

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali



CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN:
CHIMICA

Curriculum: organico

CLASSE 21: (Scienze e Tecnologie Chimiche)

Elaborato del Tirocinio

*Sintesi di derivati idrossi-piridonici a potenziale
attività antitumorale.*

Relatore Interno: Prof. Anna Iuliano

Relatore Esterno: Prof. Alessandro Mordini

Controrelatore: Prof. Fabio Bellina

Candidato: Damiano Spadoni

Anno Accademico 2011/2012

INDICE

1	INTRODUZIONE.	4
1.1	Il neuroblastoma.	4
1.2	Vecchi farmaci per nuove applicazioni.	10
1.3	Nuovi utilizzi di CPX.	11
1.4	La ciclopiroxolamina e i farmaci fuori brevetto.	12
1.5	Altre molecole chelanti ioni Fe ³⁺ .	15
2	DISCUSSIONE DEI RISULTATI.	18
2.1	Scopo della tesi.	18
2.2	Stato dell'arte sulla sintesi di 1-idrossi- α -piridoni.	19
2.3	Le strategie sintetiche. Sintesi di 1-idrossi- α -piridoni-4,6-sostituiti via lattoni.	23
2.4	Le strategie sintetiche. Sintesi di α -piridoni-4,6-sostituiti via γ -chetoesteri- α,β -insaturi.	30
2.5	Sintesi selettiva di γ -chetoesteri- β,γ -insaturi.	40
2.6	Test biologici degli analoghi di CPX.	50
2.7	Misure di chelazione del Fe ³⁺ .	55
3	CONCLUSIONI.	57
4	PARTE SPERIMENTALE.	58
4.1	Considerazioni generali.	58
4.2	Preparazione del 6-ciclopentil-4-metil-2H-piran-2-one (21).	60
4.3	Preparazione del (2 <i>E</i>)-3-metil-5-ossos-2-enoato di metile (25a) e del (2 <i>E</i>)-3-metil-5-ossos-3-enoato di metile (25b) e del 3-metilidene-5-ossosanoato di metile (25c).	61
4.4	Preparazione del 1-idrossi-4,6-dimetilpiridin-2(1 <i>H</i>)-one (26).	63

4.5	Preparazione del (2E)-3,6-dimetil-5-ossoept-2-enoato di metile (27a), del (2E)-3,6-dimetil-5-ossoept-3-enoato di metile (27b) e del 6-metil-3-metilidene-5-ossoeptanoato di metile (27c)	64
4.6	Preparazione del 1-idrossi-4-metil-6-(propan-2-il)piridin-2(1H)-one (28).	66
4.7	Preparazione del (2E)-6-etil-3-metil-5-ossodec-2-enoato (29a) di metile, del (2E)-6-etil-3-metil-5-ossodec-3-enoato di metile (29b) e del 6-etil-3-metilidene-5-ossodecanoato di metile (29c).	67
4.8	Preparazione del 6-(eptan-3-il)-1-idrossi-4-metilpiridin-2(1H)-one (30).	69
4.9	Preparazione del 4-[(1- <i>t</i> -butil-1,1-dimetilsilil)-ossi]-but-1-ino (41).	70
4.10	Preparazione del 5-[(1- <i>t</i> -butil-1,1-dimetilsilil)-ossi]-1-fenilpent-2-in-1-olo (39).	71
4.11	Preparazione del 5-[(1- <i>t</i> -butil-1,1-dimetilsilil)-ossi]-1-fenilpent-2-in-1-one (38).	74
4.12	Preparazione del (2E/Z)-3-[(1- <i>t</i> -butil-1,1-dimetilsilil)-2-ossietil]-1-fenilept-2-en-1-one (37).	75
4.13	Preparazione degli (2E/Z)-3-(2-idrossietil)-1-fenilept-2-en-1-oni (36).	76
4.14	Preparazione degli acidi (2E/Z)-3-(2-osso-2-feniletiliden)-eptanoici (35).	77
4.15	Preparazione degli (3E/Z)-3-(2-osso-2-feniletilidene)-eptanoati di metile (34) e (3E/Z)-3-butil-1-fenilept-3-ene-1,5-dione (34a).	79
4.16	Preparazione del 4-butil-1-idrossi-6-fenilpiridin-2(1H)-one (33).	81
5	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.	83

1 Introduzione.

1.1 *Il neuroblastoma.*

Il neuroblastoma è il più comune tumore solido extra craniale caratteristico del bambino. Rappresenta più del 7% di tutti i tumori pediatrici ed è responsabile del 15% dei decessi attribuiti a neoplasie infantili.¹

La maggior parte dei neuroblastomi sono tumori non differenziati e si presentano come piccole cellule di forma circolare chiamati neuroblasti che evidenziano poca o nessuna differenziazione neurale; alcuni tumori che mostrano una parziale differenziazione istologica sono chiamati ganglioneuroblastomi. Infine i tumori che riportano un alto grado di differenziazione sono chiamati ganglioneuromi consistenti in un ammasso di corpi cellulari di neuroni maturi circondati dalle cellule di Schwann.

Il neuroblastoma è un tumore neuroendocrino maligno embrionario che deriva dalle cellule della cresta neurale. Pertanto i tumori possono svilupparsi ovunque nelle cellule del sistema nervoso simpatico dove i neuroblasti si spostano e stabiliscono durante l'embriogenesi.

Circa il 65% dei tumori primari si sviluppano nell'addome ma possono manifestarsi anche nel collo, torace e bacino. Possono venir colpite anche le ossa, i linfonodi, il fegato e il midollo osseo nel caso in cui compaiano le frequenti e precoci metastasi. I sintomi sono molto variabili e dipendono dal sito del tumore primario. I più diffusi sono: febbre, anemia, inappetenza ed ecchimosi alle palpebre che sono sintomi riconducibili a stati influenzali. Perciò la malattia può trarre in inganno e per questo motivo viene spesso diagnosticata con ritardi di settimane o mesi dalla sua insorgenza.²

Il neuroblastoma è considerato un enigma per la sua eterogeneità sia nella forma che nella sua manifestazione. Questa patologia si sviluppa nelle direzioni più svariate: può regredire spontaneamente o anche maturare in un ganglioneuroma benigno. Comunque la maggior parte dei bambini sopra l'anno di età riportano un processo metastatico al momento della prognosi. Età, posizione e caratteristiche sia biologiche che istologiche riscontrate nelle cellule tumorali sono importanti fattori prognostici e sono utilizzati per la determinazione del rischio di estensione e la decisione del tipo di trattamento.³

Il ruolo dell'età nel rischio di estensione e stratificazione del neuroblastoma è fondamentale e vengono usati i primi 18 mesi di vita come punto di taglio per il più alto rischio di stratificazione della matrice: i pazienti sotto i 18 mesi di vita hanno le più alte probabilità di avere una prognosi favorevole anche con tumori con amplificazione dell'oncogene *MYCN*, gene che dimostrò, per la prima volta nel 1983, di avere un grande valore prognostico in oncologia pediatrica, la cui amplificazione è un importante *marker* di alto rischio per pazienti affetti da neuroblastoma.⁴ I bambini più grandi di 18 mesi, ai quali viene diagnosticata la metastasi del neuroblastoma, hanno minori probabilità di sopravvivere nonostante una terapia aggressiva multimodale (Fig. 1.1).⁵

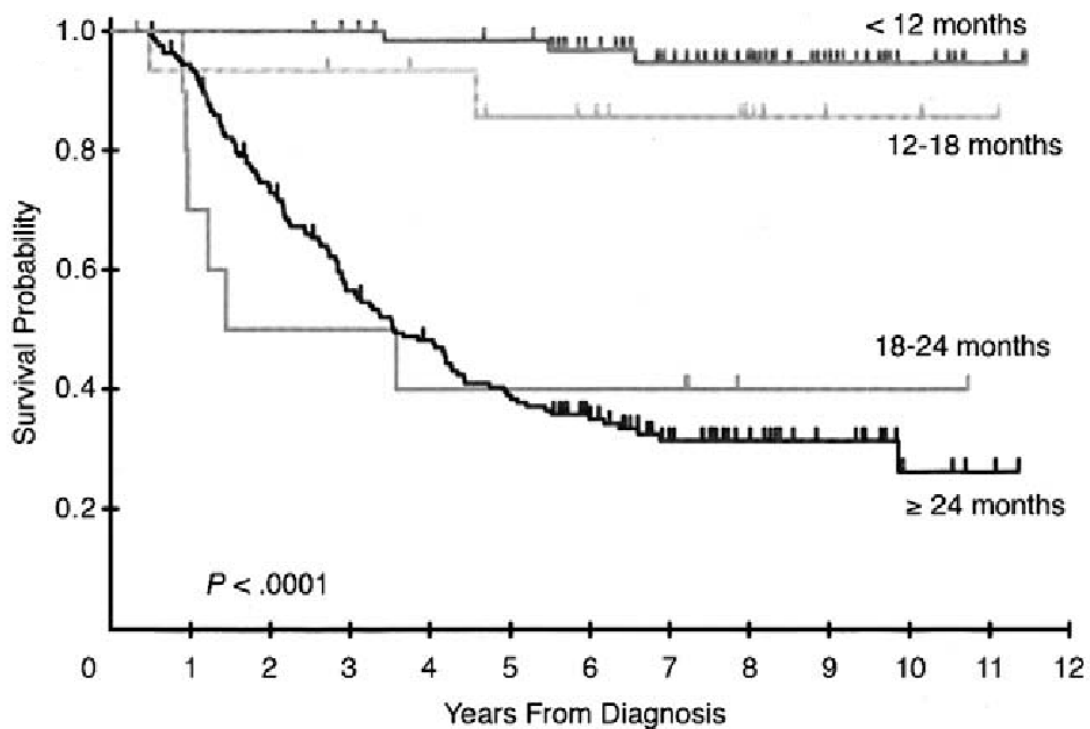


Figura 1.1: Andamento della sopravvivenza in bambini con neuroblastoma allo stadio 4 senza amplificazione *MYCN*.

Nel 1989 fu istituito l'International Neuroblastoma Staging System (INSS) che ancora oggi viene utilizzato per poter stabilire lo stadio del neuroblastoma nei pazienti.⁶

Questo sistema suddivide i pazienti in sei stadi a seconda del punto in cui viene localizzato il tumore e del suo stato di avanzamento. Lo stadio 1 considera quei pazienti che riportano un tumore localizzato e che può essere rimosso completamente per via chirurgica. Negli stadi 2A e 2B i pazienti sono affetti da tumori confinati ma che non possono essere rimossi chirurgicamente. I bambini con tumori in mezzo al torace o all'addome o divisi nella parte destra

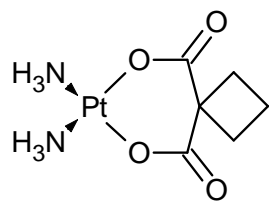
e sinistra del corpo sono raggruppati nello stadio 3. I pazienti allo stadio 4 sono affetti da tumore diffuso nei linfonodi, ossa, midollo osseo, fegato, pelle e/o altri organi. Nello stadio 4S vengono considerati i pazienti sotto i 12 mesi di età e che riportano un tumore primario localizzato che si è diffuso solo sulla pelle, fegato o midollo osseo. Quest'ultimo viene definito anche stadio speciale poiché circa il 5% dei casi di questo tipo di tumore può regredire spontaneamente o differenziarsi in un ganglioneuroma senza alcun tipo di trattamento.¹

I protocolli terapeutici attualmente in uso per questa neoplasia, prevedono la chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia. La scelta del tipo di protocollo da utilizzare va in base allo stadio in cui il tumore si trova e quindi alla gravità del caso. In quasi 2/3 dei casi la malattia richiede un trattamento con farmaci antitumorali e nella maggior parte dei casi, una combinazione di questi.

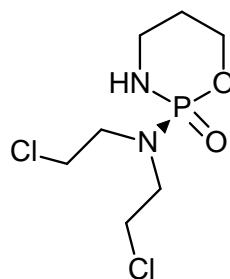
I principali farmaci utilizzati per trattare bambini affetti da neuroblastoma sono:

- Ciclofosfamide o ifosfamide
- Cisplatino o carboplatino
- Vincristina
- Doxorubicina
- Etoposide
- Topotecan

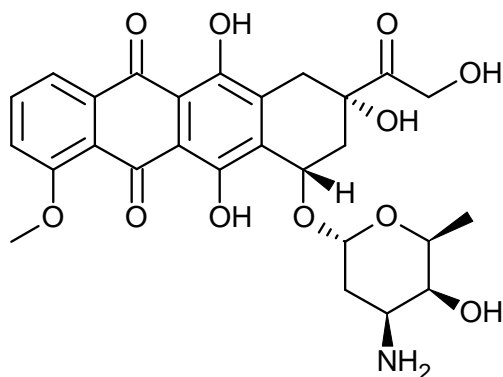
La combinazione di farmaci più usata per curare il neuroblastoma consiste nel carboplatino, ciclofosfamide, doxorubicina ed etoposide (Fig. 1.2).



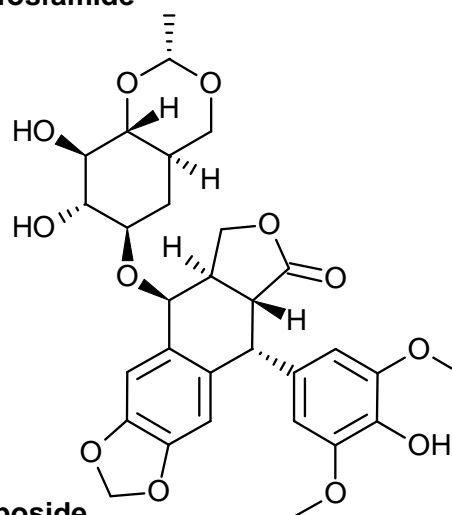
Carboplatino



Ciclofosfamida



Doxorubicina



Etoposide

Figura 1.2: Antitumorali convenzionali maggiormente utilizzati

Nei pazienti ad alto rischio vengono usate ampie combinazioni di farmaci e somministrate con dosi massicce, portando ad una serie di effetti collaterali quali: perdita di capelli, stomatite, inappetenza, nausea e vomito, aumento del rischio di infezioni, facilità al sanguinamento e alla formazione di lividi e affaticamento. La maggior parte di questi effetti collaterali durano solo il tempo del trattamento e possono essere somministrati altri farmaci insieme agli antitumorali per prevenire o ridurre tali effetti.⁷

Ma si debbono considerare anche gli effetti collaterali specifici dei medicinali. La ciclofosfamida e l'ifosfamida, già nei primi anni '60 era riportato che portassero a fibrosi e necrosi della vescica e reflusso vescicoureterale.⁸ Pericolose emorragie interne e cistiti possono comparire durante o subito dopo il

trattamento, talvolta anche tanto gravi da far riportare una mortalità associata ad esse del 4%;⁹ può essere causa dell'insorgenza del carcinoma della vescica¹⁰ e avere seri riscontri sui genitali e fertilità.¹¹

La doxorubicina entrò a far parte dei farmaci utilizzati per la cura del cancro alla fine degli anni '60 e nonostante fornisca ottimi risultati, è anche causa di complicazioni cardiache, come cardiomiopatie¹² e pericarditi.¹³ Viene classificata anche come probabile agente carcinogenico.¹⁴

Il trattamento con cisplatino e carboplatino ha causato in molti pazienti, problemi di ototossicità, neurotossicità e mielosoppressione¹⁵ ma i disturbi renali e i problemi di nefrotossicità che causa, lo rendono il maggior fattore dose limitante.¹⁶

Somministrazioni prolungate nel tempo di vincristina portano all'insorgenza di neuropatia cranica,¹⁷ neuropatia sensoriale periferica¹⁸ e con alte dosi del farmaco possono aggiungersi neuropatie motorie ed autonome.¹⁹

Il maggior effetto collaterale dose limitante dell'etoposide è la tossicità ematologica. La soppressione del midollo osseo si manifesta principalmente tramite granulocitopenia, talvolta anche letale, ma anche trombocitopenia e anemia.²⁰ L'etoposide è stato riconosciuto anche cancerogeno per l'uomo quando somministrato insieme ad altri farmaci come il cisplatino o la bleomicina.²¹

Anche la tossicità del Topotecan risiede per lo più nella mielosoppressione, in particolar modo nella neutropenia che si manifesta più frequentemente e in maniera più grave della trombocitopenia. Questi effetti indesiderati sono comunque reversibili e non cumulativi.²²

Bambini piccoli devono quindi fare i conti con limiti di tossicità troppo facilmente raggiungibili a causa della intensificazione delle dosi della chemioterapia. Sebbene alte dosi di farmaci siano importanti da somministrare

per raggiungere il riassorbimento del tumore, gli effetti collaterali a lungo termine sono un bel prezzo da pagare. Se da una parte c'è una crescente sopravvivenza al tumore, dall'altra si devono considerare i disturbi cronici legati alle terapie citotossiche tra cui crescita ritardata e problemi di sviluppo.²³ Per questo motivo si vede necessario lo sviluppo e l'utilizzo di nuovi farmaci o piccole molecole diretti verso obiettivi specifici; un miglior apprendimento dell'interazione tra farmacogenomica, tumore e il suo micro sviluppo è ancora critico. Una disciplina in grado di integrare e sfruttare tutte queste differenti modalità, nel più appropriato contesto clinico, è essenziale al fine di raggiungere lo scopo finale: curare i pazienti e migliorare la qualità delle loro vite.

1.2 Vecchi farmaci per nuove applicazioni.

I costi per lo sviluppo di un farmaco innovativo stanno diventando molto alti. Uno studio su 68 farmaci rivela che servono dai 10 ai 17 anni e 800 milioni di dollari per lanciare un nuovo farmaco sul mercato.²⁴ Inoltre la percentuale di insuccesso di un nuovo candidato farmaco è molto alta, solo 250 farmaci su 5000 candidati entrano negli studi clinici, di cui solo uno su dieci composti viene approvato. Il rapporto di scoperta dei farmaci è troppo basso per soddisfare le necessità della popolazione mondiale. Alla comunità scientifica è stato proposto di creare una libreria completa di vecchi composti pronti per essere testati per nuovi scopi.²⁵ Il vantaggio principale di questo approccio risiede nella già esistente conoscenza delle loro caratteristiche farmacologiche. Sulle molecole tuttora in uso sono già noti le farmacocinetiche ed i profili di tossicità e sicurezza, inoltre sono già stati approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per l'utilizzo sull'uomo. Perciò ogni molecola con

queste caratteristiche può velocemente essere testata nella fase II dei test clinici con notevole risparmio di costi e tempo. Finora sono 24 i farmaci già esistenti reimmessi sul mercato per nuovi utilizzi dall'industria farmaceutica e almeno altre 17 molecole sono in vari stadi dei test clinici.²⁶ La maggior parte delle molecole che hanno cambiato il loro utilizzo sono il risultato di supposizioni o osservazioni azzardate, ma la riscoperta di vecchi farmaci sta diventando una pratica molto comune. Un esempio ne è l'antibiotico ceftriaxone, un potenziale curativo per la sclerosi laterale amiotrofica che fu scoperto seguendo lo *screening* di 1040 composti presenti nella collezione di utilizzo del National Institute Neurological Disorders and Stroke (NINDS) a Gaylordsville, Connecticut.²⁷

1.3 Nuovi utilizzi di CPX.

Nel 1993 la Microsource Discovery Systems, Inc. (MDSI), mise a punto un sistema rapido e poco dispendioso per fare un *high-throughput screening* di 2000 molecole. La libreria include 800 farmaci approvati dalla FDA e 200 farmaci in uso solamente in Europa e Giappone. Di questi, 580 sono prodotti naturali e 420 sono composti con attività biologica nota.²⁸

Uno *screening* eseguito nel Laboratory of Translational Genomics (CIBIO, università di Trento), svolto su linee cellulari di neuroblastoma umano CHP134, ha selezionato 4 composti chelanti del ferro in grado di indurre efficiente citotossicità. Tre di questi erano degli agenti chemioterapici ben conosciuti appartenenti alla classe delle antracicline, utilizzati nella terapia di prima linea del neuroblastoma (doxorubicina, daunorubicina ed epirubicina) mentre la quarta molecola, appartenente alla classe degli idrossipiridoni, era un

composto antifungino utilizzato per il trattamento topico delle micosi, la ciclopiroxolamina (CPX).²⁹

Questo lavoro di tesi si è incentrato sulla sintesi di analoghi della CPX allo scopo di trovare una molecola che presentasse una migliore citotossicità e per riuscire a fornire maggiori informazioni sul meccanismo d'azione e farmacocinetica di CPX sulle cellule di neuroblastoma.

1.4 La ciclopiroxolamina e i farmaci fuori brevetto.

La ciclopiroxolamina (CPX), conosciuta anche come HOE 296, Batrafen, Loprox, Penlac e Stieprox, è il sale etanolamminico del 6-cicloesil-1-idrossi-4-metilpiridin-2(1*H*)-one (Fig. 1.3).

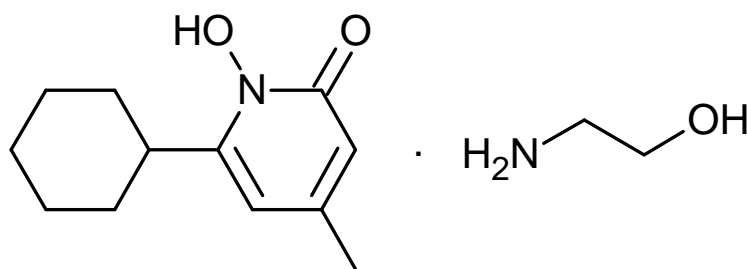


Figura 1.3: Struttura chimica della ciclopirox olamina (CPX).

È un agente antifungino sintetico, clinicamente usato per curare le micosi di pelle e unghie e possiede uno spettro d'azione molto ampio contro i dermatofiti, lieviti, funghi filamentosi e batteri.³⁰

I meccanismi di attività microbica di CPX sembrano essere diversi tra loro implicando la funzione di rottura della membrana nei funghi o attaccando differenti processi metabolici e di produzione di energia nei batteri.

Inoltre è stato dimostrato essere in grado di arrestare il ciclo cellulare alla fase G₁ delle cellule mammarie³¹ e alla fase G₂/M nei lieviti di *S. cerevisiae*.³²

CPX è un chelante del ferro ben conosciuto, perciò inibisce gli enzimi dipendenti dal ferro come la catalasi e perossidasi. Recenti studi hanno rivelato che la morte cellulare di cellule malate umane indotta dalla ciclopirox è associata alla chelazione del ferro intracellulare e all'inibizione dell'enzima ferro-dipendente ribonucleotide reduttasi.³³

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che CPX mostra attività contro i tumori a concentrazioni che sembrano farmacologicamente accessibili. Riduce la vitalità delle cellule tumorali con valori di IC₅₀ di 2.5 µM e anche meno per linee cellulari di leucemia, mieloma, e tumore solido. Contrariamente ai suoi effetti sulle linee di cellule tumorali, CPX non interferisce con la vitalità di linee cellulari non tumorali di fibroblasti polmonari a concentrazioni fino a 10 µM.³³

Un altro studio condotto su cellule leucemiche K562 e HL60 ha dimostrato che CPX ne inibisce la crescita e proliferazione con una via dose-dipendente incubando le cellule per 24, 48 e 72 ore. Inoltre è in grado di inibire la crescita di cellule primarie CD34+ derivanti da pazienti affetti da leucemia mieloide cronica.³⁴

La ciclopirox inibisce efficientemente la crescita del tumore riducendo la proliferazione e inducendo apoptosi delle cellule *in vivo*. I risultati del trattamento di CPX sul cancro al polmone umano MDA-MB231 in un modello di xenograft su topo, hanno riportato una inibizione della crescita del tumore del 75% causata in particolare da una induzione apoptotica piuttosto che ad un solo blocco della proliferazione cellulare.

