

**Alma Mater Studiorum
Università di Bologna**

FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE

Corso di Laurea Magistrale in:

CHIMICA INDUSTRIALE

Dipartimento di Chimica Organica “A. Mangini”

**Sintesi di nuovi derivati tri-componente
per target photodynamic therapy della
neoplasia prostatica**

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

Presentato da:

DANIELE, NICOLÒ RAGNO

Relatore:

DOTT. PAOLO RIGHI

Co-Relatore:

DOTT.SSA GRETA VARCHI
(ISOF-CNR BOLOGNA)

Sessione I

Anno Accademico 2011-2012

Abstract

Le terapie per la cura del tumore alla prostata dimostrano numerosi limiti soprattutto quando il tumore acquisisce resistenza al trattamento o metastatizza. Inoltre la maggior parte delle terapie ad oggi utilizzate comporta l'insorgenza, in molti casi, di effetti collaterali anche gravi. Un differente approccio terapeutico, maggiormente selettivo e meno invasivo sia rispetto alla radio che alla chemioterapia, è rappresentato dalla terapia fotodinamica (PDT). La PDT è un trattamento che utilizza farmaci fotosensibili: questi agenti sono farmacologicamente inattivi fino a quando non sono irraggiati con luce a un'opportuna lunghezza d'onda ed in presenza di ossigeno. Il farmaco attivato dalla luce, infatti, forma ossigeno singoletto, una specie chimica altamente reattiva, direttamente responsabile del danno al DNA e quindi della morte cellulare. In questo lavoro di tesi vengono presentate due strategie sintetiche per la sintesi di due nuovi derivati tri-componente per terapia foto-dinamica della neoplasia prostatica in fase avanzata, **DRPDT1** e **DRPDT2**. Entrambi i derivati sono costituiti da tre unità fondamentali: un ligando specifico con elevata affinità per il recettore androgeno, uno spaziatore opportunamente scelto ed una molecola foto-attivabile. In particolare, **DRPDT2** si differenzia da **DRPDT1** per la natura dell'AR ligando utilizzato per la sintesi. Nel caso di **DRPDT2**, infatti, questo è stato sinteticamente ingegnerizzato in modo tale da fotoreagire anche in assenza di ossigeno, liberando radicale NO. La presenza di questo ulteriore farmacoforo, oltre alla porfirina, potrebbe garantire un effetto additivo/sinergico della terapia foto-stimolata sia in presenza di ossigeno che in condizioni ipossiche. Questo approccio costituirebbe il primo esempio di terapia fotodinamica multimodale della neoplasia prostatica.

Therapies for the treatment of prostate cancer show several limitations, especially when the cancer metastasizes or acquires resistance to treatment. In addition, most of the therapies currently used entails the occurrence of serious side effects. A different therapeutic approach, more selective and less invasive with respect either to radio or to chemotherapy, is represented by the photodynamic therapy (PDT). The PDT is a treatment that makes use of photosensitive drugs: these agents are pharmacologically inactive until they are irradiated with light at an appropriate wavelength and in the presence of oxygen. The drug, activated by light, forms singlet oxygen, a highly reactive chemical species directly responsible for DNA damage, thus of cell death. In this thesis we present two synthetic strategies for the preparation of two new tri-component derivatives for photodynamic therapy of advanced prostate cancer, namely **DRPDT1** and **DRPDT2**. Both derivatives are formed by three basic elements covalently bounded to each other: a specific ligand with high affinity for the androgen receptor, a suitably chosen spacer molecule and a photo-activated molecule. In particular, **DRPDT2** differs from **DRPDT1** from the nature of the AR ligand. In fact, in the case of **DRPDT2** we used a synthetically engineered androgen receptor ligand able to photo-react even in the absence of oxygen, by delivering NO radical. The presence of this additional pharmacophore, together with the porphyrin, may ensure an additive/synergistic effect to the photo-stimulated therapy, which than may act both in the presence of oxygen and in hypoxic conditions. This approach represents the first example of multimodal photodynamic therapy for prostate cancer.

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Il cancro alla prostata	1
1.1.1. Fisiopatologia	2
1.2. L' Androgeno Recettore (AR)	6
1.2.1. Struttura e funzione dell'AR	6
1.2.2. Meccanismo d'azione di AR	7
1.3. Trattamento del cancro alla prostata	8
1.4. Antiandrogeni	10
1.4.1. Antiandrogeni e cancro alla prostata	10
1.4.2. Antiandrogeni non steroidei	11
1.4.3. Antiandrogeni in sviluppo clinico	14
1.4.4. Antiandrogeni non steroidei: un nuovo approccio sintetico	16
1.5. Terapie radicali: vantaggi e limiti	18
1.6. PDT, Photodynamic therapy	19
1.6.1. Studi clinici di PDT per la cura del cancro alla prostata	22
1.6.2. Innovazioni sulla metodologia di PDT: dove intervenire	24
1.6.3. Derivati tri-componente per PDT mirata alla cura del tumore della prostata: lo stato dell'arte	27
2. Scopo della tesi	37
2.1. DRPDT1	38
2.2. DRPDT2	39
3. Risultati e discussione	42
3.1. DRPDT1	42
3.2. DRPDT2	44
3.3. Approfondimenti sul processo sintetico	45
4. Conclusioni	49
5. Parte sperimentale	50
5.1. Sintesi di DRPDT1	51
5.2. Sintesi di DRPDT2	60
6. Schede di sicurezza	69

1. Introduzione

1.1. Il cancro alla prostata

Il cancro alla prostata (PCa) rappresenta una delle malattie più diffuse negli individui di sesso maschile e presenta notevoli differenze di diffusione al variare della zona geografica.

L'indagine delle cause e dei fattori di rischio che sono alla base di questa patologia è molto importante; grazie ai progressi nel settore della diagnosi, oggi siamo in grado di diagnosticare il PCa sempre più precocemente, con un conseguente aumento dei dati di incidenza sulla popolazione mondiale.¹

Il tasso di mortalità è di 8.1 su 100000 ed interessa principalmente uomini in età avanzata; il cancro alla prostata rappresenta un grande problema per la salute della popolazione terrestre e per il suo sviluppo. L'analisi degli effetti sulla popolazione va effettuata considerando tre parametri: l'incidenza, la mortalità e la prevalenza. Il primo parametro indica il numero di nuovi casi annuali, il secondo il numero di morti annuali mentre il terzo è relativo al numero di individui che convivono con la malattia.

I dati del 2002, ad esempio, parlano di 10.9 milioni di nuovi casi rilevati, 6.7 milioni di morti e 24.6 milioni di individui che convivono con la patologia.²

Alla luce dell'aumento della diffusione del tumore alla prostata in età avanzata e della differente distribuzione demografica terrestre, occorre introdurre dei tassi di correzione riguardo i dati di età degli individui studiati, al fine di migliorarne la comparabilità.

Pochissimi casi di cancro alla prostata vengono diagnosticati in pazienti di età inferiore ai 50 anni, pertanto, la sua diffusione risulta maggiore nei paesi sviluppati, con un'età media superiore rispetto ai paesi in via di sviluppo.³

¹ Nelen, V., *Recent Results in Cancer Research* **2007**, 175, 1.

² Parkin, D.M.; Bray F.; Ferlay J.; Pisani P., *CA Cancer J Clin* **2005**, 55, 74–108.

³ Quinn, M.; Babb, P., *BJU Int* **2002**, 90, 162–173.

Tra i fattori di rischio che sono alla base della diffusione del tumore alla prostata, il più importante è quello genetico: uomini che hanno un membro della propria famiglia di primo grado affetto da questa patologia hanno una probabilità doppia di contrarla rispetto ad individui che non hanno malati di cancro in famiglia. Sembra inoltre che il rischio sia maggiore per individui che hanno un fratello malato rispetto ad individui con il padre affetto dalla malattia. Un altro fattore significativo è legato alla dieta ed alle abitudini alimentari, testimoniando come il modello di vita occidentale favorisca maggiormente lo svilupparsi della malattia; il consumo abbondante di grassi, in particolare di origine animale, di zuccheri raffinati e bevande gassate ed alcoliche, accompagnato da un crescente abbandono del consumo di frutta e verdura, favorisce indubbiamente il manifestarsi della patologia.⁴ Non è un caso se l'incidenza sulla popolazione degli Stati Uniti è circa 10-20 volte superiore rispetto all'incidenza sulle popolazioni asiatiche.^{5,6} E' possibile quindi instaurare un nesso tra obesità e rischio di cancro alla prostata, come dimostrato in diversi studi.

1.1.1. Fisiopatologia

Il cancro alla prostata è una neoplasia ghiandolare, che si manifesta principalmente su cellule secretorie o luminali; l'origine della malattia non è da ricercare nelle cellule secretorie, bensì nei loro precursori, ovvero nel processo di differenziazione cellulare.⁷ Le cellule che formano la ghiandola sono costituite da due strati, basale e luminale (Fig.1). Le prime presentano un piccolo citoplasma e sono scarsamente differenziate; la maggior parte di esse sono cellule staminali che mancano di recettore per gli androgeni ed esprimono Bcl-2.⁷

⁴ Venkateswaran, V.; Klotz, L. H., *Nat Rev Urol* **2010**, 7 (8), 442-53.

⁵ Hoffman, R. M.; Gilliland, F. D.; Eley, J. W.; Harlan, L. C.; Stephenson, R. A.; Stanford, J. L.; Albertson, P. C.; Hamilton, A. S.; Hunt, W. C.; Potosky, A. L., *J Natl Cancer Inst* **2001**, 93 (5), 388-95.

⁶ Jemal, A.; Murray, T.; Ward, E.; Samuels, A.; Tiwari, R. C.; Ghafoor, A.; Feuer, E. J.; Thun, M. J., *CA Cancer J Clin* **2005**, 55 (1), 10-30.

⁷ Algaba, F.; Trias, I.; Arce, Y., *Recent Results in Cancer Research* **2007**, 175, 9.

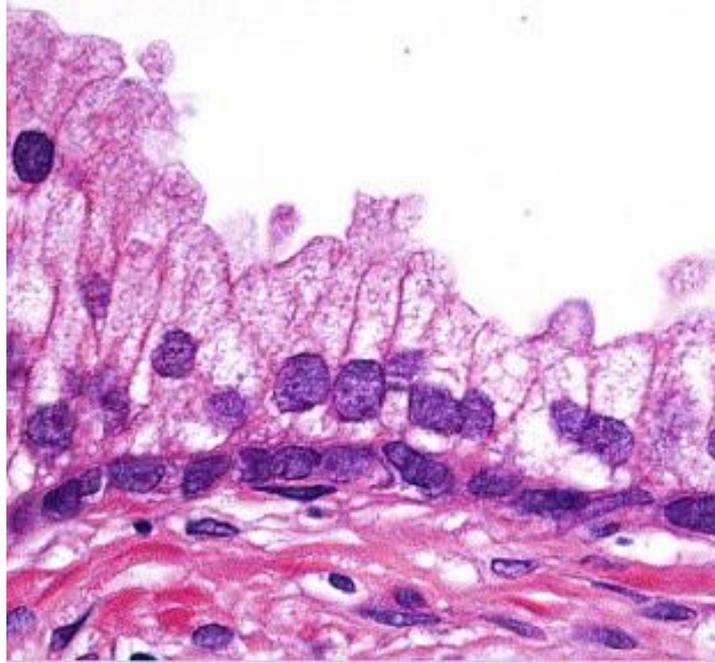


Fig.1 Cellule basali e luminali

Una piccola parte di cellule basali invece, possiede recettori androgenici, suggerendo così la possibilità dell'esistenza di un intermedio di cellule staminali in grado di differenziarsi in cellule luminali dotate di androgeno recettori.⁸

Il problema che si pone adottando questo modello scientifico è l'identificazione delle cellule-obiettivo del carcinoma. Infatti, le specifiche differenze fra una ghiandola normale ed una neoplastica non sono ancora ben conosciute.

Recenti osservazioni correlano la presenza di cellule infiammatorie fagocitate e cancro con conseguente rilascio di radicali nitro ed ossigeno, questo congiuntamente al contributo di fattori dietetici contribuisce a generare uno stress ossidativo che causa la rottura delle cellule e la successiva rigenerazione con potenziale espansione di cellule cancerogene progenitrici intermedie.⁹

Le suddette osservazioni ci hanno permesso di interpretare in maniera differente i fenomeni di dilatazione della ghiandola caratterizzati dall'appiattimento dell'epitelio secretorio, precedentemente considerati una semplice atrofia delle cellule secretorie e quindi estranei allo stato ormonale. L'apparente aspetto morfologico atrofico non è coerente con il suo stato funzionale vista l'espressione

⁸ Isaacs, J.T.; Coffey, D. S., *Prostate Suppl* **1989**, 2, 33–50.

⁹ Gonzalbo, M. L.; Isaacs, W. B., *J Urol* **2003**, 170, 2444–2452.

di bcl-2 (proteina anti apoptotica), Ki67 (stato proliferativo attivo), la ridotta espressione di p27 (inibitore di chinasi ciclina-dipendente), e l'espressione di glutatione-S-transferasi p1 (GSTP1) e cicloossigenasi-2 (COX-2), Tutti questi segnali sono tipici di cellule sottoposte a stress ossidativo.¹⁰ Per questo motivo queste lesioni, chiamate “*proliferative inflammatory atrophy*“ (PIA) sono considerate potenziali precursori di neoplasia prostatica intraepiteliale (Fig.2);¹¹ tuttavia, il ruolo di PIA è controverso e la letteratura presenta pareri discordanti sul tema, originati probabilmente dalla debole correlazione tra le lesioni o dalla mancanza di criteri morfologici omogenei.^{12,13}

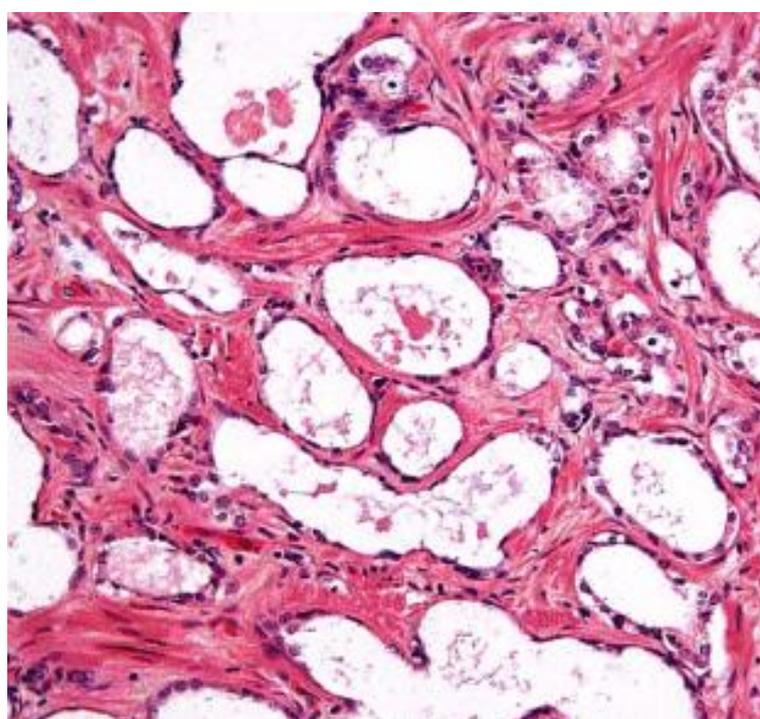


Fig.2 Proliferative inflammatory atrophy (PIA)

Questi schemi di espressione genica sono molto simili a quelli osservati nella *neoplasia prostatica intraepiteliale* (PIN).¹⁴ PIN è caratterizzata da proliferazione delle cellule epiteliali intraduttali e intra-acinali associata alla presenza di strati

¹⁰ Nelson, W. G.; De Marzo, A. M., Isaacs, W.B., *N Engl J Med* **2003**, 349, 366–381.

¹¹ De Marzo, A. M.; Marchi, V. L.; Epstein, J. I. et al, *Am J Pathol* **1999**, 155, 1985–1992.

¹² Anton, R., C.; Kattan, M.W.; Chakraborty, S. et al, *Am J Surg Pathol* **1999**, 23, 932–936.

¹³ Postma, R.; Schroder, F. H.; van der Kwast, T. H., *Urology* **2005**, 65, 745–749.

¹⁴ Putzi, M. J.; De Marzo, A. M., *Urology* **2000**, 56 (5), 828-32.

multipli di cellule caratterizzate da morfologia atipica (iperchromasia, variabilità in forma nucleare e grandezza).¹⁵

Le ghiandole caratterizzate da PIN sono a volte più grandi del normale con uno strato di cellule basali interrotto, di solito difficili da osservare. Sebbene non vi sia alcuna prova che il PIN sia un precursore del cancro, è strettamente associata ad esso. Altri passaggi essenziali della progressione del tumore prostatico includono lo sviluppo di indipendenza dai fattori di crescita, portando ad una proliferazione e ad una crescita incontrollate,¹⁶ nonché alla capacità di formare nuovi vasi sanguigni (angiogenesi).

L'angiogenesi è uno dei fattori più importanti nella crescita del tumore poiché la presenza di nuovi vasi sanguigni garantisce un apporto nutrizionale adeguato all'elevato stato proliferativo, consentendo inoltre lo scambio metabolico nel tessuto tumorale che facilita l'invasione locale dei tessuti e la metastasi distale. Il cancro alla prostata comunemente metastatizza nelle ossa, nei linfonodi, e può invadere il retto, la vescica e gli ureteri più bassi; il percorso di metastasi ossea è ritenuto di tipo venoso.¹⁷

La crescita dell'epitelio prostatico è regolato dagli androgeni endogeni (testosterone e di-idrotestosterone). Nella sua fase iniziale, anche la neoplasia prostatica è regolata ed accresciuta dagli androgeni e dalla loro azione sul recettore. Tuttavia, trascorso un certo periodo (2/3 anni), il tumore alla prostata sviluppa "indipendenza" dall'azione degli androgeni, ovvero il recettore subisce mutazioni che, o ne aumentano la "sensibilità" consentendo pertanto la formazione di legami con ligandi non specifici, o determinano l'amplificazione del numero di recettori sulla membrana cellulare.

Ognuno degli stadi di progressione della neoplasia prostatica sopra descritti avviene tipicamente nell'ordine di anni e l'intero processo richiede decenni.

¹⁵ Valdman, A.; Jonmarker, S.; Ekman, P.; Egevad, L., *Diagn Cytopathol* **2006**, 34 (5), 317-22.

¹⁶ Hanahan, D.; Weinberg, R. A., *Cell* **2000**, 100 (1), 57-70.

¹⁷ Folkman, J., *Curr Mol Med* **2003**, 3 (7), 643-51.

1.2. L' Androgeno Recettore (AR)

L'androgeno recettore (AR), appartenente alla famiglia dei recettori steroidei, è un fattore di trascrizione ligando-dipendente che regola l'azione degli androgeni nelle cellule.

Appartiene alla categoria dei recettori nucleari, composta da 48 membri, divisi in 3 classi:

- Classe I: recettori per estrogeno, progesterone, glucocorticoidi ed androgeni;
- Classe II: recettori per vitamina d, retinoidi e tiroidei;
- Classe III: recettori per ligandi non ancora identificati, cosiddetti “orfani”

1.2.1. Struttura e Funzione dell' AR

La sequenza di DNA dell'androgeno recettore è presente nel cromosoma X, il quale presenta 8 esoni, 90 kDa di sequenze che codificano 919 amminoacidi.¹⁸

Come PR ed ER, anche AR si presenta in due isoforme, AR-B e AR-A; la seconda è priva dei primi 187 amminoacidi e la sua struttura, funzione e caratterizzazione sono ancora scarsamente conosciute.

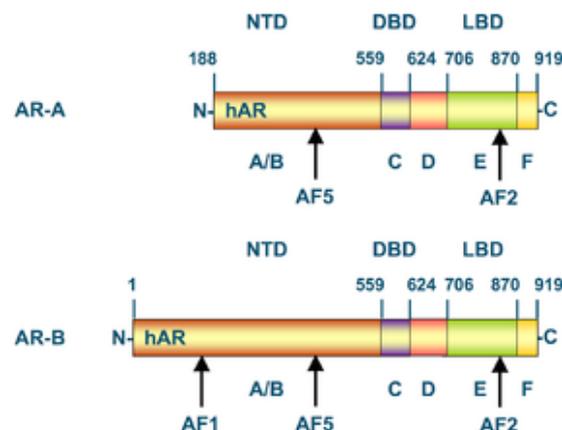


Fig.3 Struttura dei domini delle due isoforme (AR-A and AR-B) del recettore androgeno umano. Il numero sopra la barra si riferisce ai residui amminoacidi che separano i domini, partendo dall'N-terminale fino al C-terminale. NTD = N-terminal domain, DBD = DNA binding domain. LBD = ligand binding domain. AF = activation function http://en.wikipedia.org/wiki/Androgen_receptor

¹⁸ Lu, N. Z.; Wardell, S. E.; Burnstein, K. L.; Defranco, D.; Fuller, P. J.; Giguere, V.; Hochberg, R. B.; McKay, L.; Renoir, J. M.; Weigel, N. L.; Wilson, E. M.; McDonnell, D. P.; Cidlowski, J. A., *Pharmacol Rev* **2006**, 58 (4), 782-97.

AR è composto dai seguenti domini principali, visibili nell'immagine ed indicati dalle lettere che vanno da A ad F (Fig.3):

- Dominio NH2 terminale (NTD, "*NH2-terminal domain*", A/B, Fig. 3), che contiene AF-1, indispensabile per l'attività di trascrizione attivata dal legante e AF-5, responsabile dell'attività in assenza di legante;
- Dominio di legame al DNA, (DBD, "*DNA-binding domain*", C, Fig. 3), responsabile dell' attacco di AR all'ARE ("*androgen responsive element*")), 5'-AGAACANNNTGTTCT-3', sul promotore del gene di risposta androgena.¹⁹ Il DBD è costituito da due unità cisteiniche, collegate ad atomi di zinco, responsabili del riconoscimento e della dimerizzazione del DNA.
- La regione "cerniera" (D, Fig. 3), che si trova tra DBD e LBD ("*ligand binding domain*"), è ricca di lisina ed è molto importante per la localizzazione nucleare del segnale da parte del recettore.^{20,21} L'eventuale rimozione di questo dominio eliminerebbe la localizzazione nucleare del recettore androgeno in presenza di un legante, perdendo di conseguenza l'attività trascrizionale.
- Il residuo COOH terminale del LBD, responsabile del legame con il legante, è costituito da 11 eliche e contiene una seconda funzione AF-2.

1.2.2. Meccanismo d'azione di AR

In assenza di ligandi, AR assume una conformazione non attiva durante la quale è localizzato nel citoplasma ed è legato alle proteine HSP70 e HSP90 (Fig. 4). La formazione del legame con il ligando, provoca un cambiamento conformazionale nel recettore che causa la dissociazione delle HSPs (heat shock proteins), la sua dimerizzazione e traslocazione nel nucleo, dove si lega all'elemento di risposta ormonale (ARE, hormone response element) sullo specifico gene promotore di risposta androgenica.

¹⁹ Verrijdt, G.; Haelens, A.; Claessens, F., *Mol Genet Metab* **2003**, 78 (3), 175-85.

²⁰ Gao, T.; Marcelli, M.; McPhaul, M. J., *J Steroid Biochem Mol Biol* **1996**, 59 (1), 9-20.

²¹ Ylikomi, T.; Bocquel, M. T.; Berry, M.; Gronemeyer, H.; Chambon, P., *EMBO J* **1992**, 11 (10), 3681-94.

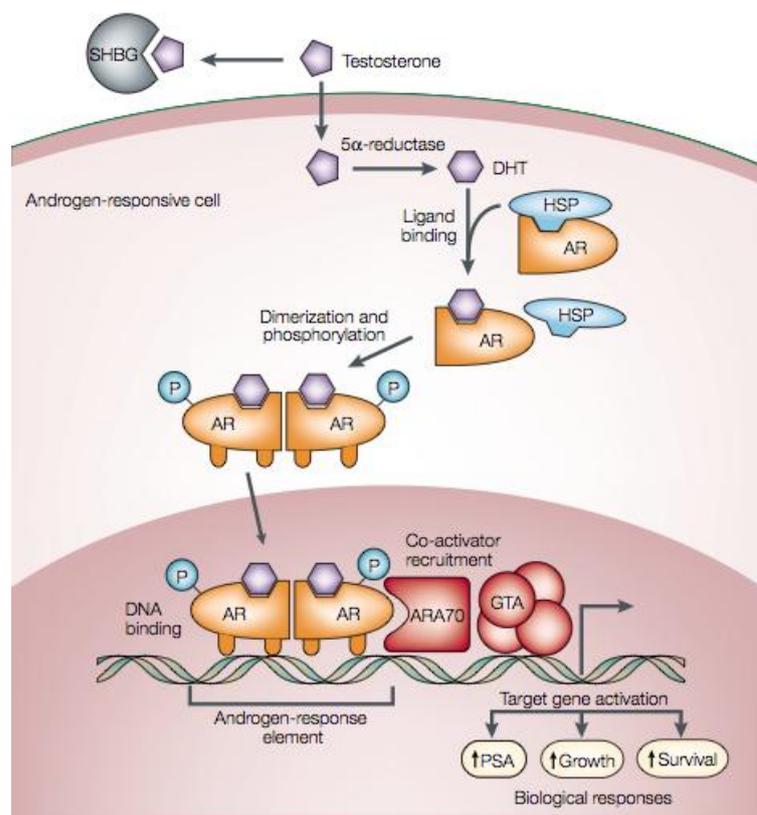


Fig.4 Meccanismo di azione dell' androgeno recettore²²

E' stato dimostrato inoltre, come AR attivato recluti co-regolatori e fattori di trascrizione generici, al fine di up- o down-regolare la trascrizione del gene target.²³

1.3. Trattamento del cancro alla prostata

Dopo la scoperta fatta da Huggins e Hodges negli anni '40, sulla dipendenza della crescita delle cellule prostatiche dagli ormoni androgenici, l'interesse scientifico si è incentrato sui meccanismi volti controllare e ridurre i livelli circolanti di androgeni e ad inibire l'attività del loro recettore, AR. La castrazione farmacologica e/o chirurgica, utilizzata per bloccare la sintesi di androgeni, determina eventi avversi che influenzano negativamente la qualità di vita dei pazienti senza inibire, se non in maniera modesta, la produzione di androgeni da

²² Feldman, B. J.; Feldman, D., *Nat Rev Cancer* **2001**, 1 (1), 34-45.

