



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche  
Dipartimento di Fisica e Chimica  
S.S.D. - CHIM06

## SINTESI DI ANALOGHI ETEROCICLICI DEL LINEZOLID DI INTERESSE BIOLOGICO

IL DOTTORE  
**Angela Accardo**

IL COORDINATORE  
**Prof. Paolo Lo Meo**

IL TUTOR  
**Prof. Andrea Pace**

IL CO-TUTOR  
**Dott. Antonio Palumbo Piccionello**

CICLO XXVI  
2013-2015

# INDICE

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	pag. 1
1.1	Gli antibiotici e la farmaco-resistenza	pag. 1
1.2	La scoperta degli ossazolidinoni come antibatterici	pag. 3
1.3	L'attività antibatterica in vitro e in vivo del Linezolid	pag. 8
1.4	Il meccanismo d'azione del Linezolid	pag. 10
1.5	Meccanismi di resistenza al Linezolid	pag. 12
1.6	Farmacocinetica del Linezolid	pag. 14
1.7	Sintesi su scala industriale del Linezolid	pag. 15
1.8	Sintesi di laboratorio del Linezolid	pag. 15
1.9	Sintesi enantioselettiva del Linezolid e potenziali strategie alternative	pag. 16
1.10	Derivati ossazolidinonici analoghi del Linezolid	pag. 19
1.11	Attività antibatterica degli analoghi del Linezolid	pag. 22
1.12	Saggi di vitalità cellulare di analoghi del Linezolid	pag. 23
1.13	Relazione struttura - attività di analoghi del Linezolid	pag. 25
1.14	Simulazione dell'interazione ligando-bersaglio di analoghi del Linezolid	pag. 27
1.15	Recenti sviluppi sul design di analoghi del Linezolid	pag. 29
<b>2</b>	<b>Scopo della tesi</b>	pag. 31
<b>3</b>	<b>Risultati e discussione</b>	pag. 32
3.1	Reazione nitroaldolica di Henry per ottenere Linezolid e derivati	pag. 32
3.2	Derivati ossadiazolici del Linezolid	pag. 37
3.3	Sintesi asimmetrica di derivati ossadiazolici del Linezolid	pag. 42
3.4	Sintesi di composti ossadiazolici con attività antibatterica	pag. 45
<b>4</b>	<b>Appendice - Attività biologica</b>	pag. 46
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b>	pag. 53
<b>6</b>	<b>Parte sperimentale</b>	pag. 55
<b>7</b>	<b>Bibliografia</b>	pag. 78
<b>8</b>	<b>Produzione scientifica triennio 2013-2015</b>	pag. 84

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 Gli antibiotici e la farmaco-resistenza**

A seguito della scoperta da parte di Fleming (1929) dell'attività battericida di alcuni metaboliti del *Penicillium notatum* ha avuto inizio la cosiddetta “era antibiotica”, caratterizzata da importantissimi successi terapeutici. Negli anni novanta vi era un gran numero di antibiotici disponibili sul mercato che facevano fronte a molteplici malattie batteriche nell'uomo, che in passato erano state causa di mortalità. A questa “era” seguì lo sviluppo di batteri Gram-positivi (stafilococchi, streptococchi ed enterococchi) resistenti alle varie classi di antibiotici esistenti. Gli enterococchi, in particolare *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium* responsabili di molte infezioni del tratto intra-addominale ed urinario divennero resistenti alla Vancomicina; lo *Streptococcus pneumoniae*, principale agente eziologico delle infezioni delle vie aeree superiori ed inferiori del tratto respiratorio, sviluppò la resistenza agli antibiotici beta-lattamici, ai macrolidi e successivamente anche ai chinoloni [1].

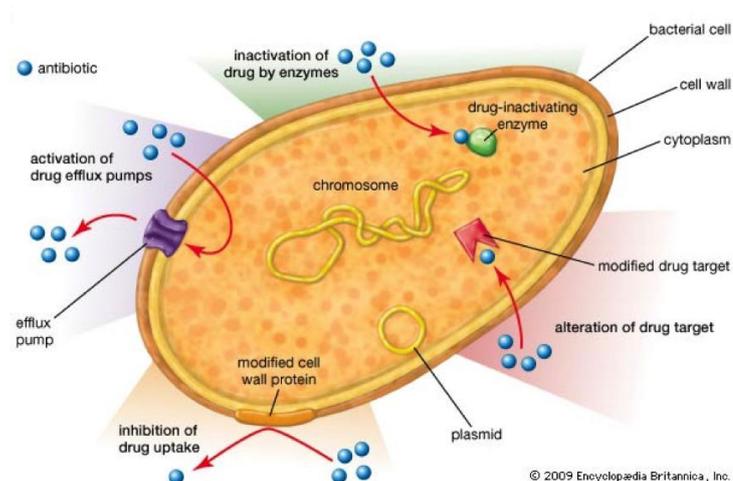
Nell'ultimo decennio c'è stato un allarme crescente nel mondo della medicina dato dall'incremento della resistenza agli antibiotici da parte di agenti patogeni [2,3]. Più di 13 milioni di decessi per anno sono stati imputati alle infezioni batteriche, quali le polmoniti e la tubercolosi. Durante gli anni '70 si riteneva che il problema delle infezioni fosse stato risolto, si possedeva infatti un'ampia gamma di antibiotici disponibili all'uso. Lo stesso Fleming aveva comunque previsto lo sviluppo di resistenze, processo che effettivamente si verificò giungendo ad una crisi degli antibiotici [4]. Il fenomeno della farmaco-resistenza si può manifestare attraverso diversi meccanismi di cui i principali sono:

- Ridotta affinità per il bersaglio (il gene che produce il bersaglio dell'antibiotico subisce una mutazione tale per cui il bersaglio continua a svolgere la sua regolare funzione, anche se con un'azione drasticamente ridotta, ma non interagisce più con l'antibiotico): è un esempio di resistenza cromosomica. Questo tipo di meccanismo è sviluppato, ad esempio, da batteri resistenti ai fluorochinoloni, una classe di antibatterici che inibiscono la DNA-girasi [5].

- Iperproduzione del bersaglio (il gene che produce il bersaglio dell'antibiotico subisce una mutazione tale per cui viene sovra-espresso): è un esempio di resistenza cromosomica.
- Inattivazione del farmaco attraverso reazioni enzimatiche (acetilazione, fosforilazione, ecc.), che determinano una variazione della carica netta sull'antibiotico ed influenzano irreversibilmente la sua affinità verso il sito di legame con il target biologico, come nel caso dei farmaci aminoglicosidici [6].
- Alterazione dei processi metabolici del batterio, come nel caso dei batteri sulfamidici-resistenti (es. alcuni batteri appartenenti alla classe degli *Escherichia coli*), che non necessitano dell'acido *p*-ammino benzoico per la sintesi dell'acido folico [7].
- Diminuita penetrazione dell'antibiotico nella cellula batterica, dovuta alla produzione di trasportatori di membrana che riconoscono ed estrudono l'antibiotico dalla cellula (alcuni batteri Gram-negativi sono capaci di pompare all'esterno del batterio complessi di tetraciclina-Mg sintetizzando una proteina specifica, dipendente da un antiporto con  $H^+$ ): è un esempio di resistenza extracromosomica [8].

---

Esempio di meccanismi di resistenza antibiotica:



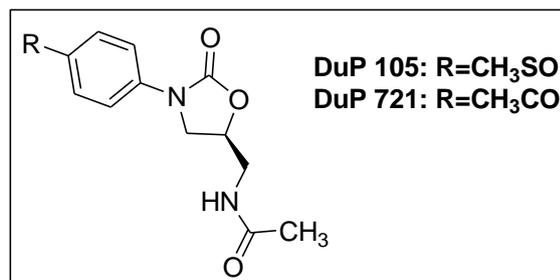
Il declino nello sviluppo di nuovi antibiotici ha esasperato questo quadro generale di per se grave. Quindi, è necessario individuare delle possibili soluzioni al problema della resistenza batterica. L'approccio più comune è quello di continuare a modificare le classi antibatteriche esistenti così che siano in grado di fornire un'attività maggiore grazie a nuovi attributi chimici. Risulta chiaro, dunque, rinnovare l'interesse nella progettazione di nuove sostanze con maggiore attività biologica e, quindi, introdurre nuovi composti farmacologicamente attivi. La scoperta del Linezolid, il primo farmaco antibatterico ossazolidinonico, rappresenta una nuova frontiera nel trattamento chemioterapico delle infezioni batteriche, soprattutto a fronte di un'evoluzione continua che gli agenti batterici subiscono per adattarsi e sopravvivere alle classi antibiotiche più usate.

## **1.2 La scoperta degli ossazolidinoni come antibatterici**

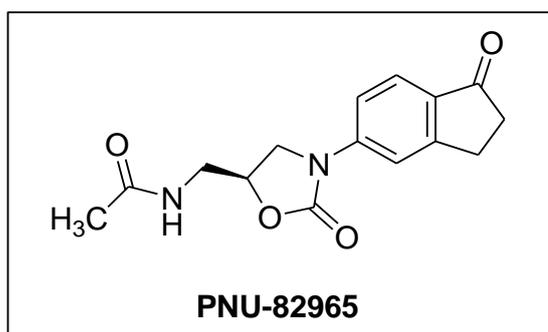
Il successo della ricerca e dello sviluppo di nuovi antibiotici da parte delle aziende farmaceutiche era diventato uno degli elementi essenziali e necessari per la multifarmaco resistenza prevista nella nostra società. A metà degli anni ottanta, il mercato non aveva ancora visto una nuova classe di antibiotici introdotta da oltre vent'anni. Durante questo periodo l'azienda farmaceutica Pharmacia aveva condotto una valutazione molto approfondita del mercato antibiotico e aveva constatato la necessità di una nuova classe di agenti antibatterici che si sarebbe prestata al trattamento empirico di *Staphylococcus* e di altri patogeni Gram-positivi. Nel 1987, a seguito di quest'analisi, si è assistito alla presentazione del lavoro di alcuni scienziati della E.I. DuPont de Nemours&Company (DuPont) che ha indirizzato il loro lavoro cumulativo su una nuova classe di agenti antibatterici, gli ossazolidinoni [9]. Gli ossazolidinoni interessavano perchè possedevano tutte le caratteristiche che sembravano importanti in un farmaco antibatterico in quel momento. Il loro spettro di attività riguardava importanti patogeni Gram-positivi, in particolare quelli che erano la causa di tanti problemi per lo sviluppo di resistenze. Agivano anche su *Streptococcus pneumoniae* che si credeva essere un problema significativo nella terapia delle loro infezioni. Gli ossazolidinoni possedevano un unico meccanismo d'azione, coerentemente con l'osservazione, non presentavano resistenza crociata con altri meccanismi di resistenza dei batteri [9-10]. Gli ossazolidinoni si presentavano attivi per via orale, requisito fondamentale per i nuovi agenti antibatterici per l'assistenza primaria nelle comunità, un vantaggio per l'ospedalizzato in cui la terapia

endovenosa poteva essere esclusa a favore di quella orale in ospedale o in casa. Era risultato difficile selezionare mutanti resistenti in laboratorio, tuttavia, gli studi sull'attività antibatterica sperimentale e studi farmacocinetici prevedevano che gli ossazolidinoni avrebbero funzionato sufficientemente nell'uomo per essere immessi nel mercato [11-12]. Nel 1987 all'Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) la Società DuPont ha riferito formalmente la struttura e i profili antibatterici di attività di due nuovi agenti antibatterici, Dup 105 e DUP 721 [12].

Questi candidati clinici sono stati i primi rappresentanti significativi di una nuova classe di composti con attività antimicrobica, gli ossazolidinoni. Gli studi condotti su questi due prototipi hanno

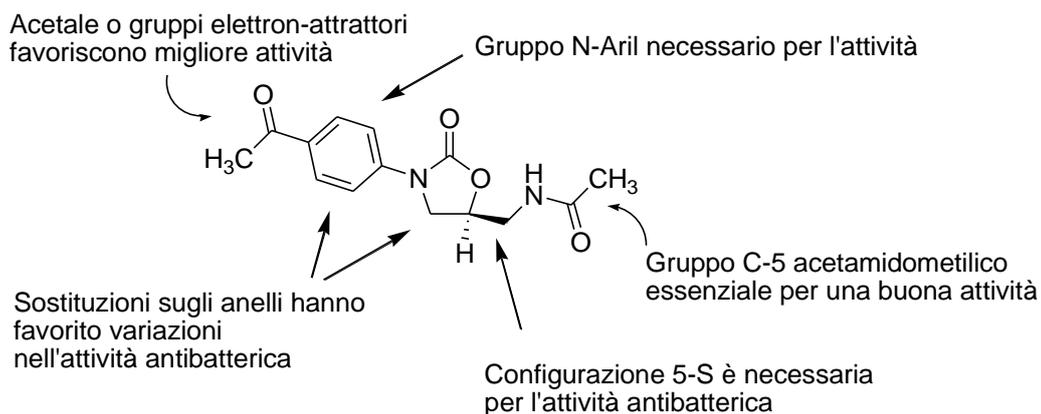


mostrato una modesta attività in vivo e in vitro nei confronti dei Gram-positivi e in parte negativi riconducibile alla configurazione del C5. Un analogo ossazolidinonico, il composto PNU-82965 infine assunse un ruolo fondamentale per il programma



dell'azienda Pharmacia. L'azienda condusse una valutazione di confronto fra il prototipo Dup 721 e il composto PNU-82965 da questi studi emerse l'elevata tossicità di Dup 721 rispetto a PNU-82965 che invece presentava un'eccellente profilo di sicurezza

durante i test di tossicità. Questi primi prototipi inoltre furono testati nella loro miscela racemica in maniera tale da velocizzarne la preparazione. Solo l'enantiomero S risultava avere attività antibatterica [13], la miscela racemica presenta generalmente metà della potenza dell'enantiomero puro. Tuttavia, questi analoghi racemi sono stati ritenuti sufficienti per sondare relazioni struttura-attività in questa fase iniziale di studio. Gli studi struttura-attività della DuPont fecero emergere come l'introduzione o la presenza di specifici gruppi funzionali migliorasse il profilo del farmaco.



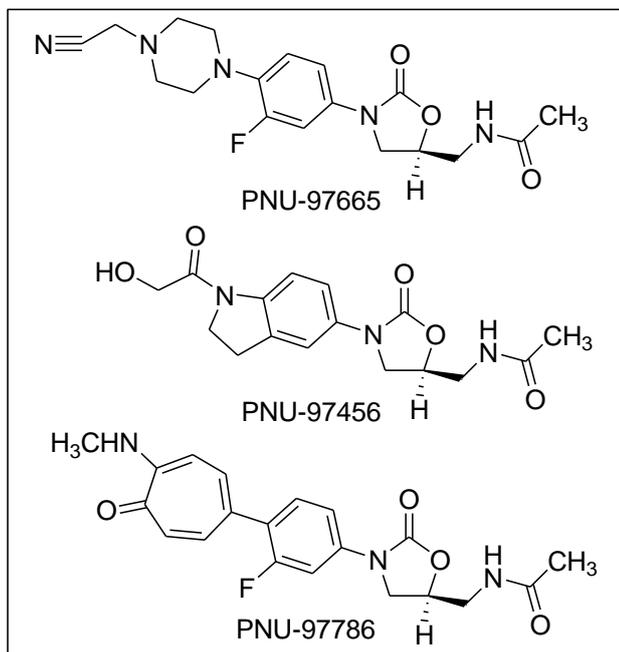
Nel 1992 l'impegno profuso nelle sintesi degli ossazolidinoni portò a tre diverse sottoclassi di analoghi composti:

- 1) piperazinilfenilossazolidinoni (per esempio, PNU-97665) [14],
- 2) indolinilossazolidinoni (per esempio, PNU-97456) [15],
- 3) i troponilfenilossazolidinoni (per esempio, PNU-97786) [16].

Gli indolinilossazolidinoni presentarono un profilo di sicurezza maggiore ma

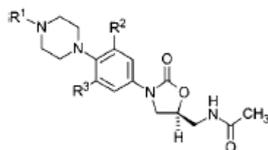
mostrano un'attività antibatterica leggermente inferiore agli altri composti. Gli analoghi troponil erano generalmente composti più interessanti con un'attività antibatterica degna di nota ma scarsa solubilità in acqua e scarse caratteristiche farmacocinetiche.

I derivati della piperazina invece mostravano un'eccellente attività in vitro e in vivo pur mantenendo un profilo di sicurezza



accettabile, buona solubilità in acqua e ottimi parametri farmacocinetiche. Inoltre gli analoghi piperazinic erano sintetizzati più facilmente. Come conseguenza di questi e delle altre caratteristiche, la serie delle piperazine divenne il principale oggetto di studio e ricerca. Questa serie mostrava interessanti valori di MIC (minima concentrazione inibente) in vitro e in vivo.

Potenziati effetti sulla fluorurazione dell'anello fenilico

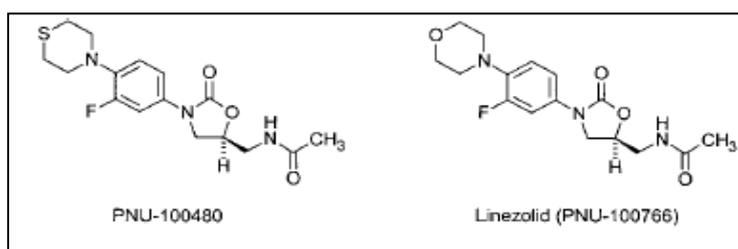


PNU	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	SA	MIC [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]			ED <sub>50</sub> [mg kg <sup>-1</sup> ]
					EF	SP		
107399	CO <sub>2</sub> Me	H	H	4	4	2	n.t.	
98257	CO <sub>2</sub> Me	H	F	4	2	1	3.7 (1.6)	
98170	CO <sub>2</sub> Me	F	F	2	2	0.5	2.5 (1.3)	
108946	COCH <sub>2</sub> OH	H	H	4	2	1	n.t.	
100592	COCH <sub>2</sub> OH	H	F	4	1	< 0.5	3.3 (5.0)	
100675	COCH <sub>2</sub> OH	F	F	2	1	0.25	1.6 (1.8)	
143145	COCH <sub>2</sub> OH	H	OMe	> 16	> 16	> 16	n.t.	
97665	CH <sub>2</sub> CN	H	F	8	4	1	4.0 (2.2)	
98172	CH <sub>2</sub> CN	F	F	4	2	1	2.8 (2.7)	
99200	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	H	F	16	16	2	7.9 (1.7)	
99372	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	F	F	8	4	1	7.7 (2.0)	
100762	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> F	H	F	16	8	2	8.6 (5.0)	
100349	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> F	F	F	4	2	1	5.0 (2.8)	

AS= *Staphylococcus aureus*, EF= *Enterococcus faecalis*, SP= *Streptococcus pneumoniae*

Di particolare rilievo è stata la constatazione gratificante che uno o due atomi di fluoro affiancando il gruppo piperazina in para esercitavano un significativo effetto potenziante sull'attività antibatterica [16]. Dopo diverse modifiche nelle sintesi si è constatato che il gruppo idrossiacetile era il sostituente ottimale. In definitiva, il congenere monofluorofenil PNU-100592, che è stato successivamente nominato Eperezolid, emerse come l'analogo con il miglior equilibrio tra attività antibatterica, farmacocinetica, solubilità in acqua e altre proprietà pertinenti [15]. Altri studi portarono all'individuazione della tiomorfolina derivato PNU-100480 [17] e anche l'analogo morfolinico

PNU-100766, che in seguito divenne noto come Linezolid [18]. I successivi sforzi

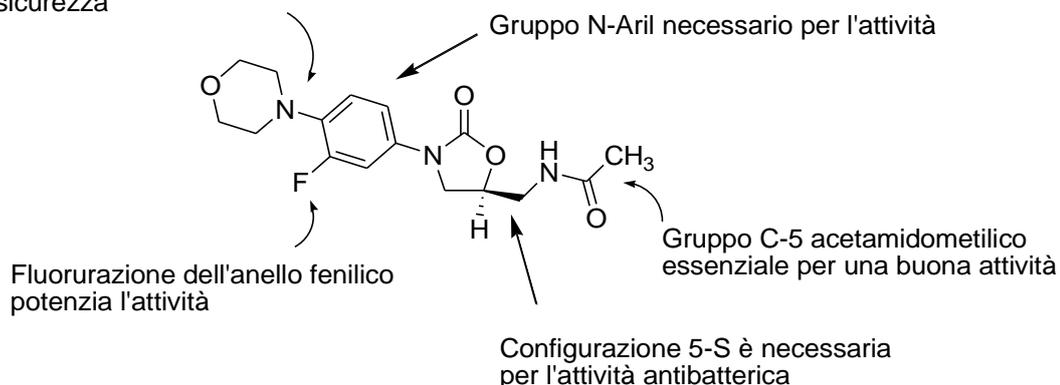


dell'azienda Pharmacia portarono a una scoperta importante, come un idoneo sostituente ammino elettron-donatore sull'anello fenilico conferiva una eccellente attività antibatterica conservando un buon profilo di sicurezza.

Un altro importante risultato di questa indagine era l'identificazione dell'effetto potenziante di uno o due atomi di fluoro che fiancheggiano la morfolina o l'anello della piperazina.

---

Sostituente ammino elettron-donatore conferisce eccellente attività antibatterica e un buon profilo di sicurezza



---

I primi ossazolidinoni a emergere come potenziali farmaci candidati furono Eperezolid (PNU-100592) e Linezolid (PNU-100766). I loro valori di MIC, il loro spettro antibatterico, i loro valori di ED<sub>50</sub> e il loro comportamento farmacocinetico in almeno due specie animali erano praticamente identici. Attraverso una fase clinica I di sperimentazione umana si dimostrò come il Linezolid avrebbe probabilmente bisogno di essere somministrato due volte al giorno nell'uomo ed Eperezolid tre volte al giorno per fornire lo stesso effetto. Ciò pose le basi per uno studio indirizzato verso il Linezolid a scopo di ulteriore sviluppo.

Nel mese di Aprile dell'anno 2000 negli Stati Uniti fu approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) e immesso in commercio con il nome di ZYVOX<sup>®</sup>, è uno dei pochi farmaci sintetizzati *ex novo* ad essere stato scoperto negli ultimi 40 anni [9, 19]. Ha mostrato un'elevata attività citotossica verso batteri di tipo Gram-positivi quali, per esempio:

- *Enterococcus vancomicino-resistente (VRE)*
- *Staphylococcus aureus meticillino-resistenti (MRSA)*
- *Streptococcus pneumoniae penicillino-resistente (PRSP)*.

La possibilità di poterlo assumere oralmente e l'alta efficacia di penetrazione a concentrazioni terapeutiche in tutti gli organi del corpo lo rendono unico nel suo genere. Per questo motivo è risultato essere molto efficace per curare organismi colpiti da gravi infezioni batteriche [1]. Tuttavia, sono stati già riportati casi di resistenza al Linezolid [20] e per questo motivo alcune ricerche sono volte alla scoperta di nuovi suoi analoghi [21]. L'azione citotossica del Linezolid consiste nell'inibire la sintesi proteica negli organismi batterici a livello ribosomiale [22]. Gli

studi di relazione struttura-attività e la possibilità di modificare il Linezolid in varie porzioni della sua struttura hanno portato alla sintesi di numerosi analoghi [1, 23].

### **1.3 L'attività antibatterica in vitro e in vivo del Linezolid**

In vitro, l'attività del Linezolid nei confronti dei ceppi di *Staphylococcus Aureus* sensibili e resistenti alla Meticillina presentava valori di MIC<sub>90</sub> che variavano tra 2 e 4 µg/mL [24] mentre quelli della Vancomicina variavano tra 1 e 2 µg/mL, un'efficacia quasi paragonabile, considerando la Vancomicina come gold standard, era un ottimo risultato [25-26]. I valori di MIC<sub>90</sub> per i ceppi di *Staphylococcus epidermidis* erano di 2 µg/mL sia per il Linezolid sia per la Vancomicina. Il Linezolid mostrava inoltre una buona attività contro i ceppi di enterococchi. I valori di MIC<sub>90</sub> per *Enterococcus faecalis* e *faecium* sono di 4 µg/mL o meno. Ciò che però rappresentava un risultato importante era l'attività contro i ceppi di *Streptococcus pneumoniae* e *pyogenes* per la loro resistenza alla penicillina. Questo batterio era responsabile di gravi infezioni delle vie respiratorie per le quali si svilupparono resistenze prima per la penicillina poi per i macrolidi ed infine per i chinoloni. Il Linezolid si prestava ad essere un antibiotico completo per il suo ampio spettro d'azione. Lo spettro del Linezolid copre i più importanti patogeni Gram-positivi come stafilococchi, enterococchi e streptococchi. Questo spettro di attività indicava che il farmaco poteva fornire la copertura per importanti patologie mediche e divenire una gradita aggiunta all'armamentario antibiotico. Agiva inoltre contro i bacilli Gram-negativi con una debole attività contro *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, due fastidiosi Gram-negativi. Possedeva una modesta attività in vitro contro gli anaerobi *Bacteroides fragilis*, *Clostridium spp.* e *Peptostreptococcus spp.*, coerente con la Clindamicina [27]. La scarsa attività mostrata per i Gram-negativi escludeva l'uso del Linezolid nelle loro infezioni, tuttavia successivi studi mostrarono la capacità di questo antibiotico di inibire la sintesi proteica di ceppi di *Escherichia coli*.

(G. H. Yagi, G. E. Zurenko, Anaerobe 1997, 3, 301)

Organism	Antibacterial agent	MIC <sub>90</sub> [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
<i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin-susceptible)	linezolid	4
	vancomycin	1
<i>S. aureus</i> (methicillin-resistant)	linezolid	4
	vancomycin	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (methicillin-sensitive)	linezolid	2
	vancomycin	2
<i>S. epidermidis</i> (methicillin-resistant)	linezolid	2
	vancomycin	2
<i>Enterococcus faecalis</i> (methicillin-sensitive)	linezolid	4
	vancomycin	2
<i>E. faecalis</i> (VanB)	linezolid	4
	vancomycin	>16
<i>Enterococcus faecium</i>	linezolid	2
	vancomycin	$\leq 0.5$
<i>E. faecium</i> (VanA)	linezolid	4
	vancomycin	>16
<i>E. faecium</i> (VanB)	linezolid	4
	vancomycin	>16
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	linezolid	1
	vancomycin	$\leq 0.25$
<i>S. pneumoniae</i> (penicillin-sensitive or -resistant)	linezolid	1
	vancomycin	$\leq 0.25$
<i>Streptococcus pyogenes</i>	linezolid	2
	vancomycin	0.5
<i>Haemophilus influenzae</i>	linezolid	8
	vancomycin	>16
<i>Moraxella catarrhalis</i>	linezolid	4
	vancomycin	>16
Gram-negative bacilli	linezolid	>64
	vancomycin	>16
<i>Bacteroides fragilis</i>	linezolid	$\geq 16$
	vancomycin	>16
<i>Clostridium</i> spp.	linezolid	2
	clindamycin	4
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	linezolid	2
	clindamycin	2

In vivo, l'attività del Linezolid era rappresentata dal valore ED<sub>50</sub> (quantità di farmaco espressa in mg/kg di peso corporeo necessaria per curare il 50% degli animali infetti) e presentava valori confortanti.

(G. H. Yagi, G. E. Zurenko, Anaerobe 1997, 3, 301)

Bacterium	Compound <sup>[a]</sup>	MIC [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	ED <sub>50</sub> [ $\text{mg kg}^{-1}$ ] <sup>[l]</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> UC9271	linezolid	9.0	6.9
	vancomycin	1.0	13.2
<i>S. aureus</i> UC 6685 <sup>[k]</sup>	linezolid	2.0	3.8
	vancomycin	2.0	2.6
<i>S. aureus</i> UC15080 <sup>[k]</sup>	linezolid	0.5	3.8
	vancomycin	1.0	1.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> UC12084 <sup>[k]</sup>	linezolid	1.0	4.7
	vancomycin	2.0	1.8
<i>Staphylococcus pneumoniae</i> UC15088 <sup>[k]</sup>	linezolid	1.0	2.7
	cefaclor	> 32.0	> 20.0
<i>Staphylococcus pyogenes</i> UC152	Linezolid	2.0	5.0
	clindamycin	0.6	8.6
<i>Enterococcus faecalis</i> UC12379 <sup>[k]</sup>	linezolid	4.0	10.0
	vancomycin	1.0	0.5
<i>Enterococcus faecium</i> UC15090 <sup>[k]</sup>	linezolid	4.0	24.0
	vancomycin	> 69.0	> 100.0
<i>S. aureus</i> UC9271 <sup>[l]</sup>	linezolid	4.0	39.7
	vancomycin	1.0	4.7
<i>E. faecalis</i> UC15060 <sup>[l]</sup>	linezolid	4.0	11.0
	vancomycin	2.0	16.3
<i>Bacteroides fragilis</i> UC12199 <sup>[l]</sup>	linezolid	4.0	46.3
	clindamycin	1.0	200.0

#### 1.4 Il meccanismo d'azione del Linezolid

L'attività antibatterica svolta da questo farmaco lo rende unico nel suo meccanismo d'azione e rende possibile la sua notevole efficacia anche contro infezioni batteriche per le quali infatti sono emerse resistenze verso i più comuni meccanismi d'azione degli altri antibiotici quali cloramfenicolo e lincomicina [28].

Il target biologico degli ossazolidinoni è la sintesi proteica. Questa nuova classe di composti agisce con un meccanismo d'azione del tutto nuovo, basato sull'inibizione in una fase precoce della sintesi proteica ribosomiale del batterio, senza influenzare direttamente la sintesi degli acidi nucleici [29].

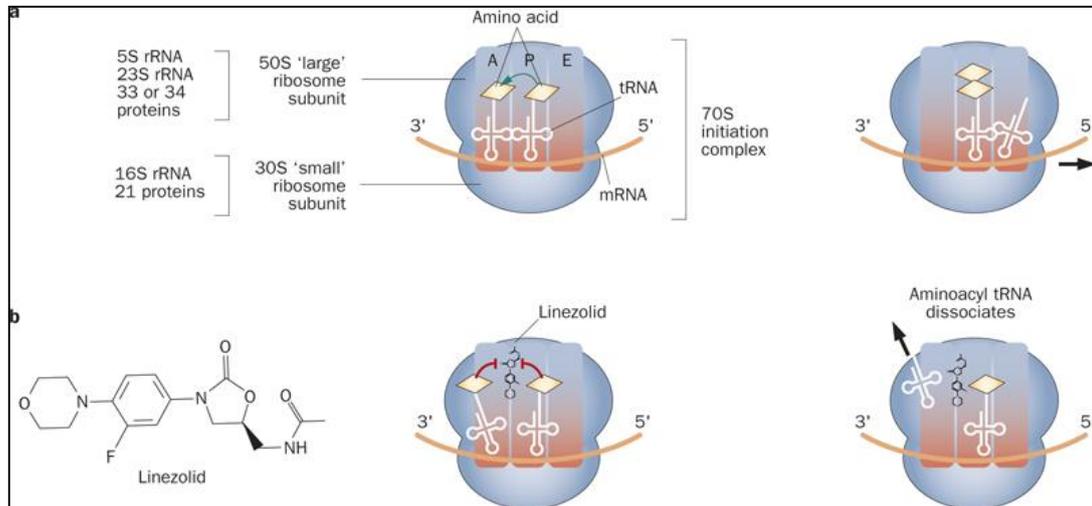
I ribosomi sono organuli intracellulari immersi nel citoplasma o ancorati al reticolo endoplasmatico rugoso e sono le particelle responsabili della sintesi proteica. La loro funzione è quindi quella di sintetizzare le proteine, leggendo le informazioni ottenute dalla catena di RNA messaggero (mRNA). I ribosomi batterici sono formati da tre molecole di RNA e da proteine che si assemblano a formare due subunità:

- Una più grande di 50S avente almeno 34 proteine e due molecole di rRNA (ribosomiale),

- Una più piccola di 30S contenente almeno 21 proteine ed una molecola di rRNA.