Infine la crescita cellulare e la vitalità delle cellule di rhabdomiosarcoma, carcinoma polmonare e adenocarcinoma al colon-retto diminuisce in seguito al trattamento con CPX.³⁵

La ciclopiroxolamina è tuttora approvata per il trattamento topico di infezioni fungine cutanee³⁶ ma non è stata precedentemente valutata come agente sistemico per il trattamento di tumori. Tuttavia, come parte dello sviluppo di questo agente per la terapia topica, CPX è stata somministrata sistematicamente ad animali ed esseri umani per valutarne la sicurezza e tossicità. Questi studi hanno dimostrato che è ben tollerata riportando valori di LD₅₀ in topi, ratti e conigli che spaziano da 1700 a 3290 mg/Kg dopo somministrazione orale. Dopo ripetute somministrazioni del farmaco a ratti e cani, la concentrazione nel siero sanguigno di 10 µM non era tossica. In volontari umani sani, 10 mg/Kg di CPX orale non ha prodotto tossicità.³⁷

Tuttavia, esistono anche altri composti chelanti del ferro con struttura simile a quella di CPX dotati di tossicità sistemica molto bassa e con biodisponibilità molto più alta rispetto ai convenzionali agenti antitumorali. Per esempio il valore di LD₅₀ del deferiprone (Fig. 1.4) nel ratto è di 2000 mg/Kg mentre per la doxorubicina e il cisplatino sono di 10.5 mg/Kg e 25 mg/Kg rispettivamente.³⁸ La concentrazione nel plasma di deferiprone nell'uomo per trattamento con ferro in eccesso in pazienti talassemici trasfusi è di 250 µM mentre quello di doxorubicina per alte dosi in infusione in pazienti con tumore è di 0.1 µM.³⁹

Questo dimostra che la tossicità sistemica tra queste classi di composti e un antitumorale convenzionale come le antracicline, potrebbe essere 200 volte inferiore, mentre la loro concentrazione nel plasma, e si presume anche la loro biodisponibilità, a dosi utilizzate nella terapia potrebbe essere persino 2500 volte superiore.

1.5 **Altre molecole chelanti ioni Fe^{3+} .**

Il meccanismo d'azione della ciclopiroxolamina come agente antifungino, non è completamente spiegato, ma, come detto sopra, pare sia correlato alla sua abilità di legare il ferro intracellulare. Per altri composti chelanti del ferro è stata riportata in precedenza l'induzione della morte cellulare attraverso l'inibizione di enzimi dipendenti dal ferro come la ribonucleotide riduttasi.⁴⁰

L'effetto chelante è stato riportato per linee cellulari di leucemia, leucemia mieloide acuta³³ e neuroblastoma.²⁹

Dopo aver individuato nella CPX un ottimo candidato per la terapia del neuroblastoma, è stato fatto un altro piccolo *screening*, condotto su un insieme chimicamente eterogeneo di chelanti del ferro per identificare altre possibili molecole.²⁹ Tra i 16 composti esaminati, quelli che presentavano maggiore attività di inibizione della proliferazione cellulare sono risultati la deferoxamina, il deferasirox, il piroctone olamina, la 8-idrossichinolina, il deferiprone, la omadina, la o-fenantrolina ed il ferricromo esente da ferro (Fig. 1.4).

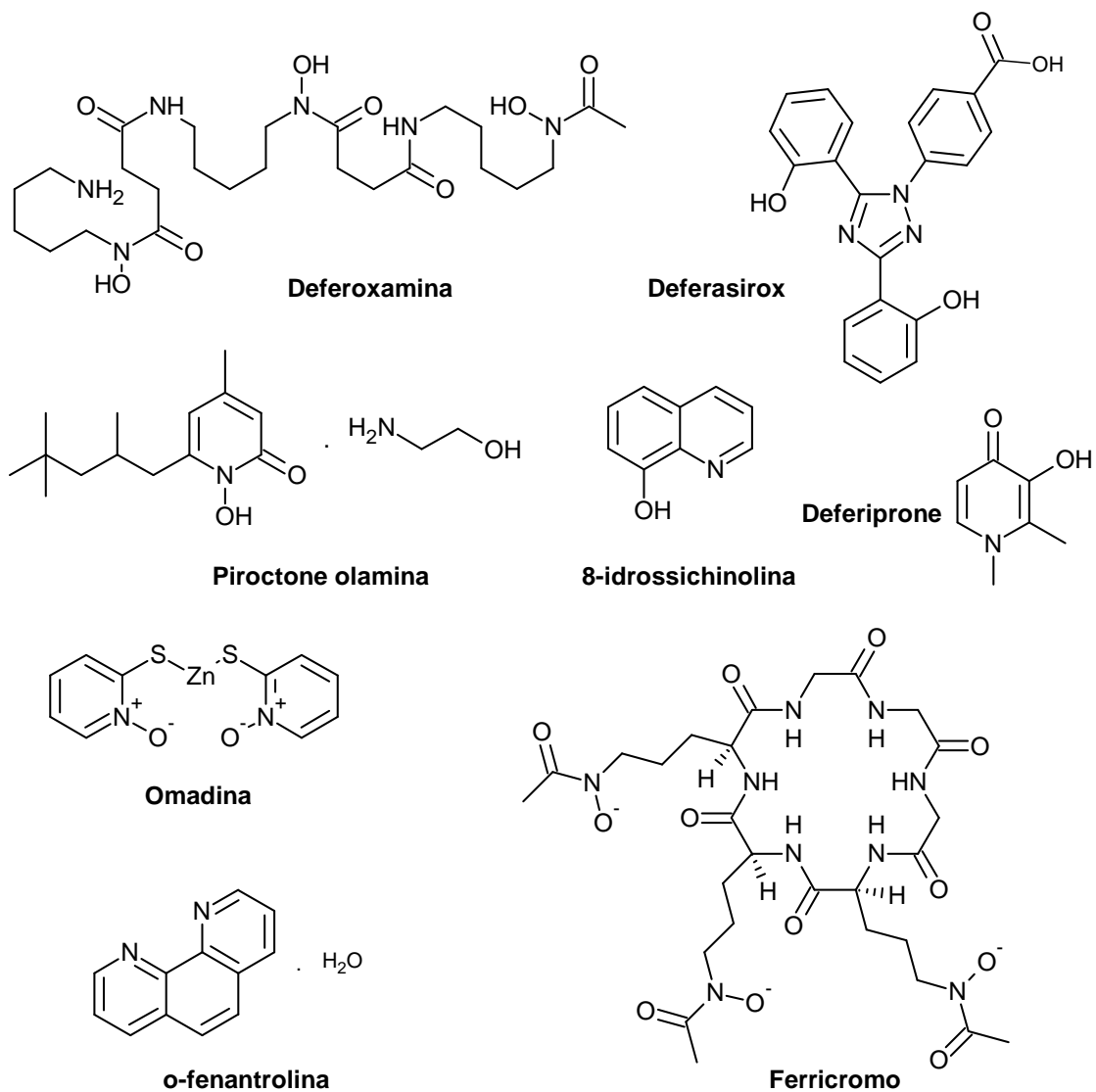


Figura 1.4: Altri chelanti del ferro attivi sul neuroblastoma.

Tra i risultati è emerso che CPX e piroctone dimostrano i migliori effetti sia nella citotossicità sia nell'abilità di legare il ferro, questo probabilmente causato dal fatto che entrambi i composti condividono una struttura 1-idrossi- α -piridonica. Non si può tuttavia affermare che ci sia una corrispondenza diretta tra l'abilità di chelare il ferro e l'attività citotossica del farmaco,²⁹ e

quindi non è ancora chiaro quali altri meccanismi siano coinvolti nell'induzione della morte cellulare da parte di queste molecole chelanti.

2 Discussione dei risultati.

2.1 *Scopo della tesi.*

L'obiettivo di questo lavoro di Tesi di laurea, seguendo un approccio di tipo SAR (Structure Activity Relationship) è stato quello di sintetizzare alcune nuove molecole strutturalmente simili alla ciclopiroxolamina (CPX) per poi studiarne l'attività citotossica su linee cellulari di neuroblastoma e contribuire a comprendere il meccanismo d'azione di questa famiglia di composti.

Come già descritto nell'introduzione (v. Paragrafo 1.4), la CPX appartiene alla classe degli 1-idrossi-piridoni e il nostro scopo è stato quello di individuare dei possibili procedimenti per la sintesi e caratterizzazione di alcuni analoghi strutturali. Nella pianificazione e progettazione degli analoghi, si è dunque tenuto come scaffold di base, comune a tutti i composti da noi presi in esame, quello dell'1-idrossi- α -piridone che si suppone essere coinvolto nella chelazione degli ioni Fe^{3+} (v. Paragrafo 1.5).

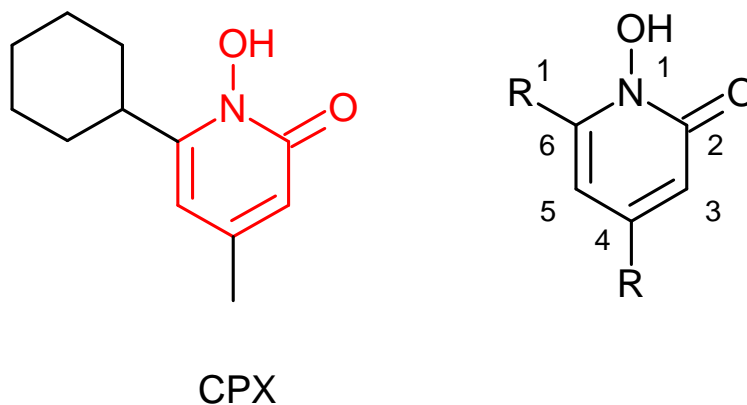


Figura 1.5: Scheletro dell'1-idrossi- α -piridone nella molecola di CPX.

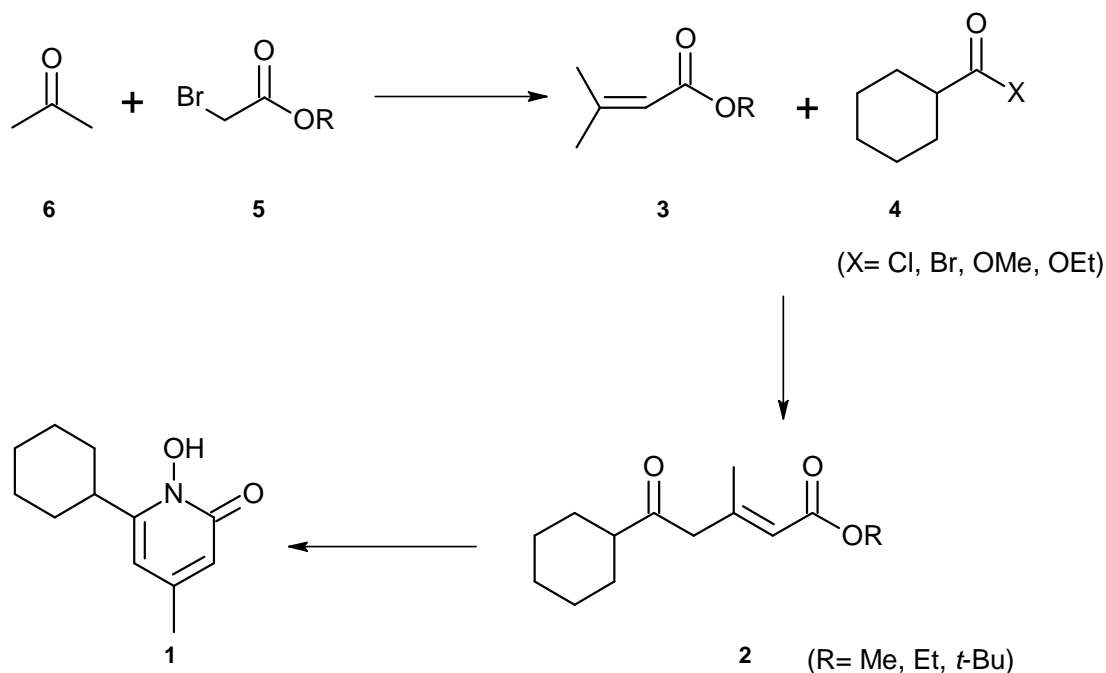
L'idea iniziale è stata quella di cambiare i sostituenti nelle posizioni 4 e 6 dell'anello piridonico perché ritenuti più facilmente accessibili sinteticamente (vedi paragrafo 2.2) e per meglio paragonarli alla molecola già esistente. Lo scopo è ovviamente quello di verificare se la variazione dei sostituenti sull'anello possa modificare, in maniera favorevole o no, la capacità di queste molecole di legarsi al metallo e di entrare all'interno delle cellule tumorali portandole alla morte.

In un primo tempo si è quindi pianificata la sintesi di derivati della CPX con sostituenti sulla posizione 6 dell'anello caratterizzati da un diverso grado di ingombro sterico, diversa lipofilità e diverse caratteristiche elettroniche rispetto al sostituito cicloesilico di partenza. Prima di esaminare in dettaglio i risultati ottenuti nella sintesi di vari analoghi della CPX, riteniamo opportuno riassumere brevemente quanto già noto in letteratura sulla preparazione di 1-idrossipiridoni.

2.2 Stato dell'arte sulla sintesi di 1-idrossi- α -piridoni.

Le procedure sintetiche atte alla preparazione di 1-idrossipiridoni sono limitate e sono generalmente descritte in articoli e brevetti datati.^{42, 47}

Molti brevetti per la sintesi della ciclopiroxolamina riportano una strategia in tre stadi illustrata nello Schema 2.1.⁴¹

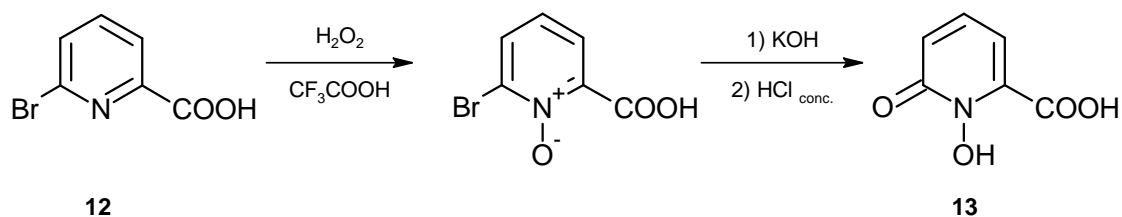


Schema 2.1: Sintesi brevettata di CPX.

La formazione dell'anello piridonico, che termina questa serie di reazioni portando al prodotto finale **1** è ottenibile tramite addizione di idrossilammina o di un suo sale (cloridrato, bromidrato o solfato) al δ -cheto-estere- α,β -insaturo **2** che porta alla relativa chiusura intramolecolare. Il prodotto **2** è a sua volta il risultato di una reazione tra l'estere metilico, etilico o *t*-butilico insaturo **3** e il composto **4** proveniente dall'acido cicloesilcarbossilico (come ad esempio cloruro, bromuro o estere). L'estere **3** infine è il prodotto della reazione tra l'estere 2-bromopropionico **5** e acetone **6**. Tuttavia, tali brevetti non forniscono purtroppo procedure dettagliate delle reazioni coinvolte nella preparazione della CPX.

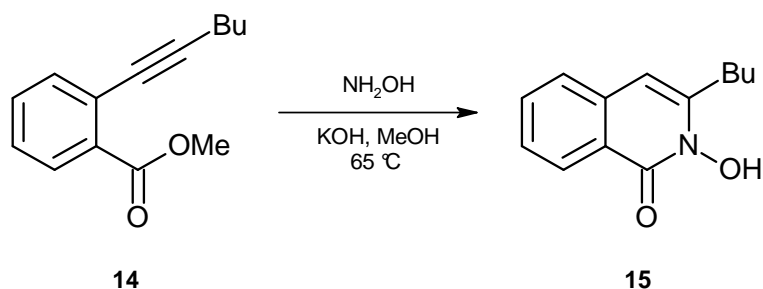
La reazione di ciclizzazione operata da idrossilammina o da un suo sale permette di ottenere selettivamente 1-idrossi-2-piridoni sfruttando la ciclizzazione di δ -cheto-esteri- α,β -insaturi ma anche β,γ -insaturi di formula generale **7**, a temperature non troppo elevate (Schema 2.2).⁴²

seguito dal trattamento con KOH per ottenere il prodotto finale **13** (Schema 2.4).⁴⁴



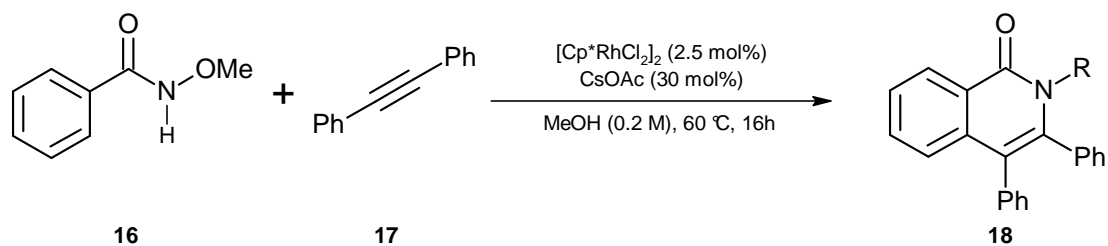
Schema 2.4.

Nel caso di esteri aromatici contenenti anche una funzionalità alchilica come **14** è possibile ottenere il prodotto di ciclizzazione atteso **15** semplicemente trattando con idrossilammina e KOH in metanolo e mantenendo la temperatura a 65°C (Schema 2.5).⁴⁵



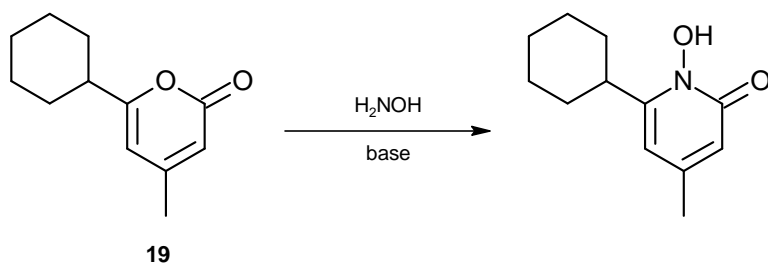
Schema 2.5.

Un altro modo, riportato in letteratura,⁴⁶ per ottenere 1-idrossi-piridoni, è quello di sottoporre ad una reazione di cicloaddizione tipo etero Diels-Alder, le *N*-metossiarilammidi tipo **16** e gli alchini tipo **17**. In presenza di un catalizzatore di rodio, la reazione conduce all'ottenimento dei piridoni desiderati **18** (Schema 2.6).



Schema 2.6.

Una strategia alternativa, riportata in alcuni brevetti, prevede l'ottenimento dell'1-idrossi- α -piridone passando inizialmente dalla sintesi del corrispondente lattone **19**. Tale lattone viene quindi trattato con idrossilammina o un suo sale, in presenza di una base organica come 2-, 3- o 4-amminopiridina o imidazolo. Tale procedura permette la trasformazione del lattone nel prodotto atteso con rese che variano dal 3 al 50% a seconda della base utilizzata (Schema 2.7).^{47, 48}



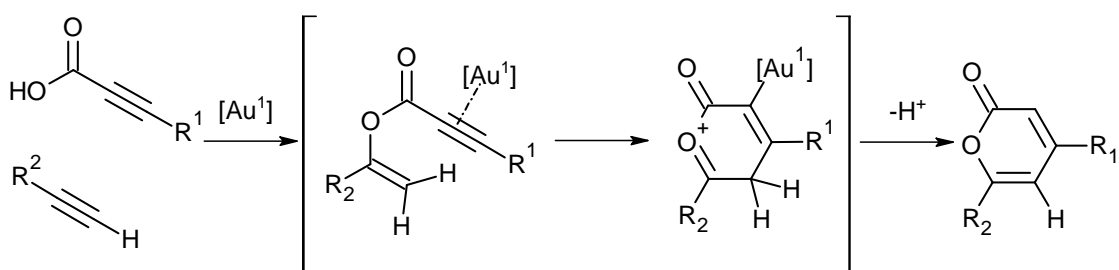
Schema 2.7.

2.3 Le strategie sintetiche. Sintesi di 1-idrossi- α -piridoni-4,6-sostituiti via lattoni.

La prima strategia di sintesi che è stata da noi presa in considerazione è stata quella appena mostrata nello Schema 2.7, ovvero la reazione di ammonolisi su lattoni sostituiti. Per ottenere la formazione dei lattoni precursori abbiamo deciso di utilizzare quella che sembrava la semplice e rapida reazione di

cicloaddizione tra l'acido 2,3-alchinoico e un alchino terminale catalizzata da un complesso organometallico, il cloro(trifenilfosfina)oro(I).⁴⁹

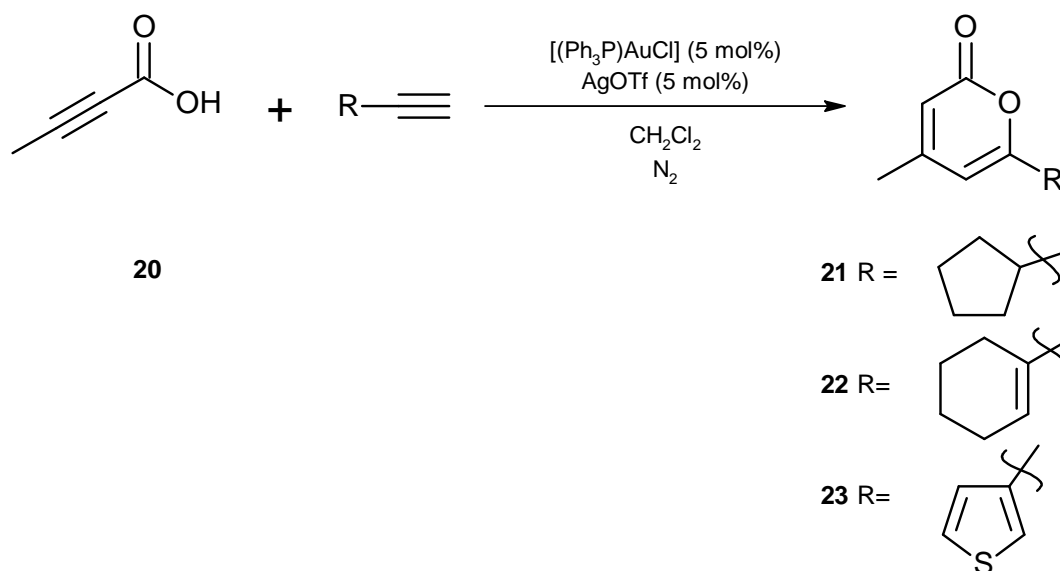
Il complesso organometallico è infatti in grado secondo quanto riportato in letteratura,⁴⁹ di attivare la eterociclizzazione 6-*endo* tra l'acido 2,3-alchinoico e una serie di alchini terminali portando alla formazione selettiva di prodotti 6-sostituiti passando attraverso lo ione ossocarbenio come intermedio di reazione, con successiva eliminazione di un atomo di idrogeno che porta alla formazione di 2*H*-piran-2-oni secondo il meccanismo ipotizzato e riportato nello schema 2.8.



Schema 2.8: Ipotesi di meccanismo della reazione di cicloaddizione oro-catalizzata.

Nel lavoro di riferimento vengono riportate, con buone rese, le sintesi di α -pironi contenenti prevalentemente un sostituito fenilico sulla posizione 4 dell'anello e molti tipi diversi di sostituenti sia alifatici che aromatici nella posizione 6 dello stesso. Si è quindi scelta questa reazione pensando che avrebbe potuto funzionare anche utilizzando come prodotti di partenza l'acido 2-butinoico **20**, prodotto commercialmente disponibile, e alcuni alchini terminali (**21**, **22**, **23**) per portare velocemente alla formazione di α -pironi contenenti un gruppo metilico sulla posizione 4 dell'anello variando al contempo i sostituenti sulla posizione 6 (Schema 2.9).

I gruppi prescelti per lo studio iniziale sono stati metile, isopropile, 1-etil-pentile e fenile, mantenendo il sostituente metile nella posizione 3 dell'anello come in CPX. Inoltre si è pianificata anche la sintesi dell'analogo contenente un gruppo fenilico nella posizione 6 e una catena lineare a quattro atomi di carbonio in posizione 4.



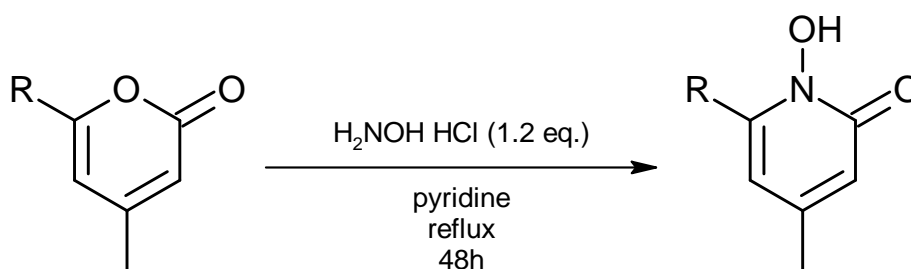
Schema 2.9.

