



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900410172
Data Deposito	21/12/1994
Data Pubblicazione	21/06/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

LATTONI AD ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE ED IPOLIPIDEMICA UTILI NELLA TERAPIA DELL'ATEROSCLEROSI
--

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

LATTONI AD ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE ED IPOLIPIDEMICA
UTILI NELLA TERAPIA DELL'ATEROSCLEROSI

a nome: **ALFA WASSERMANN S.p.A.**

Contrada S.Emidio s.n.c.

65020 ALANNO SCALO (PE)

Inventori designati: **ROSINI Goffredo**

BALDAZZI Claudia

ROMAGNOLI Eleonora

SAGUATTI Stefano

PIANI Silvano

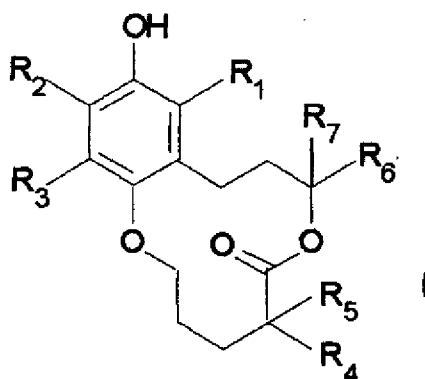
Dep. il:

No.:

21 DIC. 1994

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

Lattoni di formula



e loro sali farmacologicamente accettabili dotati di proprietà antiossidanti ed ipolipidemiche e che presentano la capacità di prevenire e/o ritardare la modificazione ossidativa delle lipoproteine competendo con la catena di propagazione della perossidazione lipidica mediante un efficace "scavenging" dei radicali perossilici.

Poiché gli elevati livelli plasmatici di lipidi e le modificazioni per via ossidativa delle lipoproteine a bassa densità (LDL) rappresentano eventi cruciali nella patogenesi dell'aterosclerosi, i derivati oggetto della presente invenzione sono utili nel trattamento dell'aterosclerosi e di numerose patologie vascolari ad essa correlate, quali cardiopatie ischemiche (angina pectoris ed infarto del miocardio), trombosi cerebrale ed arteriopatie periferiche.

AMBITO DELL'INVENZIONE

L'aterosclerosi è un processo degenerativo della parete arteriosa e rappresenta la causa primaria di numerose patologie vascolari quali cardiopatie ischemiche (angina pectoris ed infarto del miocardio) e trombosi cerebrale, principali cause di decesso nei paesi industrializzati.

Numerosi sforzi sono stati compiuti per capire l'eziologia di questa patologia di grande diffusione e rilevanza ed individuare i potenziali trattamenti terapeutici.

L'aterosclerosi è un processo ad eziologia complessa che coinvolge in varia misura differenti fattori e tipi cellulari. Ross R. in New Eng. J. Med., 314, 488-495, (1986) ipotizza che i danni endoteliali, instaurati per esposizione a diversi fattori di rischio, rappresentino l'evento preminente nella genesi dell'ateroma ed in Amer. J. Pathol., 143, 987-1001, (1993) individua negli elevati tassi sierici di lipidi e colesterolo che contraddistinguono le iperlipidemie e che spesso complicano le patologie diabetiche una causa importante della induzione di tale danno endoteliale e della progressione e complicazione della placca

ateromasica. Gli interventi farmacologici mirati alla diminuzione dei livelli plasmatici di colesterolo e lipoproteine a bassa densità (LDL) si sono dimostrati efficaci nella prevenzione delle patologie vascolari coronariche e nel trattamento di placche ateromasiche, come riportato da Steinberg D. in J.A.M.A., 253, 2080-2086, (1985) e in Atherosclerosis, 3, 283-301, (1983). Il rischio aterogenico associato alle LDL appare non solo legato alla loro concentrazione plasmatica ma anche alle loro caratteristiche qualitative; le possibili modificazioni della struttura e composizione delle LDL nel plasma o nella parete arteriosa possono infatti rendere queste macromolecole più aterogene, ossia più idonee ad innescare e stimolare la formazione della placca ateromasica, come riportato da Steinberg D. in New Engl. J. Med., 320, 915-924, (1989). Tra le modificazioni che le LDL possono subire *in vivo* particolare importanza assumono i processi ossidativi che si verificano per azione di agenti ossidanti presenti nel plasma o nelle cellule endoteliali della parete arteriosa. Parecchi esperimenti *in vitro* ed *in vivo*, insieme ai risultati di indagini epidemiologiche, supportano l'ipotesi che questo meccanismo rappresenti un evento cruciale nello sviluppo dell'aterosclerosi, come riportato da Esterbauer H. et al. in Brit. Med. Bull., 49, 566-576, (1993).

Steinberg D. in New Engl. J. Med., 320, 915-924, (1989) dimostra infatti la presenza di anticorpi anti-OX-LDL e di OX-LDL, lipoproteine a bassa densità ossidate, nelle lesioni ateromasiche di pazienti con aterosclerosi avanzata. Witztum J.L. e Steinberg D. in J. Clin. Invest., 88, 1785-1792, (1991) riportano inoltre che le OX-LDL sono tossiche nei confronti delle cellule endoteliali e presentano un'attività proinfiammatoria nei confronti di monociti e linfociti e un'aumentata suscettibilità alla captazione da parte dei macrofagi e delle cellule muscolari lisce con formazione di cellule schiumose (foam cells). Tali proprietà possono rivestire un ruolo importante nei processi di formazione e progressione della lesione ateromasica, come riportato da Ross R. in Nature, 362, 801-809, (1993).

Le LDL sono particelle ricche non solo di colesterolo ma anche di acidi grassi poliinsaturi, sigla PUFA, altamente suscettibili alla perossidazione dalla quale risultano protetti per la presenza di numerosi antiossidanti endogeni quali tocoferoli, caroteni, licopene e ubiquinolo-10.

L'ossidazione delle LDL è una reazione a catena di perossidazione lipidica guidata da radicali liberi capaci di convertire rapidamente i PUFA in idroperossidi lipidici (fase di propagazione).

Gli antiossidanti endogeni competono con la catena di propagazione mediante un efficace "scavenging" dei radicali perossilici e la concentrazione di idroperossidi aumenta solo quando gli antiossidanti endogeni sono esauriti (fase di latenza).

Le specie reattive dell'ossigeno che si formano durante il processo di ossidazione insieme alle aldeidi monoinsature che derivano dalla degradazione degli idroperossidi, principalmente malondialdeide (MDA) e 4-idrossinonenale, inducono importanti modificazioni nella struttura primaria della principale apoproteina delle LDL, l'apolipoproteina B-100 (apo B-100). Tale modificazione, favorendo l'assorbimento delle LDL da parte dei macrofagi, causa l'accumulo intracellulare di esteri del colesterolo e la formazione di cellule schiumose con conseguente sviluppo della placca aterosclerotica, come riportato da Vanderyse L. et al. in Atherosclerosis, 97, 187-199, (1992).

Steinberg D. et al. in Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84, 7725-7729, (1987) indicano come composti ad azione antiossidante nei confronti delle LDL possano rivestire un ruolo come farmaci anti-aterosclerotici. L'efficacia di un trattamento mediante sostanze ad azione antiossidante è basata su osservazioni limitate a modelli in vitro ed animali e sull'utilizzo in vivo della vitamina E. Le potenzialità aterogene delle LDL sono infatti notevolmente ridotte in vitro se le LDL sono incubate in presenza di antiossidanti, come ad esempio il probucolo

o la vitamina E, come riportato da Esterbauer H. et al., in Amer. J. Clin. Nutr., 53, 314S-321S, (1991).

Studi su conigli Watanabe, affetti da ipercolesterolemia familiare e con elevati livelli di LDL, hanno dimostrato che il trattamento con probucolo riduce le lesioni ateromasiche anche se non modifica sostanzialmente i livelli plasmatici di LDL, come riportato da Kita T. et al., in Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84, 5928-5931, (1987).

Studi prospettici su larga scala forniscono evidenza di un'associazione tra l'assunzione di cospicue quantità di Vitamina E e la diminuzione del rischio di patologie vascolari, sia negli uomini che nelle donne, come riportato da E.B. Rimm et al. in New Engl. J. Med., 328, 1450-1456, (1993) e da M.J. Stampfer et al. in New Engl. J. Med., 328, 1444-1449, (1993). Attualmente la terapia dei disordini del metabolismo lipidico, come la ipercolesterolemia familiare eterozigote, l'iperlipidemia familiare combinata, la dis- β -lipoproteinemia, l'ipertrigliceridemia familiare e l'ipercolesterolemia poligenica, che sono concause rilevanti dell'aterosclerosi, si basa sull'impiego di farmaci ad attività ipolipidemica come i fibrati (ad esempio Gemfibrozil), l'acido nicotinico, le resine sequestranti gli acidi biliari e gli inibitori dell'enzima HMGCoA reduttasi. L'effetto metabolico di questi farmaci è quello di ridurre la concentrazione plasmatica del colesterolo (LDL) ed in parte dei trigliceridi (VLDL-LDL) attraverso due meccanismi: un aumento della rimozione-recettore mediata delle LDL, oppure una diminuzione della sintesi delle VLDL-LDL. Generalmente le maggiori riduzioni delle LDL plasmatiche sono state ottenute con le resine sequestranti gli acidi biliari e con le statine, inibitori dell'HMGCoA reduttasi, mentre i livelli plasmatici di trigliceridi sono maggiormente influenzati dal trattamento con acido nicotinico e fibrati, come riportato da Betteridge, D.J. in Current Opinion in Lipidology, 4, 49-55, (1993). Pertanto, sulla base delle considerazioni sopra riportate, è ragionevole ipotizzare che molecole con attività sia ipolipemizzante che antiossidante rappresentino uno sviluppo terapeutico

5.
5.

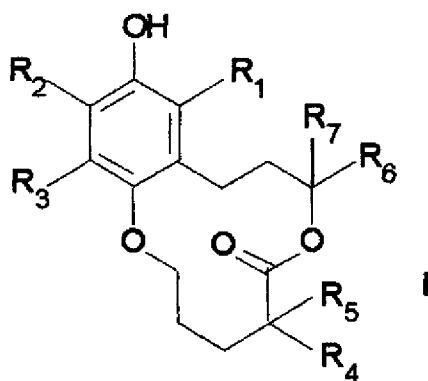
importante nel trattamento dei disordini del metabolismo lipoproteico e nella prevenzione dell'aterosclerosi.

I derivati oggetto della presente invenzione sono dotati di proprietà antiossidanti ed ipolipidemiche, in particolare presentano la capacità di prevenire e/o ritardare la modificazione ossidativa delle LDL, cioè competono con la catena di propagazione della perossidazione lipidica mediante un efficace "scavenging" dei radicali perossilici.

Le modificazioni per via ossidativa delle lipoproteine a bassa densità (LDL) rappresentano, come si è visto, un evento cruciale nella patogenesi dell'aterosclerosi e pertanto i derivati oggetto della presente invenzione possono trovare utile applicazione terapeutica nel trattamento dell'aterosclerosi e nella prevenzione di numerose patologie vascolari quali cardiopatie ischemiche (angina pectoris ed infarto del miocardio), trombosi cerebrale e arteriopatie periferiche.

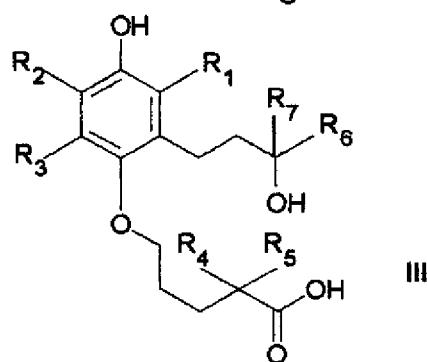
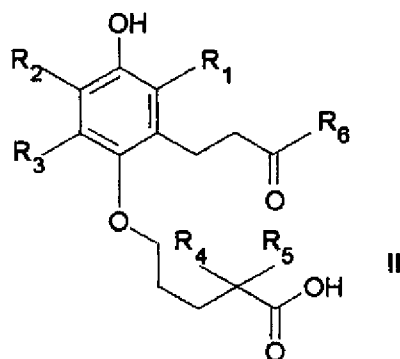
DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a lattoni di formula



e ai loro sali farmacologicamente accettabili utili nella terapia delle patologie aterosclerotiche e vascolari ad esse collegate, come cardiopatie ischemiche, trombosi cerebrale ed arteriopatie periferiche.