²³ Narayanan, R.; Mohler, M. L.; Bohl, C. E.; Miller, D. D.; Dalton, J. T., *Nucl Recept Signal* **2008**, 6, e010.

parte delle ghiandole surrenaliche. I farmaci antiandrogeni si sono dimostrati in grado di inibire l'attività degli androgeni bloccando in maniera competitiva l'interazione del testosterone e del diidrotestosterone (DHT) con AR. Questi farmaci, di natura steroidea o non steroidea, possono essere utilizzati singolarmente o in combinazione con la castrazione farmacologica per indurre un blocco androgenico totale (BAT). Gli antiandrogeni non steroidei sembrano essere meglio tollerati degli analoghi steroidei, ed attualmente rappresentano l'unica possibilità per evitare la castrazione, nel trattamento endocrino del cancro alla prostata. Tra questi farmaci, la bicalutamide (nome commerciale, Casodex®) è di gran lunga il farmaco più tollerato, anche se, come gli altri, presenti l'inconveniente di acquisire proprietà agoniste quando AR presenta determinate mutazioni (W741C e H874Y)^{24,25} Inoltre, nonostante l'uso combinato della castrazione farmacologica e del blocco di AR comporti inizialmente una buona percentuale di risposta, nel tempo i tumori alla prostata tendono a recidivare e a progredire. Infatti, un evento considerato cruciale nella progressione del tumore alla prostata è il passaggio dallo stadio ormono-sensibile a quello definito come ormono-refrattario. Nello stadio precoce della malattia (ormono-sensibile), la terapia ormonale mediante deprivazione androgenica, rappresenta l'approccio terapeutico più efficace in grado di portare a remissione la malattia. Tuttavia, con un'elevata frequenza, dopo un periodo di circa 2-3 anni, il tumore progredisce ad uno stadio più aggressivo, ormono-indipendente, con comparsa di metastasi a distanza, ossa od altra sede. In questa fase la prognosi è infausta e la sopravvivenza media risulta compresa tra i 10 e i 20 mesi.²⁶ La chemioterapia rappresenta l'unica arma terapeutica a disposizione per questi pazienti la cui aspettativa di vita rimane, tuttavia, estremamente bassa. Esiste pertanto una forte necessità di determinare terapie efficaci ed innovative per la cura del tumore alla prostata in fase avanzata.

²⁴ [Urushibara, M.; Ishioka, J.; Hyochi, N., et al., *Prostate*, **2007**, 67, 799-807.

²⁵ Hara, T.; Mijazaki, J.; Araki, H., et al., *Cancer Res* **2003**, 63, 149-153.

²⁶ Pienta, K. J.; Smith, D. C., *CA Cancer J Clin.* **2005**,55(5) 300-18.

1.4. Antiandrogeni

Gli antiandrogeni si legano selettivamente ad AR inibendo l'azione degli androgeni endogeni a livello cellulare. Essi, infatti, si legano ai siti attivi dell'androgeno recettore all'interno dei nuclei delle cellule prostatiche, bloccando pertanto la trascrizione genica e causando morte cellulare per apoptosi.²⁷

L'azione antiandrogenica si avvale di due meccanismi alternativi: l'inibizione del legante androgeno, attraverso la formazione competitiva del legame con AR, oppure l'inibizione del recettore attraverso meccanismi androgeno-indipendenti. Utilizzeremo il termine "antagonisti del recettore androgeno" per quest'ultima categoria di molecole, in quanto la loro azione consiste nell'inibire AR indipendentemente dal fatto che l'attivazione sia mediata o meno dall'androgeno.

E' possibile distinguere infine due categorie di antiandrogeni: steroidei o non steroidei.

Di seguito analizzeremo gli sviluppi della ricerca scientifica sugli antiandrogeni per la cura del tumore alla prostata, soffermandoci sulle molecole che hanno presentato elevata attività anti tumorale, sottolineandone pregi e difetti.

1.4.1. Antiandrogeni e cancro alla prostata

Il primo antiandrogeno testato clinicamente durante gli anni 70 è stato il ciproterone acetato (Fig.6), (antiandrogeno steroideo).

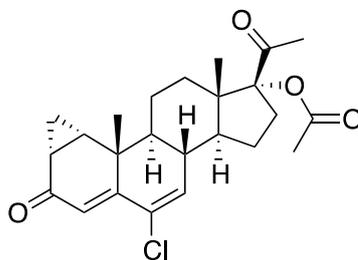


Fig.6 Ciproterone acetato

²⁷ Gaillardmoguilewsky, M., *Urology* **1991**, 37 (2), 5-12.

Le sue proprietà antiandrogeniche furono evidenziate mediante test in vivo, tramite esperimenti di femminizzazione di ratti di sesso maschile; seguirono inoltre studi su pazienti affetti dalla malattia. Il ciproterone agisce sia come antagonista competitivo del recettore androgeno, sia come inibitore di gonadotropina, riducendo tra l'altro i livelli di androgeno, estrogeno ed LH (ormone luteinizzante).

Studi clinici dimostrarono un'ottima efficacia del farmaco e poche contro indicazioni se confrontato con altri composti utilizzati nella prassi clinica per la cura del tumore alla prostata. Attualmente, il ciproterone acetato è ancora utilizzato come ingrediente attivo in pillole ad uso contraccettivo.

1.4.2. Antiandrogeni non steroidei

Di seguito sarà effettuata una panoramica delle molecole ad attività antiandrogena di natura non steroidea, che ad oggi rappresentano la scelta terapeutica più diffusa per la cura del cancro alla prostata.²⁸

Flutamide (Fig.7) è un derivato acetanilidico, che agisce come antagonista puro di AR, convertendosi in vivo nella sua forma attiva, la 2-hydroxyflutamide; dopo l'approvazione della Food and Drug Administration (FDA) nel 1989, è stato utilizzato assieme ad un GnRF (gonadotropin-releasing factor) agonista nella cura del cancro alla prostata nonostante il suo breve periodo di semivita.²⁹

Nilutamide (Fig.7) è un antagonista di AR ed ha una struttura che si differenzia dalla Flutamide per la presenza di un gruppo nitrotrifluoro-toluene; a differenza della Flutamide, questo composto ha un tempo di semivita più lungo e fu approvato nel 1996 con una dose giornaliera consigliata di 300 mg, poi rimodulati in 150mg/d. Tuttavia, il trattamento con nilutamide causa nei pazienti gravi effetti collaterali quali polmoniti e ritardato adattamento al buio, che ne hanno drasticamente limitato l'impiego clinico.³⁰

Bicalutamide (Fig.7) invece è una fluorofenil propanammide non steroidea, somministrabile per via orale in dosi di 50 mg/d in combinazione con un agonista

²⁸Haendler, B.; Cleve, A., *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012, 352, 79–91.

²⁹Brogden, R. N.; Chrisp, P., *Drugs Aging* **1991**, 1, 104–115.

³⁰Dole, E. J.; Holdsworth, M. T., *Ann. Pharmacother* **1997**, 31, 65–75.

GnRH (Gonadotropin releasing hormone). La bicalutamide ha una struttura chimica caratterizzata da un centro stereogenico e pertanto esiste nelle forme enantiomeriche (R) ed (S). Seppure numerosi studi clinici abbiano dimostrato che l'enantiomero (R) è più attivo,³¹ più affine ad AR, un tempo di semivita più lungo ed un migliore accumulo nel plasma, per motivi legati al processo industriale di sintesi, esso viene commercializzato in forma racema (Casodex®, Atra Zeneca).

La bicalutamide, grazie ad una farmacocinetica estremamente favorevole ed alla scarsità di effetti collaterali, è diventato il principale antiandrogeno utilizzato in clinica per il trattamento del cancro alla prostata.³²

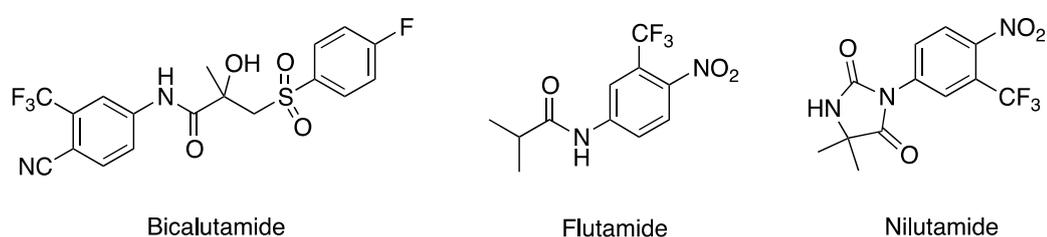


Fig.7 Antiandrogeni non steroidei: Bicalutamide, Flutamide, Nilutamide

Uno studio effettuato su più di 8000 pazienti ha dimostrato come una dose quotidiana di 150 mg, come unica terapia o in affiancamento alla radioterapia, abbia contribuito sensibilmente alla sopravvivenza media dei pazienti.^{33,34}

Tuttavia, l'entusiasmo iniziale nella comunità scientifica, legato agli ottimi risultati clinici, fu presto smorzato dall'evidenza che molti pazienti iniziavano a sviluppare (circa 2 anni) una maggiore resistenza al trattamento antiandrogeno^{35,36} accompagnata talvolta da un rinvigorimento della malattia. Studi specifici hanno dimostrato che tale fenomeno è legato all'insorgere di specifiche mutazioni del recettore androgeno, che non solo rendono inattiva la bicalutamide come antagonista, ma la recepiscono come un agonista, e quindi promotore della malattia. In questi pazienti, infatti, si è osservata una temporanea regressione del

³¹ Mukherjee, A.; Kirkovsky, L.; Yao, X. T.; Yates, R. C.; Miller, D. D.; Dalton, J. T., *Xenobiotica* **1996**, 26, 117–122.

³² Akaza, H., *Cancer Sci* **2001**, 102, 51–56.

³³ McLeod, D. G.; Iversen, P.; See, W. A.; Morris, T.; Armstrong, J.; Wirth, M. P., *BJU Int* **2006**, 97, 247–254.

³⁴ Wirth, M. P.; Hakenberg, O. W.; Froehner, M., *Front. Radiat. Ther. Oncol.* **2008**, 41, 39–48.

³⁵ Chen, Y.; Sawyers, C. L.; Scher, H. I., *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, 8, 440–448.

³⁶ Donkena, K. V.; Yuan, H.; Young, C. Y., *Curr. Cancer Drug Targets* **2010**, 10, 402–410.

tumore una volta sospeso il trattamento con bicalutamide (AWS, androgen withdrawal syndrome).

Il fenomeno della resistenza alla terapia ormonale è stato definito come HRPC “*Hormone-Refractory metastatic Prostate Cancer*”. Le alternative terapeutiche per pazienti affetti da HRPC non sono molte, e tra queste la terapia a base di Docetaxel (Fig. 8), rappresenta la prassi clinica, seppur sia in grado di garantire tempi medi di sopravvivenza che vanno dai 6 ai 15 mesi.³⁷

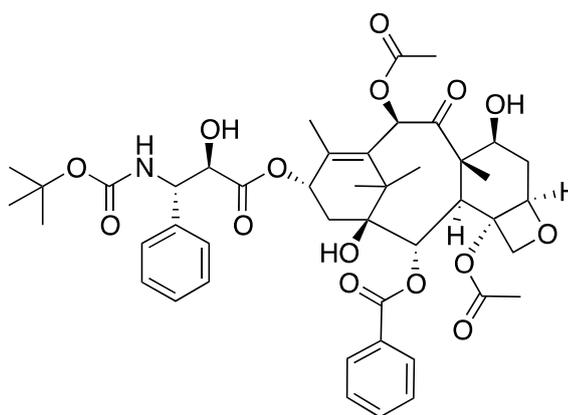


Fig.8 Docetaxel

La ricerca scientifica si è quindi indirizzata verso la scoperta di nuove molecole in grado di agire come antagonisti puri in condizioni di sovra-espressione o mutazione dell’androgeno recettore. MDV3100 e BMS-641988 (Fig.9) sono fra le molecole che hanno recentemente fornito risultati incoraggianti nei test clinici..

³⁷ Diaz, M.; Patterson, S. G., *Cancer Control* **2004**, 11 (6), 364-73.

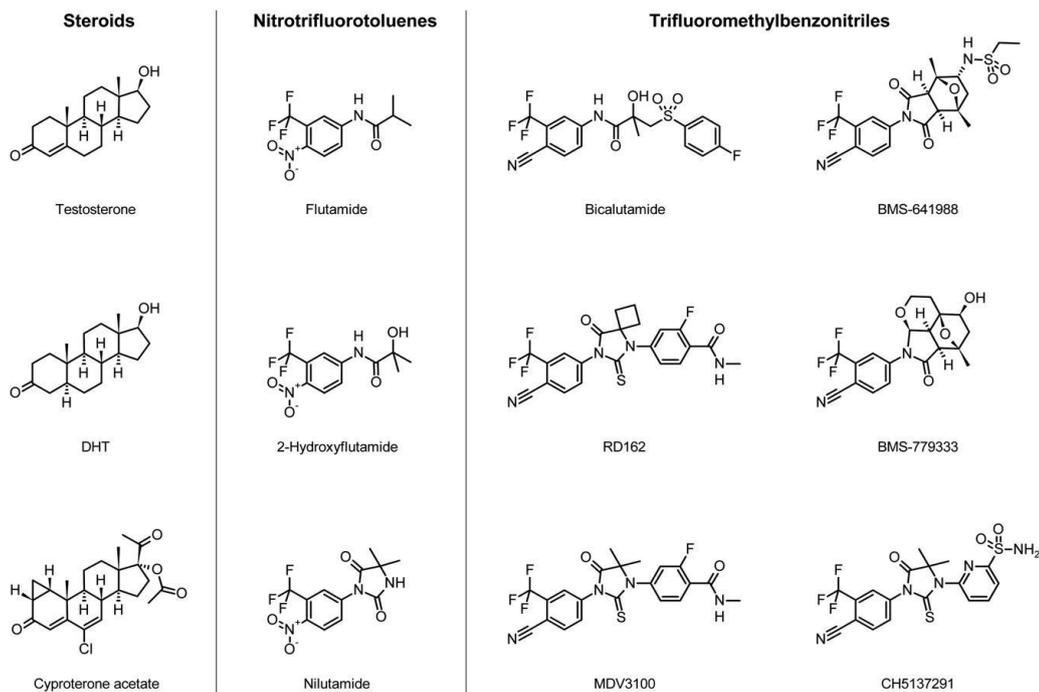


Fig.9 Schema riassuntivo delle molecole ad attività antiandrogena più importanti

1.4.3. Antiandrogeni in sviluppo clinico

RD162 e MDV3100 (Fig.9) sono molecole appartenenti alla categoria chimico-strutturale delle diaril-tioidantoine, analoghi del nilutamide, e che hanno mostrato un'elevata affinità per AR.³⁸

RD162 dimostra maggior carattere antagonista rispetto a bicalutamide nei confronti di determinati geni target e previene il legame dell'AR con la maggior parte dei geni regolatori nelle regioni analizzate.³⁹ Sia per RD162 che per MDV3100 è stata osservata azione anti neoplastica anche su tumori opportunamente ingegnerizzati, ovvero caratterizzati da sovra-espressione dell'androgeno recettore.

MDV3100 è stato testato su 140 pazienti affetti da CRPC “castration-resistant prostate cancer”, ovvero affetti da malattia metastatica o progressiva, in dosi che

³⁸ Jung, M.E.; Ouk, S.; Yoo, D.; Sawyers, C. L.; Chen, C.; Tran, C.; Wongvipat, J., *J. Med. Chem.* **53** **2010**, 2779–2796.

³⁹ Makkonen, H.; Kauhanen, M.; Jaaskelainen, T.; Palvimo, J. J., *Mol. Cell. Endocrinol.* **2011**, 331, 57–65.

variano da 30 a 600 mg/day;⁴⁰ gli effetti anti tumorali sono stati osservati considerando parametri come la diminuzione del PSA “*antigene prostatico specifico*” e la conta delle cellule tumorali circolanti (ctc, “*circulating tumor cell count*”). La massima dose tollerata dai pazienti è stata di 240 mg, ed il sintomo principale correlato ad un dosaggio superiore è risultato la stanchezza; infine un dosaggio di 160 mg è stato impiegato in ulteriori studi di fase clinica III. Il primo studio è iniziato all'inizio del 2010, reclutando pazienti CRPC già trattati con taxani, e la seconda, iniziata pochi mesi dopo, reclutando pazienti CRPC non pretrattati.

BMS-641988 (Fig.9) è un oxabicyclo-immide, che ha mostrato un'ottima affinità di legame per AR ed un'attività antagonista superiore alla bicalutamide nei saggi di trans-attivazione;⁴¹ inoltre esso dimostra un'attività citotossica maggiore in diversi tumori xeno trapiantati ed un ritardo nella ripresa del tumore superiore a quelle della bicalutamide. Sulla base di questi incoraggianti risultati pre-clinici, sono stati avviati studi clinici di fase I in pazienti CRPC⁴². A 61 uomini sono stati somministrati tra i 5 e 100 mg di dose giornaliera del composto. La risposta parziale basata sull'imaging è stata osservata solo in un paziente, mentre una diminuzione di PSA di oltre il 30% è stata osservata nel 16% dei pazienti. Questa limitata attività antitumorale nell'uomo ed il verificarsi di una crisi epilettica in un paziente ha portato alla conclusione della sperimentazione. In seguito, sono stati eseguiti studi specifici per definire le cause di questo grave effetto collaterale in diverse specie. Tali studi hanno dimostrato che alcuni antiandrogeni possono agire anche come antagonisti del recettore GABA_A, il che acquista rilevanza in vivo se abbiamo a disposizione concentrazioni cerebrali sufficientemente elevate.⁴³

Questa nuova scoperta è stata decisiva nello sviluppo degli antagonisti di AR. Negli ultimi anni sono stati descritti numerosi nuovi antiandrogeni che sono in fase preclinica e molti di essi hanno dimostrato di possedere attività anti-proliferativa sul cancro alla prostata in modelli xenotrapiantati. BMS-779.33

⁴⁰ Scher, H. I.; Beer, T. M.; Higano, C. S.; Anand, A.; Taplin, M. E.; Efstathiou, E.; Rathkopf, D.; Shelkey, J.; Yu, E. Y.; Alumkal, J., et al., *Lancet* **2010**,375, 1437– 1446.

⁴¹ Attar, R. M.; Jure-Kunkel, M.; Balog, A.; Cvijic, M. E.; Dell-John, J.; Rizzo, C. A.; Schweizer, L.; Spires, T. E.; Platero, J. S.; Obermeier, M., et al., *Cancer Res.* **2009**, 69, 6522–6530.

⁴² Rathkopf, D.; Liu, G.; Carducci, M. A.; Eisenberger, M. A.; Anand, A.; Morris, M. J.; Slovin, S. F.; Sasaki, Y.; Takahashi, S.; Ozono, S., et al., *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17, 880–887.

⁴³ Foster, W. R.; Car, B. D.; Shi, H.; Levesque, P. C.; Obermeier, M. T.; Gan, J.; Arezzo, J. C.; Powlin, S. S.; Dinchuk, J. E.; Balog, A., et al., *Prostate* **2011**, 71, 480–488.

(Fig.9) appartiene ad una seconda generazione di antagonisti di AR e presenta proprietà anti tumorali paragonabili all'analogo BMS-641.988, a cui è strutturalmente correlato.⁴⁴ BMS-779.33 è stato ampiamente caratterizzato per quanto riguarda le proprietà farmacocinetiche, ma studi tossicologici a lungo termine sui cani hanno rivelato il manifestarsi negli animali di fenomeni di convulsione, che hanno portato alla sospensione del programma.

Il derivato dimetil-tioidantoinico CH513729⁴⁵ è in grado di inibire la crescita del tumore trapiantato LNCaP-BC2, riducendo inoltre i livelli di PSA nel plasma dei ratti.

Infine sono stati isolati dall'albero africano *Pygeum africanum*⁴⁶ due composti naturali ad attività antiandrogenica: l'acido atrarico e la N-butil-benzenesulfonammide; entrambi inibiscono la proliferazione delle linee cellulari tumorali e l'acido atrarico previene la diffusione nella matrice extra cellulare.

1.4.4. Sintesi di antiandrogeni non steroidei: un nuovo approccio sintetico

I limiti esibiti dalle molecole ad attività antagonista sopra descritte, mettono in evidenza la necessità stringente di studiare e realizzare nuovi composti in grado di agire come anti-androgeni puri in condizioni di HRPC. A tale riguardo, nel laboratorio di ricerca presso cui ho svolto il presente lavoro di tesi, è stata sviluppata e messa a punto una nuova strategia sintetica versatile ed economica, per l'ottenimento di nuovi derivati ad attività antiandrogena, caratterizzati da una struttura chimica che coniuga le caratteristiche costitutive di bicalutamide e nilutamide.⁴⁷

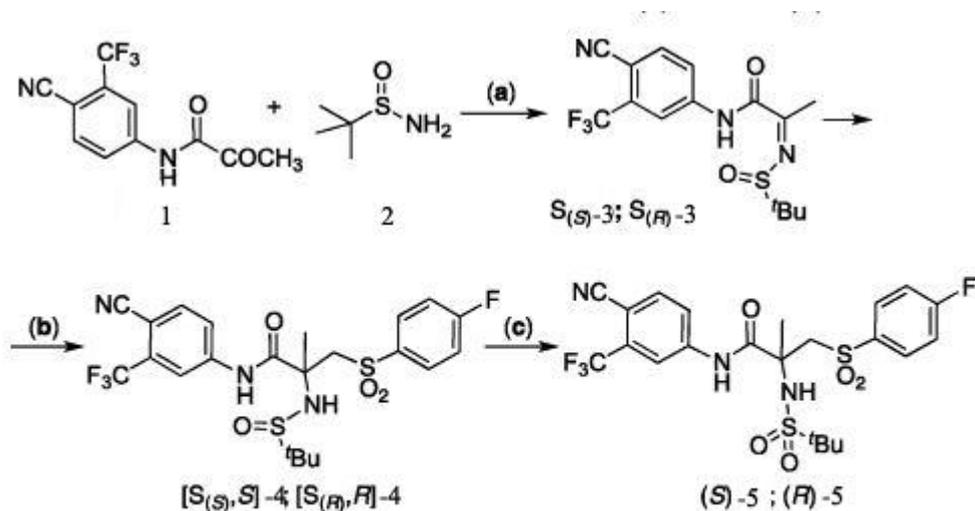
⁴⁴ Salvati, M. E.; Balog, A.; Shan, W.; Rampulla, R.; Giese, S.; Mitt, T.; Furch, J. A.; Vite, G. D.; Attar, R. M.; Jure-Kunkel, M. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 1910–1915.

⁴⁵ Yoshino, H.; Sato, H.; Shiraishi, T.; Tachibana, K.; Emura, T.; Honma, A.; Ishikura, N.; Tsunenari, T.; Watanabe, M.; Nishimoto, A., et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 8150–8157.

⁴⁶ Schleich, S., Papaioannou, M., Baniahmad, A., Matusch, R., *Planta Med.* **2006**, 72, 547–551.

⁴⁷ Varchi, G.; Guerrini, A.; Tesei, A.; Briigliadori, G.; Bertucci, C.; Di Donato, M.; Castoria, G., *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, DOI:10.1021/ml3000269

Il passaggio chiave di questa procedura sintetica è l'utilizzo di *tert*-butil sulfonammidi, introdotte dal gruppo di Ellman^{48,49,50} come precursori di ammine chirali.



Reagenti e condizioni: (a) $\text{Ti}(\text{OEt})_4$; THF, 40 °C. (b) *p*-F-(CH_3SO_2) C_6H_4 , $^n\text{BuLi}$, THF, -45 °C. (c) MCPBA, CH_2Cl_2 , rt, 2 h.

Fig.10 Schema sintetico

Le sulfenil-immino propanammidi $S(S)$ -3 e $S(R)$ -3 sono ottenute per reazione tra **1** e (*S*)-2 o (*R*)-2 con una resa del 56% e rappresentano i precursori per la sintesi dei nuovi leganti di AR.^{51,52} L'elevata reattività di queste molecole, infatti, consente la reazione con differenti carbanioni; in questo caso è stato utilizzato il fluoro fenil metil solfone, ottenendo i prodotti $[S(S), S]$ -4 e $[S(R), R]$ -4 con una resa del 74% ed un eccesso diastereomerico del 76%, misurato mediante spettroscopia NMR del grezzo di reazione.⁵³ I due diastereoisomeri puri sono ottenuti mediante separazione cromatografica su gel di silice.

Inoltre, dall'intermedio $[S(S), S]$ -7 o $[S(R), R]$ -7 è possibile accedere ad una serie di prodotti quali (*S*)-5, (*R*)-5; (*S*)-6, (*R*)-6; (*S*)-7, (*R*)-7; (*S*)-8, (*R*)-8; (*S*)-9, (*R*)-9

⁴⁸ Cogan, D. A.; Liu, G.; Kim, K.; Backes, B. J.; Ellman, J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8011–8019.

⁴⁹ Liu, G.; Cogan, D. A.; Owens, T. D.; Tang, T. P.; Ellman, J. A., *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1278–1284.

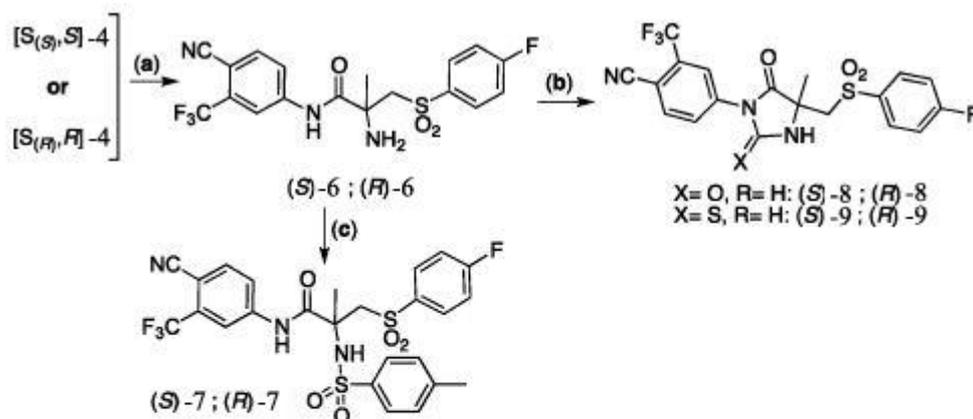
⁵⁰ Ellman, J. A.; Robak, M. T.; Herbage, M. A., *Chem. Rev.* **2010**, 110, 3600–3740 and references therein.

⁵¹ James, K.; Ekwuribe, N., *Synthesis* **2002**, 850–853.

⁵² Parent, E. E.; Dence, C. S.; Jenks, C.; Sharp, T. L.; Welch, M. J.; Katzenellenbogen, J., *J. Med. Chem.* **2007**, 1028–1040.

