



Università degli Studi di Ferrara

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FARMACEUTICHE**

COORDINATORE PROF. STEFANO MANFREDINI

**STUDI RIVOLTI ALLA SINTESI DI ANTAGONISTI
DEL RECETTORE NOP**

DOTTORANDA
DOTT.SSA GIULIA FANTON

TUTORE
PROF. GIAN PIERO POLLINI

XX° CICLO

ANNI 2005 - 2007

INTRODUZIONE

I recettori oppioidi giocano un ruolo fondamentale a livello del sistema nervoso centrale. Sono infatti responsabili di numerosi effetti farmacologici sia acuti, quali analgesia e più in generale fenomeni associati a dolore e nocicezione, depressione respiratoria, miosi e sensazione di benessere, sia cronici, quali tolleranza e dipendenza.

A fianco dei tre maggiori tipi di recettori oppioidi MOP, KOP e DOP, un nuovo recettore appartenente alla famiglia degli oppioidi è stato scoperto nel 1994. Dopo la clonazione del cDNA dei tipi MOP, KOP e DOP, sono state utilizzate sonde di oligonucleotidi per lo screening di librerie di cDNA¹ consentendo l'identificazione di una quarta sequenza di cDNA codificante per un recettore prima sconosciuto. Esso era caratterizzato da una sequenza primaria tipica dei recettori accoppiati a proteina G e da una elevata omologia con gli altri recettori oppioidi. Tale omologia è presente soprattutto a livello dei domini transmembrana, dei loops intracellulari e della piccola porzione nella regione C-terminale in prossimità del settimo dominio di transmembrana (7TM)². Questo recettore fu chiamato recettore di tipo oppioide (opioid receptor like-1, ORL-1)³.

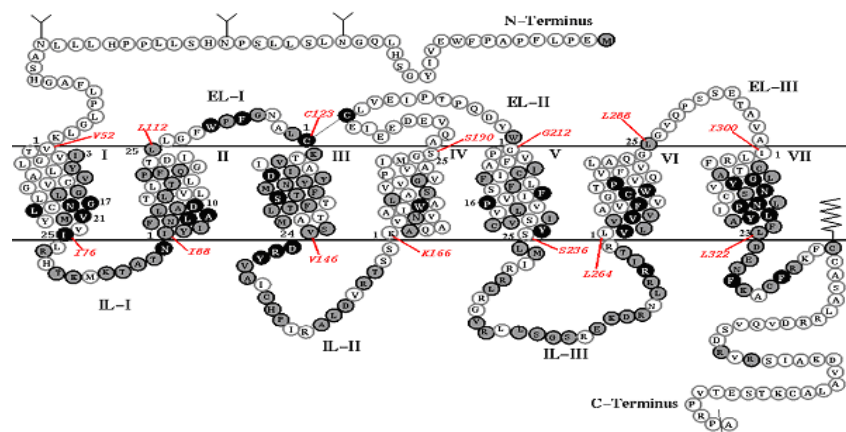


Figura 1. Struttura del recettore NOP e con in grassetto gli amminoacidi conservati rispetto ai recettori oppioidi classici.

¹ C. Mollereau, M. Parmentier, P. Mailleux *et. al.*; *FEBS lett.*; **1994**, 341, 33-38.

² J.C. Meunier *et. al.*; *Expert Opinion on Therapeutic Patents*; **2000**, 10, 4, 371-388.

³ Henderson G, Mcknight AT; *Trends Pharmacol. Sci.*; **1997**, 18, 293-300.

Nonostante l'elevato grado di similarità nella sequenza, i tipici ligandi peptidici e non-peptidici dei recettori oppioidi "classici" non legano il recettore ORL-1.

La localizzazione e l'espressione di ORL-1 è stata determinata mediante analisi di "Northern blot" sul corrispondente mRNA. Questo recettore è presente in tutte le regioni del cervello e della spina dorsale; inoltre è stato individuato nell'intestino, nel vaso deferente, a livello del fegato e della milza ma non in muscoli scheletrici, esofago e reni. All'interno del cervello e del sistema nervoso centrale, il recettore ORL-1 mostra elevata espressione di mRNA nei nuclei paraventricolare e ventromediale dell'ipotalamo, nell'amigdala, nella corteccia piriforme e nel *locus coeruleus*. Una moderata espressione è stata osservata nella corteccia, nel talamo, nell'ippocampo e nelle ghiandole della corteccia spinale^{4,5,6}.

L'elevata distribuzione di tale recettore suggerisce il suo potenziale coinvolgimento in molti processi centrali, in particolare memoria e apprendimento, attenzione ed emozioni, movimento e processi motori, omeostasi, secrezioni neuroendocrine e diverse percezioni sensoriali^{7,8}.

Il recettore è rimasto "orfano" fino al 1995, quando due gruppi di ricerca hanno isolato da estratti di cervello il suo ligando endogeno chiamandolo rispettivamente Nocicettina N (che stava ad indicare l'effetto di iperalgesia determinato in seguito a somministrazione intracerebroventricolare (icv). nei topi) o orphanin-FQ (OFQ). In seguito il recettore viene comunemente chiamato NOP (Nociceptive Opioid Receptor).

⁴ Wang JB, Johnson PS et al, *FEBS Lett* **1994**, 348, 75-79.

⁵ Fukuda K, Kato S., Mori K et al, *FEBS Lett*, **1994**, 343, 42-46

Chen Y, Fan Y, Liu J et al, *FEBS Lett*, **1994**, 347, 279-283.

⁶ Chen Y, Fan Y, Liu J et al, *FEBS Lett*, **1994**, 347, 279-283.

⁷ Meunier J-C, *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 340, 1-15.

⁸ S. Ronzoni, I. Peretto, G. Giardina, *et. al.*; *Exp. Opin. Ther. Patents*; **2001**, 11, 525-535.

Nocicettina

Nocicettina (orphanin FQ), ligando endogeno del recettore NOP, è un eptadecapeptide che presenta similarità di sequenza con i peptidi oppioidi, in modo particolare con Dinorfina A, il ligando endogeno del recettore KOP, anch'esso costituito da diciassette aminoacidi.

La Nocicettina è ora nota come peptide modulatore del dolore e la sua attività biologica è esercitata a livello cellulare e molecolare mediante interazione con una proteina G (GPCR) del tipo G_iG_o , la cui attivazione provoca inibizione dell'accumulo di cAMP forskolin-stimolato, attivazione dei canali K^+ e inibizione della corrente Ca^{2+} voltaggio dipendente (Figura 1)⁹. La modulazione della conduttività ionica è presumibilmente associata all'inibizione dell'eccitabilità neuronale e al rilascio di trasmettitori presinaptici. N/OFQ deprime la trasmissione glutamatergica a livello della colonna spinale^{10,11}, quella tachichinergica nella pelvi renale¹² e la trasmissione neuromuscolare a livello del vaso deferente di topo e coniglio; inibisce il rilascio di serotonina, acetilcolina, dopamina, Met-enkefalina e noradrenalina; stimola invece il rilascio di prolattina e ormone della crescita.

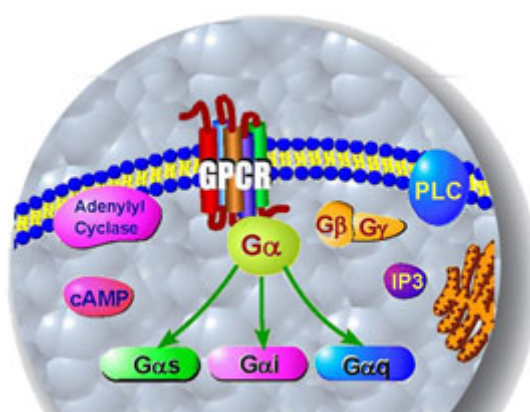


Figura 2.

⁹ L. G. Lou, Z. Zhang, *et. al.*; *J. Neurochem.*; **1998**, 70, 1316-1322.

¹⁰ Nicol B., Lambert DG, Rowbotham DJ, Smart D, McKnight AT *Br. J. Pharmacol.* **1996**, 1081-1083.

¹¹ Faber ES, Chambers JP, Evans RH, Henderson G, *Br. J. Pharmacol.* **1996**, 119, 189-190.

¹² Giuliani S., Maggi CA, *Br. J. Pharmacol.* **1996**, 118, 1567-1569.

Pur essendo nota come peptide coinvolto nella modulazione del dolore, essa svolge, dipendentemente dalla dose e dalla via di somministrazione, effetti diversi e talvolta opposti, quali allodinia (una risposta dolorosa a una stimolazione innocua, tattile), iperalgesia e analgesia.

È noto in letteratura che tale peptide causa iperalgesia quando somministrato nel topo per via intracerebroventricolare (icv) in concentrazioni nanomolari, come determinato da test di tail-flick¹³ e hot-plate¹⁴. È stato successivamente dimostrato, d'altra parte, che l'effetto di iperalgesia è solo apparente, in quanto dovuto al blocco dell'analgesia oppioidi-mediata e indotta da stress causato dalla via di somministrazione icv.

N/OFQ mostra attività funzionale anti-oppioidi in quanto in grado di contrastare l'effetto analgesico degli agonisti oppioidi MOP, KOP e DOP¹⁵.

A livello spinale, la sua azione è più complessa in quanto manifesta effetti diversi al variare della dose. La somministrazione intratecale di dosi nanomolari di N/OFQ nei topi manifesta effetto analgesico contrastato dal Naloxone, indicando la capacità della Nocicettina di stimolare il rilascio di oppioidi endogeni. Il medesimo tipo di somministrazione di dosi anche inferiori (picomolari) determina invece iperalgesia e una riduzione della soglia nocicettiva, come evidenziato in test tail-flick e hot-plate.

Secondo studi effettuati mediante oligonucleotidi antisenso i recettori MOP, KOP e DOP non sono coinvolti nell'azione di N/OFQ. I differenti effetti associati a tale peptide endogeno suggeriscono la presenza di molteplici meccanismi di attivazione, così come la presenza di siti eterogenei nel recettore.

Basse dosi (10-100 ng) di N/OFQ somministrate icv stimolano l'attività locomotoria¹⁶, mentre dosi superiori (>1µg) riducono tale attività causando atassia, perdita della coordinazione, dell'equilibrio e del tono muscolare¹¹. Nessun effetto motorio si osserva in seguito a somministrazione intratecale; il suo effetto sulla locomozione è esercitato solo a livello cerebrale.

La somministrazione centrale di Nocicettina stimola l'assunzione di cibo e aumenta l'appetito sia nei topi saziati che non saziati, induce stimolazione del comportamento esplorativo¹³, effetti associati ad una nota proprietà anti-ansia del peptide¹⁷.

¹³ Reinscheid RK, Nothacher HP, Bourson A et al, *Science*, **1995**, 270, 792-794.

¹⁴ Meunier J-C, Mollereau C, Toll L et al, *Nature*, **1995**, 377, 532-535.

¹⁵ Mogil JS, Grisel JE, Zhangs G, Belknap JK, Grandy DK, *Neurosci. Lett*, **1996**, 214, 131-134.

¹⁶ Florin S, Suaudeau C, Meunier JC, Costentin J, *Eur. J. Pharmacol.*, **1996**, 317, 9-13.

¹⁷ Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, *Eur. J. Pharmacol.*, **1998**, 350, 21-29.

La Nocicettina modula la secrezione ormonale lungo l'asse ipotalamo-ipofisaria, inibisce le β -endorfine, GnRH e i neuroni dopaminergici A₁₂. L'inibizione dei neuroni GnRH determina un calo nella secrezione di LH e FSH a livello dell'ipofisi anteriore con conseguente effetto sul ciclo riproduttivo, mentre l'inibizione dei neuroni dopaminergici A₁₂ incrementa la secrezione di prolattina.

A livello periferico il ligando endogeno influenza le funzioni cardiovascolari. Quando somministrata intravena (iv.), il peptide riduce la pressione arteriosa, il ritmo e il flusso cardiaci, le resistenze sistemiche vascolari.

N/OFQ agisce anche sul tratto urogenitale: la somministrazione iv. (20 μ g/kg/min) nel ratto cosciente aumenta in modo marcato il flusso urinario mentre riduce l'escrezione di sodio con le urine¹⁸. La Nocicettina potrebbe perciò essere utilizzata come diuretico in grado di produrre una diuresi di "acqua libera" per il controllo della ritenzione di liquidi nei pazienti. Essa sopprime il riflesso della minzione indipendentemente dalla depressione delle funzioni cardiovascolari e coinvolge, almeno in parte, l'inibizione di neurotrasmettitori eccitatori da parte dei nervi postgangliari.

¹⁸ Kapusta DR, Sezen SF, Chang JK, Lipton H, Kenigs VA, *Life Sci.*, 1997, 60, PL 15-21.

Potenziali usi di agonisti e antagonisti NOP

Diversi studi hanno dimostrato che la Nocicettina è caratterizzata da importanti proprietà ansiolitiche e antistress. Jencks *et al.*¹⁹ hanno mostrato che basse dosi di peptide attenuano le risposte comportamentali allo stress in diversi modelli ansiogenici in topi e ratti. È stato osservato che essa aumenta il comportamento esplorativo nei topi sottoposti al “light-dark aversion test”.

In modo consistente con gli effetti di tipo antistress o ansiolitici della Nocicettina somministrata ai roditori, i topi knockout per la Nocicettina (cioè non grado di sintetizzare il peptide endogeno) manifestano una maggiore ansia quando posti in un ambiente nuovo o minaccioso²⁰, hanno un ridotto comportamento esplorativo e spendono meno tempo al centro dell’area nell’“open field test”. Ciò non è attribuibile a ridotta attività locomotoria.

A conferma delle proprietà ansiolitiche del peptide endogeno, piccole molecole agoniste del recettore NOP si sono mostrate attive in vari modelli di ansia in topi e ratti.

Un esempio è l’agonista non-peptidico della Roche (Ro 64-6198) che ha mostrato una buona efficacia come ansiolitico ma una scarsa biodisponibilità e vari effetti collaterali quali sedazione e atassia a dosi vicine a quella efficace.

In aggiunta all’attività ansiolitica e antistress, gli agonisti NOP potrebbero essere efficaci nel trattamento di vari disturbi quali anoressia e ipertensione, dal momento che la Nocicettina ha mostrato, in diversi tests, azione ipotensiva e vasodilatatoria. Potrebbero essere poi utili come diuretici, in quanto in grado di aumentare il flusso urinario e di diminuire il contenuto di sodio nelle urine; in aggiunta è nota la loro capacità di ridurre il riflesso della minzione nei ratti, suggerendo una loro applicazione nell’incontinenza.

Gli agonisti NOP potrebbero trovare applicazione a livello gastrointestinale per il trattamento della costipazione, anche nel caso in cui questa sia presente come effetto collaterale degli oppioidi, come antitussivi, come broncocostrittori e contro il reflusso gastro-esofageo.

¹⁹ Jenck F., Moreau JL, Martin JR et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 26, 14854-14858.

²⁰ Koster A, Montkowski A, Schulz S et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 18, 10444-10449.

L'applicazione degli antagonisti NOP potrebbe invece riguardare il trattamento dei disturbi cognitivi attraverso il miglioramento di memoria e apprendimento.

È stata inoltre recentemente dimostrata la loro utilità nei disturbi locomotori, quali il morbo di Parkinson. Marti *et al.*²¹ hanno pubblicato studi riguardanti il peptide UFP-101 ([NPhe¹,Arg¹⁴,Lys¹⁵]-N/OFQ(1-13)-NH₂), antagonista selettivo del recettore NOP, e J-113397, antagonista selettivo NOP di tipo non peptidico. Questi composti si sono dimostrati in grado di stimolare il rilascio di dopamina e l'attività motoria quando somministrati a livello della *substantia nigra reticulata* nei ratti. Questi risultati suggeriscono che la Nocicettina è in grado di modulare l'attività motoria attraverso inibizione della trasmissione dopaminergica e che gli antagonisti del recettore NOP possono essere utili nel trattamento del morbo di Parkinson andando ad incrementare il rilascio di dopamina a livello del *Corpus Striatum*.

Ligandi peptidici

Studi SAR (Structure Activity Relationships) per la Nocicettina sono stati valutati in confronto con i tipici ligandi per i recettori oppioidi MOP, KOP e DOP. Derivati peptidici sono stati preparati, sia mediante sostituzione di singoli aminoacidi (Ala-scanning²² o D-aminoacid scanning²³), che mediante preparazione di peptidi troncati o modificati²⁴. Sono stati poi studiati peptidi chimere tra Nocicettina e Dinorfina A²⁵, dal momento che i due ligandi possiedono lo stesso numero di aminoacidi e che esiste un'elevata omologia di sequenza tra i recettori NOP e il KOP. (Figura 3)

I primi quattro residui di N/OFQ mostrano la stessa sequenza degli altri peptidi oppioidi, eccetto per il primo residuo amminoacidico che è fenilalanina (Phe-Gly-Gly-Phe) e non tirosina (Tyr-Gly-Gly-Phe). Questo aspetto è solo parzialmente responsabile della selettività di N/OFQ per gli altri recettori oppioidi, dal momento

²¹ Marti M, Mela F, Veronesi C et al, *J. Neurosci.* **2004**, 24, 30, 6659-6666.

²² Dooley CT, Houghten RA, *Life Sci.* **1996**, 59, PL 23-29.

²³ Reinscheid RK, Ardati A, Monsma FJ, Civelli O, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 14163-14168.

²⁴ Shimohigashi Y, Datano R, Fujita T et al, *J. Biol. Chem.*, 271, 23642-23645.

²⁵ Guerrini R, Calo G, Rizzi A et al, *Peptides*, **2000**, 21, 923-933.

che il concetto di message-address (dove i primi quattro aminoacidi costituiscono il “message”, quelli successivi costituiscono l’address”) stabilito per i peptidi oppioidi non può essere direttamente esteso a N/OFQ. Infatti, mentre il frammento Tyr-Gly-Gly-Phe mantiene attività sui recettori oppioidi, il più corto frammento della Nocicettina ancora attivo sul NOP è N/OFQ(1-13)-NH₂.

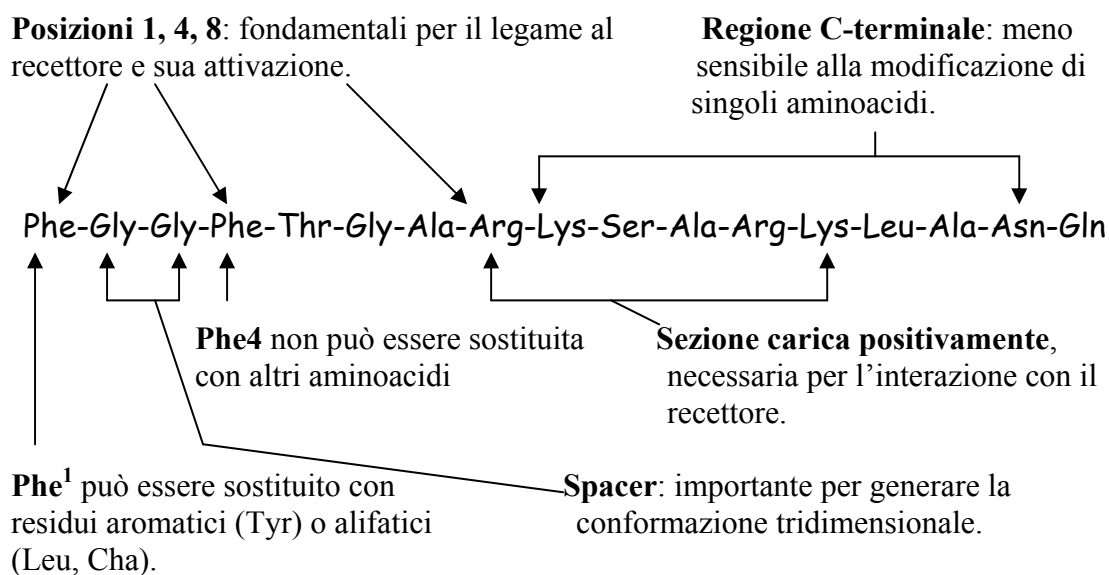


Figura 3: SAR per N/OFQ.

Le posizioni 1, 4, 8 (Phe, Phe, Arg) hanno un ruolo fondamentale nell'interazione con il recettore (Figura 3); la loro sostituzione con altri residui aminoacidici risulta in una considerevole perdita di affinità recettoriale.

I residui in 2 e 3 (Gly, Gly) costituiscono uno “spacer” importante dal punto di vista conformazionale, sensibile all'ingombro sterico e alla configurazione, soprattutto per quanto riguarda l'attività funzionale. Sostituzioni con aminoacidi ingombranti o in configurazione D portano a perdita di affinità o considerevole calo dell'attività biologica.

In generale, la porzione C-terminale risulta essere meno sensibile alla sostituzione di singoli amminoacidi; ciò nonostante la presenza di residui carichi positivamente nelle posizioni 8, 9 e 12, 13 (Arg⁸-Lys⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-Lys¹³) è importante per il mantenimento di una buona affinità recettoriale.

Tra gli analoghi troncati di N/OFQ, i frammenti ottenuti per successiva eliminazione di residui dalla porzione C-terminale conservano buona affinità e attività biologica per il recettore NOP, specialmente se modificati in modo da avere una funzionalità terminale ammidica, la quale sembra proteggere i peptidi dalla degradazione da parte di proteasi. Peptidi più corti del frammento N/OFQ(1-12) mostrano un marcato calo sia di attività che di affinità (Figura 4).

Frammenti ottenuti, al contrario, mediante successiva eliminazione di residui dalla porzione N-terminale mostrano un evidente calo sia di attività che di affinità recettoriale, già a livello dei primissimi amminoacidi.

L'acetilazione e la mono- e di-alchilazione del peptide nella porzione N-terminale portano ad un significativo calo, se non perdita completa, dell'attività biologica, a sottolineare nuovamente l'importanza della funzionalità cationica in posizione 1 per la corretta interazione con il recettore NOP. In modo simile alla Nocicettina, il primo residuo in N/OFQ(1-13)-NH₂ è stato dimostrato avere un importante ruolo sterico: la sostituzione con un amminoacido aromatico (Tyr) o anche alifatico (Cha, Leu) non causa perdita di attività, mentre qualsiasi sostituzione spaziale del gruppo fenilico (D-Phe) porta a inattività.

In posizione 4 sono tollerate, al posto di Phe, solo catene laterali aromatiche (Trp) ma con una significativa perdita di potenza. I residui cationici nelle posizioni 8, 12, 13 (Arg, Arg, Lys) sono necessari per una ottimale interazione con il recettore NOP.

Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Asn-Gln

Troncamento dalla parte C-terminale causa un progressivo calo di affinità e attività biologica; frammenti con ammine terminale sono più attivi. Il più breve frammento attivo è N/OFQ(1-13)-NH₂.

Troncamento dalla parte N-terminale riduce drasticamente sia affinità che attività.

Figura 4: SAR per analoghi troncati di N/OFQ.

L'inserzione di un legame pseudo-peptidico (CH₂-NH₂ al posto di CO-NH₂) tra Phe¹ e Gly² fa sì che il peptide acquisti attività antagonista nei confronti del recettore NOP. Da un punto di vista chimico questa sostituzione elimina un accettore di legame a idrogeno nella molecola e ne aumenta la flessibilità. È stato mostrato che anche in questo caso è richiesta la L-Phe¹, poiché D-Phe porta a un composto inattivo.

Ulteriori modificazioni sono state apportate in posizione 1. In particolare lo shift della catena laterale del primo amminoacido (Phe) dal carbonio all'azoto terminale, generando un residuo di N-benzil glicina, ha portato al composto [NPhe¹]N/OFQ(1-13)NH₂, che agisce come antagonista puro e selettivo per il recettore NOP, anche se meno potente (~5 volte) di [Phe¹Ψ(CH₂NH₂)Gly²]-N/OFQ(1-13)NH₂^{26,27,28}.

Nonostante l'ampia caratterizzazione farmacologica del recettore NOP e del suo ligando endogeno, una completa comprensione delle attività fisiologiche di questo sistema si può ottenere con lo sviluppo di agonisti e antagonisti non-peptidici potenti e selettivi, in grado di chiarire i molti e a volte contraddittori effetti della Nocicettina e permettere una valutazione realistica dei potenziali terapeutici associati alla modulazione del recettore NOP.

²⁶ Salvadori S., Guerrini R., Calò G., Regoli D., *Il Farmaco*, **1999**, 54, 810-825

²⁷ Calò G., Guerrini R., Rizzi A., Salvadori S., Regoli D., *Br. J. Pharmacol.*, **2000**, 129, 1261-1283

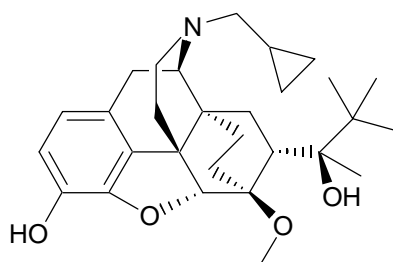
²⁸ R. Guerrini, *et. al.*; *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3956-3964.

Agonisti e antagonisti non-peptidici del recettore NOP

Ligandi a struttura morfinaica

Le prime molecole non-peptidiche scoperte con affinità per il recettore NOP sono nate prendendo come riferimento ligandi dei recettori oppioidi classici, in modo particolare quelli a struttura morfinaica. Ciononostante, la necessità di ottenere una maggior selettività per il NOP rispetto ai recettori oppioidi classici ha portato alla ricerca di più semplici strutture piperidiniche.

La Buprenorfina (**1**, Figura 5) è un parziale MOP agonista con una modesta affinità per il recettore NOP ($K_i = 285$ nM), introdotto da Reckitt & Colman²⁹ nel 1982 per il trattamento del dolore; si ritiene che la sua efficacia in questo sia mediata dal recettore NOP stesso.



1. Buprenorfina

Figura 5

Una formulazione in pastiglia sublinguale è stata lanciata in Francia nel 1996 per il trattamento della dipendenza da eroina e da droghe illegali in genere, e per la riduzione dei sintomi associati alla sindrome da astinenza. Studi sperimentali hanno dimostrato che la somministrazione cronica di Buprenorfina attenua gli effetti dovuti ad assunzioni ripetute di oppioidi e riduce l'autosomministrazione di eroina tanto da risultare, in studi clinici, efficace quanto il Metadone nella disintossicazione da oppiacei³⁰.

²⁹ Huang P, Kehner GB, Cowan A et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 297, 2, 688-695.

³⁰ Montoya ID, Gorelick DA, Preston KL, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2004**, 75, 1, 34-48.

Nalfurafine (**2**, TRK-820), un agonista KOP e un antagonista del recettore NOP, in fase di sviluppo dal 2003 in Europa e in Fase II in Giappone per il trattamento del prurito ha mostrato elevata affinità per il recettore KOP con un valore di K_i di 3.5 nM e una modesta affinità per il NOP (K_i = 380 nM). TRK-820 non ha effetti di per sé sull'accumulo di cAMP in cellule CHO esprimenti il recettore NOP ma, ad elevate concentrazioni, antagonizza in modo significativo l'inibizione dell'accumulo di secondo messaggero indotto da Nocicettina. Ha inoltre una potenza 4000 volte maggiore rispetto alla morfina sia su ileo di cavia che su vaso deferente di topo (IC_{50} = 4.8 e 36 pM rispettivamente).

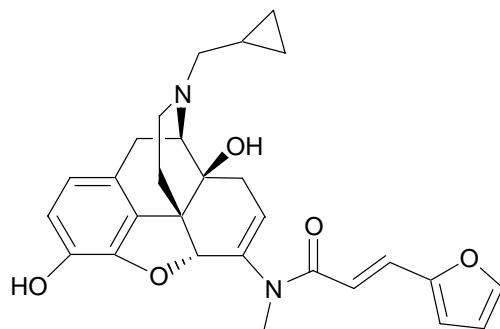
Il Naloxone benzoilidrazone (**3**, NalBzOH) è un derivato dell'antagonista MOP, Naloxone, il primo ligando non-peptidico descritto in letteratura. Esso possiede una considerevole affinità per il recettore NOP ed interagisce con i recettori MOP, KOP₁ e KOP₃ con un profilo misto agonista/antagonista³¹. Studi più recenti hanno evidenziato una stretta relazione tra il sottotipo KOP₃ e la biologia molecolare del NOP. Seguendo questi studi, diversi gruppi di ricerca hanno utilizzato NalBzOH per studiare il sistema della Nocicettina *in vitro* e *in vivo*. In particolare, è stato mostrato che NalBzOH agisce come antagonista competitivo degli effetti indotti dal ligando endogeno nel vaso deferente di ratto e riduce l'accumulo di cAMP da esso indotto. Studi comportamentali hanno evidenziato che il NalBzOH inibisce completamente l'iperalgnesia e l'ipolocomozione indotte da Nocicettina. In topi "wild-type" il composto induce antinocicezione senza modificare l'attività locomotoria. Al contrario, in topi mancanti del gene per il recettore NOP, non si osservano effetti sulla nocicezione e sulla locomozione, suggerendo che il sistema prende parte nella regolazione fisiologica della soglia nocicettiva ma non è coinvolto nella modulazione della locomozione.

Partendo da tale molecola Gruenental ha scoperto una nuova serie di derivati come il composto **4** (Figura 6), caratterizzati da un anello indolico o benzofuranico, utili per il trattamento di dolore, depressione, ansia e altri disturbi.

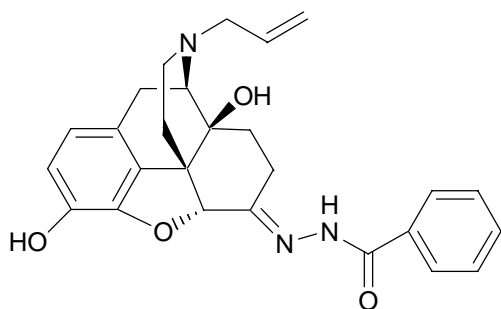
Studi SAR hanno dimostrato che i composti di tale serie sono agonisti o antagonisti NOP con valori di K_i per il binding al recettore che variano da 0.45 a 1.08 μ M. in funzione del tipo di sostituzione sull'azoto indolico e della presenza o meno di una funzionalità ossidrilica al carbonio C-3 e C-4.

³¹ Gistrak MA, Paul D, Hahn EF et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1989**, 251, 2, 469-476.

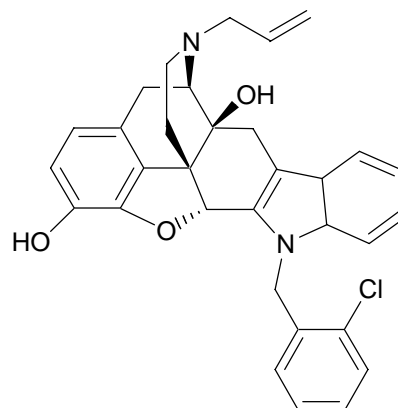
Successive modificazioni del NalBzOH focalizzate sulla sostituzione del gruppo benzoilico con una funzionalità diclorofenilacetica (una modificazione classica per gli agonisti KOP di prima generazione), ha portato Pfizer a proporre derivati dell'acido idrossammico di struttura (5) che hanno mostrato una significativa attività agonista MOP, KOP e DOP e una buona attività antagonista sul recettore NOP.



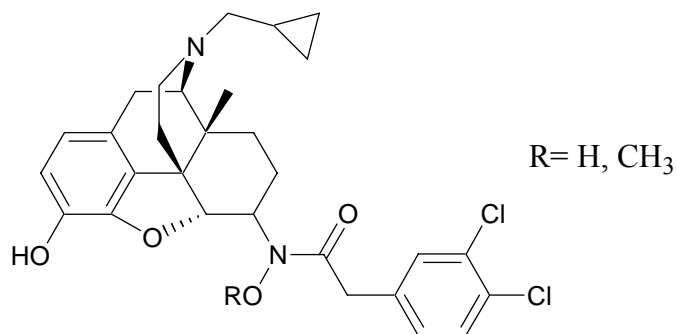
2. Nalfurafine (TRK-820)



3. Naloxone benzoilidrazone (NalBzOH)



4. Gruenthal



5. Derivati Pfizer

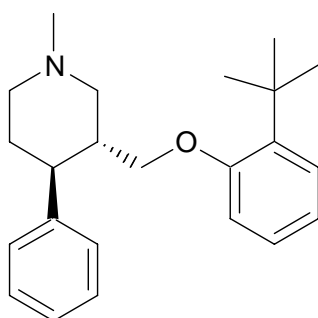
Figura 6

Ligandi a struttura 4-aril-piperidinica

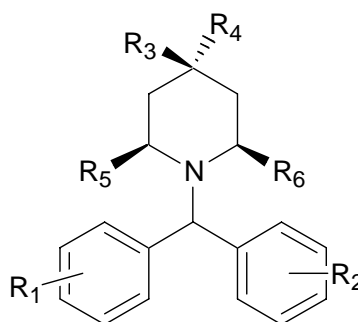
Nel 2001 Novo Nordisk ha introdotto l'uso della serie delle (3-arilossimetil)-4-arilpiperidine, antagonisti della Nocicettina, per il trattamento di vari disturbi tra cui ipotensione, emicrania, morbi di Alzheimer e Parkinson, infarto, disturbi nella memoria e apprendimento, dolore, schizofrenia, depressione, alcolismo, dipendenza da sostanze stupefacenti, disturbi del metabolismo e obesità. Il composto (6) NNC-63-0780 si è dimostrato essere antagonista della Nocicettina con una K_i di 27 nM con una selettività 290 volte superiore per il NOP rispetto al recettore MOP.

Successivamente ricercatori della Schering Corp., hanno introdotto una nuova classe di agonisti e antagonisti NOP (7) costituita da 4-aril-4-idrossi-piperidine sostituite. Altre piperidine 4-sostituite come le benzoimidazopiperidine e gli spiperoni sono stati introdotti rispettivamente da Banju e Roche. Un gruppo diarilmetilico più o meno sostituito è il sostituito d'elezione sull'azoto piperidinico e, aspetto interessante, le piperidine non-spiraniche hanno mostrato maggior affinità per il recettore NOP delle spiro-piperidine. Due esempi di agonisti NOP (8 e 9) appartenenti a tale serie sono riportati di seguito. In particolare (9) ha mostrato la miglior affinità sul recettore NOP ma non la più alta potenza agonista.

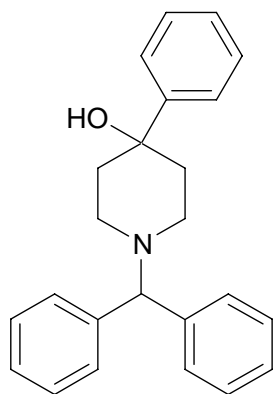
Nel 2003 studi SAR di ricercatori Schering hanno ulteriormente esteso questa classe di composti, mostrando la possibilità di introdurre sostituenti eteroarilici quali pirimidile, pirazolile o pirazinile, mantenendo l'affinità recettoriale.



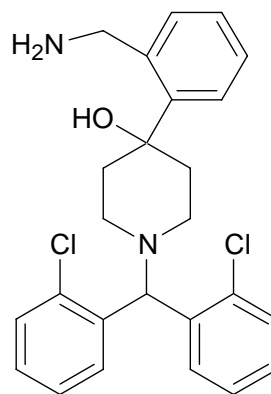
6. NNC-63-0780



7. Serie dei composti Schering Comp.



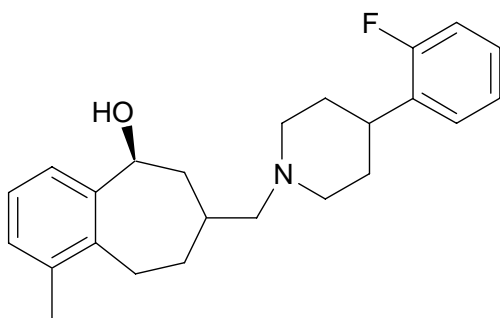
8. Schering K_i (hNOP)= 13 nM



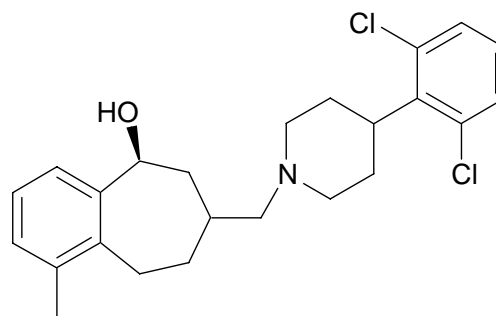
9. Schering K_i (hNOP)= 0.6 nM

Figura 7

Nel 2001 ricercatori di SmithKline Beecham hanno pubblicato una serie unica di piperidine utili come analgesici per il trattamento di diversi stati dolorosi e per vari disturbi del SNC. Queste benzosuberilpiperidine, tra cui i composti (**23**) e il potente SB-612111 (**24**) (Figura 8), che presenta una pA_2 di 8.20^{32} , hanno mostrato elevata affinità di legame (K_i subnanomolare) e selettività 100 volte superiore rispetto ai recettori oppioidi classici.



23.



24. SB-612111

Figura 8

³² Zaratini PF, Petrone G, Sbacchi M, Garnier M, Fossati C, Petrillo P, Ronzoni S, Giardina GA, Scheideler MA, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, 308, 454-461.

Spiro-piperidine

Il Naloxone benzoilidrazone (**2**, NalBzOH) e il Lofentanil (**10**) (Figura 9), agonista MOP con una considerevole affinità anche per il recettore NOP ($K_i = 24$ nM), sono stati tra i primi ligandi non-peptidici del recettore NOP descritti in letteratura. Ciò nonostante, essi non sono stati ulteriormente sviluppati a causa della mancanza di selettività per il NOP rispetto ai recettori oppioidi classici. L'introduzione della porzione 1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-4-one ha consentito la modulazione della potenza mentre la selettività è stata ottenuta mediante "ottimizzazione SAR" del "lead compound" (**11**) (Figura 9). La sostituzione del 5,8-dicloro-1,2,3,4-tetraidronaftalen-2-il con un residuo tricyclico acenaftenil ha portato a una selettività circa 10 volte superiore per il NOP rispetto al MOP e maggiore verso gli altri recettori oppioidi KOP e DOP. La separazione dell'enantiomero puro (R), denominato Ro 65-6570 (**12**), ha permesso di ottenere un composto più potente e selettivo. Il successivo analogo Ro 64-6198 (**13**), in cui l'azoto della piperidina è sostituito con un residuo (2,3,3a,4,5,6)-esaidro-1H-fenalen-1-il ha dimostrato di essere un ligando molto potente del recettore NOP (hNOP binding affinity, $pK_i = 9.4$) con una selettività 100 volte superiore rispetto ai recettori oppioidi classici.

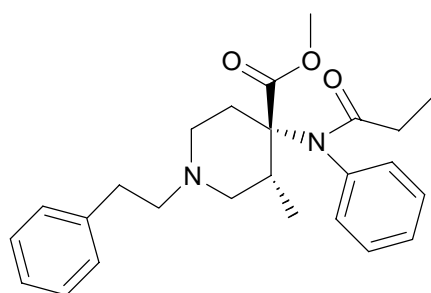
Ro 64-6198 è risultato un agonista pieno del NOP quando testato per la sua potenza nello stimolare il legame GTP γ S ($pEC_{50} = 7.41$) e nell'inibire l'accumulo di cAMP foskolin-stimolato ($pEC_{50} = 9.49$). Da test in vivo, Ro 64-6198 ha mostrato effetti di tipo ansiolitico dose-dipendenti in una serie di modelli validati per diversi stati d'ansia³³. Somministrato a livello sistemico, il composto ha un'efficacia e una potenza paragonabili a quelle degli ansiolitici benzodiazepinici come diazepam e alprazolam, senza avere, alle dosi ansiolitiche, le proprietà anti-panico, anticonvulsivanti e gli effetti sulle capacità motorie e cognitive, caratteristiche di tali farmaci.

Una successiva pubblicazione di Roche riguarda i derivati 8-alchilati (**15**) e (**16**) che differiscono nella natura della funzionalità spiro-piperidinica. Questi due composti legano il recettore NOP con pK_i di 8.6 e 9.4 rispettivamente. Tutti i composti della

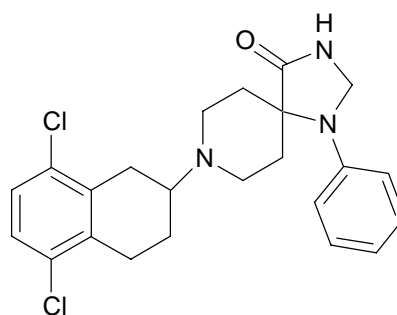
³³ Jenck F, Wichmann J, Dautzenberg FM et al, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **2000**, 97, 4938-4943.

classe sono agonisti e/o antagonisti del recettore NOP utili in molti disturbi ad esso associati, tra cui ansia, trauma, epilessia, convulsioni e dolore.

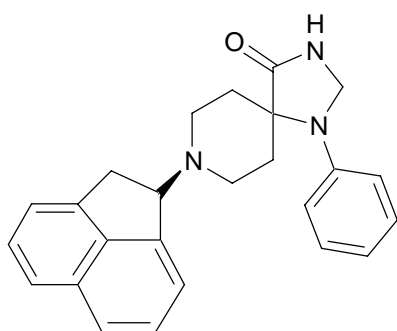
La combinazione di modificazioni sia all'anello spiro-piperidinico che a livello del sostituente sull'azoto piperidinico ha portato ai composti (17), (18) e (19), antagonisti dimostratisi utili per il trattamento dei disturbi a memoria e apprendimento, disturbi psichiatrici e neurologici, epilessia e convulsioni, sindrome da astinenza, dolore acuto o cronico, disturbi alla pressione e metabolici, quali l'obesità.



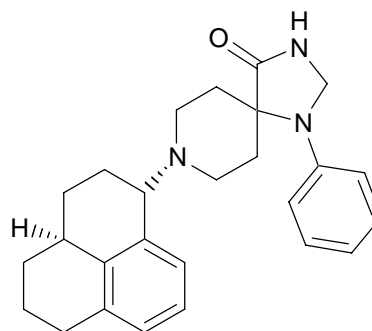
10. Lofentanil



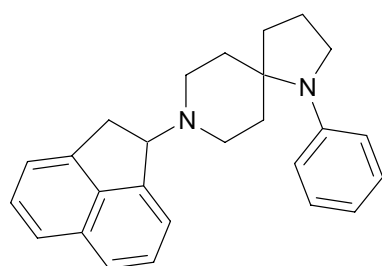
11. Lead compound



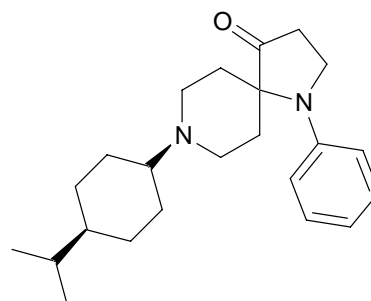
12. Ro 65-6570



13. Ro 64-6198



14. Derivato Roche



15. Derivato Roche

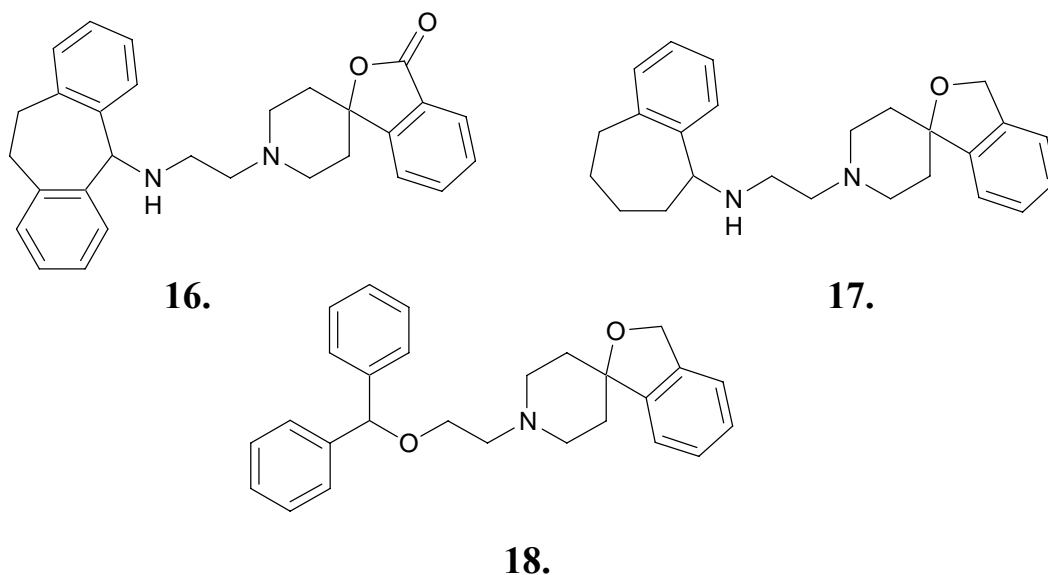
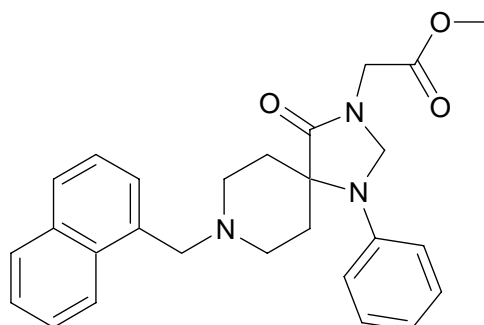


Figura 9

I centri chirali presenti nei potenti derivati Roche determinavano un considerevole incremento della complessità sintetica ed un aumento dei costi di produzione. Per questo motivo sia Hoffmann-La Roche che altre compagnie quali Novo Nordisk, Pfizer e Banju, hanno investigato derivati 1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4,5]decanonici con sostituenti più semplici e privi di chiralità all'azoto piperidinico. Sostituenti quali cicloottilmetile, (1-naftil)metile e 4-(isopropil)cicloesile si ritrovano in altri "scaffolds" e si sono mostrati in grado di conferire elevata affinità NOP. Un esempio è offerto dal composto (19), NNC-63-0532³⁴, brevettato da Novo Nordisk, contenente un sostituito achirale, potente agonista del recettore NOP (EC_{50} = 305 nM) con selettività (K_i = 7.3 nM) 12 volte superiore rispetto al MOP.



19. NNC-63-0532

Figura 10

³⁴ Thomsen C, Hohlweg R, *Br. J. Pharmacol.*, 2000, 131, 903-908.

Successivamente Banju ha pubblicato una serie di triazaspirodecanoni con attività antagonista e/o agonista a seconda del sostituente sull'anello piperidinico. Rispetto ai ligandi Roche, queste strutture sono caratterizzate da un nucleo centrale simile ma da un diverso punto di giunzione tra la funzionalità imidazolinonica e l'anello piperidinico. La presenza del sostituente cicloottilmetilico in questi 1,4,8-triazaspiro[4,5]decanoni, come nel composto **(20)** (Figura 11) ha portato a derivati ad attività antagonista verso il recettore NOP utili per il trattamento di dolore, obesità, morbi di Alzheimer e Parkinson, demenza, depressione, ipotensione e diabete insipidus.

Altri analoghi, tra cui il più potente è **(21)** ($IC_{50} = 0.2$ nM; $EC_{50} = 1.2$ nM da saggio $GTP\gamma S$) (Figura 11), sono agonisti NOP utili per il trattamento del dolore, schizofrenia, ansia, abuso da droge, disturbi neurodegenerativi, disturbi cerebrali, disfunzioni gastrointestinali e urinarie. È interessante notare come la sostituzione della porzione cicloalchilmetilica sull'azoto piperidinico con un gruppo ramificato alifatico porta, nella stessa serie, all'inversione di attività funzionale da antagonismo **(20)** ad agonismo **(21)**. Questo aspetto, frequentemente osservato, può essere associato a fattori sterici: sostituenti ingombranti come il cicloottilmetile possono occupare una larga tasca lipofila che costituisce un fattore determinante per l'attività agonista/antagonista dei ligandi NOP.

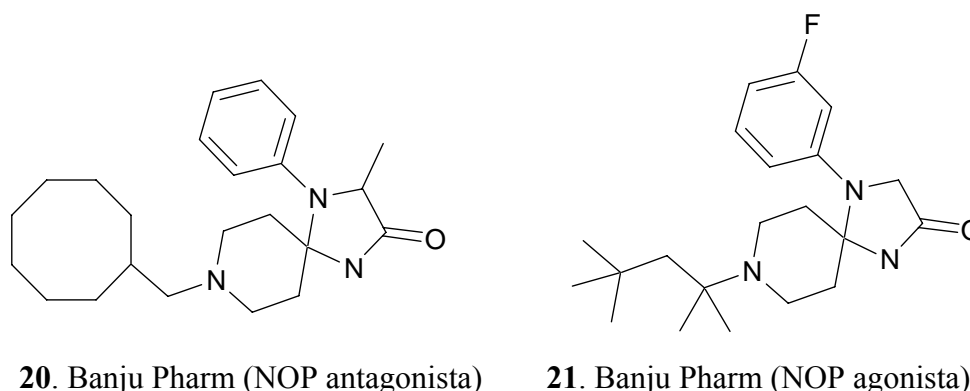
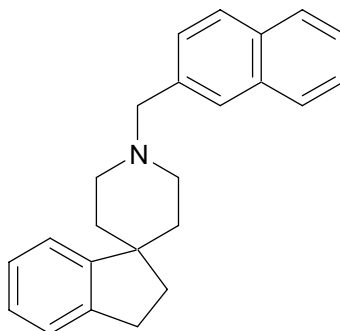


Figura 11

Ispirandosi alle strutture spirobenzofuraniche e spiroindaniche introdotte da Roche, Banju, Takeda, Euro-Celtic e Pfizer hanno pubblicato una serie molto simile di

composti ad attività antagonista. In particolare Euro-Celtic ha riportato una serie di composti utili come analgesici per la terapia del dolore. Il più potente di questi, (22), ha un valore di K_i per il recettore NOP di 35 nM e una selettività 16.5 volte superiore rispetto al recettore MOP.

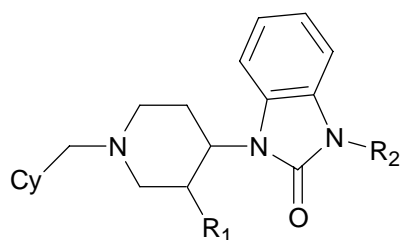


22. Euro-Celtique

Figura 1

Benzoimidazolil-piperidine

Banju è stata la prima compagnia a introdurre la classe di composti benzoimidazolinonici come nuovi antagonisti non-peptidici del recettore NOP di formula generale (25) (Figura 13).



Cy= Cicloetil, Cicloetil, Ciclononil

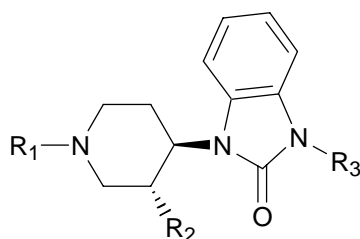
R_1 = H, CH₃, COOEt, CH₂OH, CH₂N(CH₃)₂, (CH₂)₃OH

R_2 = H, Et, i-Pr, CH₂CHF₂, CH₂CH₂OH

25.

Figura 13

Studi di relazione struttura attività (SAR) in questa serie di composti hanno permesso di individuare il primo potente e selettivo antagonista per il recettore NOP. Nella Tabella 1 sono mostrate le sostituzioni adottate dai ricercatori di Banyu per approdare a tale composto.



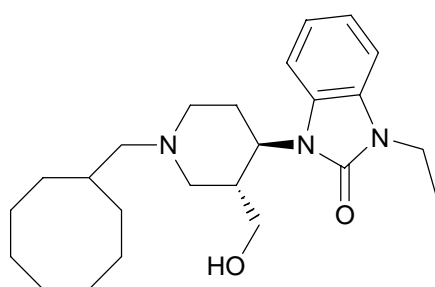
Composto	R ₁	R ₂	R ₃	Binding (IC ₅₀ , nM)				GTPγS	
				ORL-1	μ	κ	δ	Antago IC ₅₀ , nM	Ago EC ₅₀ , nM
26	CH ₂ Ph	H	H	200	1700	110	>10 ⁴	>10 ⁴	6900
27	CHMe (2-Cl)Ph	H	H	5.9	43	32	1900	>10 ⁴	25
28	CH ₂ c-Oct	H	H	6.8	780	12	>10 ⁴	270	>10 ⁴
29	CH ₂ c-Oct	H	Et	6.8	950	440	>10 ⁴	20	>10 ⁴
30 (3R,4R)	CH ₂ c-Oct	CH ₂ OH	Et	2.3	2200	1400	>10 ⁴	5.6	>10 ⁴
31 (3S,4S)	CH ₂ c-Oct	CH ₂ OH	Et	820	3300	2600	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴

Tabella 1

Il composto denominato J-113397 (**30**) caratterizzato da un nucleo piperidinico chirale con un ingombrante frammento cicloottilmetilico all'atomo di azoto e sostituito in posizione 4 da un sistema benzimidazolonico (Figura 14) si è dimostrato

essere il migliore antagonista per il recettore NOP con affinità di legame nanomolare ($K_i = 1.8$ nM), attività antagonista (saggio GTP γ S, $EC_{50} = 5.3$ nM) e selettività elevata per il NOP rispetto ai recettori MOP (550 volte), KOP (355 volte) e DOP (> 1000 volte). La stereochimica assoluta di J-113397 (l'isomero 3R,4R) è requisito essenziale per le potenti attività recettoriali. L' enantiomero (**31**) (3S,4S) J-112444, ha una affinità 400 volte inferiore ($K_i = 820$ nM) per il recettore NOP e nessun effetto in saggi funzionali, dimostrando l'importanza dei requisiti stereochimici in questa serie di composti.

Una approfondita caratterizzazione del profilo farmacologico *in vitro* e *in vivo* è stata pubblicata al fine di meglio comprendere il suo meccanismo d'azione^{35,36}. Nei test *in vitro*, J-113397 è in grado di antagonizzare l'effetto inibitorio della Nocicettina sull'accumulo di cAMP foskolin-stimolato in cellule CHO esprimenti il recettore NOP con un valore di pA_2 di 8.2. Testato *in vivo*, J-113397 inibisce l'iperalgia indotta da somministrazione icv di Nocicettina nel saggio "tail-flick" sul topo; attenua la tolleranza alla morfina quando somministrato sottocute o per via intratecale; è risultato anche in grado di abolire parzialmente o completamente la sindrome da astinenza alla morfina indotta da somministrazione di Naloxone. Questa scoperta ha dato grande supporto alla possibilità di utilizzare gli antagonisti NOP per alleviare gli effetti collaterali associati a trattamento a lungo termine con morfina di pazienti malati di cancro.



GTP S Antagonista : $IC_{50} = 5.6$ nM
 Agonista : $EC_{50} = 104$ nM

Binding $IC_{50} = 2.3$ nM NOP
 = 2200 nM DOP
 = 1400 nM KOP
 = 104 nM MOP

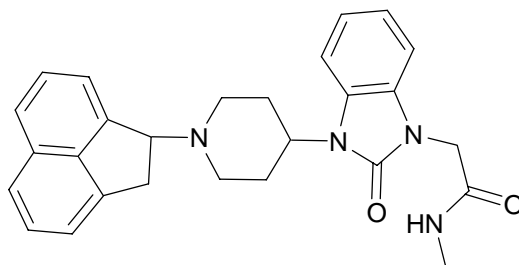
30. J-113397

Figura 14

³⁵ Ozaki S, Kawamoto H, Itoh Y, Miyaji M, Iwasawa Y, *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**, 387, R17-R18.

³⁶ Ozaki S, Kawamoto H, Itoh Y et al, *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**, 402, 45-53.

Nel 2003, Mitsubishi Pharma ha pubblicato una nuova serie di benzoimidazolinoni agonisti NOP per il trattamento dei disturbi del sonno tra cui il composto W-212393 (**32**) (Figura 15), che presenta un acenaftile sulla piperidina come nel composto Ro 65-6570. Questa considerazione costituisce un ulteriore supporto all'idea che il sostituente sulla piperidina giochi un ruolo importante nella serie dei benzoimidazolinoni, nel discriminare tra attività antagonista (cicloottilmetile nei composti Banju) e agonista (acenaftile nella serie Mitsubishi).



32. W-212393

Figura 15

Chinoline e chinazoline

Nel 1999 Japan Tobacco ha pubblicato una serie di composti basati su una struttura chinolinica ad attività antagonista, utili come analgesici tra cui il derivato 4-amino-6-(benzoilamino)chinolina JTC-801 (**33**)^{37,38,39,40} (Figura 16).

JTC-801 possiede moderata affinità per il NOP ($K_i = 45$ nM) e una discreta selettività rispetto ai recettori MOP, KOP e DOP (12, 129, 1040 volte rispettivamente). L'antagonismo funzionale è stato confermato dal valore di IC_{50} di 2.58 μ M nel contrastare l'inibizione dell'accumulo di cAMP indotta dalla Nociceptina. JTC-801 ha attività antinocicettiva in diversi modelli di dolore acuto ed è risultato efficace contro l'allodinia indotta dal ligando endogeno. Esso mostra poi, *in vivo*, un effetto

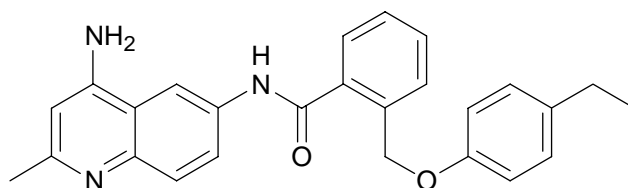
³⁷ H. Shinkai, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 43, 4667-4677

³⁸ Yamada H, Nakamoto H, Suzuki Y, *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, 135, 2, 323-332.

³⁹ Muratini T, Minami T, Enomoto U *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 303, 1, 424-430.

⁴⁰ Japan Tobacco, INC., : WO9948492 (1999).

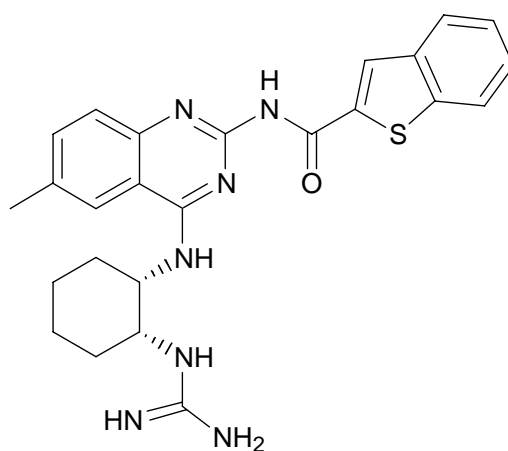
analgesico a concentrazioni di 1mg/Kg per *os*, il quale non viene bloccato dalla somministrazione di Naloxone, dimostrando chiaramente che l'azione è mediata da NOP e non dai recettori oppioidi classici.



33. JTC-801

Figura 16

Nel 2001, Nippon Shinyaku ha pubblicato una nuova classe di derivati chinazolinici in grado di legare il recettore NOP utili nel trattamento del dolore. Tali composti mostrano somiglianze con le strutture chinoliniche della Japan Tabacco e sono caratterizzate da un gruppo basico guanidino-alcil amminico in posizione 4 e un fenile o un eterociclo legato attraverso un linker etilidenico o uno carbossamidico in posizione 2 dell'anello chinazolinico. Un esempio è il composto (34) (Figura 17), che deriva da ottimizzazione degli studi SAR sulla chinazolina e presenta un metile in C-6, una *cis*-(2-guanidino-cicloesilamina) in C-4 e un benzotiofene-2-carbonilamino in C-2⁴¹. Tale derivato ha mostrato una potenza nanomolare nei saggi di binding per il NOP (K_i tra 0.15 nM e 0.67nM) e una eccellente selettività (1900 volte) rispetto al recettore MOP.



34. Nippon Shinyaku

⁴¹ Nippon Shinyaku Co., LTD, WO03091224 (2003).

Figura 17

Recentemente i ricercatori del Banyu Tsukuba Research Institute hanno identificato una nuova classe di composti con struttura spiropiperidinica ad attività NOP antagonista⁴². Studi SAR effettuati su una libreria di 480 molecole hanno dimostrato che gli elementi strutturali fondamentali per l'attività biologica sono i 2 anelli aromatici e il gruppo amminico protonabile nella porzione piperidinica.

In Figura 18 sono riportati alcuni dei composti sintetizzati dai ricercatori giapponesi. Da notare la diversa potenza dei derivati (37) e (38) che differiscono solamente per la chiralità sull'anello pirrolidinico.

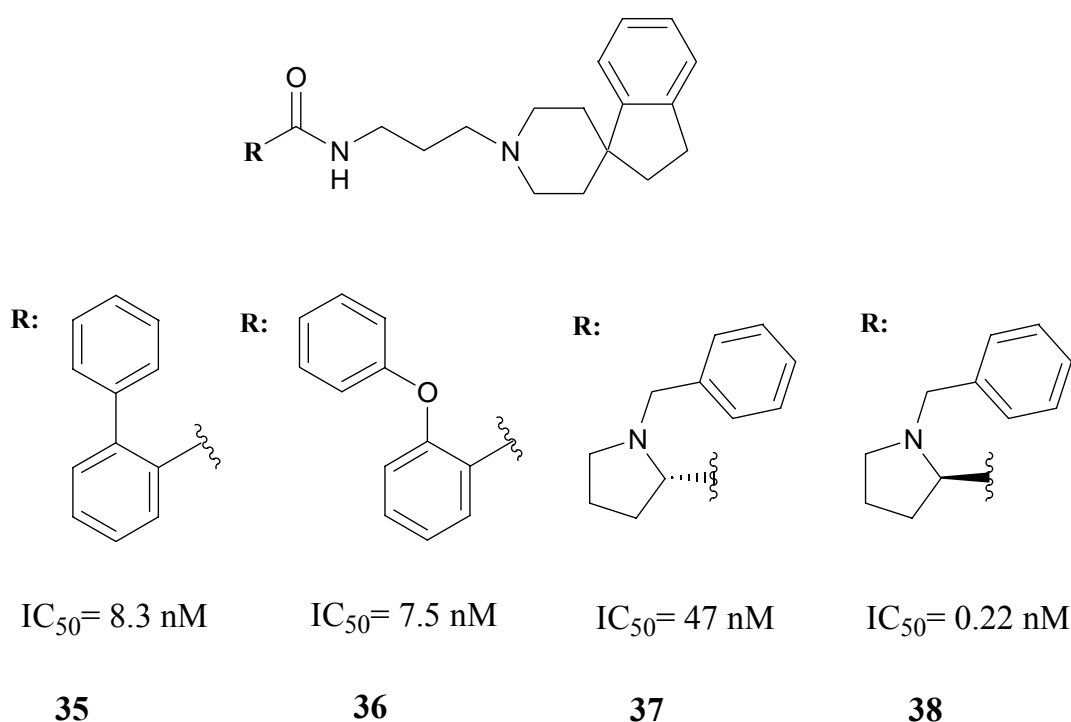
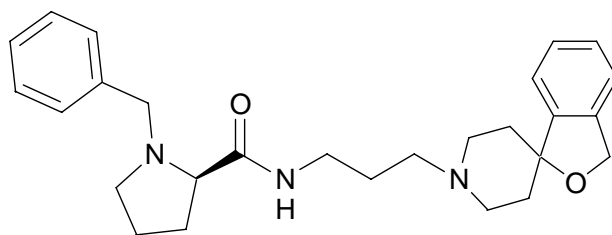


Figura 18

Il composto (38) presenta un'attività antagonista 12 volte superiore a quella di J-113397. La sostituzione nel composto (38) del nucleo spiropiperidinico con una struttura isobenzofuran-spiropiperidinica (39) ha portato all'identificazione di un nuovo "lead compound", potente antagonista NOP in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e di manifestare azione centrale in seguito a somministrazione periferica (Figura 19).

⁴² Y. Goto *et. al.*; *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 847-849.



39.

Binding	$IC_{50} = 0.27 \text{ nM}$ NOP	GTPγS	Antagonista: $IC_{50} = 0.15 \text{ nM}$
	$= 6700 \text{ nM}$ MOP		Agonista : $EC_{50} = >10^4 \text{ nM}$
	$= 2500 \text{ nM}$ KOP		
	$= >10^4 \text{ nM}$ DOP		

Figura 19

SCOPO

La distribuzione del recettore NOP a livello del cervello e del SNC, ma anche in tutto il resto del corpo, suggerisce una varietà di potenziali usi terapeutici che possono essere sviluppati con successo al fine di ottenere agonisti e antagonisti.

Possibili indicazioni primarie includono ansia, dolore, depressione, memoria, disturbi cardiaci, incontinenza urinaria, tosse, prurito e molti altri disturbi. Questo grande valore terapeutico ha portato molti gruppi di ricerca a investigare tale sistema e a ricercare piccole molecole non-peptidiche ad attività agonista o antagonista. Ne sono seguite un grandissimo numero di pubblicazioni scientifiche associate al recettore NOP. Ciononostante, sono pochissimi, ad oggi, i composti in fase di valutazione clinica per la somministrazione nell'uomo.

La sintesi di nuovi ligandi del recettore NOP prendendo come riferimento le strutture di composti ad attività antagonista noti in letteratura ha rappresentato lo scopo di questo lavoro con l'obiettivo di ottenere derivati di interesse farmaceutico e di individuare un nuovo modello farmacoforico di antagonismo sul recettore NOP.

Abbiamo innanzitutto considerato come "lead compound" la struttura piperidinica di due composti, l'antagonista NOP J-113397 (**40**), preparato seguendo una procedura sintetica alternativa a quella di Kawamoto⁴³ e pubblicata da Pollini *et.al.*⁴⁴; e l'analogo achirale Trap-101 (**41**) pubblicato da Trapella *et.al.*⁴⁵. Quest'ultimo derivato, privo di chiralità presentando un doppio legame nelle posizioni C-3 e C-4 dell'anello piperidinico, con conseguente semplificazione del processo sintetico, ha mostrato un'attività farmacologica paragonabile al (\pm)J-113397 (TRAP-101: $pA_2=7.75$; (\pm)J-113397 $pA_2=7.79$).