Lactic Acidosis Induced by Linezolid: a Case Study: Diagnosis

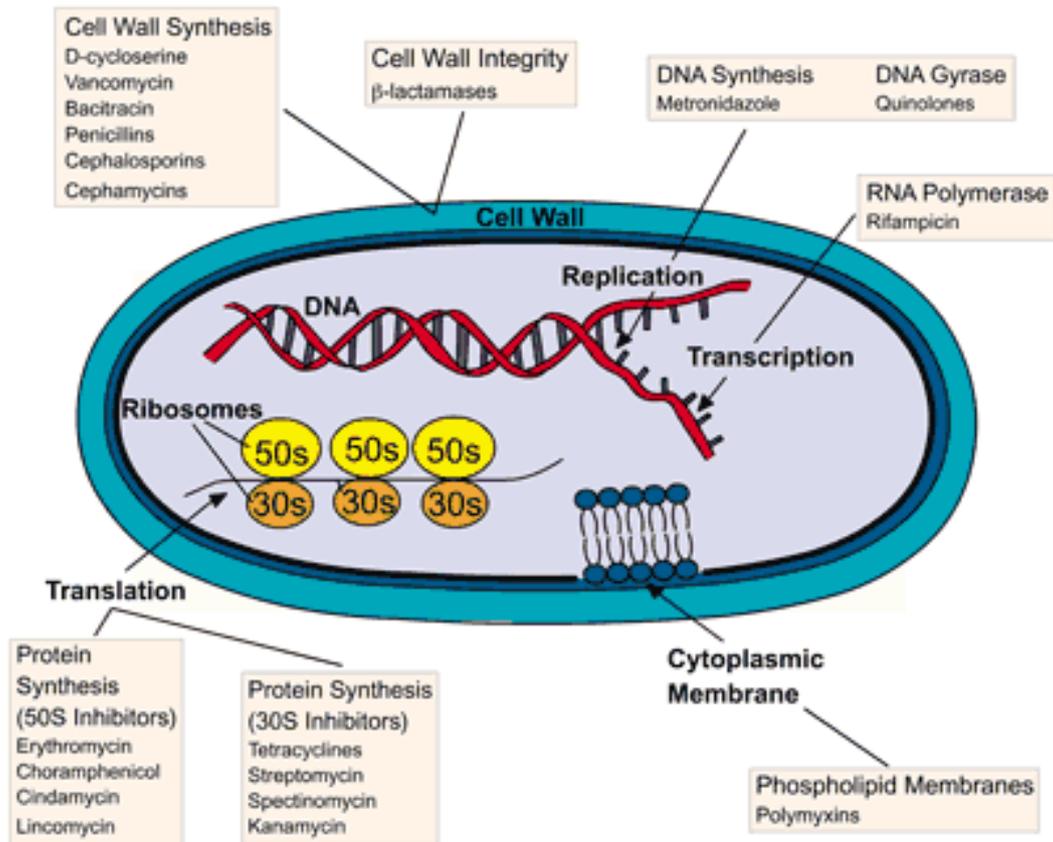
Juan Carlos Q. Velez, MD; Michael G. Janech, PhD



Gli ossazolidinoni inibiscono la formazione del complesso d'inizio, il Linezolid si lega al Peptidil Transferase Center (PTC) della subunità 50S ribosomiale (rRNA 23S), quasi all'interfaccia con la subunità 30S, attraverso un meccanismo dose dipendente, interrompendo l'elongazione della catena peptidica [29], impedendo la formazione di tRNA<sup>fMet</sup>-mRNA-70S, la subunità complesso d'inizio ternario [30], ciò spiega la sua selettività d'azione verso i Gram-positivi.

Recenti studi hanno dimostrato che Eperezolid e Linezolid non inibiscono l'allungamento o reazioni di terminazione di traduzione [29]. Il blocco della sintesi proteica in una fase così precoce porta a prevenire la sintesi di vari fattori di virulenza, come coagulasi, emolisine di stafilococchi e streptococchi e a non essere suscettibile di resistenza crociata con altri antibatterici.

Gli ossazolidinoni non competono con cloramfenicolo e lincomicina per il legame con la subunità 50S [31], agiscono sulla sintesi proteica ma in una fase più tardiva, impedendo l'allungamento della catena peptidica.



Studi effettuati su un estratto cell-free di *Escherichia coli* (bacillo Gram-negativo) hanno mostrato come i batteri Gram-negativi sono generalmente resistenti a questa nuova classe di antibiotici ossazolidinonici: i loro ribosomi si legano al Linezolid ma la molecola viene riconosciuta ed espulsa dalla cellula tramite pompe di efflusso endogene. Successivamente è stato dimostrato che rendono non funzionante la pompa transmembrana AcrAB dell'*Escherichia coli*, attraverso una mutagenesi diretta, le cellule di *Escherichia coli* diventano sensibili al Linezolid sia in vitro che in vivo. La mancanza di attività da parte degli ossazolidinoni per i Gram-negativi è dovuta quindi alla presenza di pompe transmembrana che espellono il farmaco fuori dalla cellula prima che esso agisca [32].

## 1.5 Meccanismi di resistenza al Linezolid

Meccanismi di resistenza a questo farmaco coinvolgono piccole alterazioni al sito di legame del Linezolid. Strutture ad alta risoluzione mostrano come il Linezolid si legni alla subunità 50S ribosomiale in una profonda fenditura che è circondata da

nucleotidi del 23S rRNA. Una mutazione del 23S rRNA rappresenta un meccanismo di resistenza al Linezolid. Sebbene le proteine ribosomali L3 e L4 siano situate lontano dal sito di legame del farmaco, mutazioni in regioni specifiche di queste proteine sono sempre associate alla resistenza al Linezolid. Inoltre, recenti scoperte sulla metiltransferasi Cfr sottolineano la modifica del 23S rRNA come una forma altamente efficace e trasferibile di resistenza al Linezolid. La conoscenza dettagliata del sito di legame del Linezolid ha facilitato la progettazione di una nuova generazione di ossazolidinoni che mostrano migliori proprietà contro i meccanismi di resistenza conosciuti [33].

La tasca di legame del Linezolid è allineata con i nucleotidi G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506, U2585 che interagiscono direttamente con Linezolid [34]. Ceppi selezionati per la resistenza al Linezolid hanno mutazioni in 23S rRNA ai nucleotidi G2061, C2452, A2503, U2504, e G2505, ma anche a nucleotidi che si trovano più distanziati, come A2062, G2447, A2451, C2499, U2500, e G2576 [35-43]. I siti di mutazione differiscono tra *Halobacterium halobium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pneumoniae*.

La mutazione più frequentemente riportata è G2576U. Questa mutazione è stata osservata in stafilococchi ed enterococchi [44-54]. La maggior parte delle relazioni della mutazione G2576U in isolati casi clinici sono associati con una qualche forma di aumento o prolungato trattamento di Linezolid o con utilizzo elevato di Linezolid [55, 56], sottolineando l'importanza di un uso giudizioso di Linezolid in ambito clinico.

Un altro tipo di resistenza determinante, che recentemente, ha ricevuto attenzione riguarda le mutazioni nella proteina ribosomiale L3. La parte principale della proteina ribosomiale L3 è posizionata sulla superficie della subunità 50S. Le mutazioni batteriche L3 sono state associate a resistenza a Linezolid, tiamulina/valnemulina, e anisomicina. La prima mutazione L3 in batteri è stata rilevata in *E.coli* per selezione con tiamulina, e il suo ruolo nella resistenza è stato verificato tramite prove genetiche. Molti studi hanno dato mutazioni associate a resistenza L3 al Linezolid in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, e *Staphylococcus epidermidis*.

## 1.6 Farmacocinetica del Linezolid

Il Linezolid, grazie alle sue proprietà farmacocinetiche, penetra non solo i tessuti in misura sufficiente a fornire adeguate concentrazioni di farmaco per uccidere i batteri, ma per di più lo fa tramite somministrazione orale. La dose prevista nelle somministrazioni è di 600 mg due volte al giorno [57].

La biodisponibilità è del 100% e la concentrazione massima plasmatica si registra dopo due ore dalla somministrazione orale. L'obiettivo degli ossazolidinoni è di avere per via orale la stessa attività della Vancomicina somministrata per via sottocutanea. La biodisponibilità del Linezolid è, infatti, ottima sia per via parenterale sia per via orale, per cui dalla somministrazione endovena si può passare alla formulazione orale, senza necessità di cambiare dosi [1].

Studi di farmacocinetica hanno dimostrato che il Linezolid si lega alle proteine plasmatiche per circa il 30%; arriva prontamente a tutti i tessuti ben irrorati e nel liquido cefalorachidiano [58]. Viene metabolizzato nel fegato attraverso l'ossidazione dell'anello morfolinico con la produzione di due metaboliti inattivi; il 30% viene escreto nelle urine in forma inalterata, mentre non vi è traccia nelle feci; i metaboliti non hanno una tossicità significativa e il farmaco quindi può essere somministrato anche in caso di insufficienza renale [59].

PARAMETRI	VALORI
<b>Biodisponibilità per bocca</b>	100%
<b>Effetto dei cibi</b>	Leggera diminuzione
<b>Volume di distribuzione (L)</b>	40-50
<b>Legame con le proteine</b>	31%
<b>Concentrazione massima (mg/mL)</b>	12,7*/21,2**
<b>Concentrazione minima (mg/mL)</b>	6,2
<b>Emivita in ore</b>	5,4/4,8***

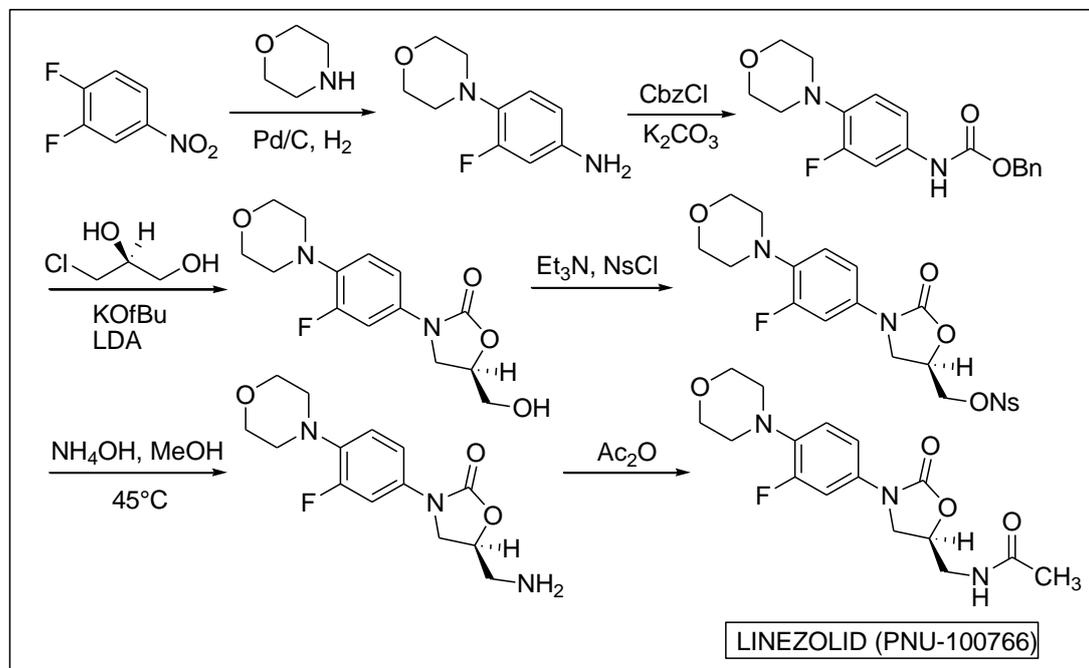
\*Dopo una dose di 600mg per bocca

\*\*Dopo una dose di 600mg ogni 12 ore per bocca

\*\*\* Per bocca o per via endovenosa

## 1.7 Sintesi su scala industriale del Linezolid

E' stata progettata una sintesi su larga scala che offre buone rese e può essere considerata abbastanza efficiente nelle produzioni industriali [60].

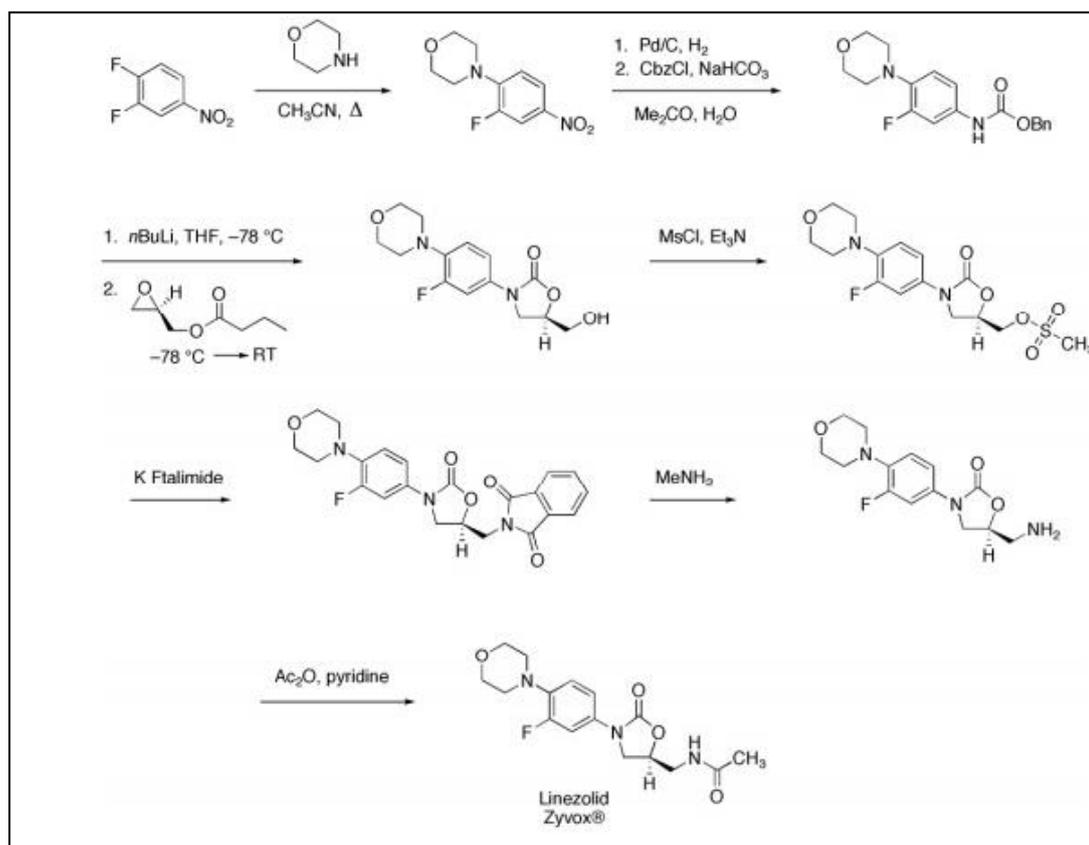


La sintesi prevede un primo passaggio nel quale si opera una sostituzione nucleofila e riduzione con idrogeno molecolare sfruttando un catalizzatore di reazione come il Palladio sulla porzione amminica, la reazione prosegue proteggendo il gruppo ammino mediante carbobenzilossicloruro (CBZ) e l'utilizzo di una base come il carbonato di potassio, in questo modo formiamo un gruppo carbammato. Il passaggio seguente comporta l'uso di un reagente quale S-3-cloro-1,2-propandiolo, formando un nucleo ossazolidinico chirale, successiva trasformazione del gruppo ossidrilico in gruppo amminico e infine acetilazione.

## 1.8 Sintesi di laboratorio del Linezolid

La sintesi del Linezolid comporta diversi metodi con i quali arrivare al composto ossazolidinico, in realtà quello più impiegato e che offre una buona resa è la reazione di Manninen. Partendo da composti carbammato arilici si opera una deprotonazione mediante l'impiego di una base (n-BuLi) in condizioni di temperatura di -78°C, questo porta alla formazione di composti N-litio-N-aril carbammato, successiva alchilazione mediante R-(-)-glicidil butirrato che porta alla formazione dell'anello

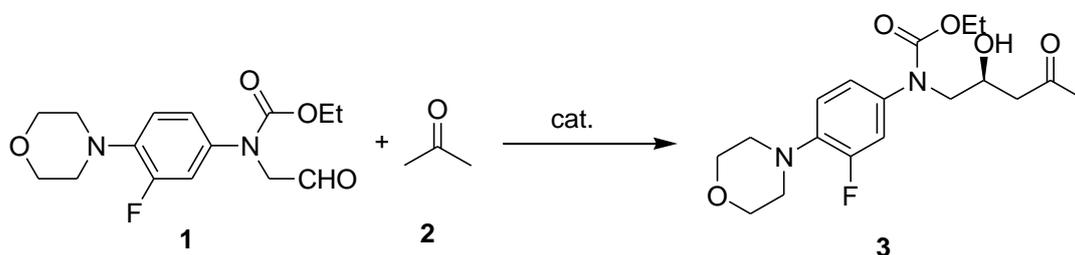
ossazolidinico con il prodotto (R)-3-aryl-5-(idrossimetil)-2-ossazolidinone. Tali intermedi sono poi trattati per ottenere il prodotto finale.



## 1.9 Sintesi enantioselettiva del Linezolid e potenziali strategie alternative

È stato sviluppato un approccio catalitico enantioselettivo come risultato di una mancanza di un metodo catalitico efficace per la costruzione dell'anello ossazolidinico chirale. Negli ultimi dieci anni, l'organocatalisi ha ricevuto una notevole attenzione sfruttando una reazione organo catalitica aldolica enantioselettiva e la reazione di Beckman come passi fondamentali per la preparazione del Linezolid. Sulla base di questo piano sintetico, viene sintetizzata l'aldeide **1** e fatta reagire con acetone. Gli organocatalizzatori comunemente usati come (R)-prolina **a** e (R)-pirrolidinil-tetrazolo **b** mostrano risultati deludenti in termini di rese di reazione e enantioselettività. I tempi di reazione lunghi e le basse rese rendono impossibile migliorare ulteriormente l'enantioselettività abbassando la temperatura di reazione. Il catalizzatore chirale **c** ha dato i migliori risultati. In questo caso, sono stati ottenuti una buona resa (67%) e alto e.e. (88%) a -35 °C. Appare

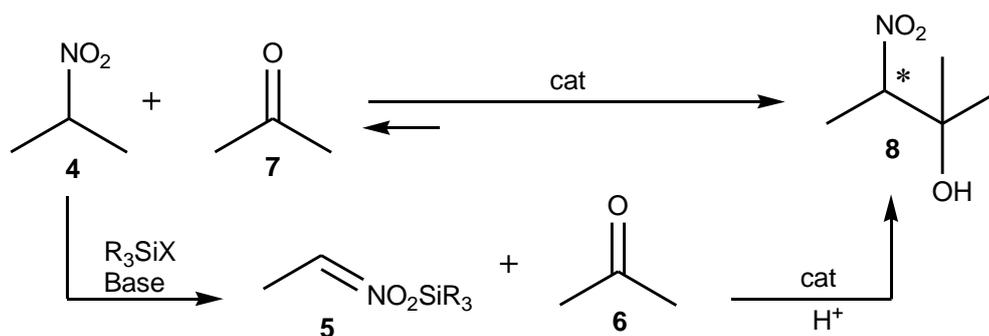
chiaro che questa procedura sia molto interessante, tranne che per la bassa resa (fino a 40 % con 72% e.e.), salvo reazioni eseguite a bassa temperatura (-35 °C) [61].



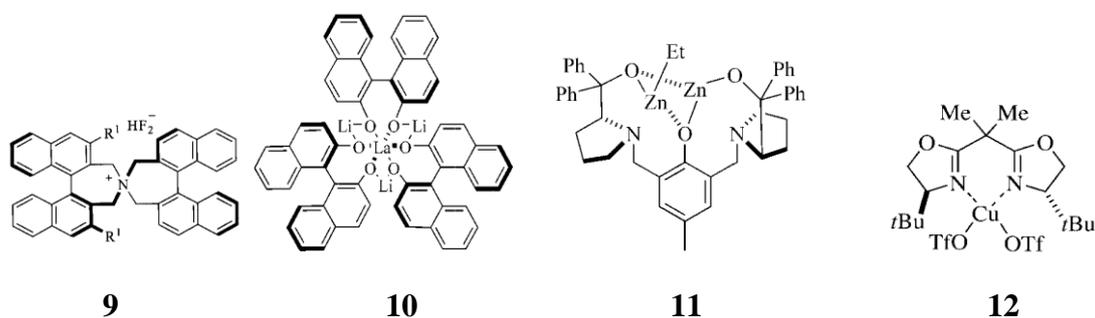
Catalizzatori:

Solvente	Cat.	T(h)	Resa%	ee
DMF	a	70	17	58
acetone	a	70	30	67
DMF	b	72	20	56
acetone	b	48	40	72
acetone	c	17	67	88

Una via alternativa alla sintesi asimmetrica del Linezolid potrebbe passare attraverso lo sfruttamento di reazioni nitroaldoliche asimmetriche. La reazione nitroaldolica, o di Henry, asimmetrica rappresenta una delle metodologie più utili per la formazione del legame C-C [62]. Grazie alla versatilità chimica del nitro gruppo [68], i risultanti idrossinitroalcani di struttura generale **8**, soprattutto in forma otticamente attiva, sono intermedi utili per la sintesi di molecole polifunzionalizzate e composti biologicamente attivi [64]. Negli ultimi anni la versione asimmetrica di questa reazione ha suscitato un particolare interesse soprattutto per la possibilità di essere sfruttata nella sintesi stereoselettiva di precursori di famiglie di composti di interesse biologico e farmaceutico [63]. Uno dei metodi catalitici utilizzati prevede l'attivazione del nitroderivato **4** attraverso la formazione di un silil-nitronato **5** che reagirà in maniera irreversibile con il composto carbonilico **6** in presenza di un catalizzatore. Nella versione diretta, la reazione di Henry prevede un singolo passaggio in cui il nitroalcano **4** non modificato e il composto carbonilico **7** reagiscono in presenza di un catalizzatore bifunzionale che possiede sia un sito acido (che attiva il carbonile) che un sito basico (attivante il nitroalcano).

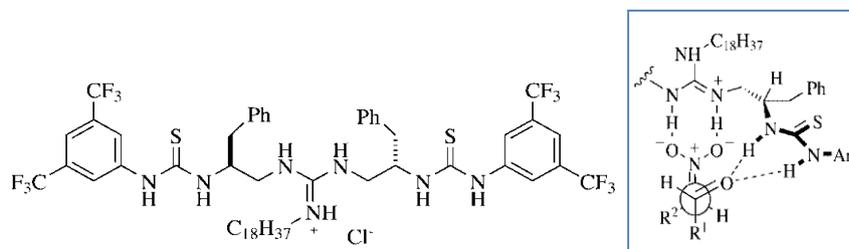


Recentemente, Maruoka e i suoi collaboratori [65] hanno dimostrato che un fluoruro di ammonio quaternario chirale **9** è un efficace promotore delle reazioni con aldeidi, fornendo preferenzialmente prodotti nitroaldolici anti con alte rese e valori di eccesso enantiomerico. Il primo catalizzatore progettato contenente Lantano come centro metallico era in grado di favorire reazioni nitroaldoliche sia a partire dal nitrometano che da altri nitroalcani generalmente con buone o ottime rese ed enantioselettività [67]. Successivamente il complesso è stato modificato per sostituzioni sul ligando BINOL **10** ottenendo un miglioramento della selettività delle reazioni [69].



Un considerevole sforzo è stato inoltre diretto verso lo sviluppo di nuovi catalizzatori per la reazione di Henry asimmetrica. In questo ambito, una classe di importanti catalizzatori sono risultati i complessi metallici dello zinco. Ad esempio, Trost [68] conducendo reazioni nitroaldoliche catalizzate da complessi metallici del tipo **11** è riuscito ad ottenere prodotti con alti livelli di enantioselettività con un ampio range di aldeidi alifatiche e aromatiche. Un altro efficace sistema metallico bifunzionale sono i catalizzatori bis-ossazolinici a base di rame **12** che sono stati impiegati con successo nelle reazioni nitroaldoliche ottenendo prodotti con buone rese ed alta enantioselettività [69]. Alternativamente all'utilizzo di catalizzatori metallici, nell'ultimo decennio la ricerca di piccole molecole organiche in grado di promuovere

cataliticamente trasformazioni chimiche in maniera stereoselettiva ha attirato considerevole attenzione [70]. Anche nel caso della reazione di Henry sono stati progettati organocatalizzatori, quali ad esempio il composto **13**, caratterizzato da una porzione guanidinica che attiva il nitroderivato e da una funzione tioureidica cge attiva il gruppo carbonilico attraverso legami a idrogeno [71].



**13**

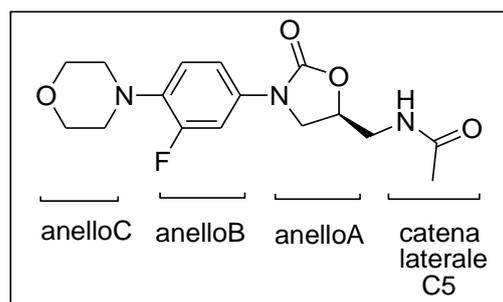
Per quanto riguarda le applicazioni sintetiche, sfruttando la reazione di Henry asimmetrica è stato possibile sintetizzare diversi composti chirali biologicamente attivi. A titolo di esempio, usando la reazione di Henry e come catalizzatore un complesso a base di rame è stato ottenuto un potente agente antitumorale quale l’Azamuricatacinana [72]. Tramite reazione nitroaldolica catalizzata dal La-BINOL è stato ottenuto in alte rese il frammento della catena laterale legata al C-13 del Tassolo, agente antitumorale di origine naturale [73].

### 1.10 Derivati ossazolidinonici analoghi del Linezolid

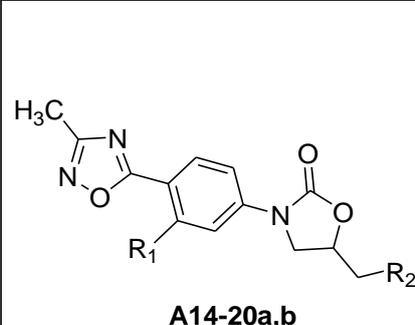
Il problema della resistenza agli antibiotici ha spinto molti ricercatori a modificare la struttura del Linezolid allo scopo di migliorarne l'attività antibatterica [23-74]. Per razionalizzare le modifiche a questo antibiotico, la struttura del Linezolid può formalmente essere divisa in quattro porzioni secondo la nomenclatura degli ossazolidinoni [23]:

- anello A, costituito dall’eterociclo centrale ossazolidinico
- anello B, costituito da una porzione N-aril legata all'azoto dell’anello A
- anello C, costituito da un gruppo carbo- o eterociclico -funzionale, non necessariamente aromatico
- catena laterale, costituita da qualsiasi gruppo funzionale legato all’anello C(5) o in una posizione isosterica rispetto ad un A- anello di tipo generale.

Diversi tipi di modifiche sono riportate in letteratura; il più comune riguarda l'anello C, mentre solo poche modifiche sono state segnalate per l'anello A, e in alcuni casi veniva mantenuta una buona attività [75-76]. La sostituzione dell'anello A con un anello 1,2,4-ossadiazolo ha provocato una mancanza di attività [77]. Pertanto, questi



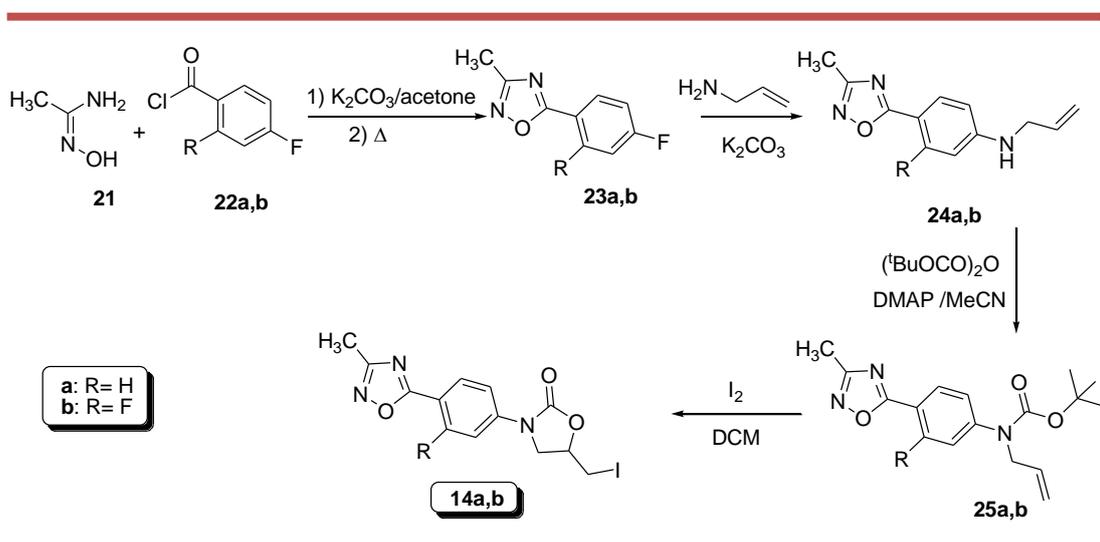
composti sono stati scelti come riferimento per testare l'attività del Linezolid mediante un approccio di screening virtuale. A causa della mancanza di bersagli farmacologici, in studi precedenti [78] si è sfruttato un sito virtuale del recettore (VRS) con un approccio Molecular Interaction Field (MIF) e l'uso di Grid Independent Descriptors (Grind) calcolati sulla base del programma Pentacle, che si basa sul presupposto che il processo di interazione ligando-recettore può essere rappresentato con l'aiuto del MIF. Lo stesso approccio, se applicato sinteticamente su derivati Linezolid-simile, indica che l'introduzione di una porzione 3-metil-1,2,4-ossadiazolo in sostituzione dell'anello C potrebbe essere una promettente modifica per l'attività antibiotica. Di seguito, si riporta la sintesi e l'attività antibatterica in vitro di nuovi derivati ossadiazolici del Linezolid come **14-20a,b**.

 <b>A14-20a,b</b>	Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
		<b>A14a</b>	H
	<b>A14b</b>	F	I
	<b>A15a</b>	H	N <sub>3</sub>
	<b>A15b</b>	F	N <sub>3</sub>
	<b>A16a</b>	H	NH(C=O)CH <sub>3</sub>
	<b>A16b</b>	F	NH(C=O)CH <sub>3</sub>
	<b>A17a</b>	H	NH(C=S)CH <sub>3</sub>
	<b>A17b</b>	F	NH(C=S)CH <sub>3</sub>
	<b>A18a</b>	H	pirazol-1-il
	<b>A18b</b>	F	pirazol-1-il
	<b>A19a</b>	H	imidazol-1-il
	<b>A19b</b>	F	imidazol-1-il
	<b>A20a</b>	H	1,2,4-triazol-1-il
	<b>A20b</b>	F	1,2,4-triazol-1-il

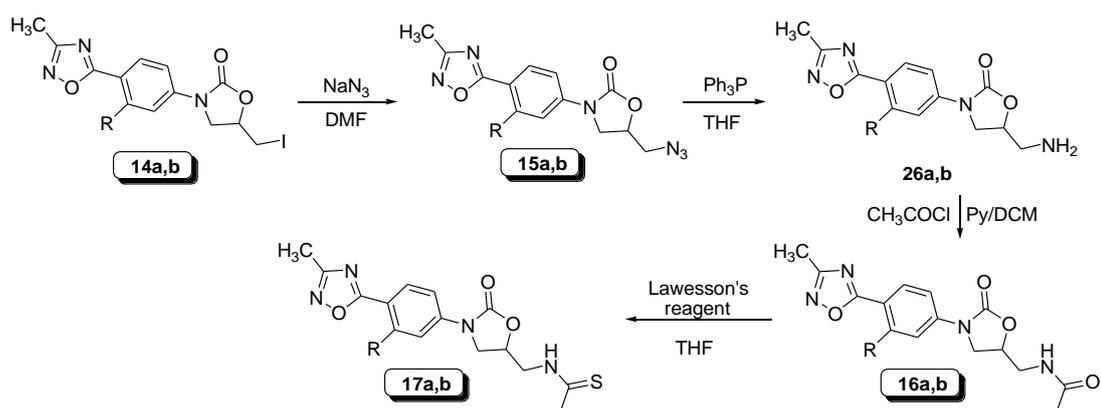
Da notare il cambiamento nell'attività biologica dovuta alla sostituzione dell'anello morfolina con 1,2,4-ossadiazolo nell'anello C, la presenza di un sostituito fluoro nell'anello B, e la varietà di sostituenti sulla catena laterale [75]. Inoltre, l'algoritmo sviluppato di recente chiamato Finger-prints for Ligands and Proteins (FLAP), può essere utilizzato per descrivere proteine e ligandi basati su un quadro di riferimento

comune [78] ed è stato utilizzato per confrontare l'attività del composto sintetizzato con quello del Linezolid sul sito di legame.