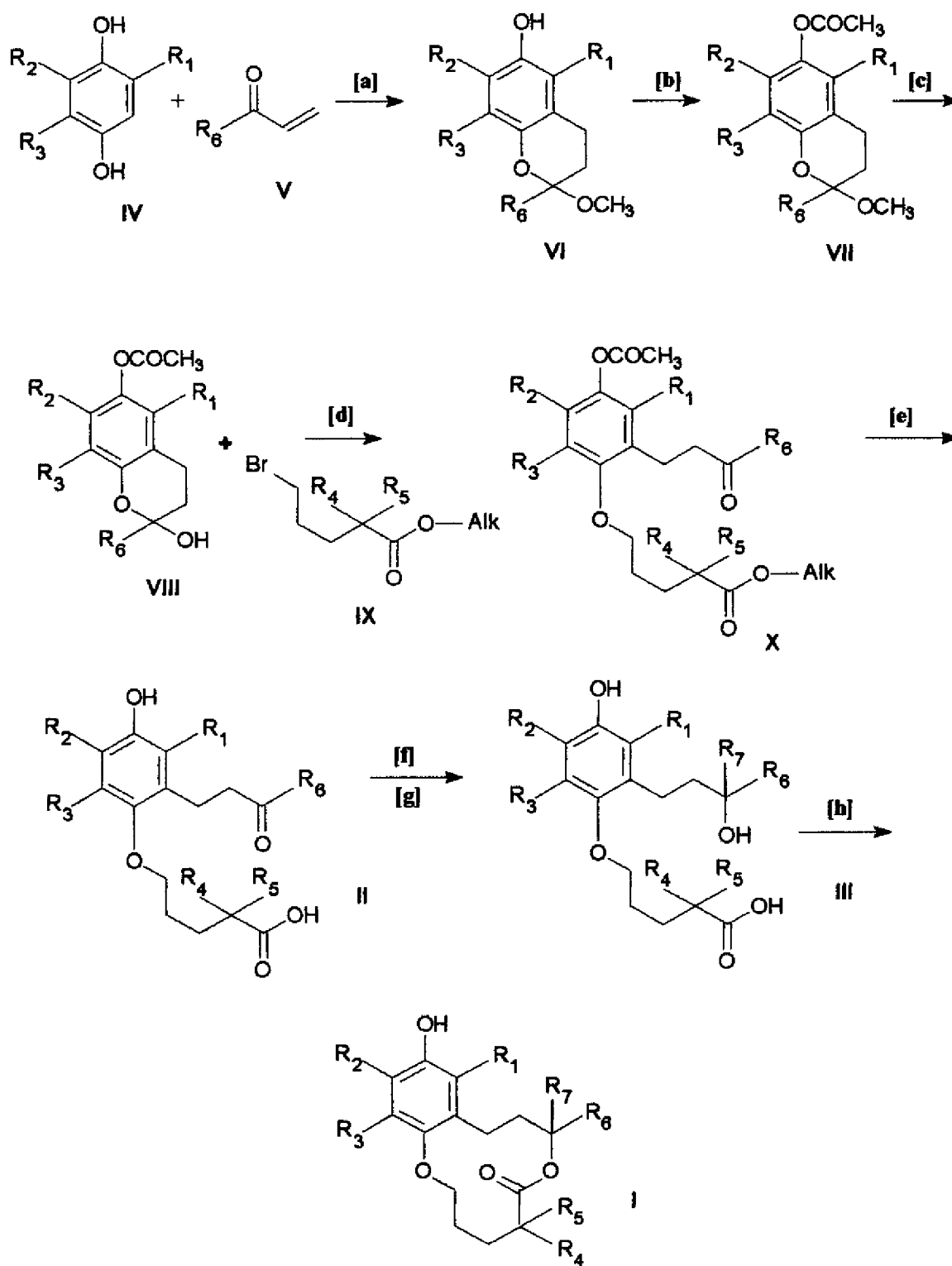
Ulteriore oggetto dell'invenzione è costituito dai composti di formula II e III utilizzati nella sintesi dei lattoni di formula I



g.g.

Nei composti delle formule I, II e III R_1 , R_2 , R_3 ed R_6 rappresentano un gruppo (C₁-C₃)-alchilico ed R_4 , R_5 ed R_7 , indipendentemente, rappresentano un atomo di idrogeno o un gruppo (C₁-C₃)-alchilico. I composti preferiti nell'attuazione della presente invenzione sono quelli in cui R_1 , R_2 ed R_3 rappresentano un gruppo metilico, R_4 , R_5 ed R_7 , indipendentemente, rappresentano un atomo di idrogeno o un gruppo metilico ed R_6 rappresenta un gruppo metilico o etilico. I lattoni di formula I ed i corrispondenti intermedi di formula II e III vengono ottenuti attraverso il processo riportato nel sottostante schema 1.

Scheme 1



9.5

I 3,4-diidro-2H-1-benzopirani di formula **VI** vengono ottenuti mettendo a reagire, in un alcool contenente da 1 a 3 atomi di carbonio, in atmosfera di gas inerte e a una temperatura compresa tra -5°C e 0°C, da 2 a 3 equivalenti molari di un alchilvinilchetone di formula **V** con un equivalente molare di un idrochinone di formula **IV** in presenza di da 1,2 a 1,4 equivalenti molari di trimetilortoformiato e di quantità catalitiche di acido solforico concentrato e continuando la reazione, a temperatura ambiente, per un periodo di tempo compreso tra 16 e 24 ore. I prodotti di formula **VI** vengono recuperati per evaporazione del solvente e successiva eventuale cristallizzazione da un solvente o miscela di solventi organici compresi tra alcoli, eteri ed idrocarburi. Per trattamento di un equivalente molare dei prodotti di formula **VI** con da 4 a 6 equivalenti molari di anidride acetica in un solvente organico a carattere basico, come la piridina, ad una temperatura compresa tra 20°C e 30°C e per un periodo di tempo compreso tra 1 e 24 ore, si ottengono gli esteri di formula **VII** che possono essere purificati per cromatografia su gel di silice e cristallizzati in doppio strato a bassa temperatura. La deprotezione selettiva dell'ossidril in posizione 2 dell'anello piranico degli esteri di formula **VII** viene ottenuta aggiungendo acido cloridrico concentrato, per un periodo di tempo compreso tra 2 e 8 ore ed a una temperatura compresa tra 40°C e 60°C, in una miscela acetone-acqua in rapporto compreso tra 1:1 e 5:1 preferibilmente 1,25:1. I prodotti di formula **VIII** vengono recuperati per cristallizzazione da miscele di solventi organici, preferibilmente acqua-acetone, a bassa temperatura. I prodotti di formula **X** vengono ottenuti per reazione di un equivalente molare di un prodotto di formula **VIII** con da 1 a 2 equivalenti molari di sodio idruro e da 1 a 2 equivalenti molari di un 5-bromopentanoato di alchile di formula **IX**, in atmosfera di gas inerte ed in un solvente costituito dalla miscela di un idrocarburo aromatico, preferibilmente benzene o toluene, con un solvente polare, preferibilmente dimetilsolfossido, ad una temperatura compresa tra 60°C e 70°C, per un periodo di tempo compreso tra 2 e 24 ore. I prodotti vengono purificati

5.5

e recuperati per cromatografia su gel di silice. I prodotti di formula **X** vengono sottoposti ad idrolisi alcalina, con una base inorganica scelta tra idrossido di potassio ed idrossido di sodio, in un alcool contenente da 1 a 3 atomi di carbonio, ad una temperatura compresa tra 20°C e la temperatura di ebollizione della miscela di reazione per un periodo di tempo compreso tra 2 e 24 ore, ottenendo i composti di formula **II**. I composti di formula **III**, in cui R₇ rappresenta un atomo di idrogeno, vengono ottenuti per riduzione dei composti di formula **II** con da 2 a 5 equivalenti molari di sodio boroidruro in un alcool contenente da 1 a 3 atomi di carbonio, ad una temperatura compresa tra 25°C e 50°C per un periodo di tempo compreso tra 10 minuti e 6 ore. I prodotti vengono recuperati per estrazione con un opportuno solvente organico ed evaporazione dello stesso, oppure per successiva cristallizzazione da miscele di idrocarburi a catena lineare o ciclici e solventi organici clorurati. Quando R₇ rappresenta un gruppo (C₁-C₃)-alchilico, i composti di formula **III** sono sintetizzati per reazione dei composti di formula **II** con un reagente di Grignard, ad una temperatura compresa tra 20°C e la temperatura di ebollizione della miscela di reazione, in un solvente etero anidro, preferibilmente etere etilico anidro, per un tempo compreso tra 1 e 3 ore. Dopo acidificazione con una soluzione acquosa di acido cloridrico la soluzione etera viene separata, il prodotto grezzo viene isolato per evaporazione del solvente e purificato per filtrazione su gel di silice con opportune miscele di solventi organici. I lattoni di formula **I** sono ottenuti per ciclizzazione dei composti di formula **III** che inizialmente vengono fatti reagire in un solvente organico, preferibilmente acetonitrile, con da 2 a 2,2 equivalenti molari di 2,2'-dipiridildisolfuro e da 2 a 2,2 equivalenti molari di trifenilfosfina e successivamente con da 2 a 3 equivalenti molari di perclorato di argento idrato in un idrocarburo aromatico, preferibilmente p-xilene. Dopo un periodo di tempo compreso tra 12 e 24 ore, ad una temperatura compresa tra 25°C e la temperatura di ebollizione della miscela di reazione, i lattoni di formula **I** vengono recuperati per evaporazione del solvente e

5.
5.

filtrazione cromatografica su gel di silice con opportuni solventi e purificati, se necessario, per successiva cristallizzazione. I sali farmacologicamente accettabili dei lattoni di formula I vengono ottenuti mescolando a freddo quantità equimolari od in leggero eccesso (1,1-1,2 equivalenti) della base opportuna disciolta in un solvente scelto tra alcoli contenenti da 1 a 6 atomi di carbonio, eteri ciclici o aciclici e loro miscele con i lattoni di formula I, disciolti in miscele degli stessi solventi, ad una temperatura compresa tra 0°C e la temperatura ambiente e filtrando il sale precipitato.

Sali di composti organici, come aminoacidi, in particolare alanina, lisina, arginina, asparagina e glicina, e trometanololo, sono preferiti nell'attuazione della presente invenzione.

La determinazione del punto di fusione è stata effettuata mediante uno strumento per punto di fusione Electrothermal a capillare, senza apportare alcuna correzione. Lo spettro I.R. è stato ottenuto mediante spettrofotometro Perkin-Elmer mod. 983/G generalmente, quando non diversamente specificato, preparando il campione in bromuro di potassio e registrando lo spettro tra 4000 e 600 nm. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ è stato registrato a temperatura ambiente con uno spettrometro Varian Gemini a 200 MHz, nei solventi riportati, utilizzando come standard interno il tetrametilsilano; le risonanze dei segnali sono state espresse in p.p.m.. Lo spettro $^{13}\text{C-NMR}$ è stato effettuato a 50,3 MHz con uno spettrometro Varian Gemini 200 utilizzando come standard interno il tetrametilsilano e come solventi quelli descritti nella parte sperimentale. Lo spettro di massa è stato registrato utilizzando uno spettrometro di massa VG 7070E, a 70 eV di voltaggio di ionizzazione e con un voltaggio di accelerazione di 6 Kvolt. Le cromatografie su gel di silice sono state effettuate usando gel di silice 60 F254 (230-400 mesh - Merck) con gli eluenti riportati negli esempi, secondo la metodica descritta da Clark Still W. et al. in J. Org. Chem., 43, 2923, (1978). L'attività farmacologica dei lattoni di formula I oggetto della presente invenzione è stata determinata attraverso una serie di tests in vitro considerati predittivi delle proprietà

9.5

antiossidanti e ipolipemiche. L'attività antiossidante è stata valutata attraverso la capacità di alcuni lattoni di formula I di prevenire e/o ritardare la modificazione ossidativa delle lipoproteine (LDL), provocata con metodo chimico mediante incubazione di LDL native con ioni rameici, secondo il metodo riportato da Steinbrecher U.P. in J. Biol. Chem., 262, 3603-3608, (1987). L'approccio sperimentale utilizzato è rappresentato dalla valutazione del grado di ossidazione delle LDL attraverso il monitoraggio della concentrazione di aldeidi originate dalla degradazione dei perossidi lipidici e dall'osservazione delle modificazioni dell'apolipoproteina B-100. L'attività antiossidante dei lattoni è stata espressa in termini di durata della fase di latenza che rappresenta un parametro della resistenza delle LDL all'ossidazione. Le LDL sono state isolate da plasma umano ottenuto da sangue raccolto, in presenza di EDTA, da volontari sani a digiuno da 8 ore secondo il metodo descritto da Havel H. in J. Clin. Invest., 34, 1345-1353, (1955). La soluzione, dializzata in tubi da dialisi Visking-Serva a 4°C per 72 ore in tampone fosfato (PBS) addizionato di EDTA (0,24 mM), è stata filtrata attraverso membrana a porosità 0,45 μ (Filtri Millex HV) e la concentrazione proteica è stata determinata in accordo con il metodo descritto da Lowry O. et al. in J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951). La soluzione è stata diluita con PBS-EDTA ad una concentrazione di 500 μ g proteina/ml e le LDL ottenute sono state incubate a 42°C per 45 minuti in presenza dei lattoni solubilizzati in etanolo (1,7 μ l /ml LDL). Al termine dell'incubazione le soluzioni sono state poste in ghiaccio per 45 minuti e dializzate a 4°C per 36 ore in PBS. L'ossidazione delle LDL è stata eseguita con solfato rameico 5 μ M a 37°C ed interrotta ai tempi sperimentali mediante raffreddamento a 4°C ed aggiunta di EDTA 0,24 mM. Durante la procedura sperimentale le soluzioni di LDL sono state mantenute a 4°C ed al riparo dalla luce. Il grado di ossidazione delle LDL è stato monitorato mediante determinazione spettrofotometrica (λ = 535 nm - spettrofotometro Perkin Elmer mod. Lambda 1) del contenuto delle aldeidi di degradazione reattive all'acido tiobarbiturico

5.5

ed impiegando malondialdeide (MDA) come standard, secondo il metodo TBARS, descritto in *Methods in Enzymology*, vol.52, (1978). I risultati delle letture spettrofotometriche, espresse come ng di MDA/mg proteina LDL sono stati riportati in funzione del tempo di ossidazione, ottenendo un grafico ad andamento sigmoidale (Figure 1a-c). L'intervallo di latenza è stato determinato come l'intercetta sull'asse delle ascisse della tangente alla curva nel punto di flesso. I risultati relativi ai lattoni descritti negli esempi 3 e 6 della presente invenzione sono riportati in Tabella 1 e risulta particolarmente interessante notare come essi presentino un'attività antiossidante decisamente superiore a quella del probucolo; infatti si osserva un allungamento paragonabile del tempo di latenza ad una concentrazione 10 volte inferiore a quella del probucolo.

