

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO
Corso di Laurea Magistrale in chimica e tecnologie farmaceutiche

TESI DI LAUREA

RICERCA DI NUOVI POSSIBILI REGOLATORI DI HIF:
ESPLORAZIONE DELLO SPAZIO
DELL' ACIDO OLEANOLICO

Relatore
Prof. Alberto Minassi

Candidato
Vicario Carlo

Anno Accademico 2023-2024
Sessione autunnale

DEDICA

A me stesso.
Hai visto che c'è l'hai fatta?

ABBREVIAZIONI

INTRODUZIONE

ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosina trifosfato
BA	Betulinic acid
BAH	Betulinic acid hydroxamate
CCl ₄	Tetracloruro di carbonio
CYP	Citocromo P450
DMAPP	Dimetilallil pirofosfato
DNA	Acido desossiribonucleico
EPO	Eritropoietina
FIH	Factor inhibiting HIF
FOXO	Forkhead box protein A1
FPP	Farnesil pirofosfato
GGPP	Geranylgeranyl pirofosfato
GLUT	Glucose transporter
GPP	Geranyl pirofosfato
HD	Huntington disease
HDL	High density lipoprotein
HIF	Hypoxia inducible factor
HRE	Hypoxia responsive elements
I κ B	Inhibiting kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
I κ k	I κ B chinasi
IPP	Isopentenil pirofosfato
K _m	Costante di Michaelis-Menten
MAE	Microwave assisted extraction
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NADP/NADPH	Nicotinammide dinucleotide fosfato
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NOX	NADPH ossidasi 2
OA	Oleanolic acid
ODDs	Oxygen-dependent degradation domain
PCTTAs	Pentacyclic triterpenoid acids
PGE	Prostaglandine
PI3K	Fosfatidilinositolo-3-chinasi
PHDs	Prolyl hydroxylases
RAAS	Renina-angiotensina-aldosterone
ROS	Reactive oxygen species
TNF	Tumor necrosis factor
UAE	Ultrawave assisted extraction
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau

DISCUSSIONE DEI RISULTATI E PARTE SPERIMENTALE

Ac ₂ O	Anidride acetica
BF ₃ *OEt ₂	Trifluoruro di boro eterato
BRINE	Soluzione satura di H ₂ O e NaCl
CHCl ₃	Cloroformio
CeCl ₃	Cloruro ceroso
DCM	Diclorometano
DMAP	4-dimetilamminopiridina
DMSO	Dimetilsolfossido
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide
EtOAc	Acetato di etile
HOBt	Idrossibenzotriazolo
H ₂ SO ₄	Acido solforico
I ₂	Iodio molecolare
IBX	Acido 2- iodossibenzoico
KOH	Potassio idrossido/potassa
LiOH	Litio idrossido

MeOH	Metanolo
N ₂	Azoto molecolare
NH ₂ OH	Idrossilammina
NaBH ₄	Sodio boro idruro
NaHCO ₃	Bicarbonato di sodio
NaOH	Sodio idrossido
Na ₂ SO ₄	Sodio solfato
O ₃	Ozonolisi
ON	Overnight
Pb(OAc) ₄	Piombo tetracetato
PE	Petroletere
Py	Piridina
RT	Room temperature
TEA	Trietilammina
THF	Tetraidrofurano
TLC	Thin layer chromatography

INDICE

1.INTRODUZIONE	1
1.1 HIF	1
1.1.1 Cos'è HIF?	1
1.1.2 Funzioni di HIF	3
1.2 Terpeni e derivati	6
1.2.1 Terpeni	6
1.2.2 Acido oleanolico	8
1.2.3 Effetti acido oleanolico	10
1.2.4 Acido betulinico e BAH	12
2. SCOPO DEL LAVORO	16
3.RISULTATI E DISCUSSIONE	17
3.1 sintesi di derivati funzionalizzati sull'anello A	17
3.1.1 Primo derivato	17
3.1.2 Secondo derivato	19
3.1.3 Terzo derivato	20
4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	23
5. PARTE SPERIMENTALE	24
5.1 sintesi di derivati idrossammici dell'acido oleanolico	25
5.1.1 Sintesi primo derivato	25
5.1.2 Sintesi secondo derivato	30
5.1.3 Sintesi terzo derivato	35

6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

47

7. RINGRAZIAMENTI

49

1. INTRODUZIONE

1.1.HIF

1.1.1 Cos'è HIF?

L'ossigeno è un fattore essenziale per la vita, basti pensare alla sua importanza come accettore elettronico nei meccanismi di respirazione cellulare e quindi come agente nella sintesi della moneta energetica della cellula, l'ATP.

Data la sua rilevanza, tutte le cellule dell'organismo necessitano della sua presenza, pertanto l'organismo distribuisce tale molecola tramite il complesso sistema vascolare e mettendo in atto specifici meccanismi di compensazione affinché la sua concentrazione non scenda sotto un valore soglia (ipossia = carenza d'ossigeno): ad esempio i chemocettori carotidei captano la variazione di pH sanguigno e stimolano l'iperventilazione per permettere un aumento dei livelli di ossigeno nel sangue [1].

La risposta cellulare all'ipossia, specialmente quella prolungata, prevede alterazioni nell'espressione genica per consentire l'adattamento cellulare. Tra le proteine più importanti che governano questo meccanismo, di grande rilevanza è il fattore HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) [1].

HIF rappresenta il più importante mediatore responsabile della risposta cellulare all'ipossia. La sua struttura si compone di due subunità di cui una sensibile alla concentrazione variabile di ossigeno (HIF- α) ed una che è il coattivatore costitutivo (HIF- β) [2].

HIF- β o ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) è costitutivamente espressa e non è regolata dai livelli di ossigeno, quindi la sua concentrazione all'interno della cellula rimane pressoché costante.

HIF- β si associa con HIF- α per formare il complesso attivo. Questo trasloca nel nucleo e tramite il dominio N-terminale di HIF- β lega la regione HRE (*Hypoxia Responsive Elements*) sul DNA [1].

HIF- α è la porzione del complesso sensibile ai valori e alle variazioni delle quantità di ossigeno, il suo destino cambierà dunque in base alla situazione.

HIF- α presenta due isoforme: HIF-1 α e HIF-2 α .

- HIF-1 α media le principali funzioni del complesso, ovvero l'angiogenesi tramite VEGF, il controllo della glicolisi (inibendo il ciclo di Krebs) e la regolazione dell'espressione di canali ionici.
- HIF-2 α invece sembra essere chiave nel metabolismo del ferro ed essere il principale regolatore nella produzione di EPO [3].

In condizioni normossiche il livello di HIF-1 α viene ridotto poiché è soggetto a reazione di idrossilazione di due suoi residui di prolina (in particolare Pro 402 e Pro 564) da parte dell'enzima Prolil Idrossilasi (PHD), in presenza di 2-ossoglutarato, ascorbato e di ferro.

L'idrossilazione porta ad un aumento dell'affinità per il fattore VHL (Von Hippel-Lindau) il quale, formando un complesso con HIF, lo indirizza verso la sua ubiquitinazione da parte della ubiquitina E3 ligasi cosicché possa essere riconosciuta e conseguentemente degradata dal proteosoma 26s [3].

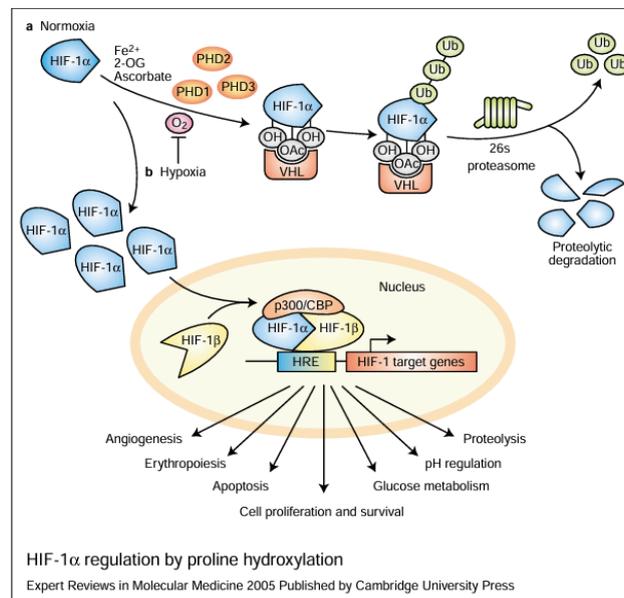


figura 1. Il destino di HIF [3]

1.1.2 Funzioni di HIF

In condizioni ipossiche, HIF- α non viene idrossilato e dunque non viene degradato.

La carenza di ossigeno fa sì che non si abbia affinità per VHL e quindi la proteina è libera di dimerizzare con HIF-1 β traslocando così nel nucleo per interagire con le HRE (regioni responsive all'ipossia) presenti sul DNA, reclutando co-attivatori trascrizionali come p300/CBP: in questo modo stimola la sintesi di circa 200 geni coinvolti nei programmi di angiogenesi (come VEGF), eritropoiesi (come EPO), omeostasi del ferro e nella glicolisi [2].

In sintesi, tra gli effetti principali di HIF si annoverano:

- Regolazione del metabolismo energetico stimolando l'espressione di geni che favoriscono la glicolisi anaerobica, inducendo l'espressione di enzimi come lattato deidrogenasi che aumentano la produzione di ATP attraverso la via anaerobica, consentendo alle cellule di generare energia anche in assenza di ossigeno [1].
- Induzione di angiogenesi promuovendo la formazione di nuovi vasi sanguigni tramite stimolo di VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*): questo processo è implicato anche nella crescita di determinate forme tumorali [3].
- Stimolazione della sovraespressione di trasportatori di glucosio (GLUTs) implicati nella richiesta energetica nelle cellule tumorali [4].
- Promozione della sintesi di EPO (eritropoietina) aumentando così la quantità di globuli rossi e di conseguenza l'ossigenazione tissutale [3].
- Protezione nei confronti della mucosa intestinale nelle patologie infiammatorie stimolando la produzione di fattori come mucine, β -defensine e claudina.
- Regolazione dell'infiammazione mediante controllo dell'apoptosi di neutrofili e la polarizzazione M1 e M2 di macrofagi, modificandone così il loro numero e l'efficacia [2].

Come si è esplicitato precedentemente, i valori di HIF sono controllati prevalentemente dalle molecole di PHDs che ne idrossilano le estremità di prolina (P402 e P564), ubicate nei cosiddetti "oxygen-dependent degradation domains" (ODDs).

Up-regolate dall'attività trascrizionale di HIF e degradate dal proteasoma, le prolil idrossilasi sono una sottofamiglia di diossigenasi che sfrutta l'ossigeno ed il 2-ossoglutarato (2-OG: agente coordinante il ferro) come substrati, usando nel contempo ascorbato e ferro come cofattori, liberando succinato e CO₂ come prodotti di scarto. Tali diossigenasi possono presentarsi in 3 diverse isoforme: PHD1, PHD2 e PHD3 che si distinguono per la quantità di a.a. posseduti (circa 400 per le prime due e 239 per la terza) e soprattutto per la loro funzione e ubicazione.

PHD1 è presente prevalentemente nel rene e nel cervello con azione legata all'eritropoiesi; PHD2 sembra essere l'isoforma più abbondante nei tessuti con influenza su VEGF; infine PHD3 si palesa in tessuti cardiaci e pare coinvolta nella sopravvivenza cellulare.

Tutte le isoforme presentano valori di Km (affinità) per l'ossigeno di 230-250 microMolare.

Le PHD sembrano avere un ruolo nella soppressione tumorale data l'azione su NF-kB, che è un fattore chiave nel controllo della sopravvivenza cellulare e dell'immunità innata. È legato nel citosol a IκB-α, rimanendo così inerte, e tale complesso può essere fosforilato dalla chinasi IKK-β e quindi essere attivato. Tuttavia, in condizioni di normale concentrazione di ossigeno, la chinasi viene idrossilata da PHD, venendo così inattivata e perciò impedita l'azione di NF-kB [5].

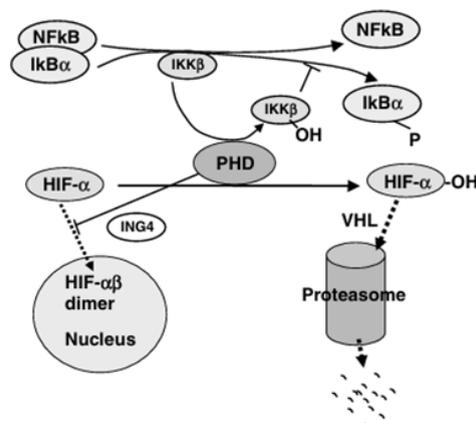


figura 2. Interazione tra NF-kB, PHD ed HIF [5]

Ricordiamo inoltre che esiste un'altra tipologia di diossigenasi ferro-dipendente definita FIH (*factor inhibiting HIF*) che ha la capacità di idrossilare il residuo di arginina (Arg 851) di HIF- α impedendo l'interazione con CBP/p300 a livello nucleare.

Altra variabile è la metilazione degli istoni che ha un ruolo nella regolazione dell'espressione dei geni di HIF. Tale modulazione infatti è operata da metiltransferasi e demetilasi che spostando il gruppo metile sugli istoni corrispondenti ne diminuiscono o ne aumentano l'espressione; in particolare per HIF, al diminuire della concentrazione di ossigeno, sono stimulate specifiche lisina demetilasi che favoriscono l'espressione di tale fattore [6].

A livello terapeutico, sono stati scoperti idrossammati inibitori di PHD come il *Roxadustat*, *Daprodustat* e *Vadadustat* nel trattamento dell'anemia renale [7].

Un ulteriore idrossammato usato in terapia è il Vorinostat (SAHA). Quest'ultimo, inibitore delle istone deacetilasi (HDAC) risulta approvato per il trattamento di linfomi cutanei a cellule T agendo epigeneticamente per ripristinare l'espressione genica normale nelle cellule tumorali, inducendo l'apoptosi nelle cellule tumorali [15].

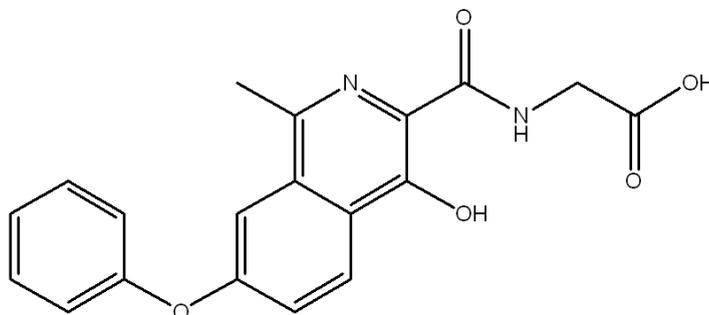


figura 3. Struttura Roxadustat

Sono inoltre stati scoperti agenti chelanti come gli idrossammati che possono inibire l'attività del PHD formando complessi stabili tramite la chelazione del ferro [7].

1.2. TERPENI E DERIVATI

1.2.1 Terpeni

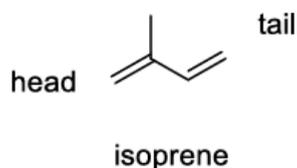


figura 4. Unità isoprenica

I terpeni rappresentano un'ampia famiglia di composti derivanti dalla condensazione di due o più unità isopreniche (fig. 4).