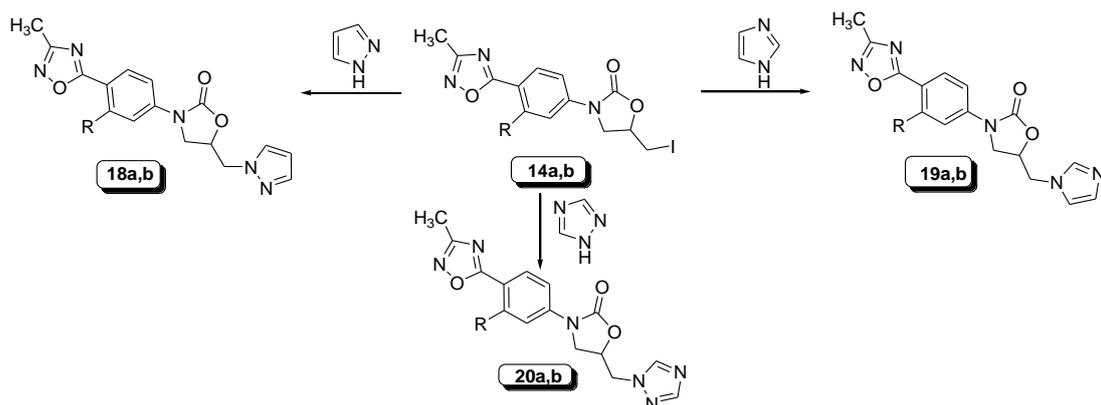
Per preparare i derivati ossadiazolici, la via di sintesi verso composti **14-20a,b** è stata realizzata seguendo la classica reazione dell'ammidossima [79]. Così, acetammidossima **21** è stata fatta reagire con mono e di-fluorobenzoil cloruri **22a,b** producendo 5-fluoroaril 1,2,4-ossadiazolo **23a,b**. Negli ultimi composti, la posizione para del sostituito 5-aril viene attivata a subire un  $S_N_{ar}$  con allilammina, producendo composti **24a,b**. Infine, reazione con di-(t-butil)-dicarbonato e successiva iodociclocarbamazione [80] del derivato **25a,b**, ideale precursore per ulteriori modificazioni della catena laterale.



Per la successiva funzionalizzazione, si considerano le catene laterali incluse le porzioni acetamidometiliche (vedi **16a,b**), tipiche del Linezolid, nonché i corrispondenti derivati tioammidici (**17a,b**). I loro precursori dell'azide **15a,b** sono stati ottenuti per reazione di composti **14a,b** con sodio azide in dimetilformamide. Successiva riduzione con trifenilfosfina [81] ha dato il corrispondente ammino-derivato **26a,b**. Dopo l'isolamento e la caratterizzazione, l'ammino-derivato è stato fatto prontamente reagire con cloruro di acetile, evitando la sua decomposizione, presumibilmente a causa di processi ossidativi che si verificano in seguito all'esposizione all'aria. I derivati acetamidometilici risultanti **16a,b**, sono stati infine fatti reagire con reagente di Lawesson dando derivati tioammidici **17a,b**.



Inoltre, dopo l'introduzione della funzione eterociclica pentatomica nella catena laterale che ha permesso di ottenere i composti **18-20a,b** si è osservato un mantenimento dell'attività antibatterica [82]. Tutti i composti **18-20a,b** sono stati ottenuti dalla reazione con i corrispondenti derivati iodometilenici **14a,b** con pirazolo, imidazolo, e 1,2,4- triazolo.



Condizioni di reazione sono state accuratamente scelte in modo da evitare la formazione di sottoprodotti a causa di  $\beta$ -eliminazione, come osservate in condizioni di soluzione alcalina.

### 1.11 Attività antibatterica di analoghi del Linezolid

I quattordici nuovi composti sono stati testati per valutare la loro attività antibatterica con i riferimenti standard e ceppi meticillino-sensibili (MSSA) e meticillino-resistenti *S.aureus* (MRSA). L'attività antimicrobica, riassunta nella Tabella 1, è stata determinata dal "gold standard" con microdiluzione in brodo, metodo che utilizza il Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Le concentrazioni minime inibenti (MIC) sono state espresse in mg/mL e test sulla vitalità cellulare

sono stati eseguiti per valutare la tossicità antibatterica selettiva dei composti più attivi. Tutti i ceppi saggiati risultavano essere Linezolid-sensibili, il Linezolid è stato usato come antibiotico di riferimento. Nel dettaglio i ceppi batterici saggiati sono: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, un ceppo clinico meticillino-sensibile di *S. aureus* (M923), *S. aureus* MU50 (meticillino-resistente MRSA), e due ceppi clinici meticillino-resistenti 433 e F511. Quattro dei quattordici composti testati hanno mostrato valori di MIC sia contro ceppi MSSA e MRSA con potenza paragonabile o superiore a quella del Linezolid. Inoltre, l'attività migliore contro MSSA e MRSA rispetto al Linezolid è quella dei composti contenenti zolfo **17a, b** mentre i composti **16a,b** sono risultati meno attivi rispetto al Linezolid, fatta eccezione per il ceppo MRSA 433. Il confronto con Linezolid deve tener conto del fatto che i composti sono stati usati come miscela racemica, quindi l'attività antibatterica per **16a, 16b, 17a e 17b** è probabilmente sottostimata rispetto alla potenza del enantiomero attivo puro.

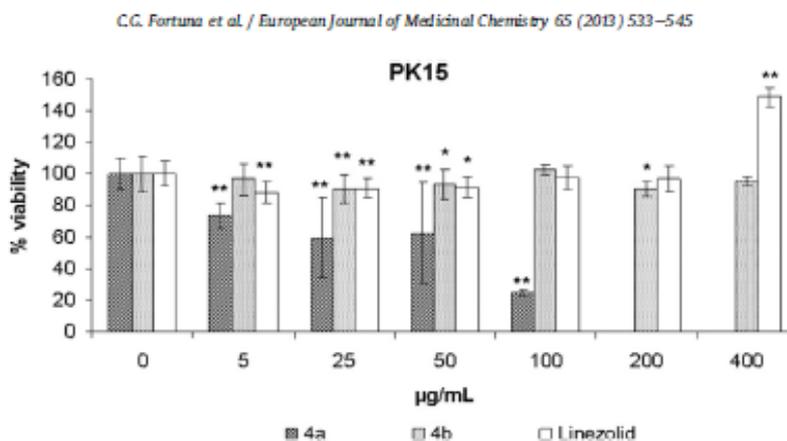
Comp.	ATCC 29213	MSSA M923	MRSA MU50	MRSA 433	MRSA F511
14a	>50	>50	50	25	50
14b	>50	>50	50	50	>50
15a	>50	>50	>50	>50	>50
15b	>50	>50	>50	>50	>50
16a	12.5	6.25	6.25	1.6	12.5
16b	12.5	6.25	6.25	1.6	12.5
17a	3.13	1.6	≤0.4	1.6	1.6
17b	1.6	1.6	≤0.4	0.8	1.6
18a	>50	>50	>50	>50	>50
18b	>50	>50	>50	>50	>50
19a	>50	>50	>50	>50	>50
19b	>50	>50	>50	>50	>50
20a	>50	>50	>50	>50	>50
20b	>50	>50	>50	>50	>50
LNZ	≤0.4	3.13	0.8	1.6	3.13

**Figura 1.** Attività antimicrobica, espressa in MIC, dei composti 14-20a,b contro ceppi MSSA e MRSA.

### 1.12 Saggi di vitalità cellulare di analoghi del Linezolid

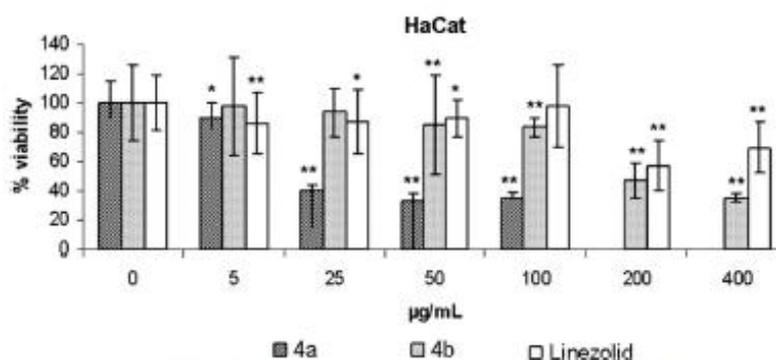
Per valutare se l'effetto contro le cellule batteriche potrebbe essere correlato a una tossicità selettiva o ad un effetto tossico più generale, si è eseguito un test in differenti tipi di cellule eucariotiche per analizzare l'attività citotossica in generale dei nuovi composti. Tutte le linee cellulari testate sono state trattate con concentrazioni crescenti di **17a** e **17b** (5-400 µg/mL), e Linezolid come composto di riferimento usando come solvente DMSO. Nella linea cellulare epiteliale PK15 (epitelio renale suino), tutte le concentrazioni testate di **17a** inducono una riduzione

significativa ( $P < 0.01$ ) della vitalità cellulare. Questi effetti sono concentrazione-dipendente (Fig. 2) e la riduzione della vitalità cellulare ha raggiunto circa il 70% a una concentrazione di 100  $\mu\text{g/mL}$  di **17a** e morte cellulare più del 90% a una concentrazione di 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 2** Saggi condotti sui composti 17° e 17b per confronto con il Linezolid

Il composto **17a** ha anche negativamente influenzato la vitalità della linea cellulare HaCaT (cheratinociti umani). In realtà, aveva ridotto significativamente la vitalità cellulare a una concentrazione di 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ) e induceva più del 60% di morte cellulare a tutte le concentrazioni superiori o uguali a 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3).



**Figura 3** Saggi condotti sui composti 17° e 17b per confronto con il Linezolid

Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando HepG2 (linea epatocellulare umana di carcinoma) (Fig. 4).

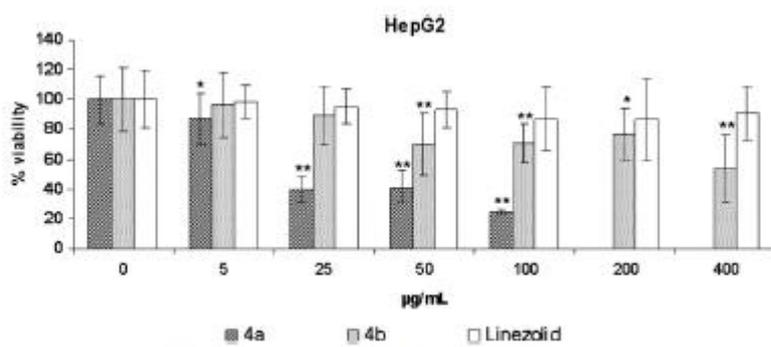


Figura 4 Saggi condotti sui composti 17<sup>o</sup> e 17b per confronto con il Linezolid

Il composto **17b** ha mostrato una riduzione della vitalità moderata (inferiore al 10%) sulle cellule PK15, che ha raggiunto risultati significativi a concentrazioni di 25 ( $P < 0.01$ ), 50 ( $P < 0.05$ ) e 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2). Questa attività era paragonabile a quella mostrata dal Linezolid alle stesse concentrazioni. La riduzione della vitalità cellulare causata da **17b** era più pronunciata nella linea HaCaT, raggiungendo morte cellulare per più del 50% a concentrazioni di 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.01$ ; Fig. 3). Cellule HepG2 hanno mostrato una riduzione significativa ( $P < 0.01$ ) della vitalità a partire da 50  $\mu\text{g/mL}$  di **17b**, con un massimo di tossicità alla concentrazione di 400  $\mu\text{g/mL}$ , con una diminuzione cellulare di circa il 40% (Fig.4). Linezolid non ha dimostrato nessuna riduzione della vitalità sulle cellule PK15, e la sua concentrazione di 400  $\mu\text{g/mL}$  paradossalmente stimola la replicazione cellulare ( $P < 0.01$ ; Fig. 2). La vitalità cellulare di HaCaT era diminuita con Linezolid, con gli effetti più alti a 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.01$ ; Fig. 3). È interessante notare che, HepG2 ben tollera Linezolid, senza effetti negativi sulla vitalità cellulare (Fig. 4).

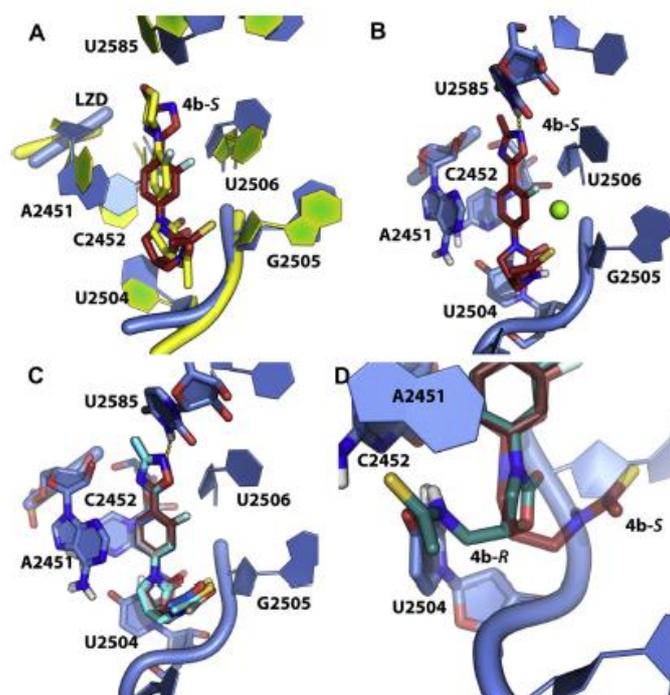
### 1.13 Relazione struttura-attività di analoghi del Linezolid

Studi struttura-attività (SAR) per gli ossazolidinoni hanno portato a risultati importanti. Nel caso della frazione 5-acetoammidometilica, si è precedentemente creduto che questo gruppo poteva svolgere un ruolo nell'attività antimicrobica; tuttavia, buone alternative come 1,2,3-triazolo-2-il-metile [83], la frazione piridinica-2-il-ossimetilica e i gruppi isossazolo-3-il-ossimetilici [84] sono stati in grado di mantenere o potenziare l'attività antibatterica [80]. In questo studio con altri anelli pentameri eterociclici come 1,2,4-triazolo e 1,3-diazolo si è osservata una perdita completa delle attività sia contro MSSA e MRSA. È stata inoltre osservata una

perdita di attività antibatterica per i precursori sintetici dove R= I o N<sub>3</sub>. Al contrario, la maggior parte dei composti attivi riportati nel presente studio mantengono il gruppo 5-acetamidometilico (**16a** e **16b**) o possiedono il gruppo 5-tioacetamidometilico (**17a** e **17b**). In particolare, la sostituzione del gruppo acetoamidometilico con un gruppo tioacetamidometilico ha portato ad una diminuzione di 8 volte il valore MIC. Questa scoperta conferma i risultati riportati da LM Thomasco [85] che ha dimostrato che gli ossazolidinoni tiadiazolo 2-amminometil con la catena laterale tioamidica sono straordinariamente potenti. In particolare, hanno mostrato che il 2-amminometil-1,3,4-tiadiazolilico tioammide fenil ossazolidinone (PNU-182347) ha valori di MIC di <0,5 µg/mL contro *S.aureus* UC 9213, *S.pneumoniae* UC 9912 e *Haemophilus influenzae* UC 30063. Più recentemente, una serie di gruppi tiocarbonilici come tioammide, ditiocarbammato, tiourea, e tiocarbammato sono stati testati come possibili modificazioni della catena laterale del Linezolid [86] e questi composti risultavano essere in vivo più attivi del Linezolid testato come riferimento. Oltre al gruppo acetoamidico, l'anello 3-(3'-fluorofenil) dell'ossazolidinone è stato considerato anche svolgere un ruolo chiave per l'attività antimicrobica, un atomo di fluoro nella posizione 3 genera praticamente una doppia attività sia in vitro che in vivo [1, 87]. In vivo, studi per Linezolid hanno anche mostrato che l'aggiunta di un fluoro sostituito sulla posizione 3 del fenile dell'anello B elimina gli effetti tossici sul midollo osseo, riduce le reazioni avverse, e incrementa l'attività biologica [87]. Infine, la dimensione dei sostituenti nella posizione 3 è molto importante, maggiore è la dimensione minore è l'attività [19, 88]. In questo studio, un confronto dell'attività antimicrobica tra **16a** e **16b**, e tra **17a** e **17b**, rispettivamente, mostra che il fluoro in posizione 3 dell'anello fenilico non gioca alcun ruolo quando l'anello morfolinico del Linezolid viene sostituito con l'anello 1,2,4-ossadiazolo. Pertanto, la modifica dell'anello C sembra cambiare drasticamente il comportamento SAR di **16a**, **16b**, **17a**, **17b** rispetto al Linezolid, anche se l'attività antimicrobica viene mantenuta.

## 1.14 Simulazione dell'interazione ligando-bersaglio di analoghi del Linezolid

Il meccanismo di azione dei composti più attivi, secondo studi su **16a**, **16b**, **17a**, **17b**, confrontato con quella del farmaco di riferimento, Linezolid, ha portato a importanti risultati. Il Linezolid si lega al Peptidil Transferase Center (PTC), in particolare al sito A, parzialmente sovrapposto alla porzione amminoacil come per molti altri antibiotici [34]. Un modello di subunità 23S per *S.aureus* è stato creato basandosi sulla subunità 23S del *D.radiodurans* [34]. L'allineamento delle sequenze di *D.radiodurans* e *S.aureus* mostra che le basi direttamente coinvolte nel sito di legame del Linezolid sono al 100% compatibili tra i due batteri, facendo nascere l'ipotesi che l'aggancio sul sito di legame dei nuovi composti ossadiazolici fosse sullo stesso punto del Linezolid. Sia gli R e S stereoisomeri di **16a**, **16b**, **17a** e **17b** offrono un legame migliore grazie alla loro conformazione superiore al Linezolid, come mostrato nella fig.5-D. La Fig. 5A mostra l' S-enantiomero **17b**, il composto più attivo, in complesso con *S.aureus*, confrontato con Linezolid in complesso con *D.radiodurans*. Dopo la minimizzazione, **17b** si sovrappone perfettamente con Linezolid e si osservano piccoli aggiustamenti sul sito di legame dello *S. aureus*. Altri farmaci sintetizzati hanno sull'anello C delle frazioni aromatiche e questa differenza rispetto all'anello C del Linezolid conferisce un sistema più rigido con aromaticità delocalizzata tra l'anello C e l'anello B. Ciò si spiega in, vedi fig.5B, una maggiore organizzazione delle basi intorno agli anelli C e B, A2451, C2452 e U2504 (*Escherichia coli*), che forza a una piccola rotazione dell'asse verticale del farmaco rispetto al Linezolid. L'anello B dei composti testati è strettamente inserito tra A2451 e C2452 e questo costringe la porzione coplanare dell'anello C ad interagire, attraverso un legame ad idrogeno coinvolgendo l'azoto N(2) della frazione 1,2,4 ossadiazolo con U2585, la cui importanza nel Linezolid è stata documentata [34]. L'accatastamento della porzione dell'anello ossazolidinonico (anello A) con U2504 osservata nella struttura cristallina si mostra anche nella nuova serie di composti.



I nuovi composti condividono un legame comune con il Linezolid. Il ruolo attivo dello ione  $Mg^{2+}$  è ancora incerto, poiché Wilson ha considerato ininfluenza lo ione Mg [34]. Tuttavia, una chiara interazione con ioni magnesio potrebbe apparentemente essere prevista nel caso specifico. Tuttavia, utilizzando questo approccio Base-Ligando, c'è una possibile interazione tra **17b-S** e  $Mg^{2+}$ , a causa di un coordinamento che coinvolge la porzione di tionile e l'atomo di F (Fig. 5B). La resistenza al Linezolid in *S.aureus* è stata associata a mutazioni in entrambi rRNA 23S e L3 proteina ribosomale. Mutazioni documentate nella 23S rRNA sono G2447T, T2500A, T2504A e G2576T [89-91], che, a differenza di U2504, non sono a contatto diretto con i composti ossazolidinoni, ma interagisce con basi implicate nel meccanismo dell'antibiotico. Infatti, T2500 interagisce con U2504, che è impilata con la frazione dell'anello A; G2447 interagisce sia con C2452 e A2451 sia, nel nostro modello di *S aureus*, lega saldamente la porzione dell'anello B; forme G2576 impilate con G2505, interagiscono con la catena laterale dell'ossazolidinone. Nella L3 proteina ribosomale è stata riportata una A157R mutazione [92]. A157 di L3, come si è visto per la maggior parte dei mutanti 23S rRNA, non interagisce direttamente con Linezolid ma, ancora una volta, interagisce sia con G2505 e U2506, entrambi coinvolti nel sito di legame. Mutazioni segnalate, ad eccezione di U2504, sembrano agire come modulatori per la forma del sito di legame, indirettamente,

consentendo o impedendo il legame del Linezolid. La Fig.5C mostra tutti gli S-enantiomeri progettati dai composti testati fatti interagire nella tasca di legame del sito A della PTC. Come indicato, non ci sono importanti differenze tra questi farmaci, e non ci sono modifiche di rilievo nel legame tra i farmaci qui riportati e Linezolid. Ciò è dovuto alla mancanza, a tutt'oggi, di una caratterizzazione dei ceppi MSSA e MRSA utilizzati per testare i nostri farmaci, per cui i nuovi modelli non tengono ancora in considerazione le basi mutate dei nuovi ceppi, che in realtà fanno la differenza. Lo studio di docking suggerisce anche una maggiore affinità degli stereoisomeri S per il sito di legame, che potrebbe portare a una maggiore attività dei composti S nella miscela racemica. Infatti, la catena laterale degli enantiomeri R prevede che si scontri con U2504 costringendo così a una rotazione della base U2504 e alterando l'interazione fondamentale di questa base con l'anello A. Un effetto simile è stato riportato per la struttura di cristallizzazione della 23S rRNA del *Haloarcula marismortui* in complesso con anisomicina [39], che mostra una base U2504 ruotata, sebbene anisomicina non occupa lo stesso sito di legame e U2504 non forma interazioni con qualsiasi anello di questo farmaco.

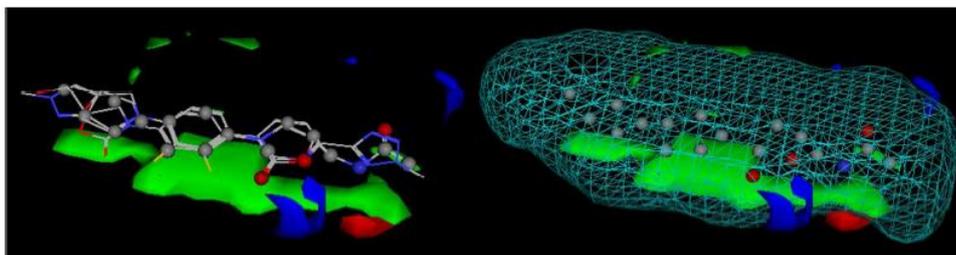
### **1.15 Recenti sviluppi sul design di analoghi del Linezolid**

La sostituzione dell'anello della morfolina, l'anello C del Linezolid, con 1,2,4-ossadiazolo e la sostituzione del gruppo carbonile con un tionile nella catena laterale è uno dei risultati più importanti nel mantenimento dell'attività antibatterica contro *S.aureus* resistente, ha mostrato maggiore attività contro i ceppi di MRSA per il composto **17b** e una vitalità cellulare simile rispetto al Linezolid. Un confronto delle possibili modalità di legame per i composti testati ottenuti da due approcci complementari (ligando-base e struttura) suggerisce che la modalità di legame dei composti esaminati è molto simile a quella riportata per il complesso ribosoma-Linezolid. In particolare, la frazione 1,2,4-ossadiazolo sembra simulare perfettamente la funzione dell'anello della morfolina, poiché il legame ad idrogeno con U2585 viene mantenuto. Gli esperimenti di attività svolti hanno suggerito che le modifiche apportate a livello delle catene laterali possono essere responsabili di variazioni dell'attività. Uno studio in silico delle possibili interazioni della catena laterale nella tasca di legame ha identificato una possibile interazione debole con A2503 per i composti attivi **16a**, **16b**, **17a**, **17b**. Per tutti i composti inattivi testati tale interazione non può verificarsi. Così il possibile ruolo di A2503 è attualmente in

studio. La fluorurazione dell'anello fenilico B, registrata per migliorare l'attività antibatterica di ossazolidinoni con l'anello C della morfolina o della piperazina [93], esibisce un effetto più contenuto rispetto alla presenza dell'anello C 1,2,4-ossadiazolo. Infatti, un effetto simile può essere evidenziato confrontando solo **17a** e **17b**, quindi con una porzione tioacetoammidometilica sulla catena laterale, e solo per alcuni ceppi. Inoltre, i gruppi funzionali acetammidometilici o tioacetoammidometilici nella catena laterale sono essenziali per l'attività, probabilmente a causa delle loro interazioni con l'accettore di legame H nella regione della tasca ribosomiale. Al fine di ottimizzare il design in silico di nuovi analoghi del Linezolid, recenti studi computazionali hanno messo a punto un approccio modellistico molecolare usando dei descrittori indipendenti (Grind Independent Descriptors-GRIND) basati su un sito virtuale del recettore (VRS), contribuendo ad analizzare gli effetti dei diversi gruppi funzionali misurabili chemiometricamente (Quantitative Structure Activity Relationship-QSAR). Il software utilizzato è FLAP (Finger-prints for Ligands and Proteins) [94-95], un programma di screening virtuale di sviluppo molecolare basato sulle analogie strutturali tridimensionali delle molecole e che usa il software GRID [96-97] con un approccio che sfrutta i campi di interazione molecolare (Molecular Interaction Field-MIF). L'algoritmo FLAP è stato sviluppato con l'obiettivo di descrivere proteine e leganti basato su un quadro di riferimento comune [95], selezionando un numero di strutture molecolari inserite in un elenco, si sovrappongono le molecole del test a questi modelli e si confronta il volume di MIF risultante. Questi punteggi costituiscono le differenze chimiche tra la molecola usata e la molecola da testare e sono una misura della possibilità della molecola da testare avente un'attività simile a quello del composto modello.

---

Modello Farmacoforico generato in collaborazione con l'Università di Catania (Dr. C.G. Fortuna)

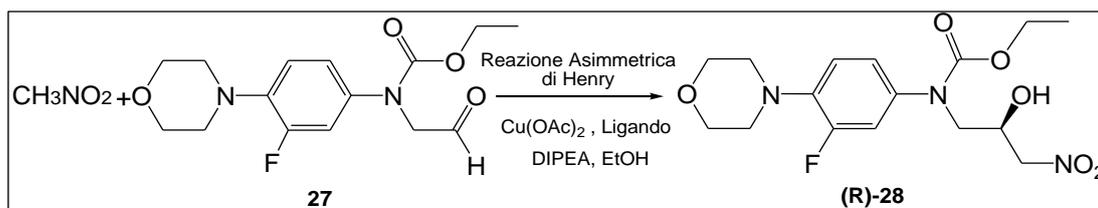


---

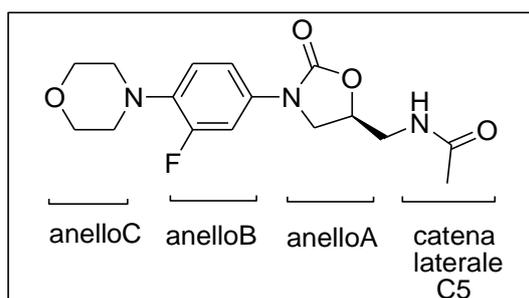
Tutti questi modelli sono stati utilizzati per prevedere l'attività di nuove molecole che saranno sintetizzate [98].

## 2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni la versione asimmetrica della reazione nitroaldolica ha suscitato particolare interesse, soprattutto, per la possibilità di essere sfruttata nella sintesi stereoselettiva di precursori di famiglie di composti di interesse biologico e farmaceutico [64]. Di recente, sono stati identificati molti catalizzatori [99], tra questi, i complessi di Cu(II) con gruppi ammino e immino piridinici derivati dalla canfora che hanno attirato una crescente attenzione per la loro alta enantio-selettività combinata con il vantaggio di un ligando conveniente e disponibile in forma enantiomerica [99b,100]. Nell'ambito del progetto di dottorato come primo obiettivo è stata considerata la sintesi del Linezolid attraverso la reazione nitroaldolica. A tale scopo si sono voluti sfruttare complessi di rame chirali inseriti in uno schema di tipo lineare usando l'aldeide **27**, come substrato per la reazione di Henry, e utilizzando come ligando il derivato amminopiridinico della canfora.



Dal momento che, i composti contenenti una porzione 1,2,4-ossadiazolica quale sostituzione dell'anello C del Linezolid, sono stati valutati positivamente per intervenire anche su batteri Linezolid resistenti, un secondo obiettivo ha riguardato lo sviluppo di analoghi ossadiazolici del Linezolid. A tal scopo sono state considerate strategie operative per ottenere nuovi composti, quali potenziali candidati antibatterici, pensando a possibili sostituenti dell'anello C, al grado di fluorurazione dell'anello B e a variazioni in catena laterale. Inoltre, un terzo

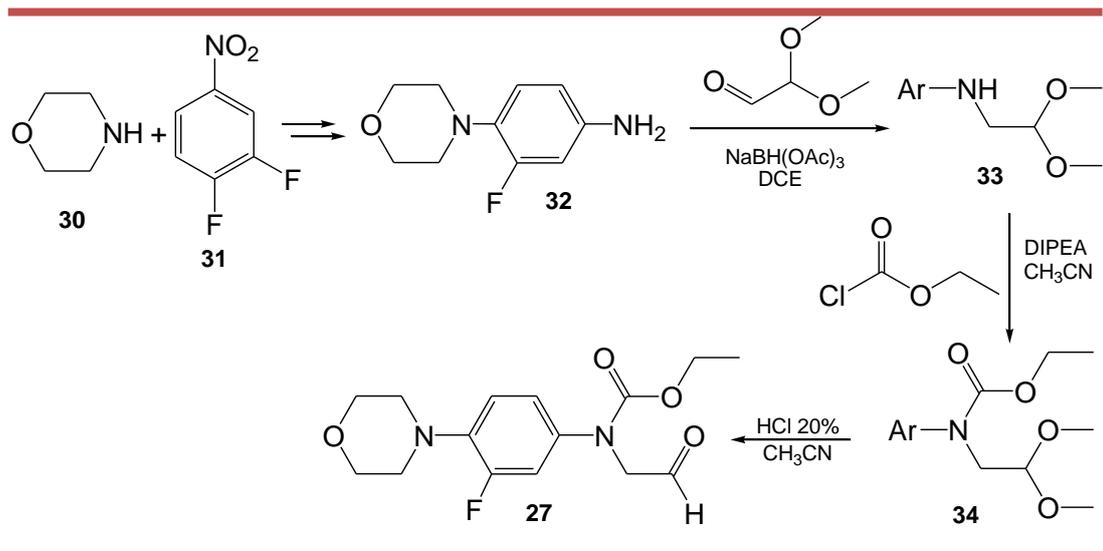


obiettivo ha riguardato la sintesi di una serie di composti selezionati, sulla base di recenti risultati di screening computazionale, da una libreria virtuale di composti eterociclici ristretta a strutture non presenti nei database pubblici e la cui sintesi sarebbe stata accessibile attraverso metodiche sviluppate all'interno del gruppo di ricerca presso il quale si è svolto il progetto di dottorato.