Tabella 1
Tempo di latenza

Composto	Tempi di latenza (minuti)		
	1 μ M	5 μ M	10 μ M
Probucolo	---	---	82
Lattone (Esempio 3)	73	120	>180
Lattone (Esempio 6)	95	>180	>180

L'inibizione del processo ossidativo è stata inoltre studiata qualitativamente attraverso la valutazione della modificazione della carica negativa superficiale dell'apolipoproteina B-100 per analisi elettroforetica su gel di agarosio, utilizzando la metodica riportata nel kit "Titan gel Multi-slot lipo-17 electrophoresis system" (Cat. No. 3095), prodotto dalla Helena Laboratories.

La cella elettroforetica utilizzata è stata la Bio-Phoresis Horizontal Electrophoresis Cell Bio-Rad (Cat. No. 1702900). La modifica della carica negativa superficiale dell'apolipoproteina B-100, generata dall'ossidazione delle LDL, provoca un aumento della mobilità elettroforetica anionica. Quindi la valutazione della variazione di questo dato elettroforetico, mobilità in presenza di sostanze antiossidanti, rappresenta una misura indiretta delle capacità antiossidanti dei composti rivendicati come riportato da Vanderyse L. et al. in Atherosclerosis, 97, 187-199, (1992). La valutazione è stata effettuata ai tempi 0, 60, 90, 120, 150, 180, 360 minuti allo scopo di massimizzare le differenze tra i composti ed i controlli. La migrazione delle LDL native viene assunta come riferimento uguale a 0 (nessuna migrazione elettroforetica), mentre la migrazione della banda delle LDL rame-ossidate al tempo di 360 minuti, in presenza di solo etanolo, viene assunta come riferimento uguale a 100. In tabella 2 sono riportati i dati di mobilità elettroforetica relativa (REM), espressa come variazione percentuale, ai tempi di 180 e 360 minuti, relativamente ai lattoni degli esempi 3 e 6 ed al probucolo, alla concentrazione 10 μ M, usando l'etanolo come controllo. I dati dimostrano che i lattoni, prevenendo le modificazioni ossidative delle LDL, ne riducono la mobilità elettroforetica in maniera nettamente più efficace rispetto al probucolo.

h.h.

Tabella 2

Mobilità elettroforetica su gel di agarosio

Composto	REM (%) a 180'	REM (%) a 360'
Etanolo	60	100
Probucolo	40	100
Esempio 3	15	30
Esempio 6	15	30

L'inibizione del processo ossidativo è stata valutata anche mediante lo studio della frammentazione dell'apolipoproteina B-100 attraverso l'analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE), secondo il metodo descritto da Laemmli U.K., in Nature, 227, 680, (1970). La valutazione quantitativa della scomparsa dell'apolipoproteina B-100 è stata effettuata mediante misura densitometrica unidimensionale dell'assorbanza a $\lambda = 633$ nm, su una lastra elettroforetica di 13,5 cm di lunghezza, dopo colorazione con Coomassie Brilliant Blue. I reagenti utilizzati per l'allestimento e la colorazione dei gels, lo standard di riferimento (SDS-PAGE standards Broad Range - Cat.No. 161-0317), il gradientometro (gradient former Bio-Rad Mod. 385) e la cella elettroforetica (Protean II) sono prodotti Bio-Rad; l'alimentatore è un LKB Pharmacia Mod. 2197, il densitometro è un Pharmacia LKB mod. 2222-020 Ultrascan XL con integratori LKB 2220 e LKB 2190 GelScan Software Package. Le modificazioni ossidative delle LDL si accompagnano a degradazione dell'apolipoproteina B-100 in una miscela eterogenea di frammenti a più basso peso molecolare; pertanto la valutazione di tale degradazione rappresenta un'indicazione predittiva dell'efficacia antiossidante dei composti rivendicati come riportato da Fong L.G. et al. in J. Lipid Res., 28, 1466-1477, (1987). In tabella 3 sono riportati i valori densitometrici relativi alle aree dei picchi dell'apolipoproteina B-100, espressi come unità di assorbanza per millimetro, per i lattoni degli esempi 3 e 6 e per il probucolo, come riferimento, tutti utilizzati alla concentrazione di 10 μ M.

5.
5.

Tabella 3

Modificazioni ossidative su SDS-PAGE

Composto	Area (AU/mm)						
	0 minuti	60 minuti	90 minuti	120 minuti	150 minuti	180 minuti	360 minuti
Etanolo	2,3	1,7	1,5	0,5	0,4	0,3	0,2
Probucolo	2,7	1,8	1,6	0,9	0,9	0,6	0,3
Esempio 3	2,2	2,0	1,9	1,6	1,5	1,5	1,5
Esempio 6	2,5	2,3	2,1	2,0	1,7	1,6	1,6

I dati dimostrano come i composti rivendicati prevengano la scomparsa dell'apolipoproteina B-100 in maniera più efficace rispetto al probucolo, come si evince dal mantenimento pressochè costante dell'area dei picchi dell'apolipoproteina B-100 ai tempi considerati.

L'attività ipolipemizzante di alcuni lattoni di formula generale I è stata valutata *in vitro* mediante l'analisi della loro influenza sulla sintesi dei lipidi cellulari quali colesterolo, acidi grassi, trigliceridi, fosfolipidi ed esteri del colesterolo, descritta da Barnhard J.W. in Amer. J. Cardiol., 62, 52B-56B, (1988).

La sintesi dei lipidi è stata studiata incubando cellule derivate da un epatocarcinoma umano (HepG2 - American Type Culture Collection) in presenza di ^{14}C -acetato (Amersham) e misurando l'incorporazione del precursore radioattivo nelle principali classi lipidiche mediante separazione cromatografica su gel di silice (Merck F254), secondo la metodica descritta da Skipski V.P. et al. in Biochem. Biophys. Acta, 106, 386-396, (1965) e dosaggio scintillografico con scintillatore β -counter Beckman, secondo la metodica riportata da Gherardi E. e Calandra S. in Lipids, 15, 108-112, (1980).

S.S.

I dati riportati nelle tabelle 4 e 5 si riferiscono all'incorporazione di ^{14}C -acetato nelle varie classi lipidiche, espressa come radioattività in colpi per minuto (cpm) per piastra di coltura, per alcuni lattoni, in confronto al probucolo e al gemfibrozil, utilizzati come controlli positivi ed al solvente etanolo, utilizzato come controllo negativo.

Tabella 4
Incorporazione di ^{14}C -acetato nelle classi lipidiche

Composto		Colesterolo (cpm)	Esteri del Colesterolo (cpm)
Sol. Fisiologica		31613	4066
Etanolo		26517 (-16%)	1467 (-64%)
Probucolo	1 μM	14360 (-55%)	1887 (-54%)
	10 μM	11389 (-64%)	2635 (-35%)
Gemfibrozil	1 μM	20820 (-34%)	968 (-76%)
	10 μM	25306 (-20%)	1156 (-71%)
Esempio 3	1 μM	23364 (-26%)	1347 (-67%)
	10 μM	19034 (-40%)	1107 (-73%)
Esempio 6	1 μM	23597 (-25%)	1098 (-73%)
	10 μM	17458 (-45%)	1148 (-72%)

I dati dimostrano come i lattoni degli esempi 3 e 6 interferiscano con la sintesi del colesterolo in maniera paragonabile a quella del gemfibrozil ed inferiore a quella del probucolo. Relativamente alla sintesi degli esteridi del colesterolo, invece, i due lattoni mostrano un'attività superiore (60-75%) a quella del probucolo (circa 35-45%) e del tutto paragonabile a quella del gemfibrozil (70-75%). I dati relativi alle altre classi lipidiche

mettono in risalto come i due lattoni mostrino praticamente la medesima influenza sulla sintesi degli acidi grassi e dei fosfolipidi rispetto sia al probucolo che al gemfibrozil mentre risulta pressochè nulla l'influenza sulla sintesi dei trigliceridi sulla quale solo il gemfibrozil mostra un'apprezzabile attività.

Tabella 5
Incorporazione di ^{14}C -acetato nelle classi lipidiche

Composto		Trigliceridi (cpm)	Acidi grassi (cpm)	Fosfolipidi (cpm)
Sol. Fisiologica		108549	670	249863
Etanolo		116544 (+7%)	468 (-30%)	190843 (-24%)
Probucolo	1 μM	100202 (-8%)	429 (-36%)	173426 (-31%)
	10 μM	105097 (-3%)	394 (-42%)	173329 (-31%)
Gemfibrozil	1 μM	84593 (-22%)	299 (-55%)	132598 (-47%)
	10 μM	96533 (-11%)	376 (-44%)	164252 (-34%)
Esempio 3	1 μM	109681 (-1%)	473 (-29%)	181053 (-27%)
	10 μM	104271 (-4%)	368 (-45%)	195274 (-22%)
Esempio 6	1 μM	107497 (-1%)	386 (-42%)	160997 (-35%)
	10 μM	110154 (+1%)	332 (-50%)	177323 (-29%)

5.5

Le percentuali in parentesi esprimono la diminuzione del ^{14}C -acetato nelle varie classi lipidiche riferita al controllo, cioè alla soluzione fisiologica. La tossicità dei lattoni descritti negli esempi 3 e 6 è stata valutata *in vitro* mediante l'effetto citotossico su cellule HepG2, secondo la metodica riportata da Cingi R. et al. in *Toxicol. in vitro*, 5, 119-125, (1991). Le cellule a confluenza sono state esposte ai prodotti testati per 24 ore; al termine

dell'incubazione il monostrato è stato solubilizzato ed è stata misurata la densità ottica del lisato a λ 260 nm. Il valore dell'assorbanza è funzione diretta della quantità di macromolecole presenti e quindi indirettamente del numero delle cellule. In Tabella 6 sono riportati i valori di DL₅₀, espressione della concentrazione dei composti rivendicati, in soluzione sia di etanolo che di dimetilsolfossido, in grado di produrre una riduzione del 50% delle macromolecole totali.

Tabella 6

Tossicità *in vitro* su cellule HepG2 (DL₅₀)

Composto	Dimetilsolfossido	Etanolo
Probucolo	---	$>10^{-3}$
Gemfibrozil	$>10^{-4}$	---
Esempio 3	$2,5 \cdot 10^{-5} + 5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5} + 5 \cdot 10^{-5}$
Esempio 6	$5 \cdot 10^{-5} + 7,5 \cdot 10^{-5}$	$>10^{-4}$

g.g.

I dati dimostrano come i due lattoni esaminati in questo test mostrino una citotossicità nettamente inferiore a quelle di probucolo e gemfibrozil.

Gli esempi di seguito riportati debbono essere considerati come una illustrazione della presente invenzione e non come una limitazione della medesima.

ESEMPIO 1

Acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

a) 5-[4-Acetossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]-2,2-dimetilpentanoato di isopropile

Una soluzione, contenente 14,0 g (0,053 moli) di 6-acetossi-3,4-diidro-2-idrossi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopirano in 240 ml di benzene viene addizionata, per lento

gocciolamento e sotto atmosfera di azoto, ad una sospensione contenente 1,82 g (0,074 moli) di sodio idruro al 97% in 100 ml di dimetilsolfossido. Dopo 40 minuti la soluzione viene aggiunta, per gocciolamento, ad una soluzione contenente 13,3 g (0,052 moli) di 2,2-dimetil-5-bromopentanoato di isopropile in 60 ml di benzene e la miscela viene fatta reagire per 19 ore a 65°C. La miscela di reazione viene quindi diluita con etere etilico ed acqua, acidificata a pH 5 con una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10% ed il prodotto viene recuperato puro per cromatografia su colonna di gel di silice con eluente cloruro di metilene-etere etilico in rapporto 90:10. Dopo evaporazione del solvente si ottiene, con una resa del 58% (13,03 g), un olio avente le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1,20 (6H, s, CH_3 geminali); 1,23 (6H, d, $J = 6,2$ Hz, 2 CH_3 dell'isopropile); 1,71 (4H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}-$); 2,02 (3H, s, CH_3 -arom.); 2,04 (3H, s, CH_3 -arom.); 2,15 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-CO}-$); 2,16 (3H, s, CH_3 -arom.); 2,34 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}-$); 2,54-2,68 (2H, m, $-\text{CH}_2-$); 2,78-2,90 (2H, m, $-\text{CH}_2-$); 3,60-3,70 (2H, m, CH_2O); 5,00 (1H, ept, $J = 6,2$ Hz, CH isopropile).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 12,6 (CH_3 -arom.); 13,1 (CH_3 -arom.); 13,2 (CH_3 -arom.); 20,6 ($\text{CH}_3\text{COO}-$); 21,7 ($-\text{COCH}_3$); 21,9 ($\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 25,2 ($(\text{CH}_3)_2\text{CCO}$); 26,1 (CH_2); 29,9 (CH_2); 37,1 (CH_2); 42,1 ($\text{CH}_2\text{CCO}-$); 44,0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 67,6 (CH isopropile); 73,8 (OCH_2); 126,8; 128,2; 128,7; 131,3; 144,9; 153,9 (6 C arom.); 169,6 ($\text{CH}_3\text{COO}-$); 177,7 ($\text{CCOO}-$); 208,6 ($-\text{CO}-$).

