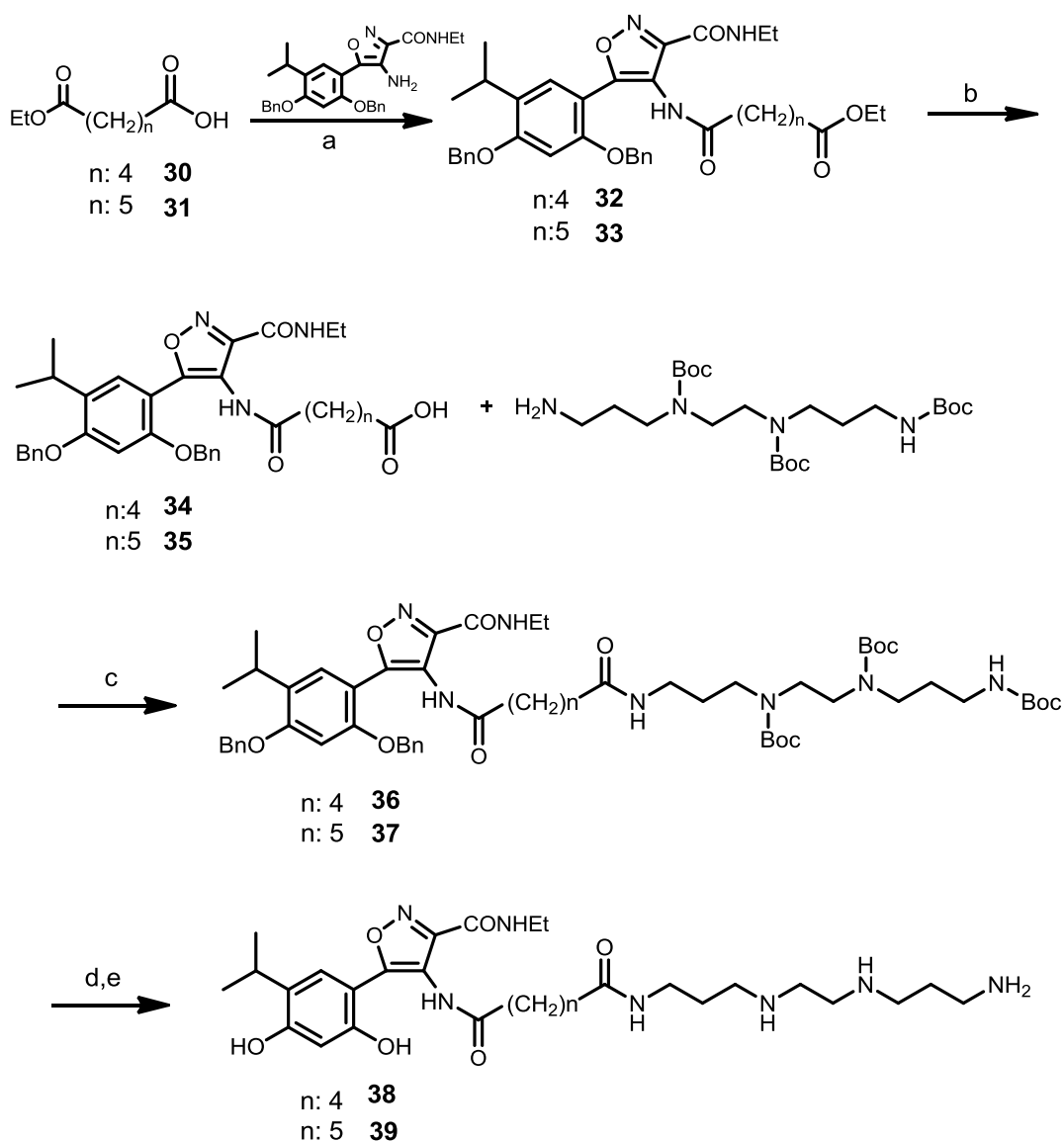
Dal composto 2,4-diidrossiacetofenone, **19**, commercialmente disponibile, si ottiene facilmente il dibenzilderivato **20** il quale attraverso una reazione di Wittig con metiltrifenilfosfonio bromuro, sodio idruro e toluene a riflusso per 5h permette di ottenere l'alchene **21** con rese elevate. La successiva reazione con Pd/C in atmosfera di idrogeno permette di ottenere il derivato isopropilico **22** che presenta le funzionalità fenoliche libere; questo permette la selettiva acetilazione con acido acetico in BF₃.OEt₂ per dare il composto **23**.

Utilizzando la stessa metodica impiegata inizialmente per il derivato **19**, cioè con K₂CO₃ e benzil bromuro in acetonitrile, si ottiene il derivato **24**, il quale viene poi fatto reagire con dietilossalato in presenza di sodio etossido per dare l'ossalilderivato **25**. La costruzione dell'eterociclo isossazolico si ottiene per

reazione del prodotto ossalilderivato con idrossilammina cloridrata in etanolo,**26**, e la successiva reazione con etilammina in metanolo porta al derivato ammidico **27**. La nitrazione regio-selettiva, in posizione 4 dell'isossazolo, è condotta in una miscela di acido nitrico al 70% ed anidride acetica per dare il nitro derivato **28**, il quale con zinco e ammonio cloruro è ridotto a dare il derivato amminico **29** con elevate rese. Utilizzando quest' ultimo intermedio sono state messe a punto diverse strategie sintetiche per ottenere una serie di derivati di seguito descritti.

III: Derivati contenenti catene poliamminiche

Schema XII



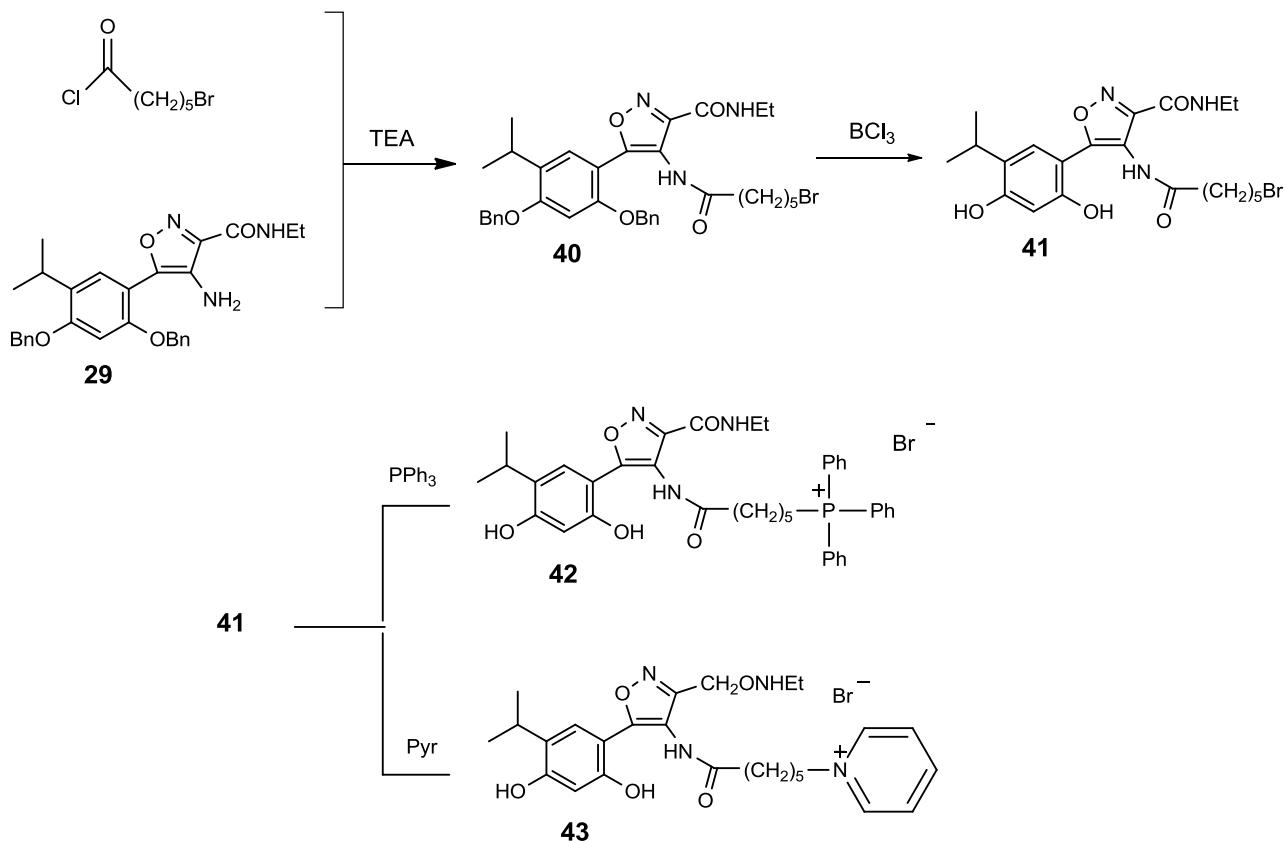
Reagenti e condizioni: a) ossalilcloruro, DMF, DCM, 4h, RT; than 4-amminoisossazolo, TEA, DMC, 16h, RT; b) THF, LiOH.H₂O, H₂O, 2h, 70°C; c) CDI, THF, 24h, RT; d) TFA, DCM, 1h, RT; e) BCl₃, DCM, -78°C, 1h.

Nello schema XII è rappresentata la sintesi di due derivati poliamminici. Partendo rispettivamente dal monoetil estere dell'acido adipico **30** e dal mono etil estere dell'acido pimelico **31** (entrambi reperibili commercialmente); sono stati ottenuti i due cloruri acilici mediante reazione con ossalil cloruro, l'intermedio sintetizzato è stato poi fatto reagire con il derivato **29** precedentemente preparato per ottenere i derivati esterei **32** e **33**. Questi sono stati idrolizzati nel rispettivo acido corrispondente **34** e **35** in presenza di litio idrossido e acqua; successivamente sono stati fatti reagire con la poliammina **11**, in presenza di carbonildiimidazolo (CDI) per ottenere i composti desiderati **36** e **37**. I due prodotti finali sono poi stati ottenuti in seguito a deprotezione dei gruppi amminici presenti sulla poliammina, con l'utilizzo di TFA, e dei gruppi ossidrilici presenti sull'anello resorcinolico mediante reazione con tricloruro di boro, per dare i derivati **38** e **39**.

Diversamente da quanto appena descritto, sono state utilizzate diverse strategie sintetiche per ottenere i seguenti derivati variamente sostituiti e descritti negli schemi XIII, XIV e XV.

IV: Derivati contenenti catene portanti cariche cationiche permanenti

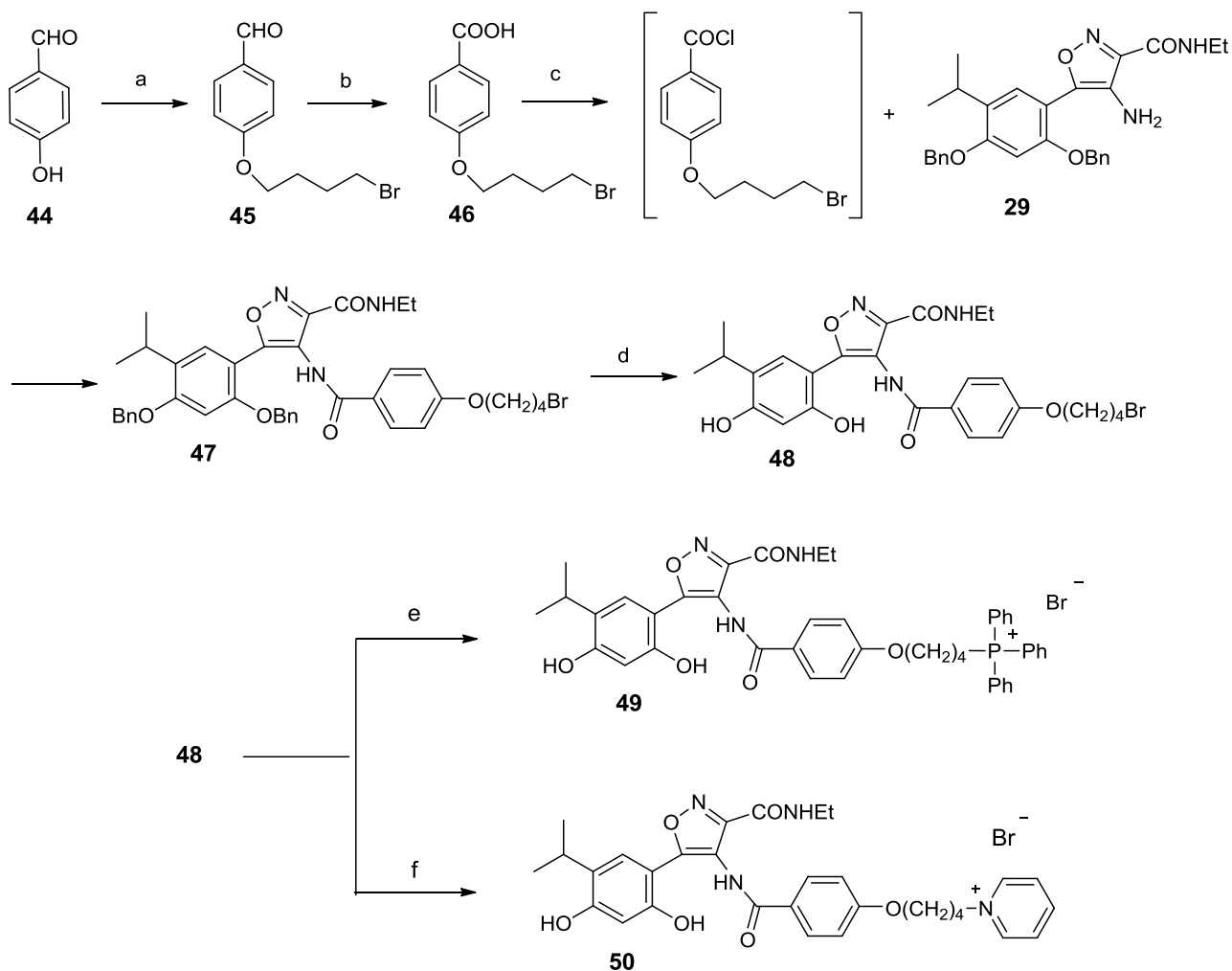
Schema XIII



In questo primo caso la condensazione dell'ammina con il cloruro dell'acido 6-bromo-esanoico ha portato ad ottenere il derivato **40**, il quale è stato deprotetto nelle funzionalità fenoliche con elevate rese in presenza di tricloruro di boro per dare il prodotto **41**.

Quest'ultimo derivato viene fatto reagire seguendo due differenti modalità per ottenere i due prodotti finali: mediante utilizzo di trifenilfosfina in diossano e reazione condotta riscaldando con microonde si ottiene il prodotto **42** ed invece lo stesso prodotto **41** posto in THF a refluxo mediante aggiunta di piridina porta al derivato **43**.

Schema XIV



Reagenti e condizioni: a) $\text{Br}(\text{CH}_2)_4\text{Br}$, K_2CO_3 ; b) reattivo di Jones; c) SOCl_2 , TEA; d) BCl_3 ; e) PPh_3 , Diossano; f) Pyr.

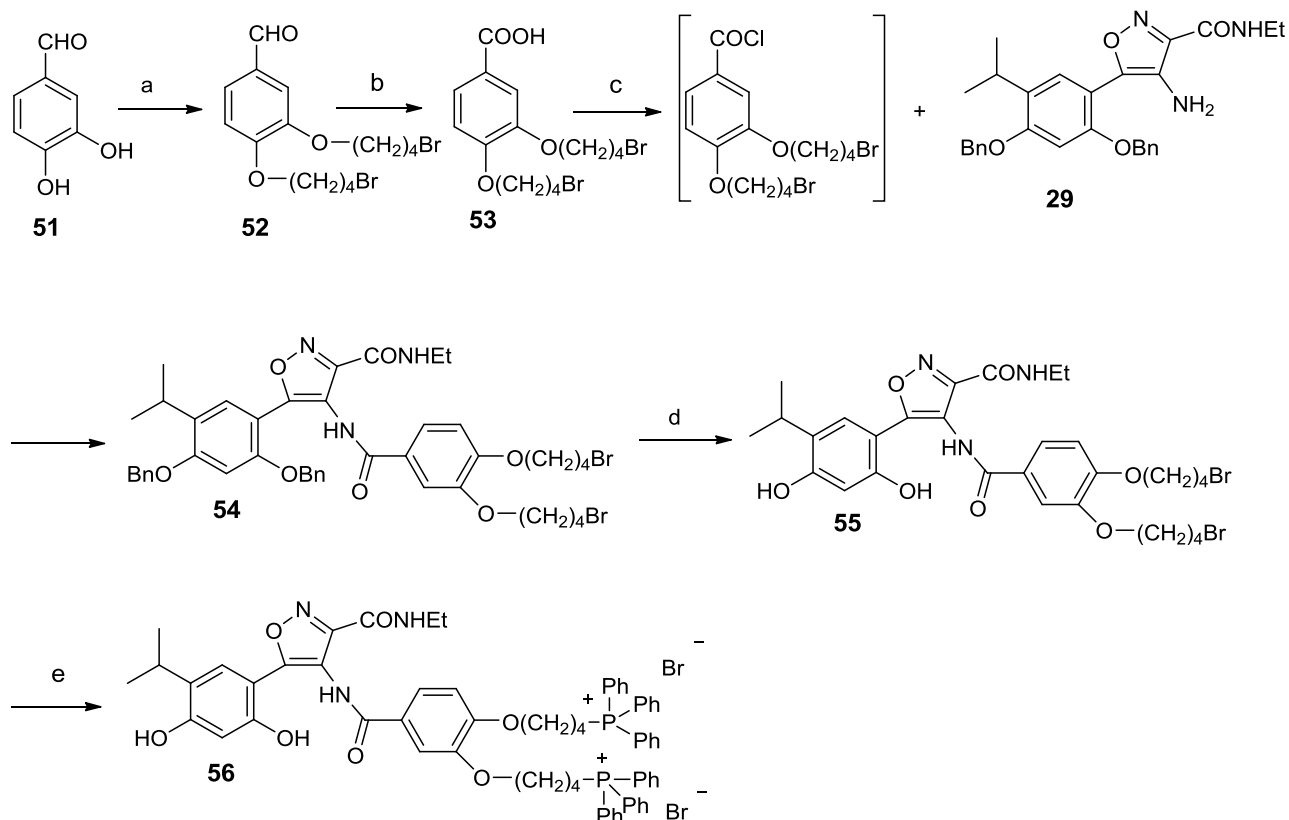
Allo scopo di poter introdurre un numero variabile di catene cationiche, si è utilizzato un linker maggiormente funzionalizzabile, di tipo fenilico.

Il composto 4-idrossi benzaldeide, **44** commercialmente reperibile, viene fatto reagire con 1,4-dibromobutano per ottenere il derivato **45** in cui la funzione fenolica viene derivatizzata ad una eterea con radicale bromo-butilico.

La funzione aldeidica viene poi ossidata ad acido carbossilico mediante aggiunta del reattivo di Jones per dare il prodotto **46**. Il derivato dell'acido benzoico viene fatto reagire, dopo attivazione a cloruro acilico mediante utilizzo di cloruro di tionile, con il composto **29** per costituire il legame ammidico. In particolare dalla formazione del legame ammidico tra il composto amminico e l'opportuno derivato si ottiene il prodotto **47** che è deproteetto nelle funzionalità fenoliche, mediante

utilizzo di tricloruro di boro alla temperatura di -78°C , per dare la molecola **48**. Il derivato appena descritto viene infine fatto reagire con trifenilfosfina in diossano mediante utilizzo del microonde oppure con piridina a refluxo per dare rispettivamente i prodotti finali **49** e **50**.

