

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

**Identificazione di un potente aza-analogo di TN-16 ad attività
antitubulinica**

Relatore

Prof.^{ssa} Ubaldina Galli

Candidata

Lavinia Magni

Anno Accademico 2025-2026

Sessione estiva

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

MT: microtubuli

GTP: guanosina trifosfato

GDP: guanosina difosfato

MTOC: centro di organizzazione dei microtubuli

MAP: proteine associate ai microtubuli

APC/C: *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*

SAC: *Spindle Assembly Checkpoint*

MTA: *Microtubule-Targeting Agents*

MSA: agenti stabilizzanti i microtubuli

MDA: agenti destabilizzanti i microtubuli

CA-4: combretastatina A-4

MDR: multiresistenza ai farmaci

P-gp: glicoproteina P

VDA: agenti di distruzione vascolare

CBS: sito di legame della colchicina

SAR: relazioni struttura-attività

EC₅₀: concentrazione effettiva semi-massimale

MCR: reazione multicomponente

THF: tetraidrofurano

PCl₃: tricloruro di fosforo

PBr₃: tribromuro di fosforo

CH₂Cl₂: diclorometano

K₂CO₃: carbonato di potassio

DMF: dimetilformammide

MeOH: metanolo

SOCl₂: cloruro di tionile

CH₃CN: acetonitrile

PPh₃: trifenilfosfina

DEAD: azodicarbossilato di dietile

NH₄Cl: cloruro di ammonio

EtOH: etanolo

DMSO: dimetilsolfossido

CH₃COOH: acido acetico

CuSO₄ · 5H₂O: solfato di rame pentaidrato

t-BuOH: tert-butanolo

TMSN₃: trimetilsililazide

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
Microtubuli e tubulina	3
Principi attivi antimitotici	8
Sito di legame della colchicina: domini strutturali e modello farmacoforico	13
TN-16 e analoghi strutturali	19
2. SCOPO DEL LAVORO	25
3. SINTESI CHIMICA E RISULTATI BIOLOGICI	29
Sintesi dell'intermedio benzilpirazolidindionico comune	31
Sintesi dei benzilbromuri	32
Sintesi delle aniline	34
Sintesi degli aza-analoghi di TN-16	42
Risultati biologici	51
4. CONCLUSIONI	57
5. PARTE SPERIMENTALE	61
Preparazione dell'intermedio 1-benzilpirazolidin-3,5-dione (3)	64
Sintesi dei benzilbromuri	65
Sintesi delle aniline via 3-idrossiacetanilide	69
Sintesi delle aniline via 3-nitrofenolo	80
Sintesi degli aza-analoghi di TN-16	105
6. BIBLIOGRAFIA	157

1. Introduzione

Microtubuli e tubulina

Struttura e organizzazione

I microtubuli (MT) rappresentano una delle principali componenti del citoscheletro nelle cellule eucariotiche. Essi si configurano come strutture cilindriche cave, caratterizzate da un diametro interno di circa 15 nm ed un diametro esterno di 24 nm.

Ciascun MT è costituito dall'associazione parallela di 13 lunghi polimeri lineari, denominati protofilamenti; a loro volta, i protofilamenti sono formati da eterodimeri di α -tubulina e β -tubulina, due proteine globulari ad alta omologia di sequenza, che si assemblano secondo una disposizione elicoidale.¹

Gli eterodimeri α/β presentano un orientamento longitudinale che determina l'alternanza regolare delle singole subunità lungo il protofilamento, conferendo alla struttura polarità intrinseca. L'estremità del protofilamento che espone la subunità β è denominata *plus-end* ed è caratterizzata da una cinetica di accrescimento rapida, mentre l'estremità opposta, che espone la subunità α , è definita *minus-end* e presenta una crescita più lenta (**Figura 1**).

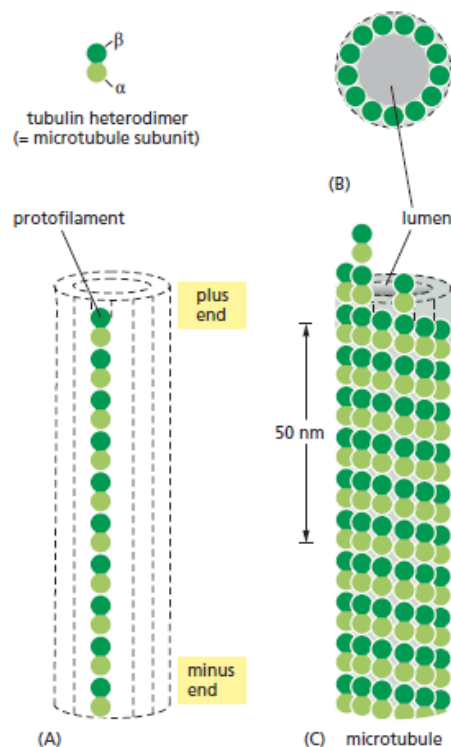


Figura 1: organizzazione strutturale del microtubulo. (A) Rappresentazione schematica dell'eterodimero di tubulina. (B) sezione trasversale del microtubulo. (C) Veduta di insieme della struttura cilindrica.²

Entrambe le subunità condividono un'organizzazione strutturale analoga, articolata in tre domini: un dominio C-terminale, un dominio intermedio e un dominio N-terminale. Il dominio N-terminale ospita il sito di legame per la guanosina trifosfato (GTP). Sebbene ciascuna subunità dell'eterodimero sia in grado di legare GTP ad alta affinità, solo il nucleotide legato alla subunità β (al sito *exchangeable*, E-site) può essere idrolizzato a guanosina difosfato (GDP). Al contrario, il nucleotide legato alla subunità α (al sito *non-exchangeable*, N-site) rimane intrappolato all'interfaccia dimerica, mantenendo stabilmente la conformazione trifosfato.³

All'interno dell'ambiente cellulare, i MT nucleano dal centro organizzatore dei microtubuli (MTOC), dove complessi ad anello di γ -tubulina (γ -TuRC) fungono da sito di nucleazione, facilitando l'assemblaggio degli α/β dimeri citosolici e promuovendo la conseguente transizione verso la forma polimerica.⁴

Instabilità dinamica

I MT sono strutture altamente dinamiche e alternano continuamente e rapidamente periodi di crescita e di contrazione, mediante l'aggiunta o la rimozione di eterodimeri di tubulina. Tale processo è mediato dall'idrolisi del GTP legato alla β -tubulina. Specificamente, poco dopo l'incorporazione del dimero di tubulina nel MT in accrescimento, il GTP viene idrolizzato a GDP. Questo evento induce un cambiamento conformazionale nel protofilamento, che tende ad incurvarsi verso l'esterno del microtubulo, rendendo i legami inter-dimerici più labili. Quando la polimerizzazione all'estremità *plus-end* procede rapidamente, la velocità di addizione dell' α/β -tubulina supera quella dell'attività GTP-asi intrinseca, consentendo la formazione del GTP-cap. Il GTP-cap mantiene una conformazione lineare che conferisce stabilità al MT in accrescimento, impedendo la deflessione dei protofilamenti verso l'esterno e la conseguente perdita di stabilità strutturale, permettendo l'accrescimento del MT. Al contrario, qualora l'idrolisi del GTP avvenga prima dell'aggiunta del successivo eterodimero, si assiste alla perdita del GTP-cap; ciò determina una destabilizzazione strutturale del complesso in grado di innescare la depolimerizzazione del MT, la quale procede con una cinetica notevolmente più rapida rispetto alla fase di allungamento. Il passaggio repentino dalla fase di accrescimento ad una di contrazione prende il nome di "catastrofe".⁵ (**Figura 2**).

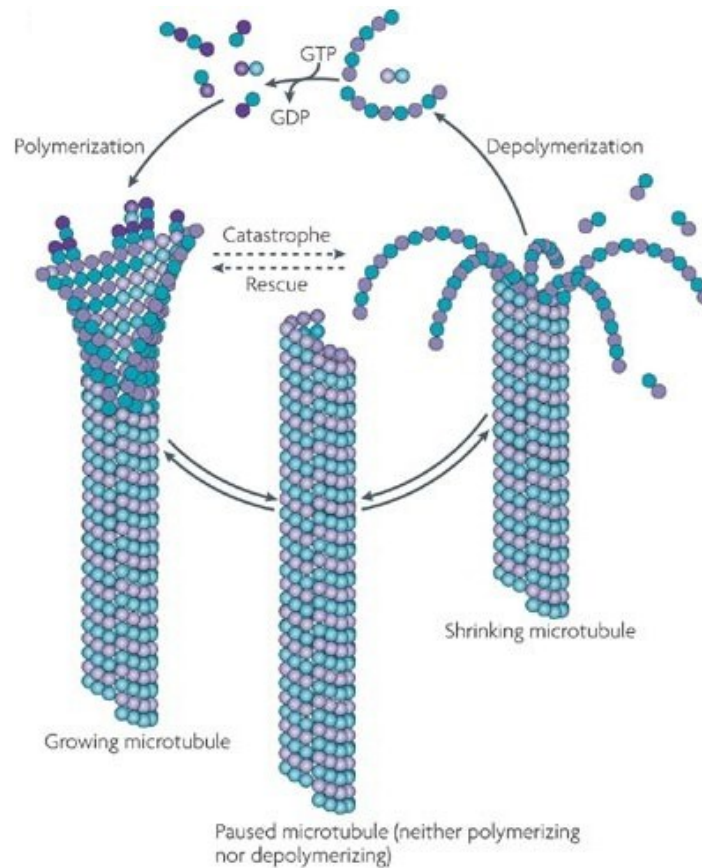


Figura 2: Rappresentazione schematica del ciclo di instabilità dinamica dei microtubuli⁶.

All'interno dell'ambiente cellulare, la dinamica dei MT vede la fine regolazione da parte di un'ampia varietà di proteine, le quali possono avere funzione stabilizzante o destabilizzante. Tra le proteine con effetto stabilizzante spiccano le MAP (*Microtubule-Associated Proteins*) non motrici, una famiglia di proteine ad alto peso molecolare, in grado di interagire tramite il proprio dominio C-terminale con la superficie del MT, impedendone la depolimerizzazione. A differenza delle MAP, esistono proteine in grado di destabilizzare il MT, quali la statmina e la catanina. La statmina è in grado di indurre la fase di catastrofe destabilizzando direttamente il MT in accrescimento al quale si lega, oppure legando direttamente gli eterodimeri liberi nel citosol, mentre, la catanina, promuove la frammentazione del MT rivestendo un ruolo fondamentale nel rimodellamento del fuso mitotico.⁷

Funzioni dei microtubuli

I MT sono coinvolti in molteplici processi cellulari: hanno un ruolo essenziale nel mantenimento della forma della cellula, nella sua motilità, nella trasduzione del segnale, nel

trasporto intracellulare e nei meccanismi di secrezione; tuttavia, è il ruolo nella proliferazione cellulare che li ha resi un importante target nella terapia antineoplastica.

I MT sono componenti fondamentali del fuso mitotico, struttura intracellulare deputata alla separazione dei cromosomi durante la mitosi. All'interno del fuso si distinguono tre tipologie funzionali di microtubuli:

- MT dell'aster: interagendo con la corteccia actinica della membrana citoplasmatica, ancorano i poli del fuso nella corretta posizione spaziale.
- MT interpolari: si irradiano verso la regione equatoriale della cellula, interagendo mediante proteine motrici con quelli provenienti dal MTOC del polo opposto, garantendo la simmetria e la stabilità strutturale del fuso.
- MT del cinetocore: si agganciano ai cinetocori presenti a livello dei centromeri dei cromosomi, garantendone la corretta segregazione.

L'assemblaggio del fuso mitotico ha inizio durante la profase della mitosi, ma è durante la metafase che i MT stabiliscono il legame con il cinetocore dei cromosomi disposti sulla piastra equatoriale della cellula; tale evento è propedeutico alla segregazione dei cromatidi fratelli ai poli opposti della cellula durante l'anafase.

Il passaggio dalla metafase all'anafase è regolato dallo *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC), meccanismo di controllo deputato a verificare che tutti i cromosomi duplicati siano adeguatamente ancorati ai MT e sottoposti a tensione bipolare.

L'eventuale presenza di cinetocori non agganciati innesca il reclutamento del complesso proteico Mad/Bub con conseguente inibizione di Cdc20. Tale inibizione impedisce l'attivazione del complesso *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C), bloccando la cascata di ubiquitinazione necessaria alla degradazione sia della securina (inibitore della separasi, enzima deputato alla scissione delle coesine che tengono uniti i cromatidi), sia della ciclina B (proteina regolatrice della chinasi mitotica Cdk1) (**Figura 3**).

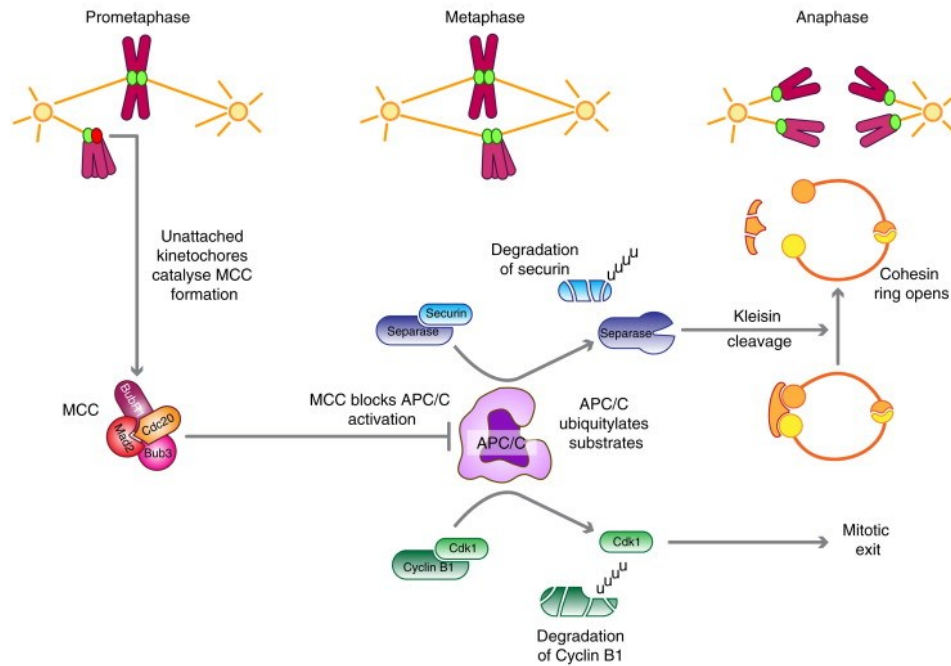


Figura 3: Meccanismo molecolare del controllo dello *Spindle Assembly Checkpoint*.⁸

Questo evento impedisce l'entrata in anafase, prevenendo fenomeni di errata segregazione cromosomica e la conseguente insorgenza di aneuploidia delle cellule figlie. Il protrarsi del blocco in metafase determina l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi, conducendo la cellula a morte programmata. Tale effetto può essere indotto anche mediante agenti esterni in grado di interferire con la dinamica del fuso mitotico, inibendo sia la polimerizzazione che la depolimerizzazione.⁹

Principi attivi antimitotici

Gli antimitotici sono sostanze in grado di interagire con i dimeri di α/β -tubulina, interferendo con la dinamica dei MT ed impedendo il superamento del SAC. Gli agenti che agiscono sui microtubuli (MTA, *Microtubule-Targeting Agents*) hanno trovato ampio impiego nei protocolli terapeutici di molteplici forme tumorali, sia nell'adulto che nel paziente pediatrico.

Gli MTA possono essere classificati in due classi, in base agli effetti determinati sulla dinamica microtubulare:

1. Agenti stabilizzanti (MSA, *Microtubule-Stabilizing Agents*);
2. Agenti destabilizzanti (MDA, *Microtubule-Destabilizing Agents*).

Agenti stabilizzanti i microtubuli (MSA)

Gli MSA comprendono un gruppo di composti strutturalmente eterogenei, capaci di legarsi alla tubulina e di impedirne la depolimerizzazione. Questo meccanismo induce la cristallizzazione del fuso mitotico e la formazione di strutture aberranti, come aster multipli o fasci di MT impacchettati. La maggior parte delle molecole appartenenti a questa classe si lega al sito dei taxani, localizzato sulla superficie interna del MT a livello del dominio intermedio della β -tubulina, costituito da tre α -eliche e un foglietto β misto.

A questa famiglia appartengono i taxani, classe che vede come capostipite il paclitaxel (principio attivo di origine naturale, isolato originariamente dalla corteccia di *Taxus brevifolia*) (**Figura 4.A**) e i suoi derivati semisintetici di seconda e terza generazione, quali docetaxel e cabazitaxel.¹⁰

Un'ulteriore classe di farmaci ad azione stabilizzante è rappresentata dagli epotiloni (**Figura 4.B**), polichetidi isolati dal mixobatterio *Sorangium cellulosum*. Essi si legano al medesimo sito di legame dei taxani, seppur interagendo con residui amminoacidici diversi. Rispetto ai taxani, gli epotiloni mostrano vantaggi farmacocinetici e farmacodinamici, tra cui l'azione citotossica contro linee cellulari tumorali resistenti ai taxani e una minore suscettibilità ai meccanismi di chemioresistenza mediati dalla glicoproteina-P.¹¹

Esistono inoltre MSA che interagiscono con la β -tubulina legandosi a siti non taxanici: ne sono un esempio la laulimalide e la peloruside A, macrolidi di origine marina che mostrano attività sinergica se somministrati in combinazione con i taxani.¹²

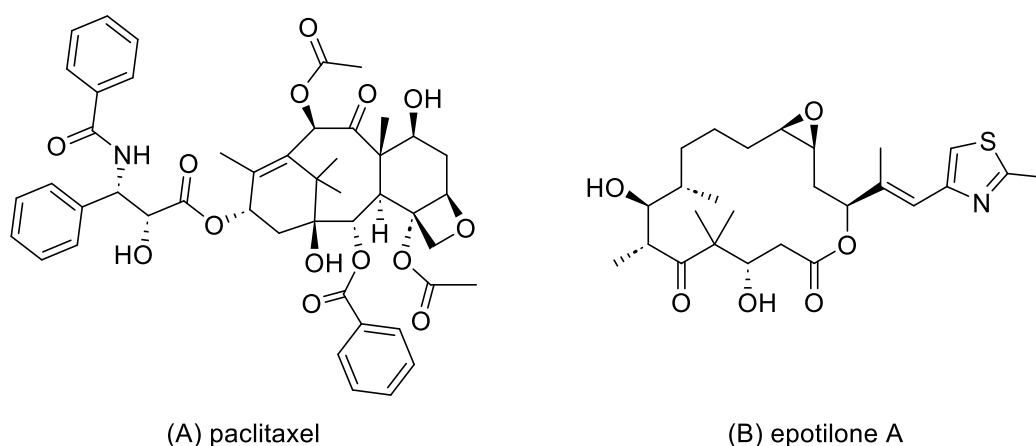


Figura 4: Strutture chimiche dei principali MSA. (A) Struttura del paclitaxel. (B) Struttura dell'epotilone A.

Agenti destabilizzanti i microtubuli (MDA)

Gli MDA, contrariamente agli MSA, dopo essersi legati alla tubulina impediscono la polimerizzazione del MT e ne promuovono la depolimerizzazione. Gli agenti destabilizzanti possono essere ulteriormente suddivisi in due categorie principali in base al loro specifico sito di legame sul target, distinguendosi in agenti che interagiscono con il dominio degli alcaloidi della vinca e quelli che si legano al dominio della colchicina.

Agenti leganti il dominio della vinca

Questa famiglia comprende gli alcaloidi della vinca, molecole in grado di instaurare un legame specifico con la β -tubulina in prossimità del sito di legame con il GTP, a livello dell'interfaccia tra due eterodimeri adiacenti sul versante esterno del MT. Tale interazione determina una modificazione conformazionale che incrementa la coesione tra i dimeri.¹³ I principali esponenti di questo gruppo di antimitotici sono vincristina e vinblastina, estratte dalle foglie di *Catharanthus roseus*, le quali trovano tuttora impiego in ambito antineoplastico, sia in regime di monoterapia che all'interno di protocolli terapeutici combinati. Oltre ai composti di origine naturale, sono stati sviluppati derivati semisintetici di rilevanza clinica, tra cui la vinorelbina (**Figura 5**). Il meccanismo d'azione di questi principi attivi presenta una variabilità di effetto strettamente correlata alla loro concentrazione citoplasmatica:¹⁴

- A basse concentrazioni: si legano selettivamente all'estremità *plus-end* del MT, bloccandone la dinamica senza tuttavia indurre una massiva depolimerizzazione;

- Ad alte concentrazioni: interagiscono anche con i dimeri di tubulina liberi nel citosol, inducendo un cambio conformazionale nell' α/β -tubulina che impedisce l'assemblaggio in protofilamenti lineari e ne favorisce l'auto-associazione laterale, con conseguente formazione di aggregati paracristallini. Questo effetto si traduce nella depolimerizzazione dei MT del fuso, dovuta alla progressiva depauperazione del pool di tubulina libera nel citoplasma e dal conseguente spostamento dell'equilibrio chimico della reazione di polimerizzazione.

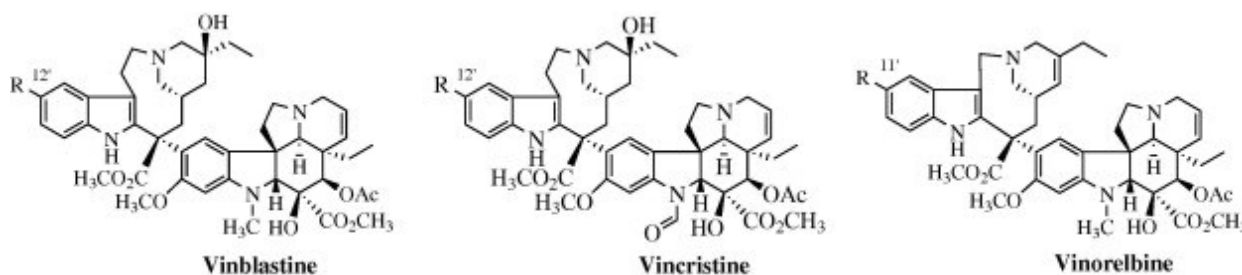


Figura 5: strutture dei principali alcaloidi della vinca ed evidenza dei vettori di modificazione strutturale.¹⁵

Agenti leganti il dominio della colchicina

I principi attivi appartenenti a questa classe si legano ad una tasca idrofobica localizzata all'interfaccia tra le subunità α e β dell'eterodimero di tubulina. In modo analogo a quanto osservato per gli alcaloidi della vinca, l'interazione con il target induce un cambio conformazionale che impedisce alla tubulina di formare protofilamenti lineari e stabili.

Il capostipite di questa classe è la colchicina (**Figura 6**), un alcaloide di origine naturale isolato dal *Colchicum autumnale*. Analogamente agli alcaloidi della vinca, gli effetti indotti dalla colchicina sono dose-dipendenti: a basse concentrazioni la colchicina interagisce con gli eterodimeri di tubulina liberi nel citosol, inducendone il cambio conformazionale; il complesso colchicina-tubulina così formato, una volta incorporato all'estremità *plus-end* del MT, ne inibisce la dinamica senza tuttavia causarne la depolimerizzazione. Diversamente, ad alte concentrazioni, il farmaco è in grado di indurre la transizione verso un'instabilità catastrofica, che conduce alla depolimerizzazione del MT preformato.¹⁶

Questo principio attivo ha ricoperto un ruolo cardine nello studio dei meccanismi mitotici e della dinamica della tubulina. Tuttavia, sebbene sia impiegata nella clinica per il trattamento di

diverse patologie su base infiammatoria (ad esempio: gotta, pericardite e febbre mediterranea familiare), la colchicina non ha mai trovato impiego come farmaco antitumorale a causa del suo profilo di tossicità e delle criticità legate alla farmacocinetica.

Al fine di superare le limitazioni dovute al ristretto intervallo terapeutico e di ottimizzare il profilo ADME della colchicina, la ricerca recente ha permesso di sviluppare innovativi approcci per migliorarne le proprietà farmacologiche. Nello specifico, sono stati progettati derivati sintetici e semisintetici volti ad ampliare la finestra terapeutica e a migliorarne la solubilità; inoltre sono state proposte strategie basate sulle nanoformulazioni al fine di ottenere un più preciso trasporto del principio attivo alla cellula target, riducendone la tossicità sistemica.

Le combretastatine sono principi attivi che interagiscono con la β -tubulina legandosi al medesimo sito di legame della colchicina. Queste molecole sono state isolate per la prima volta da G. Robert Pettit dalla corteccia del *Combretum caffrum*, albero originario del Sud Africa, noto come “salice africano”.¹⁷ Dal punto di vista chimico presentano una struttura stilbenica che conferisce loro una marcata somiglianza tridimensionale con la colchicina. Il capostipite della classe è la combretastatina A-4 (CA-4) (**Figura 6**), la quale instaura il legame con la molecola target con una cinetica più rapida rispetto a quella della colchicina. La CA-4 è un potente agente antimitotico, noto per la capacità di indurre citotossicità in un’ampia gamma di cellule tumorali, comprese quelle che esprimono fenotipi di multiresistenza ai farmaci (MDR) mediati dalla sovraespressione della P-gp e con sovraespressione dell’isoforma della β_{III} -tubulina.

Inoltre, le combretastatine, a concentrazioni sub-citotossiche, agiscono come agenti di distruzione vascolare (VDA); tale effetto è strettamente dipendente dal riarrangiamento del citoscheletro indotto dal blocco della dinamica microtubulare: l’inibizione della polimerizzazione porta le cellule endoteliali rivestenti i vasi sanguigni neoformati del tumore a passare da una forma piatta ad una forma sferica. Ciò comporta un drastico restringimento del lume vascolare, che culmina con ischemia della massa neoplastica.¹⁸ La CA-4 presenta come principale limite clinico l’elevata lipofilia; Al fine di superare questa caratteristica farmacocinetica sono state sviluppate delle pro-drug idrosolubili, tra cui la combretastatina A-4 fosfato (CA-4P).

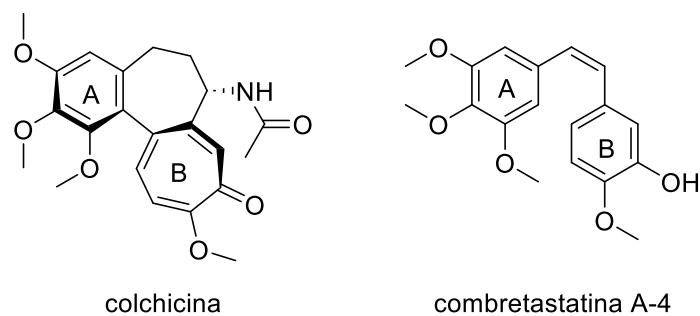


Figura 6: Strutture della colchicina e della combretastatina A-4.

Sono attualmente in fase di studio anche molecole strutturalmente eterogenee e non correlabili alla colchicina in grado di interagire con il medesimo sito di legame,¹⁶ tra cui:

- Benzimidazoli: derivati caratterizzati da un nucleo benzimidazolico, originariamente impiegati in ambito antiparassitario.
- ABT-751: una sulfonammide amminobenzolica, sviluppata da Abbott al fine di ottenere vantaggi farmacodinamici.
- **TN-16**: derivato dell'acido tetramico, impiegato prevalentemente a scopo sperimentale.

Sito di legame della colchicina: domini strutturali e modello farmacoforico

Il sito di legame della colchicina (CBS), come descritto in precedenza, è localizzato all'interfaccia intra-dimerica, tra le subunità α e β costituenti il dimero di tubulina. La pietra miliare per la caratterizzazione biologica e strutturale del CBS è rappresentata dallo studio pubblicato nel 2004 da R.B.G. Ravelli e collaboratori. Questo studio ha visto l'utilizzo del complesso T₂R- N-deacetil-N-(2-mercaptoacetil) colchicina (DAMA-colchicina) (**Figura 7**). Il Complesso T₂R è costituito da due eterodimeri di tubulina legati al dominio *stathmin-like* della proteina RB3; ciò permette di mantenere la tubulina in forma solubile non polimerizzata, rendendola idonea alla diffrazione dei raggi X. La DAMA-colchicina è un derivato sintetico della colchicina che presenta un gruppo mercaptoacetilico: l'inserimento dello zolfo in struttura determina l'introduzione di un centro a maggior densità elettronica che agisce come marker anisotropo durante la mappatura della diffrazione dei raggi X, senza però alterare l'orientamento spaziale e l'affinità originarie della colchicina. Il lavoro di Ravelli e coautori ha permesso di superare il limite della cristallizzazione della tubulina, di determinare l'esatta localizzazione e topografia del CBS e di spiegare il meccanismo biofisico alla base dell'inibizione della polimerizzazione, noto come "*Straight-to-Curve*".¹⁹

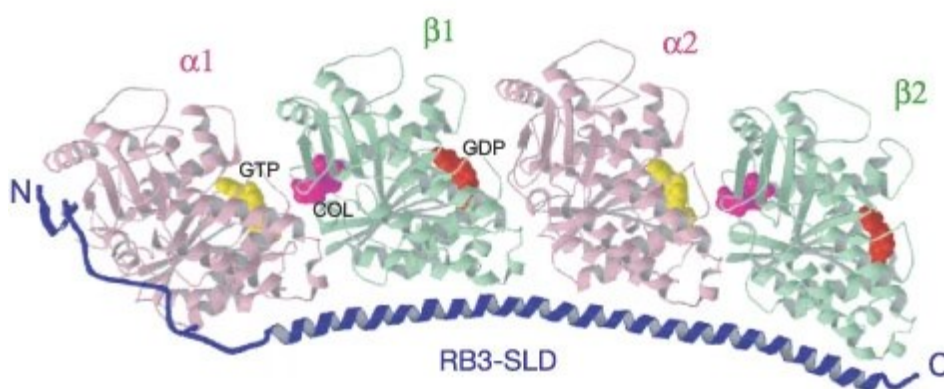


Figura 7: Struttura complesso DAMA-colchicina- T₂R.¹⁹

Topografia e struttura del CBS

Il CBS è una tasca idrofobica confinata tra il core della subunità β e il dominio GTP-asico della subunità α . Da un punto di vista topografico esso è suddivisibile in tre zone principali (**Figura 8**), ognuna deputata all'alloggiamento di una porzione specifica del ligando.²⁰

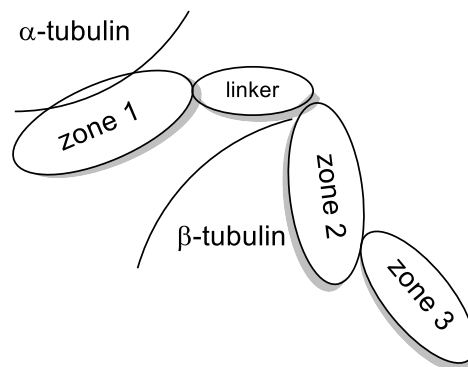


Figura 8: Schematizzazione zone del dominio della colchicina.

Zona 1: regione accessoria all'interfaccia intra-dimero

Localizzata a livello dell'interfaccia tra la subunità α e la subunità β , la zona 1 è deputata all'interazione mediante legami idrogeno con l'anello B troponilico della colchicina. Gli amminoacidi cruciali in questa zona sono sia appartenenti alla subunità β (Asn β 258 e Met β 259), che al loop T7 della subunità α (Thr α 179 e Val α 181).

Zona 2: tasca idrofobica profonda

Localizzata interamente nel core idrofobico della β -tubulina, la zona 2 è deputata a ospitare l'anello A trimetossifenilico della colchicina, stabilendo interazioni di Van der Waals. I residui cruciali di questa zona includono gli amminoacidi:

- Cys β 241: principale responsabile dell'affinità termodinamica di legame; mediante il proprio gruppo tiolico stabilisce interazioni a corto raggio con il gruppo metossilico in C-3 e con il nucleo benzenico.
- Leu β 248, Leu β 255, Ile β 318 e Val β 315: costituiscono le pareti e il fondo della tasca idrofobica; isolano stericamente l'anello A dal solvente acquoso circostante.

- Ala β 250: grazie alla corta catena laterale metilica, fornisce lo spazio fisico idoneo per ospitare il sostituito metossilico in C-4.

Zona 3: regione accessoria profonda

Localizzata nelle porzioni più profonde della subunità β , la Zona 3 è costituita da amminoacidi polari ed è implicata nella coordinazione elettrostatica mediante la formazione di legami idrogeno con il ligando. Questa sotto-tasca riveste un ruolo strategico nella moderna progettazione farmaceutica: modificando la struttura dell'anello A della molecola nativa e inserendo gruppi più ingombranti capaci di estendere l'interazione in questa zona, è possibile ottenere derivati con un'affinità di legame superiore. Questa strategia è estremamente di interesse per contrastare tumori aggressivi e chemioresistenti che sovraesprimono l'isotipo β_{III} -tubulina nei *loop* adiacenti alla tasca. Tale sovraespressione comporta un'alterata composizione amminoacidica dei *loop*, riducendo l'affinità target-ligando tradizionale. La progettazione di molecole che interagiscano in modo ottimale con il network amminoacidico della Zona 3 permette di superare le modifiche determinate da questa isoforma.

Modelli farmacoforici del CBS

L'analisi computazionale e la cristallografia a raggi X hanno permesso, nel corso degli anni, di definire l'insieme minimo delle caratteristiche chimico fisiche e spaziali necessarie affinché una molecola possa legarsi efficacemente al CBS, determinando l'inibizione della polimerizzazione dei microtubuli. Uno dei primi modelli integrati di tipo *structure-based* è stato proposto nel 2005 da Nguyen e collaboratori.²¹

Questo modello definisce sette punti di interazione essenziali (features), collocati su due differenti piani spaziali, che comprendono: due centri idrofobici principali (H_1 e H_2), tre accettori di legame a idrogeno (A_1 , A_2 , e A_3), un gruppo donatore di legami idrogeno (D_1) ed un sistema planare (R_1) (**Figura 9**). Di queste sette features, Nguyen stabilì che i requisiti minimi strutturali che i ligandi devono possedere per espletare l'attività biologica sono: R_1 , H_1 , H_2 e A_2 .

Le caratteristiche di questi features essenziali sono:

- R_1 : definisce la restrizione spaziale bidimensionale dell'anello A. Deve trattarsi di un sistema coniugato aromatico planare (ibridazione sp^2), configurazione necessaria al fine

di evitare repulsioni steriche con i residui amminioacidici circostanti. Tale planarità è fondamentale per orientare nello spazio circostante i gruppi elettron-attrattori ad esso legati.

- H_1 : definisce una sfera di elevata lipofilia che guida il processo di desolvatazione termodinamica del sito. Deve, inoltre, avere alta densità elettronica, al fine di consentire all'anello A di rimanere ancorato stabilmente al CBS, stabilendo contatto con i residui $Val\alpha181$ e $Met\beta259$.
- H_2 : definisce la seconda porzione idrofobica della molecola situata a livello dell'anello B. Rispetto alla Feature H_1 , mostra una tolleranza volumetrica più elevata e interagisce con le catene laterali di $Leu\beta255$, $Ala\beta316$, $Val\beta318$ e $Ile\beta378$.
- A_2 : deve essere costituito da un atomo fortemente elettronegativo con doppietti elettronici non condivisi, in grado di attrarre la densità elettronica del donatore proteico. Tipicamente è identificato dall'ossigeno etereo del metossile in posizione C-3 dell'anello A, il quale prende contatto con $Cys\beta241$ e viene ulteriormente stabilizzato stericamente da $Ala\beta250$.