Le varie classi vengono classificate a seconda del numero di atomi di carbonio:

- monoterpeni (con solo 2 unità isopreniche)
- sesquiterpeni (con 3)
- diterpeni (con 4)
- triterpeni (con 6)
- tetraterpeni (con 8) [8]

Questa grande famiglia entra in gioco in molti ambiti biologici: nelle piante, ad esempio viene coinvolta nel sistema difensivo contro patogeni, nei segnali per attirare gli impollinatori, come ormoni o come pigmenti fotosintetici. In ambito animale sono implicati nel trattamento di diverse patologie e come stabilizzatori per le membrane biologiche.

Nei sistemi eucariotici, la sintesi di questi composti avviene partendo dall'acido mevalonico (prodotto dell'acetil-CoA nel cytosol) dando così l'isopentenil pirofosfato (IPP), che soggetto all'isomerasi, forma il dimetilallil pirofosfato (DMAPP). Unendo questi ultimi due composti si ottiene il geranil pirofosfato (GPP), precursore dei monoterpeni.

Procedendo nella sintesi, se si unisce IPP con GPP tramite l'enzima sintetasi, si produce il cosiddetto farnesil pirofosfato (FPP) da cui si dirameranno steroidi, sesquiterpeni e triterpeni.

Come ultimo step, dalla reazione tra IPP e FPP mediata da un'ulteriore sintasi, formiamo il geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), punto di partenza per la costruzione di diterpeni, tetraterpeni e carotenoidi.

Di fondamentale importanza è lo squalene 30-C: molecola originata tramite omodimerizzazione tra FPP e GGPP, esso è il punto d'inizio, negli organismi animali, per l'ottenimento della classe degli steroidi oltre che per la sintesi della famiglia degli acidi triterpenici pentaciclici (PCTTAs) [9].

Tale classe (PCTTAs) spicca rispetto alle altre classi della famiglia terpenica grazie ai suoi potenziali effetti farmacologici e soprattutto grazie alla loro selettività biologica riducendo i possibili effetti collaterali.

I PCTTAs si possono suddividere principalmente in 4 diverse sottoclassi in base a 4 diversi scheletri carboniosi: lupani, oleanani, ursani e opani.

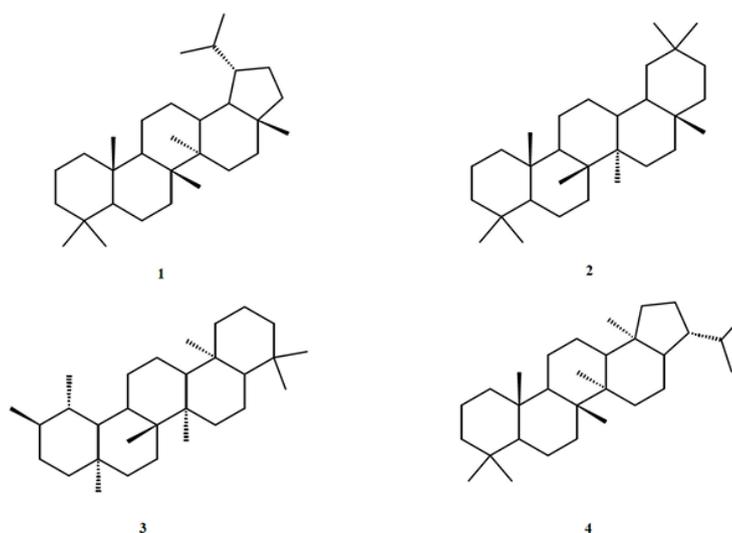


figura 5 .struttura chimica di lupano (1), oleanano (2), ursano (3) e opano (4) [4]

Si trova riscontro della loro efficacia ad esempio come antivirali, antidiabetici, antinfiammatori, come molecole cardioprotettive e soprattutto come agenti citotossici selettivi in situazioni tumorali data la loro selettività e l'assenza di tossicità; quest'ultima, senza dubbio, l'applicazione di più rilievo.

Tra i derivati terpenici dalle applicazioni promettenti, spicca in particolare la molecola dell'acido oleanolico [4].

1.2.2 Acido Oleanolico

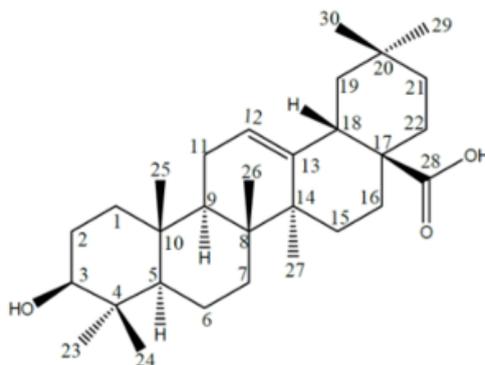


figura 6. struttura chimica dell'acido oleanolico [10]

L'acido oleanolico è un composto triterpenico che esiste come acido libero o aglicone (parte non zuccherina di un glicoside) facente parte delle saponine, ovvero molecole con parte zuccherina legata ad un triterpene oppure ad un derivato steroideo.

La presenza dell'acido oleanolico è confermata nelle foglie d'ulivo come nel suo frutto (*Olea europaea*), nel rosmarino (*Salvia rosmarinus*), in altre specie appartenenti alla famiglia delle *Lamiaceae* come la menta (*Mentha x piperita*), nelle cere epicuticolari delle piante (dove partecipa alla risposta allo stress biotico e abiotico) [10]

ed è preponderante in radici come il Ginseng (ovvero la radice della pianta "*Panax ginseng*") tramite cui si pensa che veicoli alcuni degli effetti antinfiammatori, antifungini, antitumorali ed epatoprotettivi riscontrati nella tradizione asiatica [11].

Presente in maniera ubiquitaria in tutto il regno animale, l'acido oleanolico è uno dei massimi rappresentanti della classe dei triterpeni pentaciclici. La natura triterpenica viene confermata se lo si evidenzia con tetranitrometano, dando di fatto il tipico colore giallo di tale classe.

Fondamentale è purtroppo la sua scarsa solubilità in mezzi acquosi (1,748microgrammi/L) indice evidentemente la sua natura pentaciclica.

Data la frequente scarsa concentrazione nelle piante di composti farmacologicamente attivi, la loro corretta estrazione risulta di fondamentale importanza per ottenerli in concentrazioni sufficienti per impieghi industriali e clinici.

Il metodo più utilizzato tutt'ora per l'estrazione di composti terpenici consiste nell'utilizzo di petroliere (per concentrare acidi, alcani lineari e alcoli) seguito da un lavaggio con etile

acetato; tuttavia, per l'acido oleanolico, l'abilità di percolare la matrice è migliore se si usano etanolo o metanolo al posto dell'etile. Riguardo a questi ultimi, la preferenza ricade sull'etanolo per la minor tossicità sull'uomo, e in particolare, la resa aumenta se si sfrutta l'alcol etilico diluito con acqua (fino ad una concentrazione nel solvente del 70%-95%) oppure come alternativa si può sfruttare l'n-butano per la sua polarità.

Tra le principali opzioni per l'estrazione vi sono:

- tramite solventi: Il materiale vegetale in polvere viene immerso nel solvente scelto e lasciato in macerazione per un periodo variabile (da poche ore a diversi giorni) a temperatura ambiente o sotto riscaldamento. Successivamente, la miscela viene filtrata per rimuovere i residui solidi e il solvente viene evaporato per ottenere l'estratto grezzo.
- Assistita da microonde (MAE): tecnologia "green" che genera radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti scaldando così il materiale, lisando le cellule e migliorando il trasferimento di fitocomposti nel solvente.
- Mediante biossido di carbonio supercritico: La CO₂, in questo stato a metà tra il gassoso ed il liquido, scioglie i composti bioattivi che vengono poi separati e raccolti attraverso un processo di depressurizzazione.
- Assistita da ultrasuoni (UAE) La cavitazione causata da onde ultrasoniche migliora il contatto tra il solvente e il materiale, aumentando l'efficienza dell'estrazione.

Per questa sua natura lipofila e per il suo alto peso molecolare, si palesa un problema di biodisponibilità e quindi di farmacocinetica del composto.

Per attenuare tale complicazione si è pensato di usare sistemi come nano-emulsioni per così aumentare l'assorbimento nell'organismo;

L'acido oleanolico, inoltre, se introdotto con alimenti, presenta maggior biodisponibilità poiché assunto insieme ad altre componenti idrofile.

Interessante notare la presenza di polimorfismi:

- cristalli prismatici biancheggianti se direttamente cristallizzato dagli estratti vegetali.
- Amorfo se cristallizzato con raffreddamento rapido da cloroformio o diclorometano.
- Cristalli finemente appuntiti se ricristallizza da etanolo, metanolo o acetone.

Per quanto riguarda i punti di fusione e di ebollizione la letteratura riporta un range di valori tra 30-313 °C per il primo mentre per il secondo sarebbe 553-554°C entrambi riferiti alla pressione di 760 mmHg=1 atm [10].

1.2.3 Effetti acido oleanolico

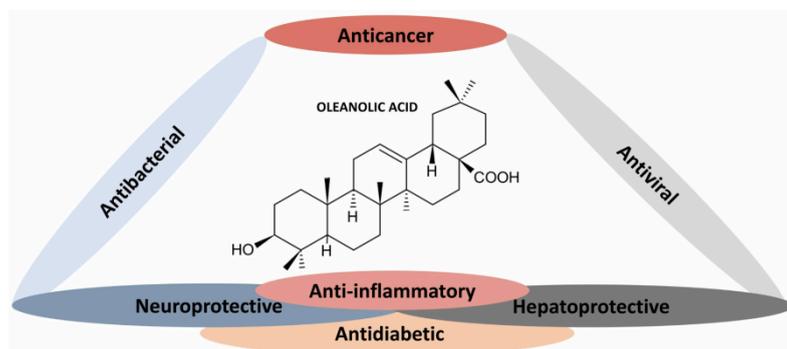


figura 7. alcuni dei possibili effetti dell'acido oleanolico sull'uomo [12]

1) Attività antinfiammatoria mediata da:

- inibizione di rilascio istamina da parte dei mastociti.
- Inibizione dell'attività ciclossigenasica e lipossigenasica tramite soppressione di sintesi di leucotrieni e di PGE2 (prostaglandine).
- Inibizione dell'elastasi: proteina che, degradando l'elastina (quest'ultima responsabile dell'elasticità di vari organi), rientra nei fattori di risposta infiammatoria [11].
- Inibizione dell'espressione di NF- κ B e di TNF- α riducendo così anche le complicanze infiammatorie legate al diabete.

2) Proprietà antitumorali

L'acido oleanolico sembra ridurre l'espressione di FOXA-1, fattore di trascrizione generalmente sovraespresso nel carcinoma tiroideo (che ne stimola la sopravvivenza).

OA infatti attiva la via di fosforilazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) che comporta la diminuzione dell'espressione di vimentina (molecola che contribuisce al mantenimento della forma della cellula) riducendo in questa maniera la proliferazione cellulare.

Oltre a ciò, il terpene parrebbe inibire l'espressione HIF-1 α in maniera dose dipendente stimolando l'attività di NADPH ossidasi 2 (NOX2) inducendo l'arresto del passaggio cellulare "G1/S" e rallentando di fatto la proliferazione tumorale; inoltre, l'acido oleanolico sembra che blocchi il segnale di sopravvivenza tumorale dato dalla proteina mTOR (regolatore della crescita oncologica), portando così all'apoptosi della cellula.

3) Effetti antiossidanti

OA sembra che aumenti la produzione di alcuni antiossidanti come il glutatione favorendo l'espressione di enzimi come la superossido dismutasi e la glutatione perossidasi, questi chiave nella difesa contro le specie reattive dell'ossigeno (chiamati "ROS")

4) Benefici cardioprotettivi

attraverso la modulazione dei livelli di fosfolipidi andando a inibire la fosfolipasi A2 secretoria (la quale abbassa i livelli di HDL e aumenta quelli lipidici) e avendo anche effetto antiipertensivo agendo sul sistema RAAS (renina-angiotensina-aldosterone) sottoregolandolo e diminuendone le concentrazioni plasmatiche di questi ultimi segnali.

5) Azione antibatterica ed antivirale

Si è scoperto che contro il virus dell'herpes, OA (acido oleanolico) dimostra attività antivirale tramite inibizione di un complesso definito "elicasi-primasi" necessario alla replicazione virale.

Si parla anche dell'applicazione di OA come agente contro la proliferazione batterica usandolo insieme a molecole come ampicillina inibendo la sintesi di peptidoglicano ed alterando la permeabilità della membrana batterica [4].

6) Proprietà neuroprotettive:

Ruolo neuroprotettivo in alcune patologie come il Parkinson e nel danno ischemico oltre che per modelli in vivo di Alzheimer. Parrebbe infatti che OA stimoli plasticità sinaptica, migrazione e proliferazione di cellule staminali neurali e la loro differenziazione tramite incremento di proteine associate ai microtubuli e a fattori di trascrizione proneurali [13].

7) effetto epatoprotettivo:

L'effetto epatoprotettivo si è notato per la prima volta con gli studi sulla "*Swertia mylaensis*", (pianta usata per la medicina tradizionale contro le epatiti).

Partendo da quest'ultima, si è isolato l'acido oleanolico, il quale ha dimostrato la sua efficacia contro la necrosi indotta da CCl₄ delle cellule parenchimali epatiche oltre a rappresentare una protezione per il fegato contro paracetamolo, furosemide e cadmio; non sembra esercitare protezione invece contro amanitina e cloroformio.

L'acido oleanolico sembra presentare tali effetti grazie all'inibizione degli enzimi CYP1A e CYP2A, diminuendo così la formazione di metaboliti tossici [11].

Va notato che mentre molti di questi effetti sono promettenti, gran parte della ricerca è ancora in fase preliminare e si basa principalmente su studi in vitro e su modelli animali. Questo non nasconde tuttavia la grande potenzialità terapeutica dei possibili derivati di tale terpene.

Nello studio di derivati di PCTTAs insieme alle loro possibili applicazioni terapeutiche, un esempio degno di nota e come spunto per ulteriori molecole influenzanti HIF è indubbiamente costituito dall'idrossammato dell'acido betulinico (BAH: *Betulinic acid Hydroxamate*).

1.2.4 Acido betulinico e BAH

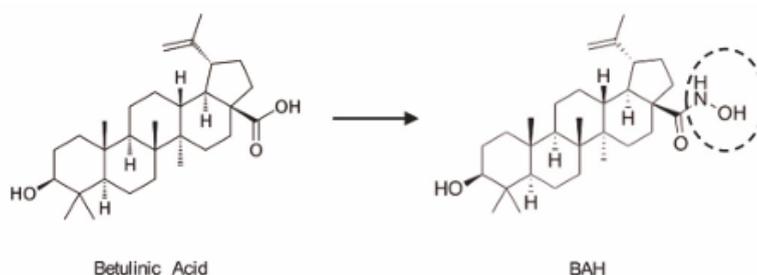


figura 8. strutture acido betulinico e del corrispondente idrossammato [2]

L'acido betulinico presenta un nucleo a cinque cicli del tipo lupanico, differente dall'oleanolico principalmente per la presenza dell'anello E pentaciclico e non più a 6 atomi di carbonio.