IR (film) ν (cm^{-1}): 1757, 1719 (C=O).

MS (m/z): 434 (M^+), 222, 171, 129, 43.

b) Acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

Una soluzione contenente 12,8 g (0,029 moli) di 5-[4-acetossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]-2,2-dimetilpentanoato di isopropile in 90 ml di etanolo al 95% viene addizionata di 90 ml di etanolo al 95% contenenti 14,9 g (0,264 moli) di idrossido di

potassio. La miscela di reazione viene mantenuta per 22 ore a 90° C e quindi viene diluita per aggiunta di etere etilico ed acqua, acidificata a pH 5 con una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10% ed il prodotto viene estratto con etere etilico. Il prodotto grezzo ottenuto per evaporazione del solvente viene purificato per cromatografia su colonna di gel di silice con eluente cloruro di metilene-etere etilico 60:40. Si ottengono, con resa del 55%, g 5,58 di prodotto che presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 106°-108°C

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1,25 (6H, s, 2 CH₃ geminali); 1,72-1,88 (4H, m, CH₂CH₂C); 2,10 (3H, s, CH₃-arom.); 2,18 (9H, s, 2 CH₃-arom. e CH₃CO); 2,56-2,70 (2H, m, CH₂); 2,80-3,00 (2H, m, CH₂); 3,60-3,70 (2H, m, CH₂O)

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3363 (OH), 1737 (C=O), 1702 (C=O).

MS (m/z): 350 (M⁺); 222; 164; 43.

ESEMPIO 2

Acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-idrossibutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

Una soluzione contenente 4,2 g (0,012 moli) di acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico in 125 ml di metanolo viene addizionata di 4,9 g (0,129 moli) di sodio boroidruro. Dopo 4 ore a temperatura ambiente la miscela di reazione viene addizionata di etere etilico e di una soluzione acquosa 6M di acido cloridrico ed il prodotto viene recuperato per evaporazione dell'etere etilico. Si ottengono 3,92 g di prodotto, resa del 93%, che presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 44°-46°C

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1,15 (3H, d, J = 6,8Hz, CH₃CH); 1,30 (6H, s, CH₃ geminali); 1,50-1,90 (6H, m, 3 CH₂); 2,10 (3H, s, CH₃-arom.); 2,18 (6H, s, 2 CH₃-arom.); 2,65-2,88 (2H, m, CH₂); 3,52-3,72 (3H, m, CH₂ e OH); 5,48 (2H, s allargato, 2 OH).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3213 (OH), 1702 (C=O).

MS (m/z): 352 (M^+), 224, 206, 164.

ESEMPIO 3

6,6,9,13,15,16-Esametil-14-idrossi-2,8-diossabiciclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one

2,0 Grammi (0,005 moli) di acido 5-[4-idrossi-2-(3-idrossibutil)-3,5,6-trimetilfenossi]-2,2-dimetilpentanoico vengono addizionati, sotto atmosfera di azoto, di 2,5 g (0,011 moli) di 2,2'-dipiridildisolfuro sciolti in 60 ml di acetonitrile anidro e di 3,0 g (0,011 moli) di trifenilfosfina e la risultante miscela viene mantenuta per 4 ore a 25°C. La miscela di reazione viene quindi diluita con 70 ml di p-xilene ed addizionata, per lento gocciolamento, ad una soluzione contenente 2,74 g (0,012 moli) di perclorato di argento idrato in 150 ml di p-xilene precedentemente scaldata all'ebollizione. La miscela di reazione viene mantenuta per 18 ore a riflusso e successivamente il prodotto grezzo viene recuperato per evaporazione del solvente e purificato per cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come eluente etere di petrolio-etere etilico 50:50. Il prodotto puro, 0,77 g con resa del 46%, mostra le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 127°-130°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1,18 (3H, s, CH_3C); 1,22 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, CH_3CH); 1,27 (3H, s, CH_3C); 1,50-1,90 (5H, m, 2 CH_2 e CH_2); 2,12 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,14 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,16 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,35 (1H, m, CH_2); 2,55 (1H, m, CH_2); 3,05 (1H, m, CH_2); 3,65 (2H, m, CH_2O); 4,50 (1H, s, OH); 4,85 (1H, m, CHO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 12,3 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 12,6 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 13,6 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 19,2 (CH_3CH); 21,8 (CH_2); 23,5 (CH_3C); 26,1 (CH_2); 28,6 (CH_2); 36,0 (CH_2); 38,1 (CH_2); 42,7 (C); 69,6 (CH); 73,1 (CH_2); 120,0; 121,2; 128,1; 131,5; 148,5; 150,2 (6 C arom.); 177,8 (COO)

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3452 (OH), 1709 (C=O).
MS (m/z): 334 (M^+), 206, 164, 119, 91.

ESEMPIO 4

Acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

a) 3,4-Diidro-2-etil-6-idrossi-2-metossi-5,7,8-trimetil-2H-1-benzopirano

Una soluzione contenente 30,0 g (0,198 moli) di trimetilidrochinone in 150 ml di metanolo viene addizionata di 30 ml (0,274 moli) di trimetilortoformiato, raffreddata sotto atmosfera di azoto a 0°C ed addizionata di 0,6 ml di acido solforico concentrato. Sulla soluzione vengono gocciolati, in 60 minuti e mantenendo la temperatura costante, 39 ml (0,396 moli) di etilvinilchetone. La miscela di reazione viene mantenuta a temperatura ambiente per 20 ore ed il prodotto grezzo viene recuperato per evaporazione a pressione ridotta del solvente e purificato per cromatografia su colonna di gel di silice con eluente etere di petrolio-etere etilico 70:30. Per successiva cristallizzazione in doppio strato da etere etilico e n-esano si ottengono, con resa dell'80%, 39,6 g di prodotto puro che presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 97°-99°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1,0 (3H, t, $J=7,3$ Hz, $-\text{CCH}_2\text{CH}_3$); 1,57-2,10 (4H, m, 2 CH_2); 2,13 (3H, s, CH_3 -arom.); 2,18 (6H, s, 2 CH_3 -arom.); 2,42-2,90 (2H, m, CH_2); 3,20 (3H, s, OCH_3); 4,27 (1H, s, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 8,5 ($-\text{CCH}_2\text{CH}_3$); 11,7 (CH_3 -arom.); 12,1 (CH_3 -arom.); 12,65 (CH_3 -arom.); 20,2 (CH_2); 28,8 ($-(\text{CH}_2)_2-$); 48,9 (OCH_3); 99,7 (C acetalico); 119,2; 119,3; 121,6; 122,7; 144,4; 145,9 (6 C arom.).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3469 (OH).
MS (m/z): 250 (M^+), 164, 221, 189, 87.

b) 6-Acetossi-3,4-diidro-2-etil-2-metossi-5,7,8-trimetil-2H-1-benzopirano

Una soluzione contenente 32,3 g (0,129 moli) di 3,4-diidro-2-etil-6-idrossi-2-metossi-5,7,8-trimetil-2H-1-benzopirano in 37,5 ml (0,465 moli) di piridina viene addizionata per gocciolamento, sotto atmosfera di azoto, di 61,5 ml (0,720 moli) di anidride acetica. La miscela viene lasciata reagire per 1 ora a temperatura ambiente ed il prodotto grezzo viene estratto con cloruro di metilene. La fase organica viene lavata con una soluzione acquosa satura di solfato rameico e successivamente con acqua. Il prodotto, dopo evaporazione del solvente, viene purificato per filtrazione su colonna cromatografica di gel di silice con eluente etere di petrolio-etere etilico in rapporto 70:30. Il prodotto puro viene ottenuto per cristallizzazione in doppio strato da etere etilico e n-esano a -20°C, 32,4 g con resa dell'86% e presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 71°-73°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,95 (3H, t, $J=7,4$ Hz, $-\text{CCH}_2\text{CH}_3$); 1,60-1,90 (2H, m, CH_2); 1,96 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,05 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,11 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 1,92-2,20 (2H, m, CH_2); 2,35 (3H, s, OCOCH_3); 2,49-2,87 (2H, m, CH_2); 3,18 (3H, s, OCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 8,1 ($-\text{CCH}_2\text{CH}_3$); 11,7 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 12,1 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 13,0 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 19,1 (CH_2); 20,6 (OCOCH_3); 28,1 (CH_2); 28,4 (CH_2); 48,5 (OCH_3); 99,6 (C acetalico); 119,2; 122,8; 125,1; 126,8; 141,5; 147,9 (6 C arom.); 169,7 ($-\text{OCOCH}_3$).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1753 (C=O).

MS (m/z): 292 (M^+), 260, 250, 217, 189, 164, 43.

c) 6-Acetossi-3,4-diidro-2-etil-2-idrossi-5,7,8-trimetil-2H-1-benzopirano

A 32,0 g (0,109 moli) di 6-acetossi-3,4-diidro-2-etil-2-metossi-5,7,8-trimetil-2H-1-benzopirano sciolti in 225 ml di una miscela acetone-acqua in rapporto 5:4, vengono

aggiunti, per gocciolamento, 0,88 ml di soluzione acquosa al 37% di acido cloridrico. Dopo aver distillato 120 ml di solvente si lascia raffreddare lentamente a 60°C e si aggiungono 80 ml di acetone. Dopo 4 ore a 55°C la miscela di reazione viene estratta tre volte con cloruro di metilene, per evaporazione del solvente si ottiene il prodotto grezzo che viene purificato su colonna cromatografica di gel di silice con eluente etere di petrolio-etere etilico in rapporto 60:40. Il prodotto puro viene ottenuto per cristallizzazione in doppio strato da etere etilico-n-esano a -20°C, 24,24 g con resa dell'80%, e presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 85°-87°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1,05 (3H, t, $J=7.4\text{Hz}$, CCH_2CH_3); 1,70-1,95 (4H, m, 2 CH_2); 1,99 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,02 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,10 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,32 (3H, s, COCH_3); 2,61 (1H, d, $J=1.9\text{Hz}$, OH); 2.65-2.86 (2H, m, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 8,1 ($-\text{CCH}_2\text{CH}_3$); 12,3 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 12,5 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 13,0 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 20,2 (CH_2); 20,95 (COCH_3); 29,5 (CH_2); 34,6 (CH_2); 97,5 (C emiacetalico); 118,6; 123,4; 125,5; 127,4; 140,9; 148,5 (6 C arom.); 170,1 (OCOCH_3).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3382 (OH), 1729 (C=O).

MS (m/z): 278 (M^+), 236, 164.

d) 5-[4-Acetossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]-2,2-dimetilpentanoato di isopropile.

Una soluzione contenente 20,0 g (0,072 moli) di 6-acetossi-3,4-diidro-2-etil-2-idrossi-5,7,8-trimetil-2H-1-benzopirano in 500 ml di benzene viene addizionata per lento gocciolamento, sotto atmosfera di azoto, ad una sospensione contenente 2,07 g (0,086 moli) di sodio idruro al 97% in 150 ml di dimetilsolfossido. Dopo 40 minuti la soluzione viene aggiunta,

per gocciolamento, ad una soluzione contenente 21,6 g (0,086 moli) di 2,2-dimetil-5-bromopentanoato di isopropile in 100ml di benzene portata a 60° e la miscela viene fatta reagire per 3 ore a 60°C. La sospensione viene infine diluita con etere etilico e acqua, acidificata con una soluzione acquosa al 10% di acido cloridrico ed il prodotto viene recuperato per evaporazione del solvente organico e purificato per cromatografia su colonna di gel di silice con eluente etere di petrolio-etere etilico in rapporto 60:40. Dopo evaporazione del solvente si ottengono 16,6 g, con resa dell' 83%, di un olio avente le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,95 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, COCH_2CH_3); 1,12 (6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,18 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 1,63 (4H, m, CH_2CH_2); 1,91 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 1,98 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,10 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-arom.}$); 2,22 (3H, s, COCH_3); 2,35 (2H, q, $J = 7.4$ Hz, COCH_2CH_3); 2,51 (2H, m, CH_2); 2,80 (2H, m, CH_2); 3,58 (2H, m, CH_2O); 4,90 (1H, ept, $J = 6.5$ Hz, $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 8,5 (COCH_2CH_3); 13,1 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 13,6 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 13,7 ($\text{CH}_3\text{-arom.}$); 21,1 (COCH_3); 22,35 ($\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$); 25,7 ($(\text{CH}_3)_2\text{COO}$); 26,6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 36,5 (CH_2); 37,6 (CH_2); 42,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 43,0 (CH_2); 67,9 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 74,1 (OCH_2); 126,9; 128,3; 128,8; 131,65; 144,9; 154,0 (6 C arom.); 169,7 (CH_3COO); 177,7 (COO); 211,3 (CO).