⁵³ Liu, J.; Hu, J., *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 11443–11454.

(Fig.11); La configurazione assoluta di (*S*)-**6** è stata determinata mediante ECD “*electronic circular dichroism*”.



Reagenti e condizioni: (a) HCl, MeOH, $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ to rt, 3 h. (b) CDI, DPEA, toluene, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 h or DPTC, DPEA, toluene, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 h. (c) *p*- $\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$, pyridine.

Fig.11 Schema sintetico

1.5. Terapie radicali: vantaggi e limiti

Come già più volte sottolineato, gli attuali trattamenti per la cura del cancro alla prostata in fase avanzata (HRPC), offrono un beneficio di sopravvivenza minimo per i pazienti, influenzandone peraltro gravemente la qualità di vita.⁵⁴

Inoltre, pazienti affetti da cancro alla prostata in stadio primordiale, alla luce dei controversi effetti che le terapie radicali hanno, decidono in molti casi di non sottoporsi a cure di questo tipo.

In questi casi la sorveglianza attiva o l'intervento selettivo successivo, sono approcci terapeutici che consentono di ridurre il numero di pazienti colpiti da patologie parallele, consecutive ad un periodo di cura radicale.

Il beneficio di un trattamento anti tumorale, nel caso della prostata è il risultato di un bilancio tra lo sradicamento del cancro dalla ghiandola e i danni indesiderati al di fuori di quest'ultima; qualora si riuscisse quindi, a limitare il trattamento alla ghiandola prostatica o ad una zona limitata intorno ad essa, saremmo in grado di

⁵⁴ Klotz, L., *World J Urol.* **2008**, 26, 437–442.

usufruire esclusivamente dei benefici terapeutici, eliminando i problemi relativi ad esempio a sessualità e continenza.

Riuscire quindi a rimuovere il cancro dalla prostata, lasciando intatti gli organi e le strutture vitali che la circondano (il retto, i fasci neurovascolari, l'apparato eiaculatorio), rappresenta il gold-standard della ricerca in tal senso.

Pur essendo ancora lontani dall'avvento di un trattamento che soddisfi questi requisiti, la ricerca scientifica offre oggi nuove prospettive, ed in tal senso uno degli approcci più realistici, meno invasivi e potenzialmente più efficaci è rappresentato dalla terapia foto-dinamica.

1.6. PDT, Photodynamic therapy

La “*photodynamic therapy*” è una tecnica terapeutica utilizzata per la cura del cancro alla prostata localizzato.

PDT è un trattamento che utilizza farmaci fotosensibili: questi agenti sono farmacologicamente inattivi finché non sono esposti alla luce in presenza di ossigeno. Il farmaco attivato dalla luce, infatti, forma ossigeno singoletto, una specie chimica altamente reattiva, direttamente responsabile del danno al DNA e quindi della morte cellulare (Fig.12).⁵⁵

⁵⁵Castano, A. P., et al., *Nat Rev Cancer* **2006**, 6, 535-545.

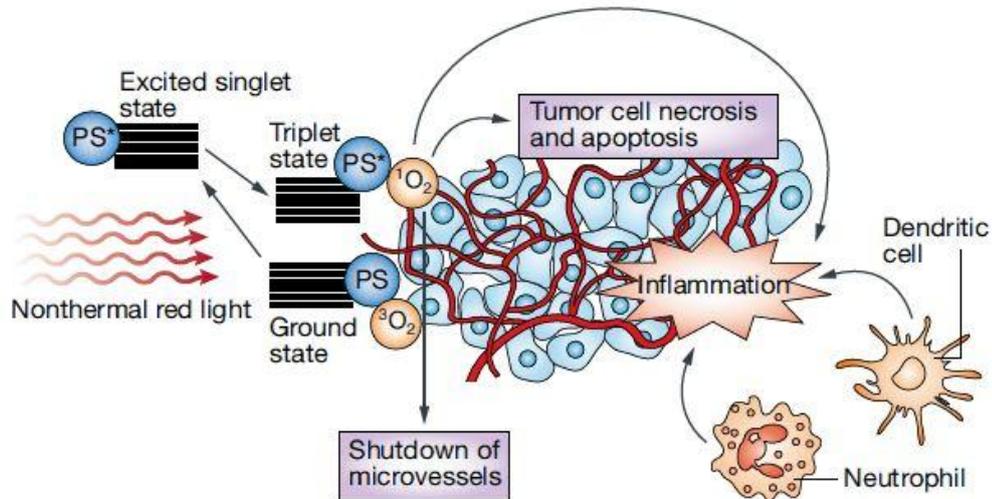


Fig.12 Meccanismo di azione della PDT. Il farmaco fotosensibile (PS) assorbe la luce e un elettrone viene promosso al livello energetico eccitato di singoletto; successivamente l'elettrone cambia il suo stato di spin, passando ad un più stabile e duraturo nel tempo (stato di tripletto). Il tripletto trasferisce energia all'ossigeno, il quale produce la specie molto reattiva ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), direttamente responsabile della necrosi o apoptosi cellulare, che comporta la distruzione del tumore vascolare e la produzione di un' infiammazione che attrae leucociti quali cellule dendritiche e neutrofili.

Questa tecnica fu inizialmente utilizzata per la cura di malattie superficiali o cutanee, come il *lupus vulgaris* ed alcuni tumori dell'epidermide. Il primo utilizzo ufficiale si attribuisce a Von Tappeiner e Jodlbauer nel 1907;⁵⁶ la fonte luminosa utilizzata era la luce visibile ed il farmaco in questione l'eosina.

L'estensione del suo utilizzo per la cura di tumori interstiziali è stato vincolato all'evolversi della tecnologia delle fibre ottiche, fondamentale per la veicolazione della luce all'interno delle zone da trattare. L'utilizzo di PDT comunque non si limita alla cura del cancro ma è utilizzata in altre tipologie terapeutiche come ad esempio la cura dell'*acne vulgaris*.⁵⁷

Nella cura del cancro alla prostata il farmaco fotosensibile può essere somministrato al paziente per via orale o intravenosa e l'irraggiamento è effettuato ad una specifica lunghezza d'onda, impiegando un laser a bassa potenza come fonte luminosa e fibre ottiche contenute in sottili aghi di plastica trasparenti per la veicolazione sino alla prostata.

⁵⁶ Von Tappeiner, H.; Jodlbauer, A., *Leipzig FCW Vogel* **1907**.

⁵⁷ Gold, M. H., *Expert Rev Anti Infect Ther* **2007**, 5, 1059–1069.

Il processo di inserimento degli aghi e delle fibre cilindriche per la diffusione luminosa viene eseguito in anestesia generale, con il paziente in posizione litotomica (Fig.13).⁵⁸

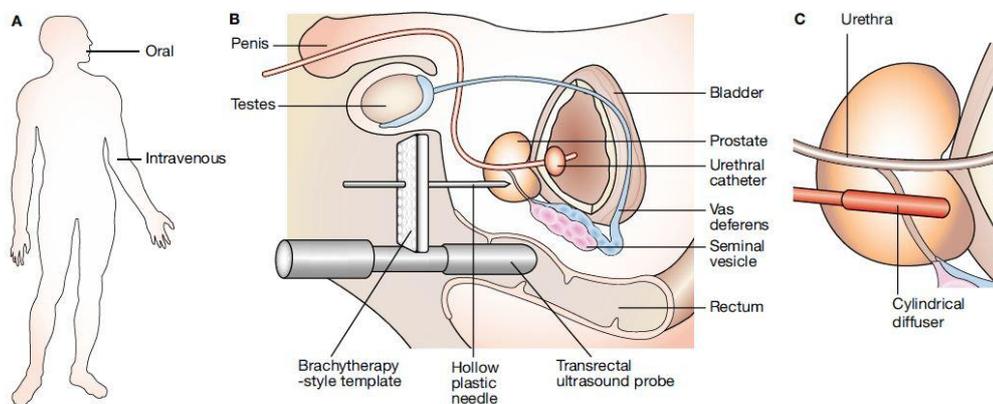


Fig.13 Terapia fotodinamica per la cura del cancro. (A) Somministrazione del farmaco per via orale o intravenosa. (B) Processo di introduzione dell' apparato strumentale nel paziente, sottoposto ad anestesia totale (C) Veicolazione della sorgente luminosa all' organo target.

I farmaci fotosensibili utilizzati in PDT si differenziano per tempo di accumulo nella zona da trattare e per tempo di esposizione alla fonte luminosa necessaria per il raggiungimento del risultato; alcuni di essi impiegano diversi giorni per raggiungere la massima concentrazione all'interno dell'organo interessato; questo tipo di molecole tende ad accumularsi sulla pelle e possono essere attivate con luce solare o artificiale un paio di settimane dopo la somministrazione. Anche il processo di smaltimento del farmaco è importante poiché occorre che il paziente stia al riparo da fonti luminose sino alla sua completa espulsione dal corpo.

Altre molecole, al contrario, diffondono velocemente e si accumulano nell'organo di interesse in tempi molto brevi, nell'arco di minuti, durante i quali sono sottoposti ad irraggiamento; anche il rilascio del farmaco è rapidissimo, evitando in tal modo la necessità di prolungata protezione dalla luce.

Studi iniziali riguardo la distribuzione del farmaco teorizzano una distribuzione omogenea ed una penetrazione della luce in forte relazione con il grado di necrosi delle cellule nella zona interessata.^{59,60} Al contrario, studi successivi hanno

⁵⁸ Moore, et al., *Nature Clinical Practice Urology* **2009**, 6, 18-30.

⁵⁹ Pantelides, M. L., et al., *J Urol* **1990**, 143, 398-401.

dimostrato come i tre componenti fondamentali della PDT (farmaco, luce ed ossigeno) siano caratterizzati da una distribuzione altamente eterogenea all'interno della prostata.⁶¹

1.6.1. Studi clinici di PDT per la cura del cancro alla prostata

Il primo utilizzo di PDT per la cura del cancro alla prostata risale al 1990. Il trattamento ha interessato due pazienti ed è stato eseguito utilizzando un derivato dell'ematoporfirina sul primo paziente e “*profimer sodium*” (Photofrin®; Axcan Pharma, Mont Saint-Hilaire, QC, Canada) sul secondo.⁶² I pazienti prima del trattamento sono stati sottoposti a resezione transuretrale della prostata, per due volte consecutive; dopo sei mesi dalla seconda resezione si è passati al trattamento fotodinamico, convogliando la luce nella cavità prostatica grazie all'uso di una fibra ottica a punta sferica. Il primo controllo medico effettuato tre mesi dopo sui pazienti non ha riscontrato la presenza di malattie residue; un paziente è deceduto 6 mesi dopo il trattamento per un cancro ai polmoni e l'esame istologico della prostata ha dimostrato la totale assenza di qualsiasi tipo di cancro che interessasse l'organo.

In seguito a questo primo approccio terapeutico si è intensificata la ricerca in questo settore, iniziando uno screening di eventuali nuove molecole fotosensibili maggiormente efficaci nella cura del cancro alla prostata.

Temoporfina

La temoporfina (meso-tetra-idrossifenil cloro, mTHPC, Foscan ®; biolitec AG, Jena, Germania) è una molecola fotosensibile che viene attivata dopo circa 2-5 giorni dalla somministrazione che avviene per via endovenosa. Essa si accumula nella pelle, e richiede protezione degli occhi e dell'epidermide dal sole per più di 6 settimane. La temoporfina è stata il primo farmaco utilizzato in uno studio clinico di PDT per la cura del cancro alla prostata, condotto nel 2002 da Nathan e colleghi⁶³ presso l'University College di Londra; lo studio è consistito nella valutazione della terapia fotodinamica in un contesto clinico post- radioterapico.

⁶⁰ Lee, L. K., et al., *BJU Int* **1999**, 84, 821-826.

⁶¹ Li, J.; Zhu, T. C., *Phys Med Biol* **2008**, 53, 2013, 2114.

⁶² Windahl T., et al., *Lancet* **1990**, 336, 1139.

⁶³ Nathan, T. R., et al., *J Urol* **2002**, 168, 1427-1432.

Nel 2006 lo stesso gruppo ha condotto uno studio pilota sull'uso della PDT come prima terapia di intervento su pazienti affetti da cancro alla prostata.⁶⁴ Entrambi gli studi hanno dimostrato la potenziale efficacia della temoporfina nella cura del cancro alla prostata. Tuttavia a causa del crollo finanziario della società produttrice del farmaco e la sua successiva acquisizione da parte di una società che non ha voluto proseguire le ricerche al riguardo, non sono stati effettuati ulteriori esperimenti sull'utilizzo di temoporfina per la cura del carcinoma prostatico.

Protoporfirina IX - ALA indotta

La Protoporfirina IX è una molecola fotosensibile biosintetizzata dagli organismi viventi a partire dall'acido *5-amminolevulinico* (ALA). Zaak e collaboratori⁶⁵ hanno studiato l'uso di ALA come precursore di protoporfirina per la cura del cancro alla prostata.

Il pro-farmaco è stato somministrato per via orale ed è stata analizzata la sua selettività nei confronti di cellule tumorali rispetto a cellule epiteliali sane. La lunghezza d'onda utilizzata per l'attivazione del farmaco è 633 nm e la terapia è stata eseguita su sei pazienti: in un caso la fibra ottica è stata inserita durante prostatectomia radicale; in due pazienti è stato utilizzato un approccio transperineale e nei tre pazienti rimanenti ci si è affidati ad un approccio transuretrale.

I risultati ottenuti sono stati positivi, constatando una diminuzione del 30% di PSA dopo 6 settimane dalla cura nei pazienti ad approccio transperineale ed una diminuzione del 55% di PSA nei pazienti con tecnica transuretrale.

Motexafin lutetium

Motexafin lutetium (MLu, LuTex; Pharmacyclics, Sunnyvale, CA) è stato utilizzato in test su cavie canine⁶⁶ e nella terapia fotodinamica su pazienti già

⁶⁴ Moore, C. M., et al., *Laser Surg Med* **2006**, 38, 356-363.

⁶⁵ Zaak, D., et al., *Medical Laser Application* **2003**, 18, 91-95.

⁶⁶ Hsi, R. A., et al., *Clin Cancer Res* **2001**, 7, 651-660.

sottoposti in precedenza a radioterapia o brachiterapia.⁶⁷ E' stato effettuato uno screening variando le concentrazioni di farmaco, la tipologia di irradiazione ed i tempi di attesa tra la somministrazione del farmaco e la sua attivazione con la luce, decretando così i valori massimi di farmaco e di luce tollerati ed il minor tempo di attesa tra somministrazione del farmaco e sua attivazione.

I pazienti sottoposti a PDT utilizzando questo set di parametri, hanno rivelato un iniziale aumento dei valori di PSA, seguito da una successiva diminuzione sino a valori molto bassi; al contrario, pazienti per i quali sono state utilizzate dosi minime di farmaco e di luce e lunghi tempi di attesa tra somministrazione ed irraggiamento, hanno dimostrato un aumento dei valori di PSA non seguito da diminuzione.

1.6.2. Innovazioni sulla metodologia di PDT: dove intervenire

La PDT, a differenza di altre tecniche terapeutiche, può essere migliorata considerando due aspetti separati: la tipologia di luce impiegata per l'irraggiamento e la natura della molecola fotosensibile.

Per quanto concerne le modificazioni della molecola fotoattivabile, è possibile intervenire su due fronti: a) migliorare le proprietà della porfirina (quantità di ossigeno di singoletto generato, lunghezza d'onda d'eccitazione nel vicino infrarosso); b) apportare modifiche strutturali tali da rendere il composto selettivo nei confronti del recettore androgeno così da limitare il numero e l'entità degli effetti collaterali.

L'irraggiamento viene effettuato mediante fibre ottiche all'interno del tessuto da trattare. L'energia fornita per unità di superficie di fibra ottica e la velocità di erogazione di energia possono essere regolate al fine di modificare la natura della lesione prodotta. Le tecniche più attuali di PDT sono basate su singola somministrazione di farmaco, seguita da irraggiamento. La dose di luce può anche essere somministrata in modo frazionato, con periodi intermittenti di buio (della durata di secondi o ore) per consentire il riassetto delle concentrazioni di farmaco ed ossigeno nella zona interessata. E' stato dimostrato come l'utilizzo

⁶⁷ Patel, H., et al., *Clin Cancer Res* **2008**, 14, 4869-4876.

della tecnica intermittente comporti un aumento dell'efficacia del trattamento, a parità di luce totale utilizzata.⁶⁸

Al contrario si potrebbe frazionare nel tempo anche la dose di farmaco ed effettuare la foto-attivazione con un unico irraggiamento finale.

Per quanto concerne le modifiche strutturali da apportare alle molecole fotosensibili per aumentarne la selettività nei confronti delle cellule tumorali prostatiche, una delle possibili strategie sintetiche è quella di legare alla molecola fotosensibile un anticorpo monoclonale specifico. A tal riguardo è stata sintetizzata una molecola costituita da due componenti legati tra loro: la porfirina pyropheophorbide-a e anti-HER2 "*human epidermal growth factor receptor 2*". Questo sistema ha dimostrato maggiore selettività ed inferiore tossicità rispetto al controllo (pyropheophorbide-a).⁶⁹

Per la cura del cancro alla prostata sarebbe interessante legare alla molecola fotoreattiva un anticorpo monoclonale specifico nei confronti di un antigene presente sulla membrana cellulare prostatica, creando in tal modo un sistema molecolare altamente selettivo. Tuttavia, al meglio delle nostre conoscenze, farmaci di questo tipo non sono stati ancora sintetizzati. E' possibile pertanto creare un elevato numero di molecole a potenziale carattere anti tumorale da utilizzare in PDT unendo una molecola fotosensibile ad un anticorpo monoclonale opportunamente scelti tra la vasta gamma a disposizione; a tal fine è importante analizzare il grado di idrofilicità/lipofilicità della molecola fotoreattiva.

Composti idrofobi hanno il vantaggio di fuoriuscire dal sistema circolatorio per accumularsi all'interno dei tumori, ma la loro somministrazione è difficoltosa e spesso tendono ad aggregarsi in ambiente fisiologico. D'altro canto i composti idrofili sono più semplici da somministrare per via endovenosa ma tendono a rimanere in circolo piuttosto che accumularsi nel tessuto tumorale.

Studi specifici hanno dimostrato come i migliori risultati in termini di efficacia anti-tumorale si ottengano per sistemi costituiti da anticorpi monoclonali e

⁶⁸ Curnow, A., et al., *Laser Surg Med* **2006**, 38, 325-331.

⁶⁹ Savellano, M. D., et al., *Cancer Res* **2005**, 65, 6371-6379.

molecole fotosensibili idrofile; anche il legame intramolecolare stesso nei confronti dell'anticorpo è favorito per molecole fotosensibili idrofile.⁷⁰

Uno degli svantaggi dell'utilizzo di sistemi di questo tipo è che spesso si osserva una diminuzione della loro fototossicità se comparata con quella del fotosensibile somministrato da solo; è inoltre possibile che la massa tumorale sia caratterizzata da una distribuzione eterogenea di antigeni per cui il trattamento potrebbe essere solo parziale. Un altro importante aspetto da tenere in considerazione nel design di un nuovo agente terapeutico è la tipologia di internalizzazione cellulare del farmaco stesso, che può avvenire secondo diversi meccanismi come ad esempio endocitosi mediata da un recettore o meccanismi mediati da recettori specifici posti sulla membrana cellulare, come lipoproteine a bassa densità e recettori della transferrina.⁷¹

Tali considerazioni hanno condotto alla sintesi di sistemi molecolari in cui la molecola fotoreattiva è legata ad una molecola che ha una forte affinità per un recettore sovra espresso nella cellula tumorale. Schneider e collaboratori hanno sintetizzato un sistema coniugato porfirina-folato utile alla veicolazione della porfirina all'interno delle cellule KB nasofaringee.⁷² Questi sistemi molecolari hanno dimostrato maggiore selettività nei confronti delle cellule tumorali rispetto al fotosensibile libero; altri gruppi hanno utilizzato liposomi opportunamente modificati come carriers per la molecola fotoreattiva.^{73,74}

Nel design molecolare inoltre assume grande importanza anche la scelta del linker che si interpone tra la specie fotosensibile e la molecola affine alle cellule tumorali, in quanto la sua natura più o meno idrofila è determinante nel processo di somministrazione e di internalizzazione cellulare.

⁷⁰ Vrouenraets, M. B., et al., *Int J Cancer* **2002**, 98, 793-798.

⁷¹ Sharman, W. M., et al., *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, 56, 53-76.

⁷² Schneider, R., et al., *Bioorg Med Chem* **2005**, 13, 2799-2808.

⁷³ Ichikawa, K., et al., *Biol Pharm Bull* **2004**, 27, 443-444.

⁷⁴ Hamblin, M. R., et al., *Br J Cancer* **2003**, 89, 937-943.

1.6.3. Derivati tri-componente per PDT mirata alla cura del tumore della prostata: lo stato dell'arte

Di seguito è riportata una panoramica sugli studi scientifici di maggior interesse effettuati sulla sintesi di nuovi derivati tri-componente per PDT mirata alla cura del tumore della prostata; molti di questi studi comprendono un successivo approfondimento sulla selettività e tossicità di questi nuovi prodotti su linee cellulari tumorali opportunamente scelte.

Sintesi di un coniugato pheophorbide a-estradiolo

Studi sulla localizzazione delle molecole fotosensibili all'interno delle cellule hanno spesso dimostrato l'assenza di molecole fotosensibili all'interno del nucleo; la loro distribuzione si limita al citoplasma. Sarebbe quindi di grande interesse riuscire ad ingegnerizzare una molecola fotosensibile in grado di penetrare all'interno del nucleo cellulare.

A tal fine è stata sintetizzata una molecola, costituita da una porfirina, pheophorbide a ed estradiolo.⁷⁵ La scelta del fotoreattivo è principalmente legata alla lunghezza d'onda utilizzata per il suo irraggiamento (680 nm, lunghezza d'onda alla quale non assorbono i tessuti), alla elevata capacità di generazione di ossigeno di singoletto⁷⁶ ed alla semplicità di sintesi a partire dalla clorofilla.⁷⁷ L'estradiolo è il ligando specifico per recettori nucleari coinvolti nello sviluppo di tumori estrogeno dipendenti ed il suo ruolo è molto importante nel processo di crescita di cellule endoteliali e di angiogenesi.⁷⁸

Il processo di sintesi consiste in un'iniziale derivatizzazione dell'estradiolo mediante reazione di coupling con un'ammina terminale (che chiameremo *spacer*), caratterizzato da idrofilicità variabile e modulabile mediante la lunghezza e la presenza di ossigeni nella catena (Fig. 14).

⁷⁵ El-Akra, N.; Noiro, A.; Faye, J.; Souhard, J., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, 5, 996-999.

⁷⁶ Krasnovsky, A. A.; Neverov, K. V.; Egorov, S. Y.; Roder, B.; Levald, T., *J. Photochem. Photobiol.* **1990**, B, 5, 245-254.

⁷⁷ Smith, K. W.; Goff, D. A.; Simpson, D. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4946-4954.

⁷⁸ Losordo, D. W.; Isner, J. M., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, 21, 6-12.

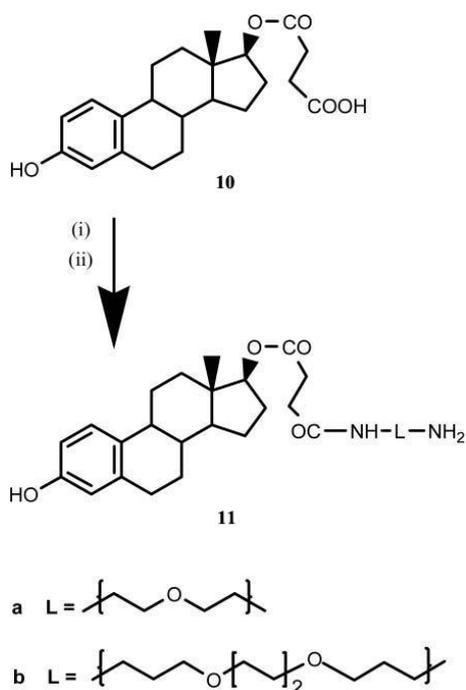


Fig.14 Reagenti e condizioni: (i) TEA, BOP, MeOH, rt, 5 min; (ii) L(NH₂)₂, NMM, MeOH, rt, 24 h.

L'intermedio **11a** o **11b** viene quindi fatto reagire con pheophorbide a dando origine alle molecole **12a** e **12b** rispettivamente (Fig. 15).

Sono state eseguite prove di scissione del DNA confrontando l'azione di **12b** con quella della singola porfirina ed è stato dimostrato come entrambe diano effetto di lisi, e come l'ossigeno di singoletto giochi un ruolo fondamentale nell'intero processo.

L'analisi dell'attività anti-tumorale di questi nuovi composti è stata valutata mediante diversi esperimenti. Il primo riguarda la diffusione e la distribuzione in cellule tumorali del seno MCF-7, caratterizzate da alta espressione dell'estrogeno recettore. Le cellule tumorali sono state trattate ed incubate con i composti **12b** e **pheophorbide a**; **12b** ha dimostrato maggiore efficacia di internalizzazione cellulare (circa 2.5 volte) rispetto alla porfirina da sola, testimoniando così l'importanza del ruolo dell'estradiolo in questo processo. In seguito si è passati all'osservazione della distribuzione cellulare dei composti, mediante l'utilizzo di microscopia a fluorescenza: dopo 3 e 24 h di incubazione si è notato come la porfirina da sola si distribuisca all'interno del citoplasma, intorno ad una zona non fluorescente che probabilmente è il nucleo, mentre nelle cellule trattate con **12b**

sono state osservate macchie fluorescenti all'interno del nucleo, confermando pertanto la traslocazione nucleare, probabilmente mediata dal recettore per gli estrogeni.