⁴³ Kawamoto *et al.*, *J Med Chem.*, **1999**, 42, 25, 5061-3.

⁴⁴ C. De Risi, G.P.Pollini, C. Trapella, I. Peretto *et.al.*; *Bioorganic & Med. Chem.*, 9, **2001**, 1871-1877.

⁴⁵ Trapella C, Guerrini R, Piccagli L, Calo G, Carra G, Spagnolo B, Rubini S, Fanton G, Hebbes C, McDonald J, Lambert DG, Regoli D e Salvadori S, *Bioorg Med Chem.*, **2006**, 14, 3, 692-704.

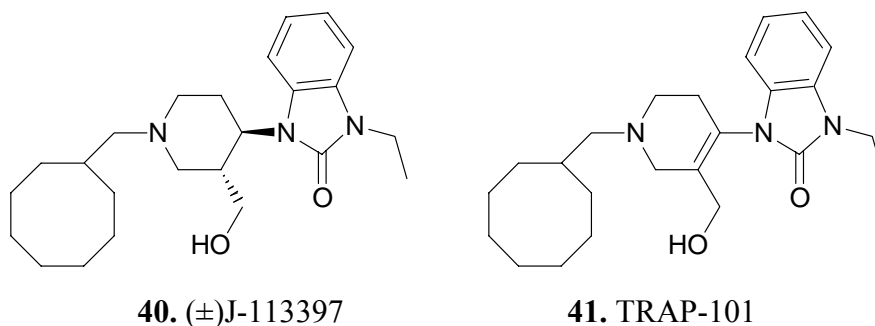
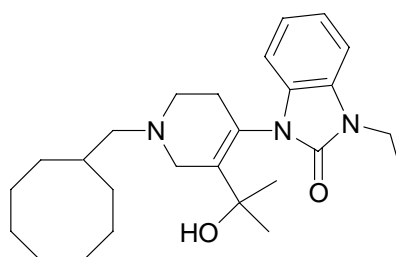


Figura 20

Sono stati inizialmente preparati analoghi modificati a livello del sostituente ingombrante cicloottilmetilico o della funzionalità idrossimetilica presente in C-3 sull'anello piperidinico.

È stato osservato che il composto TRAP-101 possiede una minor attività farmacologica *in vivo* e si è pensato che questo fosse associato ad un più rapido metabolismo a livello della funzionalità idrossimetilica al carbonio C3 dell'anello piperidinico. È stato quindi sintetizzato il derivato (**42**) (Figura 21) con una funzionalità alcolica terziaria non suscettibile di ossidazione enzimatica al posto del gruppo idrossimetile. Tale caratteristica potrebbe determinare un incremento della stabilità metabolica del composto.



42.

Figura 21

Sono poi stati preparati derivati di natura chimerica prendendo in considerazione la porzione 4-(2,6-dicloro-fenil)piperidinica del potente antagonista NOP della SmithKline Beecham SB-612111. È stato introdotto, sull'azoto piperidinico il sostituente ingombrante cicloottilmetilico presente nel J-113397, o strutture di tipo

chinolinico o naftolico in riferimento ad un altro potente antagonista del recettore NOP, il composto della Japan Tobacco JTC-801 (composti (43)-(49), Figura 22).

In tutte le molecole progettate abbiamo considerato l'introduzione di una funzionalità ossidrilica al fine di confermare il ruolo da essa giocato nell'interazione con il recettore mediante formazione di un legame a idrogeno all'interno della tasca recettoriale.

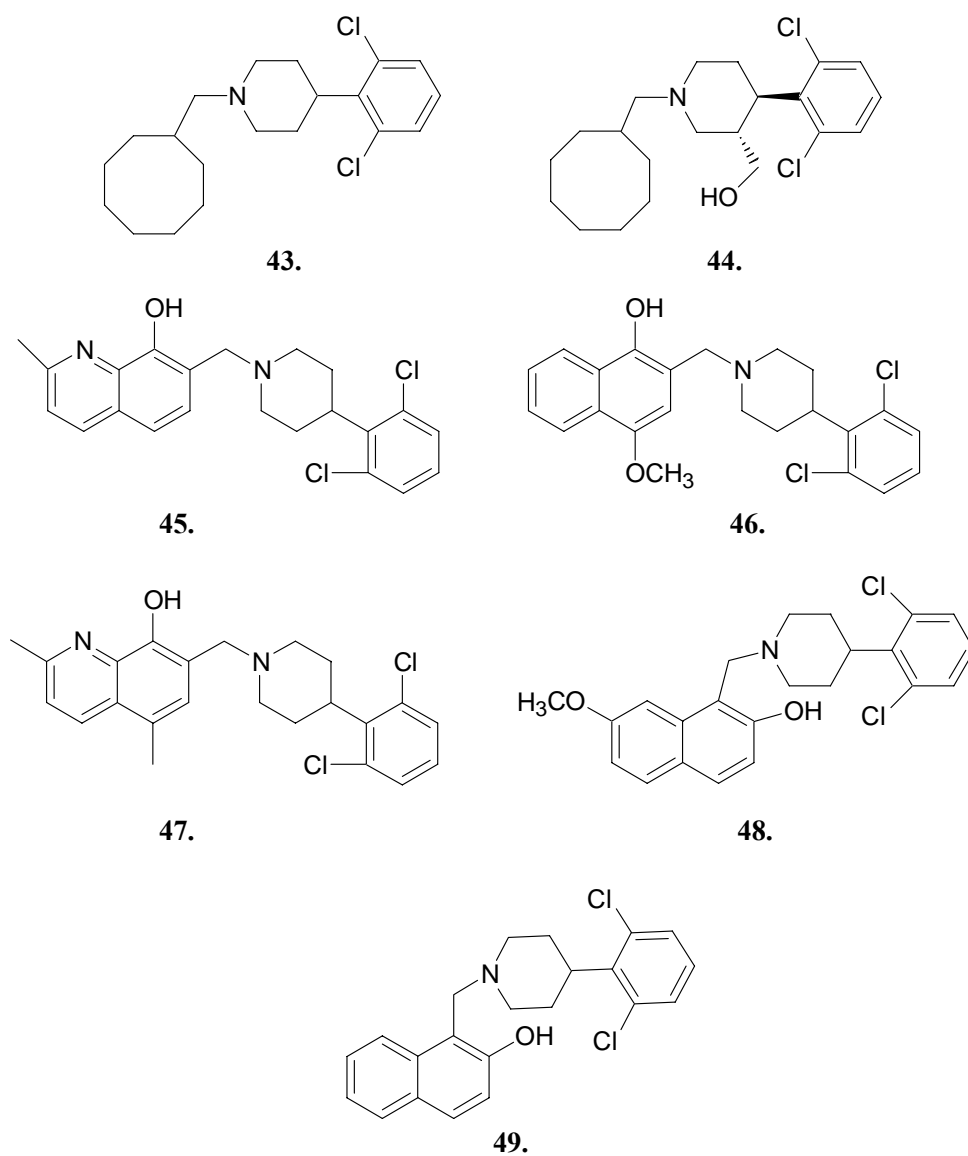


Figura 22

Ci siamo poi occupati di mettere a punto un nuovo modello farmacoforico di antagonismo sul recettore NOP prendendo come riferimento gli studi pubblicati da F.I. Carroll^{46,47} riguardanti composti attivi sui recettori oppioidi classici.

Sono stati quindi preparati derivati tetraidro-piridinici contenenti sostituenti diversi nelle posizioni 2 e 6 dell'anello aromatico e sostituenti ingombranti, benzilici o cicloottilmetilici sull'azoto piperidinico come nei composti (50)-(57) (Figura 23).

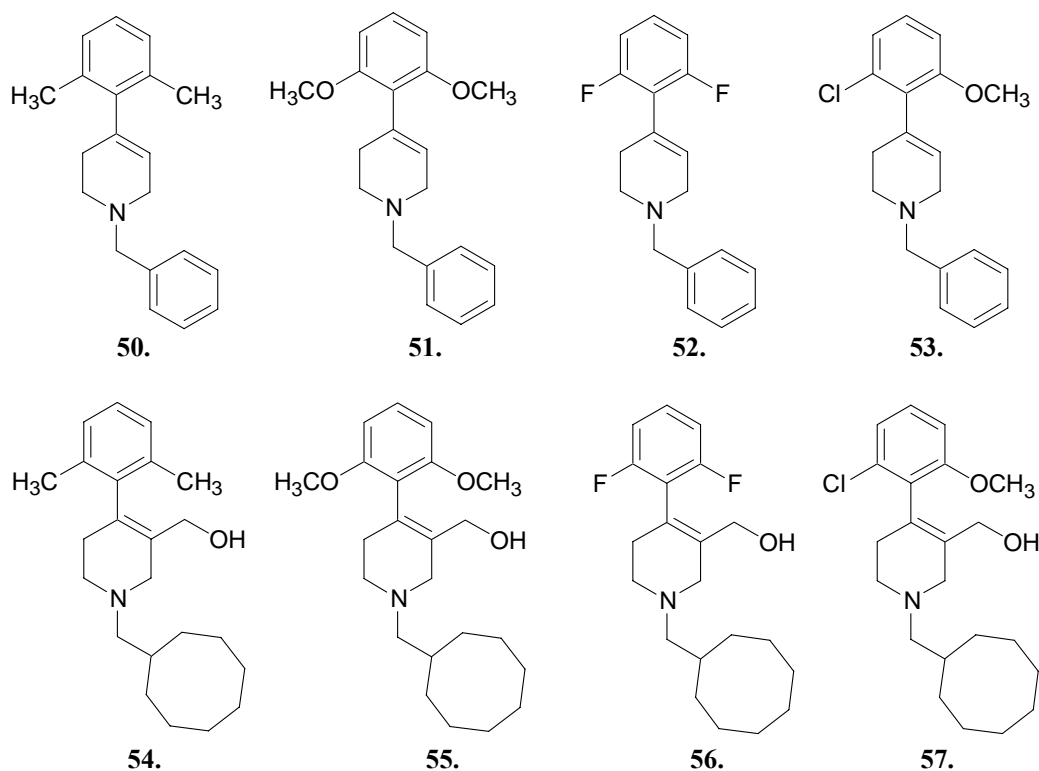


Figura 23

Sostituendo il message per i recettori oppioidi (3-idrossi-fenile) con un message per il NOP (2,6-dimetil-fenile) e introducendo sull'azoto un sostituito ingombrante benzilico o cicloottilmetilico, importante per l'attività antagonista in questo sistema, sono stati individuati i composti (59) e (60), (Figura 24) come nuovi esempi a struttura morfologica analoghi a quelli di Carroll a potenziale attività sul recettore NOP.

⁴⁶ J.B. Thomas, X. Zheng, F.I. Carroll et al, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 4143-4149.

⁴⁷ J.B. Thomas, R.N. Atkinson F.I. Carroll et al, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3524-3530.

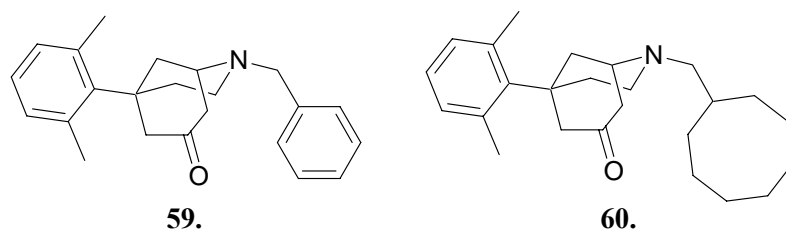
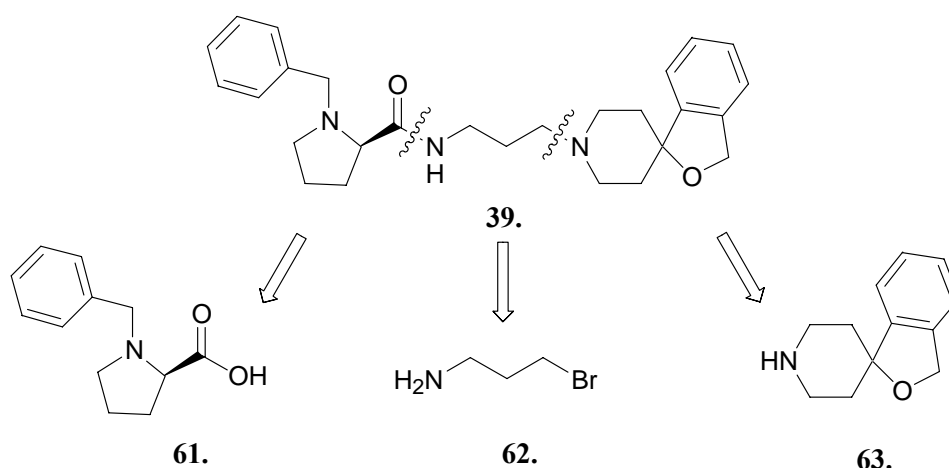


Figura 24

In aggiunta, è stata studiata la possibilità di generare nuovi ligandi del recettore NOP prendendo come molecola di riferimento il composto (**39**), acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico {3-[spiro-[isobenzofuran-1(3-*H*),4'-piperidin-1-il]]-propil}-amide, di recente identificazione⁴² che può essere suddivisa in tre elementi principali: un nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico, uno “spacer” propil-amminico e l’N-benzil-prolina in configurazione R (Schema 1).



Schema 1

Il nucleo piperidinico sostituito in posizione 4 con un anello spiranico è comune alla maggior parte dei ligandi non peptidici del recettore NOP ad attività agonista identificati principalmente da Hoffman-La Roche. È noto da indagini di spettroscopia a raggi X⁴⁸ e di Molecular Modeling⁴⁹ che questa fusione mantiene l’anello aromatico perpendicolare rispetto al nucleo piperidinico.

⁴⁸J. Wichmann *et. al.*; *J. Med. Chem.*, **2000**, 35, 839-851.

⁴⁹D. Alberati *et. al.*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 4305-4310.

Al fine di valutare se altre strutture piperidiniche diversamente sostituite in posizione 4 già presenti in letteratura e facenti parte di ligandi noti del recettore NOP, possano essere impiegate nella sostituzione del nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico, sono stati sintetizzati i seguenti composti chimerici **(64)**, **(65)** e **(66)** (Figura 25).

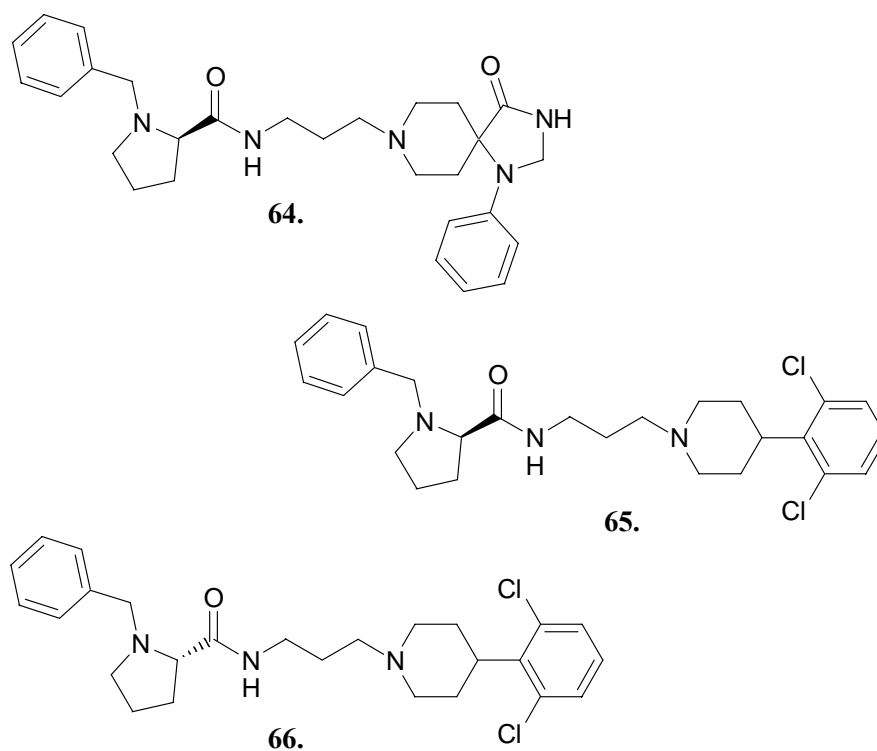


Figura 25

Nei composti **(65)** e **(66)** è stato introdotto il nucleo 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidinico caratteristico dell'antagonista NOP SB-612111 (Figura 8), mentre nel composto **(64)** il nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico è stato sostituito con lo "scaffold" 1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one, presente nei ligandi NOP agonisti sviluppati da Hoffman-La Roche (Figura 9). Il legame ammidico della molecola di riferimento **(39)** è una funzionalità poco presente nelle altre strutture non peptidiche ad attività NOP. Di tutti i composti sviluppati fin'ora solamente il JTC-801 **(33)**, Figura 16) è caratterizzato da questo gruppo funzionale.

Al fine di investigare il ruolo giocato dal legame ammidico nell'interazione con il recettore NOP abbiamo sintetizzato i composti **(67)**, **(68)**, **(69)**, **(70)** e **(71)** (Figura 26). Alcune delle modifiche apportate potrebbero rivelarsi importanti al fine di aumentare la stabilità metabolica del composto nei confronti delle peptidasi.

Nel composto (67) l'eliminazione del legame carbonilico porta alla sostituzione del gruppo ammidico con uno metilen-amminico. La N-metilazione permette di ottenere il composto (68) caratterizzato da una funzionalità ammidica terziaria. Nei composti (69) e (70) le due porzioni della molecola sono unite da legami estereo ed etereo rispettivamente. In (71) e (72) infine, è stato introdotto un legame olefinico: (71) differisce dal suo precursore (72) per la presenza di un gruppo carbonilico vicinale all'azoto piperidinico, che viene ridotto con borano-dimetil-solfuro.

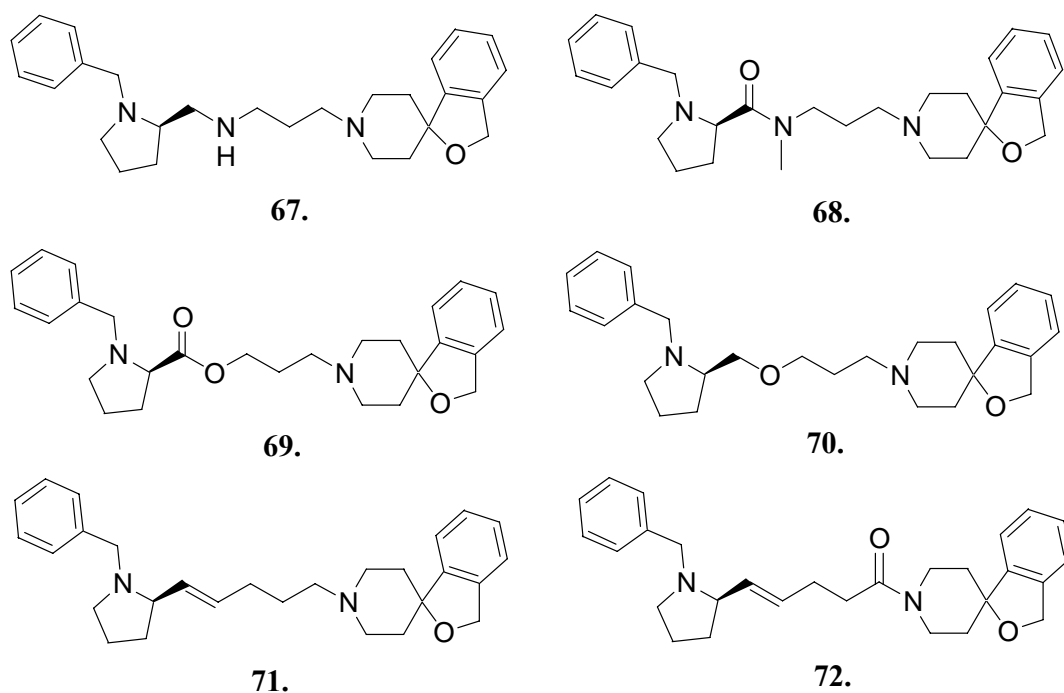


Figura 26

Lo studio dello “spacer” tra l'amminoacido N-benzil-D-prolina e il nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico ha previsto anche la sintesi dei composti (73) e (74), nei quali è stata eliminata la catena a 3 atomi di carbonio, conservando o meno la funzionalità carbonilica. Privo di “spacer” propilamminico è anche (75), nel quale il sintone presente negli importanti ligandi Roche 1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one viene condensato direttamente con N-benzil-L-prolina, mantenendo la funzionalità carbonilica (Figura 27).

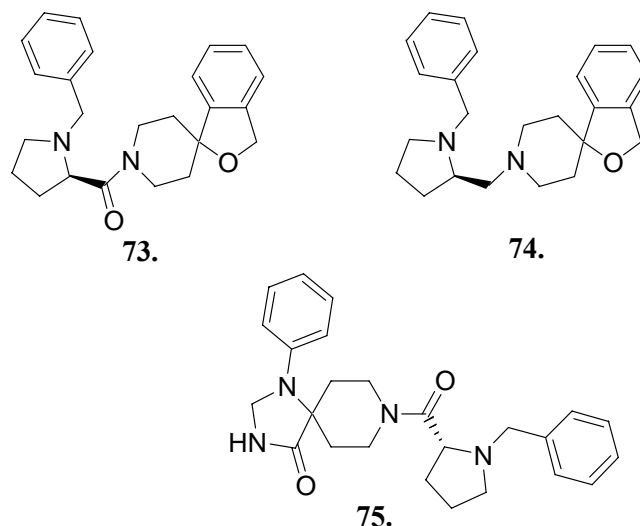


Figura 27

L’N-benzil-prolina, amminoacido N-alchilato, trova interessanti somiglianze con l’importante modifica chimica N-Phe introdotta in posizione 1 nel ligando naturale che ha portato al primo antagonista peptidico del recettore NOP²³. Tale modifica è caratterizzata dallo spostamento del gruppo benzilico dal carbonio α all’azoto N-terminale. Il composto di riferimento (**39**) presenta inoltre analogie strutturali con l’intero message domain della Nocicettina (Phe-Gly-Gly-Phe) dovute principalmente alla presenza di due nuclei aromatici distanziati da un ugual numero di atomi (Figura 28).

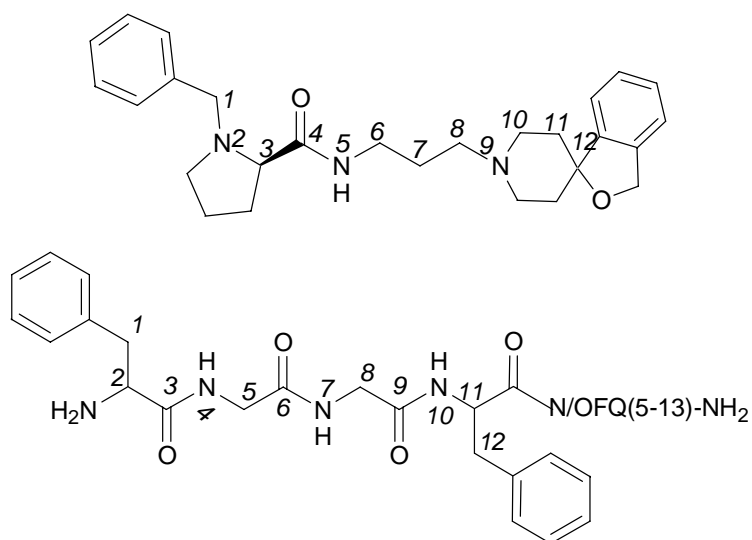


Figura 28

Sulla base di queste considerazioni sono state sintetizzate le molecole (76), (77), (78) e (79) in cui l'amminoacido di riferimento è stato sostituito rispettivamente con L-Phe, sia con legame ammidico che metilen-amminico, con D-Phe e con N-Phe (Figura 29).

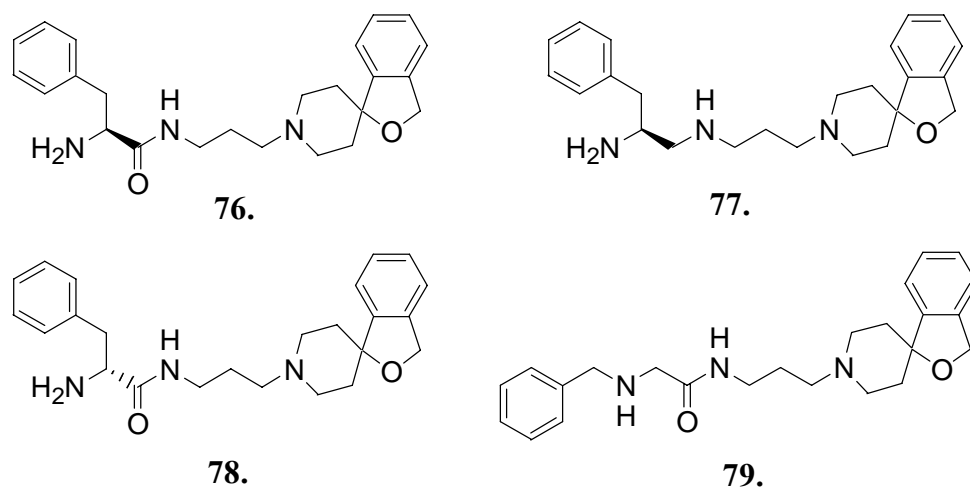


Figura 29

In ultimo, abbiamo preparato i derivati (80) e (81) nei quali l'N-benzil-prolina viene sostituita con strutture tiazolidiniche N-alchilate, come bioisosteri della prolina stessa. In particolare, nei composti (80) e (81) sono stati introdotti i nuclei di N-acetil-metil-tiazolidina e N-benzil-tiazolidina rispettivamente. Nel composto (82) infine il sostituente benzilico sull'azoto della prolina è stato sostituito con un più ingombrante anello β -naftolico.

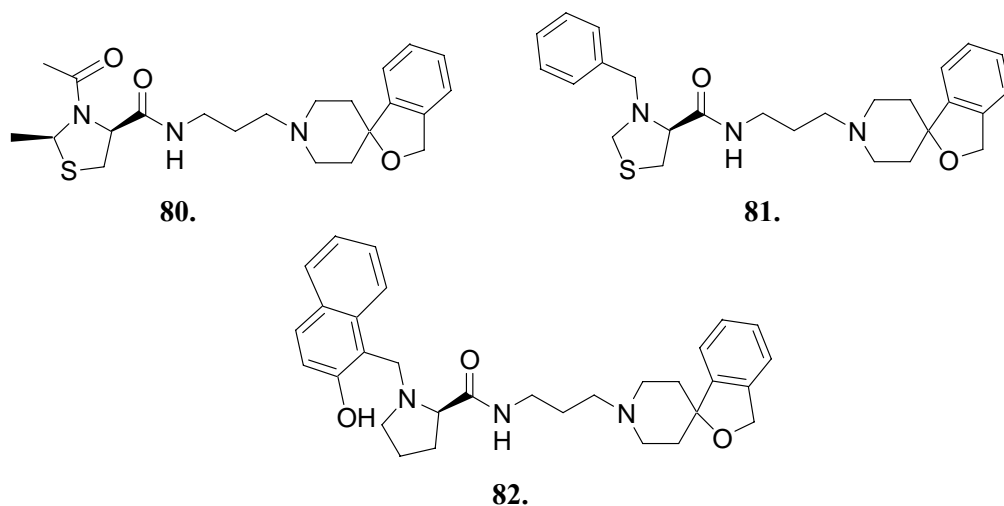


Figura 30

DISCUSSIONE

La sintesi del composto J-113397, potente antagonista del recettore NOP, è stata messa a punto da due gruppi di ricerca. Il primo procedimento sintetico è stato studiato da Kawamoto e brevettato dalla Compagnia giapponese Banyu Tsukuba Research Institute⁵⁰ mentre un metodo alternativo è stato invece proposto da un gruppo dell'Università di Ferrara⁴⁴.

In un precedente lavoro sono stati preparati diversi analoghi variamente modificati del J-113397 secondo quest'ultima procedura sintetica.⁴⁴ Tra questi è risultato di particolare interesse l'analogo TRAP-101⁴⁵ nel quale la chiralità della molecola è stata eliminata per la presenza di un doppio legame nelle posizioni C-3 e C-4 della piperidina. Tale modifica ha portato ad un composto con attività farmacologica paragonabile al riferimento (TRAP-101: $pA_2 = 7.75$; (\pm)J.113397: $pA_2 = 7.79$), e costituisce un vantaggio dal punto di vista sintetico in quanto permette di ottenere il derivato con un minor numero di passaggi e con rese maggiori. Questo composto si è dimostrato un buon sostituto del (\pm)J-113397 per vari test farmacologici *in vitro* effettuati al fine di investigare il sistema recettore NOP/ Nocicettina.

Studi di Modellistica Molecolare sono stati effettuati al fine di investigare le caratteristiche conformazionali dei composti J-113397 (caratterizzato da una

⁵⁰ H. Kawamoto, H. Nakashima, T. Kato, S. Arai, K. Kamata, Y. Iwasawa; *Tetrahedron*, 57, **2001**, 981-986.

piperidina *trans*-3,4-disostituita) e TRAP-101 (caratterizzato da una 1,2,3,6-tetraidropiridina). Essi hanno evidenziato una buona sovrapposizione della porzione benzoimidazolidinonica e una orientazione spaziale pressoché identica del farmacoforo idrossimetilico nelle due strutture, diversamente da quanto osservato per il derivato piperidinico *cis*-3,4-disostituito. I risultati di Modellistica Molecolare, l'approfondito studio NMR e i dati farmacologici ottenuti consentono di attribuire un ruolo importante alla disposizione del benzoimidazolidinone e suggeriscono soprattutto come la chiralità degli atomi C-3, C-4 della piperidina sia importante ma non essenziale per l'interazione recettoriale. Risultano invece essere di cruciale importanza la presenza e la disposizione spaziale della funzionalità idrossimetilica in C-3 (Figura 31).

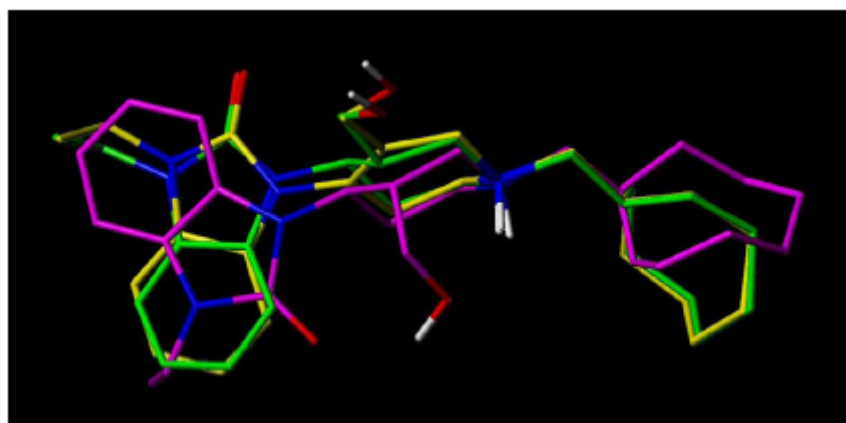
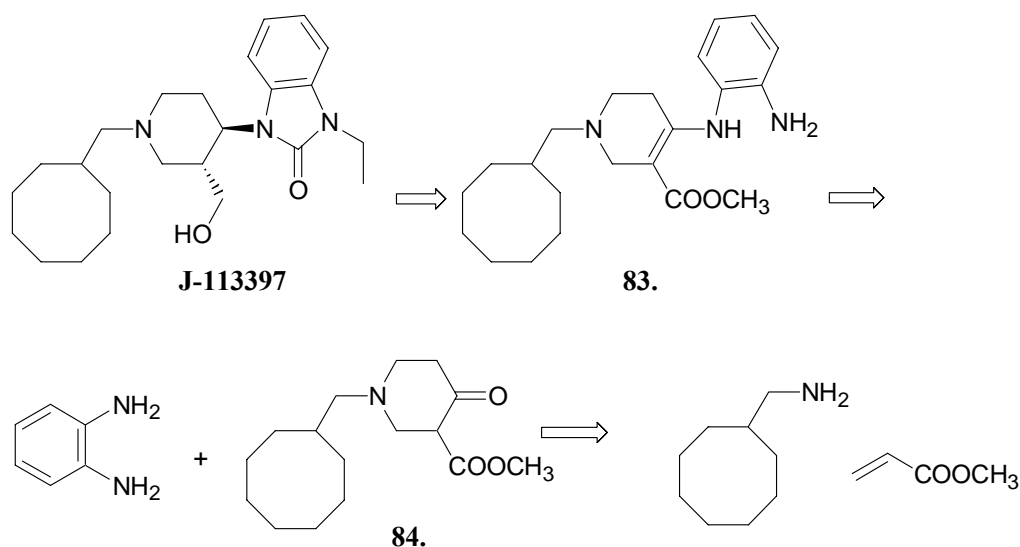


Figura 31: Sovrapposizione delle strutture *cis* (viola), *trans* (J-113397, giallo) e TRAP-101(verde).

Il derivato TRAP-101 è stato ottenuto mediante la via sintetica alternativa introdotta per il composto J-113397 secondo la procedura descritta nello schema 2.

L'enammina (**83**) si ottiene dalla condensazione tra l'orto-fenilendiammina e il β -chetoestere (**84**), ricavato a sua volta da una sequenza sintetica che prevede la reazione di Michael della cicloottilmetilammina sull'acrilato di metile, seguita da ciclizzazione di Dieckmann.

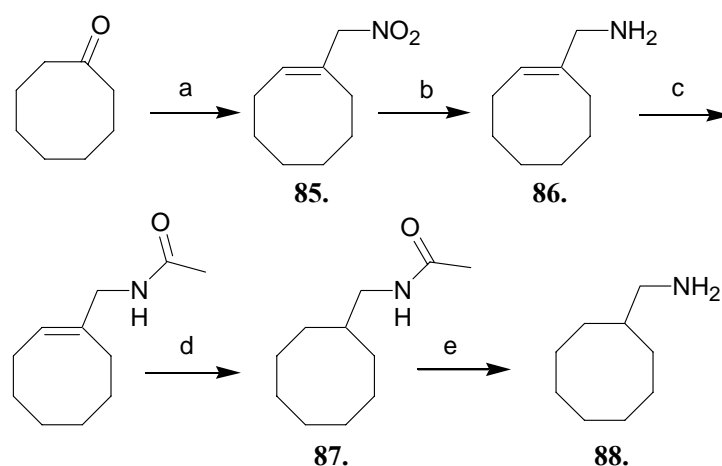


Schema 2

Secondo protocollo noto in letteratura⁵¹, la reazione di cicloottanone con nitrometano in toluene a refluxo in presenza di una quantità catalitica di N,N'-dietililendiammina con rimozione azeotropica dell'acqua formatasi produce il desiderato 1-nitrometil-cicloottene (**85**). Quest'ultimo viene trasformato nella corrispondente ammina primaria (**86**) per riduzione con litioalluminoidruro in THF a 0°C.

La riduzione del doppio legame della 1-cicloott-1-enil-metanammina per ottenere l'ammina satura (**88**) è risultata abbastanza complicata ed ha richiesto la preventiva acilazione della funzionalità amminica primaria con anidride acetica in presenza di trietilammina. La successiva riduzione catalitica in presenza di idrogeno molecolare ha fornito con elevata resa il prodotto saturo (**87**) la cui idrolisi acida permette di isolare la cicloottil-metilammina (**88**) con rese soddisfacenti (Schema 3).

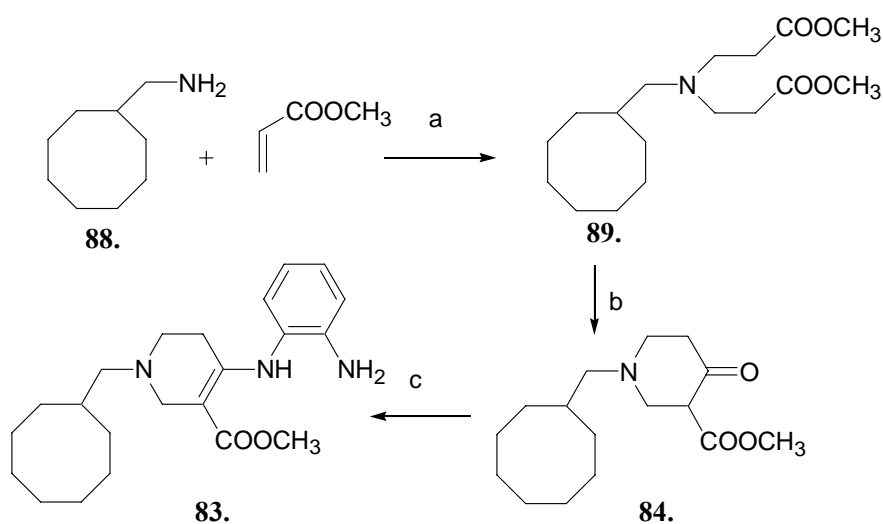
⁵¹ R. Tamura, M. Sato, D. Oda, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 4368.



Condizioni: a) CH_3NO_2 , N,N-Dietiletilendiammina, toluene, riflusso; b) LiAlH_4 , THF, 0°C ; c) Ac_2O , Et_3N , DCM, 0°C , 12h; d) H_2 , C/Pd 10%, EtOH 12h; e) HCl 37%, H_2O , riflusso.

Schema 3

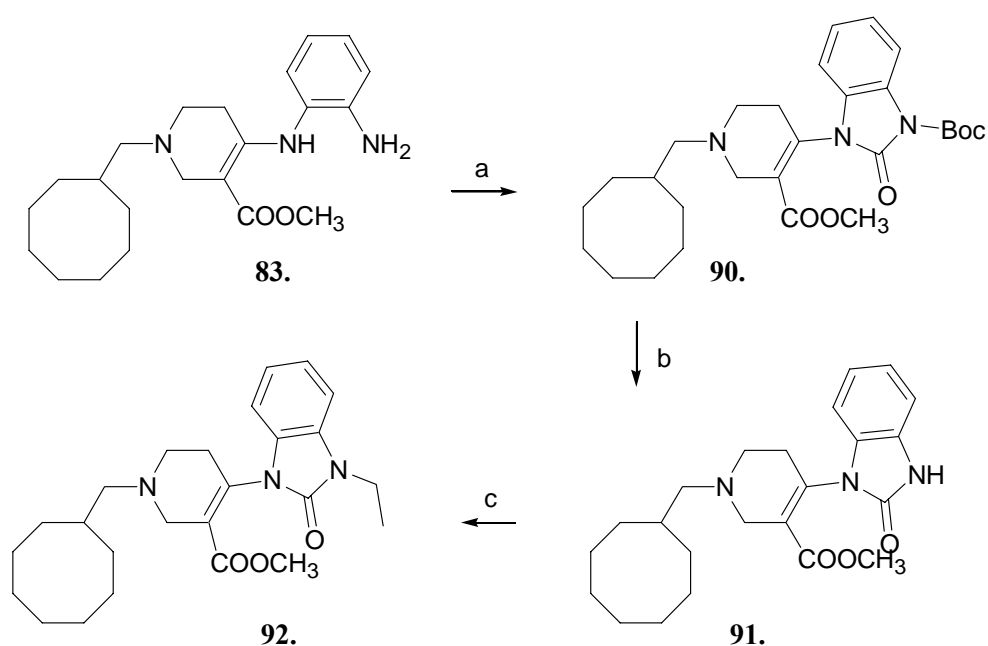
L'aggiunta di Michael del composto (**88**) sull'acrilato di metile porta alla formazione del diestere (**89**) che, per ciclizzazione di Dieckman promossa da potassio *tert*-butilato a temperatura ambiente, fornisce il β -chetoestere (**84**) la cui successiva condensazione con *orto*-fenilendiammina permette di ottenere l'enammina stabile (**83**) (Schema 4).



Condizioni: a) MeOH, 0°C , r.t.; b) $t\text{BuOK}$, toluene; c) *o*-Fenilendiammina, toluene riflusso, setacci molecolari 4 A, 24h.

Schema 4

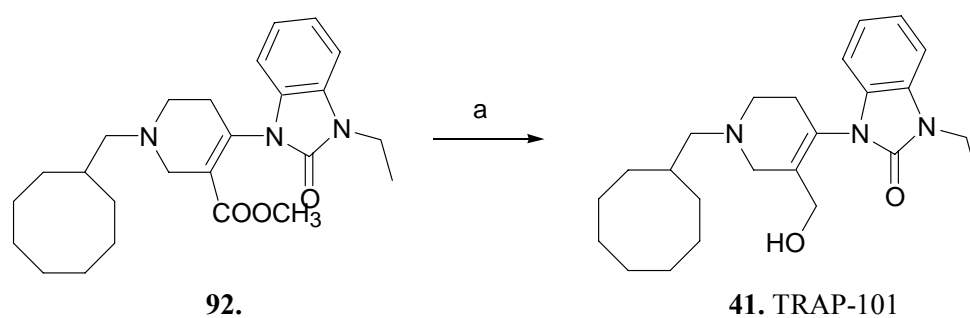
La chiusura dell'anello benzimidazolinonico presente nella molecola di J-113397 è stata realizzata attraverso trattamento dell'enammina (**83**) con un eccesso di di-*tert*-butil-dicarbonato con concomitante protezione dell'atomo di azoto N-3 come *tert*-butossicarbonile (**90**). Il trattamento di quest'ultimo con acido trifluoroacetico in diclorometano ha permesso di ottenere l'ammide libera (**91**), successivamente alchilata con etil bromuro in DMF in presenza di sodio idruro a dare il composto (**92**) (Schema 5).



Condizioni: a) $(\text{Boc})_2\text{O}$, DCM, DMAP, 0°C ; b) TFA, DCM, 0°C , r.t.; c) EtBr, NaH, DMF, 0°C .

Schema 5

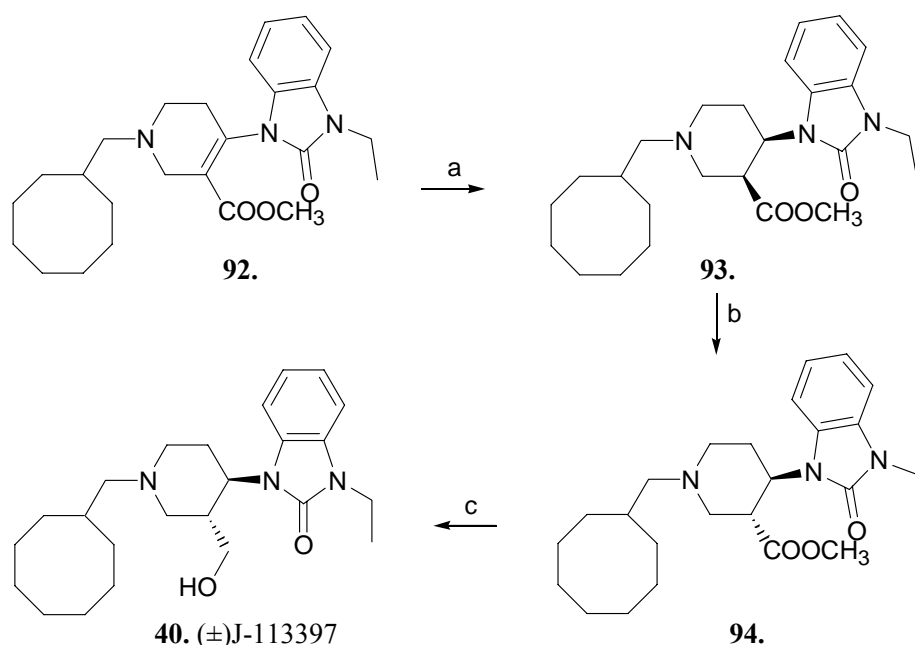
La successiva riduzione della funzionalità esterea di (**92**) con litioalluminoidruro in THF anidro a 0°C porta alla formazione di TRAP-101 (Schema 6).



Condizioni: a) THF, LiAlH_4 , 0°C 15'; b) THF, LiAlH_4 , 0°C 45".

Schema 6

La sintesi di J-113397 richiede la non semplice riduzione del doppio legame presente nell'anello piperidinico del composto (**92**). Questa operazione viene effettuata in autoclave in condizioni di pressione di idrogeno di 60 atmosfere utilizzando come catalizzatore C/Pd/10% e permette di ottenere il prodotto (**93**) con una resa del 65%. Il successivo trattamento del composto *cis*-(**93**) con sodio metossido in metanolo permette l'epimerizzazione del centro chirale sul carbonio C-3 della piperidina portando al prodotto *trans*-(**94**) con il 92 % di resa.



Condizioni: a) H_2 , C/Pd 10% CH_3OH ; b) MeONa, MeOH 60h; c) $LiAlH_4$, THF, $0^\circ C$.

Schema 7

Prendendo in considerazione come "lead compound" la struttura piperidinica dell'antagonista NOP J-113397 e dell'analogo Trap-101 sono stati preparati altri derivati modificati a livello del sostituente ingombrante cicloottilmetilico sull'atomo di azoto o della funzionalità idrossimetilica presente al carbonio C-3 della piperidina.

Una interessante pubblicazione di Zaveri *et al.*⁵² ha presentato una rassegna di ligandi NOP, agonisti e antagonisti prendendo in considerazione le caratteristiche strutturali che possono essere determinanti per la modulazione del profilo agonista/antagonista (attività intrinseca). Lo studio offre una base per lo sviluppo di modelli farmacoforici ad elevata affinità recettoriale e attività sul recettore NOP. Le relazioni struttura-attività hanno evidenziato che un sostituito lipofilo sull'atomo di azoto basico presente in tutti i composti NOP gioca un ruolo fondamentale nel determinare il profilo agonista/antagonista. I risultati riportati da Zaveri suggeriscono l'esistenza di un sito di legame lipofilo vicino al sito di interazione dell'azoto protonabile che deve essere occupato per avere affinità di legame ottimale sia dagli agonisti che dagli antagonisti. Sembra poi esserci un'altra area vicino al sito di interazione dell'azoto, di dimensioni minori, cruciale per l'attività agonista. Mentre gruppi ciclici direttamente legati all'azoto piperidinico sembrano dare attività agonista sul recettore NOP; sostituenti ingombranti distanziati attraverso un linker metilenico (benzile, cicloottilmetile) conferirebbero alla molecola attività antagonista, andando ad interagire con la tasca lipofila, ma impedendo il legame alla seconda tasca, cruciale per l'attività dell'agonista.

Al fine di valutare tale analisi e confermare il modello proposto abbiamo preparato due derivati, (95) e (96), (Figura 32), ottenuti a partire dagli antagonisti J-113397 e TRAP-101 rispettivamente, sostituendo la funzionalità cicloottilmetilica con una cicloottolica ed eliminando il linker metilenico a livello del sostituito ingombrante sull'azoto piperidinico. Secondo il modello proposto questi potrebbero risultare ligandi ad attività agonista.

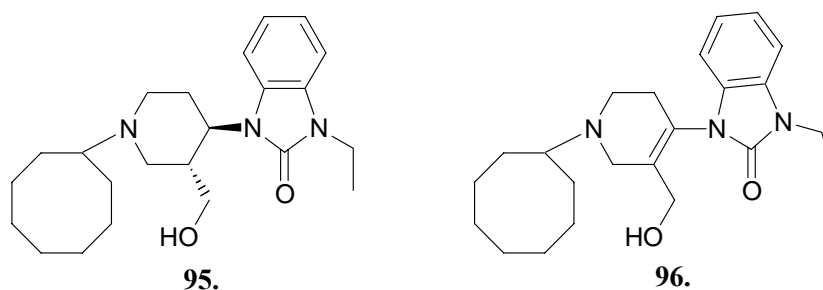
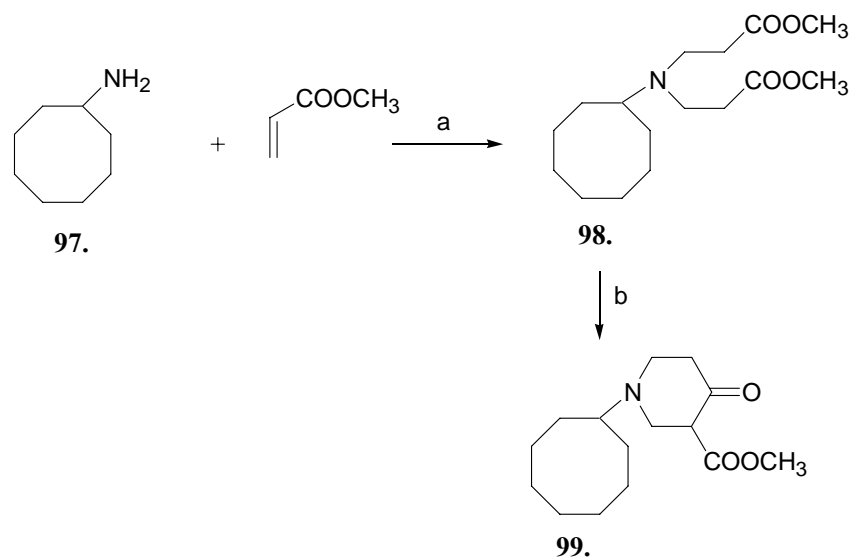


Figura 32

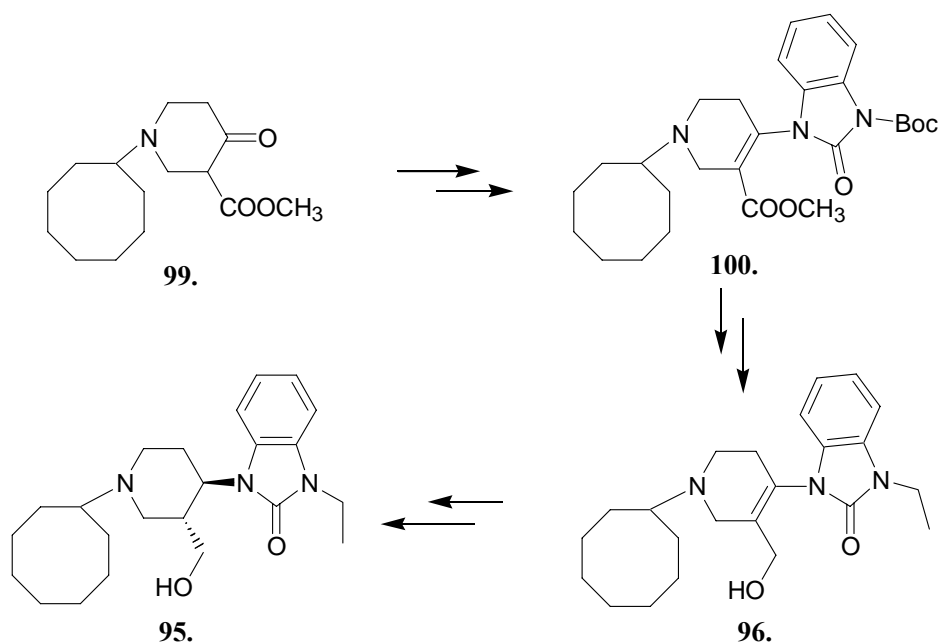
⁵² N. Zaveri, F. Jiang, C. Olsen, W. Polgar, L. Toll, AAPS L., 2005, 7, 2, E345-E352.

I derivati (**95**) e (**96**) sono stati ottenuti seguendo la procedura sintetica appena descritta per J-113397 e TRAP-101 utilizzando come materiale di partenza la cicloottilamina (**97**) che, sottoposta a reazione di Michael con acrilato di metile, produce il diestere (**98**), che viene purificato per distillazione e trattato con tert-butossido di potassio in toluene (Schema 8). Si ottiene così il β -chetoestere (**99**) che sottoposto agli stessi passaggi sintetici operati per i due composti di riferimento porta a (**95**) e (**96**) (Schema 9).



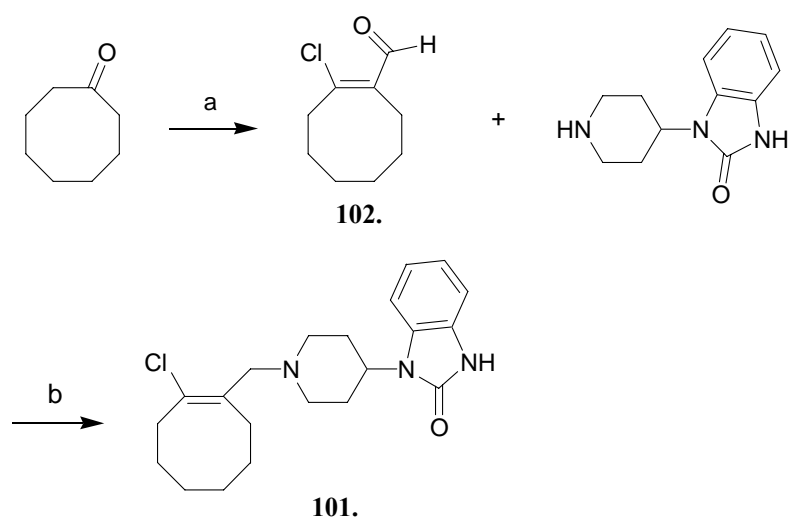
Condizioni: a) MeOH, 0°C, r.t.; b) ^tButOK, toluene.

Schema 8



Schema 9

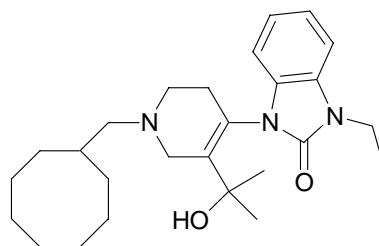
E' stato inoltre preparato il composto (**101**) che non presenta alcuna sostituzione sull'azoto benzoimidazolidinonico e nella posizione C-3 della piperidina. Esso è caratterizzato invece dalla presenza, a livello del sostituente cicloottilmetilico, di un doppio legame, modifica da noi precedentemente considerata⁴⁵ e dimostratasi tollerata. La preparazione di (**101**) parte da (**102**), un composto iniziale chiave per la sintesi di J-113397 secondo la procedura di Kawamoto. La β -cloro-aldeide α,β -insatura (**102**), ottenuta a partire da cicloottanone mediante formilazione di Vilsmeier con POCl_3 in DMF a temperatura ambiente, viene sottoposta ad amminazione riduttiva con 1-piperidin-4-il-1,3-diidro-benzoimidazol-2-one in presenza di NaBH_4 come agente riducente a dare il composto (**101**).



Condizioni: a) POCl_3 , DMF, 0°C , r.t.; b) NaBH_4 , MeOH, 0°C .

Schema 10

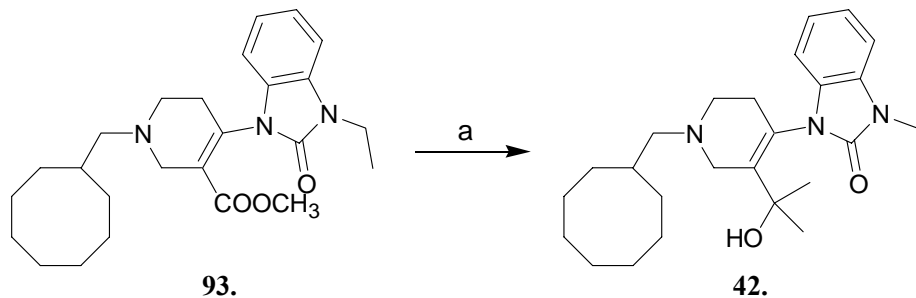
È stato osservato che l'antagonista TRAP-101 possiede un'azione *in vitro* paragonabile al riferimento (\pm)J-113397, ma una minor attività farmacologica *in vivo*. Si è pensato che questo sia associato ad un più rapido metabolismo a livello della funzionalità idrossimetilica al carbonio C-3 della piperidina. È stato quindi preparato il derivato (**42**) (Figura 33), il quale presenta al posto del gruppo alcolico primario una funzionalità alcolica terziaria non suscettibile di ossidazione enzimatica ed in grado di aumentare la stabilità metabolica del sistema.



42.

Figura 33

Il derivato (**42**) è stato ottenuto dall'intermedio della sintesi di J-113397 e TRAP-101 (**86**) mediante una reazione con metil-magnesio ioduro che agisce in posizione C-3 sulla piperidina trasformando la funzionalità esterea in alcolica terziaria (Schema 11).



Condizioni: a) CH_3MgI , THF, 0°C , r.t.

Schema 11

Abbiamo preparato composti di natura chimerica prendendo in considerazione i due potenti antagonisti NOP, SB-612111 e J-113397. Il derivato 4-(2,6-dicloro-fenil)piperidinico (**43**) è sostituito all'azoto N-1 con il cicloottilmetile caratteristico del composto Banju, in posizione C-4 dell'anello piperidinico con la funzionalità 2,6-diclorofenilica ed è privo della funzionalità idrossimetilica. Questa peculiarità dovrebbe incidere considerevolmente sulla sua attività biologica. Il composto (**58**) è stato sintetizzato seguendo lo stesso principio e con il medesimo obiettivo, ma

mantenendo in C-4 sulla piperidina la porzione benzoimidazolinonica caratteristica di J-113397. Infine (**44**) è l'interessante derivato chimerico di SB-612111 con J-113397, un composto con la struttura del derivato Banju contenente la funzionalità idrossimetilica in posizione C-3 sulla piperidina, il sostituito 2,6-dicloro-fenilico caratteristico di SB-612111 in C-4 e i due sostituenti in C-3 e C-4 in *trans* uno rispetto all'altro (Figura 34).

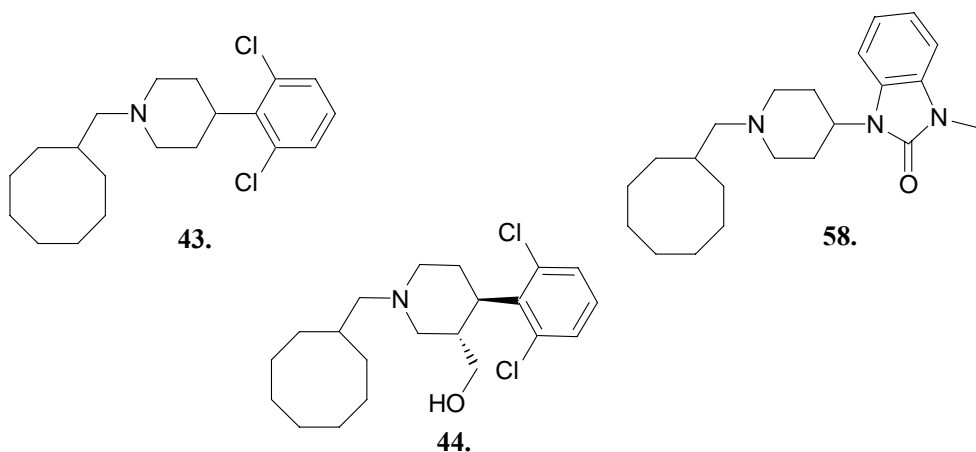
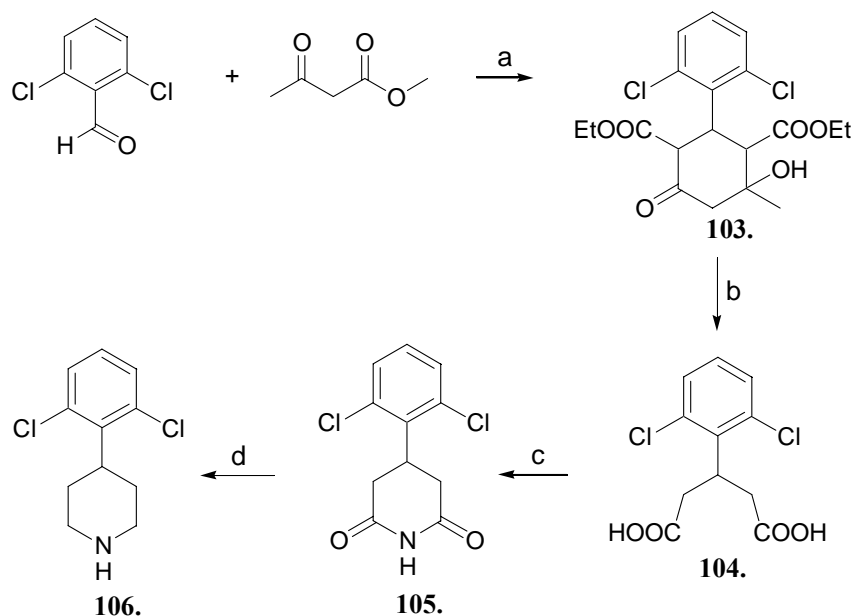


Figura 34

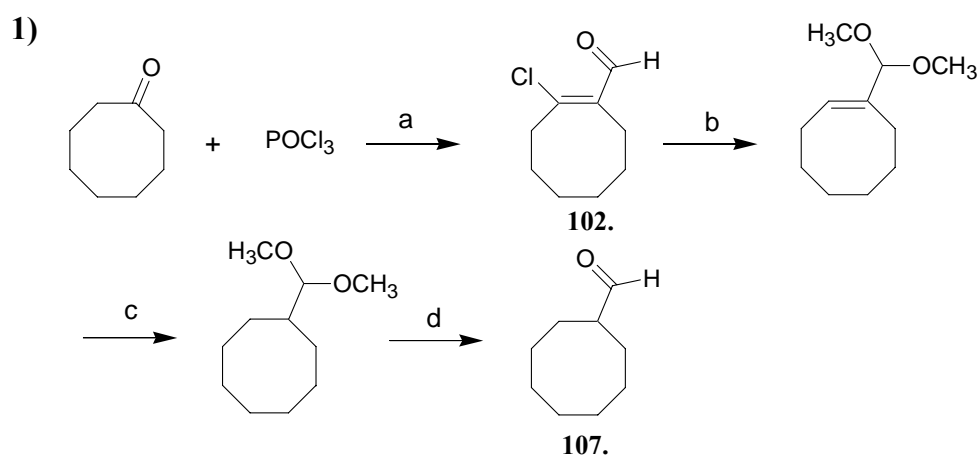
La preparazione del sintone 4-(2,6-dicloro-fenil)piperidina (**106**) si basa sulla reazione di 2,6-dicloro-benzaldeide con aceto-acetato d'etile in presenza di piperidina in etanolo a temperatura ambiente per 24 ore a dare il derivato (**103**). La successiva idrolisi porta ad ottenere l'intermedio (**104**) che reagisce con ammoniaca ad elevata temperatura (200°C per 6h) per dare l'imide ciclica (**105**). La conseguente riduzione in presenza di 10 equivalenti di $(\text{CH}_3)_2\text{S}^*\text{BH}_3$ porta ad ottenere lo scaffold molecolare richiesto (**106**) (Schema 12).



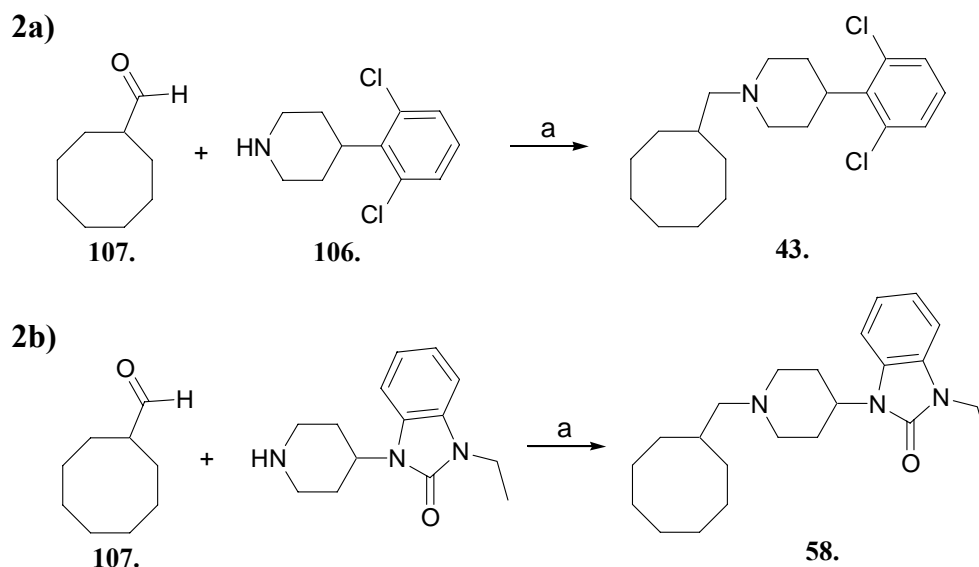
Condizioni: a) Pyp, EtOH 96%, r.t., overnight; b) NaOH 35%, H₂O, EtOH, riflusso, overnight; c) NH₄OH, 200°C, 6h; d) (CH₃)₂S*BH₃, THF anidro, 0°C.

Schema 12

Il composto (**43**) si ottiene mediante aminazione riduttiva tra (**106**) e la cicloottilcarbaldeide (**107**) (Schema 13-2a), preparata seguendo reazioni che fanno parte della procedura sintetica pubblicata da Kawamoto per J-113397 (Schema 13-1). L'intermedio (**102**), ottenuto per trattamento del cicloottanone con POCl₃ in DMF, viene sottoposto a idrogenazione catalitica a 50 psi d'idrogeno in metanolo a dare l'aldeide dimetilacetale insatura che viene poi ridotta in presenza di idrogeno a pressione atmosferica. Il trattamento con acido cloridrico in THF rimuove il gruppo protettivo acetalico portando al composto desiderato (**107**).



Condizioni: a) DMF, 0°C, r.t.; b) H₂, C/Pd, MeOH, Pyr, Parr; c) H₂, C/Pd Patm; d) THF, HCl 1M, r.t., overnight.



Condizioni: a) NaBH₃CN, MeOH.