Schema XV



Reagenti e condizioni: a) $\text{Br}(\text{CH}_2)_4\text{Br}$, K_2CO_3 ; b) reattivo di Jones; c) SOCl_2 , TEA; d) BCl_3 ; e) PPh_3 , Diossano

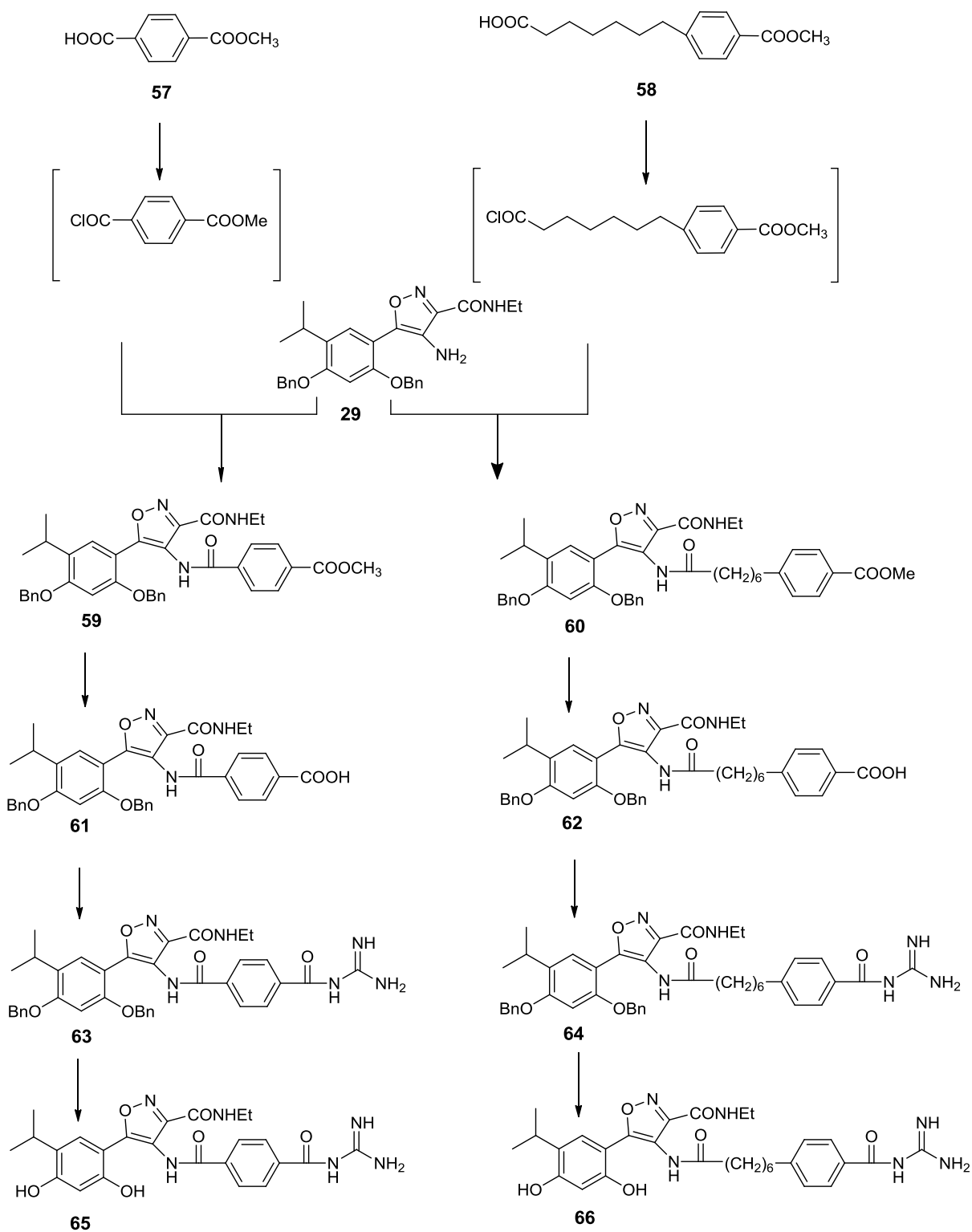
Analogamente il prodotto commerciale 3,4 diidrossi benzaldeide, **51**, viene fatto reagire con 1,4-dibromobutano per ottenere il derivato **52** in cui la funzione catecolica viene derivatizzata ad una eterea con radicale bromo-butilico. La funzione aldeidica viene poi ossidata ad acido carbossilico mediante aggiunta del reattivo di Jones per dare il prodotto **53**. Il derivato dell'acido benzoico viene attivato a cloruro acilico e poi fatto reagire con l'ammina **29** per ottenere il composto **54** che viene quindi deproteetto per avere il derivato resorcinolico **55**. Infine questo derivato viene fatto reagire con trifenilfosfina e diossano come visto in precedenza per dare il prodotto **56** in cui in posizione 4 dell'isossazolo è presente una struttura catecolica dove entrambi i gruppi ossidrilici risultano legati ad una funzione butossilica che presenta in posizione 4 il sale di trifenilfosfonio.

V: Derivati guanidinici:

La prossima serie di derivati, descritta nello schema XVI, vede la sintesi di due derivati guanidinici.

Nello specifico i rispettivi metil estere dell'acido benzoico e dell'acido eptanoico, **57** e **58**, entrambi reperibili commercialmente, sono stati trasformati nel corrispondente cloruro acilico mediante reazione con ossallil cloruro; successivamente per reazione con il composto **29** sono stati ottenuti, mediante formazione di un legame ammidico, i due derivati benzoati **59** e **60**. Questi sono poi stati idrolizzati utilizzando idrossido di sodio e acqua per dare i derivati **61** e **62**; i quali sono stati fatti reagire con la guanidina, utilizzando per la reazione carbonildiimidazolo, allo scopo di ottenere i composti desiderati **63** e **64**. Infine per deprotezione dei gruppi ossidrilici sull'anello resorcinolico mediante triclورو di boro si sono ottenuti i due finali **65** e **66**.

Schema XVI

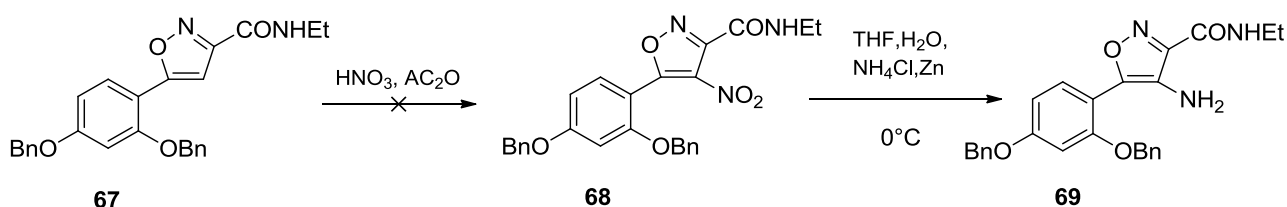


VI: Secondo obiettivo: modifica delle sostituzioni all'anello resorcinolico

La seconda serie di composti programmata per individuare molecole selettivamente attive su Trap1 segue uno schema sintetico differente dai precedenti, ed è rivolto alla rimozione di alcuni sostituenti che sono invece essenziali al legame con Hsp90. Malgrado le sostanziali analogie strutturali, però, alcune difficoltà si sono presentate nel perseguire l'approccio precedentemente elaborato per sintetizzare i composti testati su Hsp90 in quanto la mancanza di alcuni sostituenti sul nucleo del fenile ex-resorcinolico ha portato a notevoli variazioni nei risultati di reazioni già note e collaudate.

Più precisamente, il passaggio chiave nelle precedenti sintesi era l'introduzione di un gruppo funzionale nitro o alogeni nella posizione 4-dell'isossazolo. Alcuni esempi sono le trasformazioni da **6** a **7** nello schema II e da **27** a **28** nello schema XI. Il successo di queste reazioni si basava su una buona resa regio chimica per mancanza di punti alternativi di nitrurazione nel precursore. Alternando il set di sostituzioni all'anello resorcinolico, era prevedibile qualche problema in più, come confermato da alcuni tentativi qui di seguito riportati.

Schema XVII



Il primo tentativo effettuato è stato mirato ad ottenere il composto **69** il quale è sostituito con un azoto sulla posizione 4 dell'isossazolo ma mancante del sostituente isopropilico sull'anello resorcinolico; da qui sarebbe poi stato possibile sintetizzare potenziali inibitori analoghi a quelli attivi su Hsp90 con le dovute modifiche al nucleo resorcinolico, seguendo la procedura sintetica già nota.

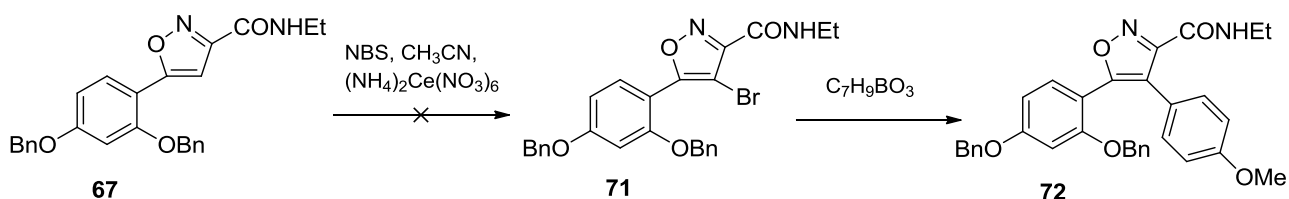
Si è quindi partiti dall'intermedio **67** (già utilizzato per la sintesi di altri derivati), si è tentato di ottenere il composto **68** mediante una reazione di nitrurazione, e da qui, attraverso una riduzione del nitrogruppo, giungere alla sintesi del composto **69**. Per l'ottenimento dell'intermedio **68** le condizioni di reazione prevedono la presenza di HNO_3 al 70% e anidride acetica. In realtà il composto risultante è stato

un prodotto nitrato sul nucleo resorcinolico anzichè sull'isossazolo; infatti come si era infatti ipotizzato, le posizioni libere del benzene recano una maggiore reattività rispetto alla posizione 4 dell'isossazolo.

Si è quindi provato a modificare il sostituente in posizione 4 dell'isossazolo, in modo da ottenere il composto **72**. Per questo è stata condotta una reazione di bromurazione sempre sull'intermedio **67** cercando di ottenere il composto **71**, sostituito con il bromo sulla posizione 4 dell'isossazolo. Da qui, attraverso una reazione di Suzuki e utilizzando l'acido 4-metossifenilboronico si sarebbe potuto ottenere **72**.

La reazione è stata condotta in presenza di N-Bromosuccinimide e Cerio ammonio nitrato in acetonitrile come da procedura di letteratura.

SCHEMA XVIII



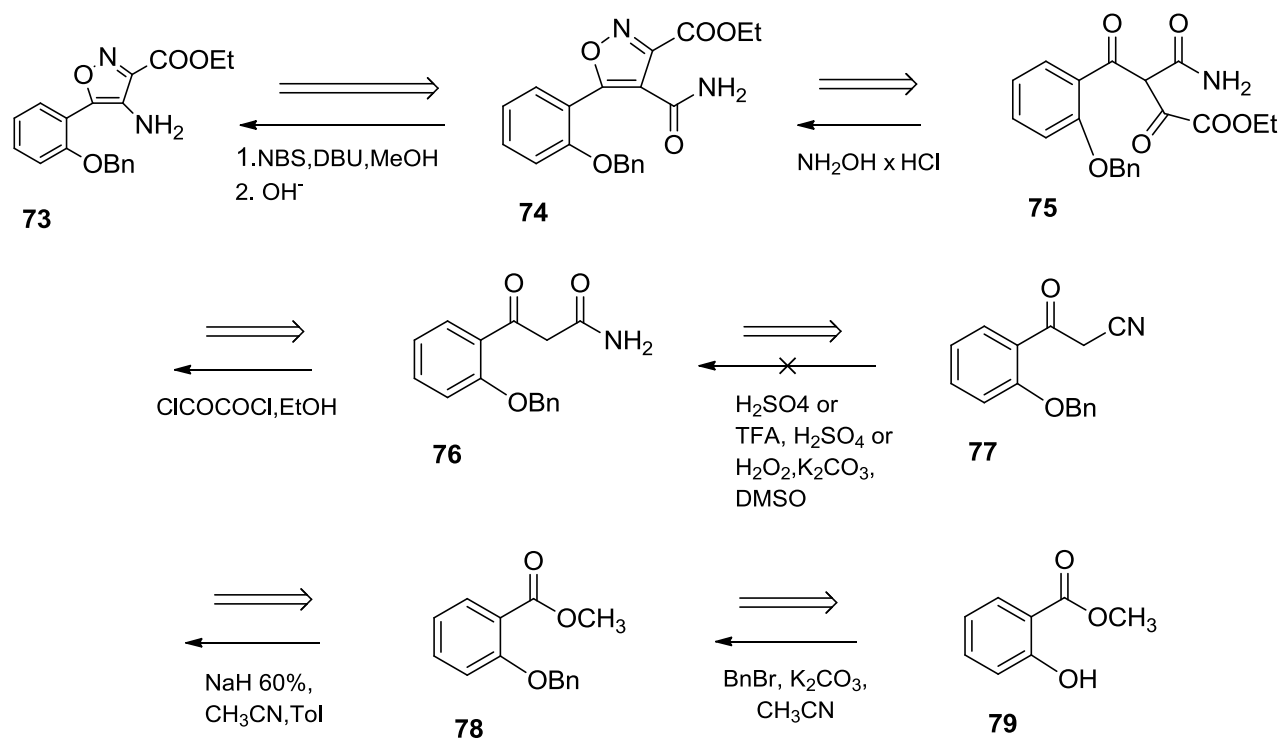
Non è stato possibile però ottenere l'intermedio **72** in quanto si formano una serie di prodotti di poli-bromurazione sull'anello aromatico, evidenziabili dalla spettrometria di massa, che non permettono di individuare il prodotto desiderato.

Vista la non efficacia di questo tipo di strategia sintetica,¹⁹ si è deciso di procedere partendo da un altro tipo di prodotto commerciale, **79**, e seguendo una via retro sintetica arrivare all'ottenimento dell'intermedio **73**, recante un'ammina primaria in posizione 4 dell'isossazolo, utile allo scopo prefissato.

Il percorso sintetico realizzato è descritto nello schema XIX.

VII: Primo approccio sintetico teorizzato: ciclizzazione di un intermedio acetamidico

SCHEMA XIX



Si è quindi partiti dal prodotto commerciale **79** e si è effettuata una protezione del gruppo ossidrilico utilizzando benzilbromuro in presenza di acetonitrile per ottenere il composto **78** con rese quantitative.

La sintesi dell'intermedio **77** è stata condotta a partire dal composto **78** in condizioni anidre e utilizzando un eccesso dei reagenti sodio idruro e acetonitrile, in modo da ottimizzare un po' le rese non tanto alte della reazione, ottenendo così il composto desiderato con una resa circa del 50%.

La reazione successiva rappresenta il punto cruciale del percorso. Nonostante le procedure utilizzate per effettuare l'idratazione del nitrile fossero note in letteratura, né l'idrolisi acida né quella basica hanno portato alla formazione del composto **76**.

Per l'ottenimento di questo derivato sono state provate le seguenti reazioni:

1. È stata tentata un'idrolisi acida sul composto **77** utilizzando acido solforico concentrato.²⁰ Dall'analisi in TLC si è evidenziata, però, solo la presenza di

sottoprodotti di decomposizione molto polari, che difficilmente si estraggono in fase organica durante il work-up della reazione.

2. Si è allora tentata un'altra idrolisi acida con l'utilizzo questa volta di acido trifluoroacetico e acido solforico concentrato in rapporto 4:1.²¹ In questo caso, come nel precedente, si sono formati sottoprodotti di decomposizione molto polari, nessuno corrispondente a quello desiderato e quindi non è stato possibile isolare e caratterizzare un prodotto definito.

3. L'ultimo tentativo effettuato è stata un'idrolisi basica utilizzando acqua ossigenata e potassio carbonato²². Anche con questa procedura non si è riusciti a idratare il nitrile e non è stato possibile caratterizzare un composto definito.

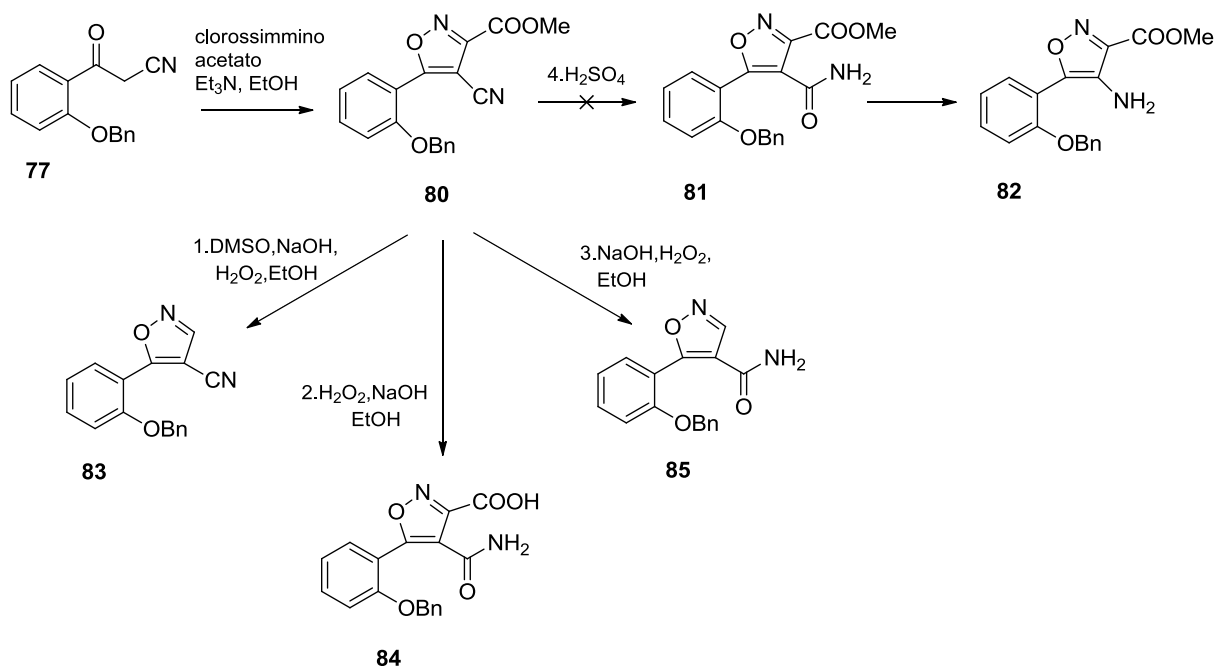
Tutte le reazioni acide effettuate sull'intermedio **77** per ottenere il prodotto **76** sono note in letteratura ma su substrati che non contengono il gruppo protettore benzil etere in posizione orto rispetto al nitrile. Probabilmente questo rappresenta l'elemento destabilizzante della molecola, il quale impedisce in qualche modo la formazione del prodotto desiderato.

Si è cercata allora una strada alternativa per arrivare all'intermedio che portasse la sostituzione amminica sull'isossazolo (**73**).

VIII: Secondo approccio: cicloadizione su un cianoacetofenone

Come si evince dallo schema XX, si è pensato di effettuare una cicloadizione direttamente sul composto **77** utilizzando il metil-2-cloro-2-(idrossimmino)acetato per ottenere **80**; in seguito provare ad arrivare all'intermedio **82** mediante idrolisi del nitrile sulla posizione 4 dell'isossazolo (**81**) e successivamente provare una trasposizione di Hoffman.

Schema XX



Sul composto **77** è stata effettuata una reazione di cicloadizione in presenza di clorossimino acetato e trietilammina in eccesso per ottenere il prodotto **80**.

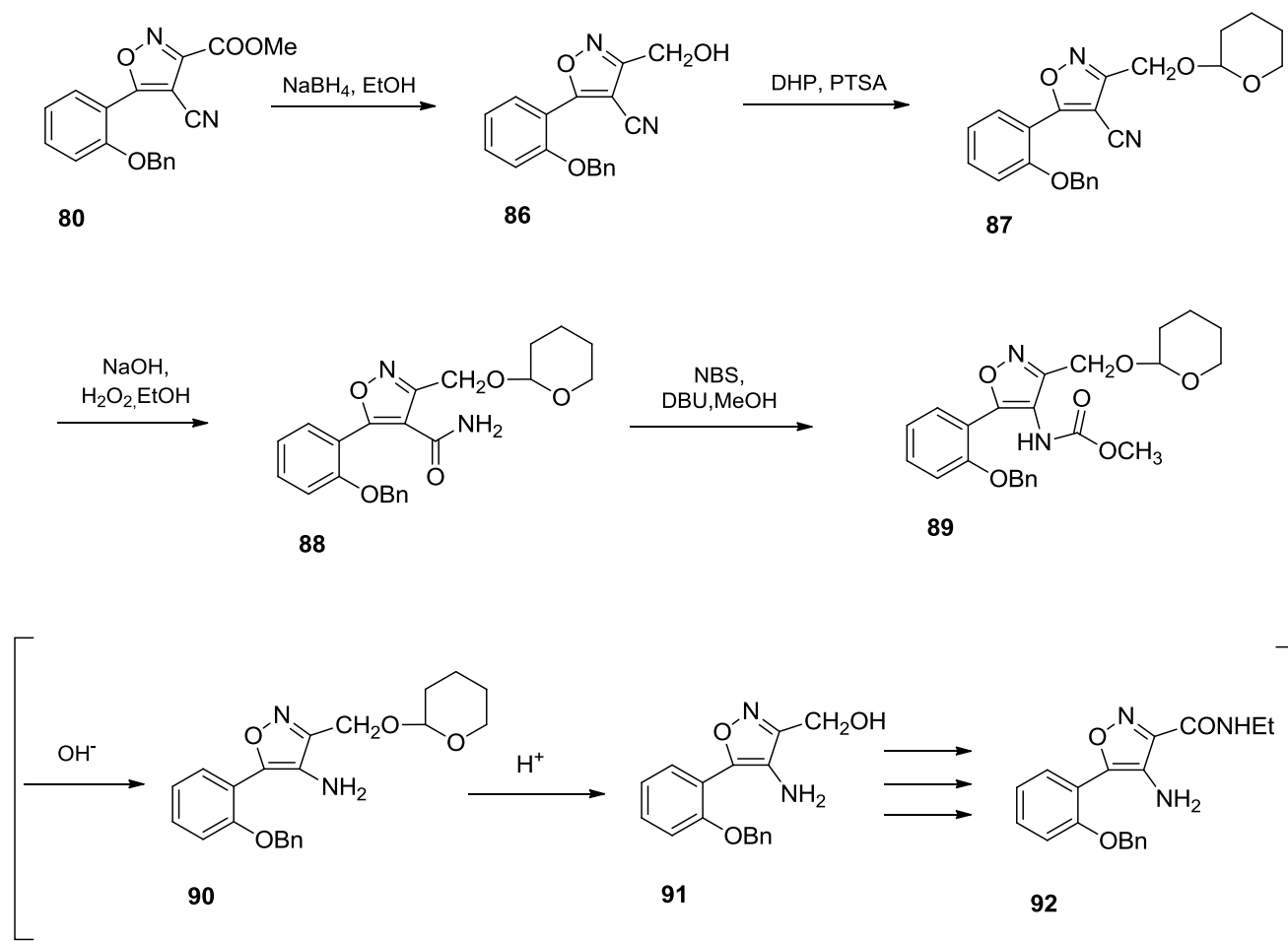
La resa della reazione è di circa il 60%. A questo punto, si sono provate altre procedure note in letteratura per idratare il nitrile in posizione 4 dell'isossazolo con i seguenti risultati:

1. la reazione condotta con DMSO, NaOH 0.2 M, H₂O₂ 11% ed etanolo come solvente²³ ha portato all'idrolisi dell'estere in posizione 3 dell'isossazolo e alla sua successiva decarbossilazione (**83**);
2. mediante la procedura che utilizza H₂O₂ 30%, NaOH 6M ed etanolo come solvente,²⁴ si è ottenuto il composto **84**; da qui si è provato ad effettuare una riesterificazione ma senza successo;
3. questa prova è stata condotta in maniera simile alla seconda, ma si sono invertiti gli ordini di aggiunta dei reagenti: prima la NaOH 6N e dopo H₂O₂ 30%. Il risultato è stato il composto **85**;

Dai risultati ottenuti da queste 3 prove, si può evincere che l'intermedio **80** presenta un punto di instabilità il quale non consente il buon esito della reazione; l'estere in posizione 3 dell'isossazolo infatti, subisce processi di idrolisi dando un acido carbossilico, il quale in alcuni casi decarbossila ulteriormente.