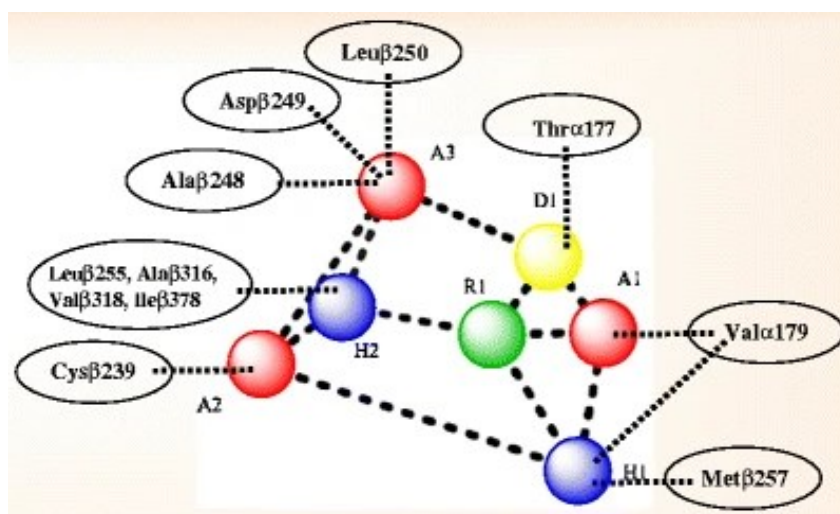


Figura 9: Modello farmacoforico a sette punti di Nguyen.¹⁶

Il modello farmacoforico di Nguyen e coautori è stato progressivamente integrato grazie all'avvento di metodologie computazionali avanzate e approcci dinamici. I principali limiti del modello risiedevano nell'assunto che il CBS fosse una tasca rigida; negli ultimi anni, sono stati

sviluppati modelli farmacoforici dinamici, i quali integrano il farmacoforo con traiettorie di dinamica molecolare, catturando i movimenti conformazionali dei loop amminoacidici del target durante l'interazione con il ligando.²² Inoltre, sono stati proposti modelli espansi che includono nuovi vettori specifici per l'interazione con Lys β 254 e Asn β 258. Tali interazioni, spesso mediate dall'inserimento di eterocicli azotati, permettono a molecole di nuova generazione di ottimizzare la stabilità termodinamica del complesso e di superare le resistenze tipiche quali, la multiresistenza ai farmaci mediante sovraespressione di P-gp e l'insensibilità ai principi attivi indotta dalla sovraespressione β III-tubulina.²³

Classificazione strutturale dei ligandi del CBS

I ligandi del CBS possono essere classificati in due raggruppamenti principali in base al loro *scaffold*: composti che presentano omologie tridimensionali con la colchicina (*colchicine-like*) e molecole dotate di struttura non correlabile ad essa (*non-colchicine-like*) (**Figura 10**).²³

Tra i ligandi *colchicine-like* si annoverano molecole come l'isocolchicina, la CA-4 e la podofilotossina. Questi composti hanno la caratteristica comune di interagire prevalentemente con la zona 1 e la zona 2 del CBS.²⁰ Tali ligandi condividono requisiti strutturali comuni, tra cui: la presenza di sistemi rigidi o semirigidi che proiettano nello spazio gruppi corrispondenti alle *feature* H₁ e H₂, un'architettura non planare ed un ponte di collegamento (*linker*) tra anello A e anello B, che ne permette la corretta allocazione nelle rispettive zone, le quali risultano distanziate tra loro; questo *linker* idrocarburico puro interagisce marginalmente con il CBS e risulta esposto verso il canale del solvente.

Al contrario, il gruppo delle molecole strutturalmente non correlate alla colchicina, comprende composti quali il nocodazolo, il TN-16 e l'MI-181. Queste molecole presentano un'architettura più compatta rispetto a quelle del primo gruppo e interagiscono prevalentemente con la zona 2 e la zona 3 del CBS, localizzandosi più in profondità all'interno della subunità β della tubulina.²⁴ I composti appartenenti a questo secondo gruppo sono caratterizzati dalla sostituzione dell'anello A trimetossifenilico con sistemi aromatici semplici o nuclei eterociclici. Inoltre, l'impiego di strutture azotate come *linker*, consente di incrementare l'interazione polare netta con il target. Queste molecole sfruttano un asse di penetrazione longitudinale ed esteso, che vede la presenza di catene laterali e porzioni aromatiche terminali idonee a instaurare contatti diretti con i residui stabili della zona 3, ottimizzando il profilo di affinità.

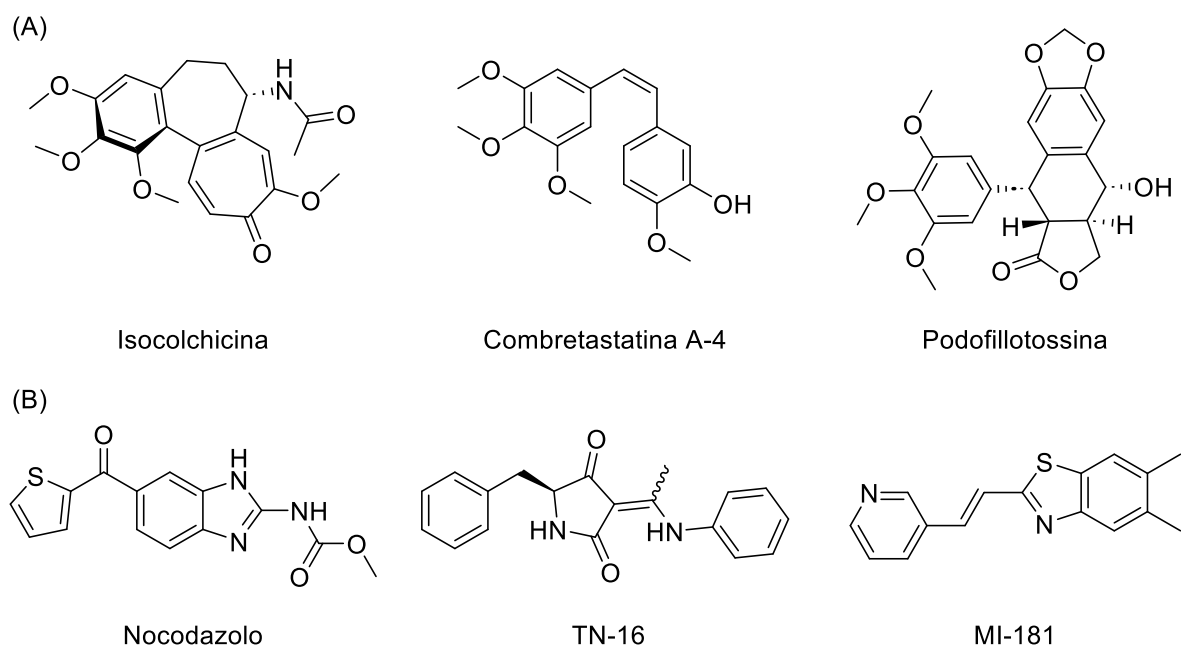


Figura 10: Strutture ligandi del CBS. **(A)** Ligandi *colchicine-like*. **(B)** Ligandi *non-colchicine-like*.

TN-16 e analoghi strutturali

Il **TN-16** è stato originariamente sintetizzato nel 1967 nell'ambito di uno screening di modificazione chimica dell'acido tenuazonico,²⁵ un antibiotico naturale isolato per la prima volta dieci anni prima dal fungo *Alternaria tenuis* (**Figura 11**). Fin dalle prime fasi di saggio, il composto ha mostrato straordinaria attività citotossica, ma si è dovuto attendere il 1983 per la decodifica del suo meccanismo d'azione molecolare, riportata negli studi di T. Arai.²⁶

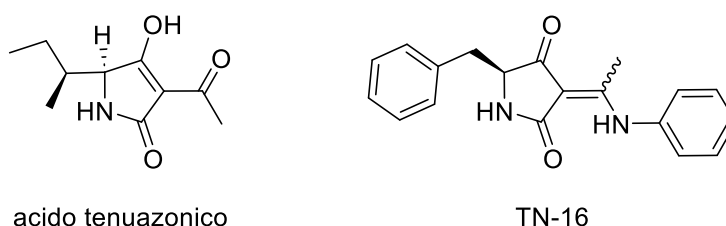


Figura 11: Confronto tra strutture dell'acido tenuazonico e del **TN-16**.

Il **TN-16** non ha mai trovato applicazione in ambito clinico a causa di severe limitazioni farmacocinetiche e tossicologiche; tuttavia, è ampiamente impiegato come *chemical probe* nella ricerca scientifica, sia in ambito di saggi di *binding* competitivo, sia come agente di blocco cellulare in metafase, finalizzato allo studio dei meccanismi di *checkpoint* del fuso mitotico.

Struttura del TN-16 e interazione con il CBS

La struttura del **TN-16** presenta uno scaffold basato sul nucleo dell'acido tetramico (pirrolidin-2,4-dione). Legati a questo eterociclo si trovano, rispettivamente in posizione 2 e 4, due funzioni carboniliche che si comportano da forti accettori di legami idrogeno. Il carbonio in C-5 presenta come sostituito un gruppo benzilico in configurazione S, mentre il carbonio in C-3 porta un gruppo etilidenico sostituito con un'anilina. Il doppio legame esociclico presente in questo linker enamminico impone una geometria planare alla molecola, stabilizzata mediante la delocalizzazione degli elettroni tra l'anello pirrolidindionico e l'anello fenilico della porzione anilina. Nonostante in soluzione acquosa questa molecola esista come un equilibrio dinamico tra i diversi tautomeri, solo la forma enamminica risulta biologicamente attiva, in quanto

vincola la molecola in conformazione planare con il braccio benzilico proiettato al di fuori del piano principale.

Mediante studi di cristallografia a raggi X (PDB 3HKD) è stato rilevato che il **TN-16** interagisce con il CBS spingendosi più in profondità nella subunità β rispetto ai ligandi di origine naturale: stabilisce inedite interazioni con il dominio N-terminale deputato al legame con il nucleotide, coinvolgendo residui amminoacidici localizzati lungo i filamenti S4, S5 e S6.²⁴ L'unica area di legame sovrapponibile a quella della colchicina è rappresentata dall'anello anilिनico di **TN-16**: analogamente all'anello A trimetossifenilico del ligando nativo, prende contatto con la zona 2. Al contrario, mentre l'anello B della colchicina si colloca nella zona 1, il braccio benzilico di **TN-16** interagisce con la zona 3.

Gli studi di S. Poddar e collaboratori, hanno ulteriormente approfondito il legame di **TN-16** con il CBS, evidenziando come l'interazione tra il ligando e la tubulina sia finemente modulata dalla presenza di molecole di acqua all'interno della cavità posta all'interfaccia α/β . In assenza di ligando, la cavità consente l'alloggiamento di molecole d'acqua, le quali vengono solo parzialmente scalzate durante il *binding* con il **TN-16**.²⁷ La permanenza o l'espulsione delle molecole esercita un impatto termodinamico decisivo sul sistema, governando fenomeni di stabilizzazione o destabilizzazione del farmaco nel sito. Nel caso specifico, sono state proposte due distinte modalità di legame (**Figura 12**):

1. Prima configurazione: In questo primo modello di *binding*, il **TN-16** stabilisce una fitta rete di interazioni polari, sia dirette che mediate da molecole di acqua. Per quanto concerne i contatti diretti, l'ossigeno carbonilico in C-2 dell'anello pirrolidindionico agisce come accettore di un legame idrogeno per la catena laterale del residuo amminoacidico Glu β 200; contemporaneamente, l'atomo di idrogeno del gruppo ammidico dell'eterociclo funge da donatore di legame idrogeno con l'ossigeno carbonilico dell'amminoacido Val β 238. In parallelo, una molecola d'acqua intrappolata nella tasca e indicata come W1 opera da ponte idrico, mediando l'interazione indiretta tra l'ossigeno della funzione ammidica e i residui Cys β 241 e Gly β 237. A questo *network* polare si associa una componente idrofobica dovuta dalle interazioni di Van der Waals che l'anello benzilico e anilिनico contraggono con un esteso *cluster* amminoacidico.
2. Seconda configurazione: Il secondo modello ipotizza uno scenario di *binding* alternativo in cui lo stato di idratazione della tasca è decisamente più pronunciato: si stima che circa cinque molecole di acqua permangano all'interno del sito, sebbene solo

due esercitano il ruolo cruciale di ponti molecolari. In questa configurazione i due anelli aromatici laterali conservano le medesime posizioni descritte in precedenza, mentre il core pirrolidindionico subisce una parziale rotazione all'interno della tasca che inverte l'orientamento dei gruppi polari. A seguito di questo riarrangiamento geometrico, il gruppo ammidico si orienta verso il residuo Glu β 200, connettendosi ad esso mediante il proprio idrogeno e mantenendo associata la molecola W1. Inoltre, la rotazione fa sì che il gruppo carbonilico vada ad occupare lo spazio precedentemente riservato al gruppo ammidico, generando un vuoto sterico locale che favorisce il reclutamento di una seconda molecola di acqua (W2); Quest'ultima funge da secondo ponte idrico, consentendo l'instaurarsi di un legame indiretto tra il carbonile della molecola e l'amminoacido Cys β 241.

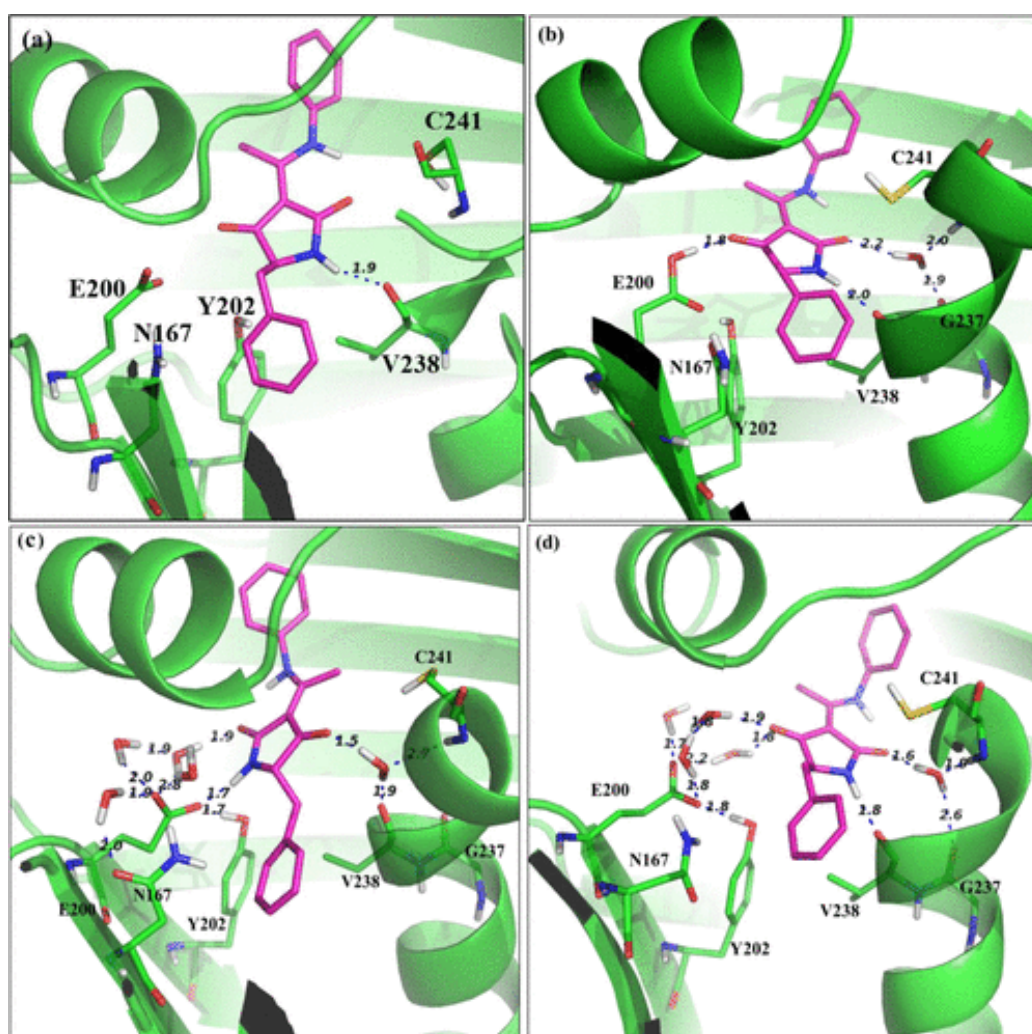


Figura 12: Interazioni polari di TN-16 con il CBS.²⁷ (a) e (b) prima configurazione, con due traiettorie diverse tra loro. (c) e (d) seconda configurazione, con due traiettorie diverse tra loro.

Progettazione e sviluppo degli aza-analoghi di TN-16

Le peculiari caratteristiche biofisiche e strutturali che governano il legame di **TN-16** all'interno del CBS, descritte nei paragrafi precedenti, hanno evidenziato come questo *chemical probe* possa costituire un eccellente punto di partenza per la progettazione razionale di nuovi agenti antitubulinici di ultima generazione. Sebbene le evidenze in letteratura siano limitate, con un solo gruppo di ricerca spagnolo che nel 2018 ha riportato lo sviluppo di agenti antitumorali ispirati alla struttura di **TN-16**,²⁸ il gruppo di Chimica Farmaceutica presso il quale è stato svolto il presente lavoro di tesi ha intrapreso un innovativo filone di ricerca volto all'identificazione e alla caratterizzazione di nuovi analoghi sintetici di questo *lead compound*.²⁹

Nello specifico, l'attività di progettazione si è focalizzata sulla sintesi di aza-analoghi (**Figura 13**). Basandosi sui principi dell'isosteria elettronica di Grimm,³⁰ la strategia sintetica ha previsto la sostituzione bioisosterica del carbonio metinico in posizione 5 dell'anello pirrolidindionico di **TN-16** con un atomo di azoto. Questa modifica ha portato all'ottenimento di un nucleo eterociclico pirazolidindionico, permettendo la rimozione del carbonio chirale presente nella molecola originaria, semplificandone il profilo stereochimico.

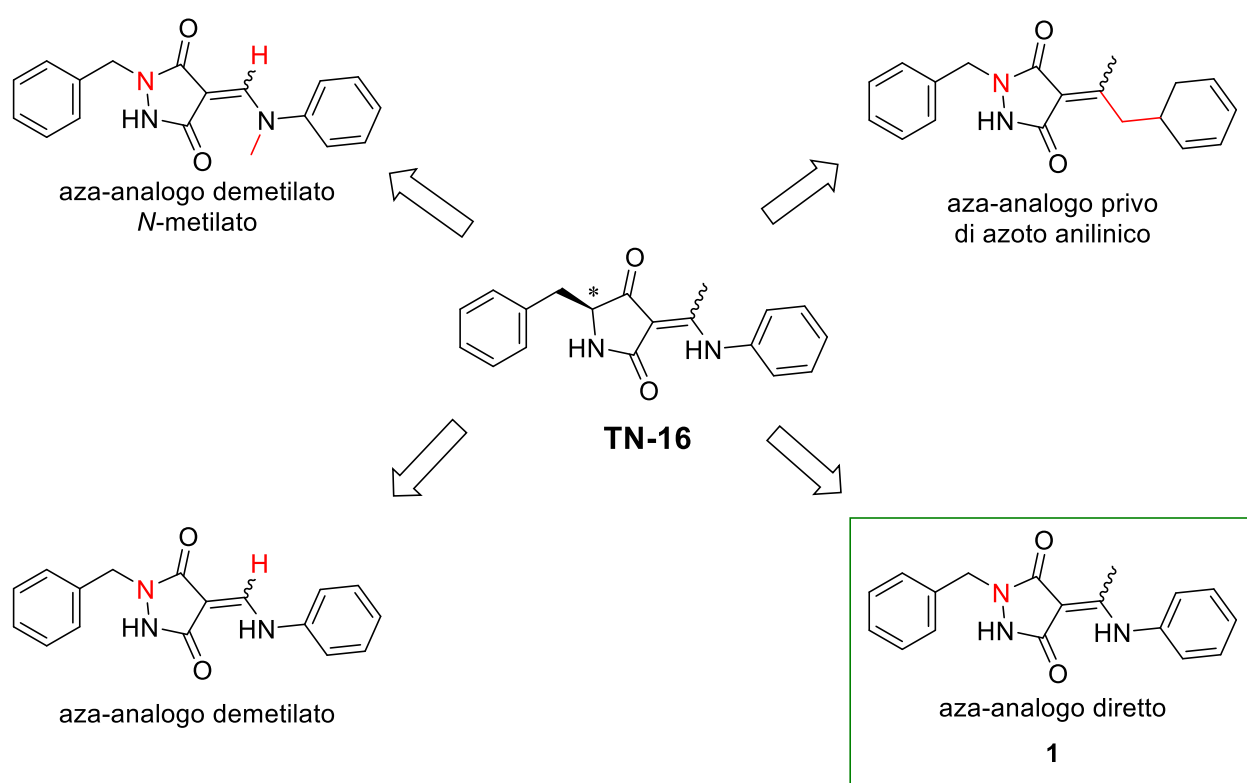


Figura 13: struttura della prima serie degli aza-analoghi di **TN-16**.²⁹

I lavori preliminari del gruppo di ricerca hanno previsto la sintesi di una prima serie di derivati di **TN-16**, comprendente aza-analogo diretto, demetilato, demetilato *N*-metilato e privo dell'azoto anilिनico. Dei 4 composti ottenuti, sottoposti a screening biologico su linee cellulari di neuroblastoma umano SH-SY5Y, solo l'aza-analogo diretto **1** (caratterizzato esclusivamente dalla sostituzione del carbonio metinico in 5 con l'atomo di azoto) ha conservato attività citotossica, mostrando una vitalità cellulare residua del 36.2 ± 9.1 % alla concentrazione di 1 μ M per 72 ore e un valore di EC_{50} pari a 630 ± 224 nM.²⁹

Lo studio di questi primi derivati ha consentito di mappare le relazioni struttura-attività (SAR) preliminari, delineando il ruolo cruciale esercitato da specifici frammenti molecolari nel determinare l'effetto citotossico. Tra questi, gli elementi chiave identificati sono stati:

- La porzione anilिनica;
- Il gruppo metilico sul *linker* etilidenico;
- Il sistema olefinico captodativo, in cui la presenza dell'alchene tetrasostituito – con un gruppo elettron-attrattore (l'anello pirazolidindionico) e un gruppo elettron-donatore (il frammento amminico dell'anilina) – influenza fortemente la stabilità conformazionale e la reattività della molecola.

Sulla base di queste SAR, sono stati successivamente progettati e sintetizzati ulteriori 34 aza-analoghi di **TN-16**, focalizzando l'attenzione sulla modulazione della porzione anilिनica mediante l'inserimento di sostituenti in posizione *orto*, *meta* e *para*. All'interno di questa seconda libreria di composti, l'unico derivato attivo è risultato essere il **2** (**Figura 14**).²⁹

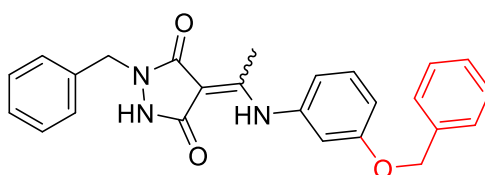


Figura 14: struttura dell'aza-analogo **2**.

Tale aza-analogo presenta lo *scaffold* eterociclico pirazolidindionico modificato di **TN-16** coniugato ad una porzione anilिनica sostituita in posizione *meta* da un gruppo ossibenilico.

Il composto **2** è stato testato *in vitro* per valutarne la citotossicità mediante saggi preliminari sulle medesime linee cellulari usate precedentemente. Questo screening ha evidenziato per la molecola in esame un profilo di citotossicità di rilievo, con una percentuale di vitalità cellulare residua del $51,9 \pm 1,2$ % e una EC_{50} pari a 970 ± 400 nM.²⁹

Sebbene i saggi biologici preliminari abbiano evidenziato che nessuna delle molecole finora sintetizzate possieda una citotossicità superiore a quella del *lead compound* (TN-16), questo filone di ricerca ha posto basi metodologiche e sintetiche fondamentali. Su queste premesse si innesta l'obiettivo del presente lavoro di tesi, focalizzato sulla progettazione e sulla sintesi di una nuova serie di aza-analoghi. L'approccio di ottimizzazione chimica prevede modificazioni strutturali mirate e sistematiche eseguite esclusivamente a carico del sostituente in *meta* dell'anello anilिनico dell'aza-analogo **2**, al fine di esplorare nuove interazioni e ottimizzare il profilo di affinità verso le sotto-tasche accessorie del CBS.

2. Scopo del lavoro

Con l'obiettivo di identificare aza-analoghi di **TN-16** dotati di un'efficacia antiproliferativa nel range nanomolare, il presente lavoro di tesi si è focalizzato sull'ottimizzazione strutturale del derivato più promettente della serie precedentemente sviluppata, ovvero il composto **2** (**Figura 14**).

A tal fine, è stata sfruttata una strategia sintetica basata su una nuova reazione multicomponente (MCR) (**Figura 15**). Questo approccio ha consentito di accedere al core eterociclico pirazolidindionico mediante un unico step sintetico, facendo reagire direttamente l'opportuno derivato anilिनico con un intermedio chiave precedentemente sintetizzato.²⁹

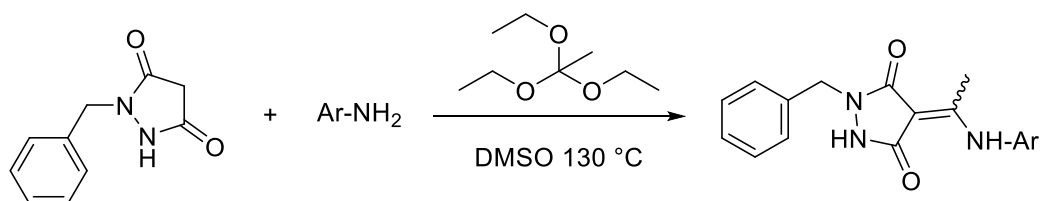


Figura 15: Schema generale della MCR per l'ottenimento degli aza-analoghi di **TN-16**.

Come primo approccio volto ad esplorare l'impatto della topografia dei sostituenti sul legame con il target, sono stati inizialmente sintetizzati gli isomeri strutturali di **2**, in cui il sostituito ossibenzilico occupa rispettivamente la posizione *orto* e *para* dell'anello anilिनico (**Figura 16**).

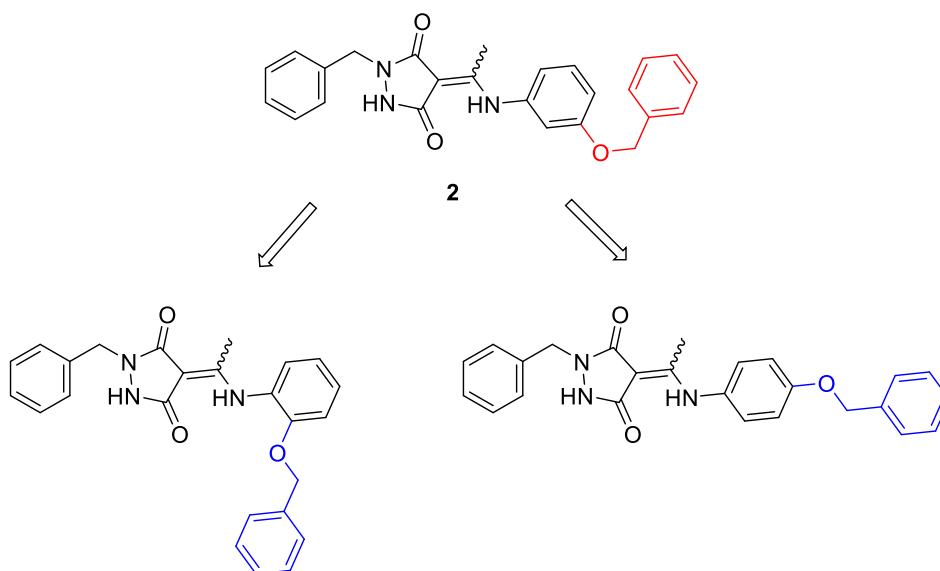


Figura 16: Strutture degli aza-analoghi *orto*- e *para*-sostituiti del composto **2**.

Ar=

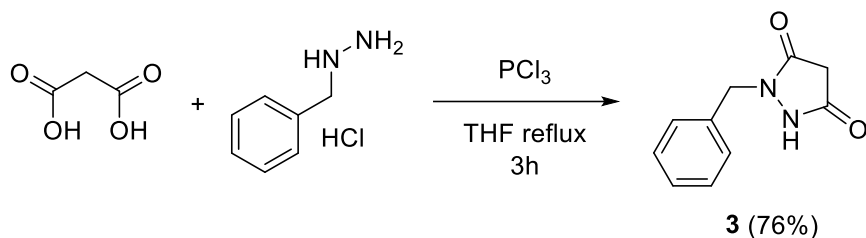
Chemical structures of various Ar groups (substituents) are shown, including phenyl, benzoyl, 2-phenylethyl, 1-phenylethoxy, 2-phenylethoxy, 2-phenylacetate, 4-methoxybenzoyl, benzyl, 4-aminobenzyl, 4-tert-butylbenzyl, 4-phenylbenzyl, 4-bromobenzyl, 4-nitrobenzyl, 3-methoxy-4-nitrobenzyl, 4-cyanobenzyl, 4-cyanobenzyl, 3-methoxy-4-cyanobenzyl, 4-methoxybenzyl, 3,4-dimethoxybenzyl, 4-methoxybenzyl, 4-ethynylbenzyl, 4-ethynylbenzyl, 4-ethynylbenzyl, 4-aminobenzyl, 4-acetamidobenzyl, 4-(2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-ylmethyl, and 4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl.

Questa estesa diversificazione strutturale è stata finalizzata a modulare finemente le proprietà elettroniche, la lipofilia e l'ingombro delle molecole, permettendo così di mappare accuratamente lo spazio chimico della sotto-tasca accessoria del target e di tracciare relazioni struttura-attività (SAR) definitive per questa classe di agenti antimitotici.

3. Sintesi chimica e risultati biologici

Sintesi dell'intermedio benzilpirazolidindionico comune

Al fine di introdurre in maniera efficiente e diretta differenti gruppi anilini strutturalmente diversificati, è stata sviluppata una strategia sintetica che prevede l'impiego dell'intermedio comune *1-benzilpirazolidin-3,5-dione* **3**, seguendo la strategia descritta nello **Schema A**.

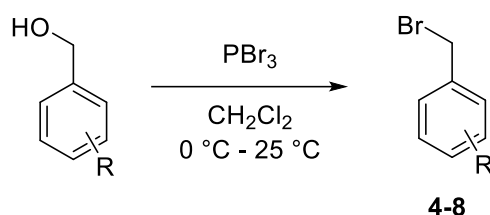


Schema A: sintesi dell'intermedio benzilpirazolidindionico comune **3**.

La procedura prevede il riscaldamento a riflusso in THF per 3 ore di una miscela composta da acido malonico, benzilidrazina cloridrato e tricloruro di fosforo (PCl_3). In questo modo si determina l'attivazione *in situ* dei gruppi carbossilici dell'acido malonico, promuovendo la successiva condensazione con la benzilidrazina e la ciclizzazione intramolecolare in un unico step sintetico; tale metodologia risulta ampiamente validata in letteratura per la preparazione di nuclei pirazolidin-3,5-dionici.³¹

Sintesi dei benzilbromuri

I bromuri, necessari per la successiva funzionalizzazione delle aniline, sono stati preparati sfruttando una reazione di sostituzione nucleofila alifatica, trattando i corrispondenti alcol benzilici commerciali con il tribromuro di fosforo (PBr_3). La reazione è stata condotta in diclorometano (CH_2Cl_2) anidro sotto atmosfera di azoto per 1 ora (**Schema B**).³²



Schema B: sintesi dei benzilbromuri.

Dal punto di vista meccanicistico, l'impiego di PBr_3 consente la conversione del gruppo ossidrilico - notoriamente un cattivo gruppo uscente - in un atomo di bromo, introducendo così un eccellente gruppo uscente per le successive tappe sintetiche. Questa metodologia è stata preferita rispetto all'uso di idracidi (come HBr) per via delle condizioni operative favorevoli al mantenimento dell'integrità strutturale dei sostituenti presenti sull'anello aromatico dei precursori.

Tale via sintetica ha permesso di ottenere i bromoderivati **4**, **5**, **6**, **7** e **8**, riportati in **Tabella 1**.

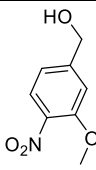
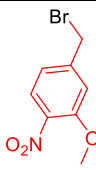
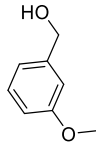
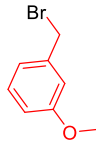
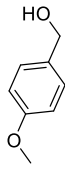
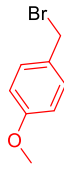
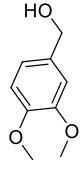
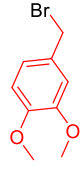
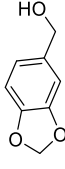
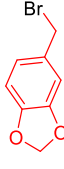
Alcol benzilico	Benzilbromuro
 Commerciale	 4
 Commerciale	 5
 Commerciale	 6
 Commerciale	 7
 Commerciale	 8

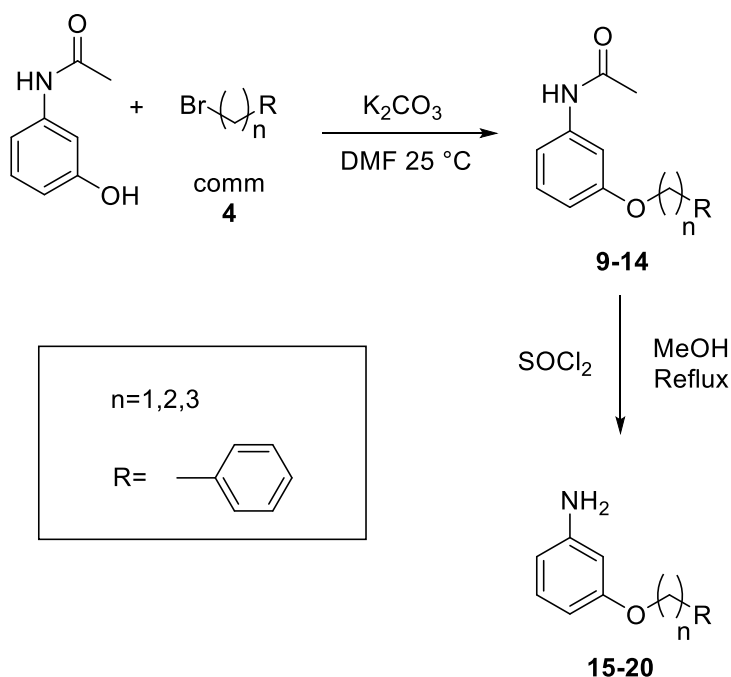
Tabella 1: alcol benzilici di partenza e corrispondenti prodotti bromurati.

Sintesi delle aniline

La preparazione delle aniline funzionalizzate è stata condotta attraverso due differenti percorsi sintetici: il primo prevede l'impiego della 3-idrossiacetanilide come *starting material*, mentre il secondo l'utilizzo del 3-nitrofenolo.

Sintesi delle aniline via 3-idrossiacetanilide

Il primo step di questa via sintetica consiste in una sintesi degli eteri di Williamson. Nello specifico, ad una sospensione di 3-idrossiacetanilide e carbonato di potassio (K_2CO_3) in dimetilformammide (DMF) anidra è stato addizionato il corrispondente benzilbromuro, lasciando la miscela di reazione sotto agitazione *overnight* a temperatura ambiente.³³ Dal punto di vista meccanicistico, questa reazione di *O*-alchilazione nucleofila prevede la deprotonazione selettiva del gruppo fenolico della 3-idrossiacetanilide da parte della base, generando il corrispondente anione fenato; quest'ultimo, agendo da forte nucleofilo, compie un attacco di tipo S_N2 sul carbonio benzilico del benzilbromuro, portando alla formazione del legame eterico e all'allontanamento dello ione bromuro come gruppo uscente. Questa strategia di sintesi consente di evitare potenziali reazioni di *N*-alchilazione a carico del gruppo ammidico, portando all'ottenimento del corrispondente etere, che verrà utilizzato nello step successivo (**Schema C**).

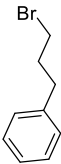
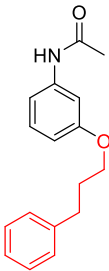
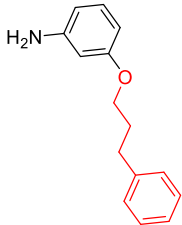
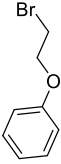
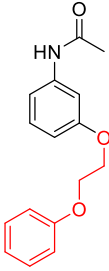
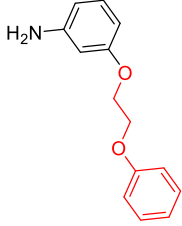


Schema C: sintesi delle aniline via 3-idrossiacetanilide.

Con questa modalità sono stati sintetizzati i composti intermedi **9**, **10**, **11**, **12**, **13** e **14**, riportati in **Tabella 2**.

Il secondo step di questa via sintetica prevede la rimozione del gruppo protettore acetilico dei corrispondenti intermedi eterici mediante una reazione di deacetilazione acido-catalizzata, al fine di liberare la funzione anilina.³⁴ Nello specifico, gli intermedi eterici sono stati disciolti in metanolo (MeOH) e trattati con cloruro di tionile (SOCl₂) a riflusso per 3 ore (**Schema c**); la miscela è stata successivamente alcalinizzata al fine di isolare le rispettive ammine come basi libere. L'aggiunta del SOCl₂ al MeOH permette la formazione *in situ* dell'acido cloridrico, conferendo all'ambiente una spiccata acidità che promuove la protonazione dell'ossigeno del carbonile ammidico dell'acetanilide, permettendo così la solvolisi mediata dal MeOH, un processo che determina la scissione del legame ammidico con formazione di acetato di metile come sottoprodotto volatile, liberando così la funzione amminica primaria.

Attraverso questa via sono state ottenute le aniline **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** (**Tabella 2**).