Come suggerisce il nome, la sua presenza, come quella della sua forma meno ossidata (il betulino) si concentra nella corteccia degli alberi appartenenti alla famiglia delle *betulaceae* (esempio *Betula alba* e *Betula pendula*), ottenibile tramite estrazione metanolica ad esempio dalle foglie del *Vitex negundo* o ancora dai ramoscelli di *Ilex macropoda*.

Data la minor concentrazione nella pianta di BA (acido betulinico) rispetto al betulino, la letteratura riporta un eventuale sintesi del primo a partire dal secondo, svolgendo prima un'ossidazione con reattivo di Jones dei carboni in posizione 3 e 28 seguita da una riduzione tramite NaBH_4 del C3.

Vanta molti effetti comuni all'acido oleanolico come l'azione antiossidante ed antinfiammatoria.

BA risulta potenziale inibitore selettivo per le cellule umane di melanoma inducendone l'apoptosi tramite attivazione di caspasi, aumento nella produzione di ROS e della permeabilità mitocondriale senza coinvolgimento dell'oncosoppressore p53 [12].

Nell'ambito dello Scaffold PCTTAs, la presenza di un gruppo idrossamico e la sua

posizione sono entrambi critici per il *targeting* di PHD, dal momento che l'attività è stata osservata quando questo gruppo era situato al C-28 ma non al C-30, mentre non è stata osservata alcuna attività quando l'idrossammato di C-28 è stato sostituito da altri gruppi chelanti [7].

Focalizziamoci ora sui potenziali effetti di tale derivato pentaciclico.

Vanno riportati i casi di fibrosi intestinale, come nel morbo di Crohn (dove può essere coinvolta l'intera parete intestinale) o nella colite ulcerosa (coinvolti solo gli strati mucoso e sottomucoso) risultato di una condizione infiammatoria cronica irrisolta.

Dato che la formazione di fibrosi non sembra unicamente legata allo stimolo infiammatorio, ci si è interessati a meccanismi specifici contro il processo fibrotico, come gli agenti influenzanti HIF.

Dato che quest'ultimo svolge un effetto barriera stimolando la produzione di mucine e β -defensine, può essere favorito da molecole che vanno ad inibire le prolil idrossilasi, come gli idrossammati.

Va chiarito che BAH non è un chelante del Fe^{2+} e non inibisce l'attività enzimatica dei PHDs; induce piuttosto modifiche post traduzionali di PHD2 come la defosforilazione della serina 125, modifica necessaria per stabilizzare HIF- α e dunque per favorirne gli effetti precedentemente elencati.

Oltre a ciò, BAH aiuta nella cura delle ferite e nel rimodellamento tissutale rafforzando l'integrità della barriera intestinale aumentando l'espressione di fattori come *Muc-2* e *Cldn-1*. Più di tutto, BAH si fa carico di essere un potenziale antinfiammatorio dando come risultato una regolazione nell'espressione di geni flogogeni causando tra gli altri effetti sistemici, una riduzione del numero di macrofagi e linfociti [2] ed una diminuzione della cascata infiammatoria di citochine attivate da cellule della microglia. La letteratura riporta effetti positivi dell'idrossammato anche nel caso della malattia di Huntington (HD), nella quale si assiste ad una degenerazione di componenti del cervello che normalmente renderebbero fluidi i movimenti.

Dato che il metabolismo energetico mitocondriale compromesso (come a sua volta la fosforilazione ossidativa) risulta essere il maggior deficit di tale patologia, gli inibitori di PHD entrano in gioco spostando l'economia energetica verso la glicolisi aerobica, sovra regolando enzimi glicolitici e potendo così compensare tale carenza [14].

Si è pensato dunque di sfruttare la caratteristica peculiare degli idrossammati come agenti chelanti legandola a molecole aventi uno scheletro lipidico con grande versatilità e selettività nel riconoscimento proteico. Si parla dunque dei derivati di terpeni pentaciclici, a loro volta derivati dalla più ampia classe dei terpeni [7].

Il gruppo di ricerca dove ho svolto la mia tesi sperimentale ha infatti già pubblicato alcuni risultati in merito a tali derivati.

Il laboratorio ha infatti preso in considerazione la sintesi di strutture contenenti idrossammati partendo da 5 molecole:

l'acido ursolico, l'acido betulinico, l'acido maslinico, l'acido oleanolico e l'acido glicirretico. L'idrossammidazione è stata raggiunta dopo protezione del gruppo idrossilico in posizione 3 tramite acetilazione seguita da una reazione con cloruro di idrossilammonio in piridina e successiva deprotezione fornendo così gli alcoli idrossammati.

Inoltre, partendo dall'acido betulinico e oleanolico, si è modificato l'anello A formando un doppio legame sull'anello per deidrogenazione del C3 con conseguente aggiunta del gruppo idrossammico allo scaffold.

Altri derivati si sono sintetizzati ampliando l'anello A del derivato di acido oleanolico deidrogenato in 3 e del suo metilestere, tramite reazione di Baeyer-Villiger, fornendone così i corrispettivi lattoni, a sua volta successivamente idrossammidati.

Per l'acido betulinico, una volta deidrogenato in 3, si è pensato di formularlo e farlo reagire con idrossilammina o idrazina a dare l'azoto eterociclico.

Nessuno dei PCTTA iniziali ha mostrato attività mimetica dell'ipossia, mentre i loro idrossammati, con l'eccezione dell'acido glicirretico, hanno mostrato tutti una significativa attività. Al contrario, nessuna attività è stata osservata nei PCTTA con gruppi chelanti diversi dall'idrossammato al C-28. [7]

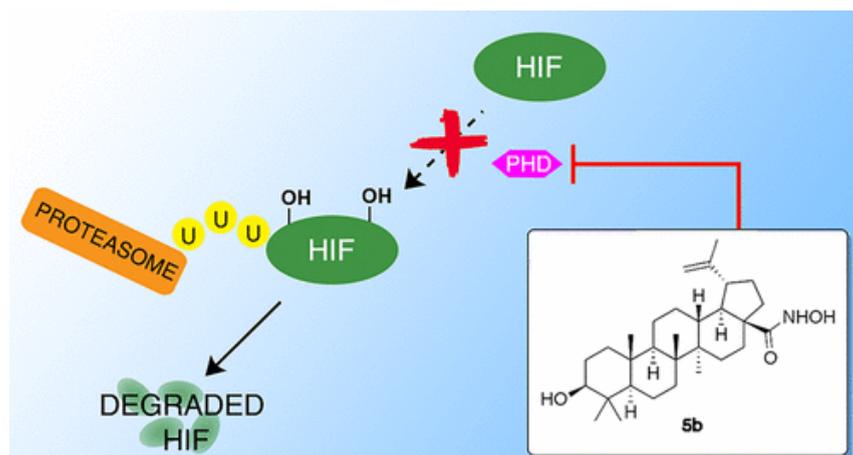


figura 9. inibizione di PHD da parte di derivati idrossammici [7]

SCOPO DEL LAVORO

Studi recenti hanno dimostrato che alcuni derivati idrossamici degli acidi triterpenici pentaciclici sono attivi nel regolare il fattore di ipossia HIF. In particolare, tra tutti gli acidi triterpenici l'acido betulinico e l'acido oleanolico hanno dimostrato di avere una struttura privilegiata nell'interagire col target biologico. I due acidi naturali, in un contesto di economia circolare, possono essere ottenuti da scarti cittadini ed industriali.

In questo lavoro di tesi ci siamo focalizzati sulla sintesi di alcuni derivati idrossamici dell'acido oleanolico sfruttando la presenza dell'alcool in posizione 3 e del doppio legame in posizione 12, mantenendo inalterata la funzione idrossamica in posizione 28.

I prodotti sono stati così ottenuti, modificando e funzionalizzando in modo differente i diversi anelli che compongono lo scaffold del prodotto naturale.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

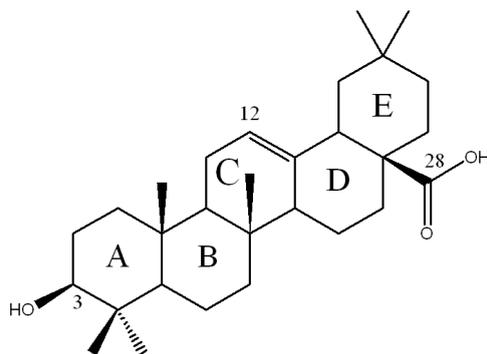


figura 10.

Visti i risultati della letteratura su acido betulinico ed acido oleanolico, in questo lavoro di tesi si è deciso di esplorare maggiormente lo spazio chimico dell'acido oleanolico attraverso la sintesi di nuovi derivati idrossamici modificando in particolare gli anelli A e C dello scheletro terpenico.

3.1 SINTESI DI DERIVATI FUNZIONALIZZATI SULL'ANELLO A

Questa tesi dunque, si prefigge di sintetizzare derivati idrossamici dell'acido oleanolico sostituendo l'acido carbossilico in C-28 con il nostro gruppo farmacoforico e andando a modificare alcuni sostituenti sugli anelli A e C.

3.1.1 primo derivato

- Per la sintesi del primo derivato, si è proceduto all'ossidazione del carbonio in posizione 3 dell'acido oleanolico dando origine all'enone corrispondente tramite reazione di IBX con fluorobenzene catalitico e in miscela 3:1 di benzene/DMSO a 100°C.
- Si è proseguito effettuando una riduzione di Luche, ovvero tramite l'utilizzo di NaBH₄ e CeCl₃ equimolari in metanolo ottenendo così una riduzione selettiva del carbonile al suo corrispondente alcool allilico. La reazione di Luche, infatti, ha il vantaggio di riuscire a ridurre chetoni senza interferire con doppi legami coniugati presenti nella

molecola, ed in questo contesto, il cerio è chiave nel complessare il chetone interessato rendendolo più elettrofilo e quindi maggiormente suscettibile all'attacco dell'idruro.

- Il prodotto **3** ottenuto è stato attivato tramite reazione con EDC e di HOBt a dare il composto **4** che infine è stato trattato con idrossilammina in piridina dry a 55° a fornire il prodotto finale **5**.

L'EDC è un agente condensante che attiva l'acido carbossilico presente sul C-28 formando con questi un intermedio (R-COO-EDC) che forma a sua volta l'addotto con l'idrossibenzotriazolo.

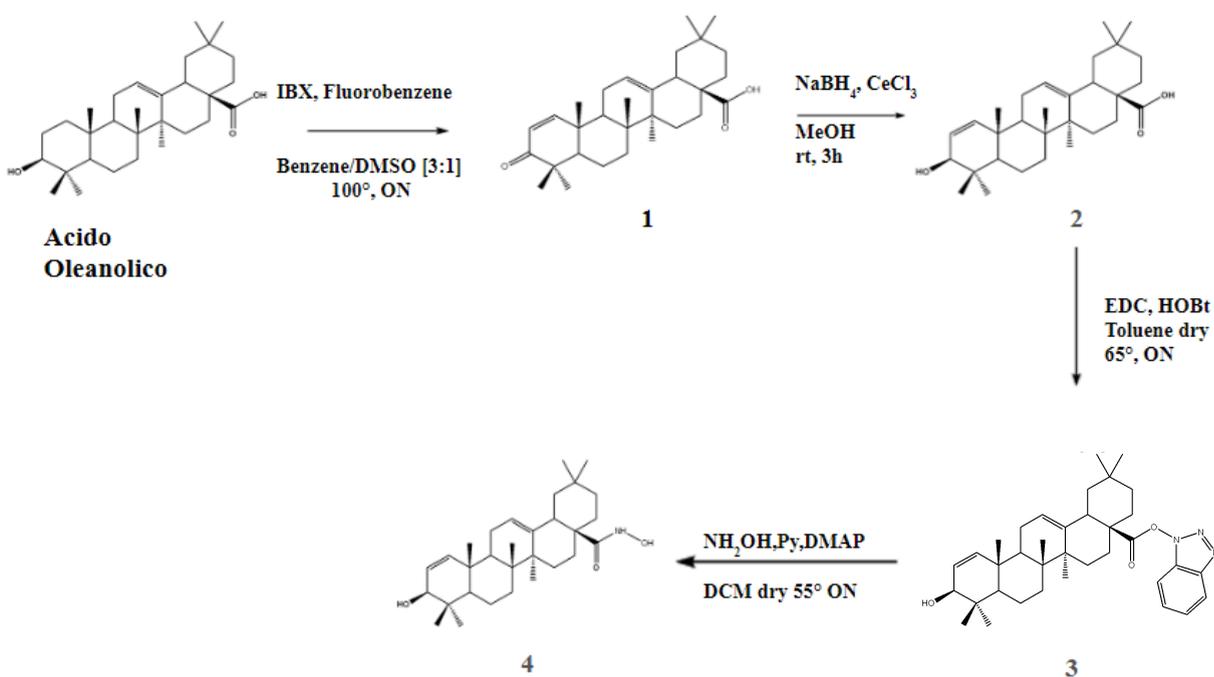


figura 11 . Schema sintetico del primo derivato idrossammico dell'acido oleanolico.

3.1.2 secondo derivato

- Per poter sintetizzare il secondo prodotto finale, si è partiti dalla molecola **3**, risultante dell'ossidazione e successiva riduzione dell'oleanolico, sulla quale si è effettuata una trasposizione mediata da BF₃ eterato (aggiunto *dropwise*) in presenza di DCM *dry* a 0°C. BF₃ eterato è un complesso formato dall'interazione tra BF₃ e un etere, dove l'etere dona una coppia di elettroni al boro, stabilizzando il composto. Tale step sintetico si traduce nell'installazione di un'insaturazione sull'anello B tra i carboni 9 e 10 indotta dalla migrazione del doppio legame dal carbonio 1 al carbonio 2 e concomitante trasposizione del gruppo metilico dal carbonio 10 al carbonio 1, il tutto in maniera concertata.
- Proseguendo nella sintesi, si ricorre ancora una volta all'utilizzo di EDC e HOBt sempre in quantità equimolari, in toluene *dry* a 65°C.
- L'ultimo passaggio richiede l'ausilio di un ambiente di DCM *dry* a 55°C dove l'aggiunta prima di NH₂OH seguita da piridina e DMAP come catalizzatore portano all'idrossammato desiderato. La piridina funge da base di Lewis, quindi da *proton sink* mentre il 4-dimetilamminopiridina (DMAP) attiva gli acidi carbossilici ed i loro derivati cosicché l'idrossilammina possa agire andando ad attaccare il carbonio carbonilico formando il gruppo funzionale richiesto.