La reazione seguente sarebbe stata la conversione del pirone a 1-idrossi- α -piridone tramite sostituzione dell'atomo di ossigeno all'interno del ciclo con quello di azoto proveniente dall'idrossilammina (vedi schema 2.7). In questo modo sarebbe stato possibile ottenere composti strutturalmente analoghi alla CPX semplicemente in due passaggi.

La prima reazione da noi effettuata è stata la sintesi del 6-ciclopentil-4-metil-2*H*-piran-2-one **21**. La reazione ha richiesto innanzitutto una modifica della procedura. Nell'articolo di riferimento, tutte le operazioni sono effettuate all'aria, mentre le reazioni da noi ripetute in condizioni simili non hanno

portato alla formazione di alcun prodotto. Si è quindi deciso di effettuare la reazione sotto atmosfera inerte di azoto, ottenendo in effetti il prodotto desiderato con rese del 41% dopo purificazione cromatografica.

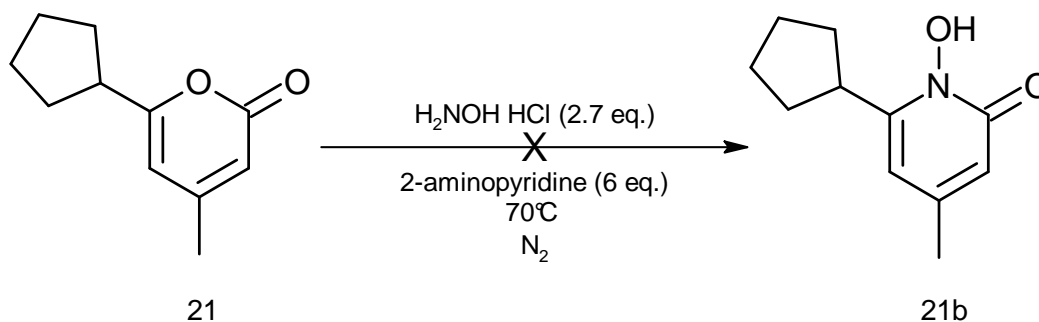
La reazione seguente prevede la conversione del lattone in idrossipiridone tramite ammonolisi con idrossilammina in piridina (Schema 2.10).⁵⁰



Schema 2.10: Ammonolisi con piridina.

I tentativi da noi fatti per effettuare la reazione, anche lavorando con tempi lunghi (48h) e temperature elevate (120 °C), non hanno però portato ad alcuna conversione.

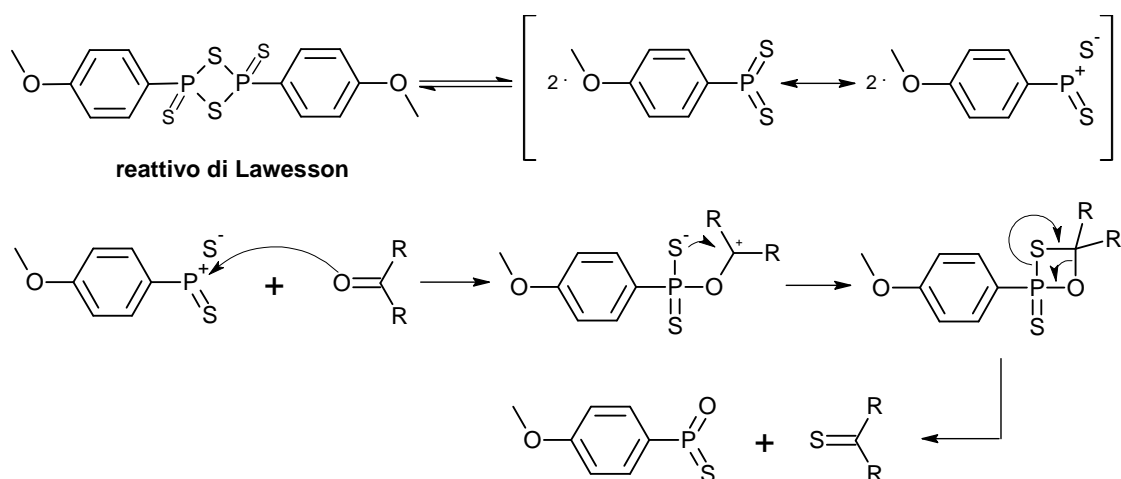
Si è deciso quindi di cambiare le condizioni della reazione di ammonolisi seguendo una procedura diversa⁵¹ che utilizza ancora il cloridrato di idrossilammina e la 2-amminopiridina come base, in atmosfera inerte e a 70 °C (Schema 2.11). Nonostante fossero state eseguite piccole aggiunte di idrossilammina, 0.3 equivalenti dopo 3, 5 e 72h, come descritto nella procedura, non è stata ottenuta alcuna conversione nel prodotto sperato.



Schema 2.11: Ammonolisi con 2-amminopiridina del composto 21 per ottenere l'idrossipiridone 21b.

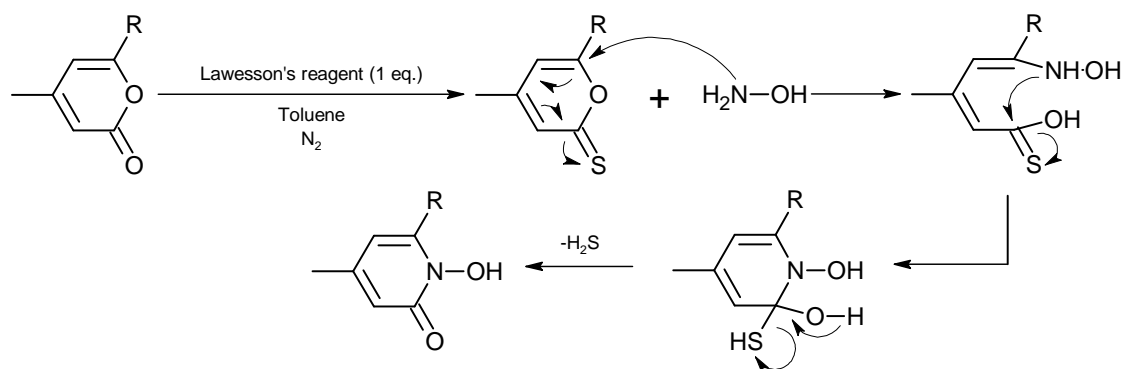
Poiché la reazione di ammonolisi di **21** risultava essere particolarmente lenta nelle prove da noi effettuate sui substrati desiderati, si è pensato di convertire il lattone in tiolattone per rendere il composto più facilmente attaccabile dall'idrossilammina e aumentare così le rese di conversione. Come è noto dalla letteratura⁵² infatti, la sostituzione dell'atomo di ossigeno carbonilico del lattone con un atomo di zolfo, rende il corrispettivo carbonio più reattivo all'attacco nucleofilo, condizione ideale, questa, per meglio favorire la reazione con l'idrossilammina.

La trasformazione del lattone in tiolattone può essere fatta utilizzando il reattivo di Lawesson, una molecola dimera aromatica che permette appunto di sostituire l'atomo di ossigeno carbonilico dei lattoni con un atomo di zolfo secondo il meccanismo riportato nello Schema 2.12.⁵³ Il reattivo di Lawesson in soluzione è in equilibrio con un ilide di ditiofosfina molto più reattiva che, reagendo con un carbonile, forma un intermedio di tiaossafosfetano. Il doppio legame fosforo-ossigeno che si forma è molto stabile e ciò permette una cicloversione che ricorda, in parte, il meccanismo della reazione di Wittig.⁵⁴



Schema 2.12: Reattivo di Lawesson e suo meccanismo d'azione.

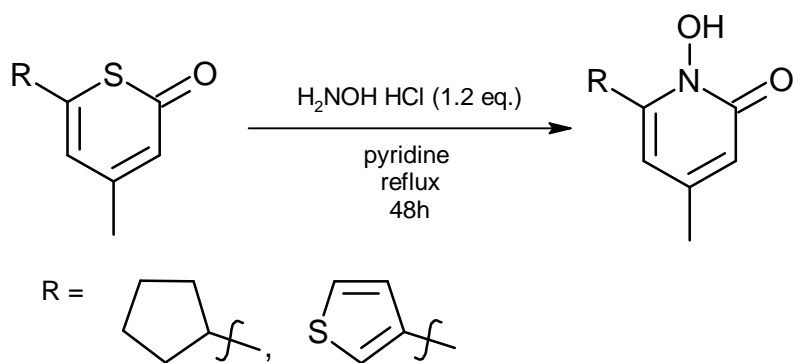
Il nostro piano sintetico alternativo è illustrato nello Schema 2.13. Alla trasformazione in tiolattone dovrebbe, come già detto sopra, seguire l'ammonolisi in condizioni analoghe a quelle già descritte precedentemente.



Schema 2.13. Conversione in tiolattone e attacco da parte di idrossilammina.

Tuttavia, nonostante la reazione di trasformazione da lattone a tiolattone sia stata tenuta sotto agitazione per 72h, l'analisi del grezzo di reazione ha mostrato principalmente prodotto di partenza. L'attivazione del processo tramite irraggiamento con le microonde (temperatura 105 °C, potenza 600W

per 2 ore) ha permesso di isolare il prodotto solforato con una resa del 56%. Il composto è stato quindi sottoposto a reazione con idrossilammina in piridina a riflusso (vedi schema 2.14) ma, purtroppo neanche in questo caso, è stato isolato il prodotto di ammonolisi atteso.



Schema 2.14.

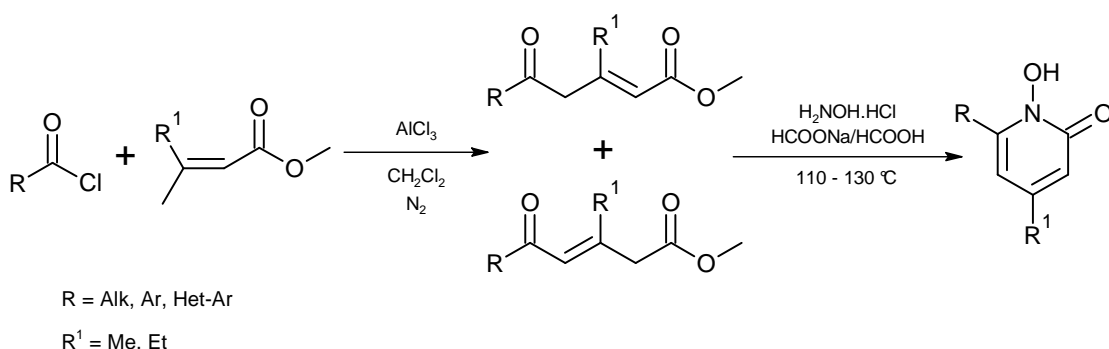
Successivamente ci siamo impegnati nella sintesi del 6-(cicloes-1-en-1-il)-1-idrossi-4-metilpiridin-2(1*H*)-one **22**. La reazione è stata condotta nelle stesse condizioni sperimentali usate per la sintesi del composto **21**, ottenendo il prodotto voluto **22** con rese isolate del 53%. Tuttavia, in questo caso la successiva reazione di tiolazione col reattivo di Lawesson non ha portato alla conversione del prodotto di partenza, che è rimasto praticamente inalterato.

Si è tentata anche la sintesi dell'1-idrossi-4-metil-6-(tiofen-3-il)piridin-2(1*H*)-one **23**. Le reazioni sono state ripetute come nei casi descritti sopra, attuando la reazione di formazione del lattone e successivamente la reazione di tiolazione e si è effettivamente ottenuto il tiolattone, sebbene con bassa resa (18%) dopo isolamento e purificazione. Il prodotto solforato sottoposto ad ammonolisi con idrossilammina a riflusso in piridina per due giorni (vedi Schema 2.14), non ha però dato alcuna conversione nell'idrossipiridone finale.

2.4 Le strategie sintetiche. Sintesi di α -piridoni-4,6-sostituiti via γ -chetoesteri- α,β -insaturi.

Visti i deludenti risultati della prima via sintetica, abbiamo deciso di cambiare radicalmente strategia, scegliendo di passare attraverso la preparazione intermedia dei γ -chetoesteri- α,β -insaturi⁵⁵ per operare poi la successiva ciclizzazione con idrossilammina cloridrato (vedi schema 2.2).^{48,51}

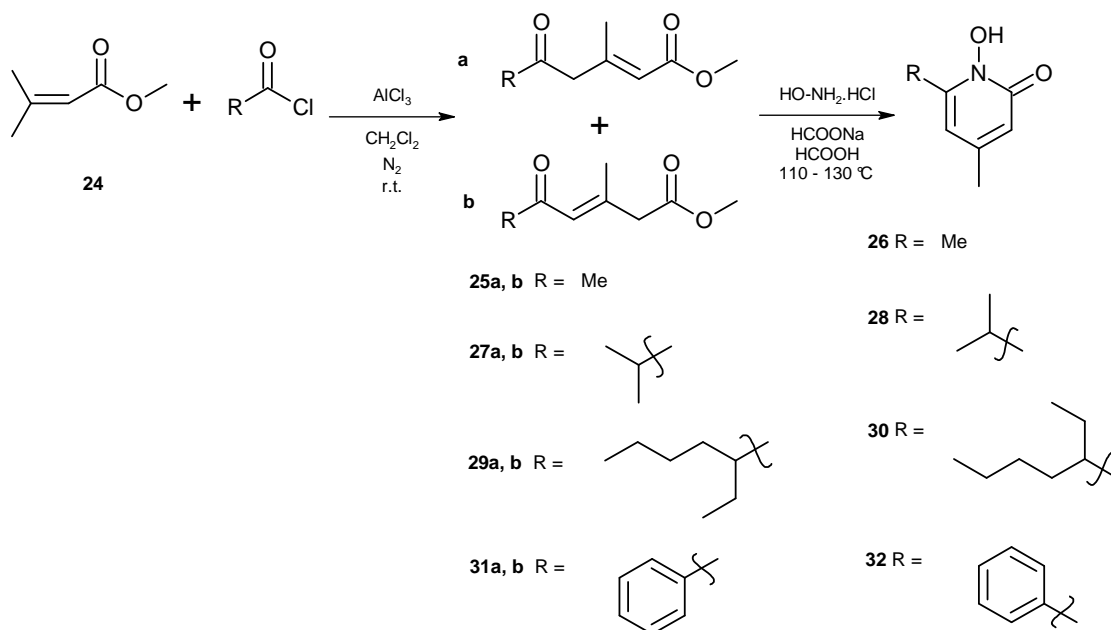
In letteratura è riportata la sintesi di γ -chetoesteri- α,β -insaturi sostituiti principalmente nelle posizioni 3 e 5 della catena (Schema 2.15).⁵⁵ In particolare gli esempi riportati mostrano un gruppo metilico alla posizione 3, mentre alla posizione 5 vengono riportati esempi con gruppi di differente natura (alchilici, aromatici ed etero aromatici). Tali esteri possono essere utilizzati per la successiva formazione dell'anello piridonico che è riportata avvenire per un gran numero di esteri variamente sostituiti.



Schema 2.15.

Un altro motivo per cui è stata scelta questa strada è la sua facilità di esecuzione: il processo consiste in una reazione tipo Friedel-Craft tra un estere acrilico e un cloruro acilico, sia alifatico che aromatico, che porta alla formazione della coppia isomerica dei due esteri α,β - e β,γ -insaturi. Se entrambi gli isomeri vengono messi in una soluzione tampone di

HCOONa/HCOOH contenente idrossilammina cloridrato a 110°C e poi l'acido formico viene evaporato, si ottiene alla fine un composto solido che, dopo purificazione, porta al prodotto desiderato (Schema 2.16).



Schema 2.16: Nuova strategia sintetica per la sintesi di idrossi-piridoni.

Le buone rese riportate in letteratura^{51,55} per entrambe le reazioni, ci hanno incoraggiato ulteriormente nella sperimentazione di queste procedure.

Per ottenere i composti di nostro interesse, ci siamo serviti del 3,3-dimetilacrilato di metile **24**, prodotto commercialmente disponibile a basso costo, come composto di partenza, che è stato fatto reagire secondo le condizioni di Friedel-Craft con alcuni cloruri acilici, normalmente preparati di fresco dai corrispondenti acidi per reazione con ossalil cloruro e DMF.⁵⁶ In questo modo è stato possibile sintetizzare ed isolare alcuni esteri aventi in posizione 3 un raggruppamento metilico che in seguito a ciclizzazione diverrà il metile sulla posizione 4 dell'anello piridonico; invece, in posizione 5 della catena, oltre alla funzionalità chetonica, si trovano i sostituenti che, con la

formazione dell'anello, diverranno i sostituenti in posizione 6 sull'anello idrossipiridonico.

2.4.1 Sintesi dei γ -chetoesteri- α,β -insaturi (**25**, **27**, **29** e **31**).

La prima reazione che abbiamo deciso di provare è stata la condensazione dell'acrilato **24** con acetil cloruro. Sulla base di quanto detto sopra, l'idea era quella di ottenere un piridone che avesse la struttura base di CPX ma che contenesse due gruppi metilici sulle posizioni 4 e 6 dell'anello.

Le prove sono state eseguite sublimando di fresco l' AlCl_3 e preparando al momento il cloruro acilico da sottoporre a reazione di Friedel-Craft. Il 3,3-dimetilacrilato **24** è stato aggiunto alla miscela di AlCl_3 e cloruro acilico in diclorometano a temperatura ambiente e lasciato reagire per 24h circa. Il prodotto di reazione è stato poi purificato tramite cromatografia flash ottenendo una miscela di isomeri inseparabili con una resa complessiva dell'86%.

Inaspettatamente nella miscela di isomeri il prodotto principale è risultato essere **25c** (Figura 2.1) anziché uno dei due attesi **25a** o **25b**. Sono inconfondibili i segnali dei protoni appartenenti al metilene terminale H_A e H_A' a $\delta=5.11$ e $\delta=5.02$ ppm e i due gruppi metilenici H_B e H_C a $\delta=3.30$ e $\delta=3.14$ ppm tutti quanti risolti in singoletti. Anche se questo sembrerebbe l'isomero meno favorito essendo il meno coniugato, in realtà in questo caso è il prodotto principale come confermato, in effetti, anche da dati di letteratura sebbene, senza spiegazioni al riguardo.⁵⁷

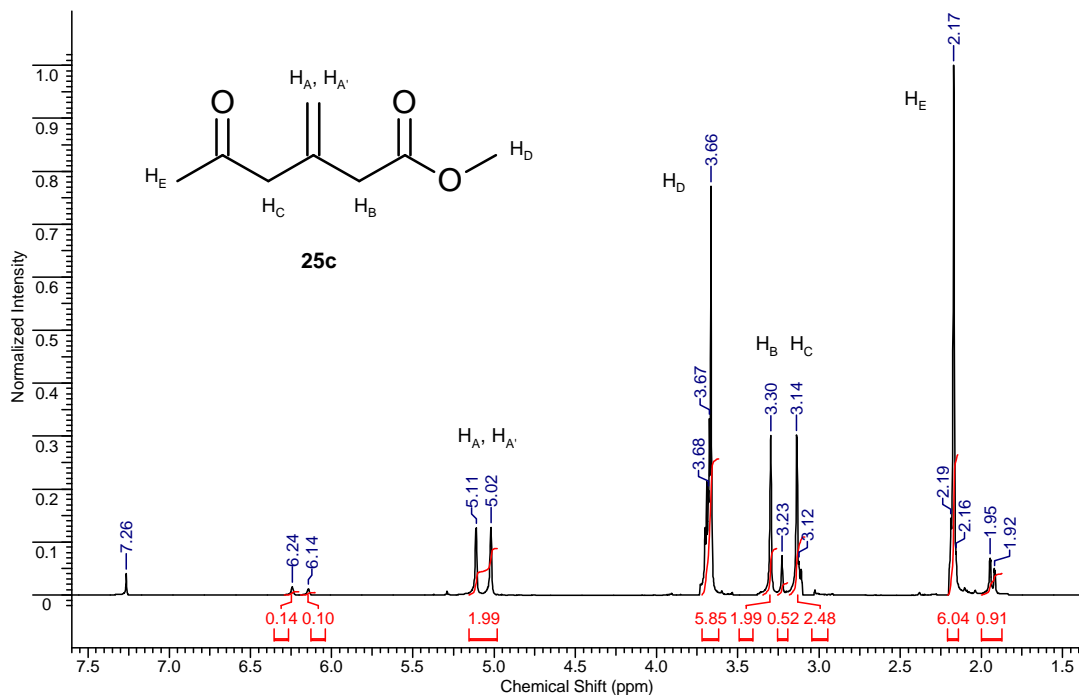


Figura 2.1: Isomero dell'estere meno stabilizzato 25c e il suo spettro $^1\text{H-NMR}$ i cui segnali prevalgono su quelli degli altri isomeri formati.

La stessa procedura è stata usata per la sintesi degli intermedi **27a** e **b** precursori dell'analogo di CPX con un sostituito isopropilico in posizione 6. La reazione tra il dimetilacrilato e il cloruro acilico dell'acido isopropilico (anch'esso preparato con la procedura descritta sopra con ossalil cloruro in CH_2Cl_2) ha condotto anche in questo caso ad un grezzo da cui è stata isolata una miscela di esteri (**27a**, **27b**, **27c**) con una resa complessiva superiore al 60%.

Dunque anche questa reazione ha portato alla formazione dell'estere contenente il doppio legame terminale non coniugato (Figura 2.2), sebbene stavolta in misura equivalente agli altri due isomeri. Sono infatti riconoscibili, ancora una volta, i segnali dei protoni sul doppio legame terminale H_A e $\text{H}_{A'}$ per $\delta=4.96$ e $\delta=4.86$ ppm e i due gruppi metilenici adiacenti allo stesso doppio legame, H_B e H_C , che danno i singoletti a $\delta=3.18$ e $\delta=3.02$ ppm.

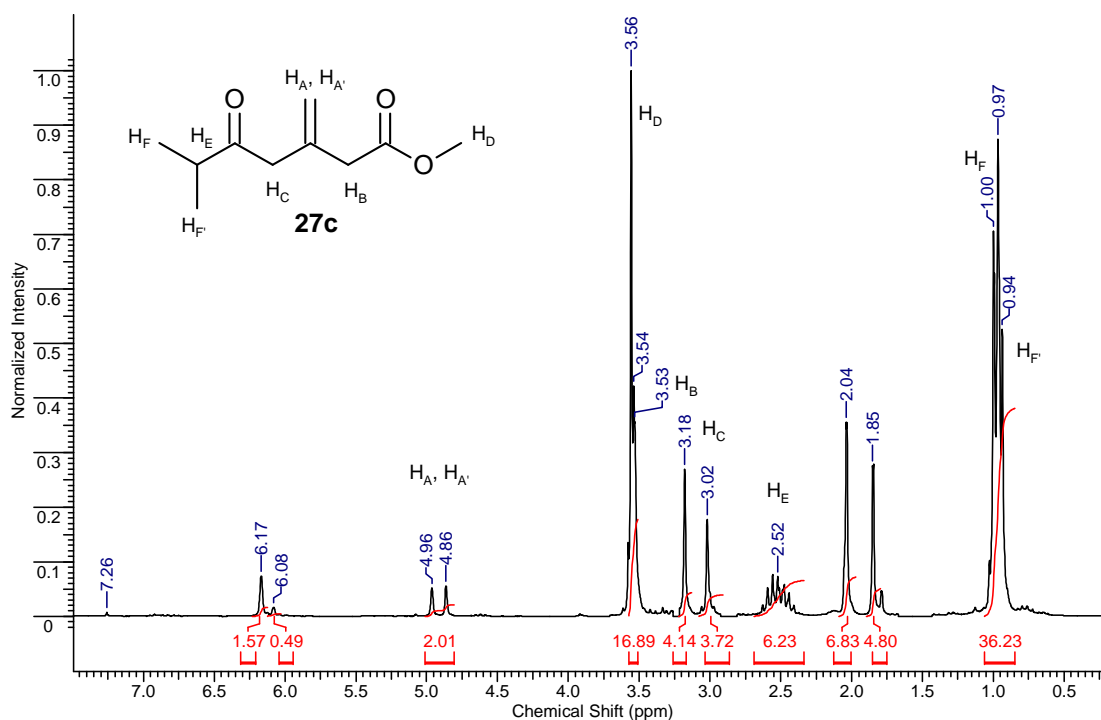


Figura 2.2: Isomero dell'estere 27c e il suo spettro $^1\text{H-NMR}$ insieme agli altri isomeri formati.