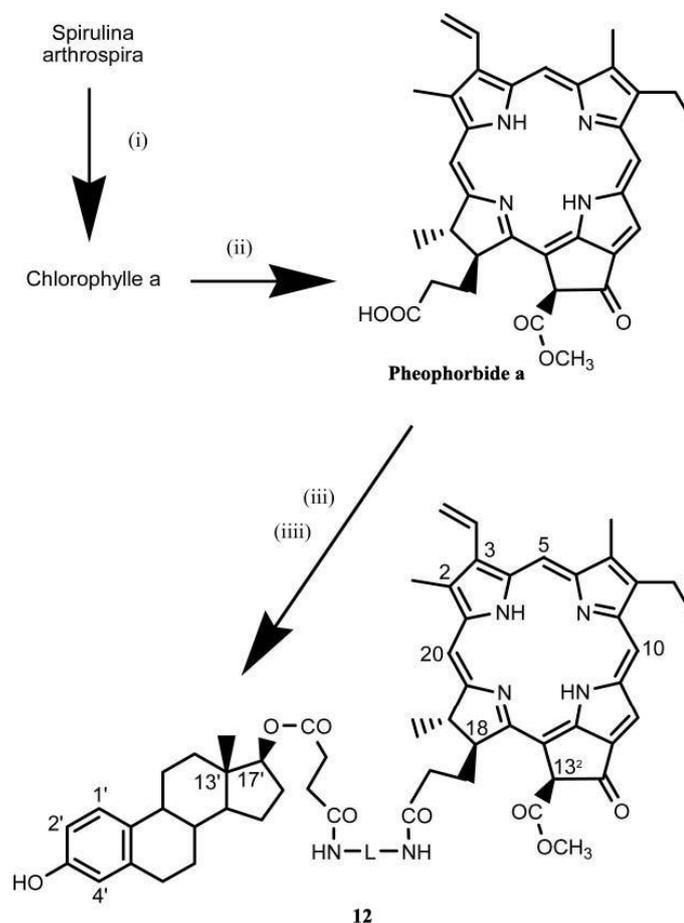


Fig.15 Reagenti e condizioni: (i) acetone, rt, ultrasuoni (15 min), 2 h; (ii) dietil etere-30%, HCl in H₂O; (iii) TEA, BOP, MeOH, 0° C, overnight; (iiii) **11a** o **11b** (Fig. 14), NMM, MeOH, rt, 72 h.

I test di fototossicità sono stati effettuati sulla linea di tumore al seno MCF-7 (ER positiva), e sulla linea SKBR3 (ER negativa), nonché su cellule umane vascolari endoteliali EA.hy926 (ER positive). I risultati hanno rivelato come **12b** sia circa 7 volte più fototossico di **pheophorbide a** sulla linea cellulare MCF-7 mentre i due composti sono equivalenti nei test sulla linea cellulare SKBR3, confermando che l'azione di **12b** è mediata da ER.

Lo stesso test, eseguito con **12a** (linker di minor lunghezza) su cellule tumorali MCF-7, dimostra una fototossicità paragonabile a quello della porfirina da sola; questo dato rivela l'importanza che assume la scelta del linker in termini di di

idrofilicità dello *spacer* stesso nel design di nuove molecole. Infine anche nei test su EA.hy926, **12b** risulta essere circa 7 volte più efficace di pheophorbide a.

Sintesi di coniugati di Pheophorbide a con Doxorubicina e Paclitaxel

In un recente articolo di You e collaboratori,⁷⁹ sono stati riportati due nuovi sistemi molecolari costituiti da **pheophorbide a** coniugata con molecole ad attività antitumorale, in particolare **doxorubicina** (DOX) e **paclitaxel** (PTX), al fine di ottenere composti efficaci in campo diagnostico o terapeutico nel trattamento del cancro (Fig. 16).

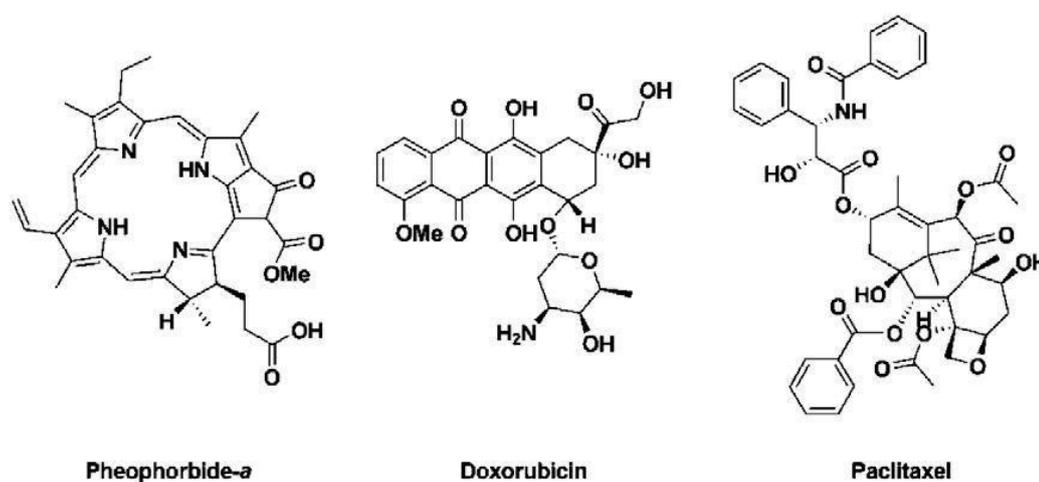


Fig.16 Pheophorbide-a, Doxorubicina e Paclitaxel

La reazione di coupling avviene direttamente tra le due molecole senza l'utilizzo di alcun *spaziatore fra le due entità chimiche* (Fig.17).^{80,81}

⁷⁹ You, H., et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5383-5391.

⁸⁰ Graham, B. J.; Miguel, O. M.; James, S. W.; Anthony, V. D.; Glenn, J. B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1987.

⁸¹ Pickaert, G.; Cesario, M.; Ziesel, R. J., *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 5335.

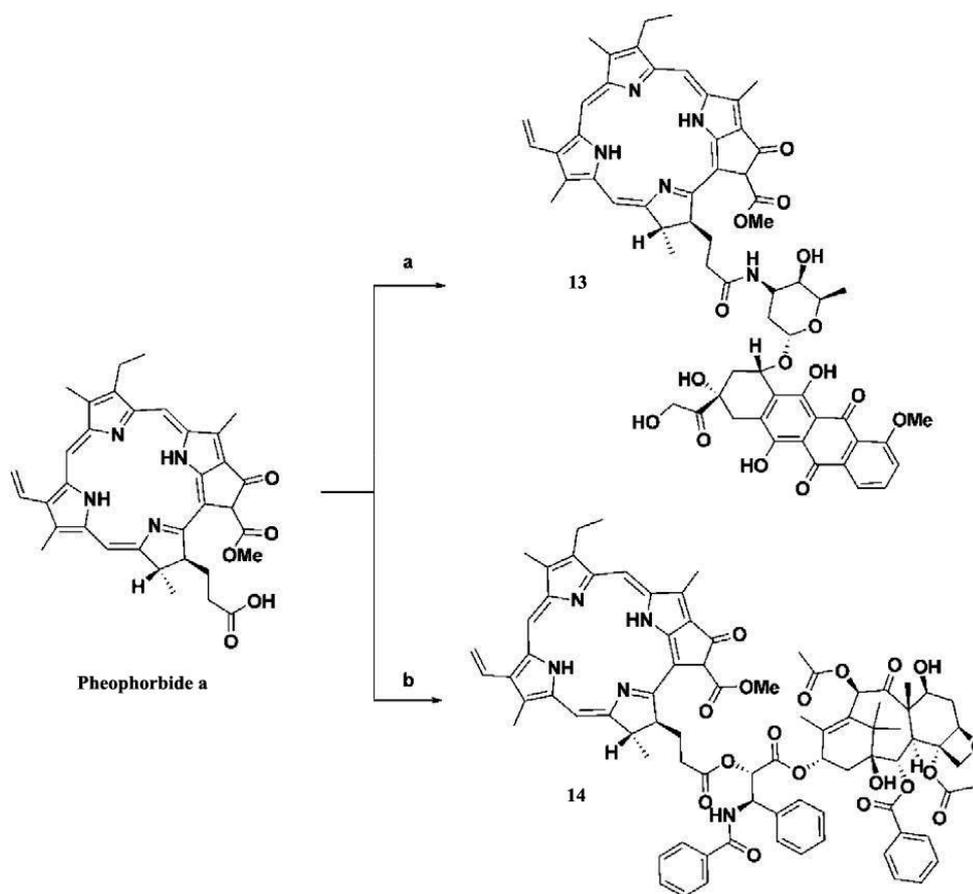


Fig.17 Reagenti e condizioni: (a) DOX, EDC, HOBt, TEA, DCM, DMF, rt, 4h, 53%; (b) PTX, EDC, DMAP, DCM, rt, 4 h, 54%.

Oltre alla sintesi di **13** e di **14** è stata effettuata la sintesi di altri due derivati, **15** e **16**, interponendo un linker idrossicinnamoile tra pheophorbide a e doxorubicina (Fig. 18), ed un linker ammino-benzilossicarbonile tra pheophorbide a e paclitaxel (Fig. 19).

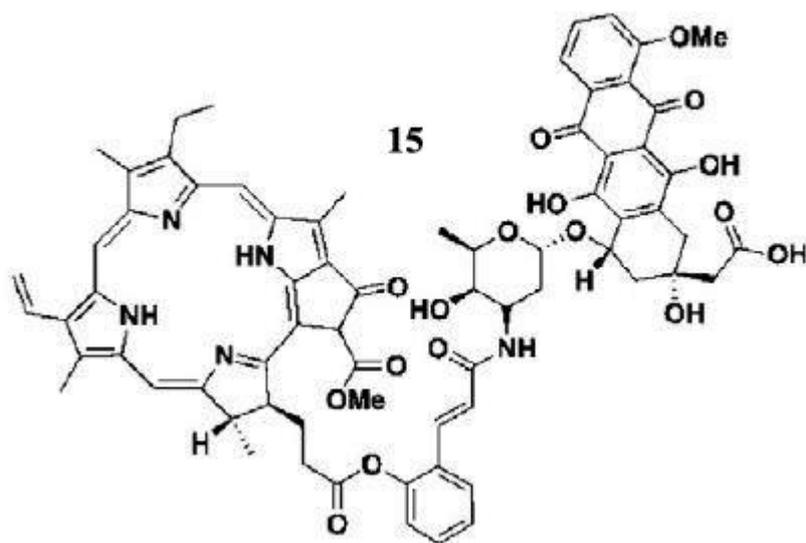


Fig.18 Struttura di 15

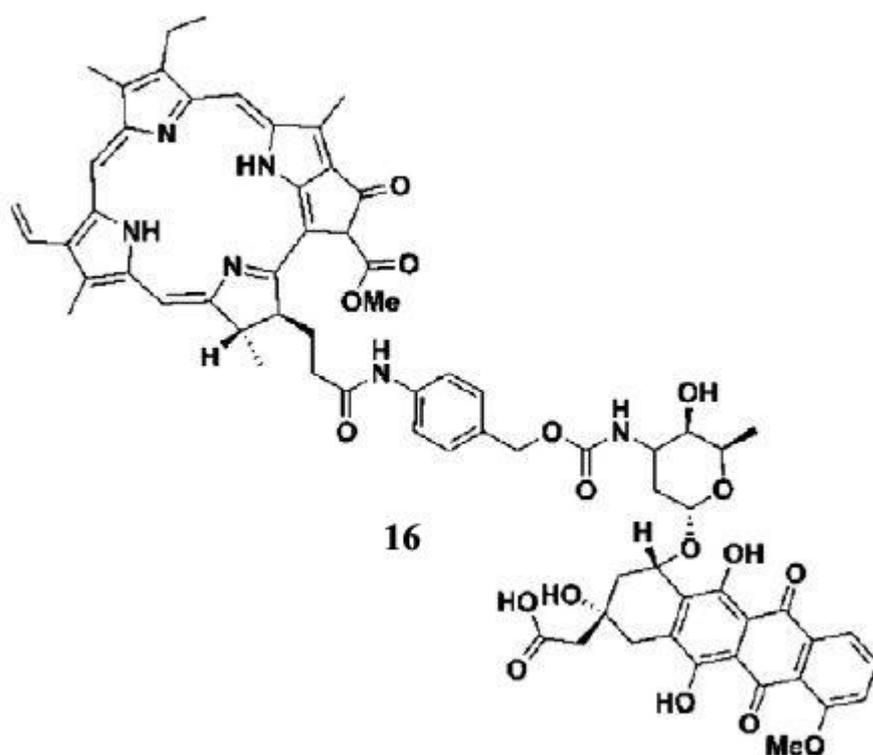


Fig.19 Struttura di 16

L'attività citotossica di **13**, **14**, **15** e **16** è stata misurata su cellule tumorali di diverso tipo tra cui MCF7 (carcinoma al seno), KB (carcinoma alla bocca), HeLa

(carcinoma cervicale), U-87mg (glioblastoma), A549 (carcinoma al polmone), AT-84 e YD-10B (tumori della cavità orale). Le cellule sono state incubate per tre giorni con i derivati sopra descritti e la vitalità cellulare è stata misurata secondo protocollo SRB (Sulforodammina B test).

I risultati hanno dimostrato che **13** alla concentrazione di 10 μ M ha un modesto effetto di inibizione della proliferazione cellulare, inferiore a quello del composto parentale, doxorubicina. I composti **15** e **16** hanno presentato minore capacità inibitoria se confrontati con DOX o PTX. Al contrario, **14** esercita un'ottima attività inibitoria alle stesse concentrazioni. La differenza di attività tra **13** e **14** va interpretata tenendo conto anche della differenza di forza del legame instaurato tra l'unità porfirinica e quella antitumorale: in **14** abbiamo la presenza di un legame di tipo estereo, sicuramente più debole del legame di tipo amidico presente in **13**, responsabile dell'eventuale rilascio dell'unità porfirinica.

Sulla base dei risultati del *test* di viabilità cellulare precedentemente descritti, è quindi stato effettuato un esperimento per verificare l'internalizzazione cellulare (HeLa cells), mediante microscopia confocale a fluorescenza. Il trattamento di queste cellule con una concentrazione di sostanza di 10 μ M ha prodotto fluorescenza a 570-600 nm e dopo eccitazione a 440 nm è stata osservata emissione a 655-755 nm, valori caratteristici rispettivamente di DOX e pheophorbide a. Il confronto delle immagini al microscopio nell'arco di 48 h di incubazione, mostrano come i valori di fluorescenza siano superiori per DOX e pheophorbide a rispetto a **13** e **15**. Tuttavia, i valori di fluorescenza per i coniugati **13** e **15** aumentano dopo le 48 h, di pari passo con l'avanzamento del processo di scissione intramolecolare del legame amidico tra DOX e porfirina. L'ultimo dato da tenere in considerazione è l'uguaglianza dei risultati riscontrati per **13** e **15**, a testimonianza del fatto che il linker aggiunto non svolge un ruolo fondamentale nella veicolazione della molecola.

Sintesi di due nuovi sistemi tri-componente: acido folico/spacer/porfirina

L'ultimo studio che prenderemo in considerazione riguarda la sintesi di due nuovi sistemi molecolari a tre componenti da impiegare in terapia fotodinamica per la cura del tumore alla prostata. In questo caso la specie fotosensibile è la 4-carbossifenilporfirina, lo spacer è costituito da una diammina opportunamente modificata e la molecola selettiva nei confronti delle cellule tumorali è l'acido folico.⁸² Sebbene il meccanismo preciso di trasporto dell'acido folico all'interno della cellula non sia ancora chiaro, è possibile ipotizzare che si tratti di un meccanismo di endocitosi mediata da un recettore.^{83,84} In seguito al legame instaurato con il recettore sito sulla superficie cellulare, il folato derivato, grazie alla sua struttura ed al carattere idrofilico, entra nella cellula e migra negli endosomi.

I due prodotti sintetizzati differiscono per la natura dello spaziatore interposto tra la tetrafenilporfirina (TPP) e l'acido folico; per il primo prodotto è stato utilizzato l'1,6-diamminoesano, mentre per il secondo è stato impiegato un polietilenglicole, PEG, 2-2'-(etilendiossi)-bis-etilammina. (Fig. 20 e Fig.21).

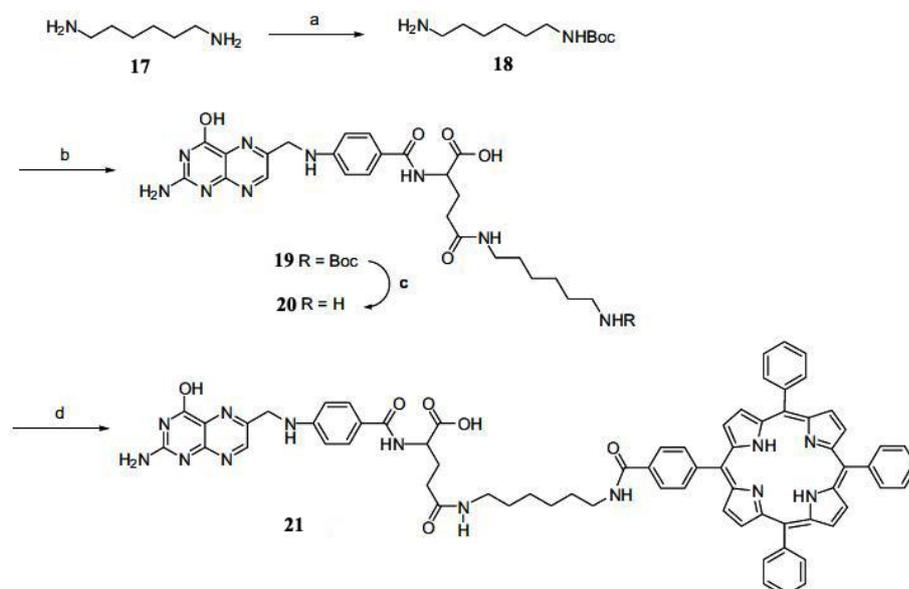


Fig.20 Reagenti e condizioni: (a) Boc₂O, CHCl₃, 0°C; (b) acido folico, DCC, piridina, DMSO; (c) CF₃CO₂H, 25°C; (d) carbossiporfirina *N*-idrossisuccinimide attivata, piridina, DMSO.

⁸² Schneider, R., et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2799-2808.

⁸³ Leamon C. P., Low, P. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 5572.

⁸⁴ Turek, J. J.; Leamon, C. P.; Low, P. S. J., *Cell Sci.* **1993**, 106, 423.

I prodotti **21** e **26** sono stati isolati come solidi dal color violaceo e sono stati caratterizzati attraverso analisi UV-visibile, NMR e spettroscopia di massa. Gli spettri di assorbimento dei due composti sono tipici delle porfirine derivate, mostrando una banda Soret a 415 nm caratterizzata da un alto coefficiente di estinzione molare e quattro bande Q. La presenza nella molecola del folato, abbassa leggermente i valori dei coefficienti di estinzione molare; la presenza di due spacers differenti nelle due molecole influenza anche le proprietà di assorbimento. E' importante notare come entrambe le molecole diano emissione fluorescente a 350 nm, tipica dell'acido folico e a 650 nm, tipica della porfirina.

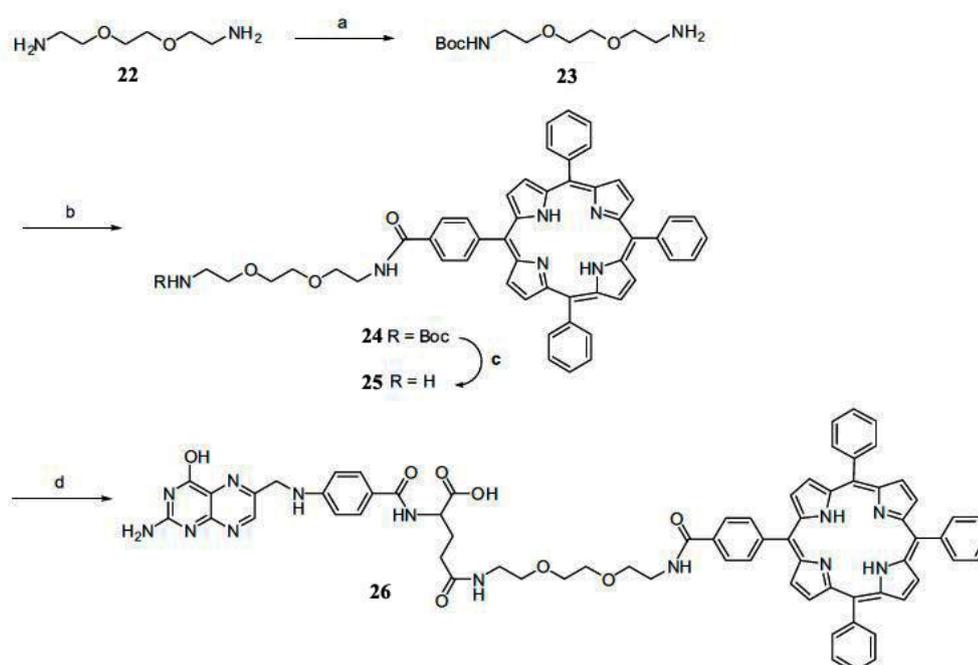


Fig.21 Reagenti e condizioni: (a)) Boc₂O, CHCl₃, 0°C; (b) carbossiporfirina *N*-idrossisuccinimide attivata, THF; (c) CF₃CO₂H, 25°C; (d) acido folico *N*-idrossisuccinimide attivato, piridina, DMSO.

Si è quindi indagato l'accumulo di **21** e **26** all'interno delle cellule, confrontando i dati ottenuti con quelli relativi a TPP; le concentrazioni utilizzate sono di 10⁻⁶ e 10⁻⁵M e le cellule in esame sono cellule KB, che sovra esprimono i recettori per il folato.⁸⁵ Dopo 6 h di incubazione l'accumulo di **21** e **26** si è rivelato nettamente superiore a quello di TPP da sola, in entrambi i test effettuati a concentrazione diversa; dopo 24 ore l'accumulo sembra 7 volte superiore.. La diffusione all'interno della cellula continua anche dopo le 24 ore, testimoniando come il

⁸⁵ Saul, J. M.; Annapragada, A.; Natarajan, J. V.; Bellamkonda, R. V. J., *Controlled Release* **2003**, 92, 49.

meccanismo di trasporto cellulare non sia un assorbimento aspecifico, bensì un trasporto attivo mediato dal recettore.

I test di citotossicità in assenza di luce hanno testimoniato valori di citotossicità nulli sia per i due nuovi derivati che per il TPP da solo. In seguito ad irraggiamento con luce rossa⁸⁶ si osserva invece, tossicità nulla da parte di TPP, una tossicità appena rilevabile per **21** ed un elevato valore di citotossicità, circa 3-4 volte superiore a **21**, per il prodotto **26**.

Questo esperimento conferma ancora una volta l'importanza della scelta dello spacer nella sintesi di tale tipologia di composti.

⁸⁶ Barberi-Heyob, M.; Vedrine, P. O.; Merlin, J. L.; Millon, R.; Abecassis, J.; Poupon, M. F.; Guillemin, F., *Int. J. Oncol.* **2004**, 24, 951.

2. Scopo della tesi

Il lavoro di tesi svolto presso ISOF (Istituto per la sintesi organica e fotoreattività), del CNR di Bologna, ha come obiettivo la sintesi di nuovi derivati tri-componente per terapia fotodinamica (PDT) della neoplasia prostatica in fase avanzata.

La fase di ricerca bibliografica che ha preceduto il lavoro di laboratorio, ci ha consentito di definire al meglio la struttura delle molecole target della nostra sintesi, tenendo quindi conto dei limiti e delle problematiche riscontrate da altri gruppi di ricerca nei loro studi.

Un sistema tri-componente per PDT dovrebbe essere caratterizzato dai seguenti requisiti:

1. Elevata affinità e selettività nei confronti delle cellule tumorali;
2. Polarità adatta sia all'internalizzazione cellulare che ad un'agevole somministrazione clinica (orale o venosa);
3. Fotoreattività in presenza di ossigeno ed alto potere di necrosi cellulare;
4. Possibilità di fotoreattività in situazioni di anaerobiosi;

Nel design dei nuovi sistemi molecolari sintetizzati, **DRPDT1** e **DRPDT2**, abbiamo cercato di considerare queste criticità e di scegliere in modo opportuno i frammenti molecolari da utilizzare, effettuando dove necessario, derivatizzazioni/funzionalizzazioni mirate.

2.1 DRPDT1

Il primo derivato tri-componente sintetizzato è **DRPDT1** (Fig. 22)

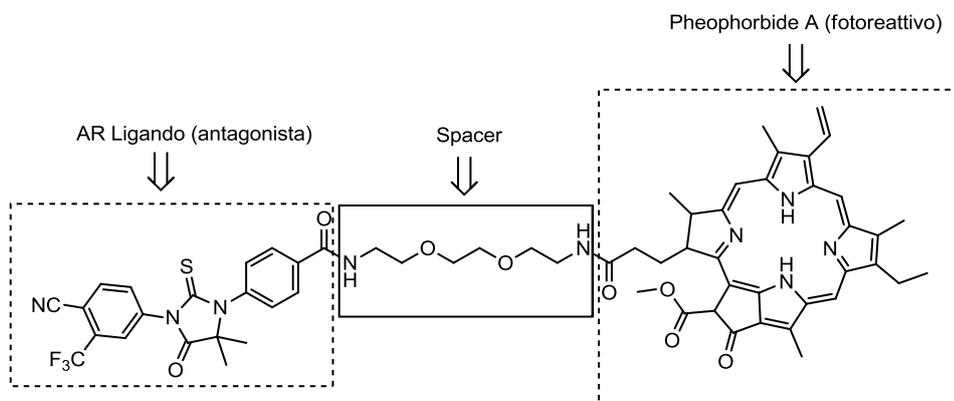


Fig.22 Struttura chimica di **DRPDT1**

E' possibile scomporre il sistema molecolare sintetizzato in 3 unità fondamentali: ligando antagonista con elevata affinità per l'androgeno recettore, spacer e molecola fotosensibile.

Il ligando, grazie alla sua elevata affinità per AR, dovrebbe essere in grado di garantire la selettività del pro-farmaco all'intero dell'organismo; un'alta selettività ed affinità nei confronti delle cellule malate consente, infatti, di limitare la necrosi alle sole cellule infette, contenendo i danni e gli effetti collaterali dovuti ad un'azione aspecifica. Per questo motivo abbiamo scelto di impiegare un analogo di MDV3100, molecola che ha recentemente concluso gli studi di fase clinica III dimostrando un'elevata affinità per AR ed una grande efficacia anti tumorale nei casi di sovra-espressione dell'androgeno recettore (resistenza).

Lo spacer molecolare assume grande importanza nelle proprietà chimico-fisiche della molecola stessa, in quanto gioca un ruolo fondamentale nella modulazione della sua idrofilicità/lipofilicità, come ampiamente descritto nella sezione introduttiva (vedi pag.25). Al variare della polarità varia sia la velocità e l'efficacia del processo di internalizzazione cellulare, che le proprietà di somministrazione del farmaco. Alla luce degli studi di Schneider e colleghi,⁸²

abbiamo scelto di impiegare come spacer un PEG, 2-2'-(etilendioxi)-bis-etilammina (vedi pag.34).