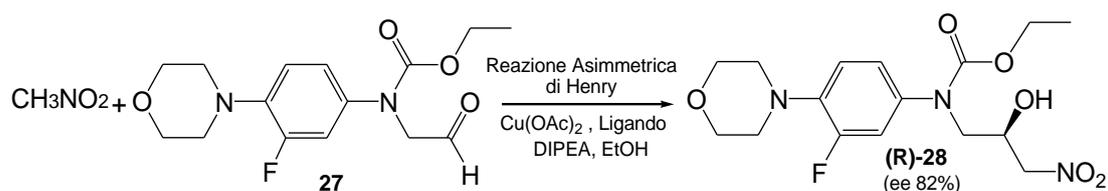
## 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1 Reazione nitroaldolica di Henry per ottenere Linezolid e derivati

Per sintetizzare il Linezolid abbiamo previsto lo sfruttamento della reazione asimmetrica di Henry, come passaggio chiave per l'ottenimento del precursore chirale (**R**)-**28**. A tal fine, abbiamo inizialmente pianificato il percorso sintetico per ottenere l'aldeide **27**.

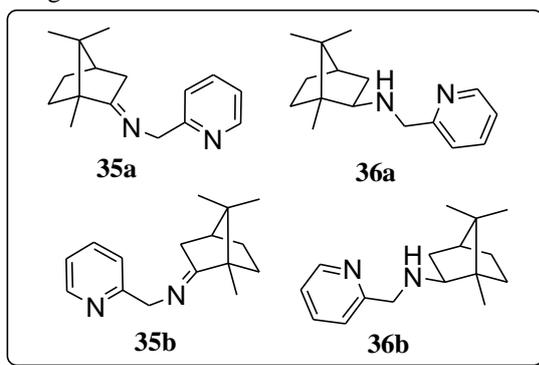


Abbiamo sintetizzato l'anilina **32**, mediante amminazione riduttiva con dimetossiacetaldeide, abbiamo ottenuto il carbammato di etile **33**, per idrolisi dei gruppi acetalici abbiamo ricavato l'aldeide **27** da sfruttare per la reazione asimmetrica di Henry.

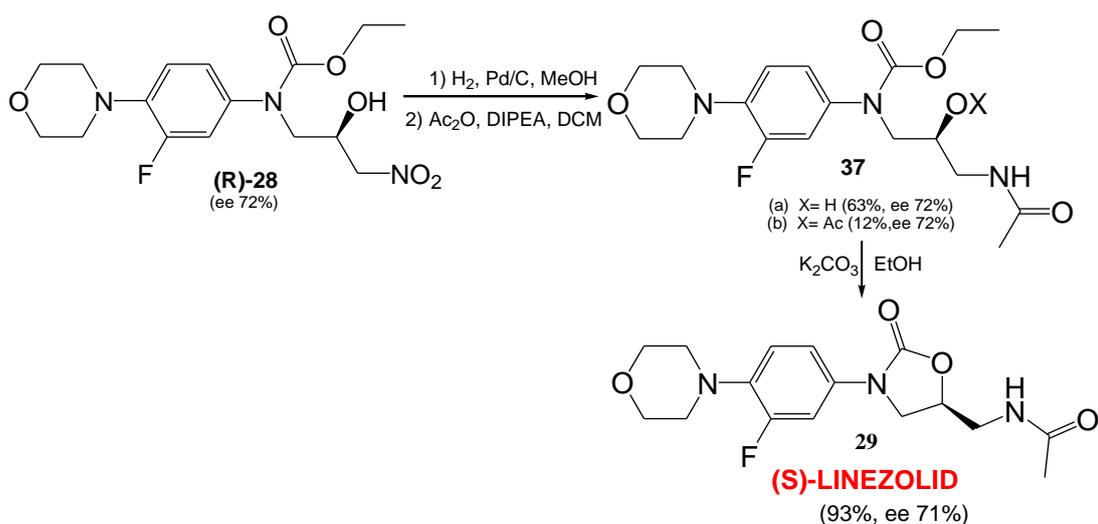


Ligando

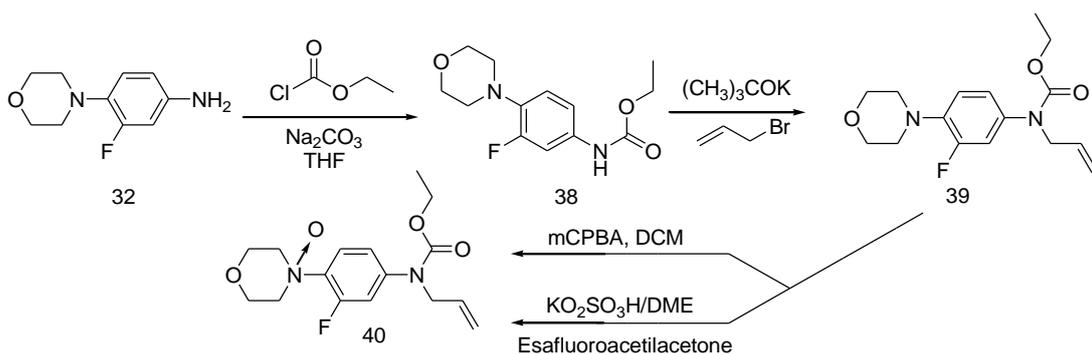
L	T (°C)	Resa(%)	ee%
35a	20	53	-2
36a	20	82	-44
35b	20	54	3
36b	20	81	45
36b	0	76	72
36b	-10	63	69
36b	-20	-	-



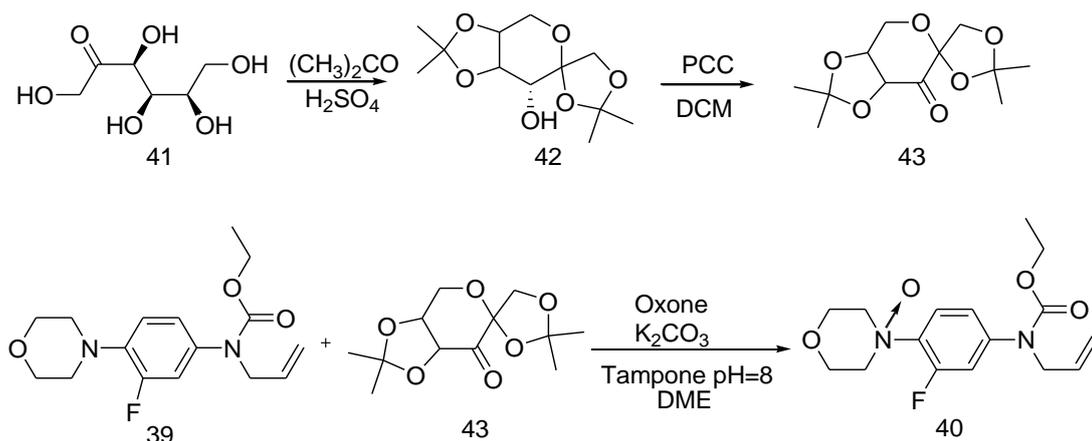
Le reazioni sono state eseguite a diverse temperature (da 20°C a -20°C). Con l'aldeide nelle nostre mani, abbiamo testato la reazione chiave asimmetrica di Henry con nitrometano. Il prodotto atteso, precursore chirale, **(R)-28** è stato ottenuto in buone rese (fino al 82%), con l'unica eccezione della reazione eseguita a -20°C, questa mancanza di reattività è dovuta alla scarsa solubilità dei reagenti. È interessante notare che i leganti amminopiridinici **36** hanno rendimenti più elevati rispetto ai corrispondenti derivati immino **35**, che peraltro hanno dato il nitroaldolo quasi in miscela racemica. D'altra parte, i ligandi amminopiridinici **36** hanno dato un buon eccesso enantiomerico a 20°C, con i migliori risultati ottenuti a 0°C (72% ee). L'abbassamento della temperatura a -10°C comporta un decremento di resa e di ee. La formazione del (R)-enantiomero è stata ottenuta utilizzando il ligando **36b** derivato amminopiridinico della (-)-canfora. La determinazione della configurazione assoluta dell'enantiomero formato è stata ottenuta per confronto con S-Linezolid mediante HPLC chirale.



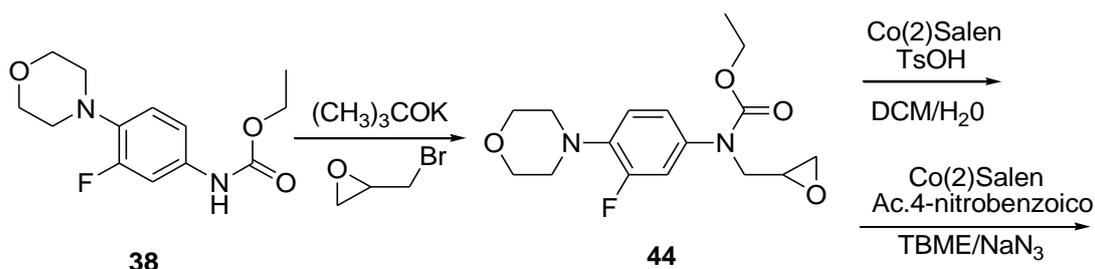
Infine, modificando la catena acetammidica e tramite ciclizzazione dell'anello ossazolidinonico abbiamo ottenuto il Linezolid. L'elaborazione della catena laterale è stata effettuata attraverso riduzione catalitica del nitro gruppo e successiva acetilazione. Per mezzo di questa procedura in due passaggi siamo riusciti a isolare due derivati acetilati **37a** e **37b** con alta resa complessiva (75%). Il prodotto **37b** non è stato considerato come un sottoprodotto perché utilizzato per la fase finale di ciclizzazione a Linezolid. Infatti mentre la reazione sul composto **37a** mostra una resa del 93%, la stessa reazione eseguita sul composto **37b** presenta una resa del 91% [101].



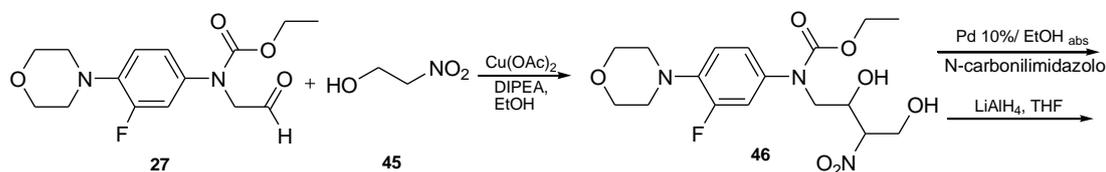
Inoltre, è stato valutato un progetto sintetico alternativo per la costruzione dell'anello ossazolidinonico e per il quale è stata richiesta la sintesi di un allil derivato, da sfruttare come substrato per successiva reazione di epossidazione. Sono stati effettuati vari tentativi che hanno favorito, però, la formazione di composti N-ossido, verificata via  $^1\text{HNMR}$ .



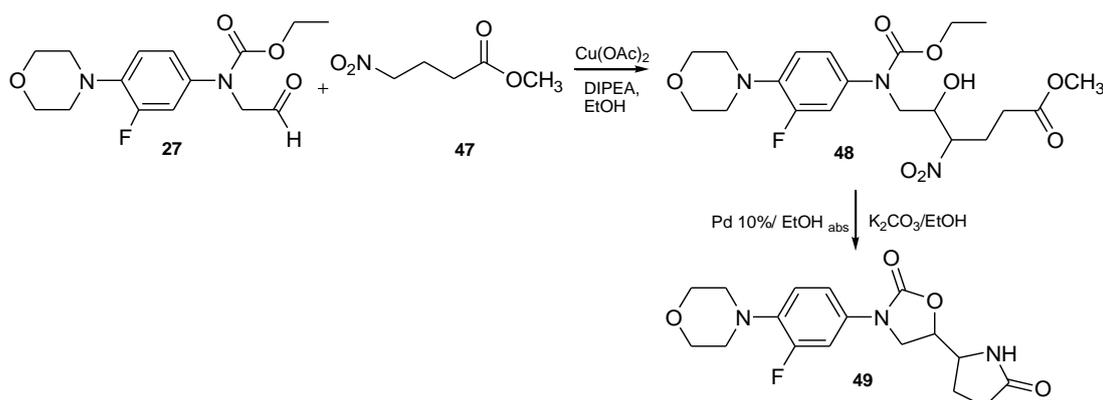
E' stata anche considerata la sintesi di un catalizzatore **43** a partire dal fruttosio **41** al fine di essere sfruttato in questo passaggio sintetico, ma anche in questo caso abbiamo osservato la formazione di un composto **40** con funzione N-ossidica.



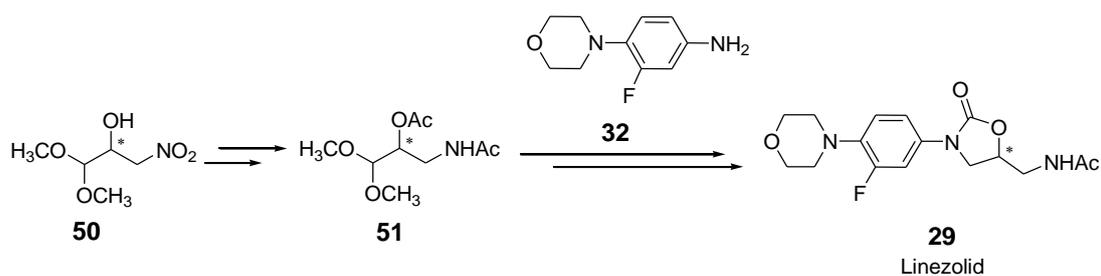
E' stato possibile ottenere l'intermedio epossidico **44** in seguito a reazione del carbammato **38** con epibroidrina. I successivi tentativi di apertura dell'anello epossidico, in presenza di un catalizzatore, non hanno avuto esiti positivi.



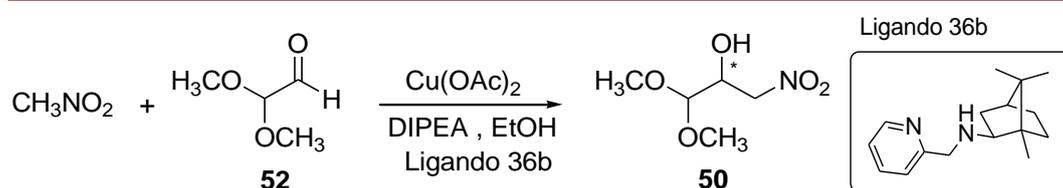
Considerando di modificare la struttura del Linezolid, si è pensato, di pianificare una strategia di sintesi volta alla realizzazione di un nuovo composto diverso dal Linezolid per variazioni relative alla catena laterale. Pertanto, l'aldeide **27** ottenuta in precedenza è stata fatta reagire con il nitroetano **45** e la reazione nitroaldolica ha portato alla sintesi del nitroderivato **46**. Lo step sintetico è stato, però, interrotto nel passaggio successivo che non ha portato al prodotto ridotto.



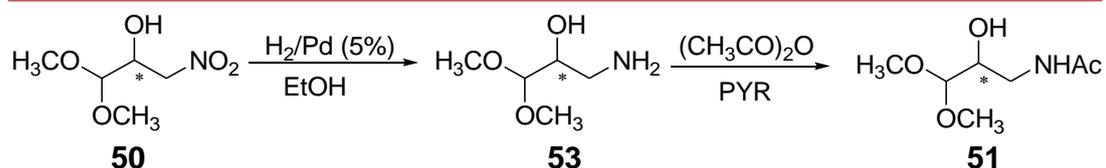
Mentre, utilizzando come nitroderivato il metil-4-nitrobutanoato **47**, abbiamo ottenuto l'intermedio **48** e in seguito a reazione di riduzione e successiva ciclizzazione è stato possibile formare un nuovo ciclo lattamico in sostituzione del braccio acetamidico del Linezolid. Questa nuova molecola, meno flessibile rispetto al Linezolid, sembra, da risorse computazionali, instaurare con il sito attivo un legame ad idrogeno simile a quello sperimentalmente osservato per il Linezolid ed inoltre dalle ricerche conformazionali sembra poter interagire maggiormente con il target ma da studi effettuati sull'attività biologica in confronto al Linezolid mostra valori di MIC superiori a  $128 \mu\text{g/mL}$ . Quindi, abbiamo constatato che la modifica strutturale realizzata non ha condotto ad un derivato con potenza paragonabile o superiore al Linezolid.



Considerando che, ad oggi, per il Linezolid non esistono metodi di sintesi convergente che sfruttano reazioni asimmetriche, si è pensato ad un possibile schema sintetico che sfruttando il nitroalcol **50** permettesse di ottenere l'intermedio **51** da utilizzare per i successivi passaggi previsti nel nostro schema di sintesi convergente.



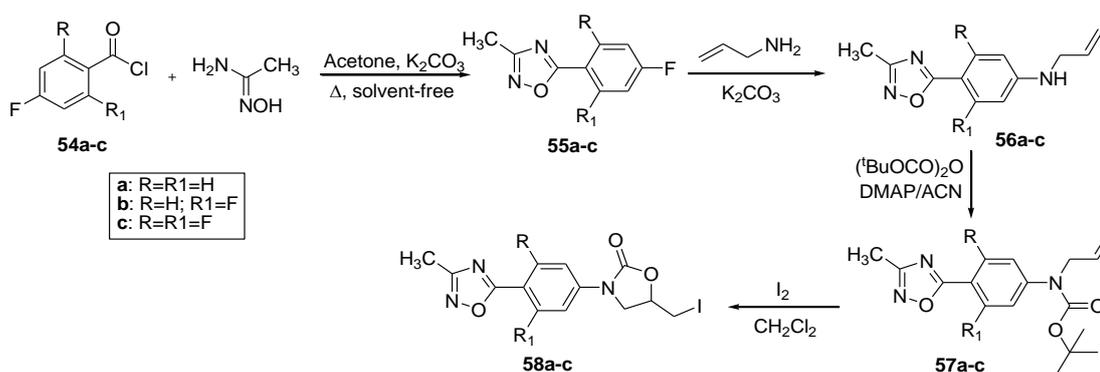
Per sintetizzare il nitroaldolo **50** si è fatto reagire il nitrometano con la dimetossiacetaldeide **52**, utilizzando il ligando **36b** usato per ottenere il Linezolid secondo lo schema lineare.



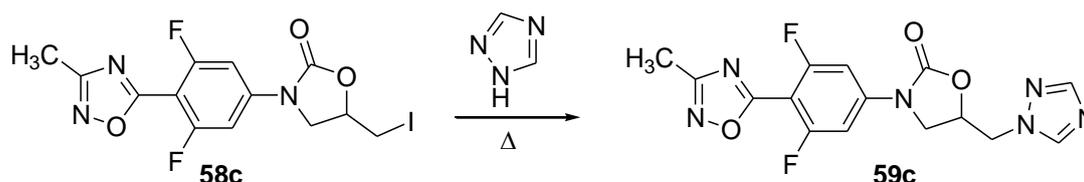
Per ottenere l'intermedio **51**, è stata prevista la riduzione del nitroalcol **50**, seguita da successiva acilazione dell'ammina. La riduzione del nitroderivato **50** è risultata problematica in termini di resa e purificazione dell'ammina finale **53**, che tende a subire processi di degradazione durante il work-up. Tra le diverse metodologie di riduzione testate, quella che ha presentato minori difficoltà è stata la riduzione con  $\text{H}_2$  in presenza di palladio metallico. L'ammina **53** è stata ottenuta, comunque, con rese basse (<50%). La successiva reazione, con anidride acetica e piridina, ha portato al derivato mono acilato **51** con resa inferiore al 10%. A questo punto risultava evidente come la strategia lineare di sintesi del Linezolid fosse decisamente vantaggiosa rispetto a quella convergente provata.

### 3.2 Derivati ossadiazolici del Linezolid

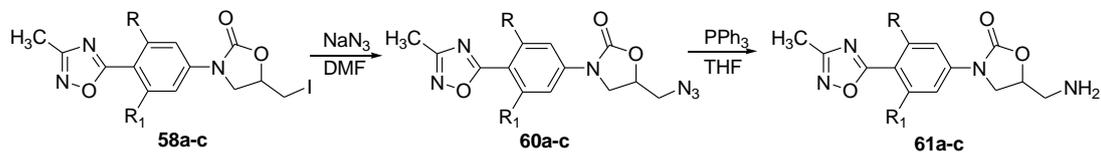
Sulla base di calcoli computazionali e di complementarietà tra substrato e proteina target eseguiti preliminarmente alla sintesi e che mirano ad individuare nuove molecole analoghe al Linezolid ma con maggiore affinità per il target si è scelto di pianificare la sintesi di nuovi derivati che hanno ricevuto punteggi simili o più alti del Linezolid negli studi computazionali. Sono stati progettati, sintetizzati e valutati composti in cui è stato modificato l'anello C del Linezolid con un sistema 1,2,4-ossadiazolico variamente funzionalizzato in posizione 3, sull'anello B è stato variato il grado di fluorurazione e sono state apportate varie modifiche in catena laterale per ottenere nuovi derivati ossadiazolici diversi dai composti **14-20ab**. La posizione C-5 dell'anello ossazolidinonico possiede un carbonio asimmetrico e i prodotti sono stati ottenuti in miscela racemica.



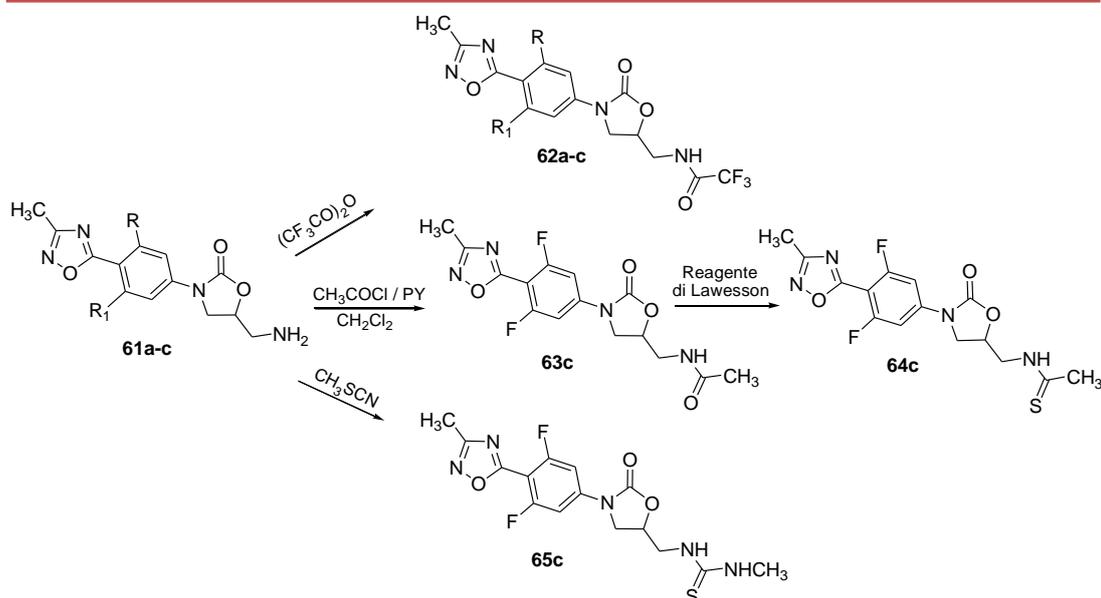
Inizialmente abbiamo considerato la sintesi di una serie di composti che presentano l'anello 3-metil-1,2,4-ossadiazolico in sostituzione all'anello morfolinico, l'anello fenilico para-sostituito variamente fluorurato e diverse sostituzioni in catena laterale. Il percorso sintetico presentato ha permesso di ottenere il substrato iodo derivato **58a-c**, lo iodio può fungere da gruppo uscente in una reazione  $\text{S}_{\text{N}}2$  e quindi permette di funzionalizzare la catena laterale.



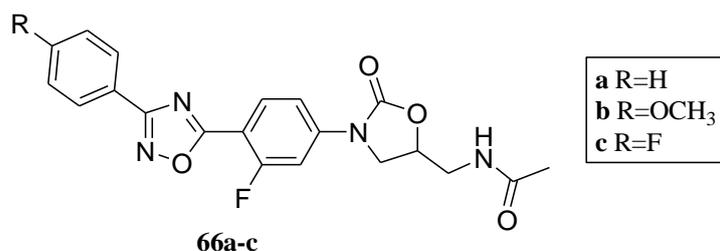
L'intermedio **58c** con 2 atomi di fluoro è stato fatto reagire con 1H-1,2,4-triazolo ottenendo il composto finale **59c**. L'intermedio iodato, inoltre, è stato usato per ulteriori funzionalizzazioni.



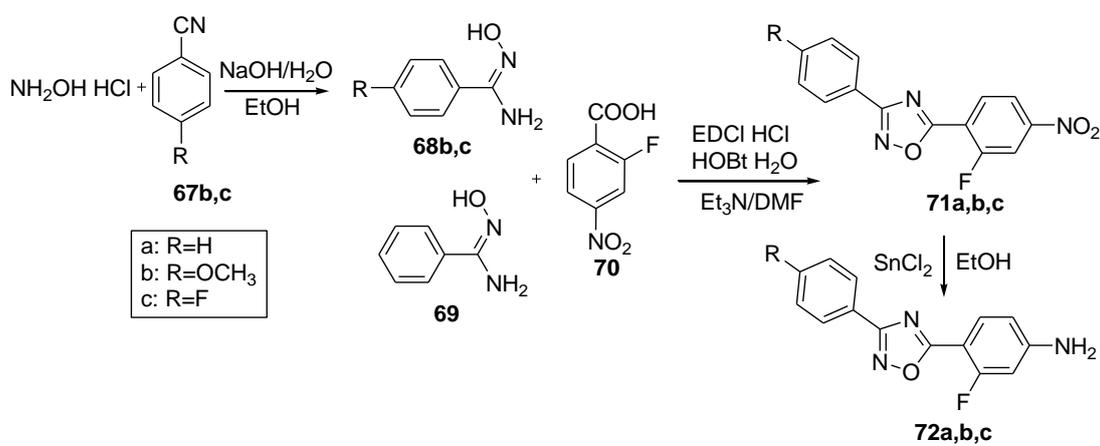
L'atomo di iodio viene sostituito da una funzione azidica per reazione con sodio azide e per successiva riduzione porta all'intermedio amminico **61a-c** che può essere sfruttato per ottenere prodotti con ulteriori modifiche sulla catena laterale.



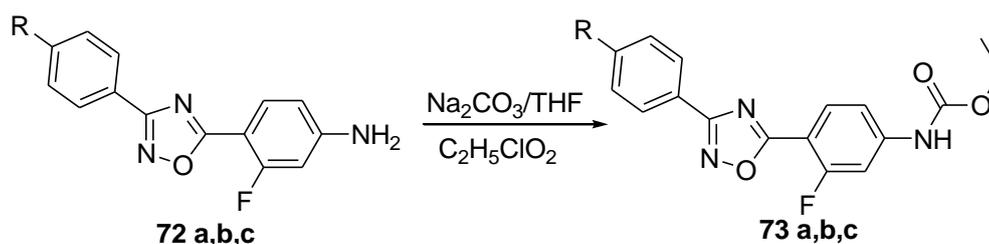
I composti **62a,b,c**, **63c**, **64c**, **65c** sono stati testati su diversi ceppi batterici ed è emerso che **64c** e **65c** mostrano i risultati migliori. I composti sintetizzati sono stati testati anche su alcune colture batteriche resistenti al Linezolid, l'attività dei composti studiati **62a**, **62b**, **63c**, **64c** risulta abbastanza buona, mentre **65c** mostra valori di attività comparabili a Linezolid. Nel confronto con Linezolid si deve tener conto che i composti saggiati sono stati utilizzati come miscela racemica, quindi l'attività antibatterica è probabilmente sottostimata rispetto alla potenza dell'enantiomero attivo puro.



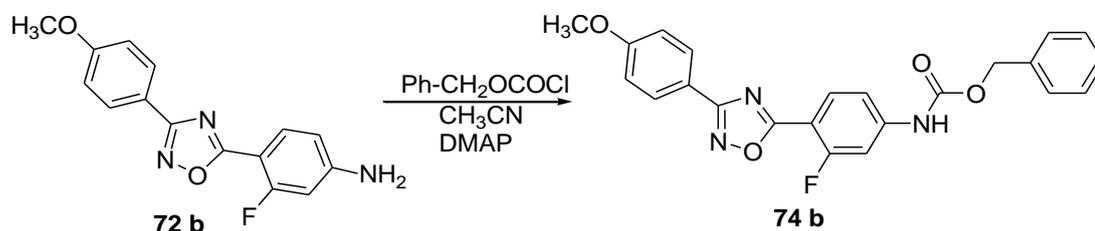
E' stata realizzata una seconda serie di derivati che presentano in posizione 3 dell'anello 1,2,4-ossadiazolico un arile variamente sostituito in para, l'anello B monofluorurato e la catena acetoamidometilica.



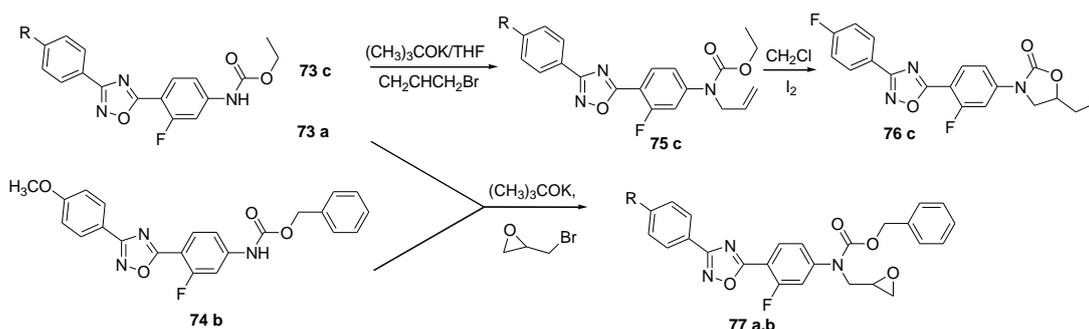
Per la sintesi del derivato con l'arile non sostituito abbiamo usato la benzoamidossima **69** disponibile commercialmente. Per gli altri due derivati abbiamo fatto reagire l'idrossilammina cloridrata con il 4-metossibenzonitrile **67b** ottenendo l'ammidossima **68b** e con il 4-fluorobenzonitrile **67c** ottenendo l'ammidossima **68c**. Le ammidossime **68b,c** e **69** sono state fatte reagire con l'acido 2-fluoro-4-nitrobenzoico **70**, sfruttando una reazione di attivazione del gruppo carbossilico con EDC cloridrato, abbiamo ottenuto i nitro composti **71a,b,c**. La successiva reazione di riduzione con cloruro stannoso in etanolo ha portato alla sintesi delle ammine **72a,b,c**.



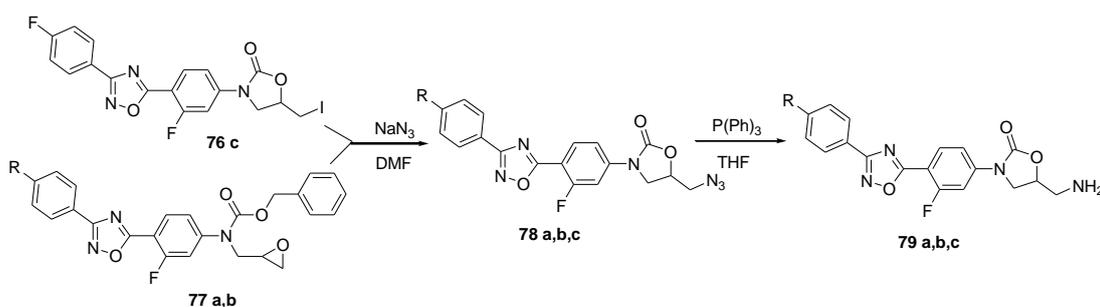
Il passaggio successivo ha previsto la funzionalizzazione delle ammine **72 a,b,c** che sono state trattate con etilcloroformiato ottenendo il substrato **73 a,c** con rese superiori al 70% mentre il composto **73b** con resa bassa (33%).



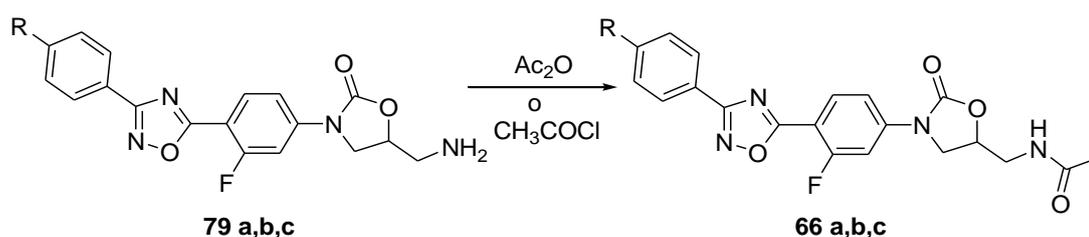
Quindi, al fine di migliorare la resa, abbiamo deciso di cambiare strategia facendo reagire il composto **72b** con benzilcloroformiato ottenendo l'intermedio **74b** con una buona resa (67%).