Si è successivamente affrontata la preparazione degli esteri **29a** e **b**, intermedi necessari al fine di ottenere un piridone con un sostituente 2-etilesilico sulla posizione 6 dell'anello. La scelta di questo tipo di sostituente è stata guidata dal voler osservare come cambia l'attività della molecola utilizzando un gruppo alchilico a catena ramificata, capace di aumentarne la lipofilità. Questa infatti potrebbe ripercuotersi in una migliore capacità di attraversamento della membrana cellulare e quindi in una maggiore disponibilità intracellulare.

La reazione di alchilazione è stata svolta tra il dimetilacrilato **24** e il cloruro di 2-etilesanoile commercialmente disponibile. In questo caso è stato necessario il riscaldamento a refluxo per 12h per ottenere la miscela di esteri isomerici **29a**

e **b** con una resa del 28% dopo purificazione. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del grezzo di reazione rivela la formazione dell'isomero dell'estere col doppio legame in posizione terminale **29c** come isomero maggioritario, a discapito degli altri due isomeri (Figura 2.3). Si riconoscono infatti anche stavolta i soliti segnali di singoletto dei protoni sul doppio legame terminale H_A e $\text{H}_{A'}$ a $\delta=5.09$ e $\delta=4.98$ ppm e dei gruppi metilenici adiacenti all'insaturazione H_B e H_C a $\delta=3.32$ e $\delta=3.16$ ppm.

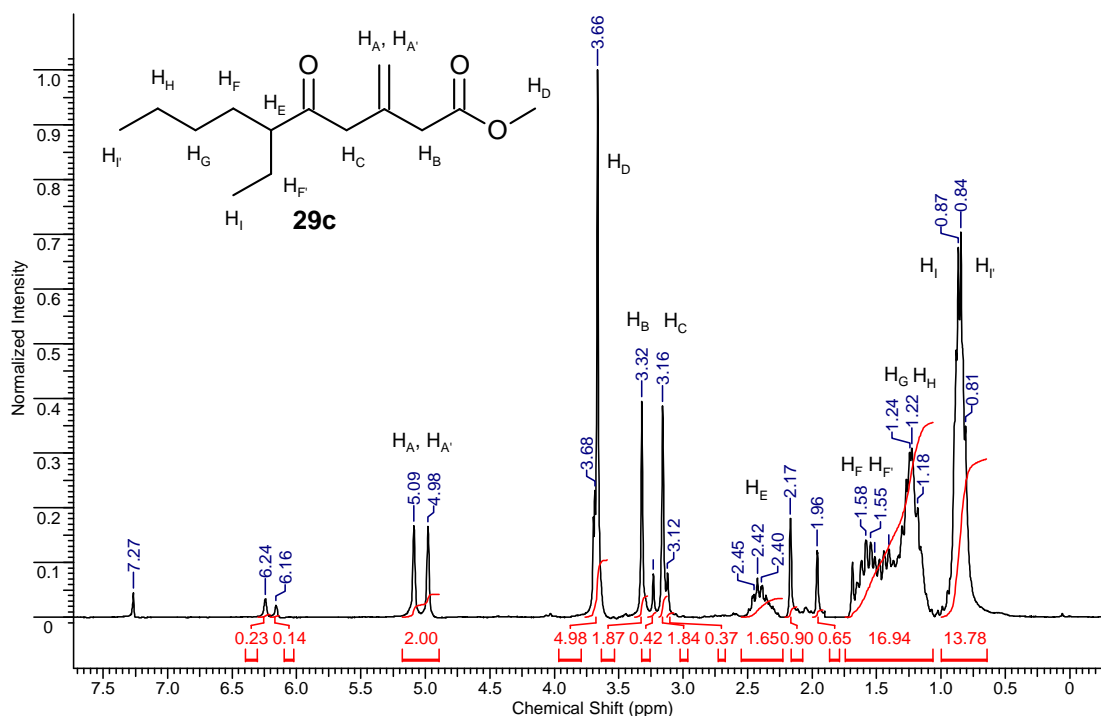


Figura 2.3: Composto 29c e suo spettro $^1\text{H-NMR}$ che evidenzia la concentrazione superiore rispetto agli altri due isomeri.

Infine l'ultimo estere progettato è stato quello precursore dell'analogo del CPX con un sostituito fenilico in posizione 6. Purtroppo però la reazione tra l'estere acrilico **24** e il cloruro di benzoile (preparato con la solita procedura con ossalil cloruro in CH_2Cl_2) non ha offerto le rese sperate in analogia a

quanto esposto sopra. Dopo tre giorni di riscaldamento a riflusso, sono stati ottenuti gli esteri **31** con una resa complessiva del 7%. Ancora una volta si è verificata la formazione di una miscela dei tre esteri isomerici in cui il maggioritario è quello col doppio legame in posizione terminale **31c** (Figura 2.4).

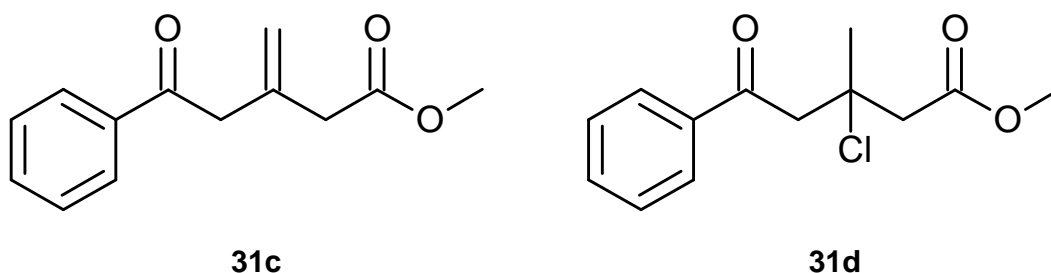


Figura 2.4: Struttura dei composti 31c e 31d.

La bassa resa in esteri è parzialmente spiegata dalla formazione, in questo caso, di altri sottoprodotti. Un'attenta analisi $^1\text{H-NMR}$ del grezzo di reazione, seguita da separazione e purificazione, ha permesso di individuare il prodotto **31d** derivante dall'addizione di HCl sul doppio legame (Figura 2.4) come confermato dall'analisi $^1\text{H-NMR}$ e, soprattutto, GC-MS e ESI-MS. E' possibile che i lunghi tempi di reazione e l'inevitabile presenza di HCl siano i responsabili della formazione di questo sottoprodotto non desiderato.

2.4.2 Sintesi dei piridoni (**26**, **28**, **30** e **32**).

Le miscele degli isomeri dei γ -chetoesteri- α,β -insaturi sono state quindi sottoposte a trattamento con idrossilammina cloridrato in presenza di una miscela di HCOONa/HCOOH, per ottenere così l'idrossipiridone finale. E'

importante sottolineare un aspetto interessante che è stato verificato durante la trasformazione dell'estere **25** al piridone **26**. Come abbiamo evidenziato nel paragrafo precedente, i γ -chetoesteri- α,β -insaturi vengono ottenuti come miscele di isomeri in cui quello non coniugato è generalmente maggioritario. L'estere non coniugato non è teoricamente il precursore del piridone da noi desiderato, però il trattamento con idrossilammina e l'analisi $^1\text{H-NMR}$ della miscela di reazione dopo work-up, mostra la presenza dell'atteso prodotto finale accanto ad una piccola quantità degli esteri coniugati da cui è però assente l'isomero maggioritario **25c**. E' probabile che nelle condizioni basiche dell'ambiente di reazione, **25c** tenda ad isomerizzare verso le due forme coniugate più stabili che successivamente reagiscono con l'idrossilammina portando alla formazione del prodotto di ciclizzazione. Dopo la purificazione è stato possibile ottenere il primo analogo di CPX **26** con una resa del 38% (Figura 2.5).

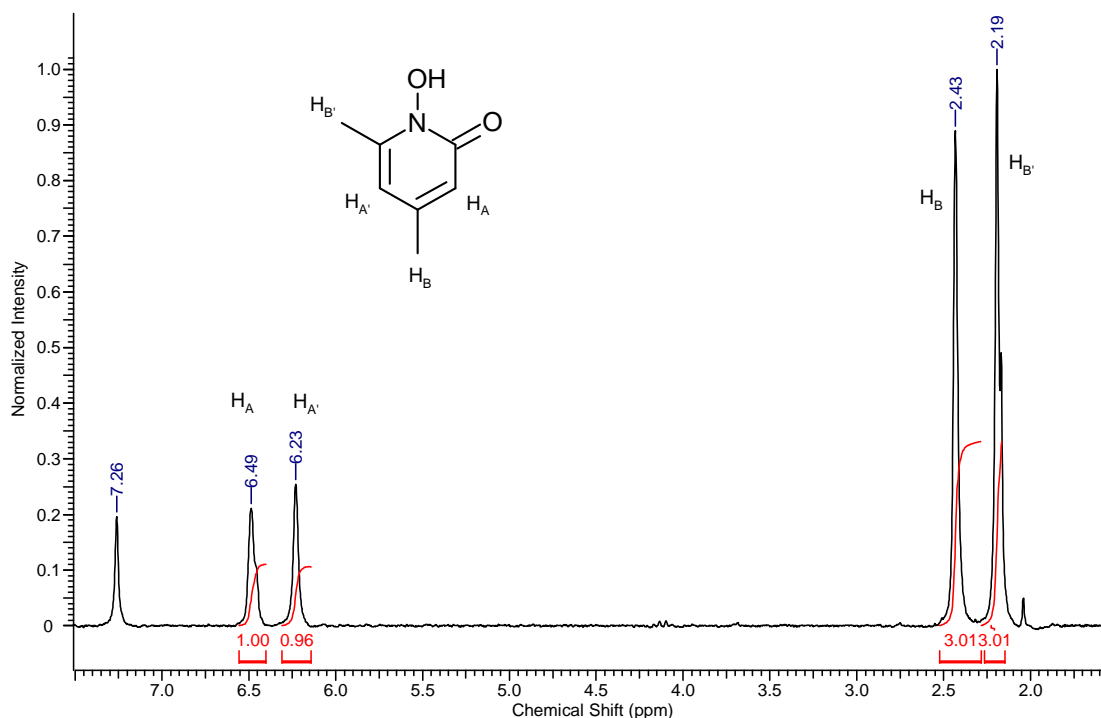


Figura 2.5: Spettro $^1\text{H-NMR}$ del composto **26**.

La stessa procedura è stata utilizzata per la preparazione dell'anello piridonico di **28** a partire dall'estere **27**. La minor reattività degli esteri **27** ha richiesto però tempi di reazione più lunghi e, come riportato in letteratura,⁵⁸ l'aggiunta di KOH in metanolo per favorire la chiusura. Dopo un ulteriore riflusso per 24h, work-up e purificazione cromatografica si è ottenuto l'1-idrossi-4-metil-6-(propan-2-il)piridin-2(1H)-one **28** con una resa del 21% (Figura 2.6).

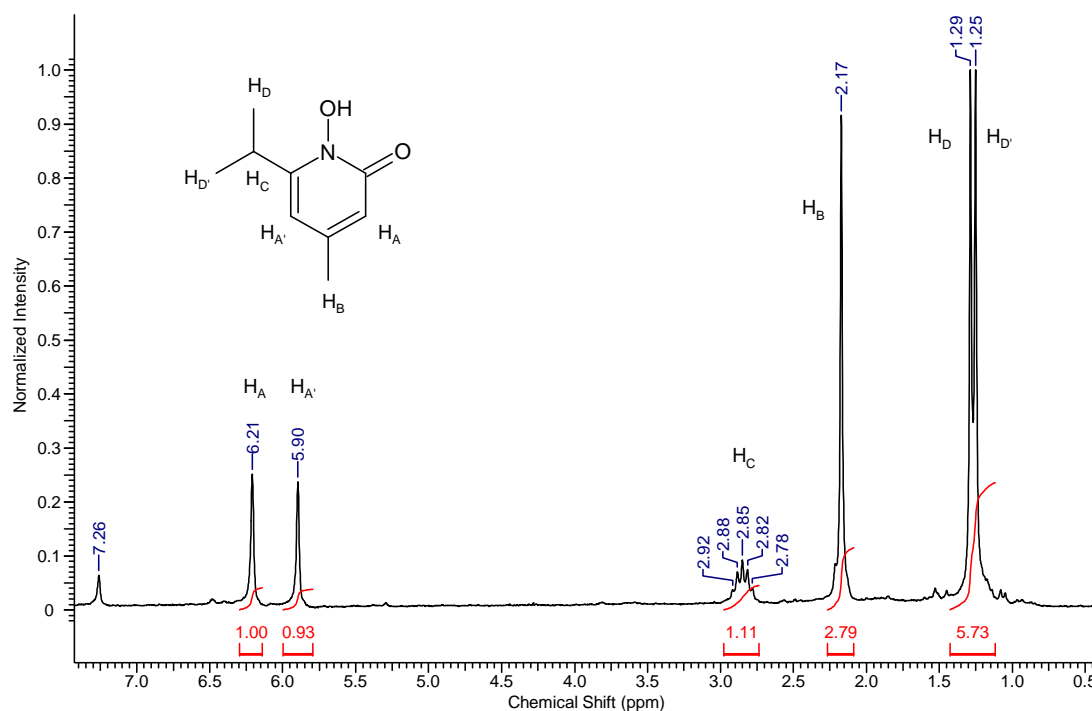


Figura 2.6: Spettri ¹H-NMR del composto 28.

Quando la stessa procedura è stata usata per la preparazione dei piridoni **30** e **32** a partire dagli esteri **29** e **31**, si sono ottenuti decorsi e risultati diversi rispetto ai casi precedenti. In entrambi i casi, dopo riscaldamento prolungato (110°C per 24h) ed evaporazione dell'acido formico, si è notata la formazione delle ossime corrispondenti **30d** e **32d** (Figura 2.7). Per entrambe si è ipotizzato che fosse possibile la trasformazione nel prodotto piridonico finale tramite trattamento basico con KOH in metanolo che, in effetti, avviene per

formare il prodotto **30** sebbene con basse rese (19%) ma non è efficace per la formazione del piridone **32** che non è stato quindi ottenuto per questa via.

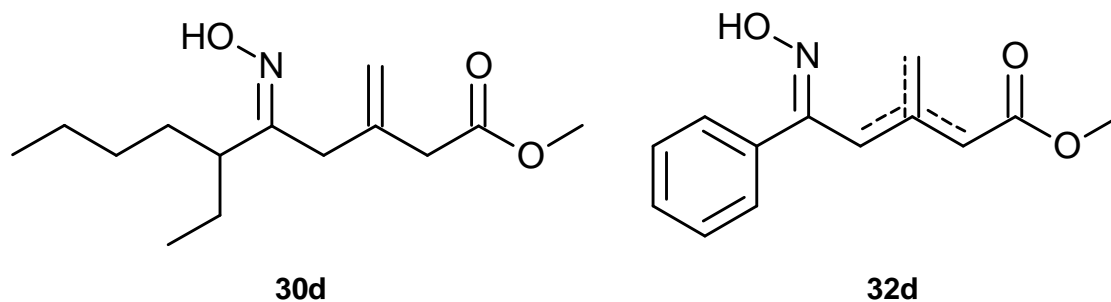


Figura 2.7: Ossime degli esteri di partenza di cui si deve favorire la formazione dell'anello piridonico.

Vista l'impossibilità di accedere, per questa via, a piridoni con un sostituito aromatico, la stessa sequenza di reazioni è stata tentata anche con altri cloruri acilici aromatici aventi caratteristiche elettroniche diverse. Purtroppo però con nessuno dei cloruri acilici indicati in Figura 2.8, si sono ottenuti risultati apprezzabili e utilizzabili per il nostro scopo, anche modificando le temperature di reazione grazie all'uso di un solvente clorurato più altobollente come l'1,1,1-tricloroetano.

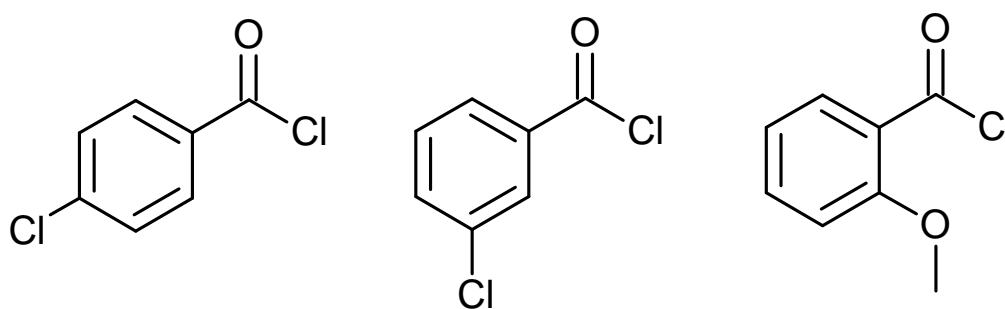


Figura 2.8: Altri cloruri acilici aromatici sui quali è stata provata la procedura.

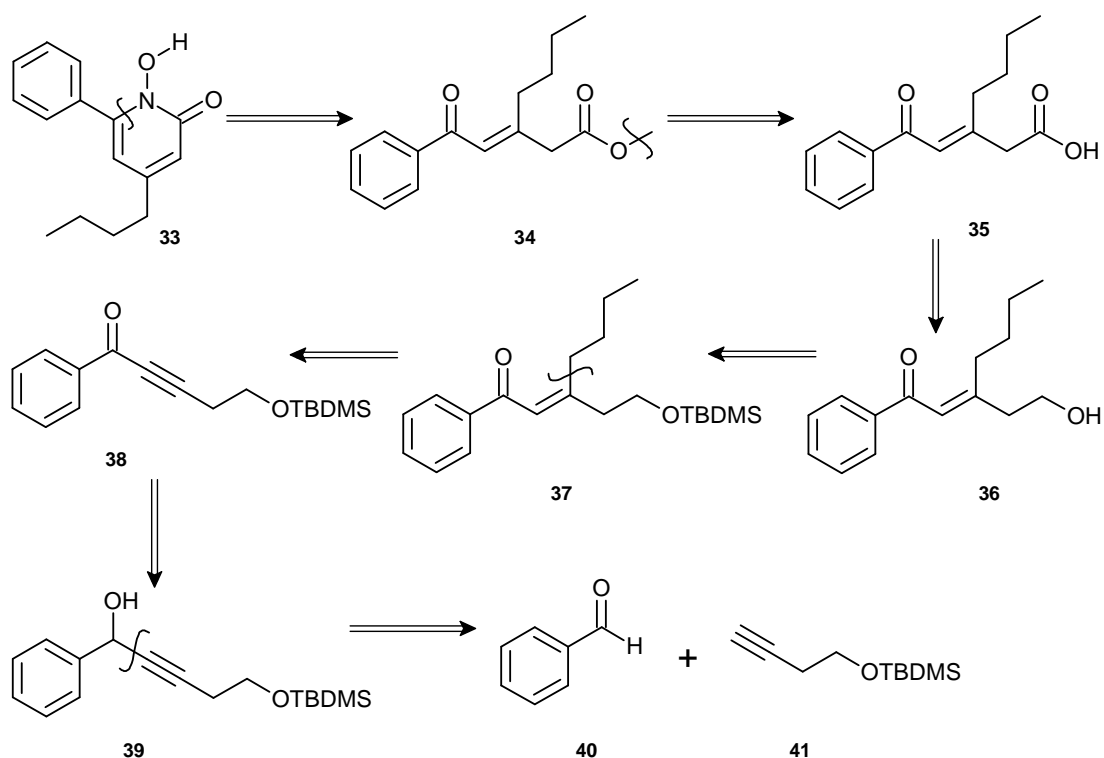
Per questo motivo si è deciso di cambiare nuovamente la strategia di sintesi al fine di ottenere analoghi strutturali della CPX contenenti un sostituito aromatico.

2.5 Sintesi selettiva di γ -chetoesteri- β,γ -insaturi.

Per riuscire a sintetizzare degli analoghi della ciclopiroxolamina che contenessero un sostituito aromatico nella posizione 6 ci siamo visti costretti a cambiare quindi completamente procedura di sintesi tenendo presente che il passaggio da modificare, nella sequenza sopra descritta, è la formazione del γ -chetoestere- α,β -insaturo che dà rese bassissime o addirittura nulle nel caso dei cloruri acilici aromatici.

2.5.1 Retrosintesi.

L'analisi retrosintetica esemplificativa è illustrata per il piridone **33** portante un residuo fenilico in posizione 6 ed una catena alchilica in posizione 4. E' stata ipotizzata una procedura retrosintetica composta da sette stadi (Schema 2.17).

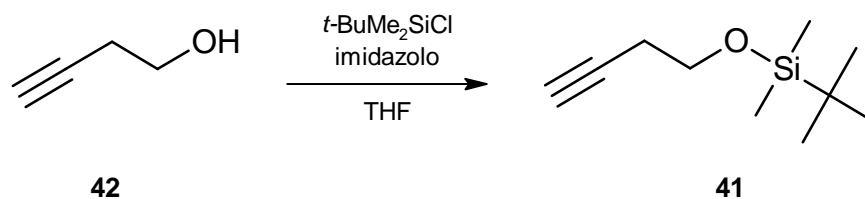


Schema 2.17: Retrosintesi del composto 33.

Secondo lo schema retrosintetico, il composto finale **33** potrebbe essere ottenuto con la stessa reazione di ciclizzazione che abbiamo già ampiamente descritto in precedenza a partire da **34**. L'estere **34** si potrebbe facilmente ottenere per esterificazione del corrispondente acido **35**, prodotto della reazione di ossidazione dell'alcol **36** suo predecessore. L'alcol **36** sarebbe il risultato di una addizione con un cuprato sull'alchinil chetone **38** seguita da deprotezione. Infine **38** verrebbe ottenuto per ossidazione dell'alcol **39** a sua volta accessibile per attacco nucleofilo del metallo derivato del *t*-butildimetilsilossi-1-butino **41** sulla benzaldeide **40**.

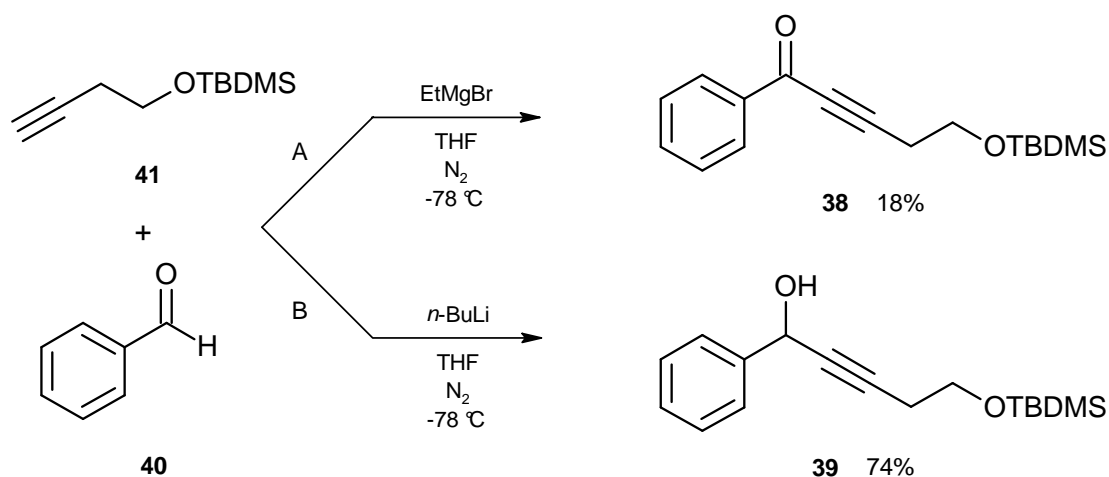
2.5.2 Descrizione della procedura sintetica.

Sulla base dell'analisi retrosintetica sopra illustrata, la prima reazione effettivamente svolta prevista da questa nuova strategia sintetica, è la protezione del gruppo alcolico del composto alchinico **42** disponibile commercialmente. La reazione sfrutta una sostituzione nucleofila da parte del *t*-butil-dimetil-cloro-silano (Schema 2.18).