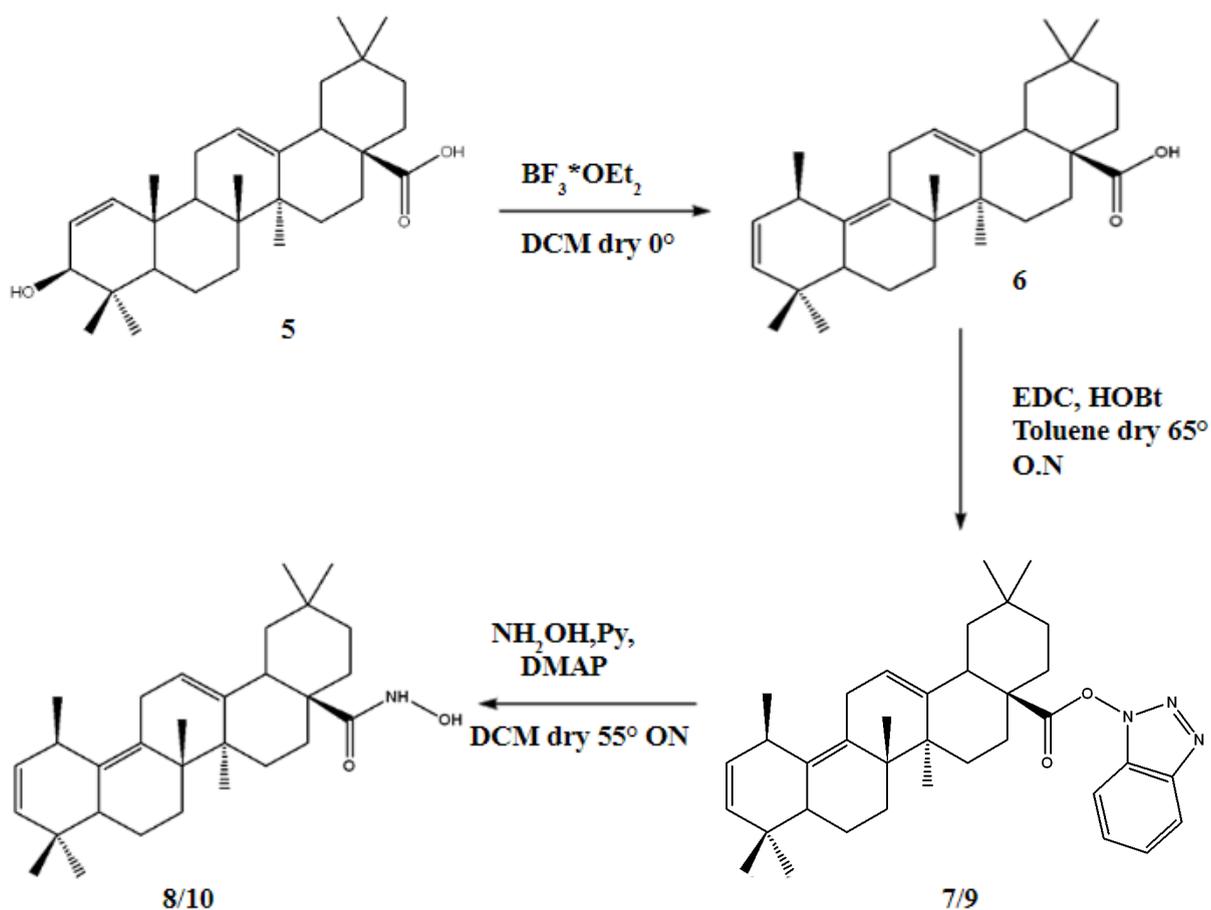


figura 12. Schema sintetico del secondo derivato idrossammico dell'acido oleanico.

3.1.3 terzo derivato

L'ultimo pathway sintetico rappresenta indubbiamente dei tre il più complesso:

1. Come punto di partenza vi è sempre l'acido oleanico il quale viene sottoposto ad una reazione di acetilazione mediante l'uso di anidride acetica con trietilammina (TEA) e DMAP, come catalizzatore, all'interno di DCM *dry*. Qui la TEA ha funzione di accettore protonico, neutralizzando l'acido acetico, prodotto dell'interazione tra l'anidride ed il gruppo alcolico in C-3. L'acetilazione di quest'ultimo ne previene una futura interazione durante i successivi passaggi sintetici.
2. Di seguito si è svolta l'ozonolisi sul doppio legame in posizione 12 mediante un ambiente di DCM con piridina sotto flusso di Ozono ed immerso in ghiaccio (0°C). L'ozono ha infatti rotto tale insaturazione fornendo l'alcol ed un ponte estereo con l'acido carbossilico sul C-28.

3. Proseguendo, l'obiettivo è stato quello di formare un ponte etereo con il C-27 sovrastante così l'anello C sfruttando il Piombo tetra acetato ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$), lo Iodio ed il Toluene *dry* come solvente; il tutto a refluxo a 125°C servendosi dell'azoto.

Il complesso del piombo reagisce dapprima con l'alcol a formare un intermedio acetossilato, in seguito forma un radicale all'ossigeno che interagisce con il metile in posizione 27 formando un radicale metilico. Il piombo rigenera un ulteriore radicale all'ossigeno cosicché quest'ultimo possa interagire con il metile costruendo in questa maniera il ponte etereo.

Lo iodio può contribuire alla generazione di radicali alchilici attraverso la rottura di legami e la formazione di intermedi radicalici. Questo processo è facilitato dalla presenza di toluene, un solvente non reattivo che può influenzare il comportamento dei radicali; il flusso di azoto, inoltre, ne previene l'ossidazione creando un'atmosfera inerte.

4. Continuando con la procedura, si passa all'idrolisi per poter efficacemente degradare il ponte estereo formatosi oltre che deacetilare la posizione 3, dando in questa maniera l'acido carbossilico in posizione C-28 e l'alcol sul C-13 e sul C-3. L'idrolisi è mediata da litio idrossido (LiOH) insieme alla soda caustica (NaOH) per la loro forte basicità, in un rapporto molare di 10:1, sempre sotto refluxo di azoto ad una temperatura di 65°C . In primis si è rotto il ponte estereo mentre si è dovuta svolgere un'ulteriore reazione di idrolisi per poter deacetilare il composto.
5. In conclusione, si sono replicate le reazioni precedenti che vedevano dapprima l'interazione con EDC e HOBt per unire la molecola al benzotriazolo, ed infine l'azione dell'idrossilamina con Potassa (KOH) in metanolo svolta mettendo il reattore in microonde a 80°C sfruttando una potenza di 150W.

L'idrossammato derivato dalla molecola di Acido Oleanolico è stata così ottenuta.

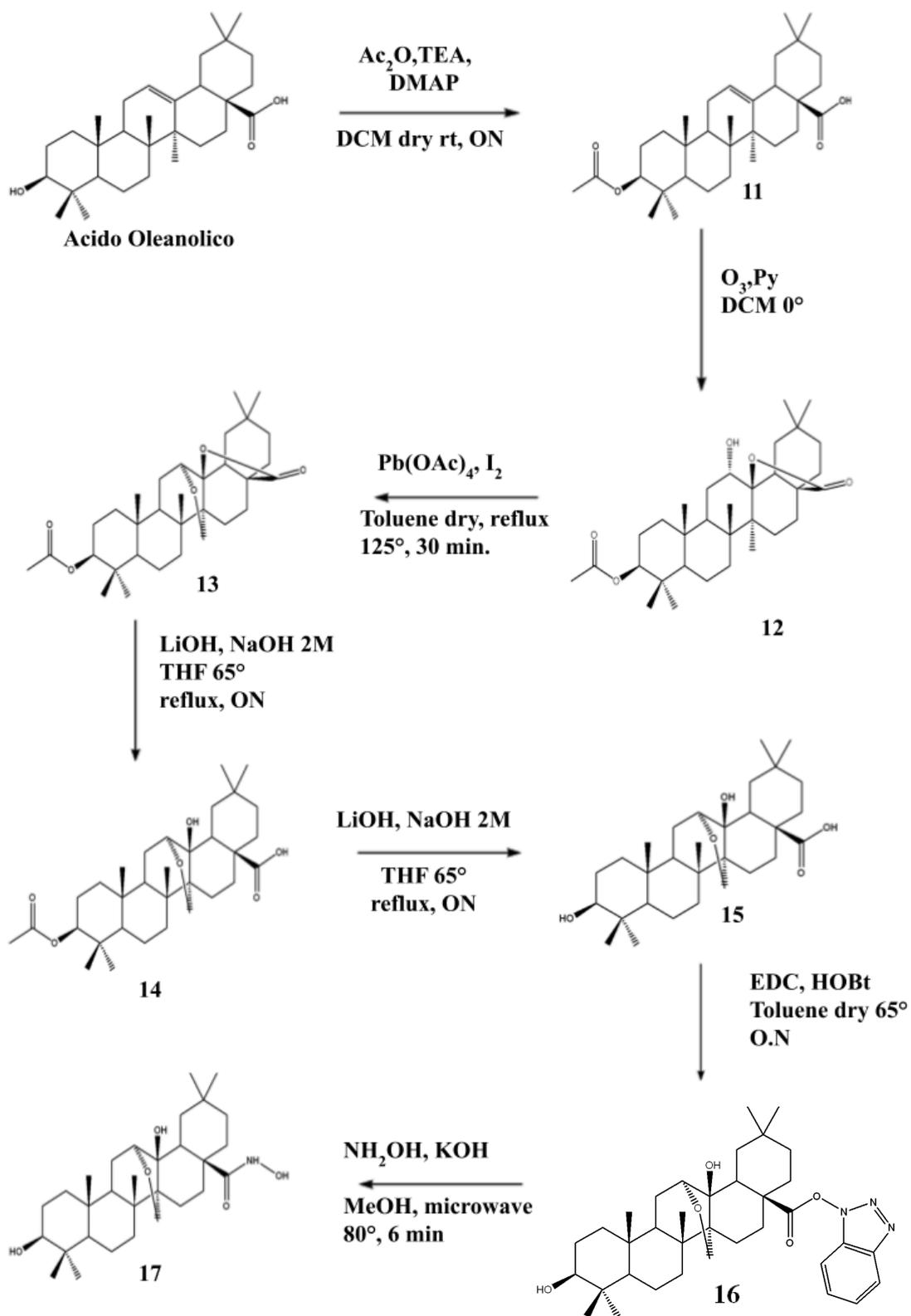


Figura 13. Schema sintetico del terzo derivato idrossammico dell'acido oleanolico.

4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

In conclusione, OA rappresenta senza ombra di dubbio un notevole punto di partenza per la costruzione di derivati sintetici con ottime potenzialità verso lo sviluppo scientifico e l'innovazione terapeutica.

Affidandoci a tali prospettive, questo lavoro di tesi, attraverso la modifica di specifici carboni all'interno dello scaffold terpenico, ci ha permesso di sintetizzare derivati dell'acido oleanolico che, facendosi carico di un gruppo idrossammico sul C-28, abbiano il potenziale di agire indirettamente a livello della regolazione del fattore HIF tramite interazione con la prolil idrossilasi, suo inibitore.

I prodotti finali sono stati inviati presso il laboratorio dell'Università di Cordoba del professor Eduardo Muñoz, per valutarne l'attività biologica.

Sulla base dei risultati ottenuti, gli sviluppi futuri mireranno alla costruzione di molecole sempre più selettive e specifiche, arricchendo così la letteratura a riguardo ed ampliandone in tal modo la ricerca.

5. PARTE SPERIMENTALE

I reattivi commercialmente disponibili sono stati utilizzati senza effettuare un'ulteriore purificazione.

Le reazioni sono state monitorate con la tecnica della cromatografia su strato sottile (TLC) su lamine di silice (TLC silica gel 60 F254; Sigma Aldrich), visualizzate con lampada UV e sviluppate in 5% H₂SO₄ in metanolo o in reagente di Pancaldi, carbonizzando infine con pistola termica.

È stato utilizzato Na₂SO₄ per anidrificare le soluzioni organiche in tutte le procedure di work-up.

Le colonne cromatografiche sono state svolte su silice, utilizzando Si gel 60 (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM). Il DCM *dry* e il toluene *dry* sono stati ottenuti per anidificazione con colonna cromatografica svolta su allumina.

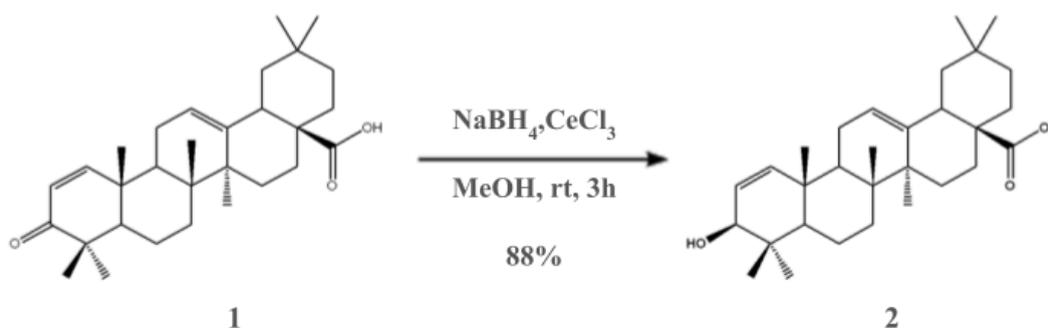
Gli spettri ¹H-NMR e ¹³C-NMR APT sono stati registrati mediante lo spettrometro Bruker Advance Neo 400 MHz a 25°. I chemical shift degli spettri ¹H e ¹³C-APT si riferiscono rispettivamente a CHCl₃ a 7.26 ppm e CDCl₃ a 77,0 ppm.

5.1 SINTESI DI DERIVATI IDROSSAMMICI DELL'ACIDO

OLEANOLICO

5.1.1 Sintesi primo derivato

Riduzione di Luche



Reagenti	PM (g/mol)	m (g)	V (mL)	mmol	eq
1	452,7	3,00		6,626	1
NaBH₄	37,83	1,25		33,134	5
CeCl₃	372,58	12,34		33,134	5
MeOH			75		

Procedimento

In un pallone posto in agitazione sciogliere 3 g di **1** in 75 mL di MeOH. Si aggiungono 12,34 g di CeCl_3 e poi 1,25 g di NaBH_4 . Solo durante l'aggiunta di quest'ultimo si è posta in ghiaccio la reazione. Si è lasciata a RT per 3h.