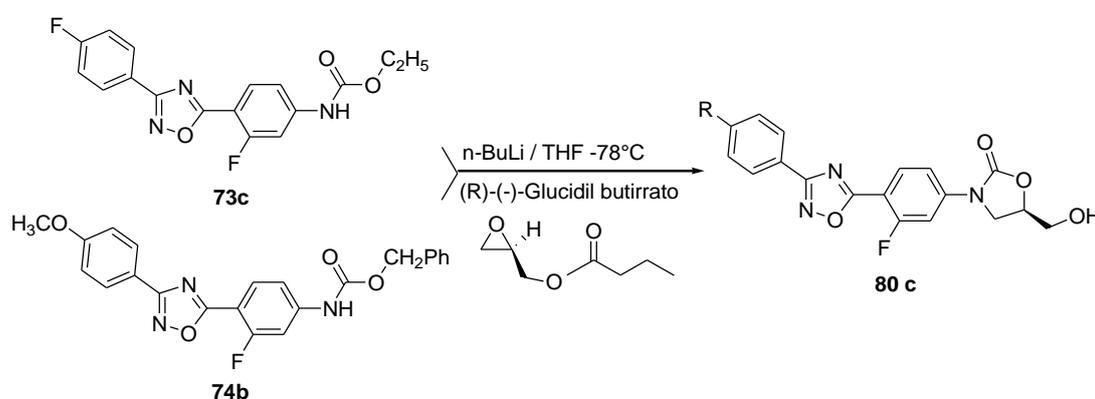
Il composto **73c** è stato fatto reagire con l'allilbromuro, ottenendo l'allil derivato **75c**. Il passaggio successivo ha previsto la reazione di iodo-lattoneizzazione che ha generato il ciclo ossazolidinonico **76c**. Al fine di ottimizzare gli schemi e ridurre i passaggi di reazione per i composti **73a** e **74b** si è optato per la formazione degli epossidi **77a,b** che possono essere direttamente usati per il passaggio successivo.



L'intermedio **76c** presenta uno iodio che può fungere da gruppo uscente in una reazione  $S_N2$  e che quindi permette di funzionalizzare la catena laterale. L'atomo di iodio viene sostituito da una funzione azidica per reazione con sodio azide e porta alla formazione del prodotto **78c**. I composti **77a,b** sono stati fatti reagire ad  $80^\circ\text{C}$  in presenza di sodio azide, si verifica l'apertura dell'eossido e la ciclizzazione ad anello ossazolidinonico **78a,b**. Il gruppo azidico attraverso reazione di riduzione con trifenilfosfina viene convertito in gruppo amminico **79a,b,c**.



Infine, l'ultimo passaggio ha previsto l'acetilazione delle ammine, effettuata con reagenti diversi ottenendo i composti finali **66a,b,c** in miscela racemica.

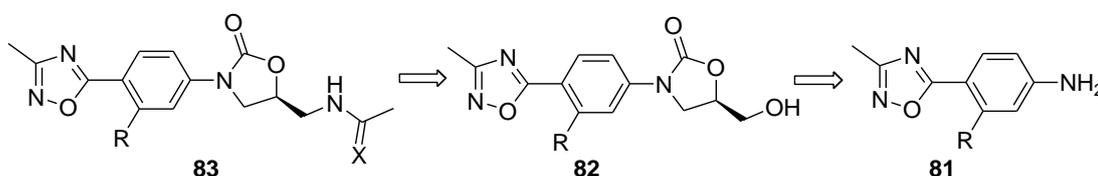


Inoltre è stata valutata, anche, la sintesi di tali prodotti come singoli enantiomeri e per tale motivo è stato tentato lo step sintetico usato in precedenza. La reazione condotta sull'intermedio **74b** non ha portato alla sintesi di prodotti di interesse. Mentre, per quanto riguarda il substrato **73c**, abbiamo ottenuto il composto **80c** ma con resa bassissima ( $< 10\%$ ), abbiamo considerato delle variabili quali solventi o temperatura di reazione ma in questo caso la reazione non ha condotto a nulla. I composti **66a,b,c** sono stati sottoposti a saggi biologici e hanno mostrato valori di MIC superiori a  $128 \mu\text{g/mL}$ . Quindi, abbiamo constatato che la sostituzione del metile sul C3 dell'anello 1,2,4-ossadiazolico con altri gruppi funzionali non ha

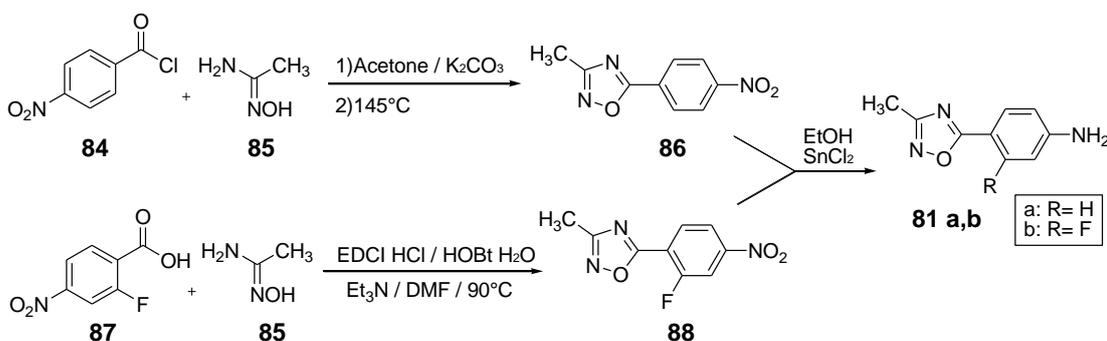
condotto all'ottenimento di derivati con potenza paragonabile o superiore al Linezolid.

### 3.3 Sintesi asimmetrica di derivati ossadiazolici del Linezolid

Alla luce dei risultati ottenuti per i composti testati **16a**, **16b**, **17a**, **17b**, in miscela racemica, che hanno mostrato valori di MIC con potenza paragonabile o superiore a quella del Linezolid si è pensato di sviluppare una metodologia di sintesi asimmetrica di derivati ossazolidinonici del Linezolid, per ricavare singoli enantiomeri, al fine di implementare ulteriori fasi di sviluppo del potenziale farmaco.

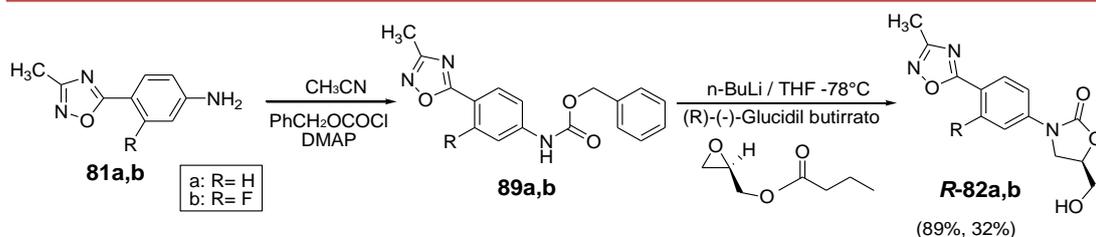


La strategia sintetica scelta prevede l'iniziale costruzione dell'anello ossadiazolico **81**, seguita dalla costruzione dell'anello ossazolidinonico chirale **82**, per completare con l'elaborazione della catena laterale **83**, secondo lo schema retro sintetico mostrato sopra.

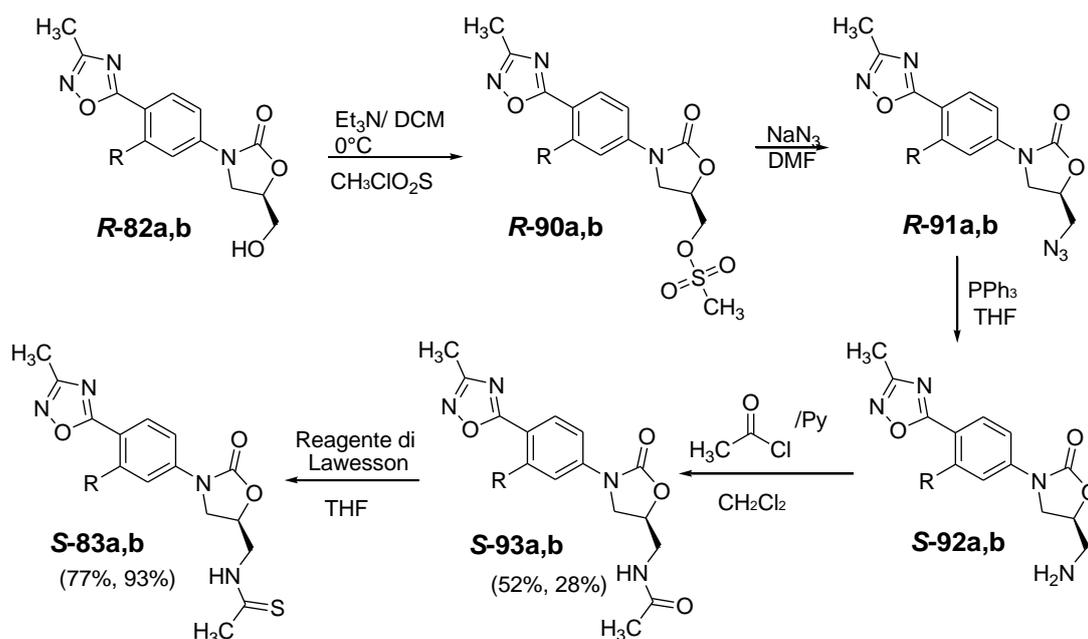


Per i derivati ossadiazolici di partenza, la via di sintesi è stata realizzata seguendo la classica reazione dell'ammidossima. L'acetammidossima **85** è stata fatta reagire con il 4-nitrobenzoyl cloruro **84**, disponibile commercialmente, producendo il 3-metil-5-(4-nitrofenil)1,2,4-ossadiazolo **86**. Attraverso riduzione del gruppo amminico con il cloruro stannoso in etanolo abbiamo ottenuto la 4-(3-metil-1,2,4-ossadiazolil)anilina **81a**. Per quanto concerne l'ottenimento dell'analogo derivato contenente un atomo di fluoro, si è optato per un procedimento diverso vista l'indisponibilità commerciale del cloruro dell'acido necessario. Pertanto, abbiamo utilizzato direttamente l'acido 3-

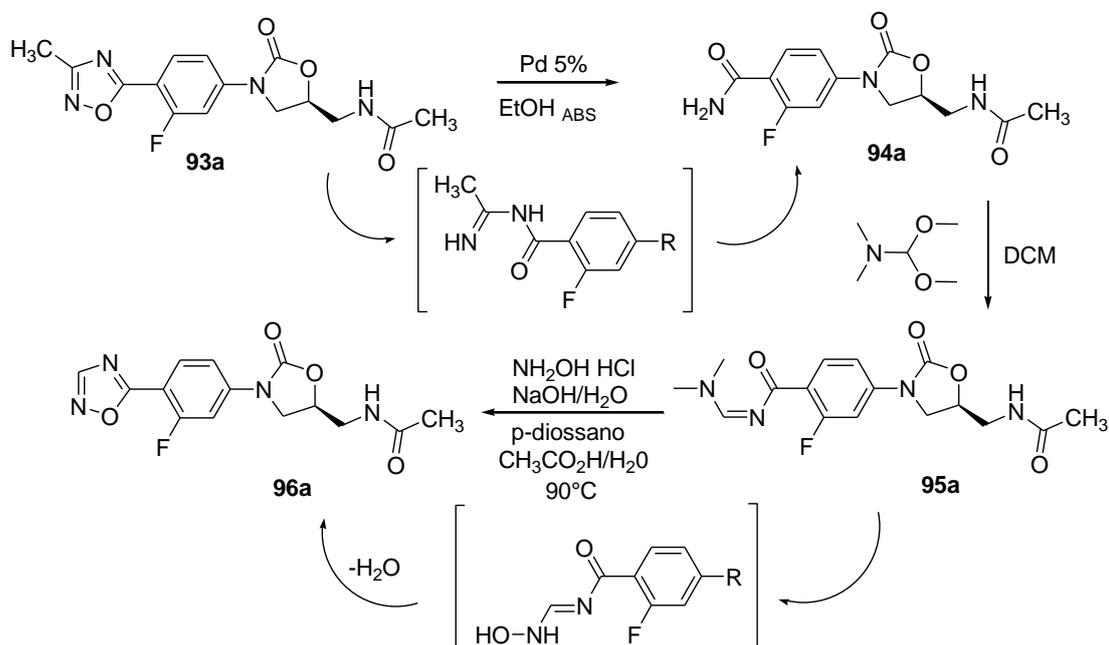
fluoro-4-nitrobenzoico **87** per l'ottenimento del corrispondente derivato 3-metil-1,2,4-ossadiazolico **88**, sfruttando una reazione di attivazione del gruppo carbossilico con EDC cloridrato. Quindi, per reazione tra l'acetammidossima **85** e l'acido 2-fluoro-4-nitrobenzoico **87** seguita da reazione di riduzione del nitro gruppo, condotta nelle stesse condizioni dello schema sintetico proposto per ottenere l'ammina **81a**, abbiamo ottenuto l'ammina **81b**.



Per la successiva costruzione dell'anello ossazolidinonico sono stati ottenuti i corrispondenti uretani. Quindi, le ammine **81a,b** sono state fatte reagire con il benzilcloroformiato ottenendo gli intermedi **89a,b**, che sono stati sfruttati per la sintesi asimmetrica di Manninen. Utilizzando l'(R)-(-)-glicidil butirato abbiamo costruito l'anello centrale ossazolidinonico e ricavato la forma enantiomerica (R)-**82a,b**. La reazione è stata condotta in atmosfera di azoto a  $-78^\circ\text{C}$  fornendo i derivati desiderati in ottime rese ed enantiomericamente puri. Si è, quindi, proceduto con l'elaborazione della catena laterale.



La successiva reazione con mesitilcloruro ha portato ai composti **90a,b**, i quali non sono stati isolati, ma sono stati direttamente utilizzati nella reazione successiva senza ulteriore purificazione cromatografica e posti a reagire con sodio azide in dimetilformammide, consentendo l'ottenimento in ottime rese delle azidi **91a,b**. La successiva riduzione dell'azide con trifenilfosfina in THF ha dato i corrispondenti ammino-derivati **92a,b**. Tale reazione è preferita alla classica reazione di idrogenazione, data la suscettibilità del legame O-N del sistema ossadiazolico alle condizioni riduttive. In seguito gli amminoderivati sono stati fatti prontamente reagire con cloruro di acetile, per ridurre l'eventuale possibilità di decomposizione collegabile a processi ossidativi che si possono verificare in seguito all'esposizione all'aria, ottenendo i derivati acetamidometilici **93a,b**. Infine, per reazione dei composti **93a,b** con il reagente di Lawesson abbiamo ottenuto i derivati tioammidici **S-83a,b**. I saggi biologici condotti sul composto **S-83b** hanno mostrato valori di MIC soddisfacenti sui ceppi testati. Mostra elevata attività contro agenti patogeni Gram-positivi, tra cui patogeni Linezolid-resistenti (LZD-R).

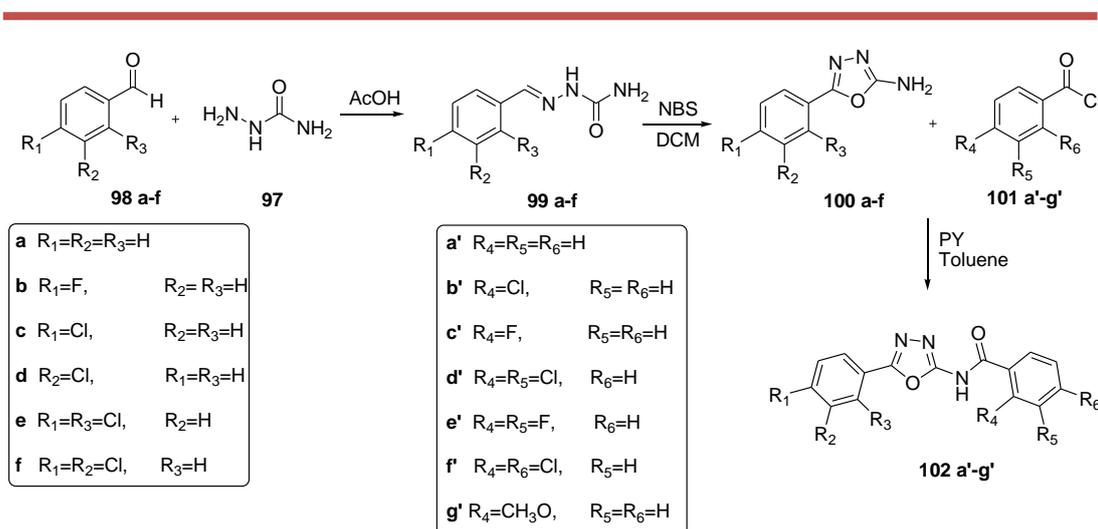


Ai fini brevettuali, per confermare l'importanza dell'attività biologica mostrata dal composto **S-83b** è stato richiesto il confronto biologico con l'analogo non metilato in posizione 3 dell'anello ossadiazolico. La strategia sintetica ha previsto l'apertura dell'anello ossadiazolico previa reazione di riduzione condotta con Pd/C 5% in etanolo. Per successiva reazione con DMF-DMA abbiamo ottenuto l'intermedio **95b**

che in ambiente basico in presenza di idrossilammina e diossano a 90°C ciclizza dando il prodotto **96b**. Il composto è stato sottoposto a saggi biologici ed è emerso come la sostituzione dell'idrogeno con un gruppo metilico permettere di ricavare valori di MIC soddisfacenti ed inferiori anche rispetto al Linezolid.

### 3.4 Sintesi di composti ossazoli azolici con attività antibatterica

Dagli studi di virtual screening Ligand-Based e Structure-Based effettuati su composti eterociclici, presenti nella libreria di molecole studiate dal gruppo di ricerca, lo scaffold eterociclico sopra indicato è risultato essere quello con punteggi più alti. Pertanto si è passati alla sintesi di derivati presenti nel database ed anche nuovi composti con modifiche strutturali.

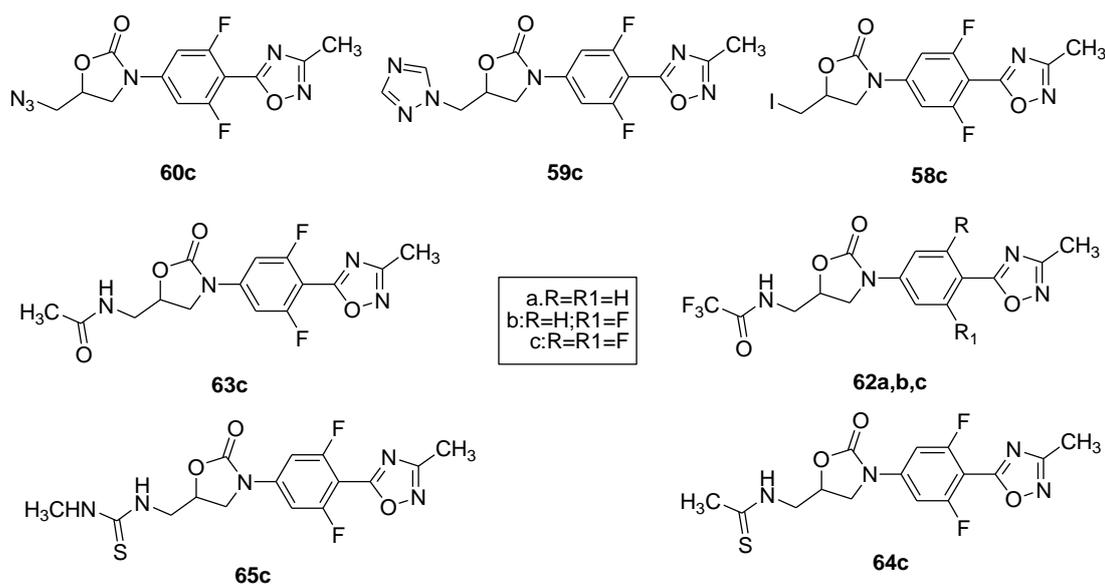


Inizialmente abbiamo ricavato il semicarbazone **99 a-f**, che per successiva ciclizzazione ossidativa a 2-ammino-5-fenil-1,3,4-ossadiazolo e reazione di acilazione ha portato ai prodotti attesi **102 a'-g'**. Le metodiche utilizzate consentono di ottenere sia i 20 prodotti finali e intermedi con rese soddisfacenti senza effettuare purificazione e questo consente un notevole risparmio in termini di materiali e solventi. Tra i composti sintetizzati e testati, il composto **102cb'** si è rivelato attivo su diversi ceppi. Gli altri derivati risultano, invece, essere meno potenti.

## 4. APPENDICE- ATTIVITA' BIOLOGICA

Le nuove serie di derivati, così sintetizzati, sono stati sottoposti ad uno screening biologico per valutare la loro attività nei confronti di diversi ceppi batterici, sia isolati clinici che standard. Le attività antimicrobiche, riassunte nelle tabelle, sono state determinate mediante il metodo "gold standard" della brodo microdiluizione, seguendo le raccomandazioni del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Le concentrazioni minime inibenti (MIC) sono state espresse in valori µg/mL. Di seguito sono riportati i dati ottenuti dai saggi biologici sulle molecole più attive tralasciando, in alcuni casi, i derivati che in tutti i saggi hanno mostrato valori di MIC superiori a 128 µg/mL.

### Derivati ossadiazolici del Linezolid

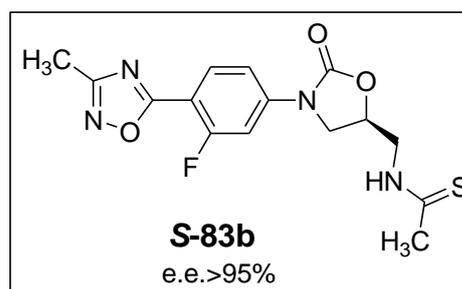


Composti	58c	59c	60c	62a	62b	62c	63c	64c	65c	LNZ
<b>10 Ceppi MR-CoNS LZD-R</b>										
<b>Mic-range</b>	128 - >128	>128	>128	16 - >128	128 - >128	64 >128	16- >128	4- >128	8-64	1-32
<b>MIC50</b>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	32	16
<b>MIC90</b>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	64	32	16
<b>40 Ceppi isolati clinici MRSA LZD-S</b>										
<b>Mic-range</b>	128 - >128			64- >128	32- >128	64- >128	16- >128	4- >128	2- >128	1-4
<b>MIC50</b>	>128			64	128	128	16	8	4	2
<b>MIC90</b>	>128			128	128	>128	32	16	8	2

La tabella riporta le attività in vitro per i composti sintetizzati vs 40 ceppi isolati clinici batterici, *Staphylococcus aureus* Meticillino-resistenti (MRSA) e sensibile al Linezolid e 10 ceppi di *Staphylococcus* Meticillino-resistenti coagulasi-negativi (MR-CoNS) resistenti al Linezolid. Questa tabella mostra che i composti **64c** e **65c** presentano i risultati migliori. L'importanza di questi risultati si basa sul fatto che l'identificazione di nuove strutture attive contro ceppi isolati clinici MRSA rappresenta un problema di salute pubblica urgente. I composti sintetizzati sono stati testati anche su alcune colture batteriche resistenti al Linezolid. La tabella mostra come l'attività dei composti studiati **62a**, **62b**, **63c**, **64c** sia abbastanza buona, mentre **65c** mostra valori di attività comparabili a Linezolid. Nel confronto con Linezolid si deve tener conto che i composti saggiati sono stati utilizzati come miscela racemica, quindi l'attività antibatterica è probabilmente sottostimata rispetto alla potenza dell'enantiomero attivo puro.

### Sintesi asimmetrica di derivati ossadiazolici del Linezolid

Ceppi	S-83b	LZD
ATCC <i>S. aureus</i> 29213	<b>4</b>	<b>4</b>
ATCC <i>E. faecalis</i> 29212	<b>2</b>	<b>1</b>
11 CoNS linezolid-resistenti		
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 1	<b>8</b>	<b>64</b>
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 2	<b>8</b>	<b>64</b>
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 3	<b>4</b>	<b>64</b>
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 4	<b>4</b>	<b>64</b>
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 5	<b>2</b>	<b>64</b>
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 6	<b>4</b>	<b>32</b>
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 7	<b>8</b>	<b>32</b>
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 8	<b>2</b>	<b>32</b>
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 9	<b>1</b>	<b>32</b>
<i>S. epidermidis</i> Ceppo 10	<b>4</b>	<b>32</b>
<i>S. hominis</i> Ceppo 11	<b>4</b>	<b>32</b>
MIC-range	<b>1-8</b>	<b>32 – 64</b>
MIC <sub>50</sub>	<b>4</b>	<b>32</b>
MIC <sub>90</sub>	<b>8</b>	<b>64</b>
45 MRSA Linezolid-sensibili		
MIC <sub>50</sub>	<b>0.5</b>	<b>2</b>



Linezolid è stato usato come antibiotico di riferimento. I saggi sono stati eseguiti usando il composto nella forma di singolo enantiomero. Nel dettaglio i ceppi batterici saggiati sono i ceppi standard di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 2921; 11 ceppi resistenti al Linezolid e 45 ceppi sensibili al Linezolid ma resistenti alla Meticillina (MRSA). Il composto testato ha mostrato valori di MIC soddisfacenti sui ceppi testati. Il dato importante è il valore di MIC<sub>50</sub> per i ceppi resistenti al Linezolid che presentano una riduzione di MIC da 32 a 4 µg/mL e per ceppi sensibili al Linezolid una riduzione di MIC da 2 a 0,5 µg/mL.

Esperimenti in vitro di citotossicità mostrano una vitalità cellulare simile al Linezolid con un minor numero di effetti sull'inibizione della sintesi delle proteine mitocondriali nei mammiferi, quindi non è citotossico.

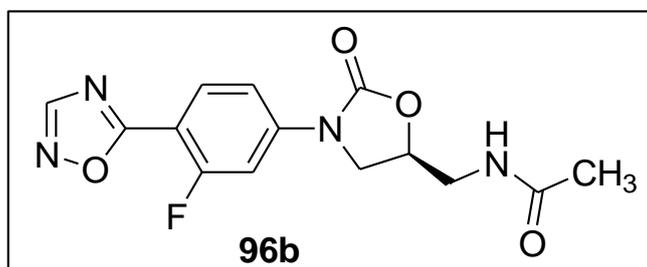
Il composto **83b**, inoltre, è stato testato anche su altri organismi in un range tra 0.063 e 128 µg/mL. E' stato

osservato il valore MIC 0.25 µg/mL contro *Bacillus anthracis*. E' stata osservata una moderata attività contro *Y. pestis* con valori di MIC pari a 128 µg/mL. Invece,

ORGANISMI	CEPPI	S-83b	DOX
<i>Bacillus anthracis</i>	Ames	0.250	0.031
<i>Burkholderia mallei</i>	China 7	>128	0.125
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	DD503	>128	2.000
	K96243	>128	1.000
	026b	>128	1.000
<i>Francisella tularensis</i>	SCHU S4	>128	0.250
<i>Yersinia pestis</i>	CO92	128.0	2.000

non è stata osservata nessuna attività biologica contro *B. mallei*, *B. pseudomallei*, e *F. tularensis*. Il confronto con l'antibiotico doxicillina è stato eseguito in un range da 16 a 0.008 µg/mL, e la sua attività antibatterica è stata confermata per ogni organismo testato.

### Confronto biologico con il composto 96b



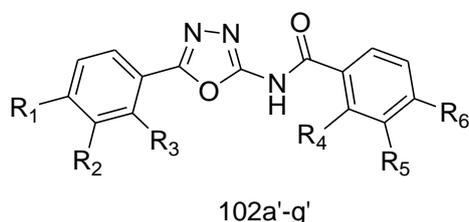
I saggi sono stati condotti su ceppi batterici *Staphylococcus epidermis* resistenti a Linezolid (LZD-R Epi), *Staphylococcus aureus* resistenti a Linezolid e Meticillina (LZD-R MRSA), Enterococchi resistenti a Linezolid e Vancomicina (LZD-R VRE), *Staphylococcus hominis* resistenti a Linezolid (LZD-R Hom), *Staphylococcus aureus* resistenti a Meticillina (MRSA) e *Staphylococcus aureus* sensibile a Meticillina (MSSA). I risultati sono stati confrontati con il Linezolid e con il composto **S-83b** che è l'analogo metilato. Dalla tabella si evince come la sostituzione dell'idrogeno con un gruppo metilico permettere di ottenere un prodotto con valori di MIC soddisfacenti anche confrontati con il Linezolid. I valori di MIC sono compresi in un range di 0,25-8 µg/mL.

Concentrazioni minime inibenti (MIC, espresse in valori µg/mL) dei composti rivelatisi attivi verso ceppi batterici. MIC range: 0.06 – 128 mcg/mL

CEPPI	FENOTIPO	MIC (µg/mL) 96b	MIC (µg/mL) LZD	MIC (µg/mL) S-83b
<i>S. epidermidis</i> 38261	Clinical strain	16	4	0.5
<i>S. epidermidis</i> 3226	Clinical strain	2	2	0.5
<i>E. faecalis</i> 4148	Clinical strain	8	2	0.25
<i>E. faecalis</i> 4791	Clinical strain	8	4	0.5
<i>S. epidermidis</i> 3715	Clinical strain	4	2	0.25
<i>E. faecalis</i> 3826	Clinical strain	8	4	0.5
<i>S. epidermidis</i> 4149	Clinical strain	2	2	0.25
<i>S. epidermidis</i> α99	LZD-R Epi	≥256	64	4
<i>S. epidermidis</i> α560	LZD-R Epi	≥256	128	4
<i>S. epidermidis</i> α758	LZD-R Epi	128	64	2
<i>S. epidermidis</i> α657	LZD-R Epi	≥256	64	4
<i>S. epidermidis</i> α1453	LZD-R Epi	≥256	128	4
<i>S. epidermidis</i> G1027	LZD-R Epi	32	16	2
<i>S. epidermidis</i> G1054	LZD-R Epi	128	64	8
<i>S. hominis</i> α26	LZD-R Hom	128	64	2
<i>S. aureus</i> FM80	LZD-R MRSA	64	64	4
<i>S. aureus</i> GD76	LZD-R MRSA	8	8	2
VRE 1	LZD-R VRE	≥256	≥256	8
VRE 2	LZD-R VRE	128	64	8
VRE 5	LZD-R VRE	32	16	1
VRE 12	LZD-R VRE	≥256	≥256	8
VRE 18	LZD-R VRE	128	64	4
<i>S. aureus</i> 43300	MRSA	8	4	0.5
<i>S. aureus</i> 44674	MRSA	8	4	0.5
<i>S. aureus</i> 68885	MRSA	16	8	2
<i>S. aureus</i> 39909	MRSA	8	4	1
14223	MRSA	8	4	1
<i>S. aureus</i> MU50	MRSA-VISA	8	4	0.5
<i>S. aureus</i> 69856	MSSA	8	4	0.5
<i>S. aureus</i> 39249	MSSA	8	4	0.5
<i>S. aureus</i> 60018	MSSA	8	4	0.5
13830	MSSA	8	4	1

## Sintesi di composti ossadiazolici con attività antibatterica

---



**a'** R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=H

**b'** R<sub>4</sub>=Cl, R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=H

**c'** R<sub>4</sub>=F, R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=H

**d'** R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=Cl, R<sub>6</sub>=H

**e'** R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=F, R<sub>6</sub>=H

**f'** R<sub>4</sub>=R<sub>6</sub>=Cl, R<sub>5</sub>=H

**g'** R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub>O, R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=H

Dei composti ottenuti è stata saggiata l'attività antibatterica verso ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibili (MSSA) o meticillino-resistenti (MRSA). In particolare il ceppo standard di riferimento *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* M923 sono stati usati come ceppi MSSA. Fra gli MRSA, *S. aureus* Mu50 (ATCC 700699) ceppo di riferimento standard e due ceppi da collezione (433 e F511) sono stati utilizzati per le prove di sensibilità. Tra i composti sintetizzati e testati, il composto **102cb'** si è rivelato attivo su diversi ceppi. I derivati **102bb'**, **102bc'**, **102ab'**, **102ac'**, **102ac'**, **102db'**, **102eb'**, **102fb'** sono meno potenti. In generale, la rimozione del cloro diminuisce l'attività, come nel caso del composto **102ca'**.