Il fotoreattivo è la molecola responsabile della necrosi cellulare in seguito ad irradiazione ad una determinata lunghezza d'onda in presenza di ossigeno. Come descritto in precedenza, l'interazione tra la molecola fotosensibile e la luce, in presenza di ossigeno, genera la specie altamente reattiva (ossigeno singoletto), responsabile della necrosi cellulare. Nella sintesi di **DRPDT1** abbiamo utilizzato come molecola fotoreattiva, pheophorbide a. Essa è disponibile commercialmente e comunque è facilmente sintetizzabile a partire dalla clorofilla; inoltre, è una porfirina caratterizzata da un'elevata efficacia di generazione di ossigeno singoletto⁸⁷ se irradiata a 680 nm (lunghezza d'onda alla quale non assorbono i tessuti),.

2.2 DRPDT2

Il secondo derivato tri-componente sintetizzato è **DRPDT2** (Fig. 23)

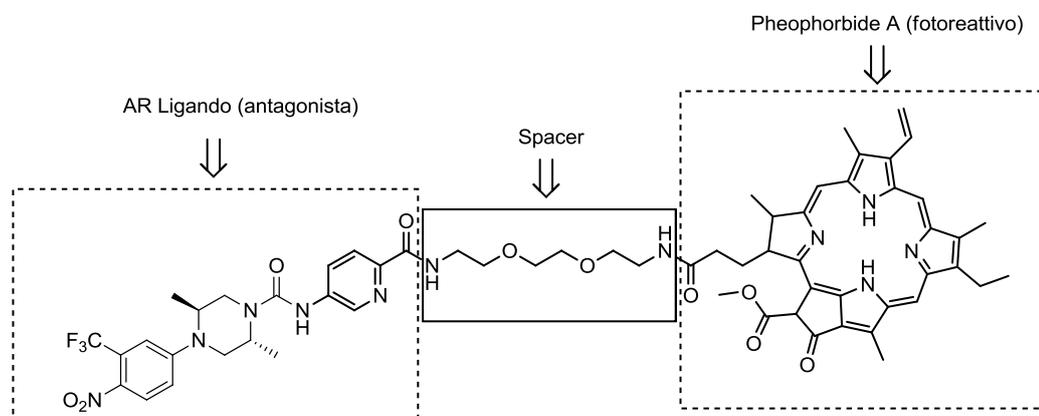


Fig.23 Struttura chimica di **DRPDT2**

Nella progettazione della struttura chimica di **DRPDT2** abbiamo apportato modifiche strutturali esclusivamente al ligando di AR, lasciando inalterato, rispetto a **DRPDT1**, il resto della struttura. In questo caso, abbiamo scelto come

⁸⁷ Krasnovsky, A. A.; Neverov, K. V.; Egorov, S. Y.; Roder, B.; Levald, T., *J. Photochem. Photobiol.* **1990**, B, 5, 245-254.

ligando di AR un trans-2,5-dimetilpiperazin derivato opportunamente modificato e caratterizzato da elevata attività anti-androgenica.⁸⁸ Kinyama e colleghi hanno descritto la sintesi e lo screening biologico di una vasta gamma di trans-2,5-dimetilpiperazin derivati a potenziale attività antitumorale. Fra questi il composto **PIP33A** (Fig.24) ha dimostrato superiore attività e selettività periferica rispetto a bicalutamide.

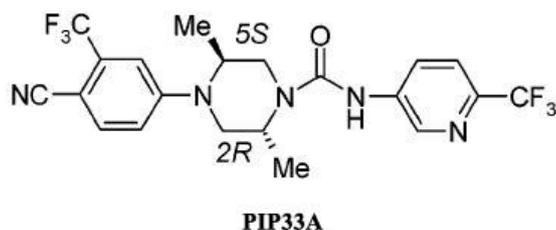


Fig.24 Struttura chimica di **PIP33A**

Alla luce di questi risultati abbiamo deciso di utilizzare un analogo di **PIP33A** opportunamente modificato. In particolare, il gruppo CF_3 terminale sito all'estremità destra della molecola è stato sostituito da un gruppo COOH , necessario per la successiva reazione di coupling con lo spacer amminico. Successivamente, si è pensato di introdurre un'ulteriore gruppo fotoreattivo (oltre all'unità porfirinica) che potesse essere efficace in condizioni di anaerobiosi. A tal fine abbiamo sostituito il gruppo CN , con un gruppo nitro NO_2 , che potenzialmente ed in maniera analoga ad altri sistemi molecolari studiati, potesse rilasciare radicale NO^\cdot ("NO release").⁸⁹

L'ossido nitrico NO , ha assunto grande importanza nella comunità scientifica grazie alle sue potenzialità antiossidanti, antitumorali e antimicrobiche; è caratterizzato da un tempo di semi-vita nei tessuti di circa 5 secondi, un raggio di diffusione nell'intervallo di 40-200 μm , un'elevata lipo-solubilità, assenza di carica e piccole dimensioni molecolari. Il rilascio di questo radicale è mediato dall'azione della luce che permette un accurato controllo del sito, dei tempi e del dosaggio. Queste premesse hanno portato allo sviluppo di sistemi molecolari innovativi di vario impiego, dal campo biomedico a quello dei materiali nano e

⁸⁸ Kinyama, I.; Taniguchi, N.; Toyoshima, A.; Nozawa, E., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 716-726.

⁸⁹ Sortino, S., *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 2903-2913.

polimerici. Dal punto di vista biologico, NO è in grado di inibire il meccanismo metabolico di crescita delle cellule tumorali, decretandone la morte,⁹⁰ inoltre essi esercita un'azione citotossica nei confronti di microorganismi invasivi⁹¹ ed agisce da antiossidante all'interno di meccanismi radicalici ossidativi.⁹² L'utilizzo di NO releasers, affiancato ad altre specie attive è alla base delle terapie definite multimodali.⁹³ In generale, queste metodologie sfruttano effetti additivi o sinergici derivanti dalla generazione di due agenti terapeutici nella stessa regione dello spazio con l'obiettivo finale di massimizzare l'efficacia del trattamento. L'azione combinata dell'ossigeno singoletto, generato da molecole fotoreattive in presenza di ossigeno, e del radicale NO, rappresenta una frontiera altamente innovativa nello sviluppo di nuovi sistemi molecolari da impiegare in terapie antitumorali.

Abbiamo pertanto scelto di inserire questo potenziale effetto additivo o sinergico esercitato dalla porfirina e dall'NO releaser nel nostro sistema tri-componente **DRPDT2**. E' importante sottolineare come l'unità porfirinica agisca esclusivamente in presenza di ossigeno mentre il radicale NO venga rilasciato solo in seguito a fotostimolazione anche in condizioni di anaerobiosi. Questa peculiarità ci consente, in seguito all'internalizzazione cellulare del nostro sistema, di incrementare la necrosi cellulare grazie all'azione combinata dei due radicali ed in molteplici condizioni fisiologiche (esaurimento di ossigeno dovuto all'azione dell'unità porfirinica).

⁹⁰ Fukumura, D.; Kashiwagi, S.; Jain, R. K., *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, 6, 521.

⁹¹ Carlsson, S. E.; Weitzberg, P.; Wiklund; Lundberg J. O., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 2352.

⁹² Packer; Lester, *Methods in Enzymology*, **1999**, vol. 301.

⁹³ Jia, Q.; Janczuk, A.; Cai, T.; Xian, M.; Wen, Z.; Wang, P. G., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2002**, 12, 819.

3. Risultati e discussione

Di seguito verranno presentate le strategie sintetiche di accesso ai nuovi derivati tri-componente potenzialmente impiegabili nella terapia fotodinamica della neoplasia prostatica: **DRPDT1** e **DRPDT2**.

3.1 DRPDT1

La sequenza sintetica che ha portato all'ottenimento di **DRPDT1** è riportata in Figura 25.

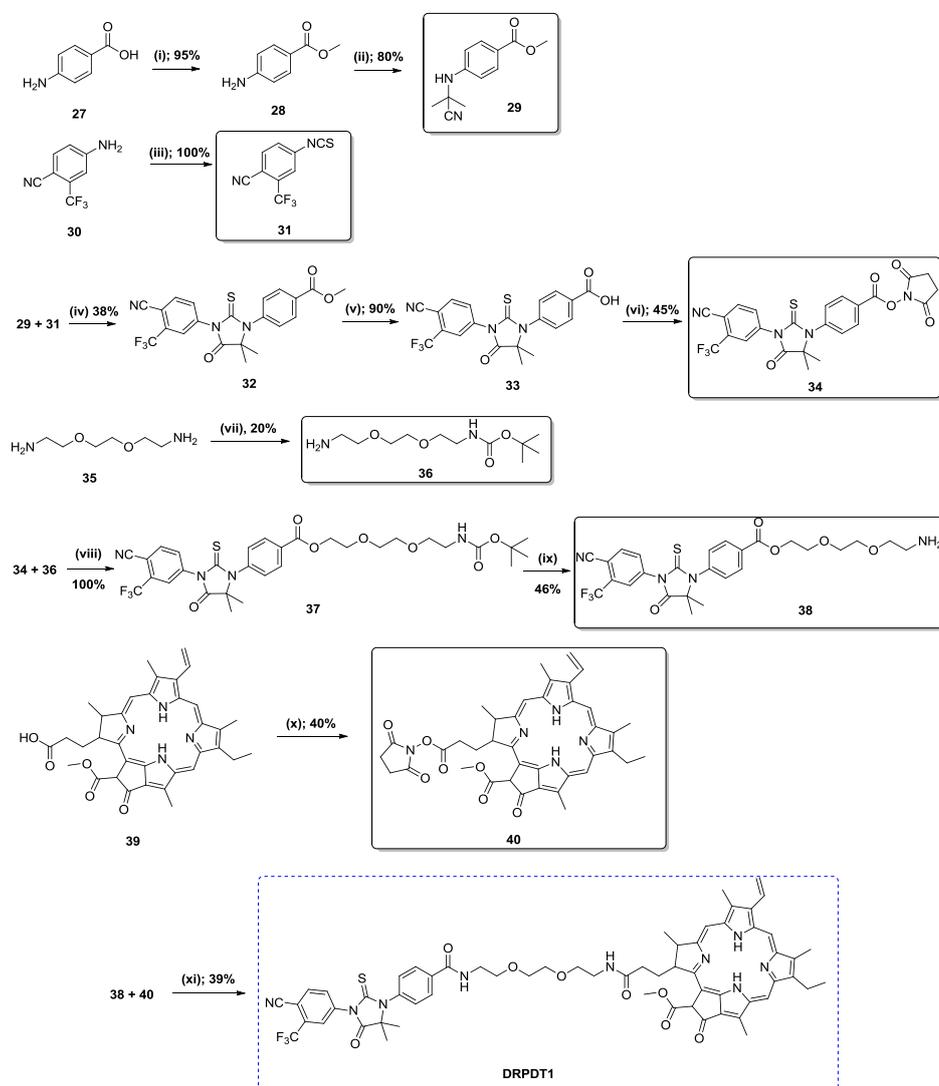


Fig.25 Sintesi di **DRPDT1**, Reagenti e condizioni: **(i)** SOCl_2 , CH_3OH , refluxo; **(ii)** acetone cianidrina, Na_2SO_4 ; **(iii)** tiofosgene, NaHCO_3 , H_2O , diclorometano, RT; **(iv)** DMF, microwave, $T=60^\circ\text{C}$, 12 h; **(v)** NaOH , CH_3OH , RT; **(vi)** DCC, *N*-idrossisuccinimide, 1,4-diossano, RT; **(vii)** Boc_2O , diclorometano, RT; **(viii)** Piridina, THF, RT; **(ix)** CF_3COOH , RT; **(x)** DCC, *N*-idrossisuccinimide, 1,4-diossano, RT; **(xi)** Piridina, THF, RT.

La strategia sintetica utilizzata prevede dapprima la sintesi del ligando di AR opportunamente funzionalizzato (**34**), seguita dal coupling con lo spacer amminico mono-protetto (**36**), ed infine il coupling tra questo sistema bicomponente (**38**) e l'unità fotoreattiva pheophorbide a. E' importante precisare come tutti gli stadi sintetici di seguito illustrati sono stati accompagnati dall'utilizzo di tecniche di purificazione e caratterizzazione dei prodotti ottenuti, come dettagliato nella sezione dedicata alla parte sperimentale (pag.50).

Lo schema sintetico proposto inizia con l'esterificazione dell'acido p-ammino benzoico per dare l'estere metilico **28**, il quale viene fatto reagire con acetone cianoidrina in presenza di Na₂SO₄, fornendo il composto **29**. Parallelamente si effettua la sintesi dell'isotiocianato **31**, facendo reagire l'ammina **30** con tiofosgene in presenza di NaHCO₃, in una miscela di H₂O e diclorometano. **29** e **31** vengono quindi fatti reagire in un microreattore a microonde, utilizzando come solvente DMF (dimetilformammide) e conducendo la reazione alla temperatura di 60°C per 12 ore. In tal modo si ottiene **32** che, agitato a temperatura ambiente in metanolo con aggiunta di una soluzione acquosa di NaOH, idrolizza fornendo il corrispondente acido carbossilico **33**. L'attivazione di **33** con DCC e *N*-idrossisuccinimide, fornisce l'acido *N*-idrossisuccinimide attivato **34**, pronto da impiegare nella reazione di coupling amidico con lo spacer.

Si procede quindi alla mono-protezione del PEG **35** con di-tert-butyl-dicarbonato (Boc₂O). L'ammina mono-protetta (**36**) così ottenuta viene quindi fatta reagire con **34** in presenza di piridina e tetraidrofurano (THF) come solvente, a dare, il prodotto *N*-Boc protetto **37** che a seguito di trattamento con acido tri-fluoro acetico fornisce **38**.

Contemporaneamente si procede all'attivazione della pheophorbide a con *N*-idrossisuccinimide in presenza di DCC, ottenendo **40**, che rappresenta il secondo intermedio da utilizzare nella reazione finale di coupling con l'ammina **38** per l'ottenimento di **DRPDT1**.

E' importante ricordare che, a causa della loro natura fotoreattiva, tutte le reazioni che coinvolgono la porfirina o i suoi derivati ed il loro eventuale stoccaggio, debbono essere condotte in assenza di luce.

3.2 DRPDT2

La sequenza sintetica che ha portato all'ottenimento di **DRPDT2** è riportata in Figura 26.

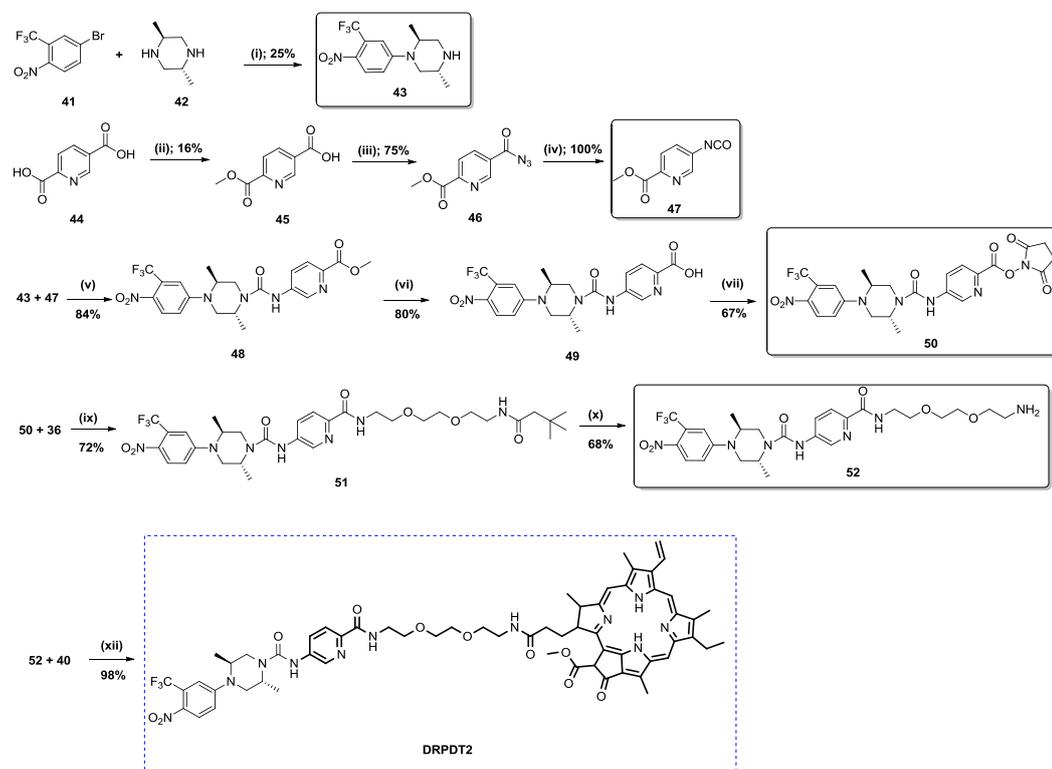


Fig.26 Sintesi di **DRPDT2**, Reagenti e condizioni: (i) DMF, 80 °C; (ii) CH₃OH, H₂SO₄, refluxo; (iii) NEt₃, etil cloroformiato, acetone, NaN₃ in H₂O; (iv) Toluene, 100° C; (v) Toluene, RT; (vi) NaOH, CH₃OH, THF, RT; (vii) DCC, *N*-idrossisuccinimide, 1,4-diossano, RT; (viii) Boc₂O, dilorometano, RT; (ix) Piridina, THF, RT; (x) CF₃COOH, RT; (xi) DCC, *N*-idrossisuccinimide, 1,4-diossano, RT; (xii) Piridina, THF, RT.

Anche in questo caso la strategia sintetica utilizzata prevede come primo stadio la sintesi del ligando di AR ovvero il trans-2,5-dimetilpiperazin derivato (**50**) opportunamente funzionalizzato per la successiva reazione con la diammina mono-protetta (**36**). La sequenza sintetica termina con il coupling fra il sistema bicomponente (**52**) e l'*N*-idrossisuccinimidil derivato della pheophorbide a (**40**) per ottenere in composto desiderato, **DRPDT2** (Fig. 26).

Il primo passaggio sintetica consiste nella reazione tra la trans-dimetil piperazina **42** ed il bromuro aromatico **41**, condotta a 80°C in dimetil-formamide (DMF) che

fornisce il composto **43** con una resa del 25%. Parallelamente, **47** viene ottenuto attraverso esterificazione selettiva di **44**, seguita dalla formazione dell'azide **46** che per trasposizione di Curtius fornisce il prodotto desiderato. A questo punto vengono fatti reagire i due intermedi sintetici **43** e **47** in toluene a temperatura ambiente, ottenendo **48** che per reazione con NaOH in CH₃OH idrolizza dando origine al corrispondente acido carbossilico **49**. Segue quindi l'attivazione dell'acido come *N*-idrossisuccinimide **50**, pronto da impiegare nella successiva reazione di coupling ammidico con lo spacer.

Analogamente a quanto visto per la sintesi di **DRPDT1**, si procede quindi alla mono-protezione del PEG **35** mediante Boc₂O, ottenendo così **36** che viene quindi fatto reagire con **50** in THF in presenza di piridina, portando alla formazione dell'addotto *N*-Boc protetto **51**. Il successivo trattamento con acido trifluoro acetico consente di ottenere **52** con una resa del 68%.

Dopo attivazione della pheophorbide a come *N*-idrossisuccinimide (**40**), si procede al passaggio finale, ovvero il coupling con l'ammina **52** in presenza di piridina in THF. Si ottiene così **DRPDT2** sotto forma di solido dal colore violaceo scuro.

3.3 Approfondimenti sul processo sintetico

I processi sintetici sopra descritti per l'ottenimento dei derivati **DRPDT1** e **DRPDT2** rappresentano il risultato finale di un lungo lavoro che ha visto, in corso d'opera, la necessità di apportare alcune modifiche, volte all'ottimizzazione ed alla messa a punto dei processi stessi.

Uno dei passaggi fondamentali delle sintesi sopra descritte è la reazione di coupling ammidico, impiegata sia nella reazione tra il ligando di AR e lo spacer, e poi nella formazione del legame tra il sistema bicomponente e la porfirina. Data la natura commerciale della porfirina e la necessità di ottenere il ligando di AR attraverso una serie di passaggi sintetici, in prima istanza si era pensato che fosse più conveniente, in termini di economia di processo, invertire l'ordine dei fattori in fase di coupling, ovvero formare prima il composto porfirina-spacer e solo successivamente effettuare il coupling con il ligando. Tuttavia, dopo aver ottimizzato la sintesi del ligando, sia in termini di rese sia di tempi di ottenimento,

e tenendo conto del costo della porfirina stessa, abbiamo scelto di impiegare il reagente più costoso solo nell'ultimo passaggio sintetico, così da utilizzarne solo la quantità strettamente necessaria all'ottenimento del prodotto finale.

La reazione di coupling amidico è stata la reazione che ha comportato il maggior numero di ostacoli. I primi tentativi effettuati, infatti, non ci consentivano di accedere al prodotto desiderato. Da una prima analisi della letteratura abbiamo verificato l'esistenza di diversi approcci sintetici utilizzabili. Schneider e collaboratori⁸² riportano la sintesi del sistema bicomponente folato-spacer, seppur con uno spacer differente dal nostro, aggiungendo dicicloesilcarbodiimmide (DCC) ad una soluzione in dimetil solfossido di acido ed ammina in presenza di piridina a temperatura ambiente. Inizialmente questo approccio sintetico ci è sembrato ottimale, in quanto consisteva di un solo passaggio sintetico a differenza di altri che ne prevedevano due: attivazione dell'acido e successivo coupling. La resa riportata in letteratura, l'economia legata ad un solo passaggio sintetico e l'analogia dei sistemi molecolari coinvolti, ci hanno indotto ad intraprendere questa via sintetica. Abbiamo quindi effettuato la reazione per due volte, variando anche il solvente (prima in DMSO, poi in THF) e monitorando il suo avanzamento mediante TLC (thin layer chromatography, cromatografia su strato sottile), osservando la formazione di un prodotto che, in principio, pensavamo essere il prodotto desiderato. La successiva purificazione cromatografica seguita da analisi NMR del prodotto isolato ci ha confermato invece che il prodotto ottenuto non era quello desiderato. Abbiamo pertanto indagato ulteriormente per definire la natura del sottoprodotto e quindi della reazione parassita. Il meccanismo di coupling amidico con attivazione dell'acido via carbodiimmide avviene attraverso il seguente meccanismo:⁹⁴

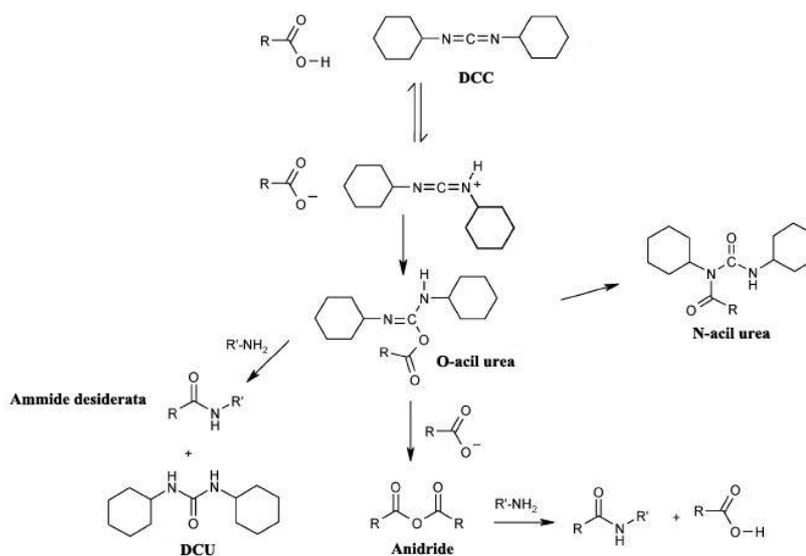
Il primo step consiste nella reazione tra l'acido e DCC, che produce l'intermedio *O*-acil urea, il quale può reagire ulteriormente fornendo i seguenti possibili prodotti (Fig.27):

- L'ammide desiderata, attraverso il coupling con l'ammina; l'unico inconveniente della reazione è la formazione di dicicloesil urea (DCU)

⁹⁴ Valeur, E.; Bradley M., *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 606-631.

come sottoprodotto, che generalmente può essere rimossa facilmente mediante filtrazione, in quanto insolubile nell'ambiente di reazione;

- Il prodotto *N*-acilurea;
- L'anidride dell'acido che successivamente può fornire l'ammide desiderata mediante reazione con l'ammina;



Fig,27 Coupling utilizzando DCC

L'analisi degli eventuali altri possibili prodotti di reazione ci ha fatto scoprire come il prodotto da noi ottenuto fosse il prodotto di tipo *N*-acil urea; questa osservazione è stata ampiamente confermata da misure spettroscopiche. (Fig. 28)

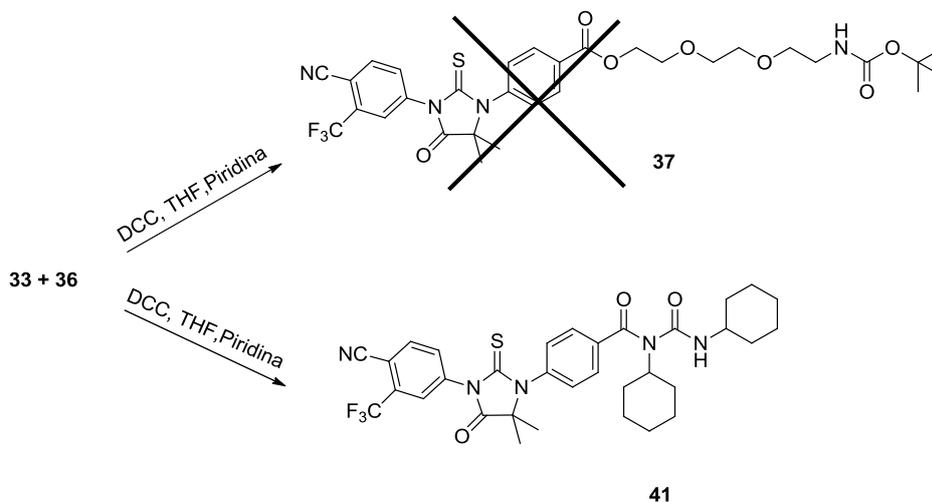


Fig.28 Sintesi del derivato *N*- acil urea

La reazione aveva come obiettivo la sintesi di **37** partendo dall'acido **33** e dalla diammina *N*-Boc protetta **36**, in THF, con aggiunta di piridina e DCC a temperatura ambiente.