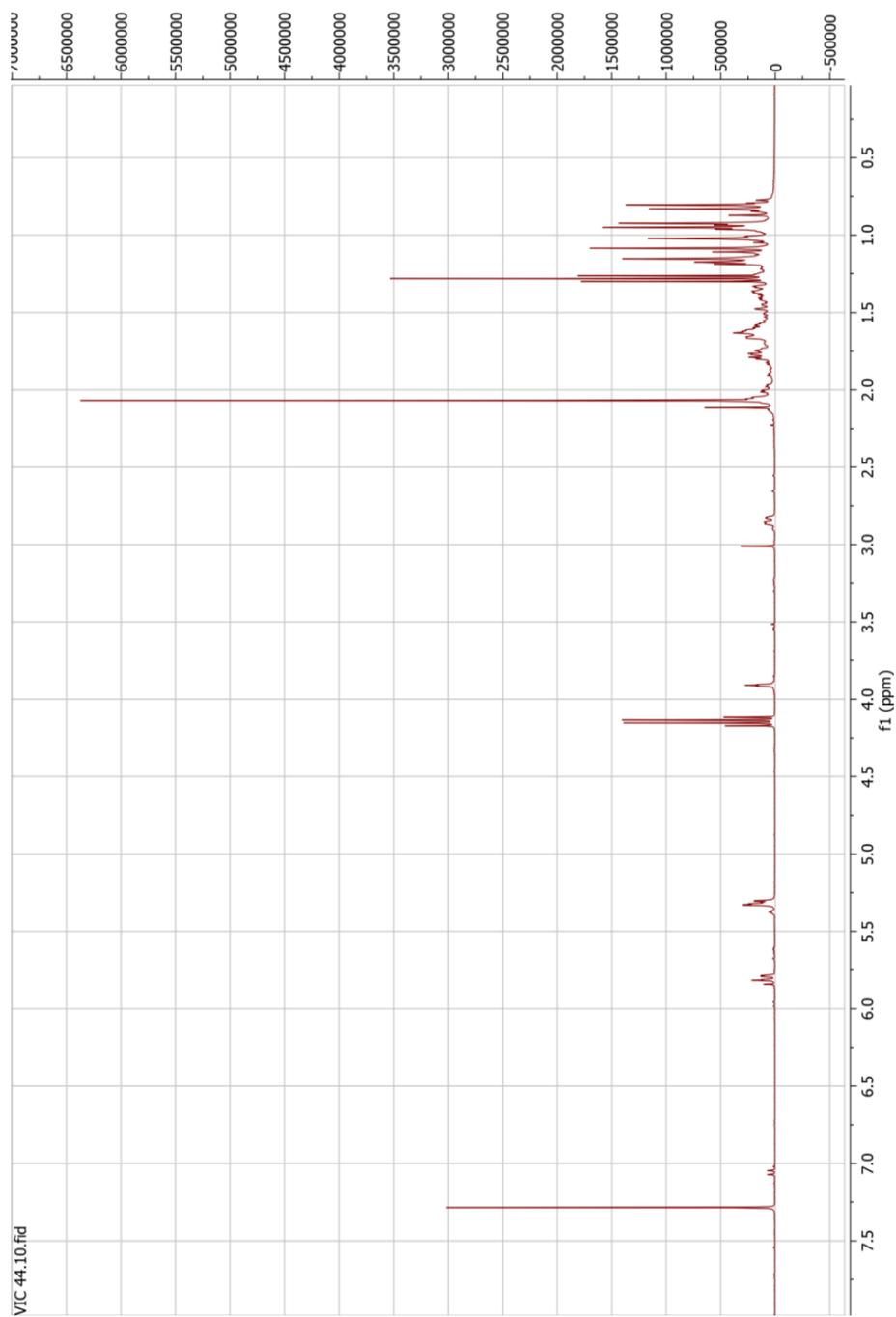
Quenching e lavorazione

TLC di controllo effettuata in PE/EtOAc 8:2.

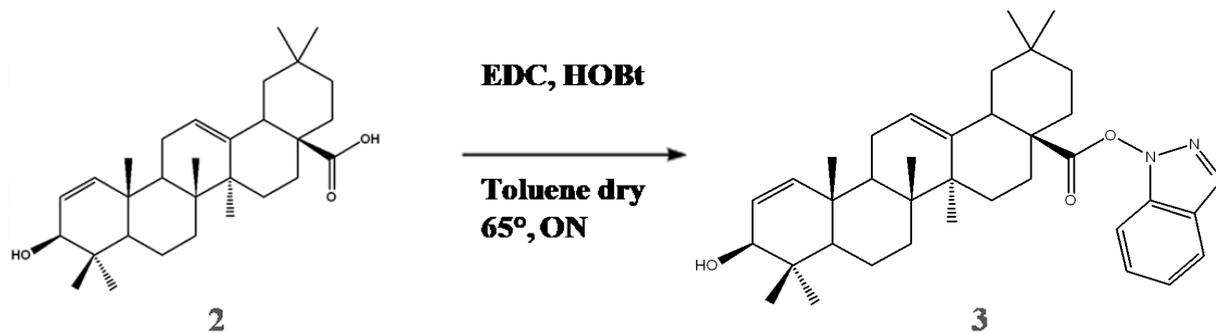
Si esegue un *work-up* con EtOAc/ H_2SO_4 2M e BRINE, si anidifica la fase organica con Na_2SO_4 e si evapora il solvente mediante rotavapor.

si ottengono 2,678 g del prodotto **2** (88%)

VIC44 Spettro NMR-1H del prodotto 2



Attacco del benzotriazolo



Resa quantitativa

Reagenti	PM (g/mol)	m (mg)	V (mL)	mmol	eq
2	454,7	500		1,1	1
EDC	191,7	633		3,30	3
HOBt	135,12	450		3,30	3
toluene <i>dry</i>			10		

Procedimento

In un pallone posto in agitazione si sciolgono 500 mg di **2** in toluene *dry*. Si scalda a 65°C e si aggiungono prima 633 mg di EDC ed in seguito 450 mg di HOBt.

Si lascia dunque la reazione in temperatura *overnight*.

Quenching e lavorazione

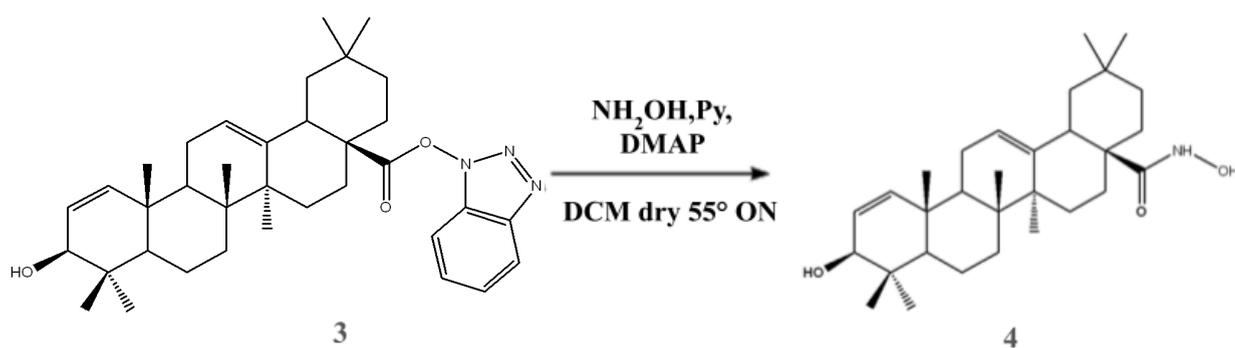
Il giorno seguente si effettua la TLC di controllo in PE/EtOAc 7:3.

Si esegue un work-up con NaHCO₃/EtOAc lavando più volte con NaHCO₃.

Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor.

Si ottengono 750 mg del prodotto **3** (resa quantitativa)

Reazione di formazione idrossammato



5%

Reagenti	PM	m	d	V	mmol	eq
	(g/mol)	(mg)	(g/ml)	(mL)		
3	555,83	600			1,08	1
NH ₂ OH	69,49	225			3,24	3
Py	79,10	427	0,978	0,43	5,40	5
DMAP						cat.
DCM <i>dry</i>				10		

Procedimento

In un carius si sciolgono 600 mg di **3** in 10 mL di DCM *dry* e si aggiungono 225 mg di NH₂OH, 0,43 mL di piridina e DMAP in quantità catalitiche.

Si lascia in agitazione a 55°C *overnight*.

Quenching e lavorazione

La reazione viene controllata con una TLC in PE/EtOAc 7:3.

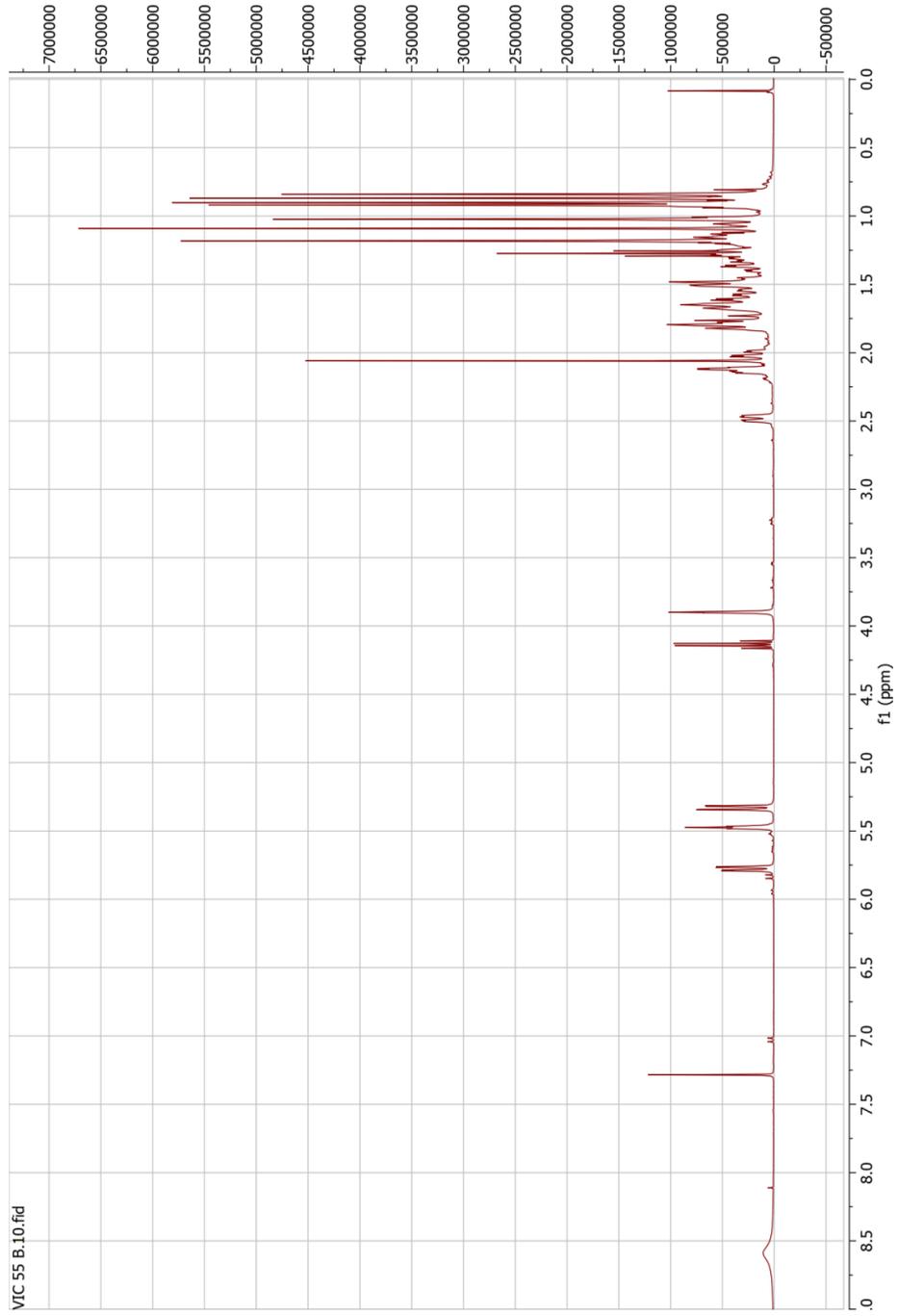
Si riporta la reazione a temperatura ambiente e si esegue un work-up con H₂SO₄ 2M/DCM.

Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor.

Si purifica il grezzo di reazione mediante colonna cromatografica.

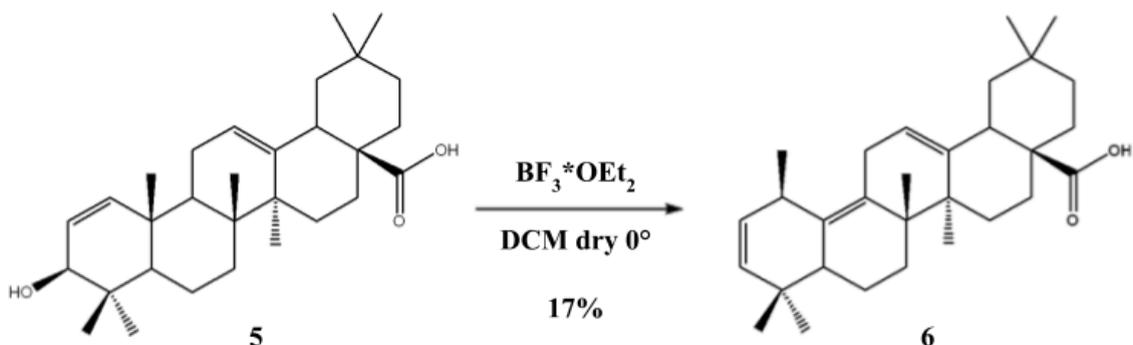
Si ottengono 25 mg del prodotto **4** (5%).

VIC 55B Spettro NMR di 4



5.1.2 Sintesi secondo derivato

Reazione di trasposizione



Reagenti	PM (g/mol)	m (mg)	d (g/ml)	V (mL)	mmol	eq
5	454,7	510			1,121	1
$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	141,93	955	1,13	0,84	6,729	6
DCM <i>dry</i>				35		

Procedimento

In un pallone posto in agitazione a 0°C si sciolgono 510 mg di **5** in 5 mL di DCM *dry* e si aggiungono 0,84 mL di $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$.

La reazione è istantanea e il colore della soluzione nel pallone vira da giallo pallido al rosso intenso.

Quenching e lavorazione

La reazione viene controllata immediatamente con una TLC in PE/EtOAc 85:15.