Concentrazioni minime inibenti (MIC, espresse in valori µg/mL) dei composti rivelatisi attivi verso ceppi batterici.

CEPPI	102aa'	102cb'	Linezolid	Cefuroxime
<b>ATCC <i>S.aureus</i> 29213</b>	4	≤0,06	4	
<b>BAA1026 <i>S. aureus</i></b>	8	≤0,06	2	
<b>ATCC 29212 <i>E. faecalis</i></b>	4	≤0,06	1	
<b>ATCC 43300 <i>S. aureus</i></b>	8	≤0,06	2	
<b>ATCC 35218 <i>E. coli</i></b>	128	>128		8
<b>ATCC 12453 <i>P. mirabilis</i></b>	128	>128		0,5
<b><i>P. aeruginosa</i> (clinico)</b>	>128	>128		>128
<b><i>S.aureus</i> FS 1</b>	8	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> FS 2</b>	4	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> FS 3</b>	8	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> MI 1</b>	8	0,12	2	
<b><i>S.aureus</i> MI 2</b>	4	≤0,06	1	
<b><i>S.aureus</i> MI 3</b>	4	≤0,06	1	
<b><i>S.aureus</i> CV 1</b>	8	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> CV 2</b>	8	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> CV 3</b>	4	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> VD 1</b>	4	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> VD 2</b>	8	≤0,06	4	
<b><i>S.aureus</i> VD 3</b>	8	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> MS 1</b>	8	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> MS 2</b>	8	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> MS 3</b>	4	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> LI 1</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> LI 2</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> LI 3</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> BM 1</b>	ND	≤0,06	1	
<b><i>S.aureus</i> BM 3</b>	ND	≤0,06	1	
<b><i>S.aureus</i> PF 1</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> FD 1</b>	ND	≤0,06	1	
<b><i>S.aureus</i> FD 2</b>	ND	≤0,06	1	
<b><i>S.aureus</i> FD 3</b>	ND	≤0,06	1	
<b><i>S.aureus</i> CTS 1</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> CTS 2</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> CTS 3</b>	ND	≤0,06	1	
<b><i>S.aureus</i> BM 2</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> PF 2</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> PF 3</b>	ND	≤0,06	1	
<b><i>S.aureus</i> AA 1</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> AA 2</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> AA 3</b>	ND	≤0,06	2	
<b><i>S.aureus</i> FB 1</b>	ND	≤0,06	2	

Concentrazioni minime inibenti (MIC, espresse in valori µg/mL) dei composti rivelatisi attivi verso ceppi batterici

CEPPI	102ab'	102ac'	102ag'	102ae'	102ca'	Clindamicina	102c c'	102cb '	Ciprofloxacina
<b>ATCC <i>S.aureus</i> 29213</b>	1	4	>128	1	2	0,25	2	2	0,5
<b>ATCC <i>S. aureus</i> 43300</b>	1	8	>128	2	2	>128	2	0,5	0,5
<b>ATCC <i>S. aureus</i> MU50</b>	2	4	>128	2	2	>128	1	0,12	128
<b>ATCC <i>E.faecalis</i> 29212</b>	1	4	>128	2	2	>128	2	0,12	0,5
<b>ATCC <i>S.aureus</i> BAA 977</b>	2	4	>128	2	2	0,25	1	0,25	0,25
<b>ATCC <i>S. aureus</i> BAA1026</b>	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	8
<b>ATCC <i>S.aureus</i> 25923</b>	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128	0,12
<b>ATCC <i>E. coli</i> 25922</b>	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128	≤ 0,06
<b>ATCC <i>P.aeruginosa</i> 27853</b>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	0,5
<b><i>S. hominis</i> α 26</b>	2	8	>128	2	2	1	2	2	64
<b><i>S. epidermidis</i> α 99</b>	2	8	128	2	2	1	2	1	128
<b><i>S. epidermidis</i> α 560</b>	2	8	>128	2	4	1	8	2	128
<b><i>S. epidermidis</i> α 657</b>	4	8	>128	2	2	2	8	8	128
<b><i>S. epidermidis</i> α 758</b>	2	8	128	2	4	1	4	0,5	128
<b><i>S. epidermidis</i> α 1453</b>	2	8	128	2	2	0,5	2	0,25	128
<b><i>S. epidermidis</i> G 220</b>	2	8	128	2	4	0,5	4	1	64
<b><i>S. epidermidis</i> G 1027</b>	2	4	>128	2	2	>128	2	2	64
<b><i>S. epidermidis</i> G 1054</b>	0,5	2	>128	1	1	0,25	4?	0,25	64
<b><i>S. epidermidis</i> CT 20 (2) cfr+</b>	1	4	>128	2	2	128	2	1	64
<b><i>S. aureus</i> FA22 isolato 1</b>	1	4	>128	4	1	0,12	2	1	2
<b><i>S. aureus</i> MS20 isolato 2</b>	0,5	2	>128	1	1	0,25	1	0,12	16
<b><i>S. aureus</i> SF32 isolato 1</b>	2	4	>128	2	2	≤ 0,06	2	0,5	128
<b><i>S.aureus</i> AG25 isolato 1</b>	1	4	>128	1	2	0,25	0,5	0,25	128
<b><i>S. aureus</i> AG25 isolato 3</b>	1	8	>128	1	1	≤ 0,06	1	1	128
<b><i>S. aureus</i> SF19 isolato 1</b>	1	4	>128	1	1	≤ 0,06	0,5	0,12	64
<b><i>S. aureus</i> CV1</b>	2	4	>128	2	2	>128	2	1	64
<b><i>S. aureus</i> MI1</b>	1	4	>128	1	2	0,5	2	0,25	64
<b><i>S. aureus</i> PF1</b>	0,5	4	>128	1	2	≤ 0,06	2	0,5	128
<b><i>S. aureus</i> FD1</b>	0,5	2	>128	1	1	≤ 0,06	0,5	0,25	16

## **5. CONCLUSIONI**

In linea generale, i test biologici effettuati sulle molecole progettate e sintetizzate hanno confermato che, sebbene gli approcci computazionali siano estremamente di aiuto per la restrizione del numero delle molecole potenzialmente attive, non è possibile paragonare esclusivamente dal punto di vista computazionale la potenziale attività di molecole con punteggi simili di virtual screening.

È proprio in questo campo che l'accessibilità sintetica di una serie di derivati risulta fondamentale per ampliare il panorama di molecole sulle quali effettuare quantomeno i test biologici preliminari per una ulteriore selezione dei potenziali farmaci.

La strategia sintetica verso un determinato target molecolare non deve pertanto seguire solo i criteri di maggiore resa o migliore economicità del processo ma deve anche considerare la versatilità del processo stesso nel potere essere modificato per l'ottenimento di vari derivati. Il progetto sintetico, idealmente, dovrebbe quindi prevedere precursori facilmente accessibili nelle varie versioni funzionalizzate, o intermedi di reazione facilmente funzionalizzabili a seconda di esigenze che possano scaturire da successivi studi farmacologici sulle molecole bioattive (ad esempio, inserimento di gruppi idrofili, ecc.).

In questo progetto di dottorato, questi requisiti sono stati mantenuti all'interno delle strategie seguite per ottenere i tre obiettivi principali.

In particolare, la strategia sintetica basata sulla reazione asimmetrica di Henry Cu(II)-catalizzata è stata svolta in presenza di un ligando economico e facilmente reperibile. Il Linezolid è stato ottenuto con una resa soddisfacente e con un elevato eccesso enantiomerico. Tale strategia è facilmente modificabile per l'ottenimento di derivati ossazolidinonici simili al Linezolid, come dimostrato dalla sintesi del derivato lattamico omologo del Linezolid, che però non ha dimostrato sufficiente attività biologica

Per quanto riguarda i derivati 1,2,4-ossadiazolici, le strategie sintetiche utilizzate si sono inizialmente focalizzate sulla diversità dei gruppi funzionali presenti in catena laterale e sull'anello ossadiazolico con l'obiettivo di massimizzare le rese in miscela racemica.

Sulla base dei risultati biologici dei composti più attivi è stato quindi messo a punto una strategia di sintesi asimmetrica che ha permesso di ottenere i nuovi derivati in buone rese e come singoli enantiomeri.

In particolar modo il derivato con l'anello B monofluorurato e la catena laterale tioacetammidometilica ha mostrato una potenza superiore al Linezolid verso ceppi MRSA LNZ-S ed elevata attività contro agenti patogeni Gram-positivi LNZ-R.

Infine, sulla base di recenti studi computazionali che hanno paragonato alla struttura del Linezolid le strutture presenti in un database ristretto di composti eterociclici, sono stati sintetizzati dei nuovi composti contenenti come anello eterociclico centrale un sistema 1,3,4-ossadiazolico. I test di attività su diversi ceppi batterici anche multiresistenti hanno dimostrato che tali composti possono costituire un potenziale scaffold da ottimizzare per lo sviluppo di nuovi antibiotici.

## **6. PARTE SPERIMENTALE**

### **Metodi generali e materiale**

I punti di fusione sono stati determinati con un apparato Reichart-Thermovar hotstage su piastra Kofler e non sono corretti. Gli spettri IR (Nujol) sono stati registrati con uno spettrofotometro Shimadzu FTIR-8300; gli spettri  $^1\text{H}$  NMR sono stati registrati con uno spettrometro BRUKER 200, 250, 300 MHz Avance, con TMS come standard interno. Le separazioni cromatografiche sono state eseguite su gel di silice (Merck, 0.040–0.063 mm) utilizzando come eluente miscele di etile acetato ed etere di petrolio (frazione p.e. 40–60°C) in diversi rapporti. Tutti i solventi in commercio sono stati tutti utilizzati senza ulteriore purificazione.

### **REAZIONE NITROALDOLICA DI HENRY PER OTTENERE LINEZOLID E DERIVATI**

#### **Sintesi composto 33**

Ad una soluzione di 32 (4,02 mmoli; 788 mg) in dicloroetano (25 mL), viene aggiunta dimetossiacetaldeide (60% in peso in acqua; 1.5 equiv., 6.03 mmol, 907 mL). Alla miscela si aggiungono i setacci molecolari 4° (200 mg) e la miscela viene mantenuta sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 1 h. Viene aggiunto  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (1.3 equiv., 5,23 mmoli, 1,17 g) a porzioni e la soluzione rimane ad agitare per 1 ora a temperatura ambiente. La miscela viene filtrata e il residuo lavato con dicloroetano (30 mL). Il filtrato viene evaporato e purificato tramite colonna cromatografica. Si ottengono 1.00 g, 95% di resa; p.f.: 72-73 °C;  $^1\text{H}$ -NMR (250 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.98 (t, J=6 Hz, 4H), 3.20 (d, J= 7Hz, 2H), 3.42 (s, 6H), 3.87 (t, J= 6 Hz, 4H), 4.56 (t, J = 7 Hz, 1H), 6,34-6,45 (m, 2H), 6,80-6,89 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (62.5MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  46,5, 52,5, 54,6, 67,8, 102,4 (d, J=24 Hz), 103,2, 109,2, 121.1, 131.6 (d, J=10 Hz), 145,4 (d, J=10 H) 157.7 (d, J=244 Hz); MS (m/z): 284 (M+).

#### **Sintesi di composti 34**

Ad una soluzione di 33 (1,00 g, 3,52 mmoli) vengono aggiunti acetonitrile (20 mL), DIPEA (1 equiv., 3,52 mmoli, 613 mL) ed etilcloroformiato (1,25 equiv., 4,40 mmol, 429 mL). Dopo 24 ore sotto agitazione a temperatura ambiente, la miscela di reazione viene diluita con acqua ed estratta con acetato di etile. La fase organica

viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 1,23 g, 98% di resa; p.f.: olio;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.23 (bt, 3H), 3,08-3,11 (m, 4H), 3.33 (s, 6H), 3.70 (D,  $J = 6$  Hz, 2H), 3,86-3,89 (m, 4H), 4.16 (bq, 2H), 4.58 (t,  $J=6$  Hz, 1H), 6,88-6,98 (m, 3H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (62,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14,5, 50.8, 51.7, 53.7, 61.8, 66.9, 101.8, 115.7 (d,  $J = 25$  Hz), 118,2, 123.0, 136.9 (d,  $J=12$  Hz), 138,3 (d,  $J = 6$  Hz), 154,9 (d,  $J=250$  Hz), 155.6; MS (m / z): 356 (M +).

### **Sintesi composto 27**

Ad una soluzione di 34 (3,43 mmol , 1,22 g ) viene aggiunto acetonitrile ( 25 mL ), HCl ( 20 % in peso , 1,5 mL). Dopo 24 ore sotto agitazione a temperatura ambiente , la miscela di reazione viene neutralizzata con una soluzione satura di  $\text{NaHCO}_3$  ed estratta con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. I dati sono coerenti con quelli precedentemente riportati in letteratura.<sup>12</sup> . Si ottengono 3,957 mg, 91% di resa; p.f. : 84-86 C;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.24 (bt, 3H ), 3.08 (t ,  $J=4,5$  Hz , 4H), 3.87 (t ,  $J=4,5$  Hz , 4H ), 4.15- 4,25 (m , 2H), 4,37 (s, 2H ), 6,88-6,98 (m, 3H), 9.69 (s, 1H ).

### **Procedura generale reazione enantioselectiva di Henry: sintesi composto 28**

In una provetta viene aggiunto a  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \times \text{H}_2\text{O}$  (9,9 mg, 0,05 mmol) una soluzione di ligando (0,055 mmol) in EtOH assoluto (2 mL) e la miscela viene agitata per 1 h a temperatura ambiente. Si forma una soluzione blu alla quale viene aggiunto il nitrometano (5 mmol, 0,27 mL) e il sistema viene introdotto in un bagno a varie temperature. Viene aggiunta aldeide 27 (0,5 mmol), DIPEA (0,5 mmol, 82 mL) e la miscela di reazione si lascia ad agitare per il tempo riportato in Tabella. Il solvente è stato evaporato e purificato tramite colonna cromatografica. Si ottengono 141 mg, 76% di resa; p.f.: 113-114 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  1.84(t,  $J = 8,4$  Hz, 3H), 3.06 (t,  $J = 4,8$  Hz, 4H), 3.59 (dd,  $J_1 = 17.1$  Hz,  $J_2 = 8.7$  Hz, 1H), 3,71-3,81 (m, 5H), 4.10 (q,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 4.31-4.51 (m, 2H), 4,82 (dd,  $J_1 = 14,5$  Hz,  $J_2 = 2,2$  Hz, 1H), 5.74 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 7,02-7,10 (m, 1H), 7,17 (dd,  $J_1= 8.7\text{Hz}$ ,  $J_2 = 2,3$  Hz, 1H), 7,28 (dd,  $J_1= 14,1$  Hz,  $J_2=2,3$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  14.2, 50.2, 50.3, 52.9, 61.1, 66.0, 79.3 , 115.3 (d,  $J = 22$  Hz), 118.4 ( d,  $J = 4$  Hz ), 123.4 (d,  $J = 3$  Hz),136,2 (d,  $J = 10$  Hz), 137.9 (d,  $J = 8$  Hz ) , 153.9 ( d,  $J = 243$  Hz), 155,8 ; MS ( m / z ) : 371 ( M + ). ee = 72 %; HPLC ( Daicel CHIRALPAK AS

- H, esano / i- PrOH = 70 : 30, flusso 0.8 mL min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 254$  nm);  $t_R$ ( major) = 71.2 min;  $t_R$ (minor) = 52,6 min .

### Sintesi composti 37 a,b

Ad una soluzione di 28 (185 mg, 0,5 mmol) viene aggiunto MeOH (20 mL), Pd/C (5%, 50 mg) e la miscela viene ridotta al Parr sotto H<sub>2</sub> (40 psi) per 3 ore a temperatura ambiente. La miscela di reazione viene filtrata su un setto di celite ed evaporata. Senza ulteriore purificazione, viene sciolto in diclorometano (10 mL), Ac<sub>2</sub>O (1 equiv., 0,5 mmoli, 50 mL) e DIPEA (1,1 equiv., 0,55 mmol, 95 mL). La miscela di reazione viene trattata con una soluzione di NaHCO<sub>3</sub> satura (20 mL). La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica dando il composto 37 a,b.

Composto 37a. Si ottengono 124 mg, 63% di resa; p.f.: olio; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.92 (t, J = 8,4 Hz, 3H), 2.02 (s, H), 3,07-3,17 (m, 5H), 3,57-3,76 (m, 3H), 3,81-3,88 (m, 6H), 4.13 (q, J = 8,4 Hz, 2H), 6.39 (bs, 1H), 6,84-6,93 (M, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (62,5 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.4, 23.1, 43.1, 50.8, 53.9, 62.4, 66.9, 70.0, 115.5 (d, J=22 Hz), 118,6, 123,1, 136,2 (d, J=10 Hz), 138.9 (d, J=8 Hz), 155.0 (d, J=246 Hz), 157,1, 171,7; MS (m / z): 383 (M +). ee = 72%; HPLC (Daicel CHIRALPAK AS-H, esano / i-PrOH = 70: 30, flusso 0.8 mL min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 254$  nm);  $t_R$  (major) = 70.2 min;  $t_R$ (minor) = 93,6 min.

Composto 37b. Si ottengono 25 mg, 12% di resa; p.f.: olio; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  1.12 (t, J ¼ 6.9 Hz, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 2.98–3.08 (m, 5H), 3.63–3.81 (m, 6H), 3.71–3.81 (m, 5H), 4.03 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 4.89–4.94 (m, 1H), 6.98–7.09 (m, 3H), 7.94 (t, J = 6.1 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  14.2, 20.6, 22.3, 50.3, 50.4, 50.7, 61.2, 66.0, 70.8, 114.9 (d, J = 22 Hz), 118.4, 123.1, 135.9, 137.8 (d, J = 8 Hz), 153.9 (d, J = 243 Hz), 154.6, 169.3, 169.7; MS (m/z): 425 (M+). ee =72%; HPLC (Daicel CHIRALPAK AS-H, esano/i-PrOH ¼ 70 : 30, flusso 0.8 mL min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 254$  nm); (major) =  $t_R$  20.8 min;  $t_R$  (minor) = 16.9 min.

### Sintesi Linezolid

Al composto 37 a,b (1 mmol) viene aggiunto EtOH assoluto (5 mL) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 mmol) e la miscela viene lasciata agitare per 3 h a temperatura ambiente. La miscela di reazione neutralizzata con HCl 1 M ed estratta con etile acetato. La fase organica viene evaporata e cristallizzata in i-PrOH, dando Linezolid (93% in resa per il

composto 37a; 91% in resa per il composto 37b). I dati per il Linezolid sono coerenti con quelli precedentemente riportati in letteratura.

Linezolid p.f : 181-182 °C [lett 181,5-182,5 °C ] ;  $^1\text{H-NMR}$  ( 300 MHz ;  $\text{CDCl}_3$  )  $\delta$  2.02 (s , 3H ), 3.06 (t , J = 4,7 Hz , 4H), 3.61- 3.78 (m , 3H) , 3.87 (t , J = 4,7 Hz , 4H ) , 4.03 (t , J = 9,0 Hz , 1H) , 4,72-4,82 ( m , 1H ) , 6,17 ( bt , 1H , ) , 6,93 (t, J = 9,0 Hz, 1H), 7,08 (dd,  $J_1 = 9,0$  Hz,  $J_2 = 2,5$  Hz, 1H), 7,44 (dd,  $J_1 = 14,4$  Hz ,  $J_2 = 2,5$  Hz , 1H); ee=71 % ; HPLC ( Daicel CHIRALPAK - IA , esano / i- PrOH = 70 : 30 , flusso 0.8 mL min<sup>-1</sup> ,  $\lambda = 254$  nm );  $t_R$  ( major)  $\frac{1}{4}$  14.1 min ;  $t_R$  ( minor) =16,4 min. Un campione di (S)-Linezolid (ee > 98 % ) nelle medesime condizioni HPLC ha dato un  $t_R = 14.1$  min .

### Sintesi composto 35b

In un pallone con un sistema di Dean-Stark ,una soluzione di (-)Canfor (6,0 g, 41,8 mmoli), picolilamine (4,27 mL, 41,8 mmol) e  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$  ( 0,24 mL) in toluene (95 mL) viene lasciata a refluxo sotto azoto per 12 h. La miscela di reazione viene diluita con EtOAc, trattata con una soluzione acquosa satura di  $\text{NaHCO}_3$  ed evaporata . Viene purificato con colonna cromatografica dando il ligando 7b. I dati per il ligando 35b sono coerenti con quelli precedentemente riportati in letterature. Si ottengono 8,6 g , 85% di resa; p.f: olio;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.78 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1,20-1,28 (m, 1H), m 1,37-1,47 (m, 1H), 1.72 (td,  $J_1 = 13,0$  Hz,  $J_2 = 4,2$  Hz, 1H), 1.83- 2.03 (m, 3H), 2,40-2,47 (m, 1H), 4.57 (d,  $J = 13,4$  Hz, 1H), 4.63 (d,  $J = 13,4$  Hz, 1H), 7,10-7,15 (m, 1H), 7.50 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 7.62- 7.69 (m, 1H), 8.52 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H).

### Sintesi composto 36b

Ad una soluzione di imminopiridina 35b (1,00 g, 4,13 mmol) e  $\text{NiCl}_2$  (1,09 g, 8,26 mmol) in MeOH (60 mL) viene aggiunto a porzioni boroidruo di sodio (1,59 g, 4,13 mmoli) a 30 °C sotto azoto. Dopo 2 h, il solvente viene evaporato e purificato tramite colonna cromatografica per dare il ligando 36b. I dati per il ligando 36b sono coerenti con quelli precedentemente riportato in letteratura. Si ottengono 584 mg, 58% di resa; p.f: olio;  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.80 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 1.01-1.06 (m, 5H), 1.43-1.67 (m, 5H), 2.03 (br s, 1H), 2.55-2.61 (m, 1H), 3.75 (d,  $J = 14,2$  Hz, 1H), 3.88 (d,  $J = 14,2$  Hz, 1H), 7.08-7.14 (m, 1H), 7.32 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 7.61 (td,  $J = 7,5, 1,8$  Hz, 1H), 8.49-8.53 (m, 1H).

## DERIVATI OSSADIAZOLICI DEL LINEZOLID

### Sintesi composto 55c

Ad una soluzione di acetamidossima (1.00 g; 13.5mmol) in acetone (35 mL) viene aggiunto 2,4,6-trifluorobenzoil cloruro (14.8 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.05 g, 14.8 mmol). La miscela viene lasciata ad agitare a temperature ambiente per 90 minuti. Il solvente viene evaporato e trattato con acqua, si forma un precipitato che viene filtrato. Senza ulteriore purificazione viene scaldato a 130°C per 60 minuti in un tubo chiuso. Viene purificato tramite colonna cromatografica. Otteniamo un olio, resa 62%. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 2.52 (s,3H); 6.85-7.27 (m, 2H); C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O (%): C, 50.70 (50.47); H, 2.35 (2.34); N, 13.26(13.08).

### Sintesi composto 56c

Ad una soluzione di 55c (1.16 mmol) in DMSO (5 mL) viene aggiunta allilammina (445 μL; 338 mg; 5.8 mmol). La reazione viene lasciata ad agitare per 3 ore: La soluzione viene trattata con acqua ed estratta con EtOAc. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottiene un olio, resa 47%. IR (Nujol) ν 3335, 1630, 1505, 1459 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.36 (s, 3H); 3.78-3.82 (m, 2H); 5.15 (dd, J<sub>1</sub>=10.2 Hz, J<sub>2</sub>=1.2 Hz, 1H); 5.23 (dd, J<sub>1</sub>=17.1 Hz, J<sub>2</sub>=1.5 Hz, 1H); 5.80-5.90 (m, 1H); 6.41 (d, J=12.9, 2H); 7.42 (t, 1H); C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O (%): C, 58.00 (57.37); H, 4.55 (4.38); N, 16.86 (16.73).

### Sintesi composto 57c

Ad una soluzione di 56c (0.39 mmol) in ACN (20 mL) viene aggiunto di-tert-butil dicarbonato (907 μL; 866 mg; 3.9 mmol) e 4-dimetilamminopiridina (475 mg; 3.9 mmol) viene posto a refluxo per 1h. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottiene un olio, resa 91%. IR (Nujol) ν 3082, 1715, 1618, 1590, 1496 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 1.32 (s, 9H); 2.53 (s, 3H); 4.32-4.34 (m, 2H); 5.18-5.28 (m, 2H); 5.88-5.97 (m, 1H); 7.15-7.17 (d, J = 10.8, 2H); C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>(%): C, 58.80 (58.12); H, 5.75 (5.41); N, 12.16 (11.96).

### Sintesi composto 58c

Ad una soluzione di 57c (1.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) viene aggiunto I<sub>2</sub> (1.14 g; 4.5 mmol). La soluzione viene agitata per 24 h. Viene trattata con una soluzione Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, la fase organica viene trattata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e viene filtrata. La fase organica

viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottiene un solido bianco, resa 64%; p.f.: 138-140 °C; IR (Nujol)  $\nu$  1765, 1620, 1464  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.53 (s, 3H); 3.38-3.54 (m, 2H); 3.79-3.84 (m, 1H); 4.19-4.24 (m, 1H); 4.77-4.84 (m, 1H); 7.38-7.41 (m, 2H);  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$  (%): C, 37.15 (37.05); H, 2.55 (2.38); N, 10.16 (9.98).

### Sintesi composto 60c

Ad una soluzione di 58c (1.35 mmol) in DMF (10 mL) viene aggiunto  $\text{NaN}_3$  (704 mg; 10.8 mmol). La soluzione viene lasciata ad agitare per 24 h. Viene trattata con acqua ed estratta con EtOAc. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottiene un solido bianco 92%; p.f.: 135-137 °C; IR (Nujol)  $\nu$  2110, 1762, 1635  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.53 (s, 3H); 3.64 (dd,  $J_1 = 13.5$ ,  $J_2 = 3.9$ , 1H); 3.80 (dd,  $J_1 = 13.2$ ,  $J_2 = 4.2$ , 1H); 3.91 (dd,  $J_1 = 9.0$ ,  $J_2 = 6.0$ , 1H); 4.10-4.15 (m, 1H); 4.86-4.91 (m, 1H); 7.40 (d,  $J = 10.8$ , 2H);  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_3$  (%): C, 46.60 (46.43); H, 3.15 (2.98); N, 25.12 (25.00).

### Sintesi composto 61c

Ad una soluzione di 60c (0.30 mmol) in THF (5 mL) viene aggiunta  $\text{PPh}_3$  (105 mg; 0.40 mmol). La soluzione viene lasciata ad agitare per 5 h. Vengono aggiunti 4 mL di acqua distillata e viene lasciato a reflusso per 2 h. Il THF viene evaporato, il residuo ottenuto viene neutralizzato con HCl ed estratto con EtOAc. La fase acquosa viene trattata con una soluzione di NaOH (pH~9) ed estratta con EtOAc. La fase organica viene evaporata. Si ottiene il prodotto con resa 82%. Il prodotto viene direttamente usato per il passaggio successivo.

### Sintesi composto 63c

Ad una soluzione di 61c (0.65 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7 mL) e piridina (105  $\mu\text{L}$ ; 103 mg; 1.30 mmol) viene aggiunto cloruro di acetile (92  $\mu\text{L}$ ; 102 mg; 1.30 mmol). La soluzione viene lasciata ad agitare per 24 hours. Viene trattata con acqua acida ed estratta con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottiene un solido bianco 62%; p.f.: 194-196 °C; IR (Nujol)  $\nu$  3350, 1755, 1448  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  1.84 (s, 3H); 2.46 (s, 3H); 3.38-3.50 (m, 2H); 3.80 (dd,  $J_1 = 9.0$ ,  $J_2 = 7.2$ , 1H); 4.15-4.23 (m, 1H); 4.76- 4.88 (m,

1H); 7.59 (d, J=12.2, 2H); 8.29 (t, 1H, J = 4.4); C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (%): C, 51.20 (51.14); H, 4.15 (3.98); N, 16.06 (15.91).

### Sintesi composto 64c

Ad una soluzione di 63c (0.43 mmol) in THF (10 mL) viene aggiunto il Reagente di Lawesson (173 mg; 0.43 mmol). La reazione viene lasciata a refluxo per 2 h. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottiene un solido bianco, resa 62%; p.f.: 178-180 °C; IR (Nujol)  $\nu$  3270, 1752, 1638 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.46 (s, 6H); 3.84-4.05 (m, 3H); 4.20-4.29 (m, 1H); 4.98-5.08 (m, 1H); 7.61 (d, J=17.4, 2H); 10.42 (bs, 1H); C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (%): C, 49.05 (48.91); H, 3.98 (3.80); N, 15.36 (15.22).

### Procedure generali per la preparazione dei composti 62a, 62b e 62c

I composti 61a, 61b e 61c (0.42 mmol) sono stati sciolti in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL); viene aggiunta anidride trifluoro acetica (117  $\mu$ L; 177 mg; 0.84 mmol) e piridina (68  $\mu$ L; 67 mg; 0.84 mmol) e viene lasciato ad agitare per 24 h. Viene trattata con acqua acida ed estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica.

**62a:** Solido bianco, resa 65%; p.f.: 192-193 °C; IR (Nujol)  $\nu$  3260, 1760, 1468 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.46 (s, 3H); 3.68-3.70 (m, 2H); 3.96 (dd, J<sub>1</sub>=10.9 Hz, J<sub>2</sub>=7.40 Hz, 1H); 4.28-4.35 (m, 1H); 4.92-4.97 (m, 1H); 7.84 (d, J = 10.7 Hz, 2H); 8.18 (d, J = 10.4 Hz, 2H); 9.89 (bs, 1H); C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (%): C, 48.80 (48.65); H, 3.75 (3.51); N, 15.31 (15.14).

**62b:** Solido bianco, resa 64%; p.f.: 205-206 °C; IR (Nujol)  $\nu$  3350, 1754, 1451 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.42 (s, 3H); 3.60 (bs, 2H); 3.89 (dd, J<sub>1</sub>=9.3 Hz, J<sub>2</sub>=6.0 Hz, 1H); 4.21-4.27 (m, 1H); 4.87-4.92 (m, 1H); 7.58 (dd, J<sub>1</sub>= 9.0 Hz, J<sub>2</sub>= 2.1 Hz, 1H); 7.70 (dd, J<sub>1</sub>= 13.5 Hz, J<sub>2</sub>=1.8 Hz, 1H); 8.11-8.17 (m, 1H), 9.83 (bs, 1H); C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (%): C, 46.50 (46.39); H, 3.15 (3.09); N, 14.86 (14.43).

**62c:** Solido bianco, resa 60%; p.f.: 214-215 °C; IR (Nujol)  $\nu$  3349, 1758, 1452 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.45 (s, 3H); 3.62 (bs, 2H); 3.88 (dd, J<sub>1</sub> =14.4 Hz, J<sub>2</sub> = 9.0 Hz, 1H); 4.20-4.29 (m, 1H); 4.87-4.97 (m, 1H); 7.58 (d, J=17.4, 2H) 9.86 (bs, 1H); C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>F<sub>5</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (%): C, 44.48 (44.33); H, 3.00 (2.71); N, 13.98 (13.79).

### Sintesi composto 59c

Il composto 58c (0,59 mmol) viene scaldato in presenza di 1,2,4-triazolo (123 mg; 1,8 mmol) per 30 minuti. La miscela viene recuperata con EtOAc ed il solvente evaporato. Viene purificato tramite colonna cromatografica. Si ottiene un solido bianco, resa 48%; p.f.: 161-163 °C; IR (Nujol)  $\nu$  1751  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.52 (s, 3H); 4.12-4.24 (m, 2H); 4.61 (d,  $J=5.5$ , 2H); 5.06-5.16 (m, 1H); 7.30 (d,  $J=12.5$  Hz, 2H); 7.95 (s, 1H); 8.25 (s, 1H);  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_3$  (%): C, 49.85 (49.72); H, 3.35 (3.31); N, 23.36 (23.20).