Schema 13

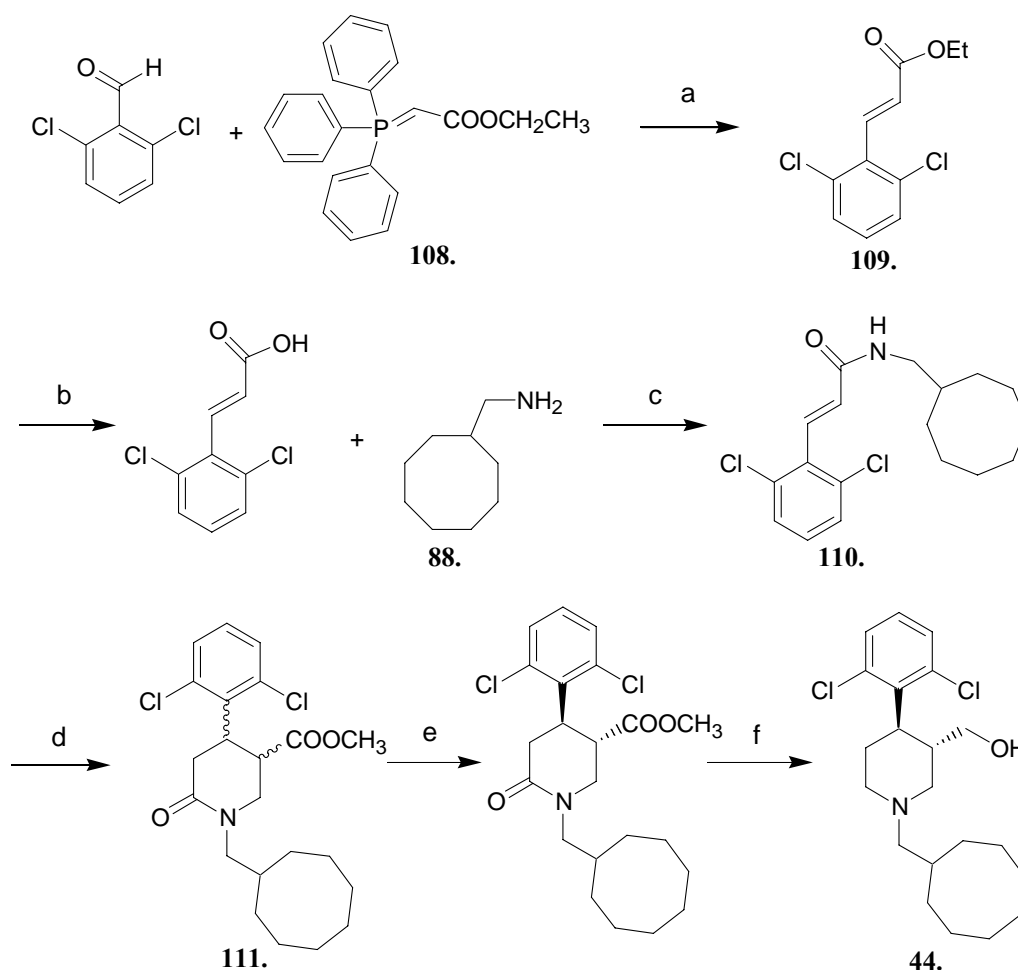
La cicloottilcarbaldeide (**107**), sottoposta ad amminazione riduttiva con 1-etil-3-piperidin-4-il-1,3-diidro-benzoimidazol-2-one, in condizioni analoghe a quelle mostrate per (**43**), permette di ottenere il derivato (**58**) (Schema 13-2b).

L'interessante derivato (**44**), (Figura 27), che costituisce la chimera perfetta tra J-113397 e SB-612111, viene preparato mediante reazione di Wittig di 2,6-diclorobenzaldeide con il fosforano (**108**) a dare il derivato estereo (**109**) (Schema 14) la cui idrolisi in ambiente basico permette di ottenere l'acido corrispondente che, condensato con la cicloottil-metilamina (**88**) porta all'intermedio aperto (**110**). Seguendo una procedura riportata in letteratura⁵³ la reazione di (**110**) con acrilato di metile in presenza di tetrabutyl-dimetil-silil-trifluoro-metansolfonato (TBDSOTf) e tracce di *tert*-butanolo, utilizzando come base trietilamina, porta al piperidone sostituito (**111**) come miscela *cis/trans* che viene epimerizzato per trattamento con metossido di sodio e metanolo a dare l'isomero *trans*. La successiva riduzione con LiAlH₄ in THF anidro a 0°C porta al composto desiderato (**44**), la cui

⁵³ Takasu et al., *J.Org.Chem.*, **2005**, 70, 3957-3962.

struttura e disposizione conformazionale sono state determinate attraverso studi NMR mono e bidimensionali (COSY, HMQC, HMBC).

L'ammina (**88**) è stata ottenuta a partire da cicloottanone secondo la procedura sintetica riportata nello schema 3.



Condizioni: a) Reazione di Wittig, THF, r.t., overnight; b) NaOH 1M, EtOH 95%; c) HOBt, WSC, DMF; 0°C, r.t.; d) acrilato di metile, TBDSOTf, DMC, TEA; e) MeONa, MeOH; f) LiAlH₄, THF, 0°C, r.t.

Schema 14

Al fine di valutare l'effetto di sostituenti ingombranti sull'azoto piperidinico diversi dal cicloottilmetile, altri derivati chimerici sono stati progettati e preparati partendo dall'importante scaffold 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidinico. Sono state introdotte in

posizione C-1 strutture di tipo chinolinico o naftolico con riferimento alla struttura di un potente antagonista del recettore NOP, il composto della Japan Tabacco JTC-801 (**33**, Figura 15). Avendo già osservato e in parte dimostrato, l'importanza della funzionalità ossidrilica per l'attività farmacologica sul recettore NOP, tutti i derivati sono stati progettati in modo da avere una funzionalità di questo tipo a livello dei sostituenti sull'azoto. Abbiamo quindi preparato i composti (**45**), (**46**), (**47**), (**48**) e (**49**) (Figura 35), seguendo uno schema sintetico comune, costituito da una reazione di Mannich acido catalizzata tra il nucleo piperidinico e le strutture β -naftoliche o metil-chinolinoliche in presenza di formaldeide e acido cloridrico in etanolo.

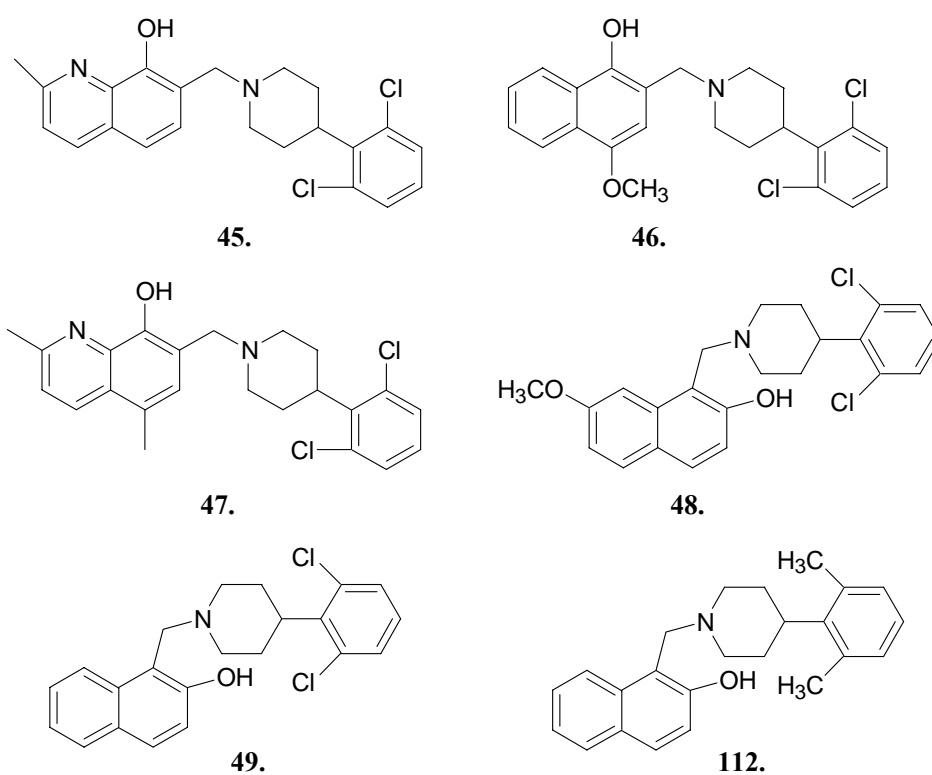
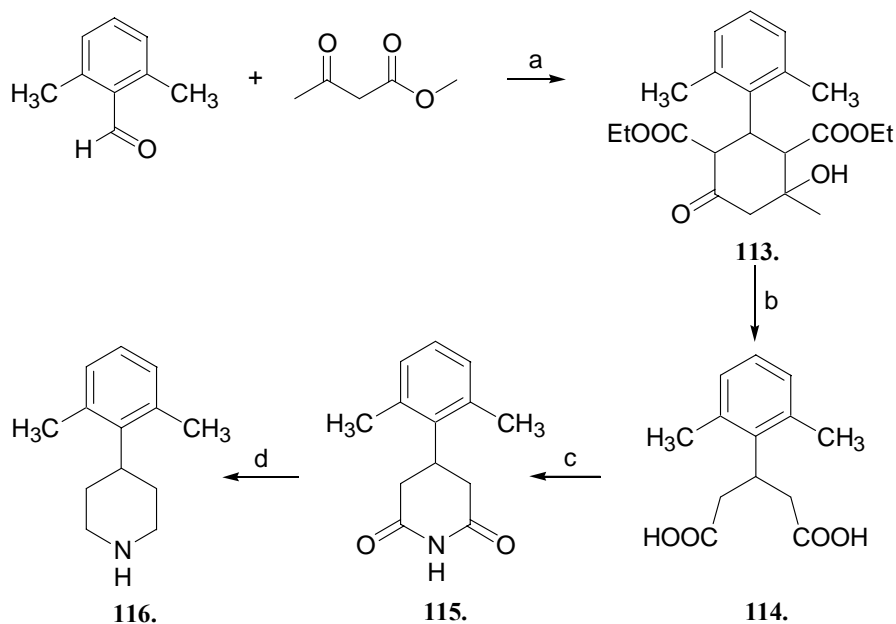


Figura 35

È stata osservata un'elevata similarità tra i farmacofori 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidina e 4-(2,6-metil-fenil)-piperidina. In entrambi i casi infatti i sostituenti nelle posizioni 2 e 6 mantengono l'anello aromatico perpendicolare rispetto al nucleo piperidinico. Questa sembra essere una caratteristica determinante per il mantenimento dell'attività farmacologica in tali scaffold. Per questo motivo è stato preparato anche il composto (**112**), (Figura 35) ottenuto per condensazione di

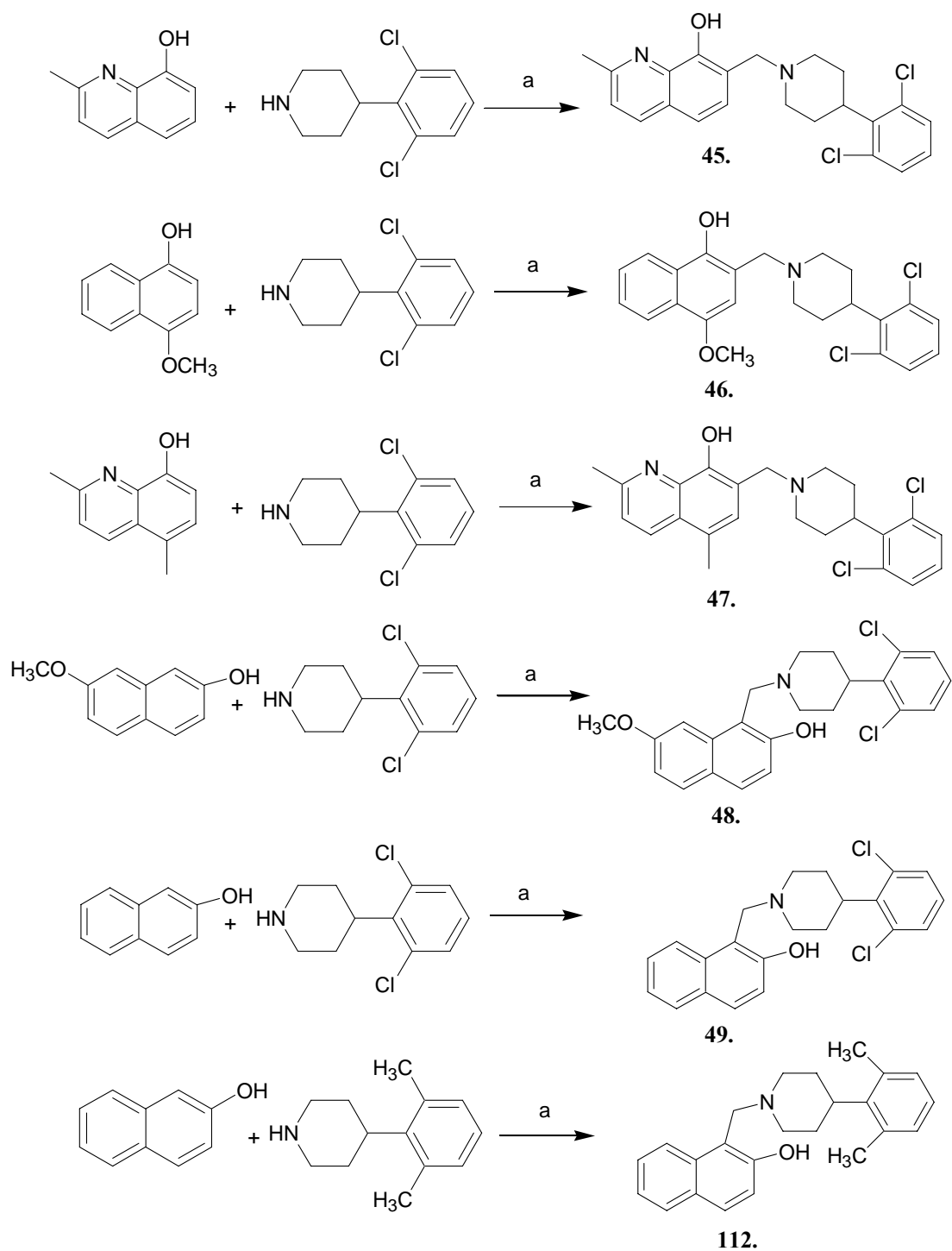
Mannich del β -naftolo con il nucleo 4-(2,6-dimetil-fenil)-piperidinico (**116**). Quest'ultimo viene preparato seguendo la medesima procedura sintetica applicata per l'analogo 2,6-dicloro, (**106**) partendo dalla 2,6-dimetilbenzaldeide commerciale (Schema 15).



Condizioni: a) Pyp, EtOH 96%, r.t., overnight; b) NaOH 35%, H₂O, EtOH, riflusso, overnight; c) NH₄OH, 200°C, 6h; d) (CH₃)₂S*BH₃, THF anidro, 0°C.

Schema 15

Nello schema 16 sono riportate le preparazioni mediante reazione di Mannich dei composti in figura 35.



Condizioni: a) HCHO, HCl 1M, EtOH, r.t., overnight.

Schema 16

In questo lavoro è stato messo a punto un nuovo modello farmacoforico di antagonismo sul recettore NOP prendendo come riferimento gli studi pubblicati da

F.I. Carroll^{54,55} riguardanti composti attivi sui recettori oppioidi classici a struttura 3,4-dimetil-4-(3-idrossifenil)piperidinica N-sostituita.

Carroll ha osservato come l'attività biologica di questi composti fosse collegata alla disposizione relativa dei due metili sull'anello piperidinico. I derivati con disposizione *cis* dei due metili in 3 e 4 mostravano infatti attività mista agonista/antagonista, mentre i derivati *trans*-3,4-dimetil-4-(3-idrossifenil)piperidinico risultavano ad attività antagonista sui recettori oppioidi.

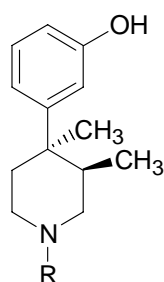


Figura 36

Questo gruppo di ricercatori ha individuato una nuova classe di composti nei quali l'attività farmacologica dipendeva dal sostituente metilico in posizione C-3 e dalla sua relazione *trans* rispetto al metile in posizione C-4 sull'anello. Tali composti sono tutti antagonisti dei recettori oppioidi indipendentemente dal sostituente sull'azoto piperidinico. Per questo motivo essi differiscono di molto dagli antagonisti classici dei recettori oppioidi, nei quali l'attività dipende proprio dal tipo di sostituente sull'azoto. In modo particolare nei derivati ossi-morfonici quali Nalossone e Naltressone, l'attività antagonista è strettamente associata alla presenza dei sostituenti allilico e ciclopropil-metilico rispettivamente. Da studi NMR, H^1 e C^{13} e di Modellistica Molecolare, Carroll ha osservato inoltre che i due metili in *trans* sull'anello piperidinico mantengono lo scaffold 3-idrossifenilico, *message* per i recettori oppioidi, in posizione perpendicolare rispetto all'anello piperidinico in conformazione a sedia. Questa costituisce un'altra differenza sostanziale rispetto agli antagonisti classici, nei quali la porzione 3-idrossifenilica è bloccata in posizione assiale rispetto alla piperidina.

⁵⁴ J.B. Thomas, X. Zheng, F.I. Carroll et al, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 4143-4149.

⁵⁵ J.B. Thomas, R.N. Atkinson F.I. Carroll et al, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3524-3530.

Carroll e collaboratori hanno ipotizzato un modello particolare di interazione con il recettore schematizzato in Figura 37.

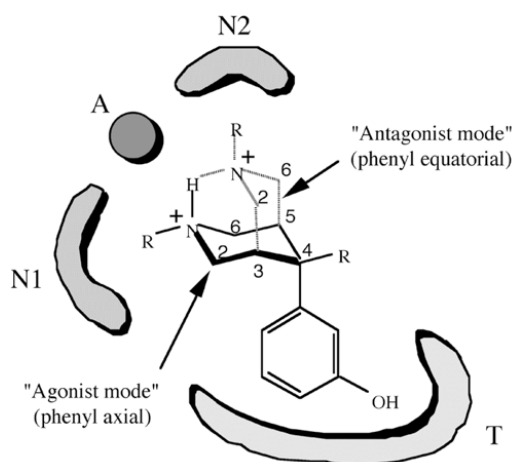


Figura 37

Assumiamo che l'azoto protonato interagisca con un sito anionico A e la funzionalità 3-idrossi-fenilica si inserisca in una tasca T del recettore. Nel caso in cui il sostituente in C-4 sia in posizione assiale con l'anello piperidinico in conformazione a sedia, il sostituente R sull'atomo di azoto è in grado di interagire con una tasca N1 determinando un "Agonist mode" di interazione con il recettore. Quando il sostituente R è un'allile o ciclopropil-metile, come nel caso di Nalossone e Naltressone, conferisce alla molecola attività antagonista. Se invece il gruppo 3-idrossifenilico si trova in posizione equatoriale rispetto alla piperidina in conformazione a sedia, il sostituente R interagisce con una tasca diversa, N2, determinando un "Antagonist mode" di interazione con il recettore. Tutti i composti che appartengono a questo secondo modello sono antagonisti dei recettori oppioidi, indipendentemente dalle caratteristiche del sostituente R sull'azoto.

Per confermare tale ipotesi e individuare una nuova classe di antagonisti dei recettori oppioidi, Carroll ha sintetizzato una libreria di composti a struttura morfana in cui il sostituente 3-idrossifenilico viene bloccato in posizione equatoriale rispetto alla piperidina in conformazione a sedia (Figura 38).⁵⁶ Tutti questi composti si sono dimostrati antagonisti dei recettori oppioidi indipendentemente dal sostituente sull'azoto piperidinico, il quale risulta importante nel modulare la potenza dell'attività

⁵⁶ Thomas J.B., Atkinson R.N., Carroll F.I., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3524-3530.

antagonista. Introducendo diverse modifiche nella posizione C-7 del nucleo morfanico, che per la procedura sintetica adottata risulta facilmente funzionalizzabile, questo gruppo di ricercatori ha selezionato composti potenti e selettivi nei confronti dei diversi sottotipi dei recettori oppioidi MOP, KOP e DOP⁵⁷.

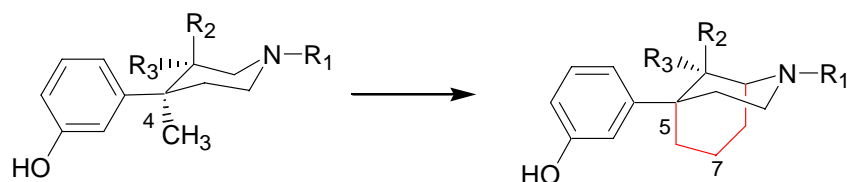


Figura 38

È nota l'esistenza di diverse similarità tra i recettori oppioidi e il NOP: esiste innanzitutto una elevata omologia (superiore al 60%) nelle sequenze amminoacidiche dei due sistemi recettoriali. Sono inoltre noti in letteratura composti attivi sia sui recettori oppioidi che sul NOP, tra questi i più importanti sono Buprenorfina^{58,59,60}, MOP agonista parziale, KOP antagonista e NOP agonista; Lofentanil⁶¹, MOP agonista, NOP agonista; e Nalossone benzoilidrazone⁶², NaBzOH, MOP antagonista, NOP antagonista potente.

Partendo da queste considerazioni, sono stati preparati composti a struttura morfanica in cui il *message* 3-idrossi-fenilico per i recettori oppioidi è stato sostituito con un *message* per il NOP. Il sostituito 2,6-dimetil-fenilico che viene a trovarsi in posizione C-5 sul morfano, risulta bloccato in posizione equatoriale rispetto all'anello piperidinico in conformazione a sedia. Al fine di potenziare l'attività NOP abbiamo introdotto sull'azoto piperidinico un sostituito ingombrante benzilico o cicloottilmetilico (R₁) che, a differenza del sistema oppioide, risulta importante, come già mostrato in precedenza, per l'azione antagonista sul NOP (Figura 39).

⁵⁷ J.B. Thomas *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3524-3530.

⁵⁸ *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 2,297, 688-695.

⁵⁹ Ciccocioppo *et al.*, *Biol Psychiatry*, **2007**, 61, 1, 4-12.

⁶⁰ B. Spagnolo *et al.*, *Br J Pharmacol.*, **2008**, 153, 3, 609-19.

⁶¹ *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 321,1, 97-103.

⁶² Noda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273,29,18047-18051.

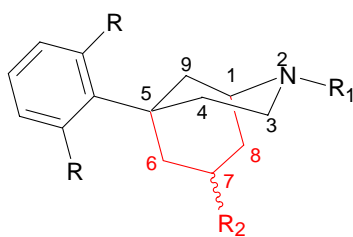


Figura 39

I composti progettati sono quindi derivati a struttura morfanica sostituiti in posizione 5 con un gruppo 2,6-dimetil-fenilico.

È noto che la porzione 2,6-dicloro-fenil-piperidinica costituisce un interessante scaffold in diversi antagonisti NOP. L'importanza di tale sistema sembra essere associata in larga parte alla disposizione perpendicolare dell'anello aromatico rispetto alla piperidina, probabilmente grazie all'ingombro sterico creato dalla presenza dei due sostituenti in 2,6 sull'anello aromatico. Si è pensato che l'importanza dei due atomi di cloro fosse anche dovuta a un effetto di elettronegatività. In realtà è già noto che la porzione 2,6-dimetil-fenil-piperidinica, di più facile preparazione, è equivalente dal punto di vista farmacologico alla 2,6-dicloro-fenil-piperidina, confermando l'ipotesi che il fattore più importante per l'azione dello scaffold sia l'ingombro sterico. Per avere ulteriori conferme al riguardo, sono state considerate le molecole contenenti sostituenti dicloro-, dimetossi-, con ingombro sterico leggermente maggiore, di fluoro-, con minor ingombro sterico ma elettronegatività paragonabile ai due clori, e con sostituzione mista cloro,metossi-. R₁ può essere un benzile o un cicloottilmetile, e anche la posizione 7 del morfano potrà essere variamente funzionalizzata con gruppi carbonilici, ossidrilici o amminici.

I primi derivati morfanici preparati sono stati **(59)**, e **(60)**, contenenti lo scaffold 2,6-dimetil-fenilico al carbonio C-5 bloccato in posizione equatoriale rispetto alla piperidina, un sostituito benzilico e cicloottilmetilico rispettivamente sull'atomo di azoto ed una funzionalità carbonilica in C-7 sul nucleo morfanico. Poteva essere prevista anche la preparazione del composto **(117)**, funzionalizzato con l'importante gruppo idrossimetilico nella posizione C-9 del morfano.

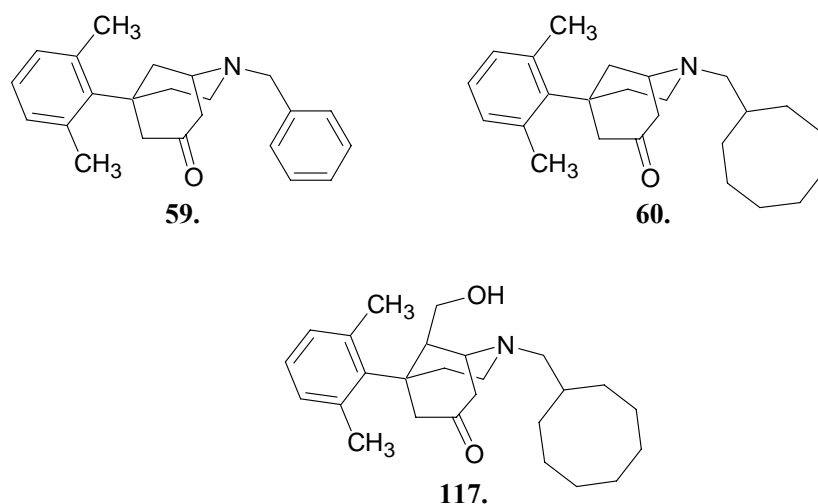


Figura 40

Al fine di valutare l'effetto dell'irrigidimento strutturale sull'attività dei composti morfanici, sono stati preparati e sottoposti a test farmacologici anche i corrispondenti precursori a struttura piperidinica o tetraidropiridinica, **(50)**-**(58)** (Figura 41). Anche in questo caso sono stati sintetizzati composti variamente sostituiti nelle posizioni C-2 e C-6 dell'anello aromatico. Tutti i precursori hanno struttura tetraidropiridinica, con un doppio legame nelle posizioni C-3,C-4. Tra questi **(50)**, **(51)**, **(52)** e **(53)**, sono privi di funzionalizzazione in C-3 e presentano nelle posizioni C-2,C-6 dell'anello aromatico sostituenti dimetil-, dimetossi-, di fluoro-, cloro,metossi-. I derivati da **(54)**-**(57)** sono analoghi dei precedenti contenenti la funzionalità idrossimetilica importante in posizione C-3 sulla piperidina. (Figura 41).

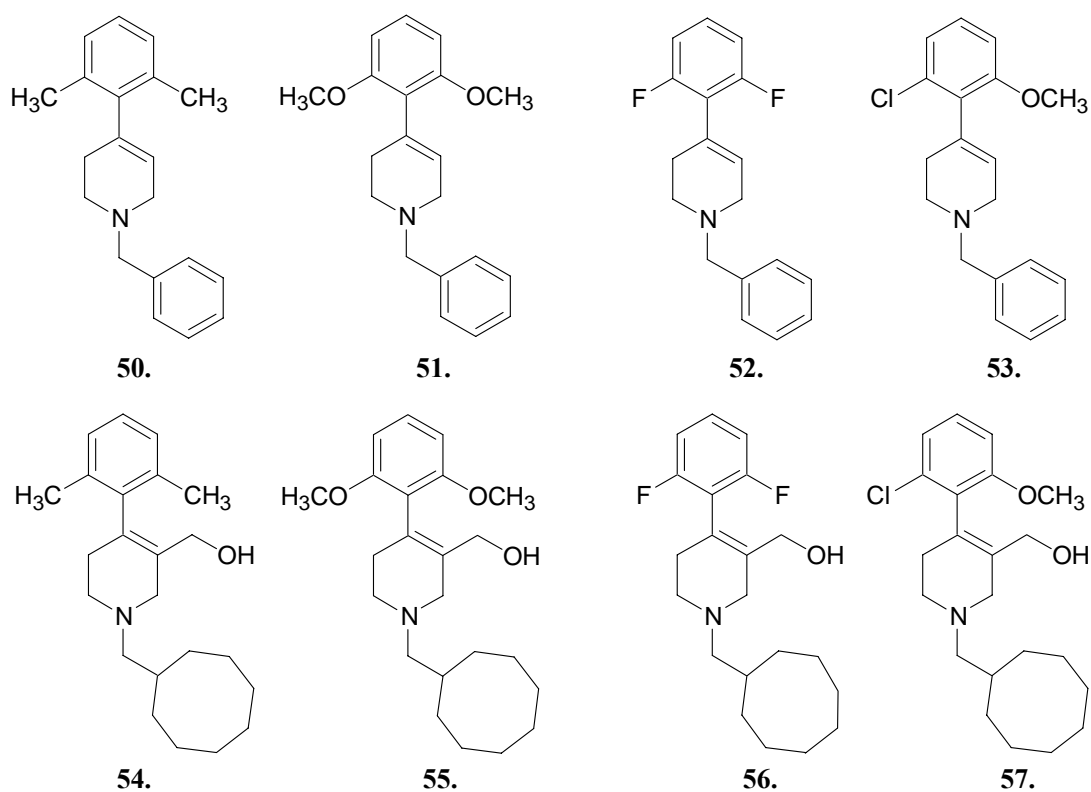


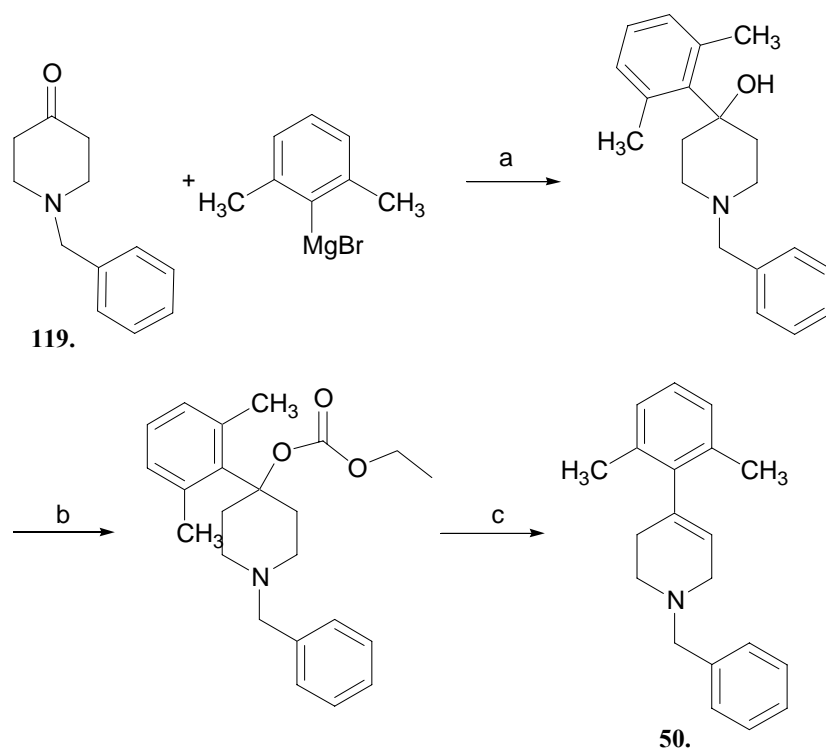
Figura 41

La prima procedura sintetica per la preparazione di (**50**) ricalcava quella descritta da Carroll^{63,64} a partire da N-benzil-piperidin-4-one. La reazione con 2,6-dimetil-fenil-magnesio bromuro in THF anidro a riflusso porta alla formazione dell'alcol terziario (Schema 17) la cui disidratazione è risultata insoddisfacente seguendo i protocolli riportati in letteratura.⁶⁵ Abbiamo quindi deciso di adottare una procedura completamente diversa (Schema 18).

⁶³ J.B. Thomas *et al*, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 3127-3137.

⁶⁴ J.A. Werner *et al*, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 587-597.

⁶⁵ B. Wenzel *et al*, *Eur. J. of Medicinal Chem.*, 40, **2005**, 1197-1205.

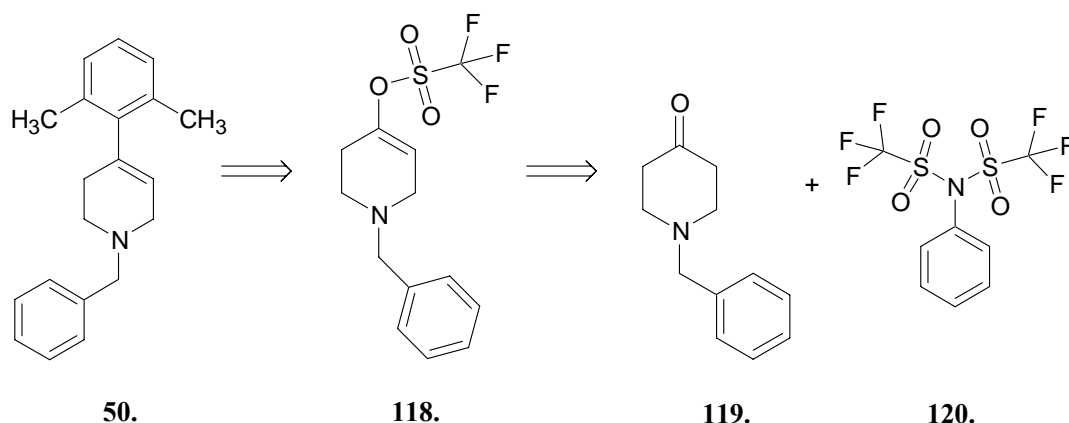


Condizioni: a) THF anidro, 1h r.t, 3h a refluxo; b) Etil cloroformiato, EtOAc, 4h r.t.; c) decalina, 24h refluxo; oppure p-TsOH, toluene refluxo 7h.

Schema 17

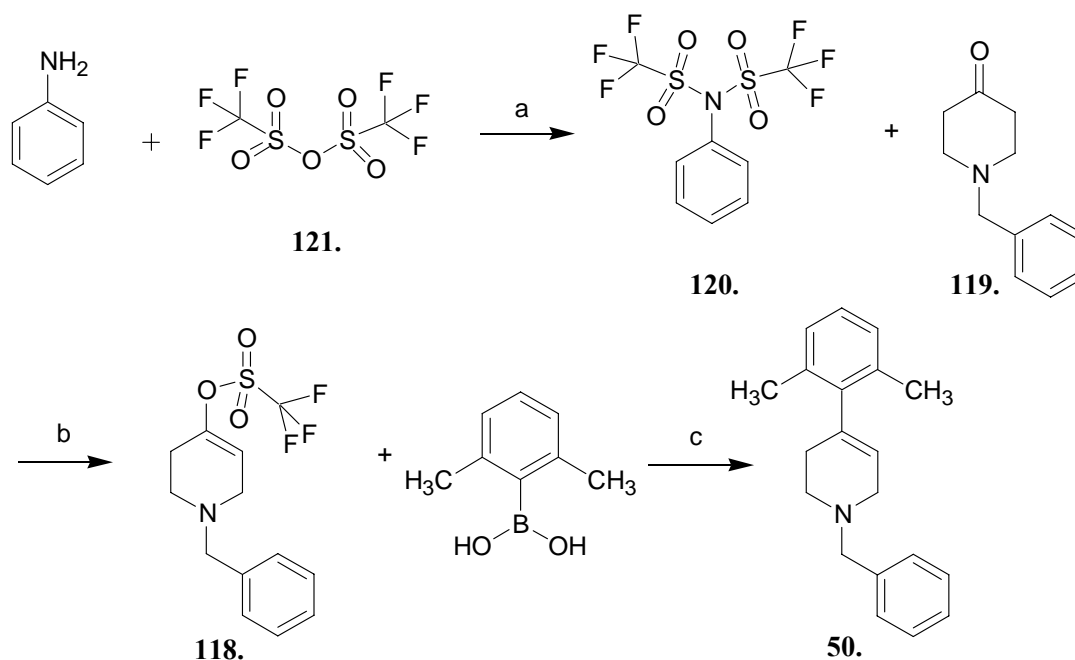
Tutti i composti in Figura 34 sono stati preparati mediante reazione di Suzuki tra l'opportuno acido boronico e un derivato trifluorometansolfonato. In modo particolare, i composti (**50**), (**51**), (**52**) e (**53**), privi di funzionalizzazione in C-3 sull'anello tetraidropiridinico, si ottengono per reazione di Suzuki del trifluorometansolfonato (**118**) con l'acido 2,6-dimetil/dimetossi/difluoro/cloro,metossi-fenil boronico utilizzando Pd(PPh₃)₄ come catalizzatore, 1,4-diossano anidro come solvente, in presenza di carbonato di sodio acquoso e litio cloruro, scaldando a refluxo per quattro ore⁶⁶. Nello schema 18 è presentata, come esempio, la via retrosintetica di preparazione di (**50**), in cui si può vedere come l'intermedio trifluorometansolfonato (**118**) si ottiene per reazione tra N-benzil-4-piperidone (**119**), disponibile commercialmente, e triflimide (**120**).

⁶⁶*Tetrahedron* 61,3, 2005, 709-715; *Synthesis*, 1991, 11, 993-5.



Schema 18

Quest'ultima è stata preparata per reazione dell'anilina con anidride triflica (**121**) in diclorometano in presenza di trietilamina come base e sottoposta a reazione con N-benzil-4-piperidone (**119**) in THF utilizzando come base LDA per dare il trifluorometansolfonato (**118**). La successiva reazione di Suzuki ha consentito di ottenere le tetraidropiridine desiderate (**50**), (**51**), (**52**), (**53**) (Schema 19).

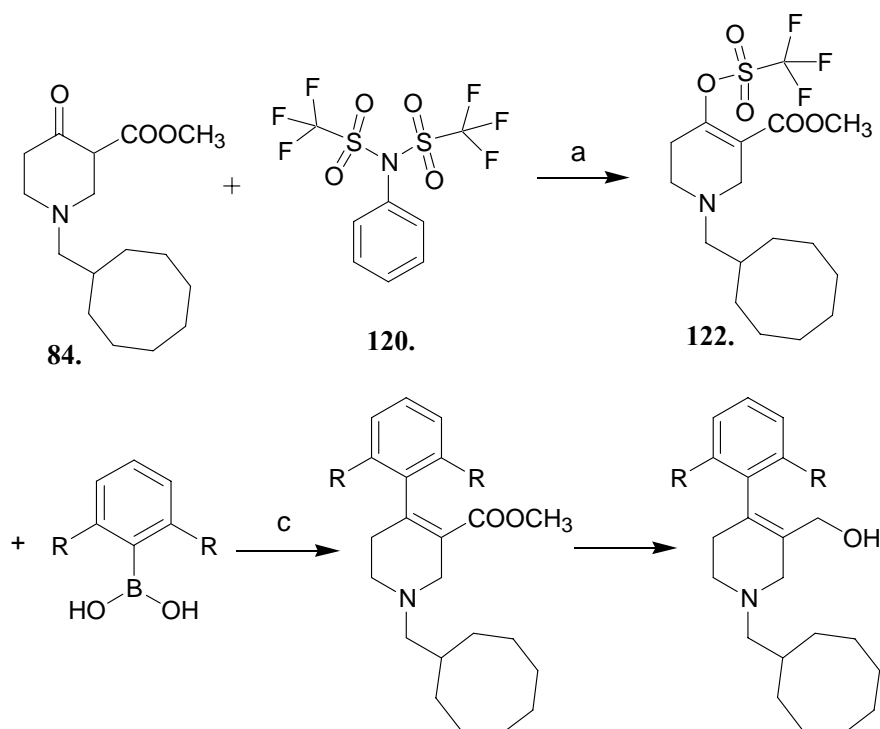


Condizioni: a) TEA, DCM anidro, -78°C , r.t.; b) LDA, THF anidro, -78°C , r.t.; c) Na_2CO_3 , 1,4-diossano, LiCl, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, riflusso 4h.

Schema 19

I derivati tetraidropiridinici (**54**), (**55**), (**56**) e (**57**), che presentano una funzionalità idrossimetilica in posizione 3 sull'anello, si ottengono secondo una procedura sintetica analoga utilizzando come materiale di partenza il β -chetoestere (**84**) al posto

dell’N-benzil-piperidone (**119**). Il trifluorometansolfonato (**122**) necessario per la reazione di Suzuki, è stato ottenuto per trattamento del composto (**84**) descritto in precedenza con triflimide (**120**) in diclorometano e sodiodruo come base⁶⁷. La successiva condensazione con l’acido boronico corrispondente conduce a un derivato tetraidropiridinico nel quale il gruppo estereo viene in seguito ridotto a funzionalità idrossimetilica con litioalluminoidruo in THF anidro a 0°C (Schema 20).

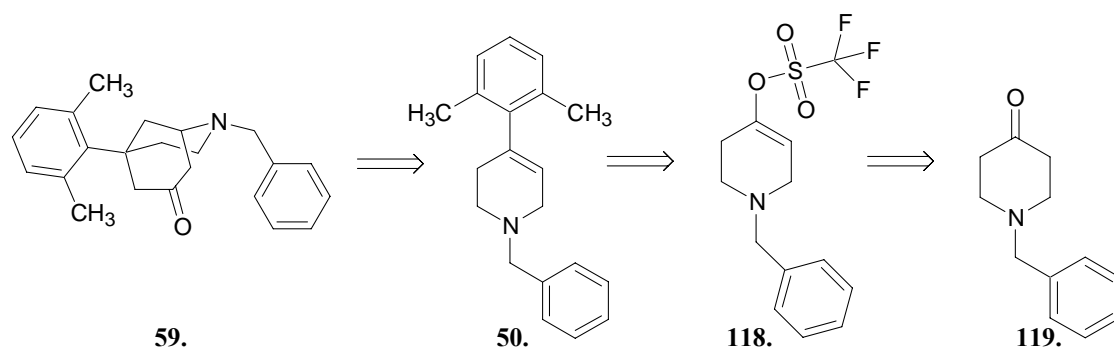


Condizioni: a) DCM, NaH, -78°C, 0°C overnight; b) Na₂CO₃, DME, LiCl, Pd(PPh₃)₄, refluxo 4h; c) LiAlH₄, THF, 0°C.

Schema 20

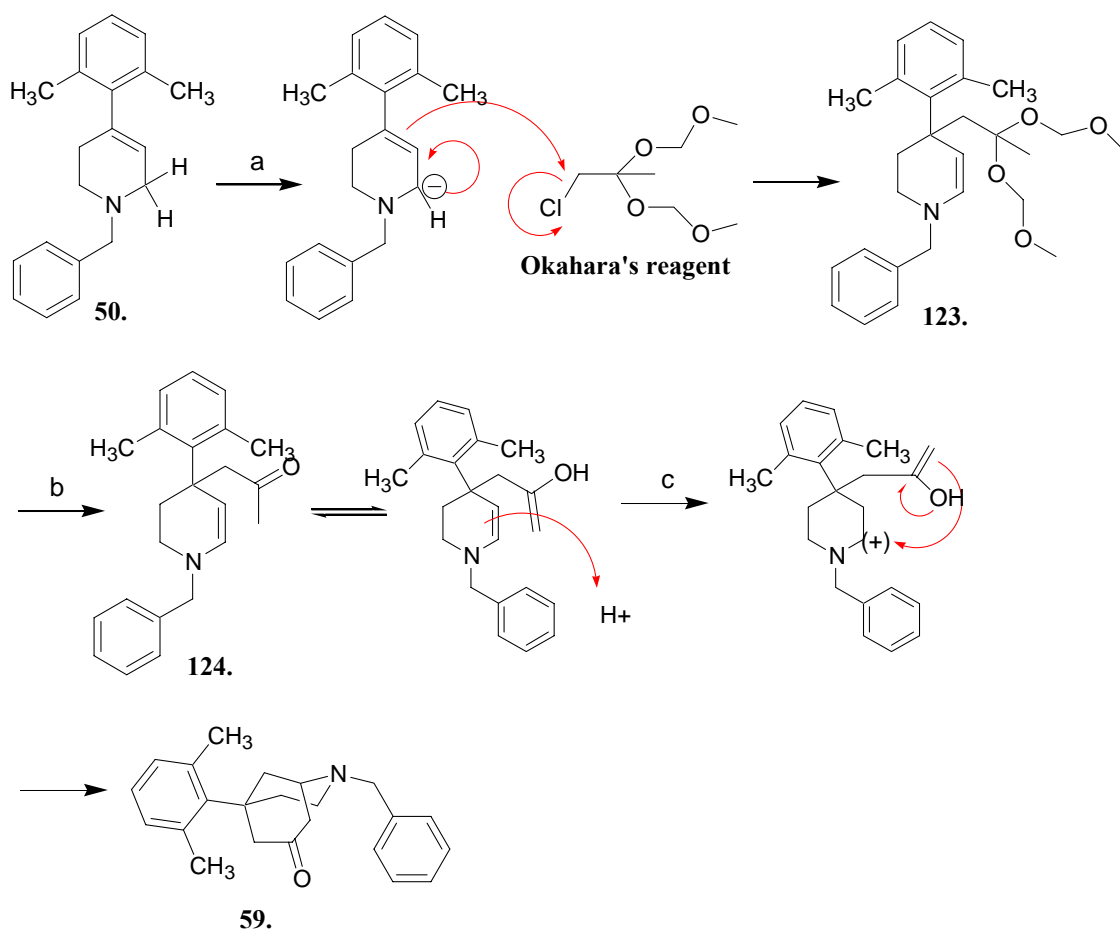
Il composto (**59**) è stato preparato secondo una via sintetica che utilizza il reattivo di Okahara per ottenere la ciclizzazione del nucleo di partenza tetraidropiridinico a morfanico come riportato in via retrosintetica nello schema 21.

⁶⁷ *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 3, 969-973.



Schema 21

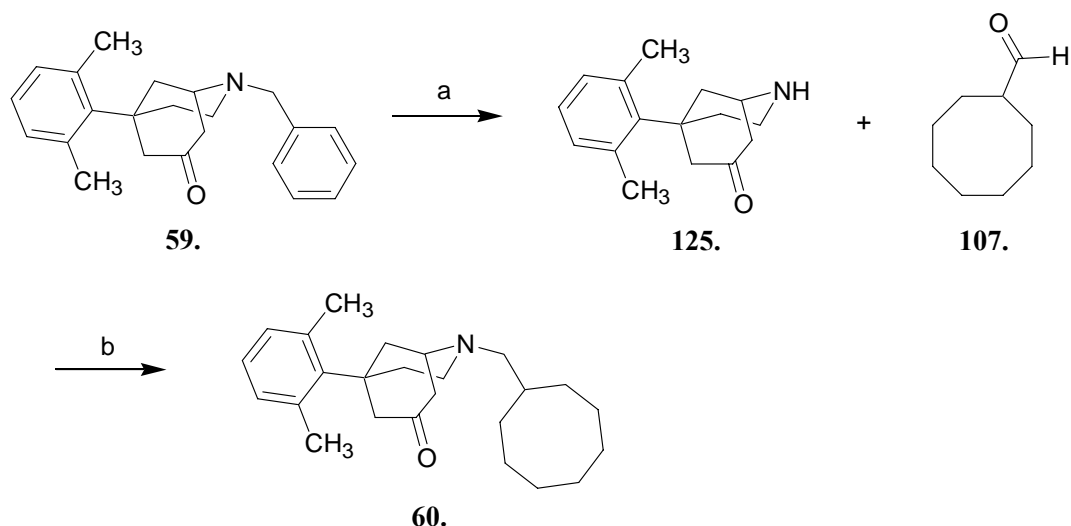
L'intermedio (**50**), già descritto nello schema sintetico 19, viene trattato con il reattivo di Okahara. Si tratta di un α -cloro-chetone protetto che, in presenza di *n*-butil-litio come base, può aggiungersi al carbonio C-4 dell'anello piperidinico portando all'intermedio (**123**) che in presenza di acido cloridrico ripristina la funzionalità carbonilica del composto (**124**), in equilibrio con la sua forma enolica. Il trattamento con acido e metanolo a temperatura ambiente porta a ciclizzazione e formazione del nucleo morfanico di (**59**) (Schema 22).



Condizioni: a) *n*BuLi 1.6M, THF, -10°C, -78°C; b) HCl 2N; c) HCl, MeOH, r.t., overnight.

Schema 22

Il composto (**59**) è stato isolato e sottoposto a test farmacologici ma anche utilizzato come intermedio per la preparazione di (**60**) attraverso rimozione riduttiva del gruppo benzilico a dare il derivato con NH libero (**125**) che viene sottoposto ad amminazione riduttiva con cicloottilcarbaldeide (**107**).



Condizioni: a) H₂, C/Pd, Parr, overnight; b) NaBH₄, MeOH, 0°C, r.t.

Schema 23

Sintesi del composto (39) e dei suoi analoghi

Il potente antagonista di riferimento (39) pubblicato da Goto *et. al.*⁶⁸ del Banyu Tsukuba Research Institute, è caratterizzato da tre sintoni fondamentali: N-benzil-D-prolina, “spacer” propil-amminico e nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico.

Nello Schema 23 viene raffigurata la via retrosintetica seguita nella sintesi di questo composto e di tutti i suoi analoghi.

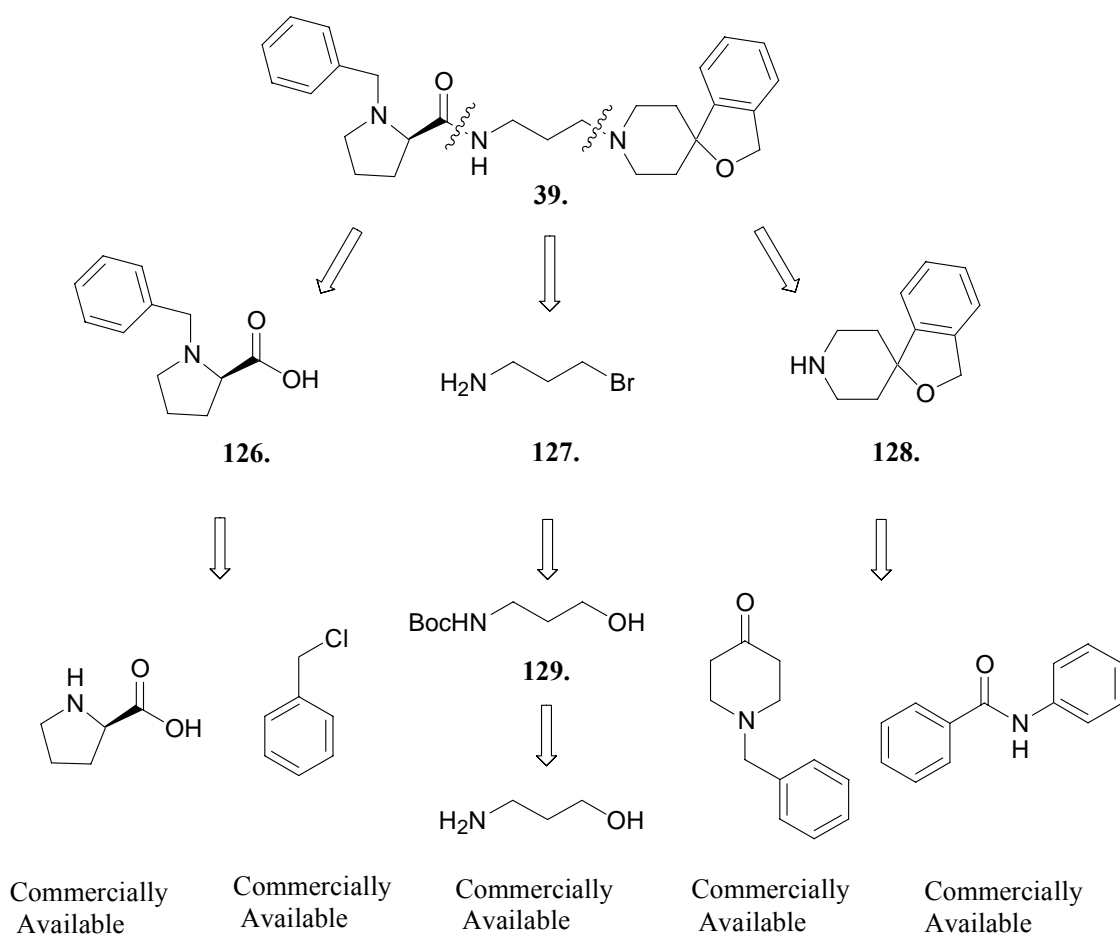
L'amminoacido pirrolidinico viene protetto alla funzionalità amminica con un gruppo benzilico (126)⁶⁹; lo “spacer” viene sintetizzato a partire dal 3-amino-propanolo, inizialmente protetto come *tert*-butil-ossi-carbonile sull'atomo di azoto a dare il composto (129)⁷⁰ il quale viene poi sottoposto a reazione di Appel a dare il composto (127)⁷¹; il nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico (128) è stato ottenuto a partire dalla benzanilide e dall'N-benzil-piperidone.

⁶⁸ Y. Goto *et. al.*; *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 847-849.

⁶⁹ Y.N. Belokon', *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 4249-4252.

⁷⁰ M. Lourdes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, **1987**, 16, 1250-1251.

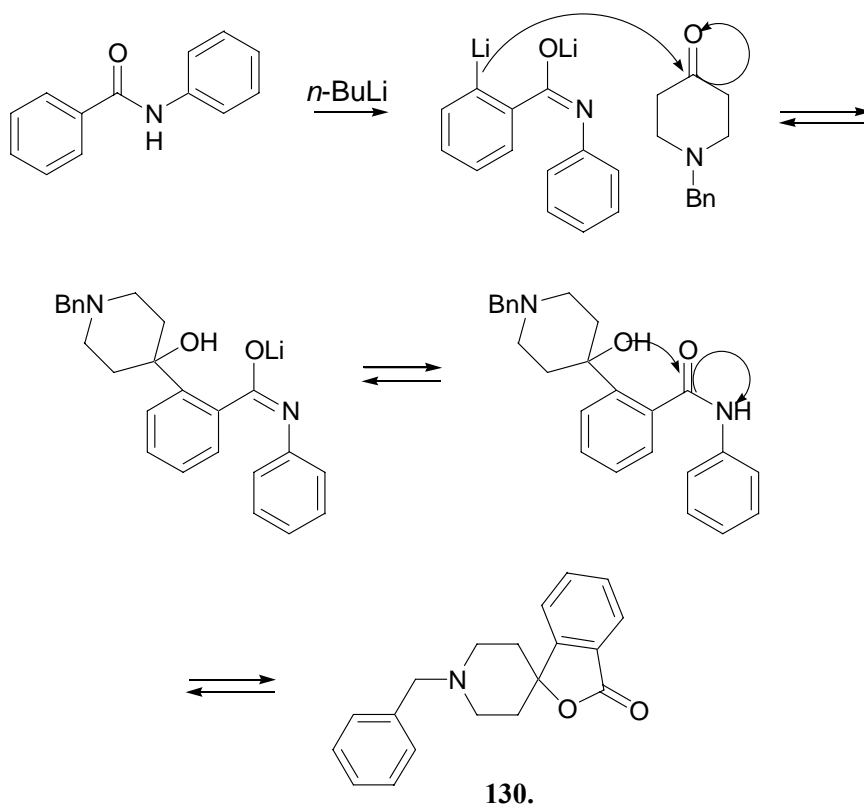
⁷¹ T.W. Baughman, J.C. Sworen, K.B. Wagener; *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10943-10948.



Schema 24

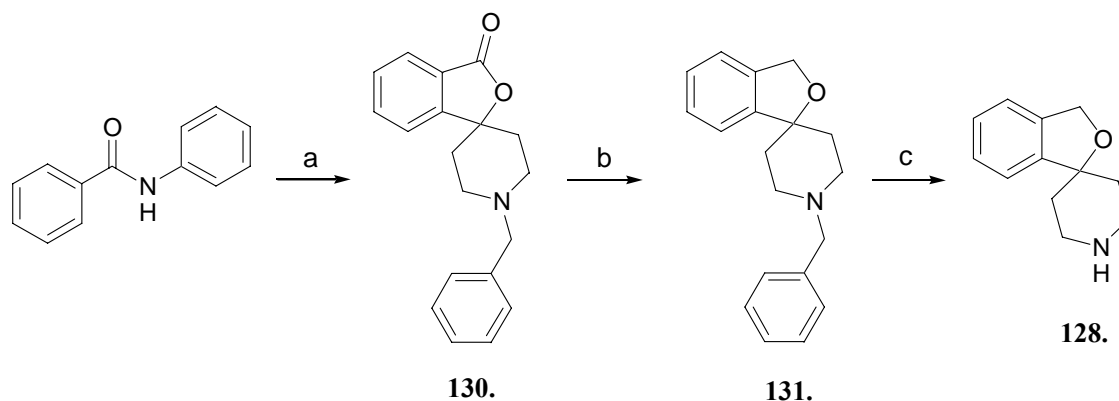
La sintesi parte da benzanilide che, per reazione con *n*-BuLi, in THF anidro a -78 °C, forma il carbanione indispensabile all'attacco in posizione C-4 dell'*N*-benzil-piperidin-4-one per dare il composto (**130**) di natura spiro-piperidinica contenente un nucleo benzo-lattonico.

Nello Schema 25 viene riportato il meccanismo di questa reazione, considerata come il passaggio chiave nella sintesi del nuovo antagonista NOP (**39**), sintetizzato per la prima volta dai ricercatori del Banyu Tsukuba Research Institute, e dei suoi analoghi.



Schema 25

Il gruppo carbonilico del composto (**130**) viene ridotto in THF anidro con $(\text{CH}_3)_2\text{S}^*\text{BH}_3$, per dare il nucleo benzo-furanico (**131**) che subisce idrogenazione catalitica in etanolo in presenza del catalizzatore C/Pd 10%, per fornire il composto (**128**) (Schema 26).



Condizioni: a) *n*-BuLi 2.5M, -78°C; N-benzil-piperidin-4-one, 0°C; THF anidro, riflusso, overnight; b) $(\text{CH}_3)_2\text{S}^*\text{BH}_3$, 0°C; THF anidro, riflusso, overnight; c) H_2 , C/Pd 10%, EtOH, overnight.

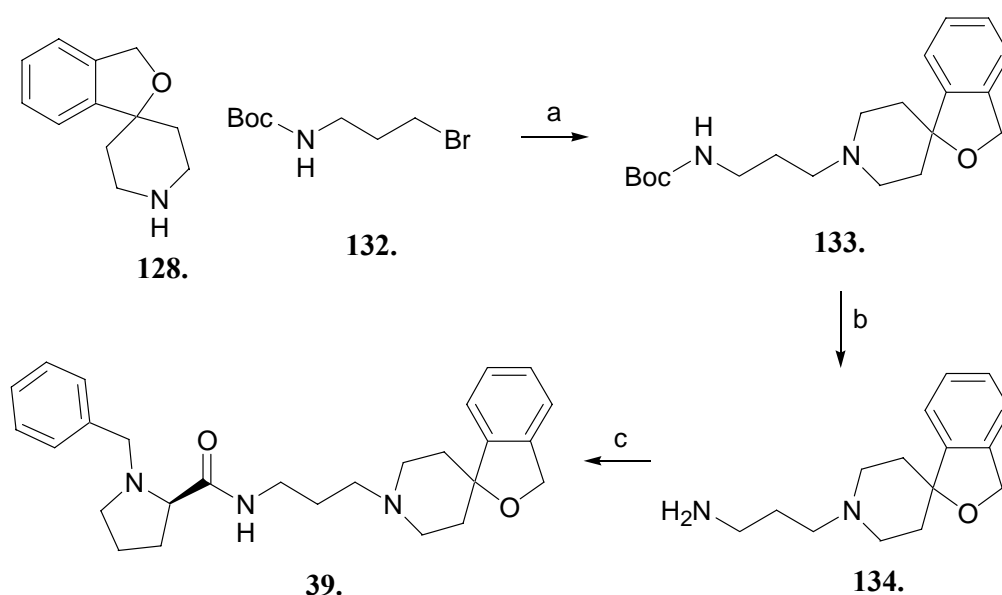
Schema 26

Questo intermedio di reazione rappresenta il nucleo fondamentale nella sintesi del ligando NOP (**39**) e di tutti i suoi analoghi.

Il lavoro è stato a questo punto focalizzato sulla sintesi dello “spacer” a tre atomi di carbonio, successivamente condensato mediante un legame amminico allo scaffold spiroperididnico e con un legame ammidico all’N-benzil-D-prolina.

Dopo aver sintetizzato i tre nuclei fondamentali, questi sono stati condensati tra loro in modo da ottenere il composto (**39**).

L’alchilazione dello “spacer” (**132**) sul nucleo spiroperididnico (**128**) viene fatta in DMF in presenza di K_2CO_3 . Il trattamento dell’intermedio (**133**) con acido trifluoroacetico ha permesso di ottenere l’ammina libera (**134**), successivamente condensata con N-benzil-D-prolina (**126**) in DMF a dare il composto (**39**) (Schema 27).



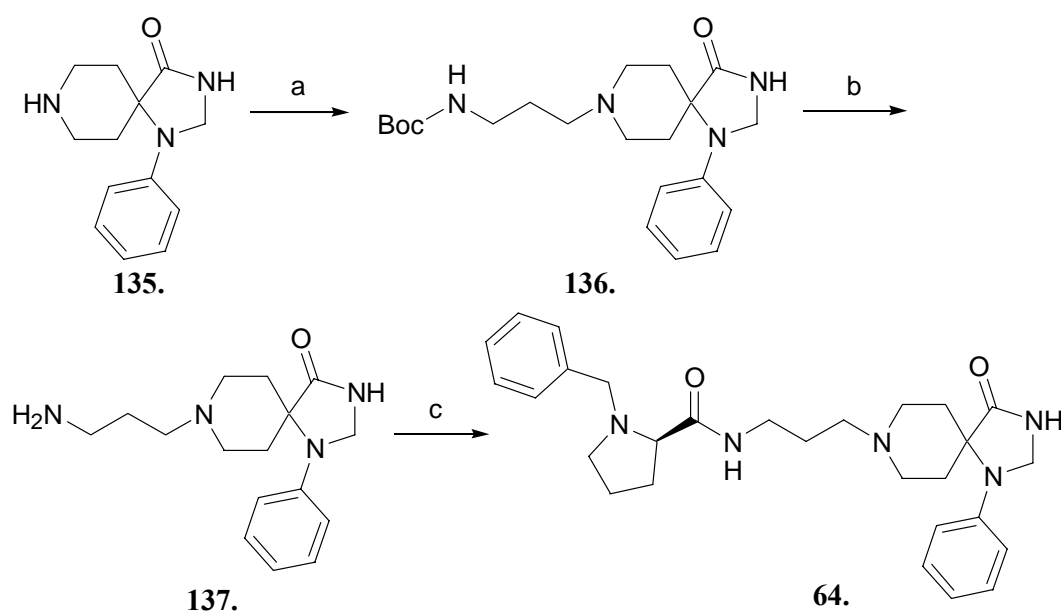
Condizioni: a) DMF, 60°C, 1h; b) TFA, r.t., 1h; c) (D)-N-Bn-Pro (**126**), HOBt, WSC, DMF, r.t., overnight.

Schema 27

Quest’ultimo rappresenta il punto di partenza per la sostituzione del nucleo spiroperididnico presente in (**128**) con altri scaffold molecolari presenti in composti attivi sul recettore NOP noti in letteratura.

Così, nel composto (**64**), il nucleo spiroperididnico presente in (**128**) è stato sostituito con il sintone 1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one (**135**), presente nei ligandi

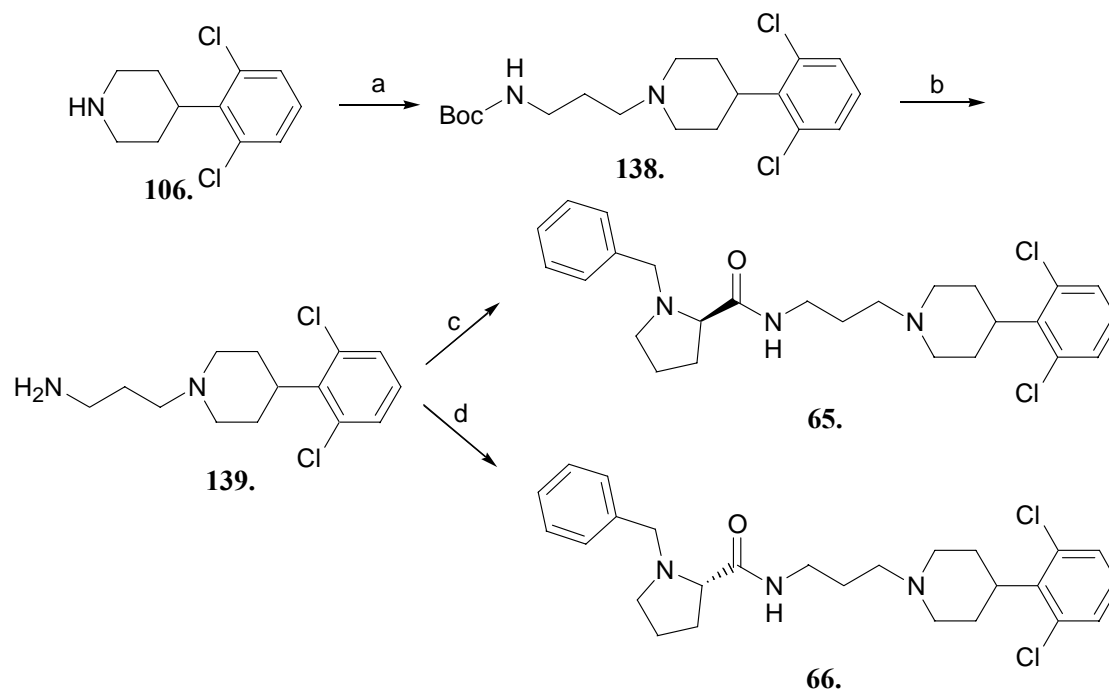
NOP agonisti sviluppati da Hoffman-La Roche (Figura 8). La procedura utilizzata per il suo ottenimento coincide con quella seguita per la sintesi di (39) attraverso il legame di (135) con lo “spacer” protetto all’N con un gruppo *tert*-butil-ossi-carbonile, la cui successiva rimozione permette la condensazione con N-benzil-prolina (Schema 28).