IR (film) ν (cm^{-1}): 1758 (C=O), 1716 (C=O).

MS (m/z): 448 (M^+), 279, 236, 171, 129, 43.

e) Acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.

Una soluzione contenente 22,6 g (0,40 moli) di idrossido di potassio in 300 ml di etanolo al 95% viene aggiunta, sotto atmosfera di azoto, ad una soluzione contenente 20,0 g (0,045 moli) di 5-[4-acetossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]-2,2-dimetilpentanoato di isopropile in 100 ml di etanolo al 95%. La miscela di reazione viene scaldata all'ebollizione

per 18 ore e quindi viene diluita per aggiunta di etere etilico ed acqua, acidificata a pH 5 con una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10% ed il prodotto estratto con etere etilico. Il prodotto grezzo, ottenuto per evaporazione del solvente, viene purificato per filtrazione su una colonna di gel di silice con eluente etere etilico. Il prodotto puro, 11,1 g con resa del 65%, ottenuto per successiva cristallizzazione da n-esano, mostra le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 108°-110°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1,05 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, COCH_2CH_3); 1,25 (6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,75 (4H, s, 2 CH_2); 2,15 (3H, s, CH_3 -arom.); 2,2 (6H, s, 2 CH_3 -arom.); 2,45 (2H, q, $J = 7,0$ Hz, COCH_2CH_3); 2,6 (2H, m, CH_2); 2,85 (2H, m, CH_2); 3,7 (2H, s, OCH_2); 4,9 (2H, s molto allargato, 2 OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 8,2 (COCH_2CH_3); 12,1 (CH_3 -arom.); 12,6 (CH_3 -arom.); 13,3 (CH_3 -arom.); 22,0 (COCH_2CH_3); 25,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 26,2 (CH_2); 36,2 (CH_2); 37,2 (CH_2); 42,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 43,0 (CH_2); 73,9 (OCH_2); 120,2; 121,6; 128,0; 130,7; 148,6; 149,6 (6 C arom.); 184,3 (COOH); 211,9 (CO).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3499 (OH), 1715 (C=O).

MS (m/z): 364 (M^+), 236, 164, 57.

ESEMPIO 5

Acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-idrossipentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

9,04 Grammi (0,024 moli) di sodio boridruro vengono lentamente addizionati sotto atmosfera di azoto ad una soluzione contenente 8,0 g (0,022 moli) di acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico in 240 ml di metanolo. Dopo 1 ora a temperatura ambiente la miscela di reazione viene diluita con 240 ml di etere etilico, acidificata con una soluzione acquosa 6N di acido cloridrico ed il prodotto estratto con etere

etilico. Il prodotto puro, 8,16 g con una resa del 93 %, ottenuto dopo evaporazione del solvente, mostra le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f.=38°-42 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,9 (3H, t, $J = 8$ Hz, CH_2CH_3); 2,7-2,85 (2H, m, CH_2CH_3); 1,25 (6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 3,3-3,45 (m, 1H, CH); 1,4-1,65 (m, 4H, CH_2CH_2); 3,6-3,75 (m, 2H, OCH_2); 1,7-1,9 (m, 4H, CHCH_2CH_2); 6,1-7,0 (bs, 3H, 3 OH); 2,15 (s, 9H, 3 CH_3 arom.)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 10,4 (CH_3); 12,25 (CH_3 -arom.); 12,7 (CH_3 -arom.); 13,5 (CH_3 -arom.); 23,5 (CH_2); 25,45 (CH_3); 26,3 (CH_2); 30,2 (CH_2); 37,2 (CH_2); 42,35 (Cq); 72,8 (CH); 74,5 (CH_2); 120,5; 121,6; 127,75; 131,3; 149,0; 149,7 (6 C arom.); 183,3 (CO).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3499 (OH), 1710 ($\text{C}=\text{O}$).

MS (m/z): 366 (M^+), 348, 322, 238, 220, 165.

ESEMPIO 6

9-Etil-14-Idrossi-6,6,13,15,16-pentametil-2,8-dirossabicciclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one

4,00 Grammi (0,011 moli) di acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-idrossipentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico vengono addizionati sotto atmosfera di azoto di 4,76 g (0.022 moli) di 2,2'-dipiridildisolfuro sciolti in 110 ml di acetonitrile anidro e di 5,68 g (0.022 moli) di trifenilfosfina. Dopo 3 ore a 25 °C la miscela di reazione viene diluita con 120 ml di p-xilene ed addizionata in un'ora ad una soluzione bollente di 5,2 g (0.025 moli) di perclorato d'argento idrato in 300 ml di p-xilene. Dopo 12 ore di ebollizione il prodotto grezzo viene recuperato per evaporazione del solvente e purificato per cromatografia su colonna di gel di silice con eluente etere etilico-etere di petrolio in rapporto 50:50. Il prodotto puro ottenuto per cristallizzazione da etere etilico e n-esano, 1,76 g con una resa del 46%, mostra le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 126°-128 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,9 (t, $J = 8$ Hz, 3 H, CH_2CH_3); 2,35-2,6 (m, 2H, CH_2CH); 1,2 (s, 3H, CH_3); 2,9-3,1 (m, 1H, 1H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1,3 (s, 3H, CH_3); 3,5-3,8 (m, 2H, CH_2); 1,4-1,9 (m, 7H, CH_2CH_3 , CH_2CH_2 1H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 4,55 (s, 1H, OH); 4,75-4,9 (m, 1H, CH); 2,15 (s, 9H, 3 CH_3 arom.);

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 10,4 (CH_3); 12,3 (CH_3 -arom.); 12,7 (CH_3 -arom.); 13,7 (CH_3 -arom.); 21,5 (CH_2); 23,5 (CH_3); 26,6 (2 CH_2); 28,6 (CH_3); 33,7 (CH_2); 37,3 (CH_2); 42,7 (Cq); 72,8 (CH_2); 74,9 (CH); 120,0; 121,2; 128,1; 131,9; 148,4; 150,3 (6 C arom.); 178,2 (CO).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3448 (OH); 1699 (C=O).

MS (m/z): 348 (M^+), 220, 165.

ESEMPIO 7

Acido 5-[4-idrossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

a) 5-[4-Acetossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoato di etile

Una soluzione contenente 15,0 g (0,057 moli) di 6-acetossi-3,4-diidro-2-idrossi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopirano in 270 ml di benzene e 45 ml di dimetilsolfossido viene addizionata per lento gocciolamento, sotto atmosfera di azoto, ad una sospensione di 1,98 g (0,080 moli) di sodio idruro al 97% in 110 ml di dimetilsolfossido. La miscela di reazione, dopo 40 minuti, viene addizionata, per lento gocciolamento, ad una soluzione contenente 13,1 g (0,062 moli) di 5-bromovalerato di etile in 80 ml di benzene e la miscela viene fatta reagire per 21 ore a 65°C. La sospensione viene diluita con etere etilico ed acqua ed acidificata con una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10%. La fase organica viene filtrata su uno strato di silice alto 4 cm ed il prodotto viene recuperato puro dopo eliminazione del solvente e dei reagenti in eccesso alla temperatura di 170°C ed alla

9.9.

pressione di 2,0 millibar. Il prodotto puro sotto forma di olio denso, 16,76 g con resa del 75%, presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1,3 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); 1,75-1,9 (m, 4H, CH_2CH_2); 2,1 (s, 6H, 2 CH_3 arom.); 2,15 (s, 6H, 1 CH_3 arom. e COCH_3); 2,3-2,5 (m, 2H, CH_2COOEt); 2,35 (s, 3H, OCOCH_3); 2,55-2,7 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$); 2,75-2,9 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$); 3,6-3,8 (m, 2H, OCH_2CH_2); 4,15 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H, OCH_2CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 10,4 (CH_3); 12,3 (CH_3 -arom.); 12,7 (CH_3 -arom.); 13,7 (CH_3 -arom.); 21,5 (CH_2); 23,5 (CH_3); 26,6 (2 CH_2); 28,6 (CH_3); 33,7 (CH_2); 37,3 (CH_2); 42,7 (Cq); 72,8 (CH_2); 74,9 (CH); 120,0; 121,2; 128,1; 131,9; 148,4; 150,3 (6 C arom.); 178,2 (CO).

IR (film), ν (cm^{-1}): 1750, 1730, 1710 (3 C=O)

MS (m/z) 392 (M^+), 347, 277, 265, 129, 101.

b) Acido 5-[4-idrossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

Una soluzione contenente 10,0 g (0,026 moli) di 5-[4-acetossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoato di etile in 60 ml di etanolo al 96% raffreddata a 0°C viene addizionata, per lento gocciolamento, di 170 ml di etanolo al 96% contenenti 7,1 g (0,127 moli) di idrossido di potassio. Dopo 3 ore a 25°C la soluzione viene diluita con etere etilico ed acqua, acidificata a pH 5 con una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10 % e, dopo separazione delle fasi, il prodotto grezzo viene recuperato per evaporazione del solvente. Il prodotto puro, 5,82 g con resa del 67%, ottenuto per cristallizzazione in doppio strato da cloruro di metilene e n-esano, presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = $104^\circ\text{-}106^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1,75-1,95 (m, 4H, CH_2CH_2); 2,55-2,7 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$); 2,2-2,25 (m, 12H, 3 CH_3 arom. e COCH_3); 2,4-2,55 (m, 2H, CH_2COOH); 2,80-2,95 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$); 3,6-3,75 (m, 2H, OCH_2CH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 12,2 (CH_3 -arom.); 12,65 (CH_3 -arom.); 13,4 (CH_3 -arom.); 22,0 (2CH_2); 30,15 (CH_2 e COCH_3); 34,2 (CH_2); 44,55 (CH_2); 73,4 (CH_2); 120,2; 121,55; 128,2; 130,8; 148,7; 149,8 (6 C arom.); 178,85 (COOH); 209,1 (COCH_3).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3478 (OH), 1709 (2 C=O)

MS (m/z): 322 (M^+), 304, 222, 164.

ESEMPIO 8

Acido 5-[4-idrossi-2-(3-idrossibutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

Una soluzione contenente 5,0 g (0,016 moli) di acido 5-[4-idrossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico in 150 ml di metanolo viene addizionata di 5,90 g (0,156 moli) di sodio boroidruro ad una temperatura inferiore a 50°C . Dopo 30 minuti a temperatura ambiente la miscela di reazione viene addizionata di etere etilico e di una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10% e, dopo separazione della fase organica, il prodotto grezzo viene recuperato per evaporazione del solvente. Il prodotto viene purificato per filtrazione su uno strato di silice alto 3 cm eluendo con una miscela etere etilico-etere di petrolio (95:5) e successiva cristallizzazione da una soluzione di cloroformio e n-esano. Si ottengono 4,25 g di prodotto, con resa dell'82%, con le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = $91^\circ\text{--}94^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) ppm: 1,15 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, CH_3); 2,35-2,50 (m, 2H, CH_2COOH); 1,5-1,7 (m, 2H, CHCH_2); 2,6-2,9 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1,75-1,95

(m, 4H, CH₂CH₂); 3,5-3,8 (m, 3H, OCH₂ e CH); 2,15 (s, 9H, 3 CH₃ arom.); 6,1 (bs, 3H, 3 OH)

¹³C-NMR (CDCl₃) ppm: 12,3 (CH₃-arom.); 12,7 (CH₃-arom.); 13,5 (CH₃-arom.); 22,0 (CH₂); 23,0 (CH₃); 23,5 (CH₂); 30,0 (CH₂); 34,2 (CH₂); 39,2 (CH₂); 66,9 (CH); 74,0 (CH₂); 120,5; 121,6; 127,8; 130,9; 149,1; 149,4 (6 C arom.); 178,0 (COOH).

IR (KBr), ν (cm⁻¹) 3400 (OH), 1709 (C=O)

MS (m/z): 324 (M⁺), 224, 206, 165.

ESEMPIO 9

14-Idrossi-9,13,15,16-tetrametil-2,8-diossabicyclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one

Una soluzione contenente 3,0 g (0,009 moli) di acido 5-[4-idrossi-2-(3-idrossibutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico in 100 ml di acetonitrile anidro viene addizionata, sotto atmosfera di azoto, di 4,1 g (0,019 moli) di 2,2'-dipiridildisolfuro e di 4,9 g (0,019 moli) di trifenilfosfina. Dopo 4 ore a 25°C la miscela di reazione viene diluita con 120 ml di p-xilene anidro e addizionata, per lento gocciolamento, ad una soluzione di 4,4 g (0,021 moli) di perclorato d'argento idrato in 420 ml di p-xilene a refluxo. Dopo 18 ore il prodotto grezzo viene recuperato per distillazione dei solventi e purificato per filtrazione su uno strato di silice impaccato alto 4 cm eluendo con una miscela di cloruro di metilene-etere etilico in rapporto 90:10. Il prodotto puro, 1,29 g con resa del 47%, ottenuto per cristallizzazione da n-esano, mostra le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 173°-175°C

¹H-NMR (CDCl₃) δ(ppm): 1,23 (d, J = 6,5 Hz, 3H, CH₃); 1,6-2,05 (m, 6H, CH₂CH e CH₂CH₂); 2,05-2,32 (m, 1H, 1H CH₂CH₂CH); 2,15 (s, 9H, 3 CH₃ arom.); 2,45-2,65 (m, 2H, CH₂CO); 2,98-3,15 (m, 1H, 1H CH₂CH₂CH); 3,58-3,70 (m, 2H, OCH₂); 4,57 (s, 1H, OH); 4,72-4,87 (m, 1H, CH)

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 12,3 (CH_3 -arom.); 12,7 (CH_3 -arom.); 13,4 (CH_3 -arom.); 20,1 (CH_3); 21,5 (CH_2); 23,0 (CH_2); 30,7 (CH_2); 35,8 (CH_2); 37,9 (CH_2); 69,6 (CH); 72,6 (CH_2); 120,1; 121,29; 128,3; 131,5; 148,7; 149,6 (6 C arom.); 174,2 (CO).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3395 (OH); 1690 ($\text{C}=\text{O}$).