Abbiamo invece ottenuto il prodotto **41**, solido bianco caratterizzato mediante analisi NMR. Si è quindi preferito un altro approccio sintetico, che vede affiancato all'uso di DCC, l'impiego di *N*-idrossisuccinimide, responsabile dell'attivazione dell'acido mediante formazione dell'estere attivato (Fig.29)

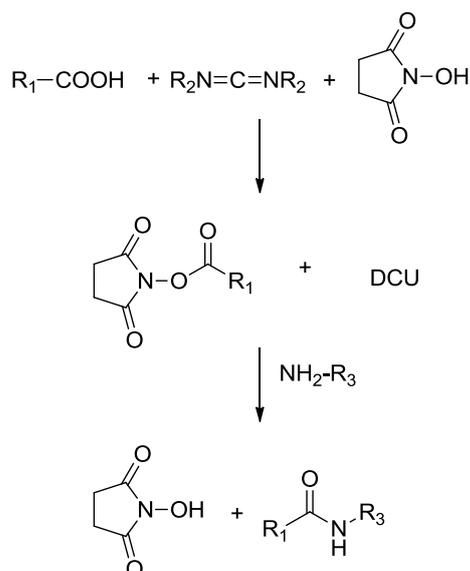


Fig.29 Coupling utilizzando DCC + *N*-idrossisuccinimide

La reazione dell'acido con DCC, *N*-idrossisuccinimide in 1,4-diossano anidro ci permette di isolare, dopo purificazione cromatografica, l'acido attivato **34**. Quest'ultimo reagisce in un secondo stadio con l'ammina *N*-Boc protetta **36**, in THF, in presenza di piridina, fornendo l'ammide desiderata *N*-Boc protetta **37** (Fig.30). Questa strategia sintetica ci ha permesso di accedere selettivamente al prodotto **37**, senza sottoprodotti di reazione. La stessa via sintetica è stata pertanto estesa alla sintesi di **DRPDT2**.

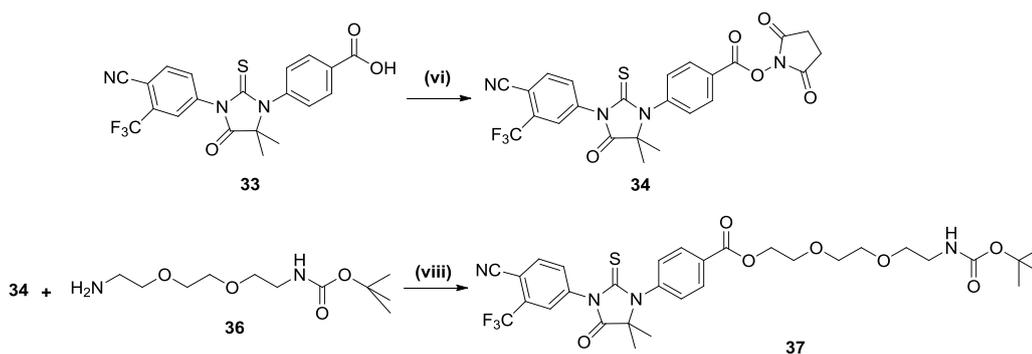


Fig.30 Reagenti e condizioni: **(vi)** DCC, *N*-idrossisuccinimide, 1,4-diossano, RT; **(viii)** Piridina, THF, RT.

4. Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi abbiamo descritto e realizzato la sintesi di nuovi derivati tri-componente per terapia fotodinamica della neoplasia prostatica in fase avanzata.

Un'attenta analisi dello stato dell'arte ci ha consentito di individuare alcune importanti caratteristiche affinché un sistema di questo tipo possa essere interessante ed efficace a livello terapeutico. In particolare: l'elevata affinità e selettività del sistema nei confronti delle cellule tumorali; l'adeguata polarità del sistema, adatta quindi a un'efficace internalizzazione cellulare; la fotoreattività in presenza di ossigeno e l'elevato potere di necrosi cellulare, unitamente alla possibilità di fotoreagire anche in condizioni di anaerobiosi, sembrano essere pre-requisiti fondamentali per la potenziale efficacia del sistema.

I nuovi composti sintetizzati, **DRPDT1** e **DRPDT2**, sono pertanto stati pensati e realizzati per rispondere a tali necessità. Complessivamente, possiamo concludere che dopo un'adeguata modulazione delle condizioni di reazione e delle sequenze sintetiche siamo riusciti ad isolare **DRPDT1** e **DRPDT2** con 11 e 12 passaggi rispettivamente. Presso il laboratorio di biologia dell'istituto ISOF sono attualmente in corso studi di citotossicità *in vitro* volti a verificare l'attività e l'efficacia dei due derivati. In particolare sono state scelte due linee cellulari di tumore alla prostata, PC3 e VCAp, la prima è stata selezionata come bianco poiché non esprime il recettore per gli androgeni, mentre la seconda sovra-

esprime il recettore di tipo wild-type. Nel corso degli esperimenti biologici si andrà a verificare che, confrontati con la porfirina da sola, i composti **DRPDT1** e **DRPDT2** vengono maggiormente (o esclusivamente) internalizzati nelle cellule che sovra-esprimono il recettore, grazie alla presenza del ligando di AR. Inoltre, sarà valutata la capacità citotossica dei composti, sempre confrontata con la porfirina da sola, una volta sottoposti ad irraggiamento con luce ad un'opportuna lunghezza d'onda. Sarà inoltre interessante studiare l'efficacia antitumorale del derivato DRPDT2 in condizioni di assenza di ossigeno, il che confermerebbe la formazione NO nell'ambiente cellulare e pertanto l'azione sinergica del composto. Da questa prima indagine sull'attività biologica *in vitro* sarà possibile definire quindi l'efficacia del sistema, che tuttavia essendo altamente modulabile in tutte le sue parti, è passibile ulteriori miglioramenti. Questa ricerca apre la strada alla sintesi di una vasta classe di analoghi potenzialmente utili in terapia oncologica fotodinamica multimodale.

5. Parte Sperimentale

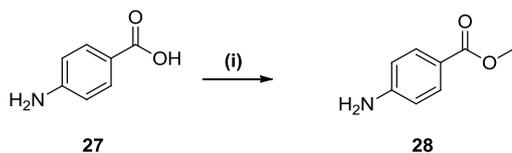
Condizioni sperimentali generali.

Tutte le reazioni sono state effettuate in atmosfera inerte di azoto o argon. THF, toluene ed etil etere sono stati distillati con sodio benzofenone chetale. Diclorometano ed acetonitrile sono stati distillati su calcio idruro. Tutti gli altri solventi erano disponibili con purezza HPLC. Le reazioni sono state eseguite sotto agitazione tramite agitatore magnetico e monitorate mediante TLC (SiO₂, Merck 60-F254). La cromatografia preparativa in pressione è stata effettuata su SiO₂ (Merk, 240-400 mesh). Gli spettri NMR sono stati registrati con uno spettrometro Varian-400 MHz in CDCl₃ o altri solventi deuterati come eventualmente specificato in seguito, e gli spettri erano riferiti al segnale del CHCl₃. Tutti i segnali ¹H e ¹³C sono espressi in ppm (s = singoletto, d = doppietto; t = tripletto; dd = quadrupletto; dt = doppietto di tripletto, m = multipletto; br = segnale allargato). Le costanti d'accoppiamento *J* sono ottenute in Hz. L'assegnazione delle risonanze dei protoni è stata confermata, quando possibile, con esperimenti di disaccoppiamento omonucleare o con ¹H-¹³C etero-correlazione. Gli spettri di massa ad alta risoluzione (HRMS) sono stati ottenuti con un Finnigan MAT 8230 con una risoluzione di 10000.

5.1 Sintesi di DRPDT1

Reazione n. 1

Sintesi di metil 4-amminobenzoato (**28**)⁹⁵



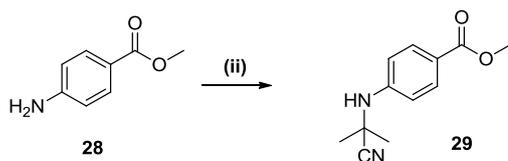
Ad una soluzione di **27** (5.47 mmol, 0.75 g) in metanolo (5 ml), viene sgocciolato tionil cloruro SOCl_2 (5.47 mmol, 0.4 ml) e la miscela di reazione viene riscaldata sino a riflusso, lasciandola reagire per 2 ore. Al termine delle 2 ore viene raffreddata sino a temperatura ambiente, travasata in una beuta dotata di agitatore magnetico e diluita con acqua; segue aggiunta di NaHCO_3 acquoso saturo ed etile acetato. La fase organica è isolata mediante più estrazioni con etile acetato, anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata e concentrata a pressione ridotta. Si ottengono così 0.78 g di **28**, solido bianco che non necessita di ulteriori purificazioni (resa= 95%).

Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH), 6.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH), 4.04 (bs, 2H, NH_2), 3.85 (s, 3H, CH_3).

Reazione n. 2

Sintesi di metil 4-((2-cianopropan-2-il)ammino)benzoato (**29**)⁹⁶



⁹⁵ *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 9, 2602-2621.

⁹⁶ Jung, M. E.; Ouk, S.; Yoo, D.; Sawyers, C. L.; Chen, C.; Tran, C.; Wongvipat, J., *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2779-2796.

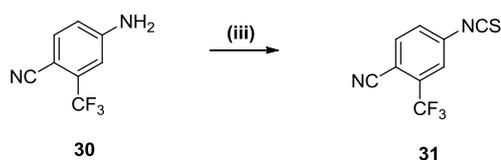
Una miscela di **28** (5.16 mmol, 0.78 g), acetone cianoidrina (80 mmol, 7.3 ml) e sodio solfato Na₂SO₄ (2.43 g) viene portata a refluxo in un pallone a due colli dotato di agitatore magnetico. La reazione viene condotta per 15 h a refluxo al termine la miscela di reazione è lasciata raffreddare sino a temperatura ambiente. La miscela viene quindi filtrata per rimuovere il sodio solfato in eccesso e vengono effettuati due lavaggi con brine (soluzione acquosa satura di NaCl), dopo i quali si procede all'estrazione della componente organica con etile acetato. Le frazioni organiche vengono quindi riunite, anidificate con Na₂SO₄, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene purificato mediante colonna cromatografica di gel di silice, eluente: diclorometano/ EtOAc/ cicloesano = 5/2/3, fornendo 0.87 g di **29**, prodotto pulito (resa= 80%).

Caratterizzazione spettroscopica

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, J = 8.6 Hz, 2H, ArH), 6.74 (d, J = 8.6 Hz, 2H, ArH), 4.73 (bs, 1H, NH), 3.72 (s, 3H, CH₃), 1.57 (s, 6H, 2 CH₃).

Reazione n. 3

Sintesi di 4-isotiocianato-2-(trifluorometil)benzonitrile (**31**)⁹⁷



In un pallone da 50 ml viene agitata una soluzione di NaHCO₃ (4.02 mmol, 0.34 g) in 3.5 ml di H₂O; a questa soluzione vengono aggiunti 1.2 ml di diclorometano e l'ammina **30** (1.34 mmol, 0.25 g). La miscela di reazione viene quindi raffreddata a 0°C e raggiunta questa temperatura, si provvede all'aggiunta di tiofosgene (2.01 mmol, 0.15 ml) goccia a goccia. Terminata l'aggiunta si lascia reagire a temperatura ambiente per un'altra ora. L'avanzamento della reazione viene controllato tramite TLC (“*thin layer chromatography*”) utilizzando come miscela eluente esano/EtOAc = 3/2.

⁹⁷ Khatik, G. L.; Pal, A.; Apsunde, T. D.; Nair, V. A., *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2010**, 47, 734-739.

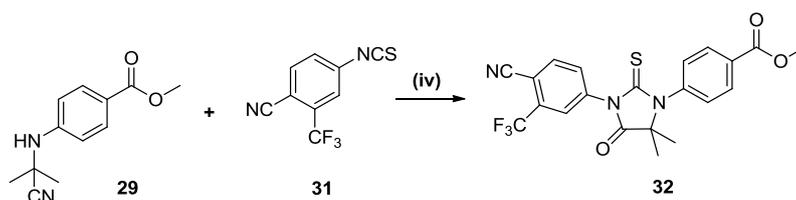
Al termine della reazione, la miscela viene versata in un imbuto separatore, dove si effettuano più estrazioni con diclorometano; le frazioni organiche vengono quindi riunite, anidificate con Na₂SO₄, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Si isolano 0.34 g di **31** come solido biancastro che risulta puro in seguito ad analisi NMR (resa= 100%).

Caratterizzazione spettroscopica

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.56 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H, ArH).

Reazione n. 4

Sintesi di metil 4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-osso-2-tiossoimidazolidin-1-il)benzoato (**32**)⁸⁷



Una miscela di **29** (1.04 mmol, 0.23 g) e **31** (1.62 mmol, 0.37g) in DMF anidra (3.3 ml) viene introdotta all'interno di un mini reattore per reazioni a microonde e viene riscaldata a microonde a 60 °C per 12 ore. A questa soluzione vengono aggiunti 10 ml di metanolo e HCl 2 N (3.3 ml); la miscela viene quindi riscaldata sino a refluxo e la reazione continua per 4 ore, al termine delle quali viene raffreddata sino a temperatura ambiente. La miscela viene successivamente versata in una beuta contenente acqua ghiacciata (circa 15 ml) e viene estratta con etile acetato (3 x 45 ml); le frazioni organiche vengono quindi riunite, anidificate con Na₂SO₄, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene purificato mediante colonna cromatografica di gel di silice, eluente: Diclorometano/EtOAc/Cicloesano = 4/3/8. Si ottengono così 0.17 g di **32** come bianco (resa=38%).

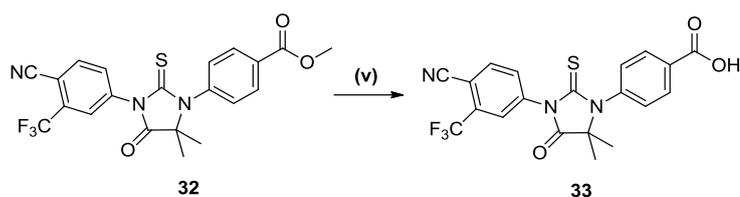
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ArH), 8.00-7.93 (m, 2H, ArH), 7.84 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ArH), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 1.59 (s, 6H, 2 CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 179.7, 174.7, 165.9, 139.2, 137.0, 135.3, 133.5 (q, $J = 32.3$ Hz), 132.2, 131.4, 131.2, 129.8, 127.1 (q, $J = 4.7$ Hz), 121.9 (q, $J = 272.7$ Hz), 114.8, 110.3, 66.6, 52.6, 23.8.

Reazione n. 5

Sintesi di 4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-osso-2-tiossoimidazolidin-1-il)acido benzoico (**33**)⁸⁸



All'interno di un pallone da 10 ml dotato di ancoretta magnetica per l'agitazione viene sciolto **32** (0.18 mmol, 0.08 g) in metanolo (2 ml), THF (qualche goccia) e viene aggiunto NaOH 1N (0.36 mmol, 0.36 ml). Dopo 15 ore circa di agitazione a temperatura ambiente, la miscela viene acidificata mediante aggiunta di HCl 1 N; si osserva quindi la formazione di un precipitato che viene filtrato ed asciugato. Il grezzo viene purificato mediante colonna cromatografica su silice flash, eluente diclorometano/metanolo = 21/1. Otteniamo così 70 mg di acido **33** (resa = 90%).

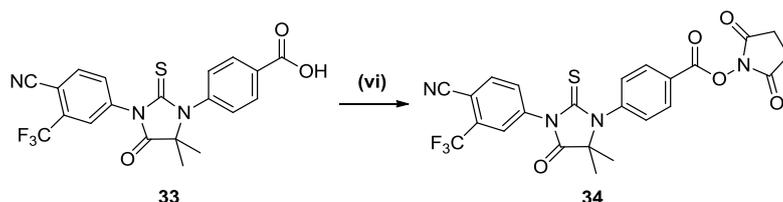
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 8.28 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, ArH), 8.25 – 8.17 (m, 3H, ArH), 8.09 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, ArH), 1.64 (s, 6H, 2 CH_3).

^{13}C NMR (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 180.6, 175.18, 165.9, 140.0, 137.0, 135.3, 133.5 (q, $J = 32.3$ Hz), 132.2, 131.4, 131.2, 129.8, 127.1 (q, $J = 4.7$ Hz), 121.9 (q, $J = 272.7$ Hz), 115.0, 109.6, 66.6, 23.1.

Reazione n. 6

Sintesi di 2,5-diossopirrolidin-1-il 4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-osso-2-tiossoimidazolidin-1-il)benzoato (**34**)⁸¹



Ad una soluzione di **33** (0.10 mmol, 0.04 g) sciolto in 1,4-diossano (1.8 ml) vengono aggiunti *N*-idrossisuccinimide (0.10 mmol, 0.01 g) e DCC (0.10, 0.02 g). L'andamento della reazione viene monitorato tramite TLC: dopo 5 ore la miscela viene diluita con THF, adsorbita su silice e purificata mediante cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluente diclorometano/EtOAc/cicloesano = 1/2/2. La cromatografia fornisce 25 mg di **34** (resa = 45%).

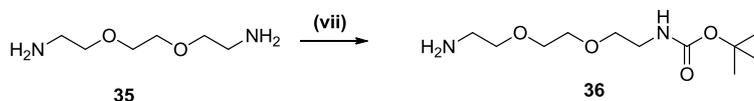
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.33 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH), 8.03 – 7.93 (m, 2H, ArH), 7.84 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, ArH), 7.50 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ArH), 2.93 (s, 4H, 2 CH_2), 1.62 (s, 6H, 2 CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 179.7, 174.7, 165.9, 139.2, 137.0, 135.3, 133.5 (q, $J = 32.3$ Hz), 132.2, 131.4, 131.2, 129.8, 127.1 (q, $J = 4.7$ Hz), 121.9 (q, $J = 272.7$ Hz), 114.8, 110.3, 66.6, 25.7, 23.8.

Reazione n. 7

Sintesi di *tert*-butil (2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)carbammato (**36**)



Ad una soluzione di **35** (17 mmol, 2.48 ml) in diclorometano (17 ml), alla temperatura di 0°C si sgocciola una soluzione di Boc₂O (di-*tert*-butil dicarbonato) (1.7 mmol, 0.47 g) in diclorometano (8.5 ml) e si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Si effettuano quindi due lavaggi con NaHCO₃ ed estrazioni con diclorometano; le frazioni organiche riunite vengono anidificate con Na₂SO₄, filtrate e concentrate al rotavapor. Si ottengono così 0.42 g di **36** come olio giallino (resa=100%).

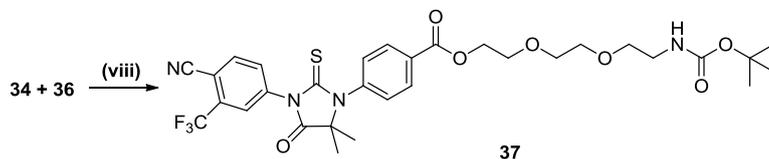
Caratterizzazione spettroscopica

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.62 (s, 4H, 2 CH₂), 3.55-3.52 (m, 4H, 2 CH₂), 3.33-3.31 (m, 2H, CH₂), 2.88 (t, 2H, CH₂), 1.44 (s, 9H, *t*-butil).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 155.7, 78.53, 73.11, 69.8, 41.32, 39.91, 28.0.

Reazione n. 8

Sintesi di 2,2-dimetil-4-osso-3,8,11-triossa-5-azatridecan-13-il4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-osso-2-tiossoimidazolidin-1-il)benzoato (**37**)



All'interno di un pallone a due colli dotato di agitatore magnetico, viene sciolto **34** (0.047 mmol, 0.025 g) in THF (1.5 ml); viene in seguito sgocciolata la piridina (0.65 ml) e infine aggiunta l'ammina **36** (0.047 mmol, 0.012 g). La reazione viene condotta a temperatura ambiente per 21 ore circa, controllandone l'avanzamento mediante tlc. Dopo aver constatato la scomparsa del prodotto di partenza, la miscela viene diluita con etile acetato e lavata più volte con acqua distillata per

favorire l'allontanamento della piridina in eccesso. Le frazioni organiche riunite vengono quindi anidrificate con Na₂SO₄, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Si ottengono 31 mg di **37** (resa = 100%) che non necessita di ulteriore purificazione.

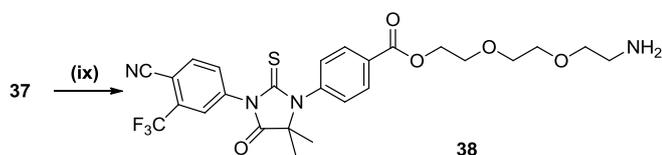
Caratterizzazione spettroscopica

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01 – 7.93 (m, 3H, ArH), 7.84 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 2H, ArH), 6.89 (s, 1H, ArH), 4.97 (bs, 1H, NH), 3.71 – 3.61 (m, 8H, 4 CH₂), 3.57 – 3.51 (m, 2H, CH₂), 3.29 (d, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 1.58 (s, 6H, 2 CH₃), 1.41 (s, 9H, *t*-butil).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 179.7, 174.7, 165.9, 139.2, 137.0, 135.3, 133.5 (q, J = 32.3 Hz), 132.2, 131.4, 131.2, 129.8, 127.1 (q, J = 4.7 Hz), 121.9 (q, J = 272.7 Hz), 114.8, 110.3, 79.38, 70.13, 66.47, 40.22, 28.32, 23.73.

Reazione n. 9

Sintesi di 2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-osso-2-tiossoimidazolidin-1-il)benzoato (**39**)



In un pallone a due colli vengono introdotti **37** (0.047 mmol, 0.031 g) ed acido trifluoro acetico CF₃COOH (1.5 ml); la miscela di reazione viene agitata a temperatura ambiente per 3 ore al termine delle quali viene si evapora l'acido trifluoro acetico a pressione ridotta. Il grezzo così ottenuto viene quindi diluito con H₂O e trattato con NaHCO₃ sino al raggiungimento di un pH basico per poi estrarre la fase organica con EtOAc. Le frazioni organiche vengono quindi anidrificate con Na₂SO₄, filtrate e concentrate al rotavapor, ottenendo così 12 mg di **38** (resa = 46%).

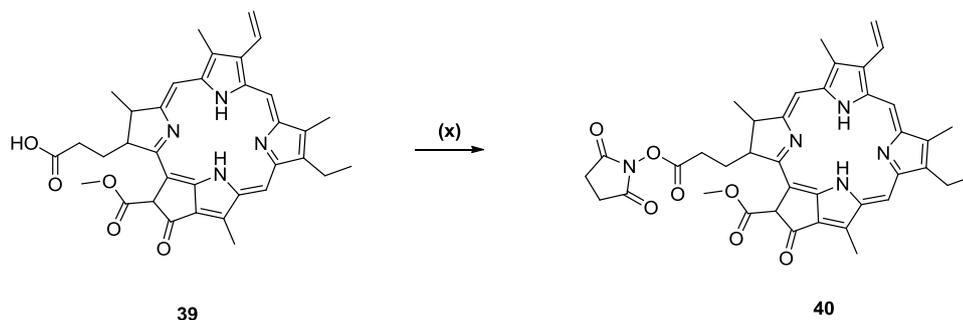
Caratterizzazione spettroscopica

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.97 (d, J = 8.6 Hz, 2H, ArH), 7.86 – 7.76 (m, 2H, ArH), 7.37 (d, J = 7.6 Hz, 2H, ArH), 3.70 – 3.30 (m, 12H, 6 CH₂), 1.58 (s, 6H, 2 CH₃).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 179.7, 174.7, 165.9, 139.2, 137.0, 135.3, 133.5 (q, $J = 32.3$ Hz), 132.2, 131.4, 131.2, 129.8, 127.1 (q, $J = 4.7$ Hz), 121.9 (q, $J = 272.7$ Hz), 114.8, 110.3, 79.38, 70.17, 66.59, 40.08, 23.74.

Reazione n. 10

Sintesi di Pheophorbide a *N*-idrossisuccinimide (**40**)



Ad una soluzione di pheophorbide a **39** (0.05 mmol, 0.3g) in 1,4-diossano anidro (1.5 ml), vengono aggiunti *N*-idrossisuccinimide (0.05 mmol, 0.006 g) e DCC (0.05 mmol, 0.01 g) in atmosfera di N_2 ed in completa assenza di luce. La soluzione viene agitata meccanicamente per 5 ore e mezza a temperatura ambiente, al termine delle quali la miscela viene concentrata ed adsorbita su silice per procedere alla sua purificazione mediante colonna cromatografica su silice flash, eluente: diclorometano/acetone = 10/1.

Si ottengono 14 mg di **40** (resa = 40%) come solido color violaceo scuro che viene conservato al fresco, lontano da fonti luminose.

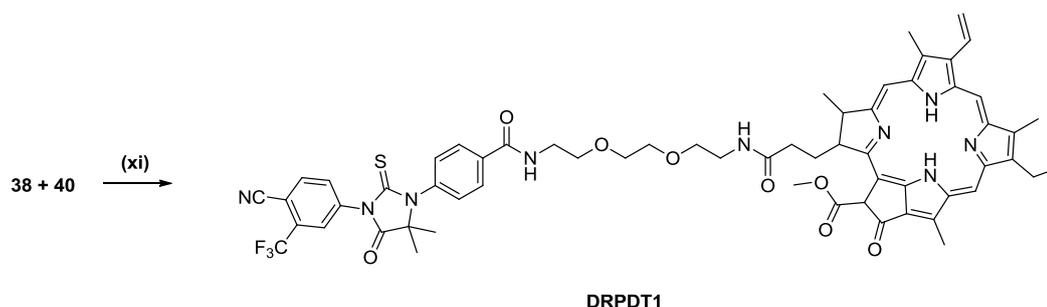
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.53 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 7.96 (dd, $J = 17.8, 11.6$ Hz, 1H), 6.32 – 6.15 (m, 3H), 4.57 – 4.47 (m, 1H), 4.36 – 4.29 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.81 (s, 2H), 3.68 (d, $J = 12.8$ Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 2.80 (s, 4H) 2.55 – 2.32 (m, 4H), 1.84 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.72 – 1.63 (m, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 189.34, 171.95, 169.42, 168.89, 168.05, 145.11, 142.18, 136.62, 132.10, 128.98, 122.96, 104.50, 97.58, 64.62, 52.88, 50.80, 49.93, 29.68, 29.31, 27.96, 25.53, 25.49, 23.03, 19.42, 17.32, 12.15, 12.08, 11.18.