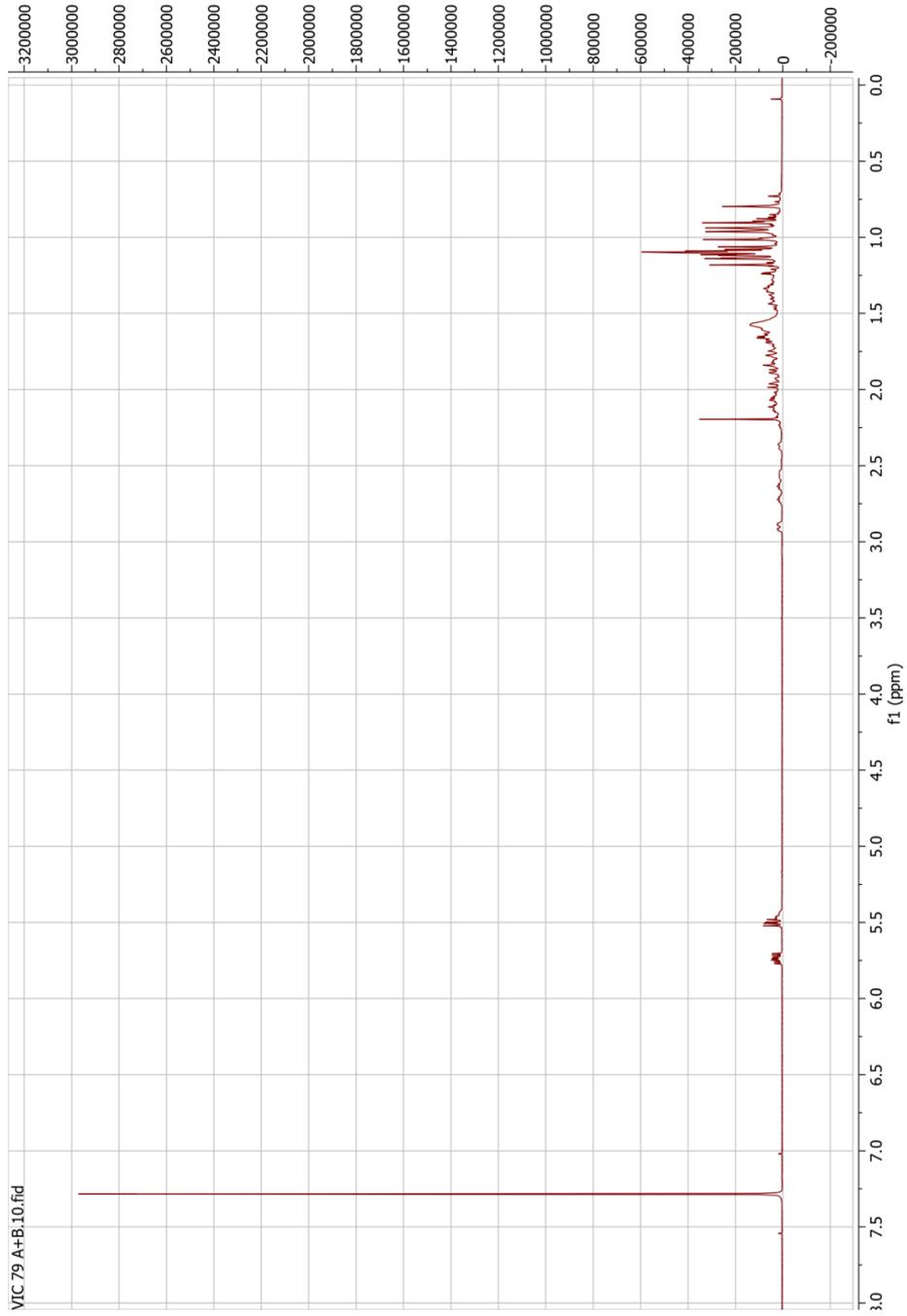
Si riporta la reazione a temperatura ambiente e si esegue un quenching gocciolando NaHCO_3 , seguito da un work-up con DCM/ NaHCO_3 .

Si anidrifca la fase organica con Na_2SO_4 e si evapora il solvente tramite rotavapor.

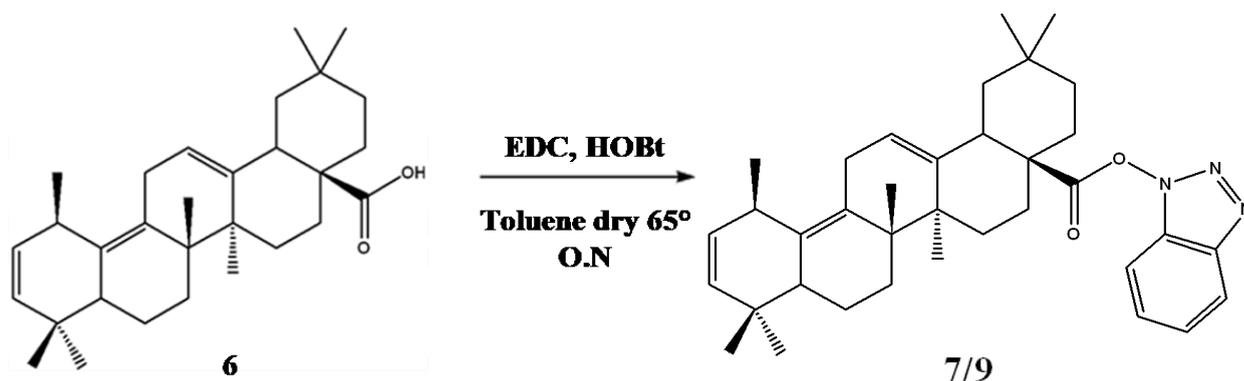
Si purifica il grezzo di reazione mediante colonna cromatografica.

Si ottengono 83 mg del prodotto **6** (17%)

VIC79 A+B Spettro NMR-1H del prodotto 6



Attacco del benzotriazolo



Resa quantitativa

Reagenti	PM (g/mol)	m (mg)	V (mL)	mmol	eq
6	436,7	104		0,238	1
EDC	191,7	137		0,714	3
HOBt	135,12	96		0,714	3
toluene <i>dry</i>			5		

Procedimento

In un pallone posto in agitazione si sciolgono 104 mg di **6** in 5 mL di toluene *dry*. Si scalda a 65°C e si aggiungono prima 137 mg di EDC ed in seguito 96 mg di HOBt.

Si lascia dunque la reazione in temperatura *overnight*.

Quenching e lavorazione

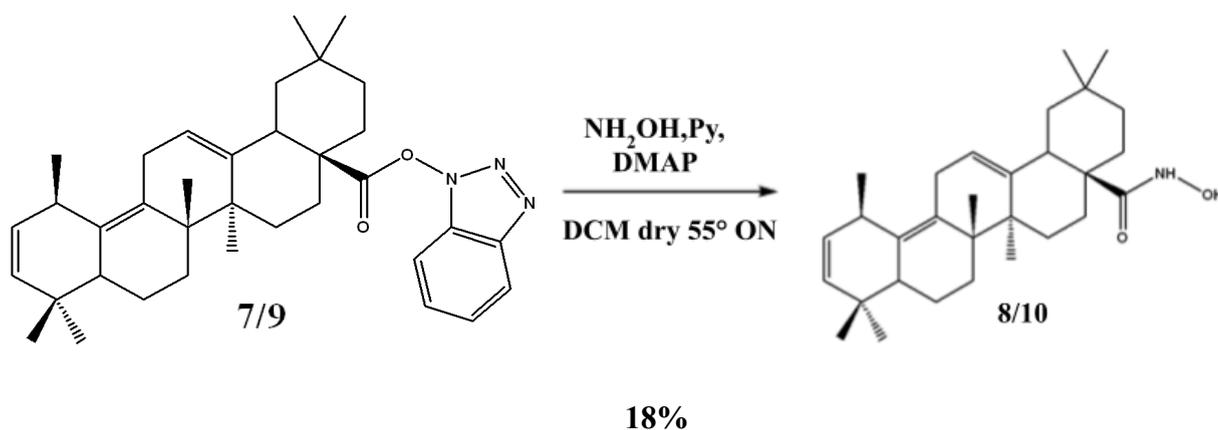
La reazione viene controllata con una TLC in PE/EtOAc 7:3.

Si riporta la reazione a temperatura ambiente e si esegue un work-up con NaHCO₃/EtOAc lavando più volte con NaHCO₃.

Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor.

Si ottengono 128 mg del prodotto **9** (resa quantitativa).

Formazione dell'idrossammato



Reagenti	PM (g/mol)	m (mg)	d (g/ml)	V (mL)	mmol	eq
9	537,83	128			0,237	1
NH ₂ OH	69,49	50			0,713	3
Py	79,10		0,978	0,1	1,189	5
DMAP						cat.
DCM <i>dry</i>				10		

Procedimento

In un carius si sciolgono 128 mg di **9** in 10 mL di DCM *dry* e si aggiungono 50 mg di NH₂OH, 0,1 mL di piridina e DMAP in quantità catalitiche. Si lascia in agitazione a 55°C *overnight*.

Quenching e lavorazione

La reazione viene controllata con una TLC in PE/EtOAc 7:3.

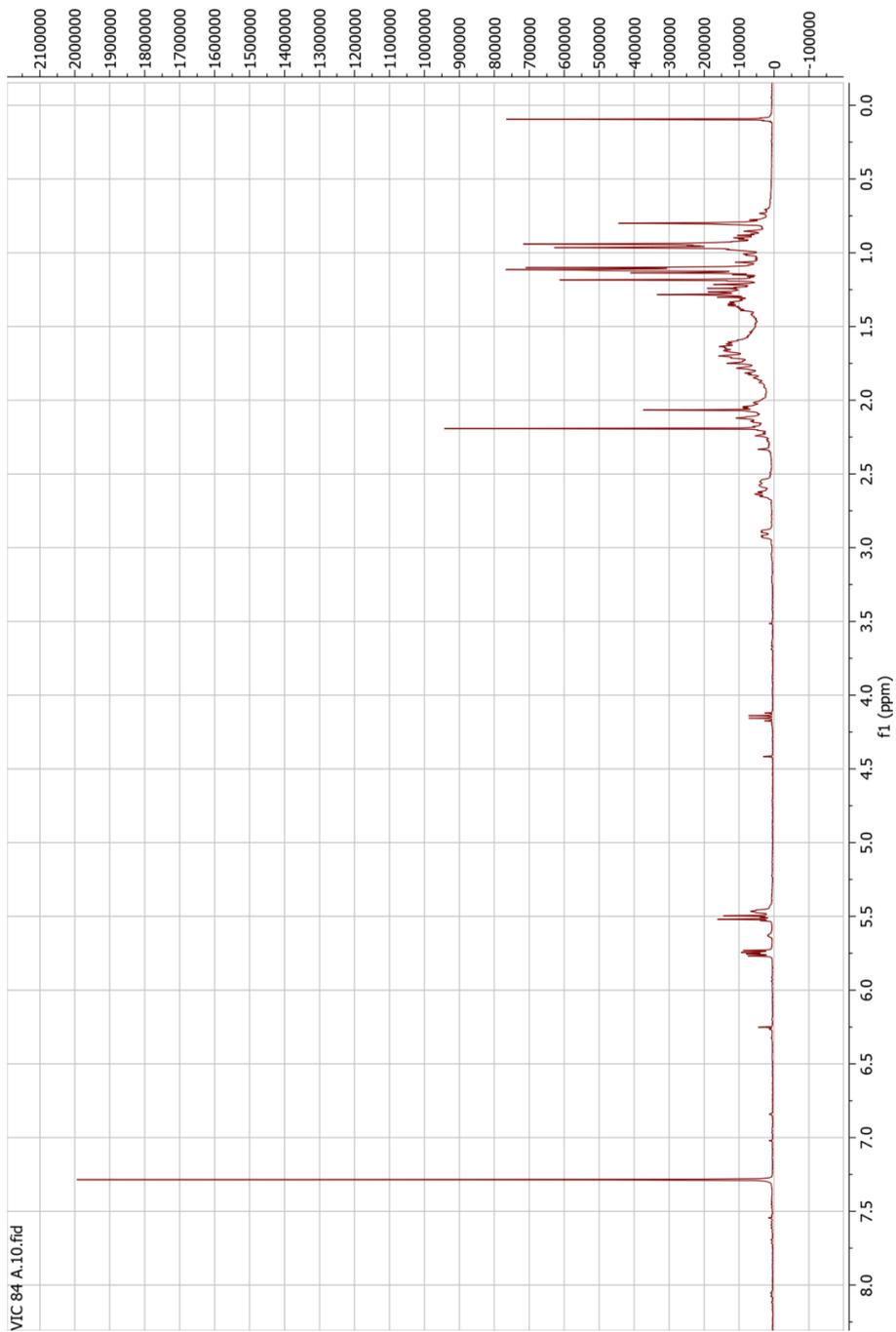
Si riporta la reazione a temperatura ambiente e si esegue un work-up con H₂SO₄ 2M/DCM.

Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor.

Si purifica il grezzo di reazione mediante colonna cromatografica.

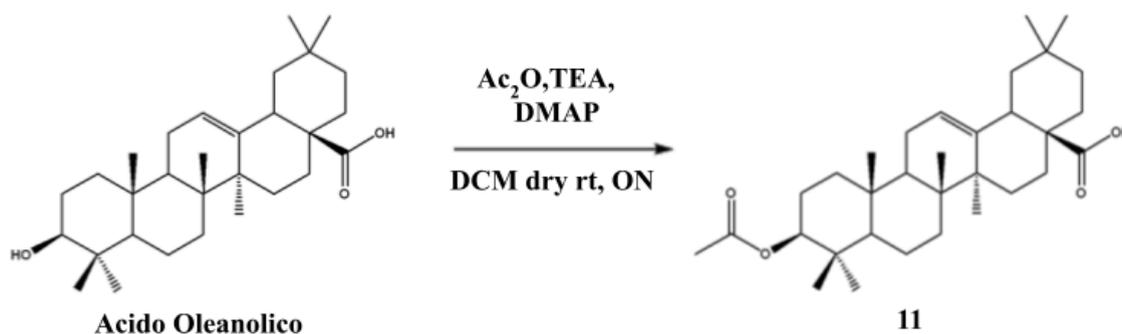
Si ottengono 20 mg del prodotto **10** (18%)

VIC 84A Spettro NMR-1H del prodotto 10



5.1.3 Sintesi terzo derivato

Acetilazione



Resa quantitativa

Reagenti	PM (g/mol)	m (g)	d (g/ml)	V (mL)	mmol	eq
Acido Oleanolico	456,7	3			6,568	1
Ac ₂ O	102,09		1,08	6,21	65,68	10
TEA	101,19		0,73	9,11	65,68	10
DMAP						cat.
DCM <i>dry</i>				60		

Procedimento

In un pallone posto in agitazione si sciolgono 3,00 g di acido oleanolico in 60 mL di DCM *dry*.

Si aggiungono 9,11 mL di TEA, 6,21 mL di Ac₂O e una quantità catalitica di DMAP.

Si lascia la reazione *overnight* a RT.

Quenching e lavorazione

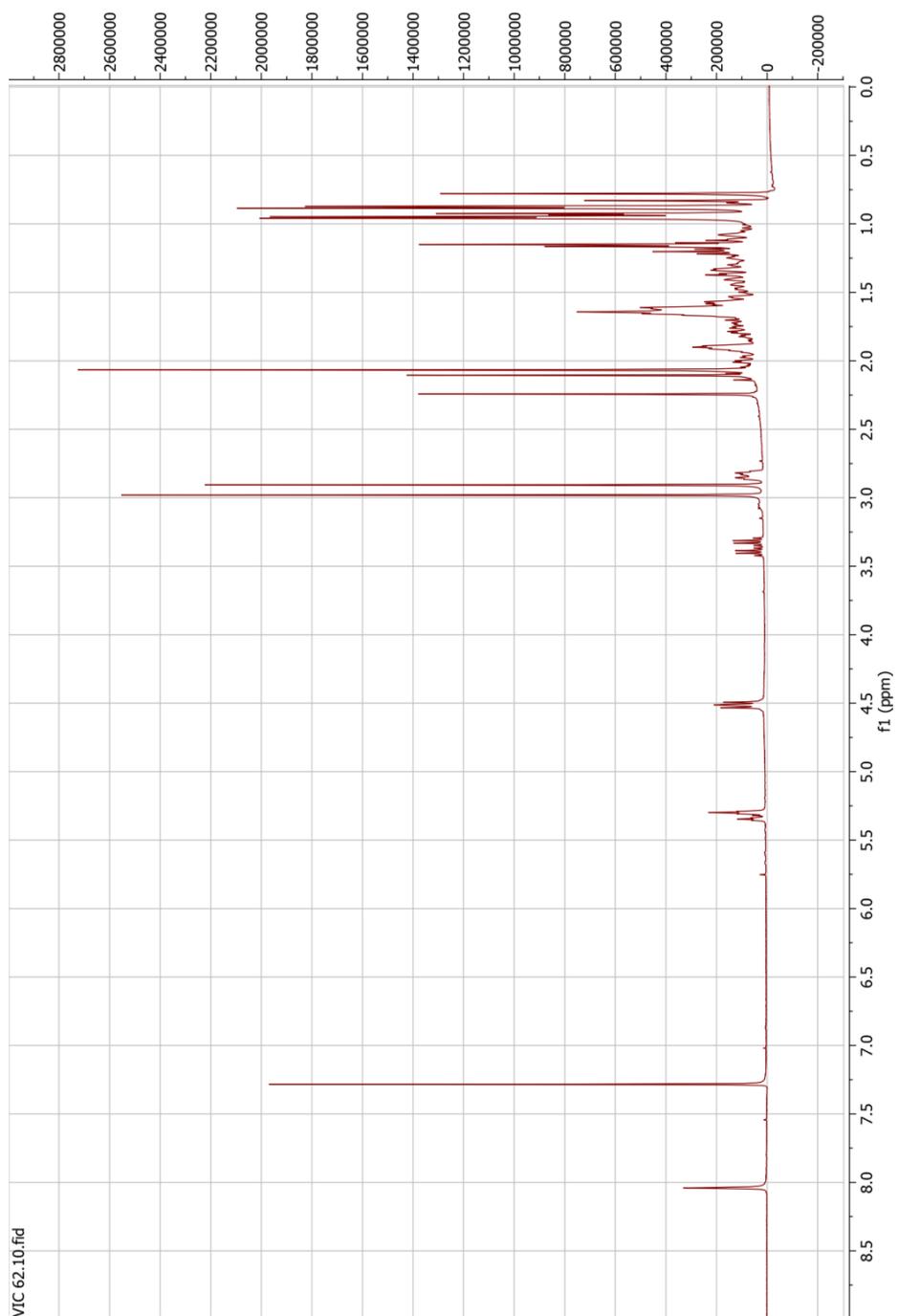
Il giorno seguente si effettua la TLC di controllo in PE/EtOAc 85:15.

Si esegue un quenching gocciolando MeOH, seguito da un work-up con DCM/H₂SO₄ 2M.

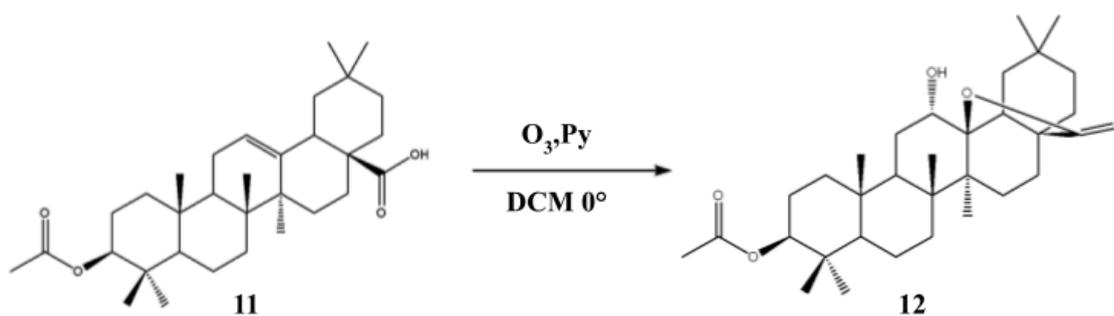
.Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor.

Si ottengono 4,136 g del prodotto **11** (resa quantitativa)

VIC 62 Spettro NMR-1H del prodotto 11



Ozonolisi



66%

Reagenti	PM (g/mol)	m (g)	d (g/ml)	V (mL)	mmol	eq
11	498,7	4,136			8,293	1
Py	79,10	1,968	0,978	2,01	24,88	3
DCM				70		

Procedimento

In una bottiglia Drechsel da 250 mL si sciolgono 4,136 g di **11** in 70 mL di DCM e si aggiungono 2,01 mL di Py. Si lascia la reazione a $0^\circ C$ sotto flusso di O_3 , generato con l'utilizzo di un ozonizzatore.

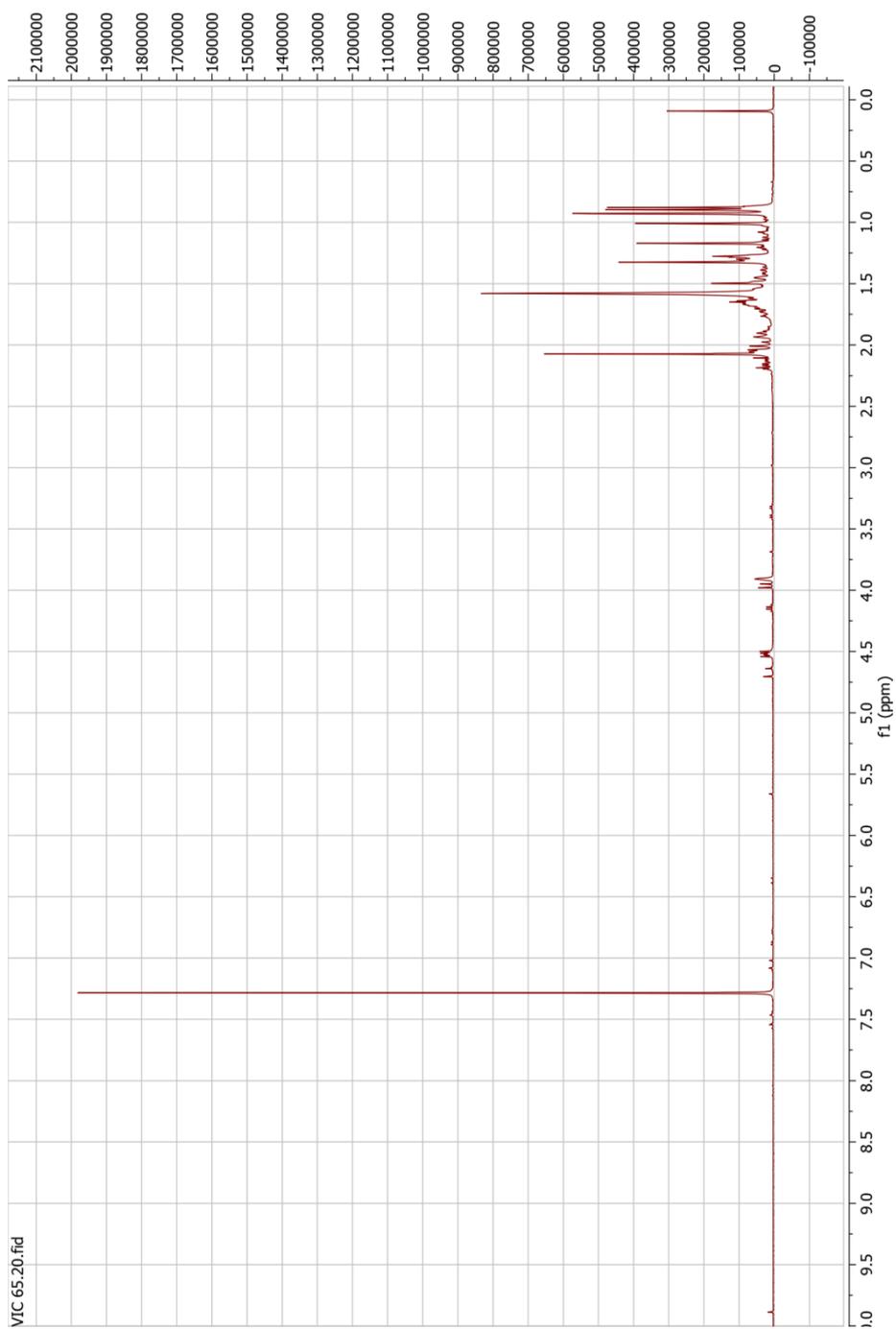
Quenching e lavorazione

Si effettua la TLC di controllo in PE/EtOAc 85:15 e si riporta la reazione a temperatura ambiente.

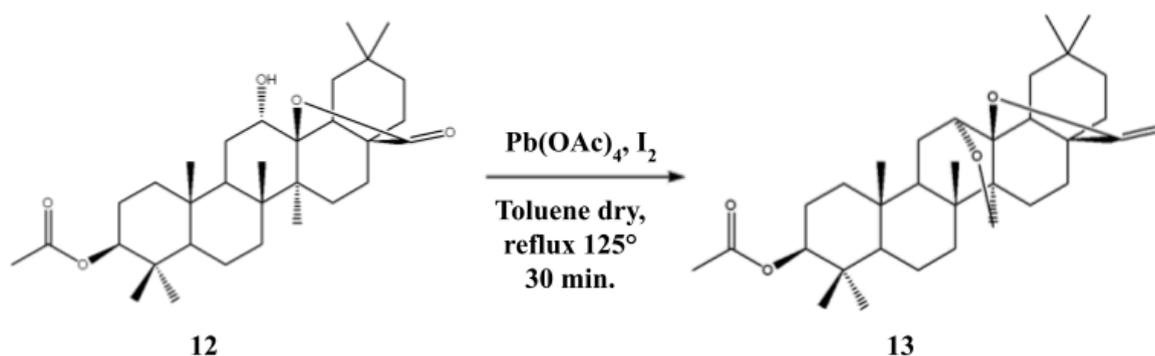
Si esegue un quenching sflussando azoto all'interno della bottiglia Drechsel e si effettua un work-up con DCM/ H_2SO_4 2M. Si anidrifca la fase organica con Na_2SO_4 e si evapora il solvente tramite rotavapor.

Si ottengono 2,833 g del prodotto **12** (66%)

VIC 65 Spettro NMR-1H del prodotto 12



Reazione di eterificazione



Resa quantitativa

Reagenti	PM (g/mol)	m (g)	V (mL)	mmol	eq
12	514,7	2,333		4,53	1
Pb(OAc) ₄	443,38	3,230		5,03	1,11
I ₂	253,81	0,287		1,13	0,25
Toluene <i>dry</i>			50		

Procedimento

In un pallone posto in agitazione in ambiente anidro si sciolgono 2,333 g di **12** in 50 mL di toluene *dry* e si aggiungono 0,287 g di I₂ e 2,230 g di Pb(OAc)₄.

Si lascia la reazione a riflusso (110°C) e sotto flusso di N₂ per 30 minuti.

Si è aggiunto 1,00 g di Pb(OAc)₄ dopo 30 min.

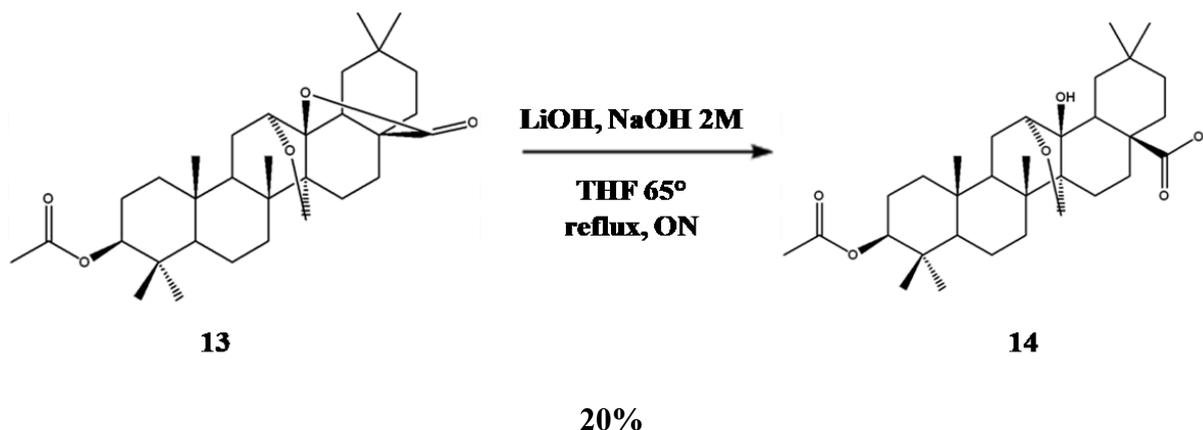
Quenching e lavorazione

Dopo aver effettuato la TLC di controllo in PE/EtOAc 7:3, si riporta la reazione a temperatura ambiente.

Si esegue un quenching gocciolando Na₂SO₃ e si effettua un work-up con EtOAc/ Na₂SO₃. Si anidrifica la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor.

Si ottengono 2,744 g del prodotto **13** (resa quantitativa)

Idrolisi Basica num. 1



Reagenti	PM (g/mol)	m (g)	V (mL)	mmol	eq
13	512,7	2,744		5,352	1
LiOH	41,96	2,24		53,52	10
NaOH		2 pipette			cat.
THF			50		

Procedimento

In un pallone posto in agitazione si sciolgono 2,744 g di **13** in 50 mL di THF e si aggiungono 2 pipette di NaOH e 2,24 g di LiOH.

Si lascia la reazione in agitazione a riflusso (65°C) *overnight*.

Quenching e lavorazione

Il giorno seguente si effettua la TLC di controllo in PE/EtOAc 7:3 e si riporta la reazione a temperatura ambiente. Si esegue un quenching gocciolando H₂SO₄ 2M e si effettua un work-up con EtOAc/H₂SO₄ 2M.

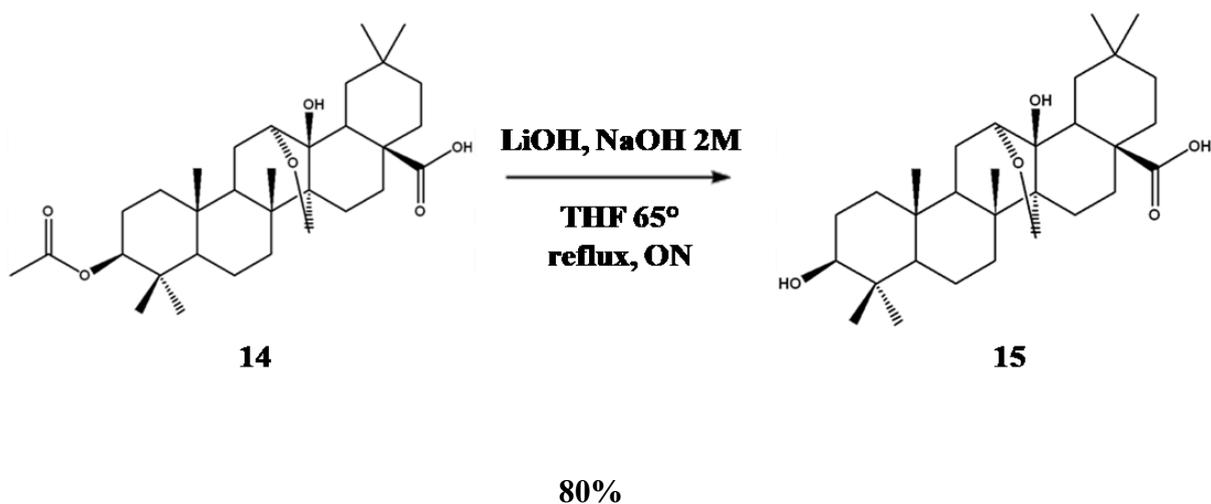
Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor. Si purifica il grezzo di reazione mediante colonna cromatografica.