Condizioni: a) DMF, 60°C, 1h; b) TFA, r.t., 1h; c) (D)-N-benzil-prolina (126), HOBT, WSC, DMF, r.t., overnight.

Schema 28

Lo scaffold spiroperidinic di riferimento è stato successivamente sostituito con una piperidina che presenta in posizione 4 il gruppo 2,6-dicloro-fenilico. Tale funzionalità è presente nel potente antagonista NOP di SmithKline Beecham SB-612111 e si è dimostrata essere uno scaffold di grande interesse. Lo schema sintetico per ottenere questo sintone è già stato mostrato nello schema 12. La 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidina (106) viene alchilata con lo “spacer” propil amminico con la funzionalità basica protetta come *tert*-butil-ossi-carbonile per dare (138), che trattato con acido trifluoroacetico viene deprotetto a dare l’ammina libera (139), successivamente condensata con la funzionalità acida dell’N-benzil-prolina sia R, a dare il composto (65) che S, portando a (66)(Schema 29).



Condizioni: a) DMF, 60°C, 1h; b) TFA, r.t., 1h; c) (D)-N-benzil-prolina (**126**), HOBt, WSC, DMF, r.t., overnight; d) (L)-N-benzil-prolina, HOBt, WSC, DMF, r.t., overnight.

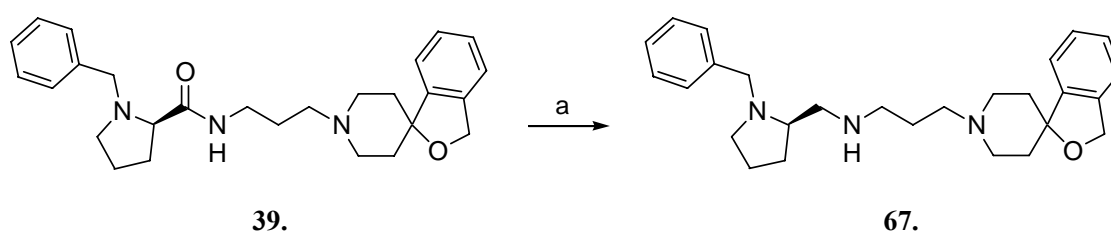
Schema 29

Con lo scopo di studiare il ruolo giocato dal legame ammidico nell'interazione col recettore NOP sono state progettate opportune modifiche di questo legame nel nuovo antagonista NOP (**39**) quali:

- Ammina secondaria;
- Ammide terziaria;
- Etere;
- Estere;
- Olefina

AMMINA SECONDARIA

Il composto (**67**), nel quale il legame ammidico viene sostituito con legame amminico, viene ottenuto a partire da composto di riferimento (**39**) mediante riduzione del carbonile dell'ammide secondaria per trattamento con borano dimetil solfuro in THF anidro a riflusso per 24h (Schema 30).

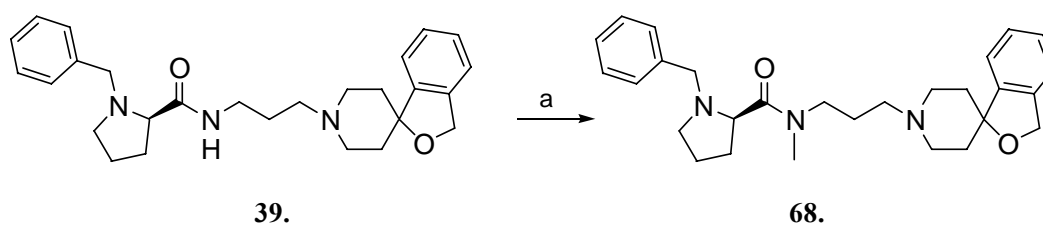


Condizioni: a) $(\text{CH}_3)_2\text{S}^*\text{BH}_3$, THF anidro, 0°C , poi riflusso, overnight.

Schema 30

AMMIDE TERZIARIA

Il composto (**39**) viene alchilato con metile ioduro in DMF in presenza di sodio idruro a dare il corrispondente derivato (**68**) caratterizzato da una ammidide terziaria (Schema 31).

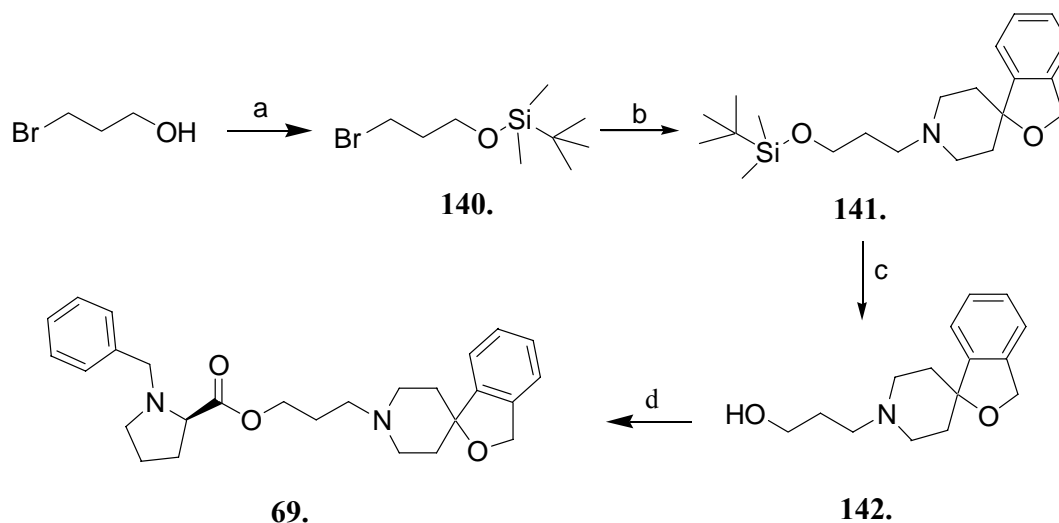


Condizioni: a) CH_3I , NaH, DMF, 0°C , r.t., 24h.

Schema 31

ESTERE

Nello Schema 32 viene descritta la preparazione del composto (**69**) caratterizzato da una funzionalità esterea al posto di quella ammidica. La sintesi prevede la protezione del 3-bromo-1-propanolo come *tert*-butil-dimetil-silil derivato (**140**), operata con *tert*-butil-dimetil-silil cloruro come reattivo in presenza di imidazolo e in THF anidro a temperatura ambiente. Questo intermedio viene poi alchilato al nucleo spiroperidinicico (**128**) a dare il composto (**141**), successivamente trattato con TBAF al fine di ottenere la funzionalità ossidrilica libera (**142**). L'esterificazione del composto (**142**) con l'*N*-benzil-D-prolina (**126**) in DMF e in presenza degli agenti condensanti HOBt e DCC, permette di ottenere il composto (**69**).

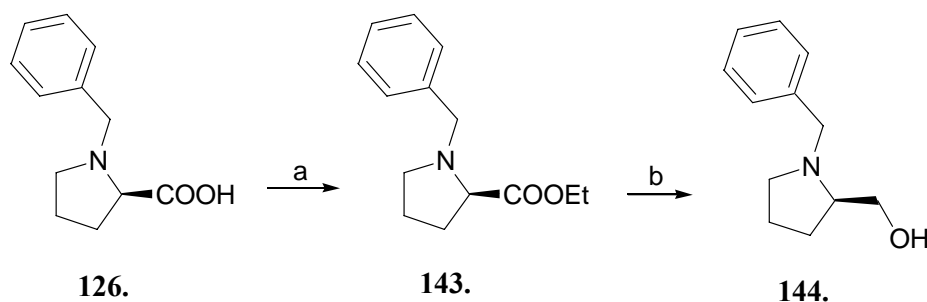


Condizioni: a) TBDMS-Cl, imidazolo, THF anidro, r.t., 24h; b) (**128**), K₂CO₃, DMF, 60°C, overnight; c) TBAF, THF, 24h; d) (**126**), HOBt, DCC, DMF, r.t., overnight.

Schema 32

ETERE

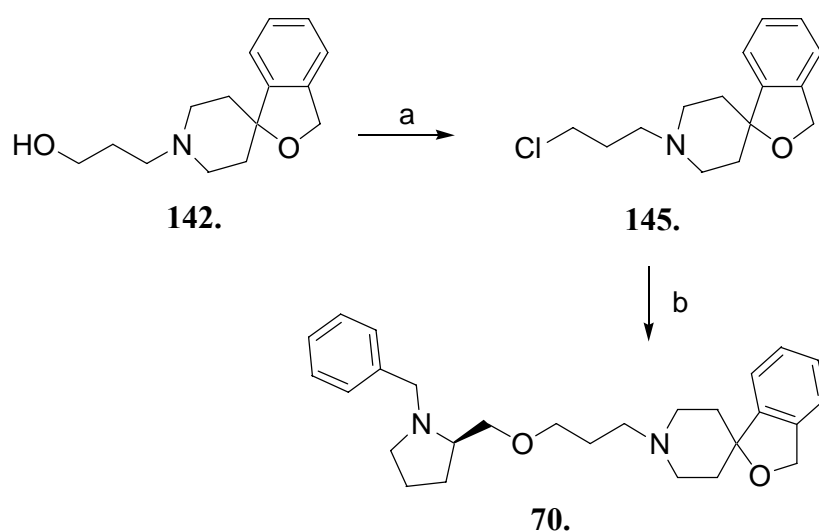
La sintesi del derivato etereo (**70**) parte dall'esterificazione della funzionalità acida dell'*N*-benzil-D-prolina a dare il composto (**143**) che viene successivamente ridotto ad alcol con litio alluminio idruro in THF a 0°C per ottenere il composto (**144**) (Schema 33).



Condizioni: a) SOCl₂, EtOH assoluto, 0°C, r.t., overnight; b) LiAlH₄, THF anidro, 0°C, 1h.

Schema 33

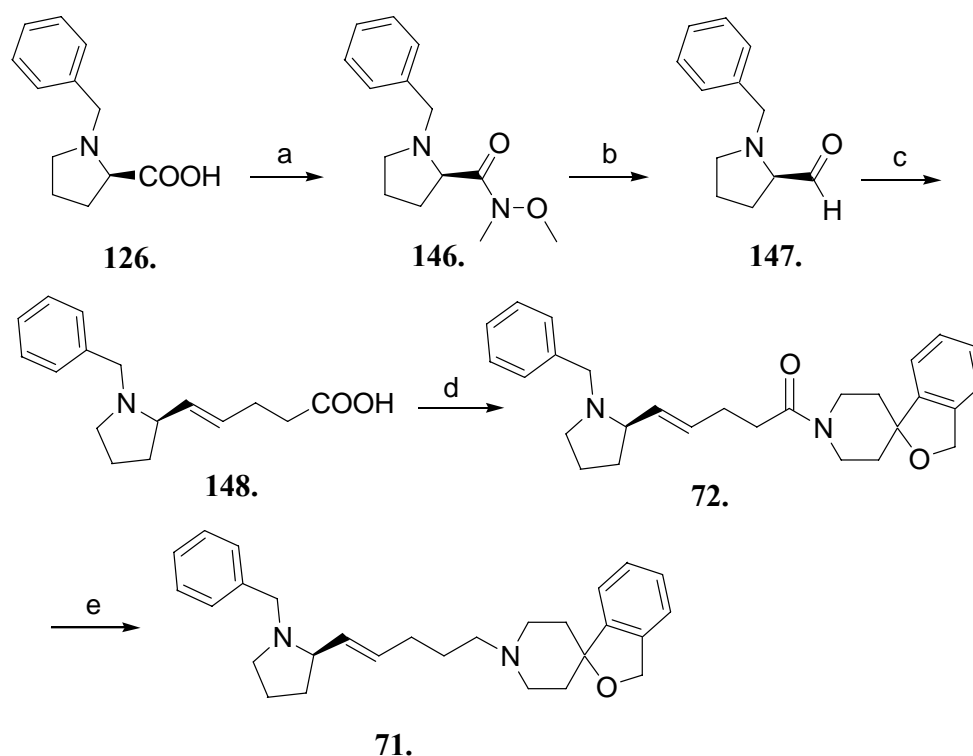
La procedura sintetica per l'ottenimento del composto (**70**) prevede l'attivazione dell'alcol (**142**), mediante tosilazione, operata in presenza di cloruro di tosile e trietilammina. Mediante studi NMR è stato osservato che il prodotto ottenuto è in realtà il cloro-derivato (**145**). Sulla base di questo risultato è stata eseguita la reazione di Williamson tra il gruppo alcolico della prolina, trattato con sodio idruro, e il composto (**142**), attivando il cloro-derivato con TBAI (tetrabutylammonio ioduro) (Schema 34).



Condizioni: a) cloruro di tosile, TEA, DCM, 0°C, r.t., overnight; b) (**144**), NaH, TBAI, DMF, 0°C, r.t., overnight.

OLEFINA

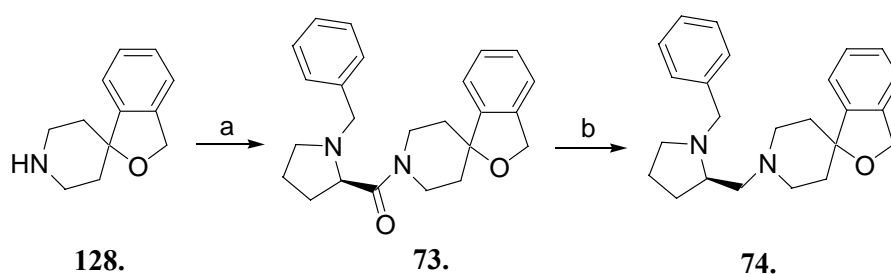
Il composto (**71**) è stato ottenuto mediante reazione di Wittig con l'aldeide ottenuta per riduzione della corrispondente ammido (**146**) con litio alluminio idruro. L'ilide di fosfonio viene fatta reagire con l'aldeide della prolina, preparata di fresco, a dare il composto (**148**). A questo punto l'acido libero viene condensato mediante procedura convenzionale con il nucleo spiroiperidinico ottenendo l'intermedio (**72**) che viene purificato e sottoposto a test farmacologici. Lo stesso derivato (**72**) viene successivamente ridotto con $(\text{CH}_3)_2\text{S}^*\text{BH}_3$ a dare il composto (**71**) in cui il legame ammidico del composto di riferimento (**39**) è stato sostituito con un legame olefinico (**71**) (Schema 35).



Condizioni: a) N-metil-N-metossi ammina * HCl, NMM, HOBt, WSC, r.t. overnight; b) LiAlH_4 , THF anidro, 0°C ; c) NaH, DMSO anidro, 77°C , 40', (3-carbossi-propil)-trifenil-fosfonio bromuro, 0°C , r.t., overnight; d) (**128**), HOBt, WSC, r.t., overnight; e) $(\text{CH}_3)_2\text{S}^*\text{BH}_3$, THF anidro, 0°C , riflusso, overnight.

Schema 35

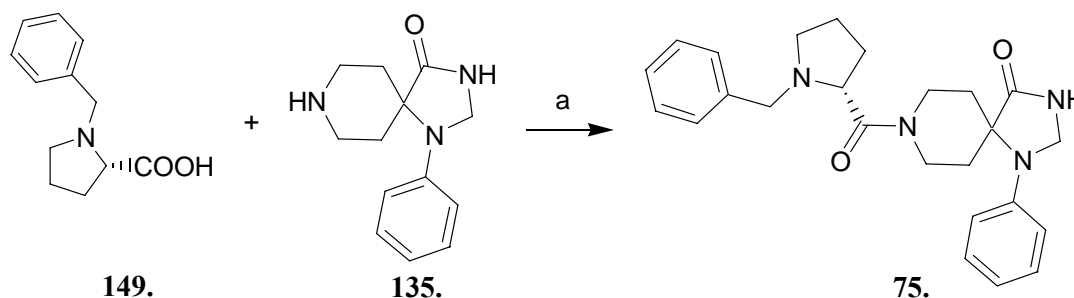
La terza fase di questo progetto è stata focalizzata sulla sintesi dei composti (**73**) e (**74**) in cui è stato tolto lo spacer propil-amminico condensando direttamente l’N-benzil-D-prolina con il nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico a dare il composto (**73**). La successiva riduzione del carbonile nelle condizioni riportate precedentemente ha permesso di isolare (**74**) (Schema 36).



Condizioni: a) (D)-N-benzil-prolina (**126**), HOAt, WSC, DMF, r.t., overnight; b) $(\text{CH}_3)_2\text{S}^*\text{BH}_3$, THF anidro, 0°C , riflusso, overnight.

Schema 36

La rimozione dello spacer è stata effettuata anche per il composto (**64**), nel quale la porzione spiro-piperidinica (**128**) è stata sostituita dal sintone 1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one (**135**), condensando direttamente (**135**) con N-benzil-L-prolina (**149**) a dare il derivato (**75**).

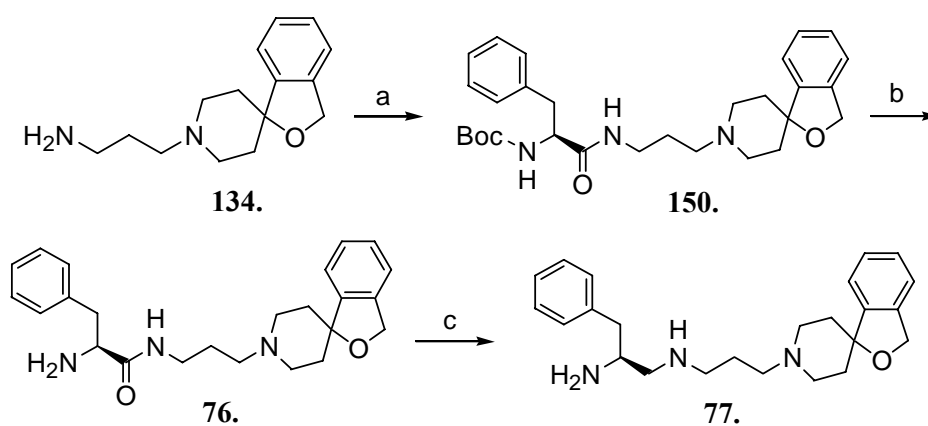


Condizioni: a) HOAt, WSC, DMF, r.t., overnight.

Schema 37

Il lavoro si è poi concentrato sulla sintesi di analoghi del composto (**39**) in cui la funzionalità amminoacidica della N-benzil-D-prolina è stata sostituita con L-Phe e con N-benzil-glicina. La condensazione di L-Phe con l'intermedio (**134**) in presenza di HOBT, WSC produce il composto (**150**) che viene poi trattato con acido trifluoroacetico per liberare la funzionalità amminica e fornire (**76**).

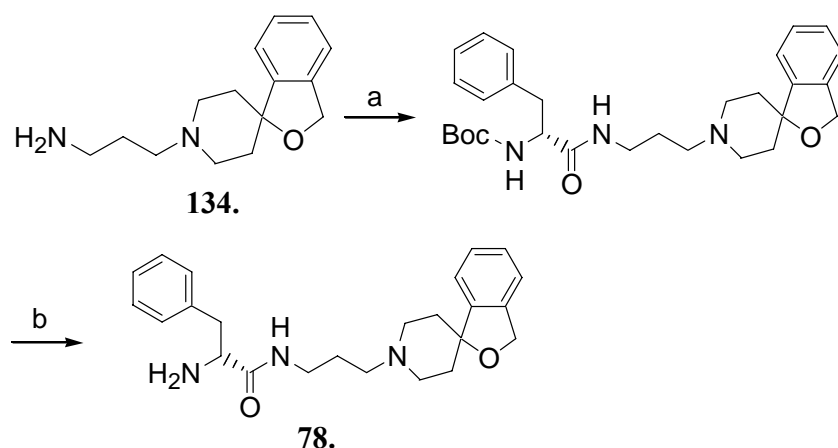
Questa molecola è stata poi sottoposta a riduzione con $(\text{CH}_3)_2\text{S}^*\text{BH}_3$ a dare il relativo composto ridotto (**77**) (Schema 38).



Condizioni: a) L-Phe, HOBT, WSC, DMF, r.t., overnight; b) TFA, r.t., 1h; c) $(\text{CH}_3)_2\text{S}^*\text{BH}_3$, THF anidro, 0°C, riflusso, overnight.

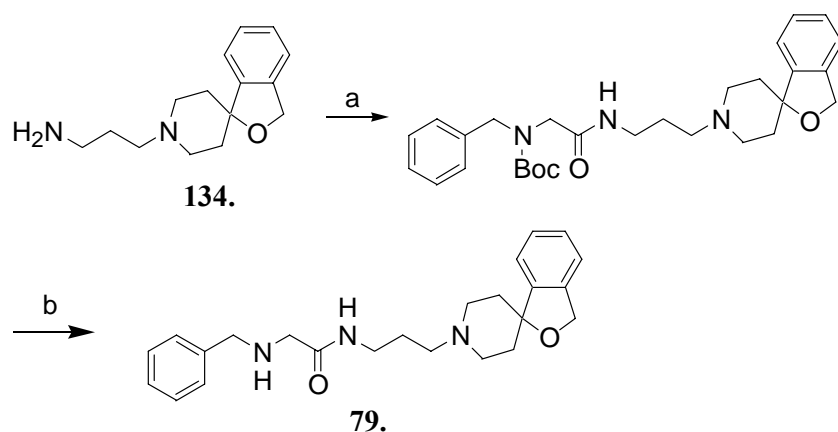
Schema 38

La medesima procedura è stata seguita per la sintesi dei composti (**78**), nel quale l'N-benzil-D-prolina è stata sostituita con l'aminoacido D-Phe (Schema 39) e (**79**), in cui l'amminoacido pirrolidinico, presente nel composto di riferimento (**39**), è stato sostituito con l'N-benzil-glicina (Schema 40).



Condizioni: a) D-Phe, HOBt, WSC, DMF, r.t.,overnight; b) TFA, r.t., 1h.

Schema 39



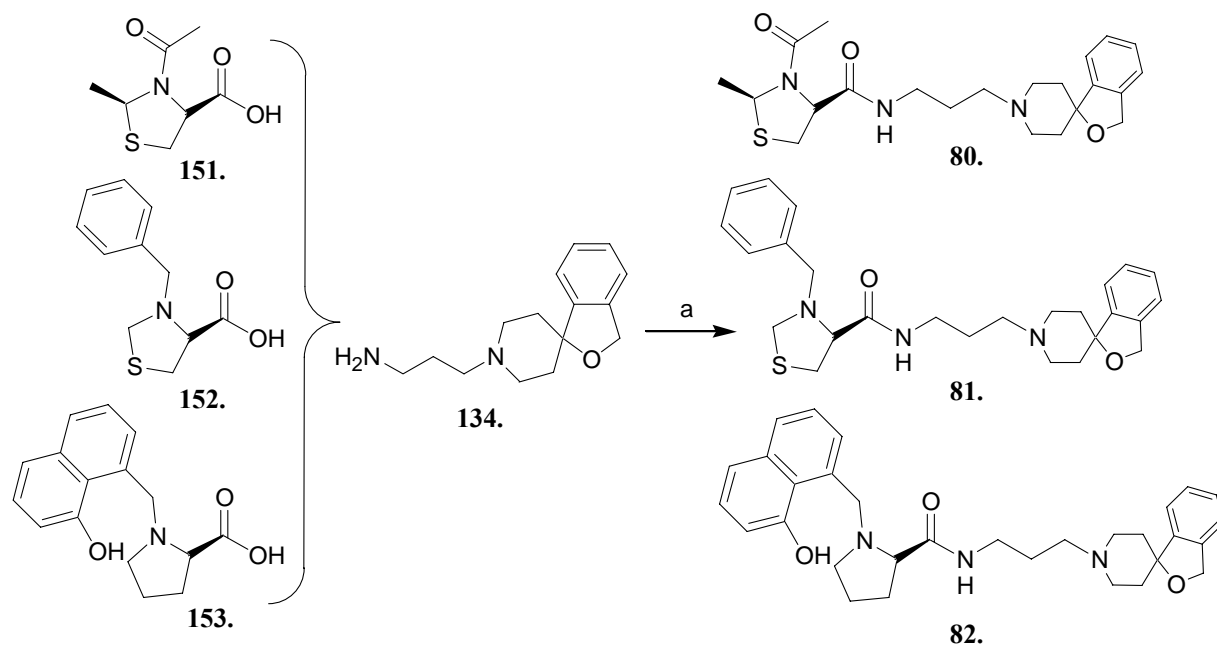
Condizioni: a) N-Phe, HOBt, WSC, DMF, r.t.,overnight; b) TFA, r.t., 1h.

Schema 40

Altre modificazioni riguardanti la porzione aminoacidica sono state la sostituzione del benzile nell’N-benzil-D-prolina con un anello β -naftolico, pi \ddot{u} ingombrante, a dare il derivato (**82**) e con strutture tiazolidiniche, che sono bioisosteri della pirrolidina, variamente modificate. Sono stati preparati quindi il derivato N-benzil-tiazolidinico (**81**) e quello 2-metil-N-acetil-tiazolidinico (**80**).

Tali derivati sono stati sintetizzati mediante la medesima procedura di condensazione dell’ammina (**134**) con gli scaffold degli acidi 3-acetil-2-metil-tiazolidin-4-carbossilico (**151**), 3-benzil-tiazolidin-4-carbossilico (**152**) e 1-(8-idrossi-naftalen-1-

ilmetil)-pirrolidin-2-carbossilico (**153**) utilizzando gli agenti condensanti classici per dare i composti desiderati (**80**), (**81**) e (**82**) (Schema 41).



Condizioni: a) HOBt, WSC, DMF, r.t. overnight.

Schema 41

RISULTATI FARMACOLOGICI

Presso i laboratori di Farmacologia del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Ferrara e i laboratori di Farmacologia del Professor Dave Lambert dell'Università di Leicester (UK) sono stati effettuati saggi di binding recettoriale utilizzando omogenati di cellule CHO transfettate con il recettore NOP umano andando a valutare l'affinità di legame come pK_i calcolata secondo quanto citato in letteratura⁷². È stata poi valutata l'attività antagonista attraverso saggi *in vitro* effettuati su vaso deferente di topo stimolato elettricamente. La potenza degli antagonisti è espressa in termini di pA_2 che è definita come il logaritmo negativo in base 10 della concentrazione molare di antagonista in presenza della quale è necessario raddoppiare la concentrazione dell'agonista per raggiungere la risposta evocata in origine.

Le proprietà antagoniste sono state valutate usando come agonista la Nocicettina, la quale è in grado di inibire la contrazione indotta elettricamente in modo concentrazione dipendente: la curva concentrazione-risposta (crc) mostra un effetto massimo pari all' $89 \pm 1\%$ del controllo e una pEC_{50} di 7.72. I risultati sono stati valutati rispetto al composto di riferimento e al ligando endogeno Nocicettina.

Il composto più interessante tra i derivati di J-113397 studiati, è quello denominato TRAP-101. Esso ha mostrato *in vitro* un'affinità recettoriale elevata, con un valore di pK_i di 8.65 (Tabella 2) e un'attività farmacologica paragonabile al riferimento, a differenza del derivato *cis* di J-113397 che ha mostrato un valore di pA_2 molto inferiore di 5.88 (Tabella 3).

⁷² G. Calò *et al*, *British J. of Pharmacology*, **2000**, 129, 1261-1283.

Tabella 2. Risultati farmacologici di affinità recettoriale per J-113397 e TRAP-101.

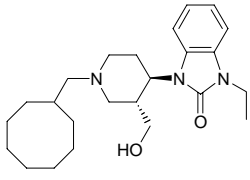
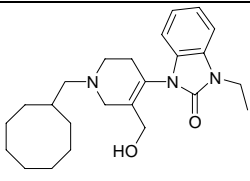
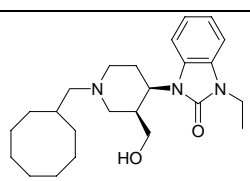
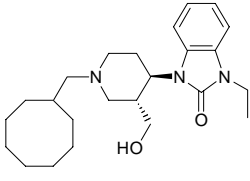
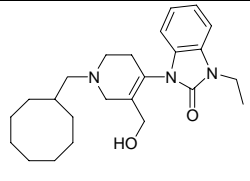
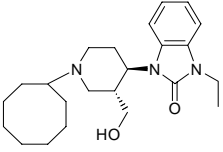
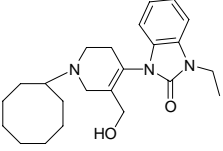
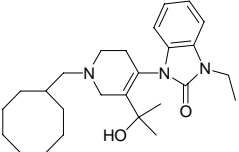
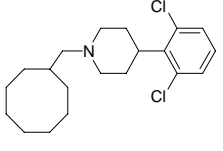
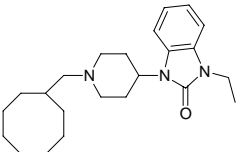
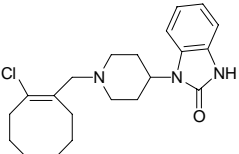
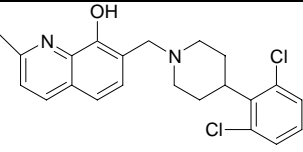
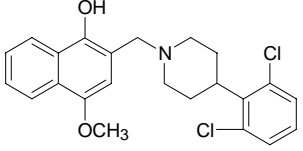
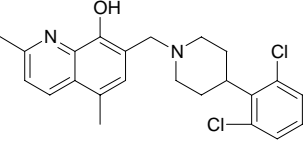
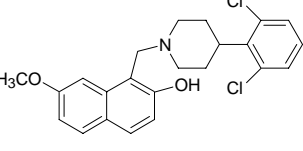
<i>Compound</i>	<i>Structure</i>	<i>pK_i</i>
N/OFQ	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln	9.02 ± 0.029
(40) (±)J-113397		9.15
(41) TRAP-101		8.65
<i>Cis</i> -derivato		5.88

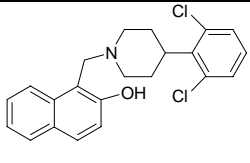
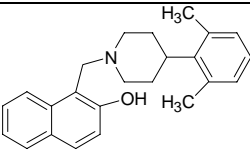
Tabella 3. Dati farmacologici di attività antagonista per J-113397 e TRAP-101.

<i>Compound</i>	<i>Structure</i>	<i>pA₂</i>
(40) (±)J-113397		7.79
(41) TRAP-101		7.75

Sono riportati in tabella 4 i risultati farmacologici ottenuti effettuando i medesimi saggi di attività antagonista per parte delle molecole presentate in questo lavoro di dottorato.

Tabella 4. Attività antagonista per derivati del J-113397 e chimere.

<i>Compound</i>	<i>Structure</i>	<i>pA₂</i>
(95)		7.41
(96)		6.77
(42)		7.08
(43)		6.09
(58)		6.04
(101)		/
(45)		< 5
(46)		4.58
(47)		< 5
(48)		5.16

(49)		6.95
(112)		7.44

Dai risultati farmacologici ottenuti si può osservare come l'eliminazione nella struttura di J-113397 dello spacer metilenico con introduzione di un sostituito ciclottilico al posto del cicloottilmetilico nei composti (95) e (96) mantenga attività antagonista anche se non particolarmente elevata, con valori di pA_2 di 7.41 e 6.77 rispettivamente. Questo risultato è in disaccordo con quanto ipotizzato da Zaveri second cui tale modifica avrebbe portato a conferire attività agonista sul recettore NOP. Da notare come in questo caso, a differenza del TRAP-101, l'introduzione del doppio legame sui carboni C-3 e C-4 della piperidina, porti ad un considerevole calo di attività *in vitro*. Questo potrebbe essere associato ad una disposizione della molecola nello spazio non ottimale rispetto al J-113397.

L'introduzione nel composto (42) di una funzionalità alcolica terziaria nel tentativo di aumentare la stabilità metabolica di TRAP-101 *in vivo* ha portato ad un composto con attività antagonista non particolarmente interessante, decisamente inferiore rispetto al riferimento. Ancora da valutare è l'effetto di tale modifica sulla stabilità metabolica *in vivo*.

I composti (58), derivato di J-113397, e (43), parziale chimera tra quest'ultimo e SB-612111, entrambi mancanti della funzionalità idrossimetilica, hanno mostrato un'attività antagonista molto scarsa in linea con quanto atteso. Essi costituiscono una conferma dell'importanza del gruppo ossidrilico per l'attività biologica sul recettore NOP.

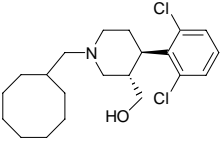
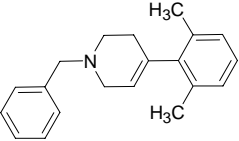
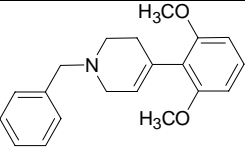
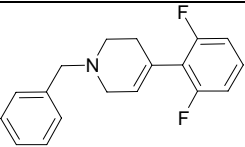
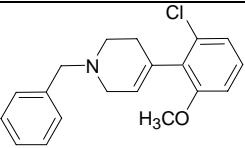
Un comportamento particolare è stato osservato per il composto (101), il quale non ha mostrato alcuna attività antagonista ma è risultato invece un agonista parziale con pEC_{50} di 5.57 ed E_{max} dell'88%.

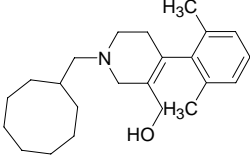
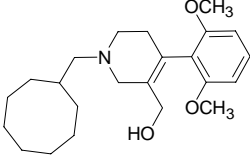
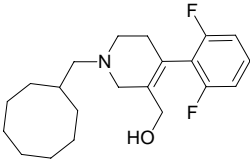
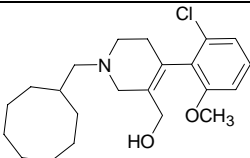
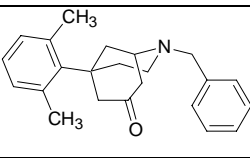
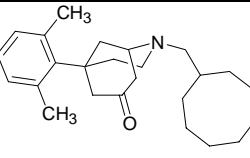
Gli interessanti derivati (45)-(49) sono chimere contenenti la porzione 4-(2,6-dicloro-fenil)piperidinica caratteristica dell'SB-612111, e, come sostituito all'azoto

piperidinico, strutture naftoliche o chinoliniche in riferimento all'antagonista NOP, JTC-801. Tutti i composti preparati portano una funzionalità ossidrilica sul sostituente dell'azoto piperidinico. Tale funzionalità è stata inserita in quanto presente nei più potenti derivati antagonisti non peptidici del recettore NOP (J-113397, SB-612111). Tra tutti i composti risulta particolarmente interessante quello che porta il β -naftolo in posizione N-1 e il 2,6-dimetil fenile in posizione 4 della piperidina. Una discreta potenza, decisamente superiore ai suoi analoghi, ($pA_2 = 7.44$), è stata infatti osservata per il composto (**112**) la cui peculiarità è la presenza dello scaffold 2,6-dimetil (e non dicloro)fenil-piperidinico. Questo risultato è di grande interesse e ci ha spinto ad approfondire lo studio su tale modifica.

Per tutti gli altri composti da noi preparati sono ad oggi a disposizione solo i dati di affinità recettoriale riportati in tabella 5.

Tabella 5. Affinità recettoriale per derivati tetraidropiridinini e morfani.

<i>Compound</i>	<i>Structure</i>	<i>pK_i</i>
(44)		< 5
(50)		6.74 ± 0.11
(51)		< 5
(52)		< 5
(53)		< 5

(54)		6.99 ± 0.13
(55)		< 5
(56)		< 5
(57)		< 5
(59)		< 5
(60)		< 5

Tutti i derivati di tipo tetraidropiridinico precursori dei composti morfani sono risultati privi di affinità per il recettore NOP con valori di pK_i inferiori a 5, quindi trascurabili. Interessante notare come anche in questo caso, i soli composti che hanno mostrato un buon grado di affinità sono (50) e (54), contenenti la porzione 4-(2,6-dimetil-fenil)piperidinica.

Questo risultato ci ha indirizzati nella sintesi dei corrispondenti derivati morfani utilizzando come scaffold i composti (50) e (54), che hanno mostrato la maggior affinità verso il recettore NOP.

I due derivati morfani (59) e (60), sottoposti a test farmacologici, si sono mostrati, a differenza dei loro precursori, del tutto privi di affinità recettoriale. Questo fa pensare che, pur essendo nota un'elevata omologia tra i due sistemi, non sia possibile trasferire un modello farmacoforico così complesso dai recettori oppioidi al NOP.

Il derivato (**44**) che porta in posizione C-4 della piperidina la porzione 2,6-dicloro-fenilica, in C-3 l'idrossimetile e sull'azoto N-1 il sostituito cicloottilmetilico, merita una discussione più approfondita. Tale composto porta nella stessa molecola i farmacofori che sono ritenuti essenziali per l'attività antagonista delle due molecole di riferimento. Il composto chimerico tra i potenti antagonisti J-113397 e SB-612111 è risultato del tutto privo di affinità per il recettore NOP.

Tale risultato, alquanto inatteso, farebbe pensare che non sia possibile creare molecole chimeriche utilizzando farmacofori presi da antagonisti noti in letteratura.

I risultati ottenuti ci permettono comunque di dire che nello scaffold 4-fenil-piperidinico 2,6 disostituito, il ruolo dei due atomi di cloro o ancora meglio, dei due gruppi metilici, è di grande importanza nel mantenere la disposizione perpendicolare dell'anello aromatico mediante ingombro sterico.

Risultati farmacologici del composto (39**) e dei suoi analoghi**

Anche il composto (**39**) e i suoi derivati sono stati sottoposti a test farmacologici al fine di valutare la loro capacità di legarsi al recettore NOP. Presso i laboratori di Farmacologia del Professor Dave Lambert dell'Università di Leicester (UK) sono stati effettuati saggi di binding recettoriale, utilizzando omogenati di cellule CHO transfettate con il recettore NOP umano. I dati riportati in tabella 6 sono espressi come pK_i e i risultati vengono valutati in riferimento al ligando endogeno Nocicettina, che presenta un valore di pK_i di circa 9.

Tabella 6. Affinità biologica del composto di riferimento (**39**) e degli analoghi sintetizzati.

<i>Compound</i>	<i>Structure</i>	<i>pK_i</i>
N/OFQ	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-	9.02 ± 0.029

	Gln	
(39)		9.62 ± 0.07
(64)		< 5
(65)		9.14 ± 0.05
(66)		7.08 ± 0.02
(67)		7.31 ± 0.06
(68)		5.94 ± 0.28
(69)		6.97 ± 0.02
(70)		6.80 ± 0.80
(71)		< 5
(72)		< 5

(73)		< 5
(74)		< 5
(75)		< 5
(76)		7.23 ± 0.05
(77)		< 5
(78)		7.23 ± 0.19
(79)		7.22 ± 0.08
(80)		6.78 ± 0.04
(81)		6.77 ± 0.12
(82)		7.24 ± 0.09

Il composto di riferimento (39) mostra in questi saggi una pK_i pari a 9.62, valore di affinità recettoriale elevato e molto interessante in quanto superiore al ligando

endogeno stesso. Questo dato è sostanzialmente in linea con quanto riportato in letteratura³².

La sostituzione del nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico con lo scaffold 1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one (**64**) ha prodotto un derivato completamente inattivo mentre l'introduzione del nucleo 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidinico (**65**) ha portato ad una molecola con valore molto alto di pK_i di 9.14.

La grande differenza di affinità recettoriale tra le due molecole chimeriche è sicuramente sorprendente poiché entrambe derivano dalla combinazione di sintoni molecolari appartenenti a ligandi NOP estremamente affini e potenti. Degno di nota il fatto che nel composto (**64**) il sintone molecolare introdotto proviene da una molecola NOP agonista (Ro 64-6198), mentre nel composto (**65**) da un ligando NOP antagonista (SB-612111).

Analizzando il sostituente in posizione 4 del nucleo piperidinico dei composti (**39**), (**64**) e (**65**) si può notare che la distanza in termini di atomi tra l'azoto piperidinico e il nucleo aromatico è la stessa per i composti (**39**) e (**65**) (entrambi ad elevata affinità per il recettore NOP) ed è invece aumentata di un atomo nel composto (**64**) (inattivo) (Figura 42).

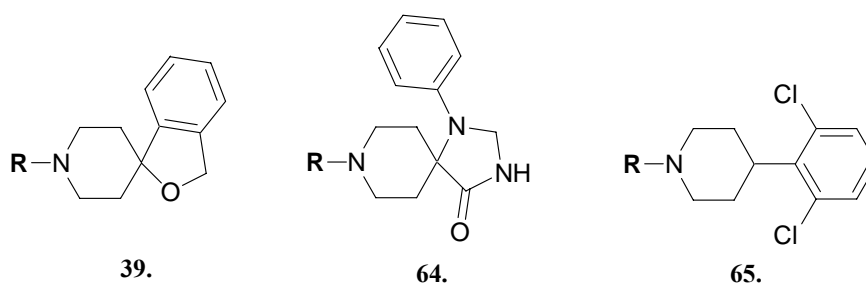


Figura 42

Questa non è sicuramente l'unica ragione in grado di giustificare l'enorme differenza di affinità tra i composti (**64**) e (**65**) in quanto nell'antagonista NOP J-113397 la distanza tra l'azoto piperidinico e il nucleo fenilico è la medesima di (**64**). Il maggior numero di atomi che separa l'azoto piperidinico dal nucleo aromatico e l'elevata libertà conformazionale del nucleo fenilico del composto (**64**) potrebbero in parte spiegarne l'inattività (Figura 43).

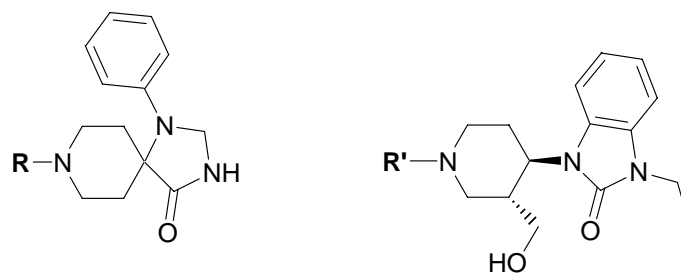


Figura 43

La sostituzione dell’N-benzil-D-prolina con N-benzil-L-prolina presente nel derivato (66) ha portato ad un calo di affinità di almeno 100 volte rispetto a (65). Questo dato è in linea con quanto precedentemente riportato per il composto (39)³², nel quale l’inversione di chiralità del residuo di prolina è accompagnata da un’importante perdita di affinità recettoriale. Anche per il composto (65), quindi, la chiralità del residuo di prolina è estremamente importante per l’affinità NOP.

Modificazioni del gruppo ammidico come la riduzione che porta al composto (67), l’N-metilazione che porta a (68), la trasformazione in estere e in metilen-ossi presente rispettivamente in (69) e (70) e in olefina, composti (71) e (72), ha generato analoghi almeno 100 volte meno affini rispetto al riferimento (39). Questo dimostra la grande importanza della funzionalità ammidica per l’interazione col recettore. Come detto precedentemente l’unico ligando NOP riportato in letteratura che presenta tale funzionalità è il JTC-801³⁰. Anche per questo composto lo studio relazione struttura-attività ha messo in evidenza che sia l’N-metilazione che la retro-inversione del legame ammidico determinano un drastico calo di affinità recettoriale. Nel tentativo di capire la ragione di questo, abbiamo osservato che tutte le modifiche apportate al legame ammidico ne impediscono l’equilibrio tautomerico (Figura 44).

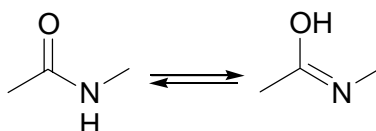


Figura 44

L’importante perdita di affinità ottenuta mediante le modificazioni alla funzionalità ammidica nei composti (67)-(72) potrebbe essere attribuita all’impossibilità di

generare per equilibrio tautomerico del legame ammidico una funzione ossidrilica in grado di agire quale accettore/donatore di legami idrogeno. È noto del resto che sia la funzione alcolica primaria presente in C-3 sull'anello piperidinico di J-113397 che in posizione 5 nel nucleo benzocicloheptanico in SB-612111, sono essenziali per l'attività biologica di queste molecole.

L'eliminazione dello "spacer" operata nei composti (73) e (74) ha prodotto analoghi completamente privi di affinità suggerendo che la distanza tra i due farmacofori aromatici è importante per l'interazione con il recettore. Sarebbe a questo punto molto interessante variare la lunghezza dello spaziatore propil-amminico e valutare l'effetto a livello di affinità recettoriale di catene a diverso numero di atomi di carbonio.

Anche il composto (75), privo di "spacer" e contenente lo scaffold 1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one è risultato non in grado di legare il recettore NOP.

La sostituzione dell'N-benzil-D-prolina con la fenilalanina, sia mantenendo invariato il legame ammidico, (76), che modificandolo come metileno-amminico, (77), porta a composti con affinità 100 volte inferiore o nulla. In considerazione del fatto che anche nella molecola di riferimento (39) l'inversione di chiralità dell'N-benzil-D-prolina porta ad un'importante perdita di affinità, il dato farmacologico ottenuto per il composto (76) risulta d'interesse. Per questo motivo abbiamo preparato e sottoposto a valutazione biologica il relativo analogo contenente la D-Phe, (78), il quale mantiene un'affinità identica al suo analogo. Questo inatteso risultato potrebbe essere spiegato considerando le diverse caratteristiche di questi derivati rispetto a (39), quali: distanza dell'aromatico dal gruppo carbonilico, mancanza della rigidità conformazionale caratteristica del residuo di prolina, presenza di un gruppo amminico primario.

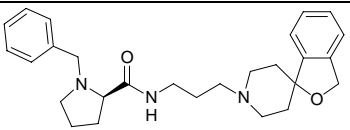
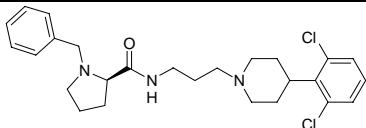
Anche la perdita di chiralità, ottenuta schiftando la catena laterale della fenilalanina dal carbonio in alfa (C α) all'azoto, ha prodotto un composto, (79), poco affine per il recettore NOP a conferma del fatto che la chiralità gioca un ruolo importante per il legame recettoriale.

Le ultime modificazioni considerate hanno riguardato ancora la porzione amminoacidica. La sostituzione del benzile nell'N-benzil-D-prolina con un anello β -naftolico, più ingombrante, ha portato a un derivato, (82), con una affinità recettoriale discreta, con pK_i di 7.24. Sarebbe interessante approfondire lo studio di questa struttura per capire se questo effetto è dovuto solo a ingombro sterico, o se la funzionalità ossidrilica in quella posizione può giocare un ruolo importante.

I derivati (**80**) e (**81**) presentano strutture tiazolidiniche, bioisosteri della pirrolidina, variamente modificate. Non sorprendente la scarsa affinità registrata per (**80**), nel quale il gruppo benzilico sull'atomo di azoto viene sostituito da un gruppo acetile, e un gruppo metilico è presente in C-2 sull'anello tiazolidinico. Inferiore alle aspettative invece la pK_i osservata per (**81**), essendo la sostituzione bioisosterica C-S l'unica modifica introdotta.

Il composto che ha mostrato maggiore affinità recettoriale tra quelli da noi preparati, (**65**), e il composto (**39**) sono stati sottoposti a test farmacologici *in vitro* al fine di valutare la loro attività come antagonisti del recettore NOP. Anche in questo caso, sono stati effettuati saggi su vaso deferente di topo stimolato elettricamente, usando come agonista il ligando endogeno Nocicettina e andando a calcolare valori di pA_2 (Tabella 7).

Tabella 7. Attività antagonista per composti (**39**) e (**65**).

<i>Compound</i>	<i>Structure</i>	<i>pA₂</i> <i>(CL</i> <i>95%)</i>
(39) 100nM		8.24 (7.74-8.78)
(65) 100nM		7.57 (6.80-8.34)

Il composto (**39**) mostra un valore di pA_2 molto alto, con un'attività farmacologica superiore ai più potenti antagonisti del recettore NOP fino ad ora presenti in letteratura. Diversamente da quanto atteso, la modifica da noi apportata con

l'introduzione della porzione 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidinica, pur mantenendo una affinità recettoriale molto alta, determina un calo di circa 60 volte dell'attività antagonista. Test farmacologici *in vivo* sono in fase di valutazione per le stesse molecole.

CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata studiata la possibilità di individuare nuovi antagonisti del recettore NOP in riferimento alle strutture di ligandi noti in letteratura, quali J-113397, SB-612111 e JTC-801 mediante la preparazione di derivati e composti chimerici. Questo studio ha permesso di ottenere molte informazioni sulle strutture dei principali antagonisti NOP.

È stata osservata l'importanza in tali strutture dei sostituenti sull'anello piperidinico e, soprattutto, della loro disposizione spaziale. In modo particolare è stata in diversi modi dimostrata l'importanza della presenza di una funzionalità ossidrilica capace di generare un legame a idrogeno a livello della tasca recettoriale, influenzando in modo considerevole l'attività farmacologica sul recettore NOP.

Si è inoltre osservata la difficoltà di trasferire lo studio su derivati morfani, potenti antagonisti dei recettori oppioidi, allo studio di ligandi per il recettore NOP.

È stato poi affrontato un approfondito studio relazione struttura-attività (SAR) del nuovo antagonista del recettore NOP: acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico{3-[spiro-[isobenzofuran-1(3-*H*),4'-piperidin-1-il]]-propil}-amide, modificando le tre parti principali della molecola: il nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico, lo "spacer" propil-aminico e la porzione costituita dalla N-benzil-D-prolina.

Sia lo "spacer" propil-aminico che la funzione ammidica sono di fondamentale importanza per l'attività del composto. L'eliminazione del primo e la sostituzione del legame ammidico con le diverse funzionalità studiate ha infatti portato a molecole a parziale o assente affinità per il recettore NOP.

La sostituzione dell’N-benzil-D-prolina con altri amminoacidi che presentano la stessa funzionalità benzilica ha determinato un importante calo di affinità.

Il nucleo spiro-isobenzofuran-piperidinico può essere sostituito con il nucleo 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidinico, già utilizzato in precedenza per lo sviluppo di ligandi NOP antagonisti. Tale modifica porta ad un composto analogo di **(39)** ad elevata affinità NOP e con una buona attività antagonista nei confronti del recettore stesso.

Il composto **(65)** rappresenta il primo esempio di molecola chimerica affine al recettore NOP ottenuta combinando sintoni molecolari appartenenti ad antagonisti potenti e selettivi per lo stesso sistema, noti in letteratura. Questo risultato è in contrasto con quanto evidenziato in precedenza per il composto chimerico tra J-113397 e SB-612111.

PARTE SPERIMENTALE

Le reazioni e le miscele di prodotti sono state controllate mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su lastre di gel di silice Macherey-Nagel poligram SIL/UV 254 da 0.25 mm, usando come sistemi di rilevazione una lampada UV a 254 nm e permanganato di potassio in soluzione acquosa al 2%. Le purificazioni cromatografiche su colonna sono state eseguite con gel di silice Merck 60-200 mesh.

I prodotti sono stati anidrificati con sodio solfato anidro Carlo Erba.

Gli spettri IR sono stati eseguiti con apparecchio Perkin-Elmer FT-IR Paragon 500 o FT-IR Spectrum 100 utilizzando una cella a diamante di seleniuro di zirconio, per le intensità valgono le seguenti abbreviazioni: s= forte; m= media; w= debole; bs= segnale allargato.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ e DEPT sono stati effettuati con uno strumento VARIAN 400 MHz in soluzione di CDCl_3 se non specificato in modo diverso. Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in parte per milione (ppm) utilizzando come standard interno il picco a 7.256 ppm del cloroformio deuterato, mentre le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hertz (Hz). Per le molteplicità valgono le seguenti abbreviazioni: s = singoletto; d = doppietto; t = tripletto; q = quartetto; m = multipletto; br = segnale allargato; dd = doppio doppietto; dt = doppio tripletto; td= triplo doppietto.

Il controllo analitico sia degli intermedi che dei prodotti finali è stato operato mediante HPLC analitico Beckmann Sistem Gold 168 e utilizzando una colonna Alltech C-18 (150 x 4.6 mm, 5 μm). I composti sono stati analizzati utilizzando un sistema eluente binario composto da H_2O e CH_3CN entrambi acidificati con lo 0.1% v/v di TFA (A ed B rispettivamente), ad un flusso di 1 ml/min.

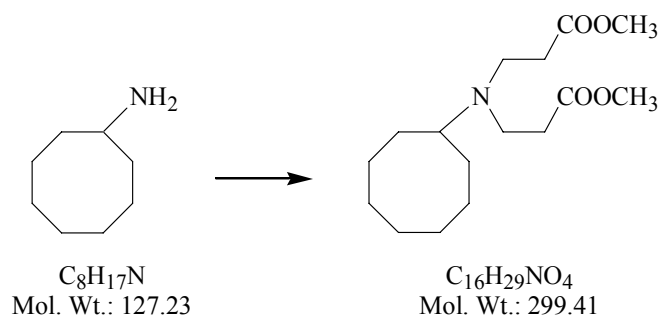
I pesi molecolari degli intermedi e dei prodotti finali sono stati determinati mediante spettrometro di massa electrospray ESI MICROMASS ZMD 2000.

I punti di fusione sono stati determinati con apparecchio Buchi-Tottoli e non sono stati corretti.

I solventi e i reagenti utilizzati per le TLC, le purificazioni cromatografiche, le cristallizzazioni e per le reazioni sono indicati come segue:

- Etere o Et₂O per l'etere etilico;
- THF per il tetraidrofurano;
- DMF per la N,N'-dimetilformammide;
- EtPt per l'etere di petrolio;
- AcOEt o EtOAc per l'acetato d'etile;
- DCM per il cloruro di metilene;
- TFA per l'acido trifluoroacetico;
- TEA per la trietil-ammina;
- MeOH per il metanolo o alcol metilico;
- i-PrOH per l'isopropanolo;
- Boc₂O per di-*tert*-butil-dicarbonato o anidride del BOC (*tert*butilossicarbonil);
- Bn-Cl per il benzil-cloruro;
- HOBt per 1-idrossi-benzotriazolo;
- HOAt per 1-idrossi-7-azabenzotriazolo;
- WSC per 1-etil-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimmide cloridrata;
- DCC per N,N'-dicioesil-carbodiimide;
- TBDMS-Cl per *tert*butildimetilsililcloruro;
- TBAF per tetrabutylamoniofloruro;
- NMM per la N-metil-morfolina;
- R.t. per la temperatura ambiente.

Preparazione di: 3-[Ciclooctil-(2-metossicarbonil-etil)-amino]-propionico acido metil estere (**98**)



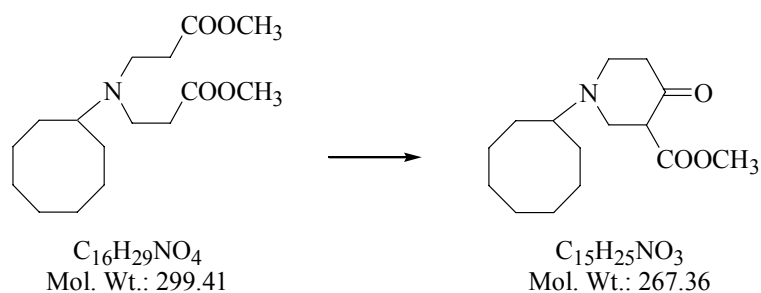
Una soluzione di (**97**) (5gr, 39.23 mmoli) in metanolo (20ml) viene aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di metil acrilato 2eq (7ml, 78.01 mmoli) in metanolo (50ml). La reazione viene agitata per 24 h, dopodiché il solvente viene evaporato sotto vuoto ed il residuo viene purificato per flash cromatografia utilizzando EtOAc/EtPt 1/6 come eluente, a dare (**98**) (8,45 gr, 72%) come olio giallo.

Caratteristiche del composto (**98**):

IR (Film): 1741 cm⁻¹.

¹H NMR(CDCl₃): δ 1.10-1.80 (m, 15H), 2.42 (t, 4H, J=7 Hz), 2.74 (t, 4H, J=7 Hz), 3.66 (s, 6H).

Preparazione di: 1-Ciclooctil-4-oxo-piperidin-3-carbossilico acido metil estere (**99**)



Ad una soluzione di (**98**) (8 gr, 26.72 mmoli) in toluene (80ml) raffreddata a 0°C viene aggiunto in un'unica porzione il potassio *tert*-butilato, la sospensione viene agitata per 30 minuti a 0°C e poi per 12h a temperatura ambiente. A reazione terminata vengono aggiunti 100ml di acqua, si separano le fasi e la fase acquosa viene estratta per 3 volte con AcOEt, le fasi organiche riunite vengono anidricate e concentrate in vuoto. Il residuo viene purificato per flash cromatografia utilizzando EtOAc/EtPt 1/9 a dare (**99**) come olio arancione con una resa del 78%.

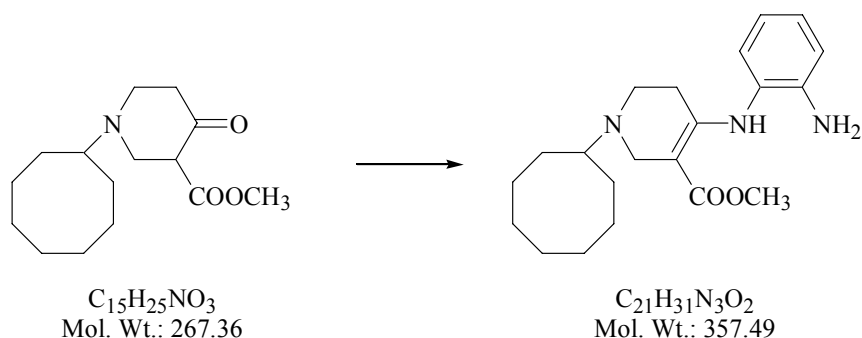
Caratteristiche del composto (**99**):

IR (Film): 1747, 1722, 1667, 1625 cm^{-1} .

MS (ESI): $[MH]^+ = 268$.

1H NMR (CDCl₃): 15-1.85 (m, 15H), 2.37 (t, 2H, J=7 Hz), 2.56 (t, 2H, J=7 Hz), 3.07 (sistema AB, 2H, J=10 Hz), 3.73 (s, 3H), 11.87 (s, b, 1H forma enolica).

Preparazione di: 4-(2-amino-fenilamino)-1-ciclooctil-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-carbossilico acido metil estere (**154**)



Una soluzione di (**99**) (3 gr, 11.22 mmoli) e *o*-fenilendiammina (2.1 gr, 17.28 mmoli) in toluene (50ml), viene scaldata a riflusso per 12 ore in presenza di acido acetico glaciale (0.5 ml) e setacci molecolari 4 Å (1gr) in presenza di apparecchio di Dean-Stark per la rimozione azeotropica dell'acqua. Dopo raffreddamento la soluzione viene filtrata e il solvente rimosso sotto vuoto, il residuo viene purificato per flash cromatografia (EtOAc/EtPt/NH₃ 1:4:0.1) per fornire (**154**) con l'83% di resa.

Caratteristiche del composto (**154**):

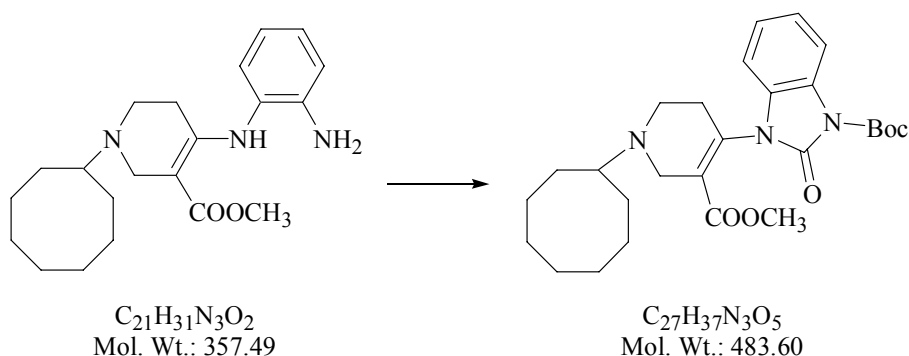
p.f. = 88-90°C

IR (KBr): 3459, 3367, 3265, 1647, 1588, 1503 cm⁻¹.

MS (ESI) : [MH]⁺ = 358.5.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.20-1.90 (m, 15H), 2.20-2.50 (m, 4H), 3.20 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.80 (s, 2H), 6.60-6.80 (m, 2H) 6.95-7.12 (m, 2H), 9.83 (s, 1H).

Preparazione di 3-(1-Cicloottil-5-metossicarbonil-1,2,3,6-tetraidro-piridin-4-il)-2-oxo-2,3-diidro-benzoimidazol-1-carbossilico acido tert-butil estere (**100**)



Una soluzione di (**154**) (2 gr, 5.6 mmoli) in 40ml di DCM, raffreddata a 0°C, viene trattata con di-*tert*-butil-dicarbonato (6.1 gr, 27.97 mmoli) ed una quantità catalitica di DMAP. La miscela di reazione viene agitata a 0°C per 3h, quindi il solvente è evaporato sotto vuoto ed il residuo purificato per flash cromatografia (EtOAc/EtPt, 1:6), fornendo (**100**) (2.4 gr, 89%) come un olio arancione.

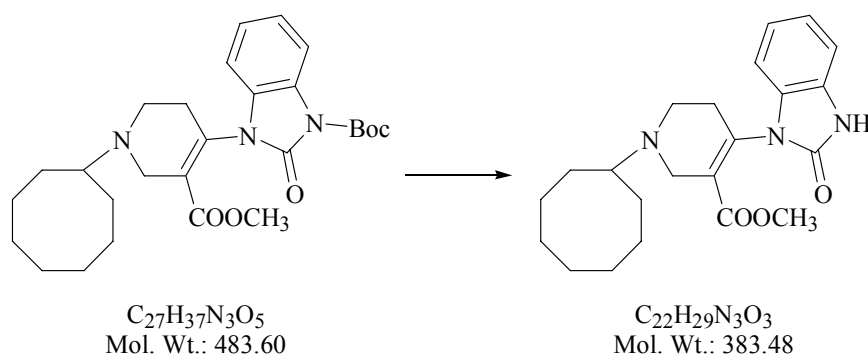
Caratteristiche del composto (**100**):

IR (KBr): 1742, 1724, 1647, 1580, 1500 cm^{-1} .

MS (ESI) : $[MH]^+ = 484$.

1H NMR (CDCl₃): δ 1.20-1.90 (m, 24H), 2.60-3.00 (m, 4H), 3.45 (sistema AB, 2H, J=15 Hz), 3.47 (s, 3H), 6.80-6.90 (m, 1H), 7.08-7.18 (m, 2H), 7.83-7.90 (m, 1H).

Preparazione di: (1-Ciclooctil-4-(2-oxo-2,3-diidro-benzoimidazol-1-il)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3- carbossilico acido metil estere (**155**)



Ad una soluzione di (**100**) (2gr, 4.13 mmoli) in DCM (20ml), raffreddata a 0°C viene aggiunto goccia a goccia il TFA (2.23 ml, 28.91 mmoli). La reazione viene portata avanti fino a completezza (8h), quindi si aggiunge una soluzione satura di NaHCO₃ (20ml). Le fasi vengono separate, e la fase acquosa viene estratta con DCM (3X 20ml) e le fasi organiche riunite ed anidificate vengono evaporate sotto vuoto a dare (**155**) come solido scuro amorfo (1.54 gr, 97%).

Caratteristiche del composto (**155**):

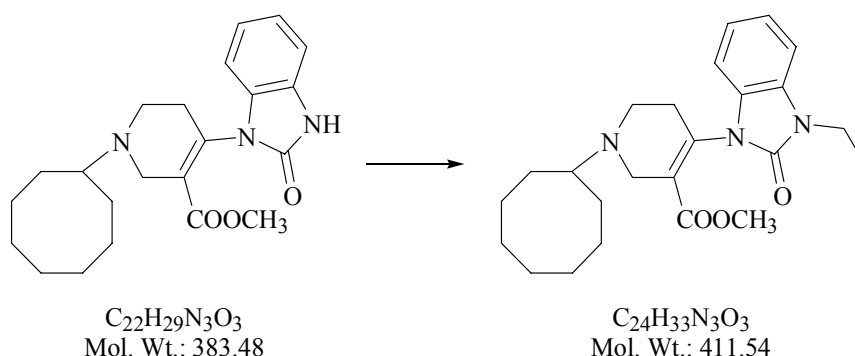
p.f.= 28-30°C

IR (KBr): 3422, 1707, 1487 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺= 384.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.20-1.90 (m, 15H), 2.60-2.90 (m, 4H), 3.30-3.60 (s, 3H, imposto a 3.44), 6.85-7.00 (m, 1H), 7.05-7.20 (m, 3H), 9.64 (s, 1H).

Preparazione di: 1-Cicloottil-4-(3-etil-2-oxo-2,3-diidro-benzoimidazol-1-il)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-carbossilico acido metil estere (**156**)



Una soluzione di (**155**) (1.56 gr, 4.07 mmoli) in 10 ml di DMF viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione, sotto agitazione, di sodio idruro al 75% (0.12gr, 4.07 mmoli) in DMF (5ml) a 0°C.