Reazione n. 11

Sintesi di **DRPDT1**



All'interno di un pallone a due colli dotato di agitatore magnetico, in atmosfera di N_2 e totale assenza di luce, viene preparata una soluzione di **40** (0.02 mmol, 0.014 g) in THF (0.7 ml). Alla soluzione così ottenuta si aggiunge piridina goccia a goccia (0.3 ml) seguita da **38** (0.023 mmol, 0.012 g). La reazione viene condotta a temperatura ambiente per 21 ore circa, controllandone l'avanzamento mediante tlc. La miscela di reazione viene quindi diluita con etile acetato, seguita da diversi lavaggi con H_2O , e le frazioni organiche riunite vengono in seguito anidificate con Na_2SO_4 , filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene successivamente purificato mediante cromatografia su silice, eluente: diclorometano/metanolo = 14/1, isolando così 9 mg della molecola target della nostra strategia sintetica, **DRPDT1**, solido dal color violaceo scuro (resa = 39%).

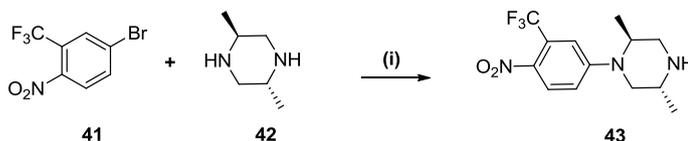
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.11 (s, 2H), 9.93 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 8.10 – 7.96 (m, 6H), 7.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.57 – 7.45 (m, 5H), 7.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 5H), 6.44 – 6.28 (m, 6H), 4.73 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.57 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.88 – 3.83 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.75 – 3.69 (m, 1H), 3.64 (d, $J = 20.0$ Hz, 1H), 3.47 (s, 4H), 3.44 – 3.38 (m, 2H), 3.37 (d, $J = 5.9$ Hz, 6H), 3.13 (d, $J = 14.8$ Hz, 4H), 3.02 (d, $J = 15.0$ Hz, 2H), 2.17 (d, $J = 2.4$ Hz, 4H), 1.93 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.64 (t, $J = 7.9$ Hz, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.47 (s, 3H).

5.2 Sintesi di DRPDT2

Reazione n.1

Sintesi di (2S,5S)-2,5-dimetil-1-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)piperazina (**43**)



Ad una soluzione di **41** (1.11 mmol, 0.3 g) in N,N-dimetil formammide DMF (7 ml) viene aggiunta la piperazina **42** (4.44 mmol, 0.52 g) e la miscela di reazione viene agitata a 80°C per 20 ore. Successivamente la miscela viene diluita con H₂O e vengono effettuate più estrazioni con EtOAc; le frazioni organiche riunite vengono quindi anidificate con Na₂SO₄, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione concentrato viene quindi purificato mediante colonna cromatografica su silice, eluente CHCl₃/CH₃OH = 20/1. Si ottengono così 83 mg di **43** come solido giallino (resa = 25 %).

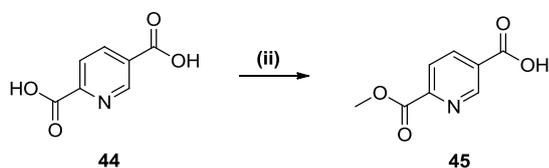
Caratterizzazione spettroscopica

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (d, J = 9.2 Hz, 1H, ArH), 7.13 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ArH), 6.92 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H, ArH), 3.81 (dt, J = 6.6, 4.4 Hz, 1H, CH₂), 3.44 – 3.30 (m, 3H, 1H CH₂, 2 H CH), 3.17 (dd, J = 12.3, 4.4 Hz, 1H, CH₂), 2.73 (dd, J = 12.9, 4.4 Hz, 1H, CH₂), 1.62 (bs, 1H, NH), 1.22 (t, J = 6.5 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 153.77, 148.79, 128.45, 123.67, 116.02, 113.47, 113.40, 50.55, 50.05, 48.13, 46.54, 18.65, 14.78.

Reazione n. 2

Sintesi di 6-(metossicarbonil) acido nicotinic (45)⁹⁸



Una soluzione di **44** (8.97 mmol, 1.5 g) in metanolo (18 ml) viene agitata magneticamente all'interno di un pallone da 50 ml; a questa soluzione viene aggiunto acido solforico concentrato (5.47 mmol, 0.3 ml) e la soluzione viene riscaldata a refluxo per 2 ore.

Successivamente si procede al raffreddamento della miscela di reazione sino a temperatura ambiente ed alla sua diluizione con H₂O, in seguito alla quale si osserva la formazione di un precipitato, che viene filtrato e lavato con metanolo. Il solido biancastro ottenuto è **45** (0.25 g, resa = 16%).

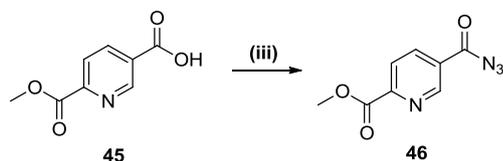
Caratterizzazione spettroscopica

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.16 – 9.11 (m, 1H, ArH), 8.42 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H, ArH), 8.14 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 3.89 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 166.19, 165.26, 150.95, 150.88, 139.14, 129.95, 125.41, 53.39.

Reazione n. 3

Sintesi di metil 5-(azidocarbonil)picolinato (**46**)⁹⁰



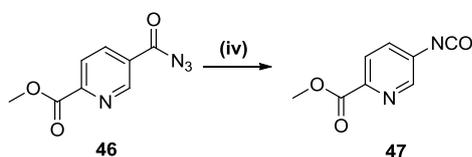
Ad una soluzione di **45** (1.38 mmol, 0.25 g) in acetone (4.58 ml) raffreddata a -10 °C, vengono aggiunti trietil ammina (1.38 mmol, 0.19 ml) ed etil cloroformiato (1.38 mmol, 0.12 ml). Dopo 30 minuti di agitazione a -10°C, viene aggiunta una

⁹⁸ Luk, K.; So, S.; Zhang, J.; Zhang, Z., *US2006/293319 A1* **2006**, column 47.

soluzione acquosa di NaN_3 (0.27g NaN_3 in 5 ml di H_2O); la reazione procede poi a temperatura ambiente per un'altra ora, dopo la quale si procede alla rimozione del solvente tramite evaporazione a pressione ridotta. Si procede quindi all'estrazione con diclorometano, lavando poi la fase organica con H_2O e BRINE. Dopo, anidificazione con Na_2SO_4 , filtrazione e rimozione del solvente si ottengono 0.194 g di **46** come solido biancastro che non necessita di ulteriori purificazioni (resa = 75%).

Reazione n. 4

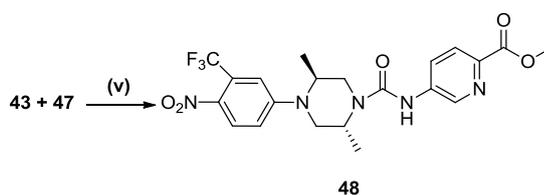
Sintesi di metil 5-(isocianatocarbonil)picolinato (**47**)



Una soluzione di **46** (1 mmol, 0.194 g) in toluene anidro (4 ml) viene riscaldata a 100°C per 2.5 ore. La miscela di reazione, contenente **47** viene quindi raffreddata a temperatura ambiente ed utilizzata nel successivo passaggio sintetico (resa = 100%).

Reazione n. 5

Sintesi di metil 5-((2S,5S)-2,5-dimetil-4-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)piperazine-1 carbossiamido)picolinato (**48**)



Alla soluzione di **47** raffreddata a temperatura ambiente viene aggiunto **43** (0.5 mmol, 0.151 g.), sciolto in 0.9 ml di toluene anidro. La miscela di reazione viene agitata per 10 minuti a temperatura ambiente, e successivamente concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene quindi purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice, eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 20/1$. Il processo di

purificazione consente l'isolamento di 0.2 g di **48** come solido giallo (resa = 84%).

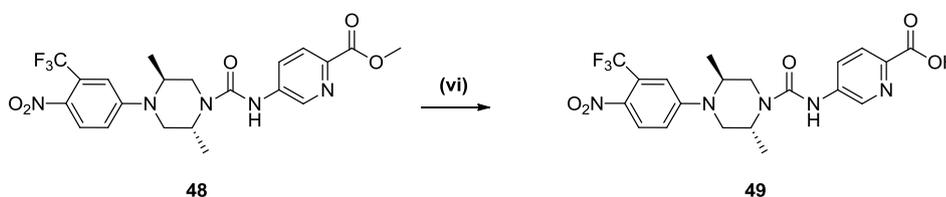
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.14 (s, 1H), 8.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H, ArH), 8.15 – 8.04 (m, 2H, ArH), 7.97 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.29 – 7.21 (m, 2H, ArH), 4.55 – 4.49 (m, 1H), 4.43 – 4.36 (m, 1H), 3.91 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.81 – 3.74 (m, 1H), 3.48 – 3.43 (m, 2H), 1.19 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 1.12 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165.61, 155.26, 153.65, 141.29, 141.14, 140.71, 135.73, 129.62, 126.25, 126.01, 115.77, 111.98, 79.85, 52.67, 49.51, 47.13, 45.62, 43.44, 16.20, 13.92.

Reazione n. 6

Sintesi di 5-((2S,5S)-2,5-dimetil-4-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)piperazina-1-carbossiamido) acido picolinico (**49**)



All'interno di un pallone a 2 colli dotato di ancoretta magnetica per l'agitazione viene sciolto **48** (0.41 mmol, 0.2 g) in metanolo (4.3 ml) e poche gocce di THF. Alla soluzione così ottenuta viene aggiunto NaOH 1N (0.43 mmol, 0.43 ml). Dopo 24 ore circa di agitazione a temperatura ambiente, la miscela viene acidificata mediante aggiunta di HCl 1 N; si osserva la formazione di un precipitato che viene filtrato ed asciugato. Si ottengono 155 mg di acido **49** (resa = 80%).

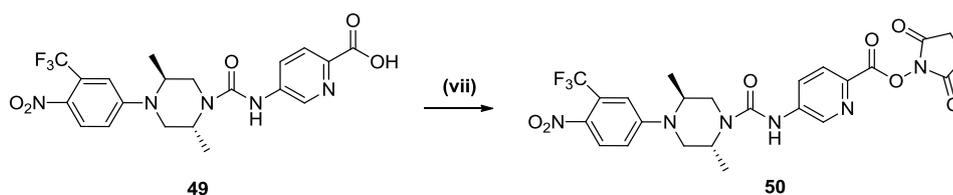
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 9.06 – 9.01 (m, 1H, ArH), 8.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 8.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, ArH), 8.05 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, ArH), 7.27 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, ArH), 7.19 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, ArH), 4.61 (s, 1H), 4.39 (s, 1H), 4.01 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 3.75 – 3.60 (m, 2H), 3.55 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 1.38 – 1.31 (m, 3H, CH_3), 1.24 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 171.84, 155.26, 153.35, 142.27, 137.01, 136.74, 130.48, 128.64, 126.58, 124.14, 115.25, 111.70, 49.72, 48.47, 48.04, 45.29, 43.12, 14.98, 12.25.

Reazione n. 7

Sintesi di 2,5-diossopirrolidin-1-il-((2S,5S)-2,5-dimetil-4-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)piperazina-1-carbossiamido)picolinato (**50**)



Ad una soluzione di **49** (0.33 mmol, 0.155 g) in 1,4-diossano (6 ml) e 2 ml di THF, vengono aggiunti *N*-idrossisuccinimide (0.33 mmol, 0.038 g) e DCC (0.33, 0.068 g). La reazione viene monitorata nel tempo tramite TLC: dopo 6 ore la miscela viene diluita con THF, adsorbita su silice e purificata mediante cromatografia su gel di silice, eluente utilizzato $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 12/1$. Il processo cromatografico fornisce 125 mg di prodotto pulito, **50** (resa = 67%).

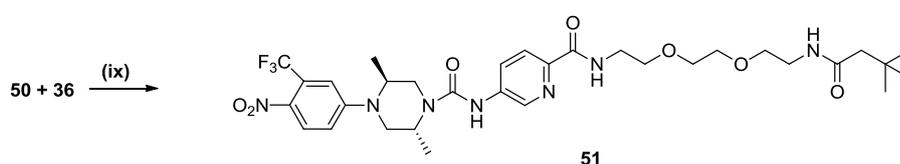
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.87 – 8.82 (m, 1H, ArH), 8.24 – 8.17 (m, 1H, ArH), 8.12 (t, $J = 0.7$ Hz, 1H, ArH), 8.08 – 8.01 (m, 1H, ArH), 7.26 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, ArH), 7.18 (dd, $J = 9.4, 2.8$ Hz, 1H, ArH), 4.62 – 4.56 (m, 1H), 4.40 – 4.32 (m, 1H), 4.25 – 4.17 (m, 1H), 3.99 – 3.91 (m, 1H), 3.73 – 3.65 (m, 2H), 2.91 (s, 4H, 2 CH_2), 1.34 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.24 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 171.84, 156.67, 154.52, 142.27, 137.38, 136.74, 130.48, 128.64, 126.58, 124.14, 116.34, 112.78, 49.72, 48.47, 48.04, 45.29, 43.12, 26.7, 16.10, 13.46.

Reazione n. 8

Sintesi di (2*S*,5*S*)-*N*-(6-((2-(2-(2-(3,3-dimetilbutanammido)etossi)etossi)etil)carbamoil)piridin-3-il)-2,5-dimetil-4-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)piperazina-1-carbossiammide



All'interno di un pallone a due colli dotato di agitatore magnetico, viene sciolto **50** (0.22 mmol, 0.125 g) in THF (4 ml). Alla soluzione così ottenuta si aggiungono piridina goccia a goccia (1.73 ml) e **36** (0.22 mmol, 0.055 g). La reazione viene condotta a temperatura ambiente per 20 ore al termine delle quali la miscela viene diluita con etile acetato e successivamente lavata vengono più volte con H_2O . Le frazioni organiche riunite vengono anidificate con Na_2SO_4 , filtrate e concentrate a pressione ridotta. Si ottengono 111 mg di **51** (resa = 72%).

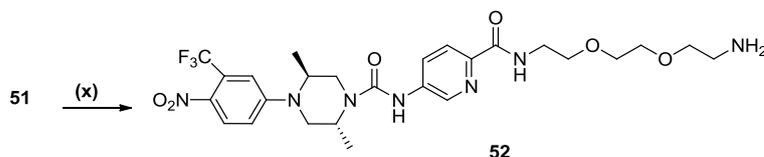
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.75 (s, 1H, ArH), 8.05 (d, $J = 9.6$ Hz, 3H, ArH), 7.27 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, ArH), 7.19 (dd, $J = 9.4, 2.8$ Hz, 1H, ArH), 4.58 (dd, $J = 7.0, 3.5$ Hz, 1H), 4.41 – 4.32 (m, 1H), 4.02 – 3.92 (m, 2H), 3.64 (dddd, $J = 13.0, 8.9, 6.6, 4.0$ Hz, 6H), 3.55 – 3.39 (m, 2H), 3.30 (p, $J = 1.6$ Hz, 4H), 3.25 – 3.17 (m, 2H), 1.41 (s, 9H, t-butyl), 1.33 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.24 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 153.37, 148.83, 140.46, 128.60, 127.46, 125.62, 122.17, 115.20, 111.66, 109.86, 70.17, 70.13, 69.91, 69.42, 51.80, 49.77, 45.33, 43.08, 40.10, 39.24, 33.57, 27.57, 25.56, 24.87, 14.95, 12.29.

Reazione n. 9

Sintesi di (2S,5S)-N-(6-((2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)carbamoil)piridin-3-il)-2,5-dimetil-4-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)piperazina-1-carbossiammide (**52**)



In un pallone a due colli vengono introdotti **51** (0.159 mmol, 0.111 g) e acido trifluoro acetico CF_3COOH (4.5 ml); la miscela di reazione viene agitata a temperatura ambiente per 3 ore al termine delle quali l'acido trifluoro acetico viene rimosso a pressione ridotta. Si diluisce con H_2O e si aggiunge NaHCO_3 sino al raggiungimento di un pH basico. La miscela viene quindi estratta con EtOAc. Le frazioni organiche riunite vengono anidificate con Na_2SO_4 , filtrate e concentrate al rotavapor, fornendo 65 mg di **52** (resa = 68%).

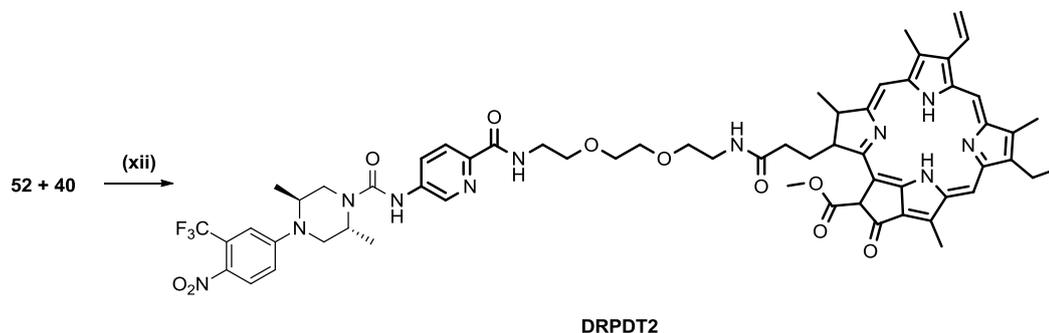
Caratterizzazione spettroscopica

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.75 (s, 1H, ArH), 8.05 (d, $J = 9.6$ Hz, 3H, ArH), 7.27 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, ArH), 7.19 (dd, $J = 9.4, 2.8$ Hz, 1H, ArH), 4.58 (dd, $J = 7.0, 3.5$ Hz, 1H), 4.41 – 4.32 (m, 1H), 4.02 – 3.92 (m, 2H), 3.64 (dddd, $J = 13.0, 8.9, 6.6, 4.0$ Hz, 6H), 3.55 – 3.39 (m, 2H), 3.30 (p, $J = 1.6$ Hz, 4H), 3.25 – 3.17 (m, 2H), 1.33 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.24 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 153.37, 148.83, 140.46, 128.60, 127.46, 125.62, 122.17, 115.20, 111.66, 109.86, 70.17, 70.13, 69.42, 51.80, 49.77, 45.33, 43.08, 40.10, 39.24, 33.57, 25.56, 24.87, 14.95, 12.29.

Reazione n. 10

Sintesi di **DRPDT2**



All'interno di un pallone a due colli dotato di agitatore magnetico, in atmosfera di N_2 e totale assenza di luce, viene preparata una soluzione di **40** (0.02 mmol, 0.015 g) in THF (0.8 ml). Alla soluzione così ottenuta vengono quindi aggiunti piridina goccia a goccia (0.32 ml) e **52** (0.033 mmol, 0.020 g). La reazione viene condotta a temperatura ambiente per 24 ore, controllandone l'avanzamento mediante tlc; la miscela viene quindi diluita con etile acetato, seguita da diversi lavaggi con H_2O , e le frazioni organiche riunite vengono anidificate con Na_2SO_4 , filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene successivamente purificato mediante cromatografia su silice, eluente: diclorometano/metanolo = 14/1, isolando così 25 mg di **DRPDT2**, come solido dal colore viola molto scuro (resa = 98%).

Caratterizzazione spettroscopica

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.41 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 9.31 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.15 (dd, $J = 4.4, 2.4$ Hz, 1H), 8.08 – 7.83 (m, 3H), 7.68 (dd, $J = 10.4, 3.0$ Hz, 1H), 7.29 (dd, $J = 7.6, 5.0$ Hz, 1H), 6.32 – 6.14 (m, 3H), 4.42 (td, $J = 5.4, 2.8$ Hz, 2H), 4.19 (d, $J = 8.7$ Hz, 3H), 3.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 3H), 3.60 (d, $J = 2.5$ Hz, 8H), 3.52 – 3.39 (m, 7H), 3.36 (d, $J = 3.6$ Hz, 7H), 3.20 (d, $J = 5.2$ Hz, 5H), 2.34 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 1.89 (d, $J = 4.0$ Hz, 3H), 1.75 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.35 – 1.28 (m, 3H), 1.25 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 189.85, 173.10, 172.43, 170.24, 164.49, 157.07, 154.99, 152.69, 149.96, 145.65, 144.03, 142.58, 139.69, 139.23, 138.04, 137.06, 136.94, 132.44, 129.03, 128.94, 127.62, 126.25, 123.83, 122.76, 121.11, 114.77,

111.90, 104.68, 97.80, 93.57, 70.73, 69.78, 65.16, 53.33, 51.61, 50.97, 49.62,
46.84, 46.10, 45.77, 45.56, 43.20, 42.93, 39.57, 34.16, 33.38, 32.15, 30.56, 29.92,
25.81, 23.33, 22.91, 19.63, 17.67, 17.54, 16.13, 14.34, 13.10, 12.96, 12.26, 11.40,

.

6. Schede di sicurezza

SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 4.1 Data di revisione 23.12.2011

Data di stampa 05.07.2012

1. IDENTIFICAZIONE DELLA SOSTANZA O DELLA MISCELA E DELLA SOCIETÀ/IMPRESA

1.1 Identificatori del prodotto

Nome del prodotto : 1,4-Diossano

Codice del prodotto : 296309
 Marca : Sigma-Aldrich
 N. INDICE : 603-024-00-5
 N. CAS : 123-91-1

1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati

Usi identificati : Chimici di laboratorio, Produzione di sostanze chimiche

1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezza

Società : Sigma-Aldrich S.r.l.
 Via Gallarate 154
 I-20151 MILANO
 Telefono : +39 02-3341-7310
 Fax : +39 02-3801-0737
 Indirizzo e-mail : eurtechserv@sial.com

1.4 Numero telefonico di emergenza

Telefono per le emergenze : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveneni Niguarda
 Ca' Granda - Milano)

2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP]

Liquidi infiammabili (Categoria 2)
 Cancerogenicità (Categoria 2)
 Irritazione oculare (Categoria 2)
 Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola (Categoria 3)

Classificazione secondo le Direttive EU 67/548/CEE o 1999/45/CE

Facilmente infiammabile. Può formare perossidi esplosivi. Possibilità di effetti cancerogeni - prove insufficienti. Irritante per gli occhi e le vie respiratorie. L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle.

2.2 Elementi dell'etichetta

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Pittogramma



Avvertenza

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H225 : Liquido e vapori facilmente infiammabili.
 H319 : Provoca grave irritazione oculare.
 H335 : Può irritare le vie respiratorie.
 H351 : Sospettato di provocare il cancro.

Consigli di prudenza

P210 : Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici

P261
P281
P305 + P351 + P338

riscaldare. - Non fumare.
Evitare di respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol.
Utilizzare il dispositivo di protezione individuale richiesto.
IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

Informazioni supplementari sui pericoli (EU)

EUH019 Può formare perossidi esplosivi.
EUH066 L'esposizione ripetuta può provocare secchezza o screpolature della pelle.

Secondo la Direttiva Europea 67/548/CEE, e successive modifiche.

Simbolo/i di pericolo



Frase "R"

R11 Facilmente infiammabile.
R19 Può formare perossidi esplosivi.
R36/37 Irritante per gli occhi e le vie respiratorie.
R40 Possibilità di effetti cancerogeni - prove insufficienti.
R66 L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle.

Frase "S"

S 9 Conservare il recipiente in luogo ben ventilato.
S16 Conservare lontano da fiamme e scintille - Non fumare.
S36/37 Usare indumenti protettivi e guanti adatti.
S46 In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta.

2.3 Altri pericoli - nessuno(a)

3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI

3.1 Sostanze

Sinonimi : Dioxane
Diethylene oxide

Formula : C₄H₈O₂

Peso Molecolare : 88,11 g/mol

Component	Concentrazione
1,4-Dioxane	
N. CAS	123-91-1
N. CE	204-661-8
N. INDICE	603-024-00-5

4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO

4.1 Descrizione delle misure di primo soccorso

Informazione generale

Consultare un medico. Mostrare questa scheda di sicurezza al medico curante.

Se inalato

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale. Consultare un medico.

In caso di contatto con la pelle

Lavare con sapone e molta acqua. Consultare un medico.

In caso di contatto con gli occhi

Sciacquare accuratamente ed abbondantemente con acqua per almeno 15 minuti e rivolgersi ad un medico.

Se ingerito

NON indurre il vomito. Non somministrare alcunchè a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua. Consultare un medico.

4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati

Nausea, Vomito, Debolezza, Vertigini, Vertigini, Mal di testa, Sudorazione, perdita di appetito, Può sopraggiungere una lesione ai reni., Può sopraggiungere una lesione al fegato.

4.3 Indicazione dell'eventuale necessità di consultare immediatamente un medico oppure di trattamenti speciali

nessun dato disponibile

5. MISURE ANTINCENDIO

5.1 Mezzi di estinzione

Mezzi di estinzione idonei

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

5.2 Pericoli speciali derivanti dalla sostanza o dalla miscela

Ossidi di carbonio

5.3 Raccomandazioni per gli addetti all'estinzione degli incendi

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

5.4 Ulteriori informazioni

Spruzzi d'acqua possono essere usati per raffreddare contenitori chiusi.

6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE

6.1 Precauzioni personali, dispositivi di protezione e procedure in caso di emergenza

Usare i dispositivi di protezione individuali. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas. Prevedere una ventilazione adeguata. Eliminare tutte le sorgenti di combustione. Evacuare il personale in aree di sicurezza. Attenti ai vapori addensati che possono formare delle concentrazioni esplosive. I vapori si possono addensare in zone poco elevate.

6.2 Precauzioni ambientali

Evitare sversamenti o perdite supplementari, se questo può essere fatto senza pericolo. Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi. La scarica nell'ambiente deve essere evitata.

6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica

Contenere e raccogliere quanto riversato accidentalmente con un aspirapolvere protetto dalle scariche elettriche o con una spazzola bagnata e porlo in un recipiente rispettando le direttive locali (riferirsi alla sezione 13).

6.4 Riferimenti ad altre sezioni

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO

7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura

Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Non inalare vapori o nebbie. Conservare lontano da fiamme e scintille - Non fumare. Prendere misure preventive per evitare la produzione di cariche elettrostatiche.

7.2 Condizioni per l'immagazzinamento sicuro, comprese eventuali incompatibilità

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato. Chiudere accuratamente i contenitori aperti e riporli in posizione verticale per evitare perdite.

7.3 Usi finali specifici

nessun dato disponibile

8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE

8.1 Parametri di controllo

Componenti con limiti di esposizione

Component	N. CAS	Valore	Parametri di controllo	Base
1,4-Dioxane	123-91-1	TWA	20 ppm 73 mg/m ³	Europa. DIRETTIVA 2009/161/UE DELLA COMMISSIONE che definisce un terzo elenco di valori indicativi di esposizione professionale in attuazione della direttiva 98/24/CE del Consiglio e che modifica la direttiva 2000/39/CE della Commissione
	Osservazioni	Indicativo		

8.2 Controlli dell'esposizione

Controlli tecnici idonei

Manipolare rispettando le buone pratiche di igiene industriale e di sicurezza adeguate. Lavarsi le mani prima delle pause ed alla fine della giornata lavorativa.