Si ottengono 565 mg del prodotto **14** (20%).

VIC 69 C+D Spettro NMR-1H del prodotto 14



IDROLISI BASICA num. 2



Reagenti	PM (g/mol)	m (mg)	V (mL)	mmol	eq
14	530,7	565		1,06	1
LiOH	41,96	446		10,64	10
NaOH		2 pipette			cat.
THF			10		

Procedimento

In un pallone posto in agitazione si sciolgono 565 mg di **14** in 10 mL di THF e si aggiungono 2 pipette di NaOH e 446 mg di LiOH.

Si lascia la reazione in agitazione a riflusso (65°C) *overnight*.

Quenching e lavorazione

Si effettua la TLC di controllo in PE/EtOAc 7:3 e si riporta la reazione a temperatura ambiente. Si esegue un quenching gocciolando H₂SO₄ 2M e si effettua un work-up con EtOAc/H₂SO₄ 2M.

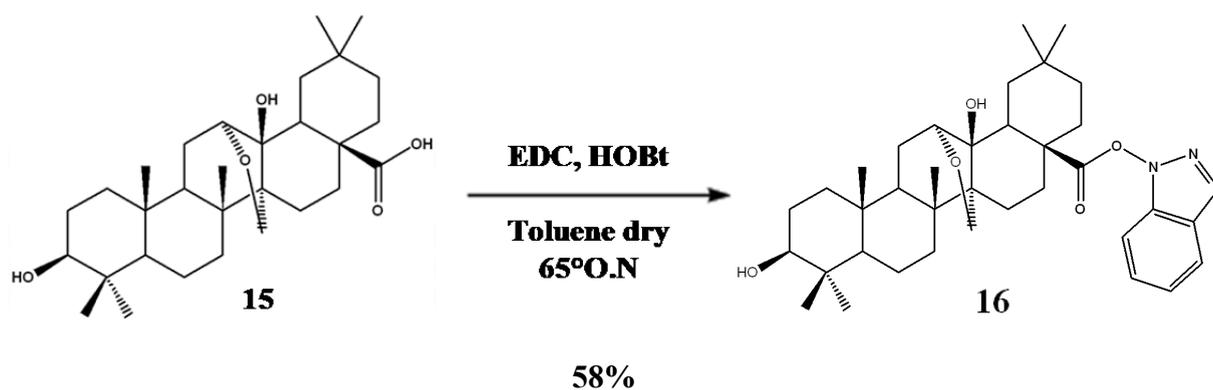
Si anidifica la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor. Si purifica il grezzo di reazione mediante colonna cromatografica.

Si ottengono 417 mg del prodotto **15** (80%)

VIC 72 B Spettro NMR-1H del prodotto 15



Attacco del benzotriazolo



Reagenti	PM (g/mol)	m (mg)	V (mL)	mmol	eq
15	488,7	100		0,204	1
EDC	191,7	117		0,612	3
HOBt	135,12	82		0,612	3
toluene <i>dry</i>			5		

Procedimento

In un pallone posto in agitazione si sciolgono 100 mg di **15** in 5 mL di toluene *dry*. Si scalda a 65°C e si aggiungono prima 117 mg di EDC ed in seguito 82 mg di HOBt.

Si lascia dunque la reazione in temperatura *overnight*.

Quenching e lavorazione

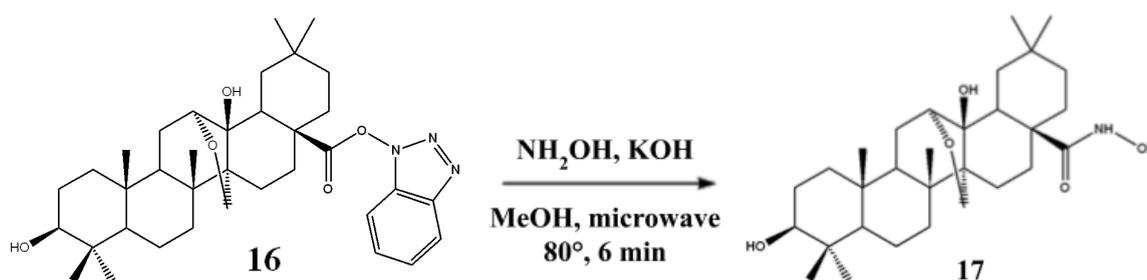
La reazione viene controllata con una TLC in PE/EtOAc 7:3.

Si riporta la reazione a temperatura ambiente e si esegue un work-up con NaHCO₃/EtOAc lavando più volte con NaHCO₃.

Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor.

Si ottengono 70 mg del prodotto **16** (58%).

Formazione dell'idrossammato



Resa quantitativa

Reagenti	PM (g/mol)	m (mg)	V (mL)	mmol	eq
16	589,7	70		0,118	1
N ₂ OH	69,49	12		0,178	1,5
KOH	56,1	20		0,356	3
MeOH	32,04		0,5		

Procedimento

In una flask per microonde si sciolgono 70 mg di **16** in 0,5 mL di MeOH e si aggiungono 12 mg di NH₂OH e 20 mg di KOH.

Si lascia in agitazione in microonde (80°) a 150W per 6 min.

Una volta concluso, si ripete il riscaldamento mediante microonde una seconda volta.

Quenching e lavorazione

La reazione viene controllata con una TLC in PE/EtOAc 7:3.

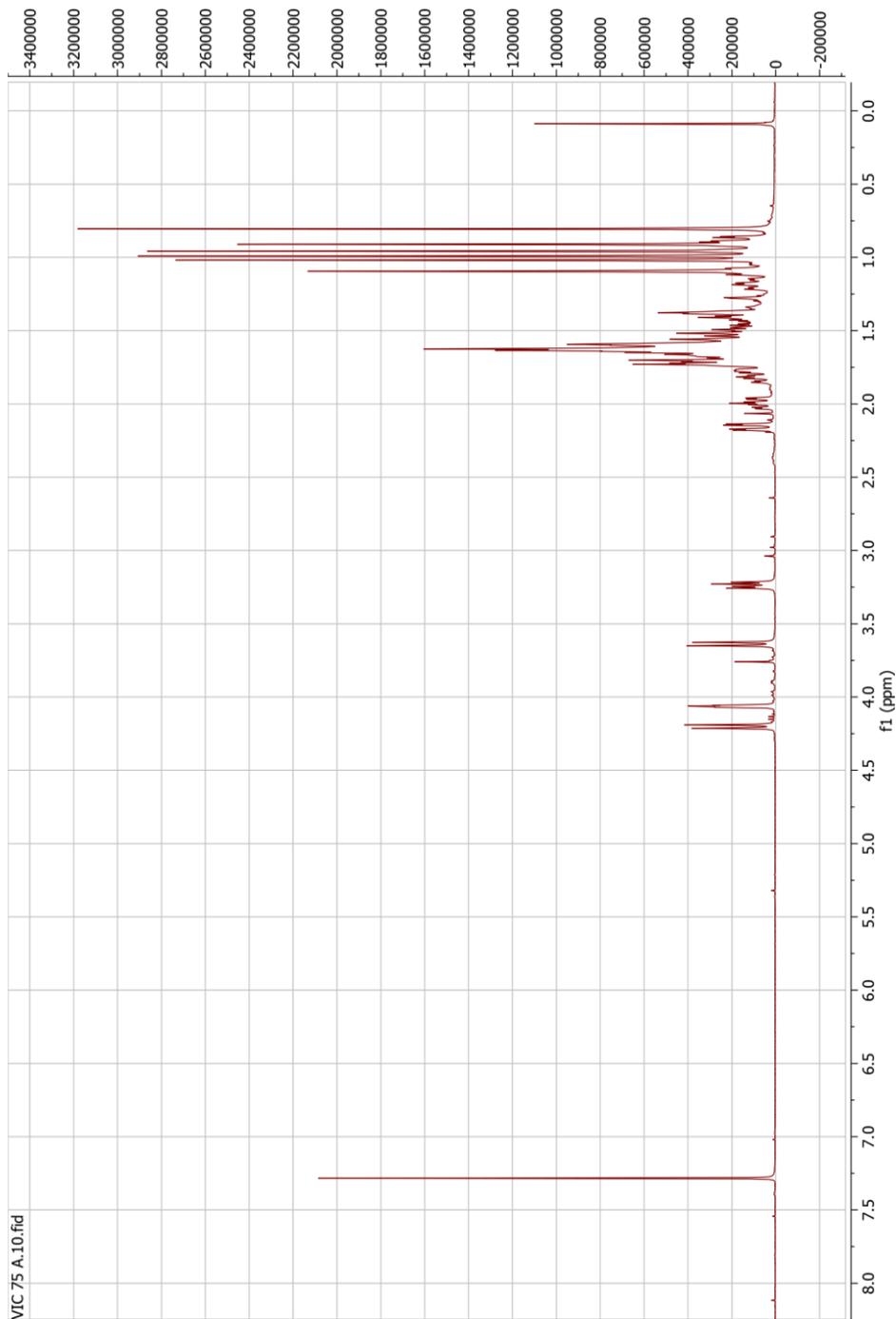
Si riporta la reazione a temperatura ambiente e si esegue un work-up con H₂SO₄ 2M/DCM.

Si anidrifca la fase organica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente tramite rotavapor.

Si purifica il grezzo di reazione mediante colonna cromatografica.

Si ottengono 67 mg del prodotto **17** (resa quantitativa)

VIC 75A Spettro NMR-1H del prodotto 17



6. BIBLIOGRAFIA & SITOGRAFIA

1. Ward, Jeremy P.T. “Oxygen Sensors in Context.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1777, no. 1, Jan. 2008, pp. 1–14.
2. Prados, María E., et al. “Betulinic Acid Hydroxamate Prevents Colonic Inflammation and Fibrosis in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease.” *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 42, no. 7, 1 July 2021, pp. 1124–1138.
3. Carroll, Veronica A., and Margaret Ashcroft. “Targeting the Molecular Basis for Tumour Hypoxia.” *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 7, no. 6, 15 Apr. 2005, pp. 1–16.
4. Marius Mioc, et al. “Recent Advances Regarding the Molecular Mechanisms of Triterpenic Acids: A Review (Part I).” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 14, 13 July 2022, pp. 7740–7740.
5. Fong, G-H, and K Takeda. “Role and Regulation of Prolyl Hydroxylase Domain Proteins.” *Cell Death & Differentiation*, vol. 15, no. 4, 15 Feb. 2008, pp. 635–641.
6. Choudhry, Hani, and Adrian L. Harris. “Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology.” *Cell Metabolism*, vol. 27, no. 2, Feb. 2018, pp. 281–298.
7. Minassi, Alberto, et al. “Triterpenoid Hydroxamates as HIF Prolyl Hydrolase Inhibitors.” *Journal of Natural Products*, vol. 81, no. 10, 10 Oct. 2018, pp. 2235–2243
8. “Compartmentalization and Transporter Engineering Strategies for Terpenoid Synthesis.” *Microbial Cell Factories*, vol. 21, no. 1, 23 May 2022.
9. P. M. Dewick, CHIMICA, BIOSINTESI E BIOATTIVITÀ DELLE SOSTANZE NATURALI, PICCIN, 2013.

10. Castellano, José M., et al. "Oleanolic Acid: Extraction, Characterization and Biological Activity." *Nutrients*, vol. 14, no. 3, 31 Jan. 2022, p. 623.
11. Liu, Jie. "Pharmacology of Oleanolic Acid and Ursolic Acid." *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 49, no. 2, Dec. 1995, pp. 57–68.
12. Hordyjewska, A.; Ostapiuk, A.; Horecka, A.; Kurzepa, J. Betulin and Betulinic Acid: Triterpenoids Derivatives with a Powerful Biological Potential. *Phytochem. Rev.* 2019, 18 (3), 929–951.
13. Fatin Jannus, et al. "Principal Bioactive Properties of Oleanolic Acid, Its Derivatives, and Analogues." *Molecules*, vol. 29, no. 14, 12 July 2024, pp. 3291–3291.
14. Prados, María E., et al. "Betulinic Acid Hydroxamate Is Neuroprotective and Induces Protein Phosphatase 2A-Dependent HIF-1 α Stabilization and Post-Transcriptional Dephosphorylation of Prolyl Hydrolase 2." *Neurotherapeutics*, vol. 18, no. 3, July 2021, pp. 1849–1861.
15. Siegel, David, et al. "Vorinostat in Solid and Hematologic Malignancies." *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 2, no. 1, 27 July 2009.

7. RINGRAZIAMENTI

E così siamo giusti alla fine, come tutte le più classiche conclusioni di tutte le tesi mai scritte e che mai si scriveranno negli annali.

Non voglio scrivere cose banali o scontate perché tanto lo farò lo stesso YEAH!!

Ringrazio innanzitutto i fantastici pranzi della nonna che mi hanno sempre dato energia per le sfide più toste e per i migliori abbiocchi della mia vita, anche se con litigi inclusi perché siamo entrambi delle teste calde. Ringrazio come dalle prassi più standard la mia famiglia compresa di padre e madre che mi hanno Sopportato (e forse anche Supportato) nel corso di questa peregrinazione dello studio matto et disperatissimo (...forse solo matto) e che nonostante le incomprensioni e i battibecchi non mi hanno mai fatto mancare niente e si sono sempre dimostrati un porto sicuro nonostante le sempre diverse situazioni.

Un saluto a mio fratello (bro) alla sua pazienza, ai grandi consigli e all'aver condiviso un botto di esperienze insieme; senza di lui sarei molto meno pazzo e molto meno simpatico di quel che sono, ti voglio bene!

Ringraziamento speciale a mia nonna di giù (Borgomanero....pensavate la Puglia eh) che purtroppo ci ha lasciato giusto lo scorso anno; volevi tanto essere presente e sostenermi a questa laurea tanto decantata, quindi questo traguardo è anche tuo.

CIAO NONNA!!!

Ringrazio tutti i cugini, i parenti, i conoscenti, relazioni e amici Tutti che senza le esperienze maturate con loro non sarei la persona che sono adesso....magari sarei potuto diventare una persona razionale o un musicista tipo Maneskin....più probabile la seconda...ma ehy, ci si accetta per quel che si è.

Un caro ringraziamento va al professor Minassi Alberto e a tutto il team pazzo e di gran cuore ce è il NoNaPCG, questi mesi con voi in laboratorio sono stati veramente unici,

Grazie di tutto davvero!!!

(Sì, fortunatamente non ho fatto Esplodere proprio tutto tutto).

E dato che non ho parlato abbastanza di me stesso, perché i pochi che leggeranno questa tesi potrebbero pensare che io sia un enorme egocentrico (spero la dedica non mi abbia tradito): grazie Carlo, perché, nonostante tutto, nonostante tutto quello che si è detto ed i mille e uno pensieri durante il cammino, se ci credi davvero, puoi raggiungere qualunque obiettivo, sono fiero di te.

CE L'HAI FATTA!!!