Schema 2.18: Protezione dell'alcol 42.

La reazione è molto semplice nell'esecuzione e non richiede particolari attenzioni, nel giro di 2-3h è possibile ottenere in maniera praticamente quantitativa il prodotto desiderato **42** senza che si presenti la necessità di particolari purificazioni.⁵⁹ Il passaggio successivo è l'addizione nucleofila dell'alcol protetto **41** alla benzaldeide **40** (Schema 2.19).



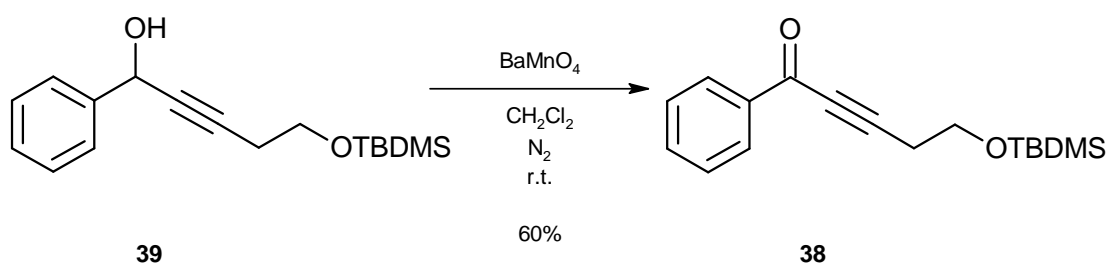
Schema 2.19. Addizione nucleofila alla benzaldeide.

Il primo tentativo di addizione nucleofila è stato effettuato utilizzando il metodo **A**, ovvero tramite trasformazione dell'alchino **41** nel corrispondente reattivo di Grignard per reazione di metallazione effettuata tramite reazione con etilmagnesio bromuro (Schema 2.19).⁶⁰ Le rese di questa reazione sono state però modeste. Inoltre inaspettatamente, il prodotto della reazione non è stato l'alcol propargilico **39** bensì, come evidenziato tramite caratterizzazione spettroscopica accurata, il corrispondente chetone **38**, prodotto di quella che avrebbe dovuto essere la reazione successiva. In seguito a purificazione cromatografica, il chetone è stato ottenuto con una resa del 18%.

Al fine di incrementare le rese di reazione e ottenere il prodotto desiderato più puro, si è deciso di cambiare reattivo organometallico utilizzando *n*-butillitio seguendo il metodo **B**.⁶¹ Con questa procedura, si è potuto ottenere il prodotto finale della reazione con un 74% di resa e senza la comparsa di sottoprodotti sgraditi. In questo caso il prodotto isolato è stato effettivamente l'alcol **39** e non il corrispondente chetone.

Il terzo passaggio della nuova procedura sintetica, prevede l'ossidazione dell'alcol **39** nel corrispondente chetone α,β -insaturo **38**, sul quale sarà poi possibile svolgere l'addizione di tipo 1,4.

Facendo uso di condizioni di reazione riportate in letteratura per un composto simile al nostro (Schema 2.20),⁶⁰ l'alcol **39** è stato ossidato con BaMnO₄ in circa 12h a temperatura ambiente per fornire il chetone desiderato **38** con una resa del 60% dopo purificazione cromatografica. La reazione di ossidazione può essere effettuata anche utilizzando MnO₂ con rese analoghe di chetone.

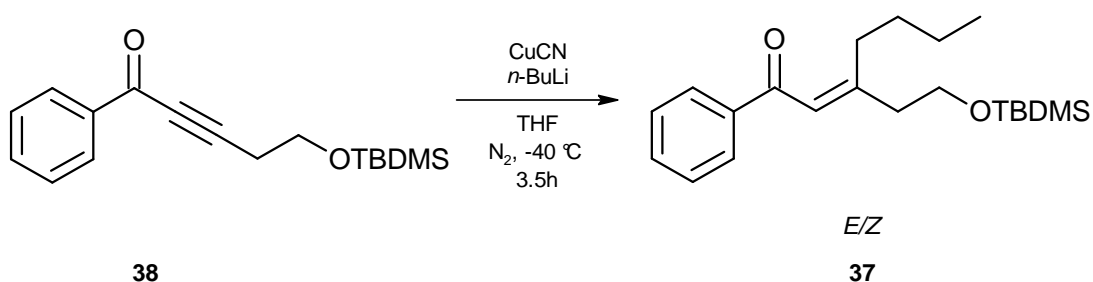


Schema 2.20: Ossidazione dell'alcol 40.

La reazione successiva all'ossidazione è quella che consente la scelta del sostituente che si vuole inserire nella posizione 4 dell'anello piridonico finale.

Questa è una tipica reazione di addizione nucleofila di tipo 1,4 sul chetone alchilico, effettuata tramite formazione *in situ* di un cianocuprato di litio.⁶²

La reazione è stata da noi provata solamente con una catena lineare *n*-butilica proveniente dal reattivo organometallico utilizzato, il *n*-BuLi, ma è ovviamente estendibile ad un qualsiasi altro reattivo di organo litio alchilico (Schema 2.21).



Schema 2.21: Addizione coniugata di tipo 1,4 sul chetone insaturo.

La reazione è altamente regioselettiva se eseguita con un accurato controllo delle condizioni di reazione ed in particolare della temperatura. Il reattivo di organorame deve essere preparato per aggiunta del derivato di organolitio, alla temperatura di -40°C , ad una sospensione di CuCN in THF. Al reattivo generato *in situ* viene poi aggiunto il chetone insaturo alla temperatura di -78°C . L'attenzione maggiore è richiesta nelle 3 ore successive in cui si deve monitorare la reazione affinché la temperatura non salga sopra i -30°C altrimenti avviene la rapida formazione di sottoprodotti che abbassano drasticamente la resa della reazione.

In seguito alla purificazione è possibile ottenere, con una resa del 64%, una miscela *E/Z* dei due isomeri α,β -insaturi non ulteriormente separabili. Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ si notano i protoni metilenici H_A a $\delta=2.84$ e $\delta=2.47$ ppm ad evidenziare la presenza di due isomeri (Figura 2.9). Anche gli altri protoni metilenici adiacenti al doppio legame H_B danno segnali diversi per i due isomeri a $\delta=2.59$ e $\delta=2.35$ ppm. I segnali dei protoni metilenici prossimi all'ossidrile protetto si risolvono in due tripletti sovrapposti così come i protoni vinilici H_D che danno due singoletti molto vicini fra loro.

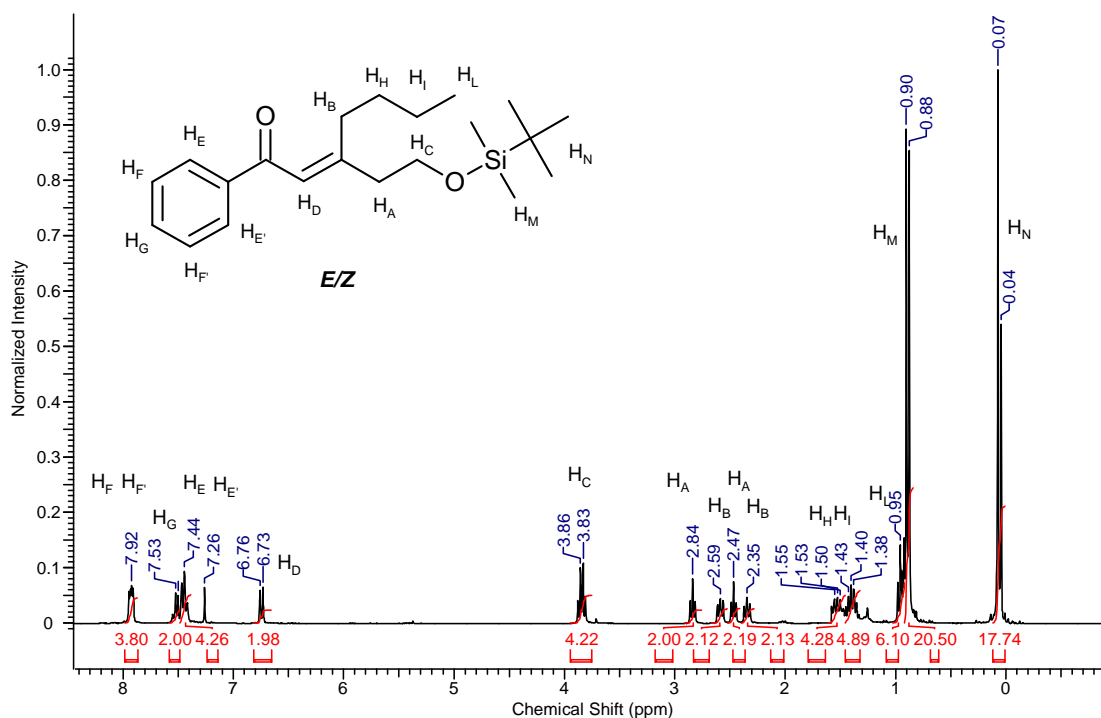
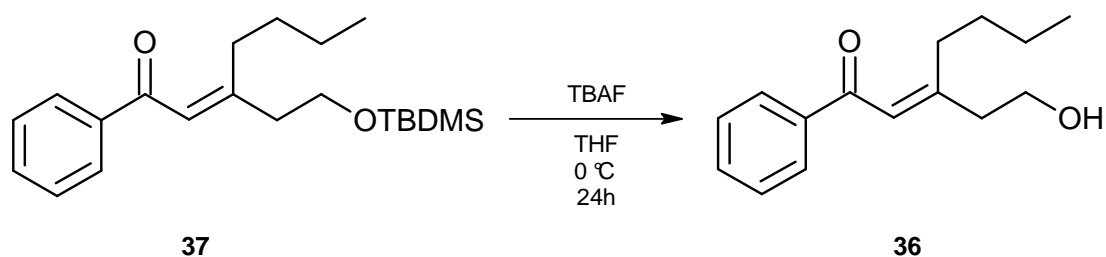


Figura 2.9: Spettro ¹H-NMR dei due isomeri *E/Z* di 37.

La rimozione del gruppo protettore è stata effettuata utilizzando tetrabutylammonio fluoruro in THF, come comunemente riportato in letteratura (Schema 2.22).⁶³

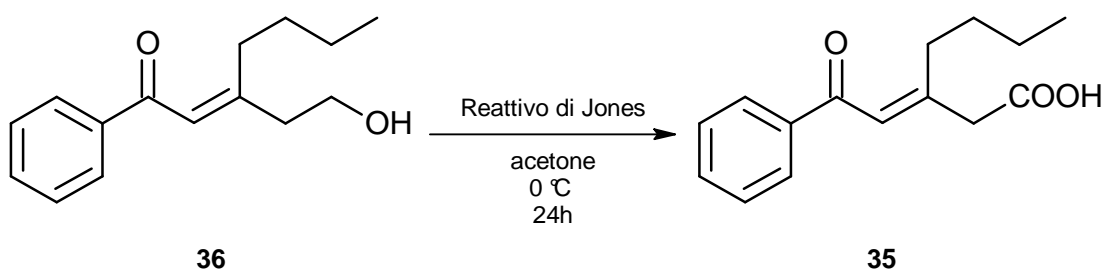


Schema 2.22: Reazione di deprotezione dell'alcol 38.

La reazione è di facile esecuzione, ma necessita un controllo accurato della temperatura poiché l'alcol da deproteggere può facilmente dare eliminazione del gruppo ossidrilico a fornire un sistema ad alta coniugazione.

Dopo purificazione per via cromatografica si ottiene l'alcol **36** con una resa del 43%.

Lo step successivo prevede l'ossidazione dell'alcol **36** al corrispondente acido carbossilico **35** (Schema 2.23).



Schema 2.23: Reazione di ossidazione ad acido 35.

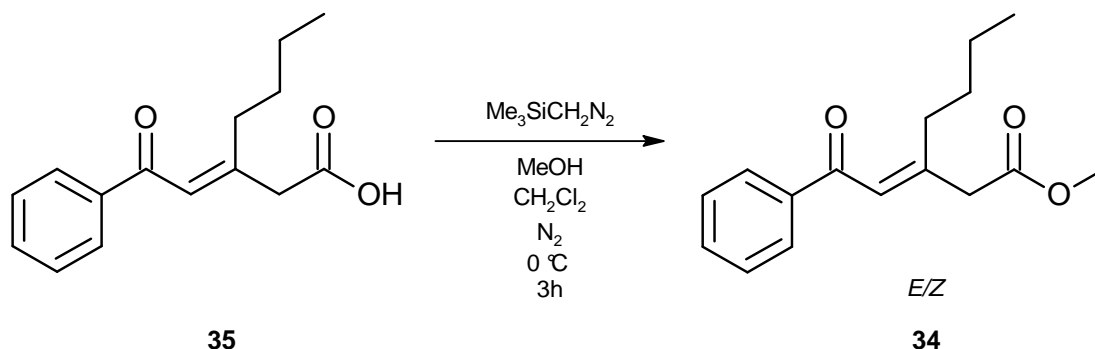
La procedura più utilizzata in letteratura per questo tipo di substrati, fa uso di derivati del cromo e il più comune rimane sempre il reattivo di Jones.⁶⁴

L'ossidazione è stata quindi eseguita con reattivo di Jones, preparato in laboratorio secondo una procedura nota⁶⁵ e ha condotto alla formazione dell'acido carbossilico sebbene con bassa resa (20%) e concomitante formazione di sottoprodotti.

La penultima reazione prevista dalla procedura sintetica è la formazione dell'estere **34** a partire dal corrispettivo acido **35** ottenuto precedentemente.

Per evitare reazioni secondarie, come l'auto condensazione, si è deciso di utilizzare un reattivo capace di svolgere selettivamente e senza troppi rischi la reazione di metilazione dell'acido, il trimetilsilildiazometano in diclorometano

anziché la procedura descritta in precedenza e che fa uso dell'ossalil cloruro (Schema 2.24).⁶⁶



Schema 2.24: Reazione di formazione dell'estere.

La reazione viene condotta a 0°C in un bagno di ghiaccio e dopo 3h porta alla formazione di una miscela dei due esteri desiderati accanto ad altri due isomeri *E/Z* **34a**, provenienti da una migrazione del doppio legame all'interno della catena alifatica (Figura 2.10).

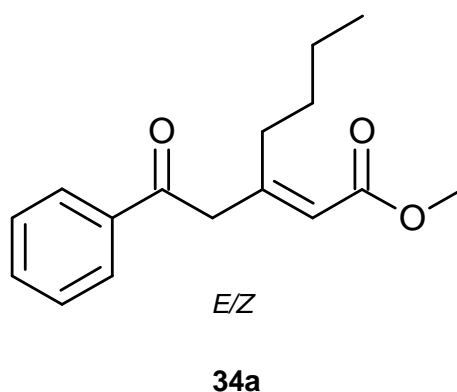


Figura 2.10: Gli altri due isomeri dell'estere 34 formatisi con la reazione.

Questa ipotesi è stata confermata dalla registrazione di uno spettro $^1\text{H-NMR}$ NOESY dove è stato rivelato un effetto di tipo NOE tra il metilene adiacente al chetone e il protone in posizione *orto* dell'anello aromatico (Figura 2.11).

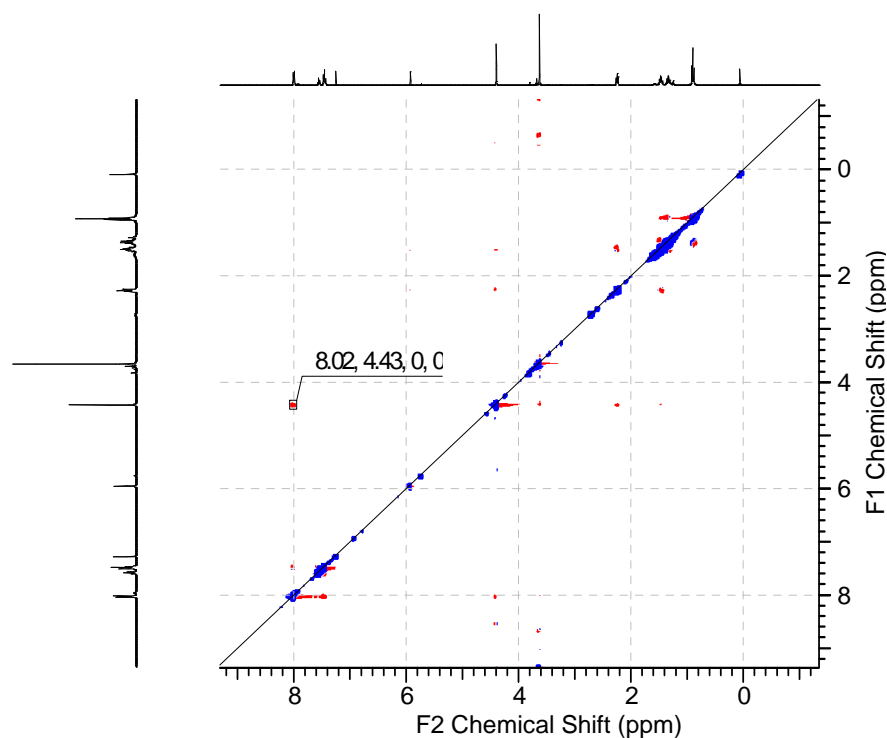


Figura 2.11: Spettro $^1\text{H-NMR}$ con NOESY del composto **34a.**

La procedura utilizzata per la formazione dell'idrossipiridone corrispondente, è la stessa precedentemente utilizzata per la formazione dei composti **26**, **28** e **30** dove viene messa a reagire l'intera miscela di isomeri così formati.

Le miscele degli isomeri dei γ -chetoesteri- α,β e β,γ -insaturi sono state sottoposte a trattamento con idrossilammina cloridrato in presenza di una miscela di $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$, al fine di ottenere l'1-idrossi- α -piridone finale. La bassa reattività degli esteri **34** e **34a**, dopo riscaldamento prolungato (110°C per 24h) ed evaporazione dell'acido formico, ha portato ad una prima formazione delle ossime corrispondenti **33b** (Figura 2.12) e si è visto necessario anche stavolta l'aggiunta di KOH in metanolo per favorire la chiusura. Dopo un ulteriore riflusso per 24h, work-up e purificazione

cromatografica si è ottenuto il 4-butil-1-idrossi-6-fenilpiridin-2(1H)-one **33** con una resa del 21%.

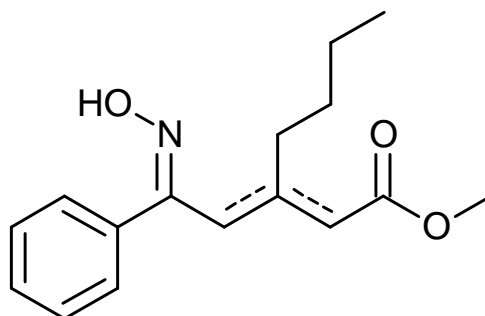


Figura 2.12: Ossima degli esteri 34 e 34a.

Si è ottenuto in questo modo il prodotto finale **33** con una resa complessiva del 0.7% in sette stadi.

2.6 Test biologici degli analoghi di CPX.

Nei laboratori del CIBIO di Trento, sono stati eseguiti i test di efficienza biologica della CPX fornita dalla Sigma-Aldrich e di alcuni composti suoi analoghi: le molecole sintetizzate durante questo lavoro di Tesi (**26**), (**28**), (**30**) e la stessa CPX commerciale (Sigma-Aldrich). Dato che la CPX commerciale viene venduta come sale di etanolamina, probabilmente per aumentarne la solubilità in acqua, per paragonarne l'attività biologica di questo composto con quelli da noi sintetizzati, è stato necessario eliminare questo controione tramite acidificazione ed estrazione in acetato di etile in modo da averne la forma protonata come i composti **26**, **28** e **30** da noi preparati.

I test biologici sono stati effettuati preparando una soluzione madre di ciascuno dei composti in DMSO seguita da una successiva diluizione nei terreni di coltura. Sono stati condotti due esperimenti di saggio della vitalità, ognuno dei quali è stato svolto su due linee cellulari diverse, CHP134⁶⁷ e SiMa,⁶⁸ utilizzando sei concentrazioni diverse per ogni composto testato. La prima è una linea di cellule di neuroblastoma umano proveniente dalla ghiandola surrenale sinistra di un paziente di 18 mesi e sono attive verso la tirosina idrossilasi. La seconda è un'altra linea cellulare di neuroblastoma che riporta i maggiori cambiamenti nei cromosomi associati con la prognosi di questo tumore come ad esempio l'amplificazione dell'oncogene *MYCN* e un alto grado di differenziazione adrenergica che lo rendono l'unico strumento per indagare sulla patologia e sulla terapia del neuroblastoma.

Fra le varie molecole testate è stato visto che la CPX privata del suo controione offre praticamente la stessa vitalità della cellula rispetto alla CPX commerciale salificata, indice del fatto che l'etanolamina non è partecipante nel processo di assorbimento del farmaco all'interno della cellula.

La sua molecola analoga **26** ha dimostrato avere una certa attività in entrambe le linee cellulari (Figura 2.12), purtroppo sempre inferiore rispetto alla molecola già nota ed inoltre tale effetto viene raggiunto a concentrazioni molto alte della stessa.

Purtroppo anche il composto **28** ha riportato un'attività molto debole ed alla concentrazione più elevata in entrambe le linee cellulari, mentre **30** non ha mai evidenziato la minima attività.

I risultati di scarsa attività degli analoghi della CPX da noi preparati possono essere dovuti, oltre che ad una loro minore efficacia nel diminuire la vitalità cellulare, anche ad una loro minore capacità di legare il ferro, nell'ipotesi che l'attività biologica di CPX e dei suoi analoghi sia legato a questo fenomeno.

Per questo motivo si è voluto anche verificare l'abilità dei composti di chelare il ferro intracellulare tramite il saggio della calceina. Il saggio della calceina è l'esperimento che viene svolto per misurare l'abilità dei composti di complessarsi al ferro intracellulare. La acetossi metil calceina, sostanza profluorescente e substrato della P-glicoproteina (P-gp), viene fatta entrare all'interno della membrana plasmatica delle cellule dove viene idrolizzata dalle esterasi in esso contenute a calceina, composto fluorescente che non è un substrato della P-gp. Le cellule resistenti ai farmaci (MDR) che esprimono alti livelli di P-gp, estruderanno la calceina-AM rapidamente dalla membrana cellulare prima che questa possa essere idrolizzata dalle esterasi a Calceina, riducendo così l'accumulo di Calceina intracellulare. Un inibitore della P-gp interferirà con questo meccanismo determinando un aumento della fluorescenza. Anche questo saggio viene svolto alla solita concentrazione di 100 μ M per tutte le molecole in questione e si è trovato che le due ciclopirox si legano alla calceina intracellulare con quasi la stessa efficacia (Figura 2.13).