MS (m/z): 306 (M^+), 206, 164.

ESEMPIO 10

Acido 5-[4-Ildrossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

a) 5-[4-Acetossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoato di etile

Una soluzione contenente 10,0 g (0,036 moli) di 6-acetossi-3,4-diidro-2-etil-2-idrossi-5,7,8-trimetil-2H-1-benzopirano in 100 ml di benzene e 30 ml di dimetilsolfossido viene addizionata, per rapido gocciolamento e sotto atmosfera di azoto, ad una sospensione di 1,0 g (0,040 moli) di sodio idruro al 97% in 50 ml di dimetilsolfossido. La soluzione, dopo 60 minuti, viene raffreddata a 5°C ed addizionata, per lento gocciolamento, di 50 ml di benzene contenenti 8,3 g (0,040 moli) di 5-bromovalerato di etile, mantenendo una temperatura inferiore a 25°C . Dopo 24 ore la miscela di reazione viene diluita con etere etilico ed acqua, acidificata con una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10% ed il prodotto grezzo viene recuperato per evaporazione della fase organica. Il prodotto puro, 9,06 g con resa del 62%, ottenuto sotto forma di olio denso per cromatografia su una colonna di gel di silice con eluente cloruro di metilene/etere etilico in rapporto 96:4, presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

^1H -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1,1 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 2,3-2,5 (m, 7H, CH_2CH_3 , COCH_3); 1,25 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); CH_2COOEt ; 1,75-1,9 (m, 4H, CH_2CH_2); 2,5-2,75 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COEt}$); 2,1 (s, 6H, 2 CH_3 arom.); 2,75-2,9

(m, 2H, CH₂CH₂COEt); 2,15 (s, 3H, 1 CH₃ arom.); 3,6-3,75 (m, 2H, OCH₂CH₂); 4,15 (q, J = 7,5 Hz, 2H, OCH₂CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8,3 (CH₃); 12,9 (CH₃-arom.); 13,4 (CH₃-arom.); 13,5 (CH₃-arom.); 14,7 (CH₃); 20,9 (CH₃); 22,1 (2 CH₂); 30,2 (CH₂); 34,5 (CH₂); 36,3 (CH₂); 42,8 (CH₂); 60,7 (CH₂); 73,3 (CH₂); 126,8; 128,2; 128,7; 131,5; 144,8; 153,8 (6 C arom.); 169,6 (COOCH₃); 173,8 (COOEt); 211,3 (COEt).

IR (film), ν (cm⁻¹): 1775, 1770, 1734 (3 C=O)

MS (m/z): 406 (M⁺), 361, 236, 219.

b) Acido 5-[4-idrossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

Una soluzione contenente 8,0 g (0,020 moli) di 5-[4-acetossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoato di etile in 50 ml di etanolo al 96% viene raffreddata a 0°C ed addizionata, per lento gocciolamento e sotto atmosfera di azoto, di 70 ml di etanolo al 96% contenenti 5,5 g (0,098 moli) di idrossido di potassio. Dopo 3 ore a 25°C la soluzione viene diluita per aggiunta di etere etilico ed acqua, acidificata a pH 5 con una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10% ed il prodotto grezzo, dopo separazione della fase organica, viene recuperato per evaporazione del solvente. Il prodotto puro, 4,77 g con resa del 71%, ottenuto per cristallizzazione da etere etilico e n-esano, presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 92°-93 °C

¹H-NMR δ (ppm): 1,1 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2,5-2,65 (m, 2H, CH₂CH₂COEt); 1,75-1,9 (m, 4H, CH₂CH₂); 2,8-2,95 (m, 2H, CH₂CH₂COEt); 2,15 (s, 9H, 3 CH₃ arom.); 3,6-3,75 (m, 2H, OCH₂CH₂); 2,35-2,5 (m, 4H, CH₂CH₃ e CH₂COOH); 5,0-7,0 (bs, 2H, 2 OH)

¹³C-NMR δ (ppm): 12,3 (CH₃-arom.); 12,8 (CH₃-arom.); 13,4 (CH₃-arom.); 22,0 (CH₂); 22,1 (CH₂); 30,1 (CH₂); 34,3 (CH₂); 36,4 (CH₂); 43,2 (CH₂); 73,4

(CH₂); 120,4; 121,7; 128,1; 130,9; 148,8; 149,6 (6 C arom.); 169,6 (COOH);
212,3 (COEt).

IR (KBr), ν (cm⁻¹): 3419 (OH), 1709 (2 C=O).

MS (m/z): 336 (M+), 236, 164, 57.

ESEMPIO 11

Acido 5-[4-idrossi-2-(3-idrossipentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

Una soluzione contenente 4,1 g (0,012 moli) di acido 5-[4-idrossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico in 120 ml di metanolo viene lentamente addizionata, sotto atmosfera di azoto, di 4,6 g (0,121 moli) di sodio boridruro; la reazione è immediata e si ha un innalzamento di temperatura fino a 50°C. Al termine dell'aggiunta alla miscela di reazione vengono aggiunti 70 ml di etere etilico ed una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10%; il prodotto grezzo, dopo separazione della fase organica, viene recuperato per evaporazione del solvente. Il prodotto puro, 3,85 g con resa del 95%, ottenuto per ulteriore eliminazione del solvente organico per evaporazione sotto vuoto a freddo, presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 96°-99 °C

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 0,9 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2,35-2,5 (m, 2H, CH₂COOH); 1,35-1,5 (m, 2H, CH₂CH₃); 2,6-2,85 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1,5-1,7 (m, 2H, CH₂CH); 3,25-3,4 (m, 1H, CH); 1,75-1,95 (m, 4H, CH₂CH₂); 3,6-3,7 (m, 2H, OCH₂); 2,15 (s, 9H, 3 CH₃ arom.); 6,3 (bs, 3H, 3 OH)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 12,3 (CH₃-arom.); 12,8 (CH₃-arom.); 13,5 (CH₃-arom.); 21,9 (CH₂); 23,4 (CH₂); 30,0 (CH₂); 30,1 (CH₂); 34,3 (CH₂); 37,0 (CH₂); 72,4 (CH); 73,9 (CH₂); 120,5; 121,6; 127,8; 131,0; 149,1; 149,5 (6 C arom.); 178,7 (COOH).

IR (KBr), ν (cm⁻¹): 3408 (OH), 3216 (OH), 1709 (C=O).

MS (m/z): 338 (M⁺), 238, 220, 165.

ESEMPIO 12

9-Etil-14-idrossi-13,15,16-trimetil-2,8-diossabicciclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one

Una soluzione contenente 3,0 g (0,009 moli) di acido 5-[4-idrossi-2-(3-idrossipentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico in 90 ml di acetonitrile anidro viene addizionata, sotto atmosfera di azoto, di 4,0 g (0,018 moli) di 2,2'-dipiridildisolfuro e di 4,7 g (0,018 moli) di trifenilfosfina. Dopo 4 ore a 25°C la miscela di reazione viene diluita con 100 ml di p-xilene anidro ed addizionata, per lento gocciolamento, ad una soluzione bollente contenente 4,26 g (0,020 moli) di perclorato d'argento idrato in 400 ml di p-xilene. Dopo 17 ore di ebollizione, il prodotto grezzo viene recuperato per evaporazione del solvente e viene purificato per filtrazione veloce su uno strato di gel di silice impaccato alto 4 cm con eluente cloruro di metilene-etere etilico in rapporto 90:10. Il prodotto puro ottenuto per cristallizzazione da etere etilico-n-esano, 1,84 g con resa del 64%, presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 145°-146 °C

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 0,9 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₂CH₃); 1,5-2,35 (m, 9H); 2,1 (s, 3H, CH₃-arom.); 2,12 (s, 3H, CH₃-arom.); 2,18 (s, 3H, CH₃-arom.); 2,35-2,7 (m, 2H, CH₂CO); 2,95-3,15 (m, 1H); 3,5-3,7 (m, 2H, OCH₂); 4,7-4,9 (m, 2H, CH e OH).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 10,1 (CH₃); 12,1 (CH₃-arom.); 12,4 (CH₃-arom.); 13,2 (CH₃-arom.); 21,2 (CH₂); 22,2 (CH₂); 26,7 (CH₂); 30,9 (CH₂); 33,6 (CH₂); 37,1 (CH₂); 71,9(CH); 75,1 (CH₂); 76,7 (CH₂); 120,3; 121,4; 128,1; 131,9; 148,6; 149,8 (6 C arom.); 164,1 (CO).

IR (KBr), ν (cm⁻¹): 3433 (OH); 1700 (C=O).

MS (m/z): 320 (M⁺), 291, 220, 165.

ESEMPIO 13

Acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-idrossi-3-metilpentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico

4,7 Grammi (0,192 moli) di magnesio vengono addizionati, sotto atmosfera di azoto, di etere etilico anidro fino a completa immersione, quindi si aggiunge, per lento gocciolamento, una soluzione contenente 12 ml (0,019 moli) di ioduro di metile in 60 ml di etere etilico anidro e, per esotermicità, la miscela di reazione raggiunge la temperatura di ebollizione. Terminata la reazione esotermica la miscela, mantenuta all'ebollizione, viene addizionata, per lento gocciolamento, di una soluzione contenente 10,0 g (0,027 moli) di acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico in 600 ml di etere etilico anidro. Dopo 2 ore la miscela di reazione viene raffreddata, acidificata con una soluzione acquosa di acido cloridrico al 10%, la soluzione eterea viene separata ed il prodotto grezzo, recuperato per evaporazione del solvente, viene purificato per filtrazione su gel di silice, con eluente acetato di etile-cloruro di metilene in rapporto 10:1. Il prodotto puro, 5,13 g con resa del 50%, ottenuto per cristallizzazione da una miscela di etere etilico-n-esano, presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

p.f. = 128°-130 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ (ppm): 0,9 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 2,2 (s, 9H, 3 CH_3 arom.); 1,3 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ e CH_3COH); 2,6-2,75 (m, 2H, CCH_2CH_2); 1,5-1,65 (m, 4H, CCH_2CH_2 e CH_2CH_3); 3,6-3,7 (m, 2H, OCH_2); 1,75-1,85 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}$); 5,2-5,8 (bs, 3H, 3 OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 δ (ppm): 8,8 (CH_3); 12,3 (CH_3 -arom.); 12,7 (CH_3 -arom.); 13,5 (CH_3 -arom.); 22,1 (CH_2); 25,2 (2 CH_3); 26,4 (CH_2 e CH_3); 34,8 (CH_2); 37,3 (CH_2); 42,0 (CH_2); 42,4 (Cq); 73,8 (Cq); 74,2 (CH_2); 120,2; 121,1; 128,1; 132,3; 148,7; 149,6 (6 C arom.); 183,7 (CO).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3408 (OH); 1692 (C=O).

MS (m/z): 380 (M⁺), 362, 234, 165.

ESEMPIO 14

6,6,9,13,15,16-Esametil-9-etil-14-idrossi-2,8-diossabiciclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one

Una soluzione contenente 3,9 g (0,011 moli) di acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-idrossi-3-metilpentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico in 100 ml di acetonitrile anidro viene addizionata di 4,65 g (0,021 moli) di 2,2'-dipiridildisolfuro e 5,75 g (0,022 moli) di trifenilfosfina. Dopo 3 ore a temperatura ambiente la miscela di reazione viene diluita con 130 ml di p-xilene anidro ed addizionata, per lento gocciolamento, ad una soluzione bollente contenete 5,1 g (0,025 moli) di perclorato d'argento idrato in 340 ml di p-xilene. La miscela di reazione viene mantenuta all'ebollizione per 18 ore, quindi il prodotto grezzo viene recuperato per evaporazione del solvente e purificato per cromatografia su colonna di gel di silice con eluente etere etilico-cloruro di metilene in rapporto 20:80. Il prodotto puro, ottenuto per cristallizzazione da una miscela di etere etilico-n-esano, 1,2 g con resa del 30%, presenta le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:

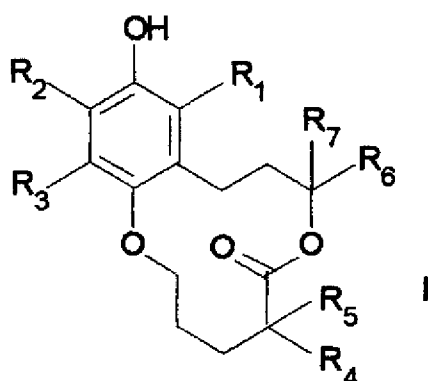
¹H-NMR (CDCl₃ δ (ppm): 1,20-1,50 (s, 9H + m, 3H); 1,50-2,05 (m, 9H); 2,12 (s, 3H); 2,16 (s, 6H); 2,70 (m, 1H); 3,70 (m, 2H).