La reazione viene agitata per 30 minuti alla stessa temperatura, quindi si aggiunge una soluzione di etil bromuro (0.33 ml, 4.48 moli) in 5ml di DMF e la reazione si lascia a temperatura ambiente per 12h. A reazione terminata si evapora la maggior parte del solvente, ed il residuo è ripreso con etere etilico (50ml). Il sale che precipita dall'Et₂O viene filtrato su gooch con strato di celite ed il solvente è rimosso sotto vuoto. Il residuo viene purificato per cromatografia su gel di silice (EtOAc/EtPt/NH₃, 1/4/0.1) a dare (**156**) (1.25 gr, 75%) come olio giallo.

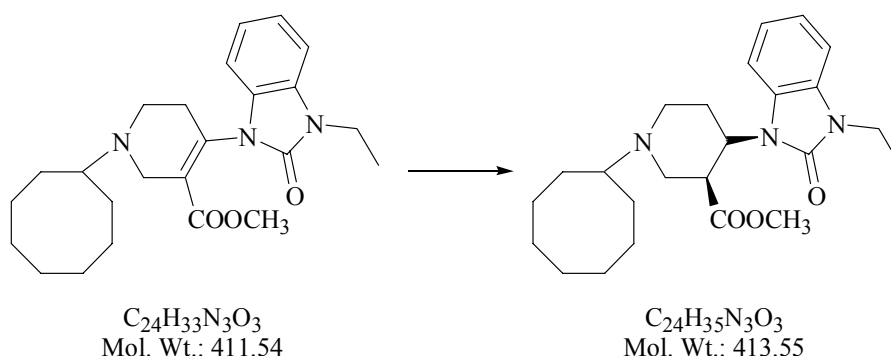
Caratteristiche del composto (**156**):

IR (Film): 1714, 1647, 1616, 1493 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺= 412.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.28 (t, 3H, J=7.2 Hz) 1.40-1.80 (m, 15H), 2.50-2.80 (m, 4H), 3.30-3.50 (m, 2H, imposto come s, 3H a 3.34), 3.88 (q, 2H, J=7.2Hz), 6.80-7.00 (m, 1H), 7.05-7.10 (m, 3H).

Preparazione di: (\pm)-*cis*-1-ciclooctil-4-(3-etil-2-oxo-2,3-diidro-benzoimidazol-1-il)-piperidin-3-carbossilico acido metil estere ((\pm)-**157**)



Una soluzione di (**156**) (1 gr, 2.43 mmoli) in 200ml di metanolo viene idrogenata all'apparecchio di Parr a 70 psi di idrogeno per 24h in presenza di C/Pd 10% (0.1gr). A reazione terminata il catalizzatore è filtrato su strato di celite ed il solvente evaporato sotto vuoto. Dopo colonna cromatografica, utilizzando AcOEt/EtPt/NH₃, 1/4/0.1 come eluente, si ottengono 0.5 gr di (**157**) come olio incolore (resa 50%).

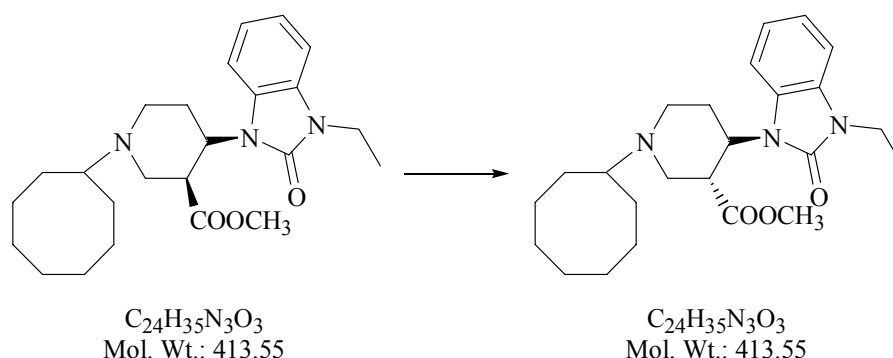
Caratteristiche del composto (\pm)-(**157**):

IR (Film): 1745, 1698, 1616, 1490 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺= 414.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.33 (t, 3H, J=7 Hz) 1.40-1.80 (m, 15H), 1.90-2.30 (m, 3H), 2.37 (dd, 1H, J=11.6, 3 Hz), 3.00-3.15 (m, 1H), 3.20-3.48 (m, 2H), 3.53 (s, 3H), 3.93 (dq, 2H, J=7, 2.4 Hz) 4.39 (dt, 1H, J=13.3, 4 Hz) 6.95-7.10 (m, 3H), 7.50-7.70 (m, 1H).

Preparazione di: (\pm)-*trans*-1-Ciclooctil-4-(3-etil-2-oxo-2,3-diidro-benzoimidazol-1-il)-piperidin-3-carbossilico acido metil estere ((\pm)-**158**)



Una soluzione di metossido di sodio preparata di fresco dissolvendo sodio metallico (0.21 gr, 8.54 mmoli) in metanolo (5ml) viene aggiunta in una sola porzione ad una soluzione di (**157**) (0.5gr, 1.21 mmoli) raffreddata a 0°C in metanolo (5ml). La reazione viene agitata per 60h, dopodiche viene adsorbita su silice (1gr) e cromatografata utilizzando come eluente EtOAc/EtPt/NH₃, 1/4/0.1, a dare (\pm)-(**158**) (0.46 gr, 92%) come solido bianco.

Caratteristiche di (\pm)-(**158**):

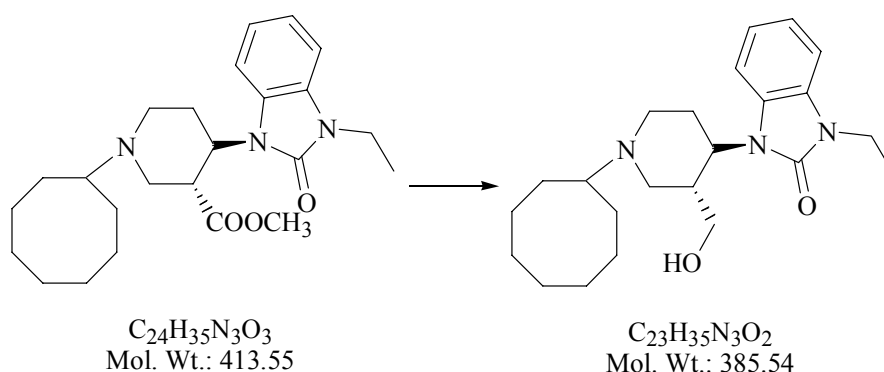
p.f. = 68-70°C

IR (KBr): 1745, 1698, 1616, 1490 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 414.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.33 (t, 3H, J=7 Hz) 1.40-1.80 (m, 15H), 2.08-2.30 (m, 3H), 2.56 (dq, 1H, J=12.5, 3.9 Hz), 2.90-3.08 (m, 1H), 3.10-3.25 (m, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.68 (m, 1H) 3.91 (q, 2H, J=7 Hz), 4.39 (dt, 1H, J=12.2, 5 Hz), 7.00-7.20 (m, 4H).

Preparazione di: *trans*- (±)-1-(1-Ciclooctil-3-idrossimetil-piperidin-4-il)-3-etil-1,3-diidrobzenzimidazol-2-one- ((±) **95**)



Una soluzione di (±)-**158** (1 gr, 2.42 mmoli) in etere etilico viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di $LiAlH_4$ (0.2 gr, 5.1 mmoli) in Et_2O (20ml) raffreddata a $0^\circ C$. Dopo 30 minuti alla stessa temperatura, si aggiungono lentamente 10ml di acqua ed i sali di alluminio che si formano vengono filtrati su strato di celite. L'evaporazione del solvente e la purificazione per flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di $AcOEt/EtPt/NH_3$, 1/2/0.1 danno (±)-**95** come solido bianco.

Caratteristiche del composto (±)-**95**

p.f. = $93-95^\circ C$

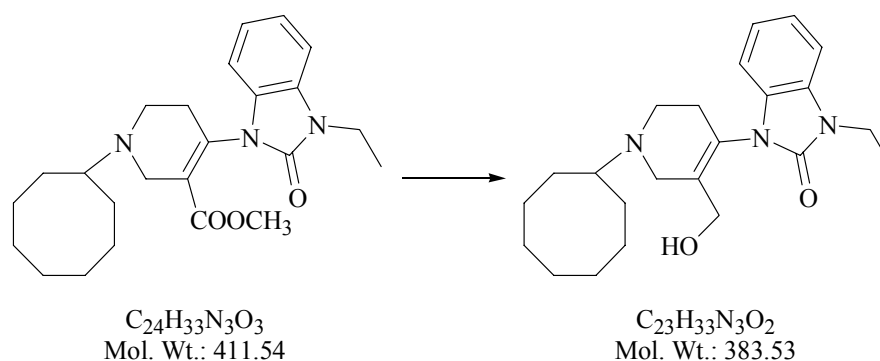
IR (KBr): 3435, 1686, 1491 cm^{-1} .

MS (ESI): $[MH]^+ = 386$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.32-1.35 (t, 3H, $J=7.2$ Hz); 1.47-1.74 (m, 12H); 1.88 (dd, 1H); 2.01-2.06 (m, 3H), 2.58-2.62 (dq, 1H, $J=8.2$ Hz, $J=4$ Hz); 2.98-3.02 (t, 3H, $J=6.4$ Hz); 3.33 (s, 2H); 3.90-4.01 (m, 2H); 4.09-4.14 (q, 1H, $J=7.2$ Hz), 4.35-4.40 (t, br, 1H, $J=11.6$ Hz), 7.03-7.11 (m, 3H), 7.31-7.33 (d, 1H, $J=7.2$ Hz).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) : 13.64; 14.26; 25.67; 26.54; 27.20; 27.22; 28.80; 30.92; 30.97; 34.92; 36.15; 41.07; 51.80; 53.65; 56.53; 61.95; 66.14; 108.02; 110.32; 121.22; 128.09; 129.30; 154.67.

Preparazione di: 1-(1-Ciclooctil-5-idrossimetil-1,2,3,6-tetraidro-piridin-4-il)-3-etil-1,3-diidro-benzoimidazol-2-one (**96**)



Una soluzione di (**156**) (0,5 gr, 1,21 mmoli) in etere etilico viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di $LiAlH_4$ (102 mgr, 2,66 mmoli) in THF anidro (20ml) raffreddata a $0^\circ C$. Dopo 15 minuti alla stessa temperatura, si aggiungono lentamente 10ml di acqua ed i sali di alluminio che si formano vengono filtrati su strato di celite. L'evaporazione del solvente e la purificazione per flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di AcOEt/EtPt/ NH_3 , 1/2/0.1 danno (**96**).

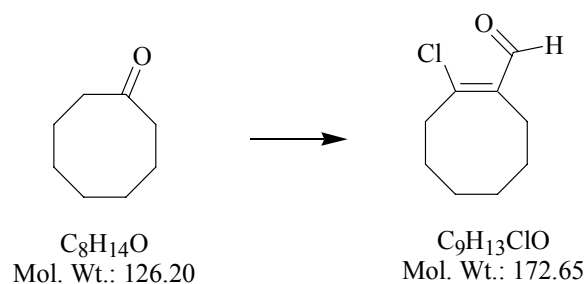
Caratteristiche di (**96**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 384.5$.

1H NMR ($CDCl_3$): 1.34-1.36 (t, 3H, $J=7Hz$); 1.48-1.75 (m, 12H); 1.83-1.84 (m, 2H); 2.55-2.59 (d, br, 1H); 2.65-2.70 (m, 1H); 2.74-2.79 (m, 1H); 3.06-3.10 (dt, 1H, $J=16.5Hz$, $J=2.5Hz$); 3.56 (m, 2H); 3.72-3.75 (m, 3H); 3.95-3.98 (m, 2H); 4.05-4.08 (d, 1H, $J=11.6Hz$); 6.94-6.96 (m, 1H); 7.04-7.13 (m, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 13.65; 25.62; 25.66; 26.49; 27.21; 27.89; 30.75; 30.85; 34.94; 36.35; 50.14; 54.82; 65.42; 68.04; 108.04; 109.58; 121.52; 121.93; 125.94; 128.88; 129.28; 136.70; 153.71.

Preparazione di: 2-Cloro-ciclooct-1-enecarbaldeide (**102**)



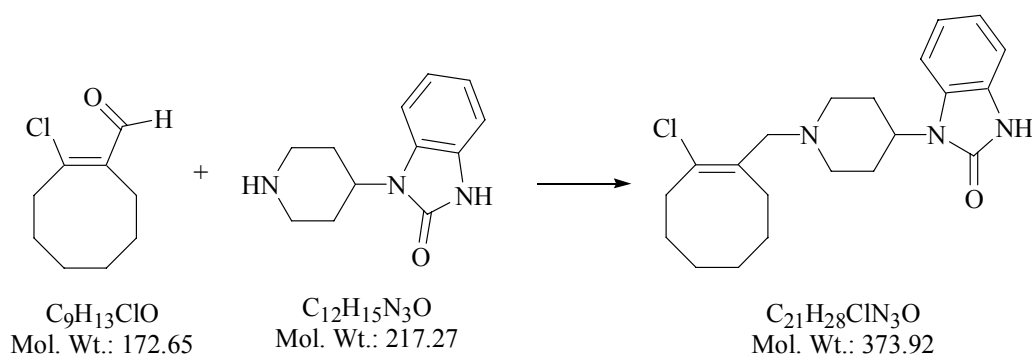
Una soluzione di ossicloruro di fosforo $POCl_3$ 1.5 eq (2.18 ml, 23.80 mmoli) in DMF (5 ml) viene agitata a $0^\circ C$. Dopo 30 minuti in agitazione alla stessa temperatura cicloottanone (2 g, 15.87 mmoli) in DMF (5 ml) viene aggiunto goccia a goccia a $0^\circ C$, poi la miscela di reazione viene agitata a temperatura ambiente per un'ora. L'andamento della reazione viene seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:6). La miscela di reazione viene suddivisa tra acetato d'etile e acqua; la fase organica viene lavata con NaOH 1M e brine, anidrificata e concentrata sotto vuoto a dare (**102**) che viene utilizzato come grezzo per la reazione successiva.

Caratteristiche del composto (**102**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 173.4$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.40-2 (m, 8H), 2.38-2.42 (m, 4H), 10.11 (s, 1H).

Preparazione di: 1-[1-(2-Cloro-ciclooct-1-enilmetil)-piperidin-4-il]-1,3-diidrobenzoimidazol-2-one (**101**)



Ad una soluzione di 1-piperidin-4-il-1,3-diidrobenzoimidazol-2-one commerciale (0.5 g, 2.30 mmoli) in metanolo, vengono aggiunti HCl concentrato (50 μl , 1.534 mmoli) e la 2-cloro-ciclooct-1-enecarbaldeide (**102**) (0.133 mg, 0.77 mmoli) sciolta in poco metanolo e la miscela viene raffreddata a 0°C. NaBH₄ (33 mg, 0.85 mmoli) viene aggiunto e la reazione viene agitata a temperatura ambiente per 2 ore. La reazione viene quindi controllata via TLC (EtOAc/EtPt 3:2). A reazione terminata il metanolo viene rimosso sotto vuoto e il residuo viene ripreso con acetato d'etile e la fase organica basificata con NaHCO₃ soluzione satura fino a pH di circa 10, separata e lavata con brine; quindi anidrificata e il solvente evaporato sotto vuoto a dare (**101**) che viene purificato via flash cromatografia usando come eluente EtOAc/EtPt/NH₃ 1:2:0.3 (213 mg, 0.57 mmoli).

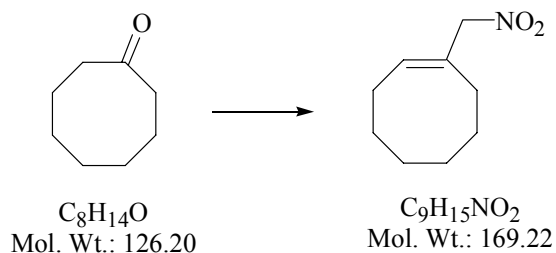
Caratteristiche del composto (**101**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 374.6.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.40-2 (m, 8H, *cicloott*); 1.72 (m, 4H, *piperid*); 2.38-2.42 (m, 4H, *cicloott*); 2.56 (m, 4H, *piperid*); 3.034 (s, 2H, N-CH₂); 6.07 (br, 1H, NH); 6.98 (m, 2H, *aromat*); 7.62 (m, 2H, *aromat*).

¹³C NMR (CDCl₃): 25.566-28.460 (5C); 29.003 (2C); 34.081; 47.307 (2C); 50.733; 52.670; 120.654 (2C); 124.677 (2C); 130.210 (3C); 136.088; 153.270.

Preparazione di: 1-Nitrometil cicloottene (**85**)



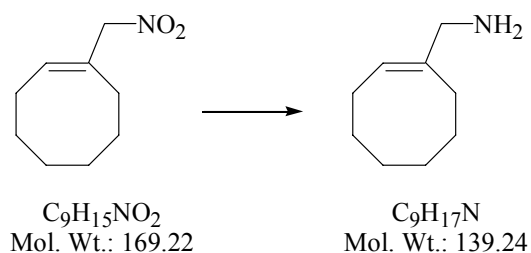
Ad una soluzione di cicloottanone (79.36 mmoli) in toluene anidro (200 ml) si aggiungono *N,N*-dietiletilendiammina (3.34 ml, 23.81 mmoli) e nitrometano (17.08 ml, 317.4 mmoli) e si scalda a riflusso con apparecchio di Dean-Stark per una notte. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente: AcOEt: EtPt 1:3). Si raffredda la soluzione a 0°C, si aggiunge HCl 20% fino a pH nettamente acido e si separano le fasi. La fase acquosa viene ripetutamente estratta con etere e le fasi organiche, riunite, sono anidrificate ed evaporate. Il residuo viene distillato (b.p.: 65°C, 1.6×10^{-1} bar) a dare (**85**) (10.7 g, 80%) come liquido giallino.

Caratteristiche del composto (**85**) :

IR (Film): 1552 cm^{-1} .

^1H NMR (CDCl_3): δ 1.4-1.7 (m, 8H), 2.1-2.4 (m, 4H), 4.84 (s, 2H), 5.89 (t, 1H, $J = 8.1$).

Preparazione di: 1-Cicloott-1-enil-metanammina (**86**)



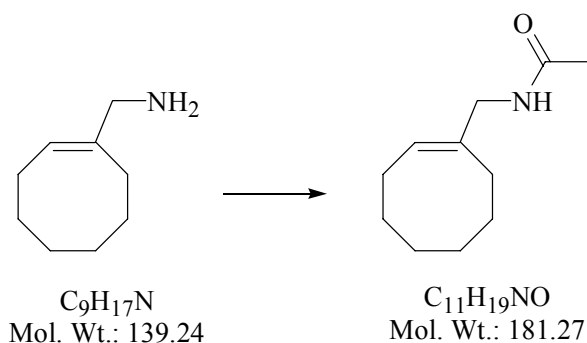
Una soluzione di (**85**) (6 g, 35.50 mmoli) in etere anidro (20 ml) è aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di $LiAlH_4$ (4 g, 106.5 mmoli) in etere anidro (80 ml), raffreddata a 0°C. Si lascia in agitazione alla stessa temperatura per 6h, seguendo l'andamento della reazione su TLC (eluente: AcOEt: EtPt 1:3). Si aggiunge cautamente acqua ghiacciata, si decantano i sali di alluminio, lavandoli ripetutamente con cloroformio, e si evapora il solvente. Si ottiene (**86**) (4.23 g, 86%) come olio giallino, che è sufficientemente puro per essere utilizzato come tale nel passaggio successivo.

Caratteristiche del composto (**86**):

IR (Film): 3300, 1579 cm^{-1} .

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.3-2.2 (m, 12H), 3.16 (s, 2H), 5.44 (t, 1H, $J = 8.1$).

Preparazione di: N-Cicloott-1-enilmetil-acetammide (**159**)



L'ammina (**86**) (8.38gr, 60.28mmoli) si scioglie in cloruro di metilene anidro (50ml) e si raffredda il tutto a 0°C, si aggiunge poi la trietilammina (6.7gr, 66.3mmoli, d=0.726, 9.24ml). L'anidride acetica sciolta in poco cloruro di metilene si aggiunge goccia a goccia alla soluzione.

Dopo 5 ore la reazione è terminata, si segue su lastra con eluente: AcOEt/EtPt/NH₃, 1/1/0.3. A reazione terminata si concentra sotto vuoto e il residuo è purificato in colonna cromatografica con eluente AcOEt/EtPt/NH₃, 1/2/0.3 ottenendo (**159**) come olio giallo (8.53gr) col 78% di resa.

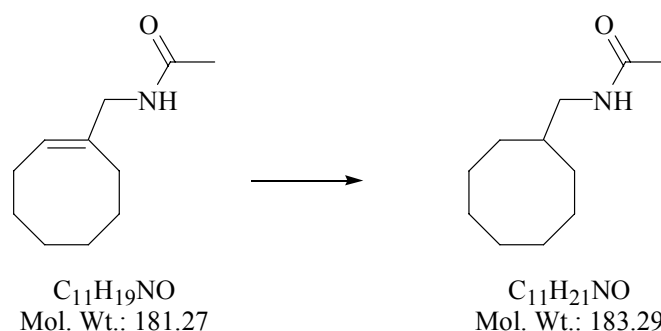
Caratteristiche del composto (**159**) :

MS (ESI): [MH]⁺ = 182.1.

IR (Film): 3288, 3080, 1651, 1557 cm⁻¹.

¹H NMR(CDCl₃): δ 1.40-1.70 (m, 8H), 1.99 (s, 3H), 2.07-2.20 (m, 4H), 3.78 (d, 2H, J=5.8Hz), 5.30 (s, br, 1H), 5.49 (t, 1H, J = 8.1).

Preparazione di: N-(ciclootilmetil)-acetammide (**87**)



Una soluzione di (**159**) (8.4gr, 46.40 mmoli) in etanolo (100ml) viene idrogenata nell'apparecchio di Parr a 70psi di idrogeno per 24 h in presenza di carbone palladiato al 10%. A reazione terminata (TLC AcOEt/EtPt/NH₃ 1/1/0.3) il catalizzatore viene filtrato su strato di celite ed il solvente evaporato a pressione ridotta a dare (**87**) come olio incolore (8.2gr 96%) che è sufficientemente puro per essere usato nello step successivo senza purificazione.

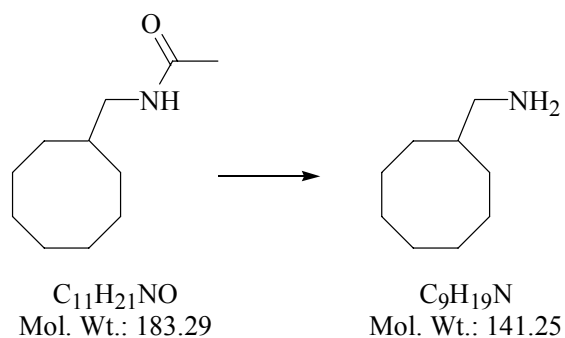
Caratteristiche del composto (**87**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 184.1$.

IR (Film): 3292, 3087, 1651 cm^{-1} .

¹H NMR(CDCl₃): δ 1.20-1.70 (m, 15H), 1.97 (s, 3H), 3.07 (t, 2H, $J=6.4$ Hz), 5.60 (s, br, 1H).

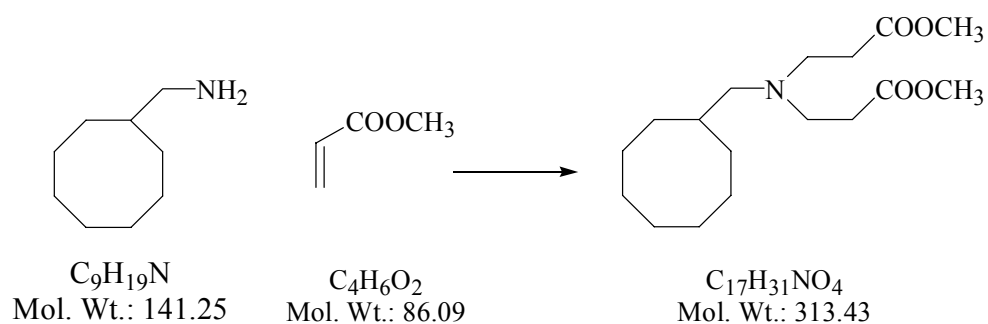
Preparazione di: 1-Cicloottil-metilammina (**88**)



Una soluzione di HCl al 37% (150ml) viene aggiunta lentamente ad una soluzione di (**87**) (8.3gr, 45.35 mmoli) sciolta in EtOH/H₂O in rapporto 1 a 2 (150ml) e la reazione viene scaldata a riflusso per una notte. A reazione terminata si raffredda a temperatura ambiente e la maggior parte del solvente è concentrato sotto vuoto, dopodiché si aggiunge cautamente NaOH al 20% fino a raggiungere pH=12. Si eseguono 5 estrazioni con etile acetato (50ml), si anidrifica con sodio solfato anidro e si concentra sotto vuoto. Si ottiene (**88**) (5.4gr 35.46 mmoli) come olio giallo con l'84% di resa.

Il prodotto viene usato direttamente per la reazione successiva.

Preparazione di: Metil 3-[cicloottilmetil-(2-metossicarbonil-etil)-ammino]-propanoato
(89)



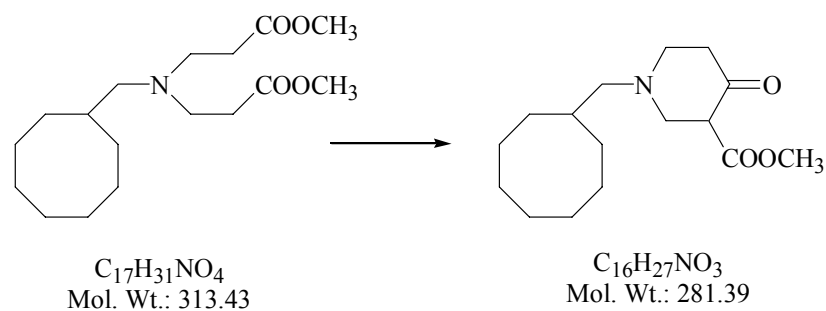
Una soluzione di (88) (5gr, 35.46 mmoli) in metanolo (20ml) viene aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di metil acrilato (7ml, 78.01 mmoli) in metanolo (50ml). La reazione viene agitata per 24 h, dopodiché il solvente è evaporato sotto vuoto ed il residuo viene purificato per flash cromatografia utilizzando EtOAc/EtPt 1/6 come eluente, a dare (89) (8gr, 72%) come olio giallo.

Caratteristiche del composto (89) :

IR (Film): 1741 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 1.10-1.80 (m, 15H), 2.11 (d, 2H, $J=7\text{Hz}$), 2.42 (t, 4H, $J=7\text{ Hz}$), 2.74 (t, 4H, $J=7\text{ Hz}$), 3.66 (s, 6H).

Preparazione di: 1-Cicloottilmetil-3metossicarbonil-piperidin-4-one. (**84**)



Ad una soluzione di (**89**) (8gr, 25.56mmoli) in toluene (80ml) raffreddata a 0°C viene aggiunto in un'unica porzione il potassio *tert*-butilato, la sospensione viene agitata per 30 minuti a 0°C e poi per 12h a temperatura ambiente.

A reazione terminata vengono aggiunti 100ml di acqua, si separano le fasi e la fase acquosa viene estratta per 3 volte con AcOEt, le fasi organiche riunite vengono anidificate e concentrate sotto vuoto.

Il residuo viene purificato per flash cromatografia utilizzando EtOAc/EtPt 1/9 a dare (**84**) come olio arancione con una resa del 78%.

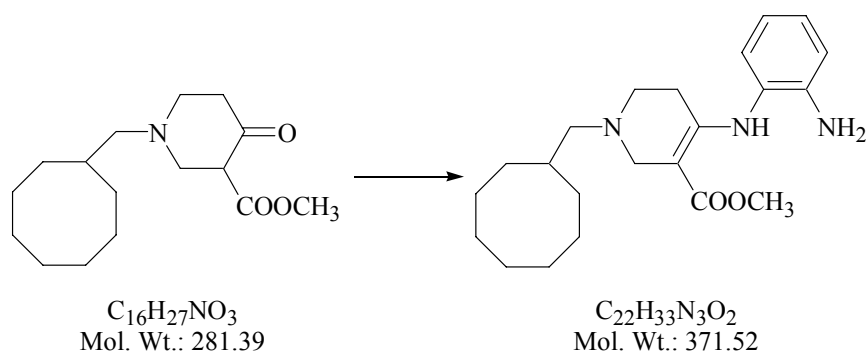
Caratteristiche del composto (**84**):

IR (Film): 1747, 1722, 1667, 1625 cm^{-1} .

MS (ESI): $[MH]^+ = 282$.

1H NMR ($CDCl_3$): 1.5-1.85 (m, 15H), 2.19 (d, 2H, $J=7.3$ Hz), 2.37 (t, 2H, $J=7$ Hz), 2.56 (t, 2H, $J=7$ Hz), 3.07 (sistema AB, 2H, $J=10$ Hz), 3.73 (s, 3H), 11.87 (s, b, 1H forma enolica).

Preparazione di: Metil 1-Cicloottilmetil-4-(*o*-fenilendiammino)-1,2,5,6-tetraidropiridina-3-carbossilato (**83**)



Una soluzione di (**84**) (3gr, 10.67 mmoli) e *o*-fenilendiammina (1.77gr, 16.43 mmoli) in benzene (50ml), viene scaldata a riflusso per 12 ore in presenza di acido acetico glaciale (0.3ml) e setacci molecolari 4 Å (1gr) in presenza di apparecchio di Dean-Stark per la rimozione azeotropica dell'acqua. Dopo raffreddamento la soluzione viene filtrata e il solvente rimosso sotto vuoto, il residuo viene purificato per flash cromatografia (EtOAc/EtPt/NH₃ 1:4:0.1) per fornire (**83**) con l'83% di resa.

Caratteristiche del composto (**83**):

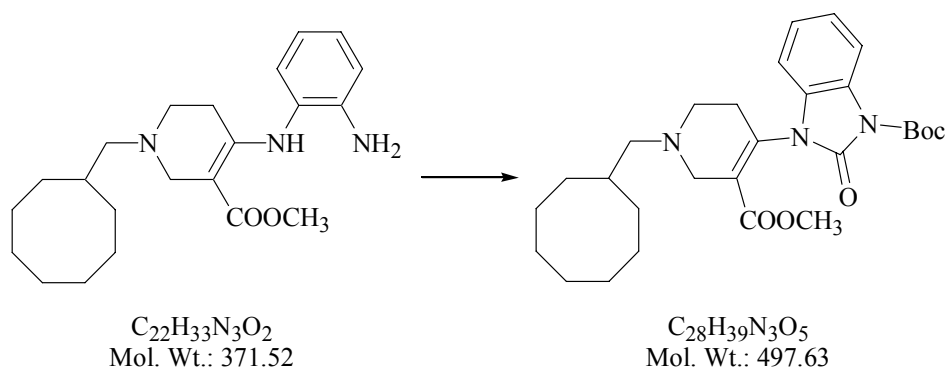
p.f. = 88-90°C

IR (KBr): 3459, 3367, 3265, 1647, 1588, 1503 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 372.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.20-1.90 (m, 15H), 2.20-2.50 (m, 4H), 2.18 (d, 2H, J=7.3 Hz), 3.20 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.80 (s, 2H), 6.60-6.80 (m, 2H) 6.95-7.12 (m, 2H), 9.83 (s, 1H).

Preparazione di: 1-(1-Cicloottilmetil-3-metossicarbonil-1,2,5,6-tetraidro-piridin-4-il)-3-*tert*-butossicarbonil-1,3-diidro-2*H*-benzimidazol-2-one (**90**)



Una soluzione di (**83**) (2gr, 5.39mmoli) in 40ml di DCM, raffreddata a 0°C, viene trattata con di-*tert*-butil-dicarbonato (5.88gr, 26.95mmoli) ed una quantità catalitica di DMAP. La miscela di reazione viene agitata a 0°C per 3h, quindi il solvente è evaporato sotto vuoto ed il residuo purificato per flash cromatografia (EtOAc/EtPt, 1:6), fornendo (**90**) (2.4gr, 89%) come un olio arancione.

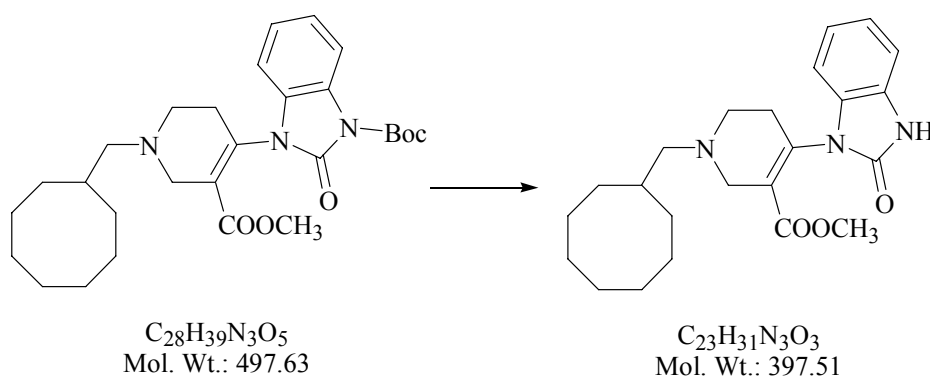
Caratteristiche del composto (**90**):

IR (KBr): 1742, 1724, 1647, 1580, 1500 cm^{-1} .

MS (ESI): $[MH]^+ = 498$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.20-1.90 (m, 24H), 2.29 (d, 2H, $J=7.2$ Hz), 2.60-3.00 (m, 4H), 3.45 (sistema AB, 2H, $J=15$ Hz), 3.47 (s, 3H), 6.80-6.90 (m, 1H), 7.08-7.18 (m, 2H), 7.83-7.90 (m, 1H).

Preparazione di: 1-(1-Cicloottilmetil-3-metossicarbonil-1,2,5,6-tetraidro-piridin-4-il)-1,3-diidro-2H-benzimidazol-2-one (**91**)



Ad una soluzione di (**90**) (2gr, 4.02mmoli) in DCM (20ml), raffreddata a 0°C viene aggiunto goccia a goccia il TFA (2.17ml, 28.14mmoli). La reazione viene portata avanti fino a completezza (8h), quindi si aggiunge una soluzione satura di NaHCO₃ (20ml). Le fasi vengono separate, e la fase acquosa viene estratta con DCM (3X 20ml) e le fasi organiche riunite ed anidificate vengono evaporate sotto vuoto a dare (**91**) come solido scuro amorfo (1.54gr, 97%).

Caratteristiche del composto (**91**):

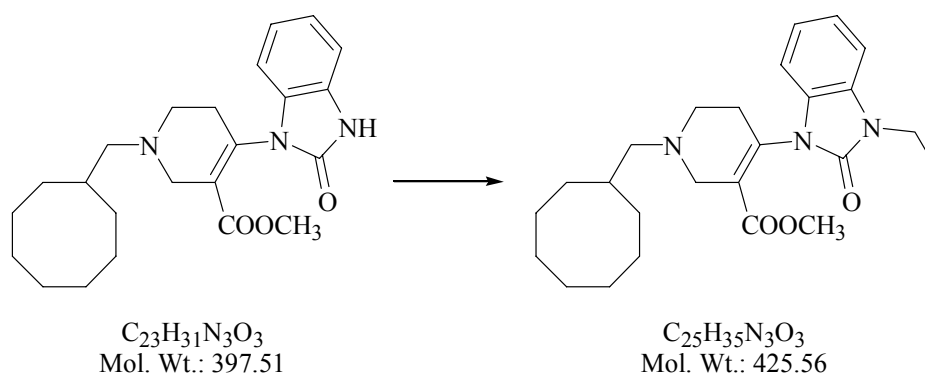
p.f.= 28-30°C

IR (KBr): 3422, 1707, 1487 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺= 398.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.20-1.90 (m, 15H), 2.31 (d, 2H, J=7.1 Hz), 2.60-2.90 (m, 4H), 3.30-3.60 (s, 3H, imposto a 3.44), 6.85-7.00 (m, 1H), 7.05-7.20 (m, 3H), 9.64 (s, 1H).

Preparazione di: 1-(1-Ciclootilmetil-3-metossicarbonil-1,2,5,6-tetraidro-piridin-4-il)-3-etil-1,3-diidro-2*H*-benzimidazol-2-one (**92**)



Una soluzione di (**91**) (1.56gr, 3.78mmoli) in 10 ml di DMF viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione, sotto agitazione, di sodio idruro al 75% (0.12gr, 3.78mmoli) in DMF (5ml) a 0°C.

La reazione viene agitata per 30 minuti alla stessa temperatura, quindi si aggiunge una soluzione di etil bromuro (0.31ml, 4.16ml) in 5ml di DMF e la reazione si lascia a temperatura ambiente per 12h. A reazione terminata si evapora la maggior parte del solvente, ed il residuo è ripreso con etere etilico (50ml). Il sale che precipita dall'Et₂O viene filtrato su gooch con strato di celite ed il solvente è rimosso sotto vuoto. Il residuo viene purificato per cromatografia su gel di silice (EtOAc/EtPt/NH₃, 1/4/0.1) a dare (**92**) (1.2gr, 75%) come olio giallo.

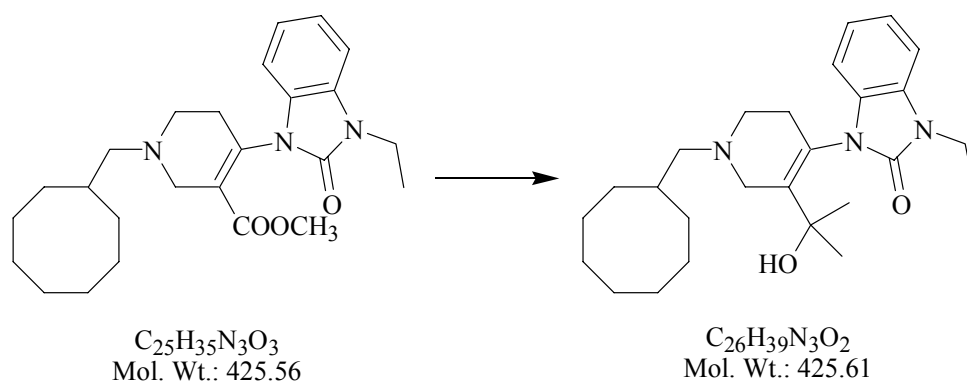
Caratteristiche del composto (**92**) :

MS (ESI): [MH]⁺= 426.

IR (Film): 1714, 1647, 1616, 1493 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.28 (t, 3H, J=7.2 Hz) 1.40-1.80 (m, 15H), 2.22 (d, 2H, J=7.2 Hz), 2.50-2.80 (m, 4H), 3.30-3.50 (m, 2H, imposto come s, 3H a 3.34), 3.88 (q, 2H, J=7.2Hz), 6.80-7.00 (m, 1H), 7.05-7.10 (m, 3H).

Preparazione di: 1-[1-Cicloottilmetil-5-(1-idrossi-1-metil-etil)-1,2,3,6-tetraidropiridin-4-il]-3-etil-1,3-diidro-benzoimidazol-2-one (**42**)



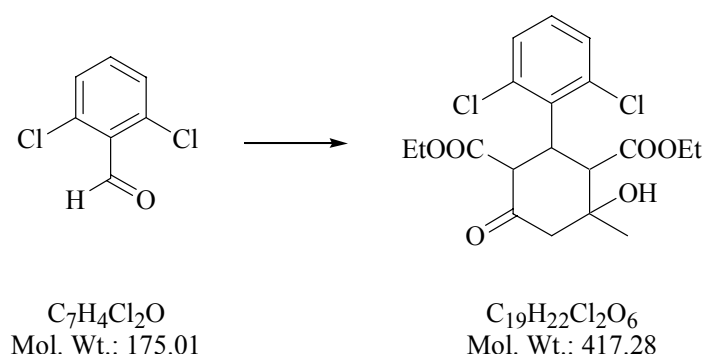
Ad una soluzione di metil magnesio bromuro (0.28 gr, 2.35 mmoli) in 10 ml di THF anidro a 0°C viene aggiunta goccia a goccia una soluzione del composto (**92**) (0.5 g, 1.175 mmoli), sciolto in THF. La reazione viene agitata per tutta la notte a temperatura ambiente e controllata via TLC (EtOAc/EtPt/NH₃ 1:2:0.3). La miscela di reazione viene quindi spenta con NH₄Cl acquoso 4M (osservo la formazione di un precipitato che poi torna in soluzione). Il solvente di reazione viene evaporato. Il residuo così ottenuto viene sciolto in etere etilico e basificato fortemente con NaOH 2N. La fase acquosa viene estratta più volte con etere etilico; le fasi organiche riunificate vengono anidificate e il solvente evaporato sotto vuoto a dare un grezzo di reazione che viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/EtPt/NH₃ 1:2:0.1) a dare (**42**) (0.35 g, 0.822 mmoli) con una resa del 70%.

Caratteristiche del composto (**42**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 426.3.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.28 (t, 3H, CH₃ etile, J=7.2 Hz); 1.36 (s, 6H); 1.40-1.80 (m, 15H); 2.22 (d, 2H, J=7.2 Hz), 2.32 (d, 2H, N-CH₂); 2.50-2.80 (m, 4H), 3.88 (q, 2H, CH₂ etile, J=7.2Hz), 6.80-7.00 (m, 1H), 7.05-7.10 (m, 3H).

Preparazione di: acido 2-(2,6-dicloro-fenil)-4-idrossi-4-metil-6-osso-cicloesano-1,3-dicarbossilico-dietil-estere (**103**)



5 g di 2,6-dicloro-benzaldeide commerciale (28.57 mmoli) e 7.22 ml (57.14 mmoli) di aceto-acetato d'etile vengono sciolti in 20 ml di etanolo al 96%, si aggiungono successivamente, goccia a goccia, 0.5 ml di piperidina. La miscela di reazione si lascia in agitazione tutta notte a temperatura ambiente fino alla comparsa di un precipitato giallo, dopodiché si evapora l'etanolo sotto vuoto e il residuo viene cristallizzato da Et₂O per ottenere (**103**) con una resa quantitativa.

Caratteristiche del composto (**103**):

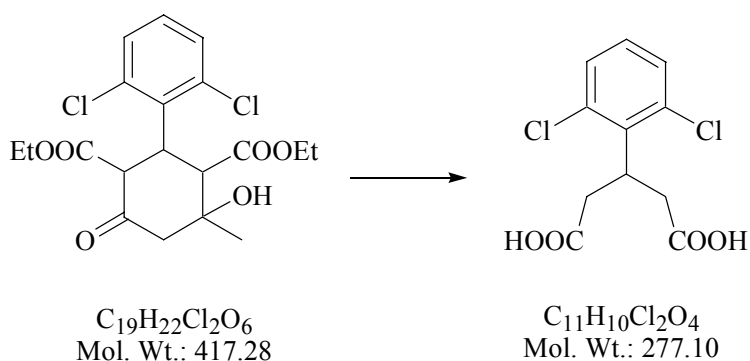
Pf = 112-115 °C.

MS (ESI): [MH]⁺ = 419.

¹H NMR (CDCl₃): 12.500 (s, 1H, Cq-OH); 7.282-7.184 (m, 2H aromatici); 7.056 (t, 1H aromatico, 8 Hz); 5.013 (d, 1H, COOEt-CH-CO, J=11 Hz); 4.056-3.833 (m, 5H, 2CH₃-CH₂-COO, Ar-CH-CH); 3.101 (d, 1H, COOEt-CH-Cq-OH, J=11.4 Hz); 2.486 (s, 2H, CO-CH₂-Cq); 1.324 (s, 3H, OH-Cq-CH₃); 0.979 (t, 3H, CH₃-CH₂-COO, 7.4 Hz); 0.851 (t, 3H, CH₃-CH₂-COO, 7 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.779; 171.112; 170.520; 138.034; 137.033; 134.288; 130.163; 128.049; 127.900; 98.095; 69.355; 61.358; 60.285; 50.852; 41.727; 38.289; 28.059; 13.831; 13.390.

Preparazione di: acido 3-(2,6-dicloro-fenil)-pentan-dioico (**104**)



In 55 ml di etanolo 96% si dissolvono 7 g di acido 2-(2,6-dicloro-fenil)-4-idrossi-4-metil-6-osso-cicloesan-1,3-dicarbossilico dietil estere (**103**) (16.79 mmoli), 40.75 ml di NaOH 35% e 16.3 ml di H₂O. La miscela di reazione viene posta a riflusso per 3h, sotto agitazione; il solvente viene poi rimosso a pressione ridotta e la fase acquosa risultante viene acidificata a 0°C con HCl 20% ed estratta ripetutamente con AcOEt; si anidrififica e si concentra sotto vuoto per ottenere un grezzo di reazione, che viene cristallizzato da Et₂O per ottenere (**104**) (4.026 g, 14.53 mmoli, resa 87%).

Caratteristiche del composto (**104**):

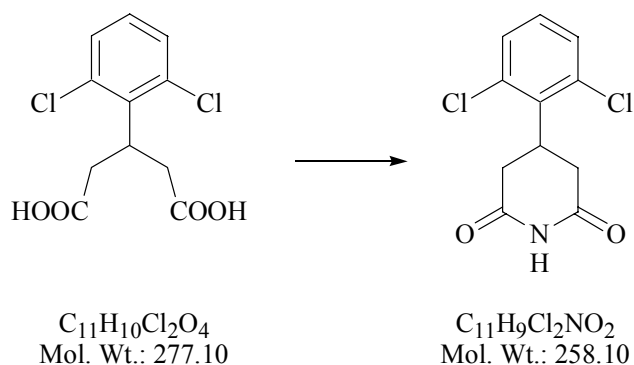
Pf = 153-155 °C.

MS (ESI): [MH]⁺ = 278.

¹H NMR (CDCl₃): 12.203 (s, 2H, 2CO-OH); 7.411 (t, 2H aromatico, 2 Cl-Cq-CH-CH-, 8 Hz); 7.235 (t, 1H aromatico, Cq-CH-CH-CH-Cq, 8 Hz); 3.430-3.325 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂-); 2.928-2.707 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂-).

IR: 2918.07; 1713.09; 1560.58; 1438.02; 1310.02; 1226.35; 1202.58; 1085.05; 903.48; 779.13.

Preparazione di: 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidin-2,6-dione (**105**)



Si dissolvono 4.026 g di acido 3-(2,6-dicloro-fenil)-pentan-dioico (**104**) (14.53 mmoli) in 40 ml di NH_4OH . Il solvente viene evaporato prima a pressione ridotta e successivamente alla pompa meccanica. Il residuo solido viene scaldato a 200 °C per 6h.

Il prodotto ben essiccato viene ripreso con cloruro di metilene e lavato per 2 volte con Na_2CO_3 0.1M. La fase organica viene anidrificata e concentrata in vuoto per ottenere un grezzo di reazione che cristallizza da Et_2O per ottenere (**105**).

Caratteristiche del composto (**105**):

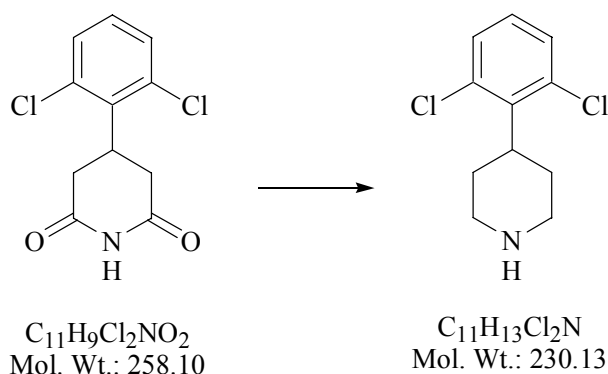
Pf = 155-157 °C.

MS (ESI): $[MH]^+ = 259$.

1H NMR ($CDCl_3$): 8.200 (br, 1H, CO-NH-CO); 7.363-7.139 (m, 3H aromatico); 4.430-4.300 (m, 1H, CH_2 -CH- CH_2); 3.605 (dd, 2H, CO-Hass.CHeq.-CH, J=18, 13.5 Hz); 2.695 (dd, 2H, CO-Hass.CHeq.-CH, J=17.7, 4.6 Hz).

IR: 3208.19; 3078.49; 2921.50; 2385.98; 2342.76; 1696.60; 1560.07; 1437.89; 1361.16; 1271.72; 1150.48; 1079.12; 770.20; 731.23.

Preparazione di: 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidina (**106**)



Si sospendono in un pallone a due colli, in atmosfera di argon, 4 g di (**105**) (15.5 mmoli) in 150 ml di THF anidro. La reazione viene messa in agitazione e raffreddata a 0°C. Vengono successivamente addizionate, goccia a goccia, 155 mmoli di $(CH_3)_2S \cdot BH_3$ (14.9 ml) e si lascia la reazione a riflusso per una notte. Si raffredda la soluzione a 0°C, si aggiunge HCl 10% fino a pH nettamente acido (66.6 ml) e si scalda nuovamente a riflusso per 4 ore. Si raffredda la soluzione a 0°C e si basifica con NaOH 2N. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt 3:2). Si elimina il THF a pressione ridotta e la fase acquosa viene ripetutamente estratta con acetato d'etile. Una volta riunite le fasi organiche si anidrificano e si concentrano in vuoto per ottenere un grezzo di reazione che cristallizza da Et_2O per ottenere (**106**) (1.23 g, 5.348 mmoli, 35%).

Caratteristiche del composto (**106**):

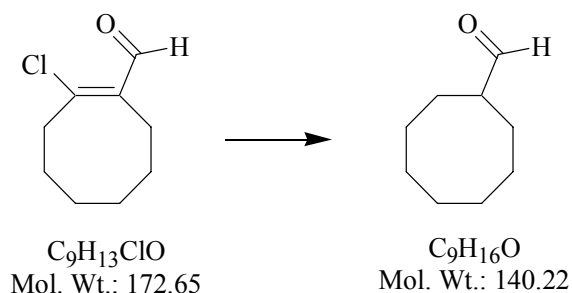
Pf = 210-215 °C.

MS (ESI): $[MH]^+ = 231$.

1H NMR ($CDCl_3$): 9.775 (br, 1H, $CH_2-NH-CH_2$); 7.286-7.259 (m, 2H aromatici, $CH-CH-CH-$); 7.089 (t, 1H, $CH-CH-CH-$, $J=8$ Hz); 3.788-3.729 (m, 1H); 3.676-3.649 (m, 2H); 3.135-3.024 (m, 4H); 1.828-1.796 (m, 3H).

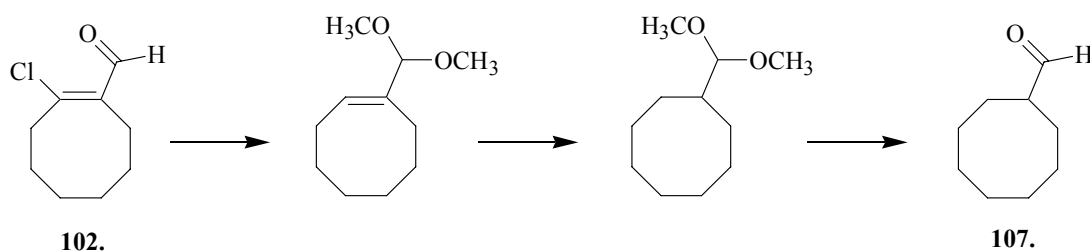
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 137.088; 135.210; 130.677; 128.654 (2C); 44.733 (2C); 38.307 (2C); 24.800 (2C).

Preparazione di: Ciclooctanecarbaldeide (**107**)



Ad una soluzione di (**102**) (0.5 g, 2.9 mmoli) come grezzo in metanolo (10 ml), viene aggiunto C/Pd 10% (0.36 g) e piridina (0.24 ml). La miscela viene agitata a temperatura ambiente e sotto atmosfera di idrogeno per 48 ore. L'andamento della reazione viene controllato via TLC (EtOAc/EtPt 1:9). Il catalizzatore viene filtrato via mediante l'utilizzo di un filtro Gooch con celite, lavando con metanolo. L'eluente viene concentrato sotto vuoto, il residuo lavato con HCl 1M per eliminare la piridina e estratto con acetato d'etile. La fase organica viene concentrata sotto vuoto a dare l'aldeide dimetilacetale come grezzo.

A una soluzione di acetale in THF anidro (10 ml) viene aggiunta HCl 1M (0.3 ml) e la miscela di reazione viene agitata a temperatura ambiente al fine di sbloccare l'acetale. Dopo 3 ore il THF viene rimosso sotto vuoto e il residuo partizionato tra acetato d'etile e NaOH 1M; la fase organica viene lavata con brine, anidrificata e concentrata sotto vuoto a dare (**107**) come olio giallo. TLC (AcOEt/EtPt 1:8).

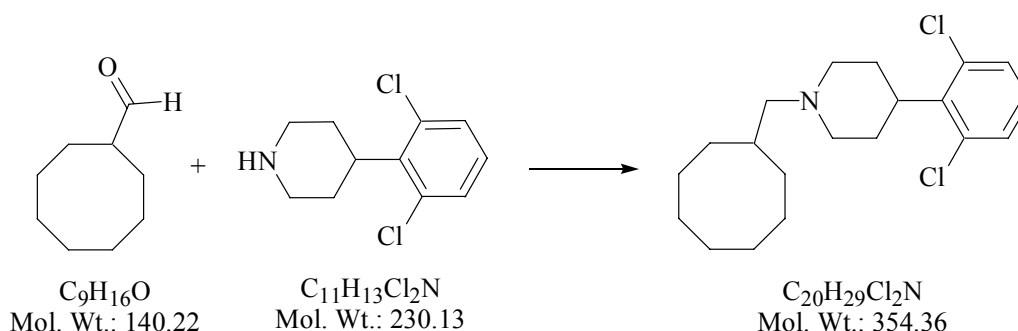


Caratteristiche del composto (**107**):

IR (film): 2852, 1726, 1469, 1446 cm^{-1} .

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.40-1.84 (m, 12H), 1.88-2.05 (m, 2H), 2.33-2.42 (m, 1H), 9.61 (s, 1H).

Preparazione di: 1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidina (**43**)



Ad una soluzione di (**106**) (0.5 g, 2.173 mmoli) in metanolo, vengono aggiunti HCl concentrato (45 μl , 1.448 mmoli) e la cicloottilcarbaldeide (**107**) (0.101 mg, 0.724 mmoli) sciolta in poco metanolo e la miscela viene raffreddata a 0°C. NaBH₄ (30 mg, 0.79 mmoli) viene aggiunto e la reazione viene agitata a temperatura ambiente per 2 ore. La reazione viene quindi controllata via TLC (EtOAc/EtPt 3:2). A reazione terminata il metanolo viene rimosso sotto vuoto e il residuo viene ripreso con acetato d'etile e la fase organica basificata con NaHCO₃ soluzione satura fino a pH di circa 10, separata e lavata con brine; quindi anidrificata e il solvente evaporato sotto vuoto a dare (**60**) che viene purificato via flash cromatografia usando come eluente EtOAc/EtPt/NH₃ 1:2:0.3) (52 mg, 0.14 mmoli).

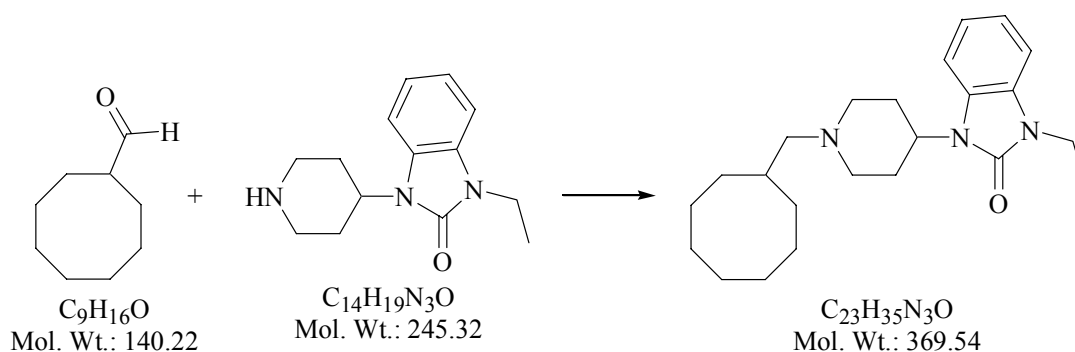
Caratteristiche del composto (**43**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 355.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.259-1.718 (m, 15H, *cicloottile*); 1.790 (m, 4H, *piperid*); 2.248 (m, 4H); 2.326 (s, 2H, *CH₂-N*); 2.785 (m, 1H); 7.089 (t, 1H, *aromatico*, J=8 Hz); 7.286-7.259 (m, 2H *aromatici*).

¹³C NMR (CDCl₃): 16.800; 27.566-34.960 (8C, *cicloottile*); 35.429(2C); 50.307 (2C); 58.733; 127.654 (2C); 128.677; 135.210 (2C); 139.088.

Preparazione di: 1-(1-Cicloottilmetil-piperidin-4-il)-3-etil-1,3-diidro-benzoimidazol-2-one (**58**)



Ad una soluzione di 1-etil-3-piperidin-4-il-1,3-diidro-benzoimidazol-2-one commerciale (0.5 g, 2.04 mmoli) in metanolo, vengono aggiunti HCl concentrato (55 μ l, 1.36 mmoli) e la cicloottilcarbaldeide (**107**) (0.95 mg, 0.68 mmoli) sciolta in poco metanolo e la miscela viene raffreddata a 0°C. NaBH₄ (30 mg, 0.74 mmoli) viene aggiunto e la reazione viene agitata a temperatura ambiente per 2 ore. La reazione viene quindi controllata via TLC (EtOAc/EtPt 3:2). A reazione terminata il metanolo viene rimosso sotto vuoto e il residuo viene ripreso con acetato d'etile e la fase organica basificata con NaHCO₃ soluzione satura fino a pH di circa 10, separata e lavata con brine; quindi anidrificata e il solvente evaporato sotto vuoto a dare (**60**) che viene purificato via flash cromatografia usando come eluente EtOAc/EtPt/NH₃ 1:2:0.3) (90.5 mg, 0.245 mmoli).

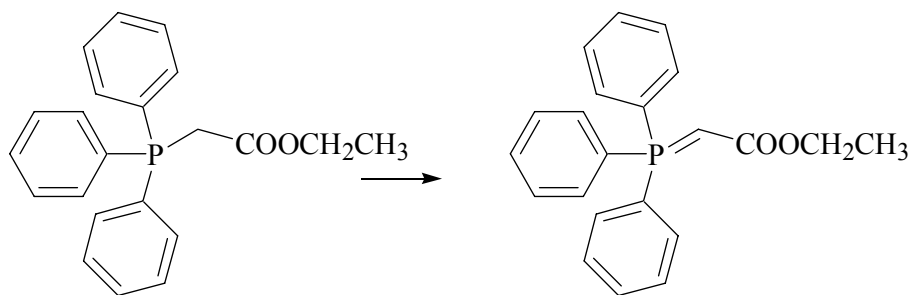
Caratteristiche del composto (**58**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 370.4.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.138 (t, 3H, CH₃ etile); 1.259-1.988 (m, 15H, cicloottile); 1.87 (m, 4H, piperid); 2.248 (m, 4H, piperid); 2.376 (s, 2H, CH₂-N); 3.205 (q, 2H, CH₂ etile); 3.601 (m, 1H, piperid); 6.989 (d, 2H, aromatici); 7.622-7.640 (m, 2H aromatici).

¹³C NMR (CDCl₃): 12.800; 27.566-35.460 (8C, cicloottile); 36.623 (2C); 44.807; 47.733 (2C); 50.870; 58.644; 120.654 (2C); 124.677 (2C); 130.210 (2C); 154.088.

Preparazione di: (etossicarbonil)metilen-trifenilfosforano (**108**)



160.

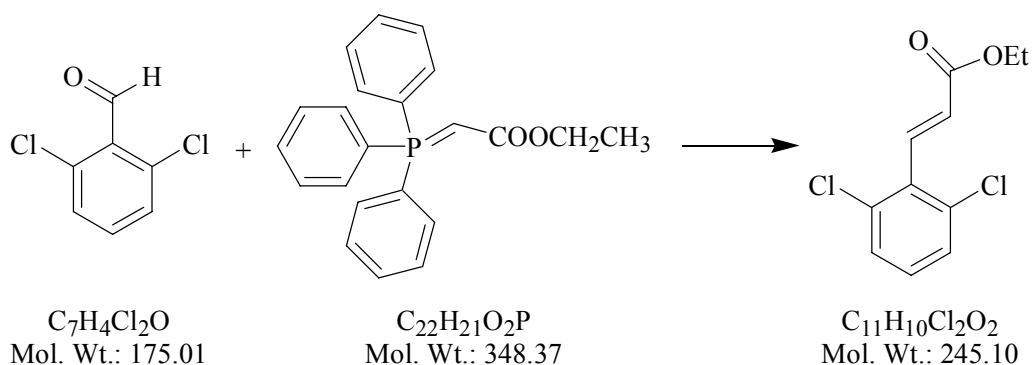
$C_{22}H_{21}O_2P$
Mol. Wt.: 348.37

$C_{22}H_{21}O_2P$
Mol. Wt.: 348.37

Una soluzione di etil bromoacetato (9.57 g, 57.3 mmoli) in 30 ml di acetato d'etile viene lentamente aggiunta a una soluzione di trifenilfosfina (15 g, 57.3 mmoli) in 30 ml di acetato d'etile. La miscela di reazione viene agitata a temperatura ambiente tutta la notte. La mattina successiva, il precipitato bianco viene filtrato, lavato con etere etilico e lasciato a seccare in stufa a 40°C per 5 ore a dare (**160**) (23 g, 55.6 mmoli) viene ottenuto con una resa del 97%.

Il sale di fosfonio (**160**) viene sciolto in acqua (250 ml) a temperatura ambiente e poi raffreddato a 0°C con un bagno di ghiaccio. NaOH 2M viene aggiunta fino a pH 9-10; si osserva la precipitazione del sale. Si estrae con DCM; la fase organica viene lavata con brine, anidrificata e il solvente rimosso sotto vuoto. Il solido così ottenuto viene cristallizzato da etere etilico e seccato all'aria a dare (**108**) come solido giallo chiaro in resa quantitativa. (**108**) viene usato come tale per la reazione successiva.

Preparazione di: acido 3-(2,6-Dicloro-fenil)-acrilico etil estere (**109**)



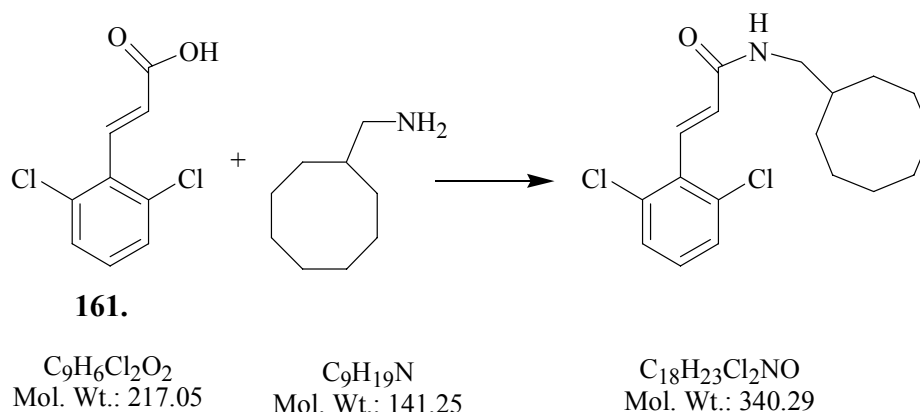
Il fosforano (**108**) (11.35 g, 32.6 mmoli) viene sciolto in THF anidro in un pallone a due colli chiuso con una valvola a cloruro di calcio, si aggiunge goccia a goccia la 2,6-dicloro-benzaldeide (2.852 g, 16.3 mmoli) sciolta in THF anidro. La miscela di reazione viene agitata per 2 ore, poi controllata via TLC (EtOAc/EtPt 1:4) e MS(ESI). Il solvente viene rimosso sotto vuoto, il residuo ripreso con acetato d'etile e lavato due volte con brine. La fase organica viene anidrificata, concentrata e il grezzo ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/EtPt 1:8) a dare (**109**) con una resa dell'80% (3.2 g, 13.04 mmoli).

Caratteristiche del composto (**109**):

MS (ESI): $[MH]^+$ = 245.0-347.0 (presenza di due atomi di cloro).

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.334 (t, 3H, $J= 7.2$ Hz), 4.275 (q, 2H, $J= 7.2$ Hz), 6.529-6.61 (d, 1H, $J= 16.4$ Hz, *trans*) 7.723-7.805 (d, 2H, $J= 16.4$ Hz, *trans*), 7.118-7.355 (m, 3H, *aromatici*).

Preparazione di: N-Cicloottilmetil-3-(2,6-dicloro-fenil)-acrilamide (**110**)



L'acido 3-(2,6-Dicloro-fenil)-acrilico (**161**) (0.817 g, 3.78 mmoli), ottenuto per idrolisi del composto (**109**) in etanolo 95% e NaOH 1M, viene sciolto in 70 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (0.636g, 4.16 mmoli), WSC (0.8 g, 4.16 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti; si aggiunge quindi (**88**) (0.746 g, 5.29 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 ore e monitorata su TLC con eluente EtOAc/EtPt 1:7.

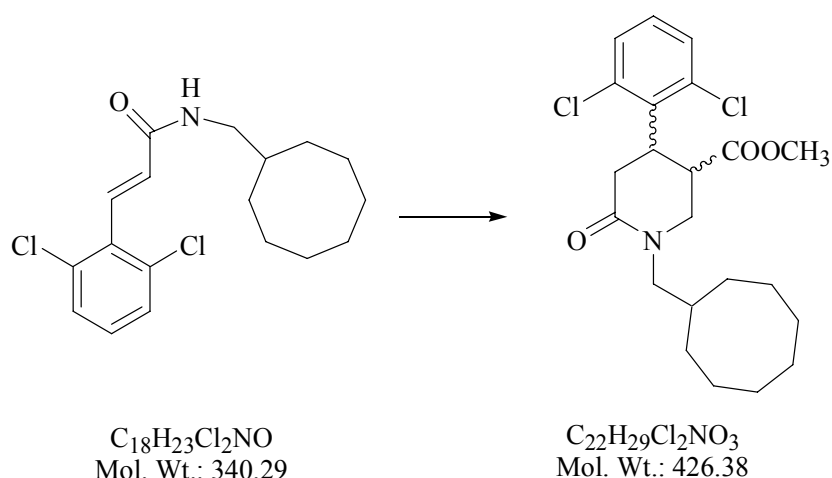
Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si riprende con acetato d'etile, si lava con soluzione di acido citrico 10%, con una soluzione di NaHCO₃ 5%, si anidrifica e si concentra sotto vuoto per ottenere un solido che viene cristallizzato da acetato d'etile e etere etilico e si ottiene (**110**) (0.78 g, 2.29 mmoli) come solido bianco con una resa del 61%.

Caratteristiche del composto (**110**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 340.0-341.9$ (presenza di due atomi di cloro).

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.248-1.632 (m, 14H, *H* cicloott), 2.5 (t, 1H, J= 1.8 Hz), 3.021 (t, 2H, J= 6.4 Hz, *N-CH*₂), 6.686-6.766 (d, 1H, J= 16 Hz, *trans*), 7.495-7.415 (d, 1H, J= 16 Hz, *trans*), 7.325-7.567 (m, 3H, *aromatici*), 8.320 (t, 1H, *NH*).

Preparazione di: 1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dicloro-fenil)-6-oxo-piperidin-3-carbossilico acido metil estere *cis/trans*-(**111**)



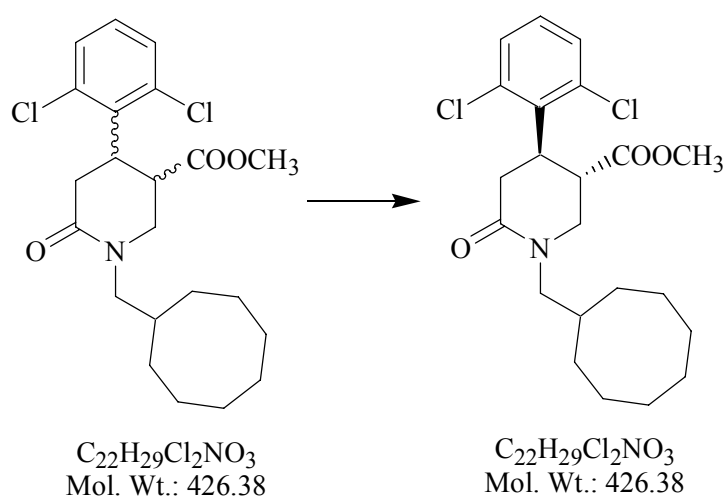
A una soluzione dell'acrilamide (**110**) (0.78 g, 2.3 mmoli) e trietilamina (0.5 ml, 3.45 mmoli) in DCM, vengono aggiunti acrilato di metile (0.207 ml, 2.3 mmoli) e TBSOTf (0.634 ml, 2.76 mmoli) a temperatura ambiente. La miscela di reazione viene agitata a temperatura ambiente per 12 ore e viene monitorata via TLC (EtOAc/EtPt 1:7) e MS(ESI). Il giorno dopo la reazione viene spenta con $NaHCO_3$ ed estratta con acetato d'etile. La fase organica viene lavata con brine, anidrificata e concentrata sotto vuoto. Il residuo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/EtPt 1:3).

Caratteristiche del composto (**111**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 426.2-427.9$ (presenza di due atomi di cloro).

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.143-1.789 (m, 15H, *ciclot*); 2.543-2.661 (dd, 1H, *piperid*); 3.064-3.123 (dd, 1H, *piperid*); 3.192-3.392 (m, 2H, *piperid*); 3.540 (s, 3H, OCH_3); 3.576-3.651 (q, 2H, N- CH_2); 3.759-3.881 (m, 1H, *C3-H piperid*); 4.173-4.422 (m, 1H, *C4-H piperid*); 7.113-7.133 (m, 1H, *aromatico*); 7.259 (d, 1H, *aromatico*); 7.27 (d, 1H, *aromatico*).

Preparazione di: 1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dicloro-fenil)-6-oxo-piperidin-3-carbossilico acido metil estere *trans*-(**162**)



Una soluzione di metossido di sodio preparata di fresco dissolvendo sodio metallico (0.92 gr, 4.02 mmoli) in metanolo (10 ml) viene aggiunta in una sola porzione ad una soluzione di (**111**) (0.243 gr, 0.57 mmoli) raffreddata a 0°C in metanolo (5ml).

La reazione viene agitata per 60h, dopodiché viene adsorbita su silice (1gr) aggiungendo direttamente la silice alla miscela di reazione, lasciando agitare per 15 minuti ed evaporando il solvente sotto vuoto. Il grezzo viene così purificato via flash cromatografia utilizzando come eluente EtOAc/EtPt 1:2, a dare (\pm)-(**162**) (0.223 gr, 92%) come solido bianco.

Caratteristiche del composto (**162**):

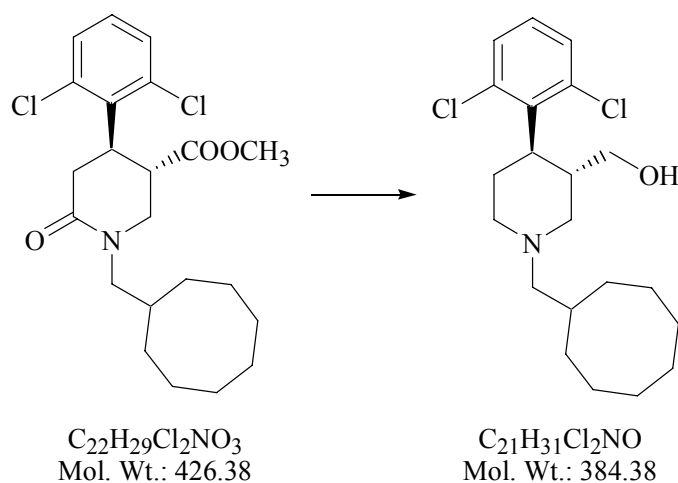
MS (ESI): $[MH]^+ = 426.1-428.1$ (presenza di due atomi di cloro).

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.421-1.789 (m, 15H, *ciclot*); 2.56-2.62 (m, 1H, *piperid*); 3.13-3.18 (m, 1H, *piperid*); 3.21-3.37 (m, 2H, *piperid*); 3.539 (s, 3H, OCH_3); 3.576-3.623 (m, 2H, $N-CH_2$); 3.78-3.84 (m, 1H, *CH piperid*); 4.26-4.30 (m, 1H, *CH piperid*); 7.115-7.135 (m, 1H, *aromatico*); 7.260 (d, 1H, *aromatico*); 7.28 (d, 1H, *aromatico*).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 23.903; 25.158; 25.333; 26.063; 27.120; 27.188; 29.493; 29.645; 34.238; 35.752; 38.109; 42.710; 49.053; 52.178; 53.312; 53.722; 128.822; 128.898; 130.289; 135.476; 169.410; 172.307.

Studi di NMR bidimensionali (COSY, HMQC, HMBC) effettuati al fine di confermare la conformazione *trans* di (**162**).

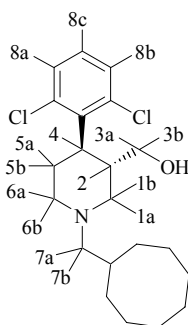
Preparazione di: [1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidin-3-il]-metanolo (**44**)



Una soluzione di (\pm)-**162** (0.223 gr, 0.523 mmoli) in etere etilico viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di $LiAlH_4$ (0.54 gr, 2.1 mmoli) in Et_2O (20ml) raffreddata a $0^\circ C$. Dopo 30 minuti alla stessa temperatura, si aggiungono lentamente 10ml di acqua e etere etilico ed i sali di alluminio che si formano vengono filtrati su strato di celite. L'evaporazione del solvente e la purificazione per flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di $AcOEt/EtPt$ 1:2 danno (**44**) come solido bianco.

Caratteristiche del composto (**44**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 384-386$ (presenza di due atomi di cloro).

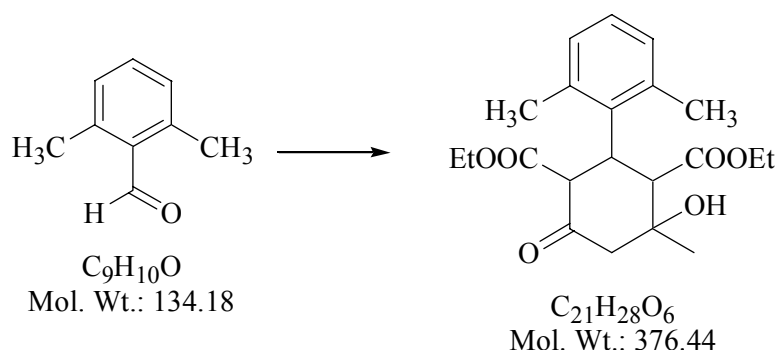


¹H NMR (CDCl₃): δ 1.437-1.741 (m, 15H, *ciclott*); 1.854-1.930 (t, H_{5a},H_{5b}, *piperid*); 1.98-2.25 (m, H_{1a},H_{1b}, *piperid*); 2.137-2.155 (d, 2H, H_{7a}, H_{7b}); 2.59 (m, H₂, *piperid*); 3.280 (m, H_{6a},H_{6b} *piperid*); 3.290-3.307 (m, 1H, H₄ *piperid*); 3.367-3.395 (m, H_{3a},H_{3b}, CH₂-OH); 7.079-7.038 (t, 1H, H_{8c}, *aromatico*); 7.231-7.316 (m, 2H, H_{8a}, H_{8b} *aromatici*).

¹³C NMR (CDCl₃): 25.652 (2C); 26.504; 27.242 (2C); 27.926; 30.884; 30.968; 34.740; 39.486; 42.543; 54.688; 58.232; 64.483; 66.476; 127.962; 128.708; 130.518; 134.906; 136.366; 138.123.

Studi di NMR bidimensionali (COSY, HMQC, HMBC) effettuati al fine di confermare la conformazione *trans* di (**44**).

Preparazione di: acido 2-(2,6-dimetil-fenil)-4-idrossi-4-metil-6-osso-cicloesan-1,3-dicarbossilico-dietil-estere (**113**)



3 g di 2,6-dimetil-benzaldeide commerciale (22.36 mmoli) e 5.65 ml (44.72 mmoli) di aceto-acetato d'etile vengono sciolti in 20 ml di etanolo al 96%, si aggiungono successivamente, goccia a goccia, 0.3 ml di piperidina. La miscela di reazione si lascia in agitazione tutta notte a temperatura ambiente fino alla comparsa di un precipitato giallo, dopodiché si evapora l'etanolo in vacuo e il residuo viene cristallizzato da Et₂O per ottenere (**113**) con una resa quantitativa.

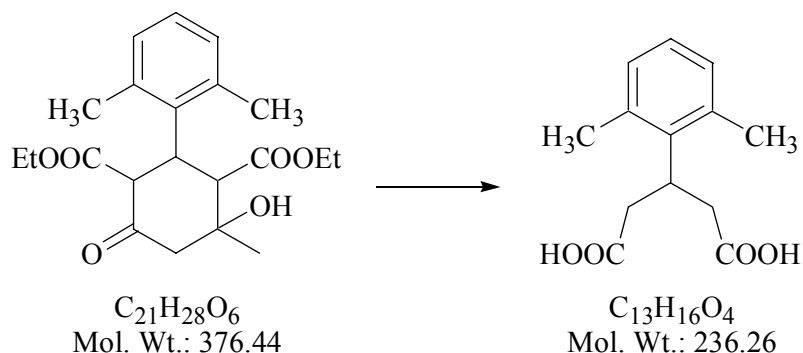
Caratteristiche del composto (**113**):

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 377.5$.

¹H NMR (CDCl₃): 12.500 (s, 1H, Cq-OH); 7.082-6.984 (m, 2H aromatici); 6.956 (t, 1H aromatico, 8 Hz); 5.013 (d, 1H, COOEt-CH-CO, J=11 Hz); 4.056-3.833 (m, 5H, 2CH₃-CH₂-COO, Ar-CH-CH); 3.101 (d, 1H, COOEt-CH-Cq-OH, J=11.4 Hz); 2.486 (s, 2H, CO-CH₂-Cq); 2.356 (s, 6H, 2CH₃); 1.324 (s, 3H, OH-Cq-CH₃); 0.979 (t, 3H, CH₃-CH₂-COO, 7.4 Hz); 0.851 (t, 3H, CH₃-CH₂-COO, 7 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.779; 171.112; 170.520; 138.034; 137.033; 134.288; 130.163; 128.049; 127.900; 98.095; 69.355; 61.358; 60.285; 50.852; 41.727; 38.289; 28.059; 15.388 (2C); 13.831; 13.390.

Preparazione di: acido 3-(2,6-dimetil-fenil)-pentan-dioico (**114**)



In 60 ml di etanolo 96% si dissolvono 6 g di acido 2-(2,6-dimetil-fenil)-4-idrossi-4-metil-6-osso-cicloesan-1,3-dicarbossilico dietil estere (**113**) (15.94 mmoli), 45 ml di NaOH 35% e 15 ml di H₂O. La miscela di reazione viene posta a riflusso per 3h, sotto agitazione; il solvente viene poi rimosso a pressione ridotta e la fase acquosa risultante viene acidificata a 0°C con HCl 20% ed estratta ripetutamente con AcOEt; si anidrififica e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene cristallizzato da Et₂O per ottenere (**114**) (3.28 g, 13.87 mmoli, resa 87%).

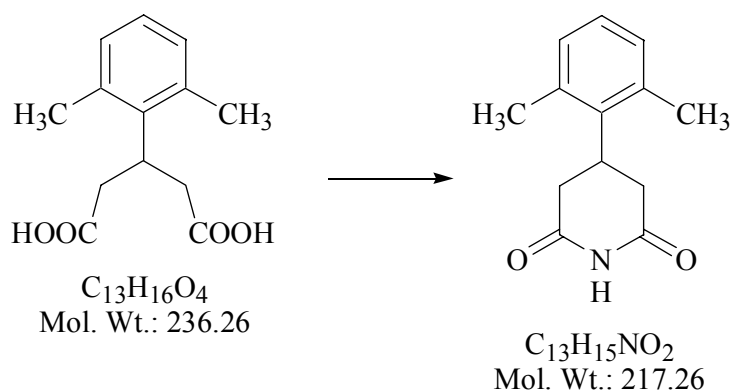
Caratteristiche del composto (**114**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 237.

¹H NMR (CDCl₃): 12.203 (s, 2H, 2CO-OH); 7.411 (t, 2H aromatico, 2 Cl-Cq-CH-CH-, 8 Hz); 7.235 (t, 1H aromatico, Cq-CH-CH-CH-Cq, 8 Hz); 3.430-3.325 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂-); 2.928-2.707 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂-); 2.356 (s, 6H, 2CH₃).

IR: 2918.07; 1713.09; 1560.58; 1438.02; 1310.02; 1226.35; 1202.58; 1085.05; 903.48; 779.13.

Preparazione di: 4-(2,6-dimetil-fenil)-piperidin-2,6-dione (**115**)



Si dissolvono 3.28 g di acido 3-(2,6-dimetil-fenil)-pentan-dioico (**114**) (13.87 mmoli) in 40 ml di NH_4OH . Il solvente viene evaporato prima a pressione ridotta e successivamente alla pompa meccanica. Il residuo solido viene scaldato a 200 °C per 6h. Il prodotto ben essiccato viene ripreso con cloruro di metilene e lavato per 2 volte con Na_2CO_3 0.1M. La fase organica viene anidrificata e concentrata in vacuo per ottenere un grezzo di reazione che cristallizza da Et_2O per ottenere (**115**).

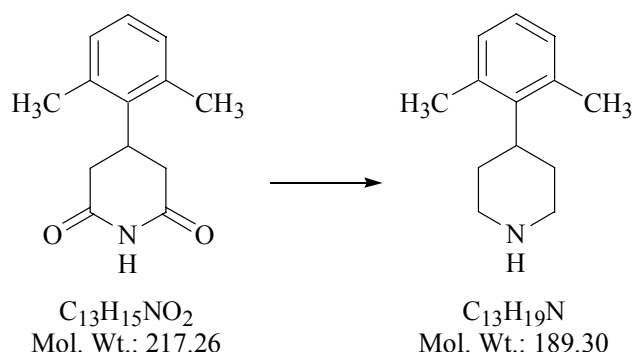
Caratteristiche del composto (**115**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 218$.

1H NMR ($CDCl_3$): 8.200 (br, 1H, CO-NH-CO); 7.363-7.139 (m, 3H aromatico); 4.430-4.300 (m, 1H, $CH_2-CH-CH_2$); 3.605 (dd, 2H, CO-Hass.CHeq.-CH, $J=18, 13.5$ Hz); 2.695 (dd, 2H, CO-Hass.CHeq.-CH, $J=17.7, 4.6$ Hz); 2.356 (s, 6H, $2CH_3$).

IR: 3208.19; 3078.49; 2921.50; 2385.98; 2342.76; 1696.60; 1560.07; 1437.89; 1361.16; 1271.72; 1150.48; 1079.12; 770.20; 731.23.

Preparazione di: 4-(2,6-dimetil-fenil)-piperidina (**116**)



Si sospendono in un pallone a due colli, in atmosfera di argon, 3 g di (**115**) (13.81 mmoli) in 150 ml di THF anidro. La reazione viene messa in agitazione e raffreddata a 0°C. Vengono successivamente addizionate, goccia a goccia, 138 mmoli di $(CH_3)_2S \cdot BH_3$ (13.26 ml) e si lascia la reazione a refluxo per una notte. Si raffredda la soluzione a 0°C, si aggiunge HCl 10% fino a pH nettamente acido (60 ml) e si scalda nuovamente a refluxo per 4 ore. Si raffredda la soluzione a 0°C e si basifica con NaOH 2N. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt 3:2). Si elimina il THF a pressione ridotta e la fase acquosa viene ripetutamente estratta con acetato d'etile. Una volta riunite le fasi organiche si anidrificano e si concentrano sotto vuoto per ottenere un grezzo di reazione che cristallizza da Et_2O per ottenere (**116**) (1.045 g, 5.52 mmoli, 40%).

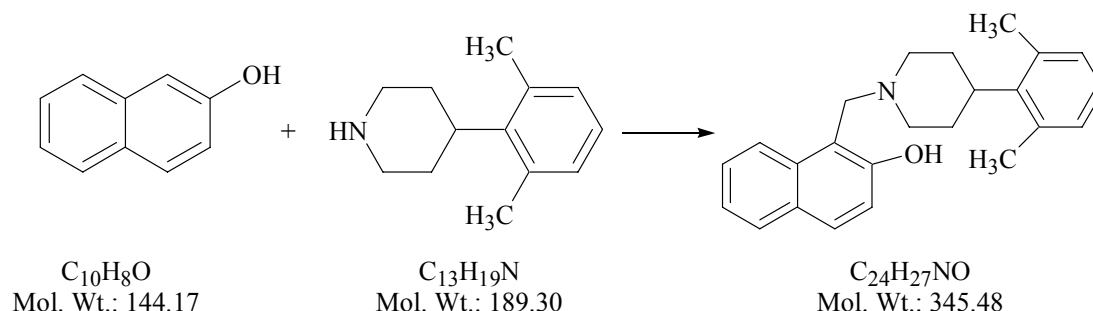
Caratteristiche del composto (**116**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 190$.

1H NMR ($CDCl_3$): 9.775 (br, 1H, $CH_2-NH-CH_2$); 7.286-7.259 (m, 2H aromatici, $CH-CH-CH-$); 7.089 (t, 1H, $CH-CH-CH-$, $J=8$ Hz); 3.788-3.729 (m, 1H); 3.676-3.649 (m, 2H); 3.135-3.024 (m, 4H); 2.356 (s, 6H, 2ch3); 1.828-1.796 (m, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 137.088; 135.210; 130.677; 128.654 (2C); 44.733 (2C); 38.307 (2C); 24.800 (2C); 15.388 (2C).

Preparazione di: 1-[4-(2,6-Dimetil-fenil)-piperidin-1-il-metil]-naftalen-2-olo, (**112**)



Ad una soluzione di 4-(2,6-dimetil-fenil)-piperidina (**116**) (80 mg, 0.426 mmoli) e naftalen-2-olo (61.3 mg, 0.426 mmoli) in 2 ml di etanolo 95%, viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di formaldeide acquosa 36.5% (52 μ l, 0.569 mmoli) e alcune gocce di HCl 1N. La miscela di reazione viene fatta reagire a temperatura ambiente per tutta la notte. Il giorno successivo si osserva la formazione di un precipitato che viene filtrato e seccato all'aria a dare (**112**) con una resa dell'80 % (118 mg, 0.341 mmoli).

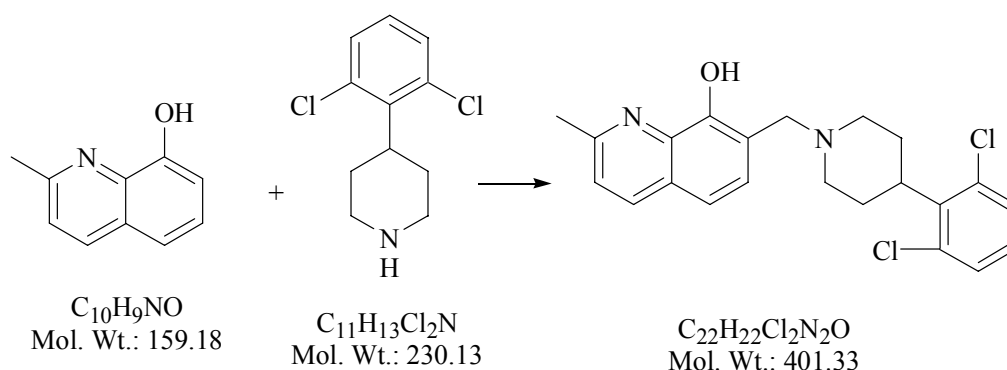
Caratteristiche del composto (**112**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 346.5$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.733 (d, 4H piperid, J= 10 Hz); 2.38 (m, 6H 2CH₃); 3.1 (m, 1H, piperid); 3.27 (d, 2H, J= 8 Hz, piperid); 4.205 (s, 2H, CH₂-N), 7.103-7.860 (9H, aromatici).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 22.041; 29.487 (2C); 39.401; 54.906 (2C); 57.083; 111.077; 119.263 (2C); 121.006 (2C); 122.458 (2C); 126.164; 126.362; 128.531, 128.964; 129.185; 132.734; 136.362 (2C); 140.621; 156.718.

Preparazione di: 7-[4-(2,6-Dicloro-fenil)-piperidin-1-il-metil]-2-metil-chinolin-8-olo, (45)



Ad una soluzione di 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidina (**106**) (50 mg, 0.217 mmoli) e 2-metil-chinolin-8-olo (34.5 mg, 0.217 mmoli) in etanolo 95%, viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di formaldeide acquosa 36.5% (24 μ l, 0.288 mmoli) e alcune gocce di HCl 1M. La miscela di reazione viene fatta reagire a temperatura ambiente per tutta la notte. Il giorno successivo si osserva la formazione di un precipitato che viene filtrato e seccato all'aria a dare (**45**) con una resa dell'80 % (70 mg, 0.174 mmoli).

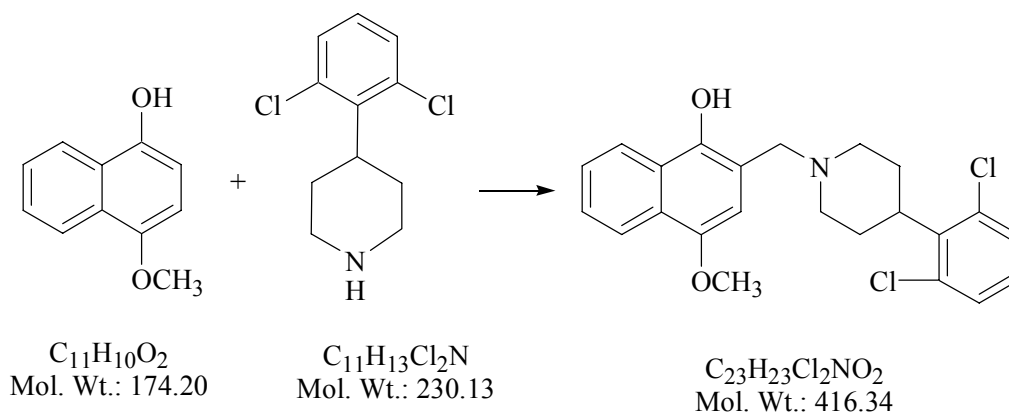
Caratteristiche del composto (**45**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 401-403$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.79 (t, 4H, piperid); 2.24 (t, 4H, piperid); 2.55 (s, 3H, CH_3); 2.78 (t, 1H, piperid); 3.62 (s, 2H, CH_2-N); 7-7.27 (m, 6H, aromatici); 7.96 (dd, 1H, aromatico).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 16.4; 21.3; 31.4 (2C); 49.2; 49.6 (2C); 119.0; 121.1; 122.2; 125; 127.1 (3C); 128.6; 134.2; 135.0 (2C); 138.6; 139.6; 150.8; 159.4.

Preparazione di: 2-[4-(2,6-Dicloro-fenil)-piperidin-1-ilmetil]-4-metossi-naftalen-1-olo
(46)



Ad una soluzione di 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidina (**106**) (50 mg, 0.217 mmoli) e 4-metossi-naftalen-1-olo (37.8 mg, 0.217 mmoli) in etanolo 95%, viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di formaldeide acquosa 36.5% (24 μ l, 0.288 mmoli) e alcune gocce di HCl 1M. La miscela di reazione viene fatta reagire a temperatura ambiente per tutta la notte. Il giorno successivo si osserva la formazione di un precipitato che viene filtrato e seccato all'aria a dare (**46**) con una resa dell'78 % (70.5 mg, 0.169 mmoli).

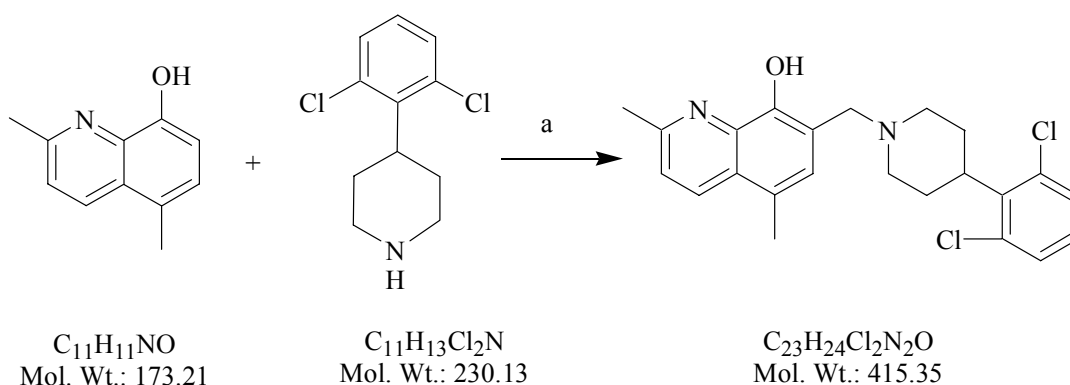
Caratteristiche del composto (**46**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 416-418$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.79 (t, 4H, piperid); 2.24 (t, 4H, piperid); 2.78 (t, 1H, piperid); 3.73 (s, 2H, CH_2-N); 3.82 (s, 3H, OCH_3); 6.35 (s, 1H, aromatico); 6.96-7.07 (d,t, 3H, aromatici); 7.04-8.19 (dd, t, 4H, aromatici).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 16.4; 31.4 (2C); 49.6 (2C); 49.9; 56.4; 105.5; 117.8; 120.1; 121.0; 124.4; 124.5; 125.0; 126.3; 127.1 (2C); 128.6; 135.0 (2C); 139.6; 142.3; 147.2.

Preparazione di: 7-[4-(2,6-Dicloro-fenil)-piperidin-1-ilmetil]-2,5-dimetil-chinolin-8-olo, (**47**)



Ad una soluzione di 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidina (**106**) (50 mg, 0.217 mmoli) e 2,5-dimetil-chinolin-8-olo (37.6 mg, 0.217 mmoli) in etanolo 95%, viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di formaldeide acquosa 36.5% (24 μ l, 0.288 mmoli) e alcune gocce di HCl 1M. La miscela di reazione viene fatta reagire a temperatura ambiente per tutta la notte. Il giorno successivo si osserva la formazione di un precipitato che viene filtrato e seccato all'aria a dare (**47**) con una resa dell'85 % (76.5 mg, 0.184 mmoli).

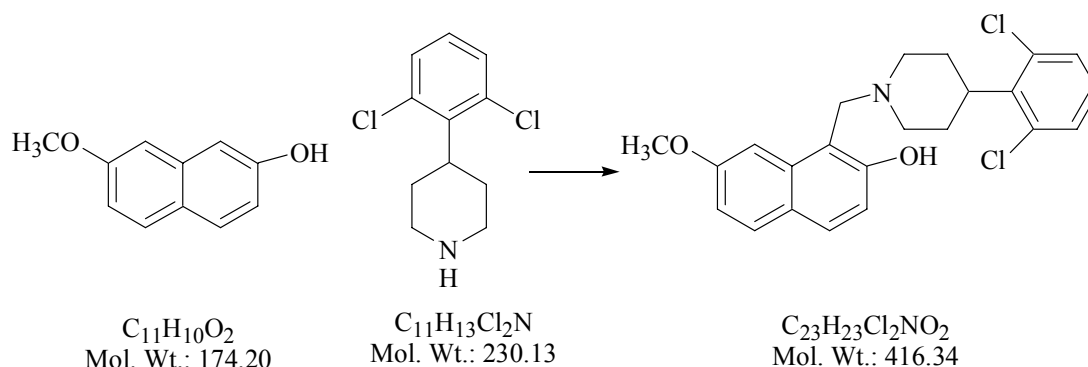
Caratteristiche del composto (**47**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 415-417$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.79 (t, 4H, piperid); 2.24 (t, 4H, piperid); 2.78 (t, 1H, piperid); 3.73 (s, 2H, CH_2-N); 3.82 (s, 3H, OCH_3); 6.35 (s, 1H, aromatico); 6.96-7.07 (d,t, 3H, aromatici); 7.04-8.19 (dd, t, 4H, aromatici).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 16.4; 31.4 (2C); 49.6 (2C); 49.9; 56.4; 105.5; 117.8; 120.1; 121.0; 124.4; 124.5; 125.0; 126.3; 127.1 (2C); 128.6; 135.0 (2C); 139.6; 142.3; 147.2.

Preparazione di: 1-[4-(2,6-Dicloro-fenil)-piperidin-1-ilmetil]-7-metossi-naftalen-2-olo
(48)



Ad una soluzione di 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidina (**106**) (50 mg, 0.217 mmoli) e 7-metossi-naftalen-2-olo (37.8 mg, 0.217 mmoli) in etanolo 95%, viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di formaldeide acquosa 36.5% (24 μ l, 0.288 mmoli) e alcune gocce di HCl 1M. La miscela di reazione viene fatta reagire a temperatura ambiente per tutta la notte. Il giorno successivo si osserva la formazione di un precipitato che viene filtrato e seccato all'aria a dare (**48**) con una resa dell'82% (74 mg, 0.178 mmoli).

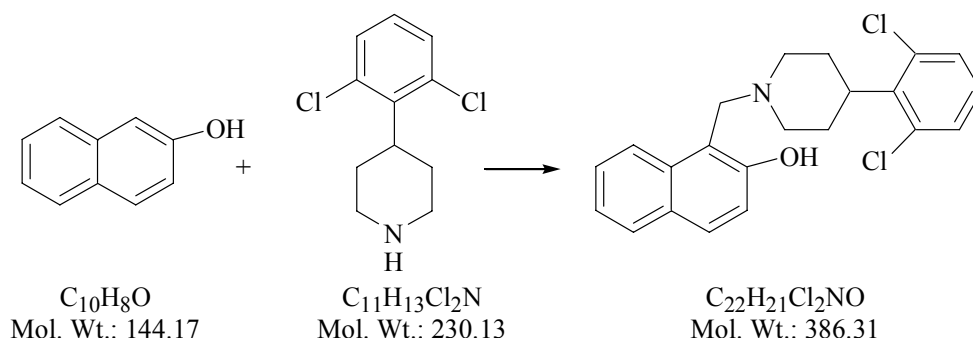
Caratteristiche del composto (**48**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 416-418$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.79 (t, 4H, piperid); 2.24 (t, 4H, piperid); 2.78 (t, 1H, piperid); 3.73 (s, 3H, OCH_3); 4.06 (s, 2H, CH_2-N); 6.73-7.07 (m, 6H, aromatici); 7.43 (d, 1H, aromatico); 7.53 (d, 1H, aromatico).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 16.4; 31.4 (2C); 47.5; 49.6 (2C); 56.0; 100.0 (1C aromatico); 114.2; 115.7; 116.0; 124.4; 127.1 (2C); 127.7; 128.6; 129.5; 134.4; 135.0 (2C); 139.6; 154.4; 157.7.

Preparazione di: 1-[4-(2,6-Dicloro-fenil)-piperidin-1-ilmetil]-naftalen-2-olo (**49**)



Ad una soluzione di 4-(2,6-cloro-fenil)-piperidina (**106**) (80 mg, 0.426 mmoli) e naftalen-2-olo (61.3 mg, 0.426 mmoli) in 2 ml di etanolo 95%, viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di formaldeide acquosa 36.5% (52 μ l, 0.569 mmoli) e alcune gocce di HCl1M. La miscela di reazione viene fatta reagire a temperatura ambiente per tutta la notte. Il giorno successivo si osserva la formazione di un precipitato che viene filtrato e seccato all'aria a dare (**49**) con una resa del 73 % (120 mg, 0.311 mmoli).

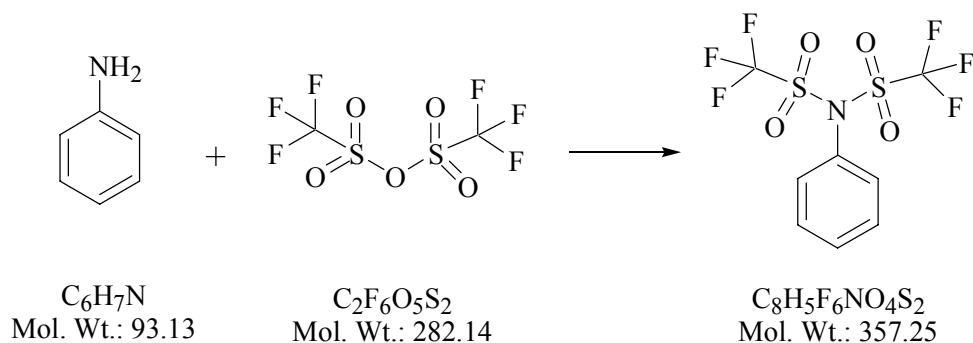
Caratteristiche del composto (**49**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 386-388$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.79 (dt, 4H piperid, $J=8$ Hz); 2.24 (m, 4H piperid, $J=8$ Hz); 2.78 (m, 1H, piperid); 4.06 (s, 2H, CH_2-N); 6.84 (d, 1H, aromatico); 6.98 (t, 1H, aromatico); 7.07 (d, 2H, aromatici); 7.18-7.63 (5H, aromatici).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 16.4; 31.4 (2C); 47.5; 49.6 (2C); 115.4; 118.2; 122.2; 122.8; 125.9; 127.1 (2C); 128.0 (2C); 128.6; 128.7; 133.4; 135.0 (2C); 139.6; 153.7.

Preparazione di: N-fenil- trifluorometansolfonimide (**116**)



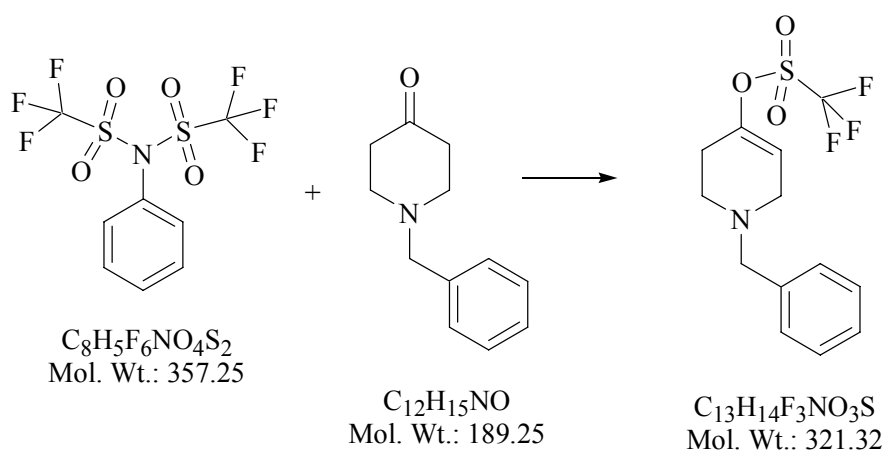
Un pallone a due colli viene fiammato e posto in atmosfera di Argon. Ad una soluzione di anilina (1.35 ml, 14.85 mmoli) e trietilammina (6.26 ml, 44.55 mmoli) in DCM anidro a -78°C , viene aggiunta lentamente anidride trifica (5 ml, 29.7 mmoli). La miscela di reazione viene agitata alla stessa temperatura per un'ora, poi si raffredda a temperatura ambiente e si lascia agitare un'altra ora. La reazione viene controllata via TLC (EtOAc/ Esano 1:9). A questo punto la miscela di reazione viene diluita con DCM (100 ml), lavata con una soluzione satura di Na_2CO_3 (2x50 ml) e con brine (1x30 ml). La fase organica viene quindi anidrificata, filtrata e concentrata sotto vuoto.

Il grezzo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/Esano 1:9) permettendo di ottenere (**116**) come solido giallo chiarissimo (4.56 g, 12.77 mmoli) con una resa dell'86%.

Caratteristiche del composto (**116**):

IR: cm^{-1} 1118.92 (SO_2 stretching); 1222.99; 1249.02; 1419.73; 1442.71; 1463.10; 1490.29; 2361.37 (CN stretc); 3064.84; 3098.97 (CH stretc aromatici); 3433.44.

Preparazione di: Acido trifluoro-metansolfonico 1-benzil-1,2,3,6-tetraidro-piridin-4-il estere (**118**)



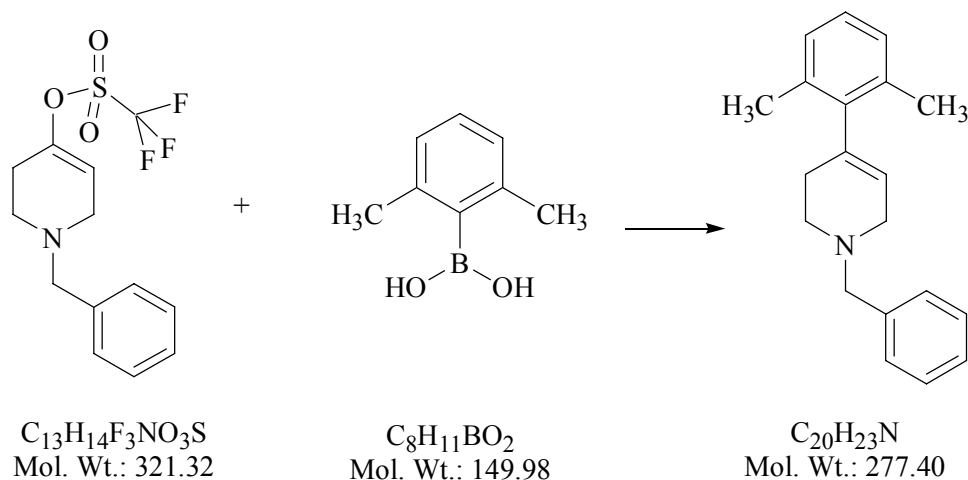
Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una soluzione di DIPA (0.406 ml, 2.9 mmoli) distillata in THF anidro (4 ml) a -78°C , viene aggiunta goccia a goccia butil-litio (2 ml, 3.2 mmoli) e la reazione viene agitata alla stessa temperatura per 15 minuti. A questo punto 1-benzil-piperidin-4-one (**119**) (0.487 ml, 2.63 mmoli) sciolto in THF e raffreddato a -78°C viene aggiunto mediante utilizzo di una canula e la miscela di reazione viene agitata per 20 minuti a -78°C . (**120**) (1 g, 2.8 mmoli) viene aggiunto, la reazione viene scaldata a 0°C e lasciata in agitazione a questa temperatura per una notte. L'andamento della reazione viene controllato via TLC (EtOAc/Esano 1:9). Il giorno seguente il THF viene rimosso sotto vuoto e il residuo viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3) a dare (**118**) con una resa del 73 % (0.616 g, 1.92 mmoli) come olio a temperatura ambiente, che solidifica però lasciato in frigorifero.

Caratteristiche del composto (**118**):

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 322$.

^1H NMR (CDCl_3): δ 2.458 (t, 2H, $J = 2.8$, piridina); 2.733 (t, 2H, $J = 11.2$ Hz, piridina); 3.136 (dd, 2H, $J = 3.2$ Hz); 3.637 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$); 5.726 (m, 1H, doppio legame piridina); 7.259-7.338 (m, 5H, aromatici).

Preparazione di: 1-Benzil-4-(2,6-dimetil-fenil)-1,2,3,6-tetraidro-piridina (**50**)



Il solvente da utilizzare 1,4-diossano viene distillato in KOH. Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una soluzione di (**118**) (0.290 g, 0.903 mmoli) in 1,4-diossano anidro, vengono aggiunti una soluzione di Na_2CO_3 2M (1.26 ml), l'acido 2,6-dimetil-fenil boronico (0.189 g, 1.26 mmoli), litio cloruro (0.115 g, 2.71 mmoli) e per ultimo il catalizzatore $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (5mol%, 52 mg, 0.045 mmoli). La miscela di reazione viene scaldata a riflusso per 3 ore e controllata via MS e TLC (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3). A reazione terminata il solvente viene rimosso sotto vuoto, il residuo diluito con DCM e la fase organica lavata con una soluzione 2N di Na_2CO_3 (100 ml) e NH_4OH concentrata (6 ml). Le acque vengono riestratte con DCM, le fasi organiche raccolte vengono anidrificate, filtrate e il solvente rimosso sotto vuoto. Il grezzo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3) a dare (**50**) (0.205 g, 0.74 mmoli).

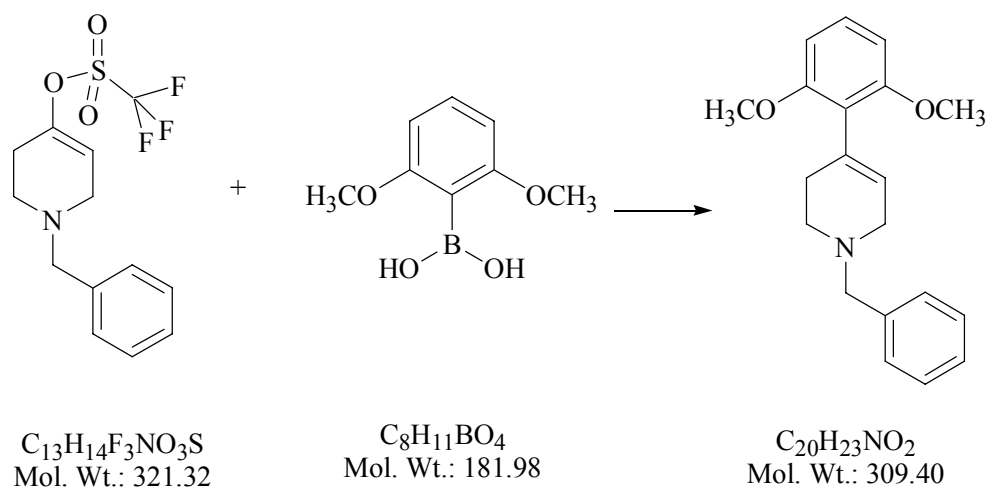
Caratteristiche del composto (**50**):

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 278.2$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 2.261 (s, 8H, 2H piridina, 2 CH_3); 2.737 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz); 3.167(d, 2H, $J = 2.8$ Hz, piridina); 3.703 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$); 5.438 (m, 1H doppio legame piridina); 7.035-7.050 (m, 3H, aromatici); 7.26-7.422 (m, 5H, aromatici).

¹³C NMR (CDCl₃), DEPT: 19.912 (2C); 29.842; 49.843; 52.690; 55.797 (CH₂-N);
62.549; 115.336; 123.238; 126.527 (2C); 127.142; 127.253; 128.310; 129.232 (2C);
135.605; 135.999; 138.247; 142.333.

Preparazione di: 1-Benzil-4-(2,6-dimetossi-fenil)-1,2,3,6-tetraidro-piridina (**51**)



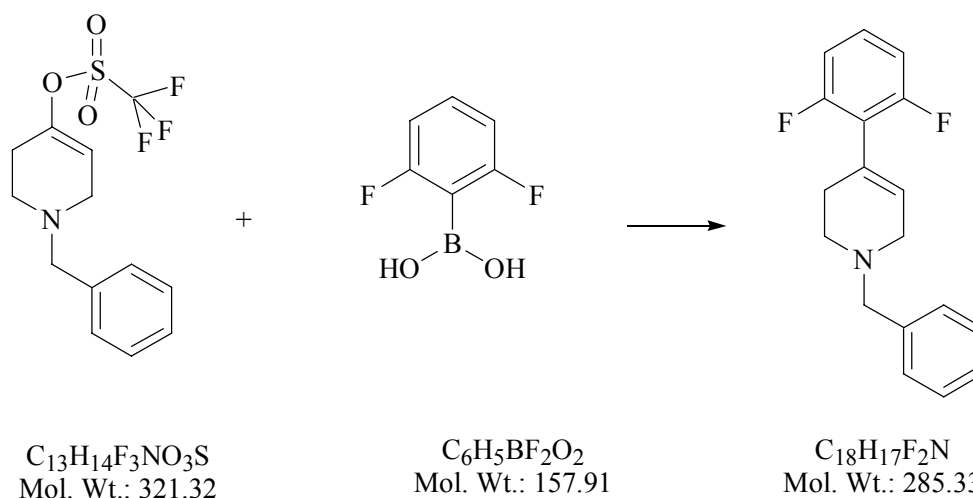
Il solvente da utilizzare 1,4-diossano viene distillato in KOH. Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una soluzione di (**118**) (0.200 g, 0.623 mmoli) in 1,4-diossano anidro, vengono aggiunti una soluzione di Na_2CO_3 2M (0.870 ml), l'acido 2,6-dimetossi-fenil boronico (0.159 g, 0.872 mmoli), litio cloruro (0.0793 g, 1.87 mmoli) e per ultimo il catalizzatore $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (5mol%, 0.036 g, 0.031 mmoli). La miscela di reazione viene scaldata a riflusso per 3 ore e controllata via MS e TLC (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3). A reazione terminata il solvente viene rimosso sotto vuoto, il residuo diluito con DCM e la fase organica lavata con una soluzione 2N di Na_2CO_3 (6 ml) e NH_4OH concentrata (0.4 ml). Le acque vengono riestratte con DCM, le fasi organiche raccolte vengono anidrificate, filtrate e il solvente rimosso sotto vuoto. Il grezzo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3) a dare (**51**) (0.158 g, 0.51 mmoli).

Caratteristiche del composto (**51**):

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 310.0$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 2.394 (m, 2H piridina); 2.856 (t, 2H piridina, $J = 5.8$ Hz); 3.288 (dd, 2H piridina, $J = 3$ Hz); 3.794 (s, 6H, 2 CH_3); 3.826 (s, $\text{CH}_2\text{-N}$); 5.53 (m, 1H, doppio legame piridina); 6.560 (d, 2H, $J = 8.2$; aromatici); 7.141-7.465 (m, 6H, aromatici).

Preparazione di: 1-Benzil-4-(2,6-difluoro-fenil)-1,2,3,6-tetraidro-piridina (**52**)



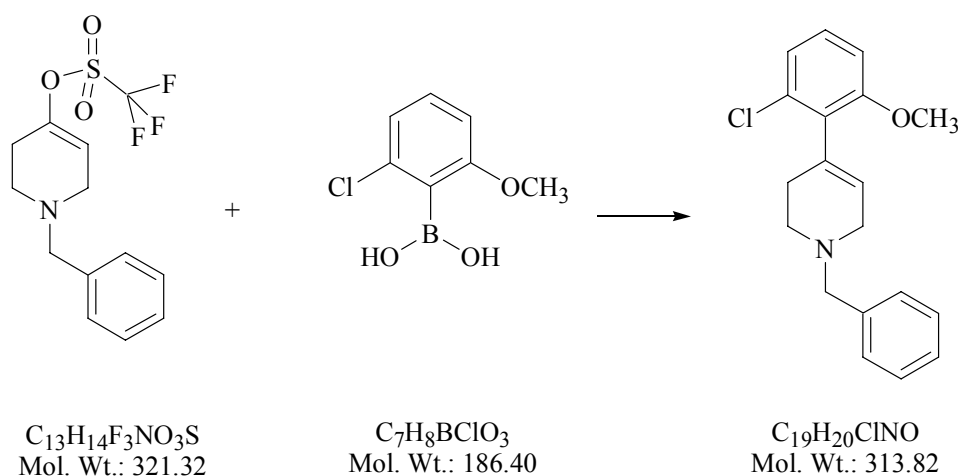
Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una soluzione di (**118**) (0.200 g, 0.623 mmoli) in 1,4-diossano anidro, vengono aggiunti una soluzione di Na_2CO_3 2M (0.872 ml), l'acido 2,6-difluoro-fenil boronico (0.138 g, 0.872 mmoli), litio cloruro (0.0792 g, 1.87 mmoli) e per ultimo il catalizzatore $Pd(PPh_3)_4$ (5mol%, 0.036 g, 0.031 mmoli). La miscela di reazione viene scaldata a riflusso per 3 ore e controllata via MS e TLC (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3). A reazione terminata il solvente viene rimosso sotto vuoto, il residuo diluito con DCM e la fase organica lavata con una soluzione 2N di Na_2CO_3 (6 ml) e NH_4OH concentrata (0.4 ml). Le acque vengono riestratte con DCM, le fasi organiche raccolte vengono anidrificate, filtrate e il solvente rimosso sotto vuoto. Il grezzo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3) a dare (**52**) (0.154 g, 0.542 mmoli).

Caratteristiche del composto (**52**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 286.0$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 2.462 (t, 2H piridina); 2.722 (t, 2H piridina, $J = 5.6$ Hz); 3.197 (dd, 2H piridina, $J = 3$ Hz); 3.671 (s, 2H, CH_2-N); 5.819 (t, 1H, doppio legame piridina); 6.814-6.896 (m, 2H, aromatici); 7.114-7.421 (m, 6H, aromatici).

Preparazione di: 1-Benzil-4-(2-cloro-6-metossi-fenil)-1,2,3,6-tetraidro-piridina (**53**)



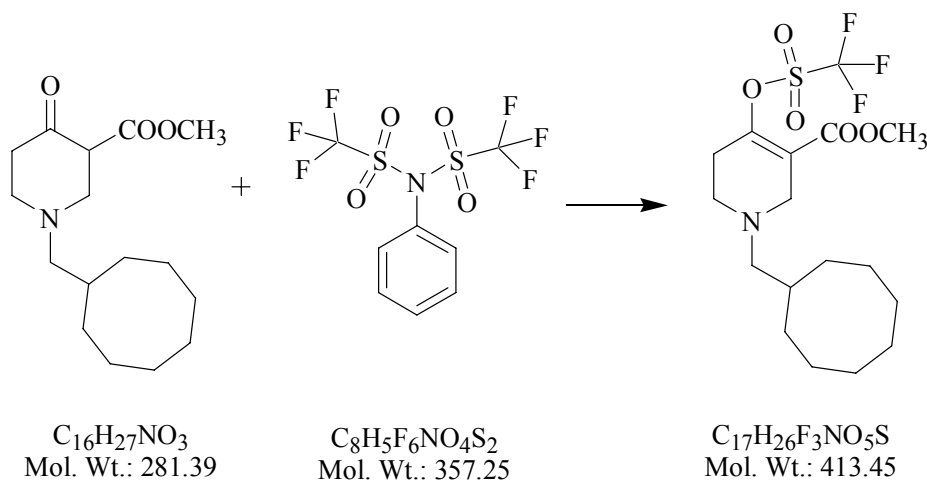
Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una soluzione di (**118**) (0.200 g, 0.623 mmoli) in 1,4-diossano anidro, vengono aggiunti una soluzione di Na_2CO_3 2M (0.872 ml), l'acido 2-cloro-6-metossi-fenil boronico (0.162 g, 0.872 mmoli), litio cloruro (0.0792 g, 1.87 mmoli) e per ultimo il catalizzatore $Pd(PPh_3)_4$ (5mol%, 0.036 g, 0.031 mmoli). La miscela di reazione viene scaldata a riflusso per 3 ore e controllata via MS e TLC (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3). A reazione terminata il solvente viene rimosso sotto vuoto, il residuo diluito con DCM e la fase organica lavata con una soluzione 2N di Na_2CO_3 (6 ml) e NH_4OH concentrata (0.4 ml). Le acque vengono riestratte con DCM, le fasi organiche raccolte vengono anidificate, filtrate e il solvente rimosso sotto vuoto. Il grezzo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3) a dare (**53**) (0.146 g, 0.467 mmoli).

Caratteristiche del composto (**53**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 314.2$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 2.328 (t, 2H piridina); 2.741 (t, 2H piridina, $J = 5.8$ Hz); 3.20 (dd, 2H piridina, $J = 3$ Hz); 3.707 (s, 2H, CH_2-N); 3.790 (s, 3H, OCH_3); 5.553 (m, 1H, doppio legame piridina); 6.746-7.431 (m, 8H, aromatici).

Preparazione di: 1-Cicloottilmetil-4-trifluorometansolfonilossi-1,2,5,6-tetraidro-
piridin-3-carbossilico acido metil estere (**122**)



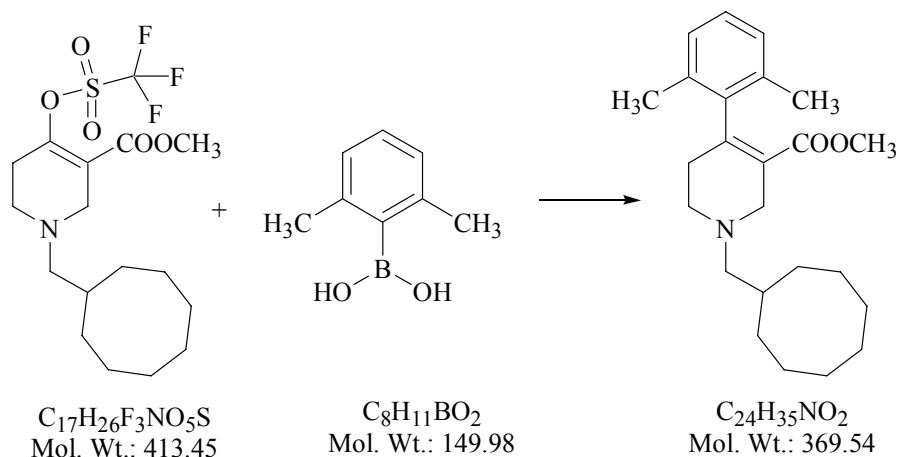
Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una sospensione di NaH (0.342 mg, 8.54 mmoli) in THF anidro (4 ml) a 0°C, viene aggiunto (**84**) (2 g, 7.12 mmoli) sciolto in THF e la reazione viene agitata a 0°C per 30 minuti. Si raffredda quindi a -78°C e (**120**) (2.7 g, 7.55 mmoli) viene aggiunto lentamente e la miscela di reazione viene agitata per 30 minuti a -78°C e poi a 0°C per una notte. L'andamento della reazione viene controllato via TLC (EtOAc/EtPt 1:9). Il giorno seguente il THF viene rimosso sotto vuoto e il residuo viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/EtPt 1:9) a dare (**122**) con una resa del 73 % (2.15 g, 5.2 mmoli).

Caratteristiche del composto (**122**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 414.0$.

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.458 (t, 2H, J= 2.8, piridina); 2.733 (t, 2H, J= 11.2 Hz, piridina); 3.136 (dd, 2H, J= 3.2 Hz); 3.637 (s, 2H, CH₂-N); 5.726 (m, 1H, doppio legame piridina); 7.259-7.338 (m, 5H, aromatici).

Preparazione di: 1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dimetil-fenil)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-carbossilico acido metil estere (**163**)



Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una soluzione di (**122**) (2.5 g, 6.053 mmoli) in THF anidro, vengono aggiunti Na_3PO_4 (6.4 g, 16.95 mmoli), l'acido 2,6-dimetil-fenil boronico (1.27 g, 8.47 mmoli) e per ultimo il catalizzatore $Pd(PPh_3)_4$ (5mol%, 0.347 g, 0.31 mmoli). La miscela di reazione viene scaldata a riflusso per 3 ore e controllata via MS e TLC (EtOAc/EtPt/ NH_3 1:7:0.3). A reazione terminata il solvente viene rimosso sotto vuoto, il residuo diluito con DCM e la fase organica lavata con una soluzione 2N di Na_2CO_3 (59 ml) e NH_4OH concentrata (3.5 ml). Le acque vengono riestratte con DCM, le fasi organiche raccolte vengono anidrificate, filtrate e il solvente rimosso sotto vuoto. Il grezzo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/EtPt 1:7) a dare (**163**) (1.78 g, 4.82 mmoli).

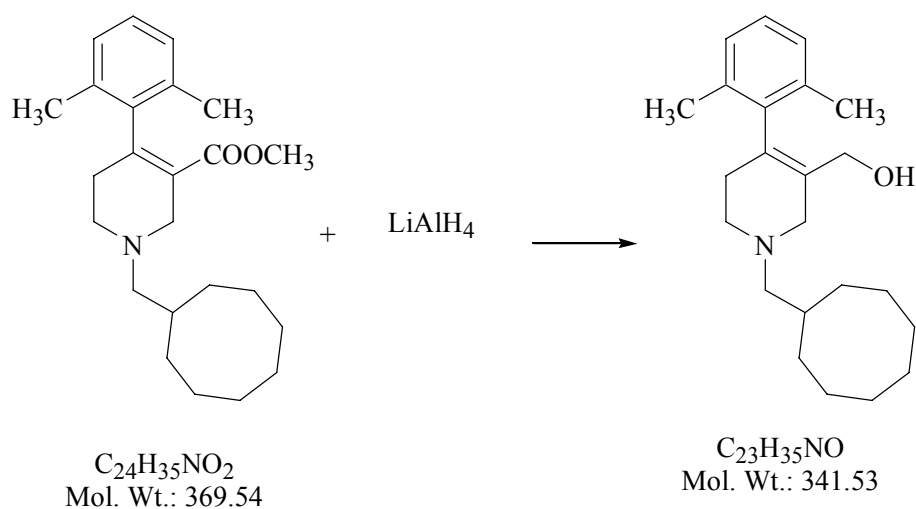
Caratteristiche del composto (**163**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 370.1$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.243-1.719 (m, 15H, cicloott); 2.148 (s, 6H, 2 CH_3); 2.249-2.274 (m, 2H, piridin); 2.316-2.330 (m, 2H, piridin); 2.631 (t, 2H, piridin, $J = 5.6$ Hz); 3.314 (t, 2H, CH_2-N , $J = 2.8$ Hz); 3.447 (s, 3H, CH_3 estere); 6.989-7.038 (m, 3H, aromatici).

¹³C NMR (CDCl₃): 19.492; 25.661 (2C); 26.499; 27.301(2C); 30.773 (2C); 32.395;
34.928; 49.918; 51.257; 53.208; 65.555; 125.605; 126.507; 127.127 (2C); 128.858;
129.396; 133.496; 141.642; 148.121; 166.628.

Preparazione di: [1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dimetil-fenil)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-il]-metanolo (**54**)



Una soluzione di (**163**) (0.5 gr, 1.35 mmoli) in THF anidro viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di LiAlH_4 (0.110 gr, 2.97 mmoli) in THF anidro (10ml) raffreddata a 0°C . Dopo 30 minuti alla stessa temperatura, si aggiungono lentamente 10ml di acqua ed i sali di alluminio che si formano vengono filtrati su strato di celite. L'evaporazione del solvente e la purificazione per flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di $\text{AcOEt}/\text{EtPt}/\text{NH}_3$, 1/1/0.3 danno (**54**) come solido bianco.

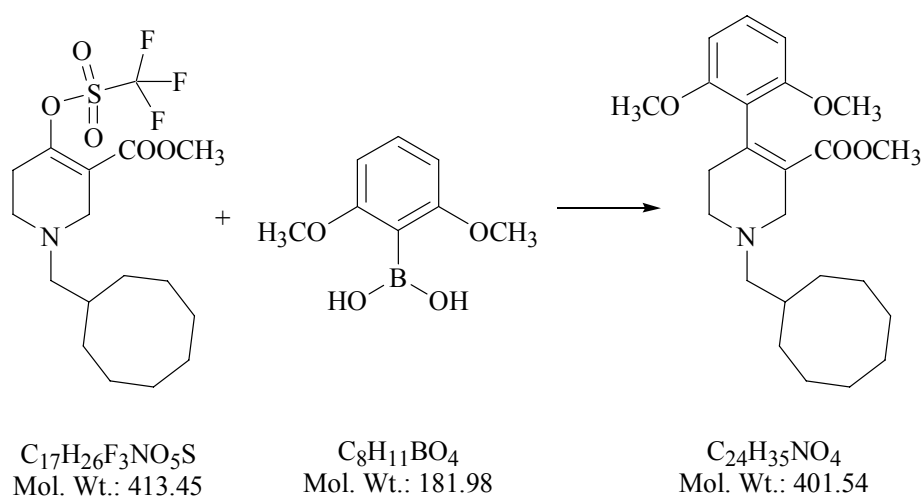
Caratteristiche del composto (**54**):

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 342$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 1.254-1.707 (m, 15H, cicloott); 2.040 (m, 1H, pirid); 2.179 (s, 6H, 2 CH_3); 2.241 (t, 3H, piridin, $J = 4.2$ Hz); 2.619 (t, 2H, piridin, $J = 5.6$); 3.156 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$); 3.767 (s, 2H, CH_2 alcol); 6.99-7.039 (m, 3H, aromatici).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): 19.762; 25.709 (2C); 26.545; 27.278 (2C); 30.583; 30.914 (2C); 34.826; 50.561; 54.323; 62.470; 66.129; 126.732; 127.395 (2C); 128.641; 131.015; 132.995; 135.353; 140.227.

Preparazione di: 1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dimetossi-fenil)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-carbossilico acido metil estere (**164**)



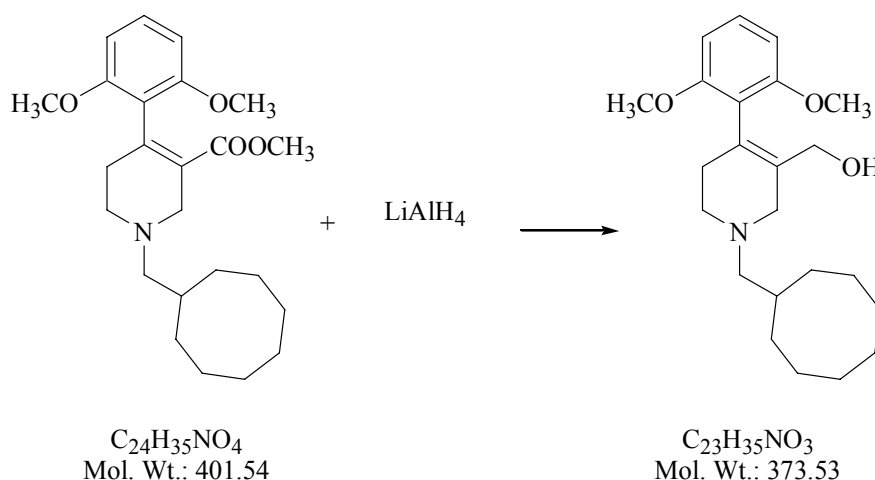
Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una soluzione di (**122**) (0.3 g, 0.726 mmoli) in THF anidro, vengono aggiunti Na_3PO_4 (0.773 g, 2.033 mmoli), l'acido 2,6-dimetossi-fenil boronico (0.185 g, 1.016 mmoli) e per ultimo il catalizzatore $Pd(PPh_3)_4$ (5mol%, 0.042 g, 0.036 mmoli). La miscela di reazione viene scaldata a riflusso per 3 ore e controllata via MS e TLC (EtOAc/EtPt/ NH_3 1:1:0.3). A reazione terminata il solvente viene rimosso sotto vuoto, il residuo diluito con DCM e la fase organica lavata con una soluzione 2N di Na_2CO_3 (7 ml) e NH_4OH concentrata (0.5 ml). Le acque vengono riestratte con DCM, le fasi organiche raccolte vengono anidrificate, filtrate e il solvente rimosso sotto vuoto. Il grezzo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/EtPt/ NH_3 1:1:0.3) a dare (**164**) (0.256 g, 0.64 mmoli).

Caratteristiche del composto (**164**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 402.1$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.212-1.765 (m, 15H, cicloott); 2.303-2.335 (m, 2H, piridin); 2.65 (t, 2H, piridin); 3.24 (t, 2H, piridin); 3.701 (m, 2H, CH_2-N); 3.778 (s, 6H, 2 CH_3 metossi); 3.889 (s, 3H, CH_3 estere); 6.466-6.609 (m, 2H, aromatici).

Preparazione di: [1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dimetossi-fenil)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-il]-metanolo (**55**)



Una soluzione di (**164**) (0.202 gr, 0.537 mmoli) in THF anidro viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di $LiAlH_4$ (0.044 gr, 1.18 mmoli) in THF anidro (10ml) raffreddata a $0^\circ C$. Dopo 30 minuti alla stessa temperatura, si aggiungono lentamente 10ml di acqua ed i sali di alluminio che si formano vengono filtrati su strato di celite. L'evaporazione del solvente e la purificazione per flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di AcOEt/EtPt/ NH_3 , 1/1/0.3 danno (**55**) come solido giallo.

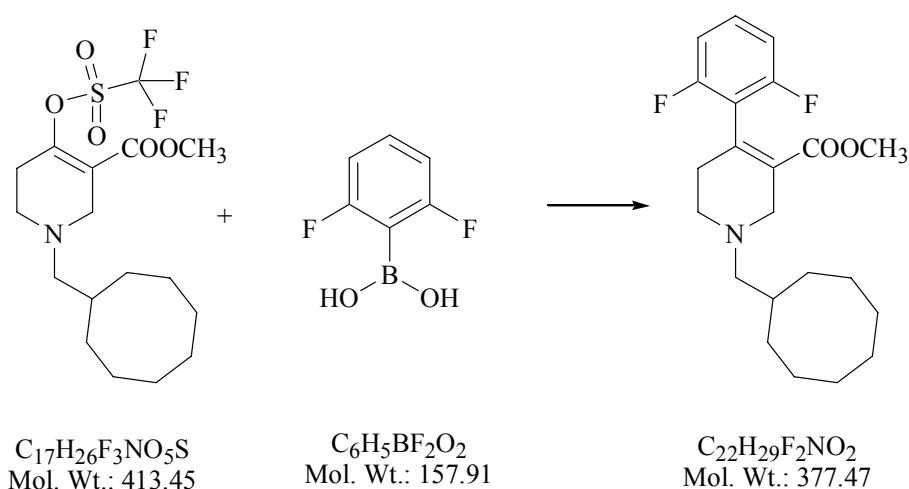
Caratteristiche del composto (**55**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 374.4$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.251-1.714 (m, 15H, cicloott); 2.319 (m, 2H, pirid); 2.65 (t, 2H, piridin); 3.24 (m, 2H, piridin); 3.701 (t, 2H, CH_2-N); 3.778 (s, 6H, CH_3 metossi); 3.889 (s, 2H, CH_2OH); 6.466-7.258 (m, 3H, aromatici).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 19.762; 25.709 (2C); 26.545; 27.278 (2C); 30.583; 30.914 (2C); 34.826; 50.561; 54.323; 62.470; 66.129; 126.732; 127.395 (2C); 128.641; 131.015; 132.995; 135.353; 140.227.

Preparazione di: 1-Cicloottilmetil-4-(2,6-difluoro-fenil)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-carbossilico acido metil estere (**165**)



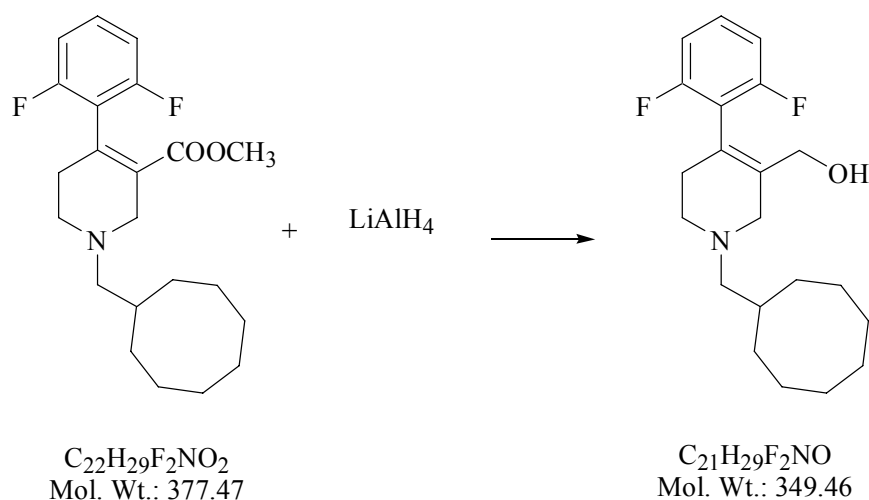
Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una soluzione di (**122**) (0.3 g, 0.726 mmoli) in THF anidro, vengono aggiunti Na_3PO_4 (0.773 g, 2.03 mmoli), l'acido 2,6-dimetil-fenil boronico (0.161 g, 1.017 mmoli) e per ultimo il catalizzatore $Pd(PPh_3)_4$ (5mol%, 0.042 g, 0.036 mmoli). La miscela di reazione viene scaldata a riflusso per 3 ore e controllata via MS e TLC (EtOAc/EtPt/ NH_3 1:4:0.3). A reazione terminata il solvente viene rimosso sotto vuoto, il residuo diluito con DCM e la fase organica lavata con una soluzione 2N di Na_2CO_3 (8 ml) e NH_4OH concentrata (0.5 ml). Le acque vengono riestratte con DCM, le fasi organiche raccolte vengono anidrificate, filtrate e il solvente rimosso sotto vuoto. Il grezzo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/EtPt/ NH_3 1:4:0.3) a dare (**165**) (0.150 g, 0.397 mmoli).

Caratteristiche del composto (**165**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 378.1$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.212-1.765 (m, 15H, cicloott); 2.505 (m, 2H, piridin); 2.668 (t, 2H, piridin); 2.631 (t, 2H, piridin, $J = 5.6$ Hz); 3.314 (t, 2H, CH_2-N , $J = 2.8$ Hz); 3.541 (s, 3H, CH_3 estere); 6.878 (t, 1H, aromatico, $J = 8$ Hz); 7.21 (d, 2H, aromatici).

Preparazione di: [1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dimetil-fenil)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-il]-metanolo (**56**)



Una soluzione di (**165**) (0.148 gr, 0.392 mmoli) in THF anidro viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di $LiAlH_4$ (0.032 gr, 0.862 mmoli) in THF anidro (10ml) raffreddata a 0°C. Dopo 30 minuti alla stessa temperatura, si aggiungono lentamente 10ml di acqua ed i sali di alluminio che si formano vengono filtrati su strato di celite. L'evaporazione del solvente e la purificazione per flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di AcOEt/EtPt/ NH_3 , 1/4/0.3 danno (**56**) come solido giallo.

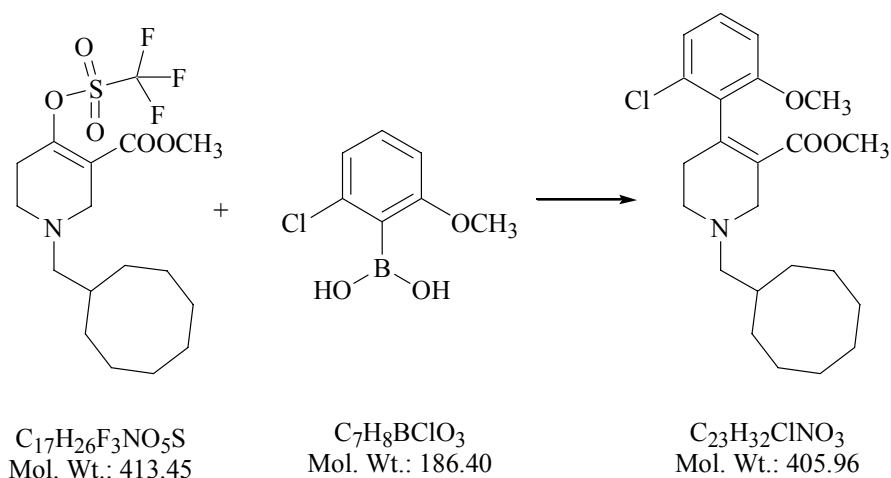
Caratteristiche del composto (**56**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 350.1$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.217-1.796 (m, 15H, cicloott); 2.26 (d, 2H, CH_2N); 2.369 (m, 2H, piridin); 2.645 (t, 2H, piridin, $J = 5.8$ Hz); 3.230 (t, 2H, piridin, $J = 2.2$); 3.869 (s, 2H, CH_2-OH); 6.891 (t, 1H, aromatico, $J = 7.8$ Hz); 7.22 (d, 2H, aromatici).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 27.5 (2C); 30.0; 30.3 (2C); 32.4 (2C); 35.0; 35.5; 53.5; 54.1; 59.0; 61.5; 108.9; 111.0 (2C); 129.3; 130.9; 133.2; 161.4 (2C).

Preparazione di: 1-Cicloottilmetil-4-(2-cloro-6-metossi-fenil)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-carbossilico acido metil estere (**166**)



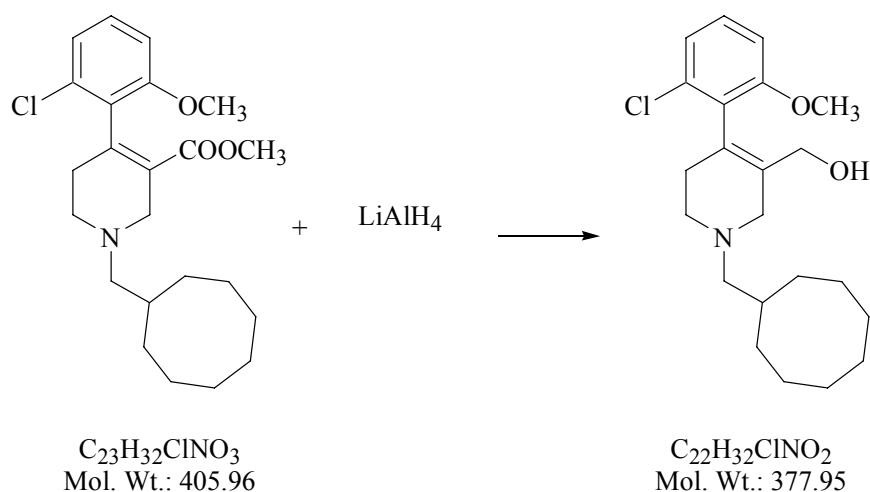
Un pallone a due colli viene fiammato e posto sotto atmosfera di Argon. Ad una soluzione di (**122**) (0.3 g, 0.726 mmoli) in THF anidro, vengono aggiunti Na_3PO_4 (0.773 g, 2.03 mmoli), l'acido 2,6-dimetil-fenil boronico (0.183 g, 1.016 mmoli) e per ultimo il catalizzatore $Pd(PPh_3)_4$ (5mol%, 0.042 g, 0.036 mmoli). La miscela di reazione viene scaldata a refluxo per 3 ore e controllata via MS e TLC (EtOAc/EtPt/ NH_3 1:4:0.3). A reazione terminata il solvente viene rimosso sotto vuoto, il residuo diluito con DCM e la fase organica lavata con una soluzione 2N di Na_2CO_3 (8 ml) e NH_4OH concentrata (0.5 ml). Le acque vengono riestratte con DCM, le fasi organiche raccolte vengono anidrificate, filtrate e il solvente rimosso sotto vuoto. Il grezzo così ottenuto viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/EtPt/ NH_3 1:4:0.3) a dare (**166**) (0.165 g, 0.406 mmoli).

Caratteristiche del composto (**166**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 406.2$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.251-1.776 (m, 15H, cicloott); 2.505 (m, 2H, piridin); 2.668 (t, 2H, piridin); 2.631 (t, 2H, piridin, $J = 5.6$ Hz); 3.314 (t, 2H, CH_2-N , $J = 2.8$ Hz); 3.695 (s, 3H, metossi); 3.795 (s, 3H, CH_3 estere); 6.789-7.260 (d,d,t, 3H, aromatici).

Preparazione di: [1-Cicloottilmetil-4-(2,6-dimetil-fenil)-1,2,5,6-tetraidro-piridin-3-il]-metanolo (**57**)



Una soluzione di (**166**) (0.160 gr, 0.395 mmoli) in THF anidro viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di $LiAlH_4$ (0.033 gr, 0.87 mmoli) in THF anidro (10ml) raffreddata a 0°C. Dopo 30 minuti alla stessa temperatura, si aggiungono lentamente 10ml di acqua ed i sali di alluminio che si formano vengono filtrati su strato di celite. L'evaporazione del solvente e la purificazione per flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di AcOEt/EtPt/ NH_3 , 1/4/0.3 danno (**57**) come solido bianco.

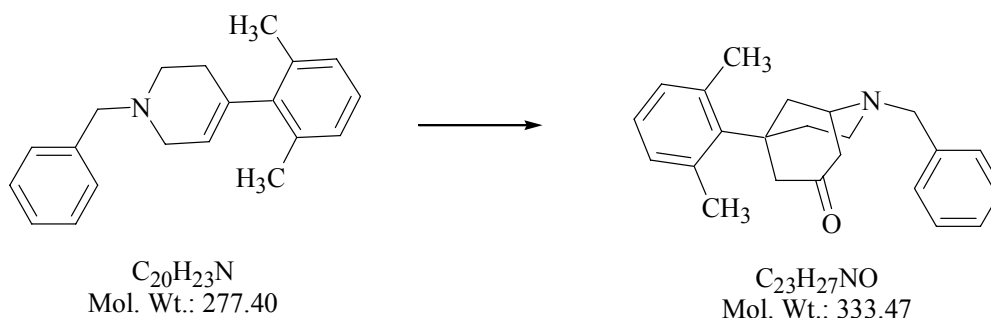
Caratteristiche del composto (**57**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 378.4$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.251-1.776 (m, 15H, cicloott); 2.283 (d, 2H, CH_2N); 2.319 (s, 1H, OH); 2.45-2.81 (m, 2H, piridin); 3.05-3.43 (dd, 2H, piridin); 3.695 (m, 2H, piridin); 3.732 (s, 2H, CH_2OH); 3.795 (s, 3H, CH_3 metossi); 6.789-7.260 (d,d,t, 3H, aromatici).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 27.5 (2C); 30.0; 30.3 (2C); 32.4 (2C); 35.0; 35.3; 53.5; 54.1; 56.4; 59.0; 61.5; 112.1; 120.9; 121.1; 129.3; 130.1; 132.5; 133.2; 161.1.

Preparazione di: 2-Benzil-5-(2,6-dimetil-fenil)-2-aza-biciclo[3.3.1]nonan-7-one (**59**)



Una soluzione di (**50**) (0.574 g, 2.072 mmoli) dissolto in THF anidro (10 ml) viene raffreddata a $-10^{\circ}C$. n-butillitio 1.6 M in esano viene lentamente aggiunto fino a quando la soluzione assume un colore rosso e lo mantiene stabile. A questo punto altri 1.1 eq di n-butillitio (2.28 mmoli, 1.42 ml) vengono aggiunti. La miscela di reazione viene agitata per un'ora a $-10^{\circ}C$, dopodichè il reattivo di Okahara (0.311 g, 2.28 mmoli) in THF (5 ml) viene canulato all'interno della reazione raffreddata a $-78^{\circ}C$. Durante l'aggiunta la temperatura deve essere mantenuta comunque al di sotto di $-30^{\circ}C$. La reazione viene agitata per 3 ore e controllata via TLC e MS. La miscela viene poi trattata con HCl 2N e estratta due volte con etere etilico. La fase acquosa viene fatta agitare per 15 minuti e poi basificata con NaOH 50% fino a pH 14 e estratta due volte con etere etilico. L'etere viene quindi lavato con NaOH 1N e acqua e il solvente rimosso sotto vuoto. Il residuo di prodotto e acqua viene quindi dissolto in metanolo (17 ml) e degasato con Argon per 5 minuti. HCl concentrato (1.15 ml) viene aggiunto e la miscela viene agitata a temperatura ambiente per 24 ore. Controllo della reazione via MS e TLC (EtOAc/Esano/ NH_3 1:9:0.3). A questa miscela di reazione viene aggiunta NaOH 50% al fine di aggiustare il pH a ~ 10 , poi il metanolo viene rimosso sotto vuoto. Il residuo acquoso viene estratto diverse volte con una miscela DCM/THF 3:1. Le fasi organiche raccolte vengono lavate con acqua e brine, anidificate ed evaporate a dare un olio che viene purificato via flash cromatografia (EtOAc/Esano/ NH_3 1:4:0.3) a dare (**59**) (0.276 g, 0.83 mmoli).

Caratteristiche del composto (**59**):

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 334.4$.

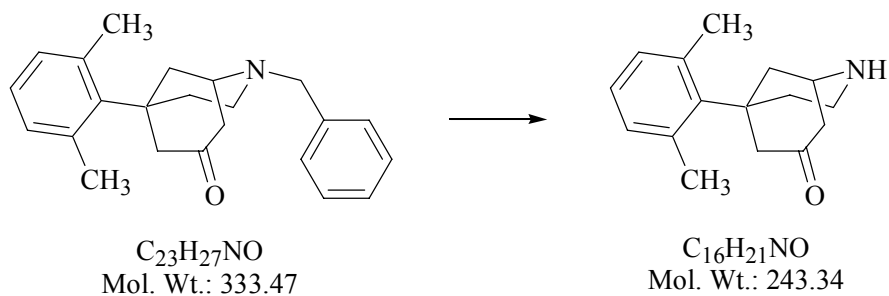
^1H NMR (CDCl_3): δ 1.228-1.286 (m, 2H, morfano); 2.142-2.233 (m, 2H, morfano); 2.006-2.152 (m, 2H, morfano); 2.253 (s, 6H, 2 CH_3); 3.02-3.198 (m, 2H, morfano); 3.315-3.309 (m, 1H, morfano); 3.344-3.367 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$); 5.25 (d, 1H, doppio legame); 7.032 (m, 2H, aromatici); 7.260-7.212 (m, 5H+1H, aromatici).

^{13}C NMR (CDCl_3): 14.214; 15.933; 20.055; 20.861; 22.785; 29.789; 30.398; 32.018; 34.307; 50.916; 58.764; 120.258; 123.019; 125.612; 127.255; 127.422; 127.825; 128.297; 128.411; 128.670; 129.080; 131.058; 149.051.

IR: 2961.68; 2924.03; 2854.65; 1667.74; 1594.90; 1463.17; 1263.27; 1099.98; 1027.62; 799.31; 699.57.

La presenza di un H nella zona dei doppi legami nell' ^1H -NMR e la mancanza del C carbonilico nel ^{13}C -NMR fa pensare alla presenza della forma enolica in cui l'atomo di H del gruppo OH può formare un legame a idrogeno con l'N morfano.

Preparazione di: 5-(2,6-Dimetil-fenil)-2-aza-biciclo[3.3.1]nonan-7-one (**125**)



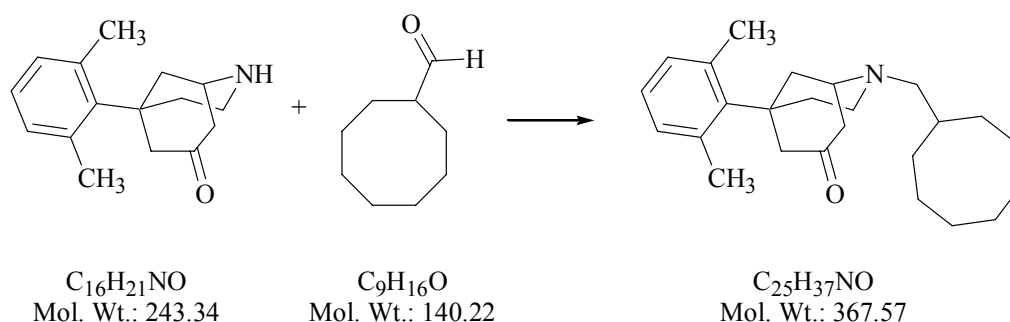
Una soluzione di (**59**) (0.250 g, 0.75 mmoli) in 20 ml di etanolo viene idrogenata all'apparecchio di Parr a 70 psi di idrogeno per 48h in presenza di C/Pd 10% (0.250 g). La reazione viene controllata su TLC (eluente AcOEt/Esano/ NH_3 1:9:0.3) e, una volta terminata, si filtra il catalizzatore su strato di celite ed il solvente viene evaporato sotto vuoto. Si ottengono 0.173 g di (**34**) sottoforma di olio incolore (0.71 mmoli, resa 95%) che vengono utilizzati come tali per la reazione successiva.

Caratteristiche del composto (**59**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 244.5$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.228-1.286 (m, 2H, morfano); 2.142-2.233 (m, 2H, morfano); 2.006-2.152 (m, 2H, morfano); 2.253 (s, 6H, 2 CH_3); 3.02-3.198 (m, 2H, morfano); 3.315-3.309 (m, 1H, morfano); 5.25 (d, 1H, doppio legame); 7.023-7.212 (m, 2H+1H, aromatici).

Preparazione di: 2-Cyclooctilmetil-5-(2,6-dimetil-fenil)-2-aza-biciclo[3.3.1]nonan-7-one (**60**)



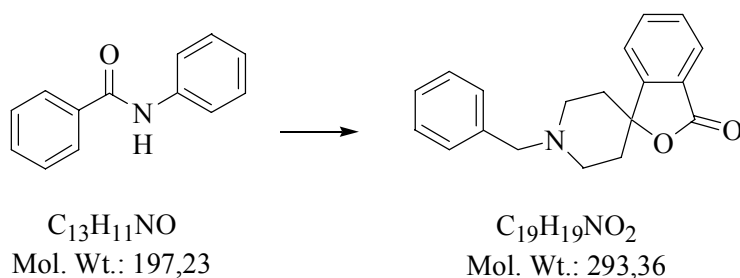
Ad una soluzione di (**125**) (0.170 g, 0.7 mmoli) in metanolo, vengono aggiunti HCl concentrato (15 μl , 0.466 mmoli) e la cicloottilcarbaldeide (**107**) (33 mg, 0.233 mmoli) sciolta in poco metanolo e la miscela viene raffreddata a 0°C. NaBH₄ (10 mg, 0.263 mmoli) viene aggiunto e la reazione viene agitata a temperatura ambiente per 2 ore. La reazione viene quindi controllata via TLC (EtOAc/Esano/NH₃ 1:9:0.3). A reazione terminata il metanolo viene rimosso sotto vuoto e il residuo viene ripreso con acetato d'etile e la fase organica basificata con NaHCO₃ soluzione satura fino a pH di circa 10, separata e lavata con brine; quindi anidrificata e il solvente evaporato sotto vuoto a dare (**60**) che viene purificato via flash cromatografia usando come eluente EtOAc/Esano/NH₃ 1:9:0.3) (52 mg, 0.14 mmoli).

Caratteristiche del composto (**60**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 368.4.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.257-1.301 (m, 15H, cicloott); 1.67 (m, 2H, morfano); 2.006-2.152 (m, 2H, morfano); 2.142-2.233 (m, 4H, morfano); 2.253 (s, 6H, 2CH₃); 2.388 (m, 2H, CH₂-N); 3.02-3.198 (m, 2H, morfano); 3.315-3.309 (m, 1H, morfano); 7.032-7.212 (m, 2H+1H, aromatici).

Preparazione di: 1'-benzil-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin]-3-one (**130**)



In un pallone a 2 colli in atmosfera di argon, si sciolgono 5 g di benzanilide (25.38 mmoli) in THF anidro (70 ml), si porta a $-78^{\circ}C$ e si aggiunge goccia a goccia *n*-BuLi 2.5M (25.98 ml, 64.97 mmoli) sotto agitazione. La reazione viene lasciata per 1 ora a $0^{\circ}C$, fino alla comparsa di un'intensa colorazione rosso-arancione, dopodiché si gocciola, alla stessa temperatura, N-benzil-piperidin-4-one (10.68 ml, 57.61 mmoli). Si lascia la reazione a temperatura ambiente per una notte.

La soluzione viene portata a $0^{\circ}C$, si acidifica con HCl 3N, si aggiunge cloroformio e si lascia in agitazione per 1 ora. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt 3:2). La fase acquosa viene ripetutamente estratta con cloroformio e le fasi organiche riunite sono anidrificate ed evaporate. Il prodotto cristallizza da Et₂O (6.547 g, 22.345 mmoli, resa 88%) come solido giallo.

Caratteristiche del composto (**130**):

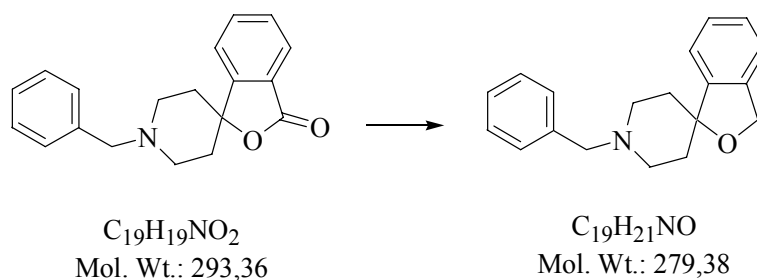
Pf = 210-215 $^{\circ}C$.

MS (ESI): $[MH]^+ = 294$.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.872 (td, 1H aromatico, J=8, 0.9 Hz); 7.660 (dt, 1H aromatico, J=7.4, 1.2 Hz); 7.511 (dt, 1H aromatico, J=7.4, 0.8 Hz); 7.427 (td, 1H aromatico, J=7.6, 0.7 Hz); 7.382-7.319 (m, 4H aromatici); 7.294-7.258 (m, 1H aromatico); 3.627 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 2.920 (dd, N-CH₂-CH₂-, 2H, J=9, 2.2 Hz); 2.562 (dt, N-CH₂-CH₂-, 2H, J=12, 2.4 Hz); 2.235 (dt, Cq-CH₂-CH₂-, 2H, J=13.2, 4.4 Hz); 1.707 (dd, Cq-CH₂-CH₂-, 2H, J=14.4, 2.4 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃): 168.801; 151.379; 135.092; 131.338 (2C); 130.360; 130.218; 129.532 (2C); 126.141 (2C); 124.800; 121.795; 81.564; 61.318; 48.920 (2C); 33.028 (2C).

Preparazione di: 1'-benzil-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidina] (**131**)



Si sospendono in un pallone a due colli, in atmosfera di argon, 6.547 g di (**130**) (22.34 mmoli) in 150 ml di THF anidro. La reazione viene posta in agitazione e raffreddata a 0°C. Vengono successivamente addizionate, goccia a goccia, 44.68 mmoli di (CH₃)₂S*BH₃ (4.30 ml) e la miscela viene lasciata a refluxo per una notte. Si raffredda la soluzione a 0°C, si aggiunge HCl 10% fino a pH nettamente acido e si scalda nuovamente a refluxo per 4 ore. La soluzione viene raffreddata a 0°C e basificata con NaOH 2N. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:1). Si elimina il THF a pressione ridotta e la fase acquosa viene ripetutamente estratta con AcOEt. Una volta riunite, le fasi organiche vengono anidrificate e concentrate in vacuo per ottenere un grezzo di reazione di colorazione marrone, che viene purificato in colonna con eluente AcOEt/EtPt 1:1 a dare (**131**) (3.43 g, 12.28 mmoli, resa 55%).

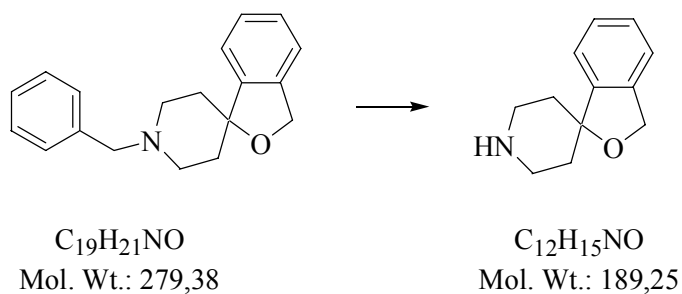
Caratteristiche del composto (**131**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 280.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.392-7.157 (m, 9H aromatici); 5.072 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.601 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 2.858 (dd, 2H, N-CH₂-CH₂-, J=10, 2 Hz); 2.446 (dt, 2H, N-CH₂-CH₂-, J=12, 2.4 Hz); 2.011 (dt, 2H, Cq-CH₂-CH₂-, J=13.2, 4.4 Hz); 1.765 (dd, 2H, Cq-CH₂-CH₂-, J=14.4, 2.4 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃): 145.788; 138.982 (2C); 129.438 (2C); 128.289 (2C); 127.597; 127.384; 127.103; 121.103; 120.890; 84.811; 70.780; 63.540; 50.216 (2C); 36.649 (2C).

Preparazione di: spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidina] (**128**)



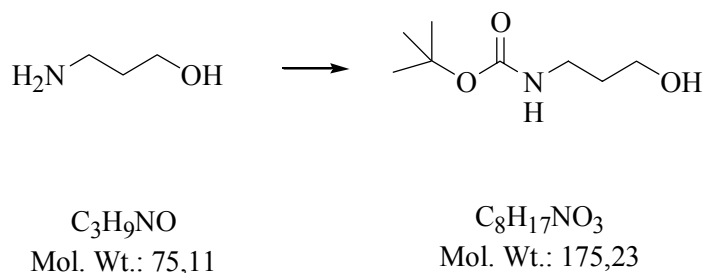
Una soluzione di (**131**) (3.43 g, 12.29 mmoli) in 200 ml di etanolo viene idrogenata all'apparecchio di Parr a 70 psi di idrogeno per 48h in presenza di C/Pd 10% (0.35 g). La reazione viene controllata su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:1) e, una volta terminata, si filtra il catalizzatore su strato di celite ed il solvente viene evaporato sotto vuoto. Si ottengono 2.20 g di (**34**) sottoforma di olio incolore (11.64 mmoli, resa 95%).

Caratteristiche del composto (**128**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 190$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.310-7.280 (m, 2H aromatici); 7.231-7.211 (m, 2H aromatici); 5.790 (br, 1H); 5.069 (s, 2H, Ar- CH_2 -O); 3.405-3.870 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2 -); 2.755-2.655 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2 -); 2.370-2.280 (m, 2H, Cq- CH_2 - CH_2 -); 1.835-1.814 (m, 2H, Cq- CH_2 - CH_2 -).

Preparazione di: acido (3-idrossi-propil)-carbamico-*tert*-butil estere (**129**)

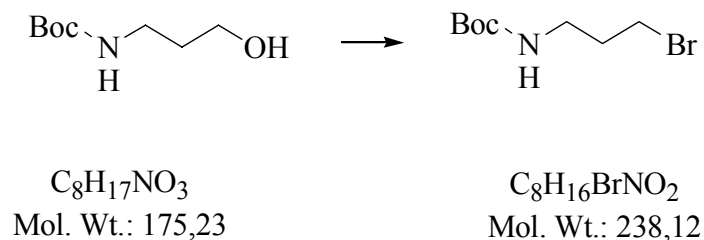


Una soluzione di 3-amino-propanolo (15.23 ml, 200 mmoli) in 100 ml di DCM, raffreddata a 0°C, viene trattata con di-*tert*-butil-dicarbonato (43.65 g, 200 mmoli). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per una notte e successivamente controllata su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:1). A reazione ultimata si evapora il solvente sotto vuoto, si recupera il residuo con metil-etil-chetone, il quale viene lavato due volte con HCl 1N saturo di NaCl.

La fase organica viene successivamente anidrificata e concentrata sotto vuoto per ottenere il prodotto finale come olio incolore (35 g, 200 mmoli, resa 100%).

Il prodotto viene utilizzato tal quale nella reazione successiva.

Preparazione di: acido (3-bromo-propil)-carbamico-*tert*-butil estere (**132**)



Ad una soluzione di (**129**) (35 g, 200 mmoli) in cloruro di metilene (150ml), raffreddata a 0°C, vengono aggiunti trifenilfosfina (67.8 g, 258.5 mmoli) e tetrabromuro di carbonio (85.73 g, 258.5 mmoli); la miscela di reazione viene lasciata in agitazione per 12h a temperatura ambiente.

L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:7). A reazione terminata vengono eseguiti due lavaggi della fase organica con acqua e uno con brine. Il CH_2Cl_2 viene anidrificato ed evaporato sotto vuoto.

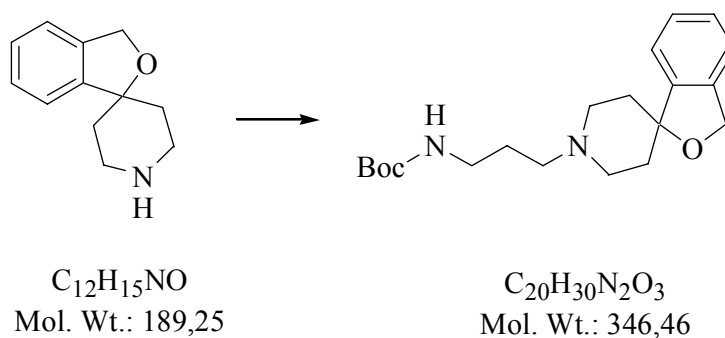
Il residuo ottenuto viene purificato per flash cromatografia utilizzando come fase mobile AcOEt/EtPt 1/7 a dare (**132**) con una resa quantitativa.

Caratteristiche del composto (**132**):

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 239$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 4.925 (br, 1H, CO-NH- CH_2 -); 3.351 (t, 2H, CH_2 - CH_2 -Br, $J=6.4$ Hz); 3.184-3.152 (m, 2H, NH- CH_2 - CH_2 -); 1.973-1.940 (m, 2H, CH_2 - CH_2 - CH_2 -); 1.348 (s, 9H, 3 CH_3).

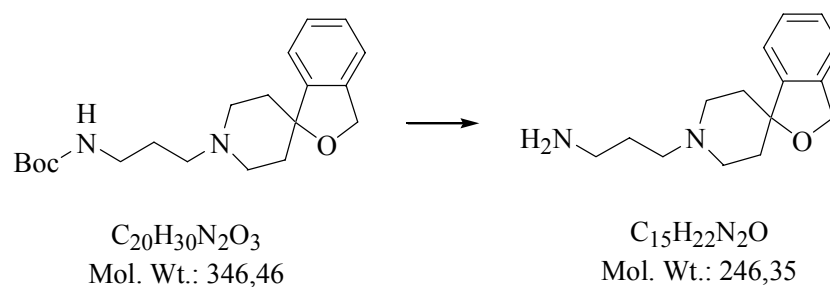
Preparazione di: acido {3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]]-propil}-
carbamico-*tert*-butil estere (**133**)



A 2 g di (**128**) (10.58 mmoli) sciolti in DMF si addiziona una soluzione di acido (3-bromo-propil)-carbamico-*tert*-butil estere (2.99 g, 12.59 mmoli) in DMF e 2.92 g di K_2CO_3 (21.16 mmoli). La reazione, di cui si segue l'andamento su TLC (eluente AcOEt/EtPt 5:1), viene portata a 60°C sotto agitazione per circa 1h. Quindi si evapora il solvente e il residuo viene recuperato con acetato d'etile, che viene lavato per 2 volte con NH_4Cl saturo e 1 volta con brine.

Si anidrifca la fase organica e si concentra a pressione ridotta per ottenere il prodotto finale che viene utilizzato tal quale nella reazione successiva.

Preparazione di: 3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]]propilamina (**134**)



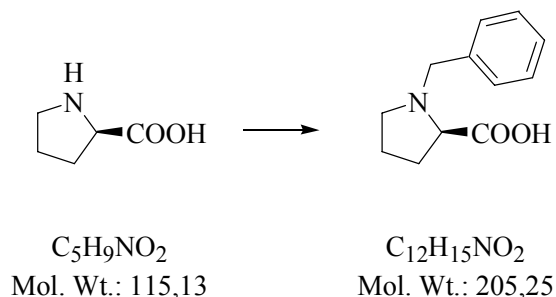
A 3.456 g di (**133**) (9.99 mmoli), raffreddati a 0°C, viene aggiunto goccia a goccia TFA (7.42 ml, 99.9 mmoli). La reazione si segue su TLC (eluente AcOEt/EtPt 5:1) e viene portata a completezza in un tempo pari a circa 1h, quindi si raffredda a 0°C e si basifica con NaOH 2N. La fase acquosa viene ripetutamente estratta con AcOEt e le fasi organiche riunite, anidificate ed evaporate sotto vuoto a dare (**134**) (2.32 g, 9.417 mmoli, resa 95%).

Caratteristiche del composto (**134**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 247$.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.271-7.249 (m, 2H aromatici); 7.206-7.142 (m, 2H aromatici); 5.062 (s, 2H, Ar-CH₂-O-); 2.896 (dd, 2H, J=9.4, 2 Hz); 2.811 (t, 2H, J=6.8 Hz); 2.504 (t, 2H, J=7.2 Hz); 2.388 (t, 2H, J=12.4 Hz); 2.233 (br, 2H, CH₂-NH₂); 1.983 (dt, 2H, J=12.4, 4.4 Hz); 1.798-1.704 (m, 4H).

Preparazione di: acido 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico (**126**)



5 g di acido D-pirrolidin-2-carbossilico (43.44 mmoli) vengono sciolti in isopropanolo e si aggiungono 8.53 g di KOH (152 mmoli) precedentemente macinato in un mortaio. Si porta la reazione a 40°C e, in seguito alla completa dissoluzione del KOH, si addiziona benzilcloruro (7.51 ml, 65.16 mmoli) distillato di fresco; la reazione si lascia in agitazione per 24h alla stessa temperatura. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt/AcOH 1:1:0.3). Si raffredda la miscela a 0°C, si acidifica con HCl 37% fino a pH 5-6, si aggiunge cloroformio e si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 1 notte. La reazione viene successivamente filtrata ed il precipitato viene lavato con CHCl₃.

Il prodotto finale si ottiene dall'evaporazione del solvente e cristallizzazione da acetone con una resa quantitativa ottenendo un solido bianco.

Caratteristiche del composto (**126**):

Pf = 175-180 °C.

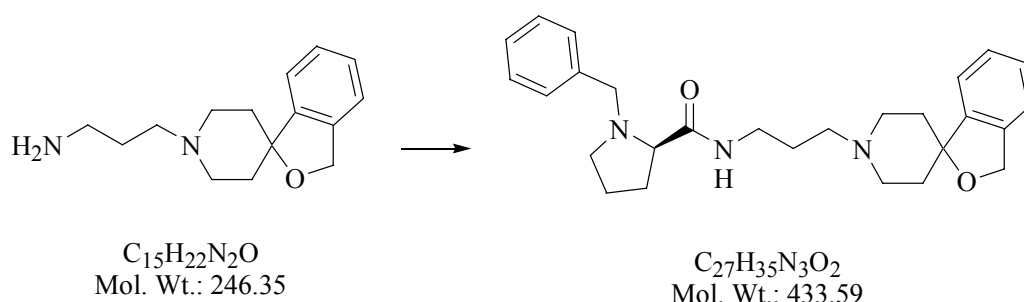
MS (ESI): [MH]⁺ = 206.

¹H NMR (CD₃OD): δ 7.508-7.484 (m, 2H aromatici); 7.414-7.377 (m, 3H aromatici); 4.344 (d, 1H, N-HCH-Ar, J=12.8 Hz); 4.124 (d, 1H, N-HCH-Ar, J=12.8 Hz); 3.905 (dt, 1H, N-CH-COOH, J=8.8, 6.8 Hz); 3.345-3.276 (m, 1H); 3.076-2.956 (m, 1H); 2.368-2.245 (m, 1H); 1.956-1.915 (m, 2H); 1.823-1.785 (m, 1H).

[α]_D²⁰ = + 27° (c = 0.1g/100 ml, Etanolo).

IR: 3649.81; 2958.99; 2831.09; 2361.76; 1722.99; 1670.45; 1458.78; 1395.81; 1348.67; 1215.87; 896.59; 746.03; 696.57.

Preparazione di: acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico {3-[spiro[isobenzofuran-1(3H),4'-piperidin-1-il]]-propil}-amide (**39**)



L'acido D-1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico (**126**) (716 mg, 3.496 mmoli) viene sciolto in 20 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (642 mg, 4.195 mmoli), WSC (804 mg, 4.195 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**134**) (860 mg, 3.496 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, il quale viene successivamente anidrificato e concentrato a pressione ridotta per ottenere un olio rosso cupo come grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**39**) (560 mg, 1.293 mmoli, resa 37%).

Caratteristiche del composto (**39**):

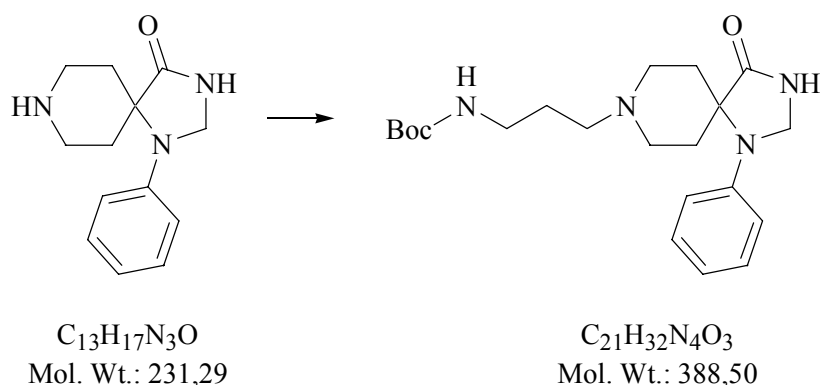
MS (ESI): [MH]⁺ = 434.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.605 (br, 1H, CO-NH); 7.307-7.206 (m, 9H aromatici); 5.055 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.876 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=12.8 Hz); 3.487 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=12.8 Hz); 3.424-3.159 (m, 4H); 3.089-3.000 (m, 1H); 2.873-2.805 (m, 2H); 2.486-2.295 (m, 5H); 2.239-2.136 (m, 3H); 2.037-1.879 (m, 2H); 1.787-1.653 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.622; 145.614; 138.949; 138.649; 128.814 (2C); 128.562 (2C); 127.624; 127.387 (2C); 121.101; 120.793; 84.695; 70.790; 67.612; 60.025; 56.768; 54.078; 50.545; 50.214; 37.673; 36.609 (2C); 30.780; 26.994; 24.092.

[α]_D²⁰ = + 43° (c = 0.1g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: acido [3-(4-osso-1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-8-il)-propil]-carbamico *tert*-butil estere (**136**)



A 500 mg di (**135**) (2.162 mmoli) sciolti in DMF si addiziona una soluzione di acido (3-bromo-propil)-carbamico-*tert*-butil estere (612 mg, 2.572 mmoli) in DMF e 2.92 g di K_2CO_3 (4.323 mmoli). La reazione, di cui si segue l'andamento su TLC (eluente AcOEt/EtPt 5:1), viene portata a 60°C sotto agitazione per circa 1h. Quindi si evapora il solvente e il residuo viene recuperato con acetato d'etile, che viene lavato per 2 volte con NH_4Cl saturo e 1 volta con brine.

Si anidrifca la fase organica e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione che viene poi cristallizzato da etere etilico a dare il composto finale (535 mg, 1.379 mmoli, resa 64%).

Caratteristiche del composto (**136**):

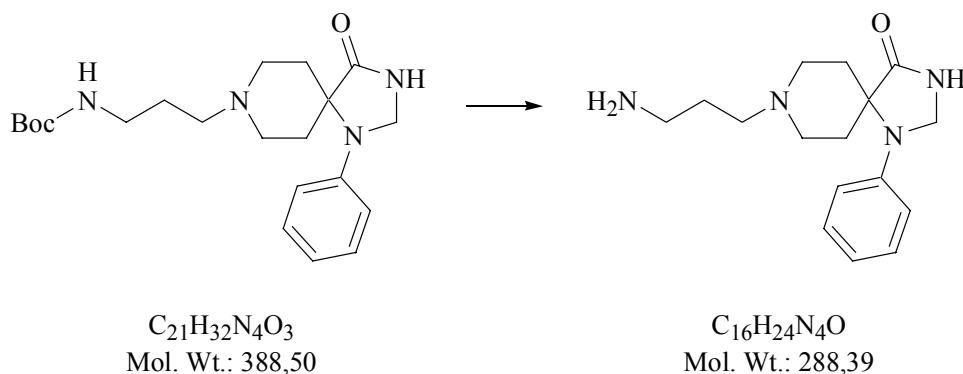
Pf = 163-165 °C.

MS (ESI): $[MH]^+ = 389$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.317-7.238 (m, 3H aromatici); 6.905-6.848 (m, 2H aromatici); 5.386 (br, 2H, NH-CO-Cq); 4.732 (s, 2H, NH- CH_2 -N-Ar); 3.234-3.193 (m, 2H); 2.822-2.449 (m, 8H); 1.757-1.662 (m, 4H); 1.411 (s, 9H, 3 CH_3 -Cq).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 178.147; 156.206; 143.216; 129.374 (2C); 119.027 (2C); 115.501 (2C); 79.009; 59.500; 59.386; 56.980; 49.843 (2C); 40.166; 29.313; 28.556 (3C); 26.915.

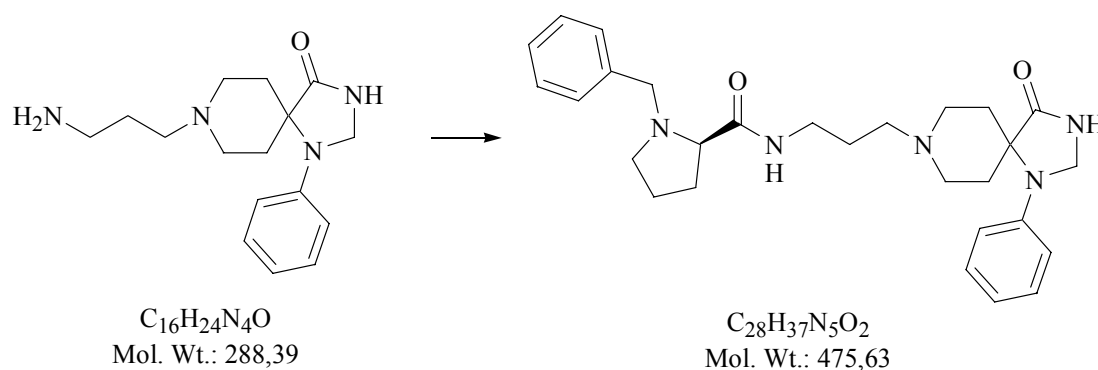
Preparazione di: 8-(3-amino-propil)-1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one (**137**)



A 3.456 g di (**136**) (9.99 mmoli), raffreddati a 0°C, viene aggiunto goccia a goccia il TFA (7.42 ml, 99.9 mmoli). La reazione si segue su TLC (eluente AcOEt/EtPt 5:1) e viene portata avanti fino a completezza (1h), quindi si raffredda a 0°C e si basifica con NaOH 2N. La fase acquosa viene ripetutamente estratta con AcOEt e le fasi organiche riunite sono anidificate ed evaporate sotto vuoto a dare (**137**) (2.32 g, 9.417 mmoli, resa 95%).

Il prodotto finale viene utilizzato tal quale per la reazione successiva.

Preparazione di: acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico [3-(4-osso-1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-8-il)-propil]-amide (**64**)



L'acido D-1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico (**126**) (356 mg, 1.736 mmoli) viene sciolta in 40 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (318 mg, 2.083 mmoli) e WSC (399 mg, 2.083 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**137**) (500 mg, 1.736 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**64**) (28 mg, 0.977 mmoli, resa 62%).

Caratteristiche del composto (**64**):

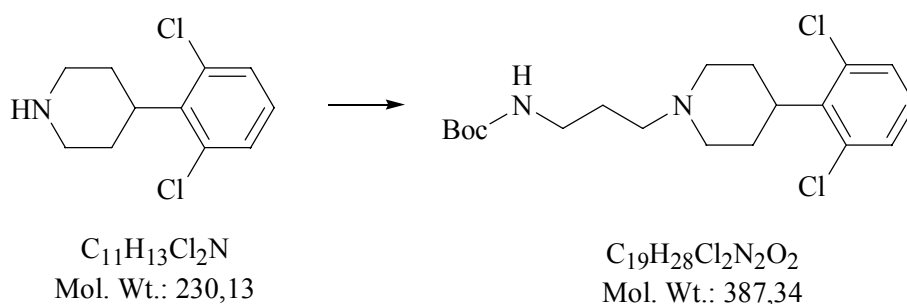
MS (ESI): [MH]⁺ = 476.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.947-7.832 (m, 2H, 2 NH-CO); 7.359-6.861 (m, 10H aromatici); 4.721 (s, 2H, NH-CH₂-N-Ar); 3.841 (d, 1H, N-HCH-Ar, J=13 Hz); 3.509 (d, 1H, N-HCH-Ar, J=13 Hz); 3.271-3.197 (m, 3H); 3.076-2.816 (m, 6H); 2.766-2.474 (m, 2H); 2.369-1.664 (m, 10H).

¹³C NMR (CDCl₃): 178.000; 175.066; 143.329; 138.802; 129.527 (2C); 128.912 (2C); 128.746 (2C); 127.548; 125.820; 119.613; 116.198 (2C); 115.307; 67.583; 60.170; 59.594; 56.045; 54.333; 49.861; 37.558; 30.980; 29.900; 29.348; 27.226; 24.379.

[α]_D²⁰ = + 24° (c = 0.1g/100 ml, Cloroformio).

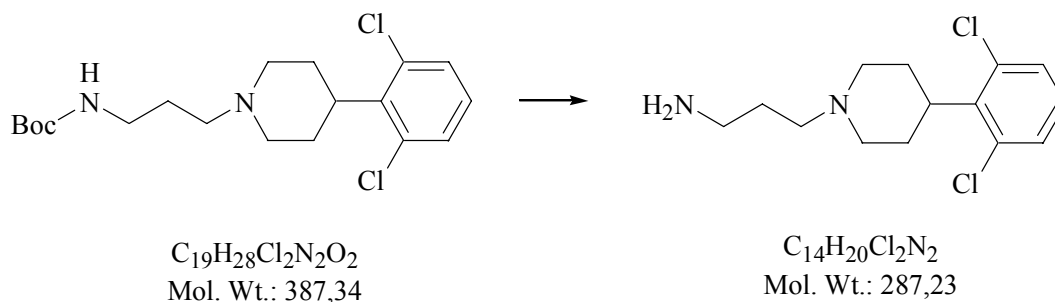
Preparazione di: acido {3-[4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidin-1-il]-propil}-carbamico *tert*-butil estere (**138**)



A 284 mg di 4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidina (**106**) (1.236 mmoli) sciolti in DMF si addiziona una soluzione di (3-Bromo-propilossi)-*tert*-butil-dimetil-silano (350 mg, 1.471 mmoli) in DMF e 341.77 mg di K_2CO_3 (2.473 mmoli). La reazione viene portata a 60°C sotto agitazione per circa 1h e si segue il suo andamento su TLC (eluente AcOEt/EtPt/ NH_3 5:1:0.3). Quindi si evapora il solvente e il residuo viene recuperato con Acetato d'etile, il quale viene lavato per 2 volte con NH_4Cl saturo e 1 volta con Brine. Si anidrifica la fase organica e si concentra in vacuo per ottenere il prodotto sottoforma di olio rosso-arancio. Tale grezzo di reazione viene poi purificato in colonna con eluente AcOEt/EtPt/ NH_3 5:1:0.3 (resa 94%).

Il prodotto (**138**) viene utilizzato tal quale nella reazione successiva.

Preparazione di: 3-[4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidin-1-il]-propilamina (**139**)



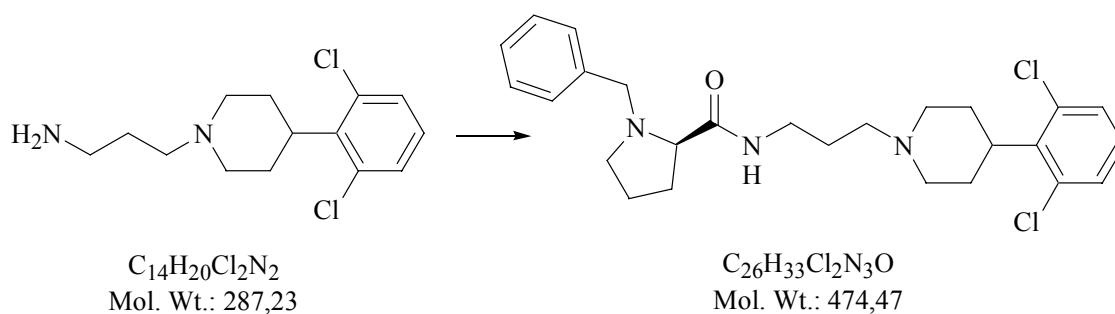
A 450 mg di (**138**) (1.163 mmoli) raffreddati a 0°C vengono aggiunti goccia a goccia 10 equivalenti di TFA (1 ml). La reazione si segue su TLC (eluente AcOEt/EtPt 5:1) e viene portata a completezza in un tempo pari circa ad 1h, quindi si raffredda a 0°C e si basifica con NaOH 2N. La fase acquosa viene ripetutamente estratta con AcOEt e le fasi organiche riunite anidrificate ed evaporate sotto vuoto a dare il composto (**139**) con una resa quantitativa.

Caratteristiche del composto (**139**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 288$.

1H NMR (CDCl₃): δ 7.259-7.004 (m, 3H aromatici); 3.536-3.462 (m, 1H); 3.364 (br, 2H); 3.1165 (dd, 2H, J=9.6, 4 Hz); 2.907 (t, 2H, J=6.8 Hz); 2.670-2.565 (m, 2H); 2.505 (t, 2H, J=6.8 Hz); 2.055 (dt, 2H, J=10, 2.4 Hz); 1.752 (t, 2H, J=6.4 Hz); 1.584 (d, 2H, J=12.4 Hz).

Preparazione di: acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico {3-[4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidin-1-il]-propil}-amide (**65**)



L'acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico (**126**) (58.63 mg, 0.286 mmoli) viene sciolto in 10 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (52.48 mg, 0.343 mmoli) e WSC (65.51 mg, 0.343 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**139**) (82 mg, 0.286 mmoli) sciolto in 10 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 1:7:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con CH₂Cl₂, si anidrifica e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 1:7:0.3 per ottenere (**65**) (48 mg, 0.101 mmoli, resa 35%).

Caratteristiche del composto (**65**):

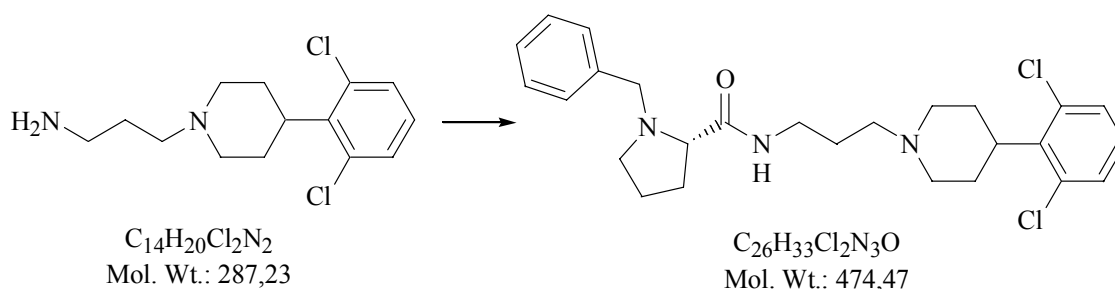
MS (ESI): [MH]⁺ = 475.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.567-7.523 (br, 1H, CO-NH); 7.353-7.240 (m, 7H aromatici); 7.036 (t, 1H aromatico, J=8 Hz); 3.860 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=13.2 Hz); 3.506 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=13.2 Hz); 3.285-3.172 (m, 2H); 3.070-3.037 (m, 3H); 2.698-2.643 (m, 2H); 2.473-2.343 (m, 3H); 2.278-2.195 (m, 2H); 2.064-2.013 (m, 2H); 1.928-1.903 (m, 2H); 1.757-1.722 (m, 4H); 1.567 (d, 2H, J=12.8 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.718; 138.678; 130.411; 128.761 (2C); 128.578 (2C); 127.780 (2C); 127.354 (2C); 67.525; 59.958 (2C); 56.414; 54.642; 54.102; 40.573; 37.432 (2C); 30.785 (2C); 27.645; 26.808; 24.146 (2C).

[α]_D²⁰ = + 27° (c = 0.1g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: acido (L) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico {3-[4-(2,6-dicloro-fenil)-piperidin-1-il]-propil}-amide (**66**)



L'acido (L) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico (58.63 mg, 0.286 mmoli) viene sciolto in 10 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (52.48 mg, 0.343 mmoli) e WSC (65.51 mg, 0.343 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**139**) (82 mg, 0.286 mmoli) sciolto in 10 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 1:7:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con CH₂Cl₂, si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 1:7:0.3 per ottenere (**66**) (48 mg, 0.101 mmoli, resa 35%).

Caratteristiche del composto (**66**):

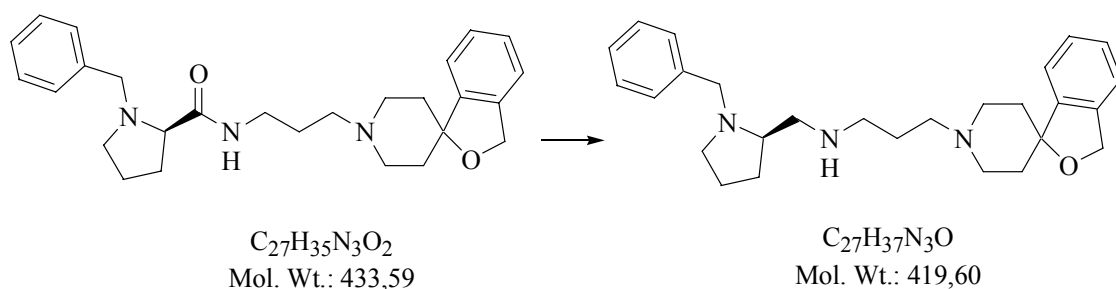
MS (ESI): [MH]⁺ = 475.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.532 (br, 1H, CO-NH); 7.337-7.259 (m, 7H aromatici); 7.036 (t, 1H aromatico, J=8 Hz); 3.862 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=13.2 Hz); 3.504 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=13.2 Hz); 3.303-3.171 (m, 3H); 3.074-3.030 (m, 2H); 2.673-2.642 (m, 2H); 2.423-2.324 (m, 3H); 2.248-2.191 (m, 2H); 2.071-2.014 (m, 3H); 1.889-1.857 (m, 2H); 1.783-1.677 (m, 3H); 1.579-1.548 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.695; 138.693; 130.404; 128.753 (2C); 128.571 (2C); 127.749 (2C); 127.354 (2C); 67.533; 59.958 (2C); 56.513; 54.688; 54.095; 40.642; 37.470 (2C); 30.785 (2C); 27.743; 26.868; 24.146 (2C).

[α]_D²⁰ = - 27° (c = 0.1g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: (1-Benzil-pirrolidin-2-il-metil)-{3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]]-propil}-amina (**67**)



Si sospendono in un pallone a due colli, in atmosfera di argon, 150 mg di (**39**) (0.346 mmoli) in 50 ml di THF anidro. Alla reazione, posta in agitazione a 0°C, si aggiungono goccia a goccia 1.038 mmoli di $(CH_3)_2S \cdot BH_3$ (99.79 μ l) e si scalda a refluxo per una notte. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt/ NH_3 9:1:0.3). Si raffredda la soluzione a 0°C, si aggiunge goccia a goccia HCl 10% fino a pH nettamente acido e si scalda nuovamente a refluxo per 4 ore. La soluzione viene portata a 0°C e basificata con NaOH 2N. Il THF viene eliminato a pressione ridotta e la fase acquosa rimanente viene ripetutamente estratta con acetato d'etile. Una volta riunite le fasi organiche si anidrificano e si concentrano in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene purificato in colonna con eluente AcOEt/EtPt/ NH_3 9:1:0.3 a dare (**67**) (20 mg, 0.239 mmoli, resa 69%).

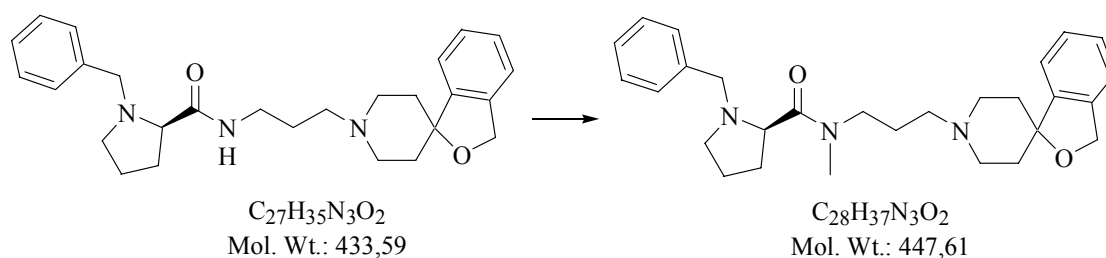
Caratteristiche del composto (**67**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 420$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.341-7.234 (m, 9H aromatici); 5.055 (s, 2H, Ar- CH_2 -O); 3.845-3.596 (m, 1H, Ar-HCH-N); 3.702-3.657 (m, 2H); 3.590 (m, 1H, Ar-HCH-N); 2.997-2.878 (m, 4H); 2.611-2.358 (m, 8H); 2.062-1.927 (m, 2H); 1.835-1.792 (m, 4H); 1.713-1.656 (m, 4H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 145.180; 139.286; 138.990; 128.928; 128.594; 127.810; 127.498; 127.430; 121.239; 120.692; 84.317; 70.833; 62.879; 61.882; 59.692; 57.890; 55.144; 51.699; 50.992; 49.859; 49.745; 36.284; 36.117; 29.964; 29.067; 24.146; 23.295.

Preparazione di: acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico {3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]]-propil}-metil-amide (**68**)



Una soluzione di (**39**) (200 mg, 0.460 mmoli) in 10 ml di DMF viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione, posta in agitazione, di sodio idruro al 60% (20.276 mg, 0,5069 mmoli) in DMF (5ml) a 0°C. La reazione viene lasciata nelle stesse condizioni sperimentali per mezz'ora, dopo si aggiunge una soluzione di metil ioduro (37.29 μ l, 0.599 mmoli) in DMF e si pone a temperatura ambiente per 24h. L'andamento della reazione viene monitorato su TLC, utilizzando il seguente bagno cromatografico AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. Una volta terminata la reazione, si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge brine (5 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, che viene anidrificato e concentrato in vacuo per ottenere un olio giallo come grezzo di reazione, successivamente purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**68**) (53 mg, 0.118 mmoli, resa 26%).

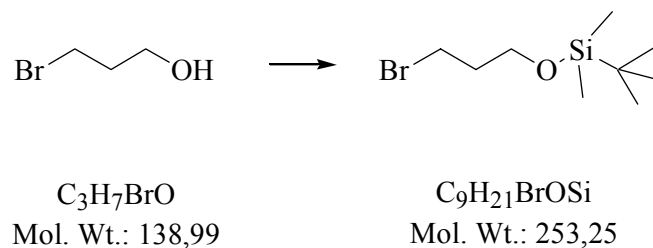
Caratteristiche del composto (**68**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 448.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.800-7.258 (m, 9H aromatici); 5.075 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.780-3.296 (m, 10H); 2.951-2.876 (m, 4H); 2.565-2.121 (m, 6H); 2.063-1.695 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃): 175.379; 171.475; 162.610; 141.828; 138.366; 138.255; 132.655; 129.390; 129.225; 128.704; 128.065; 127.545; 121.424; 81.225; 81.051; 71.477; 67.084; 66.697; 59.985; 58.045; 54.630; 45.773; 36.569; 36.254; 36.120; 31.451; 30.977; 24.187.

Preparazione di: (3-Bromo-propilossi)-*tert*-butil-dimetil-silano (**140**)

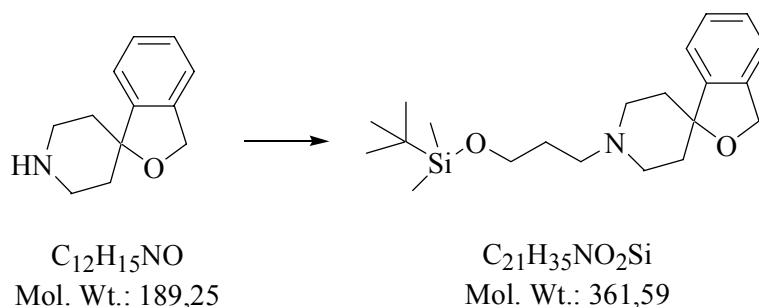


Una miscela di 3-bromo-propanolo (5 ml, 57.190 mmoli), imidazolo (11.68 g, 171.57 mmoli) e TBDMS-Cl (11.206 g, 74.347 mmoli) in THF viene lasciata a temperatura ambiente per 24h. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt 1:3). Il solvente viene evaporato a pressione ridotta e il residuo risultante si estrae più volte con CH_2Cl_2 . Quindi la fase organica viene lavata con Brine, anidrificata ed evaporata in vacuo per ottenere il prodotto (**140**) con resa quantitativa.

Caratteristiche del composto (**140**):

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 3.734 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-TBDMS}$, $J=2.8$ Hz); 3.515 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$, $J=3.2$ Hz); 2.073-1.994 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 0.895 (s, 9H, $3\text{CH}_3\text{-Cq}$); 0.066 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{-Si}$).

Preparazione di: 1-[3-(*tert*-butil-dimetil-silan-il-ossi)-propil]-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidina] (**141**)



A 1 g di (**128**) (5.71 mmoli) sciolti in DMF si addiziona una soluzione di (3-Bromopropilossi)-*tert*-butil-dimetil-silano (1.72 g, 6.8 mmoli) in DMF e 1.58 g di K_2CO_3 (11.43 mmoli). La reazione viene portata a 60°C sotto agitazione per circa 1h e il suo andamento viene monitorato su TLC (eluente AcOEt/EtPt/ NH_3 5:1:0.3). Al termine della reazione si evapora il solvente e il residuo viene recuperato con acetato d'etile, il quale viene lavato per 2 volte con NH_4Cl saturo e 1 volta con Brine. Si anidrifica la fase organica e si concentra in vacuo per ottenere il prodotto sottoforma di olio rosso-arancio. Tale grezzo di reazione viene poi purificato in colonna con eluente AcOEt/EtPt/ NH_3 5:1:0.3 a dare l'intermedio di reazione (**141**) (1.93 g, 5.35 mmoli, resa 94%).

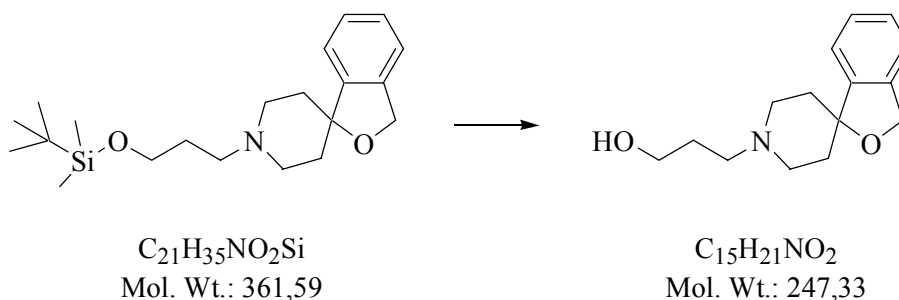
Caratteristiche del composto (**141**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 361$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.284-7.133 (m, 4H aromatici); 5.066 (s, 2H, Ar- CH_2 -O); 3.678 (t, 2H, O- CH_2 - CH_2 -, $J=6$ Hz); 2.915-2.835 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2 -); 2.539-2.360 (m, 4H); 1.998 (dt, 2H, CH_2 - CH_2 - CH_2 , $J=6, 4$ Hz); 1.810-1.733 (m, 4H); 0.895 (s, 9H, 3 CH_3 -Cq); 0.054 (s, 6H, 2 CH_3 -Si).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 145.771; 138.973; 127.600; 127.403; 121.085; 120.888; 84.821; 70.790 (2C); 61.681; 55.734; 50.308 (2C); 36.695 (2C); 30.323; 26.064 (3C); -5.292 (2C).

Preparazione di: 3-{spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]}-propan-1-olo (**142**)



1.930 g di (**141**) (5.346 mmoli) vengono sciolti in 35 ml di THF e a 0°C si aggiunge TBAF (5.06 g, 16.038 mmoli). La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 ore, dopodiché si evapora a pressione ridotta il solvente e si riprende con AcOEt, il quale viene lavato per 2 volte con H₂O. La fase organica si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere il grezzo di reazione, che viene purificato in colonna con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 a dare (**142**) (1.239 g, 5.015 mmoli, resa 94%).

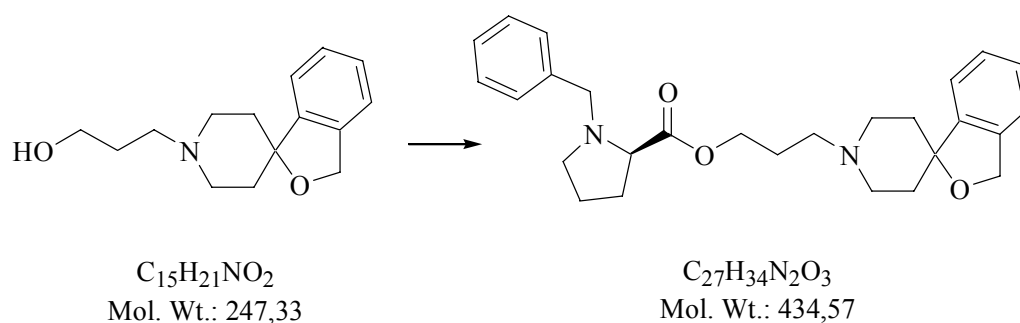
Caratteristiche del composto (**142**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 248.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.295-7.138 (m, 4H aromatici); 5.062 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.848 (t, 1H, OH-CH₂-CH₂-, J=5.2 Hz); 3.613-3.601 (m, 1H); 3.080-3.011 (m, 2H); 2.723 (t, 1H, N-CH₂-CH₂-, J=5.6 Hz); 2.516-2.440 (m, 3H); 2.057-1.952 (m, 3H); 1.827-1.728 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃): 145.203; 138.875; 127.780; 127.529; 121.141; 120.897; 84.462; 70.887; 64.643; 62.856; 59.160; 50.429; 36.550; 32.839; 27.166.

Preparazione di: acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico {3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]-propil} estere (**69**)



L'acido 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico (**126**) (264 mg, 1.288 mmoli) viene sciolto in 20 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (236 mg, 1.546 mmoli) e DCC (319 mg, 1.546 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si aggiunge (**142**) (350 mg, 1.417 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 4:1:0.3. Dopo aver evaporato la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml), si estrae ripetutamente con AcOEt, si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 4:1:0.3 per ottenere (**69**) (170 mg, 0.392 mmoli, resa 30%).

Caratteristiche del composto (**69**):

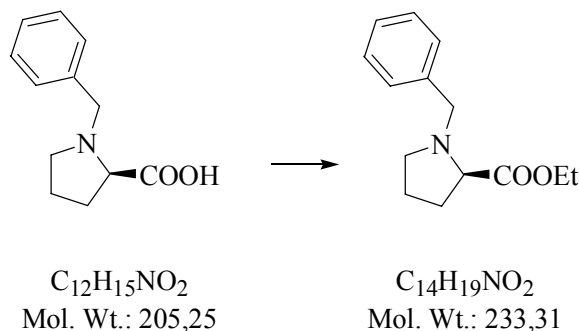
MS (ESI): [MH]⁺ = 435.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.312-7.230 (m, 9H aromatici); 5.049 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 4.124 (dt, 2H, CH₂-CH₂-O, J=6.6, 2.4 Hz); 3.915 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=12.6 Hz); 3.577 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=12.8 Hz); 3.277-3.204 (m, 2H); 3.032-2.957 (m, 2H); 2.860-2.813 (m, 2H); 2.518-2.331 (m, 5H); 1.908-1.720 (m, 8H).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.219; 145.527; 138.855; 138.413; 129.177 (2C); 128.199 (2C); 127.616; 127.395; 127.095; 121.062; 120.833; 84.624; 70.767; 65.278; 63.101; 58.653; 55.293; 53.203; 50.166 (2C); 36.514 (2C); 29.384; 26.261; 23.035.

[α]_D²⁰ = +23° (c = 0.1 g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico acido etil estere (**143**)



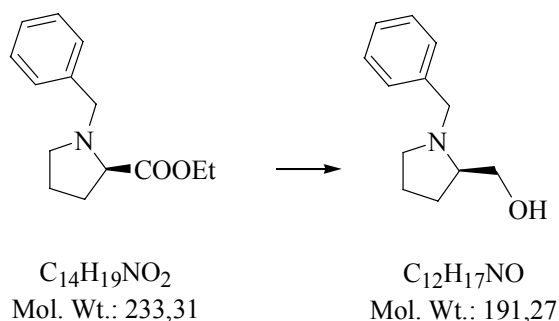
L’N-benzil-D-prolina (**126**) (700 mg, 3.415 mmoli) viene sciolta in 10 ml di etanolo assoluto, a 0 °C e sotto agitazione viene poi gocciolato il cloruro di tienile (1.62 ml, 22.195 mmoli). La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 4:1:0.3. Dopo aver evaporato l’etanolo sotto vuoto, si riprende con AcOEt e si esegue un lavaggio basico con NaHCO₃ 5%. La fase organica viene anidrificata e concentrata in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 4:1:0.3 per ottenere (**143**) (676 mg, 2.901 mmoli, resa 85%).

Caratteristiche del composto (**143**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 234.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.276-7.247 (m, 5H aromatici); 4.090-3.977 (m, 4H); 3.925-3.824 (d, 1H, N-HCH-Ar); 3.590-3.454 (m, 1H, N-HCH-Ar); 3.235-3.196 (m, 1H); 3.065-2.962 (m, 1H); 2.418-2.331 (m, 1H).

Preparazione di: (1-benzil-pirrolidin-2-il) metanolo (**144**)



Una soluzione di (**143**) (541 mg, 2.322 mmoli) in THF anidro viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di LiAlH₄ (176.46 mg, 4.644 mmoli) in THF anidro (20 ml) raffreddata a 0°C. Dopo 60 minuti alla stessa temperatura, si aggiungono lentamente 10 ml di acqua e di Et₂O, i sali di alluminio che si formano vengono filtrati su strato di celite. Il solvente viene eliminato a pressione ridotta, il residuo ripreso con H₂O e ripetutamente estratto con Et₂O che viene successivamente anidrificato ed evaporato sotto vuoto spinto ad ottenere il prodotto (**144**).

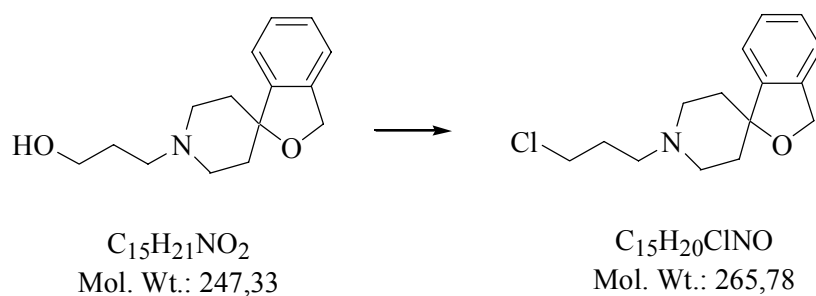
Caratteristiche di (**144**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 191.

¹H NMR (CD₃OD): δ 7.329-7.262 (m, 5H aromatici); 3.982 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=12.8 Hz); 3.621 (dd, 1H, J=10.6, 3.4 Hz); 3.376 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=13 Hz); 3.004-2.943 (m, 1H); 2.826-2.734 (m, 2H); 2.336-2.286 (m, 1H); 1.938-1.854 (m, 2H); 1.766-1.702 (m, 2H).

[α]_D²⁰ = + 49° (c = 0.15 g/100 ml, Etanolo).

Preparazione di: 1-(3-cloro-propil)-4-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidina] (**145**)



In un pallone a 2 colli si sciolgono, in 10 ml di CH_2Cl_2 anidro, 200 mg di (**142**) (0.810 mmoli) e a 0 °C si gocciolano 170 μ l di tosil-cloruro e 125 μ l di TEA.

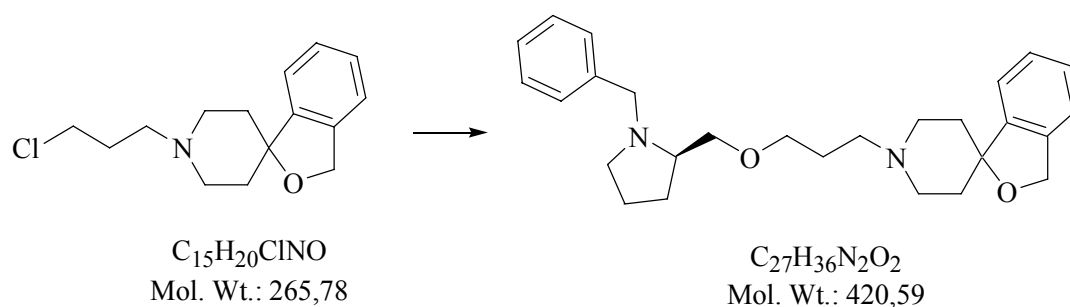
La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/ NH_3 9:1:0.3. A reazione terminata viene evaporato il cloruro di metilene a pressione ridotta; il residuo risultante viene ripreso con AcOEt e sottoposto ad un lavaggio con $NaHCO_3$ 5%. La fase organica viene anidrificata e concentrata in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, successivamente purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/ NH_3 9:1:0.3 per ottenere (**145**) (85 mg, 0.320 mmoli, resa 40%).

Caratteristiche del composto (**145**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 266$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.277-7.1452 (m, 5H aromatici); 5.053 (s, 2H, Ar- CH_2 -O); 3.610 (t, 2H, CH_2 - CH_2 -Cl, $J=6.6$ Hz); 2.859-2.804 (m, 2H); 2.555 (t, 2H, N- CH_2 - CH_2 - CH_2 -Cl, $J=7.2$ Hz); 2.408 (dt, 2H); 2.042-1.959 (m, 4H); 1.797-1.785 (m, 2H).

Preparazione di: 1-[3-(1-benzil-pirrolidin-2-il metossi)-propil]-4-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidina] (**70**)



Una soluzione di (**144**) (60 mg, 0.313 mmoli) in 10 ml di THF viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione, posta in agitazione, di sodio idruro al 60% (14 mg, 0.344 mmoli) in THF (5ml) a 0°C. La reazione viene lasciata nelle stesse condizioni sperimentali per mezz'ora, si aggiunge poi TBAI e si addiziona goccia a goccia una soluzione di (**145**) (85 mg, 0.313 mmoli) in THF. La miscela di reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24h e successivamente viene posta a riflusso per 12h. L'andamento della reazione viene monitorato su TLC, utilizzando il seguente bagno cromatografico AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. A reazione terminata la reazione, si evapora il solvente in vacuo, si riprende con Et₂O e i sali che si formano vengono filtrati su gooch. L'etere etilico viene evaporato sotto vuoto spinto ad ottenere un grezzo di reazione che viene successivamente purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**70**).

Caratteristiche del composto (**70**):

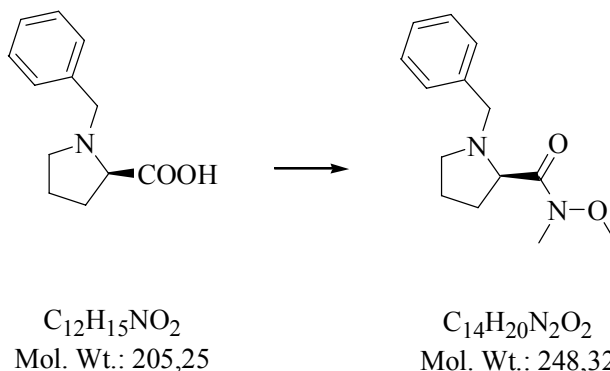
MS (ESI): [MH]⁺ = 421.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.327-7.158 (m, 9H aromatici); 5.069 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 4.134 (d, 1H, C*HCH-O, J=12.8 Hz); 3.985 (d, 1H, C*-HNH-O, J=12.8 Hz); 3.456-3.213 (m, 1H); 3.538-3.324 (m, 6H); 2.960-2.853 (m, 4H); 2.555-2.408 (m, 4H); 2.046-11.694 (m, 8H).

¹³C NMR (CDCl₃): 145.705; 138.967; 138.413; 129.177 (2C); 128.199 (2C); 127.616; 127.395; 127.095; 121.103; 120.897; 84.751; 70.986; 70.803; 69.845; 62.939; 59.799; 55.943; 54.688; 50.270 (2C); 46.657; 36.634 (2C); 27.287; 22.884.

[α]_D²⁰ = +21° (c = 0.33 g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico acido metossi-metil-amide (**146**)



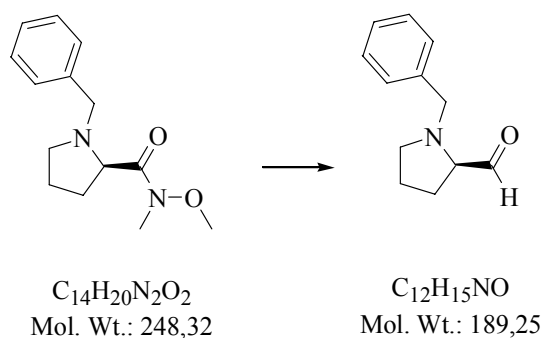
L'acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico (**126**) (800 mg, 3.902 mmoli) viene sciolta in 30 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (657 mg, 4.292 mmoli) e WSC (823 mg, 4.292 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona *O,N*-dimetil-idrossilammina (533 mg, 5.463 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h dopodiché si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere il prodotto finale (**146**) con una resa quantitativa.

Caratteristiche del composto (**146**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 248.

¹H NMR (CD₃OD): δ 7.379-7.241 (m, 5H aromatici); 3.989 (d, 1H, N-HCH-Ar, J=12.8 Hz); 3.635 (d, 1H, N-HCH-Ar J=12.8 Hz); 3.527 (s, 3H, N-O-CH₃); 3.154 (s, 3H, N-CH₃); 2.657-2.508 (m, 2H); 2.213-2.055 (m, 2H); 1.904-1.821 (m, 3H).

Preparazione di: 1-benzil-pirrolidin-2-carbaldeide (**147**)



Una soluzione di (**146**) (1.450 g, 5.847 mmoli) in THF anidro viene aggiunta goccia a goccia ad una sospensione di $LiAlH_4$ (222 mg, 5.847 mmoli) in THF anidro (20 ml) raffreddata a 0°C. Dopo 60 minuti alla stessa temperatura, si aggiungono lentamente 10 ml di acqua e di Et_2O , i sali di alluminio che si formano vengono filtrati su strato di celite. Il solvente viene eliminato a pressione ridotta, il residuo ripreso con H_2O e ripetutamente estratto con Et_2O che viene successivamente anidrificato ed evaporato sotto vuoto spinto ad ottenere il prodotto privo di umidità (**147**).

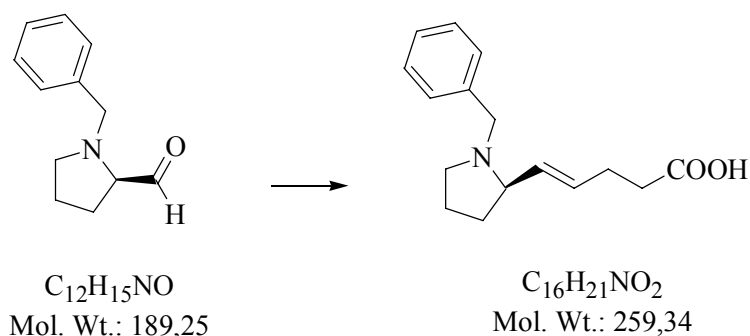
Caratteristiche di (**147**):

MS (ESI): $[MH]^+ = 190$.

1H NMR ($CDCl_3$): 9.309 (d, 1H, CO-H, J=2), 7.343-7.266 (m, 5H aromatici), 3.143-3.100 (m, 2H), 3.008-3.000 (m, 1H), 2.427-2.383 (m, 1H), 2.015-1.810 (m, 1H), 2.015-1.810 (m, 4H).

$[\alpha]_D^{20} = +79^\circ$ (c = 0.2 g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: acido 5-(1-benzil-pirrolidin-2-il)-pent-4-enoico (**148**)



In un pallone a due colli, in atmosfera di argon, si eseguono 5 lavaggi di NaH 60% (12.572 g, 64.307 mmoli) con aliquote di 20 ml di pentano anidro ciascuno. Dopo aver portato a secchezza il reagente viene sciolto in 50 ml di DMSO anidro e lasciato a 77°C per 40 minuti, osservando la comparsa di una colorazione verdastra. Alla soluzione di NaH, raffreddata a 0°C, si aggiunge goccia a goccia il (3-carbossipropil)-trifenil-fosfonio bromuro (12.55 g, 29.23 mmoli) sciolto in DMSO anidro e 1.105 g di 1-benzil-pirrolidin-2-carbaldeide (**147**) (5.847 mmoli) sciolti nel medesimo eluente. La miscela di reazione, che assume una colorazione rosso intenso, viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9:1:0.3. Al termine della reazione si evapora DMSO alla pompa meccanica, il residuo viene ripreso con acido citrico 10% e ripetutamente estratto con AcOEt. Le fasi organiche riunite si anidrificano e si concentrano in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9:1:0.3 per ottenere (**148**) (350 mg, 1.351 mmoli, resa 23%).

Caratteristiche del composto (**148**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 260.

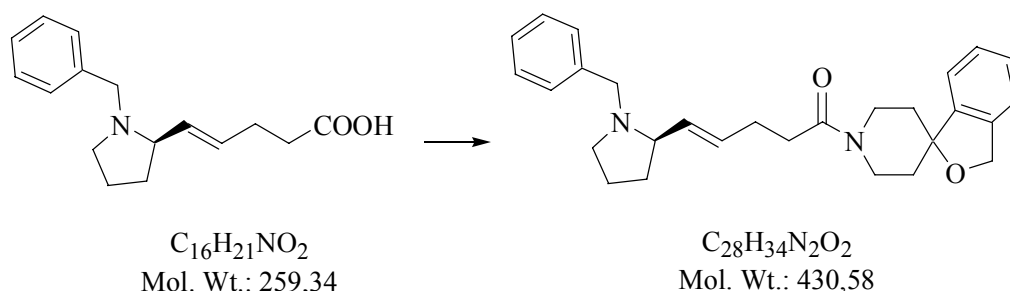
¹H NMR (CD₃OD): δ 7.768-7.323 (m, 5H aromatici); 5.955-5.865 (m, 1H, C*-CH=CH); 5.603-5.502 (m, 1H, CH=CH-CH₂); 4.457-4.393 (m, 2H); 4.164-4.100 (m, 1H); 3.348-3.293 (m, 6H); 2.401-2.390 (m, 4H).

¹³C NMR (CD₃OD): 177.930; 139.631; 132.541; 131.918; 131.027; 130.474; 124.638; 66.220; 57.710; 53.822; 50.470; 40.627; 35.485; 31.320; 25.019; 22.353.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7.14^{\circ}$ (c = 0.21 g/100 ml, Etanolo).

IR: 3398.72; 2993.34; 1658.97; 1560.22; 1435.77; 1405.21; 1315.37; 1211.62;
1159.59; 1124.14; 1013.97; 952.12; 752.60; 701.61.

Preparazione di: 5-(1-benzil-pirrolidin-2-il)-1-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]]-pent-4-en-1-one (**72**)



Il composto (**148**) (590 mg, 2.278 mmoli) viene sciolto in 50 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOAt (372 mg, 2.733 mmoli) e WSC (524 mg, 2.733 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**128**) (430 mg, 2.278 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 1:1:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt. La fase organica viene anidrificata e concentrata in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 1:1:0.3 per ottenere (**72**) (54 mg, 0.126 mmoli).

Caratteristiche del composto (**72**):

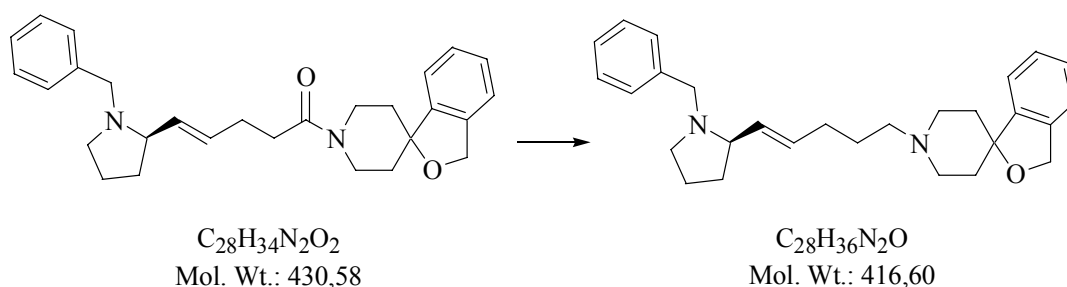
MS (ESI): [MH]⁺ = 431.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.296-7.224 (m, 9H aromatici); 5.679-5.584 (m, 1H, C*-CH=CH); 5.513-5.445 (m, 1H, CH=CH-CH₂); 5.087 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 4.672-4.615 (m, 1H); 4.045-3.987 (m, 1H); 3.865-3.800 (m, 1H); 3.676 (t, 1H, N-HCH-Ar, J=6.4 Hz); 3.577 (t, 1H, N-HCH-Ar, J=6.4 Hz); 3.224-2.899 (m, 4H); 2.556-2.445 (m, 4H); 1.953-1.558 (m, 8H).

¹³C NMR (CDCl₃): 170.733; 144.701; 139.438; 138.860; 133.476; 130.753; 129.111; 128.198; 127.970; 127.582; 126.852; 121.308; 120.692; 84.766; 71.031; 61.943; 58.529; 53.289; 44.992; 42.619; 38.733; 37.090; 36.193; 33.394; 31.409; 29.979; 23.842; 22.101.

[α]_D²⁰ = + 18° (c = 0.1 g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: 1-[5-(1-benzil-pirrolidin-2-il)-pent-4-enil]-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidina] (**71**)



Si sospendono in un pallone a due colli, in atmosfera di argon e sotto agitazione, 140 mg di (**72**) (0.325 mmoli) in 10 ml di THF anidro e si raffredda a 0°C. Vengono successivamente addizionate goccia a goccia 0.977 mmoli di $(CH_3)_2S \cdot BH_3$ (94 μ l) e si scalda a refluxo per una notte. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt/ NH_3 2:1:0.3). Si raffredda la soluzione a 0°C, si aggiunge HCl 10% fino a pH nettamente acido e si scalda nuovamente a refluxo per 4 ore. Si porta ancora la miscela a 0°C e si basifica con NaOH 2N. Il THF viene eliminato a pressione ridotta e la fase acquosa rimanente viene ripetutamente estratta con acetato d'etile. Una volta riunite le fasi organiche si anidrificano e si concentrano in vacuo per ottenere il grezzo di reazione, che viene purificato in colonna con eluente AcOEt/EtPt/ NH_3 2:1:0.3 a dare (**71**) (35 mg, 0.084 mmoli, resa 26%).

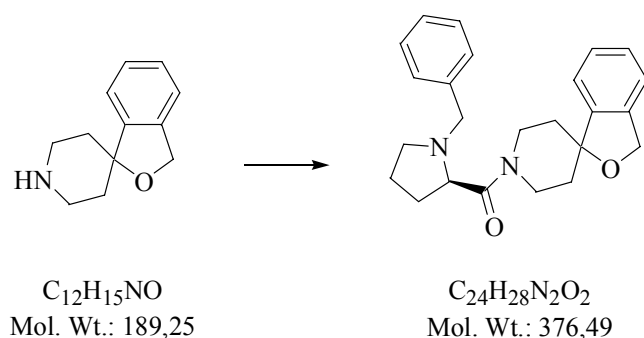
Caratteristiche del composto (**71**):

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.326-7.216 (m, 9H aromatici); 5.423-5.378 (m, 2H); 5.066 (s, 2H, Ar- CH_2 -O); 4.099 (t, 1H, Ar-HCH-N, $J=6.4$ Hz); 3.778 (s, 1H); 3.674 (t, 1H, Ar-HCH-N, $J=6.4$ Hz); 2.916-2.862 (m, 2H); 2.682-2.342 (m, 4H); 2.098-1.964 (m, 4H); 1.804-1.508 (m, 8H); 1.248-1.150 (m, 2H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 145.701; 141.238; 138.933; 130.534; 130.068; 128.444; 128.191; 127.639; 127.434; 126.953; 121.093; 120.920; 84.774; 70.830; 64.346; 62.383; 59.007; 54.086; 50.277; 49.803; 36.601; 32.519; 30.405; 29.873; 27.880; 27.713; 26.489; 25.143.

$[\alpha]_D^{20} = +1.67^\circ$ ($c = 0.31$ g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]-ammide dell'acido (1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico) (**73**)



L'acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico (**126**) (325 mg, 1.587 mmoli) viene sciolta in 20 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOAt (259 mg, 1.905 mmoli) e WSC (365 mg, 1.905 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**128**) (300 mg, 1.587 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**73**) (368 mg, 0.977 mmoli, resa 62%).

Caratteristiche del composto (**73**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 377.

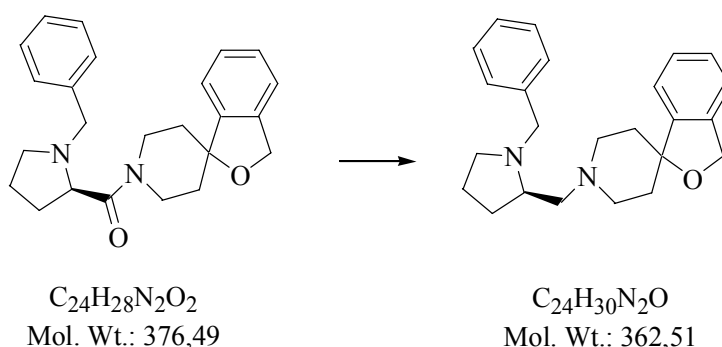
¹H NMR (CDCl₃): δ 7.367-7.223 (m, 9H aromatici); 5.084 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 4.678-4.445 (m, 1H); 4.222-3.967 (m, 2H); 3.684 (t, 1H, J=6 Hz); 3.597-3.565 (m, 1H); 3.464-3.421 (m, 2H); 3.199-3.184 (m, 1H); 1.899-1.693 (m, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃): 171.516; 144.807; 138.906; 129.369; 129.248; 128.206; 127.932; 127.536; 127.034; 121.308; 120.707; 84.888; 70.970; 65.198; 64.559; 62.042; 58.285; 52.908; 42.000; 39.101; 37.121; 36.321; 28.884; 22.785.

[α]_D²⁰ = + 48° (c = 0.1g/100 ml, Cloroformio).

IR: 3389.92; 3027.24; 2943.65; 2867.09; 1632.26; 1494.62; 1435.89; 1369.72; 1341.66; 1267.26; 1221.99; 1177.90; 1104.99; 1042.22; 1019.39; 934.77; 894.57; 755.30; 699.29.

Preparazione di: 1-(1-benzil-pirrolidin-2-il-metil)-{spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidina (74)



Si sospendono in un pallone a due colli, in atmosfera di argon e sotto agitazione, 365 mg di (73) (0.970 mmoli) in 40 ml di THF anidro e si raffredda a 0°C. Vengono successivamente addizionate goccia a goccia 2.912 mmoli di (CH₃)₂S * BH₃ (280 µl) e si scalda a refluxo per una notte. Si raffredda la soluzione a 0°C, si aggiunge HCl 10% fino a pH nettamente acido e si scalda nuovamente a refluxo per 4 ore. Si porta nuovamente la miscela di reazione a 0°C e si basifica con NaOH 2N. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 1:3:0.3). Si elimina tetraidrofurano a pressione ridotta e la fase acquosa viene ripetutamente estratta con acetato d'etile. Una volta riunite le fasi organiche si anidrificano e si concentrano in vacuo per ottenere il grezzo di reazione, che viene purificato in colonna con eluente AcOEt/EtPt/NH₃ 1:3:0.3 a dare (74) (196 mg, 0.541 mmoli, 56%).

Caratteristiche del composto (74):

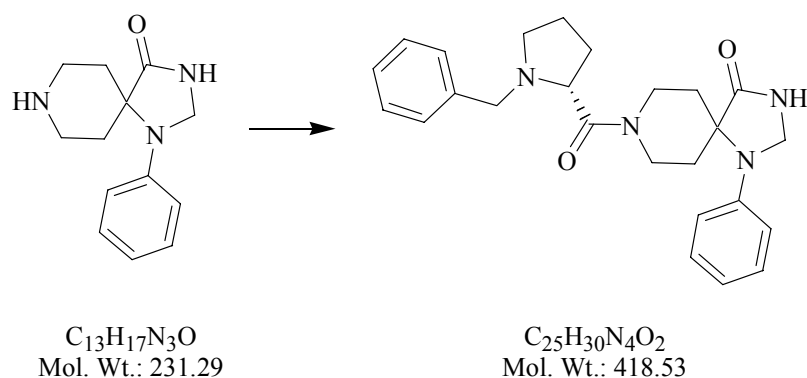
MS (ESI): [MH]⁺ = 363.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.333-7.123 (m, 9H aromatici); 5.064 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 4.237 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=13 Hz); 3.278 (d, 1H, Ar-HCH-N, J=12.8 Hz); 2.918-2.849 (m, 2H); 2.728-2.639 (m, 2H); 2.508-2.362 (m, 4H); 2.222-1.897 (m, 3H); 1.781-1.642 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃): 145.874; 139.943; 139.012; 129.083 (2C); 128.231 (2C); 127.560; 127.348; 126.811; 121.093; 120.904; 84.829; 77.290; 70.759; 64.583; 61.508; 59.662; 54.528; 51.105; 50.892; 36.727; 30.922; 22.743.

[α]_D²⁰ = + 48° (c = 0.1g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: 8-(1-Benzil-pirrolidin-2-carbonil)-1-fenil-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one (**75**)



L'acido (D) 1-benzil-pirrolidin-2-carbossilico (**126**) (325 mg, 1.587 mmoli) viene sciolta in 20 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOAt (259 mg, 1.905 mmoli) e WSC (365 mg, 1.905 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**135**) (300 mg, 1.587 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**75**) (368 mg, 0.977 mmoli, resa 62%).

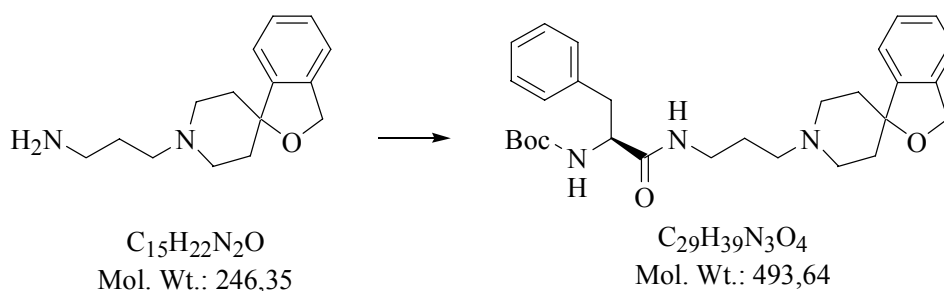
Caratteristiche del composto (**75**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 419.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.947-7.832 (m, 1H, NH-CO); 7.359-6.861 (m, 10H aromatici); 4.721 (s, 2H, NH-CH₂-N-Ar); 3.841 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 3.271-3.197 (m, 3H); 2.766-2.474 (m, 2H); 2.369-1.664 (m, 10H).

¹³C NMR (CDCl₃): 178.000; 175.066; 143.329; 138.802; 129.527 (2C); 128.912 (2C); 128.746 (2C); 127.548; 119.613; 116.198 (2C); 67.583; 59.594; 56.045; 54.333; 49.861; 37.558 (2C); 29.900; 29.348; 27.226; 24.379.

Preparazione di: acido (L) 1-{3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]-propilcarbamoyl]-2-fenil-etil)-carbamico-*tert*-butil estere (**150**)



L'acido (L) 2-*tert*-butossicarbonilamino-3-fenil-propionico (539 mg, 2.032 mmoli) viene sciolta in 70 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (373 mg, 2.439 mmoli) eWSC (467 mg, 2.439 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**134**) (500 mg, 2.032 mmoli) sciolto in 70 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/NH₃ 10:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/NH₃ 10:0.3 per ottenere (**150**) (160 mg, 0.324 mmoli, resa 16%).

Caratteristiche del composto (**150**):

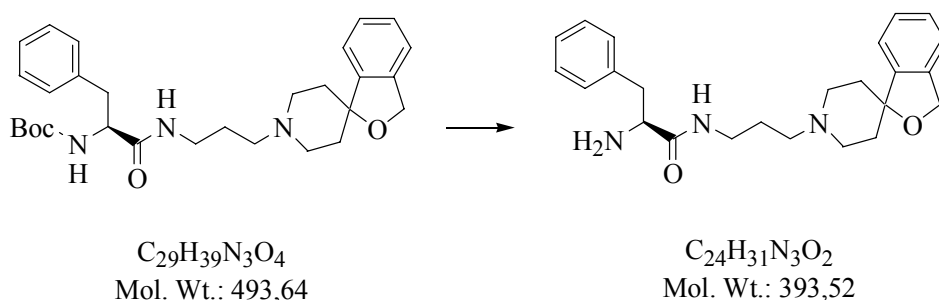
MS (ESI): [MH]⁺ = 494.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.421 (br, 1H, NH-CO); 7.285-7.157 (m, 9H aromatici); 5.830 (br, 1H, NH-CO); 5.032 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.430 (s, 1H); 3.557-3.165 (m, 3H); 3.082-2.954 (m, 2H); 2.908-2.799 (m, 3H); 2.502-2.445 (m, 4H); 1.761-1.685 (m, 4H); 1.365 (s, 9H, 3CH₃-Cq).

¹³C NMR (CDCl₃): 173.028; 171.380; 144.707; 138.626; 136.946; 129.351 (2C); 128.633 (2C); 128.546; 127.836; 127.560; 126.827; 121.054 (2C); 83.922; 70.901; 60.419; 56.318; 50.498; 49.882; 39.060; 38.383; 35.828; 35.725; 28.291 (3C); 24.671.

[α]_D²⁰ = + 8° (c = 0.1 g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: (L) 2-amino-*N*-{3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]]-propil}-3-fenil-propionamide (**76**)



Il composto (**150**) (160 mg, 0.324 mmoli) viene sciolto in 10 equivalenti di TFA. Si lascia reagire 60 minuti a temperatura ambiente, agitando di tanto in tanto. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/NH₃ 10:0.3). Quindi si raffredda a 0°C e basifica con NaOH 2 N. La fase acquosa viene estratta più volte con AcOEt, si anidrifca e si evapora il solvente a pressione ridotta per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**76**) con una resa quantitativa.

Caratteristiche del composto (**76**):

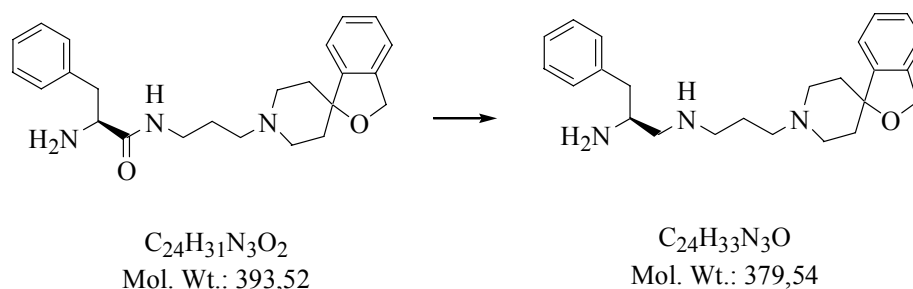
MS (ESI): [MH]⁺ = 394.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.279-7.197 (m, 9H aromatici); 5.065 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.612-3.200 (m, 6H); 2.982-2.654 (m, 4H); 2.542-2.385 (m, 5H); 1.800-1.728 (m, 5H).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.361; 145.724; 140.724; 138.886; 138.082; 129.406; 128.736; 127.773; 127.482; 126.835; 121.180; 120.809; 84.435; 70.893; 60.482; 57.115; 56.925; 50.371; 41.420; 38.486; 36.340; 25.898; 21.150; 14.273.

[α]_D²⁰ = - 15° (c = 0.2 g/100 ml, Cloroformio).

Preparazione di: (L) *N'*-{3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]]-propil}-3-fenil-propan-1,2-diamina (**77**)



Si sospendono in un pallone a due colli, in atmosfera di argon e sotto agitazione, 558 mg di (**76**) (1.410 mmoli) in 100 ml di THF anidro e si raffredda a 0°C. Vengono successivamente addizionate goccia a goccia 4.260 mmoli di (CH₃)₂S * BH₃ (409 µl) e si scalda a refluxo per una notte. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 7:3:0.3). Si raffredda la soluzione a 0°C, si aggiunge HCl 10% fino a pH nettamente acido e si scalda nuovamente a refluxo per 4 ore. A 0°C si basifica con NaOH 2N, successivamente si elimina il THF a pressione ridotta e la fase acquosa viene ripetutamente estratta con acetato d'etile. Una volta riunite le fasi organiche si anidrificano e si concentrano in vacuo per ottenere il grezzo di reazione, che viene purificato in colonna con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 7:3:0.3 a dare (**77**) (30 mg, 0.079 mmoli, 6%).

Caratteristiche del composto (**77**):

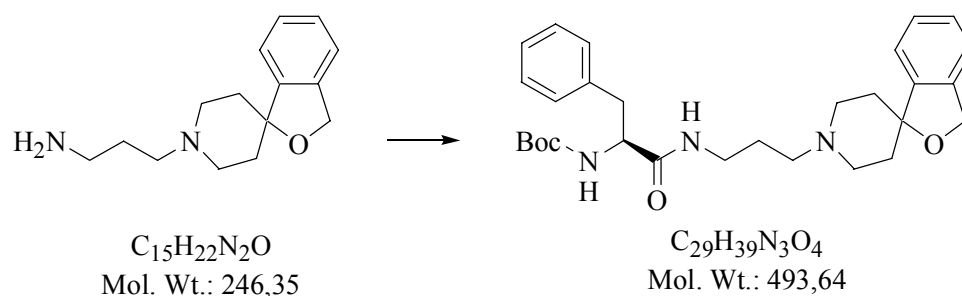
MS (ESI): [MH]⁺ = 380.

¹H NMR (CD₃OD): δ 7.297-7.230 (m, 9H aromatici), 5.031 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 3.327-3.130 (m, 2H), 2.988-2.836 (m, 2H), 2.814-2.742 (m, 4H), 2.596-2.456 (m, 6H), 2.099-2.006 (m, 2H), 1.937-1.898 (m, 2H), 1.807-1.694 (m, 4H).

¹³C NMR (CD₃OD): 146.619; 140.294; 139.718; 130.522; 130.332; 129.907; 129.741; 129.071; 128.692; 127.880; 127.659; 122.375; 121.925; 85.779; 71.804; 58.207; 55.218; 53.175; 51.416; 50.470; 47.922; 42.922; 37.283; 26.604.

[α]_D²⁰ = + 3.95° (c = 0.38 g/100 ml, Etanolo).

Preparazione di: acido (D) 1-{3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]-propilcarbamoil]-2-fenil-etil)-carbamico-*tert*-butil estere (**167**)



L'acido (D) 2-*tert*-butossicarbonilamino-3-fenil-propionico (539 mg, 2.032 mmoli) viene sciolta in 70 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (373 mg, 2.439 mmoli) eWSC (467 mg, 2.439 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**134**) (500 mg, 2.032 mmoli) sciolto in 70 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/NH₃ 10:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/NH₃ 10:0.3 per ottenere (**167**) (160 mg, 0.324 mmoli, resa 16%).

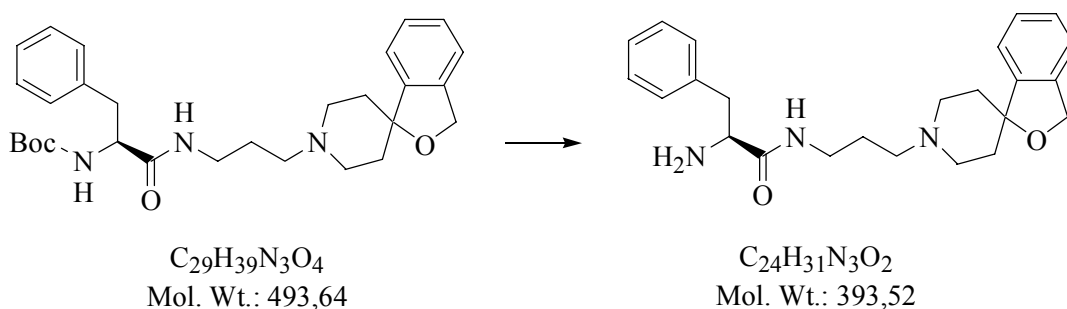
Caratteristiche del composto (**167**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 494.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.421 (br, 1H, NH-CO); 7.285-7.157 (m, 9H aromatici); 5.830 (br, 1H, NH-CO); 5.032 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.430 (s, 1H); 3.557-3.165 (m, 3H); 3.082-2.954 (m, 2H); 2.908-2.799 (m, 3H); 2.502-2.445 (m, 4H); 1.761-1.685 (m, 4H); 1.365 (s, 9H, 3CH₃-Cq).

¹³C NMR (CDCl₃): 173.028; 171.380; 144.707; 138.626; 136.946; 129.351 (2C); 128.633 (2C); 128.546; 127.836; 127.560; 126.827; 121.054 (2C); 83.922; 70.901; 60.419; 56.318; 50.498; 49.882; 39.060; 38.383; 35.828; 35.725; 28.291 (3C); 24.671.

Preparazione di: (D) 2-amino-*N*-{3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]]-propil}-3-fenil-propionamide (**78**)



Il composto (**167**) (160 mg, 0.324 mmoli) viene sciolto in 10 equivalenti di TFA. Si lascia reagire 60 minuti a temperatura ambiente, agitando di tanto in tanto. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/NH₃ 10:0.3). Quindi si raffredda a 0°C e basifica con NaOH 2 N. La fase acquosa viene estratta più volte con AcOEt, si anidrifca e si evapora il solvente a pressione ridotta per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**78**) con una resa quantitativa.

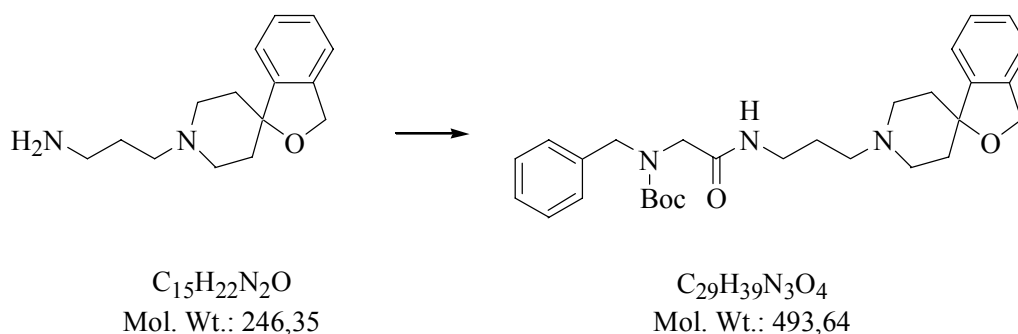
Caratteristiche del composto (**78**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 394.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.279-7.197 (m, 9H aromatici); 5.065 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.612-3.200 (m, 6H); 2.982-2.654 (m, 4H); 2.542-2.385 (m, 5H); 1.800-1.728 (m, 5H).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.361; 145.724; 140.724; 138.886; 138.082; 129.406; 128.736; 127.773; 127.482; 126.835; 121.180; 120.809; 84.435; 70.893; 60.482; 57.115; 56.925; 50.371; 41.420; 38.486; 36.340; 25.898; 21.150; 14.273.

Preparazione di: acido benzil-({3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]-propilcarbamoil}-metil)-carbamico-*tert*-butil estere (**168**)



L'acido (benzil-*tert*-butossicarbonil-amino) acetico (200 mg, 0.754 mmoli) viene sciolta in 20 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (138 mg, 0.905 mmoli) e WSC (173 mg, 0.905 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**134**) (188 mg, 0.754 mmoli) sciolto in 20 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, si anidrifca e si concentra in vacuo per ottenere un olio rosso cupo come grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**168**) (83 mg, 0.168 mmoli, resa 22%).

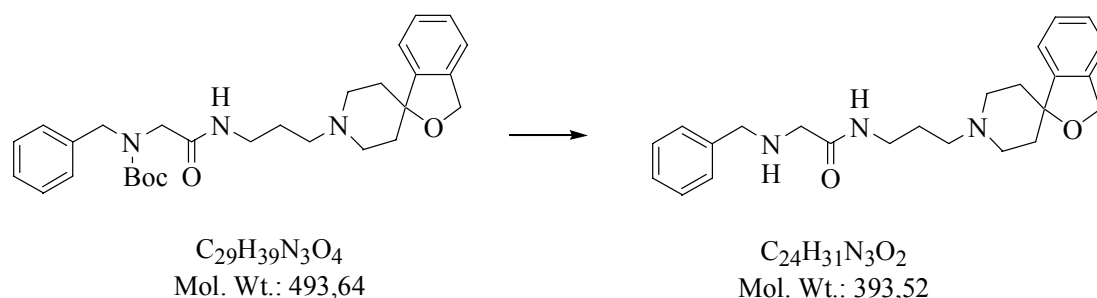
Caratteristiche del composto (**168**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 494.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.311-7.187 (m, 9H aromatici); 5.059 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 4.588-4.432 (m, 6H); 3.832-3.767 (m, 4H); 3.469-3.322 (m, 4H); 2.982-2.654 (m, 4H); 2.387 (br, 1H, CO-NH); 1.453 (s, 9H, 3CH₃-Cq).

¹³C NMR (CDCl₃): 169.965; 156.344; 143.978; 138.518; 137.651; 128.685; 128.130; 128.008; 127.765; 127.460; 127.080; 121.148 (2C); 84.252; 80.796; 79.929; 71.138; 54.886; 51.676; 50.787; 50.285; 49.562; 36.961; 34.535; 28.405 (3C); 24.466; 14.252.

Preparazione di: 2-benzilamino-*N*-{3-[spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidin-1-il]]-propil}-acetamide (**79**)



Il composto (**168**) (80 mg, 0.168 mmoli) viene sciolto in 10 equivalenti di TFA. Si lascia reagire 60 minuti a temperatura ambiente, agitando di tanto in tanto. L'andamento della reazione è seguito su TLC (eluente AcOEt/NH₃ 10:0.3). Quindi si raffredda la soluzione a 0°C e basifica con NaOH 2N. La fase acquosa viene estratta più volte con AcOEt, si anidifica e si evapora il solvente a pressione ridotta per ottenere un grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/NH₃ 10:0.3 per ottenere (**79**) con una resa quantitativa.

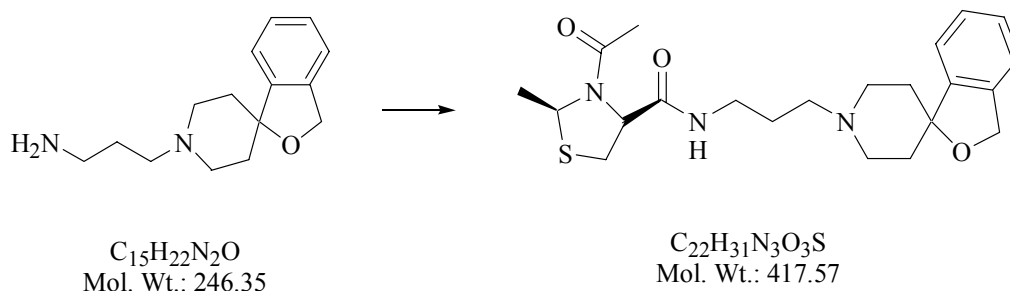
Caratteristiche del composto (**79**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 394.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.356-7.192 (m, 9H aromatici); 7.203-7.192 (m, 1H); 5.056 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.805 (s, 2H, NH-CH₂-CO); 3.325-3.291 (m, 5H); 3.2567-3.211 (m, 2H); 2.943-2.822 (m, 4H); 2.199-2.104 (m, 2H); 1.914-1.825 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃): 173.720; 145.308; 140.096; 139.722; 129.680 (2C); 129.616 (2C); 129.243; 128.678; 128.559; 122.345; 121.689; 84.283; 71.908; 56.317; 54.066; 51.597; 50.923 (2C); 37.774; 35.851 (2C); 26.447.

Preparazione di: acido (D) 3-Acetil-2-metil-tiazolidin-4-carbossilico {3-[spiro[isobenzofuran-1(3H),4'-piperidin-1-il]]-propil}-amide (**80**)



L'acido 3-acetil-2-metil-tiazolidin-4-carbossilico (**151**) (716 mg, 3.496 mmoli) viene sciolto in 20 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (642 mg, 4.195 mmoli), WSC (804 mg, 4.195 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si addiziona (**134**) (860 mg, 3.496 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, il quale viene successivamente anidrificato e concentrato in vacuo per ottenere un olio rosso cupo come grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**80**) (560 mg, 1.293 mmoli, resa 37%).

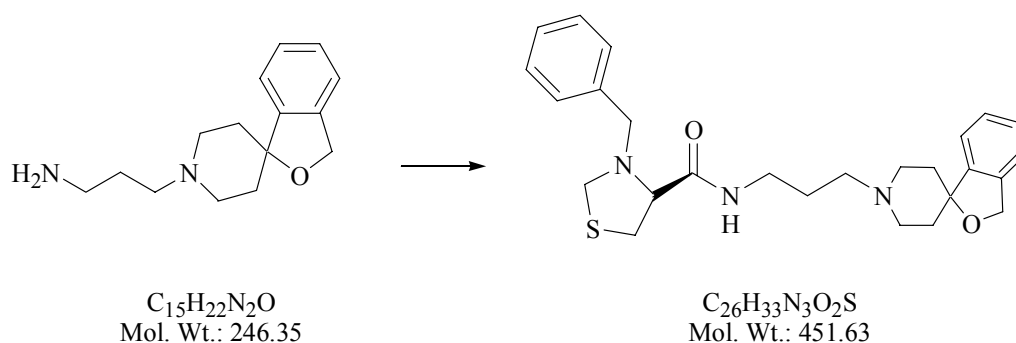
Caratteristiche del composto (**80**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 418.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.605 (br, 1H, CO-NH); 7.206 (m, 4H aromatici); 5.055 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 4.819 (m, 2H, *tiazol*); 3.424-3.159 (m, 2H); 3.089-3.000 (m, 2H); 2.486-2.295 (m, 2H); 2.239-2.136 (m, 4H); 2.149 (s, 3H, CO-CH₃); 2.037-1.879 (m, 2H); 1.787-1.653 (m, 4H); 1.540 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.622; 169.133; 145.614; 138.949; 128.814 (2C); 128.562 (2C); 84.695; 70.790; 67.612; 56.768; 54.078; 50.214; 37.673 (2C); 36.609 (2C); 30.780; 26.994; 24.092; 15.087.

Preparazione di: Acido 3-Benzil-tiazolidin-4-carbossilico {3-[spiro[isobenzofuran-1(3H),4'-piperidin-1-il]]-propil}-amide (**81**)



L'acido 3-Benzil-tiazolidin-4-carbossilico (**152**) (716 mg, 3.496 mmoli) viene sciolto in 20 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (642 mg, 4.195 mmoli), WSC (804 mg, 4.195 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si aggiunge (**134**) (860 mg, 3.496 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, il quale viene successivamente anidrificato e concentrato in vacuo per ottenere un olio rosso cupo come grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**81**) (560 mg, 1.293 mmoli, resa 37%).

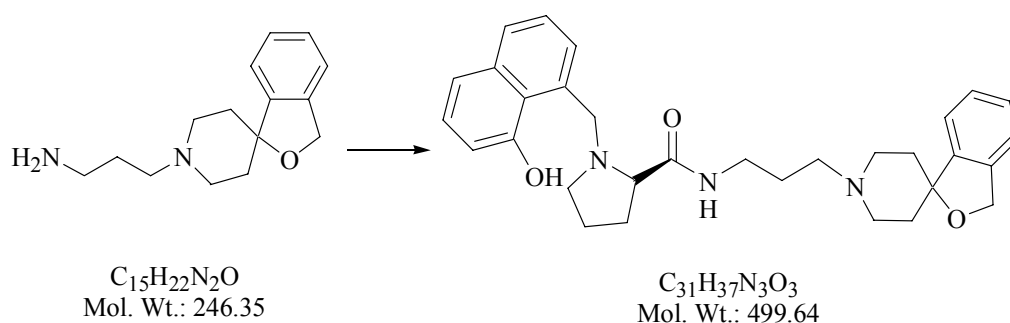
Caratteristiche del composto (**81**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 452.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.605 (br, 1H, CO-NH); 7.279-7.127 (m, 9H aromatici); 5.055 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 4.819 (t, 1H, *tiazol*); 3.424-3.159 (m, 2H); 3.089-3.000 (m, 2H); 2.486-2.315 (m, 2H); 2.281 (m, 2H); 2.239-2.136 (m, 4H); 2.109 (m, 2H); 2.037-1.879 (m, 2H); 1.787-1.653 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.622; 145.614; 138.949 (2C); 138.649 (2C); 128.814 (2C); 128.562 (2C); 127.624; 127.387 (2C); 84.695; 70.790; 67.612; 60.025; 54.078; 50.545; 50.214 (2C); 37.673; 36.609 (2C); 30.780; 26.994.

Preparazione di: acido 1-(8-idrossi-naftalen-1-ilmetil)-pirrolidin-2-carbossilico {3-[spiro[isobenzofuran-1(3H),4'-piperidin-1-il]]-propil}-amide (**82**)



L'acido 1-(8-idrossi-naftalen-1-ilmetil)-pirrolidin-2-carbossilico (**153**) (716 mg, 3.496 mmoli) viene sciolto in 20 ml di DMF. A 0°C si aggiunge HOBt (642 mg, 4.195 mmoli), WSC (804 mg, 4.195 mmoli) e si lascia in agitazione per circa 10 minuti, dopodiché si aggiunge (**134**) (860 mg, 3.496 mmoli) sciolto in 30 ml di DMF. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h e monitorata su TLC con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3. Si evapora la DMF alla pompa meccanica, si aggiunge NaHCO₃ 5% (10 ml) e si estrae ripetutamente con AcOEt, il quale viene successivamente anidrificato e concentrato in vacuo per ottenere un olio rosso cupo come grezzo di reazione, che viene poi purificato per flash cromatografia con eluente AcOEt/MeOH/NH₃ 9.5:0.5:0.3 per ottenere (**82**) (560 mg, 1.293 mmoli, resa 37%).

Caratteristiche del composto (**82**):

MS (ESI): [MH]⁺ = 500.1.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.605 (br, 1H, CO-NH); 7.526 (m, 1H, *aromatico*); 7.307-7.206 (m, 8H, *aromatici*); 6.730 (m, 1H, *aromatico*); 5.055 (br, 1H, OH); 4.890 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3.876 (s, 2H, Ar-CH₂-N); 3.424-3.159 (m, 3H); 3.089-3.000 (m, 2H); 2.873-2.805 (m, 4H); 2.486-2.295 (m, 2H); 2.239-2.136 (m, 2H); 2.037-1.879 (m, 2H); 1.787-1.653 (m, 4H); 1.598 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃): 174.622; 145.614; 138.949; 138.649; 134.224; 129.004; 128.814 (2C); 128.562 (2C); 127.624; 127.387 (2C); 123.454; 121.101; 120.793; 114.695; 70.790; 67.612; 60.025; 56.768; 54.078; 50.545; 50.214 (2C); 37.673; 36.609 (2C); 30.780; 26.994; 24.092.

BIBLIOGRAFIA

1. C. Mollereau, M. Parmentier, P. Mailleux *et. al.*, *FEBS lett.*, **1994**, 341, 33-38.
2. J.C. Meunier *et. Al*, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **2000**, 10, (4), 371-388.
3. Henderson G, Mcknight AT, *Trends Pharmacol. Sci*, **1997**, 18, 293-300.
4. Wang JB, Johnson PS *et al*, *FEBS Lett* **1994**, 348, 75-79.
5. Fukuda K, Kato S., Mori K *et al*, *FEBS Lett*, **1994**, 343, 42-46.
6. Chen Y, Fan Y, Liu J *et al*, *FEBS Lett*, **1994**, 347, 279-283.
7. Meunier J-C, *Eur. J. Phamacol.* **1997**, 340, 1-15.
8. S. Ronzoni, I. Peretto, G. Giardina, *et. al.*, *Exp. Opin. Ther. Patents*; **2001**, 11, 525-535.
9. L. G. Lou, Z. Zhang, *et.al.*; *J. Neurochem.*; **1998**, 70, 1316-1322.
10. Nicol B., Lambert DG, Rowbotham DJ, Smart D, McKnight AT *Br. J. Pharmacol.* **1996**, 1081-1083.
11. Faber ES, Chambers JP, Evans RH, Henderson G, *Br. J. Pharmac*, **1996**, 119, 189-190.
12. Giuliani S., Maggi CA, *Br. J. Pharmacol.* **1996**, 118, 1567-1569.
13. Reinscheid RK, Nothacher HP, Bourson A *et al*, *Science*, **1995**, 270, 792-794.
14. Meunier J-C, Mollereau C, Toll L *et al*, *Nature*, **1995**, 377,532-535.
15. Mogil JS, Grisel JE, Zhangs G, Belknap JK, Grandy DK, *Neurosci. Lett*, **1996**, 214, 131-134.
16. Florin S, Suaudeau C, Meunier JC, Costentin J, *Eur. J. Pharmacol.*, **1996**, 317, 9-13.
17. Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, *Eur. J. Pharmacol.*, **1998**, 350, 21-29.

18. Kapusta DR, Sezen SF, Chang JK, Lipton H, Kenigs VA, *Life Sci.*, **1997**, 60, PL 15-21.
19. Jenck F., Moreau JL, Martin JR et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 26, 14854-14858.
20. Koster A, Montkowski A, Schulz S et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 18, 10444-10449.
21. Marti M, Mela F, Veronesi C et al, *J. Neurosci.* **2004**, 24, 30, 6659-6666.
22. Dooley CT, Houghten RA, *Life Sci*, **1996**, 59, PL 23-29.
23. Reinscheid RK, Ardati A, Monsma FJ, Civelli O, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 14163-14168.
24. Shimohigashi Y, Datano R, Fujita T et al, *J. Biol. Chem.*, 271, 23642-23645.
25. Guerrini R, Calò G, Rizzi A et al, *Peptides*, **2000**, 21, 923-933.
26. Salvadori S., Guerrini R., Calò G., Regoli D., *Il Farmaco*, **1999**, 54, 810-825.
27. Calò G., Guerrini R., Rizzi A., Salvadori S., Regoli D., *Br. J. Pharmacol.*, **2000**, 129, 1261-1283.
28. R. Guerrini, *et. al*, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3956-3964.
29. Huang P, Kehner GB, Cowan A et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 297, 2, 688-695.
30. Montoya ID, Gorelick DA, Preston KL, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004, 75, 1, 34-48.
31. Gistrak MA, Paul D, Hahn EF et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1989**, 251, 2, 469-476.
32. Jenck F, Wichmann J, Dautzenberg FM et al, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **2000**, 97, 4938-4943.
33. Thomsen C, Hohlweg R, *Br. J. Pharmacol.*, **2000**, 131, 903-908.

34. Zaratin PF, Petrone G, Sbacchi M, Garnier M, Fossati C, Petrillo P, Ronzoni S, Giardina GA, Scheideler MA, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, 308, 454-461.
35. Ozaki S, Kawamoto H, Itoh Y, Miyaji M, Iwasawa Y, *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**, 387, R17-R18.
36. Ozaki S, Kawamoto H, Itoh Y et al, *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**, 402, 45-53.
37. H. Shinkai, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 43, 4667-4677.
38. Yamada H, Nakamoto H, Suzuki Y, *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, 135, 2, 323-332.
39. Muratini T, Minami T, Enomoto U *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 303, 1, 424-430;
40. Japan Tobacco, INC.: WO9948492 (1999).
41. Nippon Shinyaku Co., LTD, WO03091224 (2003).
42. Y. Goto *et al.*; *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 847-849.
43. Kawamoto *et al.*, *J Med Chem.*, **1999**, 42, 25, 5061-3.
44. C. De Risi, G.P. Pollini, C. Trapella, I. Peretto *et al.*; *Bioorganic & Med. Chem.*, 9, **2001**, 1871-1877.
45. Trapella C, Guerrini R, Piccagli L, Calo G, Carra G, Spagnolo B, Rubini S, Fanton G, Hebbes C, McDonald J, Lambert DG, Regoli D e Salvadori S, *Bioorg Med Chem.*, **2006**, 14, 3, 692-704.
46. J.B. Thomas, X. Zheng, F.I. Carroll et al, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 4143-4149.
47. J.B. Thomas, R.N. Atkinson F.I. Carroll et al, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3524-3530.
48. J. Wichmann *et al.*; *J. Med. Chem.*, **2000**, 35, 839-851.
49. D. Alberati *et al.*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 4305-4310.

50. H. Kawamoto, H. Nakashima, T. Kato, S. Arai, K. Kamata, Y. Iwasawa; *Tetrahedron*, **57**, **2001**, 981-986.
51. R. Tamura, M. Sato, D. Oda, *J. Org. Chem.*, **1986**, **51**, 4368.
52. N. Zaveri, F. Jiang, C. Olsen, W. Polgar, L. Toll, AAPS L., 2005, **7**, **2**, E345-E352.
53. Takasu et al., *J. Org. Chem.*, **2005**, **70**, 3957-3962.
54. J.B. Thomas, X. Zheng, F.I. Carroll et al, *J. Med. Chem.*, **1998**, **41**, 4143-4149
55. J.B. Thomas, R.N. Atkinson F.I. Carroll et al, *J. Med. Chem.*, **2002**, **45**, 3524-3530.
56. Thomas J.B., Atkinson R.N., Carroll F.I., *J. Med. Chem.*, **2002**, **45**, 3524-3530.
57. J.B. Thomas et al., *J. Med. Chem*, **2002**, **45**, 3524-3530.
58. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, **2,297**, 688-695.
59. Ciccocioppo et al, *Biol Psychiatry*, **2007**, **61**, **1**, 4-12.
60. B. Spagnolo et al, *Br J Pharmacol*, **2008**, **153**, **3**, 609-19.
61. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, **321,1**, 97-103.
62. Noda et al., *J. Biol. Chem.*, **1998**, **273,29**,18047-18051.
63. J.B. Thomas et al, *J. Med. Chem.*, **2003**, **46**, 3127-3137.
64. J.A. Werner et al, *J. Org. Chem.*, **1996**, **61**, 587-597.
65. B. Wenzel et al, *Eur. J. of Medicinal Chem.*, **40**, **2005**, 1197-1205.
66. *Tetrahedron* **61,3**, **2005**, 709-715.
67. *Synthesis*, **1991**, **11**, 993-5.
68. *J. Org. Chem.*, **2003**, **68**, **3**, 969-973.
69. Y.N. Belokon', *Tetraedron: Asymmetry*, **1998**, **9**, 4249-4252.

70. M. Lourdes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, **1987**, 16, 1250-1251.
71. T.W. Baughman, J.C. Sworen, K.B. Wagener; *Tetraedron*, **2004**, 60, 10943-10948.
72. G. Calò *et al*, *British J. Of Pharmacology*, **2000**, 129, 1261-1283.