Protezione individuale

Protezioni per occhi/volto

Visiera e occhiali di protezione. Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

Protezione della pelle

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto. Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani.

I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

Protezione fisica

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche, Indumenti protettivi antistatici a prova di fiamma, Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

Protezione respiratoria

Qualora la valutazione del rischio preveda la necessità di respiratori ad aria purificata, utilizzare una maschera a pieno facciale con filtri combinati di tipo ABEK (EN 14387) come supporto alle misure tecniche. Se il respiratore costituisce il solo mezzo di protezione, utilizzare un sistema ventilato a pieno facciale. Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE

9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

- | | |
|--|--|
| a) Aspetto | Stato fisico: liquido
Colore: incolore |
| b) Odore | nessun dato disponibile |
| c) Soglia olfattiva | nessun dato disponibile |
| d) pH | 6,0 - 8 a 500 g/l a 20 °C |
| e) Punto di fusione/punto di congelamento | Punto/intervallo di fusione: 10 - 12 °C - lit. |
| f) Punto di ebollizione iniziale e intervallo di | 100 - 102 °C - lit. |

ebollizione.

- | | |
|---|---|
| g) Punto di infiammabilità. | 12 °C - vaso chiuso |
| h) Tasso di evaporazione | nessun dato disponibile |
| i) Infiammabilità (solidi, gas) | nessun dato disponibile |
| j) Infiammabilità superiore/inferiore o limiti di esplosività | Limite superiore di esplosività: 22 %(V)
Limite inferiore di esplosività: 2 %(V) |
| k) Tensione di vapore | 36 hPa a 20 °C
53 hPa a 25,20 °C |
| l) Densità di vapore | 3,04 - (Aria = 1.0) |
| m) Densità relativa | 1,034 g/cm ³ a 25 °C |
| n) Idrosolubilità | completamente miscibile |
| o) Coefficiente di ripartizione: n-ottanolo/acqua | log Pow: -0,27 |
| p) Temperatura di autoaccensione | nessun dato disponibile |
| q) Temperatura di decomposizione | nessun dato disponibile |
| r) Viscosità | nessun dato disponibile |
| s) Proprietà esplosive | nessun dato disponibile |
| t) Proprietà ossidanti | nessun dato disponibile |

9.2 Altre informazioni sulla sicurezza

Tensione superficiale 36,9 mN/m a 25 °C

10. STABILITÀ E REATTIVITÀ

10.1 Reattività

nessun dato disponibile

10.2 Stabilità chimica

nessun dato disponibile

10.3 Possibilità di reazioni pericolose

nessun dato disponibile

10.4 Condizioni da evitare

Calore, fiamme e scintille. Temperature estreme e luce diretta del sole.

10.5 Materiali incompatibili

Ossigeno, Agenti ossidanti, Alogeni, Agenti riducenti, Perclorati, Trimetilalluminio

10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile

11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE

11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici

Tossicità acuta

DL50 Orale - ratto - 4.200 mg/kg

CL50 Inalazione - ratto - 2 h - 46.000 mg/m³

Osservazioni: Organi di senso: vista: altro

DL50 Dermico - su coniglio - 7.858 mg/kg

Corrosione/irritazione cutanea

Pelle - umano -

Osservazioni: L'esposizione continua causa secchezza della pelle ed eczema.

Pelle - su coniglio - Nessuna irritazione della pelle

Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi

Occhi - su coniglio - Irritante per gli occhi - 24 h

Sensibilizzazione respiratoria o cutanea

nessun dato disponibile

Mutagenicità delle cellule germinali

Prove di laboratorio hanno rivelato effetti mutageni.

Cancerogenicità

Il presente prodotto è oppure contiene un componente ritenuto un possibile agente cancerogeno secondo la sua classificazione IARC, OSHA, ACGIH, NTP o EPA.

Evidenza limitata di cancerogenità in studi sugli animali

IARC: 2B - Gruppo 2B: Possibilmente cancerogeno per l'uomo ()

Tossicità riproduttiva

nessun dato disponibile

Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola

Può irritare le vie respiratorie.

Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione ripetuta

nessun dato disponibile

Pericolo in caso di aspirazione

nessun dato disponibile

Potenziati conseguenze sulla salute

Inalazione	Può essere nocivo se inalato. Provoca irritazione delle vie respiratorie.
Ingestione	Può essere pericoloso se ingerito.
Pelle	Può essere dannoso se assorbito attraverso la pelle. Può provocare irritazione della pelle.
Occhi	Provoca grave irritazione oculare.

Segni e sintomi di esposizione

Nausea, Vomito, Debolezza, Vertigini, Vertigini, Mal di testa, Sudorazione, perdita di appetito, Può sopraggiungere una lesione ai reni., Può sopraggiungere una lesione al fegato.

ulteriori informazioni

RTECS: JG8225000

12. INFORMAZIONI ECOLOGICHE**12.1 Tossicità**

Tossicità per i pesci CL50 - Pimephales promelas (Cavedano americano) - 985 mg/l - 96 h

Tossicità per la daphnia e per altri invertebrati acquatici CE50 - Daphnia magna (Pulce d'acqua grande) - 8.450 mg/l - 24 h

Tossicità per le alghe CE50 - Desmodesmus subspicatus (alga verde) - > 500 mg/l - 72 h

12.2 Persistenza e degradabilità

Biodegradabilità Risultato: < 5 % - Non immediatamente biodegradabile.

12.3 Potenziale di bioaccumulo

Non si bio-accumula.

SCHEMA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 4.2 Data di revisione 23.12.2011

Data di stampa 05.07.2012

1. IDENTIFICAZIONE DELLA SOSTANZA O DELLA MISCELA E DELLA SOCIETÀ/IMPRESA**1.1 Identificatori del prodotto**

Nome del prodotto : Acetone cyanohydrin

Codice del prodotto : A10000
Marca : Aldrich
N. INDICE : 608-004-00-X
N. CAS : 75-86-5**1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati**

Usi identificati : Chimici di laboratorio, Produzione di sostanze chimiche

1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezzaSocietà : Sigma-Aldrich S.r.l.
Via Gallarate 154
I-20151 MILANO
Telefono : +39 02-3341-7310
Fax : +39 02-3801-0737
Indirizzo e-mail : eurtechserv@sial.com**1.4 Numero telefonico di emergenza**Telefono per le emergenze : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveneni Niguarda
Ca' Granda - Milano)**2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI****2.1 Classificazione della sostanza o della miscela****Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP]**Tossicità acuta, Inalazione (Categoria 2)
Tossicità acuta, Dermico (Categoria 1)
Tossicità acuta, Orale (Categoria 2)
Tossicità acuto per l'ambiente acquatico (Categoria 1)
Tossicità cronica per l'ambiente acquatico (Categoria 1)**Classificazione secondo le Direttive EU 67/548/CEE o 1999/45/CE**

Altamente tossico per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico. Molto tossico per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione.

2.2 Elementi dell'etichetta**Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]**

Pittogramma



Avvertenza

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H300 Letale se ingerito.
H310 Letale per contatto con la pelle.
H330 Letale se inalato.
H410 Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Consigli di prudenza

P260 Non respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol.

P264	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P273	Non disperdere nell'ambiente.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
P284	Utilizzare un apparecchio respiratorio.
P301 + P310	IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico

Descrizioni supplementari del rischio nessuno(a)

Secondo la Direttiva Europea 67/548/CEE, e successive modifiche.

Simbolo/i di pericolo



Frase "R"
R26/27/28
R50/53

Molto tossico per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione. Altamente tossico per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico.

Frase "S"
S 7/9
S27
S45

Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato. Togliersi di dosso immediatamente gli indumenti contaminati. In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

S60
S61

Questo materiale e il suo contenitore devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi. Non disperdere nell'ambiente. Riferirsi alle istruzioni speciali/schede informative in materia di sicurezza.

2.3 Altri pericoli - nessuno(a)

3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI

3.1 Sostanze

Sinonimi : α -Hydroxyisobutyronitrile
2-Hydroxyisobutyronitrile

Formula : C_4H_7NO

Peso Molecolare : 85,10 g/mol

Component	Concentrazione
2-Cyanopropan-2-ol	
N. CAS	75-86-5
N. CE	200-909-4
N. INDICE	608-004-00-X

4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO

4.1 Descrizione delle misure di primo soccorso

Informazione generale

Consultare un medico. Mostrare questa scheda di sicurezza al medico curante.

Se inalato

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale. Consultare un medico.

In caso di contatto con la pelle

Lavare con sapone e molta acqua. Portare subito l'infortunato in ospedale. Consultare un medico.

In caso di contatto con gli occhi

Come precauzione sciacquare gli occhi con acqua.

Se ingerito

NON indurre il vomito. Non somministrare alcunchè a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua. Consultare un medico.

4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati

Tosse, Mancanza di respiro, Mal di testa, Nausea, Vomito, Può causare cianosi., Convulsioni

4.3 Indicazione dell'eventuale necessità di consultare immediatamente un medico oppure di trattamenti speciali

nessun dato disponibile

5. MISURE ANTINCENDIO

5.1 Mezzi di estinzione

Mezzi di estinzione idonei

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

5.2 Pericoli speciali derivanti dalla sostanza o dalla miscela

Ossidi di carbonio, ossidi di azoto (NOx)

5.3 Raccomandazioni per gli addetti all'estinzione degli incendi

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

5.4 Ulteriori informazioni

Spruzzi d'acqua possono essere usati per raffreddare contenitori chiusi.

6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE

6.1 Precauzioni personali, dispositivi di protezione e procedure in caso di emergenza

Usare una protezione respiratoria. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas. Prevedere una ventilazione adeguata. Eliminare tutte le sorgenti di combustione. Evacuare il personale in aree di sicurezza. Attenti ai vapori addensati che possono formare delle concentrazioni esplosive. I vapori si possono addensare in zone poco elevate.

6.2 Precauzioni ambientali

Evitare sversamenti o perdite supplementari, se questo può essere fatto senza pericolo. Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi. La discarica nell'ambiente deve essere evitata.

6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica

Contenere e raccogliere quanto riversato accidentalmente con un aspirapolvere protetto dalle scariche elettriche o con una spazzola bagnata e porlo in un recipiente rispettando le direttive locali (riferirsi alla sezione 13). Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

6.4 Riferimenti ad altre sezioni

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO

7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura

Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Non inalare vapori o nebbie. Conservare lontano da fiamme e scintille - Non fumare. Prendere misure preventive per evitare la produzione di cariche elettrostatiche.

7.2 Condizioni per l'immagazzinamento sicuro, comprese eventuali incompatibilità

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato. Chiudere accuratamente i contenitori aperti e riporli in posizione verticale per evitare perdite.

7.3 Usi finali specifici

nessun dato disponibile

8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE

8.1 Parametri di controllo

Componenti con limiti di esposizione

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

8.2 Controlli dell'esposizione

Controlli tecnici idonei

Evitare il contatto con la pelle, con gli occhi e con gli indumenti. Lavarsi le mani prima delle pause e subito dopo aver maneggiato il prodotto.

Protezione individuale

Protezioni per occhi/volto

Visiera e occhiali di protezione. Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

Protezione della pelle

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto. Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani.

I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

Protezione fisica

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche, Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

Protezione respiratoria

Qualora la valutazione del rischio preveda la necessità di respiratori ad aria purificata, utilizzare una maschera a pieno facciale con filtri combinati di tipo ABEK (EN 14387) come supporto alle misure tecniche. Se il respiratore costituisce il solo mezzo di protezione, utilizzare un sistema ventilato a pieno facciale. Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE

9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

a) Aspetto	Stato fisico: limpido, liquido Colore: giallo chiaro
b) Odore	nessun dato disponibile
c) Soglia olfattiva	nessun dato disponibile
d) pH	nessun dato disponibile
e) Punto di fusione/punto di congelamento	Punto/intervallo di fusione: -19 °C - lit.
f) Punto di ebollizione iniziale e intervallo di ebollizione.	82 °C a 31 hPa - lit.
g) Punto di infiammabilità.	75 °C - vaso chiuso
h) Tasso di evaporazione	nessun dato disponibile
i) Infiammabilità (solidi, gas)	nessun dato disponibile
j) Infiammabilità superiore/inferiore o limiti di esplosività	Limite superiore di esplosività: 11 %(V) Limite inferiore di esplosività: 2,25 %(V)
k) Tensione di vapore	nessun dato disponibile
l) Densità di vapore	nessun dato disponibile
m) Densità relativa	0,932 g/cm ³ a 25 °C
n) Idrosolubilità	nessun dato disponibile
o) Coefficiente di	nessun dato disponibile

ripartizione: n-
ottanolo/acqua

- | | | |
|----|-------------------------------|-------------------------|
| p) | Temperatura di autoaccensione | nessun dato disponibile |
| q) | Temperatura di decomposizione | nessun dato disponibile |
| r) | Viscosità | nessun dato disponibile |
| s) | Proprietà esplosive | nessun dato disponibile |
| t) | Proprietà ossidanti | nessun dato disponibile |

9.2 Altre informazioni sulla sicurezza

nessun dato disponibile

10. STABILITÀ E REATTIVITÀ

10.1 Reattività

nessun dato disponibile

10.2 Stabilità chimica

nessun dato disponibile

10.3 Possibilità di reazioni pericolose

nessun dato disponibile

10.4 Condizioni da evitare

Calore, fiamme e scintille.

10.5 Materiali incompatibili

Acidi forti, Basi forti, Agenti ossidanti forti, Agenti fortemente riducenti

10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile

11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE

11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici

Tossicità acuta

DL50 Orale - ratto - 18,65 mg/kg

DL50 Dermico - su coniglio - 15,8 mg/kg

Corrosione/irritazione cutanea

nessun dato disponibile

Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi

nessun dato disponibile

Sensibilizzazione respiratoria o cutanea

nessun dato disponibile

Mutagenicità delle cellule germinali

nessun dato disponibile

Cancerogenicità

IARC: Nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC.

Tossicità riproduttiva

nessun dato disponibile

Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola

nessun dato disponibile

Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione ripetuta

nessun dato disponibile

Pericolo in caso di aspirazione

nessun dato disponibile

Potenziali conseguenze sulla salute

Inalazione	Può essere fatale se inalato. Può provocare irritazione delle vie respiratorie.
Ingestione	Può essere fatale se ingerito.
Pelle	Può essere fatale se assorbito tramite la pelle. Può provocare irritazione della pelle.
Occhi	Può provocare irritazione agli occhi.

Segni e sintomi di esposizione

Tosse, Mancanza di respiro, Mal di testa, Nausea, Vomito, Può causare cianosi., Convulsioni

ulteriori informazioni

RTECS: OD9275000

12. INFORMAZIONI ECOLOGICHE**12.1 Tossicità**

Tossicità per i pesci CL50 - *Oncorhynchus mykiss* (Trota iridea) - 0,22 mg/l - 96,0 h

Tossicità per la daphnia e per altri invertebrati acquatici CE50 - *Daphnia magna* (Pulce d'acqua grande) - 0,13 mg/l - 48 h

12.2 Persistenza e degradabilità

Biodegradabilità Biotico/ Aerobico - Tempo di esposizione 28 d
Risultato: 80 % - Rapidamente biodegradabile.

12.3 Potenziale di bioaccumulo

nessun dato disponibile

12.4 Mobilità nel suolo

nessun dato disponibile

12.5 Risultati della valutazione PBT e vPvB

nessun dato disponibile

12.6 Altri effetti avversi

Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

13. CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO**13.1 Metodi di trattamento dei rifiuti****Prodotto**

Il presente prodotto combustibile può venire bruciato in inceneritore per prodotti chimici dotato di sistema di postcombustione e di abbattitore. Conferire le soluzioni non riciclabili e le eccedenze ad una società di smaltimento rifiuti autorizzata.

Contenitori contaminati

Smaltire come prodotto inutilizzato.

14. INFORMAZIONI SUL TRASPORTO**14.1 Numero ONU**

ADR/RID: 1541

IMDG: 1541

IATA: 1541

14.2 Nome di spedizione dell'ONU

ADR/RID: ACETONCIANIDRINA STABILIZZATA

IMDG: ACETONE CYANOHYDRIN, STABILIZED

IATA: Acetone cyanohydrin, stabilized

Passenger Aircraft: Not permitted for transport

Cargo Aircraft: Not permitted for transport

14.3	Classi di pericolo connesso al trasporto		
	ADR/RID: 6.1	IMDG: 6.1	IATA: 6.1
14.4	Gruppo d'imballaggio		
	ADR/RID: I	IMDG: I	IATA: -
14.5	Pericoli per l'ambiente		
	ADR/RID: si	IMDG Marine pollutant: yes	IATA: no
14.6	Precauzioni speciali per gli utilizzatori		
	nessun dato disponibile		

15. INFORMAZIONI SULLA REGOLAMENTAZIONE

Questa scheda di sicurezza rispetta le prescrizioni del Regolamento (CE) Num. 1907/2006

15.1 Norme e legislazione su salute, sicurezza e ambiente specifiche per la sostanza o la miscela
nessun dato disponibile

15.2 Valutazione della sicurezza chimica
nessun dato disponibile

16. ALTRE INFORMAZIONI

Ulteriori informazioni

Diritti d'autore 2011 Sigma-Aldrich. Si autorizza la stampa di un numero illimitato di copie per esclusivo uso interno.

Le informazioni di cui sopra sono ritenute corrette, tuttavia non possono essere esaurienti e dovranno pertanto essere considerate puramente indicative. La società Sigma-Aldrich, non potrà essere ritenuta responsabile per qualsiasi danno derivante dall'impiego o dal contatto con il prodotto di cui sopra. Per ulteriori termini e condizioni di vendita fare riferimento al retro della fattura o della bolla di accompagnamento.

SCHEMA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 4.2 Data di revisione 22.12.2011

Data di stampa 05.07.2012

1. IDENTIFICAZIONE DELLA SOSTANZA O DELLA MISCELA E DELLA SOCIETÀ/IMPRESA**1.1 Identificatori del prodotto**

Nome del prodotto : Tiofosgene

Codice del prodotto : 115150
Marca : Aldrich
N. INDICE : 607-201-00-8
N. CAS : 463-71-8**1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati**

Usi identificati : Chimici di laboratorio, Produzione di sostanze chimiche

1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezzaSocietà : Sigma-Aldrich S.r.l.
Via Gallarate 154
I-20151 MILANO
Telefono : +39 02-3341-7310
Fax : +39 02-3801-0737
Indirizzo e-mail : eurtechserv@sial.com**1.4 Numero telefonico di emergenza**Telefono per le emergenze : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveneni Niguarda
Ca' Granda - Milano)**2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI****2.1 Classificazione della sostanza o della miscela****Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP]**Tossicità acuta, Inalazione (Categoria 3)
Tossicità acuta, Orale (Categoria 4)
Irritazione oculare (Categoria 2)
Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola (Categoria 3)
Irritazione cutanea (Categoria 2)**Classificazione secondo le Direttive EU 67/548/CEE o 1999/45/CE**

Tossico per inalazione. Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Nocivo per ingestione.

2.2 Elementi dell'etichetta**Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]**

Pittogramma



Avvertenza

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H302 Nocivo se ingerito.
H315 Provoca irritazione cutanea.
H319 Provoca grave irritazione oculare.
H331 Tossico se inalato.
H335 Può irritare le vie respiratorie.

Consigli di prudenza

P261 Evitare di respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol.

P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P311 Contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Descrizioni supplementari del rischio nessuno(a)

Secondo la Direttiva Europea 67/548/CEE, e successive modifiche.

Simbolo/i di pericolo



Fraasi "R"

R22 Nocivo per ingestione.
R23 Tossico per inalazione.
R36/37/38 Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle.

Fraasi "S"

S 7 Conservare il recipiente ben chiuso.
S 9 Conservare il recipiente in luogo ben ventilato.
S36/37 Usare indumenti protettivi e guanti adatti.
S45 In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

2.3 Altri pericoli
Lacrimogeno.

3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI

3.1 Sostanze

Sinonimi : Thiocarbonyl chloride

Formula : CCl₂S

Peso Molecolare : 114,98 g/mol

Component	Concentrazione
Thiocarbonyl chloride	
N. CAS	463-71-8
N. CE	207-341-6
N. INDICE	607-201-00-8

4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO

4.1 Descrizione delle misure di primo soccorso

Informazione generale

Consultare un medico. Mostrare questa scheda di sicurezza al medico curante.

Se inalato

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale. Consultare un medico.

In caso di contatto con la pelle

Lavare con sapone e molta acqua. Portare subito l'infortunato in ospedale. Consultare un medico.

In caso di contatto con gli occhi

Sciacquare accuratamente ed abbondantemente con acqua per almeno 15 minuti e rivolgersi ad un medico.

Se ingerito

Non somministrare alcunchè a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua. Consultare un medico.

4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati

Il prodotto danneggia gravemente le mucose e le vie respiratorie superiori nonchè gli occhi e la cute., Tosse, Mancanza di respiro, Mal di testa, Nausea

- 4.3 Indicazione dell'eventuale necessità di consultare immediatamente un medico oppure di trattamenti speciali**
nessun dato disponibile

5. MISURE ANTINCENDIO

5.1 Mezzi di estinzione

Mezzi di estinzione idonei

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

5.2 Pericoli speciali derivanti dalla sostanza o dalla miscela

Ossidi di carbonio, Ossidi di zolfo, Gas di acido cloridrico

5.3 Raccomandazioni per gli addetti all'estinzione degli incendi

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

5.4 Ulteriori informazioni

nessun dato disponibile

6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE

6.1 Precauzioni personali, dispositivi di protezione e procedure in caso di emergenza

Usare una protezione respiratoria. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas. Prevedere una ventilazione adeguata. Evacuare il personale in aree di sicurezza.

6.2 Precauzioni ambientali

Evitare sversamenti o perdite supplementari, se questo può essere fatto senza pericolo. Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica

Impregnare con materiale assorbente inerte e smaltire come rifiuto (vedere SEZ. 13). Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

6.4 Riferimenti ad altre sezioni

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO

7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura

Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Non inalare vapori o nebbie.

7.2 Condizioni per l'immagazzinamento sicuro, comprese eventuali incompatibilità

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato. Chiudere accuratamente i contenitori aperti e riporli in posizione verticale per evitare perdite.

Temperatura di stoccaggio consigliata: 2 - 8 °C

Sensibile all'umidità.

7.3 Usi finali specifici

nessun dato disponibile

8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE

8.1 Parametri di controllo

Componenti con limiti di esposizione

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

8.2 Controlli dell'esposizione

Controlli tecnici idonei

Evitare il contatto con la pelle, con gli occhi e con gli indumenti. Lavarsi le mani prima delle pause e subito dopo aver maneggiato il prodotto.

Protezione individuale

Protezioni per occhi/volto

Occhiali di sicurezza ben aderenti. Visiera protettiva (minimo 20 cm). Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

Protezione della pelle

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto. Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani.

I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

Protezione fisica

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche, Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

Protezione respiratoria

Qualora la valutazione del rischio preveda la necessità di respiratori ad aria purificata, utilizzare una maschera a pieno facciale con filtri combinati di tipo ABEK (EN 14387) come supporto alle misure tecniche. Se il respiratore costituisce il solo mezzo di protezione, utilizzare un sistema ventilato a pieno facciale. Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE

9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

a) Aspetto	Stato fisico: limpido, liquido Colore: rosso scuro
b) Odore	nessun dato disponibile
c) Soglia olfattiva	nessun dato disponibile
d) pH	nessun dato disponibile
e) Punto di fusione/punto di congelamento	nessun dato disponibile
f) Punto di ebollizione iniziale e intervallo di ebollizione.	70 - 75 °C - lit.
g) Punto di infiammabilità.	nessun dato disponibile
h) Tasso di evaporazione	nessun dato disponibile
i) Infiammabilità (solidi, gas)	nessun dato disponibile
j) Infiammabilità superiore/inferiore o limiti di esplosività	nessun dato disponibile
k) Tensione di vapore	nessun dato disponibile
l) Densità di vapore	3,97 - (Aria = 1.0)
m) Densità relativa	1,50 g/cm ³ a 20 °C
n) Idrosolubilità	nessun dato disponibile
o) Coefficiente di ripartizione: n-ottanolo/acqua	nessun dato disponibile
p) Temperatura di	nessun dato disponibile

	autoaccensione	
q)	Temperatura di decomposizione	nessun dato disponibile
r)	Viscosità	nessun dato disponibile
s)	Proprietà esplosive	nessun dato disponibile
t)	Proprietà ossidanti	nessun dato disponibile

9.2 Altre informazioni sulla sicurezza

nessun dato disponibile

10. STABILITÀ E REATTIVITÀ

10.1 Reattività

nessun dato disponibile

10.2 Stabilità chimica

nessun dato disponibile

10.3 Possibilità di reazioni pericolose

nessun dato disponibile

10.4 Condizioni da evitare

nessun dato disponibile

10.5 Materiali incompatibili

Alcoli, Ammine, Metalli

10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile

11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE

11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici

Tossicità acuta

DL50 Orale - ratto - 929 mg/kg

Corrosione/irritazione cutanea

Pelle - su coniglio - Irritante per la pelle - 24 h

Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi

Occhi - su coniglio - Grave irritazione agli occhi - 24 h

Sensibilizzazione respiratoria o cutanea

nessun dato disponibile

Mutagenicità delle cellule germinali

nessun dato disponibile

Cancerogenicità

IARC: Nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC.

Tossicità riproduttiva

nessun dato disponibile

Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola

Può irritare le vie respiratorie.

Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione ripetuta

nessun dato disponibile

Pericolo in caso di aspirazione

nessun dato disponibile

Potenziali conseguenze sulla salute

15. INFORMAZIONI SULLA REGOLAMENTAZIONE

Questa scheda di sicurezza rispetta le prescrizioni del Regolamento (CE) Num. 1907/2006

15.1 Norme e legislazione su salute, sicurezza e ambiente specifiche per la sostanza o la miscela
nessun dato disponibile

15.2 Valutazione della sicurezza chimica
nessun dato disponibile

16. ALTRE INFORMAZIONI**Ulteriori informazioni**

Diritti d'autore 2011 Sigma-Aldrich. Si autorizza la stampa di un numero illimitato di copie per esclusivo uso interno.

Le informazioni di cui sopra sono ritenute corrette, tuttavia non possono essere esaurienti e dovranno pertanto essere considerate puramente indicative. La società Sigma-Aldrich, non potrà essere ritenuta responsabile per qualsiasi danno derivante dall'impiego o dal contatto con il prodotto di cui sopra. Per ulteriori termini e condizioni di vendita fare riferimento al retro della fattura o della bolla di accompagnamento.