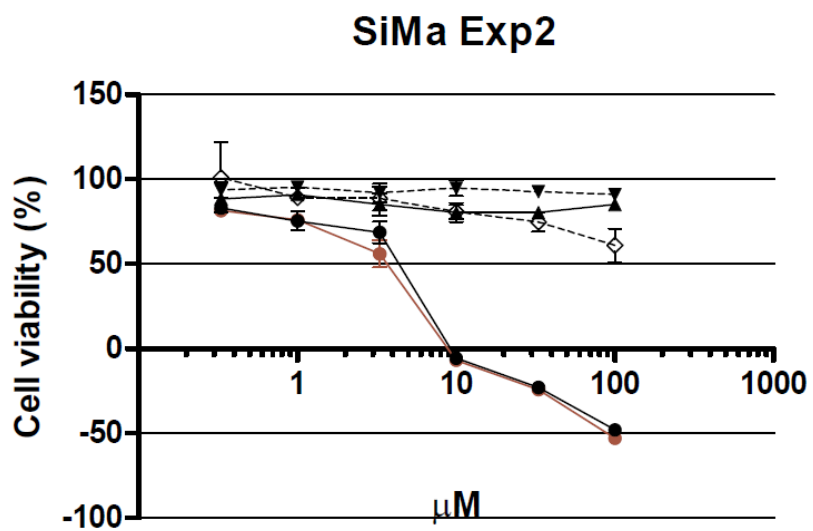
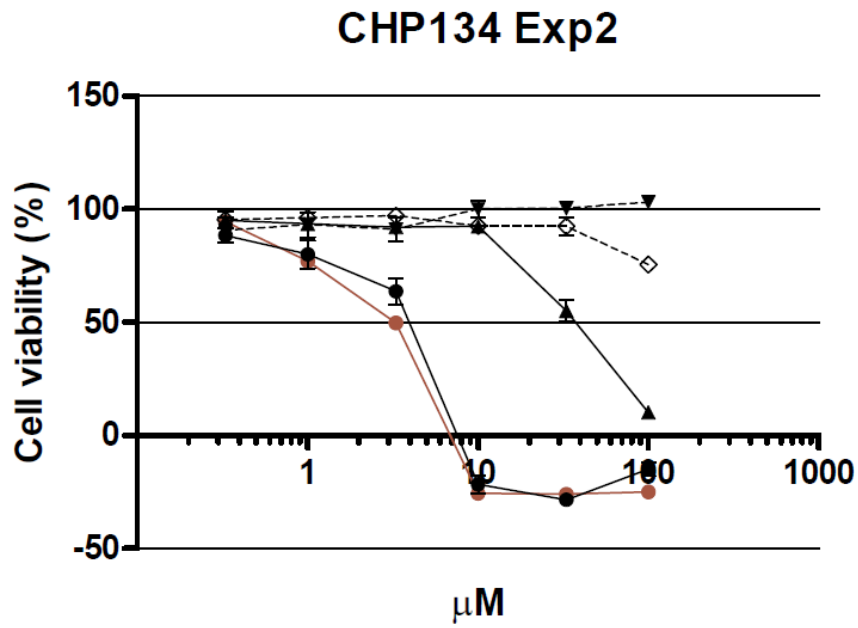


Figura 2.12: Andamento della vitalità cellulare per i composti analizzati nelle due linee cellulari. —●— CPX (Sigma-Aldrich), —●— CPX desalificata, —▲— composto 26, —▼— composto 28, —◇— composto 30.

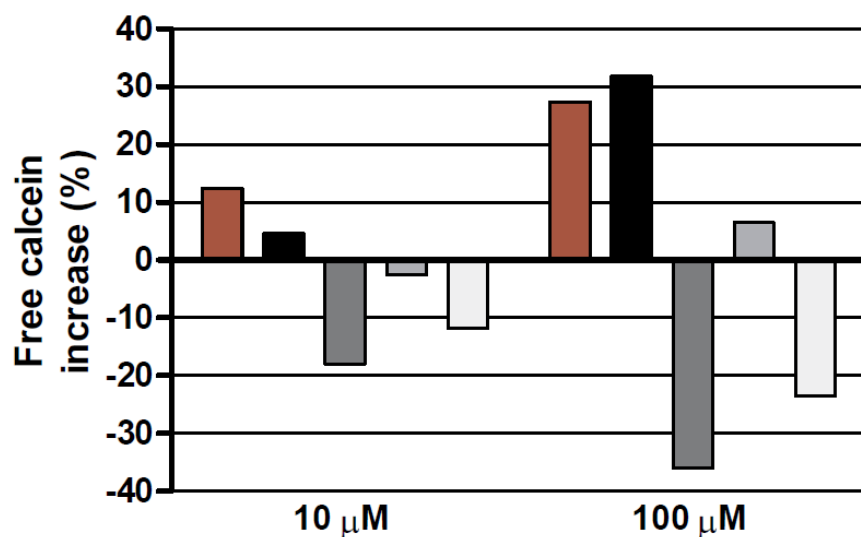


Figura 2.13: Saggio della calceina per i composti analizzati a diverse concentrazioni.

■ CPX (Sigma-Aldrich), ■ CPX desalificata, ■ composto 26, □ composto 28, ■ composto 30.

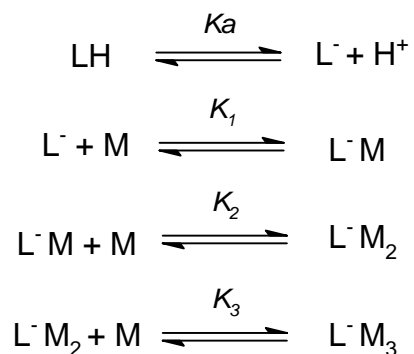
Il composto **30** non ha riportato nessun effetto legante, mentre i composti **26** e **28** hanno riportato effetti opposti. Questi risultati possono essere interpretati in due modi: (i) i due composti **26** e **28** in realtà operano tramite un meccanismo d'azione diverso, anche se non ancora dimostrabile; (ii) i due composti portano il ferro dentro la cellula essendone già saturati. Un effetto negativo analogo è stato infatti riscontrato quando le cellule vengono trattate con olotransferrina, un composto che rilascia il ferro dentro la cellula e che viene quindi utilizzato per invertire l'effetto dei leganti del ferro.

Per verificare che i composti non fossero saturati col ferro, sono stati eseguiti degli esperimenti di microanalisi ed ESI-MS, e solo il composto **30** è risultato positivo alla presenza del ferro sebbene in quantità modeste.

2.7 Misure di chelazione del Fe^{3+} .

Per verificare la differenza di affinità per il ferro dei diversi composti da noi sintetizzati, sono state eseguite misure di chelazione del ferro. Sia le misure della costante di complessazione sia quelle di protonazione, sono state eseguite per titolazione potenziometrica secondo le condizioni riportate in letteratura.⁶⁹ Purtroppo è stato possibile tentare di eseguirle solamente per la CPX (Sigma-Aldrich).

Per poter calcolare la costante di complessazione degli 1-idrossi- α -piridoni col Fe^{3+} è necessario conoscere anche la costante di protonazione, pK_a , del composto in questione, poiché nella reazione di complessazione è presente anche un equilibrio acido-base come mostrato nello schema 2.25.



Schema 2.25.

Le titolazioni vengono svolte passando da pH basici a pH acidi ed è stato visto che la CPX commerciale precipita a pH acidi non appena si protona. Questa scarsa solubilità è stata riscontrata anche nella misura della costante di complessazione col ferro, che ne ha impedito la misura sia per il prodotto commerciale sia per quello da noi sintetizzato.

Con difficoltà è stata misurata la costante di protonazione di CPX, che è risultato avere un valore di $pK_a = 6.0 \pm 0.1$.

Probabilmente è necessario svolgere i test con miscele idroalcoliche per poter trovare le condizioni ideali.

3 Conclusioni.

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati e pienamente caratterizzati tre analoghi strutturali della ciclopiroxolamina, ovvero composti appartenenti alla classe degli 1-idrossi- α -piridoni-4,6-disostituiti. Le molecole **26**, **28** e **30**, che possiedono sostituenti di tipo alifatico, sono state ottenute attraverso una strategia sintetica in due passaggi che si è rivelata facile e veloce sebbene con rese non soddisfacenti. Purtroppo questa strategia di sintesi non si è rivelata adatta per la preparazione di analoghi con sostituenti aromatici sull'anello piridonico inducendoci quindi a cambiare procedura per la sintesi del composto **33**, procedura che ha permesso di ottenere il composto di nostro interesse con rese modeste (0,7%). E' ragionevole supporre che l'ulteriore messa a punto di alcuni passaggi, in particolare lo stadio di ossidazione con il reattivo di Jones e lo stadio finale di ciclizzazione, possono permettere di migliorare tale resa.

Le molecole **26**, **28** e **30** si sono rivelate meno efficaci nei test biologici rispetto alla molecola già nota CPX ma non è stato ancora possibile condurre i test anche sull'analogo contenente il sostituyente aromatico.

Sono tuttora in corso le misure sia di affinità del ferro sia di attività chelante intracellulare per la determinazione della loro efficienza.

Possibili sviluppi futuri potrebbero basarsi sulla modifica sia dei gruppi sostituenti sia delle loro posizioni sull'anello piridonico con lo scopo di migliorarne l'efficacia come farmaco e di aiutare nella comprensione del loro meccanismo di azione all'interno delle cellule tumorali.

4 Parte Sperimentale.

4.1 *Considerazioni generali.*

4.1.1 Solventi e reagenti.

Tutte le reazioni con sostanze sensibili all'ossigeno e all'umidità sono state condotte secondo la tecnica di Schlenk in atmosfera di azoto ultrapuro (UPP), utilizzando vetreria anidrificata a fiamma o in stufa.

Il tetraidrofurano (THF) è stato distillato su sodio metallico in presenza di benzofenone come indicatore. Il diclorometano (CH_2Cl_2) è stato distillato da calcio idruro (CaH_2) e conservato sotto atmosfera inerte di azoto, su setacci molecolari (MS 4Å) attivati per 24 h per riscaldamento sotto vuoto.

N,N-dimetilformammide (DMF) anidra è stata acquistata già su setacci molecolari (MS 4Å) e sotto atmosfera inerte di azoto. Tutti i reagenti disponibili commercialmente sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich e Fluka ed utilizzati senza nessun particolare trattamento. L'etere di petrolio utilizzato aveva punto di ebollizione fra 40 e 60°C.

Per ottenere la temperatura di -78°C è stato utilizzato un bagno di alcol etilico ed azoto liquido.

4.1.2 Tecniche cromatografiche.

Le analisi cromatografiche sono state eseguite mediante cromatografia su strato sottile (TLC), su lastre con supporto in alluminio stratificate con gel di silice Merck 60 F254 (da 0.25 nm). Tutti i composti sintetizzati sono stati rilevati usando una lampada UV ($\lambda = 254$ o 356 nm) e soluzioni di sviluppo a

base di permanganato di potassio, tricloruro di ferro (I) (Test degli idrossammati), acido fosfomolibdico e molibdato di cerio e ammonio (Test Pancaldi).

Le purificazioni sono state effettuate con la tecnica della *Flash Column Chromatography*, utilizzando come fase stazionaria gel di silice 60 Å (230-400 mesh; Merck Kiesegel 60).

4.1.3 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare.

Gli spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR sono stati registrati su strumenti della serie *Varian Gemini 200* (frequenze di lavoro: 200MHz per il protone e 50 MHz per il carbonio) o *Varian Gemini 300* (frequenze di lavoro: 300 MHz per il protone e 75 MHz per il carbonio). Alcuni spettri NMR sono stati eseguiti su strumento *Varian Mercury 400* (frequenza di lavoro: 400MHz protone, 100 MHz per il carbonio). I valori di *chemical shift* sono stati espressi in ppm secondo la scala δ e sono riferiti al picco residuo del solvente (CHCl_3 , $\delta = 7.26$ ppm per ^1H NMR e $\delta = 77.16$ ppm per ^{13}C NMR). I valori delle costanti di accoppiamento (J) sono espressi in Hz. Le abbreviazioni usate e i loro significati sono i seguenti: s (singoletto), d (doppietto), t (tripletto), dd (doppietto di doppietti), td (tripletto di doppietti), m (multipletto). I multipletti sono indicati come intervalli.

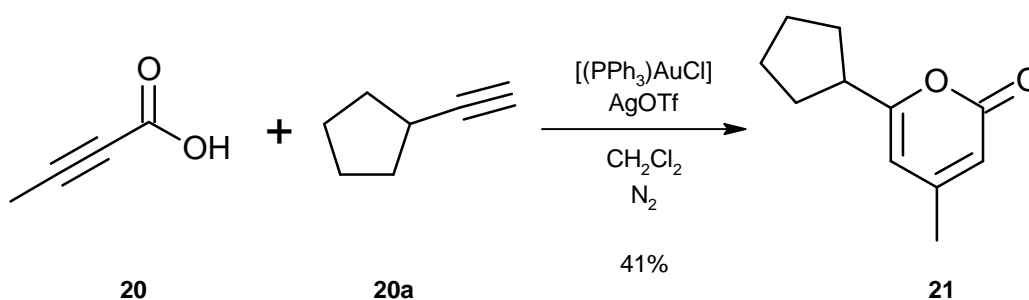
4.1.4 Spettroscopia IR.

Gli spettri FT-IR sono stati registrati con uno strumento *Perkin-Elmer Spectrum BX* nel range $4000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ con una risoluzione di 2 cm^{-1} .

4.1.5 Spettrometria di massa.

Gli spettri ESI-MS sono stati ottenuti per infusione diretta della soluzione del campione (concentrazione 10 ppm) utilizzando uno strumento *Thermo Scientific* LCQ-FLEET a trappola ionica e sono riportati nella forma m/z . Le analisi GC-MS sono state eseguite con uno strumento Shimadzu QP5050A utilizzando una colonna ZB-1HT (lunghezza 30m, diametro interno 0.25mm). La cromatografia è stata effettuata mantenendo un flusso di 1.0 ml/min di carrier alla pressione di circa 140 kPa. Il campione in uscita dalla colonna è stato ionizzato con un potenziale di +1,50 kV. Nelle analisi si riporta il tempo di ritenzione dall'iniezione, la massa misurata, l'intensità relativa al picco massimo.

4.2 Preparazione del 6-ciclopentil-4-metil-2H-piran-2-one (21).⁴⁹



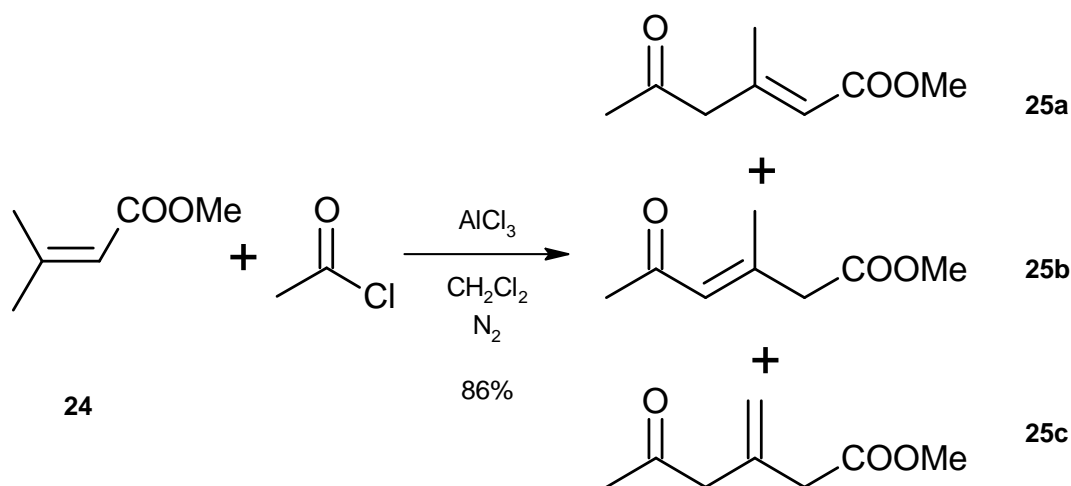
In un tubo Schlenk munito di agitatore magnetico e sotto atmosfera inerte, sono stati posti acido 2-butinoico (**20**; 45 mg; 0.53 mmol; 1 eq.), CH_2Cl_2 (2 mL), etinilciclopentano (**20a**; 251.8 mg; 2.12 mmol; 0.31 mL; 5 eq.; $0.812\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), cloro(trifenilfosfina)oro(I) (12.1 mg; 0.026 mmol; 0.05 eq.) e argento triflato (6.4 mg; 0.026 mmol; 0.05 eq.). La soluzione nera è stata lasciata sotto agitazione per 24h. Il decorso della reazione è stato monitorato mediante

analisi TLC (SiO₂; PE/AcOEt = 2/1). Il grezzo di reazione è stato filtrato su gel di silice, e la silice lavata con CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). Il solvente è stato quindi rimosso a pressione ridotta. E' stato isolato un olio incolore che è stato purificato tramite cromatografia flash (PE/AcOEt = 3/1) ottenendo 38.6 mg (0.22 mmol) del composto **21**. Resa % = 41%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.56 – 1.81 (m, 8H); 2.12 (s, 3H); 2.79 – 2.89 (m, 1H); 5.85 (s, 1H); 5.93 (s, 1H).

MS (m/z): 178 (19.71); 163 (99.21); 135 (100.00); 117 (45.57); 107 (28.42); 91 (67.75); 79 (38.93).

4.3 Preparazione del (2E)-3-metil-5-ossoes-2-enoato di metile (25a) e del (2E)-3-metil-5-ossoes-3-enoato di metile (25b) e del 3-metilidene-5-ossoesanoato di metile (25c).⁵⁵



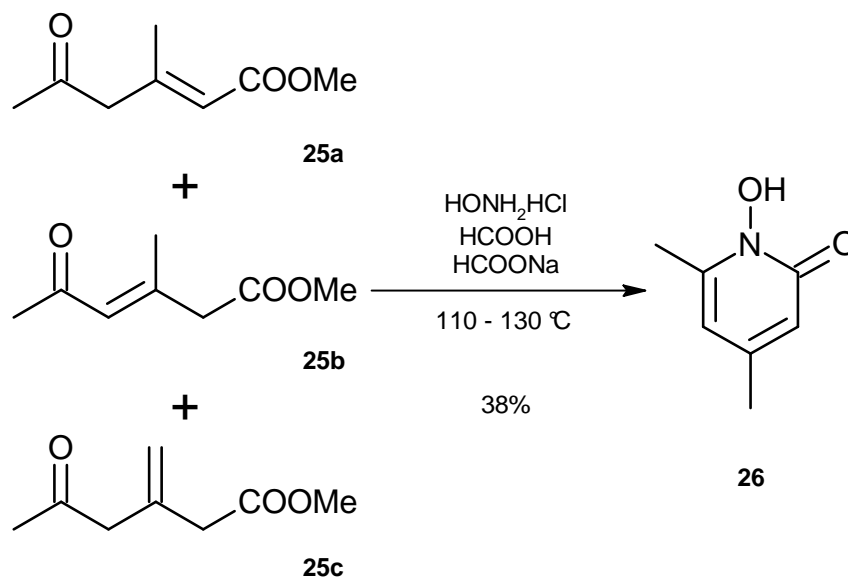
In un tubo Schlenk munito di agitatore magnetico e sotto atmosfera inerte, sono stati posti CH₂Cl₂ (4 mL), acido acetico (360 mg; 6 mmol; 1.7 eq.; 1.05 g·mL⁻¹), ossalil cloruro (762 mg; 6 mmol; 1.7 eq.; 1.455 g·mL⁻¹) e una goccia

di DMF anidra. Dopo l'immediata formazione di bolle, è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 ora. Viene fatto un controllo su TLC in seguito a un mini quench in metanolo (SiO_2 ; PE/AcOEt = 1/7) e quando si evidenzia la totale conversione dell'acido in cloruro, è stata trasferita la soluzione tramite siringa sotto atmosfera inerte, in un altro tubo Schlenk anch'esso munito di agitatore magnetico e tenuto sotto atmosfera di N_2 in cui erano stati precedentemente posti CH_2Cl_2 anidro (4 mL) e AlCl_3 (1219 mg; 9.24 mmol; 2.3 eq.). Dopo qualche minuto viene aggiunto 3-metil-2-butenato di metile (**24**; 0.4 mL; 458 mg; 4.02 mmol; 1 eq.; $0.916 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La soluzione ha assunto una colorazione giallo chiaro ed è stata tenuta sotto agitazione per tutta la notte. Il decorso della reazione è stato monitorato mediante analisi TLC (SiO_2 ; PE/AcOEt = 5/1). Una volta verificata la quasi totale assenza del reagente di partenza, la miscela è stata trasferita in una beuta da 100 mL contenente acqua (20 mL) alla temperatura di 0°C . Le due fasi sono state separate e la fase acquosa è stata estratta con CH_2Cl_2 (2 x 20 mL), mentre le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua (40 mL) e salamoia (40 mL). Dopo anidrifazione su Na_2SO_4 , filtrazione e rimozione del solvente a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia flash (SiO_2 ; PE/AcOEt = 8/1). Sono stati recuperati 125.8 mg (0.81 mmol) di prodotto (olio giallo chiaro) come miscela di tre stereoisomeri (**25a** / **25b** / **25c**). Resa % = 86%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.92 (**25a**, d, $J=1.9$ Hz, 3H); 1.95 (d, $J=1.9$ Hz, 3H); 2.16 – 2.19 (m, 9H); 3.12 (s, 2H); 3.14 (**25c**, s, 2H); 3.23 (s, 2H); 3.30 (**25c**, s, 2H); 3.65 – 3.67 (m, 9H); 5.02 (**25c**, s, 1H); 5.11 (**25c**, s, 1H); 6.14 (**25b**, s, 1H); 6.24 (**25a**, s, 1H).

GC-MS (m/z): 141 (6.21); 124 (91.47); 109 (42.56); 96 (100.00); 81 (23.00); 59 (28.98).

4.4 Preparazione del 1-idrossi-4,6-dimetilpiridin-2(1H)-one (26).⁵¹



In un pallone da 50 mL munito di agitatore magnetico sono stati introdotti la miscela di esteri **25** (125 mg; 0.81 mmol; 1 eq.) e acido formico (1 mL; 1220 mg; 26.52 mmol; 1.22 g·mL⁻¹). Dopo aver portato la soluzione alla temperatura di 0°C, è stata aggiunta NaOH solida (429 mg; 10.74 mmol). Dopo il completo scioglimento dell'NaOH, è stata aggiunta NH₂OH·HCl (61 mg; 0.87 mmol; 1.1 eq.). E' stata scaldata la reazione alla temperatura di 110°C mantenendola sotto agitazione per circa 2 ore. Dopo che l'analisi TLC (DCM/MeOH = 9 : 1) ha evidenziato la totale conversione del materiale di partenza, è stata scaldata la miscela gradualmente fino alla temperatura di 130°C, fino a completa evaporazione dell'acido formico. La miscela solida è stata così diluita con acqua e dopo estrazione della fase acquosa con AcOEt, le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua e salamoia e anidificate su Na₂SO₄. Dopo filtrazione e rimozione del solvente è stato isolato un olio di colore arancio che è stato purificato per cromatografia flash (SiO₂; DCM/MeOH = 35/1). Sono

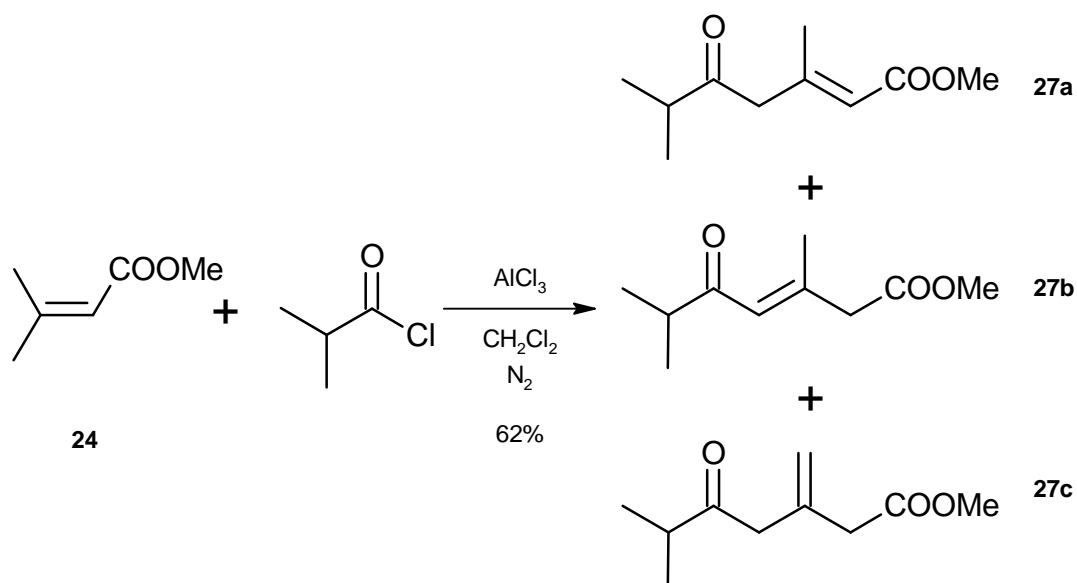
stati isolati 8 mg (0.058 mmol) di un olio arancione corrispondente al prodotto **26**. Resa % = 38%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.18 (s, 3H); 2.44 (s, 3H); 6.21 (s, 1H), 6.49 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 17.6; 21.0; 109.8; 112.0; 143.5; 144.7; 158.9.

ESI-MS: 140.07 $[\text{M}+1]^+$ teorico; 140.04 $[\text{M}+1]^+$ sperimentale.