¹³C-NMR (CDCl₃ δ (ppm): 12,2 (CH₃-arom.); 13,0 (CH₃-arom.); 25,1 (Cq); 27,2 (Cq); 29,8 (CH₂); 37,1 (CH₂); 42,1 (CH₂); 73,8 (CH₂O); 120,4; 132,4; 150,0 (3 C arom.); 182,0 (CO).

MS (m/z): 362 (M⁺), 165.

RIVENDICAZIONI

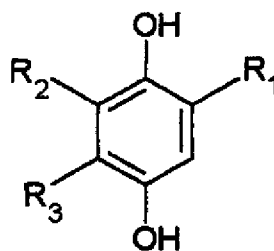
- 1) Lattoni di formula



e loro sali farmacologicamente accettabili in cui R_1 , R_2 , R_3 ed R_6 rappresentano un gruppo (C_1-C_3) -alchilico e R_4 , R_5 ed R_7 , indipendentemente, rappresentano un atomo di idrogeno o un gruppo (C_1-C_3) -alchilico utili nella terapia delle patologie aterosclerotiche e vascolari.

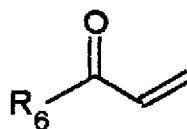
- 2) Lattoni secondo la rivendicazione 1 caratterizzati dal fatto che R_1 , R_2 ed R_3 rappresentano un gruppo metilico, R_4 , R_5 ed R_7 , indipendentemente, rappresentano un atomo di idrogeno o un gruppo metilico ed R_6 rappresenta un gruppo metilico o etilico.
- 3) Lattoni secondo ciascuna delle rivendicazioni 1 e 2 caratterizzati dal fatto che i sali farmacologicamente accettabili sono scelti tra sali di alanina, lisina, arginina, asparagina, glicina e trometamolo.
- 4) Un lattone secondo la rivendicazione 2 che è il 6,6,9,13,15,16-esametil-14-idrossi-2,8-diossabicciclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one.
- 5) Un lattone secondo la rivendicazione 2 che è il 9-etil-14-idrossi-6,6,13,15,16-pentametil-2,8-diossabicciclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one.

- 6) Un lattone secondo la rivendicazione 2 che è il 14-idrossi-9,13,15,16-tetrametil-2,8-diossabicyclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one.
- 7) Un lattone secondo la rivendicazione 2 che è il 9-etil-14-idrossi-13,15,16-trimetil-2,8-diossabicyclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one.
- 8) Un lattone secondo la rivendicazione 2 che è il 6,6,9,13,15,16-esametil-9-etil-14-idrossi-2,8-diossabicyclo[10.4.0]esadec-12,14,16-trien-7-one.
- 9) Processo per la preparazione dei lattoni di formula I che comprende:
 - a) far reagire un equivalente molare di un idrochinone di formula



IV

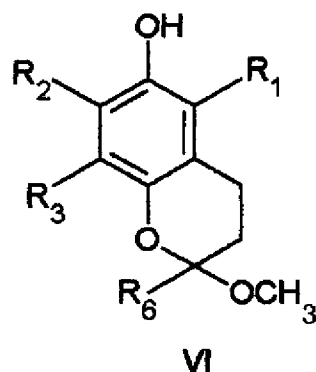
dove R_1 , R_2 ed R_3 rappresentano un gruppo (C_1-C_3) -alchilico con da 2 a 3 equivalenti molarli di un alchilvinilchetone di formula



V

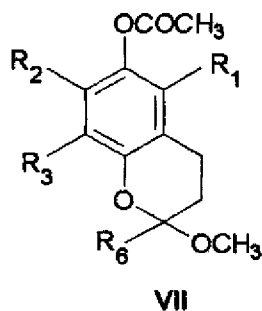
dove R_6 rappresenta un gruppo (C_1-C_3) -alchilico, in presenza di da 1,2 a 1,4 equivalenti molarli di trimetilortoformiato e di quantità catalitiche di acido solforico concentrato, in un alcool contenente da 1 a 3 atomi di carbonio, sotto atmosfera di gas inerte e a temperatura ambiente per un periodo di tempo compreso tra 16 e 24 ore;

b) far reagire un equivalente molare del risultante 3,4-diidro-2H-1-benzopirano di formula



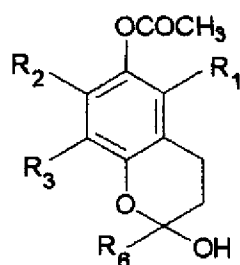
con da 4 a 6 equivalenti molarli di anidride acetica in un solvente organico a carattere basico, come la piridina, ad una temperatura compresa tra 20°C e 30°C per un periodo di tempo compreso tra 16 e 24 ore;

c) deproteggere selettivamente l'ossidril in posizione 2 del risultante estere di formula



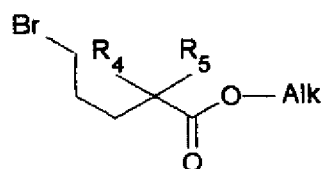
per trattamento con acido cloridrico concentrato in una miscela acetone-acqua in rapporto compreso tra 1:1 e 5:1, ad una temperatura compresa tra 40°C e 60°C e per un periodo di tempo compreso tra 2 e 8 ore;

d) far reagire un equivalente molare del risultante composto di formula



VIII

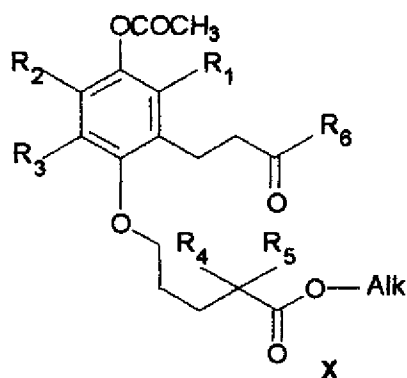
con da 1 a 2 equivalenti molarli di sodio idruro e da 1 a 2 equivalenti molarli di un 5-bromopentanoato di alchile di formula



IX

dove R_4 ed R_5 , indipendentemente, rappresentano un atomo di idrogeno o un gruppo (C_1-C_3) -alchilico, sotto atmosfera di gas inerte e in un solvente costituito dalla miscela di un idrocarburo aromatico con un solvente polare, ad una temperatura compresa tra 60°C e 70°C per un periodo di tempo compreso tra 2 e 24 ore;

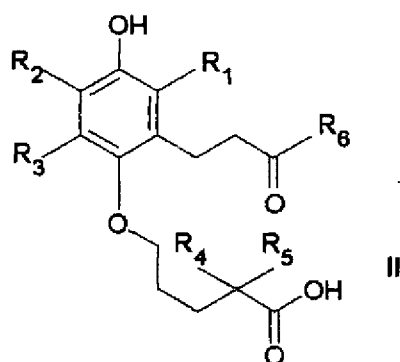
e) idrolizzare il risultante composto di formula



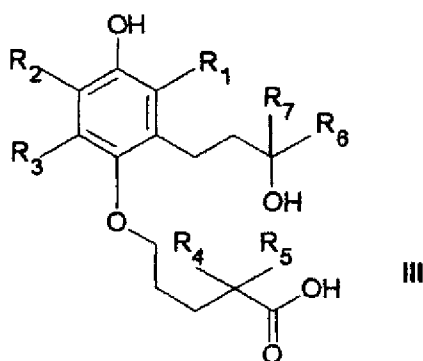
per trattamento con una base inorganica scelta tra idrossido di sodio e idrossido di potassio, in un alcool contenente da 1 a 3 atomi di carbonio, ad una temperatura

compresa tra 20°C e la temperatura di ebollizione della miscela di reazione per un periodo di tempo compreso tra 2 e 24 ore;

f) ridurre il risultante composto di formula



per trattamento con da 2 a 5 equivalenti molari di sodio boroidruro in un alcool contenente da 1 a 3 atomi di carbonio, ad una temperatura compresa tra 25°C e 50°C per un periodo di tempo compreso tra 10 minuti e 6 ore per ottenere un composto di formula

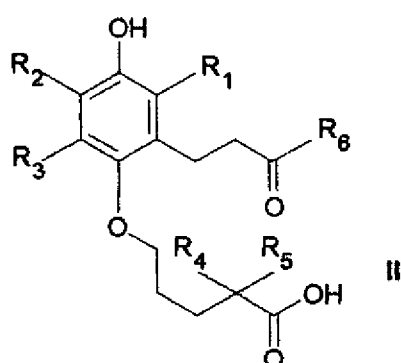


in cui R₇ rappresenta un atomo di idrogeno;

g) far reagire il composto di formula II con un reagente di Grignard in un solvente etero anidro ad una temperatura compresa tra 20°C e la temperatura di ebollizione della miscela di reazione per un periodo di tempo compreso tra 1 e 3 ore e quindi trattare la miscela di reazione con una soluzione acquosa di acido cloridrico per ottenere un composto di formula III in cui R₇ rappresenta un gruppo (C₁-C₃)-alchile;

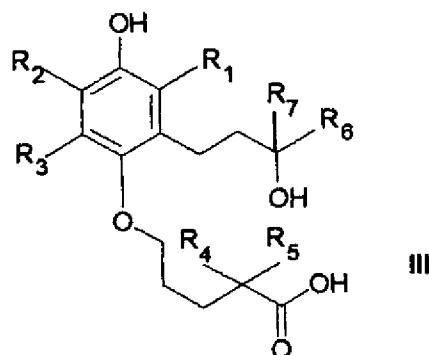
h) ciclizzare il composto di formula III inizialmente in acetonitrile con da 2 a 2,2 equivalenti molari di 2,2'-dipiridildisolfuro e da 2 a 2,2 equivalenti molari di trifenilfosfina e successivamente con da 2 a 3 equivalenti molari di perclorato di argento idrato in un idrocarburo aromatico, per un periodo di tempo compreso tra 12 e 24 ore ad una temperatura compresa tra 25°C e la temperatura di ebollizione della miscela di reazione.

10) Composti di formula



in cui R₁, R₂, R₃ ed R₆ rappresentano un gruppo (C₁-C₃)-alchilico ed R₄ ed R₅, indipendentemente, rappresentano un atomo di idrogeno o un gruppo (C₁-C₃)-alchilico, intermedi nella sintesi dei lattoni di formula I.

- 11) Un composto secondo la rivendicazione 10 che è l'acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.
- 12) Un composto secondo la rivendicazione 10 che è l'acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.
- 13) Un composto secondo la rivendicazione 10 che è l'acido 5-[4-idrossi-2-(3-ossobutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.
- 14) Un composto secondo la rivendicazione 10 che è l'acido 5-[4-idrossi-2-(3-ossopentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.
- 15) Composti di formula



in cui R_1 , R_2 , R_3 ed R_6 rappresentano un gruppo (C_1 - C_3)-alchilico ed R_4 , R_5 ed R_7 , indipendentemente, rappresentano un atomo di idrogeno o un gruppo (C_1 - C_3)-alchilico, intermedi nella sintesi dei lattoni di formula I.

- 16) Un composto secondo la rivendicazione 15 che è l'acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-idrossibutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.
- 17) Un composto secondo la rivendicazione 15 che è l'acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-idrossipentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.
- 18) Un composto secondo la rivendicazione 15 che è l'acido 5-[4-idrossi-2-(3-idrossibutil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.
- 19) Un composto secondo la rivendicazione 15 che è l'acido 5-[4-idrossi-2-(3-idrossipentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.
- 20) Un composto secondo la rivendicazione 15 che è l'acido 2,2-dimetil-5-[4-idrossi-2-(3-idrossi-3-metilpentil)-3,5,6-trimetilfenossi]pentanoico.

ALFA WASSERMANN S.p.A.

Dr. Guido Guerra



UFFICIO PROVINCIALE INDUSTRIA
COMMERCIO E ARTIGIANATO
DI BOLOGNA
UFFICIO PREVENTI
IL FUNZIONARIO

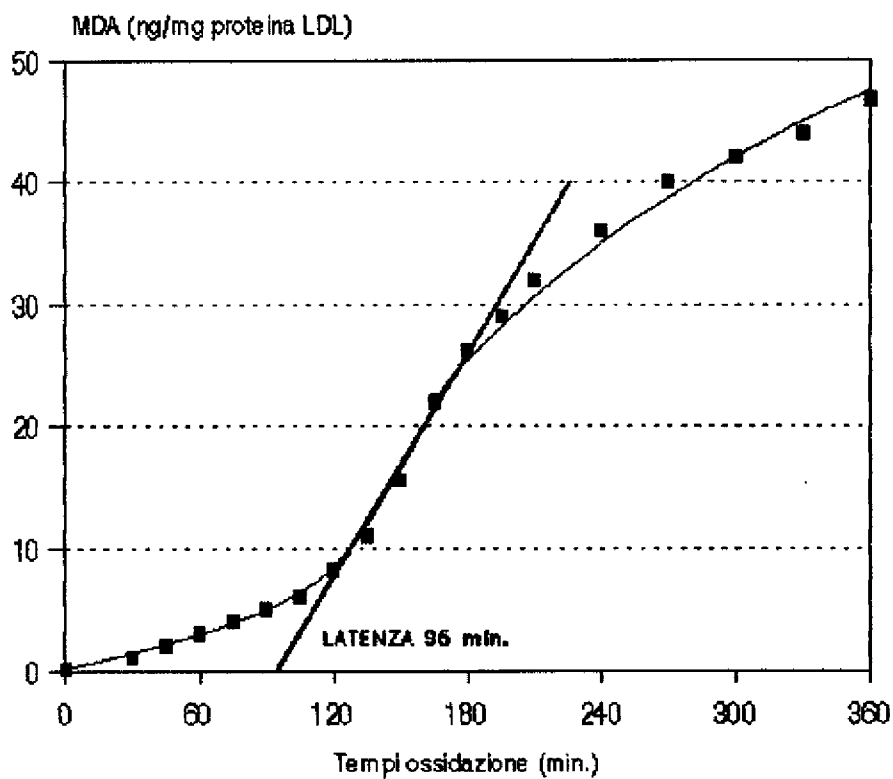
Figura 1c

Tempo di latenza (min.)