Bromuro	Intermedio eterico	Anilina
 Commerciale	 9	 15
 Commerciale	 10	 16

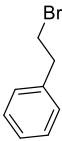
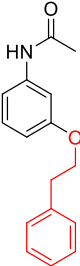
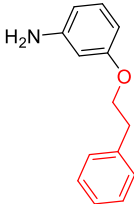
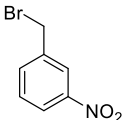
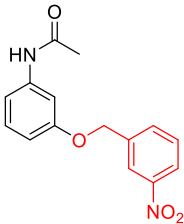
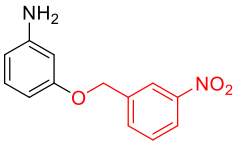
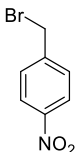
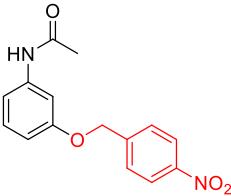
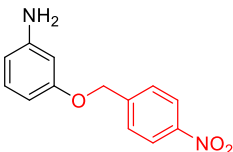
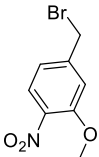
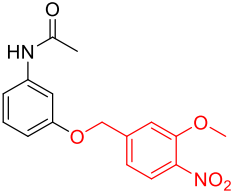
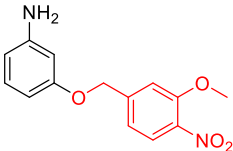
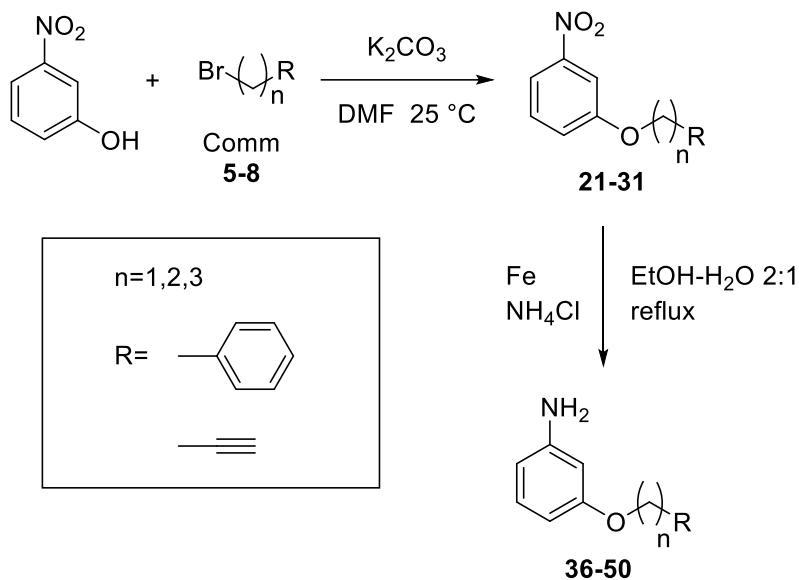
 Commerciale	 11	 17
 Commerciale	 12	 18
 Commerciale	 13	 19
 4	 14	 20

Tabella 2: Bromuri, intermedi eterei e relative aniline.

Sintesi delle aniline via 3-nitrofenolo

Il primo step di questa seconda via sintetica prevede anch'esso l'eterificazione di Williamson a partire dal 3-nitrofenolo come *starting material*.³⁵ Analogamente a quanto descritto in precedenza, ad una sospensione di 3-nitrofenolo e K_2CO_3 in DMF anidra è stato aggiunto il rispettivo benzilbromuro lasciando la miscela sotto agitazione *overnight* a temperatura ambiente (**Schema D**). Dal punto di vista della reattività, la presenza del gruppo nitro in

posizione *meta* esercita un forte effetto elettron-attrattore che favorisce una deprotonazione efficiente da parte della base.



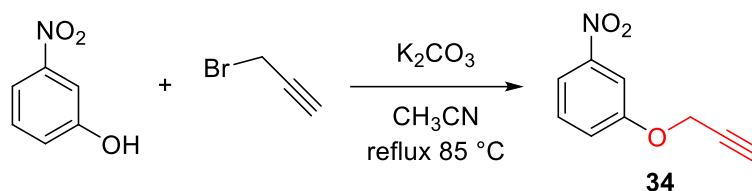
Schema D: sintesi delle aniline via 3-nitrofenolo.

Questa *O*-alchilazione nucleofila ha permesso di isolare gli intermedi nitroeterei **21**, **22**, **23**, **24**, **25**, **26**, **27**, **28**, **29**, **30** e **31** (Tabella 3).

Per quanto concerne la sintesi di **32** e **33** (Tabella 3), la reazione di alchilazione è stata condotta con la medesima metodologia, ma sostituendo il 3-nitrofenolo con rispettivamente il fenolo e la *N*-(4-idrossifenil)acetammide.

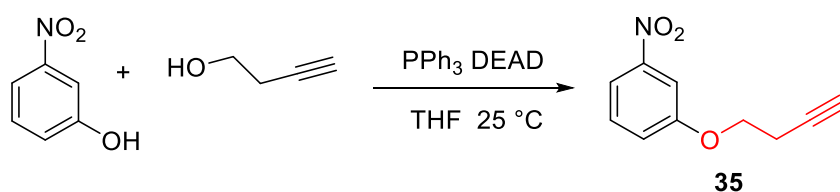
A differenza della procedura standard adottata per l'ottenimento della maggior parte degli intermedi nitroeterei, la sintesi di **34** e **35** ha richiesto l'utilizzo di strategie sintetiche differenti, pur mantenendo il 3-nitrofenolo come reagente.

Per la preparazione **34** (Tabella 3) è stata adottata una propargilazione di Williamson:³⁶ alla soluzione di 3-nitrofenolo è stato aggiunto il bromuro di propargile al fine di introdurre un gruppo alchilico insaturo (Schema E). Per contrastare la minor elettrofilia del carbonio propargilico rispetto a quello benzilico, la reazione è stata condotta in acetonitrile (CH_3CN) a riflusso, permettendo l'ottenimento del corrispondente nitroetere propargilico.



Schema E: sintesi dell'intermedio propargilico **34** tramite propargilazione di Williamson.

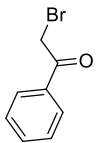
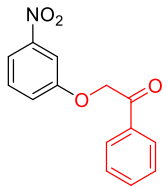
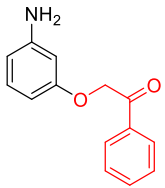
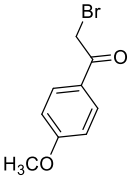
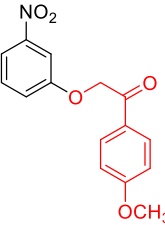
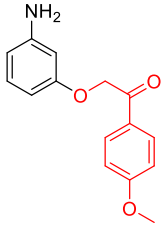
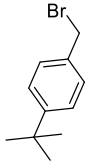
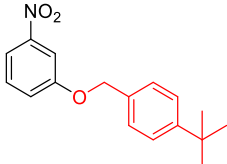
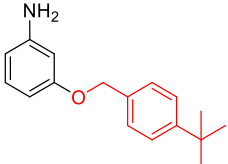
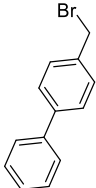
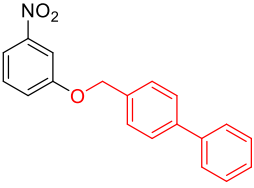
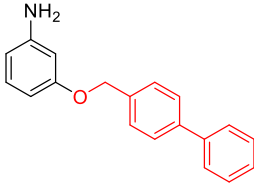
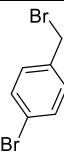
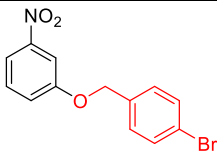
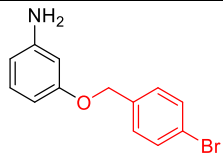
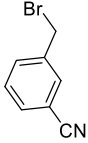
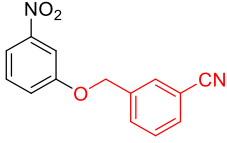
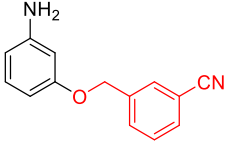
Per la sintesi di **35** (**Tabella 3**): è stata applicata una reazione di Mitsunobu,³⁷ facendo reagire il 3-nitrofenolo con il 3-butin-1-olo in presenza di trifenilfosfina (PPh_3) e azodicarbossilato di dietile (DEAD). La reazione è stata condotta in tetraidrofurano (THF) anidro a $25\text{ }^\circ\text{C}$ (**Schema F**). In questo processo, il sistema redox costituito da DEAD e PPh_3 attiva l'ossidrilico del 3-butin-1-olo, convertendolo in un eccellente gruppo uscente; ciò consente l'attacco nucleofilo da parte del 3-nitrofenolo sul carbonio alchilico e la conseguente formazione del legame etereo.

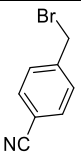
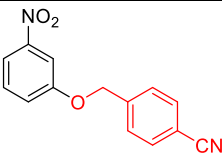
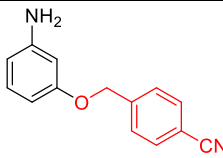
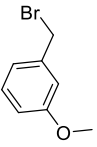
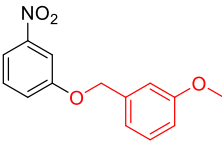
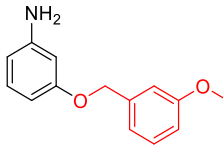
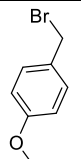
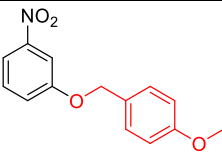
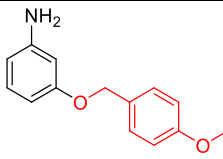
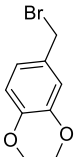
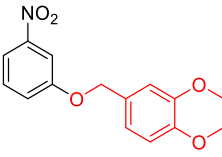
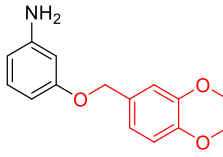
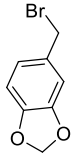
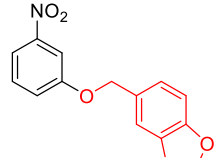
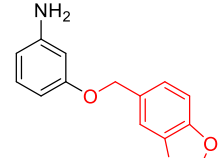
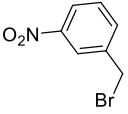
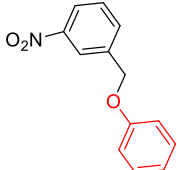
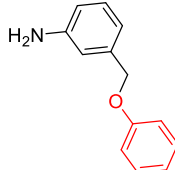
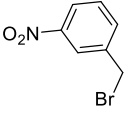
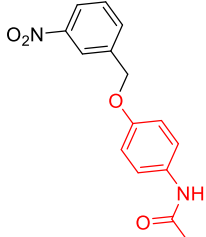
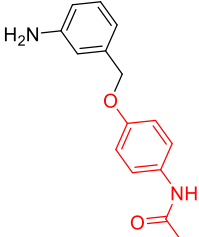


Schema F: Sintesi dell'intermedio alchinico **35** mediante reazione di Mitsunobu.

Il secondo step della sintesi delle aniline via 3-nitrofenolo prevede la riduzione degli intermedi nitroeterei, precedentemente isolati, ad aniline (**Schema D**), mediante una reazione di Béchamp in condizioni tamponate. Nello specifico, la reazione è stata condotta utilizzando ferro metallico (Fe) e cloruro di ammonio (NH_4Cl) in una miscela di etanolo e acqua in rapporto 2:1; il sistema è stato mantenuto sotto agitazione a riflusso per 1 ora.³⁸ L'impiego del sistema riducente Fe/ NH_4Cl ha permesso la riduzione del gruppo nitro senza alterare né i legami eterei né l'insaturazione dei frammenti alchinnici terminali presenti negli intermedi **34** e **35**.

Quest'ultimo step della via sintetica ha consentito di isolare le aniline **36**, **37**, **38**, **39**, **40**, **41**, **42**, **43**, **44**, **45**, **46**, **47**, **48**, **49** e **50** (**Tabella 3**).

Reagente	Intermedi nitroeterei	Aniline
 Commerciale	 21	 36
 Commerciale	 22	 37
 Commerciale	 23	 38
 Commerciale	 24	 39
 Commerciale	 25	 40
 Commerciale	 26	 41

 Commerciale	 27	 42
 5	 28	 43
 6	 29	 44
 7	 30	 45
 8	 31	 46
 Commerciale	 32	 47
 Commerciale	 33	 48

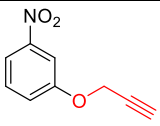
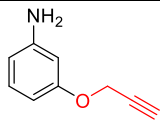
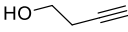
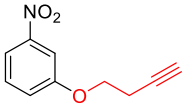
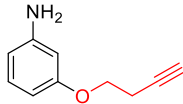
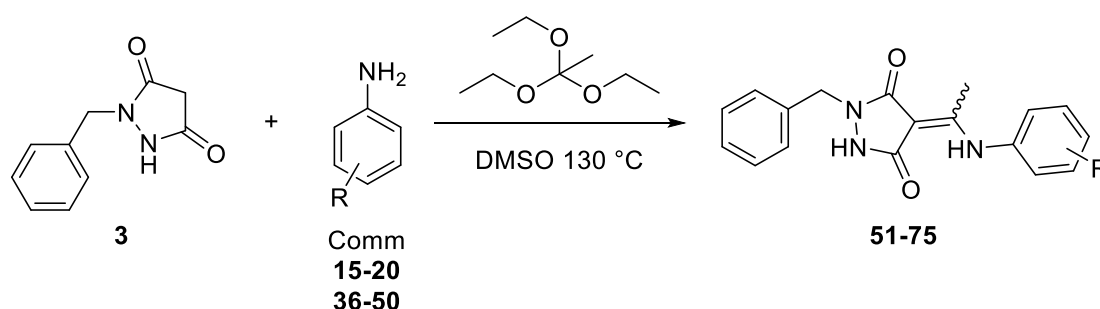
 Commerciale	 34	 49
 Commerciale	 35	 50

Tabella 3: strutture di reagenti, intermedi nitroeterei e corrispondenti aniline.

Sintesi degli aza-analoghi di TN-16

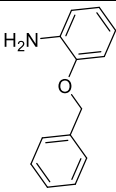
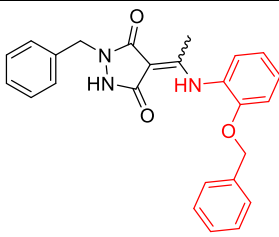
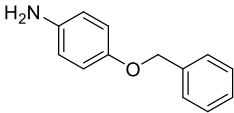
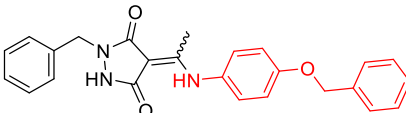
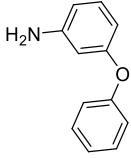
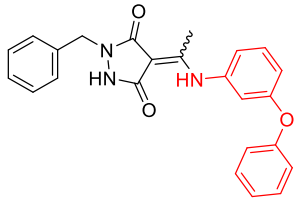
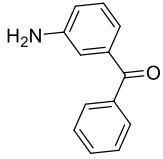
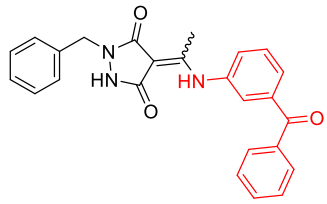
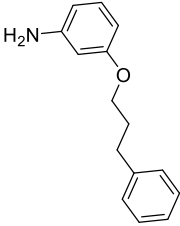
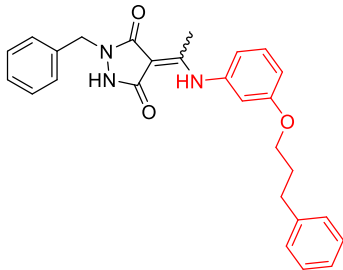
La sintesi degli aza-analoghi di **TN-16** è avvenuta mediante una nuova reazione multicomponente (MCR).²⁹ Questo processo sintetico ha previsto l'impiego dell'intermedio **3** e dell'appropriata anilina, precedentemente sintetizzata, disciolti in DMSO anidro in presenza di trietilortoacetato. La miscela di reazione è stata scaldata a 130 °C e lasciata a reagire sotto agitazione per 3 ore (**Schema G**).

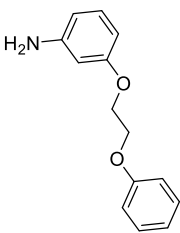
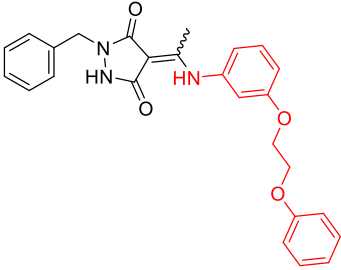
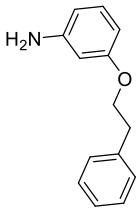
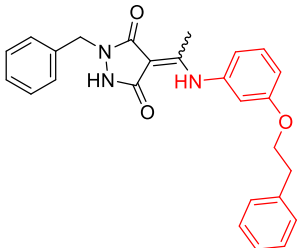
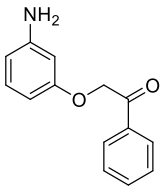
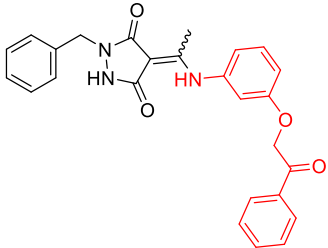
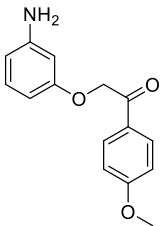
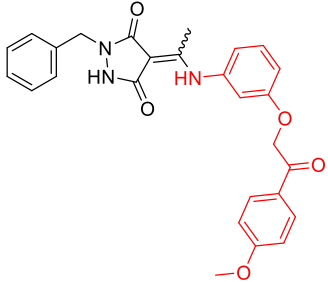
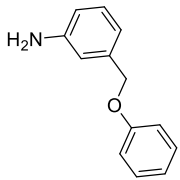
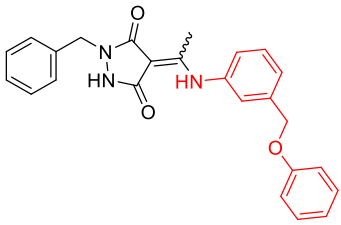


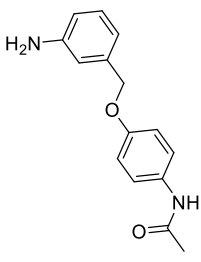
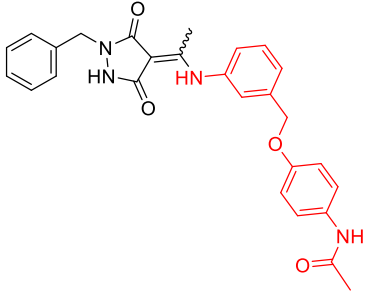
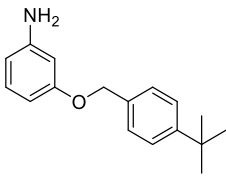
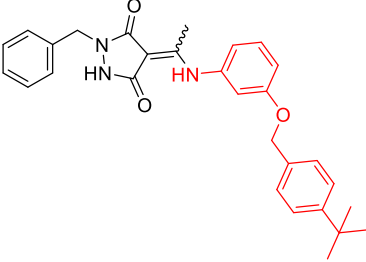
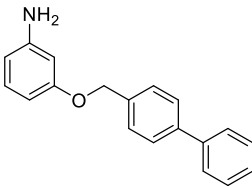
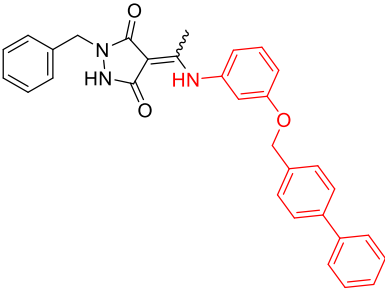
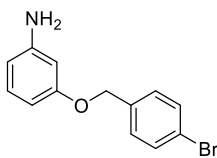
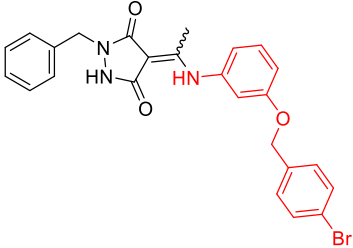
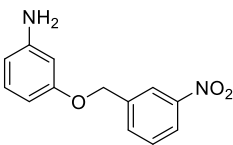
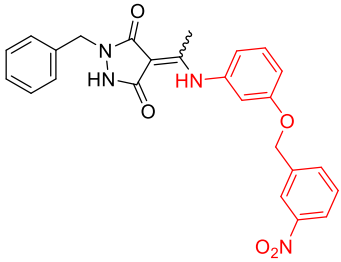
Schema G: sintesi degli aza-analoghi di **TN-16** mediante MCR.

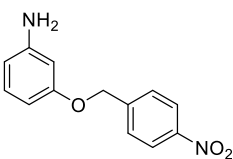
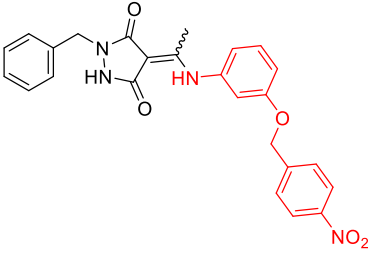
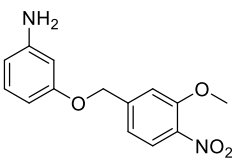
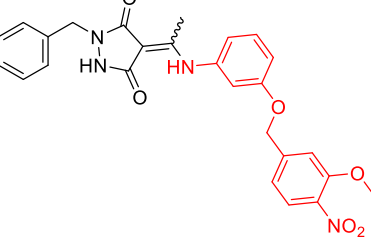
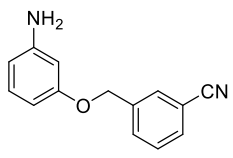
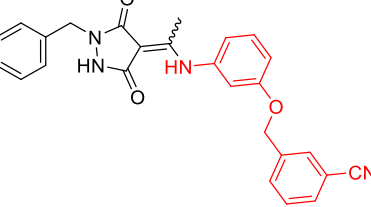
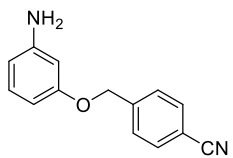
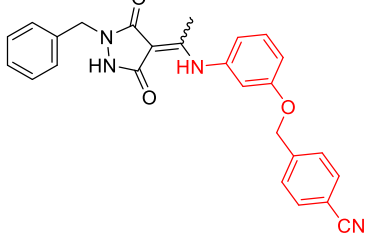
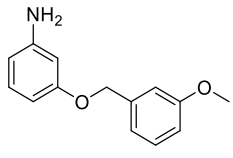
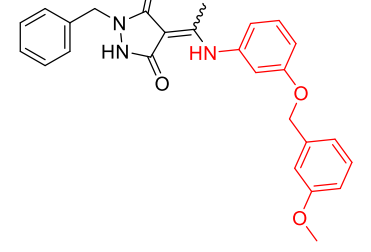
A livello meccanicistico, questa sintesi *one-pot* prevede due stadi consecutivi che si compiono spontaneamente nel medesimo ambiente di reazione. Il primo stadio consiste nella formazione dell'intermedio etossietilidene: il carbonio nucleofilo in posizione 4 di **3** attacca il trietilortoacetato con conseguente eliminazione di una molecola di etanolo; in questo modo si forma un intermedio in cui la posizione 4 del dione è legata a un gruppo etossietilidene. Nel secondo stadio, il gruppo amminico dell'anilina agisce da nucleofilo attaccando l'intermedio appena formato: questo attacco determina l'espulsione del gruppo etossidico e genera il sistema enamminico coniugato.

Grazie all'applicazione di questa MCR sono stati sintetizzati 25 aza-analoghi di **TN-16**, i cui dettagli strutturali e le rese sono riportati in **Tabella 4**.

Aniline	Aza-analoghi del TN-16	Rese
 Commerciale	 51	30%
 Commerciale	 52	58%
 Commerciale	 53	42%
 Commerciale	 54	31%
 15	 55	32%

 16	 56	5%
 17	 57	40%
 36	 58	13%
 37	 59	26%
 47	 60	21%

 48	 61	24%
 38	 62	39%
 39	 63	44%
 40	 64	40%
 18	 65	41%

 19	 66	40%
 20	 67	37%
 41	 68	38%
 42	 69	30%
 43	 70	34%

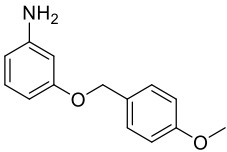
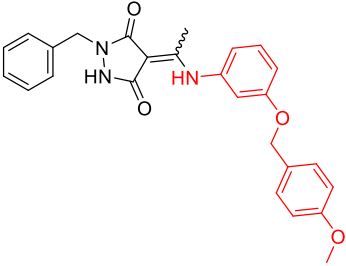
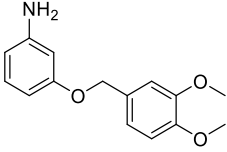
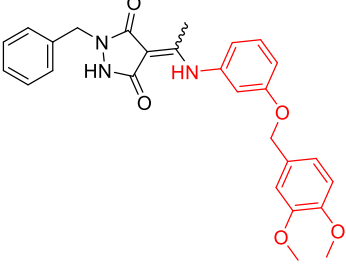
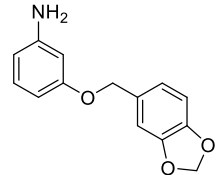
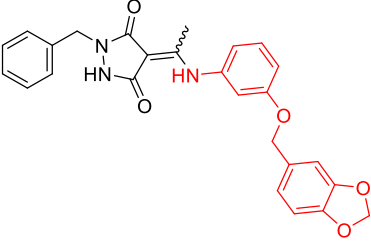
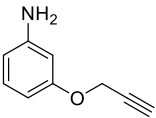
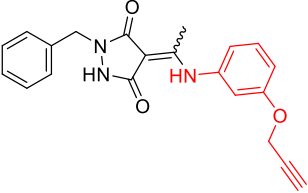
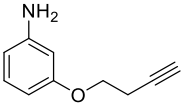
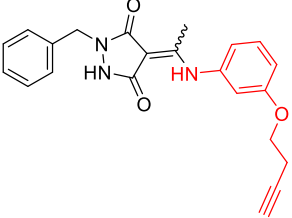
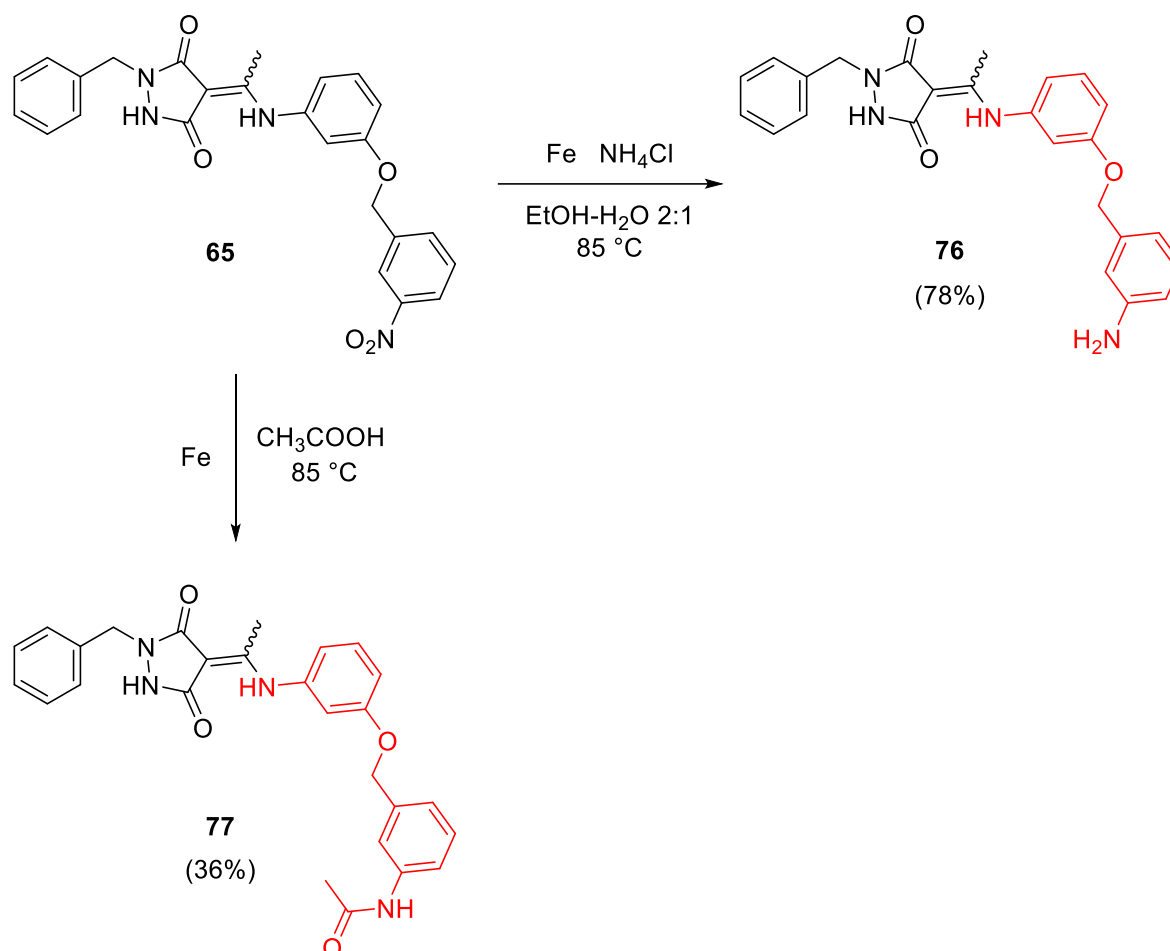
 44	 71	30%
 45	 72	30%
 46	 73	26%
 49	 74	33%
 50	 75	40%

Tabella 4: Aniline e corrispondenti analoghi di TN-16 e relative rese.

Al fine di espandere ulteriormente la libreria di composti, sono stati sintetizzati ulteriori 4 aza-analoghi di **TN-16**. In questo caso, invece di ricorrere alla MCR descritta in precedenza, si è optato per la modifica post-sintetica della porzione terminale del frammento anilिनico di due aza-analoghi precedentemente isolati: **65** e **74**.

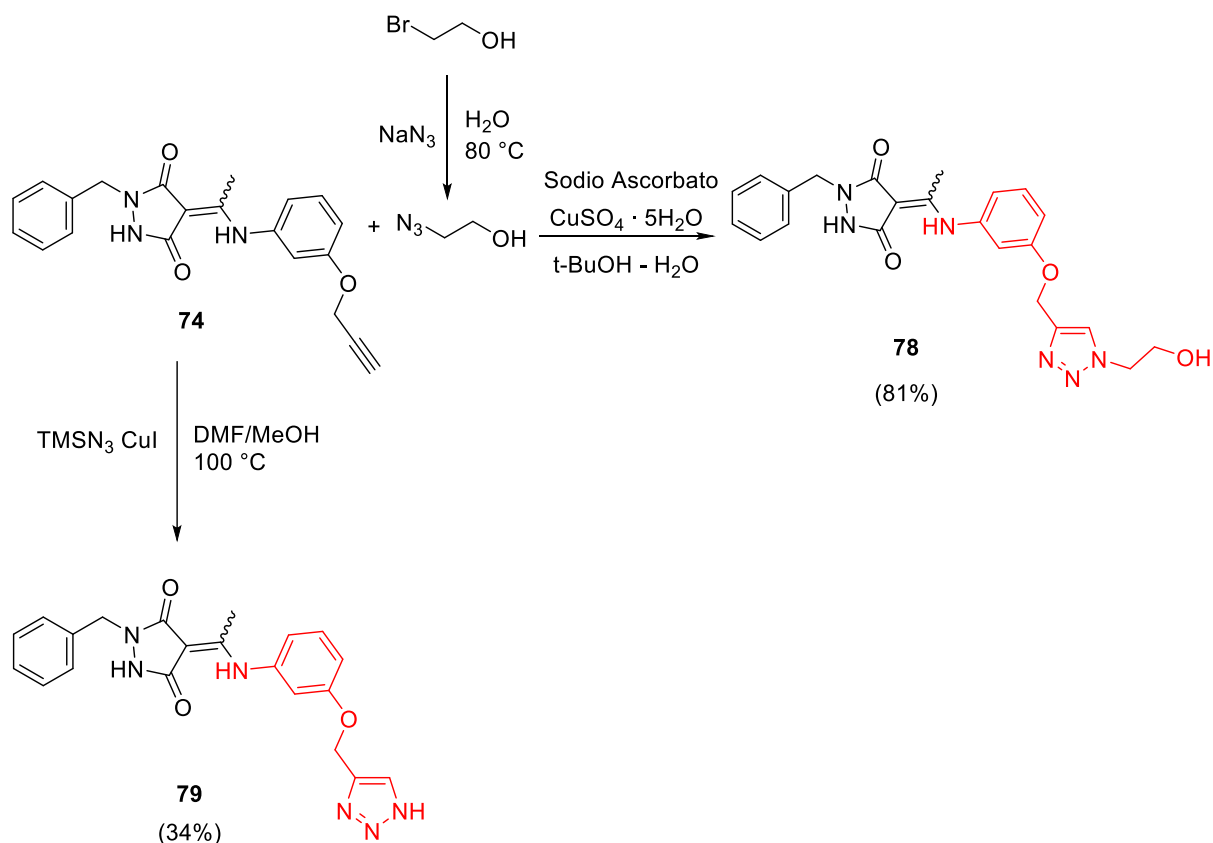
Nello specifico, la modifica di **65** ha permesso di isolare **76** e **77** (Schema H).



Schema H: Sintesi di **76** e **77**.

- Per la preparazione di **76** è stata impiegata la medesima reazione di Béchamp in condizioni tamponate ($\text{Fe}/\text{NH}_4\text{Cl}$ in etanolo/acqua) sfruttata per la conversione dei nitroeteri ad aniline.³⁸ Il trattamento ha permesso di ridurre selettivamente il gruppo nitro presente nella porzione *meta* dell'anello aromatico terminale del gruppo anilिनico.
- La preparazione di **77** ha previsto il trattamento di **65** con ferro metallico in acido acetico glaciale (CH_3COOH) a 85°C per 7 ore.³⁹ A livello meccanicistico, questa reazione *on-*

pot conduce inizialmente alla riduzione del nitrogruppo ad ammina, la quale subisce una concomitante e immediata acetilazione *in situ*, portando all'acetammide desiderata. Per quanto concerne la sintesi degli analoghi caratterizzati da un nucleo triazolico terminale, **78** e **79**, si è proceduto con la modifica post sintetica dell'aza-analogo alchinico **74** (Schema I).



Schema I: Sintesi di **78** e **79**.

Nello specifico la strategia sintetica ha previsto:

- Sintesi di **78**: L'ottenimento di questo analogo ha richiesto la preparazione del 2-azidoetan-1-olo preparato mediante una reazione di sostituzione nucleofila, trattando il 2-bromoetan-1-olo con sodio azide in acqua a 80°C *overnight*. Quindi il 2-azidoetan-1-olo è stato fatto reagire con **74** attraverso una cicloaddizione azide-alchino rame (I) catalizzata,⁴⁰ la quale permette di inserire un anello 1,2,3-triazolico 1,4-disostituito. La cicloaddizione è stata condotta in una miscela di acqua e alcol tert-butilico (1:1), impiegando solfato di rame pentaidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) come sorgente di metallo e sodio ascorbato come agente riducente. Dal punto di vista meccanicistico, l'ascorbato opera la riduzione del rame dallo stato di ossidazione +2 a quello +1, generando la specie

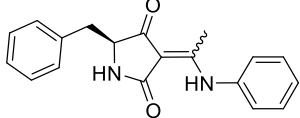
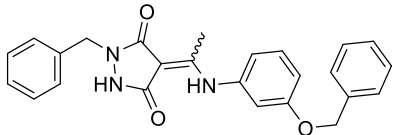
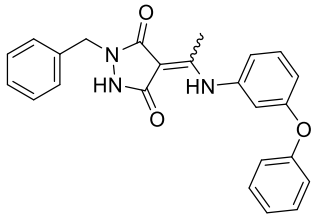
cataliticamente attiva. Il catalizzatore attivato si coordina all'alchino terminale propargilico di **74**, attivandolo e guidando la successiva cicloaddizione con il gruppo azidico e portando alla formazione dell'anello 1,2,3-triazolico funzionalizzato da una catena idrossietilica.

- Sintesi di **79**: la preparazione di questo derivato ha previsto invece la reazione tra **74** e trimetilsililazide in DMF e metanolo a 100 °C, utilizzando ioduro di rame come catalizzatore.⁴¹ Questa cicloaddizione ha permesso di ottenere un anello 1,2,3-triazolico non sostituito sulla porzione terminale del gruppo anilिनico. A livello meccanicistico, questo approccio *on-pot* evita l'isolamento del derivato *N*-protetto, fornendo direttamente l'eterociclo desiderato.

Risultati biologici

Tutti gli aza-analoghi di **TN-16** sintetizzati sono stati sottoposti a saggi biologici *in vitro* al fine di valutarne il profilo di citotossicità e l'attività antiproliferativa. Lo screening è stato eseguito presso il laboratorio di Farmacologia del Professor A. Genazzani, impiegando la linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, per la quale è stata precedentemente dimostrata sensibilità al *lead compound* **TN-16**. In una prima fase di screening, i composti sono stati saggiati alla concentrazione di 1 μ M per un tempo di incubazione di 72 ore.

Dai dati biologici ottenuti è emerso che soltanto tre derivati della serie, nello specifico **53**, **74**, **75**, hanno mostrato capacità di ridurre la vitalità cellulare del 50% o più rispetto al controllo. Per questi tre derivati è stata successivamente determinata la concentrazione EC₅₀, i cui valori sono riportati in **Tabella 5** a confronto con il *lead compound* **TN-16** e il precursore di progettazione **2**.²⁹

Composto	% di vitalità residua	EC ₅₀
 TN-16	34.7 ± 4.4	68 ± 20 nM
 2	51.9 ± 1.2	970 ± 400 nM
 53	40.6 ± 4.3	895 ± 344 nM

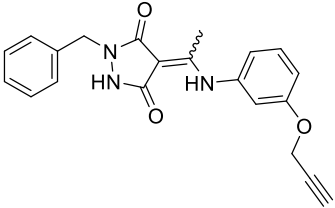
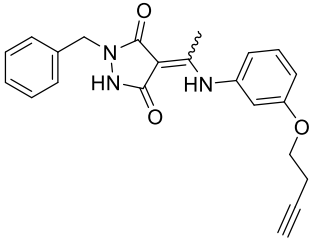
 74	29.0 ± 4.3	102 ± 42 nM
 75	48.7 ± 0.3	790 ± 104 nM

Tabella 5: Percentuale di vitalità residua e EC_{50} di *lead compound* e *hit compounds* selezionati su cellule SH-SY5Y.

L'analisi comparativa dei dati biologici permette di delineare delle cruciali relazioni struttura-attività all'interno degli aza-analoghi.

In primo luogo, l'approccio di ottimizzazione chimica strutturato a partire da **2** si è dimostrato vincente in quanto, i tre analoghi hanno dimostrato un incremento di potenza antiproliferativa rispetto al composto di partenza. Il successo di tale strategia trova la sua massima espressione nel composto **74**, il quale ha ridotto la vitalità cellulare al 29.0% e ha mostrato un valore EC_{50} pari a 102 ± 42 nM. Dal punto di vista farmacologico **74** presenta una potenza di circa un ordine di grandezza superiore rispetto al precursore **2**, posizionandosi nella range nanomolare di **TN-16**.

I derivati **53** e **75**, pur esibendo un progresso rispetto a **2**, si sono rivelati sensibilmente meno potenti del *lead compound*.

Infine, è interessante notare come la successiva ed ulteriore derivatizzazione della porzione alchonica terminale di **74** nei rispettivi nuclei triazolici **78** e **79** abbia comportato un totale abbattimento dell'attività citotossica (dati non riportati). Questa evidenza suggerisce in modo stringente che la porzione alchonica terminale di **74** giochi un ruolo stereoelettronico cruciale nel riconoscimento e nell'interazione con il target biologico.

I tre *hit compounds*, analogamente a **TN-16**, si sono dimostrati citotossici ed in grado di determinare un arresto del ciclo cellulare della cellula tumorale in fase G2/M (**Figura 18**).²⁹

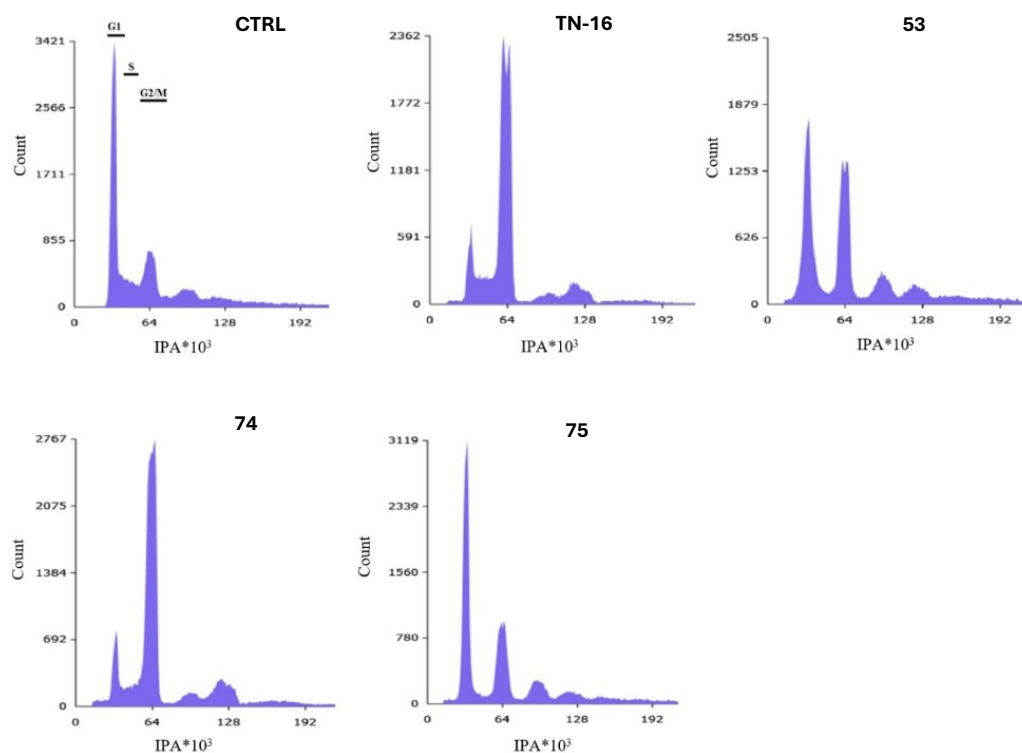


Figura 18: Effetti dei composti **TN-16** e degli *hit compounds* sul ciclo cellulare di cellule SH-SY5Y.

Al fine di confermare l'effettivo meccanismo d'azione, sono stati condotti saggi di polimerizzazione della tubulina *in vitro*. Mediante misurazioni fluorimetriche basate sul monitoraggio dell'assemblaggio dei MT, è stato possibile dimostrare la diretta attività inibitoria del composto più attivo **74** sulla polimerizzazione della tubulina purificata, supportando l'effetto *on-target* del composto (**Figura 19**).²⁹

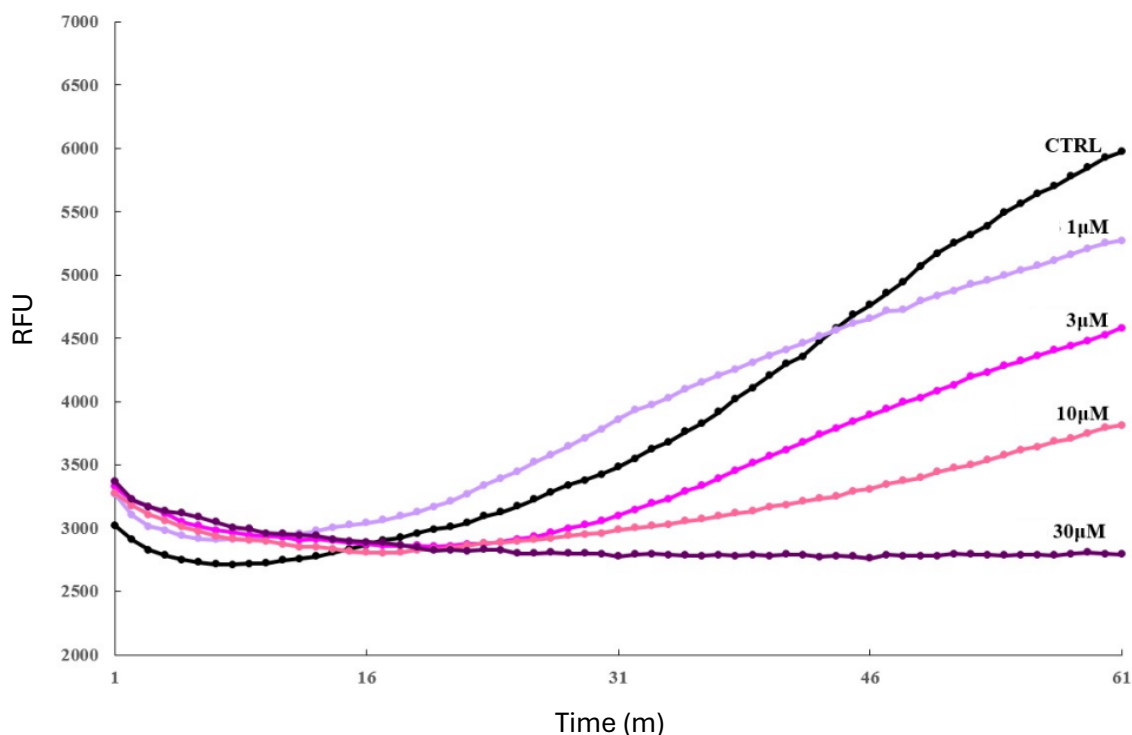


Figura 19: Curve di saggio di polimerizzazione della tubulina indotta dal composto **74** a diverse concentrazioni rispetto al controllo (esprese in Unità Relative di Fluorescenza in funzione del tempo).

Inoltre, per valutarne gli effetti morfologici indotti sul citoscheletro e sul ciclo cellulare, è stata ispezionata, mediante immunofluorescenza, l'organizzazione strutturale dei MT. Le cellule SH-SY5Y, la cui tubulina è stata marcata mediante l'uso di anticorpi anti α -tubulina, sono state sottoposte a trattamento con CA-4, **TN-16** e **74** in concentrazioni pari a 3 volte il valore di EC_{50} di ciascun composto. I risultati mostrano come le cellule trattate con **TN-16** e **74** conservino, a differenza di quelle del saggio con CA-4, in cui il network microtubulare scompare quasi completamente, un reticolo di tubulina parzialmente assemblato. Tuttavia, tale reticolo appare disorganizzato, caratterizzato da protofilamenti aggrovigliati e da una netta perdita di rigidità flessionale che determina un elevato numero di sovrapposizioni aberranti (**Figura 20**).²⁹

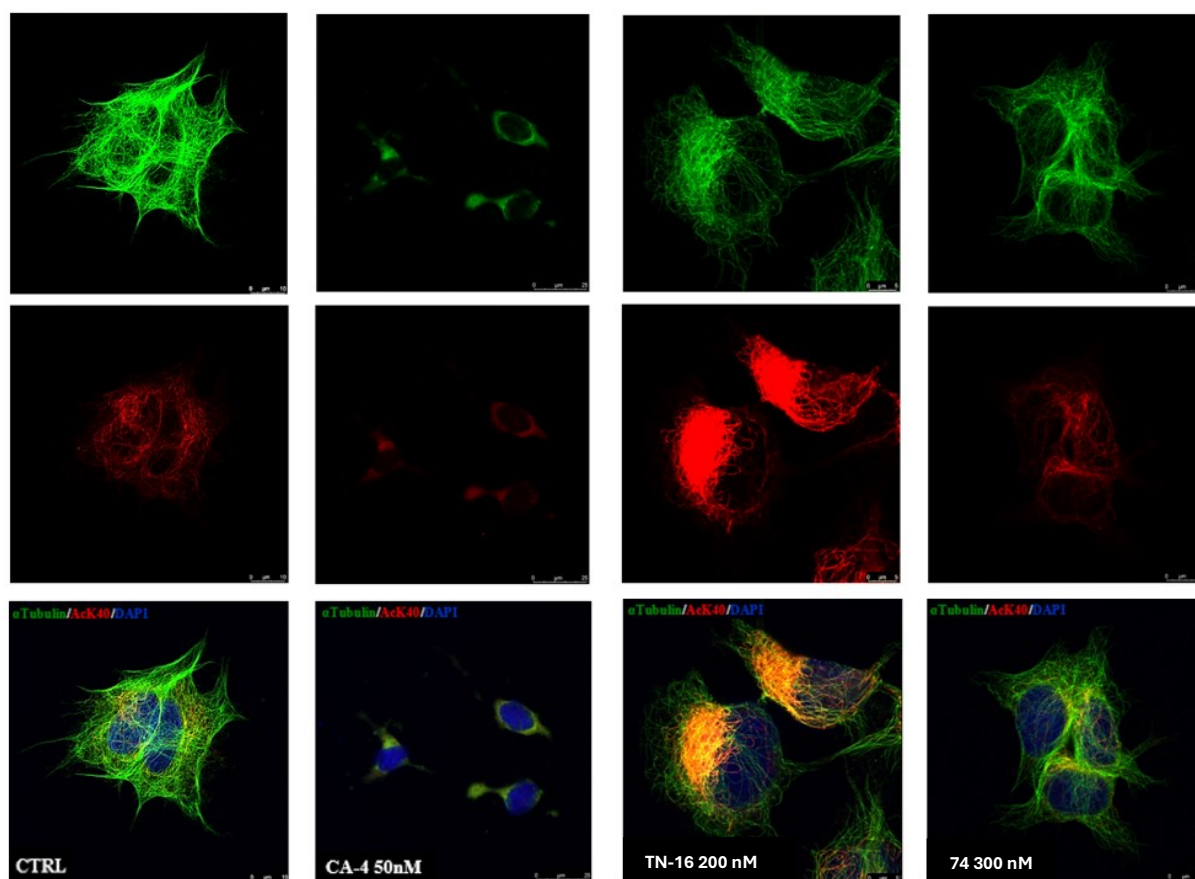


Figura 20: immagini di microscopia a immunofluorescenza dei microtubuli nelle cellule SH-SY5Y sottoposte a trattamento con CA-4, TN-16 e 74 a confronto con il controllo.

4. Conclusioni

Il presente lavoro di si è focalizzato sulla progettazione e sintesi di 29 nuovi aza-analoghi del *lead compound* **TN-16**, un noto agente antimittotico, basandosi sull'ottimizzazione di **2**, al fine di identificare nuovi candidati con un profilo antiproliferativo ottimizzato.

Inizialmente l'applicazione della nuova reazione MCR²⁹ ha consentito l'ottenimento efficiente e diversificato di 25 aza-analoghi. Successivamente la libreria è stata ampliata mediante strategie di funzionalizzazione post-sintetica sulla periferia del frammento anilिनico, sfruttando riduzioni chemoselettive di Béchamp, acetilazioni *in situ* e reazioni di Click Chemistry.

I saggi biologici in vitro condotti sulle cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y hanno validato la strategia di ottimizzazione. Lo screening ha permesso di identificare 3 *hit compounds* (**53**, **74** e **75**) dotati di attività citotossica. Il composto più attivo è risultato **74**, il quale ha mostrato una potenza di circa un ordine di grandezza superiore rispetto al precursore **2**, avvicinandosi alla performance nanomolare di **TN-16** (Figura 21).

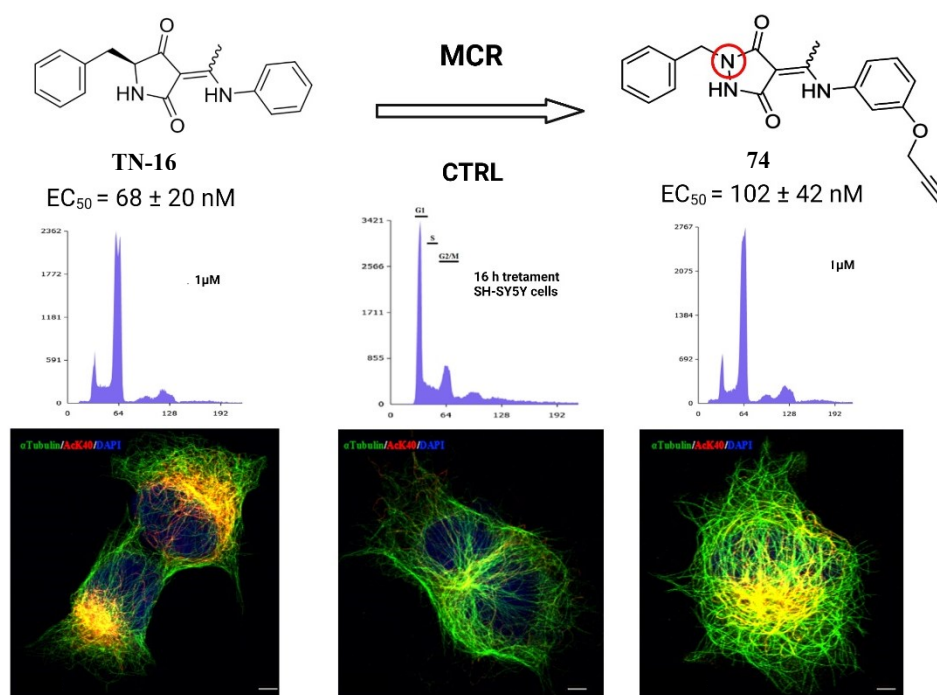


Figura 21: Riassunto dell'identificazione di **74**, potente aza-analogo di **TN-16**.

5. Parte sperimentale

I reagenti e i solventi disponibili commercialmente (Sigma-Aldrich e Alfa Aesar) sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione.

Il tetraidrofurano (THF) è stato anidrificato su Sodio/Benzofenone sotto atmosfera d'azoto, appena prima dell'uso.

Quando necessario, le reazioni sono state effettuate in vetreria anidrificata con pistola termica o essiccata in stufa, sotto pressione positiva di N₂ anidro.

L'agente anidrificante utilizzato per le fasi organiche è Na₂SO₄ anidro.

I punti di fusione sono stati determinati utilizzando lo strumento Stuart Scientific SMP3 e i valori riportati non sono stati corretti.

Gli spettri di massa sono stati registrati su spettrometro di massa Thermo Finnigan LCQ-deca XP-plus utilizzando una sorgente ESI.

Gli spettri ¹H e ¹³C APT sono stati eseguiti a temperatura ambiente su strumento Bruker Avance Neo 400 MHz e i chemical shifts sono indicati in parti per milione (ppm).

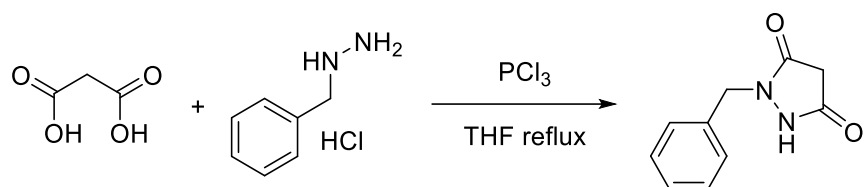
Gli spettri IR sono stati registrati su spettrofotometro FT-IR Bruker Alpha II.

Per la flash cromatografia è stato usato gel di silice (Merck Kieselgel 60, 230-400 mesh-ASTM).

Per la cromatografia su strato sottile (TLC) sono state utilizzate lastre 5 x 20 cm con spessore di 0.25 mm, rivestite di gel di silice (Merck Silica gel 60 F₂₅₄).

Quando necessario, i prodotti sono stati rivelati utilizzando una soluzione di KMnO₄ (ottenuta miscelando una soluzione di 2 g di KMnO₄ in 100 mL di acqua distillata con una soluzione di 4 g di NaHCO₃ in 100 mL di acqua distillata).

Preparazione dell'intermedio 1-benzilpirazolidin-3,5-dione (3)

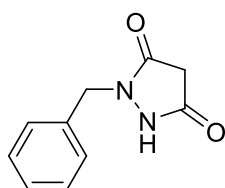


Ad una soluzione di acido malonico (10.00 g, 96.10 mmol, 1 eq) in THF anidro (165 mL), posta sotto agitazione magnetica in atmosfera di azoto, si aggiunge benzilidrazina cloridrato (15.24 g, 96.10 mmol, 1 eq) e PCl₃ goccia a goccia (8.38 mL, 96.10 mmol, 1 eq).

La miscela di reazione viene agitata e scaldata a riflusso per 3 h sotto azoto.

Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, si diluisce con acqua e si estrae con etile acetato (x3). Le fasi organiche riunite vengono anidrificate su sodio solfato e concentrate sottovuoto.

Il composto ottenuto viene triturato con metanolo a 0° C, il solido viene filtrato sottovuoto ed essiccato, per ottenere 13.87 g di prodotto come solido quasi bianco.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₀H₁₀N₂O₂

Peso molecolare: 190

Stato fisico: solido quasi bianco

Punto di fusione: 165-168 °C

Resa: 76 %

IR (KBr) 3072, 2990, 2926, 2865, 1726, 1655, 1507, 1425, 1360, 937, 700 cm⁻¹.

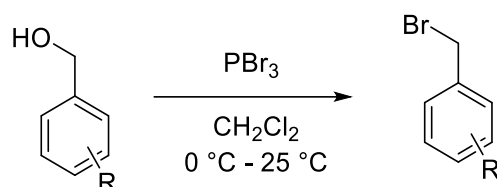
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.34 (m, 5H), 4.70 (s, 2H), 3.18 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.0, 165.8, 134.0, 129.3, 128.9, 128.6, 48.3, 37.1 ppm.

MS (ESI) m/z 191 [M+H]⁺.

Sintesi dei benzilbromuri

Procedura Generale A: sintesi dei benzilbromuri



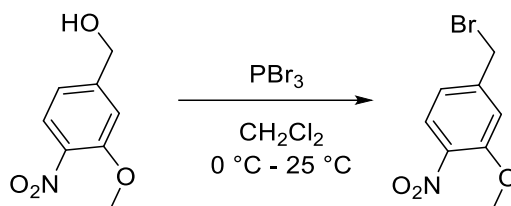
Ad una soluzione del corrispondente alcol benzilico (1.3 eq) in diclorometano anidro (0.3 M), posta sotto agitazione magnetica in atmosfera di azoto a 0 °C, si addiziona goccia a goccia il tribromuro di fosforo (1 eq).

Terminata l'aggiunta si rimuove il bagno di ghiaccio e si lascia reagire a temperatura ambiente per 1 h; la miscela di reazione viene neutralizzata con una soluzione acquosa satura di bicarbonato di sodio, si diluisce con acqua e si estrae con diclorometano (x2).

Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione acquosa satura di tiosolfato di sodio (x1), con brine (x1), anidificate e concentrate sottovuoto.

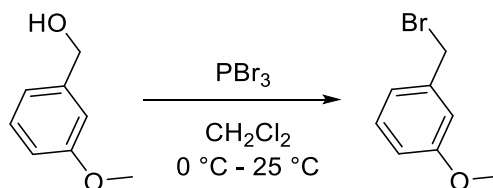
Il bromuro ottenuto risulta sufficientemente puro per essere utilizzato come tale nello step successivo.

Sintesi del 4-(bromometil)-2-metossi-1-nitrobenzene (4)

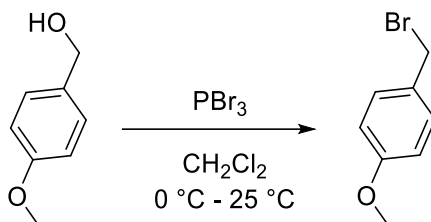


Il composto **4** è stato preparato facendo reagire il (3-metossi-4-nitrofenil)metanolo secondo la procedura A. Si ottiene un solido giallo con resa del 42%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.06 (dd, $J = 8.3 / 1.6$ Hz, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.00 (s, 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 153.2, 144.4, 139.2, 126.2, 120.7, 114.1, 56.6, 31.4 ppm.

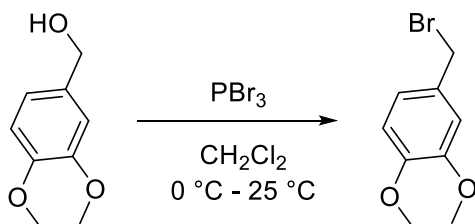
Sintesi dell'1-(bromometil)-3-metossibenzene (5)



Il composto **5** è stato preparato facendo reagire il (3-metossifenil)metanolo secondo la procedura A, si ottiene un olio incolore con resa dell'85%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.31 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.04-6.99 (m, 3H), 6.89 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.84 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 159.8, 139.3, 129.9, 121.4, 114.5, 114.2, 55.3, 33.7 ppm.

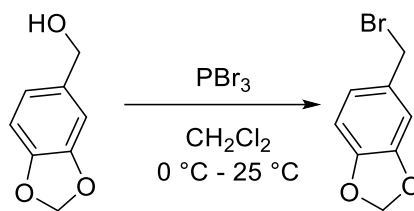
Sintesi dell'1-(bromometil)-4-metossibenzene (6)

Il composto **6** è stato preparato facendo reagire il (4-metossifenil)metanolo secondo la procedura A, si ottiene un solido quasi bianco con resa del 93%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.39 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.57 (s, 2H), 3.83 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 159.8, 130.6, 130.1, 114.3, 55.4, 34.3 ppm.

Sintesi del 4-(bromometil)-1,2-dimetossibenzene (7)

Il composto **7** è stato preparato facendo reagire il (3,4-dimetossifenil)metanolo secondo la procedura A, si ottiene un solido marrone chiaro con resa dell'88%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.69 (s, 2H), 6.54 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.27 (s, 2H), 3.59 (s, 3H), 3.57 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 149.1, 148.9, 130.1, 121.5, 112.2, 111.0, 55.7, 34.6 ppm.

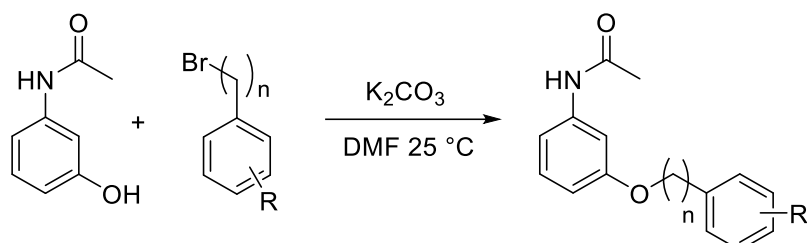
Sintesi del 5-(bromometil)benzo[d][1,3]diossolo (8)



Il composto **8** è stato preparato facendo reagire 1,3-benzodiossolo-5-ilmetanolo secondo la procedura A, si ottiene un solido beige con resa del 93%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.91-6.88 (m, 2H), 6.78 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 4.48 (s, 2H) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 148.0, 147.9, 131.6, 122.8, 109.5, 108.4, 101.4, 34.3 ppm.

Sintesi delle aniline via 3-idrossiacetanilide

Procedura Generale B: sintesi degli eteri



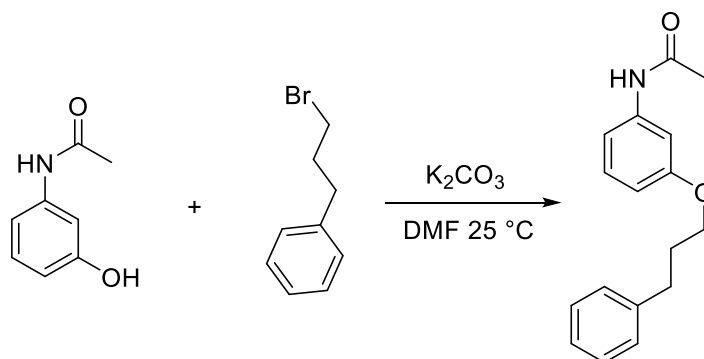
In un pallone viene sciolta l'*N*-(3-idrossifenil)acetammide (1 eq) in DMF anidra (0.6M) e si aggiunge il carbonato di potassio (2 eq) e si pone sotto agitazione magnetica in atmosfera di azoto per 15 min.

Successivamente si addiziona l'appropriato bromuro (1,2 eq) e si lascia reagire per una notte a 25 °C.

Si diluisce la miscela di reazione con acqua e si estrae con diclorometano (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate prima con soda 2M (x1), successivamente con brine (x1), anidificate ed infine concentrate sottovuoto.

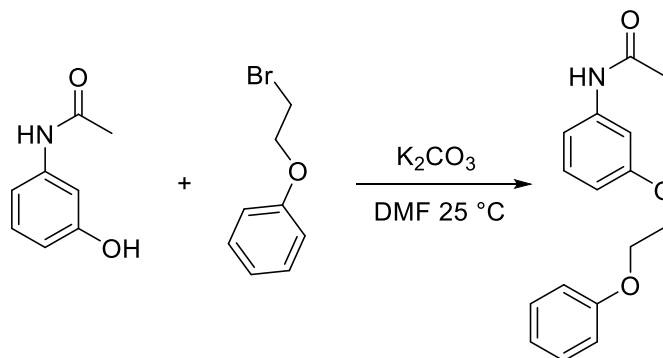
Il composto ottenuto risulta sufficientemente puro per essere usato come tale nello step successivo.

Sintesi della N-(3-(3-fenilpropossi)fenil)acetammide (9)

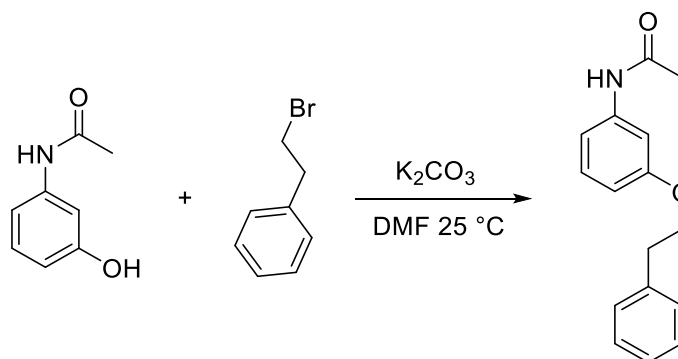


Il composto **9** è stato preparato secondo la procedura B a partire dal (3-bromopropil)benzene, si ottiene un solido beige con resa del 91%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.46 (s, 1H), 7.40-7.13 (m, 8H), 6.74-6.72 (m, 1H), 4.00-3.97 (m, 2H), 2.98-2.86 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.17-2.10 (m, 2H) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.2, 159.6, 141.6, 139.5, 129.7, 128.6, 128.5, 126.0, 112.3, 110.6, 106.6, 67.0, 32.2, 30.9, 24.6 ppm.

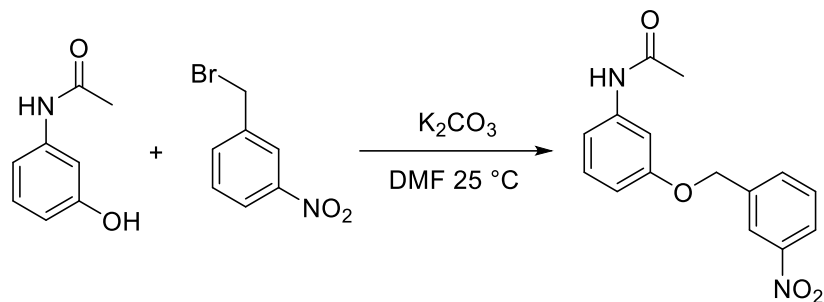
Sintesi della N-(3-(2-fenossietossi)fenil)acetammide (10)



Il composto **10** si prepara secondo la procedura B a partire dal (2-bromoetossi)benzene, si ottiene un solido quasi bianco con resa del 50%. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.21 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.19-7.17 (m, 2H), 7.00-6.93 (m, 3H), 6.67-6.38 (m, 1H), 4.31-4.25 (m, 4H), 2.05 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.9, 158.9, 158.7, 141.1, 130.0, 129.9, 121.2, 114.9, 112.1, 109.2, 106.0, 66.7, 66.6, 24.5 ppm.

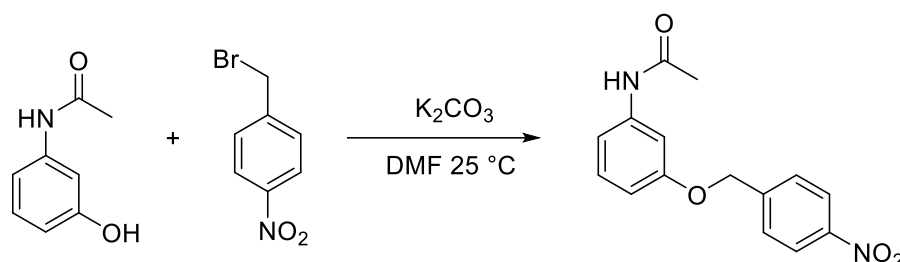
Sintesi della N-(3-fenetossifenil)acetammide (11)

Il composto **11** è stato preparato secondo la procedura B a partire dal (2-bromoetil)benzene, si ottiene un olio bruno con resa del 40%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.25-9.20 (br d, 1H), 7.84-7.26 (m, 1H), 7.16-6.96 (m, 7H), 6.48-6.46 (m, 1H), 4.00-3.97 (m, 2H), 2.93-2.76 (m, 2H), 2.00 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 169.1, 159.0, 140.1, 138.2, 129.3, 128.9, 128.3, 126.3, 112.0, 109.8, 106.1, 68.4, 35.6, 24.2 ppm.

Sintesi della N-(3-((3-nitrobenzil)ossi)fenil)acetammide (12)

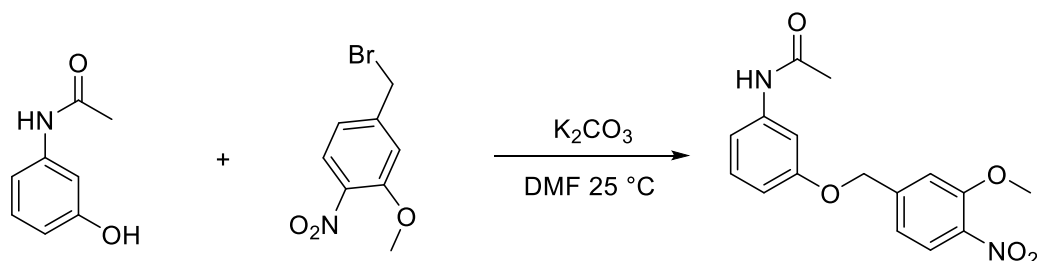
Il composto **12** è stato preparato secondo la procedura B, utilizzando 1'-1-(bromometil)3-nitrobenzene, si ottiene un solido giallo con resa del 96%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (s, 1H), 8.11 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.49 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.01 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.40-6.33 (m, 3H), 5.03 (s, 2H), 3.90 (s, 2H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 159.4, 148.3, 148.2, 139.8, 133.3, 130.3, 129.6, 122.7, 122.0, 108.7, 104.5, 101.9, 68.3 ppm.

Sintesi della N-(3-((4-nitrobenzil)ossi)fenil)acetammide (13)

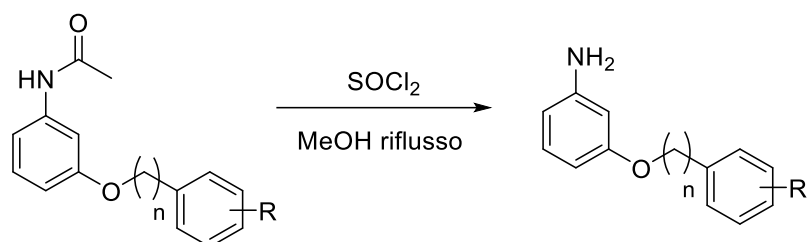


Il composto **13** si prepara secondo la procedura B, utilizzando l'1-(bromometil)-4-nitrobenzene, si ottiene un solido arancione con resa del 96%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.88 (br s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.21 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 2.18 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.7, 158.6, 147.7, 144.5, 139.6, 129.7, 127.5, 123.8, 112.5, 110.7, 106.4, 68.6, 24.6 ppm.

Sintesi della N-(3-((3-metossi-4-nitrobenzil)ossi)fenil)acetammide (14)



Il composto **14** è stato preparato secondo la procedura B, utilizzando il 4-(bromometil)-2-metossi-1-nitrobenzene (**4**), si ottiene un solido giallo con resa del 97%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (br s, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.18 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.02-6.97 (m, 2H), 6.98 (dd, *J* = 8.2 / 2.21 Hz, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.16 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.1, 158.6, 153.3, 144.5, 139.6, 138.6, 129.8, 126.0, 118.4, 112.7, 111.8, 110.7, 106.6, 68.7, 56.6, 24.5 ppm.

Procedura Generale C: idrolisi acida delle acetanilidi

In un pallone si scioglie l'appropriata acetanilide (1 eq) in metanolo (0.2 M), si pone sotto agitazione magnetica e si aggiunge goccia a goccia il tionilcloruro (7 eq) e si scalda a riflusso per 3 h.

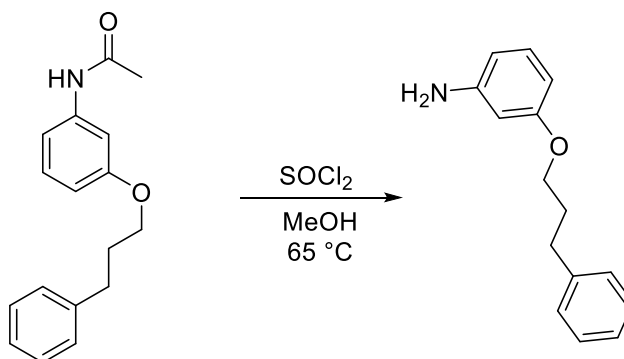
Al termine, la miscela di reazione viene concentrata sottovuoto, il residuo viene ripreso con acqua e basificato con una soluzione acquosa satura di bicarbonato di sodio fino al raggiungimento di pH 8.

Successivamente si estrae con etile acetato (x2).

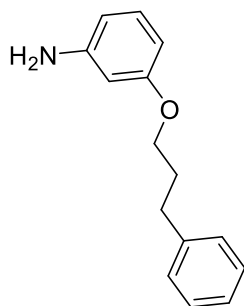
Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1), anidrificate e concentrate sottovuoto.

Il composto ottenuto risulta sufficientemente puro per essere usato come tale nello step successivo.

Sintesi dalla 3-(3-fenilpropossi)anilina (15)



L'anilina **15** è stata ottenuta seguendo la procedura C a partire dalla *N*-(3-(3-fenilpropossi)fenil)acetammide (**9**).



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_1\text{O}_1$

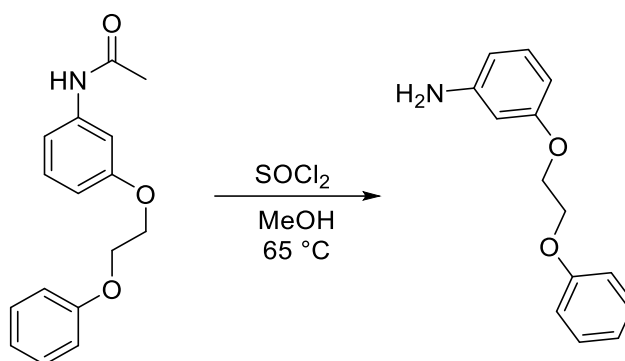
Stato fisico: olio marrone

Peso molecolare: 226

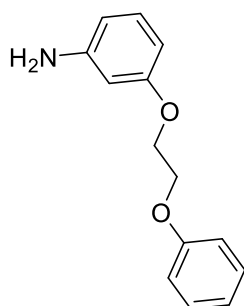
Resa: 64%

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45-7.34 (m, 5H), 7.20-7.15 (m, 1H), 6.47-6.35 (m, 3H), 4.05-4.01 (m, 2H), 3.70 (s, 2H), 2.95-2.90 (m, 2H), 2.20 (quint, $J = 7.4$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 160.3, 147.9, 141.8, 130.2, 128.7, 128.6, 126.1, 108.4, 104.8, 101.8, 66.8, 32.3, 31.0 ppm.

Sintesi della 3-(2-fenossietossi)anilina (16)

L'anilina **16** è stata ottenuta secondo la procedura C a partire dalla *N*-(3-(2-fenossietossi)fenil)acetammide (**10**).

Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₄H₁₅N₁O₂

Stato fisico: solido quasi bianco

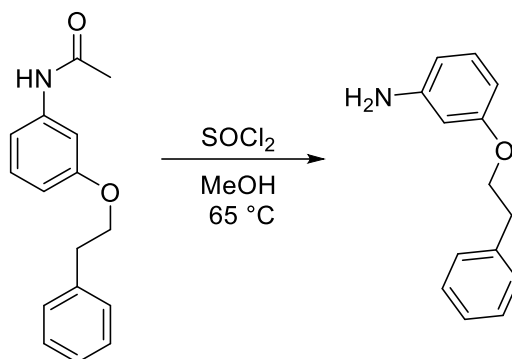
Peso molecolare: 229

Resa: 31%

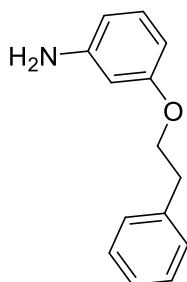
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.12 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 7.04-6.99 (m, 3H), 6.41 (dd, J = 8.3 / 1.9 Hz, 1H), 6.36-6.33 (m, 2H), 4.33-4.32 (m, 4H), 3.67 (br s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.8, 158.7, 147.9, 130.2, 129.6, 121.1, 114.8, 108.4, 104.6, 101.6, 66.4, 66.3 ppm.

Sintesi della 3-fenetossianilina (17)



L'anilina **17** è stata ottenuta secondo la procedura C a partire dalla *N*-(3-fenetossifenil)acetammide (**11**).



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_1\text{O}_1$

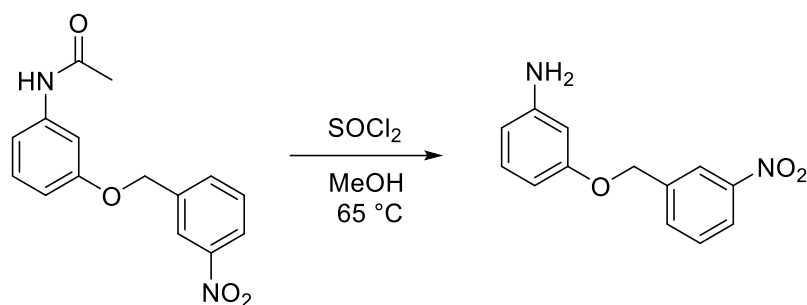
Stato fisico: olio marrone

Peso molecolare: 213

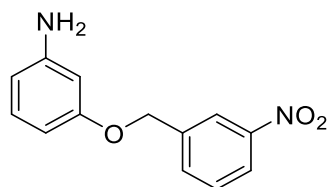
Resa: 31%

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.46-7.34 (m, 5H), 7.18-7.13 (m, 1H), 6.47-6.33 (m, 3H), 4.23 (td, $J = 7.2/2.4$ Hz, 2H), 3.68 (br s, 2H), 3.19 (td, $J = 7.1/2.8$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 160.1, 148.0, 168.5, 130.2, 129.2, 128.6, 126.6, 108.2, 104.7, 101.9, 68.6, 35.9 ppm.

Sintesi della 3-((3-nitrobenzil)ossi)anilina (18)

L'anilina **18** è stata ottenuta secondo la procedura C a partire dalla *N*-(3-((3-nitrobenzil)ossi)fenil)acetammide (**12**).

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₁₃H₁₂N₂O₃

Stato fisico: solido giallo

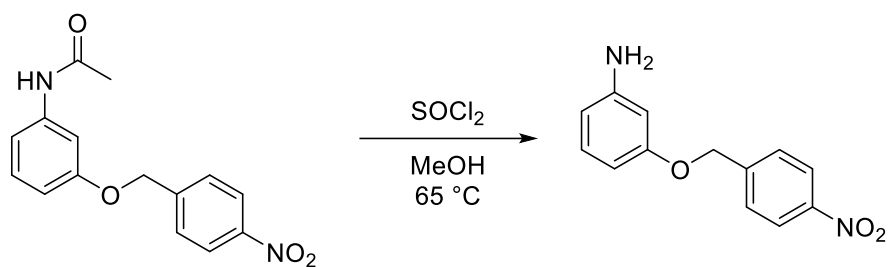
Peso molecolare: 244

Resa: 98%

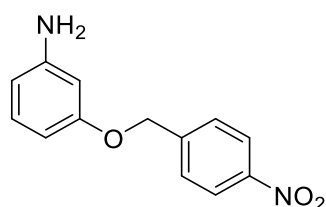
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (s, 1H), 8.11 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.49 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.01 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.40-6.33 (m, 3H), 5.03 (s, 2H), 3.90 (s, 2H) ppm

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.4, 148.3, 148.2, 139.8, 133.3, 130.3, 129.6, 122.7, 122.0, 108.7, 104.5, 101.9, 68.3 ppm

Sintesi della 3-((4-nitrobenzil)ossi)anilina (19)



L'anilina **19** è stata ottenuta secondo la procedura C partendo dalla *N*-(3-((4-nitrobenzil)ossi)fenil)acetammide (**13**).



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$

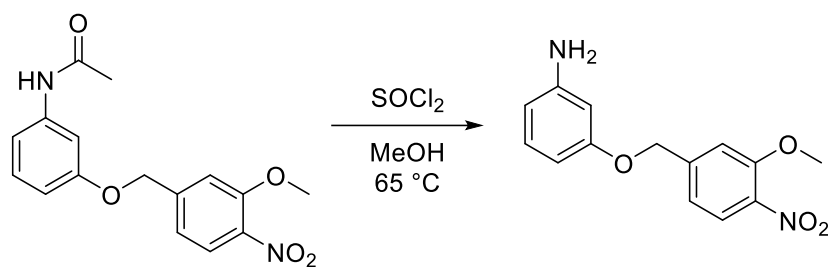
Stato fisico: solido arancione

Peso molecolare: 244

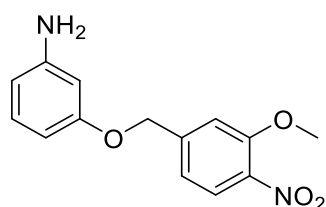
Resa: 96%

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.07 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.39-6.32 (m, 3H), 5.15 (s, 2H), 3.70 (br s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 159.4, 148.0, 147.6, 144.8, 130.3, 127.5, 123.8, 108.8, 104.6, 102.1, 68.6 ppm.

Sintesi della 3-((3-metossi-4-nitrobenzil)ossi)anilina (20)

L'anilina **20** è stata ottenuta secondo la procedura C a partire dalla *N*-(3-((3-metossi-4-nitrobenzil)ossi)fenil)acetammide (**14**).

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₁₄H₁₄N₂O₄

Stato fisico: solido marrone

Peso molecolare: 274

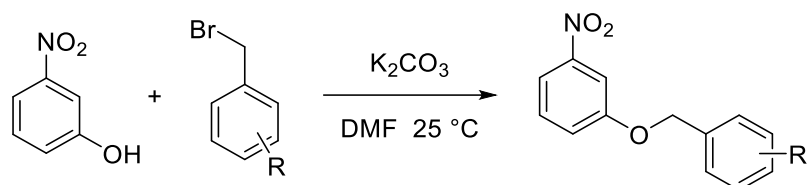
Resa: 92%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.15(s, 1H), 7.07-7.00 (m, 2H), 6.35-6.30 (m, 3H), 5.03 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.81 (br s, 2H) ppm

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.3, 153.3, 148.2, 144.9, 138.6, 130.3, 126.0, 118.4, 111.8, 108.7, 104.5, 101.8, 68.6, 56.5 ppm

Sintesi delle aniline via 3-nitrofenolo

Procedura Generale D: sintesi degli eteri



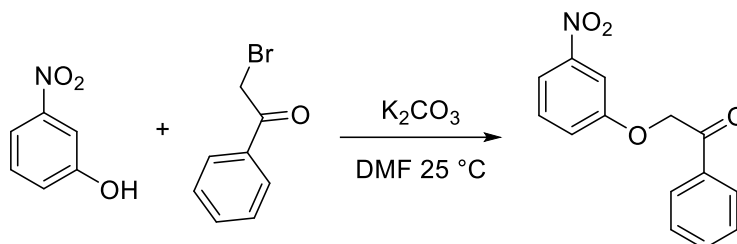
In un pallone viene disciolto il 3-nitrofenolo (1 eq) in DMF anidra (0.7 M), si aggiunge il carbonato di potassio (2 eq) e si pone sotto agitazione magnetica in atmosfera di azoto per 15 min.

Successivamente si aggiunge l'appropriato bromuro (1 eq) e si lascia reagire per una notte a 25 °C.

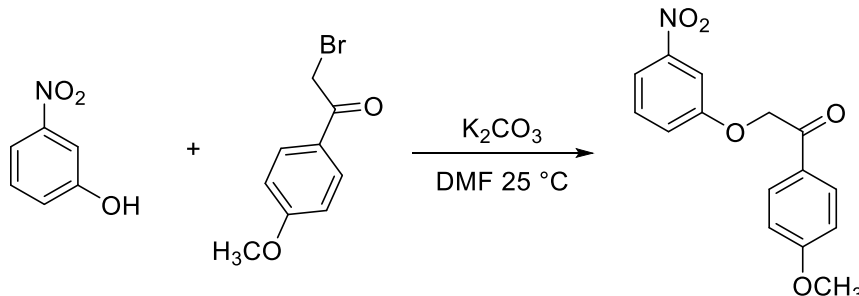
Si diluisce la miscela di reazione con acqua e si estrae con etile acetato (x2).

Le fasi organiche riunite vengono lavate con soda 2M (x1), successivamente con brine (x1), anidrificate ed infine concentrate sottovuoto.

Il composto ottenuto risulta essere sufficientemente puro da essere usato come tale nello step successivo.

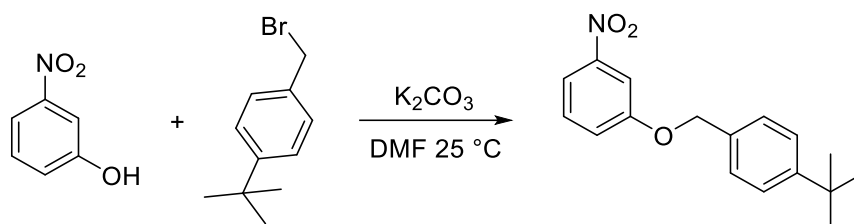
Sintesi del 2-(3-nitrofenossi)-1-feniletan-1-one (21)

Il composto **21** è stato preparato secondo la procedura generale D a partire dal 2-bromo-1-feniletan-1-one, si ottiene un solido arancione con resa del 98%. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.01 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.67 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.55 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.46 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.33-7.28 (m, 1H), 5.43 (s, 2H) ppm; ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 193.2, 158.5, 149.2, 134.1, 134.0, 130.2, 129.1, 128.0, 121.9, 116.7, 109.2, 70.7 ppm.

Sintesi dell'1-(4-metossifenil)-2-(3-nitrofenossi)etan-1-one (22)

Il composto **22** è stato preparato secondo la procedura generale D a partire dal 2-bromo-1-(4-metossifenil)etan-1-one, si è ottenuto un solido ambrato con resa del 93%. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.83 (dd, J = 8.1/1.3 Hz, 1H), 7.73 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.28 (dd, J = 7.9/2.3 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 5.36 (s, 2H), 3.89 (s, 3H) ppm; ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 191.6, 164.3, 158.7, 149.1, 130.4, 130.1, 127.1, 121.8, 116.5, 114.2, 109.3, 70.5, 55.6 ppm.

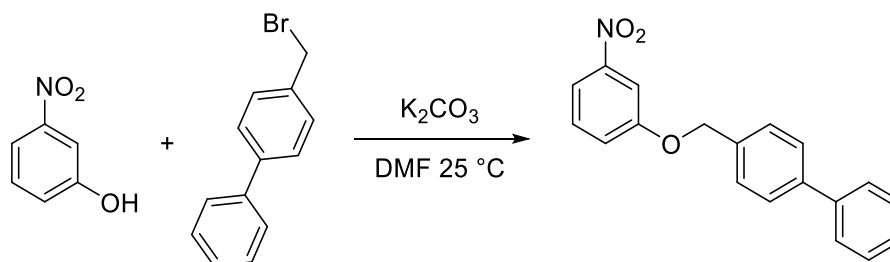
Sintesi dell'1-((4-(tert-butil)benzil)ossi)-3-nitrobenzene (23)



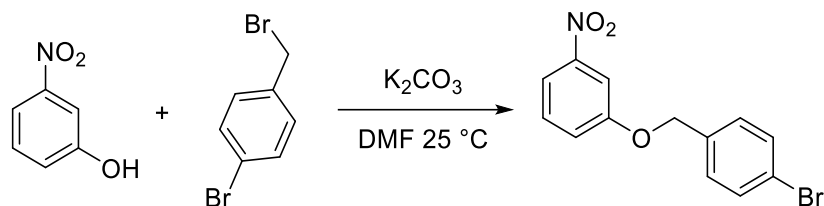
Il composto **23** è stato preparato secondo la procedura D a partire dall' 1-(bromometil)-4-(tert-butil)benzene, si è ottenuto un olio giallo chiaro con resa del 95%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ

7.80–7.87 (m, 2H), 7.35–7.46 (m, 5H), 7.27–7.34 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 1.34 (s, 9H) ppm.

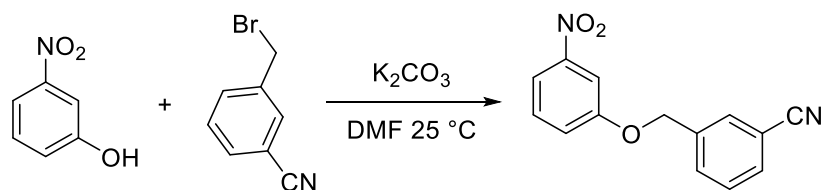
Sintesi del 4-((3-nitrofenossi)metil)-1,1'-bifenile (24)



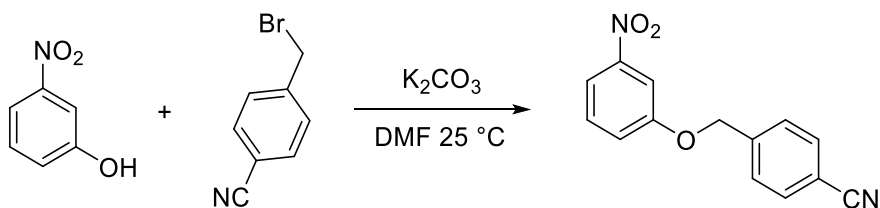
Il composto **24** è stato preparato secondo la procedura D a partire dal 4-(bromometil)-1,1'-bifenile, si è ottenuto un solido beige con resa del 92%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.75-7.72 (m, 2H), 7.55-7.50 (m, 4H), 7.42 (d, $J = 8.2\text{ Hz}$, 2H), 7.38-7.34 (m, 3H), 7.28-7.22 (m, 2H), 5.09 (s, 2H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 159.1, 149.1, 141.2, 140.4, 134.7, 130.0, 128.8, 128.0, 127.4, 127.3, 127.0, 121.8, 115.9, 109.2, 70.3 ppm.

Sintesi dell'1-((4-bromobenzil)ossi)-3-nitrobenzene (25)

Il composto **25** è stato preparato secondo la procedura D a partire dall'1-bromo-4-(bromometil)benzene, si è ottenuto un solido beige con resa del 94%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81-7.76 (m, 2H), 7.51 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 2H), 7.42 (t, $J = 8.2\text{ Hz}$, 1H), 7.33-7.27 (m, 3H), 5.07 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 158.9, 149.1, 134.9, 131.9, 130.2, 129.2, 122.3, 121.8, 116.1, 109.3, 69.8 ppm.

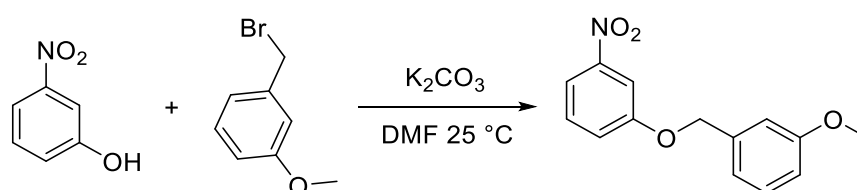
Sintesi del 3-((3-nitrofenossi)metil)benzonitrile (26)

Il composto **26** è stato preparato secondo la procedura D a partire dal 3-(bromometil)benzonitrile, si è ottenuto un solido quasi bianco con resa del 98%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90-7.88 (m, 1H), 7.82 (t, $J = 2.3\text{ Hz}$, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.72-7.67 (m, 2H), 7.56 (t, $J = 7.7\text{ Hz}$, 1H), 7.49 (t, $J = 8.2\text{ Hz}$, 1H), 7.33 (ddd, $J = 8.3/2.5/0.8\text{ Hz}$, 1H), 5.20 (s, 2H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 158.6, 149.2, 137.4, 132.0, 131.6, 130.8, 130.3, 129.6, 121.9, 118.5, 116.6, 113.0, 109.1, 62.2 ppm.

Sintesi del 4-((3-nitrofenossi)metil)benzonitrile (27)

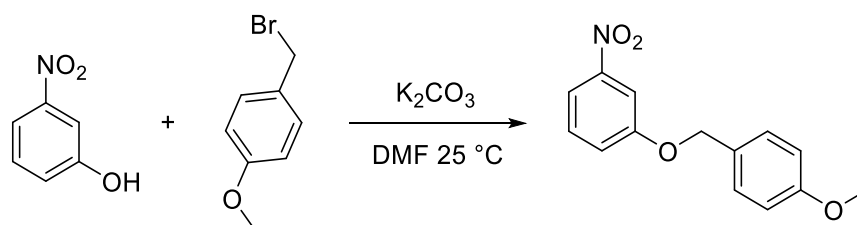
Il composto **27** è stato preparato secondo la procedura D a partire dal 4-(bromometil)benzonitrile, si è ottenuto un solido beige con resa del 95%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90-7.87 (m, 1H), 7.82 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.49 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.33-7.30 (m, 1H), 5.23 (s, 2H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 158.6, 149.3, 141.1, 132.6, 130.3, 127.7, 121.8, 118.5, 116.6, 112.2, 109.2, 69.4 ppm.

Sintesi dell'1-metossi-3-((3-nitrofenossi)metil)benzene (28)



Il composto **28** è stato preparato secondo la procedura D a partire dall'1-(bromometil)-3-metossibenzene (**5**), si ottiene un olio beige con resa del 96%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81-7.79 (m, 2H), 7.43-7.27 (m, 3H), 7.04-7.01 (m, 2H), 6.89 (dd, $J = 8.2/2.2$ Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.81 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 159.9, 159.2, 141.1, 137.4, 130.0, 129.8, 121.8, 119.7, 115.9, 113.8, 113.1, 109.3, 70.4, 55.2 ppm

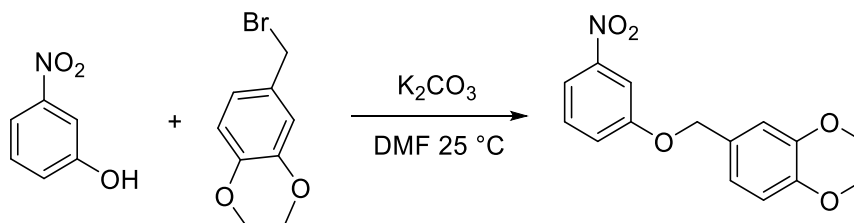
Sintesi dell'1-((4-metossibenzil)ossi)-3-nitrobenzene (29)



Il composto **29** è stato preparato secondo la procedura D a partire dall'1-(bromometil)-4-metossibenzene (**6**), si è ottenuto un solido beige con resa del 96%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.85-7.82 (m, 2H), 7.46-7.28 (m, 4H), 6.98-6.50 (m, 2H), 5.09 (s, 2H), 3.84 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$

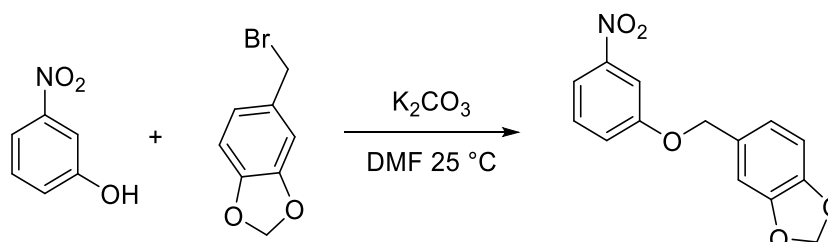
NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 159.8, 159.3, 149.2, 130.0, 129.4, 127.7, 122.0, 115.9, 114.2, 109.2, 70.4, 55.3 ppm.

Sintesi dell'1,2-dimetossi-4-((3-nitrofenossi)metil)benzene (30)



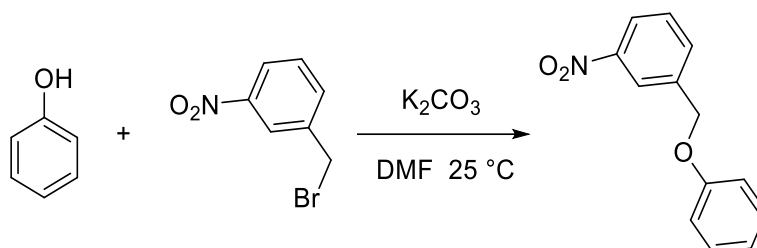
Il composto **30** è stato preparato secondo la procedura D a partire dal 4-(bromometil)-1,2-dimetossibenzene (**7**), si ottiene un solido giallo con resa del 92%. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76-7.74 (m, 2H), 7.36 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.26-7.23 (m, 1H), 6.97-6.95 (m, 2H), 6.85 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.01 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H) ppm; ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 159.2, 149.2, 149.1, 149.1, 130.0, 128.8, 121.9, 120.5, 115.8, 111.2, 111.1, 109.2, 70.6, 55.9 ppm.

Sintesi del 5-((3-nitrofenossi)metil)benzo[d][1,3]diossolo (31)



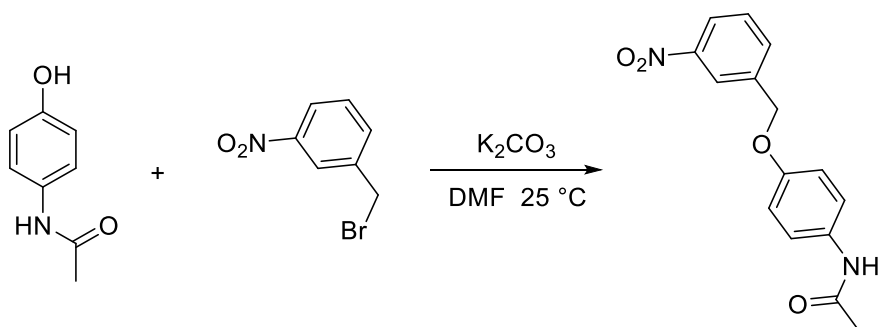
Il composto **31** è stato preparato secondo la procedura D a partire dal 5-(bromometil)benzo[d][1,3]diossolo (**8**), si ottiene un solido quasi bianco con resa del 93%. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.84-7.81 (m, 2H), 7.80 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.30-7.27 (m, 1H), 6.94-6.90 (m, 2H), 6.83 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 5.04 (s, 2H) ppm; ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 159.1, 149.2, 148.1, 147.8, 130.0, 129.5, 122.0, 121.5, 116.0, 109.2, 108.4, 108.3, 101.3, 70.6 ppm.

Sintesi dell'1-nitro-3-(fenossimetil)benzene (32)

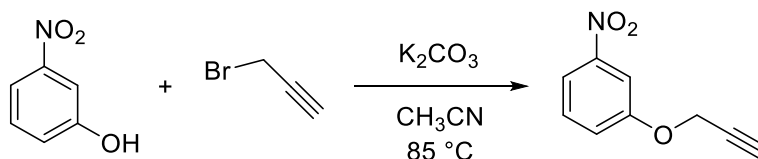


Il composto **32** è stato preparato secondo la procedura D a partire dal fenolo e dall'1-(bromometil)-3-nitrobenzene, si è ottenuto un olio giallo con resa del 92%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (s, 1H), 8.20 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.58 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.04 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H), 5.17 (s, 2H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 158.2, 148.5, 139.4, 134.0, 129.7, 129.6, 122.9, 122.1, 121.6, 114.9, 68.6 ppm.

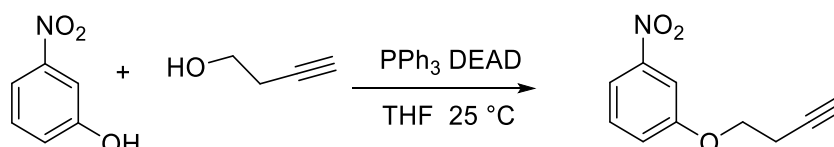
Sintesi della N-(4-((3-nitrobenzil)ossi)fenil)acetammide (33)



Il composto **33** è stato preparato secondo la procedura D a partire dalla N-(4-idrossifenil)acetammide e dal 1-(bromometil)-3-nitrobenzene, si è ottenuto un solido giallo con resa del 75%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 9.81 (br s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.18 (dd, $J = 8.2/1.6$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.51-7.48 (m, 2H), 7.00-6.96 (m, 2H), 5.22 (s, 2H), 2.01 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO) δ 168.3, 154.1, 148.3, 140.1, 134.4, 133.9, 130.5, 123.1, 122.4, 121.0, 115.3, 68.5, 24.2 ppm.

Sintesi dell'1-nitro-3-(prop-2-in-1-ilossi)benzene (34)

Il composto **34** è stato preparato a partire dal 3-bromoprop-1-ino secondo la procedura D, utilizzando come solvente l'acetonitrile (0.9 M), scaldando la miscela di reazione a riflusso e lasciandola reagire per 2h. Dopo estrazione si ottiene un solido marrone con resa del 97%, sufficientemente puro da essere utilizzato come tale nello step successivo. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.88 (ddd, $J = 8.1/2.1/0.9$ Hz, 1H), 7.84 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.32 (ddd, $J = 8.3/2.6/0.9$ Hz, 1H), 4.80 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.60 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 157.9, 149.2, 130.1, 121.9, 116.6, 109.6, 77.3, 76.7, 56.3 ppm.

Sintesi dell'1-(but-3-in-1-ilossi)-3-nitrobenzene (35)

Ad una soluzione di 3-nitrofenolo (0.80 g, 5.75 mmol, 1 eq) in THF (15 mL) raffreddata a 0 °C e posta sotto agitazione magnetica si aggiunge trifenilfosfina (1.51 g, 5.75 mmol, 1 eq), 3-butan-1-olo (0.52 mL, 6.91 mmol, 1.2 eq) goccia a goccia DEAD (dietilazodicarbossilato) (0.90 g, 5.75 mmol, 1 eq). Si lascia reagire una notte a 25 °C in atmosfera di azoto.

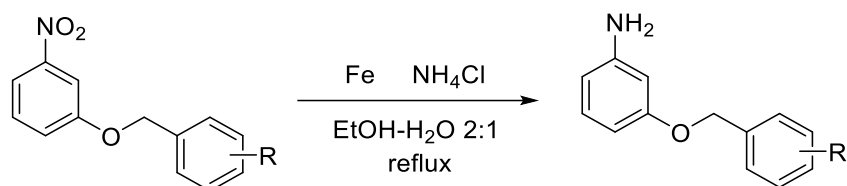
Si diluisce la miscela di reazione con acqua e si estrae con etile acetato (x2).

Le fasi organiche riunite vengono lavate con soda 2M (x2), successivamente con brine (x1), anidificate ed infine concentrate sottovuoto.

Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 95:5. Si ottengono 0,44 g di prodotto come olio giallino pallido (40%). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81 (ddd, $J = 8.2/2.1/0.9$ Hz, 1H), 7.71 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.43 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.23 (ddd, $J = 8.3/2.5/0.9$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.72

Parte sperimentale

(td, $J = 6.8/2.7$ Hz, 2H), 2.08 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 159.0, 149.1, 130.0, 121.6, 116.1, 109.0, 79.9, 70.3, 66.6, 19.4 ppm.

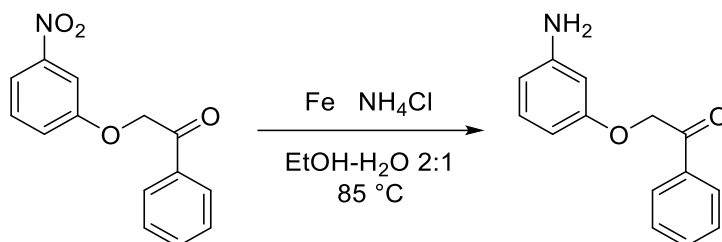
Procedura Generale E: riduzione dei nitroderivati

In un pallone si discioglie l'appropriato nitroderivato (1 eq) in etanolo (0.2 M) e si pone sotto agitazione magnetica. Successivamente si aggiunge il ferro metallico (5 eq) e in ultimo il cloruro d'ammonio (0.5 eq) disciolto in acqua (0.2 M). Si scalda a riflusso e si lascia reagire per 1 h.

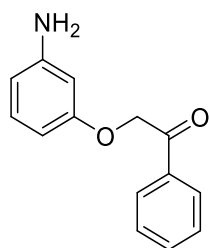
Al termine, la miscela di reazione viene filtrata su letto di Celite ed il filtrato ottenuto viene concentrato sottovuoto. Il residuo viene ripreso con acqua, neutralizzato con una soluzione satura di bicarbonato di sodio ed estratto con etile acetato (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1), anidificate e concentrate sottovuoto.

Il composto ottenuto risulta sufficientemente puro per essere usato come tale nello step successivo.

Sintesi del 2-(3-amminofenossi)-1-feniletan-1-one (36)



Il composto **36** è stato preparato facendo reagire il 2-(3-nitrofenossi)-1-feniletan-1-one (**21**) secondo la procedura E.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₄H₁₃N₁O₂

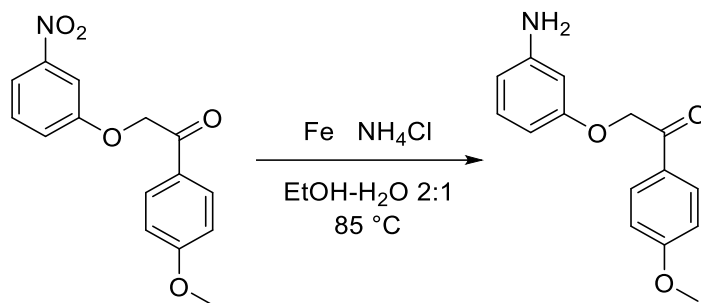
Stato fisico: solido marrone

Peso molecolare: 227

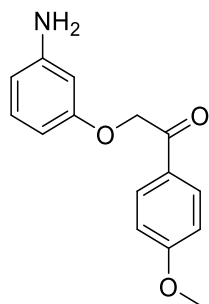
Resa: 99%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.63 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.07 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.36-6.33 (m, 3H), 5.23 (s, 2H), 3.73 (br s, 1H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 194.8, 159.2, 147.9, 134.8, 134.7, 130.2, 128.8, 128.2, 108.9, 104.5, 102.1, 70.8 ppm.

Sintesi del 2-(3-amminofenossi)-1-(4-metossifenil)etan-1-one (37)

Il composto **37** è stato preparato facendo reagire il 1-(4-metossifenil)-2-(3-nitrofenossi)etan-1-one (**22**), secondo la procedura E.

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₁₅H₁₃N₁O₂

Stato fisico: solido marrone

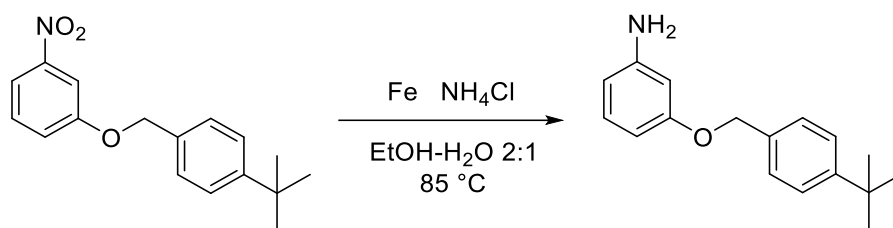
Peso molecolare: 227

Resa: 99%

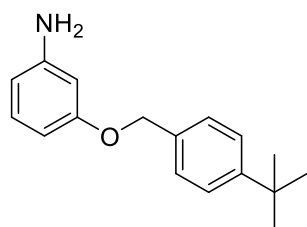
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (dd, J = 8.9/1.4 Hz, 2H), 7.05 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.35-6.31 (m, 3H), 5.15 (s, 2H), 3.87 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 193.4, 164.0, 159.3, 148.0, 130.6, 130.2, 127.7, 114.0, 108.8, 104.5, 102.0, 70.7, 55.5 ppm.

Sintesi della 3-((4-(tert-butil)benzil)ossi)anilina (38)



L'anilina **38** è stata preparata facendo reagire l'1-((4-(tert-butil)benzil)ossi)-3-nitrobenzene (**23**), secondo la procedura E.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₇H₂₁N₁O₁

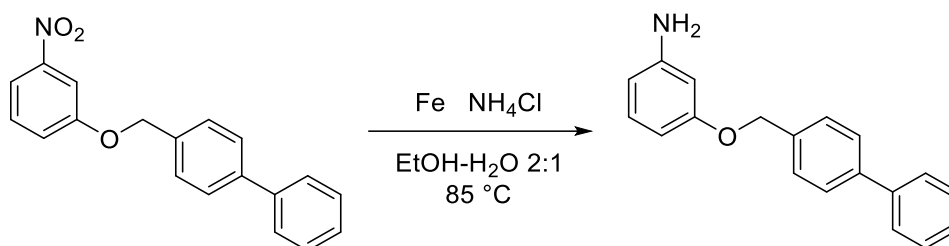
Stato fisico: olio bruno

Peso molecolare: 255

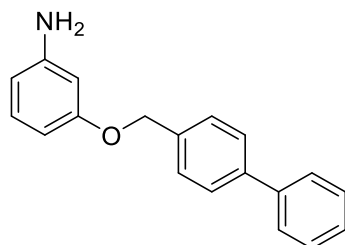
Resa: 97%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.19 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.55 (ddd, J = 8.2/2.3/0.6 Hz, 1H), 6.41-6.39 (m, 2H), 5.10 (s, 2H), 3.69 (s, 2H), 1.49 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.3, 151.0, 148.0, 134.3, 130.3, 128.9, 127.6, 108.3, 105.0, 102.1, 69.8, 34.7, 31.5 ppm.

Sintesi della 3-([1,1'-bifenil]-4-ilmetossi)anilina (39)

L'anilina **39** è stata preparata facendo reagire il 4-((3-nitrofenossi)metil)-1,1'-bifenile (**24**), secondo la procedura E.

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₁₉H₁₇N₁O₁

Stato fisico: solido quasi bianco

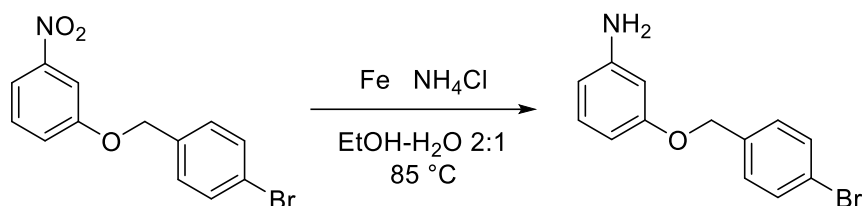
Peso molecolare: 275

Resa: 98%

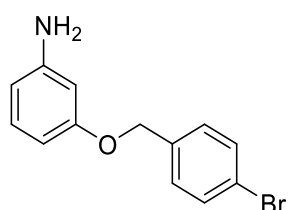
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.66-7.55 (m, 4H), 7.53-7.49 (m, 4H), 7.42-7.28 (m, 1H), 7.12 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.48 (ddd, J = 8.2/2.4/0.7 Hz, 1H), 6.39 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 6.37-6.35 (m, 1H), 5.11 (s, 2H), 3.65 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.2, 147.8, 140.9, 140.8, 136.4, 130.1, 128.8, 127.9, 127.3, 127.2, 127.1, 108.3, 105.1, 102.3, 69.7 ppm.

Sintesi della 3-((4-bromobenzil)ossi)anilina (40)



L'anilina **40** è stata preparata facendo reagire l'1-((4-bromobenzil)ossi)-3-nitrobenzene (**25**), secondo la procedura E.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₃H₁₂N₁O₁Br₁

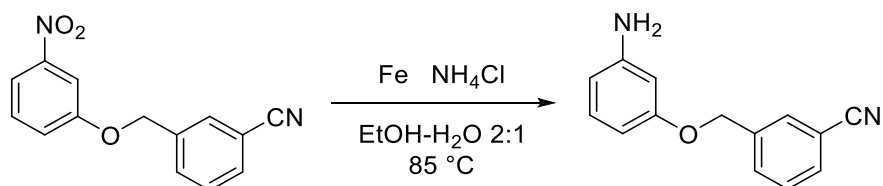
Stato fisico: solido grigio chiaro

Peso molecolare: 278

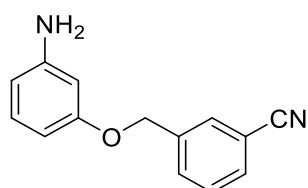
Resa: 82%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.58, (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.17 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.49-6.37 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 3.78 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.9, 148.1, 136.5, 131.8, 130.4, 129.3, 121.9, 108.6, 104.8, 102.1, 69.1 ppm.

Sintesi del 3-((3-amminofenossi)metil)benzonitrile (41)

Il composto **41** è stato preparato facendo reagire il 3-((3-nitrofenossi)metil)benzonitrile (**26**) secondo la procedura E.

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₁₄H₁₂N₂O₁

Stato fisico: olio marrone

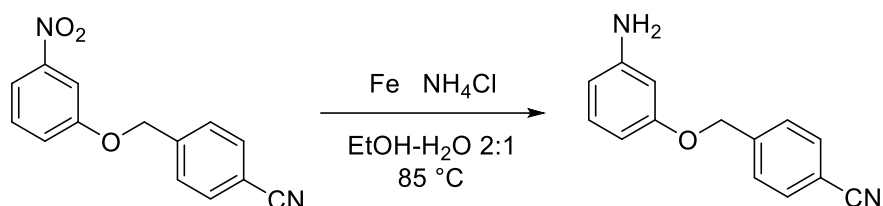
Peso molecolare: 224

Resa: 94%

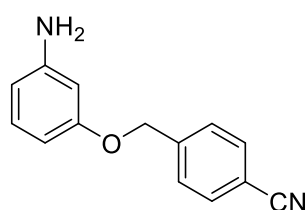
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (s, 1H), 7.62 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.09 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.39-6.32 (m, 3H), 4.97 (s, 2H), 3.85 (br s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.5, 148.4, 139.0, 131.7, 131.5, 130.7, 130.4, 129.4, 119.0, 112.4, 108.7, 104.5, 101.9, 68.4 ppm.

Sintesi del 4-((3-amminofenossi)metil)benzonitrile (42)



Il composto **42** è stato preparato facendo reagire il 4-((3-nitrofenossi)metil)benzonitrile (**27**) secondo la procedura E



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₄H₁₂N₂O₁

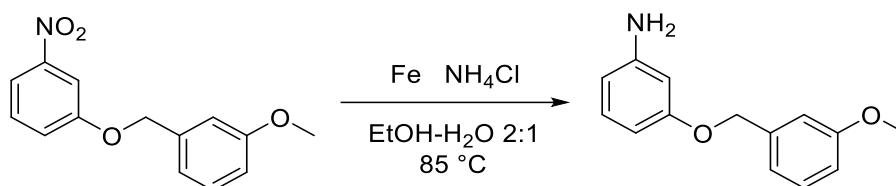
Stato fisico: solido beige

Peso molecolare: 224

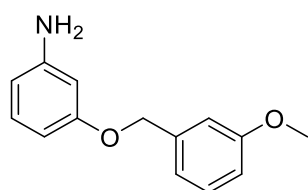
Resa: 98%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.08 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.38-6.31 (m, 3H), 5.09 (s, 2H), 3.75 (br s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.4, 148.1, 142.8, 132.4, 130.3, 127.5, 118.8, 111.5, 108.7, 104.5, 101.9, 68.7 ppm.

Sintesi della 3-((3-metossibenzil)ossi)anilina (43)

L'anilina **43** è stata preparata facendo reagire l'1-metossi-3-((3-nitrofenossi)metil)benzene (**28**) secondo la procedura E.

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₁₄H₁₅N₁O₂

Stato fisico: solido marrone

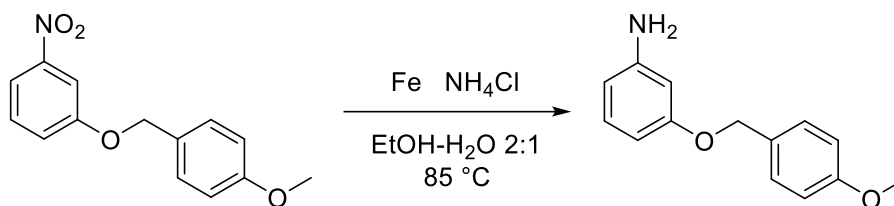
Peso molecolare: 229

Resa: 98%

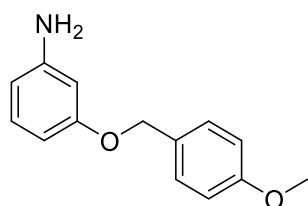
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.36 (m, 1H), 7.17-7.07 (m, 3H), 6.97-6.95 (m, 1H), 6.51-6.49 (m, 1H), 6.39-6.35 (m, 2H), 5.05 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.81 (br s, 2H), ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.1, 159.9, 148.0, 139.0, 130.3, 129.7, 119.8, 113.5, 113.0, 108.3, 104.9, 102.1, 69.8, 55.3 ppm.

Sintesi della 3-((4-metossibenzil)ossi)anilina (44)



L'anilina **44** è stata preparata facendo reagire l'1-((4-metossibenzil)ossi)-3-nitrobenzene (**29**) secondo la procedura E.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₄H₁₅N₁O₂

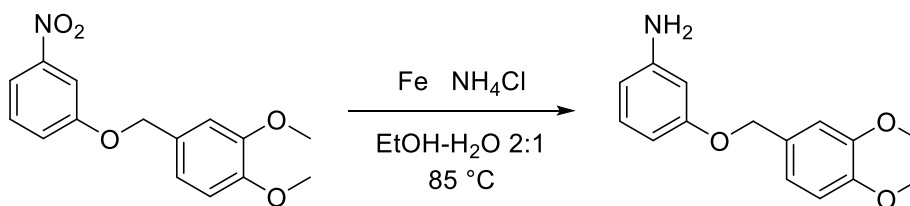
Stato fisico: solido grigio

Peso molecolare: 229

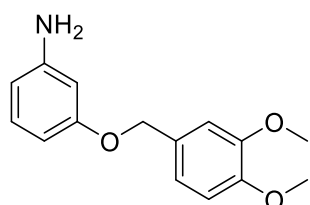
Resa: 92%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.12 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.46 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.35 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.79 (br s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.1, 159.4, 147.9, 130.2, 129.3, 128.4, 114.0, 108.2, 105.0, 102.1, 69.7, 55.4 ppm.

Sintesi della 3-((3,4-dimetossibenzil)ossi)anilina (45)

L'anilina **45** è stata preparata facendo reagire l'1,2-dimetossi-4-((3-nitrofenossi)metil)benzene (**30**) secondo la procedura E. Dopo la filtrazione e la neutralizzazione, la miscela viene estratta mediante diclorometano (x2).

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₁₅H₁₇N₁O₃

Stato fisico: solido quasi bianco

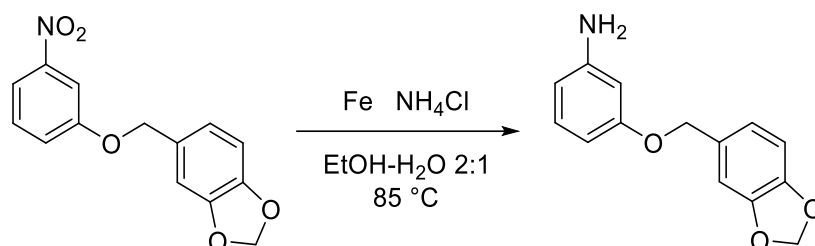
Peso molecolare: 259

Resa: 94%

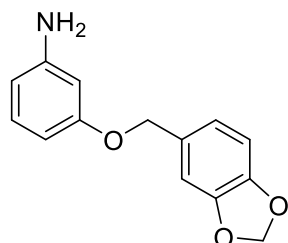
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.09 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.99-6.97 (m, 2H), 6.89 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.44-6.41 (m, 1H), 6.35-6.31 (m, 2H), 4.96 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.68 (br s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.0, 149.1, 148.8, 147.8, 130.1, 129.7, 120.2, 111.1, 111.0, 108.2, 104.9, 102.0, 69.9, 56.0, 55.9 ppm.

Sintesi della 3-(benzo[d][1,3]diossol-5-ilmetossi)anilina (46)



L'anilina **46** è stata preparata facendo reagire il 5-((3-nitrofenossi)metil)benzo[d][1,3]diossolo (**31**) secondo la procedura E.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₄H₁₃N₁O₃

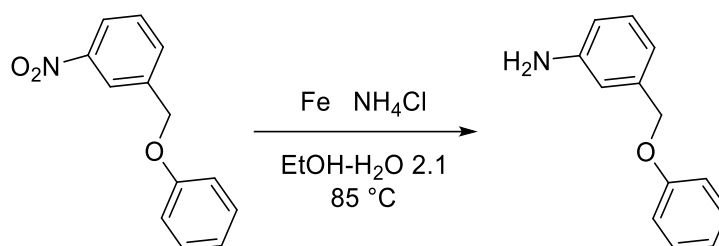
Stato fisico: solido marrone

Peso molecolare: 243

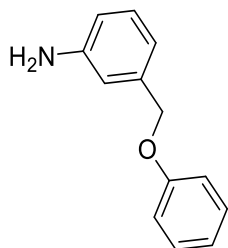
Resa: 94%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16-7.11 (m, 4H), 6.48-6.45 (m, 1H), 6.36-6.34 (m, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.94 (s, 2H), 3.76 (br s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.0, 148.1, 148.0, 147.9, 147.4, 131.1, 130.2, 121.3, 108.5, 108.4, 108.3, 104.9, 102.1, 101.2, 69.8 ppm.

Sintesi della 3-(fenossimetil)anilina (47)

L'anilina **47** è stata preparata facendo reagire l'1-nitro-3-(fenossimetil)benzene (**32**), secondo la procedura E.

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₁₃H₁₃N₁O₁

Stato fisico: solido giallo

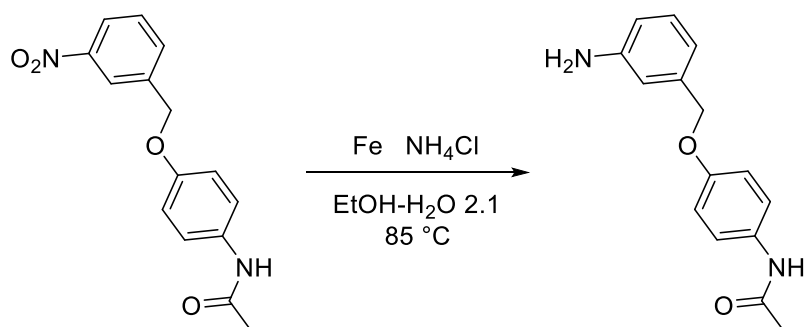
Peso molecolare: 199

Resa: 80%

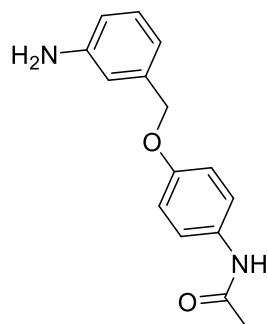
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.54-7.47 (m, 2H), 7.38-7.34 (m, 1H), 7.23-7.18 (m, 3H), 7.03-6.99 (m, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.76-6.74 (m, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.78 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.1, 147.2, 138.5, 129.9, 129.8, 121.2, 115, 2, 114.9, 114.2, 70.2 ppm.

Sintesi della N-(4-((3-amminobenzil)ossi)fenil)acetammide (48)



L'anilina **48** è stata preparata facendo reagire la N-(4-((3-nitrobenzil)ossi)fenil)acetammide (**33**), secondo la procedura E.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₅H₁₆N₂O₂

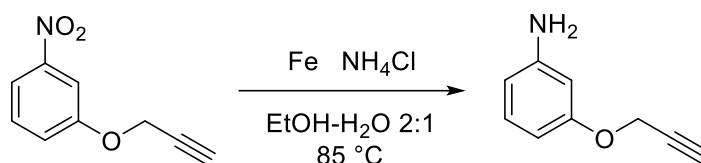
Stato fisico: solido quasi bianco

Peso molecolare: 256

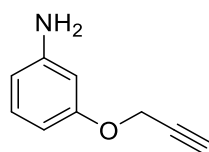
Resa: 92%

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.43-7.40 (m, 2H), 7.10 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.94-6.90 (m, 2H), 6.81-6.80 (m, 1H), 6.75 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.69-6.66 (m, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.61 (br s, 2H), 2.10 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 170.0, 155.6, 147.5, 138.2, 131.6, 128.8, 121.6, 116.9, 114.7, 114.6, 114.2, 70.0, 22.2 ppm.

Sintesi della 3-(prop-2-in-1-ilossi)anilina (49)

L'anilina **49** è stata preparata facendo reagire l'1-nitro-3-(prop-2-in-1-ilossi)benzene (**34**) secondo la procedura E.

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₉H₉N₁O₁

Stato fisico: olio marrone

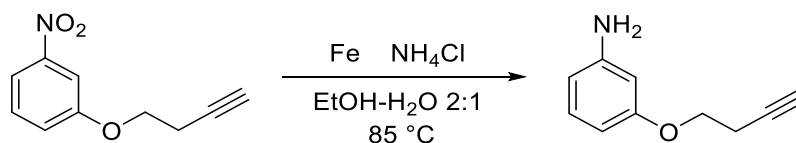
Peso molecolare: 147

Resa: 96%

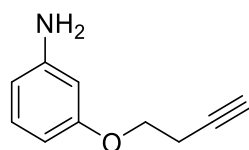
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.12 (td, J = 8.0/1.6 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.37-6.32 (m, 2H), 4.66 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.80 (br s, 2H), 2.62 (t, J = 2.4 Hz, 1H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.8, 148.3, 130.3, 108.9, 104.6, 102.0, 79.3, 75.9, 55.7 ppm.

Sintesi della 3-(but-3-in-1-ilossi)anilina (50)



L'anilina **50** è stata preparata facendo reagire 1-(but-3-in-1-ilossi)-3-nitrobenzene (**35**) secondo la procedura E.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₁₀H₁₁N₁O₁

Stato fisico: olio giallo

Peso molecolare: 161

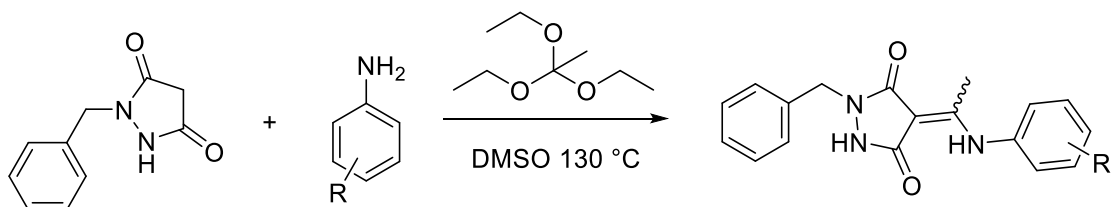
Resa: 85%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.09 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.37-6.31 (m, 2H), 6.27 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 4.08 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.71 (br s, 2H), 2.69 (td, J = 7.0/2.7 Hz, 2H), 2.09 (t, J = 2.7 Hz, 1H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.6, 148.0, 130.2, 108.3, 104.6, 101.8, 80.7, 70.0, 65.8, 19.6 ppm.

Sintesi degli aza-analoghi di TN-16

Procedura Generale F: sintesi degli aza-analoghi del TN-16

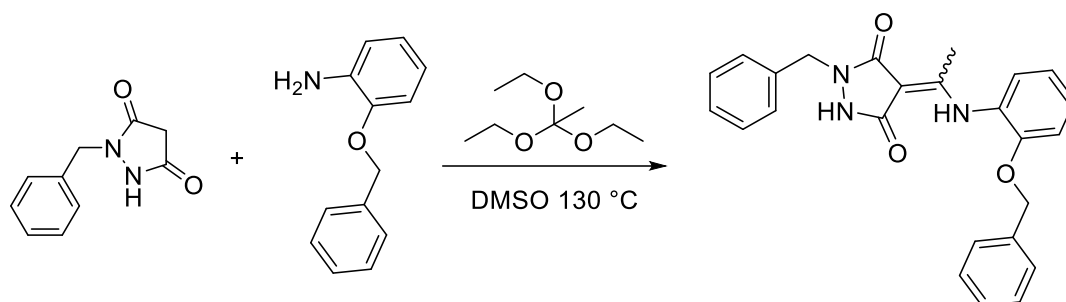


In un Carius contenente una soluzione 1-benzilpirazolidin-3,5-dione (0.53 mmol, 1 eq) in DMSO anidro (1.0 mL), posta sotto agitazione magnetica, si aggiunge l'appropriata anilina (1 eq) e il trietilortoacetato (0.68 mmol, 1.3 eq).

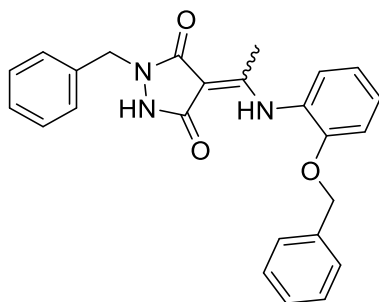
La miscela di reazione viene lasciata in agitazione per 3 h alla temperatura di 130 °C.

Al termine, si lascia raffreddare la miscela di reazione, si diluisce con HCl 1.5M e si estrae con etile acetato (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1), anidificate e concentrate sottovuoto. Il grezzo ottenuto viene purificato per flash cromatografia su gel di silice.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((2-(benzilossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione
(51)



Il composto **51** è stato ottenuto a partire dalla 2-(benzilossi)anilina secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 7:3 e petroliere/etile acetato 5:5.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₅H₂₃N₃O₃

Stato fisico: solido beige

Peso molecolare: 413

Punto di fusione: 160-162 °C

Resa: 30%

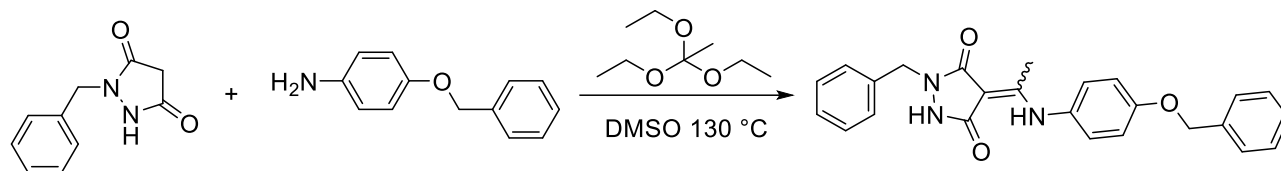
IR (neat) 3030, 2923, 1643, 1605, 1582, 1484, 1404, 1261, 1214, 752, 696 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 67:33, δ 11.82 (s, 1H), 7.34-7.09 (m, 12H), 6.98-6.90 (m, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 2.40 (s, 3H) ppm.

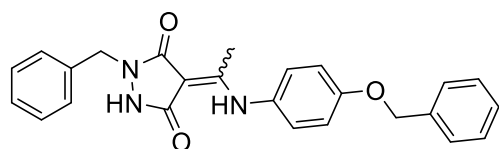
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.8, 168.4, 168.0, 152.8, 136.1, 136.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.1, 127.8, 127.0, 126.9, 125.6, 121.1, 113.8, 90.4, 70.7, 48.6, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 414 $[M+H]^+$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((4-(benzilossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione
(52)



Il composto **52** è stato ottenuto a partire dalla 4-(benzilossi)anilina secondo la procedura generale F. Il grezzo ottenuto risulta essere insolubile, pertanto non viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, ma si filtra sottovuoto isolando il solido e triturando il filtrato a 0 °C con acqua e poco metanolo.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: $C_{25}H_{23}N_3O_3$

Stato fisico: solido quasi bianco

Peso molecolare: 413

Punto di fusione: 234-235 °C dec.

Resa: 58%

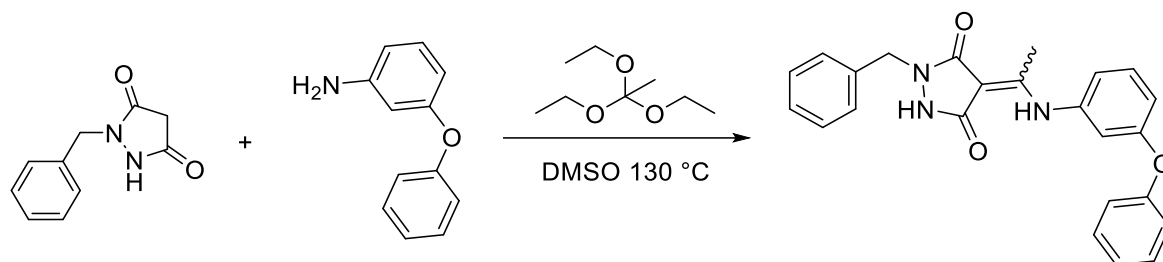
IR (neat) 3139, 3029, 2864, 1672, 1630, 1571, 1488, 1360, 1237, 1012, 738, 694 cm^{-1} .

1H -NMR (400 MHz, DMSO) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 55:45, δ 11.79 (s, 1H), 10.02 (br s, 1H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.36-7.22 (m, 8H), 7.09 (dd, $J = 9.0/3.0$ Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 2.46 (s, 3H) ppm.

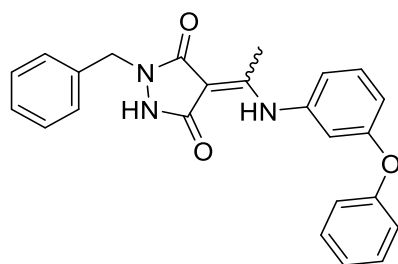
^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.9, 167.6, 165.8, 157.9, 137.3, 137.1, 129.4, 128.9, 128.8, 128.5, 128.4, 128.1, 127.7, 127.2, 116.0, 89.7, 70.1, 47.9, 15.1 ppm.

MS (ESI) m/z 414 $[M+H]^+$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-fenossifenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (53)



Il composto **53** è stato ottenuto a partire dalla 3-fenossianilina secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluente petroliere/etile acetato 5:5.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₄H₂₁N₃O₃

Stato fisico: solido quasi bianco

Peso molecolare: 399

Punto di fusione: 154-155 °C (Dec)

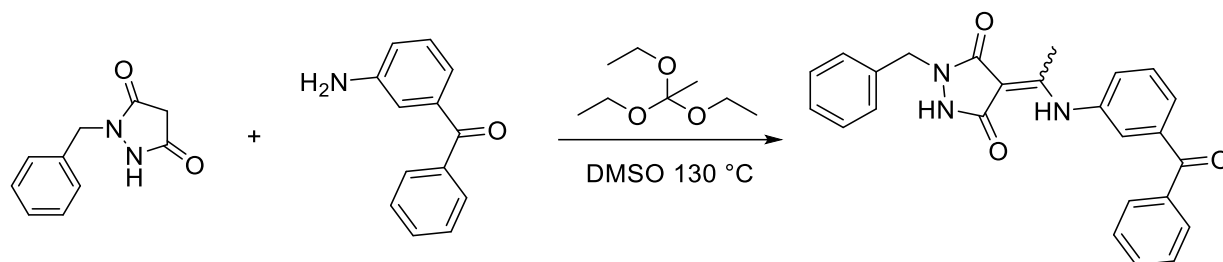
Resa: 42%

IR (neat) 3032, 2920, 1674, 1613, 1595, 1571, 1473, 1388, 1359, 1218, 749, 690 cm⁻¹.

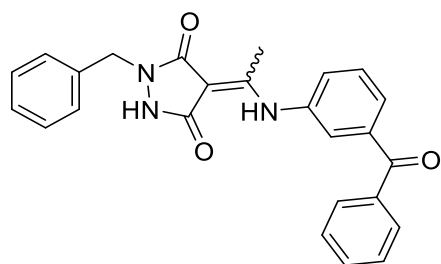
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 57:43, δ 11.88 (s, 1H), 8.43 (br s, 1H), 7.33-6.99 (m, 9H), 6.98-6.96 (m, 2H), 6.92-6.89 (m, 1H), 6.84-6.78 (m, 1H), 6.70 (dt, *J* = 9.3/2.1 Hz, 1H), 4.61 (s, 2H), 2.41 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 167.9, 167.6, 158.7, 156.0, 137.4, 135.3, 130.6, 130.1, 128.7, 128.4, 128.0, 124.4, 119.8, 119.7, 117.4, 115.0, 90.4, 48.5, 15.8 ppm.

MS (ESI) *m/z* 400 [M+H]⁺.

Sintesi dell'E/Z-4-(1-((3-benzoilfenil)ammino)etiliden)-1-benzilpirazolidin-3,5-dione (54)

Il composto **54** è stato ottenuto a partire dal (3-amminofenil)(fenil)metanone secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.

**Caratteristiche chimico-fisiche**

Formula bruta: C₂₅H₂₁N₃O₃

Stato fisico: solido beige

Peso molecolare: 411

Punto di fusione: 215-217 °C (Dec)

Resa: 31%

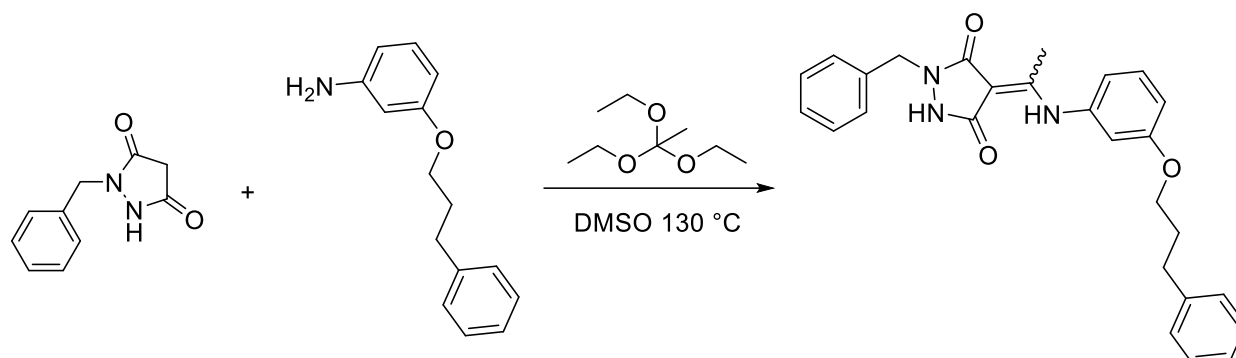
IR (neat) 3059, 3031, 2922, 1656, 1626, 1570, 1477, 1424, 1359, 1283, 804, 691 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 80:20, δ 12.32 (s, 1H), 7.83-7.79 (m, 3H), 7.67-7.28 (m, 11H), 4.81 (s, 2H), 2.56 (s, 3H) ppm.

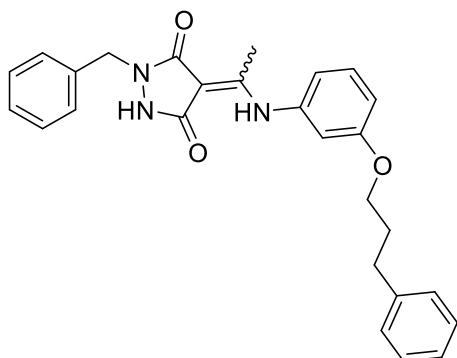
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 195.2, 168.0, 167.9, 166.8, 139.2, 136.8, 136.2, 135.1, 133.0, 130.0, 129.8, 129.2, 129.0, 128.8, 128.6, 128.5, 128.1, 126.6, 90.4, 48.4, 16.0 ppm.

MS (ESI) m/z 412 [M+H]⁺.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-(3-fenilpropossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (55)



Il composto **55** è stato ottenuto a partire dalla 3-(3-fenilpropossi)anilina (**15**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 7:3 e petroliere/etile acetato 5:5.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₇H₂₇N₃O₃

Stato fisico: solido arancione pallido

Peso molecolare: 441

Punto di fusione: 143-145 °C (Dec)

Resa: 32%

IR (neat) 3025, 2922, 2874, 1674, 1629, 1569, 1484, 1357, 1282, 1158, 692 cm⁻¹.

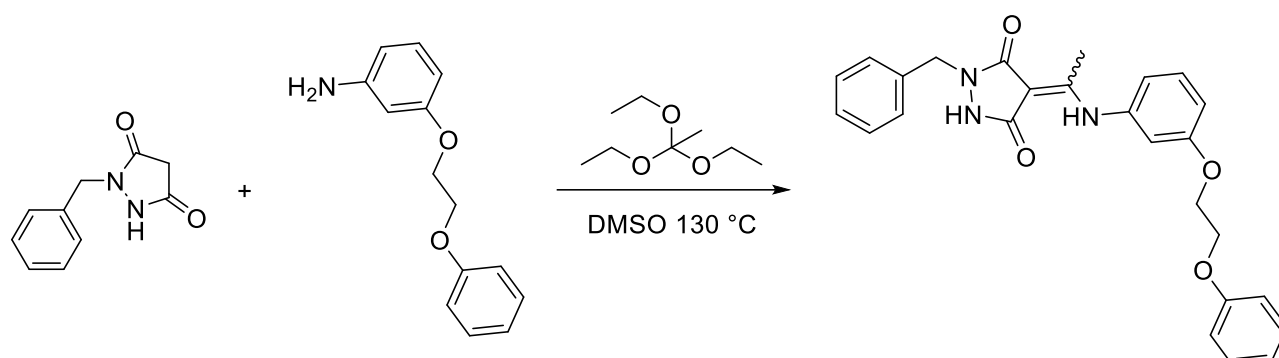
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 58:42, δ 12.00 (s, 1H), 7.40-7.21 (m, 11H), 6.92-6.88 (m, 1H), 6.79-6.70 (m, 2H),

4.75 (s, 2H), 4.00 (td, $J = 6.3/2.9$ Hz, 2H), 2.85 (td, $J = 6.0/2.1$ Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.16 (td, $J = 6.3/2.5$ Hz, 2H) ppm.

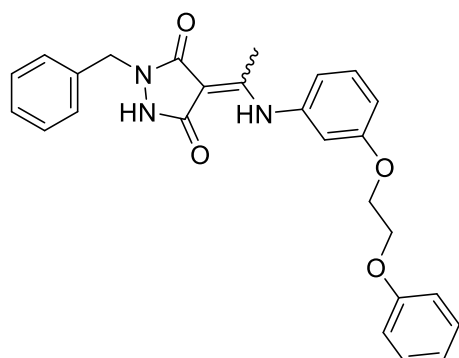
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 167.9, 167.7, 159.9, 141.2, 137.1, 135.5, 130.3, 128.7, 128.6, 128.5, 128.0, 126.1, 117.8, 113.9, 111.7, 90.1, 67.2, 48.6, 32.1, 30.7, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 442 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-(2-fenossietossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (56)



Il composto **56** è stato ottenuto a partire dalla 3-(2-fenossietossi)anilina (**16**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 7:3 e petroliere/etile acetato 5:5.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₆H₂₅N₃O₄

Stato fisico: solido beige

Peso molecolare: 443

Punto di fusione: 176-178 °C (Dec)

Resa: 5%

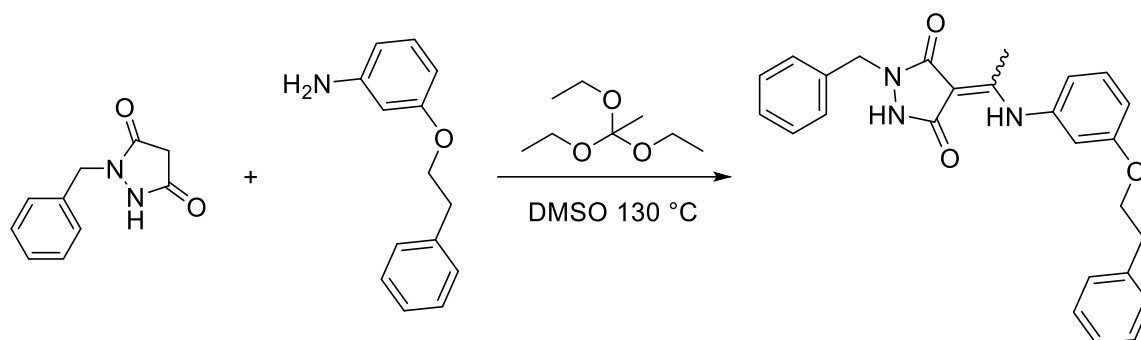
IR (neat) 3029, 2916, 2848, 1674, 1630, 1576, 1483, 1245, 1159, 1065, 756, 693 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 64:36, δ 12.41 (s, 1H), 7.42-7.03 (m, 11H), 7.02-6.83 (m, 3H), 4.88 (s, 2H), 4.38-4.34 (m, 4H), 2.54 (s, 3H) ppm.

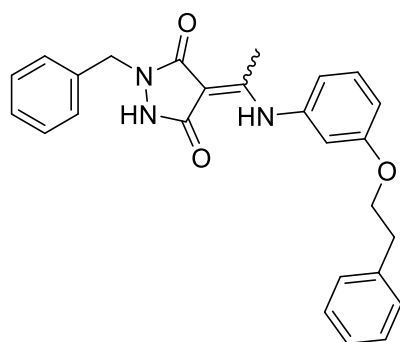
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) segnali riferiti all'isomero geometrico prevalente, δ 169.3, 166.2, 165.3, 160.1, 159.6, 136.4, 134.8, 130.6, 129.6, 128.6, 128.5, 128.3, 127.7, 121.3, 117.9, 114.7, 112.1, 89.1, 67.0, 66.2, 48.1, 16.4 ppm.

MS (ESI) m/z 444 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-fenetossifenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (57)



Il composto **57** è stato ottenuto a partire dalla 3-fenetossianilina (**17**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 7:3 e petroliere/etile acetato 5:5.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₆H₂₅N₃O₃

Stato fisico: solido beige

Peso molecolare: 427

Punto di fusione: 140-141 °C

Resa: 40%

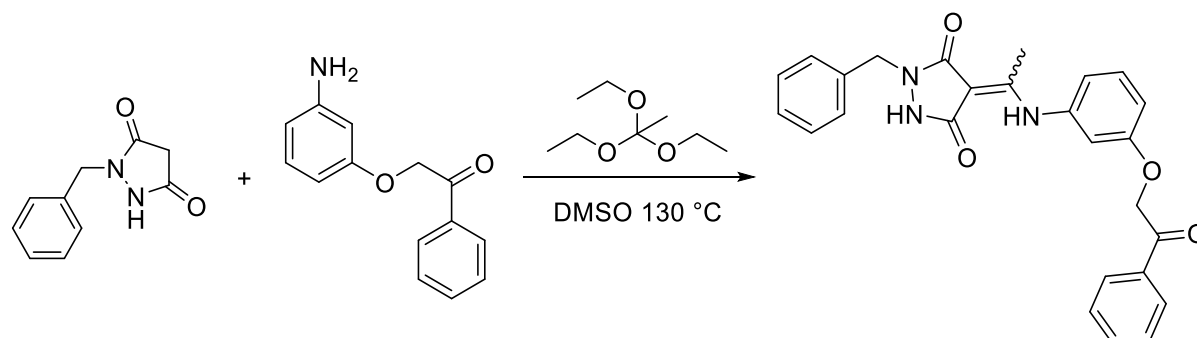
IR (neat) 3027, 2915, 2871, 1674, 1629, 1572, 1483, 1358, 1158, 1041, 764, 691 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 63:37, δ 12.00 (s, 1H), 7.38-7.19 (m, 11H), 6.93-6.88 (m, 1H), 6.81-6.71 (m, 2H), 4.74 (s, 2H), 4.24-4.19 (m, 2H), 3.17-3.12 (m, 2H), 2.52 (s, 3H) ppm.

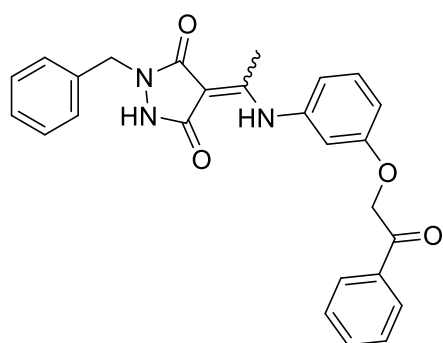
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.6, 167.7, 167.5, 159.7, 137.9, 137.2, 135.5, 130.3, 129.0, 128.7, 128.6, 128.5, 127.9, 126.7, 117.6, 113.8, 111.9, 90.2, 69.0, 48.5, 35.7, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 428 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-(2-ossi-2-feniletossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (58)



Il composto **58** è stato ottenuto a partire dal 2-(3-amminofenossi)-1-feniletan-1-one (**36**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₆H₂₃N₃O₄

Stato fisico: solido viola

Peso molecolare: 441

Punto di fusione: 83-85 °C

Resa: 13%

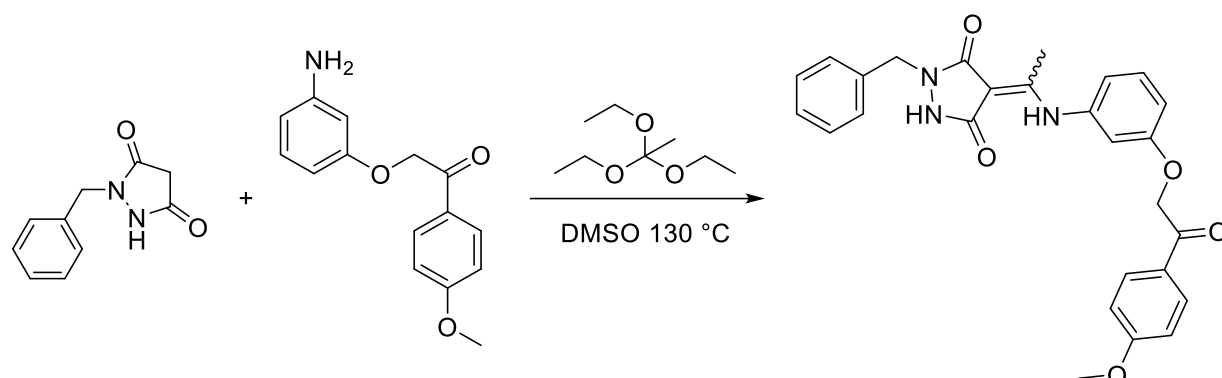
IR (neat) 3030, 2922, 1670, 1616, 1594, 1575, 1488, 1387, 1157, 1075, 970, 755, 688 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 61:40, δ 12.00 (s, 1H), 8.02-7.99 (m, 2H), 7.65-7.63 (m, 1H), 7.56-7.50 (m, 2H), 7.36-7.25 (m, 6H), 6.94-6.91 (m, 1H), 6.84-6.76 (m, 2H) ppm.

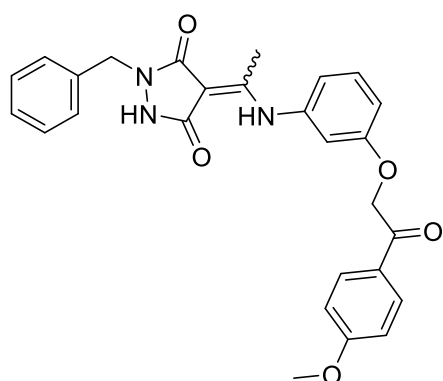
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 193.8, 168.5, 167.9, 167.6, 158.8, 137.2, 135.7, 134.3, 134.2, 130.5, 129.0, 128.7, 128.4, 128.1, 127.9, 118.5, 114.1, 112.1, 90.2, 70.7, 48.5, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 440 [M-H]⁻.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-(2-(4-metossifenil)-2-ossotossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (59)



Il composto **59** è stato ottenuto a partire dal 2-(3-amminofenossi)-1-(4-metossifenil)etan-1-one (**37**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₇H₂₅N₃O₅

Stato fisico: solido marrone scuro

Peso molecolare: 471

Punto di fusione: 94-96 °C

Resa: 26%

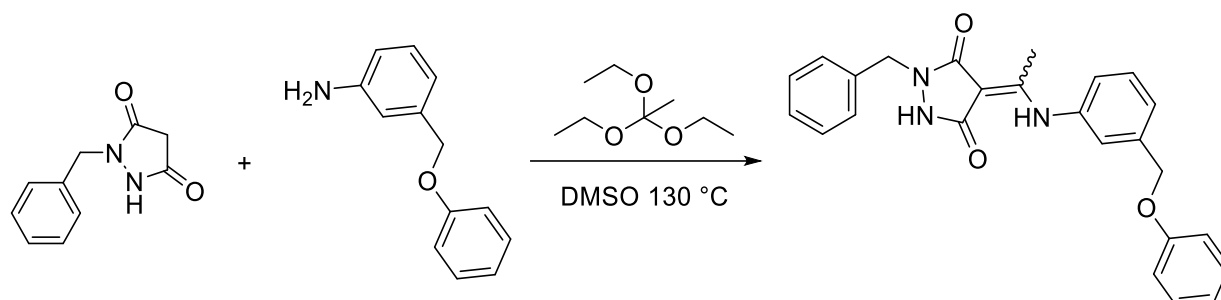
IR (neat) 2928, 2838, 1670, 1618, 1595, 1574, 1488, 1388, 1235, 1158, 795, 699 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 60:40, δ 11.98 (s, 1H), 8.00 (dd, $J = 8.9/2.2$, 2H), 7.36-7.20 (m, 5H), 7.00-6.91 (m, 3H), 6.83-6.76 (m, 3H), 5.27 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.50 (s, 3H) ppm.

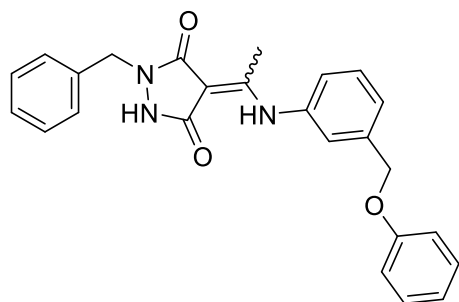
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 192.3, 168.5, 168.0, 167.5, 164.2, 158.9, 137.1, 135.3, 130.5, 130.4, 128.8, 128.7, 128.4, 128.0, 127.3, 118.4, 114.2, 112.1, 90.2, 70.6, 55.6, 48.5, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 470 [M-H]⁻.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-(fenossimetil)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione
(60)



Il composto **60** è stato ottenuto a partire dalla 3-(fenossimetil)anilina (**47**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 8:2 e petroliere/etile acetato 6:4.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₅H₂₃N₃O₃

Stato fisico: solido beige

Peso molecolare: 413

Punto di fusione: 155-157 °C

Resa: 21%

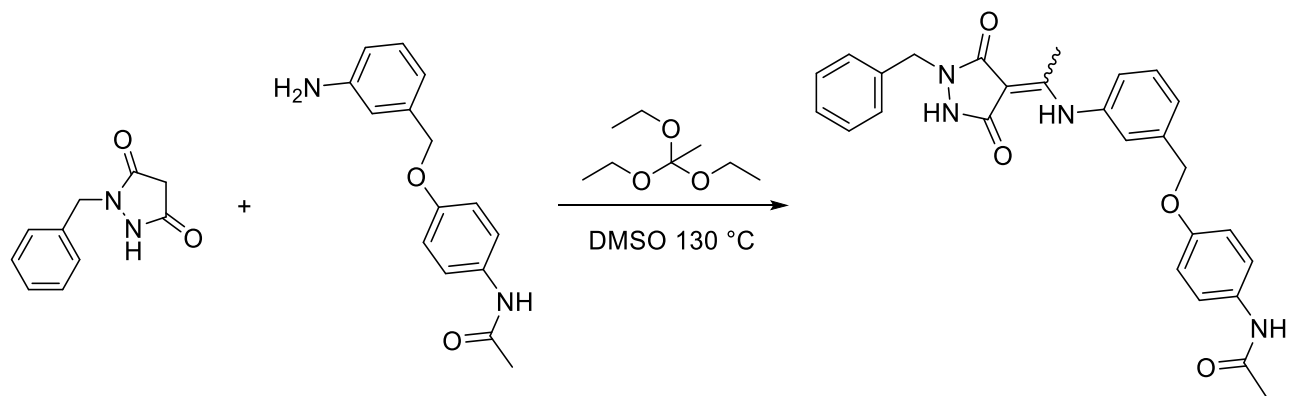
IR (neat) 3032, 2916, 2856, 1677, 1627, 1570, 1486, 1356, 1227, 805, 761, 695 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 55:45, δ 12.07 (s, 1H), 7.49-7.13 (m, 11H), 7.03-6.99 (m, 3H), 5.13 (s, 2H), 4.74 (s, 2H), 2.56 (s, 3H) ppm.

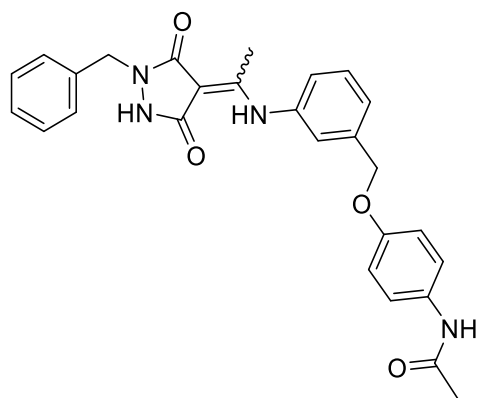
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 168.0, 167.6, 158.3, 139.2, 136.4, 135.4, 129.8, 129.6, 128.7, 128.5, 128.0, 126.3, 124.7, 124.1, 121.4, 114.9, 90.4, 69.0, 48.5, 15.7 ppm.

MS (ESI) m/z 414 [M+H]⁺.

Sintesi della E/Z-N-(4-((3-((1-(1-benzil-3,5-diossopirazolidin-4-iliden)etil)ammino)benzil)ossi)fenil)acetammide (61)



Il composto **61** è stato ottenuto a partire dalla *N*-(4-((3-amminobenzil)ossi)fenil)acetammide (**48**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroletere/etile acetato 5:5 e petroletere/etile acetato 2:8.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₇H₂₆N₄O₄

Stato fisico: solido giallo pallido

Peso molecolare: 470

Punto di fusione: 125-128 °C

Resa: 24%

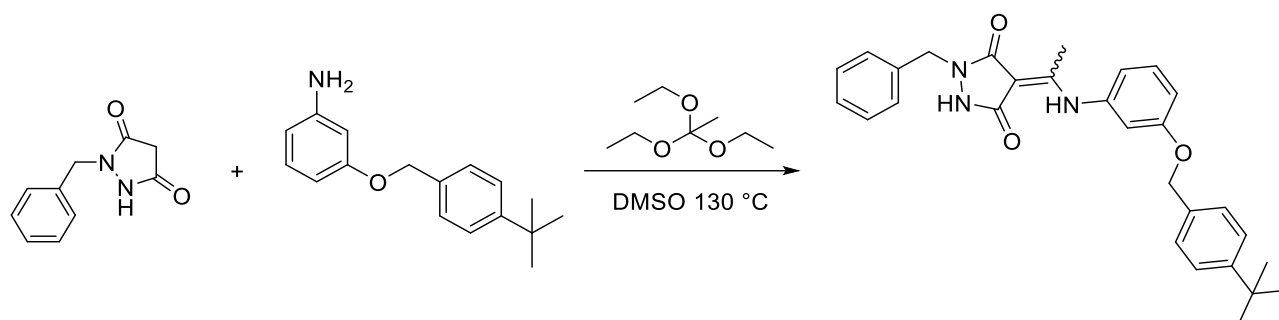
IR (neat) 3119, 3032, 2923, 1616, 1598, 1570, 1508, 1363, 1231, 1013, 797, 699 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 53:47, δ 12.03 (s, 1H), 7.78 (br s, 1H), 7.48-7.10 (m, 11H), 6.91-6.87 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.71 (s, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.13 (s, 3H) ppm.

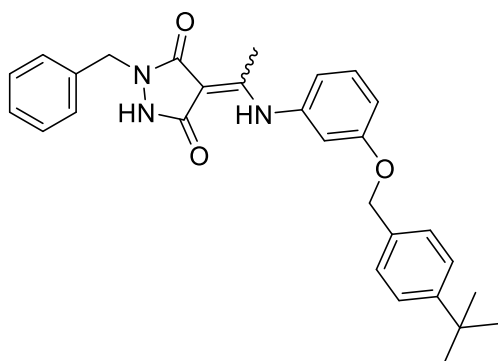
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 168.6, 168.1, 167.8, 154.9, 139.1, 136.3, 135.8, 131.8, 129.8, 128.8, 128.4, 128.0, 126.4, 124.7, 124.0, 121.9, 115.2, 90.2, 69.3, 48.6, 24.3, 15.7 ppm.

MS (ESI) m/z 469 [M-H]⁻.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-((4-(tert-butil)benzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (62)



Il composto **62** è stato ottenuto a partire dalla 3-((4-(tert-butil)benzil)ossi)anilina (**38**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 7:3 e petroliere/etile acetato 5:5.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₉H₃₁N₃O₃

Stato fisico: solido arancione pallido

Peso molecolare: 469

Punto di fusione: 76-78 °C

Resa: 39%

IR (neat) 3033, 2960, 2907, 2858, 1674, 1631, 1575, 1482, 1358, 1158, 1033, 812, 694 cm⁻¹.

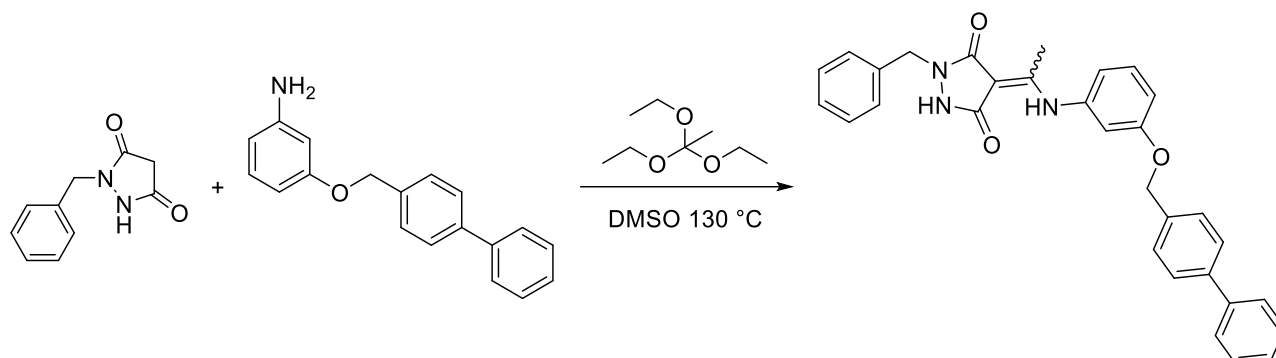
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 61:39, δ 12.02 (s, 1H), 7.46-7.23 (m, 11H), 7.01-6.97 (m, 1H), 6.82-6.77 (m, 2H), 5.06 (s, 2H), 4.74 (s, 2H), 2.50 (s, 3H), 1.32 (s, 9H) ppm.

Parte sperimentale

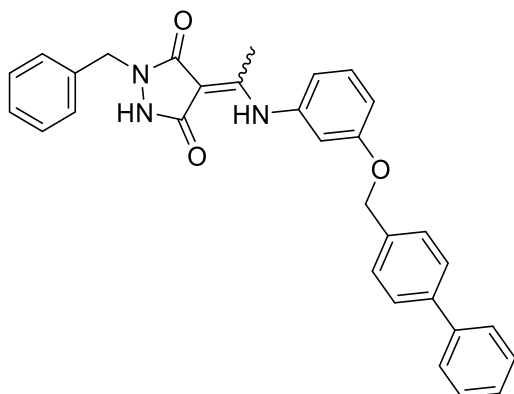
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.3, 167.9, 167.4, 159.6, 151.4, 137.1, 135.4, 133.2, 130.3, 128.7, 128.5, 128.0, 127.5, 125.7, 117.7, 114.3, 112.0, 90.1, 70.2, 48.5, 34.6, 31.4 ppm.

MS (ESI) m/z 468 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Sintesi dell'E/Z-4-(1-((3-([1,1'-bifenil]-4-ilmetossi)fenil)ammino)etiliden)-1-benzilpirazolidin-3,5-dione (63)



Il composto **63** è stato ottenuto a partire dalla 3-([1,1'-bifenil]-4-ilmetossi)anilina (**39**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 2:8.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₃₁H₂₇N₃O₃

Stato fisico: solido beige scuro

Peso molecolare: 489

Punto di fusione: 176-178 °C

Resa: 44%

IR (neat) 3029, 2918, 1674, 1630, 1572, 1484, 1358, 1283, 1156, 1033, 758, 694 cm⁻¹.

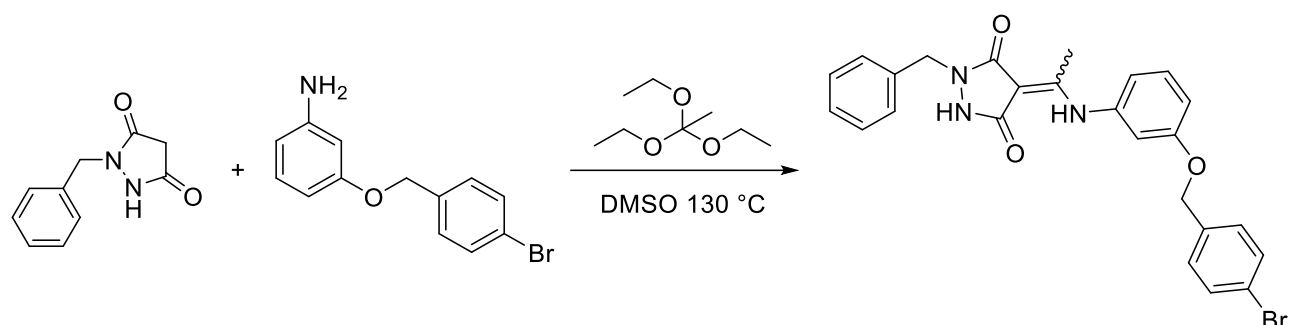
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 62:38, δ 12.03 (s, 1H), 7.67-7.54 (m, 4H), 7.51 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 7.46 (t, *J* = 7.6

Hz, 2H), 7.40-7.21 (m, 8H), 7.02 (td, $J = 8.4/2.2$ Hz, 1H), 6.86-6.79 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.74 (s, 2H), 2.53 (s, 3H) ppm.

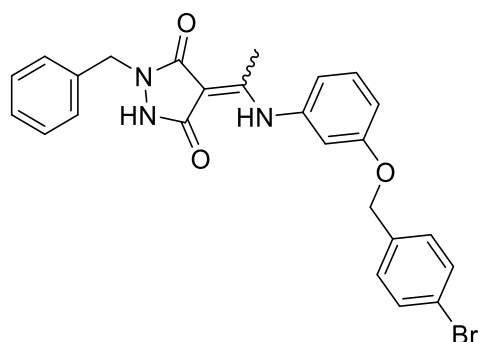
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.8, 167.8, 167.7, 159.5, 141.3, 140.6, 137.2, 135.4, 135.2, 130.4, 128.9, 128.8, 128.5, 128.0, 127.8, 127.5, 127.1, 117.9, 114.3, 112.4, 112.1, 90.3, 70.1, 48.6, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 490 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-((4-bromobenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (64)



Il composto **64** è stato ottenuto a partire dalla 3-((4-bromobenzil)ossi)anilina (**40**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₅H₂₂N₃O₃Br

Stato fisico: solido arancione

Peso molecolare: 491

Punto di fusione: 138-140 °C

Resa: 40%

IR (neat) 3118, 3030, 2902, 1671, 1629, 1575, 1485, 1358, 1157, 1010, 802, 770, 694 cm⁻¹.

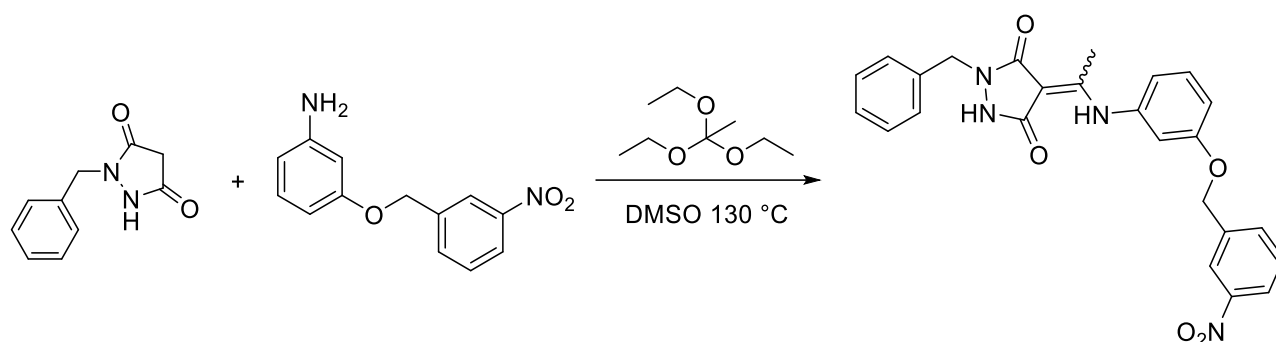
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 60:40, δ 12.07 (s, 1H), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.38-7.21 (m, 9H), 6.98-6.64 (m, 4H), 6.83-6.77 (m, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 2.51 (s, 3H) ppm.

Parte sperimentale

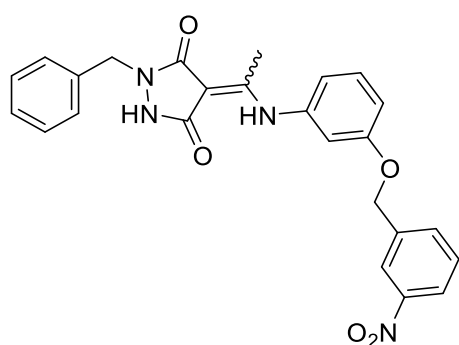
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.1, 167.9, 167.2, 159.3, 137.1, 135.9, 135.3, 131.9, 130.4, 129.1, 128.8, 128.5, 128.0, 122.2, 118.1, 114.3, 112.1, 90.1, 69.5, 48.4, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 490 $[\text{M-H}]^-$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-((3-nitrobenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (65)



Il composto **65** è stato ottenuto a partire dalla 3-((3-nitrobenzil)ossi)anilina (**18**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₅H₂₂N₄O₅

Stato fisico: solido beige scuro

Peso molecolare: 458

Punto di fusione: 68-70 °C

Resa: 41%

IR (neat) 3118, 2925, 1670, 1623, 1575, 1524, 1479, 1386, 1346, 1155, 1030, 730, 697 cm⁻¹.

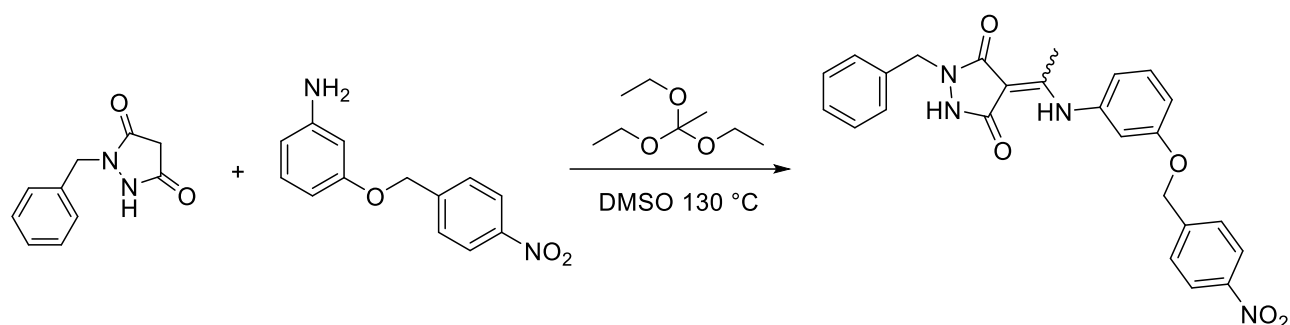
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 60:40, δ 12.00 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.22 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.61 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.41-7.21 (m, 6H), 7.00-6.97 (m, 1H), 6.87-6.81 (m, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.75 (s, 2H), 2.52 (s, 3H) ppm.

Parte sperimentale

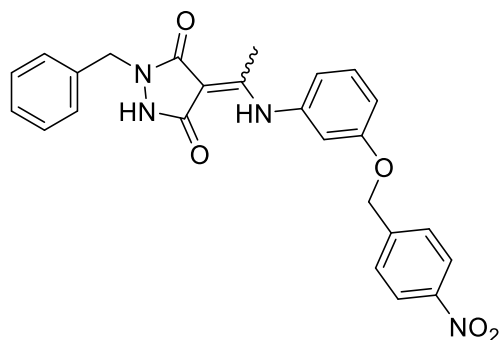
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.0, 167.9, 167.2, 159.0, 148.5, 138.5, 137.3, 135.4, 133.1, 130.6, 129.8, 128.8, 128.5, 128.0, 123.2, 122.2, 118.5, 114.1, 112.1, 90.2, 68.9, 48.4, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 457 [M-H]⁻.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-((4-nitrobenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (66)



Il composto **66** è stato ottenuto a partire dalla 3-((4-nitrobenzil)ossi)anilina (**19**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroletere/etile acetato 5:5 e petroletere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₅H₂₂N₄O₅

Stato fisico: solido quasi bianco

Peso molecolare: 458

Punto di fusione: 159-161 °C

Resa: 40%

IR (neat) 2918, 1675, 1615, 1577, 1519, 1395, 1344, 1201, 1165, 1059, 841, 735 cm⁻¹.

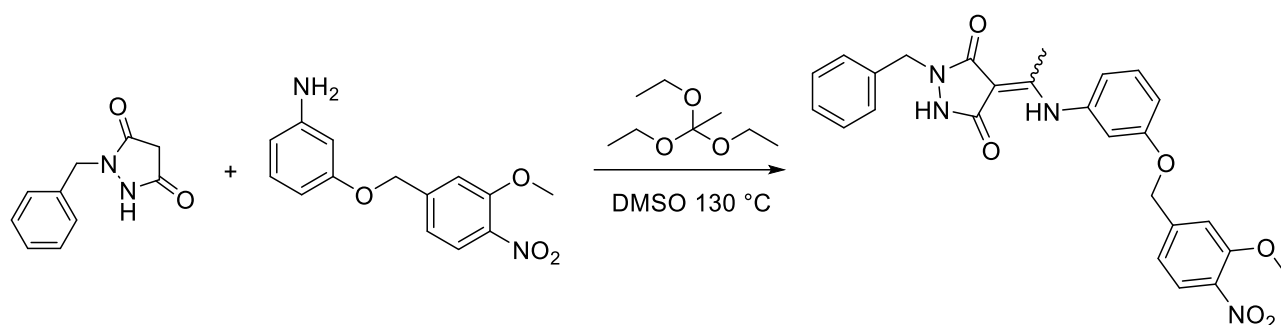
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 60:40, δ 12.10 (s, 1H), 8.28 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.40-7.25 (m, 6H), 6.98-6.81 (m, 3H), 5.21 (s, 2H), 4.75 (s, 2H), 2.52 (s, 3H) ppm.

Parte sperimentale

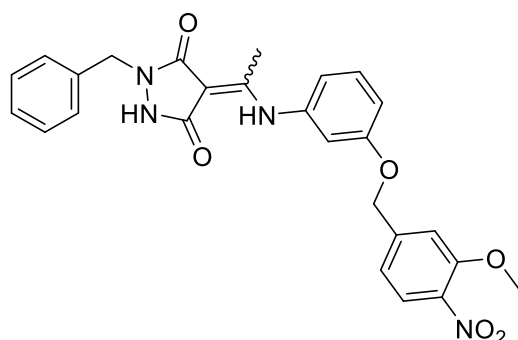
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.0, 167.8, 167.2, 158.9, 147.7, 143.7, 137.3, 135.4, 130.6, 130.5, 128.5, 128.0, 127.6, 124.0, 118.4, 114.1, 112.1, 90.4, 68.9, 48.4, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 457 $[\text{M-H}]^-$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-(3-metossi-4-nitrobenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (67)



Il composto **67** è stato ottenuto a partire dalla 3-((3-metossi-4-nitrobenzil)ossi)anilina (**20**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₆H₂₄N₄O₆

Stato fisico: solido giallo

Peso molecolare: 488

Punto di fusione: 81-83 °C

Resa: 37%

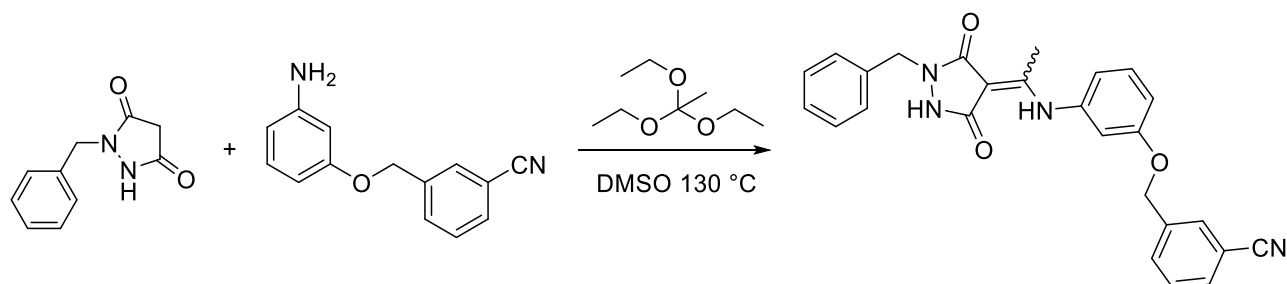
IR (neat) 2925, 1670, 1611, 1577, 1516, 1387, 1342, 1282, 1156, 1026, 699 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 58:42, δ 12.02 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.41-7.25 (m, 7H), 7.18 (s, 1H), 7.08 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.96-6.97 (m, 1H), 6.87-6.80 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.72 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 2.54 (s, 3H) ppm.

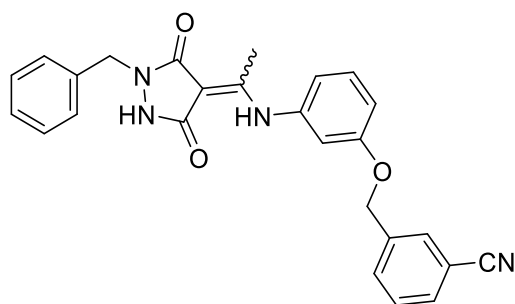
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 167.8, 167.7, 158.9, 153.4, 143.5, 139.1, 137.4, 135.3, 130.6, 128.8, 128.4, 128.0, 126.2, 118.6, 118.4, 113.9, 112.1, 111.7, 90.3, 69.1, 56.6, 48.6, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 487 $[\text{M-H}]^-$.

Sintesi dell'E/Z-3-((3-((1-(1-benzil-3,5-diossopirazolidin-4-iliden)etil)ammino)fenossi)metil)benzonitrile (68)



Il composto **68** è stato ottenuto a partire dal 3-((3-amminofenossi)metil)benzonitrile (**41**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₆H₂₂N₄O₃

Stato fisico: solido giallo

Peso molecolare: 438

Punto di fusione: 59-61 °C

Resa: 38%

IR (neat) 2923, 2229, 1671, 1623, 1574, 1482, 1385, 1338, 1155, 1029, 791, 684 cm⁻¹.

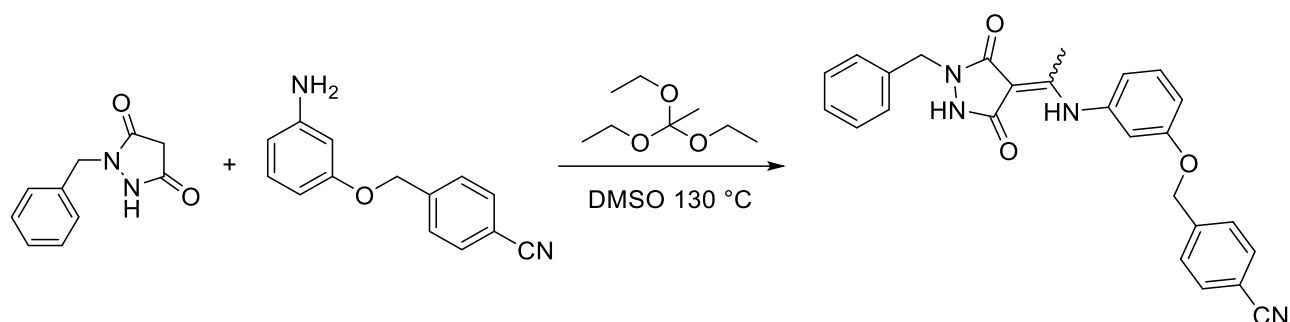
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 60:40, δ 12.01 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.69-7.64 (m, 2H), 7.53 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.40-7.23 (m, 6H), 6.98-6.94 (m, 1H), 6.86-6.78 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.72 (s, 2H), 2.52 (s, 3H) ppm.

Parte sperimentale

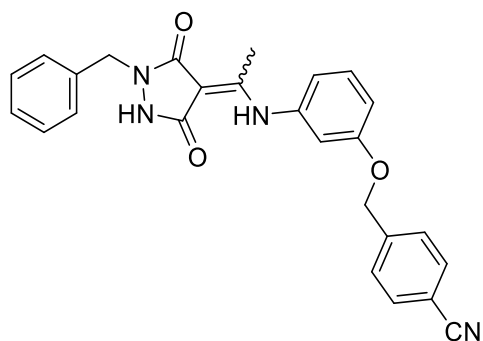
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 167.7, 167.6, 159.0, 137.9, 137.4, 135.3, 131.8, 131.4, 130.7, 130.5, 129.6, 128.8, 128.4, 128.0, 118.5, 118.4, 114.1, 112.9, 112.0, 90.3, 68.9, 48.6, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 437 $[\text{M-H}]^-$.

Sintesi dell'E/Z-4-((3-((1-(1-benzil-3,5-dirossopirazolidin-4-iliden)etil)ammino)fenossi)metil)benzonitrile (69)



Il composto **69** è stato ottenuto a partire dal 4-((3-amminofenossi)metil)benzonitrile (**42**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₆H₂₂N₄O₃

Stato fisico: solido arancione pallido

Peso molecolare: 438

Punto di fusione: 75-77 °C

Resa: 30%

IR (neat) 2973, 2925, 2228, 1618, 1577, 1488, 1387, 1285, 1156, 1042, 670, 548 cm⁻¹.

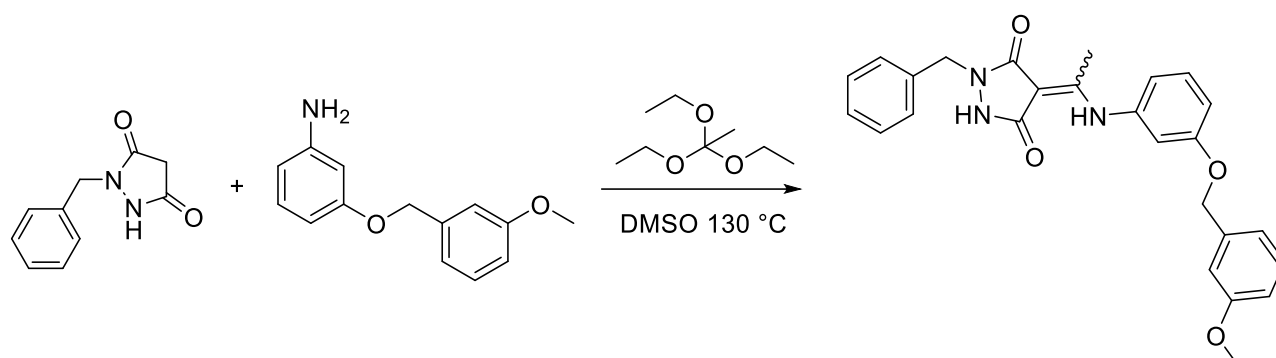
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 63:47, δ 12.01 (s, 1H), 7.69 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.39-7.17 (m, 6H), 6.96-6.92 (m, 1H), 6.85-6.77 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.71 (s, 2H), 2.50 (s, 3H) ppm.

Parte sperimentale

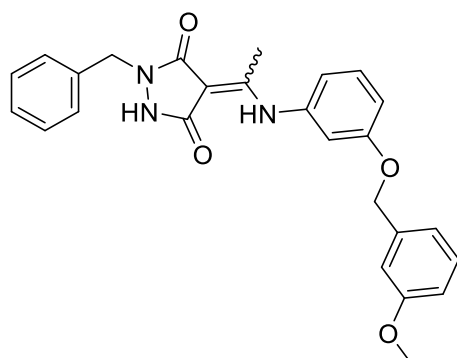
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.5, 167.6, 167.4, 159.0, 141.7, 137.4, 135.5, 132.5, 130.5, 128.7, 128.4, 127.9, 127.6, 118.5, 118.3, 114.0, 112.0 (2C), 90.3, 69.1, 48.4, 15.7 ppm.

MS (ESI) m/z 437 $[\text{M-H}]^-$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-((3-metossibenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (70)



Il composto **70** è stato ottenuto a partire dalla 3-((3-metossibenzil)ossi)anilina (**43**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₆H₂₅N₃O₄

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 443

Punto di fusione: 162-163 °C

Resa: 34%

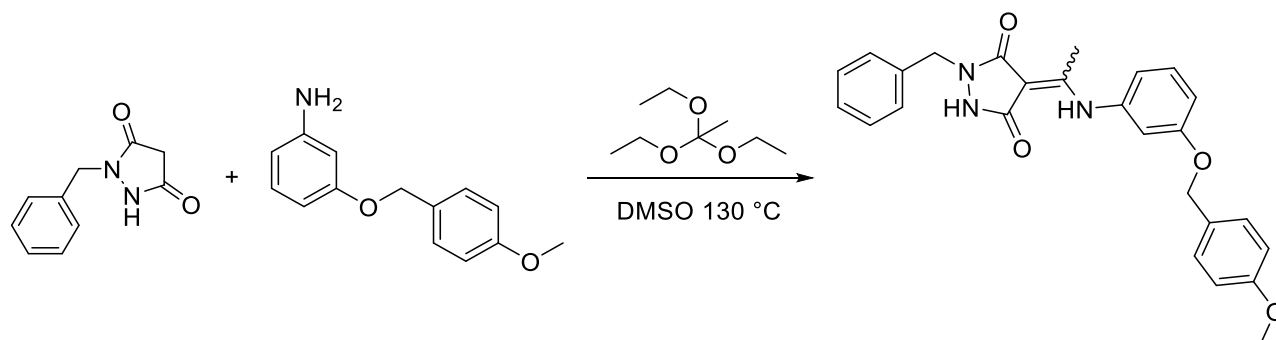
IR (neat) 3152, 3001, 2936, 2833, 1673, 1631, 1597, 1572, 1485, 1360, 1266, 1168, 1020, 797, 693 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 53:47, δ 12.01 (s, 1H), 7.38-7.20 (m, 8H), 7.03-6.77 (m, 6H), 5.08 (s, 2H), 4.73 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.50 (s, 3H) ppm.

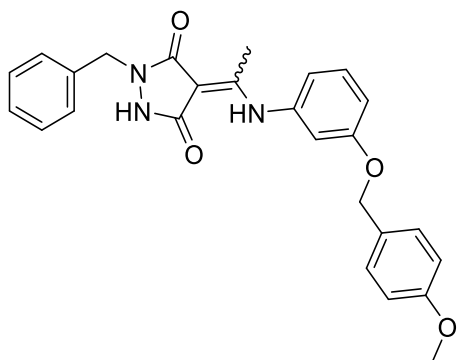
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 167.8, 167.7, 159.9, 159.5, 137.9, 137.2, 135.4, 130.3, 129.8, 128.7, 128.5, 128.0, 119.5, 117.9, 114.3, 113.6, 112.9, 112.1, 90.2, 70.2, 55.3, 48.6, 15.7 ppm.

MS (ESI) m/z 442 [M-H]⁻.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-((4-metossibenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (71)



Il composto **71** è stato ottenuto a partire dalla 3-((4-metossibenzil)ossi)anilina (**44**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₆H₂₅N₃O₄

Stato fisico: solido quasi bianco

Peso molecolare: 443

Punto di fusione: 140-142 °C

Resa: 30%

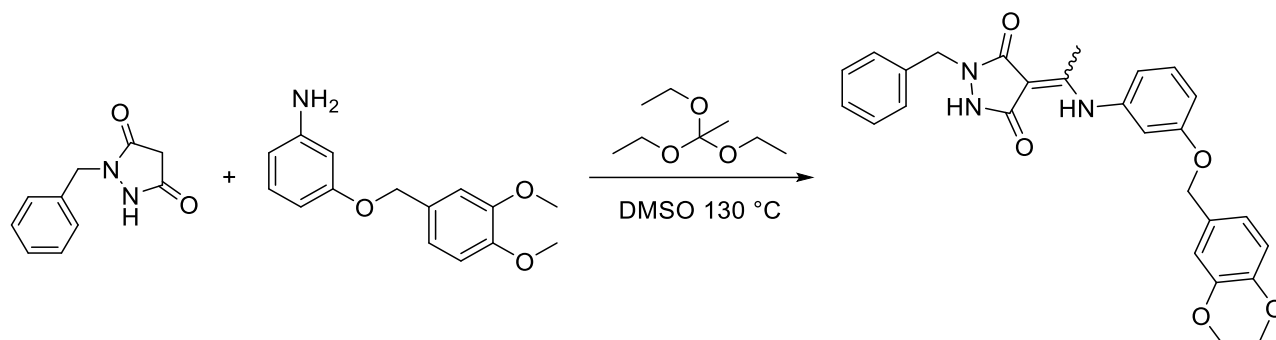
IR (neat) 2930, 2834, 1666, 1615, 1576, 1515, 1387, 1328, 1249, 1154, 1026, 701 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 55:45, δ 12.00 (s, 1H), 7.38-7.20 (m, 8H), 7.00-6.98 (m, 3H), 6.81-6.77 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.73 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.51 (s, 3H) ppm.

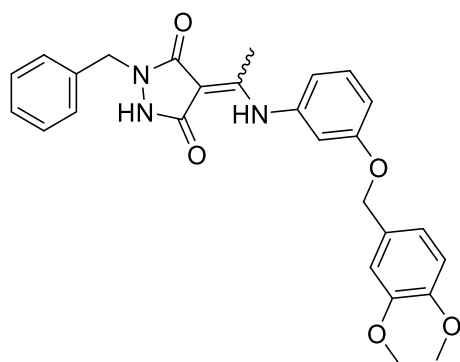
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 167.8, 167.7, 159.7, 159.6, 137.1, 135.4, 130.3, 129.3, 129.2, 128.6, 128.5, 128.0, 117.8, 114.3, 114.1, 112.1, 90.2, 70.1, 55.3, 48.6, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 442 $[\text{M-H}]^-$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3,4-dimetossibenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (72)



Il composto **72** è stato ottenuto a partire dalla 3-((3,4-dimetossibenzil)ossi)anilina (**45**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 5:5 e petroliere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₇H₂₇N₃O₅

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 473

Punto di fusione: 158-159 °C

Resa: 30%

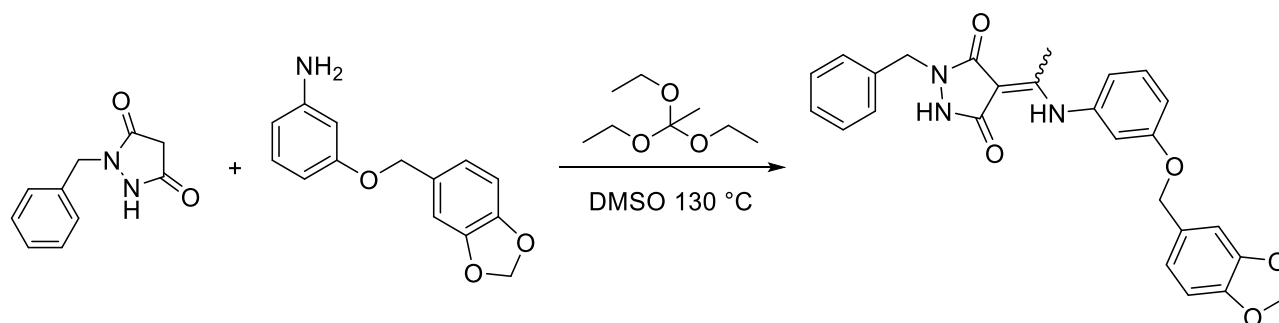
IR (neat) 3118, 2988, 2835, 1674, 1630, 1577, 1518, 1360, 1234, 1133, 1029, 800, 695 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 57:43, δ 12.00 (s, 1H), 7.38-7.21 (m, 6H), 7.00-6.96 (m, 3H), 8.90 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.82-6.77 (m, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.72 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 2.52 (s, 3H) ppm.

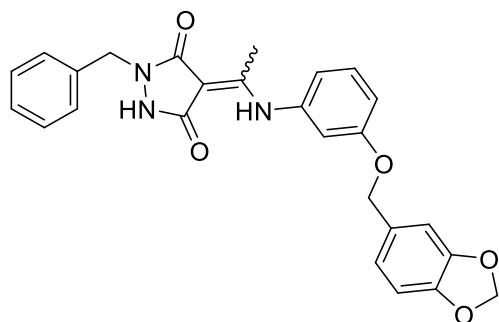
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.5, 167.8, 167.6, 159.6, 149.3, 149.1, 137.2, 135.4, 130.3, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.0, 120.4, 117.8, 114.2, 112.1, 111.2, 90.2, 70.4, 56.0, 55.9, 48.5, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 474 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Sintesi dell'E/Z-4-(1-((3-(benzo[d][1,3]diossol-5-ilmetossi)fenil)ammino)etiliden)-1-benzilpirazolidin-3,5-dione (73)



Il composto **73** è stato ottenuto a partire dalla 3-(benzo[d][1,3]diossol-5-ilmetossi)anilina (**46**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroletere/etile acetato 5:5 e petroletere/etile acetato 3:7.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₆H₂₃N₃O₅

Stato fisico: solido beige

Peso molecolare: 457

Punto di fusione: 145-147 °C

Resa: 26%

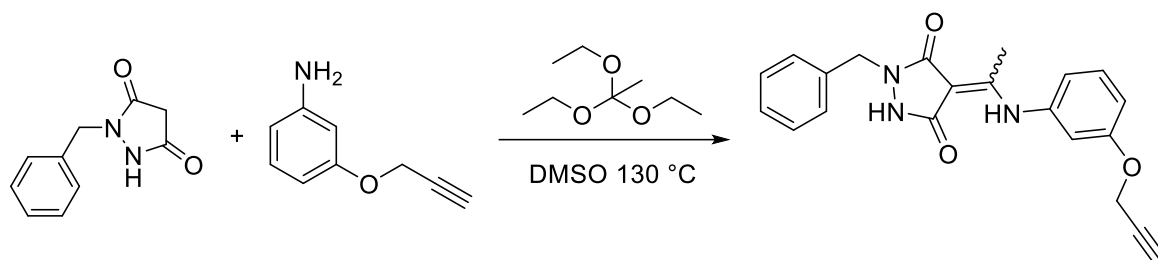
IR (neat) 3117, 2988, 2901, 1671, 1627, 1574, 1482, 1355, 1252, 1027, 800, 696 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 58:42, δ 12.00 (s, 1H), 7.38-7.28 (m, 6H), 6.98-6.77 (m, 6H), 6.00 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.73 (s, 2H), 2.52 (s, 3H) ppm.

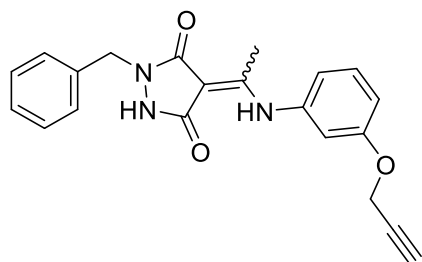
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.9, 168.1, 167.9, 159.4, 148.0, 147.7, 137.1, 135.3, 130.4, 130.0, 128.8, 128.5, 128.1, 121.3, 117.9, 114.3, 112.1, 108.4, 108.2, 101.2, 90.1, 70.3, 48.8, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 456 $[\text{M-H}]^-$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-(prop-2-in-1-ilossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (74)



Il composto **74** è stato ottenuto a partire dalla 3-(prop-2-in-1-ilossi)anilina (**49**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 7:3 e petroliere/etile acetato 5:5. Il prodotto viene triturato a 0 °C in petroliere + gocce di metanolo, si ottiene un solido biancastro che viene filtrato sotto vuoto.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₁H₁₉N₃O₃

Stato fisico: solido quasi bianco

Peso molecolare: 361

Punto di fusione: 147-149 °C

Resa: 33%

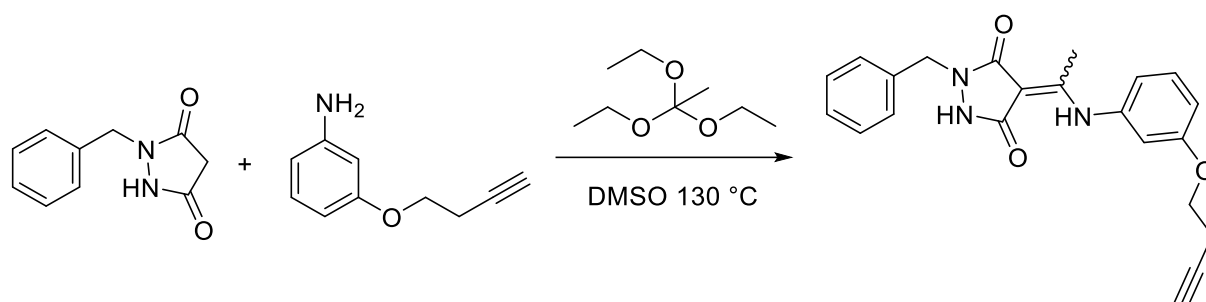
IR (neat) 3176, 2931, 2881, 2111, 1674, 1626, 1588, 1483, 1393, 1338, 1160, 1037, 775, 696 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 55:45, δ 12.00 (s, 1H), 8.38 (br s, 1H), 7.41-7.20 (m, 6H), 6.99 (td, J = 7.9/2.2 Hz, 1H), 6.86-6.81 (m, 2H), 4.75-4.73 (m, 4H), 2.58 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H) ppm.

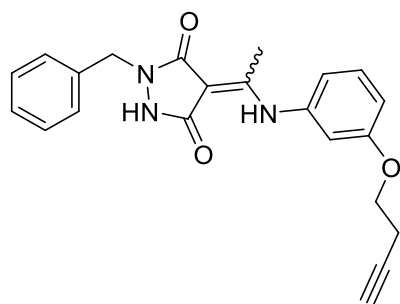
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.6, 167.8, 167.7, 158.2, 137.2, 135.4, 130.4, 128.7, 128.5, 128.0, 118.5, 114.3, 112.2, 90.3, 77.9, 76.3, 56.0, 48.6, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 360 $[M-H]^-$.

Sintesi dell' E/Z 1-benzil-4-(1-((3-(but-3-in-1-ilossi)fenil)ammino)etilidene)pirazolidin-3,5-dione (75)



Il composto **75** è stato ottenuto a partire dalla 3-(but-3-in-1-ilossi)anilina (**50**) secondo la procedura generale F. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroliere/etile acetato 7:3 e petroliere/etile acetato 5:5. Il prodotto viene triturato a 0 °C in petroliere + gocce di metanolo, si ottiene un solido bianco che viene filtrato sotto vuoto.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₂H₂₁N₃O₃

Stato fisico: solido bianco

Peso molecolare: 375

Punto di fusione: 156-157 °C

Resa: 40%

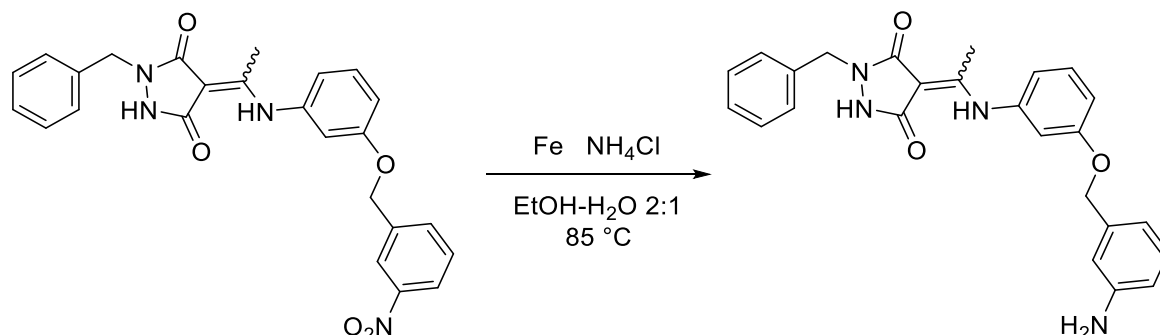
IR (neat) 3252, 2883, 2111, 1672, 1627, 1574, 1473, 1357, 1160, 1048, 800, 768, 693 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 62:38, δ 12.00 (s, 1H), 7.37-7.21 (m, 6H), 6.94-6.89 (m, 1H), 6.83-6.73 (m, 2H), 4.73 (s, 2H), 4.14-4.09 (m, 2H), 2.74-2.70 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.08 (t, J = 2.6 Hz, 1H), ppm.

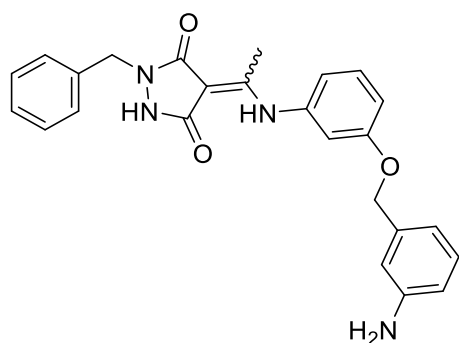
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.6, 167.8, 166.4, 159.3, 137.2, 135.9, 130.4, 128.8, 128.5, 128.0, 118.0, 113.8, 112.0, 90.2, 80.1, 70.2, 66.3, 48.6, 19.5, 15.8 ppm.

MS (ESI) m/z 376 $[M+H]^+$.

Sintesi dell'*E/Z*-4-(1-((3-((3-amminobenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)-1-benzilpirazolidin-3,5-dione (76)



Il composto **76** è stato ottenuto secondo la procedura generale E utilizzando l'*E/Z*-1-benzil-4-(1-((3-((3-nitrobenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (**65**).



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₅H₂₄N₄O₃

Stato fisico: solido giallo pallido

Peso molecolare: 428

Punto di fusione: 77-79 °C

Resa: 78%

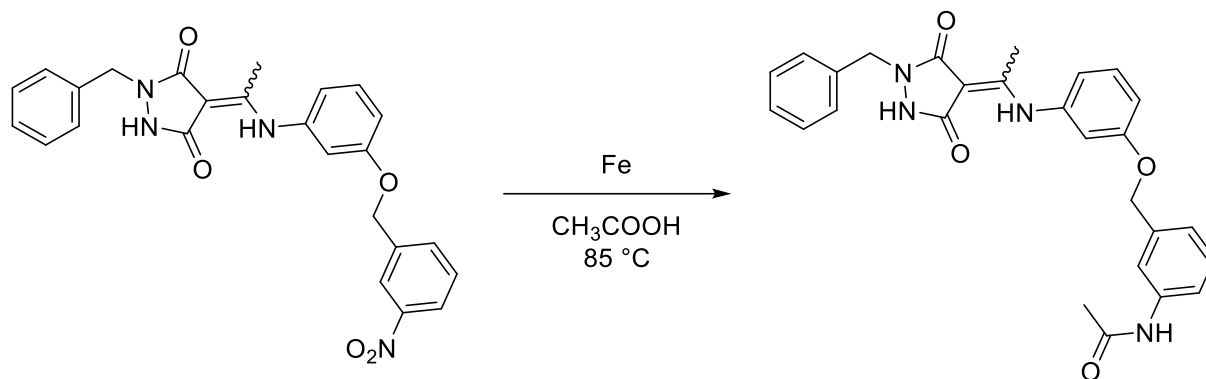
IR (neat) 3340, 3031, 2923, 1617, 1575, 1489, 1387, 1317, 1155, 1028, 774, 696 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 60:40, δ 12.00 (s, 1H), 7.34-7.15 (m, 7H), 6.96 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.82-6.74 (m, 4H), 6.66 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.72 (s, 2H), 2.47 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.5, 167.7, 167.4, 159.5, 146.6, 137.5, 137.1, 135.5, 130.3, 129.7, 128.7, 128.5, 127.9, 117.7, 117.5, 115.1, 114.3, 114.0, 112.0, 90.2, 70.3, 48.4, 15.7 ppm.

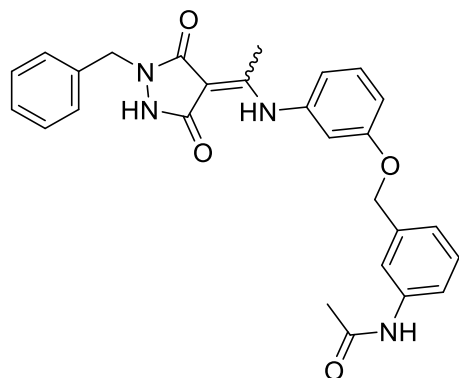
MS (ESI) m/z 429 $[M+H]^+$.

Sintesi della *E/Z*-N-(3-((3-((1-(1-benzil-3,5-diossopirazolidin-4-iliden)etil)ammino)fenossi)metil)fenil)acetammide (77)



Il composto **77** è stato ottenuto sciogliendo l'*E/Z*-1-benzil-4-((3-((3-nitrobenzil)ossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (**65**) (0,0300 g, 0,0655 mmol, 1 eq) in acido acetico glaciale (1 mL) e ponendo la miscela sotto agitazione magnetica. Successivamente viene aggiunto il ferro metallico (0,0183 g, 0,3275 mmol, 5 eq), e si lascia reagire per 7 h a riflusso.

Al termine, la miscela di reazione viene filtrata su letto di Celite ed il filtrato ottenuto viene concentrato sottovuoto. Il residuo viene ripreso con acqua, neutralizzato con una soluzione satura di bicarbonato di sodio ed estratto con etile acetato (x2). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1), anidificate e concentrate sottovuoto. Il grezzo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti etile acetato e etile acetato/metanolo 9:1.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: $C_{27}H_{26}N_4O_4$

Stato fisico: solido amorfo marrone scuro

Peso molecolare: 470

Resa: 36%

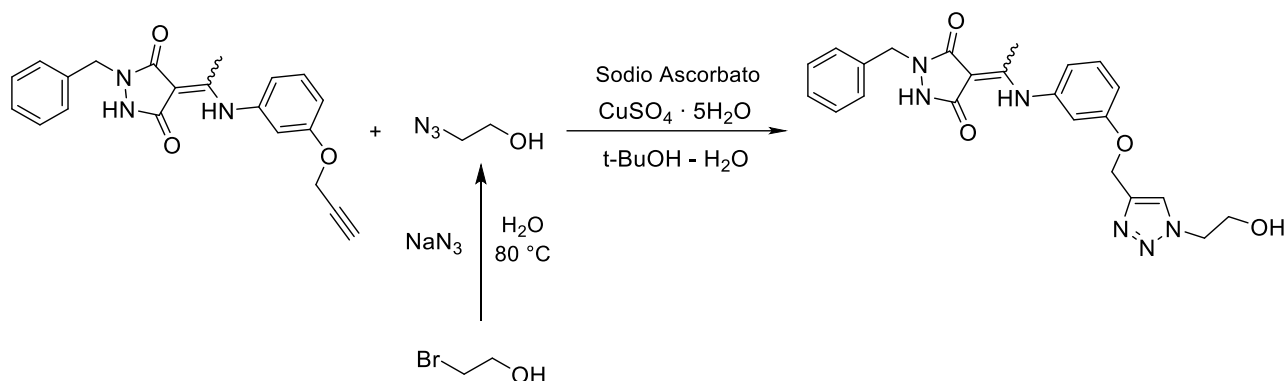
IR (neat) 2922, 2853, 1615, 1575, 1558, 1488, 1387, 1259, 1153, 1028, 788, 696, 552 cm^{-1} .

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 65:35, δ 11.99 (s, 1H), 7.68-6.77 (m, 14H), 5.06 (s, 2H), 4.73 (s, 2H), 2.50 (s, 3H), 2.18 (s, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169.7, 168.7, 168.1, 167.7, 159.3, 142.0, 138.5, 137.3, 137.0, 130.4, 129.4, 128.5, 128.4, 128.1, 123.0, 119.6, 118.7, 117.9, 114.4, 112.2, 90.2, 70.0, 48.9, 24.9, 12.2 ppm.

MS (ESI) m/z 469 $[M-H]^-$.

Sintesi dell'E/Z-1-benzil-4-(1-((3-((1-(2-idrossietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (78)

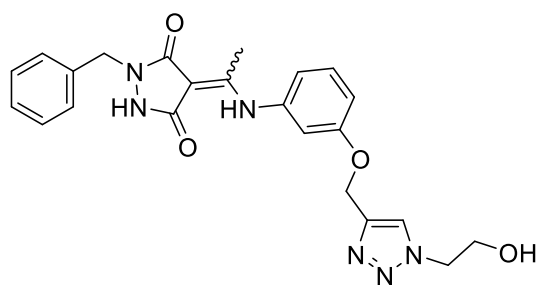


L'intermedio 2-azidoetan-1-olo viene ottenuto sciogliendo il 2-bromoetan-1-olo (2 g, 16 mmol, 1 eq) in 10.5 mL di acqua, aggiungendo la sodio azide (2.6 g, 40 mmol, 2.5 eq) e ponendo la miscela di reazione sotto agitazione magnetica a 80 °C per una notte.

Successivamente la miscela viene neutralizzata con soda 1M ed estratta con etere (x3). Le fasi organiche riunite vengono lavate con brine (x1), anidificate e concentrate sottovuoto. Si ottiene un olio incolore con resa del 92% sufficientemente puro da essere usato come tale nel passaggio successivo.

Ad una miscela di E/Z-1-benzil-4-(1-((3-(prop-2-in-1-ilossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione **74** (0.04 g, 0.11 mmol, 1 eq) e di 2-azidoetan-1-olo (9 mg, 0.11 mmol, 1 eq) in 1 mL di acqua/tert-butanolo (1:1) si aggiungono una soluzione acquosa di sodio ascorbato 1M preparata fresca (11 µL, 0.011 mmol, 0.1 eq) e rame solfato (II) pentaidrato (0.28 mg, 0.0011 mmol, 0.01 eq).

Si lascia reagire sotto vigorosa agitazione magnetica a 25 °C in atmosfera di azoto. Trascorse 4 h, si evapora il solvente sottovuoto. Il grezzo, così ottenuto, viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti etile acetato e etile acetato/metanolo 95:5.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₃H₂₄N₆O₄

Stato fisico: solido arancione pallido

Peso molecolare: 448

Punto di fusione: 53-55 °C

Resa: 81%

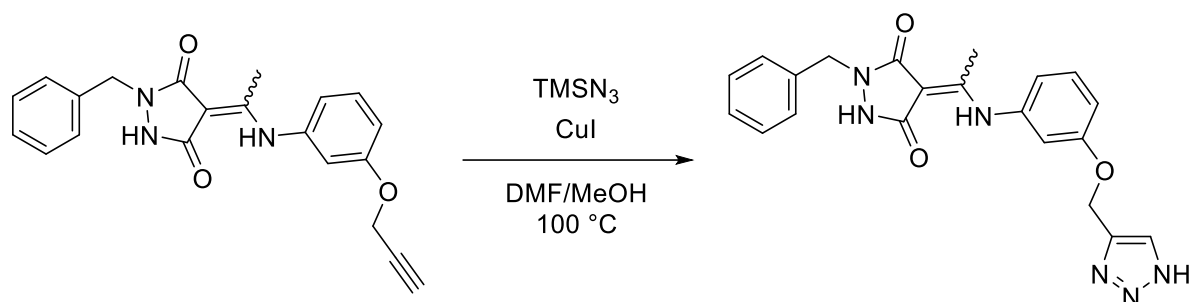
IR (neat) 2922, 2854, 1617, 1571, 1481, 1387, 1339, 1155, 1014, 794, 699, 549 cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, δ 8.10 (s, 1H), 7.42-7.26 (m, 6H), 7.06-6.99 (m, 2H), 6.81 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 5.21 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.51 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.94 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.57 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 168.6, 168.3, 166.8, 159.2, 143.0, 137.0, 136.1, 130.2, 128.2, 127.8, 127.4, 124.8, 117.8, 114.2, 111.8, 89.5, 61.2, 60.2, 52.5, 14.5 ppm.

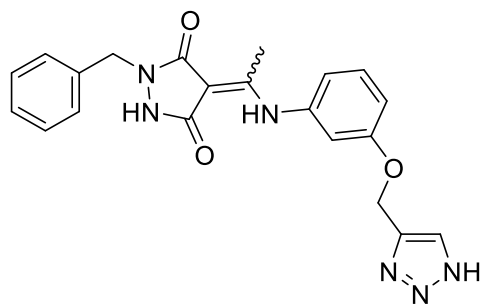
MS (ESI) m/z 447 [M-H]⁻.

Sintesi dell'*E/Z*-4-(1-((3-((1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metossi)fenil)ammino)etiliden)-1-benzilpirazolidin-3,5-dione (79)



Ad una soluzione di *E/Z*-1-benzil-4-(1-((3-(prop-2-in-1-ilossi)fenil)ammino)etiliden)pirazolidin-3,5-dione (**74**) (0.033 g, 0,091 mmol, 1 eq) in 1mL di dimetilformammide/metanolo (1:1) posta sotto agitazione magnetica vengono aggiunti ioduro di rame (3.5 mg, 0.018 mmol, 0,2 eq) e la trimetilsilil azide (0,072 mL, 0.55 mmol, 6 eq) goccia a goccia. Si lascia reagire per 4 h a temperatura ambiente.

Al completamento della reazione si concentra sottovuoto ed il grezzo, così ottenuto, si purifica mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluenti petroletere/etile acetato 2:8 ed etile acetato.



Caratteristiche chimico-fisiche

Formula bruta: C₂₁H₁₉N₆O₃

Stato fisico: solido arancione pallido

Peso molecolare: 404

Punto di fusione: 201-203 °C

Resa: 34%

IR (neat) 3117, 2920, 2838, 1677, 1624, 1604, 1580, 1448, 1354, 1259, 1192, 968, 783, 695 cm^{-1} .

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) segnali riferiti all' isomero geometrico prevalente, rapporto tra gli isomeri 59:41, δ 12.00 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.36-7.25 (m, 6H), 6.98-6.78 (m, 3H), 5.23 (s, 2H), 4.74 (s, 2H), 2.51 (s, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.9, 168.1, 166.5, 158.9, 142.7, 137.0, 135.3, 130.4 (2C), 128.8, 128.4, 128.1, 118.1, 114.5, 112.1, 90.1, 61.7, 48.6, 15.9 ppm.

MS (ESI) m/z 405 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6. Bibliografia

1. Downing, K. H.; Nogales, E. New insights into microtubule structure and function from electron crystallography. *Eur. Biophys. J.* **1998**, *27*, 431-443
2. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed.; Garland Science: New York, **2014**.
3. Nogales, E.; Wolf, S. G.; Downing, K. H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **1998**, *391*, 199-203.
4. Oakley, B. R.; Oakley, C. E.; Yoon, Y.; Jung, M. γ -Tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **1990**, *61*, 1289-1301.
5. Mitchison, T.; Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **1984**, *312*, 237-242.
6. Conde, C.; Cáceres, A.; Bradke, F. Microtubule assembly, transport and plus-end dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience* **2012**, *13*, 101-114.
7. Goodson, H. V.; Jonasson, E. M. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2018**, *10*, a022608.
8. Lara-Gonzalez, P.; Westhorpe, F. G.; Taylor, S. S. The Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology* **2012**, *22*, R966-R980.
9. Musacchio, A. The Spindle Assembly Checkpoint: Organizing Hubs. *Trends in Cell Biology* **2020**, *30*, 550-563.
10. Steinmetz, M. O.; Prota, A. E. Microtubule-targeting agents: strategies to flip the mitotic switch. *Trends in Cell Biology* **2018**, *28*, 299-311.
11. Thomas, E.; Tabernero, J.; Fornier, M., et al. Etoposides as a new class of microtubule-stabilizing agents: focus on ixabepilone in breast cancer. *Clinical Breast Cancer* **2007**, *7*, 754-762.
12. Field, J. J.; Kanakanthara, A.; Miller, J. H. Microtubule-stabilizing agents are diverse in their structure, binding site and mechanism of action. *Medical Sciences* **2014**, *2*, 43-57.
13. Gigant, B.; Wang, C.; Ravelli, R. B., et al. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **2005**, *435*, 519-522.
14. Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* **2004**, *4*, 253-265.
15. Voss, M. E.; Ralph, J. M.; Xie, D., et al. Synthesis and SAR of vinca alkaloid analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 706-709.

16. Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M., et al. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2943–2971.
17. Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hamel, E., et al. Antineoplastic agents. 168. Isolation and structure of combretastatin A-4, A-5, and A-6. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1104–1111.
18. Tozer, G. M.; Kanthou, C.; Baguley, B. C. Disrupting tumour blood vessels. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (6), 423–435.
19. Ravelli, R. B.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin function from a structure of tubulin complexed with a colchicine derivative. *Nature* **2004**, *428*, 198–202.
20. Peláez, R. **2014**. New Ligands of the Tubulin Colchicine Site Based on X-ray Structures. *MedChemComm*, *5*, 1044–1058.
21. Nguyen, T. L.; McGrath, C.; Hermone, A. R.; Burnett, J. C.; Dwyer, D. W.; Lemel, S. A.; Gussio, R. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using structure-based three-dimensional descriptors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6107–6116.
22. Sgobba, M., Caporuscio, F., Anighoro, A., Portioli, F., & Rastelli, G. **2012**. Application of a dynamic pharmacophore modeling approach to the discovery of novel colchicine site inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design*, *80*, 643–653.
23. Wang, Q., Li, W., Yin, Y., Jiang, Y., & Wang, G. **2016**. Recent Advances in Heterocyclic Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine Binding Site. *Current Medicinal Chemistry*, *23*, 2638–2663.
24. Poddar, S.; Kundu, M.; Chakrabarti, P. Discrimination of Ligands with Different Flexibilities Resulting from the Plasticity of the Binding Site in Tubulin. *Biochemistry* **2012**, *51*, 9836–9847.
25. Yuki, H.; Kaizu, Y.; Yoshida, S.; Higuchi, S.; Honda, S.; Takiura, K. Studies of Tenuazonic Acid Analogs. Synthesis of 5-Substituted 3-(1'-Anilinoethylidene) pyrrolidine-2, 4-dione. *Chem. Pharm. Bull.* **1971**, *19*, 1664–1668.
26. Arai, T. TN-16, a New Antimitotic Compound. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 5421–5426.
27. Poddar, S.; Chakrabarti, S.; Bhattacharyya, B.; Chakrabarti, P. Dynamic and Static Water Molecules Complement the TN16 Conformational Heterogeneity inside the Tubulin Cavity. *Biochemistry* **2015**, *54*, 2734–2746.
28. Matesanz, R.; Pera, B.; Canales, A.; Peñalva, V.; Galmarini, C. M.; Díaz, J. F.; Rodríguez-Fernández, E. Synthesis and biological evaluation of novel tubulin

- inhibitors inspired by the chemical probe TN-16. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 4812-4823.
29. Foroutan, A.; Corazzari, M.; Grolla, A.; Colombo, G.; Travelli, C.; Genazzani, A. A.; Theeramunkong, S.; Galli, U.; Tron, G. C. Identification of novel aza-analogs of TN-16 as disrupters of microtubule dynamics through a multicomponent reaction. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *245*, 114895.
 30. Grimm, H. G. Bau und Eigenart der chemischen Verbindungen im Anschluss an die Ergebnisse della Atomforschung. *Naturwissenschaften* **1925**, *13*, 735-741
 31. Reddy, G. V.; Rao, G. V.; Yatelli, S. B.; Iyengar, D. S. A mild and efficient one-pot synthesis of pyrazolidine-3,5-diones mediated by PCl₃. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4799-4801.
 32. Ku, J. M.; Oh, H. J.; Jwo, S. M.; Yang, J. W. Efficient and mild bromination of benzyl alcohols with phosphorus tribromide in dichloromethane. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7021-7023.
 33. Li, F.; Moyer, M. P.; Findley, L. A. Selective *O*-alkylation of hydroxyacetanilides under mild conditions. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 1715-1720.
 34. Khan, A. T.; Islam, S.; Ghosh, S.; Khan, M. W. A mild and efficient method for the deacetylation of aromatic acetates and acetamides using thionyl chloride in methanol. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2391-2394.
 35. Kantam, M. L.; Santhi, J. A.; Siddiqui, M. F. *O*-Alkylation of phenols with alkyl halides in the presence of potassium carbonate. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1483-1487.
 36. Gopalsamy, A.; Lim, K. K. Efficient synthesis of propargyl ethers of phenols under mild conditions. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 3225-3231.
 37. Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. P. Mitsunobu and related reactions: Recent advances and new perspectives. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551-2651.
 38. Ramadas, K.; Srinivasan, N.; Janarthanan, N. Iron–ammonium chloride: A convenient and chemoselective reagent system for the reduction of nitroarenes. *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 2423-2428.
 39. Laskar, D. D.; Prajapati, D.; Sandhu, J. S. A novel one-pot reductive acetylation of nitroarenes with iron powder and acetic acid. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7883-7886.

40. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
41. Jin, T.; Kamijo, S.; Yamamoto, Y. Copper-catalyzed synthesis of *N*-unsubstituted 1,2,3-triazoles from nonactivated terminal alkynes. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004* (18), 3789-3791.