### Sintesi composto 65c

Ad una soluzione di 61c (0.45 mmol) in THF (4 mL) e trietilammina (71  $\mu\text{L}$ ; 51 mg; 0.50 mmol) viene aggiunto metilisocianato (35  $\mu\text{L}$ ; 37 mg; 0.50 mmol). La soluzione viene lasciata ad agitare per 90 minuti. Il solvente viene evaporato e purificato tramite colonna cromatografica. Si ottiene un solido bianco, resa 30%; p.f.: 183-184 °C; IR (Nujol)  $\nu$  3375, 1744  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  2.45 (s, 3H), 2.83 (bs, 3H), 3.82-3.87 (m, 3H), 4.20 (dd,  $J_1=8.7$  Hz,  $J_2=6.0$  Hz, 1H), 4.91 (bs, 1H), 7.58-7.64 (d,  $J=17.7$  Hz, 2H), 8.09-8.20 (m, 2H);  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$  (%): C, 47.13 (47.00); H, 4.21 (3.92); N, 18.40 (18.28).

### Sintesi composto 71a

Ad una soluzione di 82 (500mg, 3,676 mmol) in DMF anidro (10 mL) si aggiunge l'acido 2-F-4-nitrobenzoico (1,02 g, 5,5 mmol, 1,5 equiv.) HOBt idrato (743 mg, 5,5 mmol, 1,5 equiv.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,5 mL, 11,09 mmol, 3 equiv.) infine si aggiunge EDC cloridrato (1,05 g, 5,5 mmol, 1,5 equiv.). Si lascia in un bagno ad olio a 90°C per 1 h. Si tratta con acqua e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 753 mg, 72% di resa.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.57 (m, 3H), 8.21 (d,  $J=9$  Hz, 4H, Ar), 8.49 (dd,  $J=9$  Hz, 1H, Ar).

### Sintesi composto 72a

Ad una una soluzione di 71a (410 mg, 1,44 mmol) in etanolo (50 mL) si aggiunge cloruro stannoso (2,6 g, 11,52 mmol, 8 equiv.). Si lascia a refluxo per 1 h. Si evapora la fase organica. Si tratta con una soluzione di NaOH per neutralizzare, si estrae con acetato di etile. Si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono

356 mg, 97% di resa.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.29 (s, 2H), 6.48-6.58(m, 2H, Ar) 7.52 (t, J= 6 Hz, 3H, Ar), 8.01 (t, J = 9 Hz, 1H, Ar), 8.18 (m, 2H, Ar).

### **Sintesi composto 73a**

Ad una soluzione di 72a (346 mg, 1,36 mmol) in ACN (4 mL) si aggiunge DMAP (250 mg, 2,04 mmol, 1,5 equiv.) e  $\text{ClCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$  ( 778  $\mu\text{L}$ , 8,16 mmol, 6 equiv.). Si lascia a temperatura ambiente per 20 h. Si evapora il solvente, si tratta con acqua e si estrae con acetato. Si ottengono 340 mg, 76% di resa.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.36 (t, J= 9 Hz, 3H), 4.29 (q, J = 9 Hz, 2H), 6.91 (s, 1H), 7.21 (dd, t, J = 9 Hz, 1H, Ar), 7.53-7.54 (m, 3H, Ar), 7.63 (dd, J = 9 Hz, 1H, Ar), 8.21-8.13(m, 3H, Ar).

### **Sintesi composto 77a**

Ad una soluzione di 73a (330 mg, 1 mmol) in acetone (10 mL) si aggiunge t-butilato di potassio (337 mg, 3 mmol, 3 equiv.) ed epibromoidrina (257  $\mu\text{L}$ , 3 mmol, 3 equiv.). Si lascia a refluxo per 4 h. Si tratta con acqua acida e si estrae con acetato. Si evapora la fase organica e si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 245 mg, 55% di resa. L'epossido viene usato per il passaggio successivo.

### **Sintesi composto 78a**

Ad una soluzione di 77a (235 mg, 0,61 mmol) in DMF ( 18 mL) si aggiunge  $\text{NaN}_3$  (119 mg, 1,83 mmol, 3 equiv. ). Si lascia in un bagno ad olio ad  $80^\circ\text{C}$  per 1 h. Si tratta con acqua e si estrae con dietilere. Si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 131 mg, 56% di resa.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.78 (dd, J=7.5 Hz, 1H), 4.24(t, J=9 Hz, 1H), 4.98-5.10 (m, 1H), 7.61-7.62 (m, 4H, Ar), 7.79 (d, J=12 Hz, 1H), 8.09-8.12 (m, 3H), 8.26 (t, J=9 Hz, 1H).

### **Sintesi composto 79a**

Ad una soluzione di 78a (121 mg, 0,32 mmol.) in THF (5 mL) si aggiunge  $(\text{Ph})_3\text{P}$  (113 mg, 0,43 mmol, 1,33 equiv.). Si lascia agitare per 1 h. Si aggiunge  $\text{H}_2\text{O}$  (3 mL) e si lascia a refluxo per 1 h. Si evapora il solvente, si tratta con una soluzione acquosa di HCl e si estrae con acetato di etile. La fase acquosa viene basificata con una soluzione di NaOH fino a pH 10 e si estrae con acetato di etile. Si evapora la fase organica basificata. Si ottengono 85 mg, 75% di resa. Il prodotto viene usato direttamente per il passaggio successivo.

### Sintesi composto 66a

Ad una soluzione di 79a (75 mg, 0,21 mmol) in DCM (3 mL) si aggiunge DIPEA (80  $\mu$ L, 0,42 mmol, 2 equiv. ), Ac<sub>2</sub>O (20  $\mu$ L, 0,21 mmol, 1 equiv.) e si lascia agitare a temperatura ambiente per 1 h. Si tratta con una soluzione acquosa di bicarbonato per neutralizzare e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 46 mg, 57% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.85 (s, 3H), 3.46 (t, J = 9 Hz, 2H), 3.48 (dd, J = 9 Hz, 1H), 4.22 (t, J = 9 Hz, 1H), 4.8 (dd, J = 9 Hz, 1H), 7.63 (m, 4H, Ar), 7.77 (dd, J = 12 Hz, 1H, Ar), 8.1 (dd, J = 9 Hz, 2H, Ar), 8.27 (t, J = 9 Hz, 2H, Ar).

### Sintesi composto 71b

Ad una soluzione di 68b (750 mg, 4,52 mmol) in DMF anidro (15 mL) si aggiunge l'acido 2-F-4-nitrobenzoico (1,254 g, 6,78 mmol, 1,5 equiv.), HOBt idrato (916 mg, 6,78 mmol, 1,5 equiv.), Et<sub>3</sub>N (1,9 mL, 13,56 mmol, 3 equiv.) infine si aggiunge EDC cloridrato (1,3 g, 6,78 mmol, 1,5 equiv.). Si lascia in un bagno ad olio a 90°C per 1 h. Si tratta con acqua e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 731 mg, 55% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) 3.86 (s, 3H), 7.18 (d, J = 9 Hz, 2H, Ar), 8.05 (d, J = 9 Hz, 2H, Ar), 8.3 (dd, J = 9 Hz, 1H, Ar), 8.43-8.49 (m, 2H, Ar).

### Sintesi composto 72b

Ad una una soluzione di 71b (434 mg, 1,38 mmol) in etanolo (50 mL) si aggiunge cloruro stannoso (2,48 g, 11 mmol, 8 equiv.). Si lascia a refluxo per 1h. Si evapora la fase organica. Si tratta con una soluzione di NaOH per neutralizzare, si estrae con acetato di etile. Si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 252 mg, 64% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) 3.85 (s, 3H), 6.45-6.57 (m, 4H, 2 Ar e 2 H sovrapposti ), (d, J = 9 Hz, 2H, Ar), 7.12 (d, J = 9 Hz, 2H, Ar), 7.83 (dd, J = 9 Hz, 1H, Ar), 7.98 (d, J = 9 Hz, 2H, Ar).

### Sintesi composto 74b

Ad una soluzione di 72b (509 mg, 1,78 mmol) in ACN (44,5 mL) si aggiunge DMAP (326 mg, 2,67 mmol, 1,5 equiv. ) e benzilcloroformiato (3 mL, 21,36 mmol, 12 equiv.). Si lascia a temperatura ambiente per 24 h. Si evapora il solvente, si tratta con

acqua e si estrae con acetato. Si ottengono 505 mg, 67% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.85 (s, 3H), 5.21 (s, 2H), 7.14 (d, J=9Hz, 2H, Ar), 7.36-7.49 (m, 5H, Ar), 7.65 (dd, J=12Hz, 1H, Ar), 8 (d, J = 9Hz, 2H, Ar), 8.12-8.16 (m, 2H, Ar), 10.54 (s, 1H).

#### **Sintesi composto 77b**

Ad una soluzione di 74b (100 mg, 0,24 mmol) in acetone (10 mL) si aggiunge t-butilato di potassio (81 mg, 0,72 mmol, 3 equiv.) ed epibromoidrina (62 µL, 0,72 mmol, 3 equiv.). Si lascia a reflusso per 4 h. Si tratta con acqua e si estrae con acetato. Si evapora la fase organica e si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 78 mg, 67% di resa.

#### **Sintesi composto 78b**

Ad una soluzione di 77b (179 mg, 0,38 mmol) in DMF (7 mL) si aggiunge NaN<sub>3</sub> (74 mg, 1,14 mmol, 3 equiv.) Si lascia in un bagno ad olio ad 80°C per 1h. Si tratta con acqua e si estrae con dietiletere. Si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 99 mg, 63% di resa. Il prodotto è stato usato per il passaggio successivo.

#### **Sintesi composto 79b**

Ad una soluzione di 78b (99 mg, 0,24 mmol.) in THF (5 mL) si aggiunge (Ph)<sub>3</sub>P (90 mg, 0,32 mmol., 1,33 equiv.). Si lascia agitare per 2 h. Si aggiunge H<sub>2</sub>O (3 mL) e si lascia a reflusso per 1h. Si evapora il solvente, si tratta con una soluzione acquosa di HCl e si estrae con acetato di etile. La fase acquosa viene basificata con una soluzione di NaOH fino a pH 10 e si estrae con acetato di etile. Si evapora la fase organica basificata. Si ottengono 58 mg, 63% di resa. Il prodotto viene usato direttamente per il passaggio successivo.

#### **Sintesi composto 66b**

Ad una soluzione di 79b (58 mg, 0,15 mmol) in DCM (2 mL) si aggiunge DIPEA (60 µL, 0,3 mmol, 2 equiv.), CH<sub>3</sub>COCl (20 µL, 0,15 mmol, 1 equiv.) e si lascia agitare a temperatura ambiente per 1 h. Si tratta con una soluzione acquosa di bicarbonato per neutralizzare e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 14 mg, 22% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.84 (s, 3H), 3.861 (s, 2H), 4.18(m, 4H),

4.72-4.86 (m, 2H), 7.15 (d, J = 9Hz, 2H, Ar), 7.63 (d, J = 9Hz, 1H, Ar), 7.95(d, J = 9Hz, 1H, Ar), 8.18-8.19 (m, 2H), 8.2-8.29 (m, 2H).

### **Sintesi composto 68c**

Ad una soluzione di 4-F-benzonitrile 67c (2g, 16,51 mmol) in etanolo (50 mL) si aggiunge una soluzione acquosa di NaOH (90 mg, 24,76 mmol, 1,5 equiv. in 5mL di H<sub>2</sub>O) e una soluzione di idrossilammina (1,720 g, 24,76 mmol, 1,5 equiv., in 5 mL di H<sub>2</sub>O) si lascia a refluxo per 2 h. Si evapora il solvente. Si aggiunge acqua e si lascia precipitare il prodotto, Si filtra sotto vuoto. Si ottengono 2,48 mg, 98% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 5.84 (s, 2H), 7.18-7.31 (m, 2H, Ar), 7.71 (dd, J=9 Hz, 2H,Ar), 9.63 (s, 1H).

### **Sintesi composto 71c**

Ad una soluzione di 68c (500mg, 3,25 mmol) in DMF anidro (7 mL) si aggiunge l'acido 2-F-4-nitrobenzoico (902 mg, 4,875 mmol, 1,5 equiv.), HOBt idrato (659 mg, 4,875 mmol, 1,5 equiv.), Et<sub>3</sub>N (1,4 mL, 9,75 mmol, 3 equiv.) infine si aggiunge EDC cloridrato (935 mg, 4,875 mmol, 1,5 equiv.). Si lascia in un bagno ad olio a 90°C per 1h. Si tratta con acqua e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 720 mg, 73% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.44-7.48 (m, 2H), 8.14-8.19 (m, 2H, Ar), 8.3 (dd, J=6 Hz, 1H,Ar), 8.44 (dd, J=6 Hz, 1H,Ar), 8.49 (dd, J=6 Hz, 1H,Ar).

### **Sintesi composto 72c**

Ad una una soluzione di 71c (660 mg, 2,18 mmol) in etanolo (50 mL) si aggiunge cloruro stannoso (3,9 g, 17,44 mmol, 8 equiv.). Si lascia a refluxo per 1 h. Si evapora la fase organica. Si tratta con una soluzione di NaOH per neutralizzare, si estrae con acetato di etile. Si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 444 mg, 75% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6.47(dd, J=9 Hz, 2H), 6.55(dd, J=9 Hz, 2H), 7.37-7.47 (m,2H), 7.83 (t, J=12 Hz, 1H, Ar), 8.07-8.11 (m, 2H, Ar).

### **Sintesi composto 73c**

Ad una soluzione di 72c (406 mg, 1,5 mmol) in THF (20 mL) si aggiunge Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (350 mg, 3,3 mmol, 2,2 equiv.) e ClCO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (314 μL, 3.3 mmol, 2.2 equiv.). Si

lascia agitare a temperatura ambiente per 20 h. Si evapora il solvente, si tratta con acqua acida fino a neutralizzazione e si estrae con acetato. Si ottengono 362 mg, 70% di resa.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.26 (t,  $J = 10.5$  Hz, 3H), 4.18 (q,  $J = 10.5$  Hz, 2H), 7.41-7.48 (m, 3H, Ar), 7.65 (dd,  $J = 10.5$  Hz, 1H, Ar), 8.10-8.15 (m, 3H, Ar), 10.38 (s, 1H).

### **Sintesi composto 75c**

Ad una soluzione di 73c (337 mg, 0,977 mmol) in THF (11,5 mL) si aggiunge t-butilato di potassio (121 mg, 1,07 mmol, 1,1 equiv.) e allil bromuro (93  $\mu\text{L}$ , 1,07 mmol, 1,1 equiv.). Si lascia per 3 h a refluxo e 20 h ad agitare a temperatura ambiente. Si evapora il solvente. Si tratta con acqua e si estrae con acetato. Si evapora la fase organica e si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 244 mg, 65% di resa.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.22 (t,  $J = 12$  Hz, 3H), 4.18 (q,  $J = 12$  Hz, 2H), 4.42 (d,  $J = 6$  Hz, 2H), 5.19 (d,  $J = 3$  Hz, 2H), 5.85-5.97 (m, 1H), 7.44 (t,  $J = 9$  Hz, 3H, Ar), 7.53 (dd,  $J = 9$  Hz, 1H, Ar), 8.14 (dd,  $J = 9$  Hz, 3H, Ar).

### **Sintesi composto 76c**

Ad una soluzione di 75c (214 mg, 0,556 mmol) in DCM (5 mL) si aggiunge  $\text{I}_2$  (422 mg, 1,67 mmol, 3 equiv.) Si lascia agitare per 1h. Si evapora il solvente e si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 211 mg, 78 % di resa.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.62 (t,  $J = 9$  Hz, 2H), 3.78 (dd,  $J = 9$  Hz, 1H), 4.3 (t,  $J = 9$  Hz, 1H), 4.82-4.86 (m, 1H), 7.46 (dd,  $J = 9$  Hz, 2H, Ar), 7.67 (dd,  $J = 6$  Hz, 1H, Ar), 7.8 (dd,  $J = 9$  Hz, 1H, Ar), 8.15 (dd,  $J = 9$  Hz, 2H, Ar), 8.25 (t,  $J = 9$  Hz, 1H, Ar).

### **Sintesi composto 78c**

Ad una soluzione di 76c (187 mg, 0,387 mmol) in DMF (3 mL) si aggiunge  $\text{NaN}_3$  (202 mg, 3,1 mmol, 8 equiv.) Si lascia ad agitazione a temperatura ambiente per 3 h. Si evapora il solvente. Si tratta con acqua e si estrae con acetato. Si evapora la fase organica e si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 122 mg, 79% di resa.  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.64 (dd,  $J = 11$  Hz, 1H), 3.96 (dd,  $J = 9$  Hz, 1H), 4.13-4.23 (m, 1H), 4.84-4.92 (m, 2H), 7.17-7.24 (m, 2H), 7.27 (dd,  $J = 9$  Hz, 1H, Ar), 7.48 (dd,  $J = 9$  Hz, 1H, Ar), 7.68-8.28 (m, 1H, Ar).

### **Sintesi composto 79c**

Ad una soluzione di 78c (102 mg, 0,26 mmol.) in THF (5 mL) si aggiunge (Ph)<sub>3</sub>P (89 mg, 0,34 mmol., 1,33 equiv.) Si lascia ad agitare per 2 h. Si aggiunge H<sub>2</sub>O (3 mL) e si lascia a refluxo per 1 h. Si evapora il solvente, si tratta con una soluzione acquosa di HCl e si estrae con acetato di etile. La fase acquosa viene basificata con una soluzione di NaOH fino a pH 10 e si estrae con acetato di etile. Si evapora la fase organica basificata. Si ottengono 63 mg, 65% di resa. Il prodotto ottenuto viene usato per il passaggio successivo.

### **Sintesi composto 66c**

Ad una soluzione di 79c (63 mg, 0,17 mmol) in DCM (3 mL) si aggiunge piridina (87 μL, 26,89 mg, 0,34 mmol, 2 equiv.), CH<sub>3</sub>COCl (24 μL; 26,69 mg; 0,34 mmol, 2 equiv.) e si lascia agitare a temperatura ambiente per 2 h. Si tratta con una soluzione acquosa di HCl e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 37 mg, 53% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.844 (s, 3H), 3.46 (t, J=10 Hz, 1H), 3.76 (d, J=9 Hz, 2H), 7.83-3.87 (m, 1H), 4.22 (dd, J= 9 Hz, 1H), 4.79-4.83 (m, 1H), 7.44(d, J=9 Hz, 2H), 7.48-7.65 (m, 1H), 7.75-7.80 (m, 1H), 8.15 (dd, J= 9 Hz, 2H), 8.27(d, J = 9 Hz, 2H).

## **SINTESI ASIMMETRICA DI DERIVATI OSSADIAZOLICI DEL LINEZOLID**

### **Sintesi acetamidossima: sintesi composto 85**

Ad una soluzione acquosa contenente idrossilammina (10 g, 144 mmol) e NaOH (6 g di NaOH in 10 mL di H<sub>2</sub>O) viene aggiunto CH<sub>3</sub>CN (100 mL). Si lascia agitare a temperatura ambiente per 24 h. Successivamente si evapora il solvente e si aggiunge EtOH per sciogliere l'ammidossima, il cloruro di sodio viene separato per filtrazione su filtro a pieghe e lavato più volte. Il filtrato viene evaporato. Si ottengono 9,787 g, 92% di resa.

### **Sintesi composto 86**

Ad una soluzione di 85 (2 g, 27 mmol) in acetone (80 mL), viene aggiunto K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,50 g, 39,78 mmol) e il composto 84 (6,1 g, 33 mmol). Si lascia agitare per 1h, si

forma un solido. Si evapora il solvente e si tratta con H<sub>2</sub>O eliminando così eventuali impurezze e si filtra sotto vuoto. Il filtrato viene messo a fusione in un bagno ad olio a una temperatura di 150 °C. Dopo 40 minuti si evapora il solvente e viene purificato tramite colonna cromatografica. Si ottengono 3,2 g, 58% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 2.49(s, 3H), 8.28 (d, J=7.5 Hz, 2H, Ar), 8.36 (d, J=7.5 Hz, 2H, Ar).

#### **Sintesi composto 81a**

Ad una soluzione di 86 (2 g, 9,75 mmol) in EtOH (200 mL), si aggiunge SnCl<sub>2</sub> (12 g, 63 mmol). Si lascia agitare a temperatura ambiente per 2 h. Il solvente viene evaporato. Si tratta con una soluzione di NaOH fino a pH 12 e si procede con una estrazione con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 1.7 g, 99% di resa. I dati ottenuti sono coerenti con quelli riportati in letteratura. p.f :185-186°C (Lett. 186-188°C).

#### **Sintesi composto 89a**

Ad una soluzione di 81a (1,56 g, 8,91 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (60 mL) si aggiunge DMAP (1,09 g, 2 equiv.) e benzilcloroformiato (1,26 mL, 2 equiv.). Si lascia agitare a temperatura ambiente per 2 h. Si evapora il solvente e si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 1,379 g, 50% di resa. p.f= 145-150 °C. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.46 (s, 3H), 5.24 (s,2H), 6.88 (s,1H), 7.26-7.43 (m, 5H, Ar), 7.54-7.58( m, 2H, Ar), 8.05 (t, J= 8.2 Hz, 2H, Ar).

#### **Sintesi composto 82a**

In un pallone, in presenza di argon, viene aggiunto al composto 89a (300 mg, 0,97 mmol) THF (7,5 mL) in un bagno a -78°C . Dopo 15 minuti si aggiunge n-BuLi 1,6 M in esano (606 µL). Dopo 30 minuti si aggiunge R-(-)-glicidil butirato (137µL, 140 mg, 0,97 mmol, 1 equiv.). Dopo 10 minuti si lascia reagire a temperatura ambiente per 20 h. Si aggiunge una soluzione satura di NH<sub>4</sub>Cl e si procede con estrazione con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 239 mg, 89% di resa. p.f.:200-205 °C. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.55 (s, 3H), 3.94-3.72 (m, 2H), 4 (dd, J=9 Hz), 4.31 (dd, J=9 Hz), 4.85-4.97 (m, 1H), 5.43 (t, J=12 Hz, 1H), 7.97 (d, J= 9Hz, 2H, Ar), 8.25(d, J=9 Hz,2H, Ar).

### **Sintesi composto 90a**

Ad una soluzione di 82a (300 mg, 1,09 mmol) in DCM (11,7 mL) viene aggiunta EtN<sub>3</sub> (0,68 mL) e CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl (0,2 mL) si lascia reagire per 30 minuti a 0°C. Si lascia reagire a temperatura ambiente per 20 h. Si tratta con H<sub>2</sub>O, si estrae con acetato di etile e la fase organica viene evaporata. Si ottengono 380 mg, 98% di resa. Viene direttamente usato per il passaggio successivo.

### **Sintesi composto 91a**

Ad una soluzione di 90a (414 mg, 1,17 mmol) in DMF (5 mL) viene aggiunto di NaN<sub>3</sub> (390 mg, 6 mmol) a refluxo per 1 h. Si tratta con H<sub>2</sub>O e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 290 mg di 91a, 62% di resa. I dati ottenuti sono coerenti con quelli riportati in letteratura. p.f.:127-128 °C.( Lett. 134-135°C).

### **Sintesi composto 92a**

Ad una soluzione di 91a (290 mg, 0,97 mmol) in THF (14,5 mL) viene aggiunta PPh<sub>3</sub> (339 mg, 1,294 mmol, 1,34 equiv.) e si lascia agitare a temperatura ambiente per 1 h. Si aggiunge H<sub>2</sub>O (1,4 mL) e si mette a refluxo. Dopo 20 minuti si evapora il solvente, si tratta con una soluzione acquosa di HCl e si estrae con acetato di etile. La fase acquosa viene basificata con una soluzione di NaOH fino a pH 10 ed estratta con acetato di etile. Si evapora la fase organica basificata. Si ottengono 52 mg, 19% di resa. I dati ottenuti sono coerenti con quelli riportati in letteratura. p.f.:126-130 °C (Lett. 139-141°C).

### **Sintesi composto 93a**

Ad una soluzione di 92a (33 mg , 0,12 mmol) in DCM (1,4 mL) si aggiunge piridina (19,57 µL, 18,984 mg, 0,24 mmol, 2 equiv. ), CH<sub>3</sub>COCl (20,8 µL; 18,84 mg; 0,24 mmol, 2 quiv.) e si lascia agitare a temperatura ambiente per 2 h. Si tratta con una soluzione acquosa di HCl e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 20 mg, 52% di resa. I dati ottenuti sono coerenti con quelli riportati in letteratura. p.f: 196-198°C (214-216°C).

### Sintesi composto 83a

Ad una soluzione di 93a (155 g, 0,49 mmol) in THF (14 mL) si aggiunge il reagente di Lawesson (0,2 g, 0,49 mmol, 1 equiv.). La reazione viene messa a refluxo per 2 h. Si evapora il solvente. Si ottengono 125 mg, 77% di resa. I dati ottenuti sono coerenti con quelli riportati in letteratura.

### Sintesi composto 88

Ad una soluzione di 85 (2,475 g, 33,44 mmol. ) in DMF (40 mL) viene aggiunto il composto 87 (6,8 g), HOBt H<sub>2</sub>O (4,6 g), Et<sub>3</sub>N (7 mL) e infine DCC (6,9 g), in un bagno ad olio a 90°C per 40 minuti. Si tratta con H<sub>2</sub>O e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 3,193 g, 43% di resa. p.f= 110-115 °C. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 2.55 (s, 3H), 8.18 (dd, J=7.5Hz, 2H, Ar), 8.32 (m,1H, Ar).

### Sintesi composto 81b

Ad una soluzione di 88 (2,4 g, 11,2 mmol) in ETOH (80 mL) si aggiunge SnCl<sub>2</sub> (34 g, 179,2 mmol, 16 equiv.) e si lascia reagire a temperatura ambiente 1h. Si evapora e si tratta con una soluzione acquosa di NaOH fino a pH 12. Si estrae con acetato di etile. Si evapora la fase organica. Si ottengono 2,047 g, 93% di resa. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.39 (s, 3H), 6.46-6.59 (m, 4H, 2Ar e 2H sovrapposti), 7.77 (t, J=7 Hz).

### Sintesi composto 89b

Ad una soluzione di 81b (2 g, 10,36 mmol), in CH<sub>3</sub>CN (30 mL) si aggiunge DMAP (1,9 g, 15,5 mmol, 3 equiv.) e benzilcloroformiato (2,2 mL, 2,6 g, 15,5 mmol) a temperatura ambiente per 20 h. Si evapora il solvente e si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 2,205 g, 65% di resa. p.f: 152-157 °C. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 2.47 (s, 3H), 5.23 (s, 2H), 7.06-7.26 (m, 2H, Ar) 7.36-7.41 (m, 5H, Ar). 7.59 (dd, J=12 Hz, 1 H, Ar), 8 (t, J=9Hz, 1H,Ar).

### Sintesi composto 82b

In un pallone, in presenza di argon, viene aggiunto al composto 89b (1,870 g, 5,7 mmol) THF anidro (45 mL) in un bagno a  $-78^{\circ}\text{C}$ . Dopo 15 minuti si aggiunge n-BuLi 1,6 M in esano (3,6 mL). Dopo 30 minuti si aggiunge R-(-)glicidil butirrato (807  $\mu\text{L}$ , 822 mg, 5,7 mmol, 1 equiv.). Dopo 10 minuti si lascia reagire a temperatura ambiente per 20 h. Si aggiunge una soluzione satura di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e si estrae con acetato di etile. Si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 537 mg, 32% di resa. p.f.:158-162  $^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  2.48 (s,3H), 3.39-3.67(m, 2H), 3.96 (dd,  $J=9$  Hz, 1H), 4.22 (t,  $J=12$  Hz, 1H), 4.79-4.86 (m,1H), 5.32 (t,  $J=11$  Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J=9$  Hz, 1H, Ar) 7.8 (dd,  $J=15$  Hz, 1H, Ar), 8.17 (t,  $J=9$  Hz, 1H, Ar).

### Sintesi composto 91b

Ad una soluzione di 82b (482 mg, 1,64 mmol) in DCM (18 mL) viene aggiunto  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,47 mL),  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$  (0,15 mL) e si lascia a reagire a  $0^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti e per altri 30 minuti a temperatura ambiente. Si evapora il solvente. Si tratta con  $\text{H}_2\text{O}$  e si estrae con acetato di etile. Si evapora la fase organica. Si fa reagire con DMF (10 mL)  $\text{NaN}_3$  (640 mg; 9,84 mmol, 6 equiv.) e si pone a refluxo per 20 minuti. Si evapora il solvente. Si tratta con  $\text{H}_2\text{O}$  e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 401 mg, 77% di resa. (Lett.126-127 $^{\circ}\text{C}$ ). I dati ottenuti sono coerenti con quelli riportati in letteratura.

### Sintesi composto 92b

Ad una soluzione di 91b (391 mg, 1,23 mmol) in THF (20 mL) viene aggiunta  $\text{PPh}_3$  (430 mg, 1,64 mmol, 1,33 equiv.) a temperatura ambiente per 1 h. Si aggiunge  $\text{H}_2\text{O}$  (12 mL) e si mette a refluxo. Dopo 20 minuti si evapora il solvente, si tratta con una soluzione acquosa di HCl e si estrae con acetato di etile. La fase acquosa viene basificata con una soluzione di NaOH fino a pH 10 e si estrae con acetato di etile. Si evapora la fase organica basificata. Si purifica tramite colonna cromatografica. Si ottengono 159 mg, 44% di resa. (Lett. 137-140 $^{\circ}\text{C}$ ). I dati ottenuti sono coerenti con quelli riportati in letteratura.

### **Sintesi composto 93b**

Ad una soluzione di 92b (159 mg, 0,54 mmol) in DCM (5 mL) si aggiunge piridina (87 µL, 85,43 mg, 1,08 mmol, 2 equiv.), CH<sub>3</sub>COCl (76 µL, 84,78 mg, 1,08 mmol, 2 equiv.) e si lascia agitare a temperatura ambiente per 2 h. Si tratta con una soluzione acquosa di HCl e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 50 mg, 28% di resa. I dati ottenuti sono coerenti con quelli riportati in letteratura. (Lett. p.f.:184-186°C).

### **Sintesi composto 83b**

Ad una soluzione di 93b (164 g, 0,49 mmol) in THF (14 mL) si aggiunge il reagente di Lawesson (0,2 g, 0,49 mmol). La reazione viene messa a refluxo per 2 h. Si evapora il solvente. Si ottengono 159 mg, 93% di resa. I dati ottenuti sono coerenti con quelli riportati in letteratura. (Lett. p.f.:199-201°C).

### **Sintesi composto 94b**

Ad una soluzione di 93b (170 mg, 0,58 mmol) in etanolo<sub>ABS</sub> (40 mL) viene aggiunto Pd / C (5%, 200 mg) e la miscela viene ridotta al Parr sotto H<sub>2</sub> (40 psi) per 2 ore a temperatura ambiente. La miscela di reazione viene filtrata ed evaporata. La miscela viene purificata tramite colonna cromatografica ed utilizza direttamente per il passaggio successivo. Si ottengono 90 mg, 52% di resa.

### **Sintesi composto 95b**

Ad una soluzione di 94b (90 mg, 0,30 mmol) in DCM (5 mL) viene aggiunto DMF-DMA (100 µL) e si lascia ad agitare a temperatura ambiente per 1h. Si evapora il solvente. Si ottengono 106 mg, 99% di resa.

### **Sintesi composto 96b**

Al composto 95b (106 mg, 0,30 mmol) aggiungo idrossilammina (25 mg, 0,36 mmol, 1,2 equ.), una soluzione di NaOH 5M (0,1 mL), p-diossano (0,5 mL) e una soluzione acquosa di acido acetico 70% (1 mL). Lascio ad agitare, in un tubo chiuso, a 90°C per 4h. Si tratta con acqua e si estrae con acetato di etile. La fase organica viene evaporata e purificata tramite colonna cromatografica. Si ottengono 30 mg, 37% di resa. p.f. 180-182°C; IR (Nujol)  $\nu$  3428, 1741, 1646 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz;

DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.5 (s,3H), 3,44 (t, J =10,5 Hz, 2H), 4,2 (t, J =9 Hz, 1H), 4,772-4,818 (m,1H), 7.6 (dd, J=9 Hz, 1H, Ar) 7.74 (d, J=13,8 Hz, 1H,Ar), 8.153-8.254 (m,2H, Ar), 9.13 (s,1H).MS (m/z): 321 (M<sup>+</sup>).