È necessario quindi utilizzare un gruppo protettore che impedisca l'idrolisi dell'estere e consenta solamente al nitrile in posizione 4 dell'isossazolo di idratarsi; come presentato nel seguente schema:

SCHEMA XXI



Per la protezione dell'estere in posizione 3 dell'isossazolo è stato necessario dapprima ridurre il gruppo funzionale ad alcol primario, ottenendo così **86**. La reazione è stata condotta utilizzando sodio boro idruro in etanolo con una resa di circa l'80%.

Successivamente si è potuta effettuare la protezione dell'alcol primario con diidropirano utilizzando come catalizzatore acido p-toluenosolfonico ottenendo così il composto **87**.

Una volta protetto il gruppo alcolico, si è proseguito effettuando un'idrolisi basica con NaOH 6N e H₂O₂ 30% in etanolo²⁵ per ottenere il prodotto **88**.

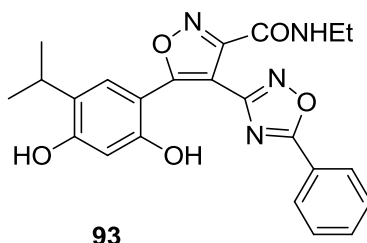
A questo punto, ottenuta l'ammide primaria sulla posizione 4 dell'isossazolo, si può proseguire con la formazione del carbammato attraverso la trasposizione di Hoffmann e successiva idrolisi basica per dare l'ammina primaria. (**90**)

L'intermedio **88** è stato fatto reagire con N-bromosuccinimide e DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) in metanolo²⁶ per dare il prodotto **89**. La reazione è stata condotta con un eccesso di N-bromosuccinimide (2 eq) per ottenere una completa trasformazione dell'intermedio con buone rese.

Ottenuto il carbammato sul composto **89**, si sarebbe potuto proseguire con successiva formazione del gruppo amminico (**90**), deprotezione dell'alcol primario (**91**) e riesterificazione (**92**), anche se il percorso intrapreso sarebbe risultato un pò lungo ed elaborato.

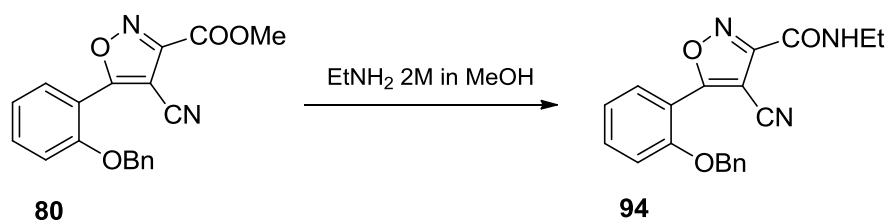
IX: Terzo approccio: sintesi di analoghi ossadiazolici

Allo stesso tempo durante un periodo di ricerche in letteratura, è stato trovato un lavoro²⁷ in cui sono state sintetizzate e testate alcune molecole su Hsp90 aventi anch'esse il nucleo del resorcinolo; questi composti hanno mostrato spesso elevata attività anche se differente in base ai sostituenti presenti.



Dato che la sintesi riportata utilizza efficacemente un 4 cianoisossazolo come intermedio, si è deciso di provare a sintetizzare lo stesso tipo di composti, con le opportune modifiche ipotizzate dagli studi di molecular design, al fine di ottenere una serie di prodotti potenzialmente utili a provare la validità della teoria elaborata e comparare le attività delle diverse molecole su TRAP1 anzichè su Hsp90; tutto questo con un procedimento sintetico semplificato rispetto al progetto iniziale.

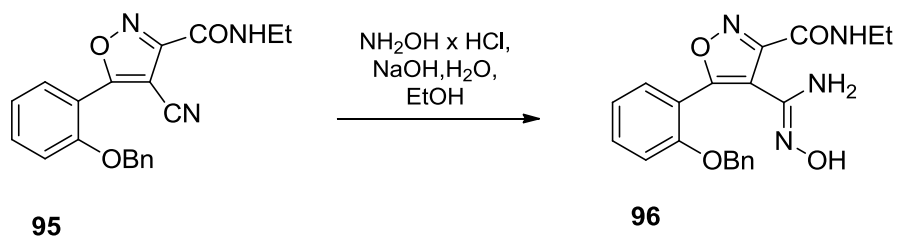
SCHEMA XXII



Si è così pensato di trattare il composto **80** in presenza di etilammina soluzione 2M in metanolo per dare il **94** e creare un sostituito ammidico in posizione 3 dell'isossazolo. L'introduzione del gruppo etilammide, in questo caso, non intralcia la sintesi di seguito riportata, la quale non prevede più la trasposizione di Hoffmann.

Infatti, si è seguita una procedura in modo da funzionalizzare il nitrile²⁸ nel seguente modo:

SCHEMA XXIII

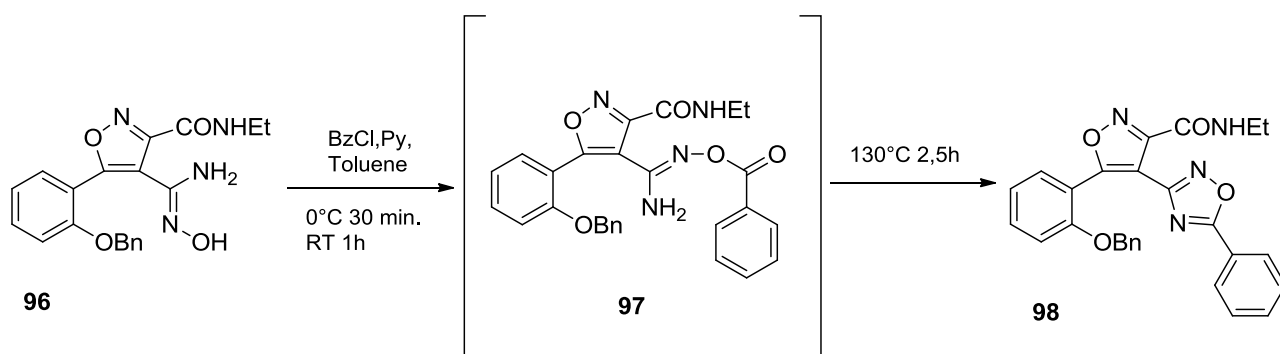


Mediante reazione con idrossilammina cloridrata e idrossido di sodio si è ottenuto il prodotto **96**. La resa è quantitativa perchè si ha come unico risultato la formazione dell'ossima in posizione 4 dell'eterociclo.

La reazione potrebbe dare origine ai due stereoisomeri Z ed E, ma per il proseguimento della sintesi non è stato fondamentale individuare quale dei due prodotti si fosse formato in reazione.

La reazione successiva è quella che porta alla formazione dell'intermedio **97** che ciclizza per dare il prodotto **98**, come riportato nello schema XXIV.

SCHEMA XXIV

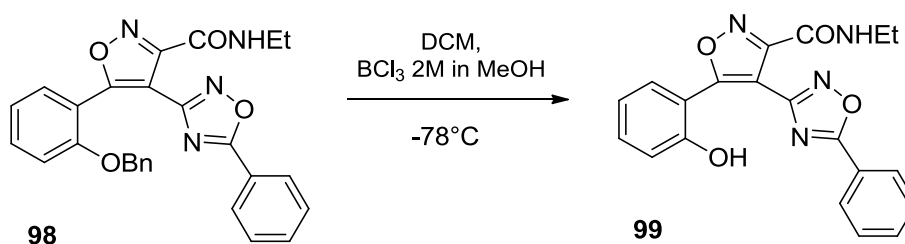


Per la formazione di **97** è stato fatto reagire **96** in presenza di piridina a 0°C ; successivamente si è aggiunto il benzoilcloruro e la reazione è stata riportata a temperatura ambiente.

La chiusura dell'eterociclo che dà come risultato l'ossadiazolo **98** è possibile solo in seguito a riscaldamento dell'intermedio **97** con una resa di circa il 40%.

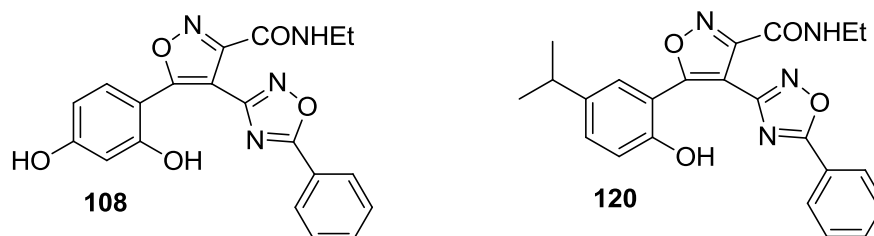
Una volta ottenuto **98**, l'ultima reazione da effettuare è la deprotezione del gruppo ossidrilico sull'anello aromatico.

SCHEMA XXV



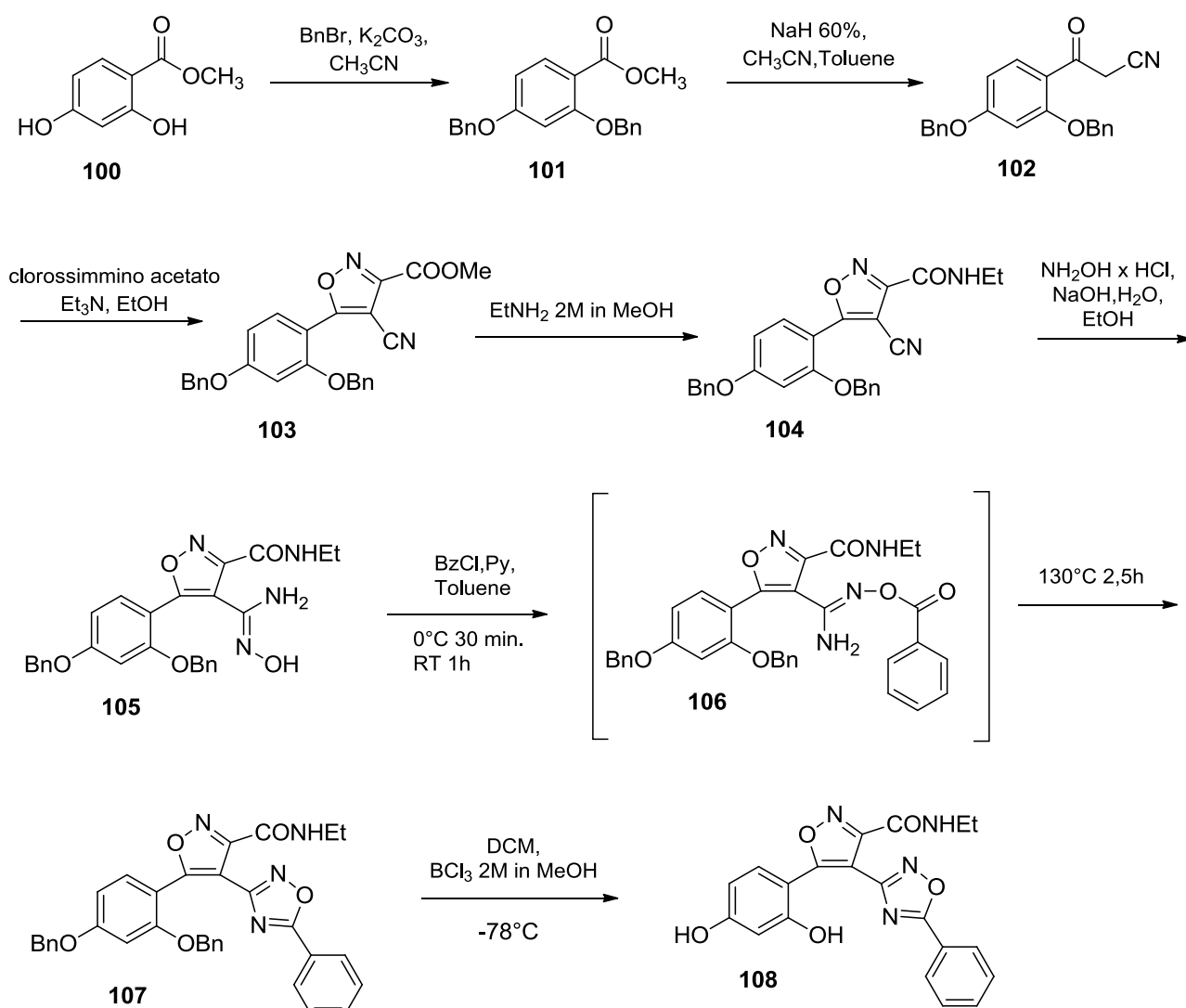
La reazione è eseguita a -78°C in presenza di BCl_3 in diclorometano e dà una resa dell'80%; il risultato è il prodotto finale **99**.

La sequenza di reazioni si è rivelata efficace e versatile, pur con rese non elevate, anche per ottenere altri due prodotti analoghi, il 2,4 diidrossi fenil derivato (**108**) e il 2 idrossi, 5-isopropilfenil derivato. (**120**)



Per la sintesi di **108** si è potuta utilizzare, quindi, la stessa metodica messa a punto per ottenere il composto **99**.

Schema XXVI



Si è partiti dal prodotto commerciale metil-2,4-diidrossibenzoato **100** e si è effettuata una protezione dei due gruppi ossidrilici utilizzando benzilbromuro e carbonato di potassio per ottenere il composto **101**.

Si è poi proceduto alla sintesi del composto **102** attraverso una reazione condotta in toluene in presenza di idruro di sodio e acetonitrile.

L'intermedio **103** è stato ottenuto facendo reagire **102** con trietilammina e clorossimino acetato attraverso una reazione di ciclo addizione. Questo poi è stato fatto reagire con etilammina per dare **104**, il quale, in reazione con idrossilammina cloridrata e idrossido di sodio in metanolo, ha dato il composto **105**.

A questo punto, mediante una reazione tra quest'ultimo intermedio, la piridina e il benzoilcloruro in toluene, si è ottenuto **107**.

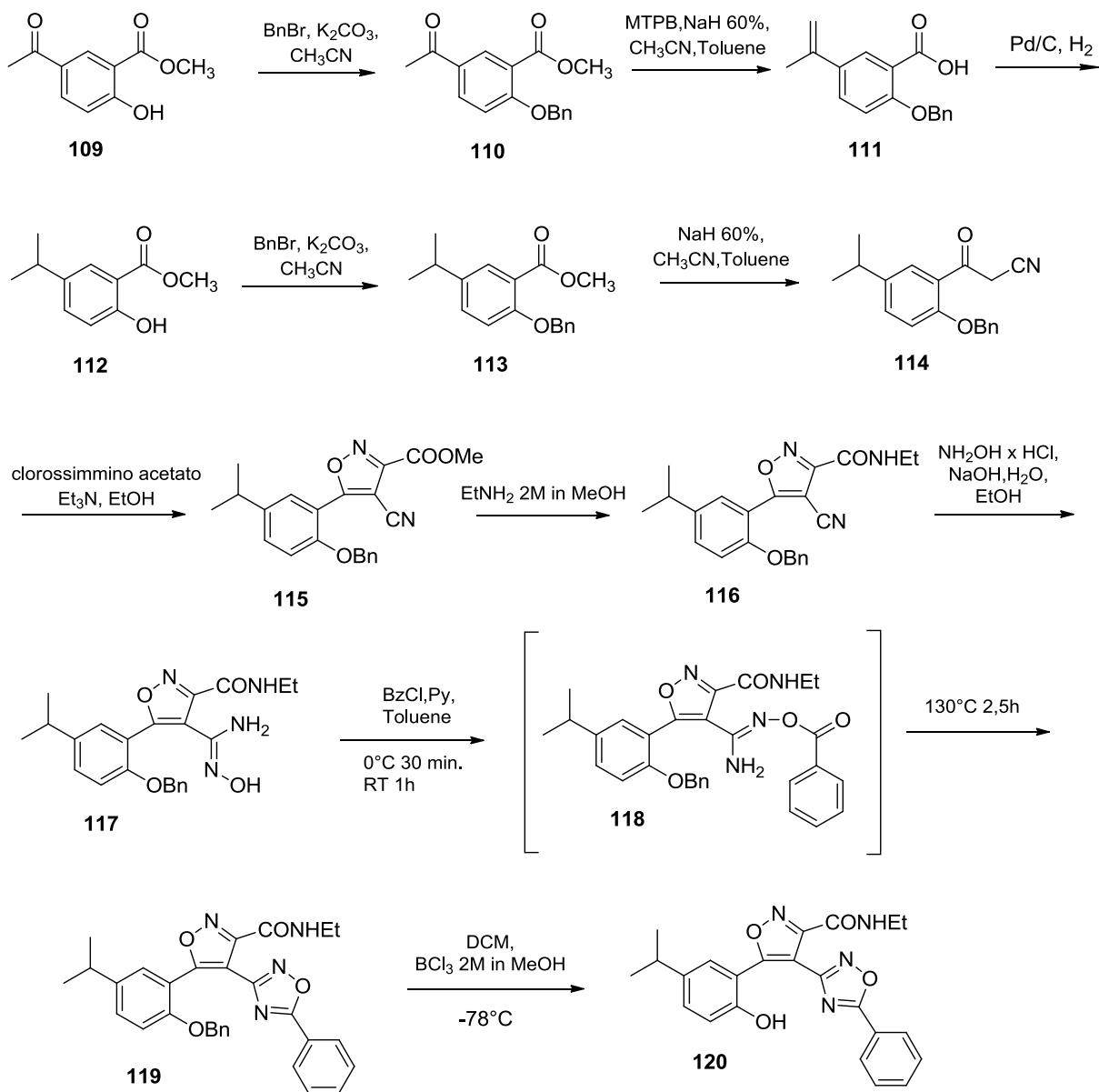
Attraverso la deprotezione dei due gruppi ossidrilici con tricloruro di boro in diclorometano, è stato sintetizzato il finale **108**.

Leggermente diversa negli step iniziali è stata la sintesi dell'ultimo derivato come riportato nello schema XXVII.

In questo caso si è partiti dal prodotto commerciale metil,5 acetil,2 idrossi benzoato, **109**, il quale è stato dapprima opportunamente protetto con benzil bromuro per ottenere il derivato **110**; successivamente mediante reazione di Wittig con l'utilizzo di sodio idruro si è ottenuto il composto **111**. Per successiva riduzione del doppio legame a gruppo isopropilico e deprotezione del gruppo ossidrilico, mediante l'uso di carbone palladiato in atmosfera di idrogeno, si è ottenuto il composto **112**. Questo è stato riprotetto con benzil bromuro e fatto reagire con acetonitrile e sodio idruro per dare l'intermedio **114** con buone rese.

Da qui sono stati effettuati gli stessi step di reazione utilizzati per i precedenti composti al fine di ottenere il composto finale **120**.

Schema XXVI



RISULTATI BIOLOGICI E DISCUSSIONE

I composti sintetizzati e descritti in questo lavoro di tesi, recanti in catena laterale sali di trifenilfosfonio, piridinio, guanidinio e i derivati poliamminici, sono stati inviati presso i laboratori del Dr. M. Landriscina dell'Università degli Studi di Foggia per essere testati *in vitro* mediante test di citotossicità su linee cellulari di tumore al colon HCT116.