4.5 Preparazione del (2E)-3,6-dimetil-5-ossoept-2-enoato di metile (27a), del (2E)-3,6-dimetil-5-ossoept-3-enoato di metile (27b) e del 6-metil-3-metilidene-5-ossoeptanoato di metile (27c).⁵⁵

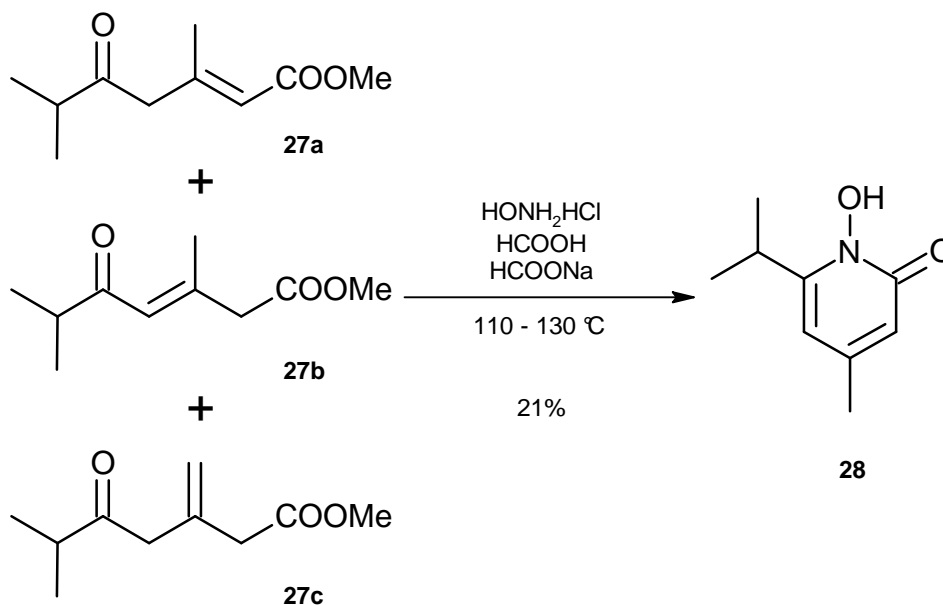


In un tubo Schlenk munito di agitatore magnetico e sotto atmosfera inerte, sono stati posti CH_2Cl_2 (4 mL), acido isobutilico (616 mg; 7 mmol; 1.7 eq.; $0.95 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ossalil cloruro (889 mg; 7 mmol; 1.7 eq.; $1.455 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e una goccia di DMF anidra. Dopo l'immediata formazione di bolle, è stata lasciata

sotto agitazione per circa 1 ora. E' stato fatto un controllo su TLC in seguito a un mini quench in metanolo (SiO_2 ; PE/AcOEt = 1/7) e quando viene evidenziata la totale conversione dell'acido in cloruro, è stata trasferita la soluzione in un altro tubo Schlenk anch'esso munito di agitatore magnetico e tenuto sotto atmosfera di N_2 in cui erano stati precedentemente posti CH_2Cl_2 anidro (4 mL) e AlCl_3 (1219 mg; 9.24 mmol; 2.3 eq.). Dopo qualche minuto è stato aggiunto 3-metil-2-butenato di metile (**24**; 0.5 mL; 458 mg; 4.02 mmol; 1 eq.; $0.916 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La soluzione ha assunto una colorazione giallo intenso ed è stata mantenuta sotto agitazione per tutta la notte. Il decorso della reazione è stato monitorato mediante analisi TLC (SiO_2 ; PE/AcOEt = 18/1). Una volta verificata la quasi totale assenza del reagente di partenza, la miscela è stata trasferita in una beuta da 100 mL contenente acqua (20 mL) alla temperatura di 0°C . Le due fasi sono state separate e la fase acquosa è stata estratta con CH_2Cl_2 (2 x 20 mL), mentre le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua (40 mL) e salamoia (40 mL). Dopo anidificazione su Na_2SO_4 , filtrazione e rimozione del solvente a pressione ridotta, è stato isolato un olio verde oliva che è stato purificato mediante cromatografia flash (SiO_2 ; PE/AcOEt = 20/1). Sono stati recuperati 458 mg (2.49 mmol) di prodotto (olio giallo) come miscela di tre stereoisomeri (**27a** / **27b** / **27c**). Resa % = 62%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.97 – 1.08 (m, 18H); 1.68 (**27a**, d, $J=1.7$ Hz, 3H); 2.07 (**27b**, d, $J=1.7$ Hz, 3H); 2.44 – 2.64 (m, 3H); 3.05 (**27c**, s, 2H); 3.20 (**27c**, s, 2H); 3.56 – 3.59 (m, 9H); 4.90 (**27c**, s, 1H); 5.00 (**27c**, s, 1H), 6.11 (**27b**, s, 1H); 6.20 (**27a**, s, 1H).

4.6 Preparazione del 1-idrossi-4-metil-6-(propan-2-il)piridin-2(1H)-one (28).⁵¹



In un pallone da 100 mL munito di agitatore magnetico sono stati introdotti la miscela di esteri (27) (458 mg; 2.49 mmol; 1 eq.) e acido formico (1 mL; 1220 mg; 26.52 mmol; $1.22\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La soluzione è stata portata alla temperatura di 0°C ed è stata aggiunta NaOH (429 mg; 10.74 mmol). Dopo il completo scioglimento di NaOH, è stata aggiunta $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (190 mg; 2.73 mmol; 1.1 eq.). Dopo 24h è stata aggiunta alla miscela di reazione KOH (244 mg; 4.37 mmol; 5 eq.) e la soluzione ottenuta, di colore giallo scuro, è stata portata alla temperatura di 110°C mantenendola sotto agitazione per circa 6 ore. Dopo che dall'analisi TLC (DCM/MeOH = 9 : 1) è stata evidenziata una buona conversione del materiale di partenza, è stata scaldata la miscela gradualmente fino alla temperatura di 130°C , fino a completa evaporazione dell'acido formico. La miscela solida è stata così diluita con acqua e CH_2Cl_2 e dopo estrazione della fase acquosa con AcOEt, le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua e salamoia e anidificate su Na_2SO_4 . Dopo filtrazione e

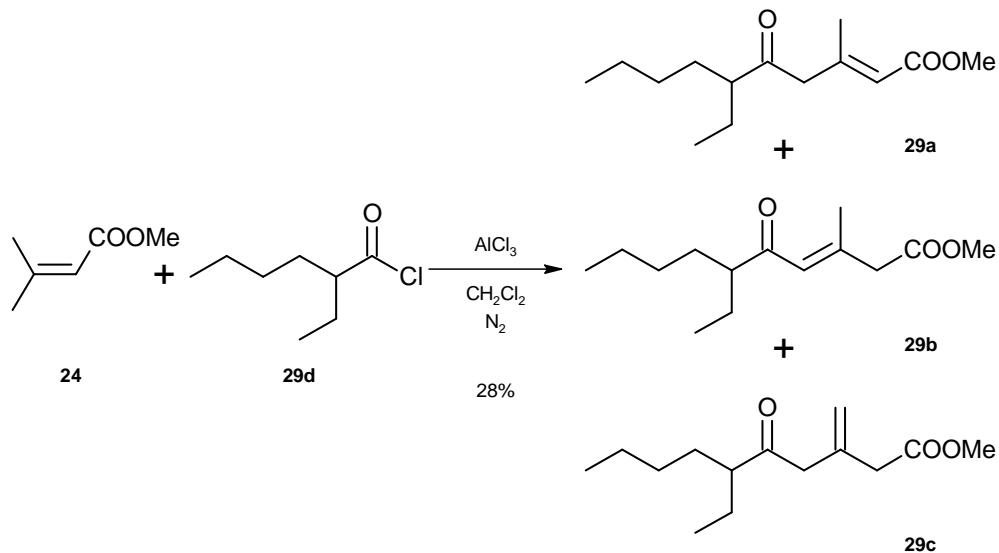
rimozione del solvente è stato isolato un olio di colore arancio che è stato purificato per cromatografia flash (SiO₂; DCM/MeOH = 30/1). Sono stati isolati 87 mg (0.52 mmol) di un olio di colore arancio scuro corrispondente al prodotto (**28**). Resa % = 21%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.27 (d, J=6.6 Hz, 6H); 2.17 (s, 3H); 2.85 (m, 1H); 5.90 (s, 1H); 6.21 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.5 (x2); 21.7; 31.9; 104.7; 115.6; 153.4, 154.2; 165.5.

ESI-MS: 168.10 [M+1]⁺ teorico; 168.12 [M+1]⁺ sperimentale.

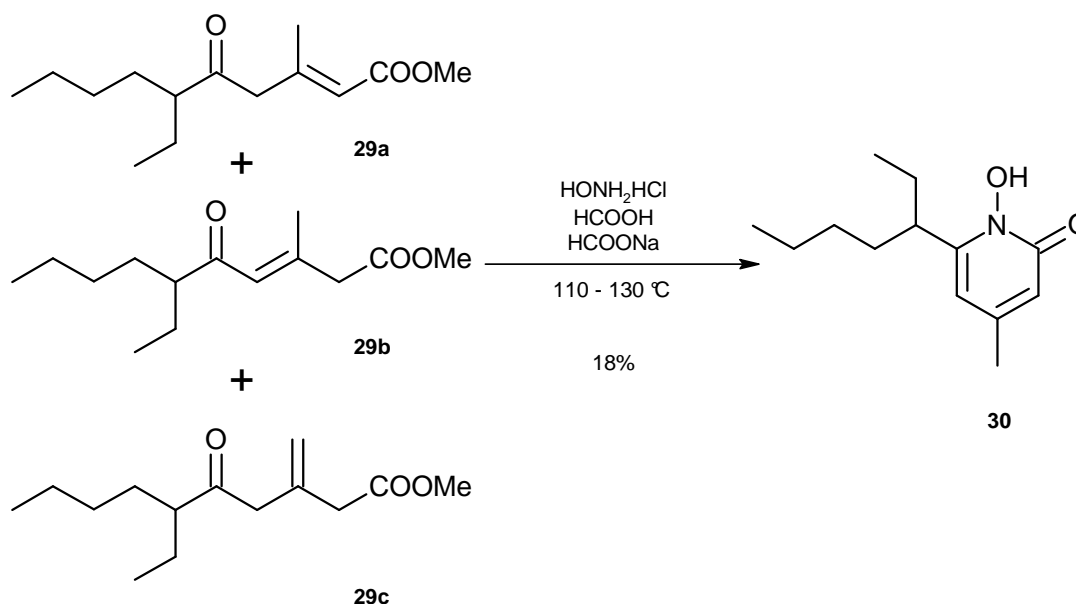
4.7 Preparazione del (2E)-6-etil-3-metil-5-ossodec-2-enoato (29a) di metile, del (2E)-6-etil-3-metil-5-ossodec-3-enoato di metile (29b) e del 6-etil-3-metilidene-5-ossodecanoato di metile (29c).⁵⁵



In un tubo Schlenk munito di agitatore magnetico e sotto atmosfera inerte di N₂, sono stati posti CH₂Cl₂ anidro (8 mL) e AlCl₃ (1219.7 mg; 9.24 mmol; 2.3 eq.) e 2-etilesanoil cloruro (**29d**; 911.7 mg; 5.6 mmol; 1.4 eq.; 0.94 g·mL⁻¹). Dopo qualche minuto è stato aggiunto 3-metil-2-butenato di metile (**24**; 0.5 mL; 458 mg; 4.02 mmol; 1 eq.; 0.916 g·mL⁻¹). La soluzione ha assunto una colorazione verde ed è stata tenuta sotto agitazione per tutta la notte. Il decorso della reazione è stato monitorato mediante analisi TLC (SiO₂; PE/AcOEt = 18/1). Una volta verificata la quasi totale assenza del reagente di partenza, la miscela è stata trasferita in una beuta da 100 mL contenente acqua (20 mL) alla temperatura di 0°C. Le due fasi sono state separate e la fase acquosa è stata estratta con CH₂Cl₂ (2 x 20 mL), mentre le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua (40 mL) e salamoia (40 mL). Dopo anidificazione su Na₂SO₄, filtrazione e rimozione del solvente a pressione ridotta, è stato isolato un olio arancio scuro che è stato purificato mediante cromatografia flash (SiO₂; PE/AcOEt = 10/1). Sono stati recuperati 270 mg (1.13 mmol) di prodotto (olio verde smeraldo) (**29a** / **29b** / **29c**). Resa % = 28%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.81 – 0.88 (m, 18H); 1.16 – 1.32 (m, 12H); 1.44 – 1.64 (m, 12H); 1.96 (m, 3H); 2.17 (m, 3H); 3.12 (**29a**, s, 2H); 3.16 (**29c**, s, 2H); 3.23 (**29b**, s, 2H); 3.32 (**29c**, s, 2H); 3.66 – 3.70 (m, 9H); 4.98 (**29c**, s, 1H); 5.09 (**29c**, s, 1H); 6.16 (**29a**, s, 1H); 6.24 (**29b**, s, 1H).

4.8 Preparazione del 6-(eptan-3-il)-1-idrossi-4-metilpiridin-2(1H)-one (30).⁵¹



In un pallone da 50 mL munito di agitatore magnetico sono stati introdotti la miscela di esteri **29** (270 mg; 1.13 mmol; 1 eq.) e acido formico (1 mL; 1220 mg; 26.52 mmol; 1.22 g·mL⁻¹). E' stata portata la soluzione alla temperatura di 0°C e sono state aggiunte le pasticche di NaOH (429 mg; 10.74 mmol). Dopo il completo scioglimento di NaOH, è stata aggiunta NH₂OH·HCl (87 mg; 1.25 mmol; 1.1 eq.). Dopo 24 ore sono stati aggiunti alla miscela di reazione KOH (691 mg, 12,35 mmoli; 5 eq) e metanolo (2mL). La soluzione è stata quindi mantenuta a riflusso per 12 ore. Dopo che dall'analisi TLC (DCM/MeOH = 20 : 1) è stata evidenziata una buona conversione del materiale di partenza, è stata scaldata la miscela gradualmente fino alla temperatura di 130°C, fino a completa evaporazione del metanolo e dell'acido formico. La miscela solida è stata così diluita con acqua e CH₂Cl₂ e dopo estrazione della fase acquosa con AcOEt, le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua e salamoia e

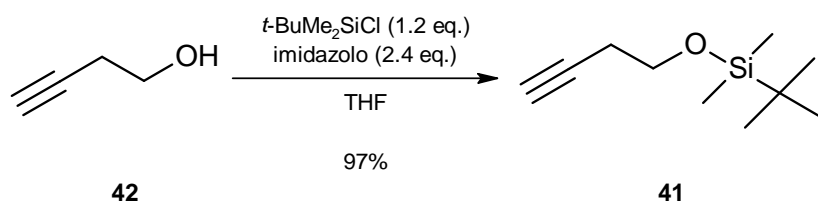
anidificate su Na₂SO₄. Dopo filtrazione e rimozione del solvente è stato isolato un olio di colore verde scuro che è stato purificato per cromatografia flash (SiO₂; DCM/MeOH = 30/1). Sono stati isolati 47 mg (0.21 mmol) di un olio e di colore giallo corrispondente al prodotto (**30**). Resa % = 18%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.78 – 0.88 (m, 6 H); 1.13 – 1.28 (m, 4H); 1.45 – 1.73 (m, 4H); 2.11 (s, 3H); 2.16 – 2.30 (m, 1H); 5.80 (s, 1H); 5.91 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.7 (x3); 13.8 (x3); 22.5 (x3); 26.0 (x2); 29.5 (x2); 32.4 (x2); 46.2; 106.3; 110.5; 155.9; 163.4; 167.2.

ESI-MS: 224.16 [M+1]⁺ teorico; 210.17 sperimentale.

4.9 Preparazione del 4-[(1-*t*-butil-1,1-dimetilsilil)-ossij]-but-1-ino (**41**).⁵⁹



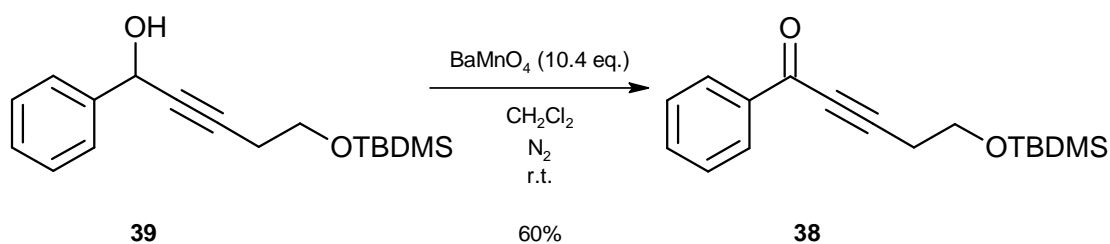
In un pallone da 100 mL munito di agitatore magnetico sono state messi 3-butin-1-olo (**42**; 1 mL; 926 mg; 13.2 mmol; 1 eq.; 0.926 g·mL⁻¹), THF anidro (20 mL), imidazolo (2160 mg; 32 mmol; 2.4 eq.) ed infine *t*-butildimetilsilil cloruro (2392 mg; 15.84 mmol; 1.2 eq.). La soluzione passa immediatamente da incolore a bianco lattiginoso. La reazione è stata tenuta sotto agitazione per 12h. Dopo scomparsa del prodotto di partenza, il grezzo di reazione è stato filtrato su vetro sinterizzato contenente 1 cm di gel di silice. Il residuo è stato lavato con Et₂O (3 x 15 mL). Le fasi organiche sono state riunite e il solvente

mL). La soluzione diventa color giallo scuro. La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione per 12h a temperatura ambiente. Il decorso della reazione è stato monitorato mediante analisi TLC (SiO₂; PE/AcOEt = 6/1). Una volta verificata la quasi totale assenza del reagente di partenza, alla miscela è stata aggiunta una soluzione satura di NH₄Cl e i componenti organici sono stati estratti con AcOEt (2 x 20 mL), e le fasi organiche riunite sono state lavate con salamoia (2 x 20 mL). Dopo anidificazione su Na₂SO₄, filtrazione e rimozione del solvente a pressione ridotta, è stato isolato un olio giallo scuro che è stato purificato mediante cromatografia flash (SiO₂; PE/AcOEt = 45/1). Sono stati recuperati 701 mg (2.42 mmol) di prodotto (liquido giallo pallido) **39** Resa % = 74%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.06 (s, 6H); 0.92 (s, 9H); 2.49 (m, 2H); 3.78 (t, J=7.1 Hz, 2H); 5.41 (s, 2H); 7.27 – 7.41 (m, 3H); 7.57 – 7.59 (m, sH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.3 (x2); 18.2; 23.6 (x3); 25.8; 62.3; 65.8; 80.2; 93.7; 128.4; 129.6 (x2); 130.6; 141.1.

4.11 Preparazione del 5-[(1-*t*-butil-1,1-dimetilsilil)-ossij]-1-fenilpent-2-in-1-one (**38**).⁶⁰



In un tubo Schlenk munito di agitatore magnetico e tenuto sotto atmosfera inerte, sono stati introdotti l'alcol **39** (701 mg; 2.42 mmol; 1 eq.), CH₂Cl₂ anidro (50 mL) e BaMnO₄ (6436 mg; 25.14 mmol; 10.4 eq.) ed è stata lasciata sotto agitazione per tutta la notte. Il decorso della reazione è stato monitorato mediante analisi TLC (SiO₂; Pentano/AcOEt = 8/1). Una volta verificata la scomparsa del reagente di partenza, è stata filtrata la miscela di reazione su Celite e sono stati fatti lavaggi con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Dopo rimozione del solvente a pressione ridotta, è stato isolato un olio verde che è stato purificato mediante cromatografia flash (SiO₂; PE/AcOEt = 40/1). Sono stati recuperati 418 mg (1.45 mmol) di prodotto (liquido giallo pallido) **38** Resa % = 60%.

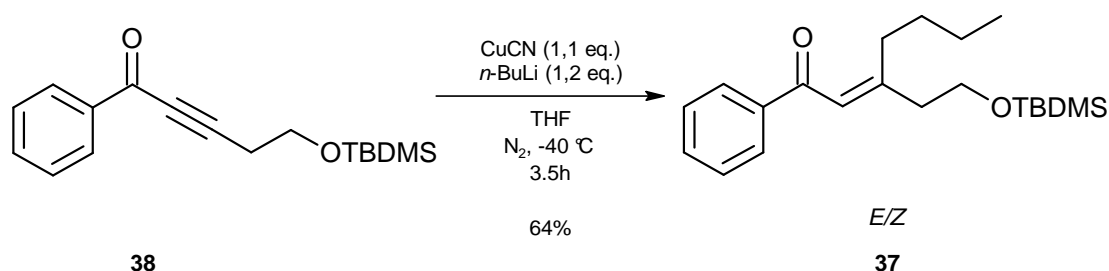
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.1 (s, 6H); 0.92 (s, 9H); 2.72 (t, J=6.6 Hz, 2H); 3.88 (m, 2H); 7.47 – 7.50 (m, 3H); 7.58 – 7.60 (t, J=7.1 Hz, 1H); 8.16 (d, 7.7 Hz, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.3 (x2); 18.2; 23.6 (x3); 25.8; 60.8; 80.2; 93.7; 128.4; 129.6 (x2); 133.9 (x2); 178.0.

GC-MS (m/z): 231(43.56); 201 (98.64); 145 (83.27); 105 (95.12); 75 (43.70).

IR (cm⁻¹): 2957; 2929; 2857; 2238; 2206; 1642; 1598; 1580; 1472; 1450; 1387; 1101; 1007.

4.12 Preparazione del (2*E/Z*)-3-[(1-*t*-butil-1,1-dimetilsilil)-2-ossietil]-1-fenilept-2-en-1-one (**37**).⁶²



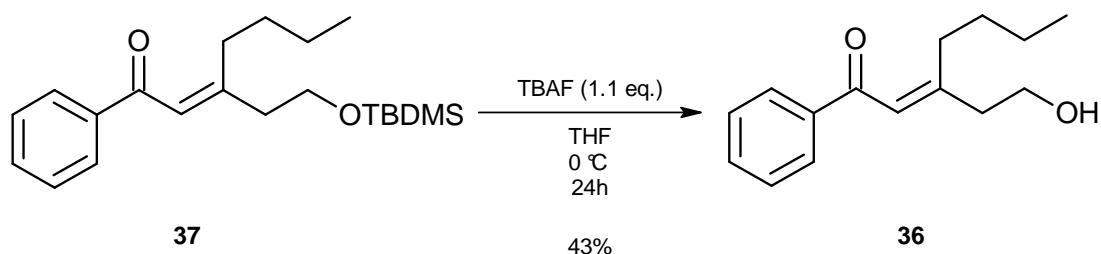
In un tubo Schlenk munito di agitatore magnetico è stata preparata una soluzione di CuCN (257 mg; 2.86 mmol; 1.1 eq.) e THF anidro (25 mL) sotto atmosfera inerte alla quale è stato aggiunto *n*-BuLi (soluzione 1.6 M in esano; 1.78 mL; 2.86 mol; 1.1 eq.) alla temperatura di -40°C. Dopo circa 15 minuti, alla soluzione incolore è stato aggiunto **38** (750 mg; 2.6 mmol; 1 eq.) precedentemente solubilizzato in THF anidro (6.5 mL) a -78 °C. La miscela rosso ruggine è stata lentamente scaldata a -40°C e tenuta sotto agitazione per 3.5 ore. E' stato aggiunto quindi un ugual volume di una soluzione satura di NH₄Cl ed è stata estratta la fase acquosa con Et₂O (2 x 15 mL) e le fasi organiche riunite sono state lavate con salamoia. Dopo anidificazione su Na₂SO₄, filtrazione e rimozione del solvente a pressione ridotta, è stato isolato un olio scuro che è stato purificato mediante cromatografia flash (SiO₂; PE/AcOEt = 60/1). Sono stati recuperati 860 mg (2.48 mmol) di prodotto (olio incolore) **37** come miscela inseparabile di isomeri (*E/Z*). Resa % = 95%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.07 (s, 12H); 0.88 (s, 9H); 0.90 (s, 9H); 0.95 – 1.01 (m, 6H); 1.35 – 1.41 (m, 4H); 1.49 – 1.55 (m, 4H); 2.34 (t, $J=7.7$ Hz, 2H); 2.47 (t, $J=6.6$ Hz, 2H); 2.59 (m, 2H); 2.84 (t, $J=6.6$ Hz, 2H); 3.84 (m, 4H); 6.75 (d, $J=8.2$ Hz, 2H); 7.44 (m, 2H); 7.53 (m, 1H); 7.93 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 13.9 (x2); 18.2; 22.5; 23.0; 25.9 (x3); 30.7; 32.9; 36.4; 41.8; 61.6; 120.9; 128.1 (x2); 128.4 (x2); 132.2; 139.2; 160.8; 191.1.

GC-MS (m/z): 346 (1.77); 289 (78.50); 259 (17.59); 214 (11.16); 185 (50.57); 103 (83.56); 75 (100.00).

4.13 Preparazione degli (2E/Z)-3-(2-idrossietil)-1-fenilept-2-en-1-oni (36).⁶³



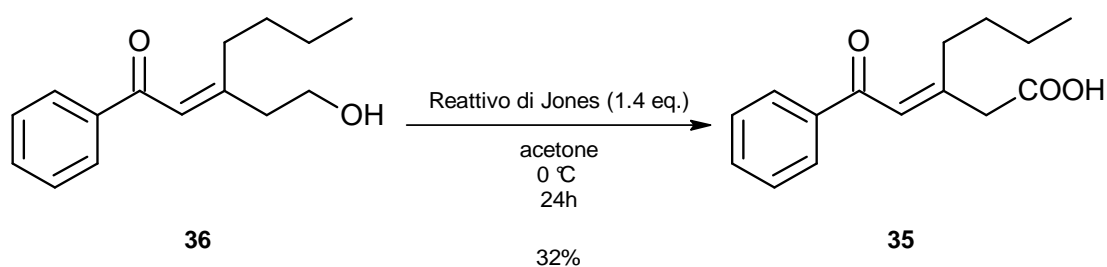
In un pallone da 100 mL munito di agitatore magnetico è stata posta la miscela di **37** (321 mg; 0.93 mmol; 1 eq.), THF (5 mL) e TBAF (267 mg; 1.02 mmol; 1.1 eq.) a 0°C per circa un'ora e mezzo e la soluzione si colora di giallo. E' stata portata la soluzione a temperatura ambiente ed è stata lasciata sotto agitazione per tutta la notte. E' stata estratta la fase organica con AcOEt (2 x 10 mL) e salamoia (2 x 10 mL) e dopo anidificazione su Na_2SO_4 , filtrazione e rimozione del solvente a pressione ridotta, è stato isolato un olio giallo che è stato purificato mediante cromatografia flash (SiO_2 ; PE/AcOEt = 14/1). Sono stati recuperati 100 mg (0.4 mmol) di prodotto (olio giallo) come miscela di isomeri (E/Z) di **36**. Resa % = 43%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.92 (t, $J=7.1$, 6H); 1.38 – 1.53 (m, 4H); 1.65 – 1.75 (m, 4H); 2.50 – 2.64 (m, 4H); 3.80 – 3.90 (m, 4H); 6.51 (s, 1H); 6.76 (s, 1H); 7.31 – 7.63 (m, 6H); 7.91 – 7.95 (m, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.8; 23.0; 30.9; 32.6; 41.8; 60.5; 122.4; 127.9 (x2); 128.3 (x2); 139.0; 159.8; 191.7.

GC-MS (m/z): 231 (45.46); 202 (100.00); 172 (18.04); 106 (25.41); 78 (18.44).

4.14 Preparazione degli acidi (2E/Z)-3-(2-osso-2-fenilettiliden)-eptanoici (35).⁶⁴



In un pallone da 100 mL munito di agitatore magnetico e contenente la miscela di **37** (240 mg; 1 mmol; 1 eq.) in acetone (3 mL) è stato versato goccia a goccia il reattivo di Jones preparato di fresco (soluzione 2.5 M in acqua; 0.525 mL; 1.4 mmol; 1.4 eq.) alla temperatura di 0°C e la soluzione diventa subito verde oliva chiaro. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per tutta la notte. Alla miscela di reazione è stato quindi aggiunto un ugual volume di isopropanolo ed è stata diluita con un altro volume d'acqua. Il solvente organico è stato rimosso a pressione ridotta. E' stata estratta quindi la miscela con Et_2O (2 x 10 mL) ed è stata lavata con una soluzione satura di NaHCO_3 (2 x 10 mL). La fase acquosa di lavaggio è stata quindi riacidificata con una soluzione 3 N di HCl fino a $\text{pH} = 3$ e lavata con Et_2O (2 x 20 mL). Dopo anidrifcazione su Na_2SO_4 , filtrazione e rimozione del solvente a pressione ridotta, è stato recuperato un olio

verastro che è stato purificato mediante cromatografia flash (SiO₂; PE/AcOEt = 2/1) ottenendo così 80 mg (0.32 mmol) come miscela inseparabili degli isomeri (*E/Z*) di **35**. Resa % = 32%.

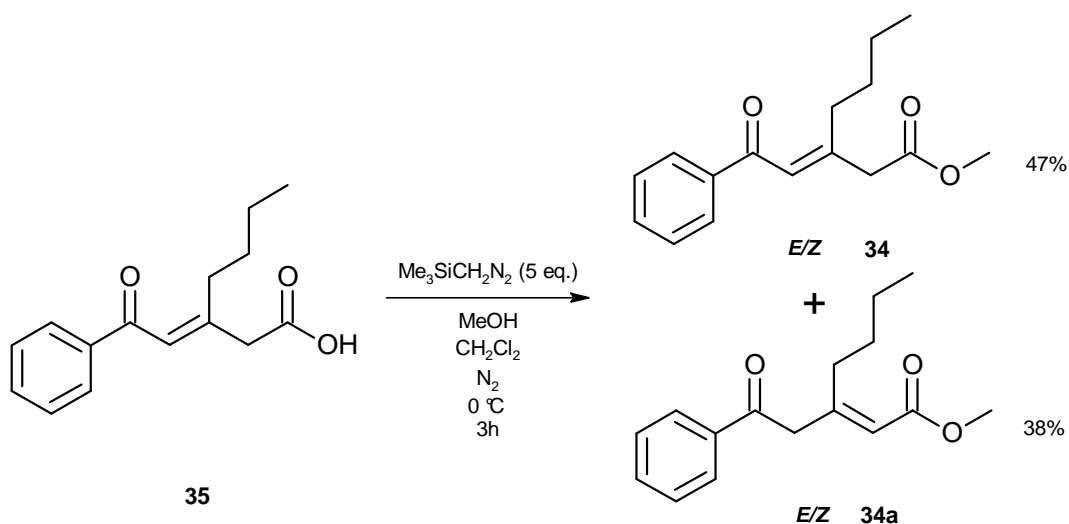
La soluzione contenente il reattivo di Jones è stata preparata sciogliendo CrO₃ (1.25 g; 12.5 mmol) in H₂SO₄ concentrato (soluzione al 98%; 1.25 mL; 1.842 g·mol⁻¹) in un pallone da 50 mL munito di agitatore magnetico. Quando è stato completamente disciolto, è stata versata la soluzione in un altro pallone munito di agitatore magnetico e acqua (3.75 mL) a 0°C. La soluzione diventa immediatamente rosso-arancio.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.88 - 0.95 (m, 6H); 1.25 – 1.55 (m, 8H); 2.60 – 2.68 (m, 2H); 2.86 (t, J=6.2 Hz, 2H); 3.30 (s, 4H); 6.82 (s, 1H); 6.98 (s, 1H); 7.42 – 7.58 (m, 6H); 7.91 – 7.96 (m, 4H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13.6; 22.6; 30.0; 32.4; 42.9; 124.6; 128.0 (x2); 128.2 (x2); 132.4; 138.2; 152.5; 175.8; 191.1.

ESI-MS: 247.3 [M+1]⁺ teorico ; 247.1 [M+1]⁺ sperimentale.

4.15 Preparazione degli (3E/Z)-3-(2-osso-2-fenilettilidene)-eptanoati di metile (34) e (3E/Z)-3-butil-1-fenilept-3-ene-1,5-dione (34a).⁶⁶



In un tubo Schlenk munito di agitatore magnetico è stata messa la soluzione contenente la miscela di isomeri di **35** (80 mg; 0.32 mmol; 1 eq.) in DCM (1 mL) e MeOH (1 mL) anidri in cui è stato gocciolato trimetilsilildiazometano (soluzione 2 M in Et_2O ; 0.8 mL; 1.6 mmol; 5 eq; $0.773 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) a 0°C e sotto atmosfera inerte. La soluzione verdastrea è stata tenuta sotto agitazione per circa un'ora. Dopo che da un controllo su TLC (PE/AcOEt = 2/1) era stata evidenziata la scomparsa del prodotto di partenza e la formazione di un solo altro prodotto, è stato aggiunto alla miscela di reazione un ugual volume di acido acetico glaciale. La miscela è stata quindi diluita con AcOEt (10 mL) e lavata prima con una soluzione 5 M di NaOH (2 x 10 mL) e successivamente con una soluzione satura di NaHCO_3 (2 x 10 mL) ed infine con salamoia (2 x 10 mL). Dopo anidrifcazione su Na_2SO_4 , filtrazione e rimozione del solvente a pressione ridotta, è stato isolato un olio giallo che è stato purificato mediante cromatografia flash (SiO_2 ; PE/AcOEt = 9/1). Sono stati recuperati 24 mg (0.09 mmol) di prodotto **34** come miscela inseparabile degli isomeri *E/Z* e 26 mg

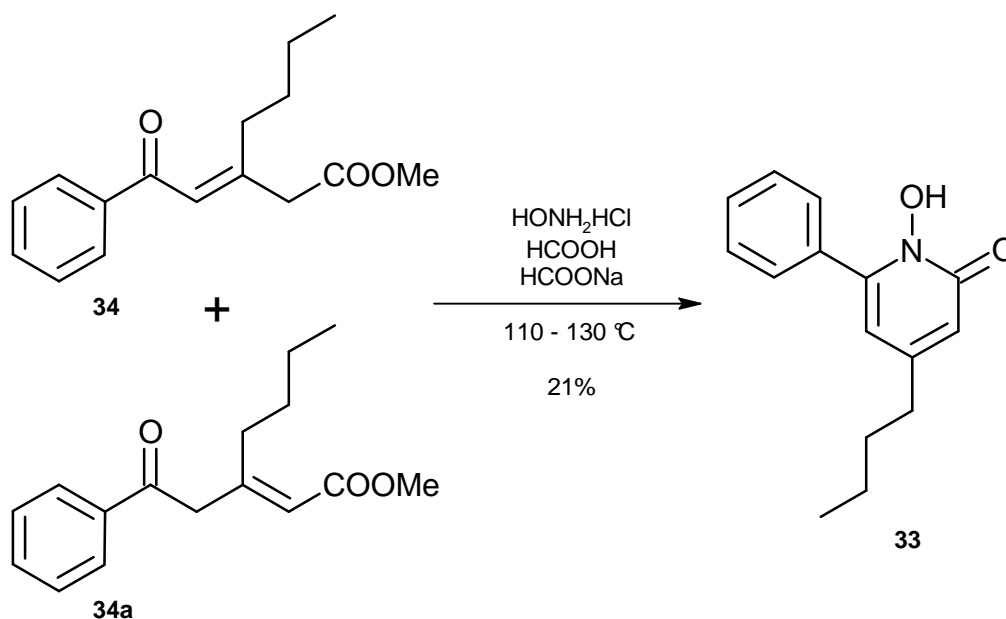
(0.1 mmol) di prodotto **34a** come miscela inseparabile degli isomeri *E/Z*. Rese % = 28% in **34** e 31% in **34a**.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.87 – 0.98 (m, 12H); 1.25 – 1.56 (m, 16H); 2.21 – 2.35 (m, 8H, **34**); 2.36 – 2.41 (m, 4H, **34a**); 3.21 (s, 2H, **34a**); 3.26 (s, 2H, **34a**); 3.55 – 3.61 (m, 12H); 5.72 (**34a**, s, 1H); 5.94 (**34a**, s, 1H); 6.91 (**34**, s, 1H); 6.98 (**34**, s, 1H); 7.27 – 7.55 (m, 6H); 7.86 – 8.01 (m, 4H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13.8 (**34**, **34a**); 21.2 (**34**); 22.3 (**34a**); 23.1 (**34**); 29.2 (**34a**); 39.2 (**34a**); 39.4 (**34**); 42.2 (**34a**); 42.7 (**34**); 51.0 (**34a**); 52.1 (**34**); 117.6 (**34a**); 119.2 (**34**); 128.1 (**34a**, x4); 128.5 (**34**, x4); 132.1 (**34**); 133.0 (**34a**); 136.9 (**34a**); 140.0 (**34**); 156.9 (**34a**); 166.8 (**34**, **34a**); 171.0 (**34**); 196.4 (**34**, **34a**).

GC-MS (m/z): 260 (1.85); 228 (5.13); 199 (2.19); 187 (3.29); 105 (100.00); 77 (33.41).

4.16 Preparazione del 4-butil-1-idrossi-6-fenilpiridin-2(1H)-one (33).⁵¹



In un pallone da 10 mL munito di agitatore magnetico sono stati introdotti la miscela di esteri **34** e **34a** (50 mg; 0.19 mmol; 1 eq.) e acido formico (1 mL; 1220 mg; 26.52 mmol; 1.22 g·mL⁻¹). Dopo aver portato la soluzione alla temperatura di 0°C, sono state aggiunte le pastiglie di NaOH (429 mg; 10.74 mmol). Dopo il completo scioglimento di NaOH, è stata aggiunta NH₂OH·HCl (15 mg; 0.2 mmol; 1.1 eq.). Dopo 24 ore sono stati aggiunti alla miscela di reazione KOH (53 mg, 0.95 mmoli; 5 eq) e metanolo (2mL). La soluzione è stata quindi mantenuta a riflusso per 12 ore. Dopo che dall'analisi TLC (DCM/MeOH = 15 / 1) è stata evidenziata una buona conversione del materiale di partenza, è stata scaldata la miscela gradualmente fino alla temperatura di 130°C, fino a completa evaporazione del metanolo e dell'acido formico. La miscela solida è stata così diluita con acqua e CH₂Cl₂ e dopo estrazione della fase acquosa con AcOEt, le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua e salamoia e anidificate su Na₂SO₄. Dopo filtrazione e rimozione del solvente è

stato isolato un olio che è stato purificato per cromatografia flash (SiO_2 ; DCM/MeOH = 22 /1). Sono stati isolati 10 mg (0.04 mol) di un olio di colore giallo corrispondente al prodotto (**33**). Resa % = 21%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.79 – 0.98 (m, 3H); 1.13 – 1.42 (m, 4H); 1.75 – 1.92 (m, 2H); 6.43 (s, 1H); 5.51 (s, 1H); 7.36 – 7.49 (m, 3H); 7.64 – 7.67 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.3; 24.4; 31.3; 34.6; 97.8; 126.1; 127.6 (x2); 128.1; 129.1 (x2); 134.9; 137.4; 153.2; 155.6.

ESI-MS: 244.05 $[\text{M}+1]^+$ teorico; 244.12 $[\text{M}+1]^+$ 242.06 $[\text{M}-1]^-$ sperimentale.

5 Riferimenti bibliografici.

- ¹ Maris J. M., Hogarty M. D., Bagatell R., Cohn S. L., *The Lancet*, **2007**, 369, 2106.
- ² Brodeur G., Maris J., *Neuroblastoma. Principles and practice of pediatric oncology*, **2006**, ed. Williams & Wilkins.
- ³ Brodeur G., *Nature Reviews Cancer*, **2003**, 3, 203.
- ⁴ Schwab M., Alitalo K., Klempnauer K. H., *Nature*, **1983**, 305, 245.
- ⁵ Modak S., Cheung N.K.V., *Cancer treat. rev.*, **2010**, 36, 307.
- ⁶ Brodeur G., Pritchard J., Berthold F., Carlsen N. L., Castel V., Castelberry R.P., De Bernardi B., *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment*, **1993**.
- ⁷ http://www.cncfhope.org/Neuroblastoma_Chemotherapy
- ⁸ Coggins P. R., Ravdin R. G., Eisman S. H., *Cancer*, **1960**, 13, 1254. Bergsagel D. E., Robertson G. L., Hasselback R., *J. Canad. Med. Ass.*, **1968**, 98, 532.
- ⁹ Gray K. J., Engelmann U. H., Johnson E. H., Fishman I. J., *J. Urol.*, **1986**, 136, 497.
- ¹⁰ Fraiser L. H., Kanekal S., Kehrer J. P., *Drugs*, **1991**, 42, 781.
- ¹¹ Watson N. A., Notley R. G., *Br. J. Urol.*, **1973**, 45, 606.
- ¹² Lefrak E. A., Pitha J., Rosenheim S., Gottlieb J. A., *Cancer*, **1973**, 32, 302.
- ¹³ Harrison D. T., Sanders L. A., *Ann. Intern. Med.*, **1976**, 85, 339.
- ¹⁴ *IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, **1987**, S7, 56.
- ¹⁵ Wang D., Lippard S. J., *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2005**, 4, 307.

Riferimenti bibliografici.

- ¹⁶ Arany I., Safirstein R. L., *Semin Nephrol*, **2003**, 23, 460.
- ¹⁷ Clarke J. T. R., Karpti G., Carpenter S., Wolfe L. S., *J. Neurop. Exper. Neur.*, **1972**, 2, 31.
- ¹⁸ Kaplan R. S., Wiernik P.H., *Semin. Oncol.*, **1982**, 9, 103.
- ¹⁹ Legha S. S., *Med. Toxicol. I*, **1986**, 6, 421.
- ²⁰ McEvoy, G. K. (ed.). *American Hospital Formulary Service- Drug Information 2004. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists, Inc.*, **2004.**, 988.
- ²¹ IARC. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, **2000**, V76, 238.
- ²² Bokkel H. W., Gore M., Carmichael J., *J. Clin. Oncol.*, **1997**, 15, 6, 2183. Kudelka A.P., Tresukosol D., Edwards C.L., *Clin. Oncol.*, **1996**, 14, 1552.
- ²³ Laverdiere C., Cheung N. K., Kushner B. H., *Pediatr. Blood. Cancer.*, **2005**, 45, 324. Hobbie W. L., Moshang T., Carlson C. A., *Pediatr. Blood. Cancer.*, **2008**, 51, 679.
- ²⁴ Tobinick E. L., **2009**, *Drug News Perspectives*, 22, 119.
- ²⁵ Cohen F. J., *Nat. Rev. Drug. Discovery*, **2005**, 4, 78.
- ²⁶ Ashburn T. T., Thor K. B., *Nat. Rev. Drug. Discovery*, **2004**, 3, 673.
- ²⁷ Rothstein J. D., Patel S., Regan M. R., Haenggeli C., Huang Y., Bergles D. E., Jin L., *Nature*, **2005**, 433, 73.
- ²⁸ <http://www.msdiscovery.com/home.html>.
- ²⁹ Quattrone A. ed altri, risultati non pubblicati.
- ³⁰ Bohn M., Kraemer K. T., *J. Am. Acad. Dermatol.*, **2000**, 43, 57.

Riferimenti bibliografici.

- ³¹ Farinelli S. E., Greene L., *The Journal of Neuroscience*, **1996**, 16, 1150.
- ³² Almeida B., Sampaio-Marques B., Carvalho J., Silva M. T., Leão C., Rodrigues F., Ludovico P., *FEMS Yeast Research.*, **2007**, 7, 404.
- ³³ Eberhard Y., Mcdermott S. P., Wang X., Gronda M., Venugopal A., Wood T. E., Hurren R., *Blood*, **2009.**, 14, 3064.
- ³⁴ Balabanov S., Gontarewicz A., Ziegler P., *Blood*, **2007**, 109, 1701.
- ³⁵ Zhou H., Shen T., Luo Y., Liu L., Chen W., Xu B., Han X., Pang J., a Rivera C., Huang S., *Int. J. Cancer*, **2010**, 1, 11.
- ³⁶ Sehgal V. N., *Brit. J. Derm.*, **1976**, 95, 83.
- ³⁷ Alpermann H. G., Schütz E., *Arzneimittelforschung*, **1981**, 31, 1328.
- ³⁸ Budach W., Budach V., Stuschke M., Schmauder B., Reipke P., Scheulen M. E., *Brit. J. Cancer*, **1994**, 70, 29.
- ³⁹ Kalinowski D. S., Richardson D. R., *Pharm. Rev.*, **2005**, 57, 547.
- ⁴⁰ Holfbrand A. V., Ganeshaguru K., Hooton J. W., Tattersall M. H., *Br. J. Haematol.*, **1976**, 33, 517.
- ⁴¹ PCT /US2011/038700, Jun. 1, **2011**. US 2012/0022115 A1. Jan 26, **2012**.
- ⁴² Offenlegungsschrift 1795831, Sep. 4, **1967**; United States Patent 3883545, May 13, **1975**.
- ⁴³ Paquette L. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 22, 5186. Hyo J. J., Ho-Joon P., Young-Gyun S., Young S. K., Sung-Hwa Y., **2008**, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 29, 11, 2277.
- ⁴⁴ Scarrow R. C., Riley P. E., Abu-Dari K., White D. L., Raymond K. N., **1985**, *Inorg. Chem.*, 24, 6, 954.

Riferimenti bibliografici.

- ⁴⁵ Knight D. W., Lewis P. B. M., Malik K. M. A., Mshvidobadze E. V., Vasilevsky S. F., **2002**, *Tetrahedron Lett.*, 43, 9187.
- ⁴⁶ Guimond N., Gouliaras C., Fagnou K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 6908.
- ⁴⁷ United States Patent 3972888, Aug. 3, **1976**.
- ⁴⁸ PCT/US/2007/085448, 29 May, **2008**.
- ⁴⁹ Luo T., Dai M., Zheng S. L., Schreiber S. L., **2011**, *Org. Lett.*, 13, 11, 2834.
- ⁵⁰ Seitz M., Pluth M. D., Raymond K. N., **2006**, *Inorg. Chem. Comm.*, 46, 351.
- ⁵¹ Lohaus G., Dittmar W., **1981**, *Arzneimittel-Forschung*, 31, 8A, 1311.
- ⁵² Deodhar K. D., Kekare M. B., Pednekar S. R., **1985**, *Synth. Comm.*, 3, 328.
- ⁵³ Defoin A., Augelmann G., Fritz H., Geffroy G., Schmidlin C., Streith J., **1985**, *Helv. Chim. Acta*, 68, 1998.
- ⁵⁴ Rauchfuss T. B., Zank G. A., **1986**, *Tetrahedron Lett.*, 27, 30, 3445.
- ⁵⁵ Lohaus G., Friedrich W., Jeschke J. P., **1967**, *Chem. Ber.*, 100, 658.
- ⁵⁶ Clayden J., **2001**, *Org. Chem. Oxford: Oxford University Press*, 276.
- ⁵⁷ McIntosh C. L., Chapman O. L., **1972**, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 1, 247.
- ⁵⁸ Massaro A., Mordini A., Reginato G., Russo F., Taddei M., **2007**, *Synthesis*, 3201.
- ⁵⁹ Sneddon H. F., Gaunt M. J., Ley S. V., **2003**, *Org. Lett.*, 5, 7, 1147.
- ⁶⁰ Egi M., Azechi K., Saneto M., Shimizu K., Shuji A., **2010**, *J. Org. Chem.*, 75, 2123.
- ⁶¹ Suffert J., Toussaint D., **1995**, *J. Org. Chem.*, 60, 3550.
- ⁶² Tanaka Y., Kanai M., Shibasaki M., **2010**, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 8862.

Riferimenti bibliografici.

- ⁶³ Corey E. J., Venkateswarlu A., **1972**, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 17, 6190.
- ⁶⁴ Nakahata T., Itagaki N., Arai T., Sugie H., Kuwahara S., **2003**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 12, 2627.
- ⁶⁵ Meinwald J., Crandall J., Hymans W. E., **1973**, *Org. Synth., Coll. Vol.*, 5, 866.
- ⁶⁶ Clayden J., Knowles F. E., Baldwin I. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 2412.
- ⁶⁷ Emanuel B. S., Balaban G., Boyd J. P., Grossman A., Negishi M., Parmiter A., Glick M. C., **2001**, *J. Clin. Pathol.*, 54, 12, 897.
- ⁶⁸ Marini P., MacLeod R. A., Treuner C., Bruchelt G., Bohm W., Wolburg H., Schweizer P., Girgert R., **1999**, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 112, 2, 161.
- ⁶⁹ Bazzicalupi C., Bencini A., Giorgi C., Valtancoli B., Lippolis V., Perra A., **2011**, *Inorg. Chem.*, 50, 7202.