## **SINTESI DI COMPOSTI OSSADIAZOLICI CON ATTIVITA' ANTIBATTERICA**

### **Sintesi composti 99 a-f**

Ad una soluzione di aldeide (0,80 mL) con acido acetico (5 mL) viene aggiunto semicarbazide cloridrato (1.5 equiv); la miscela è stata posta a reflusso per 30 minuti al termine dei quali si è formato un precipitato bianco; si è quindi separato il precipitato ottenuto dalla soluzione filtrando sotto pressione ridotta. Mediante filtrazione sotto pressione ridotta sono stati ottenuti i composti:

- 99a, 2-benzilidene idrazina carbossammide (lit. mp 223° C), <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.1414 (s, 3H), 7.6489-7.6686 (m, 3H), 7.9137-7.9903 (m, 2H), 11.8140 (s, 1H);
- 99b, 2-(4 -fluorobenzilidene) idrazina carbossammide mp219-222 °C (lit. mp 227,2-228 °C)
- 99c, 2-(4 -clorobenzilidene) idrazina carbossammide (73%) mp 207-212 °C (lit. mp 232-233 °C)
- 99d, 2-(3 -clorobenzilidene) idrazina carbossammide (96%) mp 220-224 °C (lit. mp 230 °C)
- 99e, 2-(2,4 -diclorobenzilidene) idrazina carbossammide (99%) mp 240-244 °C
- 99f, 2-(3,4 -diclorobenzilidene) idrazina carbossammide (90%) mp 223-229 °C

### **Sintesi composti 100 a-f**

Ad una soluzione di 100 a-f (0.006 moli) in DMC (100 mL), si aggiunge N-bromosuccinimide (2 equiv). Si lascia ad agitare a temperatura ambiente per 2 ore. Il solvente è stato evaporato, il prodotto ottenuto è stato trattato con soluzione satura di NaOH (1 M), filtro sottovuoto. Al precipitato asciutto aggiungo etanolo e qualche goccia di MeOH, scaldare e appena si raffredda il filtro sottovuoto e ottengo un precipitato bianco, separato per filtrazione. Mediante filtrazione sotto pressione ridotta sono stati ottenuti i composti:

- 100a, 5 fenil-1,3,4, ossadiazol-2 ammina (49%) mp 236-241 °C (lit. mp. 242 °C);

- 100b, 5-(4-fluorofenil)-1,3,4, ossadiazol-2 ammina (55%) mp 248-252 °C (lit. mp 251-253 °C);
- 100c, 5-(4-clorofenil)-1,3,4, ossadiazol-2 ammina (82%) mp 257-261 °C (lit. mp 274 °C);
- 100d, 5-(3-clorofenil)-1,3,4, ossadiazol-2 ammina (32%) mp 244-249 °C (lit. mp 245-246 °C)
- 100e, 5-(2,4-diclorofenil)-1,3,4, ossadiazol-2 ammina ( 97%) (lit. mp 213-214 °C);
- 100f, 5-(3,4-diclorofenil)-1,3,4, ossadiazol-2 ammina (70%) (lit. mp 155-157 °C);

### **Sintesi composti 102 a'-g'**

Ad una soluzione di ammina 100 a-f (2 moli) in toluene (20 mL) , aggiungo Piridina (1.5 equiv) e i rispettivi cloruri 101a'-g'(3 moli). La miscela è stata posta a reflusso per 60 minuti al termine dei quali si è formato un precipitato che è stato separato per filtrazione sotto pressione ridotta ottenendo così i composti 102a'-g'. Mediante filtrazione sotto pressione ridotta sono stati ottenuti i composti:

- 102ab', 4-cloro-N-(5 fenil-1,3,4-ossadiazolo-2-il) benzammide(14%) mp 256-260°C ; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 7.65107 -7.72503 (m, 5H) , 8.01526-8.13878 (m, 4H) ,δ 12.48123 (s, 1H)
- 102af', 2-4-dicloro-N-(5 fenil-1,3,4-ossadiazolo-2-il)benzammide (17%) mp 208-212 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 7.583-7.630 (m, 4H), 7.732-7.760 (s, 1H), 7.807-7.813 (s, 1H), 7.925-7.950 (m, 2H), 12.601-12.603 (s, 1H)
- 102ad',3-4-dicloro-N-(5 fenil-1,3,4-ossadiazolo-2-il)benzammide (83%) mp 212-215 °C ; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ 7.614-7.637 (m, 3H),7.836-7.865 (m, 1H), 7.954-8.032(m, 4H), 8.284-8.291(s, 1H);
- 102ac', 4-fluoro-N-(5 fenil-1,3,4-ossadiazolo-2-il) benzammide (22%) mp 237-241 °C ; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 7.4445-7.5141 (m, 2H), 7.6571-7.7004 (m, 3H), 8.0187-8.0563 (m, 2H), 8.1545- 8.2100 (m, 2H), 12.2584 (s, 1 H);
- 102ae',3-4-difluoro-N-(5fenil-1,3,4-ossadiazolo-2-il)benzammide (76%) mp 265-268 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ 7.6174-7.7602 (m, 3H), 8.0098-8.0356 (m, 3H),8.1141-8.1868 (m, 2H), 12.4485 (s, 1H)
- 102ag',4-metossi-N-(5fenil-1,3,4-ossadiazolo-2-il)benzammide (38%) mp 227-231°C (lit. mp 217-219 °C); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 3.9210 (s, 3H), 7.1428-7.1780 (m, 2H), 7.6331-7.6929 (m, 3H), 8.0167-8.1194 (m, 4H),12.0119 (s, 1H);

- 102ba', N-[5-(4fluorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2-il] benzammide(44%) mp 219-224 °C (lit. mp 176-177 °C); <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 7.4993-7.6656 (m, 5H), 8.0657-8.1204 (m,4H), 12.2423 (s, 1H);
- 102bb',N-4-cloro-N-[5-(4fluorofenil)-1,3,4-ossadiazolo2il] benzammide(60%) mp 254-258 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ 7.445-7.504 (m, 2H), 7.643-7.671 (m, 2H), 8.008-8.074 (m, 4H), 12.270-12.289 (s, 1H);
- 102bc',4-fluoro-N-[5-(4fluorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2-il] benzammide (67%) mp 254-256°C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ 7.383-7.498 (m, 4H), 8.005-8.052 (m, 2H),8.107-8.155 (m, 2H), 12.190-12.223 (s, 1H);
- 102be',3-4-difluoro-N[5(4fluorofenil)1,3,4-ossadiazolo2il] benzammide (91%) mp 254-258 °C ; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ7.440-7.499 (m, 2H), 7.614-7.704 (m, 1H),7.937-8.143 (m, 5H)
- 102ca', N-[5-(4-clorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2-il] benzammide(55%) mp 214-217 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 7.57706-7.76040 (m, 5H), 7.99924-8.11718 (m, 4H),12.08000-12.45000 (s, 1H);
- 102cb',4-cloro-N-[5-(4-clorofenil)1,3,4-ossadiazolo-2-il] benzammide (37%) mp 276-281 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ 7.674-7.778 (m, 4 H), 8.012-8.129 (m, 4H),12.406 (s, 1H);
- 102cc',N-[5-(4-clorofenil) 1,3,4-ossadiazolo-2-il]-4fluorobenzammide (43%) mp 269-273 °C ; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ 7.4394-7.5098 (m , 2H), 7.7309-7.7743 (m, 2H), 8.0096-8.0530 (m, 2H), 8.1539-8.2108 (m, 2H), 12.3651 (s,1H);
- 102da', N-[5-(3-clorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2-il] benzammide(55%) mp 248-252 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 7.554-7.709 (m, 2H), 7.725-7.736 (m, 3H), 7.919-7.951 (m,2H), 8.035-8.063 (m, 2H), 12.262-12.277 (s, 1H);
- 102db',4-cloro-N-[5-(3-clorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2il]benzammide (84%) mp 263-267 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ 7.637-7.706 (m, 4H), 7.915-7.940 (m, 2H) ,8.045-8.074 (m, 2H), 12.362-12.375 (s, 1H);
- 102ea',N-[5-(2,4-diclorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2-il]benzammide (47%) mp 276-278 °C ; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ 7.636-7.711 (m, 4H), 7.929-7.935 (m,1H), 7.967-7.995 (m, 1H), 8.036-8.064 (m, 1H), 11.063-11.065 (s, 1H);
- 102eb',4-cloro-N-[5-(2,4-diclorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2il] benzammide (14%) mp 250-254 °C;
- 102fa',N-[5-(3,4-diclorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2-il]benzammide(19%) mp 253-257 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,DMSO-d6) δ 7.553-7.603 (m, 2H), 7.659-7.708 (s, 1H),

7.878-7.923 (m, 2H), 7.945-7.964 (m, 2H), 8.032-8.115 (s, 1H), 12.265-12.307 (s, 1H);

•102fb', 4-cloro-N[5(3,4-diclorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2-il]benzammide (22%) mp 275-280°C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.635-7.664 (m, 2H), 7.871-7.939 (m, 2H), 8.037-8.101 (m, 3H), 12.376-12.385 (s, 1H);

•102fd', 3-4-dicloro-N[5-(3,4-diclorofenil)-1,3,4-ossadiazolo-2-il] benzammide (27%) mp 289-294°C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.835-7.903 (m, 4H), 7.977-8.011 (m, 1H), 8.087-8.090 (s, 1H), 8.263-8.270 (m, 1H).

## **7.Bibliografia**

- [1] M. R. Barbachyn; C. W. Ford “Oxazolidinones Structure-Activity Relationships Leading to Linezolid”; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 2010.
- [2] T. Dandekar, G. Dandekar, “Pharmacogenomic strategies against microbial resistance: from bright to bleak to innovation”, *Pharmacogenomics*, 2010, 11(9), 1193.
- [3] N. Khardori., “Antibiotics-past, present, and future”, *Med. Clin N Am*, 2006, 90, 1049.
- [4] S. Monroe, R. Polk, “Antimicrobial use and bacterial resistance”, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 3, 496.
- [5] D.C. Hooper, “Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones”, *Clin. Infect. Dis.*, 2000, 31, S24.
- [6] J. Davies, G.D. Wright, “Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics”, *Trends Microbiol.*, 1997, 5, 234.
- [7] H. Ota, S. Okamoto, E. Inoue, Y. Adachi, S. Machihara, M. Yoshimura, “Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance”, eds. Krčmery V., Rosival L., Watanabe T., 1972, 63.
- [8] S.B. Levy, “Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, 36, 695.
- [9] A. M. Slee, M. A. Wuonola, R. J. McRipley, I. Zajac, M. J. Zawada, P. T. Bartholomew, W. A. Gregory, M. Forbes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987, 31, 1791.
- [10] H. C. Neu, A. Novelli, G. Saha, N.-X. Chin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988, 32, 580.
- [11] J. S. Daly, G. M. Eliopoulos, E. Reiszner, R. C. Moerllering, Jr., *J. Antimicrob. Chemother.* 1988, 21, 721.
- [12] A. M. Slee, M. A. Wuonola, R. J. McRipley, I. Zajac, M. J. Zawada, P. T. Bartholomew, W. A. Gregory, M. Forbes, *Abstr. Pap. 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (October 4–7, New York)*, 1987, Abstract No. 244.
- [13] W. A. Gregory, D. R. Brittelli, C.-L. Wang, M. A. Wuonola, R. J. McRipley, D. C. Eustice, V. S. Eberly, P. T. Bartholomew, A. M. Slee, M. Forbes, *J. Med. Chem.* 1989, 32, 1673; see also: B. Riedl, R. Endermann, *Expert Opin. Ther. Pat.* 1999, 9, 625; M. Genin, *Expert Opin. Ther. Pat.* 2000, 10, 1.
- [14] D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, S. J. Brickner, R. B. Gammill, M. V. Patel (Upjohn), US5547950, 1996 [Chem. Abstr. 1996, 125, 221870].
- [15] S. J. Brickner (Upjohn), US5164510, 1992 [Chem. Abstr. 1990, 113, 172004].
- [16] M. R. Barbachyn, D. S. Toops, D. A. Ulanowicz, K. C. Grega, S. J. Brickner, C. W. Ford, G. E. Zurenko, J. C. Hamel, R. D. Schaadt, D. Stapert, B. H. Yagi, J. M. Buysse, W. F. Demyan, J. O. Kilburn, S. E. Glickman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 1003; M. R. Barbachyn, D. S. Toops, K. C. Grega, S. K. Hendges, C. W. Ford, G. E. Zurenko, J. C. Hamel, R. D. Schaadt, D. Stapert, B. H. Yagi, J. M. Buysse, W. F. Demyan, J. O. Kilburn, S. E. Glickman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 1009.
- [17] M. R. Barbachyn, D. K. Hutchinson, S. J. Brickner, M. H. Cynamon, J. O. Kilburn, S. P. Klemens, S. E. Glickman, K. C. Grega, S. K. Hendges, D. S. Toops, C. W. Ford, G. E. Zurenko, *J. Med. Chem.* 1996, 39, 680.
- [18] M. R. Barbachyn, S. J. Brickner, D. K. Hutchinson (Upjohn), US5688792, 1997 [Chem. Abstr. 1995, 123, 256742]; S. J. Brickner, D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, P. R. Manninen, D. A.

- Ulanowicz, S. A. Garmon, K. C. Grega, S. K. Hendges, D. S. Toops, C. W. Ford, G. E. Zurenko, J. Med. Chem. 1996, 39, 673.
- [19] Park C.H., Brittelli D.R., Wang C.L.J., Marsh F.D., Gregory W.A., Wuonola M.A., McRipley R.J., Eberly V.S., Slee A.M., Forbes M., "Antibacterials. synthesis and structure-activity studies of 3-aryl-2-oxoxazolidinones. 4. Multiply-substituted aryl derivatives", J Med Chem, 1992, 35, 1156.
- [20] R. Gomez-Gil, M.P. Romero-Gomez, A. Garcia-Arias, M.G. Ubeda, M.S. Busselo, R. Cisterna, A. Gutierrez-Altes, J. Mingorance, "Nosocomial outbreak of linezolid resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital", Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2009, 65, 175.
- [21] C. G. Fortuna, C. Bonaccorso, A. Bulbarelli, G. Caltabiano, L. Rizzi, L. Goracci, G. Musumarra, A. Pace, A. Palumbo-Piccione, A. Guarcello, P. Pierro, C. Cocuzza, R. Musumeci R, "New Linezolid-like 1,2,4-oxadiazoles active against Gram-positive multiresistant pathogens", Eur. J. Med. Chem., in press.
- [22] B. Bozdogan, P.C. Appelbaum, "Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance", International Journal of Antimicrobial Agents, 2004, 23, 113.
- [23] JVN Vara Prasad, "New oxazolidinones", Current Opinion in Microbiology, 2007, 10, 454.
- [24] G. E. Zurenko, B. H. Yagi, R. D. Schaadt, J. W. Allison, D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, S. J. Brickner, Antimicrob. Agents Chemother. 1996, 40, 839
- [25] J. H. Jorgensen, M. L. McElmeel, C. W. Trippy, Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41, 465.
- [26] M. E. Jones, M. R. Visser, M. Klootwijk, P. Heisig, J. Verhoef, F. J. Schmitz, Antimicrob. Agents Chemother. 1999, 43, 421.
- [27] G. H. Yagi, G. E. Zurenko, Anaerobe 1997, 3, 301.
- [28] A. H. Lin, R. W. Murray, T. J. Vidmar, K. R. Marotti, Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41, 2127.
- [29] D. L. Shinabarger, K. R. Marotti, R. W. Murray, A. H. Lin, E. P. Melchior, S. M. Swaney, D. S. Duniyak, W. F. Demyan, J. M. Buysse, Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41, 2132.
- [30] S. M. Swaney, H. Aoki, M. C. Ganoza, D. L. Shinabarger, Antimicrob. Agents Chemother. 1998, 42, 3251.
- [31] A. H. Lin, R. W. Murray, R. D. Schaadt, G. E. Zurenko, D. S. Duniyak, J. M. Buysse, K. R. Marotti. The oxazolidinone eperzolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. Antimicrob Agents Chemother. 1997, 41, 2127–2131.
- [32] J.M. Buysse, W. F. Demyan, D.S. Duniyak, D. Staperet, J. C. Hamel, C. W. Ford, Abstr. Pap. 36<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1996.
- [33] Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome. Katherine S. Long and Birte Vester.
- [34] DN Wilson. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008, 105, 13339–13344.
- [35] H Carsenti-Dellamonica. In vitro selection of mutants of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolides and linezolid: relationship with susceptibility to penicillin G or macrolides. J. Antimicrob. Chemother. 2005, 56, 633–642.
- [36] J. Feng Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. Genome Res. 2009, 19, 1214–1223.

- [37] D Hillemann, S Rusch-Gerdes, E Richter. In vitro-selected linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 800–801.
- [38] P Kloss, L Xiong, DL Shinabarger, AS Mankin. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J. Mol. Biol.* 1999, 294, 93–101.
- [39] DM Livermore, M Warner, S Mushtaq, S North, N Woodford. In vitro activity of the oxazolidinone RWJ-416457 against linezolid-resistant and -susceptible staphylococci and enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51, 1112–1114.
- [40] M Lobritz, R Hutton-Thomas, S Marshall, LB Rice. Recombination proficiency influences frequency and locus of mutational resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 3318–3320.
- [41] K Miller, CJ Dunsmore, CW Fishwick, I Chopra.. Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 1737–1742.
- [42] J. Prystowsky. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2154–2156.
- [43] P.Sander Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. *Mol. Microbiol.* 2002, 46, 1295–1304.
- [44] H. Bonilla Multicity outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a cfr-containing strain. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 51, 796–800.
- [45] A. Endimiani. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55, 1684–1692.
- [46] T Hong, X Li, J Wang, C Sloan, C Cicogna. Sequential linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with G2576T mutation. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 3277–3280.
- [47] S. Kelly. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 61, 901–907.
- [48] SH Marshall, CJ Donskey, R Hutton-Thomas, RA Salata, LB Rice.. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002, 46, 3334–3336.
- [49] VG Meka, H Gold. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 39, 1010–1015.
- [50] Raad II. Clinical-use-associated decrease in susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* to linezolid: a comparison with quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004.
- [51] SM Roberts. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in two pediatric patients receiving low-dose linezolid therapy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2006, 25, 562–564.
- [52] S Swoboda. Varying linezolid susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during therapy: a case report. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 56, 787–789.
- [53] A Wong. Polyphyletic emergence of linezolid-resistant staphylococcus in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54, 742–748.
- [54] K Yoshida. Linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated after long-term, repeated use of linezolid. *J. Infect. Chemother.* 2009, 15, 417–419.

- [55] RL. Hill. Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother* 2010.
- [56] M Souli. Colonisation with vancomycin- and linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a university hospital: molecular epidemiology and risk factor analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009, 33, 137–142.
- [57] M. R. Turner, A. Forrest, J. M. Hyatt, C. H. Ballow, D. J. Stalker, I. R. Welshman, J. J. Schentag, *Abst Pap. 38<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998.
- [58] A. M. Milstone, J. Dick, B. Carson G. K. Siberry. Cerebrospinal fluid penetration and bacteriostatic activity of Linezolid. *Pediatr Neurosurg* 2007, 43, 406–409.
- [59] L. C. Wienkers, M. A. Wynalda, K. L. Feenstra, P. Gao, J. G. Slatter, *Abstr. Pap. 39<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999.
- [60] B. A. Pearlman, W. R. Perrault, M. R. Barbachyn, P. R. Manninen, D. S. Toops, D. J. Houser, T. J. Fleck (Upjohn), US5837870, 1998 [Chem. Abstr. 1998, 130, 25061.
- [61] L. Song, X. Chen, S. Zhang, H. Zhang, P. Li, G. Luo, W. Liu, W. Duan and W. Wang, *Org. Lett.*, 2008, 10, 5489
- [62] a) G. Rosini, in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 2 (Eds.: B. M. Trost, I. Fleming), Pergamon, New York, 1991, pp. 321–340; b) F. A. Luzzio, *Tetrahedron* 2001, 57, 915–945.
- [63] N. Ono, *The Nitro Group in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, New York, 2001.
- [64] a) H. Li, B. Wang, L. Deng, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 732–733; b) L. Allmendinger, G. Bauschke, F. F. Paintner, *Synlett* 2005, 2615–2618; c) N. Gogoi, J. Boruwa, N. C. Barua, *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 7581–7582; d) F. F. Paintner, L. Allmendinger, G. Bauschke, P. Klemmann, *Org. Lett.* 2005, 7, 1423–1426.
- [65] T. Ooi, K. Doda, K. Maruoka, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 2054–2055.
- [66] a) H. Sasai, T. Suzuki, S. Arai, T. Arai, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 4418–4420; b) H. Sasai, T. Suzuki, N. Itoh, M. Shibasaki, *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 851–854.
- [67] For reviews about catalysts based on modified BINOL, see: a) M. Shibasaki, S. Matsunaga, *Chem. Soc. Rev.* 2006, 35, 269–279; b) Y. Chen, S. Yekta, A. K. Yudin, *Chem. Rev.* 2003, 103, 3155–3211; c) H. Yamamoto, K. Futatsugi, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 1924–1942. For a review about catalysts with lanthanide metals, see: d) K. Mikami, M. Terada, H. Matsuzawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 3554–3571.
- [68] a) B. M. Trost, V. S. C. Yeh, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 861–863; b) B. M. Trost, V. S. C. Yeh, H. Ito, N. Bre Meyer, *Org. Lett.* 2002, 4, 2621–2623.
- [69] a) A. K. Ghosh, P. Mathivanan, J. Cappiello, *Tetrahedron: Asymmetry* 1998, 9, 1–45; b) K. A. Jørgensen, M. Johannsen, S. Yao, H. Audrain, J. Thorhauge, *Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 605–613; c) J. S. Johnson, D. A. Evans, *Acc. Chem. Res.* 2000, 33, 325–335; d) H. A. McManus, P. J. Guiry, *Chem. Rev.* 2004, 104, 4151–4202; e) G. Desimoni, G. Faita, K. A. Jørgensen, *Chem. Rev.* 2006, 106, 3561–3651.
- [70] a) P. L. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 5138–5175; b) A. Berkessel, H. Gröger, *Asymmetric Organocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [71] a) Y. Sohtome, Y. Hashimoto, K. Nagasawa, *Adv. Synth. Catal.* 2005, 347, 1643–1648; b) Y. Sohtome, Y. Hashimoto, K. Nagasawa, *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 2894–2897.
- [72] a) A. Cave; C. Chaboche; B. Figadere; J. C. mHarmange, A. Laurens; J. F. Peyrat; M. Pichon; M. Szlosek; J. Cotte-Lafitte; A. M. Quero, *Eur. J. Med. Chem.* 1997, 32, 617–623.

- [73] D. G. I. Kingston,; G. Samaranyake; C. A. J. Ivey, *Nat. Prod.* 1990, 3, 1–12. *A.Tetrahedron: Asymmetry* 2001, 12, 1503–1509.
- [74] Y.W. Jo, W.B. Im, J.K. Rhee, M.J. Shim, W.B. Kim, E.C. Choi, *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 5909-5915.
- [75] C. Farrerons Gallemi, US Patent 2005/0014806, 2005.
- [76] L.B. Snyder, Z. Meng, R. Mate, S.V. D'Andrea, A. Marinier, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 4735-4739.
- [77] A. Palumbo Piccionello, R. Musumeci, C. Cocuzza, C.G. Fortuna, A. Guarcello, P. Pierro, A. Pace, *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 50, 441-448.
- [78] F. Broccolo, G. Cainelli, G. Caltabiano, C.E.A. Cocuzza, C.G. Fortuna, P. Galletti, D. Giacomini, G. Musumarra, R. Musumeci, A. Quintavalla, *J. Med. Chem.* 2006, 49, 2804-2811.
- [79] A. Pace, P. Pierro, *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 4337-4348.
- [80] K.C. Grega, M.R. Barbachyn, S.J. Brickner, S.A. Mizsak, *J. Org. Chem.* 1995, 60, 5255-5261.
- [81] H. Biswajit Das, H. Sonali Rudra, A. Songita Songita, P. Mohammad Salman, H. Ashok Rattan, US Patent 2008/0188470, 2008.
- [82] J.B. Locke, J. Finn, M. Hilgers, G. Morales, S. Rahawi, G.C. Kedar, J.J. Picazo, W. Im, K.J. Shaw, J.L. Stein, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54, 5337-5343.
- [83] O.A. Phillips, E.E. Udo, A.A. Ali, et al., *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 35, 1156.
- [84] M.B. Gravestock, D.G. Acton, M.J. Betts, M. Dennis, G. Hatter, et al. 2003, 13, 4179.
- [85] L.M. Thomasco, E.A. Weaver, J.M. Ochoada, R.C. Gadwood, G.E. Zurenko, C.W. Ford, *Abstr. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 40, 216.
- [86] S.-Y. Yhang, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 3881-3883.
- [87] S.J. Brickner, *Curr. Pharm. Des.* 1996, 2, 175-194.
- [88] M.R. Barbachyn, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998, 456, 219-238.
- [89] S. Tsiodras, H.S. Gold, G. Sakoulas, G.M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman, R.C. Moellering, M.J. Ferraro, *Lancet* 2001, 358, 207-208.
- [90] S. Besier, A. Ludwig, J. Zander, V. Brade, T.A. Wichelhaus, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 1570-1572.
- [91] J.B. Locke, M. Hilgers, K.J. Shaw, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53, 5275-5278.
- [92] V. Meka, S.K. Pillai, G. Sakoulas, C. Wennersten, L. Venkataraman, P.C. DeGirolami, G.M. Eliopoulos, R.C. Moellering Jr., H.S. Gold, *J. Infect. Dis.* 2004, 190, 311-317.
- [93] M.B. Gravestock, *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 2005, 8, 469-477.
- [94] M. Baroni; G. Cruciani; S. Sciabola,; F. Perruccio; J. S. Mason; A Common Reference Framework for Analyzing/Comparing Proteins and Ligands. Fingerprints for Ligands and Proteins (FLAP): Theory and Application *J. Chem. Inf. Model.*, 2007, 47, 279-294. 2010, 50, 1442-1450
- [95] S. Cross; M. Baroni; E. Carosati.; P. Benedetti P; S. Clementi, FLAP: GRID molecular interaction fields in virtual screening. validation using the DUD data set. *J. Chem. Inf. Model.*,

- [96] P. J. Goodford, A computational procedure for determining energetically favourable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* 1985, 28, 849–857.
- [97] E. Carosati; S. Sciabola; G. Cruciani, Hydrogen bonding interactions of covalently bonded fluorine atoms: from crystallographic data to a new angular function in the GRID force field. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 5114–5125.
- [98] C.G. Fortuna, C. Bonaccorso, C. Cocuzza, A. Accardo, G. Musumarra, A. Palumbo Piccionello, A. Pace, P. Pierro, R. Musumeci, *Med. Chem. Comm.* under revision.
- [99] (a) J. Boruwa, N. Gogoi, P. Pratim, P. Saikia and N. C. Barua, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, 17, 3315; (b) C. Palomo, M. Oiarbide and A. Laso, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 2561.
- [100] (a) C. Christensen, K. Juhl and K. A. Jørgensen, *Chem. Commun.*, 2001, 2222; (b) D. A. Evans, D. Seidel, M. Rueping, H. W. Lam, J. T. Shaw and C. W. Downey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 12692.
- [101] A. Palumbo Piccionello; P. Pierro; A. Accardo; A. Pace; S. Buscemi, *RSC Advances* 2013, 3, 24946.

## **8.PRODUZIONE SCIENTIFICA TRIENNIO 2013-2015**

### **PUBBLICAZIONI SU RIVISTA:**

- 1) Palumbo Piccionello, A.; Pierro, P.; Accardo, A.; Buscemi, S.; Pace, A.; "Concise asymmetric synthesis of Linezolid through catalyzed Henry reaction" RSC Adv, 2013, 3 , 24946 -24951.
- 2) Accardo, A., Musumeci, R.; Fortuna, C., G.; Palumbo Piccionello, A.; Pace, A.; "Multidisciplinary approaches for the desing of heterocycles as potential antibacterial compounds against multidrug resistant bacteria" Life Safety and Security, 2015, 3, 15-18. ISSN: 2283-7604, DOI: 10.12882/2283-7604.2015.3.4
- 3) C.G. Fortuna, C.Bonaccorso, C. Cocuzza, A. Accardo, G. Musumarra, A. Palumbo Piccionello, A. Pace, P. Pierro, R. Musumeci, Med. Chem. Comm. submitted.

### **COMUNICAZIONI A CONGRESSO:**

- 1) Accardo, A.; Palumbo Piccionello, A.; Pace, A.; Pierro, P.; Buscemi, S. "ASYMMETRIC SYNTESIS OF LINEZOLID THROUGH CATALYZED HENRY REACTION" (poster), 13° Sigma Aldrich Young Chemists Symposium, Riccione, 28-29 Ottobre 2013.
- 2) Giacalone, V.; Accardo, A.; Martorana, A.; Lauria, A.; Buscemi, S.; Palumbo Piccionello, A.; Almerico, A.M. "SYNTHESIS AND EVALUATION OF CURCUMIN ANALOGUES AS NEUROPROTECTIVE AGENTS FOR THE ALZHEIMER'S DISEASE" (poster), 13° Sigma Aldrich Young Chemists Symposium, Riccione, 28-29 Ottobre 2013.
- 3) Palumbo Piccionello, A.; Giacalone, V.; Accardo, A.; Martorana, A.; Lauria, A.; Almerico, A.M.; Pace, A.; Buscemi, S. "DESIGN E SINTESI DI DERIVATI CURCUMIN-LIKE PER IL TRATTAMENTO DEL MORBO DI ALZHEIMER" (poster), Convegno Congiunto Sicilia-Calabria Società Chimica Italiana, Catania, 2-3 Dicembre 2013.
- 4) Angela Accardo, Antonio Palumbo Piccionello, Andrea Pace, Paola Pierro, Silvestre Buscemi, Cosimo Gianluca Fortuna, Rosario Musumeci; "Asymmetric synthesis and biological evaluation of 1,2,4-Oxadiazole analogues of Linezolid" (poster), 14° Anglo-Italian Meeting on Heterocyclic Chemistry, Londra, 29 giugno-1 luglio 2014.
- 5) Antonio Palumbo Piccionello, Valentina Giacalone, Angela Accardo, Anna Maria Martorana, Antonino Lauria, Anna Maria Almerico; Andrea Pace, Silvestre Buscemi, "Design e Sintesi di derivati Curcumin-like per il trattamento del morbo di Alzheimer" (poster), XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry, Lisbona, 7-11 Settembre 2014.

### **PARTECIPAZIONE A CONGRESSI:**

- 1) 6° Corso Nazionale di Introduzione alla Fotochimica (CNIF 13), presso il Dipartimento di Chimica "G. Ciamician". Bologna, 3-6 Giugno 2013.

- 2) 13° Sigma Aldrich Young Chemists Symposium, Riccione, 28-29 Ottobre 2013.
- 3) Second Galveston-Palermo Meeting Advances in Biomedicine and Neuroscience, Palermo; 13 Marzo 2014.
- 4) 14° Anglo-Italian Meeting on Heterocyclic Chemistry, Londra, 29 giugno-1 luglio 2014.
- 5) Ricerca di base, interdisciplinare e traslazionale in ambito Biologico e Biotecnologico (II ed.), Palermo, 26-27 Giugno 2014

#### CAPITOLO LIBRO

- 1) Andrea Pace, Antonio Palumbo Piccionello, Ivana Pibiri, Angela Accardo, Nicolò Vivona, Silvestre Buscemi. “Applications of Ring-Rearrangements Involving a Participating Side-Chain for the Synthesis of Five-membered Heteroaromatics“, Target in Heterocyclic System, Chemistry and Properties, Volume 18 (2014), 48-86, Editors Orazio .A. Attanasi, Renato Noto, Domenico Spinelli