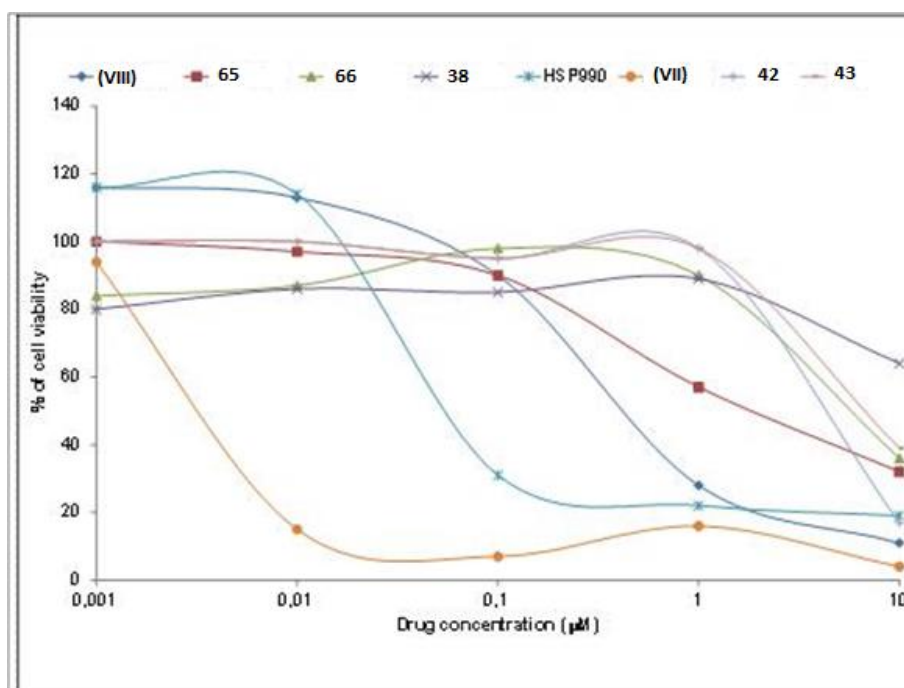


Grafico 1. Cell viability was evaluated by the MTT dye assay. Colon carcinoma HCT116 cells were seeded into 24-well plates (10^4 cells/well) and incubated, 24 h later, in the presence of indicated concentrations of inhibitors for 24h. Cells were incubated in a drug-free medium for 72 h and, then, evaluated for MTT incorporation.

I dati riportati dimostrano che i composti **38**, **42**, **43**, **65** hanno valori di IC_{50} compresi tra 6 e 10 μ M

E' interessante notare che tra questi derivati, soprattutto **43** e **65**, cioè quelli recanti in catena laterale rispettivamente un sale di piridinio e di guanidinio, mostrano un'attività comparabile con quella dei principali derivati Gamitrinibs, una classe di noti inibitori di TRAP1.

Ulteriori saggi sono poi stati condotti nei laboratori della Prof. M.P. Costi presso l'Università degli studi di Modena; dove è stata valutata l'abilità di questi composti nell'indurre apoptosi in cellule HCT116 dopo 24 ore di trattamento. I dati risultanti

hanno evidenziato che i composti sintetizzati **42**, **43**, **65** e **66** producono il 20% di apoptosi. (Grafico 2); dato comparabile con il composto di riferimento (**VIII**) il quale presenta una capacità di indurre apoptosi pari al 90%,

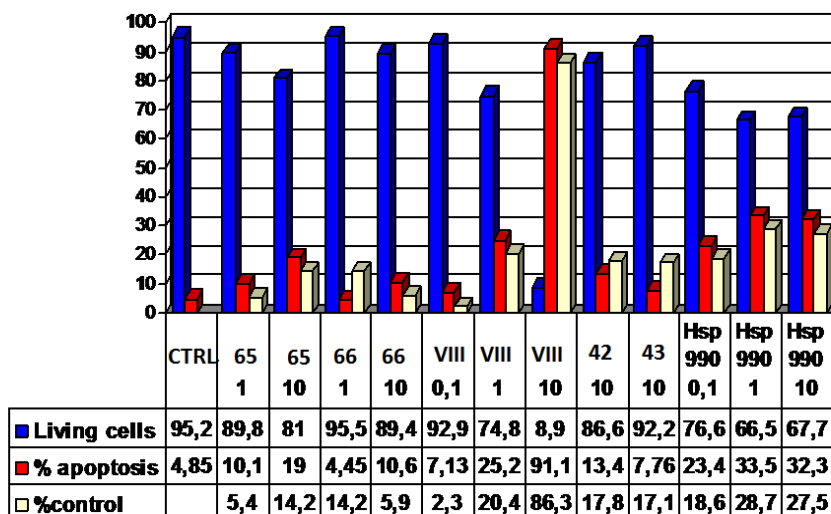


Grafico 2. Colon carcinoma HCT116 cells were treated with indicated concentrations of inhibitors for 24h and stained with 5µl of Annexin-V and 5µl of 7-amino-actinomycin-D (7-AAD) using the fluorescein isothiocyanate (FITC) Annexin-V/7-AAD kit, according to the manufacturer's protocol (Beckman Coulter, Milan, Italy). Positive cells were evaluated by cytofluorimetric analysis using the FACSCalibur™ (Becton Dickinson). Positive staining for Annexin-V as well as double staining for Annexin-V and 7-AAD were interpreted as signs of early and late phases of apoptosis, respectively.

In un ulteriore saggio, invece, è stata valutata l'attività ATPasica di TRAP1; questo ha evidenziato che gli inibitori di Hsp90 (**VII**) e (**VIII**) mostrano un valore di IC₅₀ compreso nel range tra 0,2-0,5 µM e l'attività del composto **65** risulta paragonabile a quella del composto di riferimento **VII**.

Diversamente i composti **38**, **42**, **43** e **66** rientrano in un range di interesse compreso tra 3 e 25 µM.

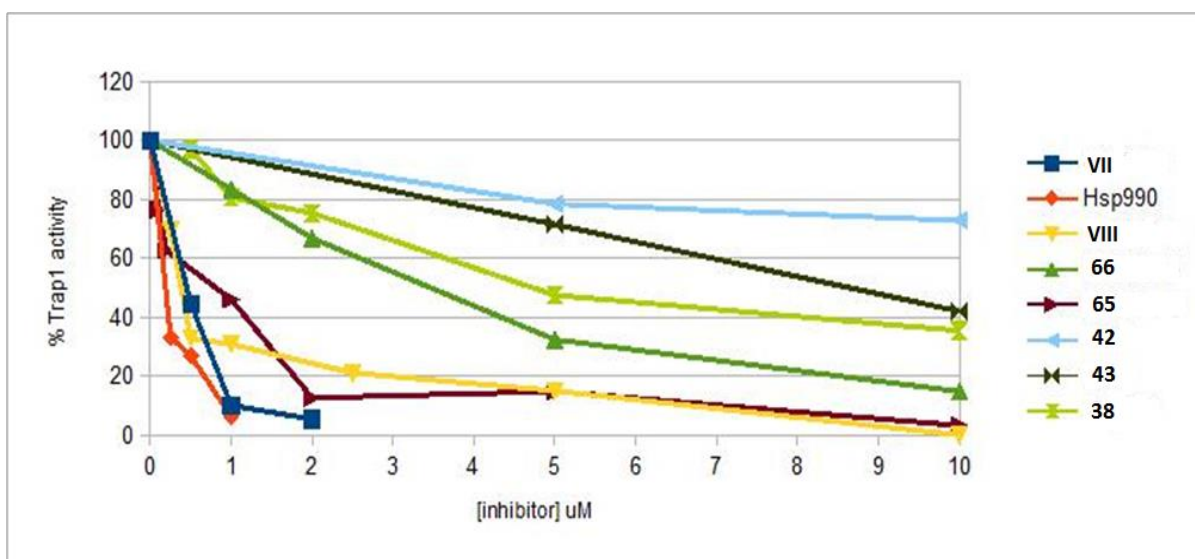


Grafico 3. Per le reazioni ATP-asiche sono stati utilizzati i seguenti reagenti: Trap1 Human Recombinant 1,9 µg/µl; Reaction Buffer: Tris-HCl 100mM pH7.4, KCl 20mM, MgCl₂ 6mM, ATP soluzione 5mM, soluzioni di inibitori in DMSO a diverse concentrazioni. I campioni sono stati incubati a 37°C overnight.

Complessivamente quindi i risultati biologici ottenuti dimostrano che l'attività dei derivati sintetizzati è paragonabile a quella di derivati già noti in letteratura come i Gamitrinibs.

Un aspetto importante e positivo è rappresentato inoltre da alcune prove effettuate sui lisati mitocondriali di cellule contenenti alcuni dei composti sintetizzati come **38**, **43** e **65**, le quali tramite analisi di Massa hanno evidenziato un accumulo di questi derivati all'interno del comparto mitocondriale. Mentre lo stesso test effettuato sul composto di riferimento (**VIII**) non ha dato nessun picco di accumulo all'interno dell'organello; sono quindi tutt'ora in corso ulteriori test di conferma anche sui restanti derivati.

Questo rappresenta un punto di forza nel lavoro fin'ora svolto in quanto fondamentale è il presupposto che questi derivati si accumulino selettivamente nel mitocondrio esplicando qui la loro attività citotossica, anche se con un valore di IC₅₀ superiore. Combinando le due informazioni sull'efficacia del veicolo policationico e sulla diminuzione delle attività ATPasica su TRAP1 insieme a quella nei confronti dell'apoptosi, possiamo ipotizzare che una possibile strategia futura possa essere sviluppata modificando l'unione tra il farmacoforo e il veicolo. Da informazioni di letteratura riguardanti i Gamitrinibs, si può ipotizzare che un

linker ideale debba avere una lunghezza maggiore, tale da separare in maniera efficace le due porzioni.

Per quanto riguarda invece la sintesi dei composti **99**, **108** e **120**, cioè quelli recanti un eterociclo ossadiazolico rispetto alla posizione 4 dell'isossazolo; la loro sintesi è stata da poco ultimata e siamo in attesa dei risultati biologici, soprattutto sarebbe importante avere un dato confortante che ci permetta di capire se la mancanza di uno o più sostituenti sull'anello ex resorcinolico sia funzionale per l'inibizione di TRAP1, come previsto dai suggerimenti di Molecular Modeling alla base di queste modificazioni.

CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di progettare nuovi derivati che agiscano da inibitori del chaperone molecolare TRAP1 a livello mitocondriale, utilizzando precedenti dati biologici relativi a prodotti sintetizzati dal gruppo di ricerca e attivi su Hsp90.

In particolare si è cercato di individuare nuovi inibitori in grado di accumularsi selettivamente nel compartimento mitocondriale oppure che permettano di sviluppare un nuovo studio struttura-attività per favorire una maggiore selettività su TRAP1.

Si è pensato di strutturare queste molecole, sulla base dei composti Gamitriinibs presenti in letteratura, in tre specifiche parti: una componente che agisca da inibitore del sito ATPasico di TRAP1, nel nostro caso una struttura isossazol resorcinolica, una porzione che permetta l'accumulo a livello mitocondriale costituita genericamente da un catione lipofilo ed un linker che colleghi le due parti.

In base a recenti studi, il chaperone mitocondriale TRAP1, omologo di Hsp90, si è potenzialmente rivelato come un ottimo target antitumorale la cui inibizione permette di agire selettivamente sulle cellule cancerose senza elevata tossicità.

Una potenziale selettività può essere supportata dal fatto che TRAP1 è presente in quantità più elevata nei mitocondri di cellule cancerose; infatti a livello dei tessuti normali la sua espressione è difficilmente rilevabile; inoltre le cellule cancerose presentano un potenziale elettrico negativo (a livello della matrice mitocondriale) significativamente più elevato rispetto alle cellule normali e ciò facilita un preferenziale accumulo dei composti che, come già riportato, contengono un catione lipofilo.

Da un punto di vista chimico, gli obiettivi prefissati sono stati pienamente raggiunti e, nonostante alcune procedure sintetiche fossero note in letteratura, è stato comunque sviluppato un differente percorso sintetico adatto alla produzione dei nuovi derivati.

I risultati biologici relativi ai composti **38**, **42**, **43**, **65**, **66**, hanno evidenziato che nonostante l'attività di questi non sia paragonabile a quella dei composti di riferimento con attività su Hsp90 citosolico, il veicolo policationico rappresenta un punto di forza per il direccionamento e l'accumulo delle stesse molecole nel mitocondrio.

Si è infine ipotizzato di introdurre dei miglioramenti nell'assemblaggio tra farmacoforo, linker e veicolo che possano aumentare anche l'attività antitumorale. Non abbiamo ancora indicazioni sulla validità delle modifiche apportate a livello del farmacoforo per confermare una maggiore selettività nei confronti di TRAP1 rispetto ad Hsp90.

PARTE SPERIMENTALE

7. 1. Metodi generali e materiali utilizzati

I dati di risonanza magnetica nucleare ($^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$) sono stati determinati, salvo diversa indicazione, in soluzione deuterata di DMSO o CDCl_3 con uno spettrometro Bruker AC-200 e Varian Mercury Plus 400; i picchi sono espressi in parti per milione (ppm) utilizzando come standard interno il tetrametilsilano. I valori delle J sono espressi in Hertz.

Il peso dello ione molecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$ dei composti è stato determinato con spettrometria di massa electrospray mediante registrazione a doppio-fuoco con uno strumento Finnigan MAT 95 con geometria BE. La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata fatta utilizzando gel di silice F-254. La cromatografia flash è stata eseguita utilizzando gel di silice Merck 60 (0.063 – 0.200 mm). I solventi sono stati essiccati in accordo con le procedure standard e le reazioni che richiedono condizioni anidre sono state fatte in atmosfera di argon. Le soluzioni contenenti i prodotti finali sono anidificate su Na_2SO_4 , filtrate e concentrate mediante sottovuoto utilizzando il rotavapor.

7. 2. Abbreviazioni

- ✓ THF tetraidrofurano
- ✓ Et_2O etere etilico
- ✓ AcOH acido acetico
- ✓ AcOEt acetato d'etile
- ✓ EtOH etanolo
- ✓ MeOH metanolo
- ✓ CH_3CN acetonitrile
- ✓ CH_2Cl_2 cloruro di metilene
- ✓ iPrOH isopropanolo
- ✓ Py piridina
- ✓ $\text{P}(\text{Ph})_3$ trifenilfosfina
- ✓ TEA trietilammina
- ✓ SOCl_2 cloruro di tionile
- ✓ BCl_3 tricloruro di boro
- ✓ $(\text{Ac})_2\text{O}$ anidride acetica

7. 3. Sintesi

Acido 4-((5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4-il)amino)-4-ossobutanoico (9)

Si scioglie il composto **8** (0,418 mmol) in CHCl_3 ; si aggiunge anidride succinica (1,253 mmol) e si mette la reazione a riflusso per 5h a 70°C .. TLC di controllo (A/P 4:6 + Ac. Formico).Dopo di che si aggiungere ancora CHCl_3 e si estrae con HCl 5%; poi si anidri fica con Na_2SO_4 e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il prodotto si purifica mediante cromatografia su colonna, utilizzando come fase eluente A/P 1:1

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.27 (t, 3H, $J= 7.2$); 2.26-2.24 (m, 2H); 2.49-2.48 (m, 2H); 3.49-3.46 (m, 2H); 4.97 (s, 2H); 5.17 (s, 2H); 6.62 (s, 1H); 6.85-6.82 (m, 1H); 7.44-7.37 (m, 10H); 7.55-7.5 (m, 1H); 8.59 (s, 1H)

terz-butil(3-aminopropil)(2-((terz-butossicarbonil)(3-((terz-butossicarbonil) amino)propil) amino) etil) carbammato (11)

La reazione è condotta in condizioni anidre. In un pallone da 50 ml si scioglie **10** (1,79,86mmol) in MeOH; si porta la temperatura a -78°C . e si aggiunge EtOOCCF_3 (9,85 mmol) nell'arco di 30 minuti. Si lascia per altri 30 minuti la reazione a -78°C e poi si porta la temperatura a 0°C . Quindi si aggiunge Boc_2O (39,4 mmol) e si lascia in agitazione per 15h a RT. Si porta il pH a 11 con l'aggiunta di NH_3 concentrato e si lascia in agitazione altre 15h a RT. Si concentra una parte di MeOH; si aggiungono altri 100mL di MeOH; poi 120 mL di THF. Si scioglie il LiOH in H_2O (50 mL) e si aggiunge pian piano alla soluzione. La reazione viene lasciata on a RT.

A termine si aggiunge qualche mL di H_2O , si evaporano THF e MeOH e si estrae con AcOEt; poi con H_2O ed infine con brine. Si anidrifica con Na_2SO_4 e si porta a secco.

Purificazione mediante cromatografia su colonna con silice normale e miscela eluente DCM/MeOH 9,5:0,5 + NH_3

Resa 60%

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,46-1,43 (m, 27H); 1,7-1,6 (m, 4H); 2,67 (b. s. 2H); 3,09 (b. s. 2H); 3,29-3,23 (br. 8H)

acido9,12-bis(tert-butossicarbonil)-2,2-dimetil-4,17-diosso-3-ossa-5,9,12,16-tetraazaicosan-20-oico (14)

Si scioglie **11** (0,42 mmol) in DCM; si aggiunge la TEA (0,84 mmol) e infine l'anidride succinica (0,42 mmol). Si lascia reagire per 24h a RT.

Si diluisce quindi con DCM; si aggiunge NaHCO₃ diluito in H₂O e si neutralizza la reazione. Si forma un'emulsione lattiginosa che viene rotta poco a poco aggiungendo DCM poco alla volta. La fase organica viene poi acidificata con KHSO₄ (0.23M) circa 20 mL fino a pH 4. Successivamente si estrae con DCM; si anidrifca e si evapora il solvente. Resa 82%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.43 (m, 27H), 1.67 (s, broad, 4H), 2.6-2.4 (m, 2H), 2.69 (s, broad, 2H), 3.1 (s, broad, 2H), 3.26 (s, broad, 10H)

5-(2,4-bis(benzilossi)-5-clorofenil)-4-(2,5-diossopirrolidin-1-il)-N-etillisossazolo-3-carbossamide (12)

La reazione è condotta in condizioni anidre. Si scioglie **14** (0,24 mmol) in circa 3 mL di DCM; si aggiunge DIPEA (0,24 mmol), DMAP (0,72 mmol), PyBROP (0,24 mmol) e si lascia in agitazione a RT per qualche minuto.

Separatamente si scioglie **8** in DCM e lo si aggiunge a **14**; si lascia in agitazione a RT per una notte.

Dopo di che si aggiunge H₂O, DCM e poco ac. citrico 10%. La soluzione bifasica viene estratta più volte con DCM; si anidrifca e si porta a seccchezza.

La reazione dà come unico prodotto **15** e si recupera **8**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.25 (t, 3H, J=7,4), 1.43 (s, 27H), 1.62 (s, 12H), 3.08 (s, 2H), 3.25 (s, 8H), 3.47-3.39 (q, 2H, J=7,5), 3.5 (s, 1H), 5.1 (s, 4H), 6.6 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 7.42-7.27 (m, 10H), 7.62 (s, 1H)

4-acrilamido-5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-N-etilisossazolo-3-carbossamide (16)

Si scioglie **8** (200 mg, 0,41 mmol) in CH₂Cl₂ dry, si aggiunge DIPEA (0,74 mmol) e, a 0°C, si aggiunge acriloil cloruro (0,627 mmol). La reazione si lascia in agitazione per 1h. Si aggiunge quindi qualche goccia di HCl 0.1N; si estrae con poco DCM per due volte, si anidrifica e si evapora il solvente.

Purificazione mediante cromatografia su colonna con l'utilizzo di silice flash e con miscela eluente a gradiente, inizialmente A/P 3:7 e poi A/P 4:6

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.27 (t, 3H, J=7.2), 3.5-3.43 (m, 2H, J=7.2), 4.94 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 5.61-5.59 (d, 1H, J=12), 5.98-5.9 (m, 1H), 6.18 (d, 1H, J=16), 6.58 (s, 1H), 6.87 (t, 1H), 7.32 (m, 10H), 8.85 (s, 1H)

terz-butil (3-((3-((5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4-il)amino)-3-ossopropil)amino)propil)(2-((terz-butossicarbonil)(3-((terz-butossicarbonil)amino)propil)amino)etil)carbammato (17)

Si sciolgono **16** (0,291 mmol) e **11** (0,582 mmol) in THF, si evapora il solvente e si mette a reagire a 100°C per 1h. TLC di controllo (DCM/MeOH9.5:0.5)

Si purifica il grezzo mediante cromatografia su colonna con silice normale e miscela eluente DCM/MeOH9.5:0.5

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.25 (t, 3H, J=7,4), 1.43 (s, 27H), 1.62 (s, 12H), 3.08 (s, 2H), 3.25 (s, 8H), 3.47-3.39 (q, 2H, J=7,5), 3.5 (s,1H), 5.1 (s, 4H), 6.6 (s,1H), 6.83 (s, 1H), 7.42-7.27 (m, 10H), 7.62 (s,1H),

MS: 1007.6

4-(3-((3-((2-((3-aminopropil)amino)etil)amino)propil)amino)propanamido)-5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-N-etilisossazolo-3-carbossamide (18)

Reazione condotta in condizioni anidre. Si scioglie **17** (0,0995 mmol) in DCM Dry, si porta a -78°C e si aggiunge pian piano BCl₃ (0,7 mmol). Si lascia 1h a -78°C e poi 2 ore a RT.

Al termine si aggiungere qualche mL di DCM; poi qualche mL di NaHCO₃ soluzione satura, fino a pH 9. Si porta a secchezza il solvente e si estrae tre volte con AcOEt; poi una volta con brine. La fase organica contiene solo impurezze, mentre

il prodotto si trova in fase acquosa. Si evapora l' H₂O; poiché non è possibile sciogliere il prodotto in alcun solvente organico, si purifica mediante HPLC. Resa 76 %.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.22 (t, 3H, J=8.5), 2.23-2.04 (m, 4H), 2.82 (t, 2H, J=8.5), 3.06 (t, 2H, J=8.5), 3.23-3.13 (m, 6H), 3.49-3.32 (m, 8H), 6.58 (s,1H), 7.4 (s,1H)

MS: 526

1-(2,4-bis-benzilossi-fenil)-etanone (20).

Benzil bromuro (0.164mol) è aggiunto lentamente goccia a goccia a una miscela di 2,4-diidrossiacetofenone **19** (10g, 0.066 mol) e K₂CO₃ (22.66g, 0.164 mol) in CH₃CN (100ml). La miscela sotto agitazione magnetica, è posta a riflusso per 4 h a 90°C, è poi riportata a temperatura ambiente e lasciata in agitazione per tutta la notte. La miscela di reazione è concentrata a pressione ridotta e il residuo ottenuto viene poi diluito con H₂O ed estratto con CH₂Cl₂. Gli estratti organici sono riuniti, lavati con brine, anidrificati e concentrati per dare un solido che è purificato mediante triturazione con Esano per dare il derivato **20** come solido che viene essiccato sotto vuoto. Resa del 90%

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ2.55(s,3H),5.08(s,2H),5.11(s,2H),6.60–6.63(m,2H),7.35–7.44(m,10H), 7.85(d, 1H;J=9.4 Hz).

IR:ν=3035,1660 cm⁻¹

MS: 333.

2,4-bis-benzilossi-1-isopropenil-benzene (21).

Ad una soluzione di metiltrifenilfosfoniobromuro (42.82g,0.12mol) in toluene (100ml) si aggiunge lentamente NaH (4.8g,0.12mol) e poi **20** (20g,0.59mol), la miscela è portata alla temperatura di 100°C per 5 h in atmosfera inerte. Dopo aver riportato la reazione a temperatura ambiente, l'eccesso di base è distrutto con H₂O aggiunta goccia a goccia. Viene aggiunto AcOEt e si esegue un lavaggio con H₂O (50mlx2), la fase organica viene lavata con brine (50ml) anidrificata e concentrata a pressione ridotta. Al residuo ottenuto viene aggiunto Esano e questa sospensione è scaldata a

riflusso a 75°C per 30 minuti, riportata a temperatura ambiente viene successivamente triturrata con Esano e filtrata su gooch a pressione ridotta. Il filtrato ottenuto è concentrato fino a ottenere un olio giallo che viene successivamente purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice, (eluente:5% AcOEt in Esano), per dare il composto **9** come un olio incolore. Resa de 90%.

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ2.12(s,3H),5.03(s,2H),5.05(s,2H),5.07(br,2H),6.54(dd, 1H, J=8.4 Hz, 2.4 Hz), 6.59(d, 1H, J=2.4 Hz), 7.14 (d,1H, J=8.4 Hz). 7.29-7.44(m10H).

isopropilbenzene-1,3-diolo(22).

Al composto **21** (18.49g,0.057mol), sciolto in EtOH (200ml), viene aggiunto Pd/C al 10% preventivamente bagnato con H₂O. La miscela viene lasciata in agitazione magnetica a temperatura ambiente e in atmosfera di H₂ per 16 h. Il catalizzatore è rimosso per filtrazione su celite e il filtrato è concentrato per dare un residuo che viene purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice (eluente: miscela Petrolio/AcOEt70:30) per dare il composto **22** come un solido cristallino bianco.

Resa 90%.

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ1.22(d,6H,J=6.8Hz),3.09(ept,1H,J=6.8Hz),4.63(br,1H),4.74 (br,1H),6.29 (d,1H,J=2.4Hz),6.38(dd,1H,J=8.4,2.4Hz),7.03(d,1H,J=8.4 Hz).

MS: 153

1-(2,4-diidrossi-5-isopropil-fenil)etanone (23).

Acido acetico (4.22ml,0.1mol) è aggiunto goccia a goccia ad una sospensione di **22** (7.66g, 0.05mol) in BF₃·OEt₂ (27.7ml,0.31mol) sotto atmosfera inerte di argon. La miscela di reazione è posta a riflusso a 90°C per 5h sotto agitazione magnetica successivamente riportata a temperatura ambiente con formazione di un precipitato. La sospensione è versata in una soluzione acquosa di acetato di sodio al 10% p/v e lasciata in agitazione per 4h. Viene poi estratta con AcOEt e le fasi organiche sono riunite, lavate prima con una soluzione satura di NaHCO₃ e poi con brine ed infine anidificate su Na₂SO₄. Il residuo ottenuto dopo evaporazione del solvente è triturrato con Esano freddo a dare il chetone **23**, si ottiene un solido con Resa dell' 80%.

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ1.25(d,6H,J=6.8Hz),2.57(s,3H),3.13(ept,1H,J=6.8Hz), 5.64 (s, 1H),6.30 (s, 1H), 7.50 (s,1H), 12.56(s, 1H).

MS: 195

1-(2,4-bisbenzilossi-5-isopropil-fenil)etanone (24).

Benzil bromuro (11.97ml,0.1mol) è aggiunto ad una sospensione di **23** (7.82g,0.04mol) e K₂CO₃ (5.56g, 0.1 mol) in CH₃CN (80 ml).

La miscela in agitazione, è posta a riflusso per 4h a 90°C, e dopo essere stata riportata a temperatura ambiente è lasciata in agitazione per una notte. La miscela di reazione è concentrata a pressione ridotta e il residuo ottenuto è diluito con H₂O ed estratto con CH₂Cl₂. Gli estratti organici sono riuniti, lavati con brine, anidrificati e concentrati per dare un solido che viene ulteriormente purificato mediante triturazione con Esano per dare il derivato **24** come solido di colore biancastro che viene essiccato sotto vuoto fino a peso costante. Resa de 94%.

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ:1.22(d,6H,J=6.9Hz),2.56(s,3H),3.28(ept,1H,J=6.9Hz), 5.08 (s, 2H),5.10 (s, 2H), 6.51 (s,1H), 7.31–7.44 (m,10H), 7.76 (s, 1H).

MS: 375.2

Etil-4-(2,4-bisbenzilossi-5-isopropil-fenil)-2-idrossi-4-oxobut-2-enoato (25).

Sodio metallico (2.17g,0.094mol) è tagliato in piccoli pezzi e aggiunto a EtOH assoluto (150ml) in atmosfera di argon. La sospensione è agitata magneticamente fino a quando il sodio non si è completamente solubilizzato. Alla soluzione di sodio etossido è aggiunto **24** (16.04g,0.043mol) e dopo 5 minuti, dietilossalato (9.31ml,0.068mmoli), la sospensione è portata a riflusso per 4h. Dopo aver portato la miscela di reazione a temperatura ambiente viene qui aggiunto acido acetico (12ml) ed è così lasciata in agitazione per 2h. Il solvente viene evaporato, al residuo si aggiunge H₂O e si esegue una estrazione con AcOEt. Le fasi organiche sono riunite, lavate con brine, anidificate su Na₂SO₄ ed evaporate a pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene ulteriormente purificato mediante triturazione con Esano, la successiva filtrazione su gooch permette di ottenere **25** come solido verde con resa dell' 84%.

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ1.23(d,6H,J=6.8Hz),1.28(t,3H,J=7.0Hz),3.29(ept,

1H, $J=6.8\text{Hz}$), 4.28(q, 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 5.11(s, 2H), 5.14(s, 2H), 6.53(s, 1H), 7.32–7.46(m, 11H), 7.87 (s, 1H). MS: 475

Etil-5-(2,4-bisbenzilossi-5-isopropil-fenil)isossazolo-3-carbossilato(26).

Ad una sospensione di **25** (17.1g, 0.036mol) in EtOH assoluto (170ml) è aggiunta idrossilammina cloridrata (3.00g, 0.043mol), la miscela di reazione è riscaldata a riflusso alla temperatura di 90°C per 5h in atmosfera di argon e successivamente raffreddata a temperatura ambiente. Viene evaporato il solvente ed al residuo si aggiunge H₂O, si esegue una estrazione con CH₂Cl₂. Gli estratti organici vengono riuniti, lavati con brine ed anidrificati su Na₂SO₄, in seguito viene evaporato il solvente per ottenere un residuo liquido che viene ulteriormente purificato mediante triturazione con una miscela di EtOH (95%)/H₂O (1:1). Si esegue una filtrazione su gooch ed il solido ottenuto viene essiccato sotto vuoto fino a peso costante per dare **26** come solido di colore verde. Resa 95%.

¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ : 1.26(d, 6H, $J=7.0\text{Hz}$), 1.41(t, 3H, $J=7.1\text{Hz}$), 3.34(ept, 1H, $J=7.0\text{Hz}$), 4.42(q, 2H, $J=7.1\text{Hz}$), 5.07(s, 2H), 5.16(s, 2H), 6.57(s, 1H), 7.00(s, 1H), 7.32–7.43 (m, 10H), 7.83(s, 1H).

MS: 472;

¹³C NMR(400MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13.9, 22.4, 26.2, 61.7, 69.8, 70.4, 98.8, 101.5, 107.2, 124.0, 127.5, 128.0, 128.0, 128.2, 128.6, 128.6, 129.3, 136.3, 136.7, 154.9, 156.5, 158.6, 159.4, 167.8.

5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropil-fenil)-N-etilisossazolo-3-carbossammide(27).

Etilammina in soluzione 2.0M di MeOH (171ml,0.34mol) viene aggiunta a **26** (16.14g,0.034mol) e la miscela è scaldata a 90°C per 1h fino ad ottenere una soluzione omogenea di colore giallo che, lasciata raffreddare a temperatura ambiente, costituisce un precipitato. La miscela di reazione è filtrata su gooch ed il solido lavato con MeOH freddo ed essiccato sottovuoto fino a peso costante a dare il composto **27** come solido biancastro. Resa 94%.

¹HNMR(400MHz,CDCl₃) δ .1.25(d,6H, J =6.8Hz),1.26(t,3H, J =7.0Hz),3.33(ept,1H, J =6.8 Hz),3.49(m,2H),5.03(s,2H),5.17(s,2H),6.55(s,1H),6.81(br,1H),7.07(s,1H),7.30–7.42 (m,10H), 7.78(s, 1H).

MS: 471.

5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropil-fenil)-N-etil-4-nitro-isossazolo-3-carbossammide(28)

Una sospensione di **27** (1g,2.1mmol) in Ac₂O (10ml), sotto vigorosa agitazione magnetica, è raffreddata a-5°C, viene qui aggiunto HNO₃ al 70% (0.27ml,4.3mmol) goccia a goccia e la temperatura è mantenuta tra 0–5°C. La miscela di reazione è mantenuta per 70 h tra 5-10°C e successivamente versata in ghiaccio ed estratta con CH₂Cl₂. Le fasi organiche sono riunite e lavate con una soluzione satura di NaHCO₃, successivamente l'estratto organico ottenuto è lavato con brine, anidrificato e concentrato sotto vuoto. Il solido giallo ottenuto è triturato con Et₂O freddo e filtrato su gooch per dare il composto **28**. Resa 45%.

¹H-NMR (200MHz CDCl₃), δ :1.22-1.26(m,9H),3.24-3.38(m,1H),3.43-3.57(m,2H),5.02 (s, 4H),6.54(br, 2H), 7.30-7.39 (m,10H), 7.46 (s, 1H).MS:516.5.

4-ammino-5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropil-fenil)-N-etil-isossazolo-3-carbossammide(29).

Una soluzione di **28** (0.490g,0.95mmol) nel minimo volume di THF (5ml) è aggiunta ad una soluzione di NH₄Cl (1.245g,23mmol) in H₂O (10ml), sotto agitazione magnetica. Dopo aver raffreddato la miscela a 0°C, è aggiunto zinco in polvere (1.965g, 29.5 mmol), in piccole porzioni. La miscela di reazione viene riportata a temperatura ambiente e lasciata così sotto agitazione magnetica per 1h, viene poi filtrata su celite ed il filtrato è diluito con H₂O ed estratto con CH₂Cl₂, le fasi organiche riunite sono lavate con brine e anidificate. La fase organica ottenuta è quindi concentrata sottovuoto fino a peso costante per il derivato amminico **29**.

Resa 91%.

¹H-NMR(200MHzCDCl₃),δ:1.21-1.28(m,9H),3.28-3.38(m,1H),3.39-3.53(m,2H),4.38(br,2H),5.05(s,2H),5.08(s,2H),6.61(s,1H),6.83(br,1H),7.33-7.42(m,10H),7.52(s,1H).

MS: 486.6.

6-etil-((5-(2,4-bis(benzylossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazolo-4-ammino)-6-ossiesanoato(32)

Procedimento come per **33** ma partendo da **30**.

Resa: 80%

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 1.22-1.26 (m, 12H); 1.48-2.37 (m, 8H); 3.29-3.35 (q, 1H); 3.43-3.50 (m, 2H); 4.07-4.14 (m, 2H); 5.02 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 6.58 (s, 1H); 6.85 (t, 1H); 7.31-7.43 (m, 10H); 8.14 (s, 1H)

MS: 642

Acido-((5-(2,4-bis(benzylossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazolo-4-ammino)-6-ossiesanoico(34)

Procedimento come per **35** ma partendo da **32**.

Resa: 90%

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 1.22-1.29 (m, 9H); 1.52-1.53 (m, 4H); 1.95-2.25 (m, 4H); 3.25 (q, 1H); 3.43-3.49 (q, 2H); 5.01 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 6.58 (s, 1H); 7.39-7.49 (m, 10H); 8.14 (s, 1H)

MS: 614

tert-butil(2-((3-(6-((5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4-amino)-6-ossoesanammido)propil)(tert-butossicarbonil)amino)etil)(3-((tert-butossicarbonil)amino)propil)carbammato(36)

Procedimento come per **37** ma partendo da **34**.

Resa: 40%

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 1.42-1.45 (m, 36H); 1.64-1.97 (m, 10H); 1.64-2.04 (m, 4H); 3.15 (q, 1H); 3,20-3,20 (m, 16H); 3.45 (q, 2H); 5.01 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 6.58 (s, 1H); 7.39-7.49 (m, 10H); 8.14 (s, 1H)

MS: 1070

N1-(3-((2-((3-aminopropil)amino)etil)amino)propil)-N6-(5-(2,4-diidrossi-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazolo-4)adipamide(38)

Procedimento come per **39** ma partendo da **36**.

Resa 30 %.

¹H-NMR (400 MHz, Acetone d): 1.18-1.21 (s,9H); 1.65 (s, 4H); 1.88 (m, 2H); 2.09 (m, 2H); 3.26-2.38 (ds, 4H); 3.03-3.19 (m, 4H); 3.15-3.19 (m, 3H); 3.34-3.39 (m, 5H); 6.46 (s, 1H); 7.26 (s, 1H)

MS: 589

Etil-7-((5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4)amino)-7-ossoeptanoato(33)

La reazione è condotta in condizioni anidre.

In un pallone da 50 ml si scioglie l'acido pimelico monoetil estere **31** (200 mg, 1,06 mmol) in diclorometano (5 ml); quindi si aggiungono ossallil cloruro (2,12 mmol) e qualche goccia di DMF, la reazione si lascia per 2h a RT e dopo di che si evapora il solvente fino a secchezza in modo da ottenere come intermedio il cloruro dell'acido di partenza che viene direttamente utilizzato per il secondo step della reazione.

L'intermedio ottenuto viene nuovamente sciolto in DCM e a questo viene aggiunta una soluzione del composto **29** (1 mmol) anch'esso sciolto in DCM, infine si aggiunge trietilammina. La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica a RT per 16h.

Al termine si diluisce la reazione con DCM, si effettua un lavaggio con HCl 1M, poi un lavaggio con Brine, si anidrifca su Na₂SO₄ e si evapora fino a secchezza. Il grezzo viene purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando una fase eluente a gradiente che prevede prima AcOEt/pet 2:8 e poi AcOEt/Pet 3:7

Resa: 50%

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 1.22-1.26 (m, 12H); 1.48-2.37 (m, 10H); 3.29-3.35 (q, 1H); 3.43-3.50 (m, 2H); 4.07-4.14 (m, 2H); 5.02 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 6.58 (s, 1H); 6.85 (t, 1H); 7.31-7.43 (m, 10H); 8.14 (s, 1H)

MS: 654

Acido7-((5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4-amino)-7-ossopentanoico(35)

Il composto **33** (0,54 mmol) viene sciolto in THF, separatamente si prepara una soluzione di LiOH x H₂O (1,35 mmol) sciolto in H₂O e la si aggiunge nel Pallone di reazione contenente il composto di partenza. La reazione si lascia sotto agitazione magnetica a riflusso di THF per 2h. Al termine si tira a secco il solvente, si effettua una estrazione con Et₂O, in seguito si acidifica la fase acquosa con H₂O e si estrae più volte con AcOEt. Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente a secchezza.

Si ottiene un solido bianco

Resa: 90%

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 1.16-1.31 (m, 9H); 1.43-1.58 (m, 4H); 1.92-2.09 (m, 4H); 2.28 (t, 2H); 3.25 (q, 1H); 3.35 (q, 2H); 5.01 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 6.58 (s, 1H); 7.39-7.49 (m, 10H); 8.14 (s, 1H)

MS: 614

tert-butil(3-(7-((5-(2,4-bis(benzilossi)5isopropilfenil3(etilcarbamoil)isossazol-4-amino)7ossoeptanamido)propil)(2-(tertbutilcarbonil)(3-terbutossicarbonil)amino)propil)amino)ethyl)carbammato(37)

La reazione viene condotta in condizioni anidre.

Il composto **37** (0,91 mmol) viene sciolto in THF, si aggiunge carbonildiimidazolo (0,91 mmol) e la reazione si lascia sotto agitazione per 1h a RT. Dopo di che si aggiunge la poliammina precedentemente sintetizzata (0,91 mmol) sciolta in THF

e si lascia la reazione sotto agitazione a RT per 24h. Al termine della reazione si tira a secco il solvente e il grezzo viene direttamente purificato mediante cromatografia utilizzando come fase eluente AcOEt/Pet 2:8

Resa: 70%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.24-1.27 (m, 9H); 1.42-1.45 (m, 12H); 1.64-2.04 (m, 4H); 3.15 (q, 1H); 3,22-3,26 (m, 10H); 3.45 (q, 2H); 5.01 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 6.58 (s, 1H); 7.39-7.49 (m, 10H); 8.14 (s, 1H)

MS: 1084

N1-(3-((2-((3-aminopropil)amino)etil)amino)propil)-N7-(5-(2,4-diidrossi-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4)eptandiamide(39)

Si scioglie il composto **37** in DCM, si aggiunge 1 ml di TFA e si tiene la reazione sotto agitazione a RT per un'ora, dopo di che si tira a secco il solvente e si effettuano delle triturazioni con Et₂O per ottenere un olio di colore scuro che viene utilizzato per la successiva reazione, condotta in condizioni anidre.

Si scioglie il composto (100 mg, 0,11 mmol) in DCM Dry, si porta la temperatura a -78°C e si aggiunge pian piano BCl₃ (0,8 ml,). La reazione si lascia sotto agitazione per 1h a -78°C e poi per 2h a RT.

Al termine si aggiungere qualche mL di DCM; poi qualche ml di NaHCO₃ soluzione satura, fino a pH 9. Si elimina il solvente e si effettuano delle estrazioni con AcOEt. Il prodotto si trova in fase acquosa, quindi si evapora H₂O e poiché non è possibile sciogliere il prodotto in alcun solvente organico si purifica mediante Hplc. Resa 50 %.

¹H-NMR (400 MHz, Acetone d): 1.17-1.21 (s,9H); 1.85-1.93 (m,6H); 3.17-3.19 (m, 3H); 3.21-3.39 (m, 20H); 6.91 (s, 1H); 7.26 (s, 1H)

MS: 604

5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropil-fenil)-4-(6-bromo-esanamide)-N-etilisossazolo-3-carbossammide(40)

Viene fatta una soluzione di **29** (0.200g,0.41mmol) e del cloruro dell'acido 6-bromoesanoico (61.5µl,0.41mmol) in CH₂Cl₂ (15ml), si aggiunge qui TEA (68.9µl,0.49mmol). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 12 ore.

La soluzione viene quindi diluita con CH₂Cl₂ (20 ml) e levata prima con una soluzione

di HCl 1N (2 x10 ml) e poi con una soluzione satura di NaHCO₃ (2 x10ml).

La fase organica viene poi lavata con brine (10ml) ed anidrificata con il sodio solfato, successivamente è evaporata fino ad avere un residuo che viene ulteriormente purificato mediante cromatografia su gel di silice (eluente: miscela Petrolio/AcOEt 70:30). Resa 50%.

¹H-NMR(200MHzCDCl₃), δ:1.30-1.56(m,13H),1.76(m,2H),1.95(t,2H;J=7Hz),3.35 (m,3H),3.47(m,2H),5.02(s,2H),5.09(s,2H),6.59(s,1H),6.83(br,1H),7.35-7.50(m,10H), 8.13 (s,1H).

4-(6-bromo-esanamide)-5-(2,4-diidrossi-5-isopropil-fenil)-N-etilisossazolo-3-carbossammide (41).

Si fa una soluzione dell'ammide **40** (0.140g,2.12mmol) in CH₂Cl₂ anidro (10ml) e a 78°C viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di BCl₃ 1M in CH₂Cl₂ (0.64ml,0.63mmol) la reazione viene lasciata in agitazione a questa temperatura per 20 minuti e poi riportata a temperatura ambiente.

La miscela di reazione viene quindi raffreddata in bagno di ghiaccio ed addizionata di una soluzione satura di NaHCO₃ (20 ml) . Viene evaporato il CH₂Cl₂ ed al residuo ottenuto è aggiunto AcOEt (30ml), la fase organica viene lavata con H₂O (2x15 ml), brine (15 ml) ed anidrificata utilizzando Na₂SO₄.

Il residuo ottenuto dopo evaporazione del solvente viene ulteriormente purificato per via cromatografica (eluente:miscelaPetrolio/AcOEt32.5:67.5).

Si ottiene **41** come solido che viene fatto essiccare fino a peso costante.

Resa 70%

¹H-NMR(200MHzCD₃OD), δ:1.18-1.25(m,9H),1.47(m,2H),1.65(m,2H),1.84(m,2H), 2.35 (t, 2H; J=7 Hz), 3.20 (m, 1H),3.40 (m, 4H),6.44 (s,1H), 7.23 (s, 1H).

6-((5-(2,4-diidrossi-5-isopropil-fenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4-yl)ammino)-6-oxo-esil)trifenilfosfoniobromuro(42).

Ad una soluzione di **41** (0.090g,0.19 mmol) sciolto in 1,4 Diossano, aggiungere trifenilfosfina (245mg, 0.93mmol). Mettere la provetta nel microonde impostando le seguenti condizioni: Power: 190Watt, Temperatura: 150°C, Ramptime: 2 min, Tempo:40 min.

Viene eliminato il solvente surnatante ed il solido presente è triturato con Et₂O e poi ulteriormente purificato mediante colonna cromatografica con silice flash

(eluente:miscelaAcOEt/MeOH 70:30).

Si ottiene un solido di colore giallo chiaro. Resa: 36%

¹H NMR(400MHzCD₃OD), δ :1.18(m,9H),1.68(m,8H),2.32(t₂H;J=6.8),3.14(ept,1H, J=6.8 Hz), 3.31 (m, 2H),6.44(s, 1H),7.23(s, 1H), 7.73-7.79 (m, 15H).

MS: 664

¹³C NMR(200MHz,CD₃OD) δ :14.9,19.5,22.3,23.1,23.3,25.6,26.8,30.9,35.5,36.5,103.9,106.6,112.5,119.3,121.0,128.0,129.0,131.6,131.9,134.9,135.1,136.4,136.5, 155.4, 156.6, 159.8, 162.0, 164.8, 174.9.

6-((5-(2,4-diidrossi-5-isopropil-fenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4yl)ammino)-6-oxoesil)piridiniobromuro (43)

Viene fatta una soluzione di **42** (0.100mg,0.15mmol) in THF (5ml) e si aggiunge Piridina (61 μ l,0.76mmol), la miscela di reazione viene portata a riflusso per 18h. Si costituisce un solido che, dopo eliminazione del solvente surnatante, viene purificato mediante triturazione con Et₂O. Dopo filtrazione su gooch a bassa pressione si ottiene un solido che viene essiccato fino a peso costante.

Resa 40%

¹H NMR (400MHz CD₃OD), δ :1.17-1.25(m, 9H), 1.44(m, 2H),1.73(m₂H), 2.04(m, 2H), 2.37(t,₂H;J=6.8Hz),3.22(m,1H),3.35(m,₂H),4.63(t,₂H;J=6.9),6.42(s,1H),7.24(s,1H), 8.09 (m₂H), 8.58 (t, 1H; J=7.8),8.99 (m, 2H).MS:= 481.2.

¹³C NMR(400MHz,CD₃OD) δ :13.3,21.7,24.0,24.9,26.2,29.9,30.5,33.9,34.7,61.4,102.3,105.0,110.2,126.3,127.3,128.1,144.6,145.4,153.8,154.9,158.2,160.3,163.3,173.3.

4-(4-bromobutossi) benzaldeide (45).

Ad una soluzione di **44** 4-idrossibenzaldeide (0.2g,1.64mmol) sciolta in Acetone, vengono aggiunti nell'ordine dibromobutano (1.95ml,16.4mmol) e K₂CO₃ (0.91g,6.55mmol). La provetta viene messa nel microonde impostando le seguenti condizioni: Power: 80 Watt, Temperatura: 100 °C, Ramp time: 2 min, Tempo: 5 minuti. La miscela viene ripresa con AcOEt (10ml) elavata con H₂O (10ml), la fase acquosa viene poi estratta con AcOEt (2x5ml) e le fasi organiche vengono lavate con brine (5ml), trattate con sodio solfato anidro e successivamente evaporate fino a peso

costante. Si ottiene un olio incolore che viene ulteriormente purificato mediante cromatografia flash su gel di silice (eluente: miscela Petrolio/ AcOEt 90:10).

Resa 65%

¹H-NMR(200MHz,CDCl₃): 2.05(m,4H),3.50 (t,2H;J=6.2Hz),4.09(t,2H;J=6Hz), 7.00 (d, 2H; J=6.8 Hz), 7.83 (d,2H; J=6.8 Hz), 9.88 (s, 1H).

3,4-bis(4-bromobutossi)benzaldeide (52).

Reazione eseguita come per **45** utilizzando come materiale di partenza **51**

Resa 62%.

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃) δ :2.02(m,4H),2.10 (m,4H),3.54(m,4H),4.10(m,4H),6.95 (d, 1H;J=8.4 Hz), 7.38 (d,1H; J=2Hz), 7.43(dd, 1H; J=8.4 Hz,J=2 Hz),9.84 (s,1H).

¹³CNMR(400MHz,CDCl₃) δ :27.7,27.8,29.7,29.9,33.5,33.6,67.5,68.2,110.8,111.7, 126.9, 130.2, 149.2, 154.3.2, 191.0

Acido 4-(4-bromobutossi) benzoico (46).

Il prodotto di partenza **45** (1.36g, 5.3 mmol) è sciolto in Acetone (40 ml) e da 0°C, in bagno di ghiaccio,viene aggiunto il reattivo di Jones goccia a goccia fino a quando la sospensione mantiene una colorazione aranciata. La reazione viene lasciata in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 2 ore. Al termine di queste si aggiunge iPrOH goccia a goccia fino a che la miscela di reazione assume una colorazione trasparente. La sospensione ottenuta viene quindi filtrata su celite e il filtrato viene concentrato fino ad ottenere un residuo che è purificato mediante estrazione. Il residuo è diluito con AcOEt (50 ml) e H₂O(50 ml) , la fase acquosa viene estratta con AcOEt (2 x25 ml) e le fasi organiche riunite sono lavate con brine(50 ml) e trattate con sodio solfato anidro. Successivamente la fase organica viene evaporata per ottenere un solido bianco che è essiccato fino a peso costante.

Resa 91%.

¹H-NMR(200MHz,DMSO) δ : 1.85-1.99(m,4H),3.61 (t,2H;J=6.4Hz),4.08(t,2H;J=6 Hz), 7.01 (d,2H, J=6.9 Hz), 7.86 (d,2H; J=6.9 Hz), 12.59 (s, 1H).

Acido 3,4-bis(4-bromobutossi)benzoico(53).

Reazione eseguita come per **46** utilizzando come materiale di partenza **52**.

Resa 81%.

¹H-NMR(400MHz,DMSO): 1.86(m,4H),2.0(m,4H),3.64(m,4H),4.02-4.10(m,4H), 7.04 (d, 1H; J=8.4 Hz), 7.44 (d,1H; J=2Hz), 7.54 (d,1H; J=8.4 Hz,J=2 Hz), 12.65 (s, 1H).

¹³CNMR(400MHz,DMSO)δ:27.72,27.4,29.3,29.4,34.8,34.9,67.5,67.6,112.3,113.7,123.0,123.3, 147.7, 152.2, 167.0.

5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropil-fenil)-4-(4-(bromobutossi)benzammide)-N-etilisossazolo-3-carbossammide(47).

Una soluzione di **46** (0.161g,0.59mmol) in toluene (5ml) e SOCl₂ (0.43ml,5.9mmol) è riscaldata a 110°C per 4.5h. La miscela di reazione viene concentrata per eliminare il cloruro di tionile in eccesso, il composto non viene isolato data l'elevata reattività ed al residuo ottenuto è aggiunto CH₂Cl₂ anidro (10ml), il composto 4-ammino isossazolico **29** (0.230g, 0.47mmol) e TEA (0.1ml,0.71mmol). La miscela di reazione viene quindi lasciata sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 12h, al termine di queste il residuo è diluito con CH₂Cl₂ (10ml) elavato prima con una soluzione di HCl al 5%(2x5ml) e poi con una soluzione satura di NaHCO₃ (2 x5ml).

La fase organica viene quindi lavata con brine (5ml), anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata per ottenere un residuo che viene ulteriormente purificato mediante colonna cromatografica (eluente: miscela Petrolio/AcOEt 75:25). Si isola un solido che viene essiccato su P₂O₅ fino a peso costante. Resa 55%.

¹HNMR(400MHz,CDCl₃)δ1.25(m,9H),1.96(m,2H),2.07(m,2H),3.34(m,1H),3.51-3.47(m,4H),4.02(t,2H;J=6Hz),4.91(s,2H),5.04(s,2H),6.55(s,1H),6.77(d,2H,J=8.8Hz),6.92(br,1H), 7.18 (m, 2H), 7.39-7.29 (m, 8H), 7.47 (m,2H), 7.58 (s,1H), 9.17 (s,1H).

MS: 740.7-742.8.

4-(4-(bromo-butossi)benzammide)-5-(2,4-diidrossi-5-isopropil-fenil)-N-etilisossazolo-3-carbossamide (48)

Ad una soluzione del composto **47** (0.360g,0.49mmol) in CH₂Cl₂ anidro (10ml) viene aggiunta, alla temperatura di -78°C, una soluzione di BCl₃ 1M in CH₂Cl₂ (1.46ml,1.46mmol) goccia a goccia. La reazione viene lasciata in agitazione a questa temperatura per 20minuti e poi riportata a temperatura ambiente e lasciata in agitazione magnetica per 1h.

La miscela di reazione viene quindi raffreddata in bagno di ghiaccio e addizionata di una soluzione satura di NaHCO₃ (20 ml). Viene evaporato il CH₂Cl₂ ed al residuo ottenuto è aggiunto AcOEt (30ml), la fase organica viene lavata con H₂O (2x15 ml), brine(15 ml) ed anidrificata utilizzando Na₂SO₄. Il residuo ottenuto dopo evaporazione del solvente viene ulteriormente purificato mediante triturazione con Et₂O e successiva filtrazione su gooch per ottenere un solido che viene essiccato su P₂O₅ fino a peso costante.

Solido, 0.196 g, resa 71%.

¹H-NMR(400MHz,DMSO):1.06(m,9H),1.87(m,2H),1.98(m,2H),3.05(m,1H),3.21(m,2H),3.62(t,2H;J=6.4Hz),4.09(t,2H;J=6.4Hz),6.49(s,1H),7.03(d,2H;J=8.8Hz),7.23(s,1H),7.86(d,2H),8.60(m,1H),9.52(s,1H),9.81(s,1H),10.04(s,1H).

¹³C-NMR(400MHz,DMSO)δ:14.4,25.5,25.9,27.2,28.7,28.9,33.4,34.7,66.9,102.6,104.4,106.9,110.1,112.5,114.0,125.7,126.0,126.4,129.3,154.0,155.0,157.6,158.6,161.2,163.4,165.1.

MS: 560.4-562.3.

5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropil-fenil)-4-(3,4-bis(bromo-butossi)benzammide]-N-etilisossazolo-3-carbossamide(54)

Reazione eseguita come per **47** partendo dal composto **53**

Resa 46%.

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ1.27(m,9H),1.91-2.17(m,8H),3.34(m,1H),3.45-3.56(m,6H),3.95(t,2H;J=6Hz),4.05(t,2H;J=6Hz),4.92(s,2H),5.04(s,2H),6.55(s,1H),6.70(m,1H),6.99(m,1H),7.18(m,2H),7.257.30(m,6H),7.39(m,4H),7.58(s,1H),9.29(s,1H).

¹³C-NMR(400MHz,CDCl₃)δ:14.6,22.6,26.6,27.7,27.8,29.7,29.8,33.6,33.7,34.3,68.1,70.0,71.0,97.5,110.9,112.1,112.6,115.7,120.4,123.8,126.4,127.0,127.2,127.9,128.

0, 128.5, 128.6, 129.8, 136.5, 136.8, 148.5, 150.7, 151.7, 155.3, 158.6, 159.7, 160.5, 163.9.

4-(3,4-bis(bromobutossi)benzamide)-5-(2,4-diidrossi-5-isopropil-fenil)-N-etil-isossazolo-3-carbossamide 55).

Reazione eseguita come per **48** partendo dal composto **54**.

Solido, 0.244 g, resa 70%.

¹HNMR(200MHz,CD₃OD)δ1.15-1.25(m,9H),1.93-

2.12(m,8H),3.19(m,1H),3.37(m,2H),3.56(m,4H),4.08(m,4H),6.43(s,1H),7.00(d,2H;J=8.8Hz),7.31(s,1H),7.47(d,2H; J=8.8 Hz).

(4-(4-((5-(2,4-diidrossi-5-isopropil-fenil)-3-(etil-carbamoil)isossazol-4yl)carbamoil)fenossi)butil) trifenilfosfoniobromuro(49)

Ad una soluzione di **48** (0.090g,0.13mmol) in 1,4-Diossano, viene aggiunta trifenilfosfina (0.166g, 0.63mmol). La provetta viene messa nel microonde impostando le seguenti condizioni: Power: 190 Watt, Temperatura: 150°C, Ramptime: 2 min, Tempo:40 min. Viene eliminato il solvente surnatante ed il solido presente è triturato con Et₂O e poi ulteriormente purificato mediante colonna cromatografica con silice flash (eluente: miscela AcOEt/MeOH 70:30). Il residuo solido ottenuto viene triturato con una miscela di AcOEt (1ml) con poche gocce di MeOH, filtrato su gooch per dare un solido bianco che viene essiccato fino a peso costante. Solido resa 36%.

¹H NMR (200MHz CD₃OD), δ:1.13-1.23(m, 9H), 1.85-2.07(m, 4H),3.17 (m, 1H),3.36 (m,2H),3.49(m,2H),4.11(t,2H;J=5.6Hz),6.44(s,1H),6.91(d,2H;J=9Hz),7.31(s,1H), 7.75-7.89 (m, 17H).

¹³CNMR(200MHz,CD₃OD)δ:13.5,19.0,21.6,21.9,26.4,29.3,29.7,34.2,66.5,102.7,105.5,114.3,117.8,119.5,126.0,126.4,127.7,129.4,130.2,130.5,133.5,133.7,135.1, 135.2, 154.0, 155.2, 158.5, 160.8, 162.2, 163.0, 166.6.

MS: 742.6.

(4-(4-((5-(2,4-diidrossi-5-isopropil-fenil)-3-(etil-carbamoil)isossazol-4-yl)carbamoil)fenossi)butil)piridiniobromuro (50).

Viene fatta una sospensione di **48** (0.030g,0.04mmol) in AcOEt (5ml) e si aggiunge Piridina (17µl,0.21 mmol), si porta poi la miscela di reazione a riflusso per18 h.

Si costituisce un residuo solido che, dopo aver eliminato il solvente surnatante, viene purificato mediante triturazione con AcOEt. Dopo filtrazione su gooch si ottiene un solido che viene essiccato fino a peso costante. Solido, 0.011 g,resa 40%.

¹H NMR(400MHzCD₃OD), δ:1.151.23(m,9H),1.91(m,2H),2.24(m,2H),3.17(m,1H),3.37(m,2H),4.13(t,2H;J=6Hz),4.74(t,2H,J=7.6Hz),6.44(s,1H),6.99(d,2H;J=8.8),7.32(s,1H),7.84(d,2H;J=8.8Hz),8.13(mH),8.60(t,1H;J=7.6),9.04(d,2H,J=5.6 Hz).

¹³CNMR(400MHz,CD₃OD)δ:13.2,21.6,25.4,26.1,28.0,33.9,61.4,66.9,102.3,105.2,114.0,126.2,127.6,128.1,129.1,144.6,145.6,150.3,155.9,156.9,157.3,160.8,161.9,163.3, 165.8.

MS: 559

Metil 4-(7-((5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4-amino)-7-ossoetil)benzoato(59)

In un Pallone contenente 10 ml di DCM si scioglie l'acido metossicarbonilfenil eptanoico, **57**, si addiziona ossallilcloruro e qualche goccia di DFM. La soluzione si lascia sotto agitazione a RT per 4h e dopo si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo si scioglie in DCM, si aggiunge l'ammina e successivamente la TEA. La miscela si lascia sotto agitazione a RT per una notte. Si diluisce con DCM, si effettua un lavaggio con HCl 1M, poi con NaHCO₃ sol. Sat. E infine con Brine. Si anidri fica e si concentra a pressione ridotta. Il prodotto è purificato per cromatografia utilizzando come eluente AcOEt/ Et. Pet 7/3. Resa: 80%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.24-1.26 (m, 9H); 1,27-1,8 (m, 12); 3.39-3.3 (m, 1H, J= 5) 3.5-3.47 (m, 2H, J= 7); 3.94 (s, 3H); 4.89 (s, 2H); 5.07 (s, 2H); 6.59 (s, 1H); 6.95-6.9 (m, 1H); 7.4-7.14 (m, 10H); 7.94-7.49 (m, 5H); 9.3 (s, 1H)

MS: 732

Acido 4-(7-((5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4-amino)-7-ossoetil)benzoico(61)

Si scioglie **59** in MeOH, si aggiunge NaOH 1N (1,1 eq) e qualche mL di H₂O. La miscela viene riscaldata a 60-70° C per una notte. Si evapora il solvente, la fase acquosa viene diluita con AcOEt e H₂O; acidificata con HCl 1N. Si riuniscono le fasi organiche, si effettua un lavaggio con Brine, si anidri fica e si concentra a pressione ridotta. Resa: 70%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ: 1.22-1.25 (m, 9H); 1,27-1,8 (m, 12H); 3.39-3.3 (m, 1H, J= 5) 3.5-3.47 (m, 2H, J= 7); 4.89 (s, 2H); 5.07 (s, 2H); 6.59 (s, 1H); 6.9 (s, 1H); 7.4-7.14 (m, 10H); 7.94-7.49 (m, 5H); 9.3 (s, 1H)

MS: 718

5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-4-(7-(4-(carbamidoil)fenil)eptanamido)-N-etilisossazol-3-carbossamide(63)

Una miscela di **61** in DMF dry e CDI viene tenuta sotto agitazione a RT per 1h in atmosfera di Argon. La guanidina utilizzata è preparata in situ aggiungendo consecutivamente sodio terbutossido e guanidina cloridrato in una miscela di DMF/Diossano (1:1)in atm. di Argon; la sospensione è riscaldata a 50° C per 30 minuti e successivamente si filtra l' NaCl formatosi. La soluzione contenente l'imidazolide viene aggiunta alla soluzione di guanidina e la risultante miscela viene lasciata sotto agitazione per tutta la notte. Si evapora il solvente, il residuo viene sospeso in H₂O fredda e si effettua una triturazione per ottenere un solido bianco, il quale viene utilizzato per la reazione successiva senza ulteriore purificazione. Resa: 85%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ: 1.22-1.25 (m, 9H); 1,27-1,5 (m, 8H); 1,93 (m, 2H); 2,56 (m, 2H); 3.39-3.3 (m, 1H, J= 5) 3.5-3.47 (m, 2H, J= 7); 4.89 (s, 2H); 5.07 (s, 2H); 6.59 (s, 1H); 6.9 (s, 1H); 7.4-7.14 (m, 10H); 7.94-7.49 (m, 5H); 9.3 (s, 1H)

MS: 759

4-(7-(4-(carbamidoilfenil)eptanamido)-5-(2,4-diidrossi-5-isopropilfenil)-N-etilisossazol-3-carbossamide(65)

Ad una soluzione di **63** in DCM dry, a -78°C viene aggiunto BCl₃ 1M in DCM. Dopo 10 minuti la reazione è riportata a temperatura ambiente per circa 1 ora. Dopo di che viene diluita con del DCM e si effettua un lavaggio con una soluzione satura di NaHCO₃. Si anidri fica la fase organica e si concentra a pressione ridotta. Purificazione con Hplc. Resa: 50%

¹H-NMR (400 MHz, cd₃od): δ: 1.16-1.22 (m, 9H); 1,33-1,35 (m, 4H); 1,61-1,63 (m, 4H); 2,3-2,34 (m, 2H); 2,65-2,68 (m, 2H); 3,17 (m, 1H); 3.36-3.39 (m, 2H); 6.44 (s, 1H); 7,23 (s, 1H); 7.36-7.39 (d, 2H); 7,86-7,88 (d, 2H)

MS: 578

4-(7-(4-(carbamidioil)fenil)eptanamido)-5-(2,4-diidrossi-5-isopropilfenil)-N-etilie-3-carboxamide(60)

In un Pallone contenente 10 ml di DCM si scioglie l'acido monometil tereftalato, **58**, si addiziona ossalilcloruro e qualche goccia di DFM. La soluzione si lascia sotto agitazione a RT per 4h e dopo si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo si scioglie in DCM, si aggiunge l'ammina e successivamente la TEA. La miscela si lascia sotto agitazione a RT per una notte. Si diluisce con DCM, si effettua un lavaggio con HCl 1M, poi con NaHCO₃ sol. Sat. E infine con Brine. Si anidri fica e si concentra a pressione ridotta. Il prodotto è purificato per cromatografia utilizzando come eluente AcOEt/ Et. Pet 7/3. Resa: 60%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ: 1.29-1.26 (m, 9H); 3.39-3.3 (m, 1H, J= 5) 3.5-3.47 (m, 2H, J= 7); 3.94 (s, 3H); 4.89 (s, 2H); 5.07 (s, 2H); 6.59 (s, 1H); 6.95-6.9 (m, 1H); 7.4-7.14 (m, 10H); 7.94-7.49 (m, 5H); 9.3 (s, 1H)

MS: 647

Acido4-((5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4)carbamoil)benzoico (62)

Si scioglie **60** in MeOH, si aggiunge NaOH 1N (1,1 eq) e qualche mL di H₂O. La miscela viene riscaldata a 60-70° C per una notte. Si evapora il solvente, la fase acquosa viene diluita con AcOEt e H₂O; acidificata con HCl 1N. Si riuniscono le fasi organiche, si effettua un lavaggio con Brine, si anidri fica e si concentra a pressione ridotta. Resa: 80%

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ: 1.05-1.10 (m, 9H); 3.20-3.22 (m, 1H, J= 5); 3.33-3.24 (m, 2H, J= 7); 5.19 (s, 4H); 6.97 (s, 1H); 7,31-7,44 (m, 10H); 7.91-7.93 (dd, 2H); 8,0-8,02 (dd, 2H); 8,8 (m, 1H); 10,04 (s,1H)

MS: 634

N1-(5-(2,4-bis(benzilossi)-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4-il)-N4-carbamimidioiltereftalamide(64)

Una miscela di **62** in DMF dry e CDI viene tenuta sotto agitazione a RT per 1h in atmosfera di Argon. La guanidina utilizzata è preparata in situ aggiungendo consecutivamente sodio terbutossido e guanidina cloridrato in una miscela di DMF/Diossano (1:1)in atm. di Argon; la sospensione è riscaldata a 50° C per 30 minuti e successivamente si filtra l' NaCl formatosi. La soluzione contenente l'imidazolide viene aggiunta alla soluzione di guanidina e la risultante miscela viene

lasciata sotto agitazione per tutta la notte. Si evapora il solvente, il residuo viene sospeso in H₂O fredda e si effettua una triturazione per ottenere un solido bianco, il quale viene utilizzato per la reazione successiva senza ulteriore purificazione. Resa: 80%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ: 1.22-1.25 (m, 9H); 3.39-3.3 (m, 1H, J= 5) 3.5-3.47 (m, 2H, J= 7); 4.89 (s, 2H); 5.07 (s, 2H); 6.59 (s, 1H); 6.9 (s, 1H); 7.4-7.14 (m, 10H); 7.94-7.49 (m, 5H); 9.3 (s, 1H)

MS: 674

N1-carbamimidoil-N4-(5-(2,4-diidro-5-isopropilfenil)-3-(etilcarbamoil)isossazol-4-yl)tereftalamide(66)

Ad una soluzione di **64** in DCM dry, a -78°C viene aggiunto BCl_3 1M in DCM. Dopo 10 minuti la reazione è riportata a temperatura ambiente per circa 1 ora. Dopo di che viene diluita con del DCM e si effettua un lavaggio con una soluzione satura di NaHCO_3 . Si anidifica la fase organica e si concentra a pressione ridotta. Purificazione con Hplc. Resa: 50%

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ : 1.16-1.22 (m, 9H); 3,17 (m, 1H); 3.36-3.39 (m, 2H); 6.44 (s, 1H); 7,23 (s, 1H); 7.36-7.39 (d, 2H); 7,86-7,88 (d, 2H)

MS: 494

Reazioni condotte sull'intermedio 67:

reazione di nitrazione: in un pallone da 100 ml si sospende **67** (1g, 0.0023mol) in anidride acetica (20ml). si porta a 0°C e si aggiunge goccia a goccia HNO_3 al 70% (0.30ml, 0.0046mol). si mette la reazione in frigo per 5 ore: si forma un solido dalla consistenza viscosa. Si gocciola la reazione in una beuta con un po' di ghiaccio e successivamente si estrae con diclorometano. Si eseguono tre successivi lavaggi con NaHCO_3 . Si anidifica la fase organica con Na_2SO_4 , si esegue una filtrazione su cotone ed si evapora il solvente di estrazione sottovuoto. Si purifica il prodotto mediante cromatografia su colonna usando come miscela eluente AcOEt / Etere di petrolio in rapporto di 3:7.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.22 -1.29 (t, 3H, $J= 7.2\text{Hz}$), 3.45 - 3.42 (q, 2H), 5.18 - 5.24 (d, 2H), 6.64 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.31 - 7.43 (m, 10H), 8.64 (s, 1H).

reazione di bromurazione: in un pallone da 100 ml solubilizzo **67** (500 mg, 1.162 mmol) in acetonitrile (30 ml) e aggiungo N-bromosuccinimide (227 mg, 1.278 mmol) e cerio ammonio nitrato (318 mg, 0.58 mmol). La soluzione assume un colore aranciato; si mette a refluxo per 4,5 h a 90°C . Si evapora sottovuoto il solvente di reazione e si eseguono 3 estrazioni con AcOEt e acqua. Si anidifica la fase organica con Na_2SO_4 anidro, si filtra su cotone e si evapora il solvente di estrazione sottovuoto.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.22 - 1.29 (t, 3H, $J=7.4$ Hz), 3.45 - 3.52 (q, 2H), 5.10 - 5.16 (m, 4H), 6.56 (s, 1H), 6.80 (bs, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.32 - 7.41 (m, 10H), 8.13 (s, 1H).

Metil 2-(benzilossi)benzoato(78)

In un pallone da 250 ml si solubilizza il prodotto commerciale **79** (5 g, 0.033 moli) in CH_3CN (50 ml). Successivamente si aggiunge K_2CO_3 (6.83g, 0.0495moli) e benzil bromuro (5.88ml, 0.0495moli) goccia a goccia.

Si mette la reazione a riflusso per 6 h alla temperatura di 120°C ; si tira a secco il solvente di reazione sottovuoto.

Il prodotto ottenuto è un solido pastoso che viene sciolto in acqua ed estratto per 3 volte con AcOEt. Controllate le estrazioni e riunite le fasi organiche, si effettua un lavaggio con Brine e si anidrifica con Na_2SO_4 anidro; si effettua la filtrazione su cotone si evapora il solvente di estrazione sottovuoto.

Il prodotto viene purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando una miscela eluente AcOEt/Etere di petrolio 0.5/9.5; il composto finale è un liquido trasparente.

La resa della reazione è del 90% .

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 3.90 (s, 3H), 5.18 (s, 2H), 6.99 - 7.03 (m, 2H), 7.33 - 7.48 (m, 6H), 7.80 - 7.84 (m, 1H).

3-(2-(benzilossi)fenil)-3-ossopropanenitrile (77)

La reazione è condotta in atmosfera di argon.

In un pallone da 100 ml si mette CH_3CN (5.12ml, 0.098moli) e lo si solubilizza in toluene (10ml).

In un pallone a parte si scioglie il composto **78** (2.25g, 0.01 mol) e si solubilizza anch'esso in toluene (10ml). La soluzione formata dal composto **78** e toluene viene a questo punto aggiunta nel pallone con CH_3CN e toluene. Infine si aggiunge NaH 60% (1.17g, 0.03moli). La reazione è messa a riflusso alla temperatura di 130°C per 4h.

Dopo 4h, si gocciola la reazione in una beuta con poco ghiaccio e successivamente si acidifica la fase acquosa con HCl 7% fino a $\text{pH}=2$. Si eseguono 3 estrazioni della fase acquosa con AcOEt; si riuniscono le fasi organiche, si anidrificano con Na_2SO_4 anidro, si filtra su cotone e si evapora il solvente sottovuoto.

Il composto viene purificato con una cromatografia flash su colonna; la miscela eluente utilizzata è AcOEt / Etere di petrolio 1:9.

Il prodotto pulito è un solido colore biancastro; la resa della reazione è del 50%.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 3.98 (s, 2H) 5.18 (s, 2H) 7.04 - 7.12 (m, 2H) 7.42 - 7.56 (m, 6H) 7.85 - 7.90 (m, 1H).

MS: 251

Metodiche utilizzate per idratare il composto 77

1) metodo con acido solforico: in un pallone da 50 ml contenente il composto **77** (251 mg, 1 mmol) inserisco goccia a goccia l'acido solforico (5 ml); la reazione è tenuta a temperatura ambiente per 5 h. Si gocciola la reazione in una beuta con poco ghiaccio e si basifica con idrossido d'ammonio. Provo ad eseguire delle estrazioni con AcOEt ma i prodotti di reazione si estraggono difficilmente in fase organica. L'unico prodotto che si è riusciti ad isolare mediante cromatografia su colonna con miscela eluente AcOEt / Etere di Petrolio (4:6) evidenzia una perdita del gruppo protettore etere benzilico e perdita della struttura molecolare.

2) metodo con acido trifluoroacetico e acido solforico: in un pallone da 25 ml si solubilizza il composto **77** in acido trifluoroacetico (560 μl) e successivamente si aggiunge acido solforico (140 μl). Si lascia la reazione a temperatura ambiente per 4 h; si gocciola la soluzione in una beuta con poco ghiaccio e si esegue un'estrazione con AcOEt, si anidrifca la fase organica con Na_2SO_4 , si filtra su cotone e si evapora il solvente di estrazione sottovuoto.

Non è stato possibile isolare alcun prodotto.

3) metodo con acqua ossigenata, potassio carbonato e dimetilsolfossido: in un pallone da 25 ml si solubilizza **77** (251 mg, 1 mmol) in dimetilsolfossido (1 ml). Si porta la reazione a 0°C e si aggiunge potassio carbonato (70 mg, 0.5 mmol) e H_2O_2 al 30% (170 μl , 5.5 mmol). Si riporta a temperatura ambiente e si lascia in agitazione 3 h; si diluisce la soluzione con acqua e dovrebbe formarsi un precipitato andrebbe filtrato, ma non si forma. Si procede all'estrazione con AcOEt ma difficilmente si riesce a portare i prodotti in fase organica. Si anidrifca con Na_2SO_4 si filtra su cotone. Si evapora sottovuoto il solvente di estrazione. Dall'analisi tramite spettrometria di massa del prodotto non purificato non si evidenzia il picco del peso molecolare desiderato.

Metile 5-(2-(benzilossi)fenil)-4-cianoisossazolo-3-carbossilato (80)

La reazione è eseguita in atmosfera di argon.

In un pallone a due colli da 50 ml si pone il composto **77** (500mg, 2 mmoli) e lo si sospende in EtOH (8ml). Si porta la reazione a 0°C e sotto agitazione si aggiunge lentamente Et₃N (364 µl, 2.6 mmol). Si riporta la reazione a temperatura ambiente e si attendono 20 minuti, dopodichè si aggiunge il clorossimmino acetato (358 mg, 2.6mmoli) preventivamente sciolto in EtOH (4ml); il clorossimmino acetato viene addizionato in frazioni di 250µl ciascuna, distanziando le aggiunte di alcuni minuti l'una dall'altra e terminando le operazioni in circa 30 minuti. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 72h.

Si tira a secco l'EtOH e si esegue una prima estrazione con AcOEt e HCl, dopo si fa un lavaggio con una soluzione satura di NaHCO₃ e successivamente con il Brine. Si anidrifica la fase organica con Na₂SO₄anidro, si effettua la filtrazione su cotone e si evapora il solvente di estrazione con il sottovuoto. Il prodotto viene purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando come miscela eluente AcOEt/Etere di petrolio 1:9.

La reazione ha una resa del 70%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 4.06 (s, 3H), 5.33 (s, 2H), 7.05 - 7.14 (m, 2H), 7.32 - 7.51 (m, 6H), 7.73 - 7.78 (m, 2H).

MS: 334

IR: CN stretch 2244,88cm⁻¹

Metodiche usate per idratare il composto (80)

1) metodo con dimetilsolfossido, idrossido di sodio (0.2M) e H₂O₂ (11 %): in un pallone si bagna il prodotto **80** (100 mg, 0.293 mmol) con qualche goccia di dimetilsolfossido (25µl, 0.351mmol). Successivamente si solubilizza in metanolo (1 ml) e si aggiungono progressivamente l'H₂O₂ all'11% (13 µl, 0.439 mmol) e l'idrossido di sodio 0.2 M (22 µl, 0.351 mmol). La reazione è riscaldata a 50°C per 1 h. Si tira sottovuoto il metanolo e si esegue un'estrazione con HCl 5% e AcOEt. Si anidrifica con Na₂SO₄e si evapora il solvente di estrazione al rotavapor.

Dalla spettrometria di massa si vede che il picco del prodotto che si è formato corrisponde al composto **83**.

MS: 277

2) metodo con idrossido di sodio (6M) e H₂O₂(11 %): ad una soluzione di **80** (50 mg, 0.143 mmol) in etanolo (1ml) si aggiunge idrossido di sodio 6M (0.35ml). Si porta la reazione a 0°C e si aggiunge H₂O₂ al 30%; successivamente si scalda a 50°C per 4 h.

Si raffredda la soluzione a 0°C, si acidifica con H₂SO₄ 3N fino a pH=2 e si evapora l'etanolo. Si esegue un'estrazione con diclorometano e si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄, si filtra su cotone e si tira sottovuoto il diclorometano.

Dall'analisi mediante spettrometria di massa si evidenzia il picco del peso molecolare corrispondente al composto **84**.

MS: 339

3) metodo con idrossido di sodio (6M) e H₂O₂(11 %): si utilizza la stessa procedura come al punto precedente ma si invertono gli ordini delle aggiunte, ovvero prima l'idrossido di sodio e dopo l'H₂O₂. Il prodotto ottenuto è il composto **85**.

4) metodo con acido solforico: si fa reagire il composto **80** (20mg,0.057 mmol) con acido solforico (50 µl). Si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 3 h. Si gocciola la reazione in una beuta con poco ghiaccio e si basifica con ammoniaca fino a pH=8. Si eseguono 2 estrazioni con acetato di etile, si anidrifca con Na₂SO₄, si filtra su cotone e si tira sottovuoto il solvente organico. Non è stato possibile isolare nessun prodotto.

5-(2-(benzilossi)fenyl)-3-(idrossimetil)isossazolo-4-carbonitrile (86)

In un pallone si sospende **80** (300 mg, 0.879 mmol) in etanolo (7 ml). Si porta la reazione a 0°C e si aggiunge il sodio boro idruro lentamente (100 mg, 2,637 mmol). La reazione è lasciata a temperatura ambiente per 1 h. Si acidifica con HCl 1M fino a pH=3, si tira l'etanolo sottovuoto e poi si eseguono 3 estrazione con acqua ed etere etilico; si anidrifca con Na₂SO₄anidro, si filtra su cotone e si evapora il solvente di estrazione.

Il prodotto è purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando una miscela eluente AcOEt / Etere di petrolio 2:8.

La resa della reazione circa dell'80%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 4.92 (s, 2H), 5.35 (s,2H), 7.01 - 7.08 (m, 2H), 7.33 - 7.46 (m, 6H), 7.52 - 7.80 (m, 1H).

5-(2-(benzilossi)fenil)-3-(((tetraidro-2H-piran-2-il)ossi)metil)isossazolo-4-carbonitrile (87)

In un pallone contenente **86** (150 mg, 0,489 mmol) si aggiunge diidropirano (178 µl, 1.96 mmol) e si solubilizza in diclorometano; si aggiunge una punta di spatola di acido p-toluensolfonico. La reazione è lasciata over night a temperatura ambiente. Si diluisce con diclorometano, si estrae con una soluzione satura di bicarbonato di sodio e si fa un lavaggio con Brine. Si anidrifica la fase organica con Na₂SO₄ anidro, si filtra su cotone e si evapora sottovuoto il solvente di estrazione.

Si purifica il prodotto mediante cromatografia su colonna utilizzando una miscela eluente AcOEt / Etere di petrolio 1:9. La resa della reazione è del 60% perchè non tutta la sostanza di partenza viene convertita in prodotto.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.58 - 1.76 (m, 6H), 3.62 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 4.64 - 4.71 (d, 1H), 4.86 - 4.90 (d, 2H), 5.34 (s, 2H), 7.02 - 7.12 (m, 2H), 7.30 - 7.46 (m, 6H), 7.33 - 7.77 (m, 1H).

5-(2-(benzilossi)fenil)-3-(((tetraidro-2H-piran-2-il)ossi)metil)isossazolo-4-carboxamide (88)

In un pallone si solubilizza **87** (436 mg, 1,116 mmol) in etanolo (10 ml) e si aggiunge idrossido di sodio 6M (2,8 ml) e H₂O₂ al 30% (107µl, 3.68 mmol). Si tiene la reazione a 50°C per 4 h; si tira sottovuoto l'etanolo e si eseguono 3 estrazioni con AcOEt e acqua, si anidrifica la fase organica con Na₂SO₄, si filtra su cotone e si tira sottovuoto il solvente di estrazione. Il prodotto è purificato mediante colonna cromatografica con miscela eluente AcOEt / Etere di petrolio 4:6. La resa della reazione è del 40%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.54 - 1.76 (m, 6H), 3.55 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 4.77 - 4.83 (d, 1H), 4.84 - 4.92 (d, 2H), 5.11 (s, 2H), 5.30 (bs, 1H), 6.85 (bs, 1H), 7.01 - 7.18 (m, 2H), 7.33 - 7.60 (m, 7H).

MS: 325

Metil(5-(2-(benzilossi)fenil)-3-(((tetraidro-2H-piran-2-il)oxy)metil)isossazol-4-il)carbamate (89)

In un pallone si solubilizza il composto **88** (180mg, 0.441mmol) in metanolo (4ml); si aggiunge 1 equivalente di N-bromosuccinimide (78mg, 0.441mmol) e 1,8-

Diazabicciclo[5.4.0]undec-7-ene (149 μ l, 1 mmol). Si mette la reazione a riflusso a 90°C per 15 minuti e successivamente si procede all'aggiunta di un altro equivalente di N-bromosuccinimide. Si rimettere a riflusso per altri 30 min. Si tira sottovuoto il metanolo.

Si purifica il prodotto mediante colonna cromatografica utilizzando una miscela eluente AcOEt / Etere di petrolio 2.8.

La resa della reazione è del 70%.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.51 - 1.64 (m, 6H), 3.42 - 3.46 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 3.70 - 3.85 (m, 1H), 4.61 - 4.68 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 6.70 (bs, 1H), 7.08 - 7.16 (m, 2H), 7.36 - 7.41 (m, 6H), 7.60 - 7.63 (m, 1H).

MS: 355

5-(2-(benzilossi)fenil)-4-ciano-N-etilisossazolo-3-carbossamide(95)

In un pallone da 50 ml si scioglie il prodotto **80** (650 mg, 1,9 mmoli) in una soluzione di EtNH_2 2M in metanolo (9.5 ml, 19 mmoli).

La reazione è portata a riflusso a 90°C per 1h e 30 min.

Si evapora il MeOH sottovuoto e si effettua un lavaggio con AcOEt e HCl 1M, si anidrifica la fase organica con Na_2SO_4 anidro, si filtra su cotone e si evapora il solvente di estrazione sottovuoto.

Il prodotto viene purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando una miscela eluente di AcOEt / Etere di petrolio 2:8.

La resa della reazione è del 60%.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.24 - 1.31 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz), 3.50 - 3.56 (q, 2H), 5.32 (s, 2H), 6.70 (bs, 1H), 7.04 - 7.13 (m, 2H), 7.33 - 7.50 (m, 6H), 7.70 - 7.74 (m, 1H).

MS: 348

5-(2(benzilossi)fenil)-N-etil-4-(N'-idrossicarbamimidoil)isossazolo-3-carbossamide(96)

In un pallone da 100 ml, ad una sospensione del prodotto **95** (500 mg, 1.44 mmoli) in EtOH (20 ml) è aggiunta NH_2OH cloridrata (250 mg, 3.6 mmol) ed NaOH (115mg, 2.88 mmol) preventivamente sciolto in acqua (2,5 ml). La soluzione è portata a riflusso alla temperatura di 80°C per 4 h.

Il solvente è poi evaporato sotto vuoto, e il residuo è lavato con AcOEt e H_2O . Si anidrifica la fase organica con Na_2SO_4 anidro, si esegue la filtrazione su cotone e si

evapora il solvente di estrazione sotto vuoto. Il prodotto viene purificato con cromatografia su colonna con una miscela eluente AcOEt / Etere di petrolio 4:6.

La resa della reazione è dell'80%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.28 - 1.32 (t, 3H), 3.47 - 3.50 (q, 2H), 5.11 (s, 2H), 5.32 (s, 1H), 5.50 (bs, 1H), 6.09 (bs, 1H), 6.68 (bs, 1H), 7.05 - 7.20 (m, 2H), 7.28 - 7.49 (m, 6H), 7.65 - 7.75 (m, 1H)

MS: 381

5-(2-(benzilossi)fenil)-N-etil-4-(5-fenil-1,2,4-ossadiazol-3-il)isossazolo-3-carbossamide(98)

In un pallone da 50 ml contenente una soluzione del composto **96** (100 mg, 0,263 mmol) in toluene (5 ml) viene aggiunta piridina (32 µl, 0.394 mmol); la reazione è raffreddata a 0°C e si procede all'aggiunta del benzoil cloruro (46 µl, 0,394 mmol) nelle medesime condizioni. Dopo 30 min la reazione è riportata a RT e lasciata in agitazione per 1 h. Successivamente la si scalda a riflusso per 2,5 h. Il solvente è evaporato sotto vuoto. Il composto è purificato direttamente tramite cromatografia su colonna.

La reazione ha una resa del 30%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.22 - 1.29 (t, 3H, J=7.4 Hz), 3.46 - 3.53 (m, 2H), 4.94 (s, 2H), 6.95 (d, 1H), 7.07- 7.18 (m, 6H), 7.38 - 7.58 (m, 5H), 7.63 - 7.7 (m, 1H), 7.98 - 8.03 (m, 2H).

MS: 467

N-etil-5-(2-idrossifenil)-4-(5-fenil-1,2,4-ossadiazol-3-il)isossazolo-3-carbossamide(99)

La reazione è condotta in condizioni anidre.

Una soluzione del composto **98** (70 mg, 0.15 mmol) in diclorometano anidro (0.45 ml) viene raffreddata alla temperatura di - 78 °C. Lentamente si aggiunge una soluzione di BCl₃ 2M in metanolo; la reazione viene lasciata a freddo per un'ora e dopo si riporta a temperatura ambiente.

Si diluisce la reazione con altro diclorometano, si porta a 0°C e si aggiunge qualche ml di NaHCO₃ saturo. Si esegue un'estrazione e si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ anidro, si filtra su cotone e si evapora il solvente di estrazione sottovuoto.

Il prodotto viene purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando una miscela eluente AcOEt / Etere di petrolio 3:7.

La resa della reazione è dell' 80%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 1.22 - 1.24 (t, 3H), 3.41 - 3.43 (q, 2H), 4.87 (s, 1H), 6.83 - 6.85 (d, 1H), 6.96 - 7.00 (t, 1H), 7.34 - 7.38 (t, 1H), 7.55 - 7.59 (m, 3H), 7.60 - 7.65 (m, 1H), 8.10 - 8.12 (d, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 14.83 - 35.82 - 105.54 - 114.94 - 117.42 - 120.79 - 125.43 - 129.24 - 130.62 - 131.46 - 134.14 - 134.41 - 156.98 - 159.20 - 161.12 - 163.59 - 171.16 - 176.86.

MS: 377

Metil-2,4-bis(benzilossi)benzoato (101)

Stessa procedura come per il composto **78**. A partire da **100** (10 gr, 0.06 mol) in acetonitrile (100 ml) si aggiunge potassio carbonato (25 gr, 0.18 mol) e benzilbromuro (22 ml, 0.18 mol).

La resa della reazione è del 90%.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 3.87 (s, 3H), 5.07 - 5.14 (d, 4H), 6.57 - 6.61 (m, 2H), 7.33 - 7.48 (m, 10H), 7.85 - 7.90 (m, 1H).

3-(2,4-bis(benzilossi)fenil)-3-ossopropanenitrile(102)

Stessa procedura come per il composto **77**. A partire da **101** (3,5 gr, 0.01 mol) si sono utilizzati sodio idruro al 60% (1.2 gr, 0.03 mol) e acetonitrile (5.24 ml, 0.1 mol); la reazione è stata condotta in toluene (40 ml). Per la purificazione del prodotto si è effettuata una ricristallizzazione sciogliendo il tutto in 100 ml di toluene e portando ad ebollizione per 20 minuti. Si lascia raffreddare e si isola il prodotto per decantazione.

La resa della reazione è intorno al 40%.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 3.92 (s, 2H), 4.70 (s, 1H), 5.11 (s, 3H), 6.62 - 6.69 (m, 2H), 7.36 - 7.42 (m, 10H), 7.91 - 7.95 (d, 1H).

Metil-5-(2,4-bis(benzilossi)fenil)-4-cianoisossazolo-3-carbossilato (103)

Stessa procedura come per il composto **80**. A partire da **102** (530 mg, 1.48 mmol) si è utilizzato trietilammina (270 μ l, 1,93 mmol) e clorossimmino acetato (265 mg, 1.93 mmol) in etanolo (15 ml). La resa della reazione è intorno al 50%.

MS: 441

5-(2,4-bis(benzilossi)fenil)-4-ciano-N-etilisossazolo-3-carbossammide (104)

Stessa procedura come per il composto **95**. Si fa reagire l'intermedio **103** (330 mg, 0.738 mmol) in presenza di etilammina 2M in metanolo (3.7ml, 7.38 mmol). La resa della reazione è del 40%.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.23 - 1.31 (t, 3H, J = 7.2 Hz), 3.49 - 3.53 (q, 2H), 5.06 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 6.63 - 6.71 (m, 2H), 7.33 - 7.39 (m, 10H), 7.67 - 7.72 (d, 1H).

MS: 454

5-(2,4-bis(benzilossi)fenil)-N-etil-4-(N'-idrossicarbamimidoil)isossazolo-3-carbossammide (105)

Stessa procedura come per il composto **96**. A partire da **104** (350 mg, 0.771 mmol) si ottiene **105** utilizzando idrossilammina cloridrata (134 mg, 1.93 mmol), idrossido di sodio (62 mg, 1.54 mmol), acqua (1.4 ml) in etanolo (15 ml). La resa della reazione è del 35 %.

MS: 487

5-(2,4-bis(benzilossi)fenil)-N-etil-4-(5-fenil-1,2,4-ossadiazol-3-il)isossazolo-3-carbossammide (107)

Stessa procedura come per il composto **98**. Partendo da **105** (125 mg, 0.257 mmol) si sono utilizzati benzoil cloruro (45 μ l, 0.385 mmol) e piridina (31 μ l, 0.385 mmol); la reazione è svolta in toluene (5 ml). La resa della reazione è del 30%.

MS: 573

5-(2,4-diidrossifenil)-N-etil-4-(5-fenil-1,2,4-ossadiazol-3-il)isossazolo-3-carbossamide (108)

Stessa procedura come per il composto **99**. Si fa reagire **106** (45 mg, 0.078 mmol) con tricloruro di boro (0.234 μ l, 0.234 mmol) in diclorometano (5 ml). La reazione ha una resa del 50%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 1.21 - 1.23 (t, 3H), 3.40 - 3.45 (m, 2H), 6.47 - 6.48 (d, 1H), 6.52 - 6.54 (m, 1H), 7.47 - 7.49 (d, 1H), 7.61 - 7.66 (m, 2H), 7.68 - 7.71 (m, 1H), 7.72 - 8.14 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 14.01 - 33.95 - 102.99 - 104.20 - 107.76 - 124.21 - 127.79 - 129.35 - 131.54 - 132.90 - 156.76 - 158.14 - 161.52 - 169.54 - 174.79

MS: 353

methyl 5-acetyl-2-(benzyloxy)benzoate(110)

In un Pallone da 500 ml si scioglie **109** (0,051 mmol) in CH_3CN e poi si aggiunge K_2CO_3 BnBr goccia a goccia. La reazione si tiene a riflusso per 6h a 100 °C.

Al termine si evapora il solvente, si effettuano delle estrazioni con $\text{AcOEt}/\text{H}_2\text{O}$, poi si anidri fica con Na_2SO_4 e si porta a secco fino a peso costante.

Il prodotto si purifica mediante triturazione utilizzando come solvente Esano, per ottenere un solido bianco. Resa: 90%

methyl 2-(benzyloxy)-5-(prop-1-en-2-yl)benzoate(111)

In un Pallone da 250 ml si sospendono **110** (0,025 mmol) e il trifenilfosfonio bromuro(0,05 mmol) in Toluene e si aggiunge poco per volta NaH 60%. La reazione si lascia a riflusso per 5h. Al termine si aggiunge qualche ml di MeOH e di H_2O , si effettuano delle estrazioni con AcOEt , poi si effettua un lavaggio con Brine e si anidri fica con Na_2SO_4 . Il grezzo viene portato a secchezza fino a peso costante.

Il grezzo viene sciolto in Esano e messo a riflusso per 1h; dopo si filtra e si tritura con Et_2O .

La purificazione si effettua mediante cromatografia su colonna utilizzando come fase eluente AcOEt/Pet 1:9

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): 2,12-2,13 (s, 3H); 3,91 (s, 3H); 5,04 (s, 1H); 5,19 (s, 2H); 5,32 (s, 1H); 6,94-6,98 (d, 1H); 7,33-7,46 (m, 6H); 7,91-7,93(d, 1H)

MS: 282,33

methyl 2-hydroxy-5-isopropylbenzoate(112)

Al composto **111** (0,016 mmol), sciolto in EtOH (200ml), viene aggiunto Pd/C al 10% preventivamente bagnato con H₂O. La miscela viene lasciata in agitazione magnetica a temperatura ambiente e in atmosfera di H₂ per 16 h. Il catalizzatore è rimosso per filtrazione su celite e il filtrato è concentrato per dare un residuo che viene purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice (eluente: miscela Petrolio/AcOEt70:30) per dare il composto desiderato come un solido cristallino bianco.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 1,20-1,24 (m, 3H); 2,82-2,85 (m, 1H); 3,94 (s, 3H); 6,89-6,93 (d, 1H); 7,31-7,36 (dd, 1H); 7,66-7,67 (d, 1H).

MS: 194,35

methyl 2-(benzyloxy)-5-isopropylbenzoate(113)

In un Pallone da 500 ml si scioglie **112** (0,014 mmol) in CH₃CN e poi si aggiunge K₂CO₃ BnBr goccia a goccia. La reazione si tiene a riflusso per 6h a 100 °C.

Al termine si evapora il solvente, si effettuano delle estrazioni con AcOEt/H₂O, poi si anidri fica con Na₂SO₄ e si porta a secco fino a peso costante.

Il prodotto si purifica mediante triturazione utilizzando come solvente Esano, per ottenere un solido bianco. Resa: 90%

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 1,21-1,24 (d, 6H); 2,88 (m, 1H); 3,90 (s, 3H); 5,15 (s, 2H); 6,91-6,96 (d, 1H); 7,26-7,51 (m, 5H); 7,66-7,67 (d, 1H).

3-(2-(benzyloxy)-5-isopropylphenyl)-3-oxopropanenitrile(114)

La reazione è condotta in atmosfera di argon.

In un pallone da 100 ml si mette CH₃CN (5.12ml, 0.098moli) e lo si solubilizza in toluene (10ml).

In un pallone a parte si scioglie il composto **113** (2.25g, 0.01 mol) e si solubilizza anch'esso in toluene (10ml). La soluzione formata dalla sostanza di partenza e toluene viene a questo punto aggiunta nel pallone con CH₃CN e toluene. Infine si aggiunge NaH 60% (1.17g, 0.03moli). La reazione è messa a riflusso alla temperatura di 130° C per 4h.

Dopo 4h, si gocciola la reazione in una beuta con poco ghiaccio e successivamente si acidifica la fase acquosa con HCl 7% fino a pH=2. Si eseguono 3 estrazioni della fase acquosa con AcOEt; si riuniscono le fasi organiche, si anidrificano con Na₂SO₄anidro, si filtra su cotone e si evapora il solvente sottovuoto.

Il composto viene purificato mediante cromatografia su colonna; la miscela eluente utilizzata è AcOEt / Etere di petrolio 1:9.

Il prodotto pulito è un solido colore biancastro; la resa della reazione è del 50%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 1,21-1,24 (d,6H); 2,87-2,90 (m, 1H); 3.98 (s, 2H); 5.18 (s, 2H); 6,98-7,03 (d, 1H); 7.38-7.45 (m, 6H) 7.72-7.73 (d, 1H).

MS: 293,36

ethyl 5-(2-(benzyloxy)-5-isopropylphenyl)-4-cyanoisoxazole-3-carboxylate(115)

La reazione è eseguita in atmosfera di argon.

In un pallone a due colli da 50 ml si sospende **114** (500mg, 2 mmoli) in EtOH (8ml). Si porta la reazione a 0°C e sotto agitazione si aggiunge lentamente Et₃N (364 µl, 2.6 mmol). Si riporta la reazione a temperatura ambiente e si attendono 20 minuti, dopodichè si aggiunge il clorossimmino acetato (358 mg, 2.6mmoli) preventivamente sciolto in EtOH (4ml); il clorossimmino acetato viene addizionato in frazioni di 250µl ciascuna, distanziando le aggiunte di alcuni minuti l'una dall'altra e terminando le operazioni in circa 30 minuti. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 72h.

Si tira a secco l'EtOH e si esegue una prima estrazione con AcOEt e HCl, dopo si fa un lavaggio con una soluzione satura di NaHCO₃ e successivamente con il Brine. Si anidrifica la fase organica con Na₂SO₄anidro, si effettua la filtrazione su cotone e si evapora il solvente di estrazione con il sottovuoto. Il prodotto viene purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando come miscela eluente AcOEt/Etere di petrolio 1:9.

La reazione ha una resa del 70%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 1,21-1,26 (m, 6H); 2,92 (m, 1H); 4.06 (s, 3H), 5.29 (s, 2H), 6,97-7.01 (d, 2H), 7.31-7.42 (m, 6H), 7.42-7,59 (m, 2H).

MS: 383

5-(2-(benzyloxy)-5-isopropylphenyl)-4-cyano-N-ethylisoxazole-3-carboxamide(116)

In un pallone da 50 ml si scioglie **115** (650 mg, 1,9 mmoli) in una soluzione di EtNH₂ 2M in metanolo (9.5 ml, 19 mmoli).

La reazione è portata a riflusso a 90°C per 1h e 30 min.

Si evapora il MeOH sottovuoto e si effettua un lavaggio con AcOEt e HCl 1M, si anidrifica la fase organica con Na₂SO₄ anidro, si filtra su cotone e si evapora il solvente di estrazione sottovuoto.

Il prodotto viene purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando una miscela eluente di AcOEt / Etere di petrolio 2:8.

La resa della reazione è del 60%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.21 - 1.31 (m, 9H); 2,91 (m, 1H); 3.50 - 3.56 (q, 2H), 5.29 (s, 2H), 6.70 (bs, 1H), 6,96 – 7,00 (d, 2H), 7.31 - 7.44 (m, 6H), 7.55 - 7.56 (d, 1H).

MS: 389

5-(2-(benzyloxy)-5-isopropylphenyl)-N-ethyl-4-(N'-hydroxycarbamidoyl)isoxazole-3-carboxamide(117)

In un pallone da 100 ml, ad una sospensione del prodotto **116** (500 mg, 1.44 mmoli) in EtOH (20 ml) è aggiunta NH₂OH cloridrata (250 mg, 3.6 mmol) ed NaOH (115mg, 2.88 mmol) preventivamente sciolto in acqua (2,5 ml). La soluzione è portata a riflusso alla temperatura di 80°C per 4 h.

Il solvente è poi evaporato sotto vuoto, e il residuo è lavato con AcOEt e H₂O. Si anidrifica la fase organica con Na₂SO₄ anidro, si esegue la filtrazione su cotone e si evapora il solvente di estrazione sotto vuoto. Il prodotto viene purificato mediante cromatografia su colonna con una miscela eluente AcOEt / Etere di petrolio 4:6.

La resa della reazione è dell'80%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 1.28 - 1.32 (m, 9H), 3.47 - 3.50 (q, 1H), 4.06 - 4.17 (q, 2H), 5.11 (s, 2H), 6.68 (bs, 1H), 7.05 - 7.20 (m, 2H), 7.28 - 7.49 (m, 6H), 7.65 - 7.75 (m, 1H)

MS: 422

5-(2-(benzyloxy)-5-isopropylphenyl)-N-ethyl-4-(5-phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)isoxazole-3-carboxamide(119)

In un pallone da 50 ml contenente una soluzione del composto **117** (100 mg, 0,263 mmol) in toluene (5 ml) viene aggiunta piridina (32 μ l, 0.394 mmol); la reazione è raffreddata a 0°C e si procede all'aggiunta del benzoil cloruro (46 μ l, 0,394 mmol) nelle medesime condizioni. Dopo 30 min la reazione è riportata a RT e lasciata in agitazione per 1 h. Successivamente si scalda a riflusso per 2,5 h. Il solvente è evaporato sotto vuoto. Il composto è purificato direttamente tramite cromatografia su colonna utilizzando come fase eluente AcOEt/Pet 2:8

La reazione ha una resa del 30%.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 1.20-1.25 (m, 9H), 2.89 (q, 1H), 3.46-3.52 (q, 2H), 4.90 (s, 2H), 6.81-6.86 (d, 1H), 7.07- 7.18 (m, 6H), 7.38 - 7.58 (m, 5H), 7.63 - 7.7 (m, 1H), 7.98 - 8.03 (m, 2H).

MS: 508

N-ethyl-5-(2-hydroxy-5-isopropylphenyl)-4-(5-phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)isoxazole-3-carboxamide(120)

La reazione è condotta in condizioni anidre.

Una soluzione del composto **119** (100 mg, 0.2 mmol) in diclorometano anidro (10 ml) viene raffreddata alla temperatura di – 78 °C. Lentamente si aggiunge una soluzione di BCl₃ 2M in metanolo (0,6 ml); la reazione viene lasciata a freddo per un'ora e dopo si riporta a temperatura ambiente.

Si diluisce la reazione con altro diclorometano, si porta a 0°C e si aggiunge qualche ml di NaHCO₃ saturo. Si esegue un'estrazione e si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ anidro, si filtra su cotone e si evapora il solvente di estrazione sottovuoto. Il prodotto viene purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando una miscela eluente AcOEt/Pet 3:7. Resa 80%.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1.18-1.29 (m, 9H), 2.85 (q, 1H), 3.5-3.53 (q, 2H), 7.00-7.03 (d, 1H), 7.25-7.26 (d, 1H), 7.31-7.32 (d, 1H), 7.51-7.62 (m, 3H), 7.60 - 8.10 - 8.12 (d, 2H)

¹³C-NMR(400 MHz, CD₃OD): 14.64 - 23.98 – 33.22 - 34.80 - 114.65 – 119.80 – 128.42 - 129.37 - 131.78 - 133.56 – 141.83 – 152.43 – 157.04 – 157.92 – 161.23 – 170.49 - 175.99

MS: 418

BIBLIOGRAFIA

- 1) Langer, T.; Rosmus, S. & Fasold, H. *Cell Biol. Int.* **2003**, 27, 47-52.
- 2) Whitesell, L. & Lindquist, S.L. *Nature Rev. Cancer* **2005**, 5, 761-772.
- 3) Whitesell, L. & Lindquist, S. L. HSP90 and chaperoning of cancer. *Nature Rev.Cancer* , **2005**, 5, 761-772.
- 4) Trepel, J.; Mollapour, M.; Giaccone, G.; Neckers, L.; *Nature Rev. Cancer* **2010**, 10, 537-549.
- 5) Landriscina, M.; Amoroso, M.R.; Piscazzi, A.; Esposito, F.; *Gynecol. Oncol.*, **2010**, 177 -182.
- 6) Tsutsumi, S et al. *Nature Struct. Mol.Biol.* **2009**, 16, 1141-1147.
- 7) Retzlaff, M. et al. *EMBO Rep.* **2009**, 10, 1147-1153
- 8) Hessling, M.; Richter, K. & Buchner, J.; *Nature Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 287-293.
- 9) Tsutsumi, S. & Neckers, L.; *Cancer Sci.* **2007**, 98, 1536-1539.
- 10) Masuda, Y.; *J.Health Sci.*, vol. 57, **2011**, 1-9.
- 11) Green, D. R.; Kroemer, G.; *Science* **2004**, 305, 626-629.
- 12) Altieri D.C., et al., *Biochim. Biophys. Acta* **2011**.
- 13) Felts, S. J. et al. *Biol. Chem.* **2000**, 275, 3305-3312.
- 14) Altieri, D.C.; Kang, B.H.; Plescia, J.; Dohi, T.; Rosa, J.; Doxsey, S.J.; *Cell* **2007**, 131, 257-270.
- 15) Kang, B.H.; Plescia, J.; Song, H.Y.; Meli, M.; Colombo, G.; Beebe, K.; Scroggins, B.; Neckers, L.; Altieri, D.C.; *Journ. of Clinic. Investig.* **2009**, 119, 454-464.

- 16) Biasutto, L.; Dong, L.; Zoratti, M.; Neuzil, J.; *Mitochondrion* **2010**, 10, 670-681.
- 17) Simoni E. et al. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 7264–7268
- 18) Patent WO 2011/102660.
- 19) Zankowska-Jasińska, W.; Golus, J.; Kamela, Z.; Kolasa, A.; *Pol. J. Chem.*, **1987**, 61 (1-3), 141- 148.
- 20) Herschhorn, A.; Leraman, L.; Weitman, M.; Oz Gleenberg, I.; Nudelman, A.; Hizi, A.; *J. Med. Chem.*, **2007**, 50 (10), 2370–2384.
- 21) Moorthy, J.N.; Singhal, N.; *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1926 -1929.
- 22) Kim, E. S.; Kim, H.S.; Kim, J.N.; *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 2937 - 2975.
- 23) Sawaki, Y.; Ogata, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1981**, 54, 793 – 799
- 24) Katritzky, A.R.; Pilarsky, B.; Urogdi, L.; *Synthesis*, **1989**, 949-950
- 25) Lakshiminarayana, N. et al.; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 3709 - 3718.
- 26) Keillor, J.W.; Huang, X.; *Org. Synth.*, **2004**, 10, 549; **2002**, 78, 234.
- 27) Patent WO 2011/102660.
- 28) Palumbo Piccionello, A.; Guarcello, A.; Pace, A.; Buscemi, S.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 1986 - 1992.