(lattone dell'esempio 6 - $1\mu\text{M}$)



UFFICIO PROVINCIALE INDUSTRIA
COMMERCIO E ARTIGIANATO
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO



ALFA WASSERMANN S.p.A.
Dr. Guido Guerra

B094A 000562

Figura 1a
Tempo di latenza (min.)
 (controllo negativo - etanolo)



UFFICIO PROVINCIALE INDUSTRIA
 COMMERCIO E ARTIGIANATO
 DI BOLOGNA
 UFFICIO BREVETTI
 IL FUNZIONARIO

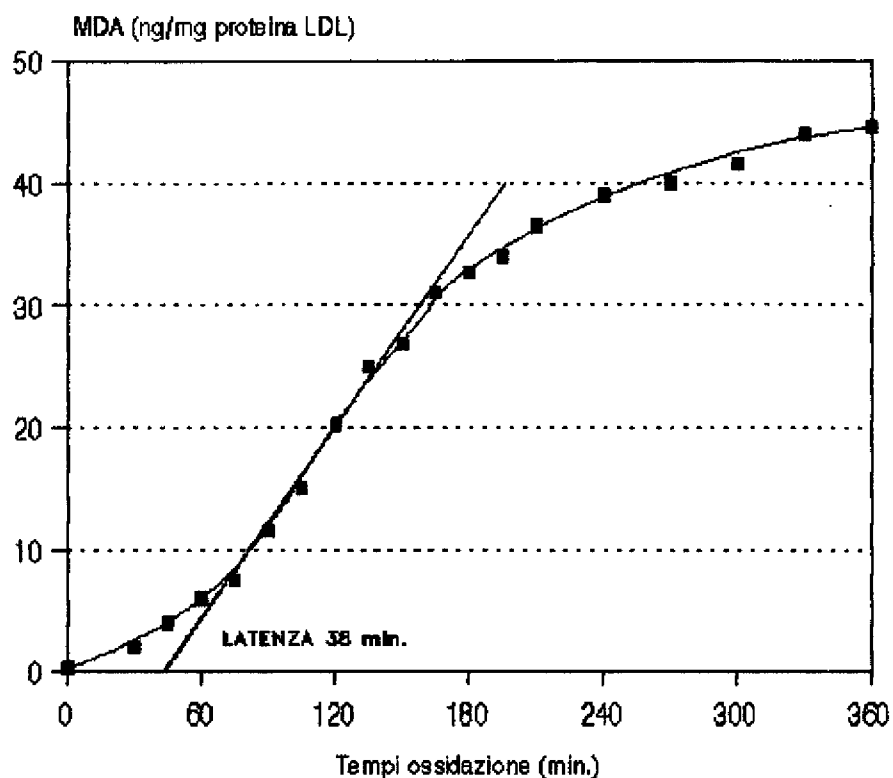
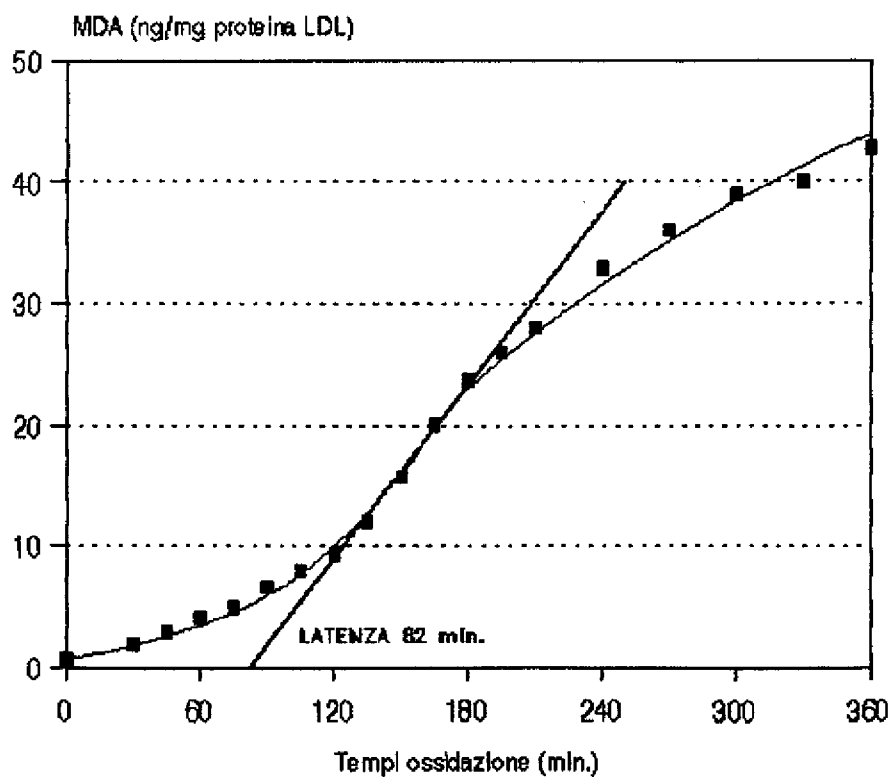


Figura 1b
Tempo di latenza (min.)
 (composto di riferimento - probucolo 10 μ M)

ALFA WASSERMANN S.p.A.
 Dr. Guido Guerra



B094A 000 562

Figura 1a
Tempo di latenza (min.)
 (controllo negativo - etanolo)

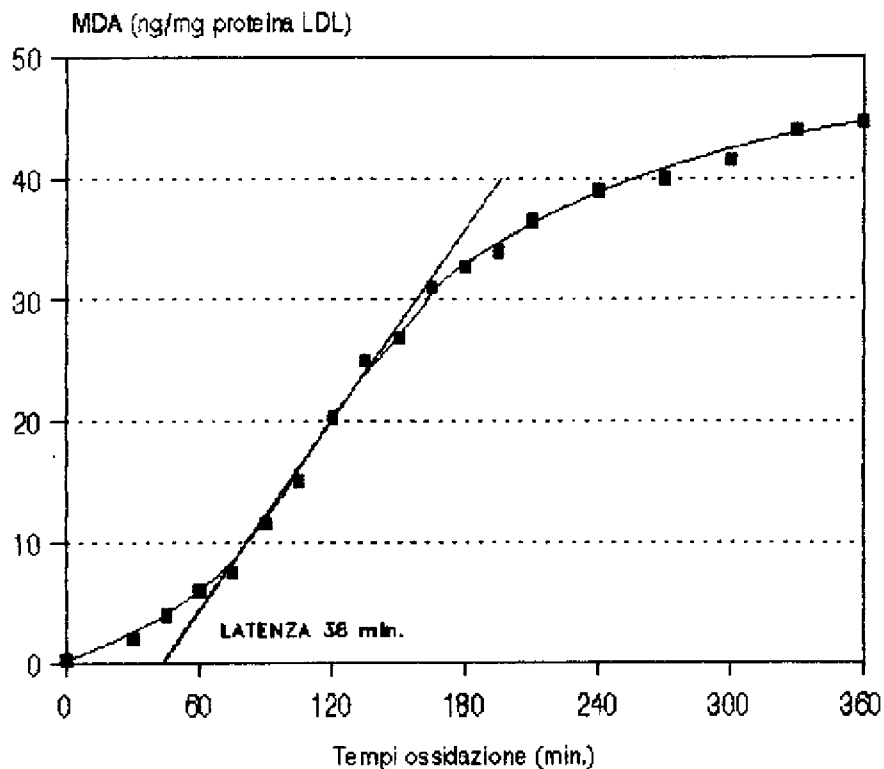


Figura 1b
Tempo di latenza (min.)
 (composto di riferimento - probucolo 10 μ M)

ALFA WASSERMANN S.p.A.
 Dr. Guido Guerra

Guido Guerra

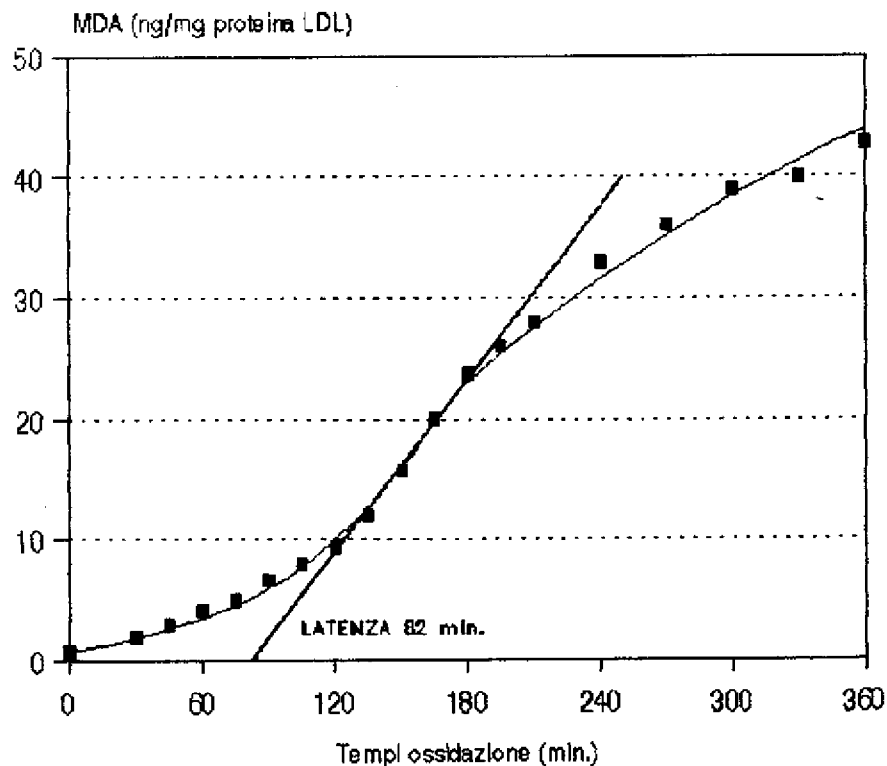
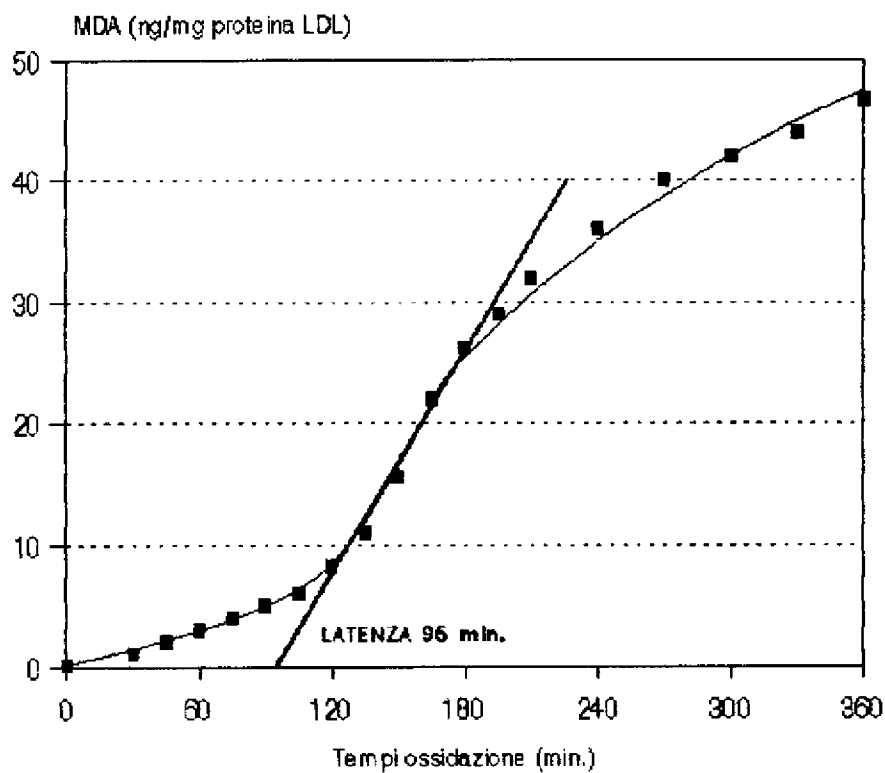


Figura 1c

Tempo di latenza (min.)

(lattone dell'esempio 6 - $1\mu\text{M}$)



ALFA WASSERMANN S.p.A.
Dr. Guido Guerra

B094A 000562



UFFICIO PROVINCIALE INDUSTRIA
COMMERCIO E ARTIGIANATO
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO