



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FARMACEUTICHE
CICLO XXVII

Coordinatore Prof. Teodori Elisabetta

**Progettazione, sintesi e valutazione farmacologica
preliminare di ligandi e modulatori dei recettori
colinergici centrali**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

Dottorando

Dott. Martino Maria Vittoria

Tutore

Prof. Romanelli Maria Novella

Coordinatore

Prof. Teodori Elisabetta

Anni 2012/2014

PREMESSA AL LAVORO

Il lavoro effettuato in questi 3 anni di dottorato è stato svolto nell'ambito del progetto PRIN 2009, basato sulla ricerca di sostanze in grado di modulare, direttamente o indirettamente, i recettori colinergici a livello centrale; lo scopo è quello di sviluppare molecole in grado di migliorare i processi cognitivi, quindi utilizzabili nel trattamento di patologie caratterizzate da deficit cognitivo come morbo Alzheimer, schizofrenia, mild cognitive impairment.

Le linee di ricerca su cui si è sviluppato tale progetto andavano in 3 direzioni:

- Ricerca di ligandi muscarinici selettivi;
- Ricerca di sostanze dotate di attività nootropa formalmente correlate al Piracetam.
- Ricerca di ligandi nicotinici;

Le prime due sono oggetto della mia tesi di dottorato; i due diversi ambiti verranno descritti separatamente.

INDICE

1.	Introduzione	pg. 1
1.1.	Ligandi muscarinici	pg. 1
1.1.1.	I recettori muscarinici	pg. 1
1.1.2.	Allosterismo: Definizione, concetti e prospettive storiche	pg. 5
1.1.3.	Individuazione, quantificazione e validazione delle interazioni allosteriche	pg. 6
1.1.4.	ACTM: modello di complesso ternario allosterico	pg. 7
1.1.5.	Effetti allosterici sul binding (affinità)	pg. 8
1.1.6.	Efficacia o potenza: effetti allosterici sugli studi funzionali	pg. 9
1.1.7.	Agonismo allosterico	pg. 11
1.1.8.	Vantaggi terapeutici dei modulatori allosterici	pg. 11
1.1.9.	Ligandi muscarinici allosterici	pg. 13
1.1.10.	Ligandi allosterici che legano il “sito della gallamina”	pg. 14
1.1.11.	Ligandi allosterici che legano il “sito WIN”	pg. 16
1.1.12.	Altri siti allosterici	pg. 16
1.1.13.	Possibili applicazioni terapeutiche dei ligandi allosterici muscarinici per il trattamento di patologie del SNC	pg. 17
1.1.14.	Ligandi bitopici: ortosterici ed allosterici	pg. 19
1.2.	Sostanze dotate di attività nootropica	pg. 25
1.2.1.	DM232, DM235 ed analoghi strutturali	pg. 25
2.	Scopo del Lavoro	pg. 35
2.1.	Ligandi Muscarinici	pg. 35
2.2.	Modulatori indiretti dei recettori colinergici ad azione nootropica	pg. 36
3.	Parte chimica	pg. 39
3.1.	Ligandi muscarinici derivati dal carbacolo	pg. 39
3.2.	Sostanze ad attività nootropica	pg. 49
4.	Risultati Farmacologici	pg. 59
4.1.	Ligandi muscarinici	pg. 59
4.1.1.	Risultati all'Equilibrio: studi di competizione da parte delle molecole indagate con [³ H]-NMS per i cinque sottotipi recettoriali muscarinici umani espressi in cellule CHO	pg. 59
4.1.2.	Studi funzionali su cellule CHO che esprimono i sottotipi hM ₁ , hM ₂ e hM ₃	pg. 65

4.1.3.	Studi di molecular modelling	pg. 68
4.1.4.	Esperimenti di tipo cinetico	pg. 69
4.1.5.	Misura dell'affinità degli agenti allosterici per i recettori occupati da [³ H]-NMS	pg. 77
4.2.	Sostanze ad attività nootropa	pg. 81
4.2.1.	<i>Passive avoidance test</i>	pg. 81
5.	Parte Sperimentale	pg. 87
5.1.	Materiali e metodi farmacologici	pg. 87
5.1.1.	Preparati cellulari	pg. 87
5.1.2.	Preparazione delle membrane cellulari	pg. 88
5.1.3.	Esperimenti di binding all'equilibrio	pg. 88
5.1.4.	Curve di saturazione omologhe	pg. 89
5.1.5.	Curve di competizione eterologa	pg. 89
5.1.6.	Esperimenti di binding in cinetica	pg. 89
5.1.7.	<i>Full time course experiments</i>	pg. 90
5.1.8.	<i>Single time – off rate experiments</i>	pg. 90
5.1.9.	Esperimenti su cellule isolate per la misura della fosforilazione di ERK1/2	pg. 91
5.1.10.	Analisi dei dati	pg. 93
5.1.11.	<i>Passive avoidance test</i>	pg. 94
5.2	Parte Chimica Sperimentale	pg. 96
6.	Bibliografia	pg. 159
	Ringraziamenti	pg. 169

1. INTRODUZIONE

1.1. Ligandi muscarinici

1.1.1. I recettori muscarinici

I recettori muscarinici sono proteine di membrana, costituite da una catena polipeptidica di 460-590 aminoacidi i organizzati in 7 domini che attraversano la membrana citoplasmatica 7 volte in corrispondenza di regioni idrofobiche per formare una proteina integrale di membrana globulare. Le porzioni terminali della catena sono costituite da un dominio N-terminale extracellulare e da uno C-terminale intracellulare.

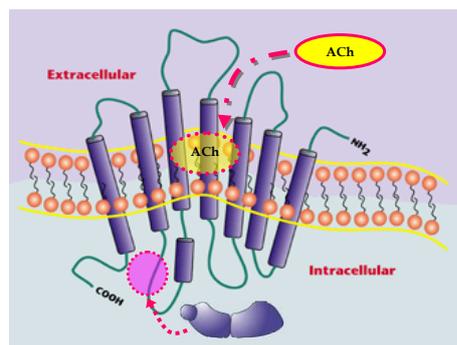


Figura 1.1: Rappresentazione della struttura transmembrana del recettore muscarinico. Sono evidenziati i punti d'interazione dell'ACh con il recettore e il sito di legame della proteina G a livello del 3° loop citoplasmatico.

Fanno parte della grande famiglia dei recettori associati a proteina G (GPCRs), in particolare della famiglia 1 dei GPCRs in quanto caratterizzati dalla presenza di una porzione N-terminale corta. I GPCR sono infatti classificati in tre diverse famiglie che presentano tutte la stessa struttura ma differiscono per la lunghezza della porzione N-terminale, per il sito di legame dell'agonista e per il tipo di ligando con cui vanno ad interagire. I recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) sono la più grande famiglia di recettori di membrana nel genoma umano e, a causa della loro distribuzione ubiquitaria sulla superficie delle cellule, attualmente costituiscono il bersaglio farmacologico di circa il 50% dei farmaci presenti in commercio.

I recettori muscarinici (mAChRs) presentano come ligando endogeno il neurotrasmettitore *acetilcolina* (ACh), neurotrasmettitore presente a livello del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico. L'acetilcolina, infatti agisce sia a livello di sinapsi neurone-neurone, sia a livello di sinapsi neurone-placca muscolare attraverso recettori di tipo muscarinico e/o nicotinico.

La prima definizione di queste due classi di recettori colinergici fu data da sir Henry Dale nel 1914. Il nome “muscarinico” attribuito a questi recettori deriva appunto dalle osservazioni di sir Dale a proposito del loro legame con la muscarina, principio attivo ottenuto dal fungo *Amanita Muscaria*, che agisce su questa tipologia recettoriale come agonista e li distingue dall'altra tipologia di recettori colinergici, detti “nicotinici”, che sono insensibili alla muscarina ma sensibili alla nicotina, ottenuta dalla pianta *Nicotiana Tabacum*: un'altra caratteristica che li distingue dai precedenti è quella di non essere associati a proteine G, come poi verrà scoperto in studi successivi).

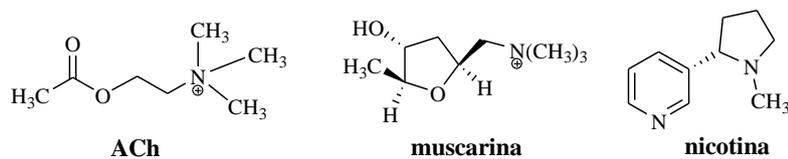


Figura 1.2: Ligandi colinergici: acetilcolina, muscarina, nicotina.

L'azione dell'ACh come neurotrasmettitore fu confermata solo in seguito da Otto Loewy (1921) il quale, sulla base di esperimenti eseguiti su cuore di rana, dimostrò che la stimolazione del nervo vago rilascia una sostanza da lui chiamata “vagusstoff”, o “sostanza vagale”, responsabile dell'effetto inotropo negativo e bradicardico. Tuttavia solo nel 1970, con l'avvento della spettrometria di massa, fu ottenuta la conferma definitiva dell'identità tra la sostanza vagale e l'ACh. La caratterizzazione dei vari sottotipi recettoriali ha inizio dagli anni '80 in poi.

Attraverso studi di clonazione molecolare si è giunti all'identificazione di 5 sottotipi recettoriali a cui si è dato nome da M₁ a M₅ ^[1,2,3]. Gli M₁, M₂, M₃ furono individuati già per primi tramite tecniche ^[2,4,5] mentre gli M₄ e gli M₅ sono stati scoperti successivamente tramite approcci di biologia molecolare ^[6,7,8]. Ogni sottotipo recettoriale muscarinico ha una particolare posizione e funzionalità, sia nel sistema nervoso centrale che periferico e non è stato facile identificarle, tanto che gli studi si sono protratti per oltre un ventennio.

La difficoltà nelle ricerche è stata soprattutto causata dall'elevata omologia tra i vari sottotipi recettoriali e dalla mancanza di ligandi selettivi. Numerosi studi hanno

investigato sul ruolo dei diversi sottotipi nel mediare le risposte fisiologiche dell'ACh e tramite esperimenti di immunocistochimica e ibridazione dell'mRNA è stato dimostrato che mAChRs sono presenti in tutti gli organi, tessuti, cellule. L'altra difficoltà che gli studiosi hanno incontrato è stata che la maggior parte di organi, tessuti e cellule esprime più di un sottotipo recettoriale [9,10,11,12]. L'analisi del ruolo fisiologico e fisiopatologico di ogni specifico sottotipo è stata ampiamente semplificata dall'uso di topi transgenici, nei quali uno o più geni codificanti per i diversi mAChRs è stato eliminato [13,14,15]. I cinque sottotipi recettoriali muscarinici possono essere oggi classificati in due gruppi principali, in base all'interazione preferenziale con specifiche proteine G [16]. I recettori M₁, M₃ e M₅ che interagiscono con la subunità α di proteine della classe Gq/G₁₁ e stimolano l'enzima fosfolipasi C, mentre i recettori M₂ e M₄ che interagiscono con la subunità α di proteine della classe Gi/Go determinando inibizione dell'adenilato ciclasi (AC).

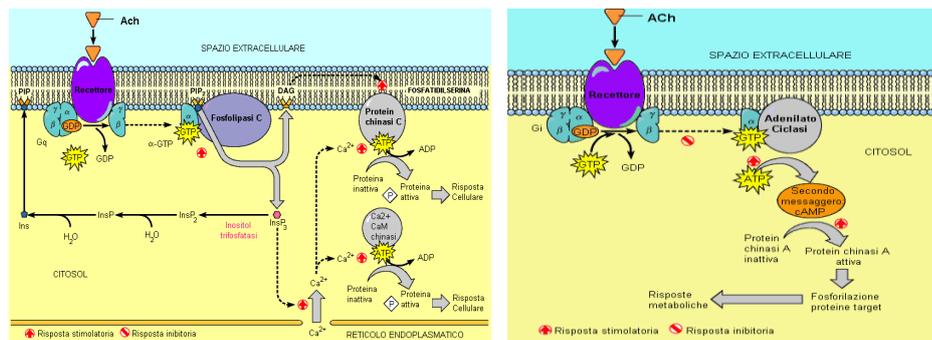


Figura 1.3: Rappresentazione schematica dell'attivazione dei recettori muscarinici associati a proteine Gs e Gi/Go.

L'interazione di agonisti con il recettore muscarinico di membrana lo attiva e induce quindi importanti risposte biochimiche ed elettrofisiologiche; quest'ultime portano a una serie di effetti fisiologici che dipendono dalla localizzazione e dall'identità molecolare del sottotipo recettoriale attivato [17,18,19]. Il loro ruolo è molto complesso e non del tutto chiarito, ma certamente ogni sottotipo recettoriale muscarinico ha una particolare posizione e funzionalità, sia nel sistema nervoso centrale che periferico (Tabella 1.1).

Fino a oggi solo un quinto di tutti i recettori GPCRs del genoma sono stati considerati come bersagli terapeutici, evidenziando così un notevole potenziale per la scoperta di nuovi farmaci associata a questa importante famiglia di recettori. Nonostante la loro struttura simile, i recettori associati a proteina G rispondono a diversi stimoli extracellulari (fotoni, ioni, ammine biogene, peptidi, lipidi, ammine aromatiche,

proteine) e trasducono il loro segnale nell'ambiente intracellulare ^[20]. L'approccio tradizionale per la progettazione di nuovi ligandi è quello di avere come bersaglio il sito ortosterico del recettore; questo è definito come quel sito che lega il ligando endogeno per provocare una trasduzione del segnale. Tale strategia di progettazione ha guidato lo sviluppo di ligandi ortosterici che attivano direttamente il recettore (agonisti) o bloccano l'azione del ligando endogeno (antagonisti/agonisti inversi).

Tabella 1.1: Localizzazione e funzione dei 5 sottotipi recettoriali mAChRs.

<i>Sottotipo</i>	<i>Localizzazione</i>	<i>Funzione</i>
hM ₁	SNC, ghiandole gastriche e salivari, gangli autonomi, nervi enterici.	↑ funzione cognitiva ↑ secrezione ↑depolarizzazione dei gangli autonomi ↓ rilascio dopamina e locomozione
hM ₂	SNC, muscolatura liscia, ghiandole e cuore.	↓battito cardiaco ↑contrazione muscolatura liscia ↓trasmissione gangliare ↑tremori ↑ipotermia e analgesia
hM ₃	SNC, predominante nei neuroni dopaminergici della sostantia e dell'area tegumentale ventrale; ghiandole, muscolatura liscia, cuore.	↑contrazione muscolatura liscia (vescica) ↑secrezione salivare ↑assunzione cibo, deposito grassi ↓ rilascio dopamina ↓sintesi NO
hM ₄	Terminazioni nervose del sistema nervoso autonomo.	↓battito cardiaco ↑contrazione muscolatura liscia ↓trasmissione gangliare ↑tremori ↑ipotermia e analgesia
hM ₅	SNC	↑ rilascio dopamina ↑ dilatazione arterie cerebrali

↑ incremento; ↓ diminuzione

In generale, i ligandi ortosterici, comunque, non sono selettivi, dato che il sito ortosterico è spesso altamente conservato tra i differenti sottotipi recettoriali; questo porta ad un'insufficiente efficacia clinica ed a numerosi effetti indesiderati ^[21].

Negli ultimi due decenni abbiamo visto un aumento di nuovi modelli sul comportamento dei GPCRs. Per esempio, è ormai ben consolidato che i GPCRs possono mostrare un'attività costitutiva (per esempio ligando-indipendente), che può

essere modulata in modo differenziato da altri tipi di ligandi ^[22]. Inoltre, GPCRs possono avere anche dei siti allosterici topograficamente distinti, riconosciuti da modulatori allosterici strutturalmente differenti, che regolano l'affinità e/o l'efficacia del ligando co-legato nel sito ortosterico ^[21,23]. Questi modulatori allosterici sono considerati promettenti molecole farmaceutiche, essendo privi di molti svantaggi che presentano i ligandi ortosterici.

Infatti i composti allosterici mostrano un'alta affinità per i sottotipi recettoriali (i siti allosterici sono generalmente meno conservati rispetto ai siti ortosterici), esplicano i loro effetti solo in presenza di ligando endogeno e in alcuni casi non inducono la desensitizzazione dei recettori ^[23]. Un approccio ancora più moderno, attualmente in fase di studio e sviluppo, è quello di unire farmacofori ortosterici e allosterici per produrre ligandi ibridi o bitopici, con lo scopo di aumentare l'affinità e/o la selettività per sottotipi recettoriali.

1.1.2. Allosterismo: Definizione, concetti e prospettive storiche

Il termine “allosterico” (dal greco = “altro sito”) fu definito da Monod nel 1963 ^[24]. in un articolo che descriveva la proprietà degli enzimi di aver modificata la propria attività biologica, in modo positivo o in negativo, dall'interazione con ligandi di siti topograficamente distinti dal sito di legame col substrato. Questi siti distinti furono definiti come *siti allosterici* in contrasto col sito di legame per il substrato (endogeno).

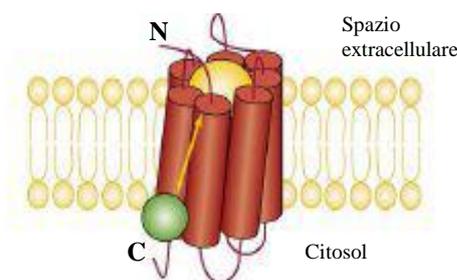


Figura 1.4: interazione allosterica al GPCR: il modulatore allosterico (verde) lega lo stesso recettore del legante ortosterico (giallo), ma in una porzione non sovrapposta. ^[25].

Ci sono 2 concetti principali che la maggior parte degli studi sull'allosterismo sottolineano. Uno di questi, che si è sviluppato inizialmente nel campo dell'enzimologia, è che molte proteine possiedono più di un sito di legame e che possono legare successivamente più di un ligando a questi siti allosterici. Il fenomeno si

riflette nel primissimo modello sperimentale di allosterismo, quello di Bohr sul binding dell'ossigeno all'emoglobina ^[26].

Il secondo importante concetto associato all'allosterismo è la capacità delle proteine di attuare cambiamenti conformazionali che portano ad un'alterazione nell'affinità dei siti di legame per i ligandi, evidenziando il fatto che i siti sono “costitutivamente concatenati” ^[27]. Si preferisce studiare i GPCRs poiché sono naturalmente allosterici, possiedono più di un tipo di sito di legame e la proteina G stessa è il modulatore del legame agonistico ai GPCRs meglio conosciuti ^[28,29].

Quindi, i presupposti essenziali ad un'interazione allosterica sono:

- non esiste un solo sito di legame
- l'interazione di un ligando con il suo sito interferisce con il legame di un secondo ligando all'altro sito e viceversa. Le interazioni allosteriche sono quindi reciproche in natura.
- l'effetto di un modulatore allosterico può essere sia positivo che negativo a seconda del legame e/o della funzione di un ligando ortosterico.

1.1.3. Individuazione, quantificazione e validazione delle interazioni allosteriche

L'affinità è definita dal rapporto tra le velocità di associazione e dissociazione. Quando un ligando allosterico si lega a un recettore, la struttura conformazionale di quest'ultimo viene modificata e quindi le velocità con cui un ligando ortosterico si associa o si dissocia dalla nuova conformazione recettoriale può essere diversa dalla velocità che si misura nel recettore libero. Questo può risultare come un'alterazione dell'affinità del ligando ortosterico per il suo sito di legame; ciò non è altro che un'altra manifestazione dell'interazione allosterica. Dunque, un incremento della velocità di associazione e/o una diminuzione della velocità di dissociazione del ligando mostra un potenziamento allosterico, mentre cambiamenti opposti portano a un'inibizione allosterica.

Entrambe le velocità di associazione e di dissociazione possono anche cambiare nella stessa direzione con un incremento o un'inibizione, in funzione degli effetti su ciascuno dei parametri considerati. Una situazione particolare si ha quando avviene un'interazione allosterica, ma l'affinità del ligando ortosterico resta invariata, cioè la cooperatività è neutra. Le valutazioni cinetiche sono una specifica manifestazione dell'allosterismo.

1.1.4. ACTM: modello di complesso ternario allosterico

Per analizzare le conseguenze dell'allosterismo sia in cinetica che all'equilibrio, il metodo più semplice è quello del modello del complesso ternario; nel contesto del modello è possibile sia analizzare i dati che confermare la validità dei risultati.

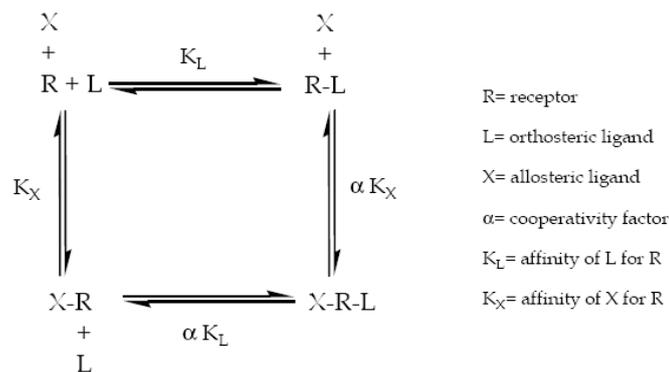


Figura 1.5: Modello del complesso allosterico ternario. X, L: leganti. R: recettore. K_X : costante di associazione per il legante X. K_L : costante di associazione per il legante L. α : fattore di cooperatività [30]

Questa è solo una rappresentazione matematica del fenomeno, dove il recettore può legare un ligando ortosterico L a un sito sul “lato destro” del recettore. Un ligando allosterico X si lega a un sito separato sul “lato sinistro”. L'allosterismo è associato con il legame del ligando allosterico XR+L che cambia in base a come L interagisce. In questo caso il cambiamento è descritto come fattore alfa [α]. Questo è la natura dell'allosterismo, per la quale il recettore lega simultaneamente 2 ligandi, che hanno entrambi l'abilità di interferire l'uno sull'altro equamente.

In questo modello, ligando allosterico e ortosterico interagiscono reversibilmente e saturabilmente con i loro rispettivi siti di legame sul recettore libero.

A causa del legame conformazionale, l'interazione allosterica tra i 2 siti è reciproca: ciò che L fa al ligando X è lo stesso che X fa ad L.

L'interazione è guidata dalla concentrazione di ogni ligando, dalle sue costanti di affinità (K_L , K_X) e dal parametro aggiuntivo α , considerato comunemente come un fattore di cooperatività [31]. Quest'ultimo parametro descrive la misura del cambiamento allosterico nell'affinità di legame che accade tra 2 siti di legame conformazionalmente legati, quando entrambi interagiscono con un ligando, e rappresenta il rapporto tra le costanti di affinità del recettore occupato su quella del recettore libero.

Un valore $\alpha > 1$ descrive cooperatività positiva (incremento allosterico del binding), mentre un valore $\alpha < 1$ (ma > 0) descrive cooperatività negativa (inibizione allosterica del binding); $\alpha = 1$ descrive cooperatività neutra cioè non si hanno effetti sull'affinità di legame all'equilibrio, e $\alpha = 0$ descrive fundamentalmente interazione competitiva. K_L , K_X e α (e quindi αK_X) possono essere misurate all'equilibrio e in studi funzionali. Independentemente, possiamo misurare αK_X in studi in cinetica, misurando come la dissociazione di L dal recettore varia in presenza di X.

Come X è progressivamente aggiunto, la costante di velocità di dissociazione osservata cambia, come si nota dalle differenze tra gli studi su RL e quelli su XRL, e questo cambiamento è governato da questa costante di legame, αK_X . In tutti i casi i valori in cinetica e all'equilibrio stimati da αK_X devono coincidere, secondo la validazione di questo modello.

1.1.5. Effetti allosterici sul binding (affinità)

Per indagare gli effetti allosterici sull'affinità di un ligando ortosterico vengono effettuati esperimenti di binding con radioligandi, all'equilibrio e in cinetica. Questi permettono di calcolare le costanti di affinità di legame per il ligando ortosterico sul recettore occupato e non occupato.

Il valore di cooperatività tra il ligando allosterico e ortosterico viene ugualmente determinato.

Il modo più semplice di descrivere un'interazione allosterica, che contemporaneamente costituisce anche le basi per gli studi quantitativi sull'allosterismo nei GPCRs, è, come già accennato, il modello allosterico ternario (ACTM). La fig. 1.6 confronta il grado teorico infinito di inibizione ottenuto con un antagonista ortosterico competitivo con gli effetti di un promotore allosterico ($\alpha = 10$) e un inibitore allosterico ($\alpha = 0.1$) sull'occupazione allosterica di un ligando ortosterico.

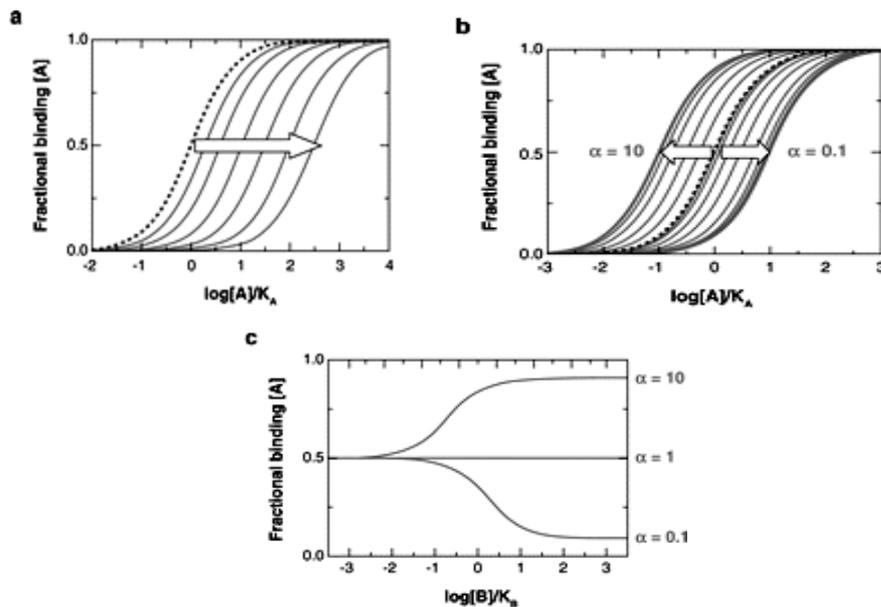


Figura 1.6: (a) confronta il grado teorico infinito di inibizione ottenuto con un ligando ortosterico competitivo a concentrazioni crescenti. Invece (b) confronta il grado teorico infinito di inibizione ottenuto con un promotore allosterico ($\alpha = 10$) e un inibitore ($\alpha = 0.1$) sull'occupazione allosterica di un ligando ortosterico. (c) Stessa interazione mostrata nel pannello b, ma utilizzando una concentrazione fissa di ligando ortosterico e aumentando la concentrazione di ciascun modulatore allosterico positivo, negative o neutro.

Lo spostamento massimale a destra della curva del ligando ortosterico, dovuto a un ligando allosterico, corrisponde a un limite che è definito da alfa. Per un promotore allosterico, la curva di occupazione ortosterica è spostata a sinistra. La stessa cosa si può vedere da un punto di vista di $1/K_A$.

1.1.6. Efficacia o potenza: effetti allosterici sugli studi funzionali

Gli studi funzionali portano ad individuare gli effetti allosterici sull'efficacia come sulla potenza degli agonisti. Le curve concentrazione-effetto dell'agonista (figura 1.7) sono spostate a sinistra da agenti allosterici a cooperatività positiva e a destra da quelli a cooperatività negativa.

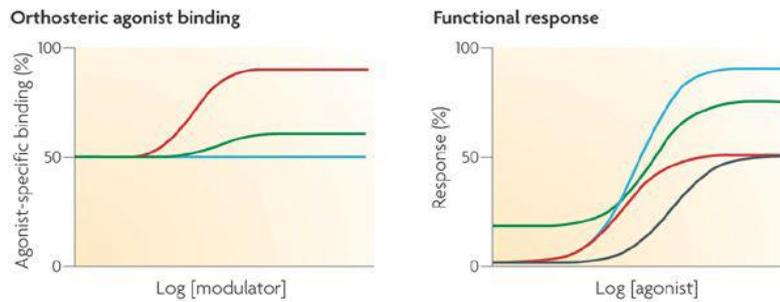


Figura 1.7: Possibili effetti di un modulatore allosterico. I grafici mostrano gli effetti sul legame (sinistra) e sulla risposta (destra) di un agonista ortosterico, la cui azione è mediata da tre diversi modulatori allosterici: il primo (rosso) aumenta esclusivamente l'affinità dell'agonista ortosterico; il secondo (blu) ne aumenta soltanto l'efficacia; il terzo (verde) incrementa modestamente sia affinità che efficacia ^[32].

La “funzionalità” allosterica può essere misurata ugualmente usando l'ACTM (figura 1.8). Comunque bisogna fare delle premesse: 1) l'affinità vista negli studi funzionali è quella vista anche nel binding; 2) non c'è attività costitutiva del sistema; 3) non c'è agonismo da parte del ligando allosterico; 4) l'efficacia di L su RL e XRL è la stessa, sebbene α stimato dagli studi di binding e dagli studi funzionali sarà differente.

In condizioni diverse da queste c'è bisogno di modelli matematici più complessi per analizzare i dati. In tempi più recenti sono stati elaborati altri modelli che considerano la complessità delle interazioni recettore-ligando, ovvero quelli che sono definiti “cubic models”. Questi modelli sono stati sviluppati per descrivere interazioni che possono avvenire contemporaneamente tra il recettore e l'agente ortosterico, il modulatore allosterico e una proteina G o per descrivere il legame simultaneo tra un ligando ortosterico e due ligandi allosterici a siti differenti dello stesso recettore ^[30].

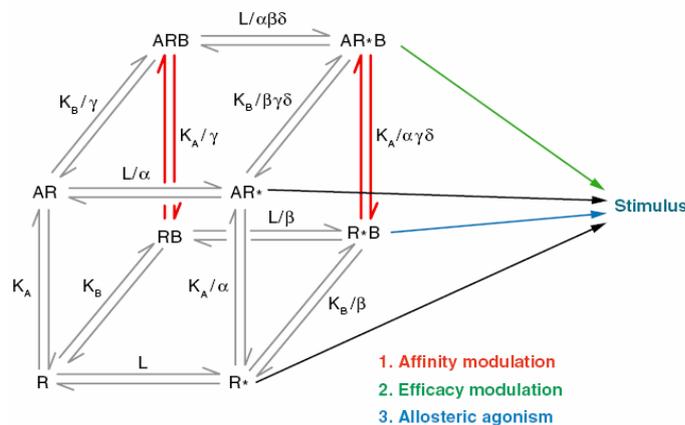


Figura 1.8: modello a due stati o “allosteric cubic ternary complex” ^[33].

1.1.7. Agonismo allosterico

Alcuni ligandi possono attivare il recettore tramite un sito allosterico e non attraverso quello ortosterico (al quale si lega il ligando endogeno), cioè aumentano lo stato attivato delle conformazioni dei GPCRs stessi: in questo modo mostrano agonismo in assenza di un legame al sito ortosterico ^[34,35,36]. Ci sono 3 potenziali vantaggi per gli agonisti allosterici. Il primo è che l'agonismo allosterico potrebbe essere il miglior modo di ottenere agonisti selettivi per alcuni recettori. Questo potrebbe stare alla base dell'affinità selettiva per il suo sito "non conservato" o per la selettività. Il secondo vantaggio di un agonista allosterico è che può trovare utilità clinica in combinazione a terapie per alcuni disordini. Infine, gli agonisti allosterici che agiscono da promotori dell'agonista endogeno potrebbero risultare clinicamente più efficaci paragonati con gli altri agonisti o con i promotori allosterici da soli.

1.1.8. Vantaggi terapeutici dei modulatori allosterici

In termini terapeutici, gli agenti allosterici possono essere visti come principi attivi a sé stanti, che selettivamente promuovono o inibiscono l'affinità per il ligando endogeno sul sottotipo recettoriale desiderato.

Hanno la potenzialità di provvedere a un'azione selettiva temporale e spaziale su un dato sottotipo recettoriale che non è possibile con un ligando ortosterico. In più, hanno la capacità di mimare un agonista o antagonista endogeno non selettivo grazie alla loro differente cooperatività con i diversi sottotipi. Essi possono agire da "promotori allosterici" per incrementare l'affinità del ligando endogeno, quindi provvedendo a un'amplificazione del segnale endogeno uso dipendente, similmente a una benzodiazepina tipo il diazepam, che agisce allostericamente promuovendo l'affinità al GABA su alcuni sottotipi recettoriali GABA_A ^[36].

Di seguito sono elencati i principali vantaggi dei siti allosterici e dei loro ligandi, considerando in maniera particolare i recettori muscarinici:

1. I recettori muscarinici costituiscono uno dei più importanti targets terapeutici. I siti allosterici su questi recettori sono meno conservati nei diversi sottotipi rispetto al sito ortosterico, fornendo un grande potenziale per lo sviluppo di farmaci selettivi. Infatti, è stato difficile sviluppare agonisti e antagonisti muscarinici sottotipo selettivi, forse perché la struttura della regione di legame

per l'ACh nel recettore (sito ortosterico) è fortemente conservata attraverso i vari sottotipi ^[3,17,38,39]. Un sito allosterico su un recettore è meno conservato nei i vari sottotipi, considerando che il sito non è quello di legame per un ligando endogeno e/o che potrebbe essere una parte di un dominio del recettore che svolge un'altra importante funzione.

2. I ligandi allosterici possiedono una selettività per i sottotipi basata sulla cooperatività come anche sull'affinità: hanno una “selettività assoluta” potenziale per i sottotipi recettoriali, dando origine ad un nuovo e potente tipo di selettività recettoriale ^[40]. Quindi, un modulatore può avere la stessa affinità per i diversi sottotipi recettoriali ma esercitare un effetto selettivo attraverso i differenti gradi di cooperatività per ciascun sottotipo. Un agente allosterico con cooperatività positiva o negativa con il ligando endogeno su un sottotipo recettoriale e cooperatività neutra con gli altri sottotipi (tralasciando la concentrazione o la dose dell'agente allosterico e la sua relativa affinità per i diversi sottotipi) dovrebbe avere “selettività assoluta” per il sottotipo. Chiaramente gli agenti allosterici hanno la capacità di mostrare diversi schemi di cooperazione con l'ACh o gli altri ligandi ortosterici sul sottotipo muscarinico.
3. L'effetto dei modulatori allosterici è saturabile: una volta che i siti sono completamente occupati non si osserva un ulteriore effetto allosterico ^[41] o effetti collaterali dovuti al sovradosaggio. I modulatori allosterici possono essere dati ad alte dosi senza paura di iperstimolare o inibire il sistema. Ciò non è applicabile solo ai promotori allosterici, ma anche agli inibitori che abbassano, anche se non azzerano, il segnale di un recettore come un antagonista ortosterico può fare. Bisogna comunque tener sempre presente che i ligandi allosterici non variano l'attività costitutiva, quindi non hanno azione sul recettore muscarinico in assenza di ACh.
4. Poiché la maggior parte dei ligandi muscarinici allosterici non incrementano la risposta massima all'ACh, ulteriore vantaggio dei ligandi allosterici, specialmente dei modulatori positivi, è quello di evocare una risposta solo ed esclusivamente in quei tessuti in cui l'agonista endogeno esercita il suo effetto ^[42].
5. Fondamentalmente, il caso in cui un sottotipo recettoriale muscarinico, bersaglio di un agonista o di un antagonista, ^[43,44], a livello del quale però l'efficacia del ligando ortosterico sia stata limitata da effetti collaterali muscarinici, questa è la

condizione ottimale per un approccio allosterico. Un esempio è che i promotori allosterici con selettività per il recettore hM₁ potrebbero essere usati nel trattamento del declino cognitivo nei primi stadi della patologia di Alzheimer, dove potrebbero compensare gli effetti dovuti al deficit locale di ACh.

1.1.9. Ligandi muscarinici allosterici

I più ampi studi farmacologici sul sito di legame allosterico sulla famiglia A (rodopsina-like) dei GPCRs sono stati quelli condotti sui recettori muscarinici e come risultato questi sono diventati il prototipo di GPCRs per lo studio dell'allosterismo. Questo è in parte dovuto alle prime evidenze sulla modulazione allosterica che furono scoperte in questa famiglia recettoriale [45,46] e ai molteplici ligandi allosterici di struttura differente già descritti in letteratura. Attualmente, infatti, molti dei protocolli usati per studi sull'allosterismo dei GPCRs sono stati originariamente sviluppati usando i recettori muscarinici [47,48,49].

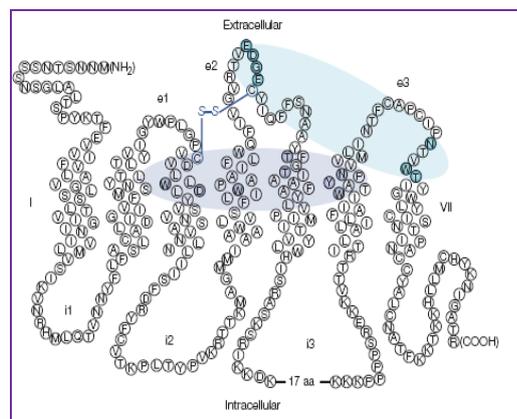
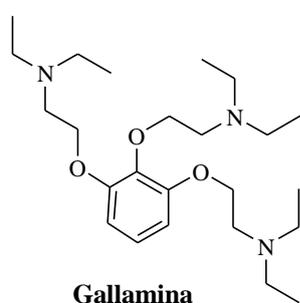


Figura 1.9: Struttura del recettore muscarinico M₂. I domini transmembranari sono ordinati da I a VII (da sinistra verso destra); le anse extracellulari sono indicate con la lettera 'e' mentre i loop intracellulari con 'i'. Gli aminoacidi, identificati attraverso tecniche di mutagenesi, che concorrono all'interazione con il ligando orto sterico, sono evidenziati in violetto, mentre quelli coinvolti nel binding di modulatori allosterici sono in turchese. Si può osservare che, nonostante si tratti di una proteina monomerica, molteplici domini (ombreggiati) sono disponibili come potenziale bersaglio di farmaci [21].

Usando il recettore muscarinico M₂ come modello (figura 1.9), molti studi hanno localizzato il sito allosterico nel secondo loop extracellulare (sequenza EDGE, Glu¹⁷²-Asp¹⁷³-Gly¹⁷⁴-Glu¹⁷⁵ e Tyr¹⁷⁷ in hM₂) [50,51,52] e nella regione della fine del terzo loop esterno/inizio dell'elica 7 transmembrana [TM7] [53,54,55], in particolare Thr⁴²³ in M₂ [56], che occupa la posizione 7.36 secondo Ballesteros & Weinstein [57]. L'affinità allosterica sottotipo indipendente è fornita dal Trp 7.35, che è conservato tra i cinque sottotipi

muscarinici e situato nelle immediate vicinanze della Tyr¹⁷⁷ del recettore M₂ [58]. Inoltre, il ponte disolfuro conservato tra l'elica TM3 transmembrana e la Cys¹⁷⁶ del secondo loop esterno del recettore hM₂ è importante per il legame del ligando allosterico e ortosterico [59,60]. Così, mentre il sito ortosterico sembra essere compreso in una tasca interna, il sito allosterico è localizzato a livello extracellulare. È importante notare, infatti, che mutazioni in queste aree esterne hanno minimi effetti sul legame del ligando ortosterico nei confronti del suo recettore; questo suggerisce che i due tipi di ligandi, ortosterico e allosterico, interagiscono con aree topograficamente distinte [33].

1.1.10. Ligandi allosterici che legano il “sito della gallamina”

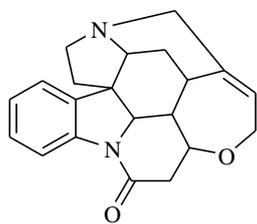


L'idea dell'esistenza di un secondo sito di legame sul recettore muscarinico apparve quando fu dimostrato che l'effetto causato dal bloccante neuromuscolare gallamina, un inibitore dell'azione inotropica e cronotropica negativa degli agonisti muscarinici sul cuore, non avveniva attraverso un meccanismo di tipo competitivo [46]. Inoltre, sembrava esserci un effetto selettivo sui recettori muscarinici cardiaci, come dimostrato da studi analoghi condotti su altri tipi di tessuto dove erano presenti altri recettori muscarinici, come le ghiandole salivari, l'ileo e la cistifellea: in questi organi la gallamina risultava essere meno potente [61,62]. Di conseguenza, un'ampia caratterizzazione delle proprietà di binding della gallamina sul recettore muscarinico confermò l'esistenza di un sito allosterico che, quando è occupato, modifica l'affinità del ligando al sito ortosterico ma non lo inibisce totalmente [63]. Questi studi portarono alla conclusione che infatti la gallamina inibiva allostericamente numerosi agonisti e antagonisti, e la sua potenza nel modulare queste proprietà di legame era dipendente dal tessuto, essendo più potente sul cuore. I modulatori allosterici dei recettori muscarinici possono sia diminuire che incrementare l'affinità di un antagonista o di un agonista.

Durante l'ultimo decennio, è stato studiato ampiamente il comportamento di diversi composti allosterici dall'attività agonista e antagonista allosterica [64-69]. La gallamina è diventata il prototipo di ligando muscarinico allosterico, essendo un composto a cooperatività negativa con agonisti e antagonisti e, sui 5 sottotipi muscarinici, con l'affinità maggiore sul sottotipo M₂. Sullo stesso sito sembra che agiscano anche altri ligandi allosterici quali l'*obidossima* [70], e la *tubocurarina* [71]. Un altro bloccante

neuromuscolare, l'*alcuronio*, fu il primo ligando dove la cooperatività positiva venne dimostrata con l'antagonista muscarinico [^3H]-NMS ^[72]. Questo aumento dell'affinità sui recettori hM₂ fu osservato, non solo con l'antagonista ortosterico [^3H]-NMS, ma anche con un altro antagonista muscarinico, quale l'atropina ^[73]. La scoperta che alcuni agenti allosterici erano capaci di produrre un incremento dell'affinità di alcuni antagonisti muscarinici portò a pensare che un aumento analogo potesse essere prodotto con gli agonisti, per esempio, con il neurotrasmettitore endogeno acetilcolina.

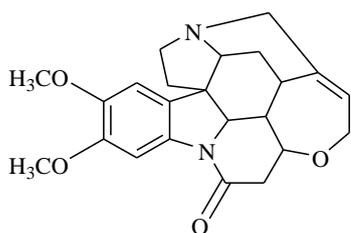
Successivamente, fu scoperto che la *stricnina*, precursore nella sintesi dell'alcuronio, aveva proprietà simili sul recettore muscarinico, come il suo dimero funzionale alcuronio.



Stricnina

Una caratterizzazione completa degli esperimenti di binding della stricnina fu fatta su tutti i sottotipi recettoriali muscarinici ^[64]. Gli effetti allosterici quando NMS o ACh sono legati al recettore sono stati studiati procedendo allo stesso modo. La stima delle affinità per il recettore libero e occupato è stata determinata e da questo la cooperatività che il modulatore esercita sul ligando (agonista o antagonista) ^[67,74]. La stricnina è una molecola più piccola (paragonata all'alcuronio) e lega con affinità simile i recettori M₁, M₃ e M₄ liberi, ma manifesta un'affinità sui recettori M₂ 10 volte più bassa dell'alcuronio.

La stricnina aumenta l'affinità dell'antagonista NMS sugli M₂ e sugli M₄, ha attività neutra sugli M₁ e inibisce l'affinità dell'NMS sugli M₃ ^[64]. Comunque su tutti i sottotipi



Brucina

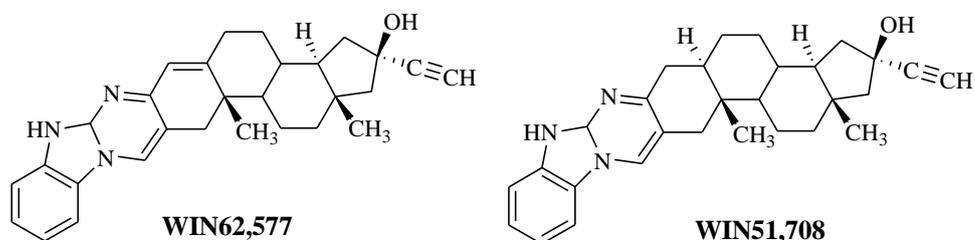
decrece l'affinità dell'ACh, dissociandosi quando il modulatore è presente ^[64,67]. Un altro alcaloide, con una struttura molto simile alla stricnina, è la *brucina* (10,11-dimetossistricnina). Sebbene essa legghi il recettore muscarinico con affinità molto più bassa della stricnina (2-10 volte minore), è stata il primo ligando allosterico a mostrare un aumento sia dell'affinità che della potenza funzionale dell'ACh sui recettori M₁ (anche se di sole 2 grandezze), essendo negativo o neutro sugli altri sottotipi ^[65].

In contrasto è riportato ^[67] che la brucina è positivamente cooperativa con l'ACh sugli M₃ come sugli M₁. E' stato trovato inoltre che un analogo quaternario della brucina, N-clorometilbrucina (CMB), incrementa il binding dell'ACh esclusivamente sugli M₃ di più di 3 grandezze, con cooperatività negativa o neutra sugli altri sottotipi. La selettività e l'azione allosterica della brucina e di CMB è stata confermata da studi funzionali

[65,41]. Questo composto ha dimostrato un diverso pattern di cooperatività con l'ACh e la [³H]-NMS attraverso i vari sottotipi. Altri analoghi N-sostituiti, come la brucina-N-ossido e N-benzilbrucina, sono stati studiati e mostrano una varietà di affinità e cooperatività con i diversi ligandi e sui diversi sottotipi, ma non ne emergono figure di SAR considerevoli [65,74].

1.1.11. Ligandi allosterici che legano il “sito WIN”

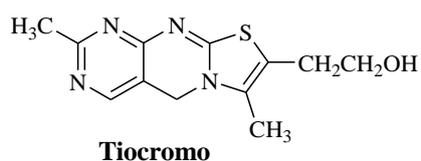
I composti WIN 62,577 e WIN 51,708, derivati di analoghi degli steroli, hanno contribuito a definire il secondo sito allosterico sul recettore muscarinico, indicato come “WIN site”, inoltre sono molecole interessanti poiché capaci di attraversare la barriera ematoencefalica e quindi di agire a livello centrale.



La localizzazione di questo secondo sito allosterico è però ancora sconosciuta, anche se è stato riportato che se un residuo del sottotipo recettoriale M₁, Tyr⁸², localizzato nel TM2, viene sostituito con Ala, si ha un incremento di affinità e cooperatività dei composti WIN con ACh [75]. Ciò indica che la tirosina potrebbe interferire con il legame di questi composti.

1.1.12. Altri siti allosterici

Lazareno et al. [76] hanno supposto che il recettore muscarinico potrebbe avere anche un

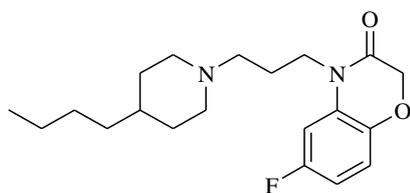


terzo sito allosterico; quello che lega il *tiocromo*, un prodotto di ossidazione della tiamina. Questo composto agisce allostericamente con i recettori

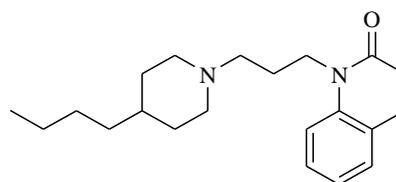
muscarinici causando un aumento dell'affinità dell'ACh verso il sottotipo hM₄, mentre non ha effetto sulla potenza e l'efficacia dell'ACh sui recettori hM₁, hM₂, hM₃, hM₅. E' proprio la sua struttura molto diversa dai precedenti modulatori allosterici suggerisce che questo si leghi ad un sito allosterico diverso.

1.1.13. Possibili applicazioni terapeutiche dei ligandi allosterici muscarinici per il trattamento di patologie del SNC

I recettori muscarinici sono da lungo tempo i target di molti farmaci usati per il trattamento di patologie che riguardano il sistema nervoso centrale come morbo Alzheimer, schizofrenia, disturbi cognitivi. In particolare il recettore hM₁ è un target molto promettente nella terapia del morbo d'Alzheimer, in quanto una sua attivazione può ridurre i livelli di proteina β amiloide contribuendo al miglioramento delle capacità cognitive. Ciò ha incoraggiato una intensa ricerca, fino ad oggi purtroppo senza successo, da parte delle industrie farmaceutiche diretta a portare sul mercato un agonista del recettore muscarinico hM₁ [77]. Tuttavia, gli sforzi di sviluppare agonisti del recettore muscarinico sottotipo selettivi sono stati ostacolati dalla difficoltà di ottenere un farmaco selettivo per ogni sottotipo muscarinico in quanto, come detti precedentemente, i siti ortosterici di hM₁, hM₃, hM₅, e hM₂, hM₄ sono molto simili tra loro. Migliori prospettive terapeutiche possono essere raggiunte con la scoperta di agonisti allosterici e modulatori allosterici selettivi per il recettore hM₁, in quanto con questo tipo di selettività possono essere evitati gli effetti avversi dovuti all'attivazione di recettori muscarinici periferici hM₂, hM₃, che includono bradicardia, disturbi gastrointestinali, eccessiva salivazione e sudorazione. Recentemente è stata sviluppata una serie di agonisti allosterici selettivi per il recettore hM₁: la molecola AC-42 e i suoi analoghi AC-260584, 77-LH-28-1 [78].

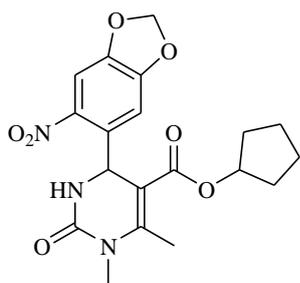


AC-260584

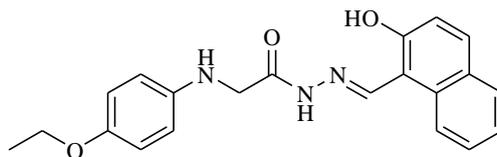


77-LH-28-1

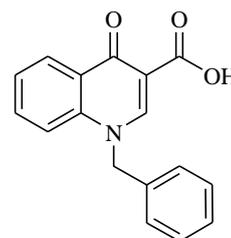
Inoltre sono stati scoperti nuovi modulatori positivi per il recettore hM₁ come la molecola VU0090157, VU0029767 e BQCA [79]. Nessuna di queste molecole ha presentato attività agonista o competitiva per il legame al sito ortosterico, ma inducono un aumento di affinità dell'acetilcolina per il sito ortosterico.



VU0090157



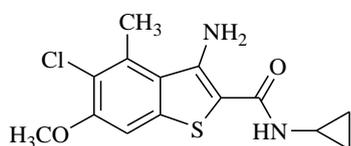
VU0029767



BQCA

Il BQCA (Benzyl Quinolone Carboxylic acid) è un innovativo esempio di modulatore allosterico positivo setettivo per il recettore muscarinico M₁. I residui Tyr-85^{2,64} a livello del II dominio trans membrana (TMII), Tyr-179 e Phe-182 a livello del II loop extracellulare e Glu-397^{7,32} e Trp-400^{7,35} a livello del TMVII, contribuiscono al binding pocket del BQCA col recettore M₁, paragonabilmente all'agonista ortosterico carbacolo. Quindi si può affermare che il binding pocket del BQCA si sovrappone parzialmente con il sito allosterico "principale" nella porzione extracellulare del M₁, suggerendo che un'alta selettività derivi o da un contatto addizionale oltre questa regione o tramite un meccanismo di cooperatività sottotipo-specifica. Mutazioni dei residui amminoacidici che costituiscono il sito allosterico causano una perdita della risposta al carbacolo che può essere compensata dal BQCA. Due residui, Leu-102^{3,29} e Asp-105^{3,32}, sono stati identificati come indiretti responsabili dell'affinità di binding del modulatore. Questa nuova intuizione nelle basi strutturali del binding e del meccanismo di interazione del BQCA possono guidare nel design di nuovi ligandi allosterici con adatte proprietà farmacologiche^[80].

La molecola BQCA, inoltre, reverte i danni indotti da scopolamina in esperimenti di contextual fear conditioning (CFC)^[79,81]. Questo suggerisce che potrebbero essere sviluppati modulatori allosterici selettivi per il recettore hM₁ con potenziali benefici



LY2033298

verso i disturbi cognitivi. Un altro agonista allosterico LY2033298, selettivo per il recettore hM₄, ha mostrato, in esperimenti condotti in vari modelli di roditori, una buona azione antipsicotica^[82]. Studi preliminari su animali di

questa e di altre molecole allosteriche ne stanno mostrando l'efficacia nel trattamento del morbo di Alzheimer, schizofrenia e altri disturbi a livello del SNC.

1.1.14. Ligandi bitopici: ortosterici ed allosterici

La classe di ligandi chiamati “bitopici”, “dualsterici” o “multivalenti” è stata sviluppata sull’idea di combinare l’alta affinità che la molecola può avere per il sito ortosterico con l’alta selettività per il sito allosterico. Il concetto è quello di non ricorrere alla co-somministrazione di due molecole bioattive separate, ma di unire entrambe le proprietà di riconoscimento ortosterico e allosterico in un singolo agente terapeutico, producendo

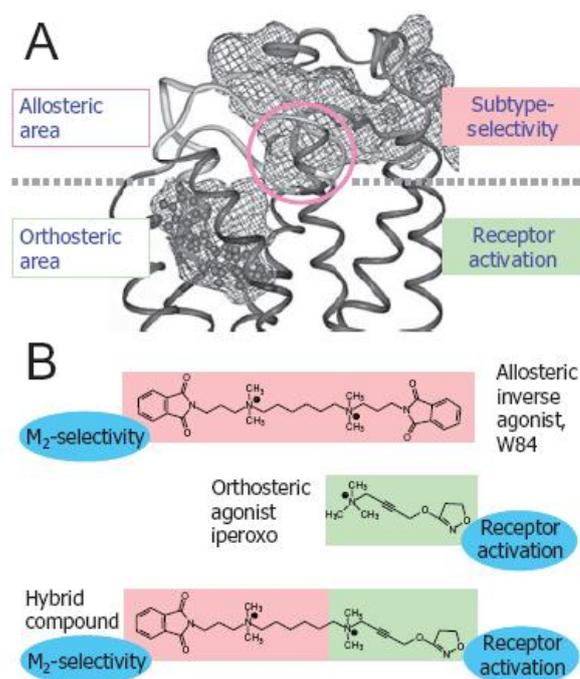


Figura 1.10: (A) rappresentazione della parte superiore del recettore M_2 . Il cerchio delimita l’area della regione allosterica. (B) Formule del composto allosterico che lega selettivamente il recettore, dell’ iperoxo che l’agonista ortosterico e della molecola ibrida^[87].

una molecola bitopica che collega due domini di legame topograficamente distinti. Finora per lo sviluppo e la caratterizzazione dei ligandi bitopici è stato preso come modello il recettore muscarinico, in letteratura vengono riportati studi limitati al recettore hM_2 di cui ci sono sostanziali dati farmacologici e di mutagenesi che confermano la presenza di almeno un sito allosterico che lega una piccola molecola^[83,84]. Nel 2004, Tahtaoui et al.^[85], hanno sintetizzato una serie di derivati fluorescenti della pirenzepina, un antagonista del recettore muscarinico hM_1 , e hanno usato esperimenti di Real-Time Fluorescence Monitoring per studiare le interazioni recettore-ligando. Gli autori hanno mostrato che questi analoghi potrebbero interagire sia con il sito di legame dell’acetilcolina (ortosterico) che con quello della brucina (allosterico) del recettore hM_1 , comportandosi quindi come potenziali ligandi bitopici. In letteratura vengono riportati anche progetti di molecole ibride formate da modulatori allosterici del recettore hM_2 , come il composto W84, e da agonisti o antagonisti ortosterici muscarinici per ottenere ligandi sottotipo selettivi con proprietà agonistiche o antagonistiche^[86] (fig.1.10).

una molecola bitopica che collega due domini di legame topograficamente distinti. Finora per lo sviluppo e la caratterizzazione dei ligandi bitopici è stato preso come modello il recettore muscarinico, in letteratura vengono riportati studi limitati al recettore hM_2 di cui ci sono sostanziali dati farmacologici e di mutagenesi che confermano la presenza di almeno un sito allosterico che lega una piccola molecola^[83,84]. Nel 2004, Tahtaoui et al.^[85], hanno sintetizzato una serie di derivati fluorescenti della pirenzepina, un antagonista del recettore muscarinico hM_1 , e hanno usato esperimenti di Real-Time Fluorescence Monitoring per studiare

In una recente pubblicazione Christopoulos e colleghi ^[88] mostrano che la molecola McN-A-343 (figura 1.11), parziale agonista per il recettore hM₂, risulta essere un ligando bitopico. Da questo studio aumenta l'intrigante questione se agonisti funzionalmente selettivi, riportati in precedenza in letteratura, rappresentino ligandi bitopici finora non compresi.

McN-A-343 è uno dei più conosciuti esempi di agonista del recettore muscarinico che mostra sostanziali differenze nell'efficacia per i sottotipi recettoriali: risulta essere un forte agonista del recettore hM₁ o hM₄, ma un debole agonista del recettore hM₂ ^[17].

Il meccanismo d'azione della molecola McN-A-343 è stato studiato per decenni, dato che la molecola può interagire allostericamente con il recettore hM₂ quando l'accesso al sito ortosterico è occupato dalla presenza dell'antagonista NMS ^[33,71,89], e allo stesso tempo presenta un'interazione di tipo competitivo con ligandi ortosterici, in particolare agonisti ^[33,90]. Da queste osservazioni e dal fatto che McN-A-343 mostra una struttura simile al carbacolo e all'oxotremorina, due noti agonisti ortosterici, Christopoulos e colleghi ^[90] hanno ipotizzato che il composto in esame potesse rappresentare una molecola ibrida composta da una porzione ortosterica e una allosterica (fig.1.11).

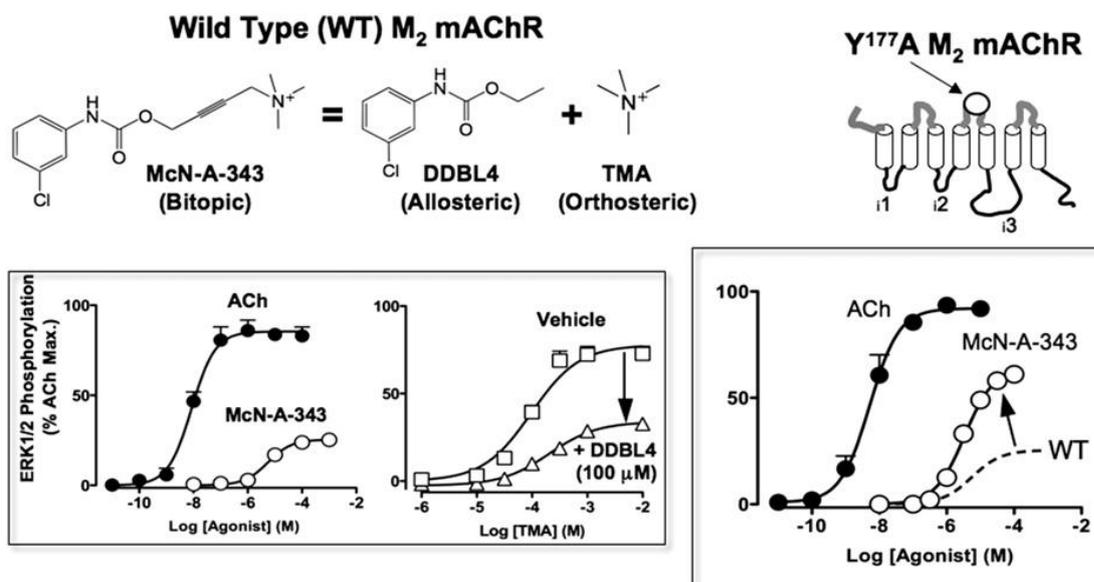


Figura 1.11: Strutture di McN-A-343, DDBL4, TMA; dimostrazione che McN-A-343 è un agonista bitopico con effetto di agonista parziale su M₂ mAChR. TMA, agonista ortosterico; DDBL4, modulatore allosterico negativo. I grafici rappresentano curve di concentrazione-risposta relative alla stimolazione di ERK1/2 in cellule CHO-FlpIn che esprimono stabilmente il recettore muscarinico hM₂ con mutazione Y177A. I dati rappresentano la media ± S.E.M. ottenuta da quattro esperimenti condotti in duplicato ^[88].

La porzione ortosterica è rappresentata dal tetrametilammonio (TMA) (figura 1.11) e risulta essere un agonista ortosterico per il recettore hM₂, mentre la porzione allosterica

è rappresentata dal 3-clorofenilcarbammato (DDBL4) (figura 1.11); quest'ultimo ha un sostanziale effetto allosterico negativo sulla segnalazione dell'efficacia del TMA, simile al debole agonismo parziale mostrato dallo stesso composto ibrido, McN-A-343.

E' stato dimostrato infatti che DDBL4 è in grado di agire, seppur debolmente, come un modulatore allosterico positivo nel binding della [³H]-NMS nel sottotipo M₂ e anche di ridurre l'affinità e l'efficacia intrinseche di TMA e acetilcolina in ERK1/2-phosphorilation assay. Altri studi hanno rivelato che una mutazione della Tyr¹⁷⁷ nel sottotipo M₂, un amminoacido del core allosterico ^[51], è capace di incrementare l'efficacia di McN-A-343 e di indebolire l'azione dei building blocks di tipo clorofenilcarbammici rispetto sia a un'inibizione allosterica della dissociazione della [³H]-NMS e sia a una diminuzione dell'efficacia intrinseca di quelli di tipo TMA o acetilcolinici. Altri esperimenti suggeriscono che la funzione clorofenilcarbammica è un *built-in allosteric quencher*: questa porzione della molecola, interagendo col sito allosterico, limita l'efficacia intrinseca di McN-A-343 mediata dall'interazione col sito ortosterico. Questa ipotesi è in linea con i risultati ottenuti da Disingrini et al. ^[91] che ipotizzano una perdita di efficacia degli agonisti ortosterici puri dopo la fusione con un building block di un agonista inverso allosterico ^[92].

Il comportamento bitopico della molecola, cioè il fatto che si leghi allo stesso tempo sia al sito ortosterico che al sito allosterico (fig. 1.12), è supportato dal fatto che una singola mutazione di un residuo di tirosina ad alanina (Y177A) nella seconda ansa del recettore muscarinico hM₂ a livello del sito allosterico, causa una diminuzione dell'effetto allosterico del DDBL4, portando a un incremento consistente dell'efficacia dovuta all'azione ortosterica del TMA.

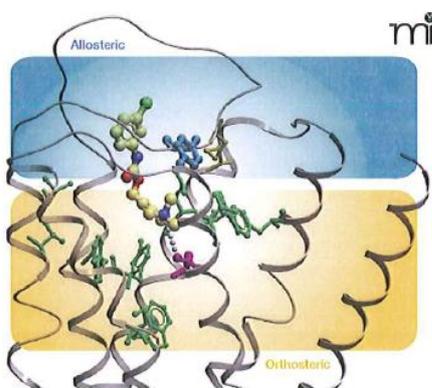
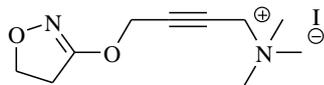


Figura 1.12: Modello molecolare bitopico del McN-A-343 al recettore muscarinico M₂. I residui verdi degli amminoacidi del sito ortosterico non interagiscono nel binding del McN-A-343. Il residuo viola è l'acido aspartico (D103) ortosterico del TM3 che agisce come contro ione per la testa ammonica quaternaria. Il residuo di tirosina blu (Y177) nella tasca allosterica, agisce sull'efficacia del McN-A-343 ^[93].

Successivamente, nel 2009, Antony e colleghi ^[91] hanno progettato e sintetizzato molecole ibride; differenti tipi di modulatori allosterici sono stati uniti con iperoxo, un agonista ortosterico del recettore muscarinico, confermando la validità del modello bitopico.



Iperoxo

Si può supporre che i ligandi bitopici mostrino un'aumentata affinità per il loro recettore rispetto all'affinità di legame dei singoli relativi farmacofori. Comunque, nello studio di Antony e colleghi ^[91], non è stato osservato l'aumento previsto dell'affinità di legame ma i due diversi ligandi bitopici hanno mostrato affinità simili a quelli dei corrispondenti farmacofori monovalenti allosterici e più basse rispetto a quelle del farmacoforo ortosterico, iperoxo.

Diverso invece è il caso del ligando bitopico THRX-160209 (figura 1.13), che ha un'affinità di legame per il recettore muscarinico hM₂ di diversi ordini di grandezza più alta rispetto sia alla porzione ortosterica (3-benzidril piperidina; 3-BHP) che a quella allosterica (4-aminobenzilpiperidina; 4-ABP) ^[94]. Tre evidenze suggeriscono un'interazione simultanea con il sito allosterico e quello ortosterico ^[92]:

- 1) l'affinità di binding del THRX-160209 (pK_i: 9.5) è più alta delle affinità di binding di ognuno dei building blocks testati separatamente (pK_i: 5.4 e 5.7 rispettivamente);
- 2) L'ordine delle affinità per i singoli sottotipi è quella tipica di un'interazione allosterica (M₂ > M₄ > M₁ > M₃ > M₅);
- 3) Il binding è sensibile a cambiamenti dei probes allosterici e ortosterici usati in concomitanza.

Le differenze notate tra i due studi possono riguardare le diversità nella natura dei farmacofori ortosterici e allosterici che sono stati combinati per dare i ligandi bitopici. La

porzione ortosterica (3-BHP) nel THRX-160209 è un antagonista e la porzione allosterica (4-ABP) è un modulatore allosterico negativo; entrambi i farmacofori potrebbero interagire preferenzialmente con uno stato simile, inattivo del recettore

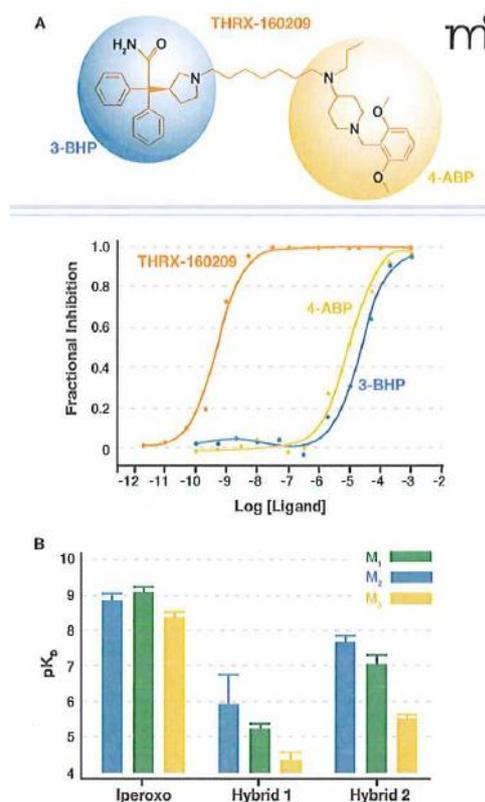


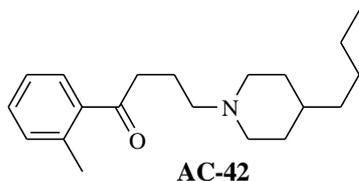
Figura 1.13: effetto del legante bitopico THRX-160209 e dei suoi costituenti ortosterico (3-BHP) e allosterico (4-ABP) sul binding di NMS al recettore M₂ ^[93].

muscarinico hM₂. Invece, le molecole ibride riportate nello studio di Antony e colleghi^[91] sono formate da un agonista ortosterico (ipeross) unito a un modulatore ortosterico negativo; è probabile che in questo caso, i farmacofori individuali preferiscano diversi stati recettoriali, sostenendo così un costo termodinamico per quanto riguarda la risultante affinità del ligando bitopico.

Comunque, nonostante una perdita complessiva nell'affinità di legame, le molecole bitopiche che sono state sviluppate manifestano notevolmente un'aumentata selettività per i recettori hM₂ rispetto i recettori hM₃ (si nota infatti un aumento di almeno due ordini di grandezza), ed anche una leggera preferenza rispetto i recettori hM₁^[91] (figura 1.13).

Recentemente è stato fatto un notevole passo avanti nella scoperta di nuove molecole riconosciute come agoniste del recettore muscarinico funzionalmente selettive come AC-42, AC-260584, 77-LH-28-1, N-desmetilclozapina e TBPB. Queste, risultate allosteriche^[33,78,95,96,97,98], potrebbero essere molecole bitopiche^[99] come è risultata essere bitopica la molecola McN-A-343.

Il prodotto AC-42 (Acadia Pharmaceuticals Compounds) attiva selettivamente il



sottotipo M₁ ed è stato dimostrato che legghi una nuova combinazione di residui tra la porzione N-terminale/TMI e le regioni EC3/TMVII. Diversi studi farmacologici hanno rivelato che AC-42 possiede caratteristiche tipiche

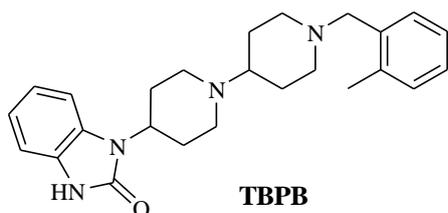
sia del meccanismo di azione ortosterico che allosterico. E' noto che mutazioni single point dei residui Y381A e W101A, residui chiave del sito ortosterico, che riducono l'affinità di tipici agonisti muscarinici ortosterici come la ACh e la pilocarpina, portano ad un incremento dell'affinità di AC-42 rispetto ai valori ottenuti nel recettore M₁ wild type^[100]. AC-42 potrebbe adottare un binding mode differente da quello degli agonisti non selettivi tradizionali, cioè uno che ponga AC-42 in stretta vicinanza al sito ortosterico, implicando che le sue proprietà agoniste derivino sia da interazioni con residui ortosterici tanto quanto con residui allosterici, rendendolo per definizione un ligando di tipo bitopico. Un suo analogo strutturale, AC-260584^[101], si è dimostrato più potente ed efficace, con lo stesso grado di selettività per il sottotipo M₁ ma con l'ulteriore vantaggio della biodisponibilità orale in modelli murini e l'esibizione di effetti antipsicotici e procognitivi in modelli animali di schizofrenia e AD.

77-LH-28-1 è un composto selettivo M₁, come già introdotto nel paragrafo 1.1.13., strutturalmente correlato ai composti AC, che dimostra caratteristiche agoniste per i

recettori M_1 in studi in vitro su recettori M_1 di ippocampo di ratto e in vivo in simulazioni del cell firing sempre su ippocampo di ratto [97].

L'affinità di 77-LH-28-1, come di AC-42, aumenta nel recettore M_1 quando presenti mutazioni al sito ortosterico di Y381A e W101A rispetto al recettore wild-type.

La N-Desmetilclozapina è un metabolita della Clozapina, antipsicotico di seconda generazione conosciuto per la sua insuperata efficacia come trattamento sia per i sintomi positivi che per quelli negativi della schizofrenia, noto anche per un'attività promiscua off-target che lo ha reso un'opzione terapeutica rischiosa; il metabolita contribuisce al particolare profilo terapeutico del suo precursore. Seguendo una valutazione degli effetti di questo metabolita sui recettori mAChRs umani clonati [102], la N-desmetilclozapina è descritta come un agonista allosterico con parziale selettività per il sottotipo M_1 , che indirettamente facilita anche il potenziamento dell'attività dei recettori NMDA. In esperimenti di binding, la N-desmetilclozapina ha dimostrato un'interazione competitiva con la Brucina, noto ligando allosterico M_1 selettivo, suggerendo una sua attività di tipo allosterico; comunque, la sua attività in esperimenti di mobilitazione del Ca^{2+} è completamente bloccata quando incubata con atropina, suggerendo così anche un'interazione con il sito ortosterico. Queste osservazioni indicano sicuramente che il ligando possiede interazioni di tipo bitopico. Confrontandolo con gli scaffold dei composti riportati fino a ora, il TBPB rappresenta un ligando muscarinico strutturalmente unico, che esibisce selettività per il sottotipo M_1 a livello funzionale.



Il TBPB dimostra comportamento agonista e in vitro potenzia le correnti dei recettori NMDA [96] nei recettori M_1 di ippocampo di ratto, è dimostrato anche che promuove un processo non amiloidogenico in cellule PC12, misurato tramite una diminuzione dei livelli di $A\beta_{42}$ e in un aumento dei metaboliti dell' α -secretasi. Inoltre, il TPBP è responsabile di un'attività antipsicotica in modelli murini di schizofrenia. In esperimenti di mobilitazione del calcio il TPBP mostra una competizione apparentemente non competitiva con l'antagonista ortosterico atropina. Comunque, questo tipo di esperimenti non tiene conto del ligando in uno stato di equilibrio, quindi non conferma un'interazione di tipo allosterico. Inoltre la modulazione TPBP-mediata nel processo APP in cellule PC12 che esprimono il recettore hM_1 è completamente bloccata dall'atropina [96]; ciò può essere sia il risultato di un alto grado di cooperatività

negativa tra i due ligandi quando legano in modo concomitante il sito ortosterico (atropina) e il sito allosterico (TPBP), o l'evidenza di una interazione competitiva. Anche studi SAR su questo scaffold non hanno portato a ulteriori chiarimenti, infatti un ampio range di sostituzioni sia sull' azoto basico distale della piperidina sia dell'anello benzilico fuso hanno portato a composti con minor potenza e selettività negli M₁ e una indesiderabile attività off-target. Molto interessante si è dimostrato essere uno studio sui molecular switches nella molecola TPBP che convertono il ligando da agonista allosterico selettivo a un pan-mAChR antagonista ortosterico. Sorprendentemente, l'aggiunta di un singolo atomo di fluoro sull'anello piperidinico centrale è sufficiente per distruggere un'interazione critica per il binding allosterico. Questo risultato, unito a quelli ottenuti negli esperimenti di mobilitazione del calcio che dimostrano che il TPBP si comporta da antagonista ortosterico sui restanti sottotipi recettoriali muscarinici, ha portato alla prima classificazione del TPBP come ligando bitopico; ancora oggi sono in corso ulteriori indagini farmacologiche di supporto per meglio confermare questa classificazione.

1.2. Sostanze dotate di attività nootropica

1.2.1. DM232, DM235 ed analoghi strutturali

La progettazione e sintesi di sostanze dotate di attività nootropica che originano da modificazioni molecolari di derivati del Piracetam è da molto tempo ormai oggetto di studio del gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di dottorato.

Questo produttivo filone di ricerca ha avuto inizio nell'anno 2000 quando furono sintetizzati una serie di 1,4-diazabicyclo[4.3.0]nonan-9-oni, molecole in cui la porzione 2-oxopirrolidinica, che era tipica dei derivati del piracetam della I generazione, è stata ibridata e quindi condensata con un ciclo piperazinico. Fu progettata e sintetizzata una serie di derivati^[103] (Figura 2.1 A) nei quali sull'azoto piperazinico furono introdotti gruppi aromatici recanti un residuo acilico o solfonilico. In questo modo si ottennero molecole non basiche e lipofile che si rivelarono capaci di oltrepassare la barriera ematoencefalica. Lo screening farmacologico di tali composti, effettuato tramite il *mouse passive avoidance test*^[104], fu in grado di evidenziare la potenza di DM232, in

seguito denominato Unifiram ^[103] (Figura 2.1 B), attivo alla Minima Dose Efficace di 0.001 mg/kg s.c., quattro ordini di grandezza più bassa di quella del piracetam.

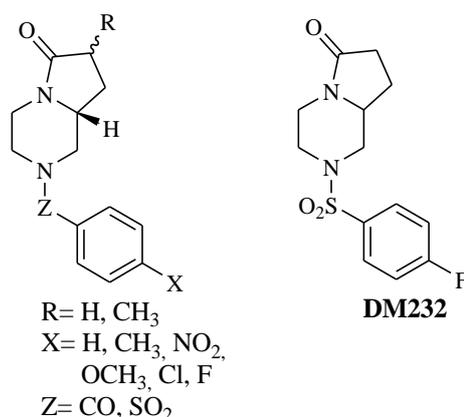


Figura 2.1: A: 4-acil o solfonil-1,4- diazabicyclo[4.3.0]nonan-9-oni. B: DM232 (Unifiram)

Successivamente furono riportate in letteratura le proprietà nootrope dei derivati FK960 ^[105] e FR121196 ^[106], dovute al potenziamento della trasmissione somatostatinergerica (Figura 2.2).

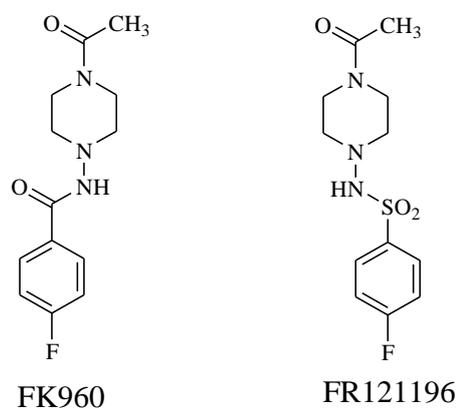


Figura 2.2: Nootropi che interagiscono con i recettori della somatostatina

La somiglianza strutturale di quest'ultime molecole con i derivati biciclici precedentemente sintetizzati suggerì la sintesi dei loro derivati di semplificazione molecolare e cioè di molecole a struttura diacilpiperazinica ^[103] (Figura 2.3 A). Lo screening farmacologico di queste nuove molecole, realizzato sempre attraverso il *passive avoidance test* ^[104], mise in luce la potenza di un secondo composto, il DM235 (Sunifiram) ^[103] (Figura 2.3 B), attivo, come DM232, alla Minima Dose Efficace di 0.001 mg/kg s.c.

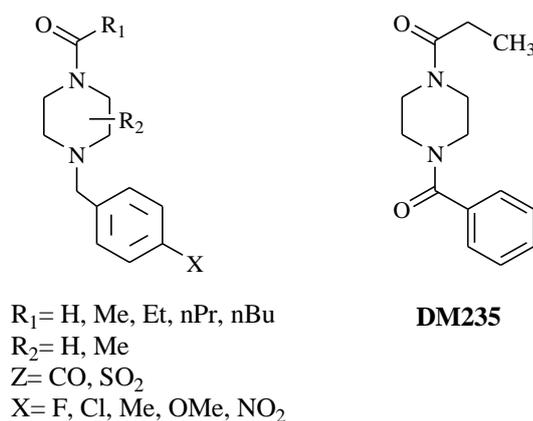


Figura 2.3: A: molecole a struttura diacylpiperazinica. B: DM235 (Sunifiram)

Risultò evidente che erano state individuate due nuove classi di potenti *cognition enhancers* i cui capostipiti erano Unifiram (DM232), strutturalmente correlato al piracetam per la presenza di una porzione 2-oxopirrolidinica, e Sunifiram (DM235), analoga diacylpiperazina derivante da semplificazione molecolare di tale porzione.

La struttura di DM232, come già detto, può essere correlata a quella del piracetam per la presenza di una porzione 2-oxopirrolidinica, tuttavia, tale anello non è indispensabile per l'attività: infatti DM235 può essere considerato un derivato di apertura del ciclo. Questa caratteristica è diversa rispetto agli analoghi del piracetam, per i quali l'anello pirrolidinico è essenziale ^[107]. Altra importante differenza è la potenza: Unifiram, Sunifiram e molti altri derivati hanno una potenza di vari ordini di grandezza superiore a quella del piracetam e dei suoi analoghi.

Ciò che invece accumuna i derivati piperazinici al piracetam e ai suoi derivati è la mancanza di conoscenza del loro meccanismo di azione. Tale caratteristica ha da sempre reso controverso l'uso del piracetam e dei suoi analoghi, anche perchè il meccanismo d'azione, individuato per alcuni composti, non è comune a tutti i membri della classe (Figura 2.4): infatti, per alcuni derivati è stata dimostrata l'attività modulatoria di alcuni sistemi di neurotrasmettitori, ad esempio colinergico o glutamatergico ^[108].

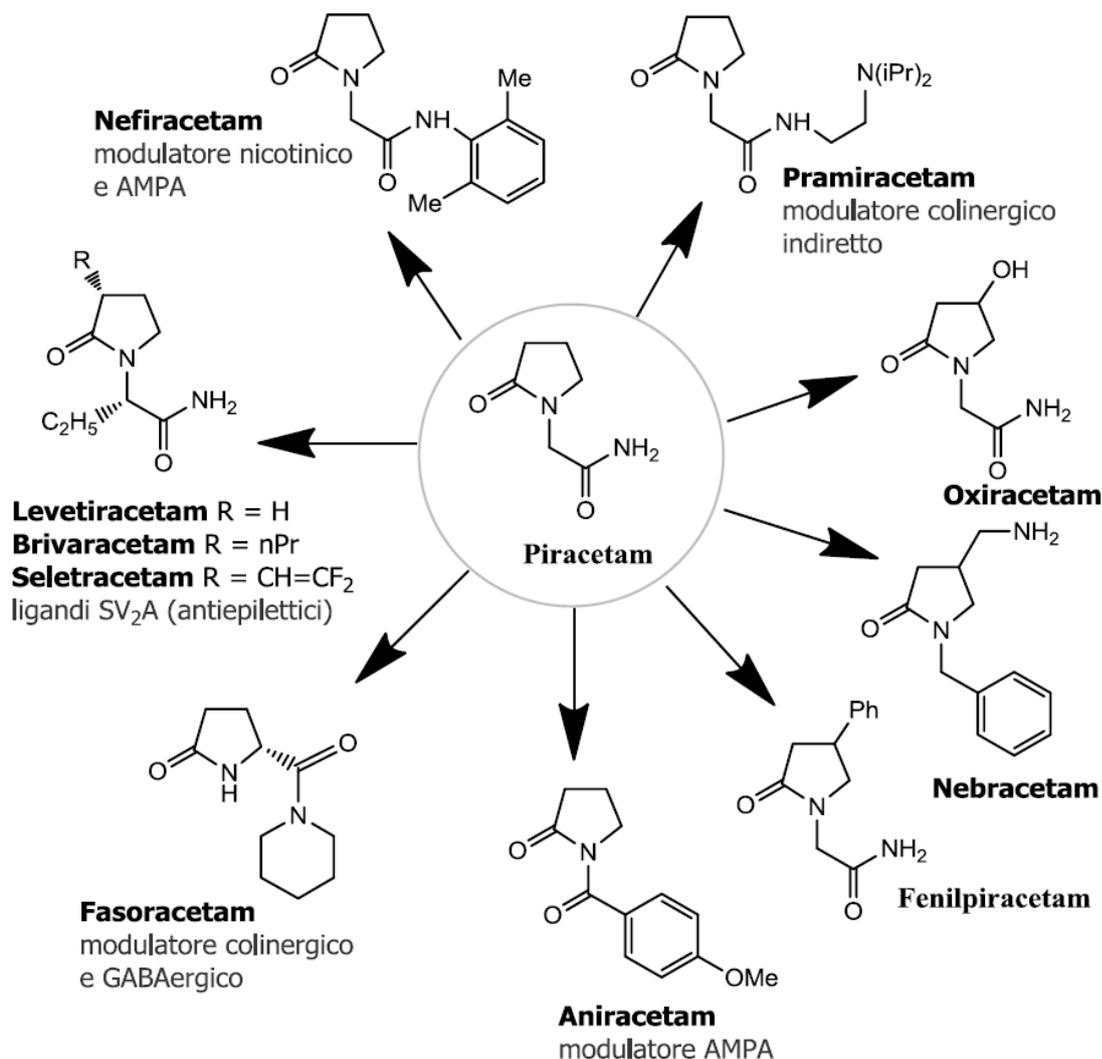


Figura 2.4: Strutture del piracetam e dei suoi derivati

Le ipotesi sul meccanismo d'azione del piracetam restano comunque molteplici. Tra i vari meccanismi proposti si ritrovano: la modulazione di canali ionici e di recettori ionotropici e metabotropici, tra cui molto importanti sono i recettori colinergici e glutamatergici, infatti è stato proposto un ruolo di queste sostanze nei meccanismi metabolici che producono energia, una azione GABA-mimetica, una azione antiossidante e neuroprotettiva, dimostrata, quest'ultima, in diversi modelli sperimentali^[109, 110].

Il piracetam e l'aniracetam sono stati inoltre cristallizzati all'interno della parte extracellulare del recettore AMPA, dimostrando che queste molecole possono interagire con questo recettore ionotropico^[111]; tuttavia, mentre questa interazione sembra fondamentale per l'azione biologica di aniracetam, la debole attività del piracetam su

questo recettore suggerisce che questo non è il meccanismo di azione principale di questa molecola.

Tra gli analoghi del piracetam riportati in figura 2.4 si trovano anche alcuni composti ad azione antiepilettica, una caratteristica presente solo in alcune molecole di questa serie, in grado di legarsi ad una proteina della vescicola sinaptica detta 2A, coinvolta nel rilascio di neurotrasmettitori; tra queste molecole, il levetiracetam è stato approvato per la terapia, mentre brivaracetam e seletracetam sono ancora in sperimentazione. Queste molecole sono caratterizzate dalla presenza di due centri stereogenici, uno sulla catena laterale e l'altro sull'anello, importanti per l'azione antiepilettica ^[112]. Il levetiracetam ha mostrato efficacia nel migliorare alcune funzioni cognitive in pazienti affetti da glioma ^[113] o da emorragia intracranica ^[114] o in pazienti epilettici ^[115], attività che lo distingue dagli altri farmaci antiepilettici ^[116].

Come per il piracetam e i suoi analoghi, anche per quanto riguarda la classe delle piperazine, sono stati fatti molti esperimenti per caratterizzarne il profilo farmacologico e comprenderne il meccanismo di azione. Unifiram e Sunifiram, nel *passive avoidance test*, si dimostrano in grado di revertire l'amnesia indotta da un'ampia serie di farmaci amnesizzanti con uno spettro di potenza simile a quello esibito nei confronti della scopolamina (1.5 mg/kg i.p.); in particolare hanno protetto l'animale dall'azione amnesizzante di antagonisti nicotinici (20 mg/Kg i.p. di mecamilamina), di agonisti GABA_B (2 mg/Kg i.p. di baclofen) e di agonisti α 2-adrenergici (0.125 mg/Kg i.p. di clonidina) ^[117]. Alle dosi alle quali producono attività anti-amnesica non alterano il comportamento e la coordinazione motoria (*rotating test*) né il comportamento esploratorio spontaneo (*hole-board test*), dimostrando di essere ben tollerati. Unifiram e Sunifiram sono in grado di incrementare il release di acetilcolina a livello cerebrale (misurato sulla corteccia cerebrale di ratto in esperimenti di microdialisi), potenziando quindi la trasmissione colinergica, sia muscarinica che nicotinic ^[103]. Questa azione potrebbe spiegare sia l'azione nootropa di queste sostanze, come anche la loro azione analgesica centrale, misurata attraverso il test della piastra calda ^[117].

L'azione di Unifiram e Sunifiram sembra legata non solo al sistema colinergico, ma anche alla trasmissione glutamatergica. Infatti, queste molecole sono attive nel test del chinurenato, un test in vitro effettuato su fettine di ippocampo di ratto, che serve ad evidenziare la modulazione del recettore AMPA, ma che coinvolge anche l'attività del recettore NMDA. In effetti, registrazioni extracellulari di potenziali postsinaptici eccitatori di campo (fEPSP) nella regione CA1 di fettine di ippocampo di ratto hanno

reso possibile evidenziare per DM232 un potenziamento delle correnti AMPA con una EC_{50} di 27 ± 6 nM ^[118]. Tuttavia, una interazione diretta di DM235 con il recettore AMPA non è stata ancora provata: studi di elettrofisiologia su sistemi ricombinanti infatti non hanno mostrato alcuna modulazione di questo recettore ^[119]. In tempi recenti alcuni ricercatori giapponesi ^[120,121] hanno studiato l'effetto di Sunifiram in topi nei quali era stato rimosso il bulbo olfattorio. Questo modello sperimentale riproduce la ipofunzionalità di questo organo caratteristica di malati di Alzheimer, dovuta alla presenza di placche senili che causano una degenerazione dei neuroni colinergici nel setto mediale, che porta ad una diminuzione della attività colinergica nell'ippocampo. In queste condizioni Sunifiram è in grado di migliorare alcuni processi di memoria (memoria spaziale e memoria al breve termine), misurati attraverso specifici test comportamentali, e di ripristinare ai livelli di controllo il processo della long term potentiation (LTP), l'autofosforilazione della calmodulina CaMKII α e della PKC α , nonché la fosforilazione delle subunità GluR1 del recettore AMPA e di NR1 del recettore NMDA. In fettine di ippocampo di topo, sunifiram a 10–100 nM incrementa in maniera significativa la LTP; la curva dose-risposta è la caratteristica curva a campana, con un picco a 10 nM. Studi con antagonisti hanno suggerito che fosse coinvolto il sito di binding della glicina. Studi condotti su adipociti di ratto hanno mostrato un effetto insulino-simile di DM235. Infatti Sunifiram promuove il rilascio di N-ossido probabilmente attivando il recettore nicotinico $\alpha 7$, dal momento che questo effetto è bloccato da metillicaconitina, antagonista specifico per questo recettore. Inoltre, anche l'agonista selettivo $\alpha 7$ PNU120596 dà lo stesso effetto. La stimolazione di questo recettore induce l'attivazione della PLC- β e la mobilizzazione del calcio intracellulare dai depositi sarcoplasmatici ^[122]. Anche in questo caso però non è stato possibile dimostrare un'interazione diretta di DM235 con i recettori $\alpha 7$; studi di elettrofisiologia su recettori di ratto espressi in oociti di *Xenopus Laevis* non hanno evidenziato alcuna attività agonista o potenziatrice ^[123].

Infine, DM235 stimola l'uptake di glucosio all'interno degli adipociti con un meccanismo dipendente dalla presenza di calcio extracellulare e non influenzato dall'attivazione di recettori nicotinici. Da questi risultati si può quindi ipotizzare che DM235 sia una molecola in grado di spiegare le proprie azioni metaboliche mediante l'attivazione di più di un bersaglio cellulare. Nonostante, quindi, diversi aspetti del meccanismo molecolare di DM235 rimangano tuttora da chiarire, gli ultimi risultati sono particolarmente interessanti in quanto la capacità di attivare il metabolismo

cellulare potrebbe concorrere in maniera importante all'effetto nootropo di DM235, anche se questo rimane ancora da provare sperimentalmente. Viste tali premesse, DM232 e DM235 sono quindi diventati composti lead su cui, negli ultimi anni, sono state effettuate moltissime modificazioni strutturali al fine di chiarire le corrette relazioni struttura-attività. Purtroppo, l'unica maniera di saggiare l'attività di queste sostanze è il *passive avoidance test*, quindi un saggio in vivo. Quello che va sempre ricordato è che uno screening preliminare *in vivo* non può consentire di stilare relazioni struttura-attività realmente significative, in quanto l'attività biologica che si registra è conseguenza sia delle proprietà farmacocinetiche che delle proprietà farmacodinamiche delle molecole, che possono essere diversamente influenzate dalla medesima modificazione strutturale.

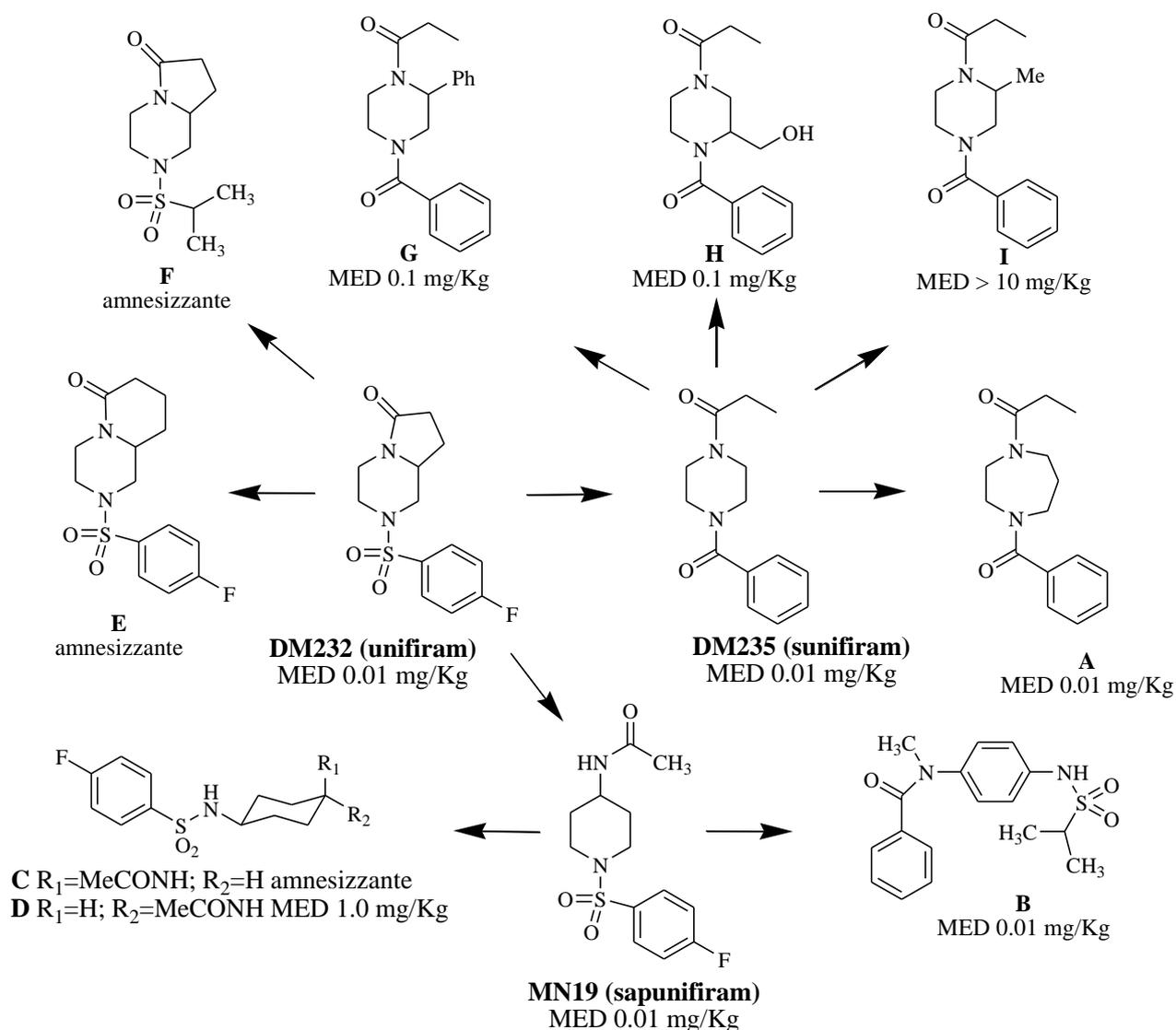


Figura 2.5: Strutture di DM232 e DM235 e dei composti ad essi strutturalmente correlati.

Come detto, sono stati sintetizzati molti analoghi strutturali che hanno ulteriormente dimostrato la buona attività di questa classe di composti: ad esempio (Fig. 2.5) MN19 (Sapunifiram), dove un gruppo ammidico è stato portato fuori dal ciclo piperazinico, oppure **A**, il derivato di espansione d'anello, e **B**, in cui i due gruppi ammidici, entrambi essenziali per l'attività, sono uniti da un anello aromatico; tutti questi composti sono risultati attivi alla dose di 0.01 mg/kg.

A volte invece sono emerse proprietà opposte, comunque interessanti: per esempio, alcuni analoghi strutturali (**C** e **F**, Fig. 2.5) sono in grado di indurre amnesia nel topo, cioè una azione opposta a quella nootropica. In particolare è da notare come **D**, con isomeria *cis*, ha azione amnesizzante, mentre **E**, il suo isomero *trans*, è nootropo con una MED di 1 mg/kg; questo fatto suggerisce che queste molecole siano in grado di modulare lo stesso bersaglio o meccanismo molecolare ma in maniera opposta.

L'introduzione di un sostituente sull'anello piperazinico ha anche portato a prodotti interessanti: per esempio **G** si è mostrato attivo a dosi di 0.1 mg/kg, così come il derivato idrossimetilico **H**, mentre l'analogo che presente un metile al posto del fenile (**I**) è privo di attività. Questo dimostra che sull'anello possono essere tollerati sostituenti di varia natura, lipofila e non. Come abbiamo visto precedentemente per i derivati del piracetam, anche in quel caso l'introduzione di un sostituente di varia natura sull'anello pirrolidinonico aveva portato a prodotti interessanti.

Inoltre poichè Unifiram possiede un centro stereogenico, si è ritenuto di poter ricavare utili informazioni dalla sintesi dei suoi enantiomeri. Questi sono stati ottenuti, a partire da (R) ed (S)-5-idrossimetil-2-pirrolidinone, con un eccesso enantiomerico del 99.9%. In tutti i test eseguiti (*mouse passive avoidance test*^[104], *social learning test*^[124] *ACh release*) la forma (R), [(+)-R-**I**], ha mostrato potenza superiore all'enantiomero (S), essendo in grado di provocare gli stessi effetti a dosi da 3 a 10 volte inferiori.

Da questi dati si può evincere che per garantire una buona attività nootropica, la struttura diammidica va mantenuta perchè, come evidenziato da precedenti risultati, si è rivelata caratteristica strutturale fondamentale per mantenere una potente azione nootropica. Dal momento che l'introduzione di un gruppo carbonilico all'interno del ciclo piperazinico è sfavorevole per l'attività, al fine di avere elevata attività nootropica quindi è importante che le porzioni aciliche di entrambe le funzioni ammidiche risultino esocicliche. Da altre modificazioni strutturali che qui non sono riportate è emerso anche che le due funzioni ammidiche, devono essere ad una distanza di almeno 2-3 atomi di carbonio tra di loro, e che l'anello deve essere a 6 o 7 termini (piperazine ed omopiperazine); infatti

nei prodotti delle serie esaidropirimidinica e imidazolidinica i due atomi di azoto ammidici sono separati solo da un atomo di carbonio e dunque troppo vicini per consentire alla molecola una corretta interazione con il target.

2. SCOPO DEL LAVORO

2.1. Ligandi Muscarinici

Allo scopo di trovare ligandi di tipo allosterico/bitopico sono state preparate diverse serie di dimeri dell'agonista colinergico Carbacolo, (Figura 1) in cui le unità di agonista sono legate, in posizioni diverse, tramite una catena polimetilenica di lunghezza variabile (composti **1-4**). Per derivare le relazioni struttura attività in questa classe di composti sono stati anche sintetizzati ibridi (**5**) e composti contenenti solo una unità di carbacolo (derivati **6-9**). Una reazione collaterale inaspettata ha portato anche ai derivati **10**. Alcuni di questi composti erano già stati sintetizzati nel laboratorio in cui ho svolto la mia tesi di dottorato, ma dal momento che avevano dato risultati interessanti si è reso necessario riprepararli per completarne la caratterizzazione biologica e approfondirne il profilo farmacologico.

Sempre nell'ambito dei ligandi muscarinici, è stato sintetizzato anche il prodotto **11**, un derivato di ibridazione del carbacolo con BQCA (benzyl quinolone carboxylic acid), agonista muscarinico allosterico selettivo per il sottotipo recettoriale hM₁^[125].

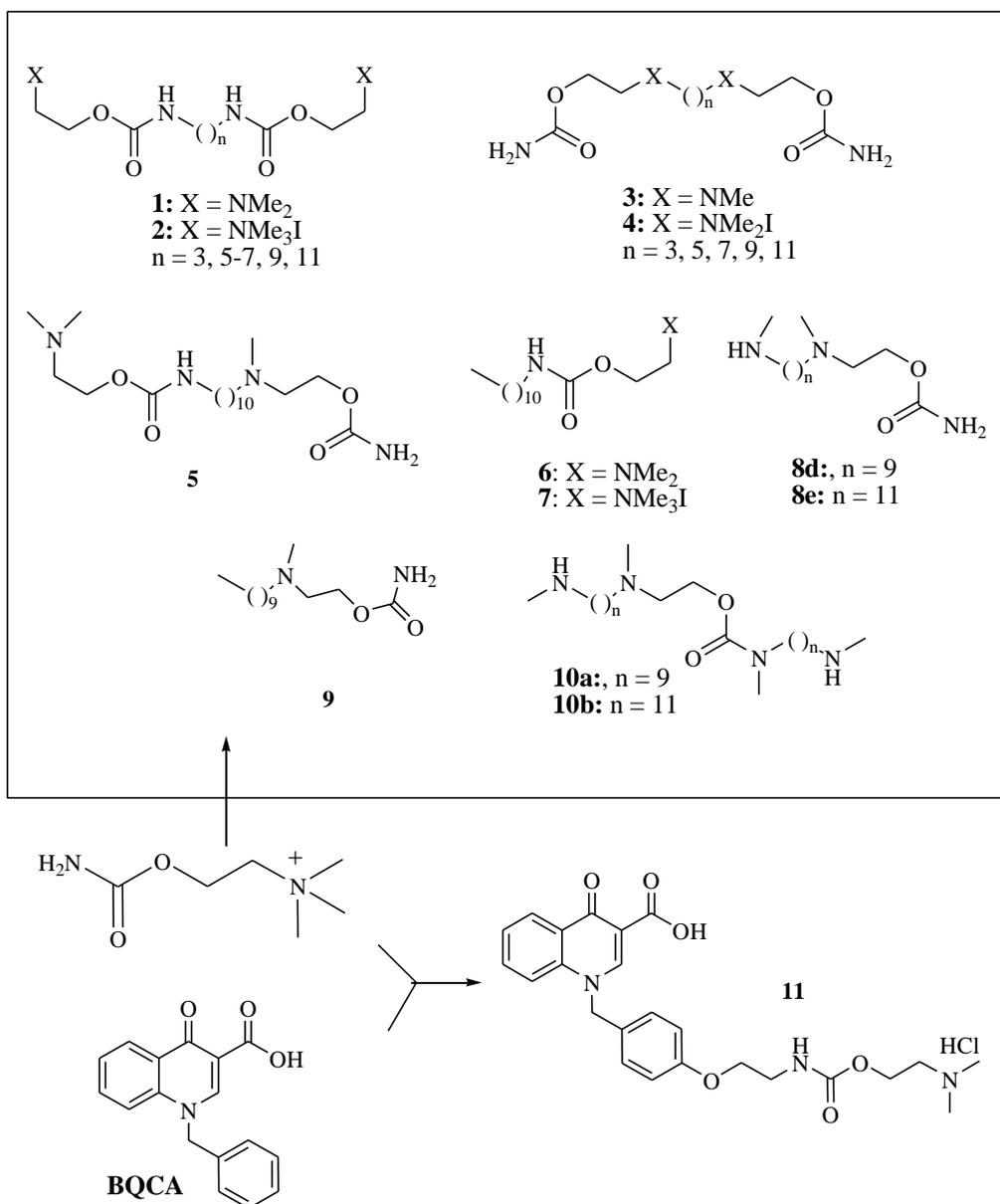


Figura 2.1: strutture del carbacolo, BQCA e dei derivati sintetizzati.

2.2. Modulatore indiretti dei recettori colinergici ad azione nootropica

I nuovi analoghi di DM235 e DM194, sintetizzati nel corso del mio dottorato, sono stati progettati in base a diverse strategie. Nei derivati di formula generale I, riportati in Figura 2, è stato inserito sull'anello piperazinico un gruppo elettron ricco, cioè un gruppo idrossimetilico in grado di formare legame idrogeno. Per migliorare la lipofilia delle molecole, che devono attraversare la barriera ematoencefalica, il gruppo alcolico

è stato trasformato anche in etere o estere. Nei derivati di formula generale II invece è stato applicato l'approccio del raddoppiamento molecolare; 2 unità di DM235 sono state unite attraverso il residuo aromatico benzoilico. Infine, le strutture di DM235 e MN19 sono state ibridate a dare i derivati III. Per i derivati più interessanti con formula generale I sono stati studiati gli enantiomeri; sono stati preparati e saggiati anche gli enantiomeri di ELF11, un derivato di DM235 che aveva dimostrato una buona potenza nootropica.

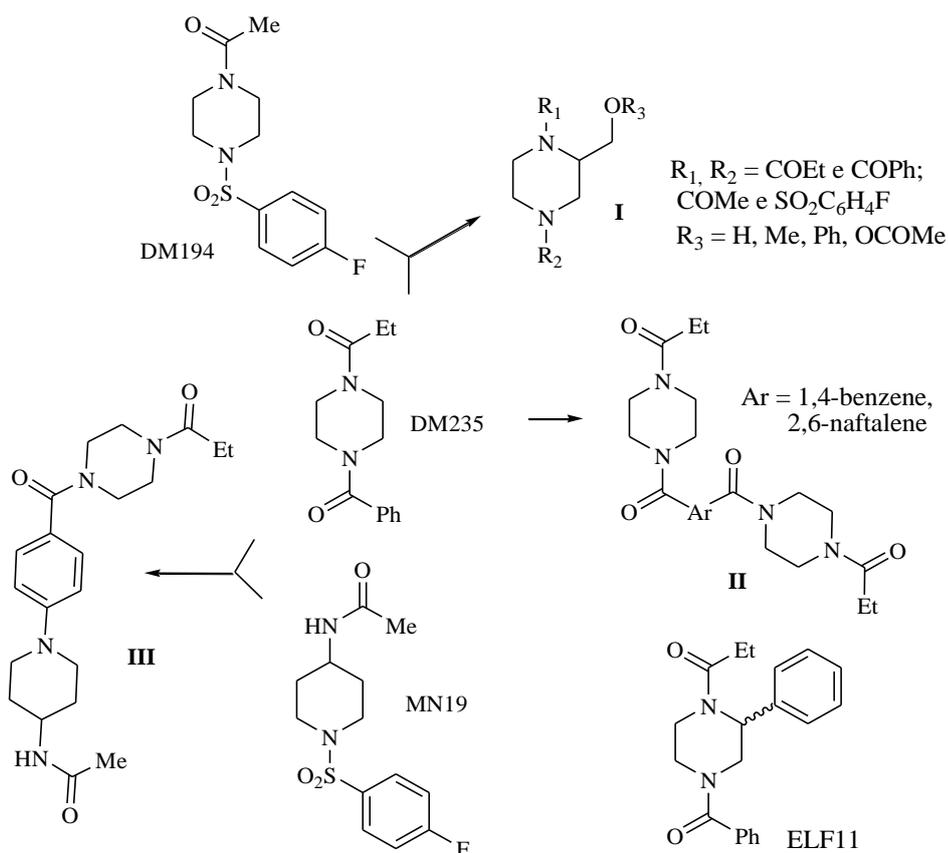


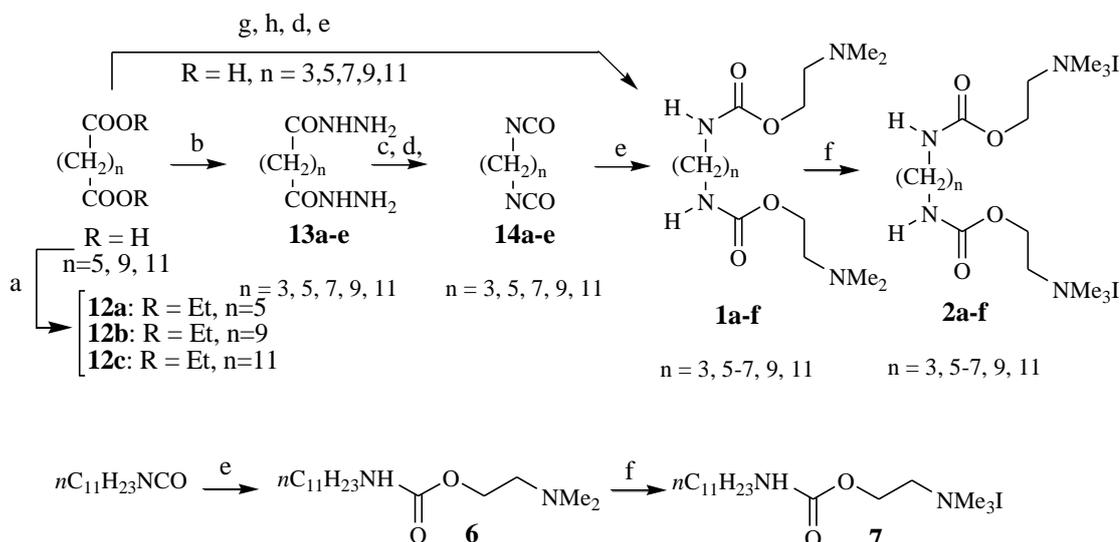
Figura 2.2: Strutture delle nuove molecole ad attività nootropica sintetizzate.

3. PARTE CHIMICA

4.1. Ligandi muscarinici derivati dal carbacolo

Nella prima serie riportata in Figura 2.1 (prodotti **1a-f** e **2a-f**) sono presenti due residui di (dimetilamino)etil carbammato i cui atomi di azoto carbammici sono legati da una catena metilenica con lunghezza variabile ($n = 3, 5-7, 9, 11$); i composti sono stati preparati come basi libere o come iodometilati e la loro sintesi è riportata nello Schema 1.

Schema 1



a) EtOH, H₂SO₄; b) NH₂NH₂; c) HNO₂, CHCl₃; d) D; e) Me₂NCH₂CH₂OH; f) MeI; g) SOCl₂; h) NaN₃, acetone.

Originariamente la sintesi di questi composti partiva dal dietil estere dell'opportuno acido alcandicarbossilico, disponibile in commercio per $n = 3$ o 7 , o preparato partendo dall'acido carbossilico commerciale per trattamento con trietil ortoacetato (**12a-c**, $n = 5, 9, 11$)^[126-128]; questi esteri venivano fatti reagire con idrazina per dare i composti **13a-e**^[129-132], poi con acido nitroso in cloroformio a dare le corrispondenti acilazidi, che non venivano isolate, ma trasformate nei corrispondenti diisocyanati **14a-e**^[129,132,133] tramite riarrangiamento di Curtius^[129]. La reazione con dimetilamminoetanolo portava ai carbammati **1a-e**. Il composto **4f** ($n = 6$)^[134] era stato sintetizzato allo stesso modo

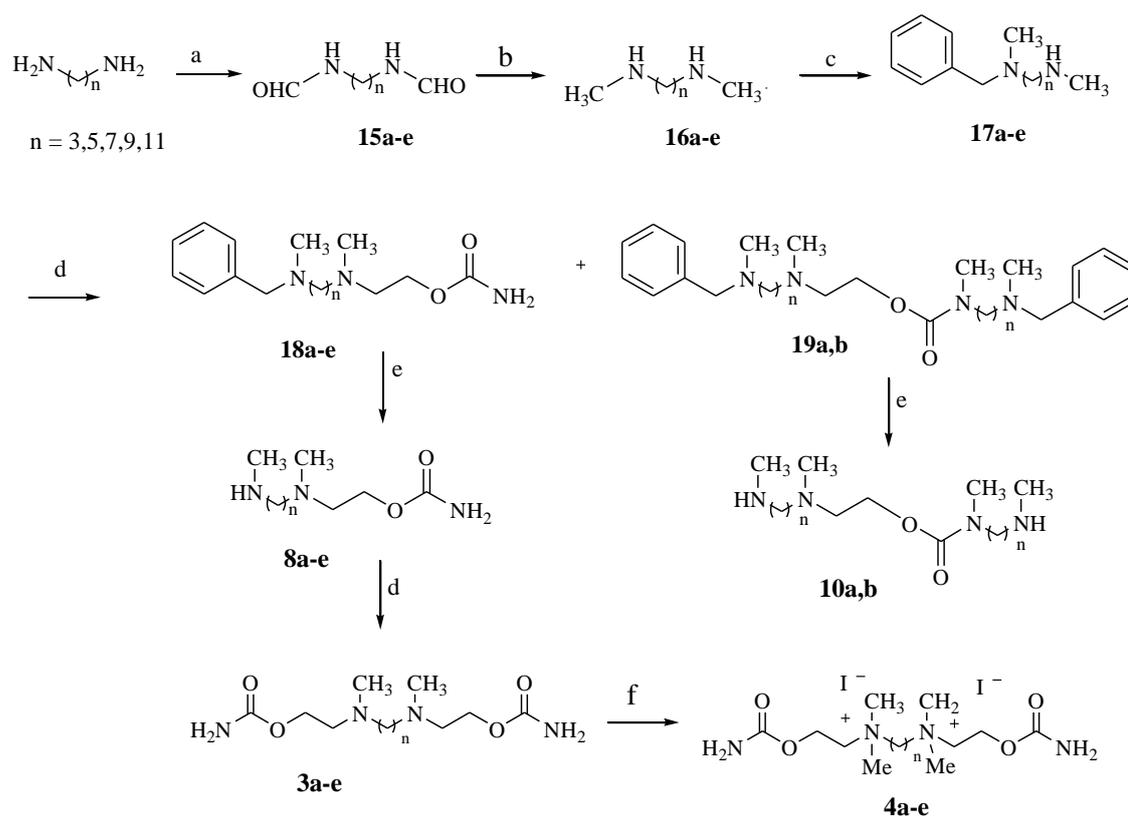
partendo dal 1,6-esandiisocianato commerciale. Al momento di dover risintetizzare tali prodotti, è stata preferita un'altra via sintetica che permette di ottenere i composti **1a-e** in maniera più semplice e con un incremento delle rese totali. In particolare, la via adottata ha previsto la preparazione delle acilazidi per trattamento degli acidi alcandicarbossilici corrispondenti prima con tionilcloruro e dopo con sodio azide in acetone; la solita trasposizione a caldo ha condotto ai corrispondenti diisocianati che, fatti direttamente reagire con dimetilamminoetanolo, hanno dato i composti finali desiderati. I carbammati **1a-f** sono stati trasformati nei corrispondenti sali ammonici quaternari **2a-f** per trattamento con metil ioduro.

Al fine di approfondire gli studi sull'importanza della posizione e della presenza di entrambi i residui carbammici è stato sintetizzato anche il composto **6** (Schema 1): l'1-isocianundecano è stato trattato con dimetilamminoetanolo a dare il 2-(dimetilammino)etilundecilcarbammato **6**, che è stato trasformato nel corrispondente iodometilato **7** come già visto per gli altri prodotti.

La seconda serie di composti riportati in Figura 1 (prodotti **3a-e** e **4a-e**), che erano già stati sintetizzati e saggiati e avevano portato a risultati interessanti, è caratterizzata da due residui di carbacolo uniti tra loro, attraverso gli atomi di azoto basici, da una catena polimetilenica di lunghezza variabile ($n = 3, 5, 7, 9, 11$).

Nel preparare queste sostanze sarebbero stati sintetizzati anche i composti **8d** e **8e**, intermedi nel processo sintetico utilizzato, che avrebbero dato informazioni, anche in questo caso, sull'importanza della presenza di entrambe le funzioni carbammiche. Per ripreparare i composti abbiamo inizialmente seguito lo schema usato in passato (Schema 2); ci siamo accorti però che i prodotti desiderati venivano ottenuti con rese molto basse. Questo ci ha spinto a indagare quale fosse lo step limitante dell'intera via sintetica, evidenziando così una inaspettata side-reaction.

Schema 2



a) etilformiato; b) LiAlH_4 ; c) benzilbromuro, K_2CO_3 ; d) 2-iodoetil carbammato, K_2CO_3 ; e) H_2 , Pd/C 10%; f) MeI.

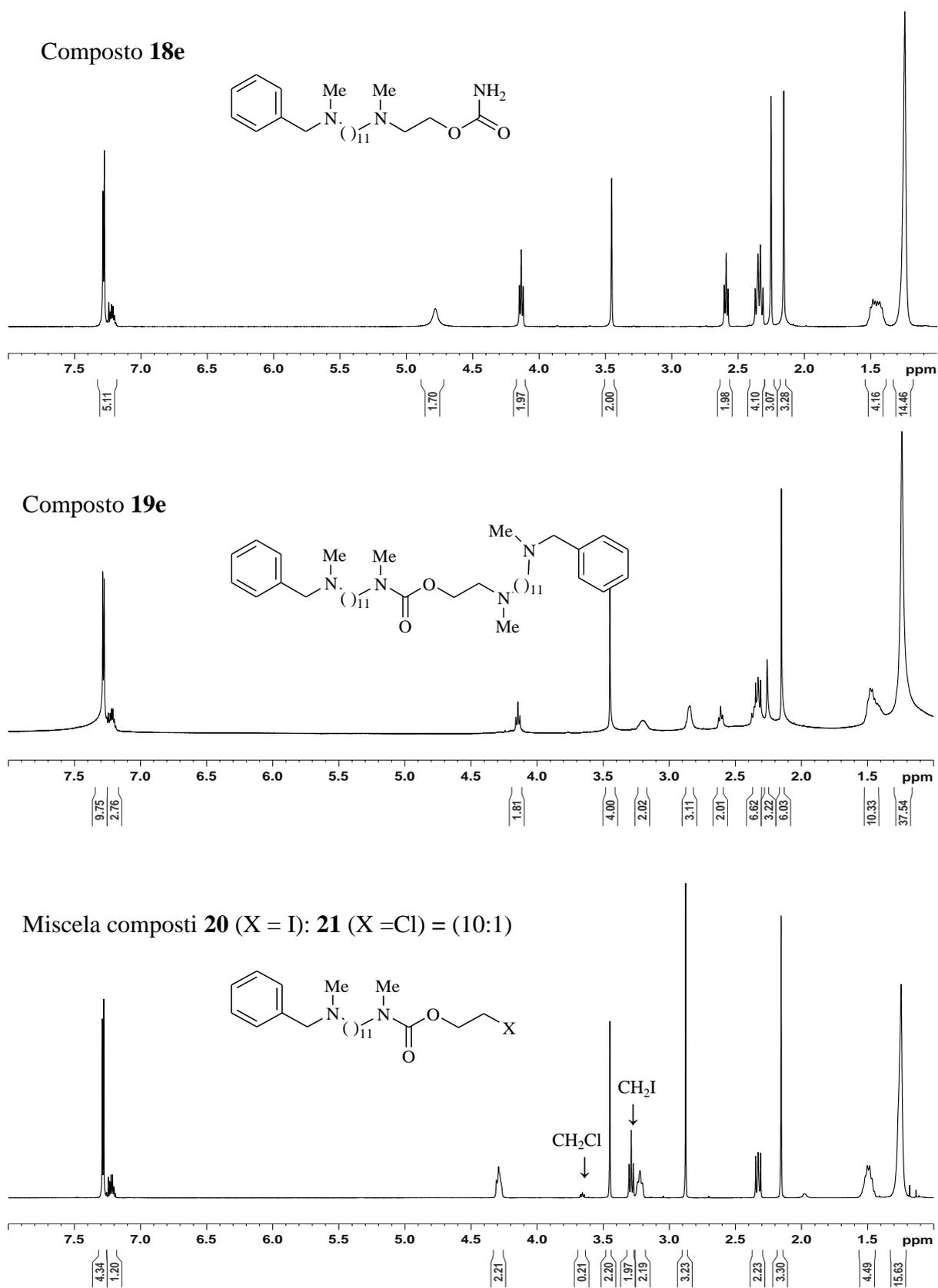
Lo schema sintetico iniziale prevedeva di trattare gli α,ω -diamminoalcani, disponibili in commercio, con etil formiato a 52°C , in modo da ottenere le diformilammidi **15a-e**, che poi venivano ridotte con LiAlH_4 in THF anidro a dare le metilammine **16a-e**. Trattando **16a-e** con benzil bromuro e K_2CO_3 , in CH_3CN anidro, uno dei due gruppi amminici secondari veniva protetto, ottenendo i composti **17a-e**, che venivano fatti reagire con il 2-iodoetilcarbammato (la cui sintesi è riportata nello Schema 4): la purificazione cromatografica della complessa miscela di reazione permetteva di ottenere i composti **18a-e**, da cui, tramite idrogenazione catalitica a dare **8a-e** e una nuova reazione con 2-iodoetilcarbammato, si ottenevano i composti **3a-e** desiderati. I composti iodometilati **4a-e** erano poi ottenuti per trattamento con metil ioduro.

Nel rifare questa via sintetica, per ottenere i derivati **18c-e**, ci siamo accorti che la quantità di prodotto finale ottenuto era piuttosto scarsa, a causa delle rese molto basse nella prima alchilazione con 2-iodoetilcarbammato; infatti, come mostrato in Figura 3 per i derivati con $n=11$, in questa reazione si ottengono, oltre a **18e** (20%) anche altri prodotti tra cui quello più abbondante era **19e** (56%). L'ottenimento nella miscela del

prodotto **21** è dovuta al fatto che lo scambio Cl-I nella sintesi dello iodoetilcarbammato (Schema 6) non è completa, per cui questo reattivo contiene sempre una certa percentuale di prodotto clorurato. Contrariamente alle nostre aspettative, quindi, lo iodoetilcarbammato reagisce più velocemente sulla funzione carbammica rispetto alla funzione alogenata, dando il prodotto di doppia alchilazione **19e** in quantità preponderante rispetto al prodotto desiderato **18e**. Analoga situazione è stata riscontrata nella sintesi di **3d**.

L'assegnazione della struttura ai composti **19e**, **20** e **21** è stata fatta combinando spettrometria di massa e NMR. Infatti, lo spettro ESI-MS di **19e** aveva fornito un peso molecolare basso, in quanto il prodotto, avendo 2 atomi di azoto basici, dà un doppio ione. Tuttavia, dallo spettro NMR di **19e** (Figura 3.1) si distinguono chiaramente i segnali dei protoni adiacenti alla funzione ammidica, due picchi a 2.8 ppm e 3.2 ppm, la cui forma slargata è dovuta alla presenza di conformeri sul legame ammidico, in equilibrio tra loro. Tali picchi sarebbero stati a δ troppo bassi per protoni di tipo carbammico, che infatti nello spettro di **18e** risuonano a campi più bassi. A conferma di ciò, lo spettro IR ha evidenziato la mancanza del gruppo NH_2 carbammico. Analoghe considerazioni sono state fatte per i derivati con $n = 9$.

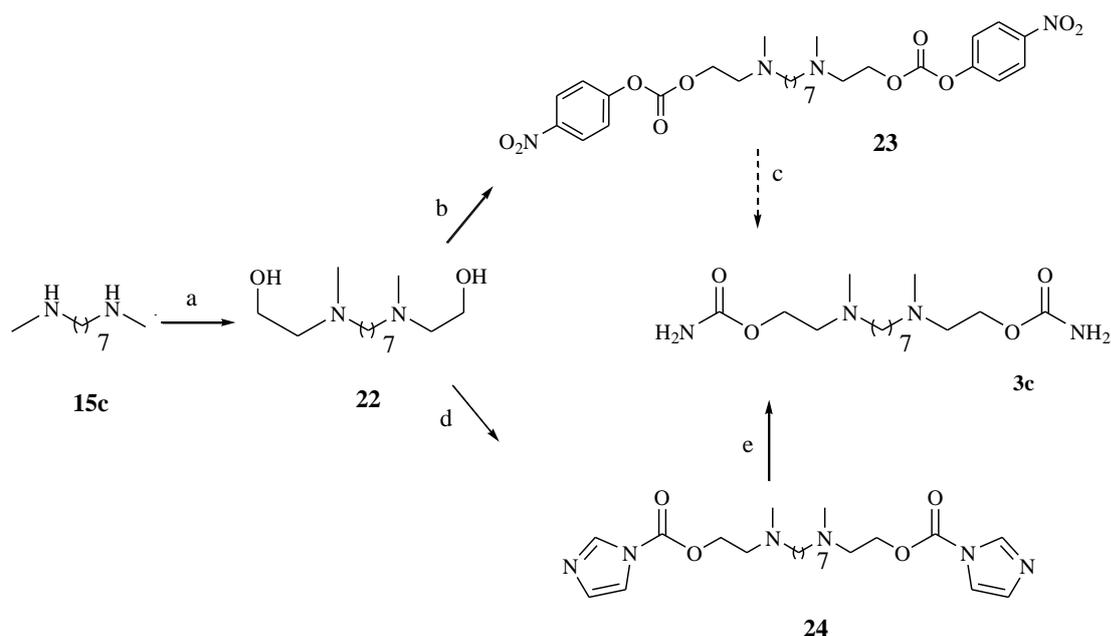
Figura 3.1: Spettri H-NMR in $CDCl_3$ relativi ai composti **18e**, **19e** e a una miscela di composti **20** e **21** (10:1).



Pertanto, al fine di ottenere il composto **3c**, l'ultimo prodotto da sintetizzare, si è reso necessario mettere a punto una nuova strategia (Schema 3) che non prevedeva l'uso del 2-iodoetilcarbammato.

Quindi, la diammina **15c** è stata trattata con bromoetanolo e un eccesso di K_2CO_3 , in CH_3CN anidro, con resa del 40%. Il diolo **22** è stato poi trattato con 4-nitrofenilformiato per formare il carbonato **23** che è stato fatto reagire, senza isolarlo, con NH_3 in diossano. La formazione del carbonato è immediata ma purtroppo il passaggio successivo fornisce una miscela di reazione molto complicata, nella quale il prodotto desiderato poteva essere presente solo in piccole quantità; per questo questa via è stata abbandonata.

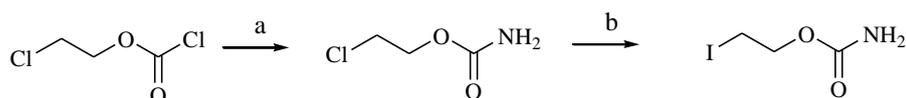
Schema 3



a) $BrCH_2CH_2OH$, K_2CO_3 , CH_3CN ; b) 4-Nitrofenilcloroformiato, CH_3CN ; c) NH_3 , diossano; d) carbonildiimidazolo, DCM; e) NH_3/THF 1:10.

Invece, la reazione di **22** con carbonildiimidazolo in DCM anidro ha fornito **24** con resa quantitativa. Il carbammato finale **3c** è stato ottenuto trattando l'intermedio imidazolico **24**, non isolato, con una miscela 1/10 di NH_3/THF .

Schema 4

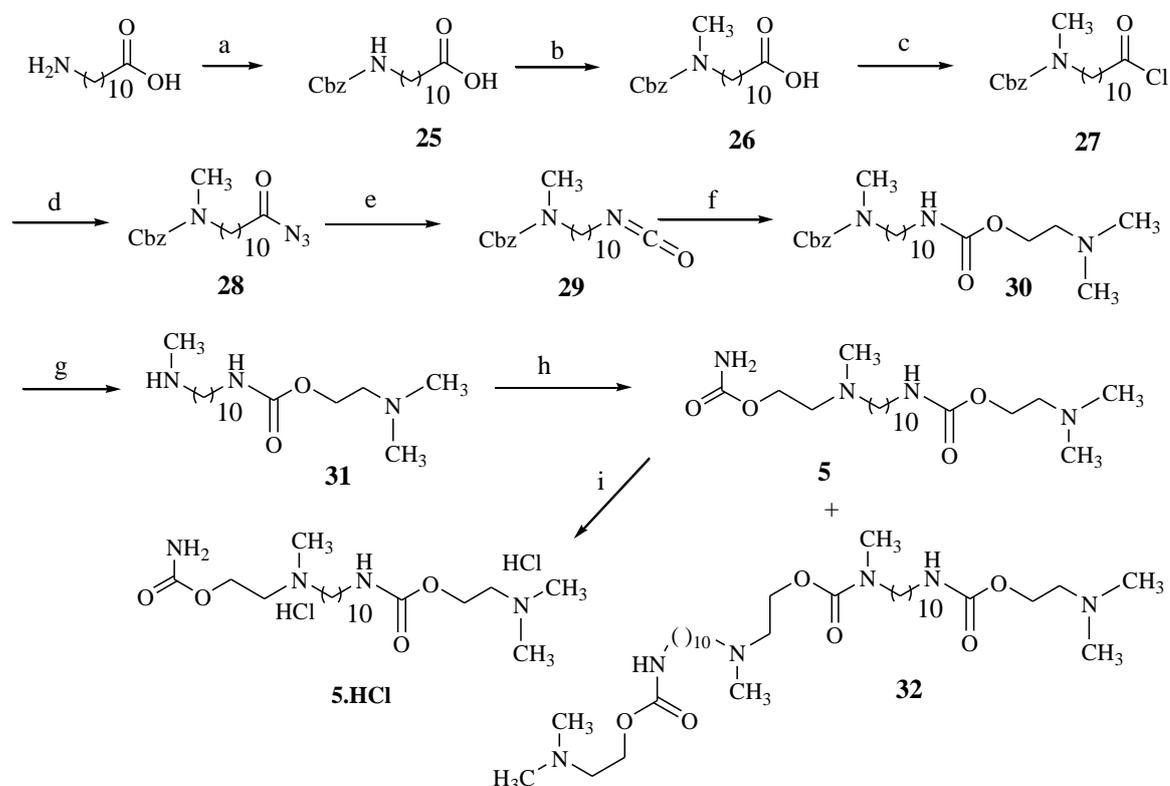


a) NH_4OH 15%; b) NaI .

Nello Schema 4 è riportata la sintesi del 2-iodoetilcarbammato: il 2-cloroetil cloroformiato è trasformato nel 2-cloroetil carbammato con NH_4OH 15%, e poi in 2-iodoetil carbammato tramite reazione con NaI in acetone a 56°C . Lo scambio Cl-I , necessario per aumentare la reattività tramite l'introduzione di un miglior gruppo uscente, non va comunque a completamento, per cui il 2-iodoetil carbammato che è stato utilizzato contiene il precursore clorurato (16%).

Il composto **5** (Figura 2.1), in cui due unità di carbacolo sono state unite in maniera non simmetrica da una catena a 10 metileni, rappresenta un ibrido tra le strutture di **1** e **3**. La sua sintesi è riportata nello Schema 5.

Schema 5



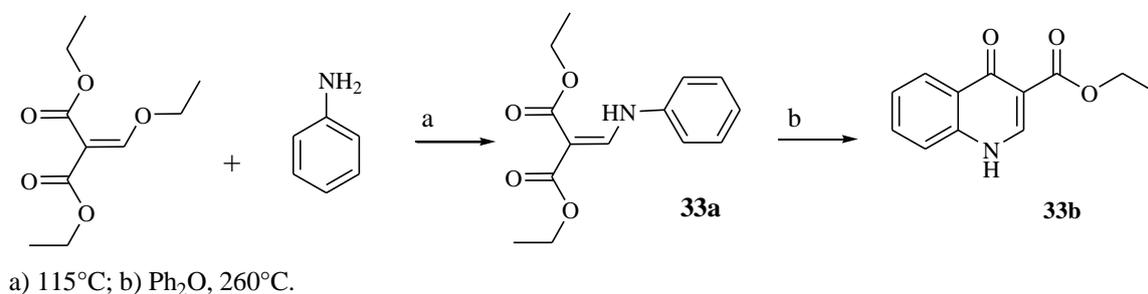
a) cloroformiato di benzile, NaOH 1M; b) CH_3I , $\text{K}(\text{C}_4\text{H}_9\text{O})$; c) SOCl_2 ; d) NaN_3 ; e) 70°C ; f) dimetil etanolamina, Et_3N ; g) H_2 , Pd/C ; h) 2-iodoetil carbammato[schema 2], K_2CO_3 ; i) CH_3COCl , MeOH .

L'acido 11-aminoundecanoico, commerciale, solubilizzato in una soluzione acquosa di NaOH 1M, è stato trattato con cloroformiato di benzile proteggendo così la funzione amminica terminale; **25** è stato fatto reagire con iodometano in presenza di *t*-butilato di potassio a dare **26**. Questo, per trattamento con cloruro di tionile, è stato trasformato nel cloruro acido **27**, poi in acil azide con una soluzione satura di sodio azide. La successiva trasposizione a caldo porta all'isocianato **29**, che per reazione con dimetiletanolammina dà il carbammato **30**, purificato mediante cromatografia flash. A questo punto la funzione amminica viene deprotetta mediante idrogenazione catalitica con Pd/C al 10% e poi funzionalizzata con 2-iodoetil carbammato. Da quest'ultima reazione si ottiene una miscela complessa da cui il prodotto finale è stato separato anche se con basse rese (10%), e trasformato nel cloridrato solubilizzandolo in una soluzione di acetil cloruro in metanolo anidro. Analogamente a quanto avviene nella reazione per l'ottenimento del composto **18e**, anche in questa reazione il 2-iodoetil carbammato reagisce anche sulla funzione carbammica, dando il prodotto di doppia alchilazione che porta alla formazione del prodotto **32** (9%), che è stato infatti isolato dalla miscela di reazione.

Un altro composto, appartenente a questa serie, è il prodotto **9**, che presenta un solo residuo etilcarbammico. Tale composto è stato sintetizzato semplicemente facendo reagire 2-iodoetilcarbammato e metil decilammina.

La via sintetica utilizzata nella preparazione del composto **11**, invece, parte dalla preparazione del nucleo chinolonico come riportato nello Schema 6. Si fanno reagire a caldo dietossimetilenmalonato e anilina, poi l'enammina intermedia viene ciclizzata ad alta temperatura a dare il prodotto **33**.

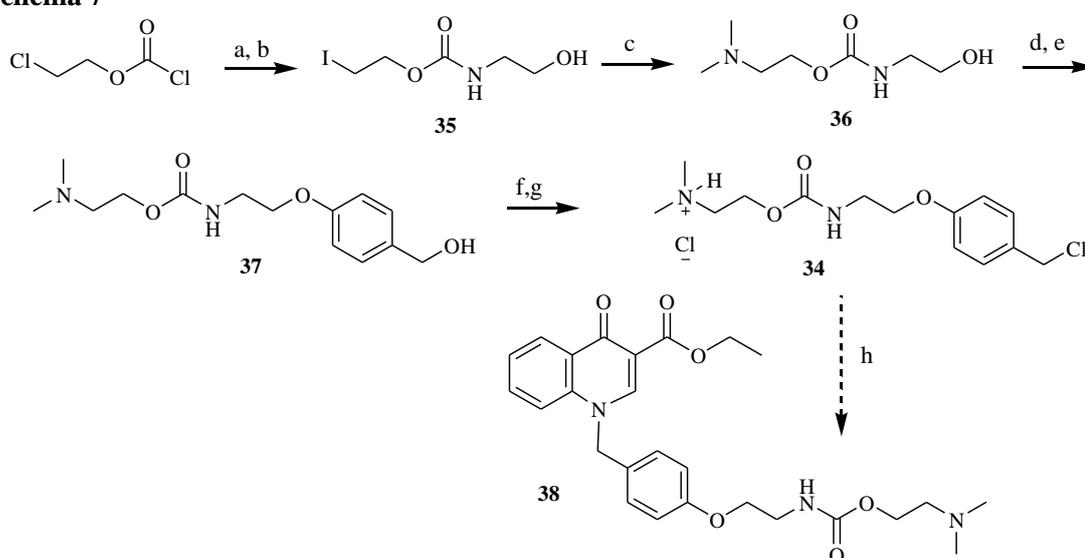
Schema 6



In un primo tentativo la chinolina **33** è stata fatta reagire con il derivato **34**, sintetizzato come riportato nello Schema 7: il 2-cloroetil cloroformiato è stato fatto reagire con 2-

aminoetanolo a dare **35**, che è stato trattato con NaI in acetone, poi con dimetilamina in etanolo per ottenere **36**. Una reazione di Mitsunobu con 4-idrossibenzaldeide, e la successiva riduzione del gruppo carbonilico ha portato a **37**, che è stato trasformato nel cloruro benzilico per reazione con cloruro di tionile; **34** è stato utilizzato sotto forma di cloridrato per prevenire una possibile reazione interna tra la funzione alogenata e il gruppo dimetilaminico. Tuttavia, la reazione di **34** con **33** in presenza di un eccesso di KI e di base non ha portato al prodotto desiderato **38**. Abbiamo quindi pensato di costruire la molecola in più tappe (Schema 8).

Schema 7

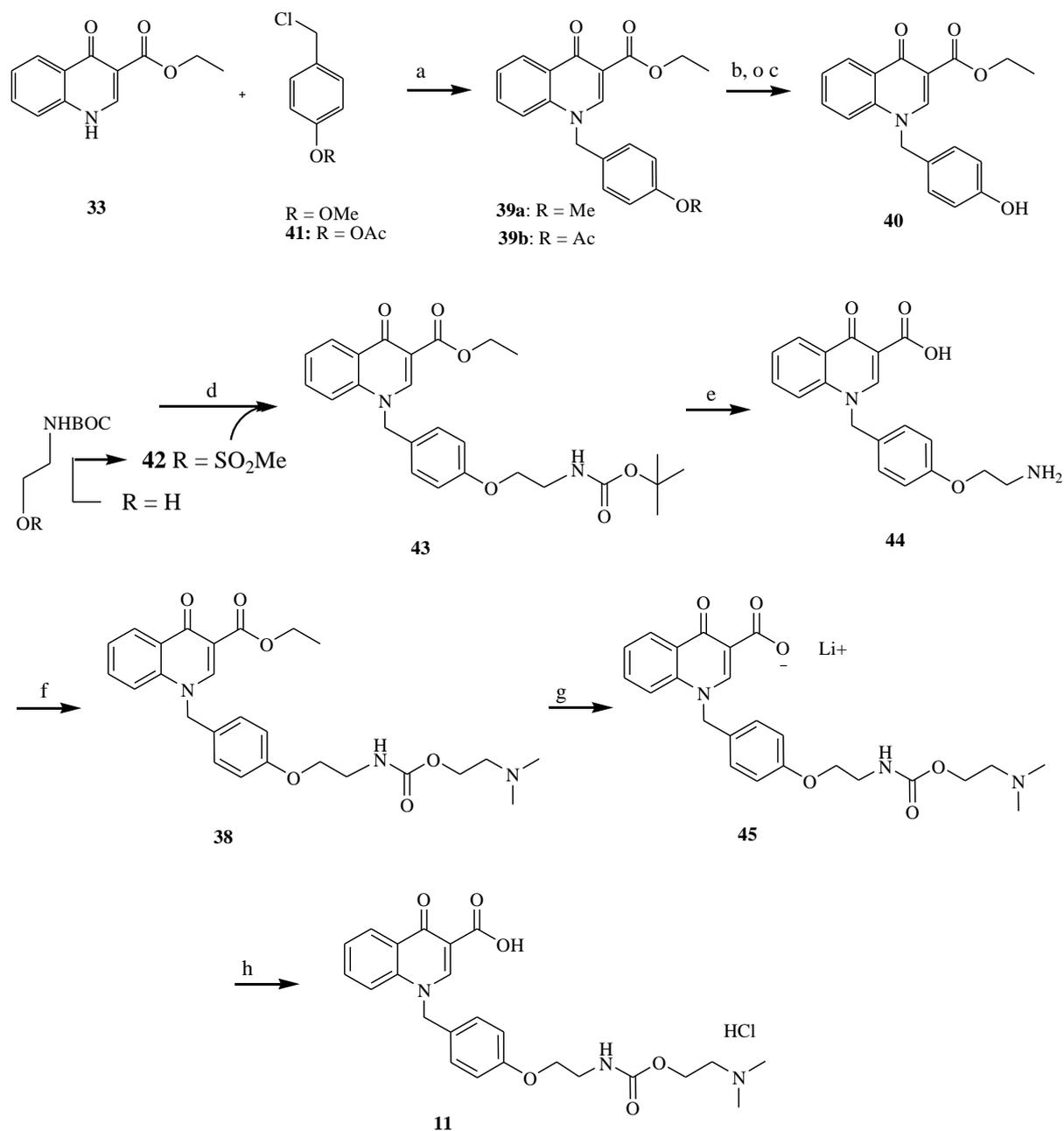


a) $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, DMF; b) NaI, 56°C , acetone; c) $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$, EtOH abs.; d) 4-idrossibenzaldeide, DEAD, Ph_3P , THF; e) NaBH_4 , THF; f) SOCl_2 , CH_2Cl_2 ; g) CH_3COCl , MeOH; h) **33**, KI, K_2CO_3 , DMF.

La reazione di **33** con il 4-metossi-benzilcloruro commerciale ha portato al derivato **39a** con buone rese, tuttavia la successiva idrolisi, effettuata in varie maniere, ha dato il prodotto **40** solo in rese molto basse. Quindi, la chinolina **33** è stata alchilata con il 4-acetossi-benzil cloruro **41**, preparato come riportato nello Schema 9, ottenendo il composto **39b** con rese accettabili; la successiva idrolisi ha dato il composto **40** con resa quantitativa. Il fenolo è stato fatto reagire quindi in presenza di base con il composto **42** (ottenuto per solfonazione della N-BOC-etanolamina commerciale con mesil cloruro) a dare il prodotto **43**; a questo punto la funzione amminica è stata deprotetta con acido trifluoroacetico (a dare **44**) e fatta reagire con carbonildiimidazolo e dimetiletanolamina a dare il composto **38**. L'idrolisi dell'estere etilico conduce a **45**

come sale di Litio, poi trasformato nel cloridrato **11** dopo trattamento con AcCOCl in MeOH.

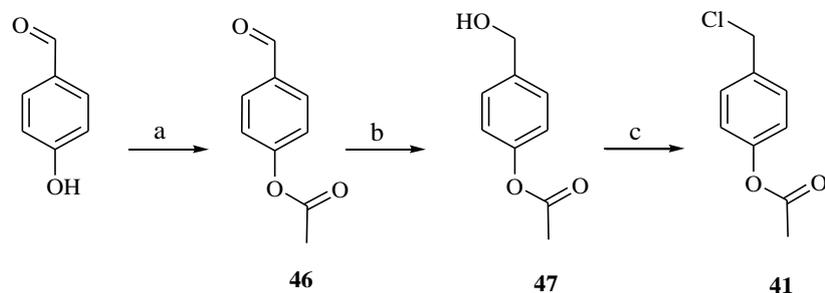
Schema 8



a) KI, K₂CO₃, DMF; b) NaHCO₃, MeOH; c) HBr/CH₃COOH, oppure BBr₃; d) K₂CO₃, DMF; e) CF₃COOH; f) carbonildiimidazolo, dimetiletanolamina; g) LiOH; h) AcCOCl/MeOH.

Nello Schema 9 è riportata la preparazione di **41**.

Schema 9



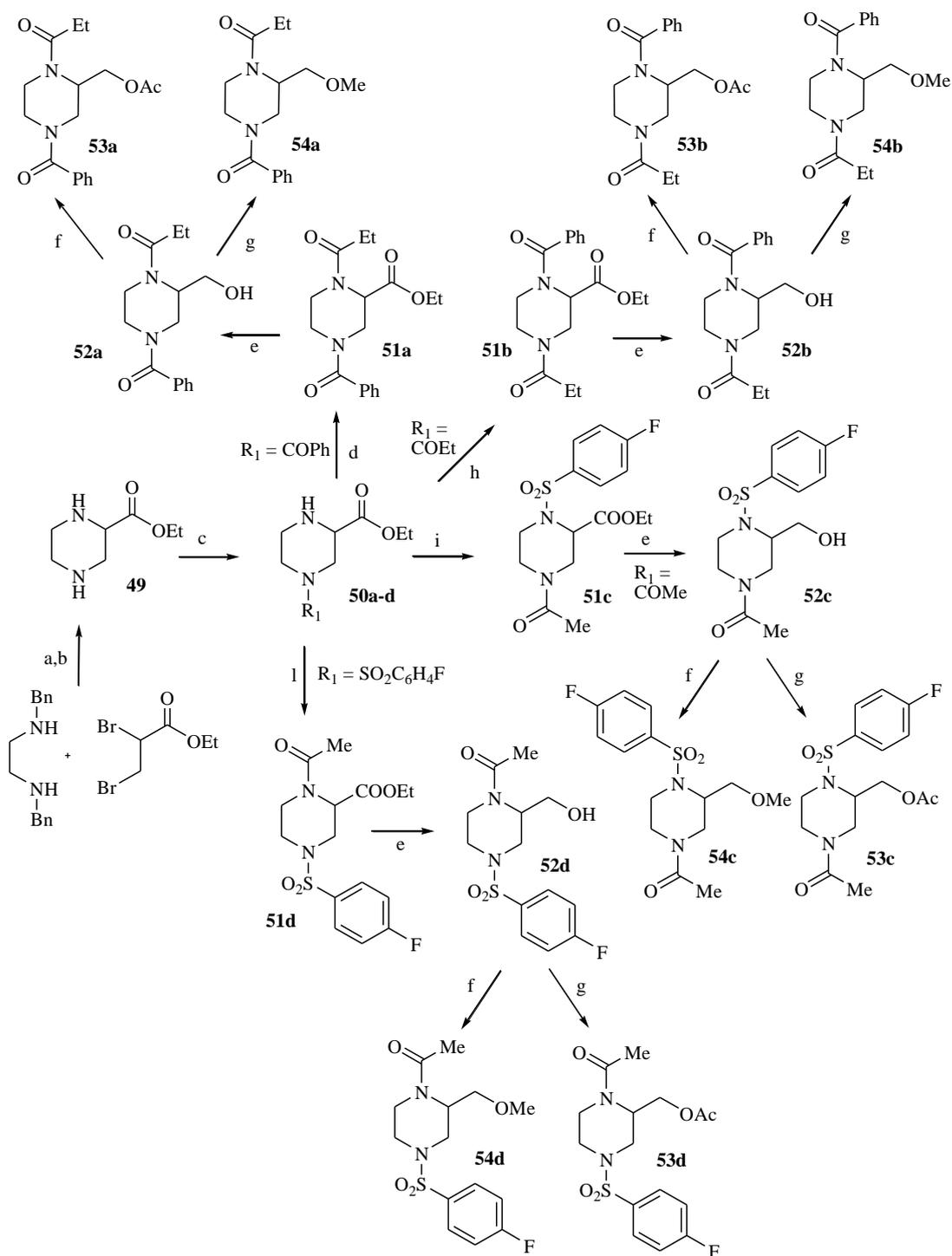
a) CH_3COCl , Et_3N , DCM; b) NaBH_4 , THF; c) SOCl_2 , DCM.

4.2. Sostanze ad attività nootropica

Per la preparazione dei derivati piperazिनici ad azione nootropica, le cui strutture sono riportate in Figura 2, abbiamo pensato di utilizzare l'intermedio comune **49**, sintetizzato a partire da N,N-dibenziletildiammina e dibromopropionato di etile, e successiva idrogenazione catalitica. La piperazina **49** viene trattata con il primo acil o sulfonil cloruro (R_1Cl) in difetto, in modo da ottenere principalmente i prodotti di monoaddizione **50a-d**, che comunque devono essere separati dalle diammidi per cromatografia. La reazione con il secondo acil o sulfonil cloruro porta ai prodotti **51a-d**. La funzione esterea è stata ridotta ad alcool con sodio boridruro in una miscela di THF-etanolo 10:1, in modo da non toccare le funzioni ammidiche, ottenendo così i derivati **52a-d**, che poi sono stati trattati con acetil cloruro o con metil ioduro e base a dare i prodotti **53a-d** e **54a-d**, rispettivamente.

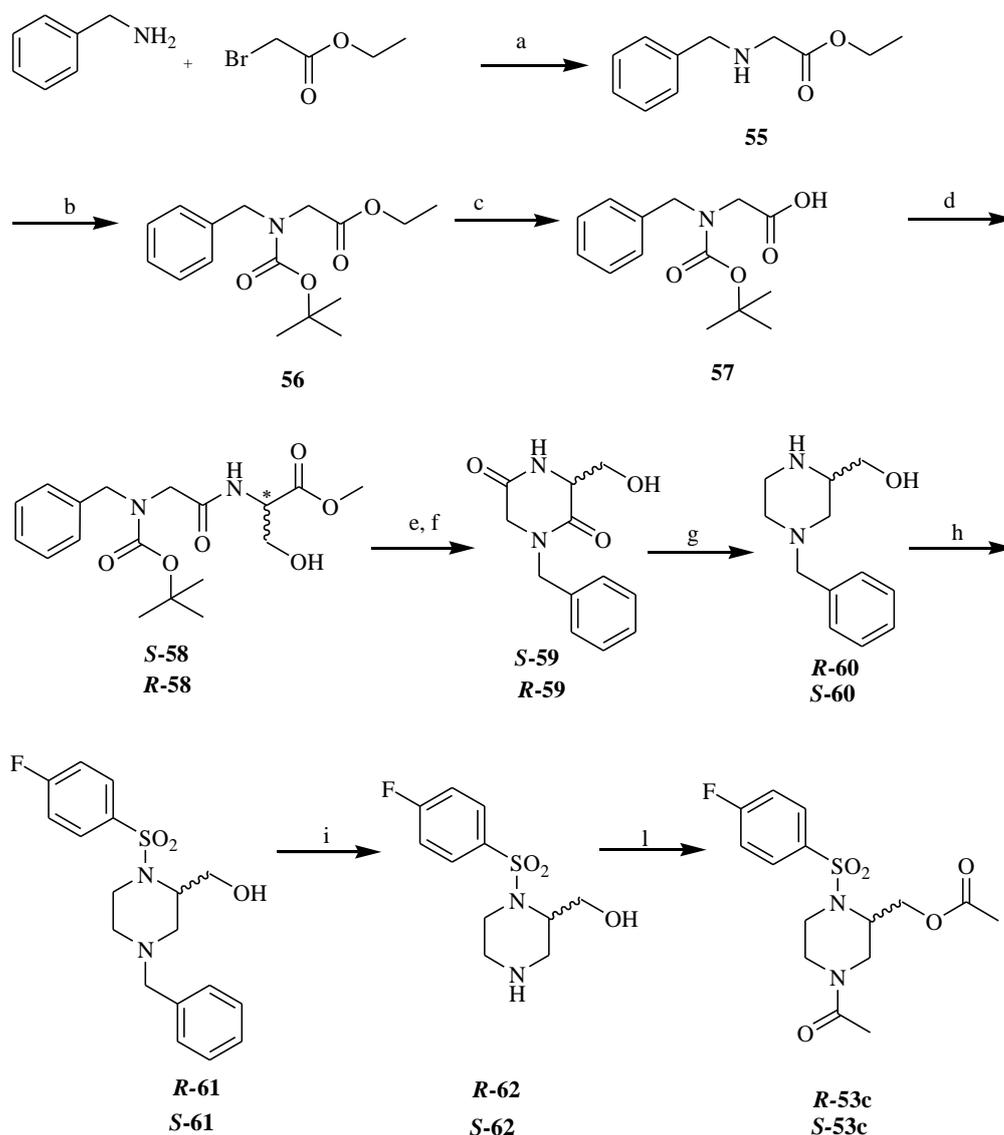
Gli enantiomeri dei derivati **52b** e **53c**, così come quelli di **ELF11** (Figura 2.2) sono stati preparati a partire da precursori chirali, in modo da conoscere la configurazione assoluta del prodotto finale. Quindi, per la sintesi degli enantiomeri di **52b** e di **53c** è stata utilizzata la *S* e *R* serina, mentre per la sintesi degli enantiomeri di **ELF11** abbiamo utilizzato la *R* e *S*-fenilglicina.

Schema 10



a) toluene, D; b) H₂/Pd/C; c) R₁Cl, Et₃N; d) EtCOCl, Et₃N; e) NaBH₄, THF-EtOH; f) AcCl; g) NaH, MeI; h) PhCOCl, Et₃N; i) 4F-C₆H₄SO₂Cl, Et₃N; l) MeCOCl, Et₃N

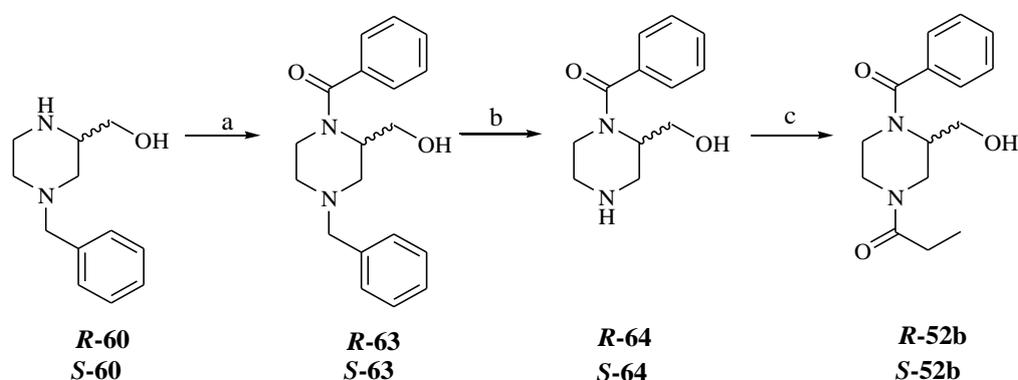
Schema 11



Per ottenere i derivati contenenti la funzione idrossimetilica siamo partiti da un intermedio comune, **57**, ottenuto come mostrato nello Schema 11: la reazione tra benzilammina e 0.5 Eq di etil bromoacetato in presenza di K_2CO_3 in grande eccesso ha dato l'estere **55**, la cui la funzione amminica è stata protetta con di-terbutildicarbonato a dare **56**. Per idrolisi basica è stato ottenuto l'acido **57** che è stato fatto reagire separatamente con la *R* o la *S*-serina metilestere.HCl in presenza di Et_3N , EDCi.HCl e HOBT, ottenendo i due enantiomeri di **58** ^[135]. Quindi la via sintetica ha proseguito separatamente per ogni enantiomero. Dopo un trattamento con HCl per rimuovere il residuo di BOC che proteggeva la funzione amminica, in presenza di NH_3 il composto è

ciclizzato nella corrispondente dichetopiperazina **59**, che è stata poi ridotta a **60** con LiAlH_4 in THF anidro. Nella piperazina **60** l'ordine di priorità dei sostituenti sullo stereocentro è diverso rispetto ai derivati della serina, per cui la riduzione di **R-59** conduce a **S-60**, quella di **S-59** porta a **R-60**. Successivamente il gruppo amminico secondario è trattato con p-benzensolfonilcloruro in lieve difetto, onde evitarne l'addizione anche sulla funzione alcolica, ottenendo i composti **S-61** e **R-61**. L'idrogenazione catalitica ha portato rispettivamente a **S-62** e **R-62**. L'ultimo passaggio prevede l'acetilazione della funzione alcolica e in questo modo sono stati ottenuti i composti finali **S-53c** e **R-53c**

Schema 12

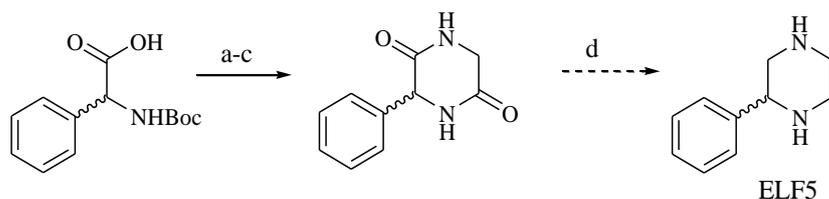


a) BzCl ; b) Pd/C 10%, H_2 ; c) CH_3COCl .

Per ottenere i composti **S-52b** e **R-52b** (Schema 12) siamo partiti da **S-60** e **R-60** che, per trattamento con benzoylcloruro in presenza di Et_3N a dare **S-63** e **R-63** e successiva idrogenazione catalitica, hanno portato a **S-64** e **R-64**. L'ultimo passaggio ha previsto il trattamento con propionilcloruro; in questo modo si ottengono i composti finali desiderati **S-52b** e **R-52b**.

Per ottenere gli enantiomeri di **ELF 11**, siamo partiti da fenilglicina chirale. In un primo momento abbiamo cercato di applicare il metodo di Zindell^[136] (Schema 13) che era stato utilizzato con successo nel nostro laboratorio per la sintesi della 2-benzilpiperazina racemica, ma che è descritto anche per la 2-fenilpiperazina. Questa via sintetica prevedeva di trasformare la fenilglicina N-Boc enantiopura nella 2,5-dichetopiperazina, per reazione con glicina metilestere, deprotezione e ciclizzazione, cioè la stessa sequenza di reazione che aveva permesso di arrivare all'intermedio **59** (Schema 11).

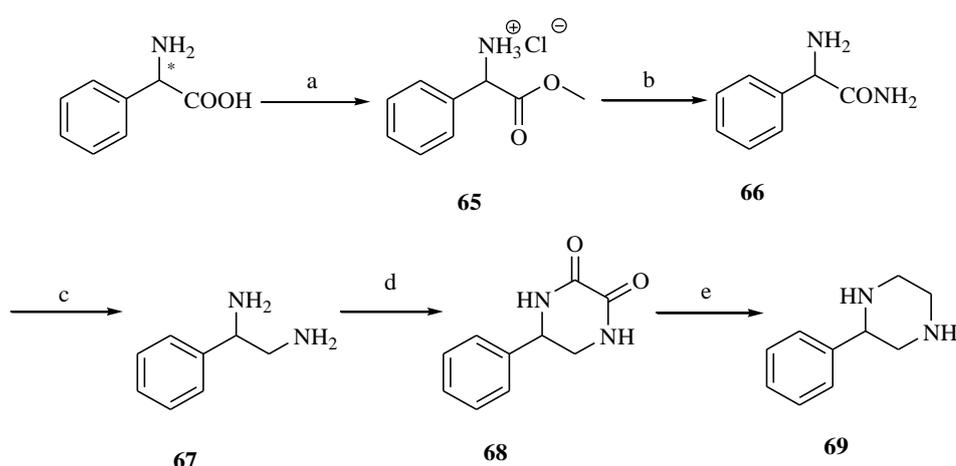
Schema 13



a) glicina metilestere, $i\text{PrOCOCl}$, Et_3N ; b) acido trifluoroacetico; c) diossano, 80°C ; d) LiAlH_4 , THF.

Mentre le reazioni iniziali avevano dato rese più che accettabili, la riduzione della dichetopiperazina aveva condotto al prodotto desiderato solo in tracce. Le rese troppo basse per continuare su questa strada, e una possibile instabilità del centro stereogenico all'azione del riducente, ci hanno spinto a cercare una via diversa, messa a punto prima sulla fenilglicina racema, in modo da ottimizzare la procedura (Schema 14).

Schema 14



a) SOCl_2 , MeOH; b) NH_3 ; c) LiAlH_4 ; d) dietilossalato; e) LiAlH_4 .

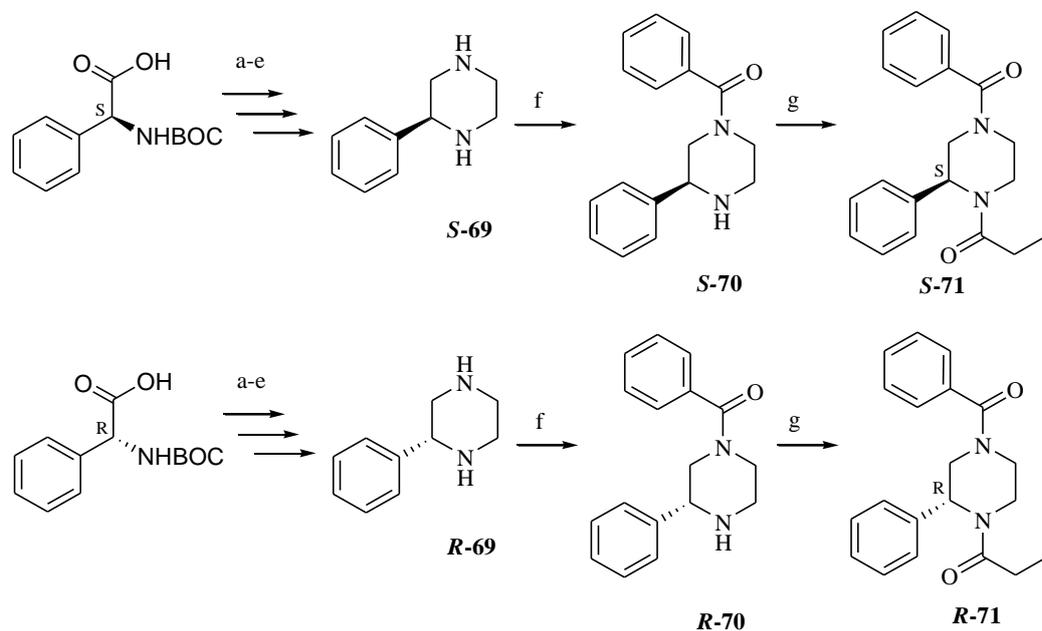
Il primo step ha previsto l'esterificazione della fenil glicina per trattamento con una soluzione di HCl in metanolo, ottenuta aggiungendo cloruro di tionile al solvente; la formazione del metil estere cloridrato **65** è stata quantitativa^[137].

Nel passaggio successivo, **65** è stato trattato con ammoniaca concentrata, ottenendo la fenilglicinamide **66** come base libera^[138]; questo passaggio avviene con buone rese (maggiori del 70%) e senza particolari difficoltà. La riduzione dell'ammide ad ammina **67** mediante l'utilizzo di LiAlH_4 è risultato essere lo step limitante, nonostante che in letteratura sia riportato che questa reazione avviene con rese buone^[138-140]. In seguito all'aggiunta di ghiaccio e NaOH 10%, sembrava che il prodotto andasse incontro,

abbastanza velocemente, a degradazione; risultati migliori sono stati ottenuti aggiungendo solo H₂O e purificando il grezzo ottenuto direttamente per via cromatografica. La reazione di ciclizzazione per l'ottenimento del nucleo piperazin-2,3-dionico **68** è avvenuta per addizione di dietil ossalato in EtOH. La reazione, condotta a refluxo, avviene con rese non eccelse (intorno al 50%) per la formazione di un sottoprodotto, forse dovuto alla reazione dell'ammina con 2 molecole di estere. La seconda riduzione, per l'ottenimento di **69**, è stata effettuata con LiAlH₄ in THF anidro e non ha presentato particolari problemi neppure nella lavorazione. Questa serie di reazioni erano state già descritte in un patent sul derivato racemico^[141].

Una volta ottenuta **69** come racemato abbiamo ripetuto il procedimento sui prodotti enantiopuri. Sono state ripetute le stesse reazioni, partendo però dalla *S* ed *R* N-BOC-fenilglicina, che avevamo a disposizione in laboratorio. Le rese di reazione sono state del tutto paragonabili a quelle appena descritti per il racemo. Una volta ottenuti gli intermedi *S*-**69** e *R*-**69**, abbiamo proceduto alla funzionalizzazione dei due atomi di azoto piperazिनici come riportato nello Schema 15.

Schema 15



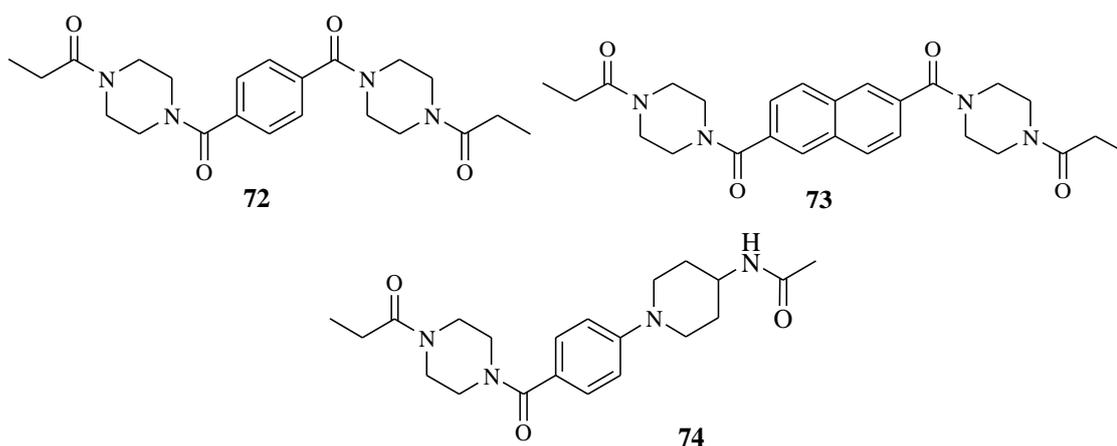
a) SOCl₂, MeOH; b) NH₄OH 33%; c) LiAlH₄; d) (COEt)₂; e) LiAlH₄; f) PhCOCl, Et₃N; g) EtCOCl, Et₃N.

L'acilazione sull'atomo di N in posizione 4 è stata effettuata con benzil cloruro in presenza di trietilammina in condizioni controllate, per dare gli intermedi *S*-**70** e *R*-**70**. Nonostante questi accorgimenti la resa si è rivelata piuttosto bassa (49%) per la

formazione del dibenzoil derivato, che è stato separato tramite cromatografia flash. Infine l'acilazione sull'azoto piperazinico non sostituito è stata effettuata con propionil cloruro in presenza di trietilammina a dare i prodotti finali **S-71** e **R-71**.

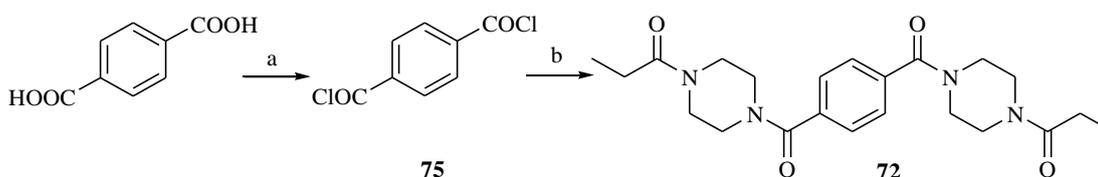
Le reazioni effettuate avvengono senza racemizzazione, come evidenziato da una analisi HPLC su colonna chirale. L'eccesso enantiomerico dei derivati **S-71** e **R-71** è risultato del 89 %. In letteratura era già riportato che la riduzione della fenilglicinamide a 1-feniletan-1,2-diammina avveniva senza racemizzazione ^[138,139], mentre la successiva riduzione della 5-fenilpiperazina-2,3-dione è riportata in letteratura solo sul prodotto racemo ^[141].

L'ultima parte del mio lavoro di dottorato ha previsto la sintesi di composti molecolari che rappresentano un raddoppiamento di DM235 oppure una ibridazione di DM235 con MN19 (sapunifiram).



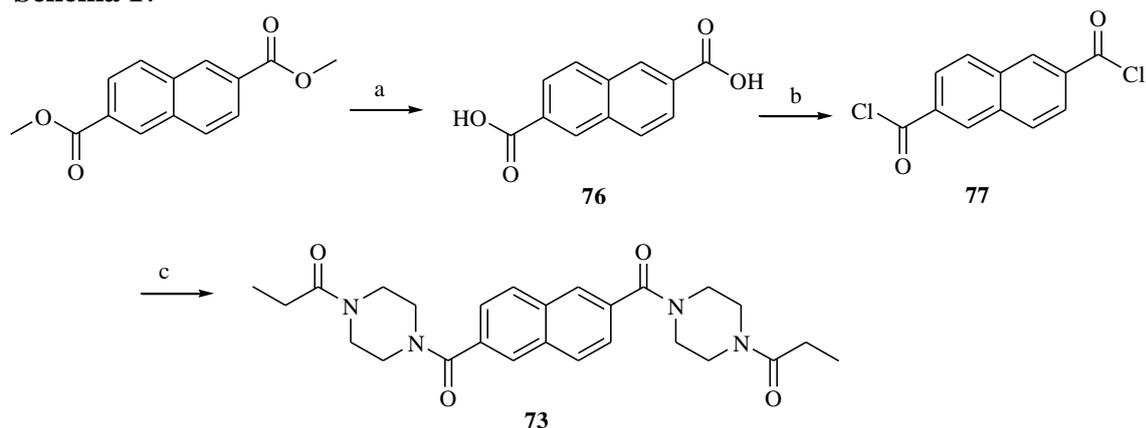
Le prime molecole di questo tipo sintetizzate sono quelle simmetriche, **72** e **73**; la loro sintesi è riportata negli schemi **16** e **17**.

Schema 16



a) SOCl_2 , 76°C ; b) 1-propionilpiperazina, Et_3N .

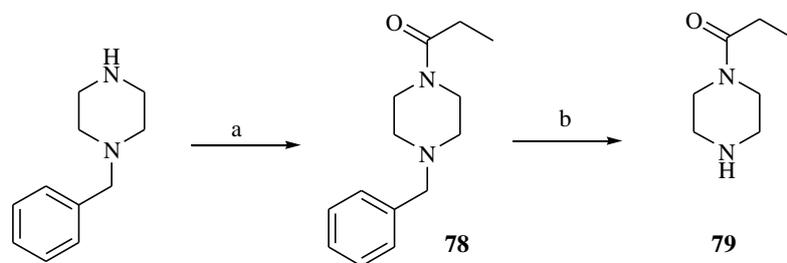
Schema 17



a) NaOH ; b) SOCl_2 , 76°C ; c) 1-propionilpiperazina, Et_3N .

Il composto **72** è stato sintetizzato con buone rese a partire dall'acido tereftalico commerciale che è stato trasformato nel corrispondente cloruro acido **75** per trattamento con cloruro di tionile in eccesso a refluxo e poi messo a reagire in DCM con 2 Eq di 1-propionilpiperazina **79** (sintetizzata in modo standard, vedi Schema 18) in presenza di Et_3N . Il prodotto **73** è stato sintetizzato in modo analogo partendo dal dimetil 2,6-naftalendicarbossilato commerciale che è stato idrolizzato con NaOH per ottenere l'acido dicarbossilico **76** da cui è stato preparato **73** come visto in precedenza.

Schema 18

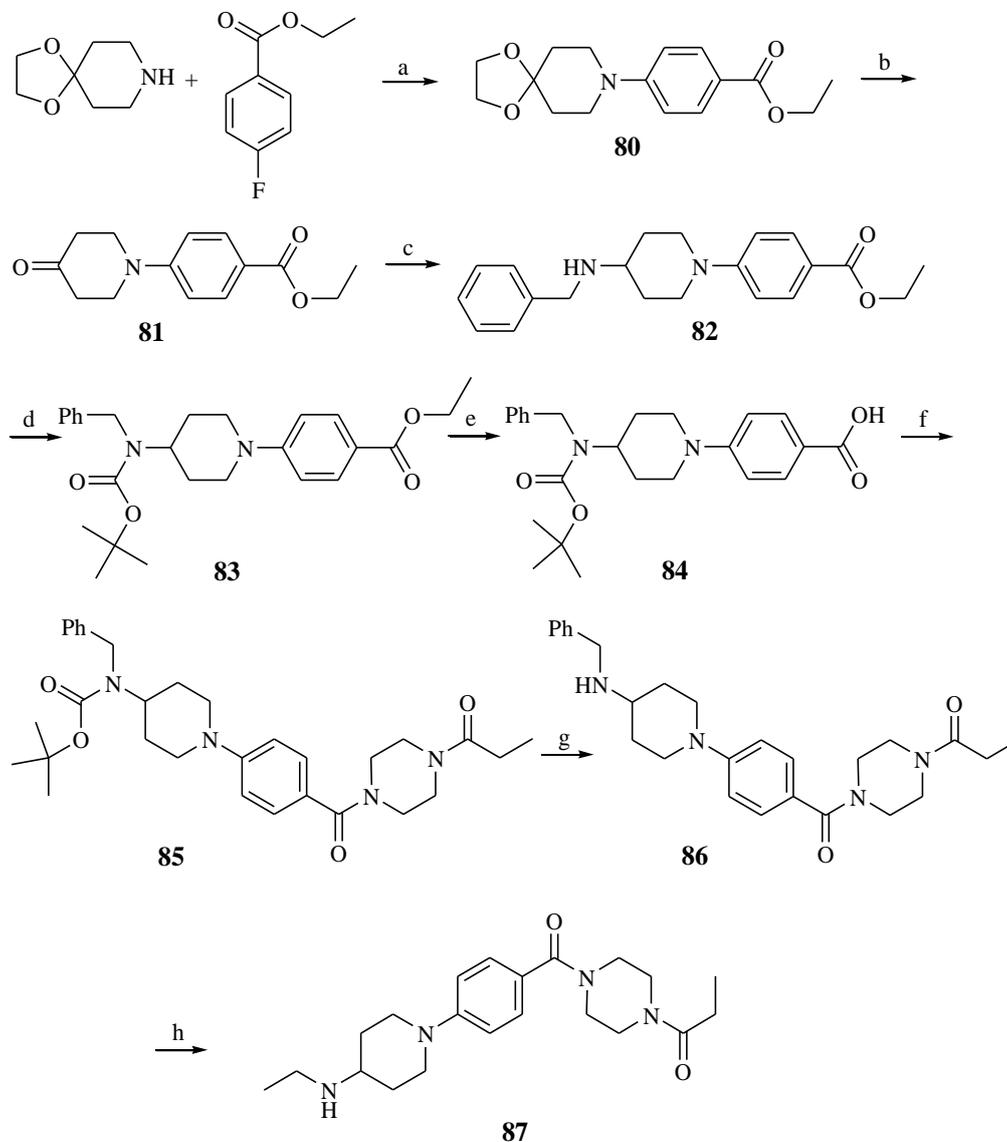


a) AcCOCl , Et_3N ; b) $\text{H}_2/\text{Pd/C}$ 10%, MeOH .

Per ottenere, invece, il composto ibrido, è stata inizialmente utilizzata la via sintetica riportata nello Schema 19: piperidone etilchetale e etil p-fluorobenzoato vengono messi a reagire ad alta temperatura in DMF in presenza di K_2CO_3 come base. Il composto **80** è stato ottenuto in buone quantità e non ha avuto bisogno di ulteriori purificazioni. Il chetale è stato poi idrolizzato a chetone **81** con acido solforico al 10% in THF. La reazione con benzilammina in presenza di NaBH_4 e acido acetico ha portato con buone rese al N-benzilderivato **82** che è stato protetto sulla funzione amminica libera con

diterbutildicarbonato (BOC) a dare **83**, poi la funzione esterea è stata idrolizzata con NaOH a dare **84**.

Schema 19

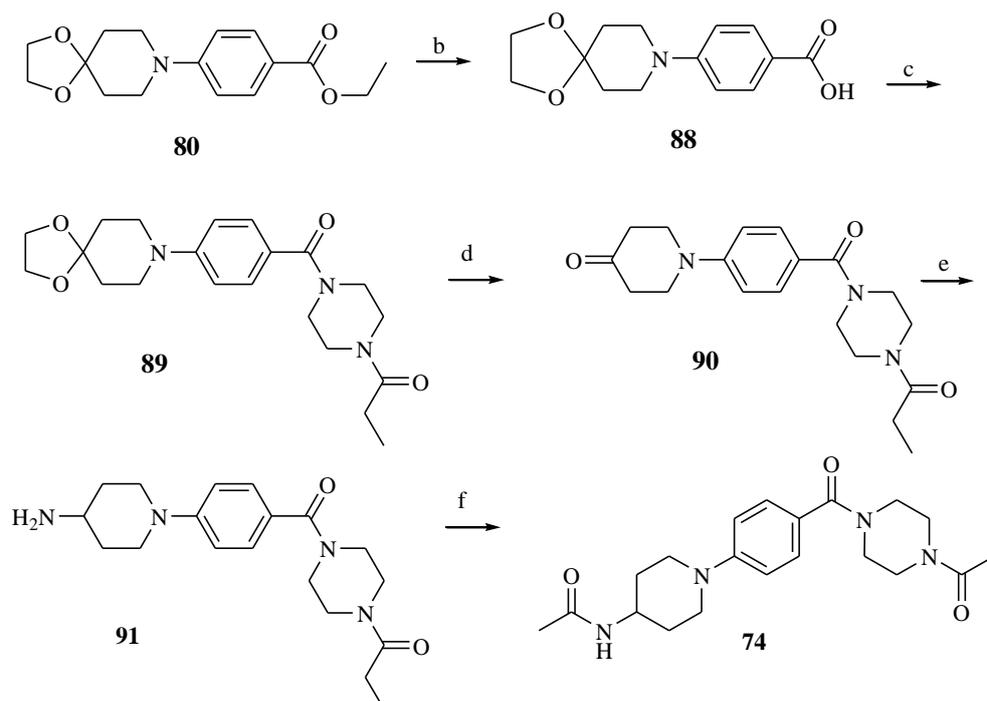


a) K_2CO_3 , $120^\circ C$; b) H_2SO_4 10%; c) benzilamina, $NaBH_4$, AcOH; d) $(tBuCO)_2O$; Et_3N ; e) NaOH; f) **79**, EDCi.HCl, HOBT; g) CF_3COOH ; h) H_2 , Pd/C10%.

L'ammide **85** è stata ottenuta per reazione di **84** con **79** in presenza di EDCi.HCl e HOBT, in seguito a purificazione cromatografica. Nei passaggi successivi, il carbammato è stato rimosso con acido trifluoroacetico (**86**) e la successiva idrogenazione catalitica in etanolo assoluto avrebbe dovuto condurre all'ammina primaria. Proprio questo step è risultato il passaggio limitante l'intera via sintetica, infatti non ha portato all'ammina primaria desiderata ma al composto **87**, che deriva da

una addizione di un gruppo etilico probabilmente derivante da etanolo, che si forma anche cambiando le condizioni di reazione; il problema nell'uso di altri solventi per la reazione è la scarsa solubilità di **86**. Quindi per ottenere il composto voluto è stata cambiata la sequenza di reazioni, come riportato nello Schema 20.

Schema 20



a) K₂CO₃, 120°C; b) NaOH; c) 1-(piperazin-1-il)propan-1-one, EDCi.HCl, HOBT; d) acido p-toluensolfonico, acetone/H₂O; e) NH₄COCH₃, NaBH₃CN; f) AcCOCl, Et₃N.

Si è scelto di lavorare prima sulla funzione esterea, mantenendo il carbonile protetto. Quindi, **80** è stato idrolizzato in ambiente basico ottenendo **88**, che è stato trasformato nell'ammide **89** come visto in precedenza. A questo punto la funzione chetale è stata trattata con acido p-toluensolfonico in una miscela 1:1 acetone:H₂O a dare il chetone **90**, che è stato sottoposto ad amminazione riduttiva con acetato d'ammonio e NaBH₃CN. L'ammina secondaria **91** è stata trattata con acetil cloruro in presenza di Et₃N a dare il prodotto finale desiderato **74**.

4. RISULTATI FARMACOLOGICI

4.1. Ligandi muscarinici

4.1.1. Risultati all'Equilibrio: studi di competizione da parte delle molecole indagate con [³H]-NMS per i cinque sottotipi recettoriali muscarinici umani espressi in cellule CHO

In una prima fase della ricerca, sono stati condotti esperimenti di binding recettoriale all'equilibrio, allo scopo di valutare sia l'affinità di questi composti verso il sito di legame ortosterico del recettore muscarinico, sia una eventuale selettività nei confronti di un particolare sottotipo recettoriale. I saggi sono stati effettuati con membrane ottenute da cellule CHO-K1 che esprimono stabilmente i cinque sottotipi recettoriali hM₁-hM₅ umani.

Questi esperimenti di competizione eterologa sono condotti utilizzando una concentrazione fissa di radioligando ([³H]-NMS 0.2 nM, concentrazione vicina al valore di K_d del legante radioattivo) e concentrazioni crescenti (da 0.1 nM a 0.1 mM) di agente spiazzante, rappresentato dalla molecola in esame. I risultati sperimentali ottenuti con queste curve di competizione sono stati elaborati simultaneamente alle curve omologhe (curve di saturazione) con il programma LIGAND, come descritto nella parte sperimentale. E' stato così possibile ottenere il valore delle costanti di inibizione del binding all'equilibrio, che sono riportate nelle tabelle come pK_i, valore corrispondente a -logK_i. I grafici riportati nella figura 4.1 mostrano, a titolo di esempio, le curve di competizione del composto **3d** sui 5 sottotipi del recettore muscarinico. Le elaborazioni grafiche sono state fatte con il programma GraphPad Prism (vers. 5.02).

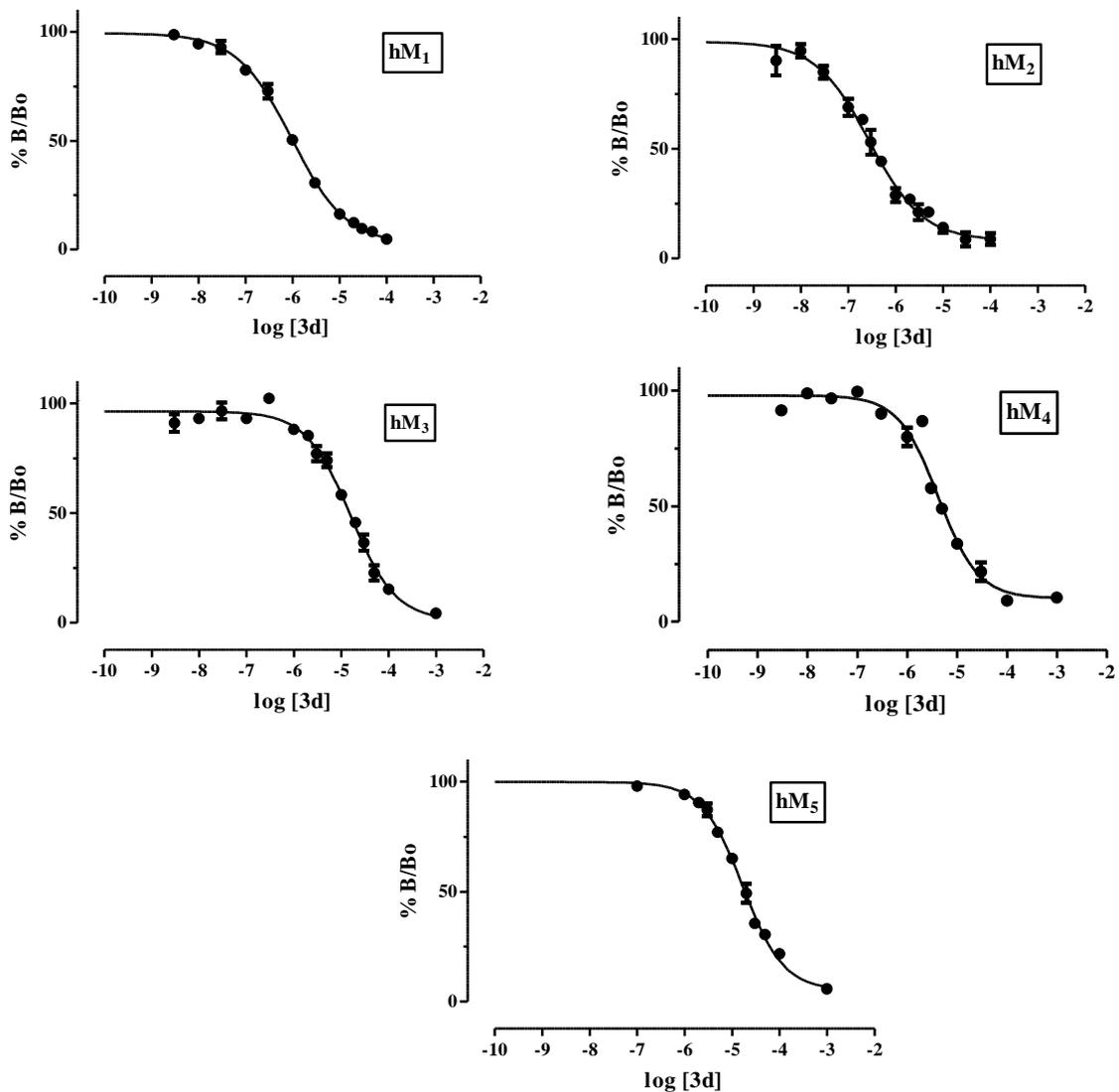
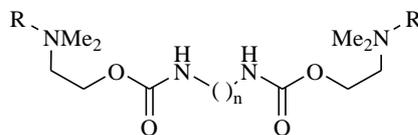


Figura 4.1: curve di competizione del binding specifico della [³H]-NMS 0.2 nM in membrane di cellule CHO che esprimono i cinque sottotipi recettoriali muscarinici, ottenute utilizzando concentrazioni crescenti della molecola **3d**. I risultati rappresentano la media \pm SEM di almeno 3 esperimenti, ciascuno condotto in duplicato. Ordinata: (%B/B₀) percentuale di inibizione del binding specifico totale, valore ottenuto in assenza di spiazzante e considerato pari al 100% di binding, risposta normalizzata.

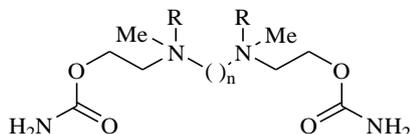
Come appare evidente, la molecola **3d**, come anche tutte le altre molecole indagate, è in grado di inibire completamente il binding specifico della [³H]-NMS in modo analogo per ciascun sottotipo recettoriale. Nelle tabelle 4.1, 4.2 e 4.3 sono riportati i valori di affinità delle molecole oggetto di questo studio, espressi come pK_i.

Tabella 4.1: Tabella riassuntiva dei valori di pK_i relativi ai composti **1a-f/2a-f** testati sui cinque sottotipi di recettore muscarinico umano clonato, espressi in cellule CHO-K1; il carbacolo (CCh) è riportato come molecola di riferimento. I valori rappresentano la media di almeno 3 esperimenti, ciascuno condotto in duplicato. In parentesi tonde è riportata la Hill slope, nH. Gli errori standard, omessi per chiarezza descrittiva, sono tutti compresi fra il 10 e il 20% del valore medio.



	n	R	hM ₁	hM ₂	hM ₃	hM ₄	hM ₅
1a	3		4.68 (0.67)	4.14 (0.69)	<4	<4	<4
2a	3	MeI	4.91 (0.84)	4.65 (0.77)	<4	<4	<4
1b	5		4.98 (0.72)	4.84 (1.10)	4.46 (1.15)	4.24 (1.10)	4.41 (0.78)
2b	5	MeI	4.95 (0.63)	4.95 (0.74)	4.79 (1.08)	<4	4.84 (0.83)
1c	6		6.18 (0.79)	5.37 (0.93)	6.16 (0.89)	5.78 (0.71)	6.12 (0.68)
2c	6	MeI	6.16 (0.91)	5.73 (0.89)	6.28 (0.90)	5.87 (0.82)	6.36 (0.65)
1d	7		7.45 (1.00)	6.42 (0.81)	7.76 (0.86)	7.27 (0.96)	8.01 (0.95)
2d	7	MeI	7.75 (0.96)	7.20 (0.85)	8.14 (1.00)	7.70 (1.16)	8.19 (0.88)
1e	9		7.56 (1.10)	6.53 (0.88)	7.89 (0.70)	7.48 (0.96)	7.68 (1.04)
2e	9	MeI	7.93 (1.11)	7.35 (1.09)	8.02 (1.01)	7.78 (1.19)	7.91 (0.92)
1f	11		7.16 (1.14)	6.29 (0.71)	6.89 (0.77)	6.80 (1.12)	6.76 (0.82)
2f	11	MeI	7.59 (1.07)	7.38 (0.90)	7.50 (1.00)	7.49 (1.06)	7.35 (1.04)
<i>CCh</i>			4.42 (0.63)	5.92 (0.98)	4.36 (0.57)	5.20 (0.61)	4.16 (0.80)

Tabella 4.2: Tabella riassuntiva dei valori di pK_i relativi ai composti **3a-e/4a-e** testati sui cinque sottotipi di recettore muscarinico umano clonato, espressi in cellule CHO-K1 e al carbacolo (CCh) come molecola di riferimento. I valori rappresentano la media di almeno 3 esperimenti, ciascuno condotto in duplicato. In parentesi tonde è riportata la Hill slope, nH. Gli errori standard sono omessi per chiarezza descrittiva e sono tutti compresi fra il 10 e il 20% del valore medio.



	n	R	hM ₁	hM ₂	hM ₃	hM ₄	hM ₅
3a	3		4.97 (0.88)	<4	4.53 (1.12)	<4	<4
4a	3	MeI	4.97 (0.76)	4.89 (0.81)	4.35 (1.09)	<4	<4
3b	5		5.18 (0.87)	5.34 (0.89)	4.59 (0.98)	<4	4.31 (1.19)
4b	5	MeI	4.97 (0.89)	5.00 (0.69)	4.68 (1.04)	5.18 (1.02)	4.16 (1.15)
3c	7		5.53 (0.93)	5.64 (0.83)	5.09 (0.71)	5.48 (0.90)	4.80 (1.11)
4c	7	MeI	5.99 (0.89)	6.13 (0.72)	5.41 (0.79)	5.80 (0.78)	5.11 (0.96)
3d	9		6.73 (0.70)	6.68 (0.61)	5.50 (0.90)	6.16 (0.88)	5.33 (0.92)
4d	9	MeI	6.28 (0.85)	6.75 (0.55)	5.18 (0.79)	5.74 (0.62)	5.08 (0.88)
3e	11		7.42 (0.88)	7.45 (0.59)	6.45 (1.00)	7.15 (0.80)	6.32 (0.88)
4e	11	MeI	6.95 (0.80)	6.82 (0.59)	6.12 (0.90)	6.38 (0.90)	5.80 (0.86)
<i>CCh</i>			4.42 (0.63)	5.92 (0.98)	4.36 (0.57)	5.20 (0.61)	4.16 (0.80)

I composti **1a-f** e **2a-f** (Tab. 4.a), la cui struttura porta i gruppi amminici o ammoniaci in posizione terminale, possono essere suddivisi in due gruppi, a seconda del valore di pK_i : i derivati con $n = 3$ e 5 hanno bassa affinità, con valori di pK_i inferiori a 5. I composti con $n \geq 7$ mostrano affinità nel range nanomolare: i valori di pK_i sono superiori a 7 con poche eccezioni (**1d** e **1e** su hM₂, e **1f** su hM₂, hM₃, hM₄ e hM₅). L'affinità di solito aumenta passando da ammine terziarie a derivati ammoniaci, anche se l'incremento è al massimo di una unità logaritmica. L'affinità sui sottotipi hM₁, hM₂ e hM₄ aumenta anche aumentando la lunghezza della catena spaziatrice fino a $n = 9$ poi diminuisce per $n = 11$. Su hM₅ il massimo di affinità si registra per $n = 7$; su hM₃ il massimo si ha con $n = 9$ per la serie amminica e per $n = 7$ per la serie ammoniacale. Il grafico riportato in figura 4.2 mostra chiaramente tra i derivati con $n = 5$ e $n = 7$ un salto di affinità inaspettato, che ci ha spinto a sintetizzare e saggiare i derivati **1c** e **2c** con $n =$

6, che hanno mostrato una affinità intermedia. Il derivato **1c** era noto: erano state riportate le sue proprietà antagoniste nicotiniche (effetto miorilassante misurato su cani e gatti da esperimento) ^[142]. Dalla figura 4.2, risulta chiaro che, per $n > 5$, l'affinità più bassa si riscontra generalmente sui sottotipi hM_2 e hM_4 .

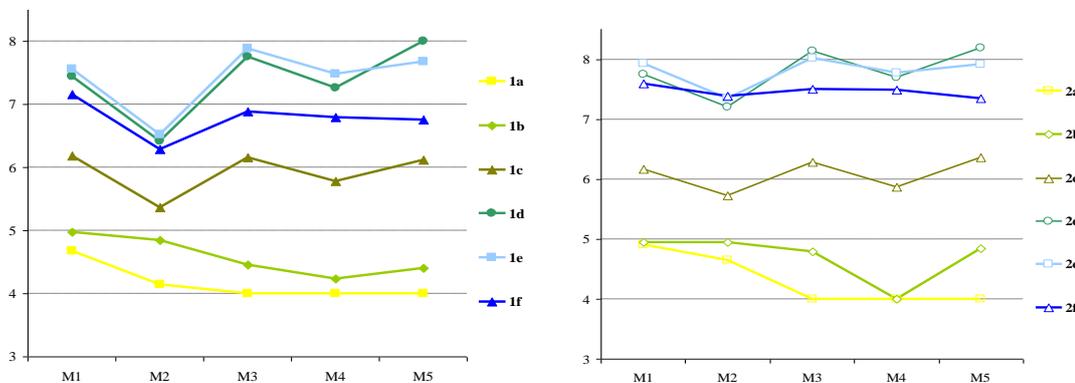


Figura 4.2. Variazione dei valori di pK_i in funzione del sottotipo recettoriale per i composti **1** e **2**.

Per quanto riguarda i derivati **3a-e** e **4a-e**, che presentano i gruppi basici o ammoniacali in posizione interna, possiamo notare come l'affinità delle ammine terziarie sia generalmente superiore a quella dei derivati ammoniacali quaternari, un fatto inaspettato in derivati del carbacolo, e diverso da quanto visto per i derivati **1** e **2**. L'affinità aumenta con l'aumentare della catena polimetilenica, con il massimo per $n = 11$; l'unica eccezione a questo andamento regolare è dato dal derivato **4d**, la cui affinità è minore di quella del suo omologo inferiore **4c**. Inoltre, a differenza di quanto visto per i derivati **1** e **2**, nella serie **3** e **4** l'affinità sui sottotipi hM_3 e hM_5 è generalmente inferiore rispetto a quella sugli altri sottotipi; fanno eccezione il derivato **4a** e **3b**, la cui affinità su hM_4 e hM_5 (**4a**) e hM_4 (**3b**) è troppo bassa per essere misurata (Fig. 4.3).

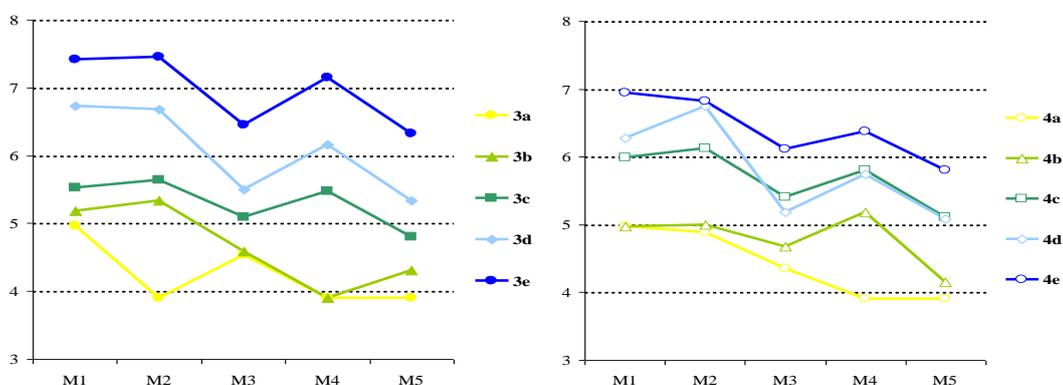


Figura 4.3: Variazione dei valori di pK_i in funzione del sottotipo recettoriale per i composti **3** e **4**.

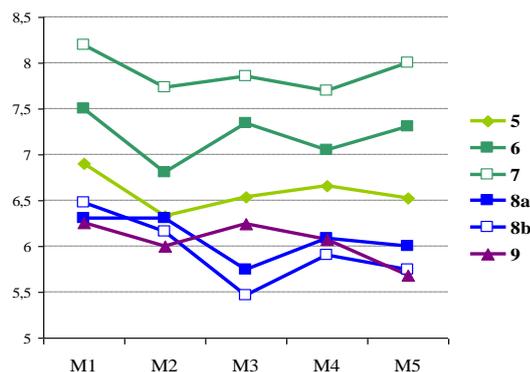


Figura 4.4: Variazione dei valori di pK_i in funzione del sottotipo recettoriale per i composti 5-9.

Si può notare che il composto **5**, paragonato ai derivati che presentano uno spaziatore di simile lunghezza, dimostra un grado di affinità comparabile ai suoi analoghi **3d** e **3e**, ma è meno potente se paragonato a **1e** e **1f**, confermando che un maggiore ingombro sull'azoto basico porta una diminuzione di affinità. Inoltre, il valore di pK_i più alto è sul sottotipo hM_1 , mentre quello più basso è per hM_2 , dimostrando così un profilo diverso da quello delle serie **1** e **3**.

Il composto **6** e il suo ammonico quaternario **7** hanno affinità comparabile rispetto a **1e-f**, loro analoghi a spaziatore polimetilenico della stessa lunghezza, ma rispetto a **1a-b**, che presentano la stessa lunghezza totale, dimostrano affinità maggiore. Un simile andamento si riscontra anche nella molecola **9**, che ha affinità inferiore rispetto ai suoi analoghi **3d-e**, ma nuovamente, affinità maggiore quando comparata ai suoi analoghi con la stessa lunghezza totale (**3b**). Invece, nei prodotti **8a** e **8b** la mancanza della seconda unità carbammica porta una diminuzione di affinità rispetto ai derivati **3d** e **3e**, variazione che è molto evidente per $n=11$. Questi risultati suggeriscono che un secondo residuo etilcarbammico non è essenziale per l'attività, ma quando presente può giocare un ruolo importante nell'interazione coi vari sottotipi.

Per quanto riguarda i composti **10a** e **10b**, disponiamo solo di pochi dati preliminari (che quindi non verranno mostrati) che fanno pensare che questi prodotti abbiano un complesso profilo di interazione con i recettori muscarinici.

4.1.2. Studi funzionali su cellule CHO che esprimono i sottotipi hM_1 , hM_2 e hM_3

Alcune molecole delle serie **1-4**, sono state selezionate per indagarne le proprietà di

agonista o di antagonista attraverso studi funzionali direttamente su cellule CHO, che esprimono il sottotipo recettoriale hM₁, hM₂ o hM₃, misurando il livello di ERK fosforilato con il saggio *Cellul'Erk*. Tutte le molecole sono state provate una concentrazione vicina ai rispettivi valori di Ki; per quanto riguarda la dose di ACh è stato deciso di usare la concentrazione di 0.1 μM, che è in grado di indurre una risposta submassimale nelle cellule CHO transfettate e che viene completamente bloccata da atropina alla dose di 10 μM.

Abbiamo scelto di testare le molecole con affinità submicromolare, selezionando **1c**, **2c,d**, **3c,d**, **4c,d** e **7**. Tutte queste molecole sono state prima testate come agonisti, tranne **2d** e **7**, che, in esperimenti preliminari su ileo di cavia, avevano già mostrato un effetto antagonista. Nessuna delle sostanze, saggiate fino ad una concentrazione di 100 μM, ha mostrato capacità di incrementare la concentrazione di ERK fosforilato in cellule esprimenti i sottotipi recettoriali muscarinici hM₁, hM₂ e hM₃ (dati non mostrati). Quindi è stata valutata la loro possibile attività antagonista, alla concentrazione di 10 μM, o di 100 μM quando alla dose inferiore si erano mostrati inattive; i risultati sono riportati nelle figure 4.5-4.7.

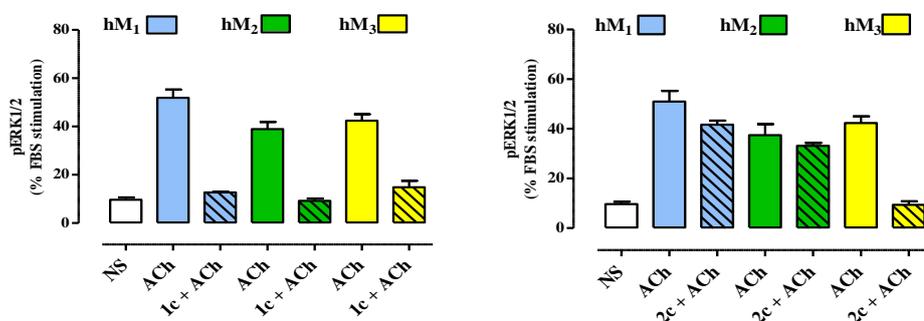


Figura 4.5: Istogrammi che rappresentano l'antagonismo di **1c** e **2c** (100 μM) verso ACh 10 nM sui sottotipi recettoriali hM₁, hM₂ e hM₃. NS: controllo non stimolato.

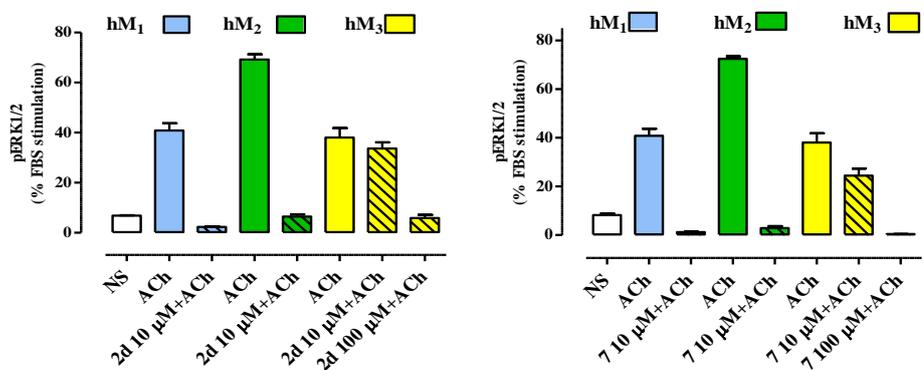


Figura 4.6: Istogrammi che rappresentano l'effetto antagonista di **2d** e **7** (10 – 100 μM) verso ACh 0.1 μM sui tre sottotipi recettoriali hM₁, hM₂, hM₃. NS: controllo non stimolato.

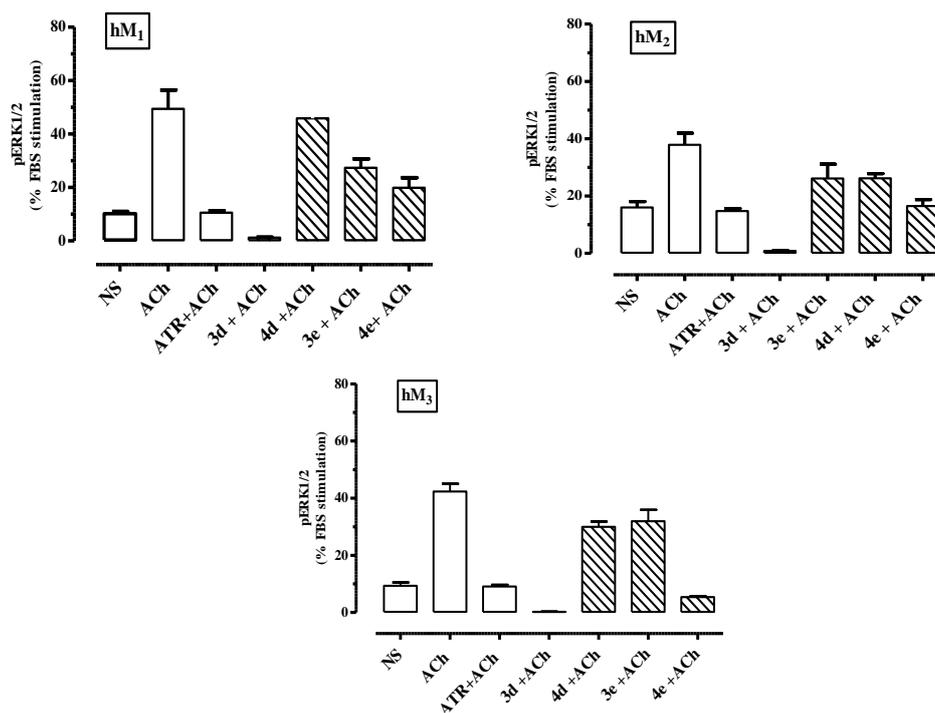


Figura 4.7: Istogrammi che rappresentano l'azione antagonista delle molecole **3d,e/4d,e** ($100\mu\text{M}$) nei confronti di ACh 10 nM . L'atropina (ATR) è stata utilizzata alla concentrazione $10\mu\text{M}$. NS: controllo non stimolato.

In queste condizioni il derivato **1c** si rivela un'antagonista su tutti e tre i sottotipi recettoriali muscarinici umani (figura 4.5), mentre il corrispettivo iodometilato **2c** dimostra un effetto antagonista solo sul sottotipo hM₃, con poco o nessun effetto su hM₁ e hM₂. I composti **2d** e **7** sono attivi a $10\text{ }\mu\text{M}$ sui recettori hM₁ e hM₂, ma solo alla dose più alta sul sottotipo hM₃, dimostrando quindi una certa selettività funzionale. Il prodotto **3d** ($100\text{ }\mu\text{M}$) blocca in modo evidente l'effetto di ACh su tutti e tre i sottotipi recettoriali, mentre **3e** e **4d** sono molto meno potenti; **4e** è un antagonista più efficace su hM₃ rispetto a hM₁ e hM₂.

Questi dati non sono completamente in accordo con i dati di binding riportati nelle Tab 4.1-4.3. Infatti, nessuno dei composti si dimostra selettivo quando ne è valutata l'affinità; invece, **2c** mostra una certa selettività funzionale, seppure a dosi alte, verso il sottotipo hM₃ rispetto a hM₁ e hM₂, anche se i valori di pKi per i sottotipi hM₁ e hM₃ sono molto simili (6.16 e 6.28, rispettivamente) mentre su hM₂ la pKi (5.73) è leggermente inferiore. Il derivato **2d** mostra una maggiore affinità rispetto a **2c**, e infatti è attivo nel saggio funzionale alla dose di $10\text{ }\mu\text{M}$ ma solo sui sottotipi hM₁ e hM₂; al contrario, **2d** mostra affinità più alta per il sottotipo hM₃ (pKi 8.14) sul quale è attivo solo a $100\text{ }\mu\text{M}$. Il derivato **7** mostra un comportamento simile a quello di **2d**. Anche la

leggera selettività di **4e** nei confronti di hM₃ non è facilmente spiegabile visto che su questo sottotipo la sua affinità è 5-7 volte minore rispetto ai recettori hM₂ e hM₁.

In ogni caso, dal momento che le molecole testate mostrano avere azione antagonista debole in tutti e tre i sottotipi recettoriali, da questo saggio si evince che i derivati del carbacolo da noi sintetizzati hanno perso le proprietà agoniste del composto lead.

4.1.3. Studi di molecular modelling

Per razionalizzare i risultati ottenuti dagli esperimenti di binding all'equilibrio, sono stati effettuati studi di docking dal Prof. Vistoli (Università di Milano). Risultati preliminari per alcuni composti della serie **2**, su un modello di recettore hM₂ [143], dimostrano che i composti possono adottare differenti modi di interazione a seconda della lunghezza dello spaziatore polimetilenico. In figura 4.8, a destra, è riportato il possibile binding mode del composto **2e**, che è capace di inserirsi a ponte tra il sito ortosterico (individuato da Asp¹⁰³) e il sito allosterico, situato vicino ai residui Glu¹⁹⁷, Glu⁴⁰¹, Tyr⁸⁵, Tyr¹⁷⁹, Gln¹⁷⁷. I composti a catena corta invece, non riescono a raggiungere il sito allosterico (fig. 4.8, sinistra), preferendo una posizione che è confinata all'area ortosterica. Inoltre, a causa della presenza del ponte polimetilenico, il gruppo etilcarbammico non è capace di adottare un'orientazione ottimale nel sito ortosterico, rispetto a quanto accade per gli agonisti muscarinici classici. Questi dati suggeriscono quindi che almeno i composti a lunga catena possano avere un comportamento di tipo bitopico.

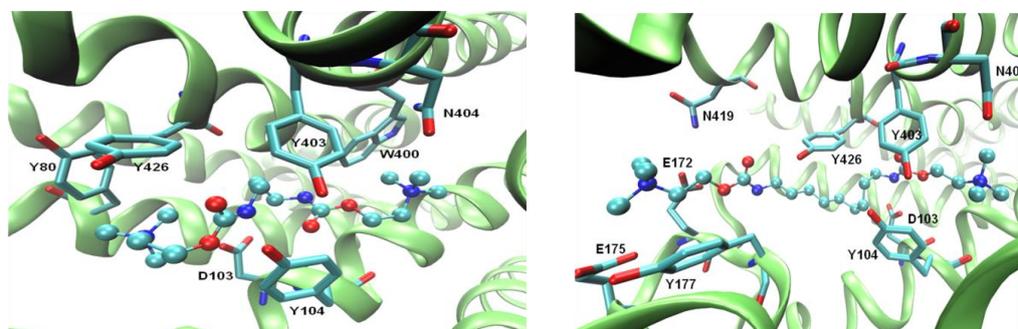


Figura 4.8: *Composti 2a (sinistra) e 2e (destra) all'interno nel recettore hM₂.*

4.1.4. Esperimenti di tipo cinetico

L'azione allosterica nei confronti del recettore muscarinico di solito si misura valutando la modulazione della cinetica di dissociazione di un radioligando dal proprio recettore da parte dell'agente in esame; composti che presentano un simile effetto spesso si sono rivelati anche inibitori in studi di binding condotti all'equilibrio e/o in studi funzionali [72]. Da un punto di vista empirico, per meglio comprendere quanto accade in vitro, si considera il legame tra l'ipotetico farmaco (L^*) marcato con un isotopo radioattivo ed un recettore (R).

Supponendo che la popolazione recettoriale in studio sia omogenea, la reazione segue la legge di azione di massa:



regolata dalla costante di equilibrio K_a che indica quanto la reazione di formazione del complesso $[L^*R]$ sia spostata verso destra. Non a caso la K_a , nota anche come costante di affinità, esprime il rapporto tra la costante di formazione del complesso (K_{on}) e la costante di dissociazione del medesimo (K_{off}), che rappresentano le costanti di velocità associate a questi due processi:

$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[L^*R]}{[L^*][R]} = \frac{1}{K_d}$$

Negli studi di binding è tuttavia utilizzata di preferenza la costante di equilibrio della reazione inversa, ovvero la K_d , espressa come concentrazione molare:

$$K_d = \frac{1}{K_a}$$

il cui valore è dunque inversamente proporzionale all'affinità del legante in studio nei confronti del recettore. La K_d rappresenta la concentrazione di un farmaco che occupa per il 50% il recettore all'equilibrio.

Gli studi di binding all'equilibrio, che abbiamo preso in considerazione nel paragrafo 4.1, sono spesso utilizzati come screening iniziale nei protocolli di ricerca farmaceutica, per costruire curve di competizione che permettono di valutare l'affinità di legame di un determinato ligando, aggiunto alle concentrazioni opportune, per uno specifico tipo di recettore. Gli studi di binding in cinetica invece sono utilizzati per ottenere appunto

informazioni sulla cinetica di dissociazione della [³H]-NMS in presenza o assenza di un modulatore allosterico in funzione del tempo; si misura dunque la velocità di dissociazione del complesso farmaco recettore [L*R] in presenza di alte concentrazioni di un legante ortosterico non marcato, che impedisca la riassociazione del radiolegante al recettore: viene misurata quindi la quota effettiva di radioattività che rimane legata al recettore nel tempo. Gli esperimenti di dissociazione del radiolegante sono quindi i più usati fra i saggi di cinetica per rivelare e quantificare le condizioni di allosterismo.

La dissociazione di [³H]-NMS dal complesso legante-recettore si studia preincubando il recettore con il legante marcato per un tempo sufficientemente lungo da permettere alla reazione di raggiungere le condizioni di equilibrio; successivamente, si aggiungono, a tempi diversi, concentrazioni elevate di un altro legante non marcato che compete con [³H]-NMS in modo da prevenire la riassociazione di questa al recettore (nel nostro caso atropina 1 μM). In questo modo viene ridotta a 0 la velocità di associazione (K_{on}) e questo fa sì che sia rilevabile solo la velocità di dissociazione del radiolegante dal recettore (K_{off}). Per questo motivo, l'effettiva riduzione del binding di [³H]-NMS in funzione del tempo ci permette di quantificare la K_{off} e il relativo tempo di emivita (t_{1/2} = 0.69/K_{off}), che rappresenta il tempo necessario affinché il radiolegante si dissocia per il 50% dal recettore.

In presenza di un modulatore allosterico i valori di K_{off} possono cambiare e la dissociazione può essere rallentata oppure accelerata. Come è prevedibile dal modello del complesso allosterico ternario (Fig. 4.9), il radiolegante chiaramente può dissociare sia dal recettore occupato che dal recettore non occupato dalla molecola allosterica.

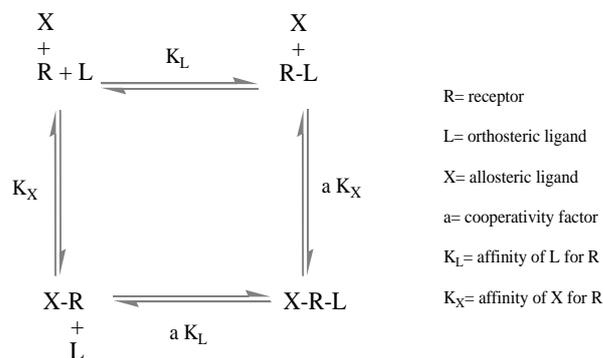


Figura 4.9: rappresentazione del modello allosterico ternario (ATCM).

Oltre alle affinità di questi due ligandi per i rispettivi siti di legame, questo modello incorpora anche un fattore di cooperatività (α), che spiega dell'effetto o degli effetti che

ciascuno di questi ligandi porta alla luce nei confronti dell'altro quando si instaura il legame con il recettore; questo fattore di cooperatività rende conto della complessità dell'interazione che va al di là dei semplici schemi di reazione competitiva (rappresentati nel classico modello binario).

In pratica, il modello ATCM proposto è quello con il minimo numero di parametri (K_L , K_X , α e anche αK_X) che può essere determinato sperimentalmente per definire le proprietà di molecole allosteriche. Per lo studio delle cinetiche di dissociazione di [^3H]-NMS sono stati condotti esperimenti in cinetica (tecnica *reverse time protocol*) come descritti nella parte sperimentale.

Lo scopo di questo protocollo è stato anche quello di determinare i $t_{1/2}$ di [^3H]-NMS per ciascun sottotipo recettoriale, in modo da stabilire i tempi di incubazione necessari per i successivi esperimenti, che sono stati tutti realizzati con la tecnica di *single time off rate*. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in tampone fosfato, a pH=7.4, a temperatura ambiente; per impedire la riassociazione di [^3H]-NMS, l'atropina 1 μM è stata aggiunta all'ambiente di reazione a tempi diversi, e precisamente: 0, 10, 20, 40, 80 min.

I dati sono stati analizzati ed elaborati con un modello di dissociazione mono-esponenziale, come descritto da Lazareno & Birdsall ^[64] secondo la formula seguente:

$$Y = Y_0 \times \exp(-K \times X) + \text{Plateau}$$

dove Y_0 rappresenta la quota di [^3H]-NMS legata al tempo 0, K è la velocità di dissociazione del complesso e X è il tempo.

Le cinetiche di dissociazione di [^3H]-NMS dai cinque sottotipi recettoriali sono mostrate in figura 4.10, mentre in tabella 4.4 sono riportate le informazioni quantitative relative alle K_{off} ed ai rispettivi valori di $t_{1/2}$ calcolati.

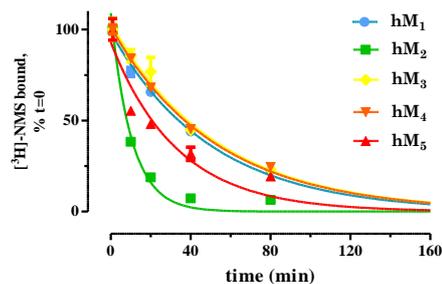


Figura 4.10: Curve di dissociazione di [³H]-NMS dai cinque sottotipi recettoriali muscarinici. I valori rappresentano la media ± SEM di 2-10 esperimenti indipendenti, ciascuno condotto in duplicato. Tutti gli esperimenti sono condotti con la tecnica del “full time dissociation assay”

Tabella 4.4: Velocità di dissociazione (K_{off} , min^{-1}) e tempo di dimezzamento della dissociazione ($t_{1/2}$, min) di [³H]-NMS dai recettori muscarinici, ottenuti con esperimenti condotti con modalità “full time”. I valori rappresentano la media ± SEM di 2-10 esperimenti, ciascuno condotto in duplicato.

	hM ₁	hM ₂	hM ₃	hM ₄	hM ₅
K_{off}	0.025±0.001	0.096±0.005	0.015±0.002	0.019±0.001	0.021±0.005
$t_{1/2}$	34.66 ± 2.98	7.24 ± 0.85	36.60 ± 7.31	36.36 ± 2.93	23.16 ± 7.34

I parametri delle cinetiche di dissociazione sono in accordo con i dati presenti in letteratura, condotti con tamponi di analoga forza ionica ^[144] inoltre, sempre in accordo con la letteratura, la cinetica di dissociazione del radiolegante impiegato dal sottotipo recettoriale hM₂ risulta più rapida ($t_{1/2} = 7.24 \pm 0.85$), se confrontata con gli altri recettori, che presentano valori di $t_{1/2}$ che variano da 23.16 ± 7.34 min nel caso del recettore hM₅ e 36.60 ± 7.31 min calcolato invece per il sottotipo hM₃. La stima del tempo di *half-life* di [³H]-NMS è fondamentale per stabilire i tempi di incubazione necessari negli esperimenti successivi, che saranno per la maggior parte condotti con modalità *single time*.

Sono stati quindi presi in considerazione studi di binding in cinetica, allo scopo di determinare se anche le molecole indagate avessero un comportamento tipico di modulatori allosterici, per la loro capacità di modificare la cinetica di dissociazione di [³H]-NMS da tutti e cinque i sottotipi recettoriali. Dopo aver calcolato le cinetiche di dissociazione di [³H]-NMS da sola, è stata misurata la dissociazione dell’antagonista non selettivo ortosterico dai cinque sottotipi recettoriali muscarinici in seguito all’aggiunta di atropina 1 μM, in presenza dei nuovi composti. In una prima fase della ricerca, le curve di dissociazione sono state ottenute utilizzando il protocollo *full time course*. La caduta esponenziale di radioattività osservata in funzione del tempo

consente, come già descritto, di misurare il valore della k_{off} , che rappresenta la velocità di dissociazione del radiolegante dal recettore. Se ci troviamo in presenza di modulatori allosterici negativi, come possiamo stimare dalle valutazioni fatte in precedenza, la velocità di questo processo di dissociazione potrà essere diminuita, in presenza di concentrazioni crescenti delle molecole in esame. In figura 4.11 sono riportate, a titolo di esempio, le curve di dissociazione della $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ dal recettore hM_4 e hM_5 in assenza e in presenza di due concentrazioni crescenti (10 e 100 μM) del derivato **3e** misurate in modalità *full time*.

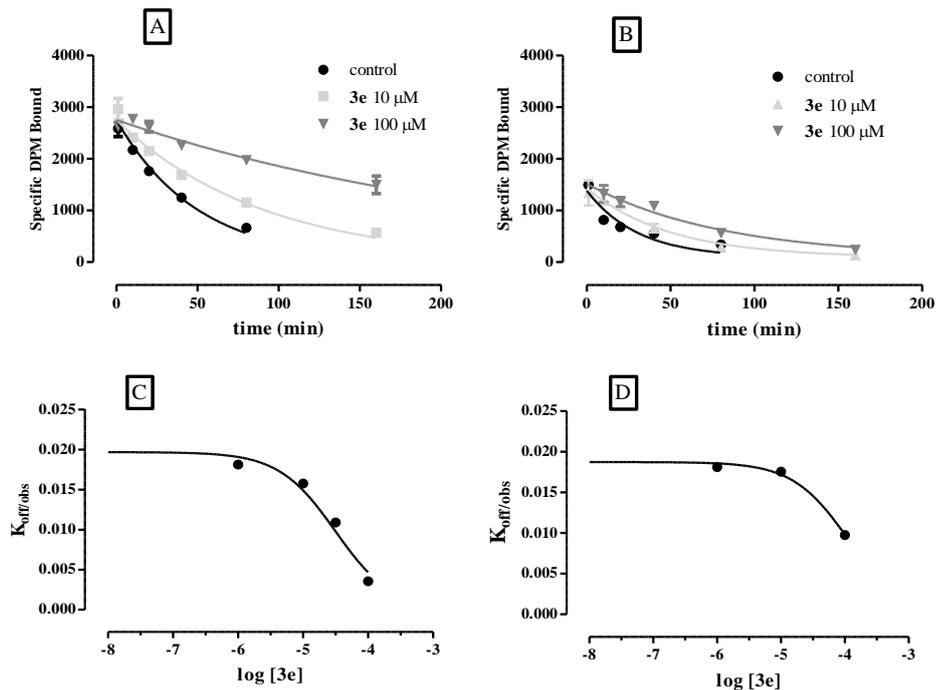


Figura 4.11: grafici rappresentativi del saggio di cinetica di dissociazione per la determinazione dell'affinità del composto **3e** per i recettori hM_4 (A) e hM_5 (B) legati alla $[^3\text{H}]\text{-NMS}$: curve di dissociazione della $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ in assenza (nero) e in presenza di due concentrazioni (10-100 μM) di **3e**. (C) e (D) rappresentano le curve dose-risposta sigmoidali dei valori di k_{obs} espressi in funzione del log della concentrazione di **3e** per i recettori rispettivamente hM_4 e hM_5 .

Dai grafici risulta evidente come concentrazioni crescenti del composto sono in grado di rallentare fortemente e in modo dose-dipendente la velocità di dissociazione di $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ dal suo legame al sito ortosterico presente sul recettore hM_4 : la quota di radioattività che rimane legata al recettore ad un dato tempo, infatti, aumenta all'aumentare della concentrazione del legante testato. Nel recettore hM_5 il fenomeno si conferma meno evidente, almeno alle concentrazioni utilizzate; in questo caso, infatti, per percepire una riduzione apprezzabile dei valori di K_{off} della $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ dal suo legame al sito ortosterico, si devono utilizzare concentrazioni 10 volte più alte (100

μM), rispetto a quella che era già efficace nel sottotipo hM_4 . I valori di K_{off} e K_{obs} , che derivano dalla elaborazione dei dati di ciascuna concentrazione di modulatore con l'equazione di decadimento monoesponenziale (descritta in precedenza), possono essere riportati in un grafico in funzione del logaritmo della concentrazione dell'agente allosterico ed analizzati con l'equazione classica di una curva dose-risposta sigmoidale:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \times \text{HillSlope})})$$

dove i valori Top e Bottom rappresentano rispettivamente il plateau massimo e minimo della curva sigmoidale, Hill slope è la pendenza della curva e IC_{50} è la concentrazione che inibisce del 50% il binding specifico di $[^3\text{H}]\text{-NMS}$.

Le curve così costruite (fig. 4.11 parti C e D) rappresentano le curve occupazionali dell'agente allosterico al recettore legato alla $[^3\text{H}]\text{-NMS}$. Il valore di IC_{50} che viene calcolato corrisponde, in questo caso, alla costante di affinità dell'agente allosterico per il recettore occupato, e viene espresso come $\log K_{\text{occ}}$ (tab. 4.5).

Tabella 4.5: valori di $\log K_{\text{occ}}$ calcolati per il composto **3e** in modalità *full time* e *single time*. I valori rappresentano la media \pm SEM della elaborazione di 1-2 esperimenti indipendenti, ciascuno condotto in duplicato.

	Full time course	Single time off rate
hM₁	4.10 \pm 0.06	4.28 \pm 0.18
hM₂	4.98 \pm 0.06	4.96 \pm 0.07
hM₃	4.00 \pm 0.19	4.15 \pm 0.08
hM₄	4.57 \pm 0.06	4.79 \pm 0.06
hM₅	4.02 \pm 0.07	4.15 \pm 0.06

Come si può notare dalla tabella 4.5 i valori di $\log K_{\text{occ}}$ ottenuti con entrambi i metodi, *full time course* e *single time off rate*, sono analoghi e perfettamente sovrapponibili, infatti la differenza dei valori medi calcolati, non è apprezzabilmente diversa nei due protocolli sperimentali usati.

Per tutti gli esperimenti successivi il comportamento di ciascuna molecola sulla cinetica di dissociazione del radiolegante dal recettore già occupato da $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ è stato determinato quindi con esperimenti del tipo *single time*. Inoltre questo approccio ci permette di poter valutare l'effetto di un numero maggiore di concentrazioni delle molecole che ipotizziamo allosteriche all'interno di uno stesso esperimento.

Con la modalità *single time*, il grado di dissociazione è valutato ad un singolo tempo, ma possiamo determinare lo stesso il valore di K_{off} per [^3H]-NMS. Negli esperimenti in *single time* il punto cruciale è, come già ricordato, la determinazione del tempo di incubazione, che deve essere 2-3 volte il $t_{1/2}$: solo in queste condizioni rimane ancora circa il 20% di [^3H]-NMS legata al recettore e questo ci garantisce una stima accurata della $K_{\text{off/obs}}$

In accordo con il modello del complesso allosterico ternario (ATCM), il radiolegante, di tipo ortosterico, può quindi dissociare sia dal recettore libero, che dal recettore simultaneamente occupato dall'agente allosterico. Con questi esperimenti pertanto si misura contemporaneamente la velocità di dissociazione della [^3H]-NMS in assenza (k_{off}) e in presenza del potenziale modulatore allosterico (k_{obs}).

In questo modo è stata valutata quindi la capacità di rallentare la cinetica di dissociazione di [^3H]-NMS dai cinque sottotipi recettoriali muscarinici di alcuni dei composti delle serie **1-4** che si erano dimostrati più interessanti negli studi precedenti, del composto **5** che rappresenta un ibrido tra le serie **1** e **3**, infine di alcuni dei composti che presentano un unico residuo carbammico (**6**, **7**, **9**) in modo da indagare sul ruolo della posizione e dell'importanza di avere in contemporanea entrambi i residui etilcarbammici. Per confermare e dimostrare ulteriormente le caratteristiche allosteriche di questi composti, abbiamo valutato anche il loro effetto concentrazione-dipendente (0.01 -100 μM) sulla dissociazione di [^3H]-NMS dai recettori muscarinici. La figura 4.12, mostra per la molecola **3d**, a titolo di esempio, per ciascun sottotipo recettoriale, l'influenza di concentrazioni crescenti di prodotto sulla dissociazione del radiolegante in presenza di atropina 1 μM : per maggiore chiarezza rappresentativa sono riportate solo le curve associate alle concentrazioni 1, 3, 10, 30 e 100 μM).

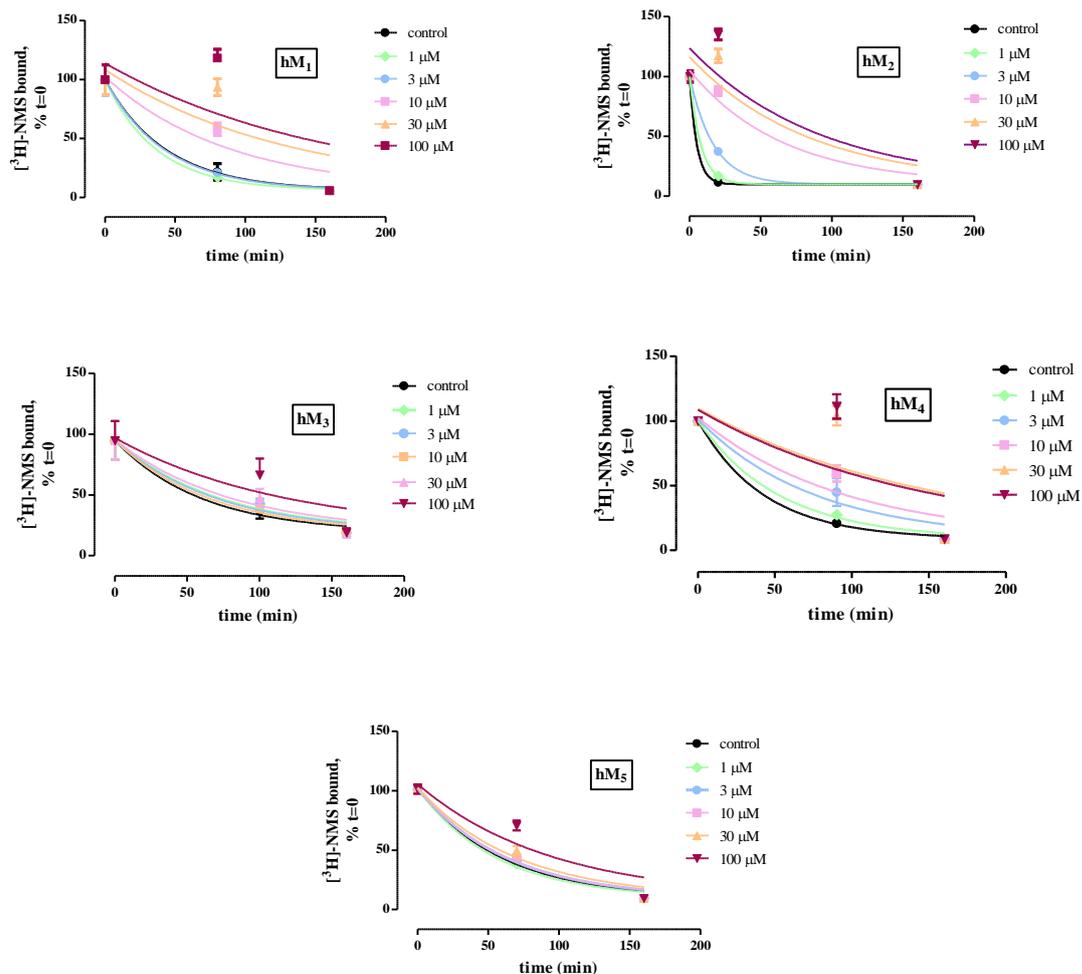


Figura 4.12: effetto di **3d** sulla dissociazione di [^3H]-NMS dai cinque sottotipi recettoriali muscarinici espressi in cellule CHO. Gli esperimenti sono condotti con la tecnica del single time off rate (vedere per dettagli il capitolo materiali e metodi); il binding non specifico è determinato in parallelo aggiungendo atropina $1\ \mu\text{M}$ prima della fase di preassociazione. I dati mostrati rappresentano la media di tre esperimenti, ciascuno condotto in duplicato.

Basse concentrazioni ($1\ \mu\text{M}$) non sono in grado di modificare le K_{off} in nessun sottotipo recettoriale, mentre a concentrazioni superiori (da 3 a $100\ \mu\text{M}$), il composto **3d**, come anche tutti gli altri composti testati, rallentano la velocità di dissociazione nei sottotipi hM₁, hM₂ e hM₄, anche se con diversa potenza.

Nei sottotipi hM₃ e hM₅ solo la concentrazione più alta utilizzata di tutti i composti ($100\ \mu\text{M}$) è in grado di rallentare, anche se debolmente, la cinetica di dissociazione di [^3H]-NMS.

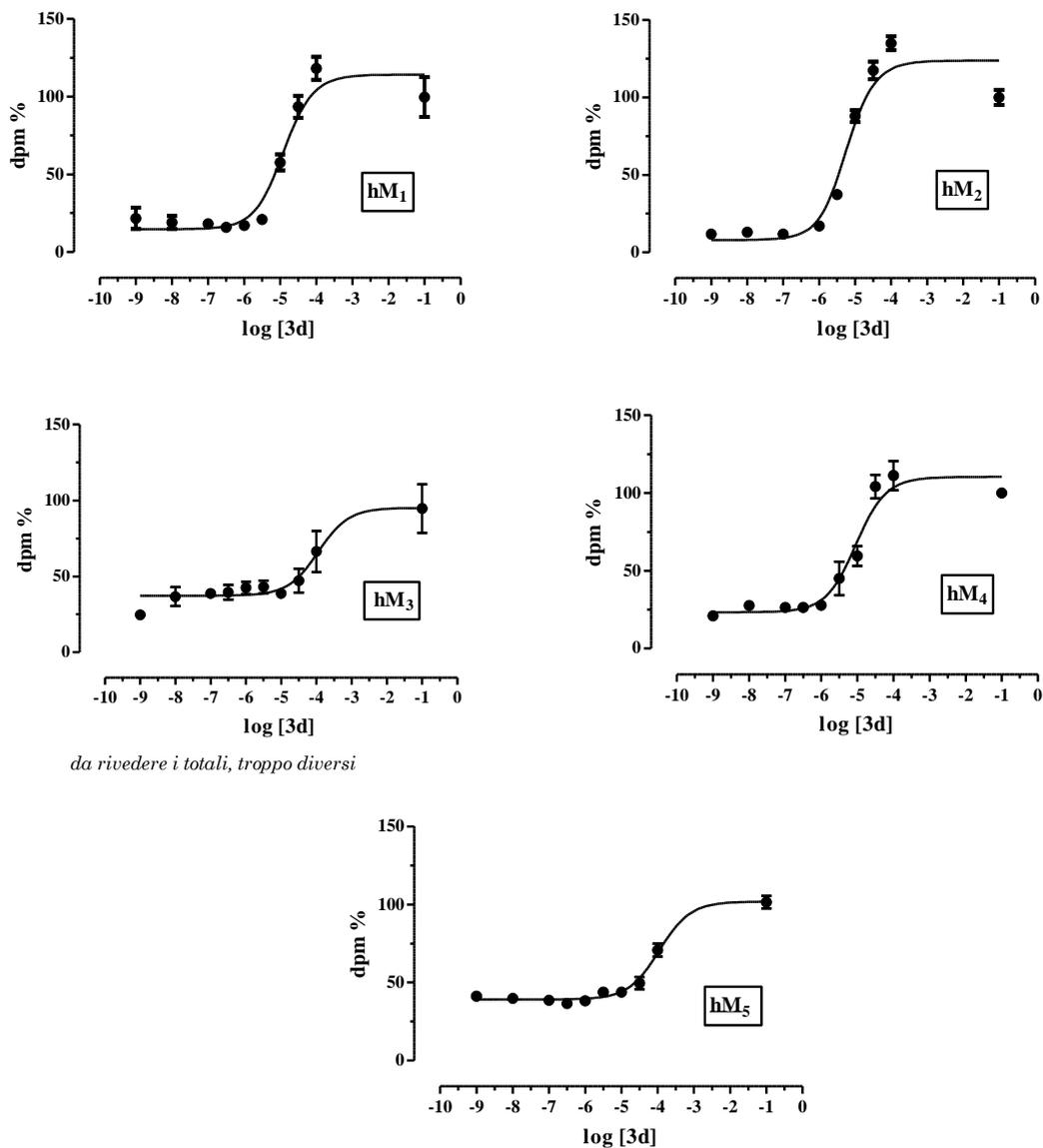
4.1.4. Misura dell'affinità degli agenti allosterici per i recettori occupati da [³H]-NMS

Per determinare l'affinità di ciascun modulatore allosterico per ogni sottotipo recettoriale occupato da [³H]-NMS, i dati ricavati dalle cinetiche di dissociazione condotti in modalità *one point kinetic* sono stati elaborati secondo l'equazione seguente:

$$Y = \text{Span} \times \exp\{-t \times k_{\text{off}} / [1 + 10^{(\log K_{\text{occ}} + X)}]\}$$

Dove K_{off} è l'affinità del radiolegante in assenza del composto allosterico, $\log K_{\text{occ}}$ rappresenta il log della costante di affinità del legante allosterico per il recettore occupato e t è il tempo scelto per la cinetica in *single time*, equivalente a 2-3 volte il valore di $t_{1/2}$ per ciascun recettore.

Con questa elaborazione ^[48] si possono ottenere i valori di K_{off} (in assenza di agente allosterico) e K_{obs} (in presenza di agente allosterico) e possiamo determinare, in un unico passaggio matematico, il valore di affinità dell'agente allosterico per il recettore occupato dalla [³H]-NMS (K_{occ}). Le curve sigmoidali che si disegnano con l'applicazione di questa formula sono riportate in figura 4.13, come esempio sono riportate le curve relative alla molecola **3d**.

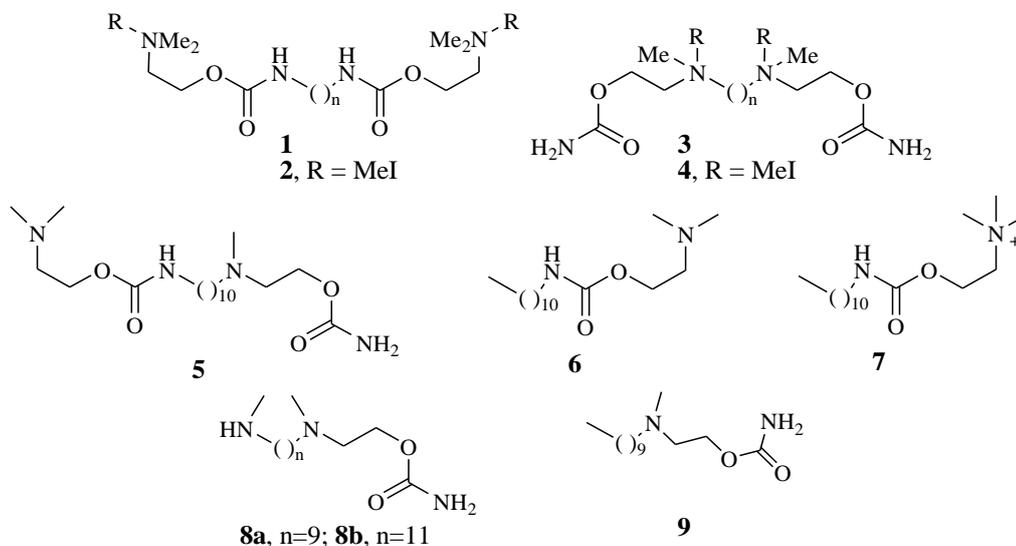


da rivedere i totali, troppo diversi

Figura 4.13: effetto di $3d$ sulla cinetica di dissociazione di [^3H]-NMS dai cinque sottotipi recettoriali muscarinici espressi in cellule CHO. Gli esperimenti sono condotti con la tecnica del single time off rate (vedere per dettagli il capitolo materiali e metodi); il binding non specifico è determinato in parallelo aggiungendo atropina $1\ \mu\text{M}$ prima della fase di preassociazione. I dati mostrati rappresentano la media \pm SEM di tre esperimenti, ciascuno condotto in duplicato.

I valori numerici delle affinità (espressi come pK_{occ} , ovvero $-\log\text{K}_{\text{occ}}$) dei composti provati sui cinque sottotipi di recettore occupato da [^3H]-NMS sono riportati in tabella 4.6, mentre le elaborazioni grafiche sono riportate in figura 4.14. La gallamina è riportata come confronto.

Tabella 4.6: Valori di pK_{occ} ($-\log K_{occ}$) misurati per ogni composto per tutti e cinque i sottotipi recettoriali muscarinici. I valori sono la media ($\pm SEM$) di tre osservazioni. n.T. = non testato.



	n	R	hM ₁	hM ₂	hM ₃	hM ₄	hM ₅
1b	5	-	3.43	3.71	3.36	3.36	3.39
2b	5	MeI	4.04	4.64	3.58	4.34	3.41
1c	6	-	3.13	3.00	3.50	3.00	3.62
2c	6	MeI	3.61	3.95	3.66	3.58	3.59
1d	7	-	4.24	4.57	3.73	4.14	3.69
2d	7	MeI	4.11	4.62	3.71	4.15	3.53
1e	9		5.00	4.76	4.14	5.54	3.94
2e	9	MeI	5.25	4.98	4.34	5.36	4.31
1f	11		5.05	4.72	3.43	5.16	3.76
2f	11	MeI	5.43	5.12	4.10	5.50	4.35
3d	9	-	5.32	5.79	4.14	5.36	4.16
4d	9	MeI	4.73	4.65	4.09	3.84	3.70
3e	11	-	4.28	4.96	4.15	4.79	4.15
4e	11	MeI	4.91	5.18	3.82	4.67	4.07
5	-	-	5.02	5.30	3.80	4.81	3.72
6	-	-	3.92	4.02	4.19	4.29	4.27
7	-	MeI	3.84	4.46	4.40	4.57	4.40
8a	9	-	4.98	4.57	4.01	4.36	3.87
8b	11	-	4.80	4.51	4.23	4.52	4.26
9	-	-	3.35	n.T	n.T	4.42	4.03
<i>gall</i>	-	-	4.15	5.16	4.20	4.56	4.30

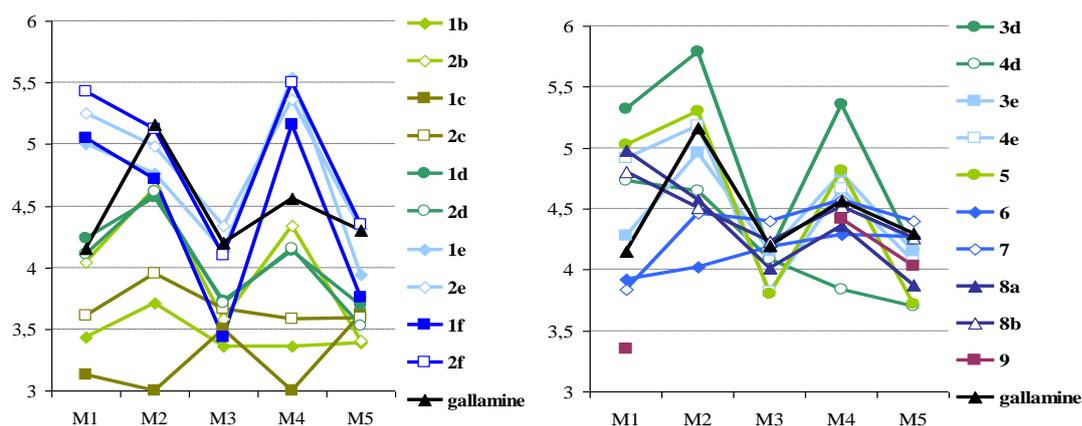


Figura 4.14. *Variazione dei valori di pK_{occ} in funzione del sottotipo recettoriale per i composti riportati in tabella 4.6.*

I valori di pK_{occ} , riportati in tabella dimostrano che per i prodotti della serie **1** e **2** solitamente l'affinità per il sito allosterico è maggiore per i sottotipi recettoriali hM₁, hM₂ e hM₄ rispetto a hM₃ e hM₅, in parziale disaccordo con i dati all'equilibrio (tab. 4.1, fig. 4.2) che mostrano una preferenza per i recettori dispari, e un minimo di affinità per hM₂ e hM₄. Non c'è un andamento univoco della pK_{occ} al variare della lunghezza dello spaziatore, ma i prodotti più lunghi mostrano maggiore affinità per il sito allosterico. Anche in questo caso i prodotti ammonici quaternari hanno una affinità generalmente maggiore a quella delle ammine terziarie, a parte la coppia **1d-2d**, dove la quaternarizzazione o meno sull'atomo di N non fa praticamente differenza. Anche per i prodotti **3d,e** e **4e** il minimo di affinità è sul recettore hM₃, mentre per **4d** la pK_{occ} varia con un diverso andamento.

Per quanto riguarda il composto **5**, i valori di pK_{occ} si sono dimostrati interessanti e intermedi tra quelli dei suoi analoghi delle serie **1** e **3** testati con questo tipo di saggio; contrariamente a quanto accade per i saggi all'equilibrio, l'affinità più alta per il sito allosterico si registra sul sottotipo hM₂. Le molecole che presentano due residui etilcarbammici (**1b-f**, **2b-f**, **3d,e**, **4d,e**, **5**), inoltre, hanno valori di pK_{occ} maggiori se paragonate ai derivati monocarbammici **6-9**, suggerendo un ruolo per la seconda unità di carbacolo nell'interazione col sito allosterico.

In conclusione dagli studi in cinetica si può affermare che le molecole testate possono interagire con il sito allosterico del recettore muscarinico, mostrando alcune preferenze per i sottotipi hM₁, hM₂ e hM₄ rispetto ai sottotipi hM₃ e hM₅, suggerendo

un'interazione di tipo bitopico, supportata anche da studi di molecular modelling. Ulteriori valutazioni su recettori hM₂ mutati sono in corso per caratterizzare meglio le proprietà allosteriche di queste classi di composti.

4.2. Sostanze ad attività nootropica

4.1.1. *Passive avoidance test*

I prodotti sintetizzati sono stati saggiati nel test del *passive avoidance* nel topo, come descritto nella parte farmacologica sperimentale. I risultati in nostro possesso sono riportati nelle tabelle 4.7 e 4.8; la potenza dei composti è indicata come MED (Minima dose efficace). Nella tabella 4.7 sono riportati gli analoghi preparati durante il mio lavoro di dottorato **51a-d/ 52a-d/ 53a-d/ 54a-d**, poi per confronto sono riportati anche i derivati sostituiti in posizione 2 con un gruppo fenilico o metilico, nonché i prodotti non sostituiti DM235 e DM194^[103,145]. Come sempre fatto nel corso di questa ricerca, non sono state saggiate dosi superiori ai 10 mg/kg, in quanto questa rappresenta una dose 4 ordini di grandezza superiore alla minima dose efficace di DM235 e DM232, i prodotti più attivi della serie. Per quanto riguarda gli analoghi di DM235, la serie che reca nelle posizioni 1 e 4, rispettivamente, i gruppi propionico e benzoilico (**51a-54a**), ha mostrato attività comprese tra 1 e 10 mg/kg, quindi sembra meno potente rispetto alla sua serie isomerica (**51b-54b**) che infatti, si è dimostrata piuttosto potente, con valori di MED compresi tra 0.1 e 1 mg/kg; il prodotto più attivo della serie si è dimostrato l'alcool **52b** di cui sono stati preparati anche gli enantiomeri, per i quali però ancora non abbiamo i risultati. Solo il derivato **54b** si è mostrato, stranamente, inattivo. I risultati ottenuti per queste due serie suggeriscono che un sostituito in grado di formare legami idrogeno è meglio tollerato vicino all'ammide aromatica rispetto a quella alifatica. Occorre ricordare come l'inserimento di un gruppo alchilico e arilico, effettuate nel corso di lavori precedenti, avevano dato risultati contrastanti. Infatti, mentre l'inserimento di un gruppo metilico in posizione 2 (adiacente al gruppo propionilico) aveva portato ad un prodotto inattivo (DM312, MED > 10 mg/Kg), un anello benzenico in posizione 2

aveva portato ad un prodotto (ELF11, MED 0.1 mg/Kg), che si era mostrato il più attivo tra i derivati 2-fenilici.

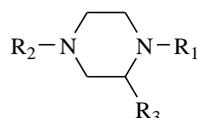
Tra gli analoghi di DM194, la serie recante sugli atomi di azoto nelle posizioni 1 e 4, rispettivamente, il gruppo fluorobenzenesolfonilico e acetilico (prodotti **51c-54c**) si è dimostrata piuttosto potente, infatti, i prodotti possiedono MED comprese tra 0.1 e 1 mg/Kg, quindi solo 1-2 ordini di grandezza superiori rispetto a DM194. In particolare, i composti più attivi di questa serie risultano essere **51c** e **53c**, che hanno MED paragonabili all'analogo metilico DM324, per questo motivo ci è sembrato interessante preparare gli enantiomeri di **53c**, di cui purtroppo non risultati conosciamo ancora l'attività. Al contrario, la serie isomerica (**51d-54d**) si è mostrata la meno potente, in quanto solo **51d** e **52d**, recanti in posizione 2 rispettivamente il gruppo carbetossilico e idrossimetilico, hanno mostrato attività, mentre sia l'acetato **53d** che l'etere **54d** sono risultati inattivi fino a dosi di 10 mg/kg. L'inattività di questi derivati conferma quanto trovato in precedenza per ELF9, l'analogo 2-fenilico.

Per analizzare i risultati ottenuti occorre ricordare che l'effetto farmacologico misurato in vivo risulta da una combinazione delle proprietà molecolari sia farmacodinamiche che farmacocinetiche; non è possibile distinguerne il contributo, anche perché potrebbero essere diversamente influenzate dalla stessa modificazione strutturale. Possiamo notare come molte delle molecole riportate in tabella, sicuramente meno potenti di DM232 e DM235, sono comunque attive a dosi nettamente inferiori a quelle del piracetam; la loro buona attività indica che queste molecole sono in grado di passare la barriera emato-encefalica. E' possibile che la minor potenza rispetto al lead DM235 sia dovuta ad una minore lipofilia, per esempio nel caso dei derivati idrossimetilici, o ad una certa instabilità metabolica, come nel caso dei derivati di tipo estereo, come pure può dipendere da una interazione meno forte con il bersaglio biologico, dovuta a problemi sterici e/o elettronici.

Per esempio, la minore attività di **52d** e l'inattività di **53d** e **54d** potrebbero essere dovute all'ulteriore ingombro sterico portato dai gruppi ossidrilico, metossilico o acetato, che non è evidentemente compensato da interazioni di tipo attrattivo (ad esempio legame idrogeno o altre) che questi gruppi avrebbero potuto stabilire con il bersaglio biologico. Infatti, le proprietà chimico-fisiche (lipofilia, peso molecolare) e la stabilità metabolica dei derivati **52d-54d** sono simili a quelle dei derivati **51c-54c**, che invece sono attivi a dosi tra 0.1 e 1 mg/Kg.

Inoltre, in tre serie su quattro il derivato idrossimetilico è più attivo dei relativi derivati estereo o etereo; il derivato idrossimetilico **52b** è equiattivo col suo analogo metilico DM325. Questo suggerisce che la lipofilia non è il fattore più importante per spiegare l'azione di queste molecole.

Tabella 4.7: Risultati dei derivati 1-5 nel passive avoidance test, in confronto con i prodotti precedentemente sintetizzati.



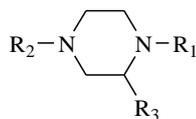
Trattamento	R1	R2	R3	MED (mg/kg)	1° sessione (s)	2° sessione (s)	Δ
salina					16.2 ± 3.3	112.3 ± 9.5	96.1
Scopolamina					15.9 ± 2.7	48.4 ± 7.6	32.5
51a + S	COEt	COPh	COOEt	1	15.8 ± 3.5	66.9 ± 8.0 [^]	51.1
52a + S	COEt	COPh	CH ₂ OH	10	19.6 ± 3.3	92.3 ± 10.5 [*]	72.7
53a + S	COEt	COPh	CH ₂ OAc	1	19.3 ± 3.2	81.5 ± 9.9 [*]	62.2
54a + S	COEt	COPh	CH ₂ OMe	10	18.0 ± 2.2	97.7 ± 0.3 [*]	79.7
DM312 + S ^b	COEt	COPh	Me	n.a.	-	-	-
ELF11 + S ^c	COEt	COPh	Ph	0.1	17.7 ± 2.5	60.2 ± 9.6 [^]	42.5
51b + S^a	COPh	COEt	COOEt	1	15.1 ± 2.9	71.7 ± 9.5 [^]	56.6
52b + S^a	COPh	COEt	CH ₂ OH	0.1	13.7 ± 2.2	66.3 ± 9.1 [^]	52.6
53b + S^a	COPh	COEt	CH ₂ OMe	1	13.9 ± 2.0	87.3 ± 9.0 [*]	73.4
54b + S^a	COPh	COEt	CH ₂ OAc	n.a.	-	-	-
DM325 + S ^b	COPh	COEt	Me	0.1	21.0 ± 5.3	81.2 ± 9.6 [^]	60.2
ELF13 + S ^c	COPh	COEt	Ph	1	15.2 ± 2.4	72.9 ± 9.5 [*]	57.7
51c + S^a	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	COMe	COOEt	0.1	15.9 ± 2.8	71.6 ± 8.5 [^]	55.7
52c + S^a	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	COMe	CH ₂ OH	1	15.5 ± 2.1	81.7 ± 8.5 [*]	66.2
53c + S^a	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	COMe	CH ₂ OAc	0.1	16.9 ± 2.2	73.7 ± 6.9 [^]	56.8
54c + S^a	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	COMe	CH ₂ OMe	1	12.8 ± 1.7	89.3 ± 9.0 [*]	76.5
DM324 + S ^b	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	COMe	Me	0.1	16.6 ± 4.1	99.2 ± 8.5 [*]	82.6
ELF15 + S ^c	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	COMe	Ph	10	13.9 ± 2.2	79.5 ± 11.6 [*]	65.6
51d + S	COMe	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	COOEt	1	19.2 ± 3.6	69.3 ± 8.8 [^]	50.1
52d + S^a	COMe	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	CH ₂ OH	10	14.4 ± 2.3	62.4 ± 9.1 [^]	48.0
53d + S^a	COMe	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	CH ₂ OAc	n.a.	-	-	-
54d + S^a	COMe	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	CH ₂ OMe	n.a.	-	-	-
DM303 + S ^b	COMe	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	Me	1.0	12.5 ± 3.9	96.4 ± 10.1 [*]	83.9
ELF9 + S ^c	COMe	pF-C ₆ H ₄ SO ₂	Ph	n.a.	-	-	-
DM235 + S^b	H	COPh	COEt	0.001	20.5 ± 3.4	91.5 ± 8.0 [*]	71.0
DM194 + S^b	H	COMe	SO ₂ C ₆ H ₄ F	0.01	19.8 ± 4.1	89.0 ± 18.3 [*]	69.2
Piracetam + S ^b	-	-	-	30	15.2 ± 3.5	97.6 ± 9.1 [*]	82.4

Le sostanze sono state somministrate s.c. 30 min prima della sessione di training. La scopolamina (S, 1.5 mg/kg i.p.) è stata iniettata immediatamente dopo la punizione. Ogni valore rappresenta la media di 12-14 topi. [^]P < 0.05; * P < 0.01 in paragone con topi trattati con scopolamina. a) ref. 1. b) ref. 3. c) ref. 2.

Un altro composto di cui sono stati sintetizzati gli enantiomeri è il derivato ELF11 che, come già citato, si era mostrato il più attivo tra i derivati 2-fenilici sintetizzati in lavori precedenti.

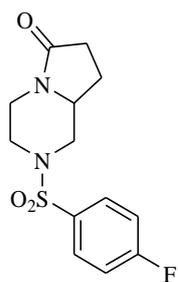
I risultati relativi al racemo ELF11 e ai suoi enantiomeri **R-71** e **S-71** sono riportati in tabella 4.8. L'attività nootropa del racemo si era manifestata già alla dose di 0.1 mg/kg, a questa dose presenta attività solo l'enantiomero **R-71** mentre l'enantiomero **S-71** presenta una MED superiore. Questa debole enantioselettività è in linea con quanto precedentemente trovato per altre coppie enantiomeriche correlate strutturalmente a questi composti. Infatti (fig. 4.15) gli enantiomeri del 3-7-diazabicyclo[4.3.0]nonanone **A**^[146] o della pirrolidina **B**^[147] non hanno mostrato differenza di attività nel passive avoidance test, così come anche gli enantiomeri del composto amnesizzante MC68^[148]. Al contrario, gli enantiomeri di DM232^[148] hanno mostrato una debole enantioselettività nel passive avoidance test, dove l'enantiomero R si è mostrato 3 volte più potente dell'enantiomero S. Anche nel release di ACh (R)-DM232 si è dimostrato più potente di (S)-DM232; in quest'ultimo caso, come anche in questo lavoro, i composti sono stati testati a diluizioni di 10 in 10.

Tabella 4.8: Risultati relativi agli enantiomeri di ELF11 nel passive avoidance test.

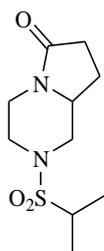


Trattamento	R ₁	R ₂	R ₃	MED (mg/kg)	1° sessione (s)	2° sessione (s)	Δ
salina	-	-	-		16.8 ± 2.7	97.2 ± 8.8	80.4
Scopolamina	-	-	-		15.4 ± 2.5	41.9 ± 8.2	26.5
ELF11 +S	COEt	COPh	Ph	0.1	14.3 ± 3.6	65.4 ± 10.3 [^]	51.1
				1.0	17.1 ± 2.5	70.2 ± 8.4 [^]	53.1
				10	15.4 ± 3.1	89.9 ± 8.5 [*]	74.5
S-71 +S	COEt	COPh	Ph	0.1	16.7 ± 2.7	57.3 ± 8.2	40.6
				1.0	13.2 ± 3.0	75.3 ± 9.1 [*]	62.1
				10	16.1 ± 2.4	91.8 ± 10.3 [*]	75.7
R-71 +S	COEt	COPh	Ph	0.1	14.5 ± 2.1	61.2 ± 8.7 [^]	46.7
				1.0	17.2 ± 2.7	71.4 ± 7.5 [*]	54.2
				10	16.1 ± 2.4	91.8 ± 10.3 [*]	75.7
DM235 +S ^a	H	COPh	COEt	0.001	20.5 ± 3.4	91.5 ± 8.0 [*]	71.0
Piracetam+S ^a	-	-	-	30	15.2 ± 3.5	97.6 ± 9.1 [*]	82.4

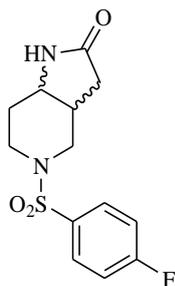
Le sostanze sono state somministrate s.c. 30 min prima della sessione di training. La scopolamina (S, 1.5 mg/kg i.p.) è stata iniettata immediatamente dopo la punizione. Ogni valore rappresenta la media di 11 topi [^]P < 0.05; * P < 0.01 in paragone con topi trattati con scopolamina. a) ref. 3.



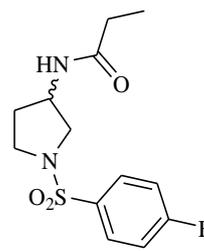
DM232
R>S



MC68 (amnesizzante)
nessuna enantioselettività



cis-A e trans-A
nessuna enantioselettività
per l'effetto nootropo



B
nessuna
enantioselettività

Figura 4.15: *Composti nootropi sintetizzati da nostro gruppo di ricerca per i quali è stata studiata l'enantioselettività.*

In conclusione, pur confermando che la sostituzione nella posizione 2 dell'anello piperazinico diminuisce la potenza, l'introduzione di una funzione ossigenata ha portato a derivati interessanti, dotati di buona attività nootropica. I derivati 2-fenilpiperazinici hanno mostrato una debole ma interessante enantioselettività.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1. Materiali e metodi farmacologici

5.1.1. Preparati cellulari

Gli esperimenti di binding (equilibrio e cinetica) e per la misura della fosforilazione di ERK1/2 sono stati effettuati dal gruppo di ricerca della prof.ssa Matucci presso il Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica dell'Università di Firenze utilizzando membrane plasmatiche di cellule che esprimono stabilmente tutti i sottotipi recettoriali di tipo muscarinico: hM₁, hM₂, hM₃, hM₄, hM₅.

In particolare per questi esperimenti, le cellule usate sono quelle di ovario di criceto (Chinese Hamster Ovary, CHO) transfettate con plasmidi (CHO-K1) che contengono le sequenze codificanti per i recettori muscarinici umani clonati (hM₁-hM₅).

La transfezione con plasmidi contenenti le sequenze codificanti per i recettori muscarinici umani clonati è stata effettuata presso i laboratori del prof. Roberto Maggio dell'Università degli Studi di L'Aquila. Le cellule sono routinariamente riprodotte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) addizionato di siero fetale bovino (FBS) (10%), penicillina (50 U/mL), streptomina (0.05mg/mL) e 2 mM di L-glutamina e mantenute a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Le linee cellulari sono ridistribuite in più piastre quando raggiungono il 95% della confluenza. Per il passaggio delle cellule in altre piastre è necessario lavare il monostrato di cellule aderenti alla superficie della piastra con phosphate buffered saline (PBS), in modo da eliminare le cellule morte e quelle meno vitali, nonché i residui di siero che potrebbero impedire l'azione della tripsina; successivamente quindi si aggiungono 2 ml di tripsina-EDTA che si lasciano all'interno della piastra per 2-3 minuti, modo che avvenga il distacco completo del monostrato di cellule aderenti alla superficie della piastra. Poi si aggiungono 0.7 mL di siero in modo da inattivare la tripsina e poi le cellule sono centrifugate a 300g per 5 minuti. Le cellule sono infine risospese in DMEM e divise in piastre e collocate in incubatore alla temperatura di 37°C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Questo procedimento è ripetuto fino al raggiungimento di un'adeguata quantità di cellule, che serviranno alla preparazione di membrane per la realizzazione degli esperimenti e per l'allestimento di crescite cellulari successive.

5.1.2.Preparazione delle membrane cellulari

Gli esperimenti di binding sono effettuati su membrane cellulari preparate a partire dalle cellule a confluenza, seguendo il procedimento appena descritto.

Dopo di che si elimina il supernatante, la pellet presente in ciascuna provetta viene sospesa con 5 ml di tampone fosfato (PB), contenente 5 mM MgCl₂, pH 7.4 e omogenate per 30 s usando un Ultra-Turrax(16000 rpm). L'omogenato è quindi separato dal surnatante per centrifugazione (1700g per 15 minuti a 4°C) e il pellet ottenuto è sospeso in 1.5 mL dello stesso tampone e riomogenato con l'Ultra-Turrax per 10 s.

Le sospensioni di membrane ottenute vengono ripartite in criovial da 1 ml e conservate in congelatore a – 80 °C fino al momento dell'uso per gli esperimenti di binding. Un'aliquota viene prelevata per verificarne la concentrazione proteica seguendo il metodo Bradford ^[149] usando il reattivo per il saggio proteico Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Germania) e il BSA è usato come standard.

5.1.3.Esperimenti di binding all'equilibrio

Gli esperimenti di binding vengono realizzati in piastre di polistirene a 96 pozzetti, all'interno di ogni pozzetto vengono fatte delle aggiunte che portano ad un volume finale di 0.25 mL in cui sono presenti 25 mM di tampone sodio fosfato (PB) e 5 mM MgCl₂ a pH 7.4 le membrane sono lasciate a incubare per 2 ore. La concentrazione proteica finale delle membrane è 30 mg/mL (hM₁), 70 mg/mL (hM₂), 25 mg/mL (hM₃), 50 mg/mL (hM₄) e 25 mg/mL (hM₅) (CIT Dei, Biochem Pharmacol). Alla fine della reazione di binding, il radioligante libero è separato da quello legato tramite rapida filtrazione attraverso filtri UniFilter GF/B usando l'apparecchio FilterMate Cell Harvester (Perkin-Elmer Life and Analytical Science). Successivamente alla filtrazione, i filtri vengono lavati diverse volte con acqua milli-Q (bidistillata) fredda e asciugati a temperatura ambiente sotto cappa d'aspirazione. In ogni pozzetto vengono aggiunti 0.25 mL di liquido di scintillazione Microscint 20, il binding totale del radioligante è misurato con lo strumento TopCount NXT Microplate Scintillation Counter (Perkin-Elmer Life and Analytical Science) dopo 4 ore. Le soluzioni madre dei composti da testare sono fatte in DMSO, le diluizioni vengono invece solitamente fatte nel buffer d'incubazione. Il DMSO alle massime concentrazioni in cui viene usato (10%) non

influisce sul binding. Il legame non specifico è definito usando 10 μM di atropina. La determinazione del legame non specifico, il metodo di filtrazione e la procedura di misurazione sono le stesse per tutti i protocolli di esperimenti di binding all'equilibrio di seguito descritti. In tutti gli esperimenti, per ogni concentrazione di [^3H]-NMS usata, il binding totale è sempre minore del 10% della quantità totale aggiunta.

5.1.4. Curve di saturazione omologhe

I saggi di saturazione servono a valutare la densità dei recettori, espressa come B_{max} , e l'affinità del radiolegante per essi, espressa come costante di dissociazione (K_d). Le membrane delle cellule CHO sono incubate in ogni pozzetto con 0.25 ML di tampone sodio fosfato (PB) con concentrazioni crescenti di [^3H]-NMS (da 0.075 a 0.2 nM) in assenza di ligando non marcato. In altri pozzetti la concentrazione di [^3H]-NMS è mantenuta costante (0.2 nM, ca K_d) e vengono aggiunte concentrazioni crescenti di NMS non marcata (0.03 – 1000 nM). Tutte le misurazioni sono fatte in duplicato.

5.1.5. Curve di competizione eterologa

Con gli studi di competizione è misurata l'affinità dei composti presi in esame per il recettore, valutando la loro capacità di competere con il legante marcato per lo stesso recettore. Le curve di competizione vengono ottenute misurando la quota di binding specifico di [^3H]-N-metilscopolamina 0.2 nM alle membrane, in assenza e in presenza di concentrazioni crescenti di agenti spiazzanti, di solito 0.1 nM – 1000 μM . Come per il procedimento degli esperimenti di saturazione, anche questi campioni vengono preparati in duplicato, utilizzando piastre a 96 pozzetti. I composti testati sono sciolti in DMSO che, alle più alte concentrazioni (10%), non ha effetti sul binding.

5.1.6. Esperimenti di binding in cinetica

Le soluzioni madre dei composti da testare sono preparate in DMSO, tutte le diluizioni vengono fatte nel buffer di incubazione. Il DMSO alle più alte concentrazioni utilizzate (2%) non influisce sul binding. In tutti gli esperimenti il binding aspecifico è definito usando atropina (10 μM). L'incubazione è interrotta per rapida filtrazione attraverso filtri Whatman GF/B filters (Brandel, USA), che sono stati pretrattati con una

soluzione allo 0.05% di polietilenimmina (PEI) per almeno 1 ora, usando l'apparecchio Brandell cell harvester. I filtri sono lavati 3 volte con aliquote da 3 mL di acqua fredda bidistillata milli-Q, asciugati, introdotti in vials e addizionati di 4.5 mL di cocktail di scintillazione.

Una volta che i filtri sono divenuti uniformemente traslucidi, i vials vengono posti nell'apparecchio TRICARB 1900 (P.E. Life Sci) che effettuerà la misura della scintillazione. La determinazione del Binding aspecifico, la filtrazione e le procedure di misurazione sono le stesse per tutti gli esperimenti di dissociazione in cinetica della [³H]NMS descritti di seguito.

5.1.7. Full time course experiments

La cinetica di dissociazione della [³H]-NMS in presenza o assenza di un modulatore allosterico viene valutata tramite esperimenti detti “*full time course*” che misurano la velocità di dissociazione del complesso farmaco recettore [FR] che si è formato, in funzione del tempo:



Da questa tipologia di esperimento si può ricavare il valore di $t_{1/2}$ in presenza ed in assenza del modulatore allosterico per ciascun sottotipo recettoriale. Il protocollo usato è il *reverse time protocol*. Per questi esperimenti, alte concentrazioni di membrane di cellule CHO (50-100 ig/mL) sono incubate con [³H]-NMS 2 nM in tampone PB per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente aliquote da 100 µL di questa mistura sono distribuite in provette che contengono 10 µL di atropina 100 µM, ciascuna da sola o insieme a 100 µL del composto da testare (volume finale totale 1 mL), in tempi diversi (0, 10, 20, 40, 80, ecc., minuti) in modo da prevenire la riassociazione del radioligando al recettore. Al momento appropriato, i campioni vengono filtrati e trattati come descritto in precedenza.

5.1.8. Single time – off rate experiments

Gli esperimenti “*single time off rate*” o “*one point kinetic*” valutano l'effetto di diverse concentrazioni di modulatore allosterico sulla velocità di dissociazione di [³H]-NMS.

Gli esperimenti “*single time off rate*” o “*one point kinetic*” valutano l’effetto di diverse concentrazioni di modulatore allosterico sulla velocità di dissociazione di [³H]-NMS. Si può procedere con questi esperimenti solo una volta che siano stati ricavati con gli esperimenti di tipo “*full time course*”, i valori calcolati dalla cinetica di dissociazione di [³H]-NMS e in particolar modo quelli relativi al $t_{1/2}$ in assenza del modulatore allosterico per i diversi sottotipi di recettore. Questo approccio semplificato per determinare la velocità di dissociazione di [³H]-NMS è valido quando il radioligando dimostra una cinetica di dissociazione monoesponenziale sia in assenza che in presenza del modulatore da testare ^[64], come dimostrato per [³H]-NMS in questo studio. Un’alta concentrazione di membrane hM1-hM5 CHO (50-75 µg/mL) sono incubate con un’alta concentrazione di [³H]-NMS (2 nM) per almeno 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente, aliquote da 100 µL sono distribuite in provette contenenti 10 µL di atropina 100 µM, ciascuna da sola o insieme a 100 µL del composto da testare (volume finale totale 1 mL in PB buffer). Per determinare la quota di binding del radiolegante a 0 min è usata un’aliquota di 100 µL di una miscela contenente solo le membrane e la [³H]-NMS. Ai tempi di incubazione propri del sottotipo recettoriale in esame (per esempio 80 min per hM₁ e 20 min per hM₂) i campioni vengono filtrati e trattati come descritto in precedenza.

5.1.9. Esperimenti su cellule isolate per la misura della fosforilazione di ERK1/2

Il test funzionale *Cellul’Erk* è test basato su un immunodosaggio che misura appunto la quota di ERK1/2 fosforilato all'interno di cellule che esprimono i recettori muscarinici quando queste sono sottoposte ad uno stimolo. Si può valutare così l'attivazione della cascata enzimatica che si ottiene dal legame delle nostre molecole con i recettori, per verificare appunto che, oltre ad una capacità di legame, valutato attraverso studi di binding, ci sia anche un'attivazione della proteina G associata al recettore in esame e che quindi la nostra molecola possieda anche una certa efficacia. Si fanno agire le molecole in esame con i recettori presenti sulle cellule; quindi le stesse cellule vengono lisate per poter determinare la quota fosforilata di ERK1/2 utilizzando due specifici anticorpi monoclonali in grado di legarsi a queste kinasi, formando una struttura definita a “sandwich” (figura 3.2). I due anticorpi sono anti-phospho-ERK1/2 marcato con d2 (accettore) e anti-ERK1/2 marcato con Eu³⁺-cryptate (donatore). Ottenuta la struttura a

mantenendo la piastra a temperatura ambiente e sotto leggera agitazione, si ottiene così la lisi delle cellule.

In questi 30 minuti si procede alla preparazione della piastra a 384 well dove poi andremo a trasferire il contenuto della piastra a 96 well. La preparazione consiste nell'aggiungere nei pozzetti che ci serviranno la miscela dei due anticorpi fondamentali per il rilevamento di ERK, aggiungendo 2 μL per ogni anticorpo. Dopo 30 minuti si prende la nostra piastra a 96 well e si procede al trasferimento del contenuto in quella a 384 well, disponendo in quest'ultima anche i controlli previsti dal test. Effettuato il trasferimento si aspettano 2 ore a temperatura ambiente per fare avvenire la reazione con gli anticorpi e, dopo di che viene effettuata la lettura con l'apposito strumento Flex Station 3 Microplate Reader (Molecular Devices).

5.1.10. Analisi dei dati

Le rappresentazioni grafiche dei risultati degli esperimenti di binding (all'equilibrio che in cinetica) e degli esperimenti funzionali riportate in questo lavoro, sono ottenute con il programma GraphPad Prism vers. 5.02 (GraphPad Software, Inc. CA, USA). I valori sono espressi come media \pm errore standard (\pm SEM) del numero n di esperimenti effettuati.

Nei dati ottenuti per gli esperimenti di binding all'equilibrio (curve di competizione omologa) è stato eliminato il binding aspecifico le curve sono calcolate un'analisi di regressione non lineare. I valori di K_i sono calcolati dai valori di IC_{50} ^[150]. In particolare, per gli esperimenti di binding questo programma ci permette di ricavare per ogni curva dose-risposta i valori di IC_{50} , cioè la concentrazione che inibisce del 50% il binding specifico totale. La IC_{50} comunque non è equivalente alla K_i per il competitore, perché questa dipende sia dalla concentrazione usata di radiolegante, sia dalla sua affinità nei confronti del recettore indagato e non rappresenta quindi un parametro "universale" di confronto per le molecole. Le curve per le cinetiche di dissociazione di [^3H]-NMS sono calcolate come decadimento di tipo monoesponenziale. L'influenza sul rallentamento della cinetica di dissociazione di [^3H]-NMS da parte dell'agente allosterico è espressa come percentuale della riduzione di [^3H]-NMS. Le curve concentrazione-effetto per il rallentamento della cinetica di dissociazione di [^3H]-NMS risultano da un'equazione logistica a 4 parametri. Il parametro "top" è il valore $k-1$ misurato in assenza del composto allosterico ed è fissato come 100%, mentre il punto di

flesso e la pendenza (dovuta a fattori n) sono settati come variabili. Il parametro “bottom” è considerato anch’esso una variabile, fornendo così un fit migliore se comparato con gli stessi dati ottenuti quando fissato come 0%. Infine sono stati testati anche i fattori di pendenza delle curve (F-test, $P < 0.05$ valore di significanza statistica adottato). L’analisi dei dati per valutare l’effetto dei composti sul binding specifico del radioligando ortosterico [^3H]-NMS è basato sul modello del complesso allosterico ternario (ATCM): l’equazione usata è quella di Lazareno & Birdsall ^[64]. Per quanto riguarda gli esperimenti per la misura della fosforilazione di ERK1/2, i valori ottenuti con il Flex Station 3 Microplate Reader (Molecular Devices) sono relativi alle due lunghezze d’onda che abbiamo impostato per la lettura (620 nm e 655 nm) e da questi si calcola il rapporto delle due lunghezze d’onda moltiplicando il risultato per uno specifico fattore, secondo la seguente equazione:

$$\text{Ratio} = (\text{segnale}_{655\text{nm}} / \text{segnale}_{620\text{nm}}) \times 10^4.$$

Si ottiene così il valore di segnale relativo ad ogni molecola nelle condizioni (agonista o antagonista) saggiate. Al rapporto così ottenuto viene prima di tutto tolto il B (bianco) che rappresenta la lettura del campione alle lunghezze d’onda di riferimento in assenza di cellule. Dopo di che tutti i valori vengono normalizzati al valore ottenuto dall’aggiunta di Siero al 10% che rappresenta la produzione massimale di Erk. (100%).

5.1.11. *Passive avoidance test*

Il test è stato eseguito dal gruppo di ricerca della prof.ssa Ghelardini presso il Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica dell’Università di Firenze seguendo il protocollo sperimentale di Jarvik e Kopp ^[104], a cui sono state applicate alcune modifiche ^[103].

Viene preparata una scatola in acrilico costituita da due compartimenti, uno buio ed uno illuminato, separati da una parete attraversata da una porta a ghigliottina che permette l’entrata nella camera buia, ma non ne permette l’uscita. Dei due compartimenti uno resta buio. Il compartimento in questione è dotato di una botola, sotto cui viene sistemato, ad una distanza di 40 cm, un bagno di acqua fredda (circa 10°C). Nel compartimento illuminato viene collocato il topolino rivolto con il muso verso la parete esterna; l’animale per sua natura ricerca l’oscurità; nel momento in cui attraversa la porta ed entra nella zona buia, viene azionata una leva che spalanca la botola, così da far cadere nell’acqua il topolino. Questo, dopo pochi secondi, viene recuperato ed

asciugato, ma mantiene il ricordo dell'esperienza spiacevole. Il metodo originale prevedeva invece che l'animale subisse una scarica elettrica nel momento in cui entrava all'interno del compartimento non illuminato. I topolini che collocati nella camera illuminata, non entrano nella camera oscura nell'arco di tempo di 60 secondi, vengono scartati; generalmente per ogni gruppo di animali che si prepara, il 20-30% non viene utilizzato per questo motivo ^[103]. L'esperimento viene effettuato in due giorni consecutivi; il primo giorno (training session) il protocollo prevede la somministrazione di scopolamina (amnesizzante) al termine della sessione, iniettata per via i.p. Il giorno successivo (retention session) il test viene ripetuto.

Il giorno successivo dunque, il topolino è collocato nuovamente all'interno della scatola, nella camera illuminata; l'animale conserva il ricordo dell'esperienza sgradevole subita ed eviterà di entrare nel compartimento in ombra, trattenendosi alla luce per un intervallo di tempo maggiore. La differenza tra la latenza di entrata nella camera oscura del primo giorno e quella del secondo giorno è considerata un indice della capacità mnemonica del topo, ed è espressa in secondi (s).

$$\Delta = (t'' \text{ retention session} - t'' \text{ training session})$$

- Per valori alti di Δ si considera che il topolino ricordi la punizione subita.
- Per valori bassi di Δ si considera che il topolino non abbia memoria dell'esperienza.

Con questo test è possibile rivelare la capacità delle molecole in studio di proteggere gli animali dall'effetto amnesizzante della scopolamina: tale capacità è appunto propria dei farmaci nootropi. I farmaci in questione sono iniettati per via i.p. o p.o. 20 minuti prima dell'inizio della sessione sperimentale di training. Un farmaco è attivo come nootropo quando, ad una determinata dose, è capace di riportare la latenza di entrata dei topolini trattati con scopolamina, sui valori di quella dei topi del gruppo di controllo trattati con sola soluzione salina. Vengono classificate come inattive le sostanze che non manifestano alcuna attività alla dose massima di 10 mg/Kg. Attraverso questo test è possibile anche riconoscere se le sostanze oggetto di studio sono dotate di eventuali proprietà amnesizzanti; in tal caso gli animali trattati con queste molecole, ma non con scopolamina, mostrano una latenza d'entrata nella camera oscura paragonabile al valore esibito dagli animali trattati con scopolamina, ed esercitano effetto amnesizzante additivo se somministrate insieme alla scopolamina. Esempio di sessione sperimentale con valori medi di Δ raccolti su un numero di esperimenti compresi tra 9 e 22; ogni esperimento prevede l'utilizzo di quattro gruppi di circa 10 animali.

- il gruppo A, (10 topolini) di controllo, è trattato con soluzione salina: $\Delta_{exp} = 54.8''$
- il gruppo B (10 topolini) è trattato con soluzione salina e 1.5 mg/Kg di sostanza amnesizzante (scopolamina), iniettata i.p., 30' dopo la punizione subita alla fine della training session. $\Delta_{exp} = 26.8''$
- al gruppo C (10 topolini) viene inoculata la sostanza in studio (**DM235**) 20' prima dell'inizio della training session per valutare l'effetto nootropo del farmaco, ovvero la capacità di proteggere l'animale dall'effetto amnesizzante della scopolamina inoculata alla fine della training session. $\Delta_{exp} = 71.0''$ per 0.001 mg /Kg i.p.
- sul gruppo D (10 topolini) si può testare la capacità della sostanza (**DM235**) di aumentare il tempo di latenza di entrata nella camera oscura rispetto al gruppo A di controllo (trattato solamente con soluzione salina). Si può così valutare il potere procognitivo del farmaco che viene sempre inoculato 20' prima dell'inizio del training session: $\Delta_{exp} = 94.6''$ per 1.0 mg/Kg s.c.

Dopo 30' dalla punizione, quindi alla fine della training session, ai topolini vengono iniettati i.p. 1.5 mg/ Kg di scopolamina. Alcuni prodotti valutati con questa metodica, ovvero in assenza di scopolamina, si sono rivelati amnesizzanti: Δ_{exp} (**EM194**) = 28.1' per 1.0 mg/Kg s.c.

5.2. Parte Chimica Sperimentale

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$, 1D e 2D, sono stati eseguiti con uno spettrometro Bruker Avance, a 400 MHz per il protone e a 100 MHz per il ^{13}C , utilizzando il solvente deuterato come standard interno (CDCl_3 , CD_3OD , $\text{DMSO-}d_6$).

Nel caso siano presenti conformeri in rapporto definito, lo spettro $^1\text{H-NMR}$ viene descritto come somma di due molecole A e B separate.

Le separazioni cromatografiche sono state effettuate su colonne di gel di silice (Kieselgel 40, 0.063-0.20 mm e 0.040-0.063 mm per flash chromatography Merck).

Le cromatografie su strato sottile sono state condotte su lastre di gel di silice Kieselgel Merck F254.

Gli spettri LC-MS sono stati acquisiti con un analizzatore a triplo quadrupolo (VARIAN 1200 L) munito di sorgente ionica electrospray (ESI).

Gli spettri sono stati registrati in positivo e in negativo nel range da 100 a 800 m/z.

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Stuart SMP5.

Le rese delle reazioni sono calcolate dopo purificazione.

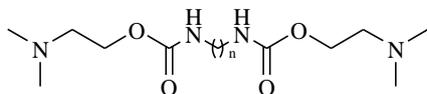
Eluenti utilizzati nelle separazioni cromatografiche su silice:

- Eluente 1: (We1): EtOH abs. / NH₄OH / CH₂Cl₂ / Etere di petrolio (65:8:340:60).
- Eluente 2: CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ (70:30:3)
- Eluente 3: CH₂Cl₂/MeOH/ NH₃ (90:10:1)
- Eluente 4: (We2): EtOH abs / NH₄OH / CH₂Cl₂ / Et₂O / Etere di petrolio (180:9.9:360:900)
- Eluente 5: (We4): EtOH abs / NH₄OH / CH₂Cl₂ / Etere di petrolio (225:45:600:90)
- Eluente 6: CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ (90:10:0.5)
- Eluente 7: CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ (97:3:0.3)
- Eluente 8: CH₂Cl₂ / MeOH (8:2)
- Eluente 9: CH₂Cl₂ / MeOH (95:5)
- Eluente 10: CHX/ EtOAc (7:3)
- Eluente 11: CH₂Cl₂ / MeOH (9:1)
- Eluente 12: CH₂Cl₂ / MeOH (96:4)
- Eluente 13: CH₂Cl₂ / MeOH (93:7)
- Eluente 14: CHX/ EtOAc (1:1)
- Eluente 15: CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ (93:7:0.3)
- Eluente 16: CH₂Cl₂ / MeOH (98:2)
- Eluente 17: CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ (95:5:0.5)
- Eluente 18: CHX/ EtOAc (2:3)
- Eluente 19: CH₂Cl₂ / MeOH (97:3)
- Eluente 20: CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ (80:20:0.5)
- Eluente 21: CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ (98:2:0.2)
- Eluente 22: EtOH abs / CH₂Cl₂ / Et₂O / Etere di petrolio (180:360:900)

La sintesi dei composti **3a,b**, **4a,b** (Schema 2), **6**, **7**, **12a-f**, **13a-f**, **14a-f** (Schema 1), **15a,b**, **16a,b**, **17a-c**, **18a-c** (Schema 2), non è riportata nella parte sperimentale perché questi prodotti sono stati sintetizzati precedentemente al mio lavoro di tesi. La sintesi di **3a,b**, **4a,b**, **15a,b**, **16a,b**, **17a-c**, **18a-c** è riportata nella ref ^[151].

Abbreviazioni: THF, tetraidrofurano; CHX, cicloesano; EtOAc, etile acetato; MeOH, metanolo; EtOH, etanolo; DCM, diclorometano; Et₂O, etere dietilico; TLC, cromatografia su strato sottile.

5.2.1. Procedura per la sintesi di 2-dimetilammino-etil esteri di acidi [ω -(2-dimetilammino-etossicarbonilammino)-alchil]-carbammici (1a-f)



n= 3 **1a**
n= 5 **1b**
n= 6 **1c**
n= 7 **1d**
n= 9 **1e**
n= 11 **1f**

L'acido dicarbossilico (1.5 mmol) è sciolto in CH_2Cl_2 (15 mL), e alla soluzione viene aggiunto SOCl_2 (15 mmol); la miscela è lasciata sotto agitazione fino a quando non diventa limpida. Il solvente è poi rimosso sotto vuoto, il residuo è trattato con esano e il solvente è nuovamente rimosso: questo passaggio è ripetuto tre volte. Il residuo è dunque sciolto in acetone (4 mL), messo sotto agitazione e trattato con una soluzione satura di NaN_3 (2 mL); dopo 30 minuti a temperatura ambiente la miscela è diluita con H_2O ed estratta con CH_2Cl_2 (10 mLx 3volte). La fase organica viene anidrificata su Na_2SO_4 e la rimozione del solvente porta all'ottenimento di un olio giallo chiaro che è disciolto in toluene e scaldato a refluxo per 4 ore. Dopo aver lasciato raffreddare, viene aggiunto dimetilamminoetanolo (3 mmol) e la soluzione è prima scaldata a 60°C per 4 ore e poi lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per la notte. Il solvente è quindi rimosso sotto vuoto lasciando un residuo che viene purificato tramite cromatografia flash usando come eluente 1. Con questa procedura sono stati ottenuti i seguenti prodotti:

2-dimetilamminoetil estere dell'acido [3-(2-dimetilammino-etossicarbonil ammino)-propil]-carbammico (PAG 29) (1a)

Olio.

Resa: 30%.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 1.36-1.39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.22 (s, 12H, 4 CH_3); 2.49 (t, $J=5.6$ Hz, 4H, CH_2N); 3.15-3.17 (m, 4H, CH_2NH); 4.08 (t, $J=5.6$ Hz, 4H, CH_2O); 5.36 (s, 2H, NH) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 30.28 (CH_2); 37.65 (CH_2NH); 45.08 (CH_3); 58.07 (CH_2N); 61.9 (CH_2O); 156.81 (CO) ppm.

2-dimetilamminoetil estere dell'acido [5-(2-dimetilammino-etossicarbonil ammino)-pentil]-carbammico (PAG 28) (1b)

Olio.

Resa: 23%.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 1.34-1.37 (m, 2H, CH_2); 1.47-1.52 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.46 (s, 12H, 4 CH_3); 2.76 (t, $J=5.2$ Hz, 4H, CH_2N); 3.14-3.18 (m, 4H, CH_2NH); 4.23 (t, 4H, $J=5.2$ Hz, CH_2O); 5.25 (s, 2H, NH) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 23.68 (CH_2); 29.43 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 40.67 (CH_2NH); 45.03 (CH_3); 59.08 (CH_2N); 61.73 (CH_2O); 156.48 (CO) ppm.

2-dimetilamminoetil estere dell'acido [6-(2-dimetilammino-etossicarbonil ammino)-esil]-carbammico (PAG 82) (1c)

Solido, p.f. 73-75°C.

Resa: 87%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.30-1.36 (m, 4H, CH₂); 1.46-1.49 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 2.29 (s, 12H, 4CH₃); 2.56 (t, J=5.6 Hz, 4H, CH₂N); 3.12-3.17 (m, 4H, CH₂NH); 4.15 (t, J=5.6 Hz, 4H, CH₂O); 4.92 (s, 2H, NH) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 26.43 (CH₂); 29.91 (CH₂CH₂NH); 41.82 (CH₂NH); 45.65 (CH₃); 58.43 (CH₂N); 58.91 (CH₂O); 155.94 (CO) ppm.

2-dimetilamminoetil estere dell'acido [7-(2-dimetilammino-etossicarbonil ammino)-eptil]-carbammico (PAG 44) (1d)

Olio.

Resa: 22%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.27-1.31 (m, 6H, 3CH₂); 1.47-1.49 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 2.54 (s, 12H, 4CH₃); 2.86 (t, J=5.2 Hz, 4H, CH₂N); 3.12-3.17 (m, 4H, CH₂NH); 4.27 (t, J=5.2 Hz, 4H, CH₂O); 5.31 (s, 2H, NH) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 26.47, 28.72 (CH₂); 29.70 (CH₂CH₂NH); 40.81 (CH₂NH); 45.36 (CH₃); 58.10 (CH₂N); 61.7 (CH₂O); 156.40 (CO) ppm.

2-dimetilamminoetil estere dell'acido [9-(2-dimetilammino-etossicarbonil ammino)-nonil]-carbammico (PAG 56) (1e)

Solido bassofondente.

Resa: 22%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.18-1.24 (m, 10H, 5CH₂); 1.40-1.43 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 2.25 (s, 12H, 4CH₃); 2.52 (t, J=5.2 Hz, 4H, CH₂N); 3.09-3.13 (m, 4H, CH₂NH); 4.08-4.13 (m, 4H, CH₂O); 4.85 (s, 2H, NH) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 26.66, 29.13, 29.35 (CH₂); 29.87 (CH₂CH₂NH); 40.99 (CH₂NH); 45.52 (CH₃); 58.25 (CH₂N, t); 61.94 (CH₂O); 156.60 (CO) ppm.

2-dimetilamminoetil estere dell'acido [11-(2-dimetilammino-etossicarbonil ammino)-undecil]-carbammico (PAG 57) (1f)

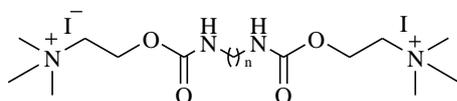
Solido, p.f. 87-89°C.

Resa: 46%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.20-1.24 (m, 14H, 7CH₂); 1.43-1.46 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 2.26 (s, 12H, 4CH₃); 2.52 (t, J=5.4 Hz, 4H, CH₂N); 3.05-3.13 (m, 4H, CH₂NH); 4.12 (t, J=5.4 Hz, 4H, CH₂O); 4.93 (bs, 1H, NH); 5.63 (bs, 1H, NH) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 25.44, 26.62, 29.11, 29.16, 29.29, 29.40, 29.81 (CH₂); 35.86 (CH₂CH₂NH); 40.96 (CH₂NH); 45.44 (CH₃); 58.18 (CH₂N); 61.86 (CH₂O); 156.6 (CO) ppm.

5.2.2. Procedura per la sintesi di iodio metilati di 2-dimetilamminoetil esteri di acidi [ω -(2-dimetilammino-etossicarbonilammino)-alchil]-carbammici (2a-f)



n= 3 **2a**
n= 5 **2b**
n= 6 **2c**
n= 7 **2d**
n= 9 **2e**
n= 11 **2f**

A una soluzione dell'ammina corrispondente in Etere dietilico anidro (30 mL per ogni mmol di reagente) è aggiunto un eccesso di CH₃I. La miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte al buio. Il solido che si forma è raccolto e seccato. Con questa procedura sono stati ottenuti i composti seguenti:

Iodio metilato del 2-dimetilamminoetil estere dell'acido [3-(2-dimetilammino-etossicarbonilammino)-propil]-carbammico (PAG 21) (2a)

Solido, p.f. 168-170°C.

Resa: 50%.

[¹H]-NMR CD₃OD δ : 1.69 (t, J=6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH,); 3.18 (t, J=6.8 Hz, 4H, CH₂NH); 3.22 (s, 18H, 6CH₃); 3.70-3.73 (m, 4H, CH₂N); 4.50-4.52 (m, 4H, CH₂O) ppm.

[¹³C]-NMR CD₃OD δ : 29.27 (CH₂CH₂NH); 37.32 (CH₂NH); 53.21 (CH₃); 57.86 (CH₂N); 65.22 (CH₂O); 155.9 (CO) ppm.

Iodio metilato del 2-dimetilamminoetil estere dell'acido [5-(2-dimetilammino-etossicarbonilammino)-pentil]-carbammico (PAG 30) (2b)

Solido bassofondente.

Resa: 20%.

[¹H]-NMR CD₃OD δ : 1.36-1.39 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH); 1.59-1.49 (m, 4H, CH₂CH₂NH,); 3.12 (t, J=6.8 Hz, 4H, CH₂NH); 3.24 (s, 18H, 6CH₃); 3.70-3.72 (m, 4H, CH₂N); 4.48-4.52 (m, 4H, CH₂O) ppm.

[¹³C]-NMR CD₃OD δ : 23.61 (CH₂); 29.06 (CH₂CH₂NH); 40.40 (CH₂NH); 53.27 (CH₃); 53.31 (CH₃); 57.76 (CH₂); 65.23 (CH₂); 156.50 (CO) ppm.

Iodio metilato del 2-dimetilamminoetil estere dell'acido [6-(2-dimetilammino-etossicarbonilammino)-esil]-carbammico (PAG 83) (2c)

Solido, p.f. 178-180°C.

Resa: 28%.

[¹H]-NMR CD₃OD δ : 1.33-1.36 (m, 4H); 1.49-1.53 (m, 4H, CH₂CH₂NH,); 3.11 (t, J=6.8 Hz, 4H, CH₂NH); 3.26 (s, 18H, 6CH₃); 3.73-3.75 (m, 4H, CH₂N); 4.50-4.52 (m, 4H, CH₂O) ppm.

^{13}C -NMR CD_3OD δ : 25.98 (CH_2); 29.28 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 40.36 (CH_2NH); 53.40 (CH_3); 57.80 (CH_2O); 65.32 (CH_2N); 156.01 (CO) ppm.

Iodio metilato del 2-dimetilamminoetil estere dell'acido [7-(2-dimetilammino-etossicarbonilammino)-eptil]-carbammico (PAG 51) (2d)

Solido bassofondente.

Resa: 87%.

^1H -NMR CD_3OD δ : 1.32-1.35 (m, 6H, 3CH_2); 1.49-1.53 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.11 (t, $J=6.8$ Hz, 4H, CH_2NH); 3.26 (s, 18H, 6CH_3); 3.73-3.75 (m, 4H, CH_2N); 4.50-4.52 (m, 4H, CH_2O) ppm.

^{13}C -NMR CD_3OD δ : 26.33 28.60 (CH_2); 29.30 (CH_2); 40.49 (CH_2); 53.41 (CH_3); 57.83 (CH_2); 65.25 (CH_2); 156.03 (CO) ppm.

Iodio metilato del 2-dimetilamminoetil estere dell'acido [9-(2-dimetilammino-etossicarbonilammino)-nonil]-carbammico (PAG 58) (2e)

Solido, p.f. 80-82°C.

Resa: 26%.

^1H -NMR CD_3OD δ : 1.24-1.31 (m, 10H, 5CH_2); 1.46-1.51 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.09 (t, $J=6.8$ Hz, 4H, CH_2NH); 3.22 (s, 18H, 6CH_3); 3.65-3.70 (m, 4H, CH_2N); 4.37-4.50 (m, 4H, CH_2O) ppm.

^{13}C -NMR CD_3OD δ : 26.41, 28.91, 29.16 (CH_2); 29.40 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 40.53 (CH_2NH); 53.41 (CH_3); 57.81 (CH_2O); 65.25 (CH_2N); 156.50 (CO) ppm.

Iodio metilato del 2-dimetilamminoetil estere dell'acido [11-(2-dimetilammino-etossicarbonilammino)-undecil]-carbammico (PAG 59) (2f)

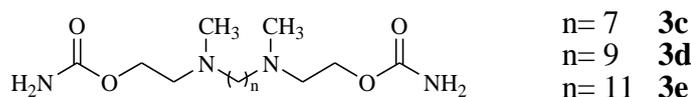
Solido, p.f. 106-108°C.

Resa: 34%.

^1H -NMR CD_3OD δ : 1.26-1.35 (m, 14H, 7CH_2); 1.48-1.53 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.09 (t, $J=6.8$ Hz, 4H, CH_2NH); 3.22 (s, 18H, 6CH_3); 3.67-3.70 (m, 4H, CH_2N); 4.45-4.50 (m, 4H, CH_2O) ppm.

^{13}C -NMR CD_3OD δ : 26.41, 28.91, 29.16 (CH_2); 29.40 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 40.53 (CH_2NH); 53.41 (CH_3); 57.81 (CH_2O); 65.25 (CH_2N); 156.43 (CO) ppm.

5.2.3. Procedura per la sintesi dei 2-({ ω [(2-carbamoilossi-etil)-metilammino]-alchil}-metil-ammino)-etilcarbammati (3)



In un pallone viene solubilizzato 1 equivalente di prodotto **3c**, **3d** o **3e** in CH_3CN anidro (5.0 ml per ciascuna mmole di prodotto), a tale soluzione sono addizionati 1 equivalente di 2-iodioetil carbammato e 1 equivalente di K_2CO_3 . Queste aggiunte vengono

effettuate a zero gradi. La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica, con tappo a CaCl_2 e a temperatura ambiente per 24 ore. Trascorso questo tempo, la sospensione viene filtrata su buckner per eliminare il K_2CO_3 , le acque madri recuperate sono portata a secco. I prodotti vengono purificati attraverso una cromatografia sotto pressione, utilizzando gel di silice come fase stazionaria e diversi tipi di eluenti: 5 (prodotto **3c**), 1 (prodotti **3d** e **3e**).

2-({7[(2-carbamoilossi-etil)-metil-amino]-eptil}-metil-ammino)-etilcarbammato (IR32) (3c**)**

Resa: 16%.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 1.24-1.31 (m, 6H, 3 CH_2); 1.41-1.45 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.24 (s, 6H, CH_3); 2.34 (t, $J=7.4$ Hz, 4H, CH_2N); 2.58 (t, $J=5.7$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4.12 (t, $J=5.7$ Hz, 4H, CH_2O); 4.81 (s, 4H, NH_2) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 26.93, 27.23, 29.29 (CH_2); 42.56 (CH_3); 55.92 (CH_2N); 57.98 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 62.54 (CH_2O); 157.04 (CO) ppm.

Alternativamente questo composto è stato ottenuto a partire da **22** (196 mg, 0.8 mmol), stato solubilizzato in 5 mL di CH_2Cl_2 anidro e messo a reagire a 0°C con carbonildiimidazolo (259 mg, 1.6 mmol). Si lascia la miscela sotto agitazione 2 ore a 0°C e altre 2 ore a temperatura ambiente, fino a completo esaurimento del prodotto di partenza. L'andamento della reazione è monitorato tramite TLC su gel di silice, usando l'eluente **6**. La miscela viene dunque diluita con CH_2Cl_2 , lavata con H_2O e questa poi estratta con nuovo CH_2Cl_2 (2 volte). Le fasi organiche riunite sono anidrificate su Na_2SO_4 e il solvente è allontanato sotto vuoto. Il grezzo ottenuto è l'intermedio imidazolico che viene usato tal quale per il passaggio successivo, risolubilizzandolo in una miscela 7:1 THF/ NH_3 10%. Dopo 15 minuti la reazione è finita. Il prodotto finale è ottenuto dopo purificazione cromatografica flash usando l'eluente 7. Resa: 28% (resa complessiva migliore della via sintetica usata in precedenza).

2-({9[(2-carbamoilossi-etil)-metil-amino]-nonil}-metil-ammino)-etilcarbammato (IR40) (3d**)**

Resa: 16%.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 1.20-1.33 (m, 10H, 5 CH_2); 1.40-1.50 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.27 (s, 6H, 2 CH_3); 2.37 (t, $J=7.4$ Hz, 4H, CH_2N); 2.61 (t, $J=5.6$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4.15 (t, $J=5.6$ Hz, 4H, CH_2O); 4.79 (s, 4H, NH_2) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 26.97, 27.32, 27.41, 29.38, 29.49 (CH_2); 42.56 (CH_3); 55.87 (CH_2N); 57.89 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 62.50 (CH_2O); 157.03 (CO) ppm.

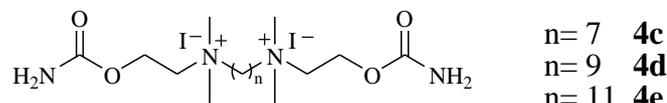
2-({11[(2-carbamoilossi-etil)-metil-amino]-undecil}-metil-ammino)-etilcarbammato (IR43) (3e**)**

Resa: 15%.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 1.21-1.33 (m, 14H, 7 CH_2); 1.41-1.59 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.27 (s, 6H, 2 CH_3); 2.37 (t, $J=7.6$ Hz, 4H, CH_2N); 2.61 (t, $J=5.6$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4.15 (t, $J=5.6$ Hz, 4H, CH_2O); 4.81 (s, 4H, NH_2) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 27.04, 27.41, 29.45, 29.51, 29.57, 29.59 (CH_2); 42.55 (CH_3); 55.92 (CH_2N); 57.97 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 62.60 (CH_2O); 157.06 (CO) ppm.

5.2.4. Procedura per la sintesi di iodometilati di 2-({ ω [(2-carbamoilossi-etil)-metil-ammino]-alchil}-metil-ammino)-etilcarbammati (4)



In un palloncino viene solubilizzato 1 equivalente di prodotto **3c**, **3d** o **3e** in CHCl_3 anidro (28.5 ml per ciascuna mmole di prodotto); a tale soluzione si aggiunge un eccesso di CH_3I (circa 15.0 ml per ciascuna mmole di prodotto). Questa soluzione viene lasciata a temperatura ambiente, sotto agitazione magnetica, con tappo a CaCl_2 e al riparo dalla luce per 24 ore; trascorso questo tempo si osserva la formazione di un precipitato. Il CHCl_3 viene evaporato a bassa pressione, il prodotto è lavato più volte con etere etilico, poi seccato e conservato in essiccatore.

Iodometilato del 2-({7[(2-carbamoilossi-etil)-metilammino]-eptil}-metilammino)-etilcarbammato (IR35) (**4c**)

Solido giallo-bianco, p.f.= 170-172 °C.

Resa: 43%

^1H -NMR CD_3OD δ : 1.41-1.54 (m, 6H, 3CH_2); 1.80-1.82 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.18 (s, 12H, CH_3); 3.44 (t, $J=8.6$ Hz, 4H, CH_2N); 3.67 (t, $J=4.8$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4.48 (m, 4H, CH_2O) ppm.

^{13}C -NMR CD_3OD δ : 22.06, 25.46, 28.00 (CH_2); 50.88 (CH_3); 57.50 (CH_2O); 62.71 (CH_2N); 65.23 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 156.81 (CO) ppm.

Iodometilato del 2-({9[(2-carbamoilossi-etil)-metilammino]-nonil}-metilammino)-etilcarbammato (IR42) (**4d**)

Solido giallo chiaro igroscopico.

Resa quantitativa.

^1H -NMR CD_3OD δ : 1.36-1.48 (m, 10H, 5CH_2); 1.73-1.87 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.17 (s, 12H, 4CH_3); 3.43 (t, $J=8.6$ Hz, 4H, CH_2N); 3.68 (t, $J=4.8$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4.47 (m, 4H, CH_2O) ppm.

^{13}C -NMR CD_3OD δ : 22.23, 25.81, 28.54, 28.71 (CH_2); 50.89 (CH_3); 57.48 (CH_2O); 62.66 (CH_2N); 65.34 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 156.81 (CO) ppm.

2-({11[(2-carbamoilossi-etil)-metilammino]-undecil}-metilammino)-etilcarbammato (IR44)(**4e**)

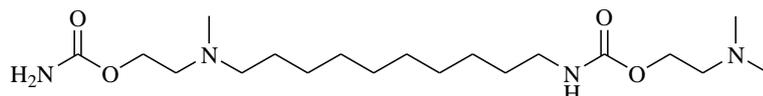
Solido giallo-chiaro, igroscopico.

Resa: 25%.

[¹H]-NMR CD₃OD δ: 1.23-1.40 (m, 14H, 7CH₂); 1.72-1.84 (m, 4H, CH₂CH₂N); 3.17 (s, 12H, CH₃); 3.42 (t, J=8.6 Hz, 4H, CH₂N); 3.66 (t, J=4.8 Hz, 4H, CH₂CH₂O); 4.47 (m, 4H, CH₂O) ppm.

[¹³C]-NMR CD₃OD δ: 22.28, 25.93, 28.76, 29.00 (CH₂); 50.89 (CH₃); 57.49 (CH₂O); 62.68 (CH₂N); 65.37 (CH₂CH₂O); 156.83 (CO) ppm.

5.2.5. 2-{10-[2-(dimetilammino)-etossicarbonil]-ammino-decil-(metil-ammino)}-etil-carbammato (MVM25) (5)



Il prodotto **31** (128 mg, 0.44 mmol) è solubilizzato in 5 ml di CH₃CN anidro, viene aggiunto K₂CO₃ (73.1 mg, 0.53 mmol) e poi, a 0°C, il 2-iodoetilcarbammato (114 mg, 0.53 mmol). La miscela di reazione è poi lasciata sotto agitazione temperatura ambiente e monitorata tramite TLC di gel di silice su alluminio usando l'eluente 1. Dopo 18 ore, la miscela viene filtrata su buckner e il solvente è allontanato a bassa pressione. Il prodotto desiderato è ottenuto in seguito a cromatografia flash usando lo stesso eluente impiegato nel monitoraggio. Oltre al prodotto desiderato è stata recuperata una frazione (8.6%) corrispondente al composto **32**.

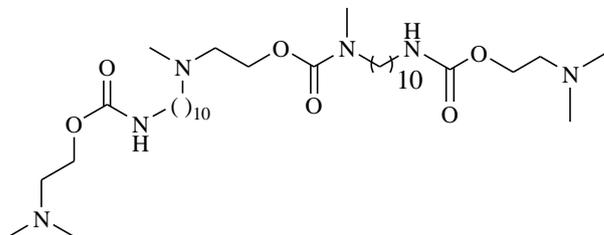
5: olio incolore.

Resa: 12%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.18-1.37 (m, 12 H, 6CH₂); 1.41-1.51 (m, 4H, CH₂CH₂N + CH₂CH₂CO); 2.21 (s, 9H, CH₃); 2.31 (t, J= 7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₂NMe); 2.46-2.50 (m, 2H, CH₂NMe₂); 2.55 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NMe); 3.05-3.12 (m, 2H, CH₂NH); 4.09 (t, J= 5.6 Hz, 4H, CH₂O); 4.96 (bs, 2H, OCONH) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 26.68, 27.00, 27.37, 29.18, 29.44, 29.87 (CH₂); 41.00 (CH₂NHCO); 42.58 (CH₃NH); 45.49 (CH₃N); 55.90 (CH₂NH); 57.99, 58.24 (CH₂N); 61.95 (CH₂COONH₂); 63.22 (CH₂COONH₂); 156.55, 157.08 (CO) ppm.

Composto **32** (MVM65)



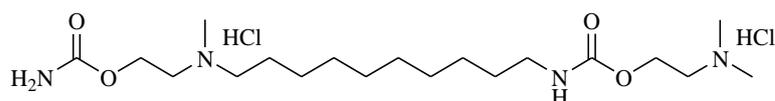
Resa: 8.6%

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.15-1.27 (m, 24H, 12CH₂); 1.45-1.48 (m, 8H, CH₂CH₂N); 2.29 (s, 15H, 5 CH₃); 2.41-2.43 (m, NCH₂CH₂O); 2.57 (t, J= 5.6 Hz, 4H, CH₂NMe₂); 2.66-2.68 (m, 2H, CH₂NCH₂CH₂O); 2.86-2.88 (m, 3H, CH₃NHCO); 3.13 (q, J= 6.4 Hz, 4H,

CH_3NCH_2Ar); 3.16-3.21 (m, 2H, CH_2NCH_3CO); 4.16 (t, $J=5.6$ Hz, 4H, CH_2O); 4.19 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, CH_2O); 4.90 (bs, 2H, $NHCO$) ppm.

$[^{13}C]$ -NMR $CDCl_3$ δ : 26.74, 27.40, 29.25, 29.36, 29.52, 29.92 (CH_2); 34.52 (CH_3NCO); 41.04 (CH_2NMe_2); 42.66 (CH_3N); 45.48 (CH_3N); 48.80 (CH_2NCH_3CO); 55.89 (CH_2NCH_3); 58.01, (NCH_2CH_2O); 58.23 (CH_2NHCO); 61.84 (CH_2OCONH); 62.98 ($CH_2OCONMe$); 156.49 (CO) ppm.

5.2.6. Cloridrato del 2-{10-[2-(dimetilammino)-etossicarbonil]-ammino-decil-(metil-ammino)}-etilcarbammato (MVM26) (5.HCl)



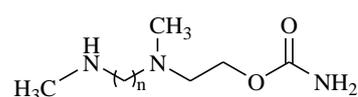
A 1 Eq di **5** (21 mg, 0.05 mmol) solubilizzato in 2 mL di MeOH anidro viene aggiunta una soluzione metanolica di HCl, preparata con Acetilcloruro (0.02 mL, 0.3 mmol) in 3 mL di MeOH anidro. La miscela di reazione è lasciata temperatura ambiente per 16 ore al termine delle quali il solvente è allontanato a bassa pressione e il residuo ottenuto è triturato in Et_2O , il surnatante è eliminato e il residuo è poi portato nuovamente a secco.

Solido igroscopico.

Resa quantitativa.

$[^1H]$ -NMR CD_3OD δ : 1.22-1.45 (m, 12 H, $6CH_2$); 1.46-1.52 (m, 2H, CH_2CH_2N); 1.70-1.81 (m, 2H, CH_2CH_2CO); 2.93 (s, 9H, CH_3); 3.08 (m, 4H, CH_2N^+); 3.22-3.39 (m, 2H, CH_2N^+); 3.41-3.47 (m, 2H, CH_2NH^+); 4.41-4.39 (m, 4H, CH_2O) ppm.

5.2.7. Procedura generale per la sintesi dei 2-[metil-(ω -metilammino-alcil)-ammino]-etilcarbammati (**8**)



$n=9$ **8d**
 $n=11$ **8e**

In un beacker viene solubilizzato 1 equivalente di **18do** **18e** in EtOH assoluto (circa 30.0 ml), a tale soluzione è aggiunto come catalizzatore Pd/C 10% (160 mg per ciascuna mmole di prodotto). Il beacker è posto all'interno dell'idrogenatore Parr, ad una pressione di 53 psi, per 1-2 giorni. Al termine della reazione, la soluzione viene filtrata su filtro a pieghe, successivamente evaporando il solvente si ottiene un olio giallo-chiaro che viene purificata con cromatografia sotto pressione, usando come fase stazionaria gel di silice ed eluente **5**. I prodotti si presentano come olio giallo viscoso. Con questa procedura sono stati ottenuti i composti seguenti.

2-[metil-(9-metilamino-nonil)-ammino]-etilcarbammato (IR34) (**8d**)

Resa 94%.

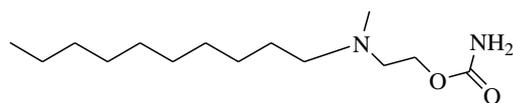
$[^1H]$ -NMR $CDCl_3$ δ : 1.22-1.38 (m, 10H, $5CH_2$), 1.43-1.51 (m, 4H, CH_2CH_2N , CH_2CH_2NH); 2.27 (s, 3H, $CH_3NCH_2CH_2O$); 2.36 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, $CH_2NCH_2CH_2O$); 2.44 (s, 3H, CH_3NH); 2.58-2.62 (m, 4H, CH_2CH_2O , CH_2NH); 4.15 (t, $J=5.8$ Hz, 2H, CH_2O) ppm.

2-[metil-(11-metilamino-undecil)-amino]-etilcarbammato (IR41) (8e)

Resa 79%.

$^1\text{H-NMR}$ CDCl_3 δ : 1.21-1.26 (m, 14H, 7CH_2), 1.44-1.51 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.29 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 2.38 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 2.44 (s, 3H, CH_3NH); 2.56-2.61 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2NH); 4.15 (t, $J=5.8$ Hz, 2H, CH_2O) ppm.

5.2.8. 2-(decil-metil-amino)etilcarbammato (DM456) (9)



Il composto è stato preparato come visto per i prodotti **3**, con 2-iodoetilcarbammato, a partire dalla decilammina metilata.

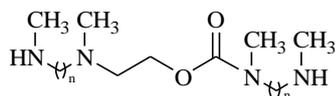
Olio trasparente.

Resa: 33%.

$^1\text{H-NMR}$ CDCl_3 δ : 0.86 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH_3); 1.18-1.27 (m, 14H); 1.40-1.46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.24 (s, 3H, CH_3N); 2.35 (t, $J=5.4$ Hz, 2H, CH_2N); 2.58 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4.12 (t, $J=5.4$ Hz, 2H, CH_2O); 5.13 (bs, 2H, CONH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ CDCl_3 δ (ppm) : 14.04 (CH_3); 22.62, 26.93, 27.46, 29.28, 29.57, 29.6, 31.85 (CH_2); 42.41 (CH_3N); 55.88 (CH_2N); 57.99 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 64.57 (CH_2O); 157.24 (CO) ppm.

5.2.9. Procedura per la sintesi dei 2-{metil [(ω -metilammino)-alchil]-ammino }-etil-N-metil-N-[(metilammino)-alchil]-carbammati (10)



n=9 **10a**
n=11 **10b**

In un beacker viene solubilizzato 1 equivalente di prodotto **19a** o **19b** in EtOH assoluto (circa 30.0 ml), a tale soluzione è aggiunto come catalizzatore

Pd/C 10% (160 mg per ciascuna mmole di prodotto). Il beacker è posto all'interno dell'idrogenatore catalitico, ad una pressione di 53 psi, per 12- 36 ore. Al termine della reazione, la soluzione viene filtrata su filtro a pieghe, successivamente evaporando il solvente si ottiene un olio giallo-chiaro che viene purificato con cromatografia sotto pressione, usando come fase stazionaria gel di silice e l'eluente 5. I prodotti si presentano come olio giallo viscoso. Con questa procedura sono stati ottenuti i composti seguenti.

2-{metil [(ω -metil-ammino)-nonil]-ammino }-etil-N-metil-N-[(metil-ammino)-nonil]-carbammato. (MVM62) (10a)

Resa: 78%.

$^1\text{H-NMR}$ CDCl_3 δ : 1.10-1.26 (m, 24H, 12CH_2); 1.46-1.53 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.21 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 2.35 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); 2.58-2.67 (m, 8H, $\text{CH}_3\text{NH} + \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 2.80-2.92 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{NH} + \text{CH}_3\text{NCO}$); 3.20 (bs, 2H, $\text{CH}_2\text{NCH}_3\text{CO}$); 4.14 (t, $J=4.4$ Hz, 2H, CH_2O) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 26.25, 26.68, 27.27, 27.92, 29.09, 29.32 (CH_2); 33.20 (CH_3NH); 34.52 (CH_3NCO); 42.58 ($\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 48.75 ($\text{CH}_2\text{NCH}_3\text{CO}$); 49.69 (CH_2NH); 56.07 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 57.92 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); 63.06 (CH_2O); 156.40 (CO) ppm.

ESI – LC/MS: ($\text{C}_{29}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_2$): 250.4 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; 499.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

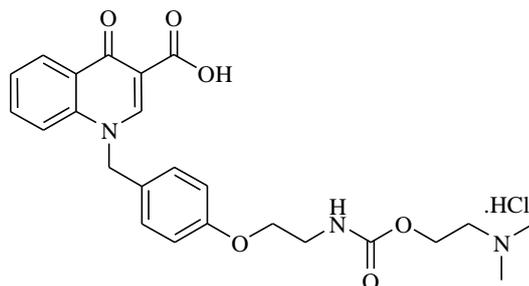
2-{metil [(ω -metilammino)-undecil]-ammino}-etil-N-metil-N-[(metilammino)-undecil]-carbammato (MVM60) (10b)

Resa: 82%

^1H -NMR CDCl_3 δ : 1.10-1.26 (m, 28H, 14 CH_2); 1.46-1.53 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.24 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 2.36 (t, $J=7.6$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); 2.37 (s, 6H, CH_3NH); 2.50 (t, $J=7.2$ Hz, 4H, CH_2NH); 2.58 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 2.82 (bs, 3H, CH_3NCO); 3.19 (bs, 2H, $\text{CH}_2\text{NCH}_3\text{CO}$); 4.10 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, CH_2O) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 26.66, 27.31, 27.42, 27.88, 29.35, 29.53, 29.90 (CH_2); 33.79, 34.42 (CH_3NCO); 36.47 (CH_3NH); 42.74 ($\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 48.66, 49.04 ($\text{CH}_2\text{NCH}_3\text{CO}$); 52.18 (CH_2NH); 56.11 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 58.11 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); 63.27 (CH_2O); 156.40 (CO) ppm.

5.2.10. Cloridrato dell'1-{4-[2-(2-dimetilammino)-etossicarbonil-ammino]-benzil}-1,4-diidro-4-ossocinolin 3-carbossilato (MVM80) (11)



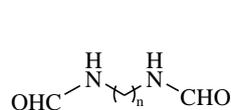
Ad una soluzione metabolica di HCl, preparata da acetilcloruro (0.02 mL, 0.24 mmol) in 5 mL di MeOH anidro, viene aggiunta una soluzione di **45** (34 mg, 0.08 mmol) sciolto in altri 5 mL di MeOH anidro. La miscela viene lasciata sotto agitazione temperatura ambiente per 2 ore. Il solvente è poi eliminato a bassa pressione e il residuo lavato con esano (10 mL x 2volte). Il solido che rimane viene triturato in etere dietilico e filtrato. Il precipitato viene raccolto e costituisce il prodotto finale pulito.

Solido bianco.

Resa quantitativa.

^1H -NMR CD_3OD δ : 2.91 (s, 6H, CH_3N); 3.41-3.46 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{NH}^+\text{Me}_2 + \text{CH}_2\text{NH}$); 3.97-3.99 (m, 2H, CH_2OAr); 4.35-4.38 (m, 2H, CH_2OCO); 5.72 (s, 2H, CH_2Ar); 6.91 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, H-2' + H-6'); 7.23 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H-3' + H-5'); 7.61-7.63 (m, 1H, H-6); 7.86-7.88 (m, 1H, H-7); 8.01-8.03 (m, 1H, H-8); 8.39-8.41 (m, 1H, H-5); 9.19 (s, 1H, H-2) ppm.

5.2.11. Procedura per la sintesi di N-formilamminoalchil-formammidi (15c-e)



n= 7 **15c**
n= 9 **15d**
n= 11 **15e**

In un palloncino a due colli, 1 equivalente di alchildiamina è solubilizzato in 9.95 equivalenti di etilformiato non distillato. Questa miscela viene tenuta a riflusso per una notte (T=52°C), il mattino successivo, si osserva la formazione di un precipitato; evaporando il solvente sotto vuoto, si ottiene un solido che costituisce il prodotto desiderato.

N-(7-formilammino-eptil)-formammide (IR7) (15c)

Solido bianco, p.f.= 82-84 °C.

Resa 92%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.27-1.38 (m, 6H, 3 CH₂); 1.49-1.51 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 3.26-3.31 (m, 4H, CH₂NH); 8.15 (s, 2H, 2CHO) ppm.

N-(9-formilammino-nonil)-formammide (IR26) (15d)

Solido bianco-giallo.

Resa 95%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.22-1.38 (m, 10H, 5 CH₂); 1.45-1.55 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 3.24-3.29 (m, 4H, CH₂NH); 8.13 (s, 2H, 2CHO) ppm.

N-(11-formilammino-undecil)-formammide (IR36) (15e)

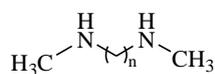
Solido bianco.

Resa 84%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.21-1.29 (m, 14H, 7 CH₂); 1.40-1.53 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 3.26-3.31 (m, 4H, CH₂NH); 8.13 (s, 2H, 2CHO) ppm.

5.2.12. Procedura per la sintesi di N,N'-dimetil-alchildiammine (16c-e)

In un palloncino tenuto a zero gradi con l'utilizzo di un bagno di ghiaccio e contenente THF anidro (2.8 ml per ciascuna mmole di **15c-e**), sono aggiunti lentamente 6 equivalenti di LiAlH₄; a tale soluzione viene poi addizionato 1 equivalente di prodotto **16**. La miscela viene lasciata sotto agitazione e sotto un costante flusso di azoto e a riflusso (T=60°C) per 4 ore, poi altre 15 ore circa a temperatura ambiente. Al termine della reazione, il pallone è portato nuovamente a 0°C e lentamente alla sospensione si aggiunge del ghiaccio e NaOH 10% (1.2 ml per ciascuna mmole di prodotto). Quando la sospensione appare completamente bianca, viene filtrata su buckner, lavando il solido con THF, le acque madri vengono raccolte ed il solvente è concentrato sotto vuoto. Questa operazione è ripetuta un'altra volta. I prodotti **16c**, **16d**, **16e** così ottenuti non necessitano di ulteriore purificazione



n= 7 **16c**
n= 9 **16d**
n= 11 **16e**

N,N'-dimetileptan-1,7-diamina (IR8) (16c)

Olio giallo.

Resa quantitativa

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.27-1.33 (m, 6H, 3CH₂); 1.45-1.49 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 2.41 (s, 6H, 2CH₃); 2.55 (t, J=7.2 Hz, 4H, CH₂NH) ppm.

N,N'-dimetilnonan-1,9-diamina (IR28) (16d)

Solido giallo-chiaro.

Resa 84%.

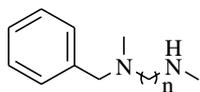
[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.23-1.32 (m, 10H, 5CH₂); 1.41-1.47 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 2.41 (s, 6H, 2CH₃); 2.54 (t, J=7.2 Hz, 4H, CH₂NH) ppm.

N,N'-dimetilundecan-1,11-diamina (IR37) (16e)

Olio trasparente.

Resa 84%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.20-1.39 (m, 14H, 7CH₂); 1.42-1.47 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 2.42 (s, 6H, 2CH₃); 2.55 (t, J=6,6 Hz, 4H, CH₂NH) ppm.

5.2.13. Procedura per la sintesi di N-benzil-N,N'-dimetil-alchildiammine (17d,e)

n= 9

n= 11

17d**17e**

In un pallone a 2 colli, vengono solubilizzati 2 equivalenti di N,N'-dimetil-alchildiammina **16d-e** in CH₃CN anidro (4.5 ml per ciascuna mmole di prodotto); a tale soluzione sono aggiunti 1 equivalente di benzilbromuro e 1 equivalente di K₂CO₃. Questa miscela viene lasciata circa 24 ore in ambiente inerte, sotto agitazione magnetica; trascorso questo tempo, la miscela di reazione viene filtrata su buckner per eliminare il K₂CO₃. Le acque madri vengono recuperate, e il solvente è fatto evaporare a bassa pressione. Il prodotto viene purificato attraverso una cromatografia sotto pressione, utilizzando gel di silice come fase stazionaria e l'eluente 3. Tutti i prodotti si presentano come oli giallo-chiaro.

N-benzil-N,N'-dimetileptan-1,7-diamina (IR25) (17c)

Resa: 26%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.25-1.38 (m, 6H, 3CH₂); 1.42-1.57 (m, 4H, CH₂CH₂N, CH₂CH₂NH); 2.17 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.34 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH₂NCH₂Ar); 2.43 (s, 3H, CH₃NH); 2.56 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂NH); 3.46 (s, 2H, CH₂Ar); 7.18-7.32 (m, 5H, Ar) ppm.

N-benzil-N,N'-dimetilnonan-1,9-diamina (IR30) (17d)

Resa: 36%.

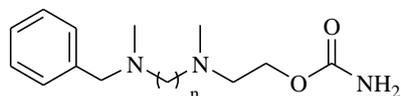
[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.22-1.37 (m, 10H, 5 CH₂); 1.42-1.53 (m, 4H, CH₂CH₂N, CH₂CH₂NH); 2.16 (s, 3H, CH₃NCH₂Ph); 2.34 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH₂NCH₂Ar); 2.42 (s, 3H, CH₃NH); 2.55 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂NH); 3.46 (s, 2H, CH₂Ar); 7.18-7.37 (m, 5H, Ar) ppm.

N-benzil-N,N'-dimetilundecan-1,11-diamina (IR38) (17e)

Resa: 42%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.23-1.26 (m, 14H, 7 CH₂); 1.48-1.52 (m, 4H, CH₂CH₂N, CH₂CH₂NH); 2.17 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.35 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH₂NCH₂Ar); 2.44 (s, 3H, CH₃NH); 2.58 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂NH); 3.47 (s, 2H, CH₂Ar); 7.20-7.33 (m, 5H, Ar) ppm.

5.2.14. Procedura per la sintesi dei 2-[[ω-(benzil-metil-ammino)-alchil]-metil-ammino] etilcarbammati (18d,e)



n= 9

18d

n= 11

18e

In un pallone a 2 colli, viene solubilizzato 1 equivalente della N-benzil-N,N'-dimetil-alchil-diammina **17d-e** in CH₃CN anidro

(5.0 ml per ciascuna mmole di prodotto), a tale soluzione vengono addizionati 1 equivalente di 2-iodioetil carbammato e 1 equivalente di K₂CO₃; queste aggiunte sono effettuate a zero gradi. La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica in ambiente inerte per 24 ore. Trascorso questo tempo la miscela è filtrata su buckner, le acque madri recuperate vengono portate a secco. Il prodotto viene purificato attraverso una cromatografia sotto pressione, utilizzando gel di silice come fase stazionaria e l'eluente 4. I prodotti desiderati, **18d** e **18e**, sono separati dai composti **19d-e** che risultano essere i composti più abbondanti di questa reazione e giustificano le basse rese del prodotto desiderato e dai sottoprodotti **20a-b** e **21a-b**.

Tutti i prodotti si presentano come oli giallo-chiaro.

2-[[9-(benzil-metil-amino)-nonil]-(metil)-ammino]-etil carbammato (IR33) (18d)

Resa: 23%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.20-1.33 (m, 10H, 5CH₂); 1.44-1.53 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.21 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.28 (s, 3H, CH₃NCH₂CH₂O), 2.36-2.40 (m, 4H, CH₂N); 2.62 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂CH₂O); 3.52 (s, 2H, CH₂Ar); 4.16 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂O); 7.20-7.38 (m, 5H, Ar) ppm.

2-[[11-(benzil-metil-amino)-undecil]-(metil)-ammino]-etil carbammato (IR39) (18e)

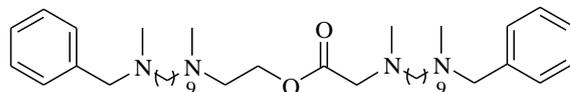
Resa: 21%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.23-1.26 (m, 14H, 7CH₂); 1.46-1.53 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.21 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.28 (s, 3H, CH₃NCH₂CH₂O), 2.37-2.41 (m, 4H, CH₂N); 2.62 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂CH₂O); 3.52 (s, 2H, CH₂Ar); 4.16 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂O); 7.2-7.37 (m, 5H, Ar) ppm.

ESI – LC/MS: (C₂₃H₄₁N₃O₂) 393.3 [M+H]⁺ m/z.

2-[[9-(benzil-metil-ammino)-nonil]-metil-ammino]etil-N-[[9-(benzil-metil-ammino)-nonil]-N-metil carbammato (MVIR33) (19d)

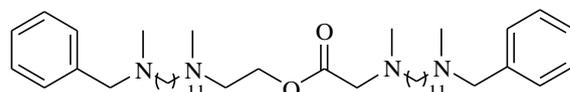
Resa: 57%.



¹H-NMR CDCl₃ δ: 1.20-1.33 (m, 24H, 12CH₂); 1.46-1.53 (m, 8H, CH₂CH₂N); 2.16 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.26 (s, 3H, CH₃NCH₂CH₂O); 2.32 (t, J=7.2 Hz, 6H, CH₂CH₂N); 2.61 (t, J= 6 Hz, 2H, NCH₂CH₂O); 2.83 (bs, 3H, CH₃NCO); 3.21 (bs, 2H, CH₂NCH₃CO); 3.45 (s, 2H, CH₂Ar); 4.14 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂O); 7.2-7.37 (m, 5H, Ar) ppm.

2-[[11-(benzil-metil-ammino)-undecil]-metil-ammino]etil-N-[[11-(benzil-metil-ammino)-undecil]-N-metil carbammato. (MVIR39) (19e)

Resa: 56%.



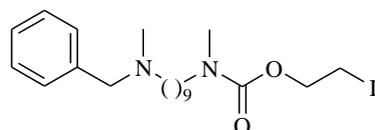
¹H-NMR CDCl₃ δ: 1.10-1.26 (m, 28H, 14CH₂); 1.46-1.53 (m, 8H, CH₂CH₂N); 2.21 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.26 (s, 3H, CH₃NCH₂CH₂O); 2.33 (t, J=7.2 Hz, 6H, CH₂CH₂N); 2.61 (t, J= 6 Hz, 2H, NCH₂CH₂O); 2.83 (bs, 3H, CH₃NCO); 3.19 (bs, 2H, CH₂NCH₃CO); 3.47 (s, 2H, CH₂Ar); 4.14 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂O); 7.2-7.37 (m, 5H, Ar) ppm.

¹³C-NMR CDCl₃ δ: 26.72, 27.40, 27.47, 27.94, 28.70, 29.42, 29.61 (CH₂); 33.86, 34.50 (CH₃NCO); 42.23 (CH₃NCH₂); 42.81 (CH₃NCH₂CH₂O); 48.70, 49.10 (CH₂NCO); 56.10 (NCH₂CH₂O); 57.61 (CH₂NCH₃); 58.17 (CH₂NCH₂CH₂O); 62.31 (CH₂Ar); 63.28 (CH₂O); 126.86, 128.16, 129.07 (CH); 139.19 (C); 156.38 (CO) ppm.

ESI – LC/MS: (C₄₄H₇₆N₄O₂) 340.4 [M+2H]²⁺; 679.6 [M+H]⁺ m/z.

2-[[9-(benzil-metil-ammino)-nonil]-metil-ammino]-1-iodoetilcarbammato (20a)

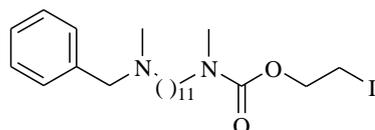
Resa: 18%.



¹H-NMR CDCl₃ δ: 1.20-1.33 (m, 10H, 5CH₂); 1.46-1.51 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.15 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.32 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂N); 2.88 (s, 3H, CH₃NCO); 3.22 (t, J= 6.0 Hz, 2H, CH₂I); 3.29 (t, J= 6.4 Hz, 2H, CH₂NCO); 3.45 (s, 2H, CH₂Ar); 4.30 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂O); 7.20-7.29 (m, 5H, Ar) ppm.

2-[[11-(benzil-metil-ammino)-undecil]-metil-ammino]-1-iodoetilcarbammato (20b)

Resa: 22%.

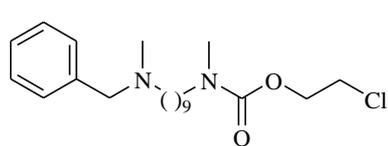


¹H-NMR CDCl₃ δ: 1.20-1.33 (m, 14H, 7CH₂); 1.46-1.51 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.16 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.32 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂N); 2.87 (s, 3H, CH₃NCO); 3.22 (t, J= 6.0 Hz, 2H, CH₂I); 3.29 (t, J= 6.4 Hz, 2H, CH₂NCO); 3.45 (s, 2H, CH₂Ar); 4.30 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂O); 7.20-7.29 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 2.07 (CH₂I); 26.36, 26.66, 27.13, 27.38, 27.90, 29.36 (CH₂); 33.93, 34.59 (CH₃NCO); 42.05 (CH₃NCH₂); 48.32, 48.84 (CH₂NCO); 57.39 (CH₂NCH₃CH₂); 62.08 (CH₂Ar); 65.12 (CH₂O); 127.08, 128.23, 129.22 (CH); 138.40 (C); 155.53 (CO) ppm.

ESI – LC/MS: (C₂₅H₄₃IN₂O₂) 503.2 [M+H]⁺ m/z.

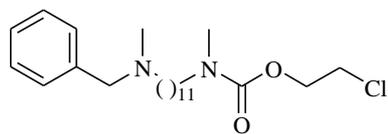
2-[[9-(benzil-metil-amino)-nonil]-metil-amino]-1-cloroetilcarbammato (21a)



Resa: 2%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.19-1.33 (m, 10H, 5CH₂); 1.46-1.51 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.16 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.32 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂N); 2.87 (s, 3H, CH₃NCO); 3.30 (t, J= 6.4 Hz, 2H, CH₂NCO); 3.45 (s, 2H, CH₂Ar); 3.62 (t, J= 6.0 Hz, 2H, CH₂Cl); 4.30 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂O); 7.20-7.29 (m, 5H, Ar) ppm.

2-[[11-(benzil-metil-amino)-undecil]-metil-amino]-1-cloroetilcarbammato (21b)



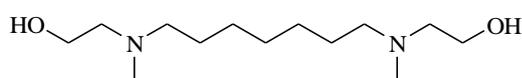
Resa: 2%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.20-1.33 (m, 14H, 7CH₂); 1.46-1.51 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.16 (s, 3H, CH₃NCH₂Ar); 2.32 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂N); 2.87 (s, 3H, CH₃NCO); 3.29 (t, J= 6.4 Hz, 2H, CH₂NCO); 3.45 (s, 2H, CH₂Ar); 3.62 (t, J= 6.0 Hz, 2H, CH₂Cl); 4.30 (t, J=5.6 Hz, 2H, CH₂O); 7.20-7.29 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 26.36, 26.66, 27.13, 27.38, 27.90, 29.36 (CH₂); 33.93, 34.59 (CH₃NCO); 42.05 (CH₃NCH₂); 42.38 (CH₂Cl); 48.32, 48.84 (CH₂NCO); 57.39 (CH₂NCH₃CH₂); 62.08 (CH₂Ar); 65.12 (CH₂O); 127.08, 128.23, 129.22 (CH); 138.40 (C); 155.07 (CO) ppm.

ESI – LC/MS: (C₂₅H₄₃ClN₂O₂) 411.3 [M+H]⁺ m/z.

5.2.15. 2-[[2-(idrossietil)-metil-ammino]-eptil-(metil-ammino)-etanolo. (MVM69) (22)

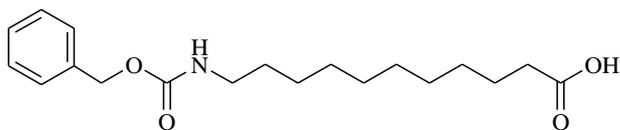


A **16c** (155 mg, 1 mmol) sciolto in 12 mL di CH₃CN anidro, portato a 0°C, vengono aggiunti K₂CO₃ (276mg, 2 Eq), e 2-Bromoetanolo (0.142 mL, 1Eq). La miscela è poi lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente. La reazione è controllata tramite TLC su gel di silice con eluente 70/30/3 DCM/MeOH/NH₃. Dopo 18 ore, la miscela è filtrata su buckner e le acque madri sono portate a secco. Il composto desiderato è ottenuto per purificazione cromatografica flash usando come eluente 2.

Olio trasparente.

Resa: 93%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.20-1.39 (m, 6H, 3CH₂); 1.56-1.637 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.43 (s, 6H, 2CH₃); 2.62 (t, J=7.2 Hz, 4H, CH₂NH); 2.73 (t, J= 4.8 Hz, 4H, CH₂CH₂OH); 2.91 (bs, 1H, OH); 3.71 (t, J= 5.2 Hz, 4H, CH₂OH) ppm.

5.2.16. Acido 11-[(benzilossi)-carbonil-ammino]-undecanoico (MVM18) (25)

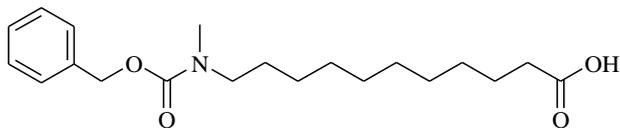
L'acido 11-amminoundecanoico (201 mg, 1 mmol) è sciolto in una soluzione acquosa di NaOH 0.4M (160mg, 4mmol in 10 mL H₂O) a 0°C

sotto forte agitazione. Quando la miscela è totalmente limpida si aggiunge il benzilcloroformiato (0.17 mL, 1.2 mmol) e si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore. L'andamento della reazione è monitorato tramite TLC di gel di silice su alluminio usando come eluente 8. Trascorso questo tempo si acidifica con HCl 2N fino a pH=3 e si porta a secco. Il residuo ottenuto viene estratto a secco con Et₂O. Il solvente di estrazione è quindi allontanato sotto vuoto lasciando il prodotto desiderato come solido.

Solido bianco.

Resa quantitativa.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.15-1.36 (m, 12 H, 6CH₂); 1.40-1.57 (m, 2H, CH₂CH₂N); 1.60 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂CO); 2.32 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂CO); 3.12-3.21 (m, 2H, CH₂N); 4.74 (bs, 1H, NH); 5.08 (s, 2H, CH₂Ar); 7.28-7.38 (m, 5H, Ar).

5.2.17. Acido 11-[[(benzilossi)-carbonil]-metil-ammino]-undecanoico (MVM20) (26)

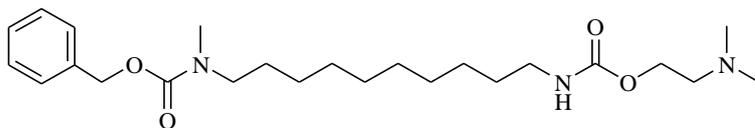
Il prodotto **25** (381.7 mg, 1.14 mmol) è solubilizzato in 10 mL di THF anidro e portato a 0°C, poi viene aggiunto *t*C₄H₉OK (254.8 mg, 2.28

mmol) e dopo un'ora lo Ioduro di Metile (0.16 mL, 2.6 mmol). La reazione è lasciata a temperatura ambiente per 18 ore al termine delle quali la miscela viene diluita con poca H₂O e con HCl 2N fino a pH=3 ed estratta con etile acetato (10 mL x 3 volte). La fase organica è anidrificata su Na₂SO₄ e il sovente è allontanato sotto vuoto. Il prodotto desiderato è ottenuto dopo purificazione cromatografica flash usando come eluente 8.

Olio marrone.

Resa: 76%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.15-1.41 (m, 12 H, 6CH₂); 1.43-1.57 (m, 2H, CH₂CH₂N); 1.61 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂CO); 2.33 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂CO); 2.89 (s, 3H, CH₃); 3.19-3.38 (m, 2H, CH₂N); 4.74 (bs, 1H, NH); 5.10 (s, 2H, CH₂Ar); 7.28-7.39 (m, 5H, Ar) ppm.

5.2.18. 2-(dimetilammino)-etil-N-(10-[[(benzilossi)-carbonil]-metil-ammino]-decilcarbammato (MVM22) (30)

Il prodotto **26** (127.7 mg, 0.36 mmol) è sciolto in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro al

quale viene aggiunto lentamente SOCl₂ (0.24 mL, 3.2 mmol). La miscela di reazione è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 6 ore. Al termine della reazione il solvente è allontanato sotto vuoto a bassa temperatura e il residuo è lavato con esano

che poi viene nuovamente evaporato (questa operazione è ripetuta per 2 volte). Il cloruro acido così ottenuto è sciolto in 10 mL di acetone e addizionato di 1 mL di una soluzione satura di NaN_3 . Dopo 30 minuti a temperatura ambiente la miscela è diluita con H_2O ed estratta con CH_2Cl_2 (10 mL x 3 volte). La fase organica viene anidrificata su Na_2SO_4 e la rimozione del solvente porta all'ottenimento di un olio giallo chiaro (acil azide) che è disciolto in toluene e scaldato a riflusso per 4 ore ottenendo, attraverso un riarrangiamento di Curtius, l'isocianato corrispondente. Dopo aver lasciato raffreddare, alla miscela di reazione viene aggiunto dimetilamminoetanol (0.04 mL, 0.36 mmol) e la soluzione è quindi scaldata a 70°C per 4 ore. Il prodotto finale è ottenuto puro in seguito a purificazione cromatografica flash (eluente 9).

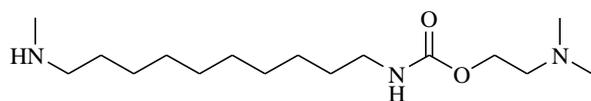
Olio giallo.

Resa: 36%.

[^1H]-NMR CDCl_3 δ : 1.13-1.35 (m, 12 H, 6CH_2); 1.41-1.53 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N} + \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2.25 (s, 6H, CH_3N); 2.52 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH_2NMe_2); 2.86 (s, 3H, CH_3NCO); 2.99-3.15 (m, 2H, CH_2NH); 3.16-3.24 (m, 2H, CH_2NMe); 4.11 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH_2O); 4.83 (bs, 1H, NH); 5.90 (s, 2H, CH_2Ar); 7.21-7.38 (m, 5H, Ar) ppm.

[^{13}C]-NMR CDCl_3 δ : 26.64, 26.72, 27.47, 27.93, 29.22, 29.32, 29.44, 29.91 (CH_2); 41.03 (CH_2NH); 45.37 (CH_3); 48.69, 49.17 (CH_2N); 58.12 (CH_2NMe_2); 61.86 (CH_2Ar); 66.88 (CH_2O); 127.95, 128.87 (CH Ar); 137.08 (C); 156.61 (CO) ppm.

5.2.19. 2-(dimetilammino)-etil-N-10-(metil-ammino)-decilcarbammato (MVM23) (31)



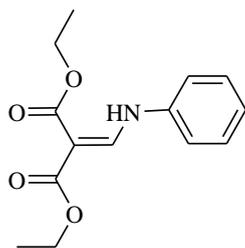
Il composto **30** (62.5 mg, 0.14 mmol) è solubilizzato in un beacker con 25 mL di EtOH assoluto al quale viene aggiunto Pd/C 10% (32 mg; 160 mg per ciascuna mmole di prodotto) e posto in idrogenatore PARR a 80 PSI per 18 ore. L'andamento della reazione è monitorato tramite TLC di gel di silice su alluminio usando l'eluente 1. La miscela viene quindi filtrata e le acque madri portate a secco. Il prodotto desiderato è ottenuto in seguito a purificazione cromatografica flash (eluente 1).

Olio giallo.

Resa: 58%.

[^1H]-NMR CDCl_3 δ : 1.13-1.39 (m, 12 H, 6CH_2); 1.41-1.51 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N} + \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2.21 (s, 6H, CH_3N); 2.38 (s, 3H, CH_3NCO); 2.47 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2NMe_2); 2.52 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2NH); 2.64 (bs, 1H, NH); 3.08 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2NHCO); 4.07 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH_2O); 4.90 (bs, 1H, NHCO) ppm.

[^{13}C]-NMR CDCl_3 δ : 26.68, 27.20, 29.18, 29.40, 29.87 (CH_2); 35.98 (CH_3NH); 40.98 (CH_2NHCO); 45.44 (CH_3N); 51.80 (CH_2NH); 58.27 (CH_2NMe_2); 61.98 (CH_2O); 156.53 (CO) ppm.

5.2.20. Dietil anilinomietilmalonate (MVM41) (33a)

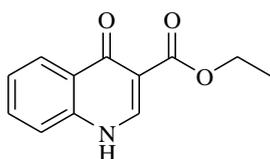
Il dietiletossimetilmalonato (4.86 mL, 24.0 mol) è messo sotto agitazione senza solvente con l'anilina (2.19 mL, 24.0 mol) e portato a 115°C per 4 ore. La reazione è monitorata con TLC di gel di silice su alluminio usando l'eluente 10. Trascorso questo tempo la miscela viene lasciata tornare a temperatura ambiente e si vede la formazione di un precipitato voluminoso beige che viene rilavato con esano e filtrato. Il residuo che si ottiene costituisce l'enammina intermedia **33a**.

Solido beige, p.f. = 46-48°C

Resa 90%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.33 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O); 1.37 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O); 4.23 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂O); 4.29 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂O); 7.10-7.16 (m, 3H, 3CH); 7.36 (t, J = 7.6 Hz, 2H, 2 CH); 8.53 (d, J = 14.0 Hz, 1H, H-β); 10.99 (d, J = 13.2 Hz, 1H, NH) ppm.

IR (KBr) v: 1718 e 1675 (C=O); 1261 (C-O) cm⁻¹.

5.2.21. Etil- 1,4-diidro-4-ossochinolin-3-carbossilato (MVM41b) (33b)

33a (5.68 g, 22.0 mol) viene scaldato gradualmente in bagno di sabbia fino a 115 °C, a questa temperatura viene aggiunto del difenil etero (7.0 mL, 44.2 mol), dopo si scalda ulteriormente fino a 260°C per 2 ore e poi si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per altre 14 ore. La reazione è monitorata con TLC di gel di silice su alluminio usando l'eluente 11. La miscela di

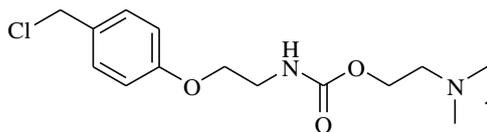
reazione è poi diluita con etere di petrolio e il precipitato ottenuto è filtrato e seccato e costituisce il prodotto desiderato.

Solido bianco, p.f. = 268–269 °C;

Resa: 92%.

[¹H]-NMR DMSO-*d*₆ δ: 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O); 4.19 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂O); 7.39 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-6); 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-8); 7.68 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-7); 8.13 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5); 8.51 (s, 1H, H-2) ppm.

IR (KBr) v : 3300–2800 (OH/NH); 1695 (C=O) cm⁻¹.

5.2.22. Cloridrato del 2-(dimetilammino)etil 2-(4-clorobenzil)etil carbammato (MVM49) (34)

Una miscela di acetilcloruro (0.021 mL, 0.29 mmol) in 5 mL di MeOH anidro a 0°C è posta sotto agitazione per 15 minuti e poi viene aggiunto **37** (70 mg, 0.25 mmol)

sciolto in altri 5 mL di MeOH anidro. La miscela è lasciata a questa temperatura per altri 15 minuti e poi il solvente è allontanato sotto vuoto. Si ottiene un olio giallo (**37.HCl**) che viene sospeso in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro a 0°C e addizionato con 0.054 mL di SOCl₂ (0.75 mmol), dopo 15 minuti si lascia risalire a temperatura ambiente. Dopo 2 ore si allontana nuovamente il solvente, il residuo che se ne ottiene viene lavato

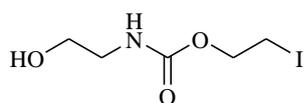
con esano (10 mL x 2v.) che viene poi rimosso sotto bassa pressione lasciando il prodotto desiderato puro.

Solido bianco.

Resa quantitativa.

[¹H]-NMR CD₃OD δ: 2.92 (s, 6H, CH₃); 3.29-3.31 3.41-3.44 (m, 2H, CH₂NH⁺Me₂); 3.50 (t, J= 5.2 Hz, 2H, CH₂NH); 4.04 (t, J=5.2 Hz, 2H, CH₂OAr); 4.35-4.39 (m, 2H, CH₂OCO); 4.54 (s, 2H, CH₂OH); 6.91 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-3 + H-5); 7.31 (d, J= 8.4 Hz, 2H, H-2 + H-6) ppm.

5.2.23. 2-iodoetil 2- idrossietilcarbammato (MVM44) (35)



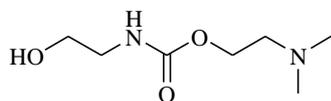
A 0.1 mL di 2-cloroetilcloroformiato (0.1 mmol) sciolti in 2 mL di CH₂Cl₂, viene aggiunta Et₃N (0.25 mL) e poi la dimetiletanolammina (0.06 mL, 0.1 mmol). La miscela è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 14 ore. Al termine della reazione, la miscela è diluita con ulteriore CH₂Cl₂ e lavata con una soluzione satura di NaCl; questa fase acquosa viene poi estratta con CH₂Cl₂ (10 mL x 2 volte). Le fasi organiche vengono riunite e anidificate su Na₂SO₄ e il solvente eliminato sotto vuoto. Si ottiene il 2-cloroetil 2- idrossietilcarbammato (MVM42) come olio incolore con resa del 30%. **[¹H]-NMR** CDCl₃ δ: 3.26 (q, J= 5.2 Hz, 2H, CH₂NH); 3.62 (bs, 1H, OH); 3.61-3.68 (m, 4H, CH₂OH + CH₂Cl); 4.27 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂O); 5.63 (bs, 1H, NH) ppm. Questo prodotto (236 mg, 1.4 mmol) viene solubilizzato in 15 mL di acetone e si aggiungono 5 Eq di Ioduro di potassio (1.06 g, 7.0 mmol), poi la miscela viene posta a riflusso al riparo dalla luce per 48 ore. Al termine della reazione il solvente è eliminato sotto vuoto e il residuo ripreso con H₂O ed estratto con CH₂Cl₂ (10 mL x 3 volte). La fase organica ottenuta è anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente nuovamente eliminato lasciando il prodotto desiderato come olio.

Olio giallo.

Resa: 82%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 2.66 (bs, 1H, OH); 3.24-3.45 (m, 4H, CH₂NH + CH₂I); 3.70 (t, J= 4.8 Hz, 2H, CH₂OH); 5.38 (bs, 1H, NH) ppm.

5.2.24. 2-(dimetilammino)etil 2-idrossietilcarbammato (MVM46) (36)



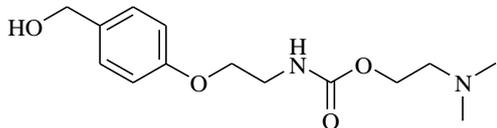
Lo iododerivato **35** (117 mg, 0.45 mmol) è solubilizzato in 0.28 mL di dimetilamina al 33% in EtOH assoluto (1.45 mmol) e 1 mL di EtOH assoluto a 0°C. Dopo 30 minuti a freddo (0°C) il prodotto di partenza è totalmente solubilizzato e la miscela è lasciata tornare a temperatura ambiente e resta sotto agitazione per 18 ore. Trascorso questo tempo il solvente viene allontanato sotto vuoto e il residuo ripreso con una soluzione satura di Na₂CO₃ in MeOH (5 mL), la nuova miscela è filtrata e il solvente nuovamente allontanato tramite bassa pressione. Il solido ottenuto dalle acque madri è trattato con CH₂Cl₂ (10 mL) e nuovamente filtrato. Portando a secco queste acque madri si ottiene un olio che dopo purificazione cromatografica flash usando l'eluente 8, porta all'ottenimento del composto desiderato.

Olio giallo.

Resa: 50%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 2.32 (s, 6H, CH₃); 2.58-2.62 (m, 2H, CH₂NMe₂); 2.67 (bs, 1H, OH); 3.31 (q, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NH); 3.68 (t, J=4.8 Hz, 2H, CH₂OH); 4.17-4.19 (m, 2H, CH₂O); 5.50 (bs, 1H, NH) ppm.

5.2.25. 2-(dimetilammino)etil 2-(4-idrossibenzil)etilcarbammato (MVM48) (**37**)



A 208 mg di **36** (1.18 mmol) sciolti in 10 mL di THF anidro a 0°C sono aggiunti: 173,3 mg di p-idrossibenzaldeide (1.42 mmol), 465.2 mg di trifenilfosfina (1.78 mmol) e 0.279 mL di DEAD (1.78 mmol). Dopo un'ora la miscela è lasciata risalire a temperatura ambiente e lasciata ancora sotto agitazione per 2 ore. La reazione è monitorata con TLC di gel di silice su alluminio usando come eluente 90/10/0.5 DCM/MeOH/NH₃. Al termine il solvente è allontanato sotto vuoto e il residuo ripreso con H₂O acida da HCl 2M (pH = 4) ed estratto con CH₂Cl₂ (10 mL x 3 volte), poi si rilava la fase organica con NaHCO₃ (10 mL x 2v.), la si anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente viene eliminato. In seguito a purificazione cromatografica flash usando l'eluente 15, si ottiene il 2-(dimetilammino)etil 2-(4-formilfenossi)etil carbammato (MVM47) come olio giallo con resa del 64%. **[¹H]-NMR** CDCl₃ δ: 2.24 (s, 6H, CH₃); 2.52 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NMe₂); 3.59 (q, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NH); 4.09 (t, J=5.2 Hz, 2H, CH₂OAr); 4.15 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂OCO); 5.35 (bs, 1H, NH); 6.96 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-3 + H-5); 7.80 (d, J= 8.4 Hz, 2H, H-2 + H-6); 9.86 (s, 1H, CHO) ppm. **[¹³C]-NMR** CDCl₃ δ: 40.30 (CH₂NMe₂); 45.53 (CH₃); 58.18 (CH₂NH); 62.38 (CH₂O); 67.24 (CH₂OAr); 114.72 (C-3 + C-5); 130.27 (C-4); 132.01 (C-2 + C-6); 156.53 (C-1); 163.45 (OCONH); 190.73 (CHO) ppm.

L'aldeide MVM47 (74.6 mg, 0.26 mmol) è poi solubilizzata in una miscela 10:1 THF anidro/EtOH assoluto (5.5 mL) a 0°C viene aggiunto NaBH₄ (29.4 mg, 0.78 mmol). La miscela è mantenuta a 0°C. Dopo 1 ora si spegne la reazione con 2-3 chicchi di ghiaccio e si ripartisce la miscela tra H₂O e CH₂Cl₂ (10 mL x 3v.). La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente allontanato sotto vuoto. Il prodotto finale **37** è ottenuto in seguito a cromatografia flash usando l'eluente 6.

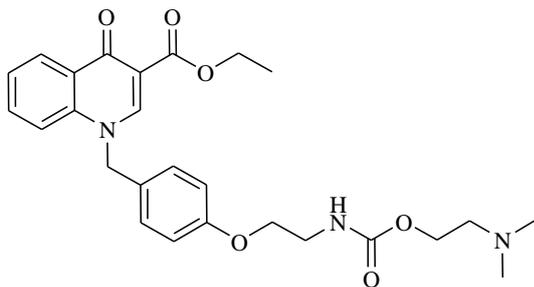
Olio trasparente.

Resa: 61%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 2.21 (s, 6H, CH₃); 2.50 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NMe₂); 2.90 (bs, 1H, OH); 3.51 (q, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NH); 3.95 (t, J=5.2 Hz, 2H, CH₂OAr); 4.11 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂OCO); 4.57 (s, 2H, CH₂OH); 5.50 (bs, 1H, NH); 6.79 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-3 + H-5); 7.22 (d, J= 8.4 Hz, 2H, H-2 + H-6) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 40.48 (CH₂NMe₂); 45.39 (CH₃); 58.07 (CH₂NH); 62.06 (CH₂OAr); 64.55 (CH₂OCO); 66.86 (CH₂OH); 114.41 (C-3 + C-5); 128.49 (C-2 + C-6); 133.94 (C-4); 156.62 (C-1); 157.91 (OCONH) ppm.

5.2.26. Etil 1-{4- [2-(2-dimetilammino)-etossicarbonil-ammino]-benzil}-1,4-diidro-4-ossochinolin 3-carbossilato (MVM78) (**38**)



A 0.075 mL di dimetiletanolamina (0.72 mmol), solubilizzati in 10 mL di THF anidro a 0°C, vengono aggiunti 120 mg di carbonildiimidazolo (0.72 mmol). La miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore, al termine delle quali si ha l'esaurimento dei prodotti di partenza e la formazione dell'intermedio

imidazolico che non viene isolato. A questo punto sono aggiunti 68 mg di **44** (0.18 mmol) e la miscela è portata a riflusso per 3 ore e poi lasciata a temperatura ambiente per 14 ore. Al termine, il solvente è allontanato sotto vuoto e il residuo ripreso con 10 mL di H₂O e lasciato sotto agitazione per 20 minuti. Poi la fase acquosa è estratta con CH₂Cl₂ (10 mL x 3 volte) e la fase organica che se ne ottiene è anidrificata su Na₂SO₄, infine il solvente è di nuovo eliminato sotto vuoto. Il prodotto finale è ottenuto dopo purificazione cromatografica usando come eluente 6.

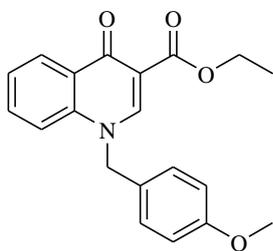
Olio incolore.

Resa: 75%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.39 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O); 2.26 (s, 6H, CH₃N); 2.54 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NMe₂); 3.54 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NH); 3.97 (t, J= 5.2 Hz, 2H, CH₂OAr); 4.14 (t, J= 5.2 Hz, 2H, CH₂OCO); 4.38 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂O); 5.31 (s, 2H, CH₂Ar); 6.84 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-2' + H-6'); 7.08 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-3' + H-5'); 7.32 (d, J=8.4 Hz, 1H, H-8); 7.37 (t, J= 7.2 Hz, 1H, H-6); 7.53 (td, J= 8.2 Hz, 7.2 Hz, 1.6 Hz, 1H, H-7); 8.51 (dd, J= 8.0, 1.6 Hz, 1H, H-5); 8.55 (s, 1H, H-2) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 14.45 (CH₃CH₂O); 40.37 (CH₂NH); 45.46 (CH₃N); 56.95 (CH₂Ar); 58.12 (CH₂NMe₂); 60.94 (CH₃CH₂O); 62.18 (CH₂OCO); 66.95 (CH₂OAr); 111.14 (C-1'); 115.23 (C-2' + C-6'); 116.50 (C-8); 125.16 (C-6); 126.49 (C-9); 127.68 (C-3' e C-5'); 127.92 (C-5); 129.29 (C-4'); 132.57 (C-7); 139.13 (C-10); 149.54 (C-2); 156.49 (OCONH); 158.64 (C-3); 165.81 (C-4=O), 174.46 (CO) ppm.

5.2.27. Etil 1-(4-metossibenzil)-1,4-diidro-4-ossochinolin 3-carbossilato (MVM51) (**39a**)



Il composto **33b** (256.3 mg, 1.12 mmol) è solubilizzato in 3 mL di DMF anidra, si aggiungono K₂CO₃ (278 mg, 2.0 mmol), p-metossibenzilcloruro (262.9 mg, 1.7 mmol) e in quantità catalitiche KI (3 mg, 0.02 mmol). Dopo una notte a temperatura ambiente, il solvente di reazione viene allontanato e il residuo ripreso con acqua ed estratto con CH₂Cl₂ (10 mL x 2v.). La fase organica anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente allontanato sotto vuoto. Il prodotto desiderato è ottenuto in seguito a purificazione cromatografica flash usando l'eluente 16.

Solido bianco.

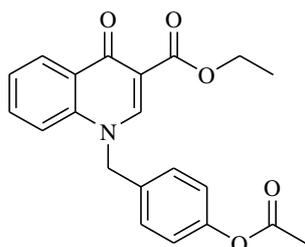
Resa: 74%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.33 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O); 3.70 (s, 3H, CH₃); 4.30 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂O); 5.27 (s, 2H, CH₂Ar); 6.80 (d, J= 8.4 Hz, 2H, H-2' + H-6'); 7.05

(d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3' + H-5'); 7.25-7.32 (m, 2H, H-6 + H-8); 7.46 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-7); 8.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5); 8.58 (s, 1H, H-2) ppm.

[^{13}C]-NMR CDCl_3 δ : 14.42 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 55.29 (CH_3O); 56.85 (CH_2Ar); 60.73 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 110.92 (C-1'); 114.65 (C-2' + C-6'); 116.64 (C-8); 125.00 (C-7); 126.10 (C-4'); 127.64 (C-5); 127.69 (C-3' + C-5'); 129.14 (C-9); 132.47 (C-6); 139.11 (C-2); 149.42 (C-10); 159.67 (C-3); 165.55 (C-4=O); 174.36 (CO) ppm.

5.2.28. Etil 1-(4-(acetossi)benzil)-1,4-diidro-4-ossochinolin 3-carbossilato (MVM58) (39b)



Il chinolone **33b** (328.3 mg, 1.4 mmol) è solubilizzato in 5 mL di DMF anidra, poi vengono aggiunti: **41** (263.7 mg, 1.4 mmol), KI (11 mg, 0.07 mmol), e K_2CO_3 (400 mg, 2.9 mmol). La miscela di reazione è lasciata a temperatura ambiente per 18 ore. Trascorso questo tempo, il solvente di reazione è allontanato sotto basso vuoto e il residuo è ripreso con H_2O . La fase acquosa è dunque estratta con EtoAc (10 mL x 3 volte) e la fase organica che se ne ottiene è anidrificata su Na_2SO_4 e portata a secco. Il prodotto finale è ottenuto in seguito a purificazione cromatografica flash (eluente 13).

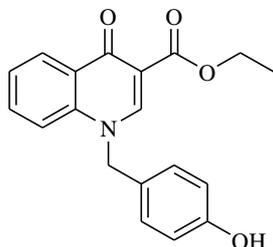
Solido beige.

Resa: 70%.

[^1H]-NMR CDCl_3 δ : 1.38 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 2.64 (s, 3H, CH_3CO); 4.37 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 5.37 (s, 2H, CH_2Ar); 7.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2' + H-6'); 7.15 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3' + H-5'); 7.28 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-8); 7.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-6); 7.53 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-7); 8.51 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.6 Hz, 1H, H-5); 8.57 (s, 1H, H-2) ppm.

[^{13}C]-NMR CDCl_3 δ : 14.28 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 21.06 (CH_3CO); 56.18 (CH_2Ar); 60.96 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 111.38 (C-1'); 116.45 (C-8); 122.59 (C-2' + C-6'); 125.25 (C-6); 127.15 (C-3' + C-5'); 129.21 (C-7'); 130.47 (C-4'); 131.80 (C-9); 132.72 (C-5); 139.05 (C-10); 149.64 (C-2); 150.71 (C-3); 165.61 (C-4=O); 169.22, 174.42 (CO) ppm.

5.2.29. Etil 1-(4-idrossibenzil)-1,4-diidro-4-ossochinolin 3-carbossilato (MVM61) (40)



Il composto **39b** (245.4 mg, 0.67 mmol) è solubilizzato in 5 mL di MeOH e trattato con 4mL di una soluzione satura NaHCO_3 . La miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 14 ore. Al termine della reazione il solvente è evaporato e il residuo ripartito tra H_2O e CH_2Cl_2 . La fase organica è anidrificata su Na_2SO_4 e il solvente nuovamente allontanato.

Solido bianco.

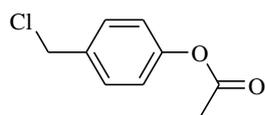
Resa quantitativa.

[^1H]-NMR CD_3OD δ : 1.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 4.33 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 5.52 (s, 2H, CH_2Ar); 6.76 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2' + H-6'); 7.11 (d, $J = 8.8$

Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7.48(dt, J= 9.6 Hz, 6.4 Hz, 1.6 Hz, 1H, H-7); 7.68-7.75 (m, 2H, H-6 + H-8); 8.42 (dd, J= 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H, H-5); 8.88 (s, 1H, H-2) ppm.

[¹³C]-NMR CD₃OD δ: 13.29 (CH₃CH₂O); 56.41 (CH₂Ar); 60.25 (CH₃CH₂O); 109.72 (C-1'); 114.68 (C-2' e C-6'); 117.56 (C-8); 125.23 (C-7); 125.32 (C-4'); 126.57 (C-5); 128.39 (C-3' + C-5'); 129.40 (C-9); 132.89 (C-6); 139.40 (C-10); 149.20 (C-2); 157.47 (C-3); 164.85 (C-4=O); 175.43 (CO) ppm.

5.2.30. 4-(clorometil)fenilacetato (MVM57) (41)



Il prodotto **47** (375.3 mg, 2.3 mmol) è solubilizzato in 10 mL di CH₂Cl₂ anidro e portato a 0°C. Alla soluzione è aggiunto lentamente del SOCl₂ (0.49 mL, 6.9 mmol), al termine dell'aggiunta la reazione è lasciata a 0°C per 45 minuti e poi a temperatura ambiente per 4 ore. L'andamento della reazione è monitorato con TLC di gel di silice su alluminio usando la miscela eluente 12. Al termine della reazione il solvente viene allontanato tramite bassa pressione e il residuo ottenuto è lavato con esano che poi viene allontanato sotto vuoto (10 mL x 2 volte).

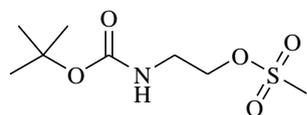
Olio giallo.

Resa: 95%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 2.87 (s, 3H, CH₃); 4.57 (s, 2H, CH₂Cl); 7.06 (d, J= 6.8 Hz, 2H, H-3 + H-5); 7.38 (d, J= 5.2 Hz, 2H, H-2 + H-6) ppm.

IR (KBr) ν: 1762 (C=O) cm⁻¹.

5.2.31. *t*-butil N-2-(metansulfonilossi)etilcarbamato (MVM73) (42)



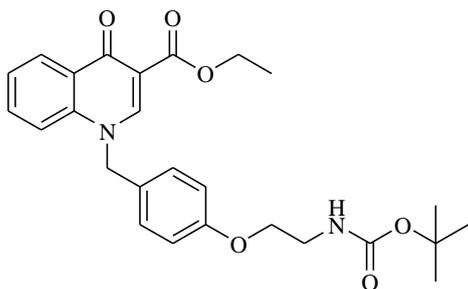
La N-BOC-etanolamina commerciale (0.2 mL, 1.2 mmol) è solubilizzata in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro, viene aggiunta Et₃N anidra (0.22 mL, 1.5 mmol) e il metansolfonilcloruro (0.12 mL, 1.5 mmol). La miscela è lasciata a temperatura ambiente per 18 ore. L'andamento della reazione è monitorato con TLC di gel di silice su alluminio usando come eluente 14, usando poi un bagno di permanganato per rilevare la lastrina. Al termine della reazione la miscela viene diluita con CH₂Cl₂ e lavata una volta con H₂O acida da HCl, una volta con una soluzione satura di NaCl e una volta con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene quindi anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente evaporato sotto bassa pressione. Il prodotto finale è ottenuto senza ulteriori purificazioni.

Olio incolore.

Resa: 93%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.43 (s, 9H, *t*-But); 3.02 (s, 3H, CH₃S); 3.44-3.46 (m, 2H, CH₂NH); 4.26 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂O); 4.93 (bs, 1H, NH) ppm.

5.2.32. Etil 1-{4-[(2-terbutossicarbonil-ammino)etossi]-benzil}-1,4-diidro-4-ossochinolin 3-carbossilato (MVM74) (43)



I composti **42** (333 mg, 1.3 mmol), **40** (360 mg, 1.1 mmol) e K_2CO_3 (773 mg, 5.6 mmol), in polvere fine, sono solubilizzati in 5 mL di DMF anidra e lasciati sotto agitazione a 50°C per 24 ore e poi a temperatura ambiente per altre 24^[152]. La reazione è monitorata tramite TLC di gel di silice su alluminio usando come eluente 15. Il solvente di reazione viene evaporato e il residuo ripreso con

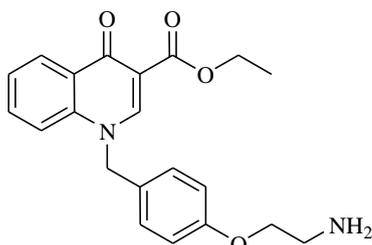
H_2O ed estratto con Act (10 mL x 3 v.); la fase organica è anidrificata su Na_2SO_4 e il solvente viene nuovamente allontanato sotto vuoto.

Olio marrone.

Resa: 95%.

[¹H]-NMR CD_3OD δ : 1.39 (s, 9H, tBut); 1.41 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3CH_2O); 3.41-3.50 (m, 2H, CH_2NH); 3.96 (t, $J=5.2$ Hz, 2H, CH_2O); 4.39 (q, $J=6$ Hz, 2H, CH_3CH_2O); 5.31 (s, 2H, CH_2Ar); 6.85 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-2' + H-6'); 7.01 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H-3' + H-5'); 7.31-7.40 (m, 2H, H-7 + H-9); 7.53 (t, $J=6.8$ Hz, 1H, H-8); 8.52 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-5); 8.58 (s, 1H, H-2) ppm.

5.2.33. Etil 1-[4-(2-ammino-etossi)-benzil]-1,4-diidro-4-ossochinolin 3-carbossilato (MVM76) (44)



A **43** (456.6 mg, 1 mmol) sciolto in 5 mL di CH_2Cl_2 anidro, sono aggiunti 1.5 mL di acido trifluoroacetico (20 mmol) e poi si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo 1 ora e 30 minuti la miscela è diluita con ulteriore CH_2Cl_2 e lavata con una soluzione satura di $NaHCO_3$ (10 mL x 2 volte); la fase organica è anidrificata su Na_2SO_4 e il solvente eliminato sotto

vuoto. Il composto desiderato è ottenuto in seguito a purificazione cromatografica flash usando l'eluente 6.

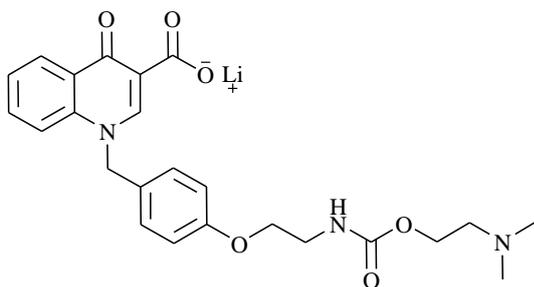
Olio giallo.

Resa: 69%.

[¹H]-NMR CD_3OD δ : 1.34 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3CH_2O); 2.94 (t, $J=5.2$ Hz, 2H, CH_2NH); 3.94 (t, $J=5.2$ Hz, 2H, CH_3CH_2O); 4.30 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_3CH_2O); 5.49 (s, 2H, CH_2Ar); 6.90 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-2' + H-6'); 7.16 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H-3' + H-5'); 7.36-7.43 (m, 1H, H-7); 7.60-7.63 (m, 2H, H-6 + H-8); 8.36 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-5); 8.81 (s, 1H, H-2) ppm.

[¹³C]-NMR CD_3OD δ : 13.33 (CH_3CH_2O); 40.49 (CH_2NH_2); 56.26 (CH_2Ar); 60.27 (CH_2CH_2O); 68.93 (CH_2OCO); 109.81 (C-1'); 114.83 (C-2' + C-6'); 117.52 (C-6); 125.15 (C-7); 126.49 (C-5); 127.04 (C-9); 127.88 (C-3' + C-5'); 128.38 (C-4'); 132.72 (C-8); 139.30 (C-10); 149.93 (C-2); 159.00 (C-3); 164.80 (C-4=O); 175.32 (CO) ppm.

5.2.34. Litio 1-{4-[2-(2-dimetilammino)-etossicarbonil-ammino]-benzil}-1,4-diidro-4-ossocinolin 3-carbossilato (MVM79) (45)



Il prodotto **38** (65 mg, 0.14 mmol) è solubilizzato in 2 mL di MeOH ai quali vengono aggiunti 6.5 mg di LiOH (0.28 mmol) e la miscela è posta sotto agitazione a riflusso per 2 ore. Trascorso questo tempo il solvente viene allontanato sotto vuoto e il residuo triturato in etere dietilico e filtrato. Il solido che se ne ottiene costituisce il prodotto desiderato.

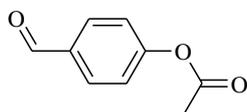
Solido bianco.

Resa: 67%.

[¹H]-NMR CD₃OD δ: 2.23 (s, 6H, CH₃N); 2.54 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NMe₂); 3.43 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂NH); 3.95 (t, J= 5.2 Hz, 2H, CH₂OAr); 4.12 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂OCO); 5.50 (s, 2H, CH₂Ar); 6.87 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-2' + H-6'); 7.17 (d, J= 8.4 Hz, 2H, H-3' + H-5'); 7.41 (m, 1H, H-6); 7.62-7.66 (m, 2H, H-7 + H-8); 8.45 (d, J= 8.0 Hz, 1H, H-5); 8.96 (s, 1H, H-2) ppm.

[¹³C]-NMR CD₃OD δ: 40.0 (CH₂NH); 44.3 (CH₃); 56.3 (CH₂Ar); 57.5 (CH₂NMe₂); 61.8 (CH₂OCO); 62.5 (CH₂OAr); 114.2 (C-2' + C-6'); 115.1 (C-1'); 117.2 (C-8); 124.5 (C-6); 126.6 (C-5); 127.5 (C-9); 128.1 (C-3' e C-5'); 128.8 (C-4'); 132.4 (C-7); 139.4 (C-10); 150.3 (C-2); 156.7 (OCONH); 158.8 (C-3); 170.5 (C-4=O), 177.8 (CO) ppm.

5.2.35. 4-formil-fenilacetato (MVM54) (46)



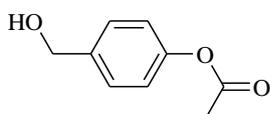
La 4-idrossibenzaldeide (300 mg, 2.4 mmol) è solubilizzata in 10 mL di CH₂Cl₂ anidro, la soluzione è portata a 0° C, viene aggiunta Et₃N anidra (0.34 mL, 2.4 mmol) e acetilcloruro (0.19 mL, 2.6 mmol). La miscela di reazione è poi lasciata a temperatura ambiente per 4 ore. La reazione è monitorata con TLC di gel di silice su alluminio usando l'eluente 12. Il solvente viene quindi allontanato tramite bassa pressione e il residuo ripreso con CH₂Cl₂ e lavato con NaHCO₃ soluzione satura (10 mL x 2 volte). La fase organica è anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente è nuovamente eliminato sotto vuoto.

Olio giallo.

Resa: 97%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 2.33 (s, 3H, CH₃); 7.26 (d, J= 8.4 Hz, 2H, H-3 + H-5); 7.91 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-2 + H-6); 9.98 (s, 1H, CHO) ppm.

5.2.36. 4-(idrossimetil)fenilacetato (MVM55) (47)



L'aldeide **46** (470.8 mg, 2.8 mmol) è solubilizzata in 15 mL di THF anidro a 0°C, dopo aver aggiunto lentamente NaBH₄ (324 mg, 8.6 mmol), la miscela è lasciata a questa temperatura per 2 ore e 30 minuti, monitorandola con TLC di gel di silice su alluminio usando come eluente 12. La reazione è interrotta per aggiunta di 2-3 chicchi

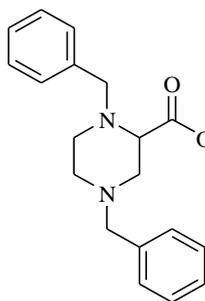
di ghiaccio, la fase acquosa è poi estratta con CH_2Cl_2 (15 mL x 3 volte). La fase organica ottenuta è anidrificata su Na_2SO_4 e il solvente eliminato sotto vuoto.

Olio giallo.

Resa: 70%.

[^1H]-NMR CDCl_3 δ : 2.29 (s, 3H, CH_3); 4.67 (s, 2H, CH_2OH); 7.06 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, H-3 + H-5); 7.37 (d, $J=5.2$ Hz, 2H, H-2 + H-6) ppm.

5.2.37. Etil 1,4-dibenzilpiperazina-2-carbossilato (DM123) (48)



L' etil 2,3-dibromopropionato (6.25 mmol, 0.91 mL) è solubilizzato in 20 mL di toluene anidro, poi la soluzione è portata a 40°C e si aggiungono Et_3N anidra (11.25 mmol, 1.57 mL) e $\text{N,N}'$ -dibenziletildiammina (6.25 mmol, 1.47 mL). La sospensione bianca che si forma è lasciata sotto agitazione a questa temperatura per 3 ore, dopo viene ulteriormente scaldata a 80°C per un'ora. Al termine della reazione il solvente viene allontanato sotto vuoto e il residuo viene ripartito tra Et_2O e HCl 2N. Poi la fase acquosa viene basificata con NaOH al 10% ed estratta con CH_2Cl_2

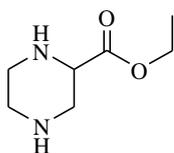
(10 mL x 3 volte). Questa seconda fase organica è anidrificata su Na_2SO_4 e portata a secco.

Olio giallo-arancio.

Resa: 98%.

[^1H]-NMR CDCl_3 (*miscela di conformeri, spettro non risolto*) δ : 1.24 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, CH_3); 2.39-2.49 (m, 3H); 2.61-2.64 (m, 1H); 2.73-2.78 (m, 1H); 3.02-3.11 (m, 1H); 3.16-3.30 (m, 1H); 3.43 (d, 1H, $J=13.2$ Hz); 3.56 (d, $J=13.2$ Hz, 1H); 3.61 (bs, 1H); 3.91 (d, $J=13.2$ Hz, 1H); 4.16 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{O}_\text{B}$); 4.17 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{O}_\text{A}$); 7.22-7.32 (m, 10H, Ar) ppm.

5.2.38. Etil-piperazina-2-carbossilato (VS4) (49)



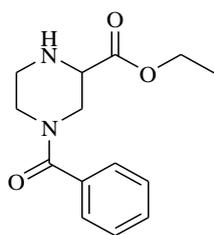
Ad una soluzione di **48** (1.59 g, 4.70 mmol) in 20 mL di EtOH assoluto, sono aggiunti 0.80 g di Pd/C al 10%. La miscela viene lasciata sotto H_2 a 70 psi per 15 ore nel reattore PARR. La reazione viene controllata tramite TLC (eluente 17) e si lavora filtrando su celite. Portando a secco le acque madri si ottiene il composto desiderato pulito.

Solido giallo basso fondente, p.f. 34°C .

Resa: 92%.

[^1H]-NMR CDCl_3 δ : 1.27 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3); 2.72-2.78 (m, 2H); 2.85-2.90 (m, 2H); 2.96-3.01 (m, 1H); 3.19 (dd, $J=12.4$ Hz, 3.6 Hz, 1H); 3.44 (dd, $J=8$ Hz, 3.2 Hz, 1H, H-2); 4.18 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2O) ppm.

5.2.39. Etil 4-benzoilpiperazina-2-carbossilato (VS5) (50a)



L'intermedio **49** (0.214 g, 1.36 mmol), viene solubilizzato sotto N_2 , con 4 mL di CH_2Cl_2 anidro e addizionato di Et_3N (0.23 mL, 1.63 mmol). La soluzione viene raffreddata a $0^\circ C$ poi è addizionato lentamente del benzoil cloruro (0.13 mL, 1.08 mmol) solubilizzato in 8 mL di CH_2Cl_2 (0.1 eq ogni 20 minuti). Ad ogni aggiunta la reazione viene controllata tramite TLC (Eluente 3). Dopo l'aggiunta di 0.7 equivalenti di benzoil cloruro, la TLC rivela la formazione di un altro prodotto, probabilmente il derivato di doppia addizione e quindi l'aggiunta del reattivo viene interrotta. La miscela viene lavorata con una soluzione satura di $NaHCO_3$ ed estratta con CH_2Cl_2 . La fase organica viene quindi anidrificata con Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Il residuo ottenuto viene purificato con cromatografia flash su colonna usando l'eluente 2.

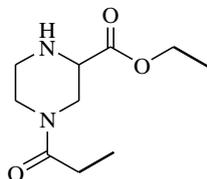
Olio giallo.

Resa: 67%.

$[^1H]$ -NMR $CDCl_3$ δ : 1.18 (bs, 3H, CH_3); 2.16-2.35 (m, 1H); 2.72-2.86 (m, 1H); 3.08-3.15 (m, 1H); 3.27-3.66 (m, 3H); 3.72-3.88 (m, 1H); 3.90-4.15 (m, 2H, CH_2O); 7.00-7.45 (m, 5H, Ar) ppm.

$[^{13}C]$ -NMR (CPD) $CDCl_3$ δ : 13.99 (CH_3); 44.20 (CH_2); 47.99 (CH_2); 49.42 (CH_2); 56.69 (CH); 61.16 (CH_2O); 126.94 (CH); 128.34 (CH); 129.68 (CH); 135.42 (C); 170.45 (CO); 170.68 (CO) ppm.

5.2.40. Etil 4-propionilpiperazina-2-carbossilato (VS7) (50b)



Ad una soluzione di **49** (0.10 g, 0.63 mmol) in 4 mL di CH_2Cl_2 anidro, sotto N_2 , viene aggiunta Et_3N (0.10 mL, 0.76 mmol). La miscela di reazione viene portata a $0^\circ C$ e si aggiunge a piccole porzioni il propionil cloruro (0.04 mL, 0.44 mmol) solubilizzato in 7 mL di CH_2Cl_2 anidro (0.1 eq ogni 30 minuti). La reazione viene controllata ad ogni aggiunta tramite TLC (eluente 17). Dopo l'aggiunta di 0.7 equivalenti si nota anche la formazione del prodotto diacilato. Si lavora la reazione lavando due volte con una soluzione satura di $NaHCO_3$, quindi la fase organica viene anidrificata su Na_2SO_4 anidro, filtrata e portata a secco. Il residuo ottenuto viene purificato con cromatografia flash su colonna con eluente 17.

Olio giallo.

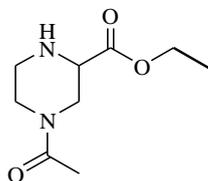
Resa: 44%.

$[^1H]$ -NMR $CDCl_3$ (miscela di conformeri, $A:B=1:1$) δ : 1.13 (t, $J=7.2$ Hz, 6H, CH_3CH_2CO); 1.24 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_{3A}); 1.28 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_{3B}); 2.12 (s, 2H, NH); 2.32 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, $COCH_{2A}$); 2.39 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, $COCH_{2B}$); 2.71-2.77 (m, 2H, $H-3_A + H-6_A$); 2.92-2.97 (m, 1H, $H-6_B$); 3.05-3.10 (m, 2H, $H-6_A + H-6_B$); 3.17-3.22 (m, 1H, $H-5_A$); 3.38-3.45 (m, 3H, $H-2_{A+B} + H-3_B$); 3.55-3.60 (m, 2H, $H-5_{A+B}$); 3.73-3.77 (m, 2H, $H-3_B + H-5_B$); 4.15-4.23 (m, 4H, CH_2O_{A+B}); 4.48 (dd, 1H, $J=2.8$ Hz, $J=13.2$ Hz, $H-3_A$) ppm.

$[^{13}C]$ -NMR (CPD) $CDCl_3$ (miscela di conformeri) δ : 9.31 ($CH_3CH_2CO_B$); 9.44 ($CH_3CH_2CO_A$); 14.20 (CH_2CH_{3A+B}); 26.19 ($COCH_{2B}$); 26.55 ($COCH_{2A}$); 41.73 (C-3_B);

43.73 (C-3_A); 43.78 (C-6_B); 44.70 (C-6_A); 45.86 (C-5_A); 47.01 (C-5_B); 56.80 (C-2_A); 57.02 (C-2_B); 61.25 (CH₂O_A); 61.49 (CH₂O_B); 170.97 (CO); 172.50 (CO) ppm.

5.2.41. Etil 4-acetilpiperazina-2-carbossilato (VS13) (50c)



Ad una soluzione di **49** (0.34 g, 2.15 mmol) e Et₃N (0.36 mL, 2.58 mmol) in 10 mL di CH₂Cl₂ anidro, sotto N₂, a 0°C viene aggiunto a piccole porzioni l'acetil cloruro (0.09 mL, 1.29 mmol) solubilizzato in 12 mL di CH₂Cl₂ anidro (0.1 eq ogni 30 minuti). La reazione viene controllata ad ogni aggiunta tramite TLC (eluente 3). La reazione viene fermata dopo l'aggiunta di 0.6 equivalenti a causa della formazione del prodotto diacilato e lavorata lavando due volte con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, portata a secco e il residuo purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 11.

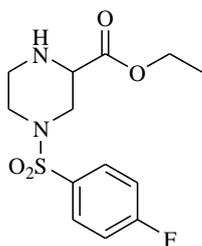
Olio giallo.

Resa: 49%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (miscela di conformeri, A:B circa 1:1) δ: 1.14 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH_{3A}); 1.17 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH_{3B}); 1.96 (s, 3H, CH₃CO_A); 2.00 (s, 3H, CH₃CO_B); 2.25 (bs, 2H, NH_{A+B}); 2.62-2.68 (m, 2H, H-3_A + H-6_A); 2.79-2.84 (m, 1H, H-6_B); 2.90-2.99 (m, 2H, H-6_A + H-6_B); 3.07-3.13 (m, 1H, H-5_A); 3.28 (dd, J = 3.6 Hz, 9.2 Hz, 1H, H-2_A); 3.31-3.39 (m, 2H, H-2_B + H-5_B); 3.45-3.63 (m, 4H, 2H-3_B + H-5_A + H-5_B); 4.06 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH_{3A}); 4.12 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH_{3B}); 4.34 (dd, J = 13.3 Hz, J = 2.8 Hz, 1H, H-3_A) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (miscela di conformeri) δ: 14.14 (CH₂CH_{3A+B}); 21.14 (COCH_{3B}); 21.33 (COCH_{3A}); 41.48 (C-3_B); 43.49 (C-3_A+C-3_B); 44.53 (C-6_A); 46.64 (C-5_A); 47.74 (C-5_B); 56.61 (C-2_A); 56.80 (C-2_B); 61.20 (CH₂O_A); 61.44 (CH₂O_B); 169.19 (CO); 170.92 (CO) ppm.

5.2.42. Etil 4-(4-fluorofenilsolfonil)piperazina-2-carbossilato (LA1) (50d)



Ad una soluzione dell'intermedio **49** (0.209 g, 1.32 mmol), sotto N₂, in 15 mL di CH₂Cl₂ anidro, si aggiunge Et₃N (0.18 mL, 1.32 mmol). La soluzione viene raffreddata a 0°C e addizionata lentamente e a piccole porzioni del 4-fluorofenilsolfonil cloruro (0.206 g, 1.06 mmol) solubilizzato in 8 mL di CH₂Cl₂ (0.1 eq ogni 20 minuti). La reazione viene controllata ad ogni aggiunta tramite TLC (Eluente 3). Dopo l'aggiunta di 0.5 equivalenti di 4-fluorofenilsolfonil cloruro la TLC rivela la formazione di un altro prodotto, probabilmente il composto di doppia addizione; quindi l'aggiunta del reattivo viene interrotta. La miscela di reazione viene lavata con una soluzione satura di NaHCO₃ e la fase organica nuovamente estratta con CH₂Cl₂. Le fasi organiche vengono riunite e anidificate su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Il residuo ottenuto viene purificato con cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 14.

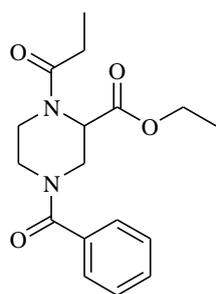
Olio giallo/arancione.

Resa: 52%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.24 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃); 2.19 (s, 1H, NH); 2.52-2.60 (m, 1H, H-5_{ax}); 2.67 (dd, J= 10.8, 8.8 Hz, 1H, H-3_{ax}); 2.81-2.87 (m, 1H, H-6_{ax}); 3.03-3.08 (dt, J= 12.0, 4.0 Hz, 1H, H-6_{eq}); 3.27-3.33 (m, 1H, H-5_{eq}); 3.52 (dd, J= 8.4, 3.2 Hz, 1H, H-2); 3.62 (dd, J= 11.2, 2.4 Hz, 1H, H-3_{eq}); 4.07 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂O); 7.11 (t, J= 8.4 Hz, 2H, H-3' + H-5'); 7.67 (dd, J= 8.6, 5.0 Hz, 2H, H-2' + H-6')

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 14.04 (CH₃); 44.63 (C-6); 45.28 (C-5); 47.40 (C-3); 56.34 (C-2); 60.78 (CH₂O); 116.35 (d, J_{C-F} = 23.0 Hz, C-3' + C-5'); 130.37 (d, J_{C-F} = 10.0 Hz, C-2' + C-6'); 131.12 (C-1'); 165.24 (d, J_{C-F} = 254.0 Hz, C-4')

5.2.43. Etil 4-benzoil-1-propionilpiperazina-2-carbossilato (LA3) (51a)



Ad una soluzione di **50a** (0.386 g, 1.47 mmol) e Et₃N (0.25 mL, 1.77 mmol) in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro, sotto N₂, viene aggiunto a piccole porzioni il propionil cloruro (0.13 mL, 1.47 mmol) solubilizzato in 1 mL di CH₂Cl₂ anidro (0.05 mL ogni minuto). La soluzione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore. Quindi la miscela viene ripartita tra CH₂Cl₂ e una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e il residuo purificato tramite cromatografia flash su colonna usando l'eluente 19. Si ottengono 0.127 g di

prodotto purificato.

Olio incolore.

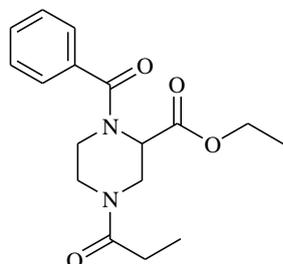
Resa: 27%

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 0.90-1.40 (m, 6H, CH₃); 2.09-2.42 (m, 2H, COCH₂); 2.82-3.06 (m, 2H); 3.07-3.30 (m, 2H); 3.41-3.55 (m, 2H); 3.58-3.63 (m, 2H); 3.86-4.61 (m, 4H, CH₂O+CH₂N); 5.08 (bs, 1H, H-2); 7.25-7.38 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 9.09 (COCH₂CH₃); 13.92 (OCH₂CH₃); 26.18 (CH₂); 26.50 (CH₂CO); 38.81 (CH₂); 52.04 (CH); 61.64 (CH₂O); 126.70 (CH); 126.99 (CH); 128.67 (CH); 130.22 (CH); 134.74 (C); 135.02 (C); 168.96 (CO); 171.42 (CO); 172.72 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₇H₂₂N₂O₄) 319.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.44. Etil 1-benzoil-4-propionilpiperazina-2-carbossilato (VS9) (51b)



Ad una soluzione di **50b** (0.16 g, 0.73 mmol) e Et₃N (0.12 mL, 0.88 mmol) in 4 mL di CH₂Cl₂ anidro, sotto N₂, viene aggiunto a piccole porzioni il benzoil cloruro (0.085 mL, 0.73 mmol) solubilizzato in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro (0.05 mL ogni minuto). La reazione viene controllata tramite TLC (eluente 15). terminate le aggiunte si lascia la soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore. Trascorso il tempo necessario la reazione viene lavorata ripartendo tra CH₂Cl₂ e una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, portata a secco e il residuo purificato tramite cromatografia flash utilizzando l'eluente 15.

Olio giallo.

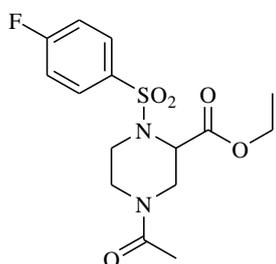
Resa: 96%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri A:B=2:1, spettro non risolto*) δ: 1.08-1.15 (m, 6H, CH₃CH₂CO_{A+B}), 1.23-1.35 (m, 6H, CH₃CH₂O_{A+B}); 2.23-2.54 (m, 4H, CH₂CO_{A+B}); 2.55-2.72 (m, 2H, 1H_A+ 1H_B); 2.80-2.96 (m, 1H, H_B); 3.00-3.39 (m, 3H, 2H_A+ 1H_B); 3.61-3.64 (m, 2H, H_A); 4.21-4.24 (m, 4H, CH₂O_{A+B}); 4.41-4.50 (m, 3H, 1H_A+ 1H_B+H-2_B); 4.61-4.70 (m, 1H, H_B); 4.92-5.18 (m, 1H, H_B); 5.42-5.49 (m, 1H, H-2_A); 7.35-7.48 (m, 10H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 9.11 (CH₃CH₂CO); 14.20 (CH₃CH₂O); 25.83, 39.62, 40.58 (CH₂N); 41.12 (CH₂CO); 42.24, 45.19, 45.63 (CH₂N); 52.54 (CH); 58.32 (CH); 62.17 (CH₂O); 126.70, 126.99, 128.67, 130.22 (CH); 134.74, 135.02 (C); 168.96, 171.42, 172.72 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₇H₂₂N₂O₄) 319.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.45. Etil 4-acetil-1-(4-fluorofenilsulfonyl)piperazina-2-carbossilato (VS14) (51c)



Ad una soluzione di **50c** (0.21 g, 1.06 mmol) e Et₃N (0.18 mL, 1.28 mmol) in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro, sotto N₂, si aggiunge a piccole porzioni il 4-fluorobenzensulfonyl cloruro (0.21 g, 1.06 mmol) solubilizzato in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro (1 gg ogni minuto). terminate le aggiunte si lascia la soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo 12 ore, la miscela viene ripartita tra CH₂Cl₂ e una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata,

portata a secco e il residuo purificato tramite cromatografia flash utilizzando l'eluente 17.

Olio giallo.

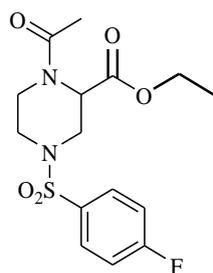
Resa: 94%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, A:B= 2:3*) δ: 1.12 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH_{3B}); 1.15 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH_{3A}); 2.01 (s, 3H, COCH_{3A}); 2.06 (s, 3H, COCH_{3B}); 2.68 (td, J=13.1 Hz, 3.6 Hz, 1H, H-5_B); 2.96 (dd, J= 12.8 Hz, 4 Hz, 1H, H-3_A); 3.11 (td, J= 12.4 Hz, 12.4 Hz, 3.2 Hz, 1H, H-6_B); 3.28 (td, J= 12.8 Hz, 12.8 Hz, 3.6 Hz, 1H, H-6_A); 3.38 (dd, J= 13.6 Hz, 4 Hz, 1H, H-3_B); 3.51 (td, J= 12.0 Hz, 12.0 Hz, 3.2 Hz, 1H, H-5_A); 3.70-3.79 (m, 3H, H-6_A+ H-6_B+ H-5_A); 3.92-3.98 (m, 3H, OCH_{2A}+ OCHH_B); 4.04-4.12 (m, 1H, OCHH_B); 4.35 (d, J= 13.2 Hz, 1H, H-3_B); 4.55-4.63 (m, 2H, H-2_A+ H-5_B); 4.72 (s, 1H, H-2_B); 4.99 (d, J= 13.6 Hz, 1H, H-3_A); 7.14-7.19 (m, 4H, H-3'_{A+B}+ H-5'_{A+B}); 7.83-7.75 (m, 4H, H-2'_{A+B}+ H-6'_{A+B}) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 13.93 (OCOCH₃); 20.95 (COCH_{3B}); 20.80 (COCH_{3A}); 40.66 (C-5_B); 41.87 (C-5_A); 42.02 (C-6_B); 43.57 (C-3_A); 45.72 (C-6_A); 48.08 (C-3_B); 54.58 (C-2_A); 55.47 (C-2_B); 61.64 (CH₂O_A); 62.05 (CH₂O_B); 116.19 (d, J_{C-F} = 22 Hz, ppm, C-3'_{A+B}+ C-5'_{A+B}); 129.98 (d, J_{C-F} = 10 Hz, C-2'_{A+B}+ C-6'_{A+B}); 134.89 (C-1'_A); 135.63 (C-1'_B); 165.12 (d, J_{C-F} = 253 Hz, C-4'_{A+B}); 168.45 (CO_B); 168.65 (CO_A); 168.98 (CO_A); 169.12 (CO_A) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₅H₁₉FN₂O₅S) 359.0 [M+H]⁺ m/z.

5.2.46. Etil 1-acetil-4-(4-fluorofenilsolfonil)piperazina-2-carbossilato (LA2) (51d)



Ad una soluzione di **50d** (0.169 g, 0.54 mmol) e Et₃N (0.09 mL, 0.64 mmol) in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro, sotto N₂, viene aggiunto a piccole porzioni l'acetil cloruro (0.04 mL, 0.54 mmol) solubilizzato in 1 mL di CH₂Cl₂ anidro (0.05 mL ogni minuto). Dopo 12 ore a temperatura ambiente, la miscela viene lavorata ripartendola tra CH₂Cl₂ e una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e il residuo purificato tramite cromatografia flash su colonna usando l'eluente 21.

Olio incolore.

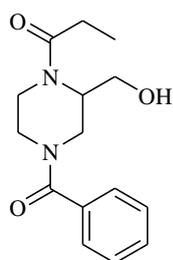
Resa: 54%

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, A:B=1:1*) δ: 1.27 (t, J=7.2 Hz, 6H, CH₃); 1.99 (s, 3H, CH_{3A}); 2.08 (s, 3H, CH_{3B}); 2.00-2.27 (m, 1H, CHHN_B); 2.32 (td, J= 11.2 Hz, 3.6 Hz, 1H, CHHN_A); 2.41 (dd, J= 12.0 Hz, 4.4 Hz, 1H, CHHN_A); 2.47 (dd, J= 12.0 Hz, 4.4 Hz, 1H, CHHN_B); 2.93-3.00 (m, 1H, CHHN_B); 3.56-3.75 (m, 4H, 3CHHN_A+1CHHN_B); 4.10-4.55 (m, 6H, CH₂O+1H-2_B+1CHHN_A); 4.40-4.50 (m, 2H, 2CHHN_B); 5.27 (s, 1H, H-2_A); 7.21 (t, J=8.4 Hz, 4H, H-3'_{A+B}+H-5'_{A+B}); 7.75 (dd, J= 8.4 Hz, 4.8 Hz, 4H, H-2'_{A+B}+H-6'_{A+B}) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 14.15 (CH₃); 21.05 (CH₃CO_B); 21.26 (CH₃CO_A); 38.39 (CH₂N); 43.11 (CH₂N); 45.36 (CH₂N); 45.50 (CH₂N); 47.05 (CH₂N); 51.30 (CH_A); 56.37 (CH_B); 62.01 (CH₂O_A); 62.50 (CH₂O_B); 116.60 (d, J_{C-F}= 23.0 Hz, C-3'+C-5'); 130.48 (d, J_{C-F}= 9.0 Hz, C-2'+C-6'); 131.52 (C-1'); 165.46 (d, J_{C-F}= 255.0 Hz, C-4'); 168.27 (CO); 170.55 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₅H₁₉FN₂O₅S) 359.0 [M+H]⁺ m/z.

5.2.47. 1-(4-benzoil-2-(idrossimetil)piperazin-1-il)propan-1-one (LA4) (52a)



Sotto atmosfera di N₂, il prodotto **51a** (0.262 g, 0.82 mmol) viene solubilizzato in una miscela di THF anidro ed EtOH assoluto (10:1). La soluzione viene raffreddata a 0°C con bagno di ghiaccio e addizionata di NaBH₄ (0.078 g, 2.06 mmol). La miscela viene refflussata (66°C) per 3 ore e infine lasciata a temperatura ambiente per 15 ore. L'eccesso di NaBH₄ viene spento con ghiaccio e dopo aver evaporato sotto vuoto, il residuo ripartito tra H₂O e CH₂Cl₂. La fase organica viene poi anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash utilizzando come eluente EtOAc. Si ottengono 0.120 g di prodotto purificato.

Olio incolore.

Resa: 53%.

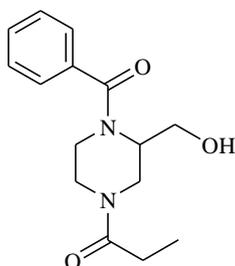
[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, spettro non risolto*) δ: 1.01-1.20 (m, 3H, CH₃); 2.22-2.48 (m, 2H, CH₂CO); 2.62-2.80 (m, 1H); 2.91-3.30 (m, 2H); 3.30-3.92 (m, 4H, CH₂OH + 2CH₂N); 4.01-4.12 (m, 1H, H-2); 4.26-4.87 (m, 1H); 7.40 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 9.27 (CH_{3A}); 9.46 (CH_{3B}); 26.29 (CH₂CO_A); 26.84 (CH₂CO_B); 37.56 (CH₂); 42.51 (CH₂); 47.79 (CH₂); 54.39 (C-2);

58.75 (CH₂O_A); 59.71 (CH₂O_B); 127.22 (CH); 128.70 (CH); 130.31 (CH); 134.24 (C); 134.71 (C); 171.72 (CO); 173.78 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₅H₂₀N₂O₃) 277.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.48. 1-(4-benzoil-3-(idrossimetil)piperazin-1-il)propan-1-one (VS12) (52b)



Sotto atmosfera di N₂, **51b** (0.04 g, 0.13 mmol) viene solubilizzato in una miscela di THF anidro ed EtOH assoluto (10:1). La soluzione viene portata a 0°C e si addiziona NaBH₄ (0.12 g, 0.31 mmol). Terminata l'aggiunta, si lascia agire per 15' il riducente. La miscela viene successivamente portata a temperatura ambiente e mantenuta per circa 48 ore sotto agitazione. La reazione viene controllata tramite TLC (eluente 17). Per favorire la reazione, che ancora non è andata a completamento, si scalda a 60°C per circa 30 minuti. L'eccesso di NaBH₄ viene spento con ghiaccio e dopo aver evaporato sotto vuoto, il residuo ripartito tra H₂O e CH₂Cl₂. La fase organica viene poi anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash con l'eluente 12.

Olio giallo.

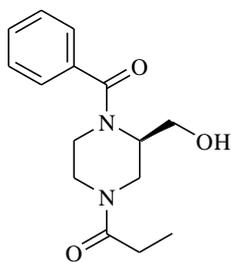
Resa: 78%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (miscela di conformeri, spettro poco risolto) δ: 1.07-1.14 (m, 3H, CH₃); 2.35 (bs, 2H, CH₂CO); 2.67 (t, J = 12.4 Hz, 1H); 2.70-3.21 (m, 3H); 3.35-4.12 (m, 4H); 4.38-4.72 (m, 2H); 7.37-7.39 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (miscela di conformeri) δ: 9.24 (CH₃); 9.46 (CH₃); 26.07 (CH₂N); 26.33, (CH₂N); 38.11 (CH₂N); 41.47 (CH₂N); 44.13 (CH₂N); 45.51 (CH₂N); 51.20 (CH₂N); 58.53 (C-2) 126.90, 128.67, 130.01(CH); 135.36 (C); 171.70, 173.42 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₅H₂₀N₂O₃) 277.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.49. (R)-1-(4-benzoil-3-(idrossimetil)piperazin-1-il)propan-1-one (MVM89) (R-52b)



Si solubilizza l'intermedio **R-64** (0.030 g, 0.14 mmol), sotto N₂, in 3 mL di CH₂Cl₂ anidro e si aggiunge Et₃N (0.02 mL, 0.14 mmol). La soluzione viene portata a 0°C e addizionata lentamente e a piccole porzioni del propionil cloruro (0.01 mL, 0.11 mmol) solubilizzato in 8 mL di CH₂Cl₂ (0.1 eq ogni 20 minuti). Dopo l'aggiunta di 0.8 equivalenti di propionil cloruro, la miscela viene portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per 2 ore. La miscela di reazione viene lavata con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e il grezzo purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 16. Si ottengono 0.022 g del prodotto desiderato.

Olio giallo.

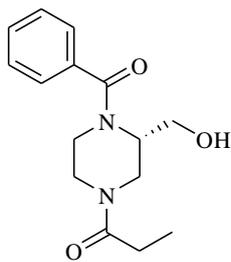
Resa: 58%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, spettro poco risolto*) δ: 1.07-1.14 (m, 3H, CH_{3A+B}); 2.35 (bs, 2,5H); 2.63-3.21 (m, 2,5H); 3.55-4.12 (m, 5H); 4.38-4.67 (m, 2H, 0.5H-2+1,5CHHN); 7.37-7.39 (m, 5H, Ar_{A+B}) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 9.46 (CH_{3A}); 9.25 (CH_{3B}); 58.62 (CH_{2N}); 45.54 (CH_{2N}); 44.34 (CH_{2N}); 41.45 (CH_{2N}); 26.34 (CH_{2N}); 26.09 (CH_{2N}); 130.04 (CH); 128.69 (CH); 126.90 (CH); 135.35 (C); 173.42, 171.77 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₅H₂₀N₂O₃) 277.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.50. (S)-1-(4-benzoil-3-(idrossimetil)piperazin-1-il)propan-1-one (MVM107) (S-52b)

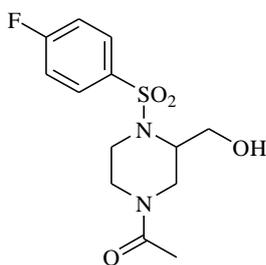


Per ottenere il prodotto **S-52b** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del prodotto **R-52b**. A partire da 0.119 g (0.54 mmol) dell'intermedio **S-64** si ottengono 0.105 g del prodotto desiderato. Gli spettri [¹H]- e [¹³C]-NMR e di massa sono identici a quelli di **R-52b**.

Olio giallo.

Resa: 71%.

5.2.51. 1-(4-(-fluorofenilsulfonil)-3-(idrossimetil)piperazin-1-)etanone (VS15) (52c)



Si solubilizza, sotto N₂, **51c** (0.26 g, 0.72 mmol) in una miscela di THF anidro ed EtOH assoluto (10:1); la soluzione viene portata a 0°C e si aggiunge NaBH₄ (0.27 g, 7.20 mmol), dopo 15' la miscela viene fatta risalire a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per circa 24 ore, poi scaldata a 60°C per 30 minuti. Una volta constatato il completamento della reazione, il solvente viene allontanato sotto vuoto. Successivamente si tratta con ghiaccio per distruggere il NaBH₄ in eccesso e si ripartisce il residuo tra H₂O e CH₂Cl₂. La fase organica viene quindi anidrificata su Na₂SO₄ anidro e portata a secco. Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash con l'eluente 17.

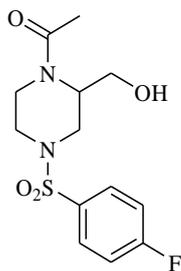
Olio giallo.

Resa: 62%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri A:B=1:1*) δ: 2.03 (s, 6H, CH_{3A+B}); 2.56 (dt, J= 13.0 Hz, 3.6 Hz, 1H, H-3_A); 2.71 (dd, J= 14 Hz, J= 3.6 Hz, 1H, H-2_B); 3.02-3.17 (m, 4H, H-6_A + H-6_B + H-5_A + H-5_B); 3.44 (d, J= 7.2 Hz, 2H, CHHO_{A+B}); 3.59 (d, J= 7.2 Hz, 2H, CHHO_{A+B}); 3.59-3.79 (m, 3H, H-6_A + H-6_B + H-5_B); 3.96-4.03 (m, 3H, H-3_A + H-3_B + H-5_A); 4.34 (d, J= 13.2 Hz, 1H, H-2_A); 4.48 (d, J= 14 Hz, 1H, H-2_B); 7.15-7.19 (m, 4H); 7.81-7.82 (m, 4H) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 21.06, 20.95 (CH_{3A} + CH_{3B}); 40.55 (C-2_A); 41.13 (C-6_B); 41.34 (C-6_A + C-2_B); 44.97 (C-5_A); 46.05 (C-5_B); 54.03, 54.26 (C-3_A + C-3_B); 58.40, 58.46 (CH₂OH_A + CH₂OH_B); 116.69 (d, J_{C-F} = 23 Hz, ppm, C-3'_{A+B} + C-5'_{A+B}); 129.75 (d, J_{C-F} = 9 Hz, C-2'_{A+B} + C-6'_{A+B}); 136.29 (C-1'_{A+B}); 165.21 (d, J_{C-F} = 254 Hz, C-4'_{A+B}); 170.20 (CO); 170.61 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₃H₁₇N₂SO₄F) 317.0 [M+H]⁺ m/z.

5.2.52. 1-(4-(4-fluorofenilsolfonil)-2-(idrossimetil)piperazin-1-il)etanone (VS10) (52d)


Sotto atmosfera di N₂, **51d** (0.075 g, 0.21 mmol) viene solubilizzato in una miscela di THF anidro ed EtOH assoluto (10:1). La soluzione viene raffreddata a 0°C e addizionata di NaBH₄ (0.020 g, 0.52 mmol). Dopo 15 minuti a temperatura ambiente, la miscela viene scaldata a refluxo (66°C) per 3 ore. La reazione viene lavorata evaporando sotto vuoto la miscela di solventi. Successivamente si spegne con ghiaccio l'eccesso di NaBH₄ e si ripartisce il residuo tra H₂O e CH₂Cl₂. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, e evaporata sotto vuoto. Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash con l'eluente 9 ottenendo 0.009g di prodotto.

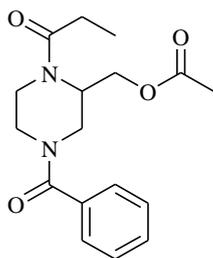
Olio incolore.

Resa: 13%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, A:B=1:1*) δ: 2.03 (s, 3H, CH_{3A}); 2.08 (s, 3H, CH_{3B}); 2.18-2.24 (dt, J= 11.8 Hz, 4.8 Hz, 1H, H-3_A); 2.28-2.43 (m, 6H); 2.87-3.03 (m, 3H, CHHN, OH); 3.46 (t, J = 11.2 Hz, 1H, CHHN); 3.61-4.01 (m, 7H, CH₂OH_{A+B} + H-2_B + CH₂N_{A+B}); 4.49 (d, J = 14.0 Hz, 1H); 4.73 (bs, 1H, H-2_A); 7.20-7.24 (m, 4H, H-3'_{A+B}+ H-5'_{A+B}); 7.72-7.74 (m, 4H, H-2'_{A+B}+H-6'_{A+B}) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 21.42 (CH_{3A}); 21.61 (CH_{3B}); 36.28 (CH₂N); 42.02 (CH₂N); 45.45 (CH₂N); 45.74 (CH₂N); 45.97 (CH₂N); 49.39 (C-2_A); 54.77 (C-2_B); 59.31 (CH₂O_A); 59.43 (CH₂O_B); 116.63 (d, J= 22.0 Hz, 2H, C-3'_{A+B}+C-5'_{A+B}); 130.39 (d, J= 9.0 Hz, 2H, C-2'_{A+B}+C-6'_{A+B}); 131.26 (C-1'_A); 131.37 (C-1'_B); 165.44 (d, J= 255.0 Hz, (C-4'_{A+B})); 170.46, 170.60 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₃H₁₇N₂SO₄F) 317.0 [M+H]⁺ m/z.

5.2.53. (4-benzoil-1-propionilpiperazin-2-il)metil acetato (LA5) (53a)


Il prodotto **52a** (0.027 g, 0.10 mmol), in ambiente inerte di N₂, viene solubilizzato in 5 mL CH₂Cl₂ anidro e addizionato di Et₃N anidra (0.02 mL, 0.12 mmol). La soluzione viene raffreddata con bagno di ghiaccio a 0°C e addizionato goccia a goccia acetil cloruro (0.01 mL, 0.12 mmol) solubilizzato in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro (0.05 mL ogni 2 minuti). Terminata l'aggiunta la soluzione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore e quindi ripartita tra CH₂Cl₂ ed una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene poi anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Il grezzo viene purificato tramite cromatografia flash utilizzando l'eluente 19.

Olio incolore.

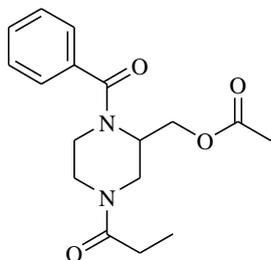
Resa:56% .

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, spettro non risolto*) δ: 1.05-1.22 (m, 3H, CH₂CH₃); 1.72-2.18 (m, 3H, CH₃CO); 2.23-2.42 (m, 2H, CH₂CO); 2.76-3.30 (m, 2H, CH₂O); 3.30-3.42 (m, 1H); 3.52-4.90 (m, 6H); 7.29-7.43 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 9.27, 9.44 (CCH₃); 20.61 (CH₃CO); 26.14, 26.80 (CH₂CO); 36.86, 41.22, 42.28 (CH₂N); 47.15 (C-2); 60.31 (CH₂O); 127.07, 128.64, 130.14 (CH); 134.92 (C); 170.56, 171.15, 173.16 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₇H₂₂N₂O₄) 319.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.54. (1-benzoil-4-propionilpiperazin-2-il)metil acetato (VS29) (53b)



Si solubilizza **52b** (0.05 g, 0.16 mmol), in ambiente inerte di N₂, in 5 mL CH₂Cl₂ anidro e si aggiunge Et₃N anidra (0.03 mL, 0.20 mmol). Si porta la soluzione a 0°C e si aggiunge goccia a goccia acetil cloruro (0.01 mL, 0.20 mmol) solubilizzato in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro (0.05 mL ogni 2 minuti). Terminata l'aggiunta si lascia la soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente per 15 ore. La reazione viene controllata tramite TLC (eluente 17) e lavorata ripartendo tra CH₂Cl₂ ed una soluzione satura di

NaHCO₃. La fase organica viene poi anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e portata a secco. Il prodotto viene purificato tramite cromatografia flash utilizzando l'eluente 12.

Olio giallo.

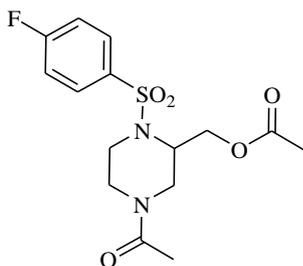
Resa: 81%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*spettro poco risolto*) δ: 1.14 (t, 3H, J=7.2 Hz, CH₂CH₃); 2.03-2.05 (m, 3H); 2.38 (bs, 2H); 3.14-4.63 (m, 9H); 7.38-7.43 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 9.32 (CH₂CH₃); 20.81 (CH₃CO); 26.42 (CH₂CO); 41.51 (CH₂); 45.25 (CH₂); 47.16 (C-2); 60.46 (CH₂O); 126.93, 128.72, 130.17 (CH); 135.28 (C); 172.89 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₇H₂₂N₂O₄) 319.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.55. (4-acetil-1-(4-fluorofenilsulfonil)piperazin-2-il)metil acetato (VS16) (53c)



Si solubilizza **52c** (0.03 g, 0.10 mmol), sotto N₂, in 5 mL CH₂Cl₂ anidro e Et₃N anidra (0.02 mL, 0.12 mmol) e, a 0°C si aggiunge acetil cloruro (0.01 mL, 0.12 mmol) solubilizzato in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro (0.05 mL ogni 2 minuti). Terminata l'aggiunta si lascia la soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente per 5 ore. Al termine della reazione si diluisce con dell'ulteriore CH₂Cl₂ e si lava con una soluzione satura di

NaHCO₃ (10 mL x 2 volte). La fase organica viene poi anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e portata a secco. Il residuo ottenuto è purificato con cromatografia flash (eluente 17).

Olio incolore.

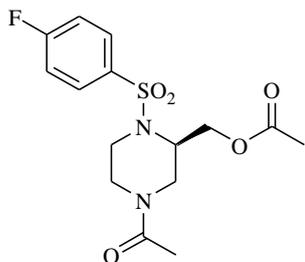
Resa: 77%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, A:B=1:1*) δ: 1.97 (s, 3H), 2.02 (s, 6H), 2.03 (s, 3H); 2.58 (dt, J= 12.8 Hz, 3.6 Hz, 1H, H-5_A); 2.72 (dd, J= 13.6 Hz, 4 Hz, 1H, H-3_B); 3.03-3.12 (m, 2H); 3.18-3.27 (m, 2H); 3.63-3.80 (m, 4H); 3.94-4.03 (m, 2H, CH₂O_A); 4.09-4.15 (m, 2H, CH₂O_B); 4.21-4.27 (m, 2H, H-2_{A+B}); 4.48-4.52 (m, 2H, H-3_B + H-5_A); 7.18-7.26 (m, 4H, H-3' + H-5'); 7.84-7.87 (m, 4H, H-2' + H-6')

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 20.71 (CH₃); 20.94 (CH₃); 21.13 (CH₃); 40.66, 40.84, 40.96, 41.06 (C-3, C-5); 45.48, 46.19 (C-6); 51.10, 51.87 (C-2); 59.81, 60.03 (CH₂O); 116.68 (d, J_{C-F} = 22 Hz, ppm, C-3'_{A+B} + C-5'_{A+B}); 129.75 (d, J_{C-F} = 9 Hz, C-2'_{A+B} + C-6'_{A+B}); 136.35, 136.57 (C-1'_A + C-1'_B); 165.23 (d, J_{C-F} = 255 Hz, C-4'_{A+B}); 169.48(CO); 170.19(CO); 170.51 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₅H₁₉FN₂O₅S) 359.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.56. (R)-(4-acetil-1-((4-fluorofenil)solfonil)piperazin-2-il)metil acetato (MVM99) (R-53c)



Ad una soluzione dell'intermedio **R-62** (0.010 g, 0.04 mmol) e Et₃N (0.01 mL, 0.09 mmol) in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro, sotto N₂, viene aggiunto acetil cloruro (0.01 mL, 0.08 mmol). La reazione, lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore, quindi viene addizionata di CH₂Cl₂ e lavata con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e

il grezzo purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente. Si ottengono 0.005 g del prodotto desiderato.

Olio incolore.

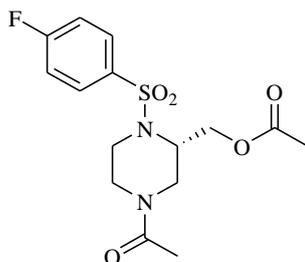
Resa: 40%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, A:B circa 1:1*) δ: 1.97 (s, 3H, CH_{3A}), 2.02 (s, 6H, CH_{3A+B}), 2.03 (s, 3H, CH_{3B}); 2.58 (dt, J = 12.8 Hz, 3.6 Hz, 1H, H-5_A); 2.72 (dd, J = 13.6 Hz, 4.0 Hz, 1H, H-3_B); 3.03-3.12 (m, 2H, 2CHHN); 3.18-3.27 (m, 2H, 2CHHN); 3.63-3.80 (m, 4H, 4CHHN); 3.94-4.03 (m, 2H, CH₂O_A); 4.09-4.15 (m, 2H, CH₂O_B); 4.21-4.27 (m, 2H, H-2_{A+B}); 4.48-4.52 (m, 2H, H-3_B + H-5_A); 7.18-7.26 (m, 4H, H-3'_{A+B} + H-5'_{A+B}); 7.84-7.87 (m, 4H, H-2'_{A+B} + H-6'_{A+B}) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 20.71 (CH_{3A}); 20.94 (CH_{3B}); 21.13 (CH₃); 40.66 (CH₂N); 40.84(CH₂N); 40.96 (CH₂N); 41.06 (CH₂N); 45.48 (CH₂N); 46.19 (CH₂N); 51.10 (C-2_A); 51.87 (C-2_B); 59.81 (CH₂O_A); 60.03 (CH₂O_B); 116.68 (d, J_{C-F} = 22.0 Hz, C-3'_{A+B} + C-5'_{A+B}); 129.75 (d, J_{C-F} = 9.0 Hz, C-2'_{A+B} + C-6'_{A+B}); 136.35 (C-1'_A); 136.57 (C-1'_B); 165.23 (d, J_{C-F} = 255.0 Hz, C-4'_{A+B}); 169.48, 170.19, 170.51 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₅H₁₉FN₂O₅S) 359.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.57. (S)-(4-acetil-1-((4-fluorofenil)solfonil)piperazin-2-il)metil acetato (MVM104) (S-53c)



Per ottenere il prodotto **S-53c** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del prodotto **R-53c**. A partire da 0.031 g (0.11 mmol) dell'intermedio **S-62** si ottengono 0.022 g del prodotto desiderato.

Olio incolore.

Resa: 55%.

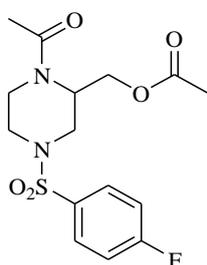
[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri A:B circa 1:1*) δ: 1.97 (s, 3H, CH_{3A}), 2.02 (s, 6H, CH_{3A+B}), 2.03 (s, 3H, CH_{3B}); 2.58 (dt, J = 12.8 Hz, 3.6 Hz, 1H, H-5_A); 2.72 (dd, J =

13.6, 4.0 Hz, 1H, H-3_B); 3.03-3.12 (m, 2H, 2CHHN); 3.18-3.27 (m, 2H, 2CHHN); 3.63-3.80 (m, 4H, 4CHHN); 3.94-4.03 (m, 2H, CH₂O_A); 4.09-4.15 (m, 2H, CH₂O_B); 4.21-4.27 (m, 2H, H-2_{A+B}); 4.48-4.52 (m, 2H, H-3_B + H-5_A); 7.18-7.26 (m, 4H, H-3'_{A+B} + H-5'_{A+B}); 7.84-7.87 (m, 4H, H-2'_{A+B} + H-6'_{A+B}) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 20.71 (CH_{3A}); 20.94 (CH_{3B}); 21.13 (CH₃); 40.66 (CH₂N); 40.84(CH₂N); 40.96 (CH₂N); 41.06 (CH₂N); 45.48 (CH₂N); 46.19 (CH₂N); 51.10 (C-2_A); 51.87 (C-2_B); 59.81 (CH₂O_A); 60.03 (CH₂O_B); 116.68 (d, J_{C-F} = 22.0 Hz, C-3'_{A+B} + C-5'_{A+B}); 129.75 (d, J_{C-F} = 9.0 Hz, C-2'_{A+B} + C-6'_{A+B}); 136.35 (C-1'_A); 136.57 (C-1'_B); 165.23 (d, J_{C-F} = 255.0 Hz, C-4'_{A+B}); 169.48, 170.19, 170.51 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₅H₁₉FN₂O₅S) 359.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.58. (1-acetil-4-(4-fluorofenilsulfonil)piperazin-2-il)metil acetato (VS23) (53d)



Si solubilizza **52d** (0.03 g, 0.10 mmol), sotto N₂, in 5 mL CH₂Cl₂ anidro e si aggiunge Et₃N anidra (0.02 mL, 0.12 mmol). Si porta la soluzione a 0°C e si aggiunge goccia a goccia acetil cloruro (0.01 mL, 0.12 mmol) solubilizzato in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro (frequenza di aggiunta: 0.05 mL ogni 2 minuti). Terminata l'aggiunta si lascia la soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente per 15 ore. La reazione viene controllata tramite TLC (eluente 17) e lavorata ripartendo tra CH₂Cl₂ ed una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene poi anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e portata a secco.

Olio giallo.

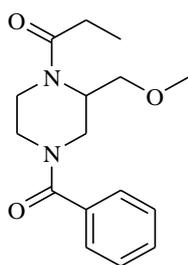
Resa: 95%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri A:B=1:1, spettro non risolto*) δ: 2.02 (s, 3H, CH_{3A}); 2.06 (s, 3H, CH_{3B}); 2.18-2.46 (m, 6H); 2.94 (t, J = 13.0 Hz, 2H); 3.54 (t, J = 13.0 Hz, 2H); 3.62-3.88 (m, 6H); 4.09-4.18 (m, 1H, H-2_A); 4.19-4.32 (m, 4H); 4.47-4.56 (m, 2H); 4.93-5.02 (m, 1H); 7.22 (t, J = 8.6 hz, 4H, H-3'_{A+B} + H-5'_{A+B}); 7.72-7.77 (m, 4H, H-2'_{A+B} + H-6'_{A+B}) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 20.71, 21.08, 21.54 (CH₃); 36.09, 41.74, 45.69, 45.79, 45.98, 46.27, (CH₂); 51.76 (C-2); 60.17, 60.68 (CH₂O); 116.62 (d, J_{C-F} = 23 Hz, ppm, C-3'_{A+B} + C-5'_{A+B}); 130.45 (d, J_{C-F} = 9 Hz, C-2'_{A+B} + C-6'_{A+B}); 131.24 (C-1'); 165.49 (d, J_{C-F} = 255 Hz, C-4'_{A+B}); 169.64, 170.47 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₅H₁₉FN₂O₅S) 359.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.59. 1-(4-benzoil-2-(metossimetil)piperazin-1-il)propan-1-one (LA6) (54a)



Il prodotto **52a** (0.055 g, 0.20 mmol) viene solubilizzato in 4 mL di THF anidro sotto N₂. La soluzione viene raffreddata a 0°C e viene addizionato NaH (dispersione solida in olio al 55% , 0.024 g, 1.00 mmol). Dopo un'ora e mezza, sempre a 0°C, viene aggiunto CH₃I (0.03 mL, 0.50 mmol) solubilizzato in 2 mL di THF anidro e lasciato sotto agitazione per un'ora. Si controlla la reazione tramite TLC (Eluente 1) e si vede come sia presente ancora prodotto di partenza. Si aggiunge quindi un altro equivalente di NaH (0.010 g) e CH₃I (0.01 mL) e si lascia ancora sotto agitazione per mezz'ora. Esaurito il prodotto di partenza la

reazione viene lavorata distruggendo l'eccesso di base mediante piccole aggiunte di ghiaccio ed evaporando sotto vuoto. Il residuo viene ripartito tra H₂O ed CH₂Cl₂. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e purificata tramite cromatografia flash utilizzando l'eluente 19.

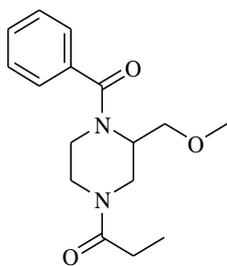
Olio incolore.

Resa: 68% .

[¹H]-NMR CDCl₃ (*spettro non risolto*) δ: 1.13 (t, J= 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2.25-2.52 (m, 2H, COCH₂); 2.72-4.35 (m, 10H); 4.38-4.81 (m, 2H, CHHN + H-2); 7.31-7.58 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR (CPD) CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 9.43 (CCH₃); 26.28, 26.81 (COCH₂); 37.01, 41.32, 42.20, 46.75, 47.39 (CH₂N); 47.85 (C-2); 59.30 (OCH₃); 68.98, 70.03 (CH₂O); 127.10, 128.59, 130.10 (CH); 135.08 (C); 171.29, 172.98 (CO) ppm.

5.2.60. 1-(4-benzoil-3-(metossimetil)piperazin-1-il)propan-1-one (VS20) (54b)



Si solubilizza, sotto N₂, **52b** (0.06 g, 0.20 mmol) in 5 mL di THF anidro, quindi si aggiunge a 0°C una dispersione in olio solida al 55% di NaH (0.05 g, 1.00 mmol). Si osserva così la formazione di una sospensione bianca che viene mantenuta in agitazione per 20', al termine dei quali si aggiunge CH₃I (0.06 mL, 1 mmol) solubilizzato in 2 mL di THF anidro con una frequenza di 0.05 mL ogni 20' circa. Si controlla la reazione tramite TLC (eluente 12). Si lascia la miscela sotto agitazione a temperatura ambiente per 4 ore, poi l'eccesso di base viene distrutto mediante piccole aggiunte di ghiaccio e la miscela viene concentrata al rotavapor. Il residuo viene ripartito tra H₂O ed CH₂Cl₂. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, portata a secco e purificata tramite cromatografia flash utilizzando l'eluente 17.

Olio trasparente.

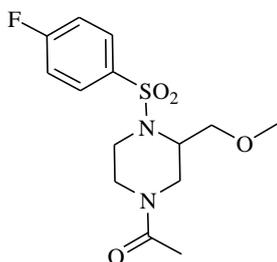
Resa: 76%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, spettro non risolto*) δ: 1.12 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃); 2.27-2.42 (m, 2H, COCH₂); 2.64 (t, J = 12.8 Hz, 1H); 2.75-3.62 (m, 9H); 3.70-4.11 (m, 1H); 4.40-4.96 (m, 1H); 7.35-7.38 (m, 5H) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 9.26, 9.38 (CH₂CH₃); 26.41 (COCH₂); 41.39, 45.20, 45.54 (CH₂); 58.97 (OCH₃); 59.17 (CH); 68.20, 69.35 (CH₂O); 126.80, 127.13, 128.52, 128.66, 129.79, 129.96 (CH-Ar); 135.42, 135.71 (C); 172.62, 173.18 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₆H₂₂N₂O₃) 291.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.61. 1-(4-(4-fluorofenilsulfonyl)-3-(metossimetil)piperazin-1-il)etanone (VS17) (54c)



Si solubilizza, sotto N₂, **52c** (0.05 g, 0.15 mmol) in 4 mL di THF anidro, alla quale si aggiunge a 0°C una dispersione di NaH in olio (0.02 g, 0.36 mmol). Si osserva così la formazione di una sospensione bianca che viene mantenuta in agitazione per 20', al termine dei quali si aggiunge CH₃I (0.02 mL, 0.36 mmol)

solubilizzato in 2 mL di THF anidro con una frequenza di 0.05 mL ogni 20' circa. La reazione viene mantenuta per 21 ore a temperatura ambiente. Poiché la reazione ancora non è andata a completamento si aggiungono ulteriori 2.5 eq di NaH e di CH₃I e si attende 1 ora e 30'. La reazione viene lavorata spegnendo la base mediante piccole aggiunte di ghiaccio e concentrando al rotavapor la miscela. Il residuo viene ripartito tra H₂O ed CH₂Cl₂. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, portata a secco e purificata tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 17.

Olio trasparente.

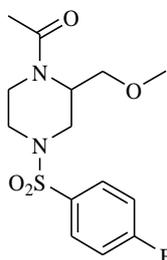
Resa: 50%.

[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, A:B=3:2*) δ: 2.15 (s, 6H, COCH_{3A+B}); 2.58 (dt, J= 12.8 Hz, 3.9 Hz, 1H_A); 2.82 (dd, J= 13.6 Hz, 4 Hz, 1H_B); 3.03-3.27 (m, 6H); 3.26-3.46 (m, 3H); 3.29 (s, 6H, OCH_{3A+B}); 3.63-3.67 (m, 1H_A); 3.68-3.72 (m, 1H_B); 3.94 (d, J= 14 Hz, 1H_A); 4.05-4.12 (m, 1H, H-2_A); 4.13-4.20 (m, 1H, H-2_B); 4.49 (d, J= 13.6 Hz, 2H); 7.18-7.26 (m, 4H); 7.83-7.86 (m, 4H) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 20.88 (COCH₃); 40.63, 41.15, 41.62, 45.54, 45.76 (CH₂N); 51.80 (C-2_A); 52.72 (C-2_B); 58.90 (OCH₃); 68.01 (CH₂O_A); 69.87(CH₂O_B); 116.57 (d, J_{C-F} = 22 Hz, ppm, C-3'_{A+B} + C-5'_{A+B}); 129.74 (d, J_{C-F} = 9 Hz, C-2'_{A+B} + C-6'_{A+B}); 136.57, 136.35 (C-1'); 165.20 (d, J_{C-F} = 255 Hz, C-4'_{A+B}); 170.19 (CO) ppm

ESI-LC/MS: (C₁₄H₁₉FN₂O₄S) 331.0 [M+H]⁺ m/z.

5.2.62. 1-(4-(4-fluorofenilsulfonil)-2-(metossimetil)piperazin-1-il)etanone (VS22) (54d)



Si solubilizza, sotto corrente di N₂, **52d** (0.05 g, 0.17 mmol) in 4 mL di THF anidro, quindi si aggiunge a 0°C una dispersione in olio solida al 55% di NaH (0.04 g, 0.84 mmol). Si osserva così la formazione di una sospensione bianca che viene mantenuta in agitazione per 20', al termine dei quali si aggiunge CH₃I (0.05 mL, 0.84 mmol) solubilizzato in 2 mL di THF anidro con una frequenza di 0.05 mL ogni 20' circa. Si controlla la reazione tramite TLC (eluente 12). La reazione viene

fatta proseguire per 15 ore a temperatura ambiente. Al termine dell'attesa la reazione ancora non è andata a completamento ma viene comunque lavorata spegnendo il riducente con piccole aggiunte di ghiaccio e concentrando al rotavapor la miscela. Il residuo viene ripartito tra H₂O ed CH₂Cl₂. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, portata a secco e purificata tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 7.

Olio trasparente.

Resa: 60%.

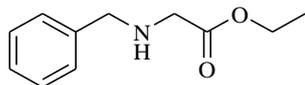
[¹H]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri, A:B=1:0.7*) δ: 2.02-2.08 (m, 3H_A + 3H_B, COCH₃); 2.30-2.39 (m, 2H_A + 2H_B); 2.90 (t, J = 12.4 Hz, 1H, CHH_A); 3.36 (s, 3H_A + 3H_B, OCH₃); 3.36-3.45 (m, 1H, CHH_B); 3.48-3.69 (m, 2H_A + 3H_B, CH₂O_{A+B} + CHH_B); 3.72-3.85 (m, 2H_A + 2H_B); 3.90-4.05 (m, 1H, H-2_A); 4.53 (d, J= 13.2 Hz, 1H, CHH_A); 4.85-4.88 (m, 1H, H-2_B); 7.20-7.26 (m, 2H_A + 2H_B); 7.73-7.77 (m, 2H_A + 2H_B) ppm

[¹³C]-NMR CDCl₃ (*miscela di conformeri*) δ: 21.33, 21.59 (COCH₃); 36.34, 42.03, 45.62, 45.75, 46.36 (CH₂); 46.67 (C-2_B); 53.08(C-2_A); 59.11, 59.42 (OCH₃); 68.26,

69.52 (CH₂O); 116.58 (d, $J_{C-F} = 23$ Hz, ppm, C-3'_{A+B} + C-5'_{A+B}); 130.38 (d, $J_{C-F} = 9$ Hz, C-2'_{A+B} + C-6'_{A+B}); 131.44 (C-1'); 165.42 (d, $J_{C-F} = 254$ Hz, C-4'_{A+B}); 170.12 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: (C₁₄H₁₉FN₂O₄S) 331.1 [M+H]⁺ m/z.

5.2.63. Etil-2-(benzilamino)acetato (MVM81) (55)



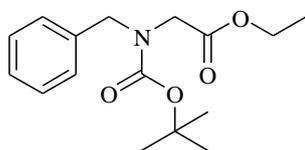
Si solubilizza, sotto flusso di N₂, la benzilammina (2.00 mL, 18.28 mmol) in 15 mL di CH₃CN anidro, si aggiunge K₂CO₃ (12.600 g, 91.42 mmol) e infine l'etil bromo acetato (1.02 mL, 9.14 mmol). La miscela posta al riparo dalla luce è lasciata sotto agitazione per 5 ore a temperatura ambiente. La reazione viene lavorata allontanando CH₃CN per evaporazione sotto vuoto quindi il residuo ripartito tra H₂O e CH₂Cl₂. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e il residuo purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 21 a dare 1.469 g di prodotto pulito.

Olio incolore.

Resa: 84%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.25 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃); 1.95 (bs, 1H, NH); 3.39 (s, 2H, CH₂Ar); 3.78 (s, 2H, COCH₂); 4.16 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂O); 7.21-7.31 (m, 5H, Ar) ppm.

5.2.64. Etil 2-(benzil(terbutossicarbonil)amino)acetato (MVM82) (56)



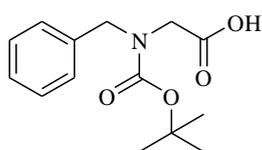
Sotto atmosfera di N₂, si solubilizza il composto **55** (0.606 g, 3.14 mmol) in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro, si aggiunge Et₃N (0.53 mL, 3.77 mmol) e infine il diterbutildicarbonato (0.823 g, 3.77 mmol). Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per un'ora. La reazione viene lavorata lavandola con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene quindi anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Si ottengono 0.927 g di prodotto.

Olio giallo pallido.

Resa: 100%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.23 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃); 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3.75 (s, 1H, COCHH); 3.89 (s, 1H, COCHH); 4.14 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂O); 4.49 (s, 1H, ArCHH); 4.53 (s, 1H, ArCHH); 7.19-7.33 (m, 5H, Ar) ppm.

5.2.65. Acido 2-(benzil(terbutossicarbonil)amino)acetico (MVM83) (57)



Il composto **56** (0.137 g, 0.47 mmol) solubilizzato in 1 mL di MeOH, viene addizionato di una soluzione di 2 equivalenti di NaOH (0.035 g, 0.94 mmol) in 1 mL di MeOH ed alcune gocce di acqua distillata. Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 ora. Quindi la soluzione viene addizionata di

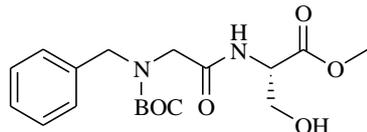
acqua e dopo aver acidificato a pH 5 con 2 equivalenti di HCl (2N) si estrae con CH₂Cl₂. La fase organica viene quindi anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Si ottengono 0.124 g di prodotto.

Olio giallo pallido.

Resa: 100%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3.80 (s, 1H, COCHH); 3.95 (s, 1H, COCHH); 4.50 (s, 1H, ArCHH); 4.54 (s, 1H, ArCHH); 7.15-7.33 (m, 5H, Ar) ppm.

5.2.66. (S)-metil 2-(2-(benzil(terbutossicarbonil)amino)acetamido)-3-idrossipropanoato (MVM84) (S-58)



Sotto atmosfera di N₂, il composto **57** (0.124 g, 0.47 mmol) viene solubilizzato in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro e raffreddato a 0°C con bagno di ghiaccio. Alla soluzione viene quindi aggiunta Et₃N (0.13 mL, 0.94 mmol) e il cloridrato della L-serina metil estere (0.08 mL, 0.47 mmol). Dopo un'ora a 0°C si aggiunge HOBT (0.076 g, 0.56 mmol) ed EDCi.HCl (0.108 g, 0.56 mmol). La miscela, riportata a temperatura ambiente, viene lasciata sotto agitazione per 3 ore. La reazione viene ripartita fra CH₂Cl₂ e una soluzione satura di NaCl, rilavando quest'ultima con un'altra porzione di CH₂Cl₂. Le due fasi organiche sono riunite e ulteriormente lavate con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica è anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e il residuo purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 6 a dare 0.068g di prodotto desiderato.

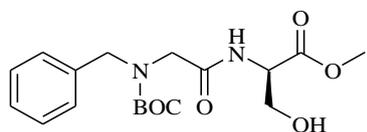
Olio giallo.

Resa: 78%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3.60-3.75 (m, 3H, OCH₃); 3.75-4.00 (m, 4H, CH₂CO+CH₂OH); 4.30-4.70 (m, 3H, CH + ArCH₂); 7.10-7.30 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 28.26 (CH₃); 50.32 (CH₂Ar+CH₂N); 52.59 (OCH₃); 54.68 (CHN); 62.65 (CH₂OH); 81.35 (C(CH₃)₃); 127.63, 128.69 (CH); 137.24 (C); 169.62 (CON+OCON); 170.68 (COO) ppm.

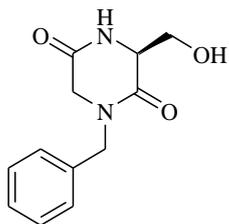
5.2.67. (R)-metil 2-(2-(benzil(terbutossicarbonil)amino)acetamido)-3-idrossipropanoato (MVM91) (R-58)



Per ottenere il prodotto **R-58** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del prodotto **S-58**. A partire da 2.572 g (9.70 mmol) dell'intermedio **57** abbiamo ottenuto 3.324 g di prodotto desiderato. Gli spettri [¹H] e [¹³C]-NMR sono identici a quelli di **S-58**.

Olio giallo.

Resa: 93%.

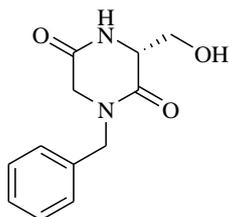
5.2.68. (S)-1-benzil-3-(idrossimetil)piperazin-2,5-dione (MVM85) (S-59)

In 5 mL di MeOH si aggiunge a 0°C, SOCl₂ (0.07 mL, 0.93 mmol). Quindi si aggiunge lentamente e a piccole porzioni una soluzione del composto **S-58** (0.068 g, 0.19 mmol) in altri 5 mL di MeOH. Alla fine dell'aggiunta la soluzione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 4 ore. Si evapora sotto vuoto e il residuo ottenuto viene triturato con Et₂O (polvere bianca). Il cloridrato intermedio viene solubilizzato in MeOH (5 mL) e addizionato di 2 mL di NH₄OH al 33% (pH =8). La soluzione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 15 ore dopo di che la miscela viene evaporata sotto vuoto a dare il prodotto desiderato (0.045 g).

Olio trasparente.

Resa quantitativa.

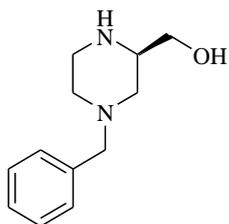
[¹H]-NMR CD₃OD δ: 3.72 (d, J= 17.2 Hz, 1H, H-6_{ax}); 3.71-3.76 (m, 1H, H-3); 3.98 (d, J= 17.2 Hz, 1H, H-6_{eq}); 3.97-4.03 (m, 2H, CH₂OH); 4.54 (d, J= 14.8 Hz, 1H, CHHAr); 4.73 (d, J= 14.8 Hz, 1H, CHHAr); 7.26-7.34 (m, 5H, Ar) ppm.

5.2.69. (R)-1-benzil-3-(idrossimetil)piperazin-2,5-dione (MVM94) (R-59)

Per ottenere il prodotto **R-59** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del prodotto **S-59**. A partire da 3.324 g (9.10 mmol) dell'intermedio **R-58** abbiamo ottenuto il prodotto desiderato (4.063 g). Lo spettro [¹H]-NMR è identico a quello di **S-59**

Olio trasparente.

Resa quantitativa.

5.2.70. (R)-(4-benzilpiperazin-2-il)metanolo (MVM86) (R-60)

Sotto atmosfera di N₂, l'intermedio **S-59** (0.459 g, 1.96 mmol) viene solubilizzato in 20 mL di THF anidro. La soluzione viene portata a 0°C e addizionata di LiAlH₄ (0.298 g, 7.84 mmol). Terminata l'aggiunta la miscela viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 4 ore. Quindi si raffredda a 0°C, si spegne con ghiaccio l'eccesso di LiAlH₄ e si aggiungono 2 mL di NaOH al 10%. I sali di litio e alluminio sono eliminati per filtrazione sotto vuoto e la soluzione evaporata sotto vuoto. Il grezzo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 7 a dare 0.141 g di prodotto puro.

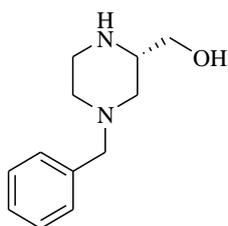
Olio giallo.

Resa: 35%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.84 (t, J= 10.4 Hz, 1H); 2.07 (td, J= 11.2 Hz, 3.2 Hz, 1H); 2.63-2.73 (m, 2H); 2.80-3.00 (m, 3H, H-2+CHH); 3.26 (bs, 1H, OH); 3.37-3.54 (m, 4H, ArCH₂+CH₂OH); 7.15-7.35 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 44.78 (CH₂); 53.13 (CH₂); 55.34 (CH₂); 56.36 (C-2); 63.30, 63.41 (CH₂Ar+CH₂OH); 127.19, 128.27, 129.22 (CH); 137.61 (C) ppm.

5.2.71. (S)-(4-benzilpiperazin-2-il)metanolo (MVM95) (S-60)

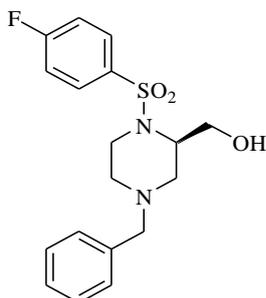


Per ottenere l'intermedio **S-60** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento dell'intermedio **R-60**. A partire da 1.010 g (4.32 mmol) del composto **R-59** abbiamo ottenuto 0.258 g di prodotto **S-60**. Gli spettri ^1H e ^{13}C -NMR sono identici a quelli di **R-60**

Olio giallo.

Resa: 29%.

5.2.72. (R)-(4-benzil-1-((4-fluorofenil)solfonil)piperazin-2-il)metanolo (MVM90) (R-61)



Ad una soluzione del composto **R-60** (0.130 g, 0.63 mmol) e Et_3N (0.10 mL, 0.76 mmol) in 5 mL di CH_2Cl_2 anidro, sotto N_2 , viene aggiunto a piccole porzioni il 4-fluorofenilsolfonil cloruro (0.110 g, 0.57 mmol) solubilizzato in 9 mL di CH_2Cl_2 anidro. La soluzione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per mezz'ora quindi si lavora aggiungendo CH_2Cl_2 e lavando con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase organica viene anidrificata su Na_2SO_4 anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e il residuo purificato tramite cromatografia flash su colonna

utilizzando l'eluente 17. Si ottengono 0.059 g di prodotto.

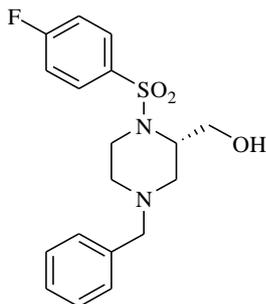
Gomma gialla.

Resa: 27%.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 2.00 (td, $J = 12.0$ Hz, 3.6 Hz, 1H, H-5_{ax}); 2.17 (dd, $J = 11.2$ Hz, 4.0 Hz, 1H, H-6_{ax}); 2.74 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-5_{eq}); 2.90 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-6_{eq}); 3.40 (s, 2H, CH_2Ar); 3.50 (td, $J = 12.4$ Hz, 2.8 Hz, 1H, H-3_{ax}); 3.67-3.70 (m, 1H, H-3_{eq}); 3.74 (dd, $J = 11.2$ Hz, 4.0 Hz, 1H, CHHOH); 3.88 (dd, $J = 11.2$ Hz, 5.2 Hz, 1H, CHHOH); 3.89-3.95 (m, 1H, H-2); 7.13-7.30 (m, 7H, $\text{ArCH}_2 + \text{H-3}' + \text{H-5}'$); 7.70-7.85 (m, 2H, H-2' + H-6')

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 42.73 (C-6); 51.98 (C-5); 53.92 (C-2); 54.61 (C-3); 62.76 (ArCH_2); 64.57 (CH_2OH); 116.44 (d, $J_{\text{C-F}} = 22.0$ Hz, C-3' + C-5'); 127.67 (CH); 128.56 (CH); 128.95 (CH); 129.72 (d, $J_{\text{C-F}} = 9.0$ Hz, C-2' + C-6'); 136.60 (C); 136.90 (C-1'); 165.04 (d, $J_{\text{C-F}} = 253.0$ Hz, C-4')

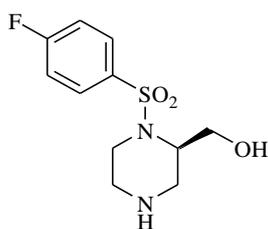
5.2.73. (S)-(4-benzil-1-((4-fluorofenil)solfonil)piperazin-2-il)metanolo (MVM100) (S-61)



Per ottenere il composto **S-61** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento dell'intermedio **R-61**. A partire da 0.258g (1.25 mmol) del composto **S-60** abbiamo ottenuto 0.223 g di prodotto **S-61**. Gli spettri ^1H e ^{13}C -NMR sono identici a quelli di **R-61**

Olio arancione.

Resa: 51%.

5.2.74. (R)-(1-((4-fluorofenil)solfonil)piperazin-2-il)metanolo (MVM96) (R-62)

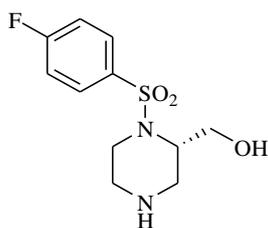
Ad una soluzione dell'intermedio **R-61** (0.060 g, 0.17 mmol) in 20 mL di EtOH assoluto, sono aggiunti 0.030 g di Pd/C al 10%. La miscela viene idrogenata a 70 psi per 4 giorni nel reattore PARR. La sospensione viene filtrata su celite ed evaporata sotto vuoto. Il grezzo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 6. Si ottengono 0.010 g di prodotto.

Olio marrone.

Resa: 22%.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 2.50 (bs, 1H, NH); 2.64 (td, J = 12.0 Hz, 3.6 Hz, 1H, H-5_{ax}); 2.78 (dd, J = 12.0, 3.6 Hz, 1H, H-6_{ax}); 2.92 (d, J = 12.0 Hz, 1H, H-5_{eq}); 3.14 (d, J = 12.0 Hz, 1H, H-6_{eq}); 3.45 (td, J = 12.4, 3.2 Hz, 1H, H-3_{ax}); 3.66 (d, J = 12.4 Hz, 1H, H-3_{eq}); 3.75-4.10 (m, 3H, H-2+CH₂OH); 7.10-7.40 (m, 2H, H-3'+H-5'); 7.75-7.95 (m, 2H, H-2'+H-6')

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 42.81 (C-6); 45.19 (C-5); 47.53 (C-3); 53.36 (C-2); 63.77 (CH₂OH); 116.47 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22.0 Hz, C-3'+C-5'); 129.70 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 9.0 Hz, C-2'+C-6'); 137.07 (C-1'); 165.05 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 254.0 Hz, C-4')

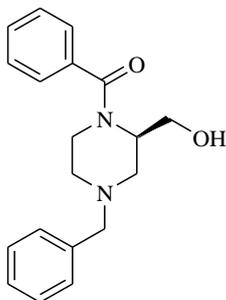
5.2.75. (S)-(1-((4-fluorofenil)solfonil)piperazin-2-il)metanolo (MVM102) (S-62)

Ad una soluzione del composto **S-61** (0.090 g, 0.25 mmol) in 5 mL di EtOH assoluto, sono aggiunti Pd/C al 10% (0.080 g) e HCOONH₄ (0.079 g, 1.25 mmol). La reazione viene montata in autoclave e lasciata per 2 ore a 65°C. Viene poi lasciata raffreddare fino a portarla a 0°C. Si lavora filtrando su filtro a pieghe, alcalinizzando, ed estraendo con CH₂Cl₂. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, evaporata

sotto vuoto e il residuo purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 6. Si ottengono 0.011 g di prodotto. Gli spettri ^1H e ^{13}C -NMR sono identici a quelli di **R-62**

Olio incolore.

Resa del 16%.

5.2.76. (R)-(4-benzil-2-(idrossimetil)piperazi-1-il)(fenil)metanone (MVM87) (R-63)

Ad una soluzione dell'intermedio **R-60** (0.113 g, 0.55 mmol) e Et₃N (0.10 mL, 0.71 mmol) in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro, sotto N₂, viene aggiunto a piccole porzioni il benzoyl cloruro (0.06 mL, 0.55 mmol) solubilizzato in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro. La soluzione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore. Quindi si lavora aggiungendo CH₂Cl₂ e lavando la fase organica con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e il grezzo purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 21. Si

ottengono 0.104 g di prodotto desiderato.

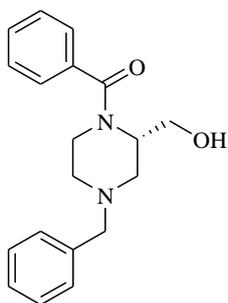
Gomma bianca.

Resa: 61%.

^1H -NMR CDCl_3 (miscela di conformeri, spettro non risolto) δ : 1.92-2.40 (m, 4H); 2.60-3.10 (m, 4H); 3.10-3.30 (m, 1H); 3.30-3.70 (m, 8H); 3.70-3.80 (m, 1H); 3.80-4.10 (m, 4H); 4.35-4.60 (m, 1H, H-2_A); 4.65-4.85 (m, 1H, H-2_B); 7.10-7.50 (m, 20H, Ar_A+Ar_B) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 45.21 (CH_2N); 50.42 (C-2); 52.84 (CH_2N); 54.26 (ArCH_2); 62.76 (CH_2OH); 64.56 (CH_2N); 127.00 (CH); 127.46 (CH); 128.48 (CH); 128.91 (CH); 129.67 (CH); 135.88 (C); 137.25 (C); 171.61 (CO) ppm.

5.2.77. (S)-(4-benzil-2-(idrossimetil)piperazin-1-il)(fenil)metanone (MVM105) (S-63)

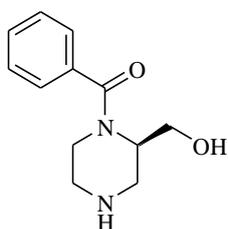


Per ottenere il prodotto **S-63** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del prodotto **R-63**. A partire da 0.260 g (1.26 mmol) dell'intermedio **S-60** si ottengono 0.224 g del prodotto desiderato. Gli spettri ^1H e ^{13}C -NMR sono identici a quelli di **R-63**

Gomma marrone.

Resa: 60%.

5.2.78. (R)-(2-(idrossimetil)piperazin-1-il)(fenil)metanone (MVM88) (R-64)



Ad una soluzione dell'intermedio **R-63** (0.104 g, 0.34 mmol) in 20 mL di EtOH assoluto, sono aggiunti 0.055 g di Pd/C al 10%. La miscela viene idrogenata a 70 psi di H_2 per 3 ore nel reattore PARR. La sospensione viene filtrata su celite ed evaporata sotto vuoto. Il grezzo viene purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 7. Si ottengono 0.030 g di prodotto desiderato.

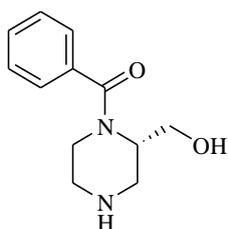
Olio incolore.

Resa: 60%.

^1H -NMR CDCl_3 (spettro non risolto) δ : 2.50-3.30 (m, 7H); 3.30-3.60 (m, 1H); 3.60-4.10 (m, 2H); 4.60-4.80 (m, 1H, C2); 7.30-7.40 (m, 5H, Ar) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 45.92 (CH_2N); 46.56 (CH_2OH); 126.87 (CH); 128.57 (CH); 129.70 (CH); 135.89 (C); 171.88 (CO) ppm.

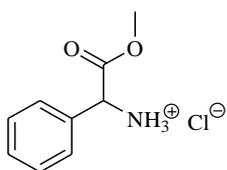
5.2.79. (S)-(2-(idrossimetil)piperazin-1-il)(fenil)metanone (MVM106) (S-64)



Per ottenere il prodotto **S-64** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del prodotto **R-64**. A partire da 0.204 g (0.66 mmol) del composto **S-63** si ottengono 0.119 g di prodotto desiderato. Gli spettri ^1H e ^{13}C -NMR sono identici a quelli di **R-64**

Olio incolore.

Resa: 82%.

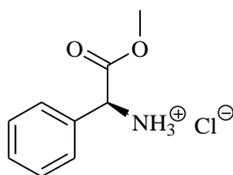
5.2.80. Fenilglicina metil estere cloridrato (MVM97) (65)

Ad una sospensione di fenilglicina (1.009 g, 6.68 mmol) posta a 0°C in MeOH si aggiunge goccia a goccia SOCl₂ (1.45 mL; 20.01 mmol). Al termine dell'aggiunta il sistema viene mantenuto a temperatura ambiente per 15 ore. La miscela viene lavorata evaporando sotto vuoto il MeOH e il residuo lavato con Et₂O per allontanare l'eccesso di SOCl₂. L'allontanamento del solvente per evaporazione sotto vuoto porta all'ottenimento del prodotto desiderato.

Solido bianco.

Resa quantitativa.

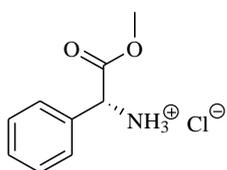
[¹H]-NMR CD₃OD δ: 3.78 (s, 3H, CH₃); 5.16 (s, 1H, CH); 7.46 (m, 5H, Ar) ppm.

5.2.81. (S)-fenilglicina metil estere cloridrato (LA7) (S-65)

Per ottenere l'intermedio **S-65** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del'intermedio **65**. A partire da 0.500 g (1.99 mmol) di (S)-N-BOC-fenilglicina abbiamo ottenuto un 0.401 g di prodotto puro. Lo spettro [¹H]-NMR è identico a quello del racemo.

Solido bianco.

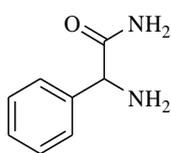
Resa quantitativa.

5.2.82. (R)- fenilglicina metil estere cloridrato (LA13) (R-65)

Per ottenere l'intermedio **R-65** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del'intermedio **65**. A partire da 1.000 g (3.98 mmol) di (R)-N-BOC-fenilglicina abbiamo ottenuto un 0.802 g di prodotto. Lo spettro [¹H]-NMR è identico a quello del racemo e di **S-65**.

Solido bianco.

Resa quantitativa.

5.2.83. 2-amino-2-fenilacetammide (MVM98) (66)

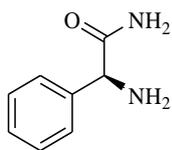
Si solubilizza, a temperatura ambiente, il composto **65** (1.990 g, 9.90 mmol) in 4 mL di NH₄OH 33% e si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. La reazione viene lavorata ripartendo il residuo tra H₂O ed EtOAc. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto a dare 1.056 g di prodotto **66**.

Gomma bianca.

Resa: 71%

[¹H]-NMR CD₃OD δ: 4.44 (s, 1H, CH); 7.10-7.45 (m, 5H, Ar) ppm.

5.2.84. (S)-2-amino-2-fenilacetamide (LA8) (S-66)

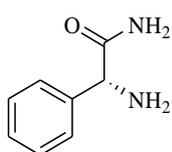


Per ottenere l'intermedio **S-66** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del'intermedio **66**. A partire da 0.838 g (4.17 mmol) di **S-65** abbiamo ottenuto 0.472 g del prodotto desiderato. Lo spettro [¹H]-NMR è identico a quello del racemo.

Gomma bianca.

Resa: 76%.

5.2.85. (R)-2-amino-2-fenilacetamide (LA15) (R-66)

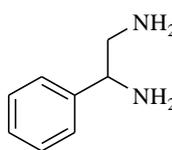


Per ottenere l'intermedio **R-66** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del'intermedio **66**. A partire da 0.873 g (4.34 mmol) di **R-65** abbiamo ottenuto 0.538 g del prodotto desiderato. Lo spettro [¹H]-NMR è identico a quello del racemo e di **S-66**.

Gomma bianca

Resa: 83%.

5.2.86. 1-feniletan-1,2-diammina (MVM101) (67)



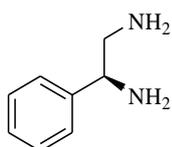
Sotto atmosfera di N₂, il composto **66** (0.179 g, 1.19 mmol) viene solubilizzato in THF anidro. La soluzione viene raffreddata a 0°C e addizionata di LiAlH₄ (0.136 g, 3.58 mmol). Al termine dell'aggiunta la miscela viene scaldata al refluxo (68°C) per 5 ore. Quindi l'eccesso di LiAlH₄ viene spento con ghiaccio dopo aver raffreddato la miscela a 0°C con bagno di ghiaccio. La miscela viene poi lasciata tornare a temperatura ambiente. I sali di litio e alluminio vengono eliminati per filtrazione sotto vuoto e la soluzione evaporata sotto vuoto. Il residuo viene purificato tramite cromatografia flash utilizzando l'eluente 20.

Olio giallo (0.056 g).

Resa: 35%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 2.63 (bs, 4H, NH₂); 2.82 (dd, J= 12.8 Hz, 7.6 Hz, 1H, CHH); 2.90 (dd, J= 12.4 Hz, 4.8 Hz, 1H, CHH); 3.92 (dd, J= 7.2 Hz, 4.8 Hz, 1H, CH); 7.19-7.30 (m, 5H, Ar) ppm.

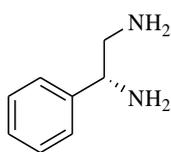
5.2.87. (S)-1-feniletan-1,2-diammina (LA9) (S-67)



Per ottenere l'intermedio **S-67** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del'intermedio **67**. A partire da 0.343 g (2.29 mmol) di **S-66** abbiamo ottenuto 0.233g del prodotto desiderato. Lo spettro [¹H]-NMR è identico a quello del racemo.

Olio giallo.

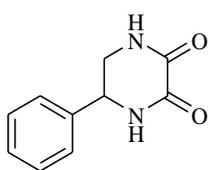
Resa: 75%.

5.2.88. (R)-1-feniletan-1,2-diammina (LA16) (R-67)

Per ottenere l'intermedio **R-67** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del'intermedio **67**. A partire da 0.234 g (1.56 mmol) di **R-66** abbiamo ottenuto 0.074g del prodotto desiderato. Lo spettro $[^1\text{H}]\text{-NMR}$ è identico a quello del racemo e di **S-67**.

Olio giallo.

Resa: 35%.

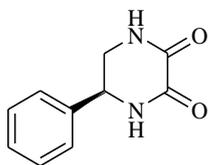
5.2.89. 5-fenilpiperazin-2,3-dione (MVM103) (68)

Sotto atmosfera di N_2 , il composto **67** (0.156 g, 1.15 mmol) viene solubilizzato in 5 mL di EtOH assoluto. Si aggiunge dietil ossalato (0.16 mL, 1.15 mmol) e si scalda la miscela al refluxo (78°C) sotto agitazione per 3 ore. Al termine della reazione si allontana l'EtOH per evaporazione sotto vuoto e il residuo viene purificato tramite cromatografia flash utilizzando l'eluente 6 a dare 0.144 g del prodotto desiderato.

Olio incolore.

Resa: 66%

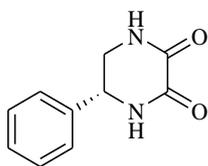
$[^1\text{H}]\text{-NMR}$ CD_3OD δ : 3.57 (dd, $J = 13.0, 7.8$ Hz, 1H, *CHH*); 3.67 (dd, $J = 13.0, 4.5$ Hz, 1H, *CHH*); 4.85-4.90 (m, 1H, *CH*); 7.30-7.50 (m, 5H, *Ar*) ppm.

5.2.90. (S)-5-fenilpiperazin-2,3-dione (LA10) (S-68)

Per ottenere l'intermedio **S-68** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del'intermedio **68**. A partire da 0.233 g (1.71 mmol) di **S-67** abbiamo ottenuto 0.140 g del prodotto desiderato. Lo spettro $[^1\text{H}]\text{-NMR}$ è identico a quello del racemo.

Olio incolore.

Resa: 43%.

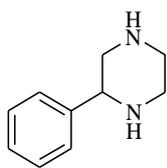
5.2.91. (R)-5-fenilpiperazin-2,3-dione (LA17) (R-68)

Per ottenere l'intermedio **R-68** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del'intermedio **68**. A partire da 0.094 g (0.69 mmol) di **R-67** abbiamo ottenuto 0.080 g del prodotto desiderato. Lo spettro $[^1\text{H}]\text{-NMR}$ è identico a quello del racemo e di **S-68**.

Olio incolore.

Resa: 61%.

5.2.92. 2-fenilpiperazina (ELF5) (**69**)



Sotto atmosfera di N₂, il composto **68** (0.128 g, 0.68 mmol) viene solubilizzato in THF anidro. La soluzione viene portata a 0°C e addizionata di LiAlH₄ (0.174 g, 4.59 mmol). Terminata l'aggiunta la miscela è scaldata al refluxo (68°C) per un'ora. La miscela viene quindi raffreddata a 0°C e viene spento l'eccesso di LiAlH₄ con ghiaccio. I sali di litio e alluminio sono eliminati per filtrazione sotto vuoto e la soluzione evaporata sotto vuoto. Si ottengono 0.107 g del prodotto desiderato che non necessita di purificazione.

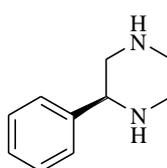
Olio incolore.

Resa: 97%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.95 (bs, 2H, NH); 2.56 (dd, J= 12.0 Hz, 10.0 Hz, 1H, H-3_{ax}); 2.71-2.85 (m, 3H, 2H-5 + H-6_{ax}); 2.87 (dd, 1H, J= 12.0 Hz, 2.8 Hz, H-3_{eq}); 2.92-2.98 (m, 1H, H-6_{eq}); 3.61 (dd, 1H, J= 10.4 Hz, 2.8 Hz, H-2_{ax}); 7.11-7.25 (m, 5H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 45.95 (CH₂N); 47.67 (CH₂N); 54.19 (C-3); 61.89 (C-2); 126.82 (CH-2/6' o CH-3/5'); 127.33 (C-4'); 128.33 (CH-2/6' o CH-3/5'); 142.72 (C-1')

5.2.93. (S)-2-fenilpiperazina (LA11) (**S-69**)

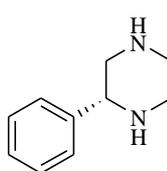


Per ottenere l'intermedio **S-69** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del'intermedio **69**. A partire da 0.140 g (0.74 mmol) di **S-68** abbiamo ottenuto 0.061g di prodotto puro. Gli spettri [¹H] e [¹³C]-NMR sono identici a quelli del racemo.

Olio incolore.

Resa: 51%.

5.2.94. (R)-2-fenilpiperazina (LA18) (**R-69**)

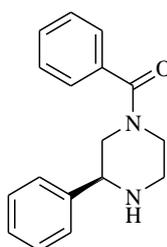


Per ottenere l'intermedio **R-69** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento dell'intermedio **69**. A partire da 0.142 g (0.75 mmol) di **R-68** abbiamo ottenuto 0.074g di prodotto puro. Gli spettri [¹H] e [¹³C]-NMR sono identici a quelli del racemo e di **S-69**

Olio incolore.

Resa: 61%.

5.2.95. (S)-fenil (3-fenilpiperazin-1-il) metanone (LA12) (**S-70**)



Una soluzione del composto **S-69** (0.058 g, 0.36 mmol), sotto N₂, in 4 mL di CH₂Cl₂ anidro viene addizionata di Et₃N (0.06 mL, 0.43 mmol). La soluzione viene raffreddata a 0°C e addizionato lentamente e a piccole porzioni del benzoil cloruro (0.03 mL, 0.28 mmol) solubilizzato in 8 mL di CH₂Cl₂ (0.1 eq ogni 20 minuti). Ad ogni aggiunta la reazione viene controllata tramite TLC (Eluente 9). Dopo l'aggiunta di 0.7 equivalenti di benzoil cloruro la TLC rivela la formazione di un altro prodotto, probabilmente il derivato di doppia addizione, quindi l'aggiunta del reattivo

viene interrotta. La miscela di reazione viene lavata con una soluzione satura di NaHCO_3 ed estratta con CH_2Cl_2 . La fase organica viene quindi anidrificata con Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Il grezzo ottenuto viene purificato (0.034 g) con cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 17.

Olio incolore.

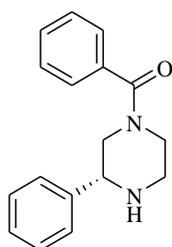
Resa: 46%.

^1H -NMR CDCl_3 δ (spettro non risolto): 2.37 (bs, 1H, NH); 2.60-3.20 (m, 4H, CHHN); 3.50-3.85 (m, 2H, CHHN); 4.65 (bs, 1H, H-2); 7.05-7.50 (m, 10H, Ar) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 (miscela di conformeri) δ : 42.36 (CH_2N); 45.93 (CH_2N); 46.62 (CH_2N); 48.04 (CH_2N); 49.29 (CH_2N); 55.08 (CH_2N); 60.16 (C-3_A); 61.13 (C-3_B); 126.95 (CH); 127.03 (CH); 127.94 (CH); 128.51 (CH); 128.59 (CH); 129.69 (C-4''); 135.90 (C-1'); 141.12 (C-1''); 170.33 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$) 267.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 290.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.2.96. (R)-fenil(3-fenilpiperazin-1-il)metanone (LA19) (R-70)

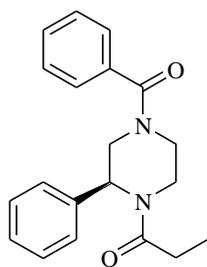


Per ottenere l'intermedio **R-70** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento dell'intermedio **S-70**. A partire da 0.047 g (0.29 mmol) del composto **R-69** abbiamo ottenuto 0.038 g del prodotto desiderato. Gli spettri ^1H e ^{13}C -NMR e di massa sono identici a quelli di **S-70**

Olio incolore.

Resa: 49%.

5.2.97. (S)-1-(4-benzoil-2-fenilpiperazin-1-il)propan-1-one (LA14) (S-71)



Ad una soluzione del composto **S-70** (0.043 g, 0.16 mmol) e Et_3N (0.03 mL, 0.19 mmol) in 4 mL di CH_2Cl_2 anidro, sotto N_2 , viene aggiunto a piccole porzioni il propionil cloruro (0.01 mL, 0.16 mmol) solubilizzato in 1 mL di CH_2Cl_2 anidro. terminate le aggiunte si lascia la soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore, quindi la reazione viene lavorata ripartendo tra CH_2Cl_2 e una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase organica viene anidrificata su Na_2SO_4 anidro, filtrata, evaporata sotto vuoto e il residuo purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando l'eluente 6. Si ottengono 0.032 g del prodotto desiderato.

Olio incolore.

Resa: 61%.

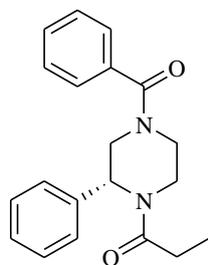
^1H -NMR CDCl_3 δ (spettro non risolto): 1.0-1.3 (m, 3H, CH_3); 2.37 (bs, 2H, COCH_2); 3.16 (bs, 1H, CHHN); 3.33-3.81 (m, 2H, CHHN); 4.04 (bs, 1H, CHHN); 4.37 (bs, 1H, CHHN); 4.70-5.50 (m, 1H, CHHN); 5.50-6.20 (m, 1H, CHHN); 6.72-7.50 (m, 10H, Ar) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 9.42 (CH_3); 26.55 (CH_2CO); 36.73 (CH_2N); 41.28 (CH_2N); 42.22 (CH_2N); 47.39 (CH_2N); 50.17 (CH_2N); 51.23 (CH_2N); 56.09 (CH_2N); 126.34 (CH);

126.93 (CH); 127.65(CH); 128.48 (CH); 128.94 (CH); 129.93 (CH); 135.20 (C-1'); 137.60 (C-1''); 170.87 (CO); 173.29 (CO) ppm.

ESI-LC/MS: HR-MS (C₂₀H₂₃N₂O₂) 323.1759[M+H]⁺; 346.1608[M+Na]⁺; 645.3452[2M+H]⁺; 667.3268[2M+Na]⁺.

5.2.98. (R)-1-(4-benzoil-2-fenilpiperazin-1-il)propan-1-one (LA20) (R-71)

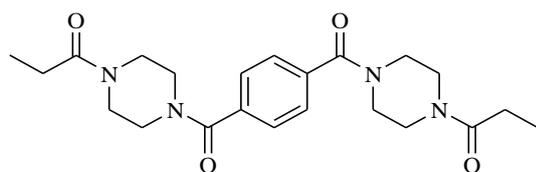


Per ottenere il prodotto **R-71** abbiamo seguito la stessa procedura descritta per l'ottenimento del prodotto **S-71**. A partire da 0.036 g (0.14 mmol) del composto **R-70** abbiamo ottenuto 0.039 g del prodotto desiderato. Gli spettri [¹H] e [¹³C]-NMR sono identici a quelli di **S-71**.

Olio incolore.

Resa: 89%.

5.2.99. 1-{4-[4-(4-propanoilpiperazin-1-carbonil)benzoil]piperazin-1-il}propan-1-one (MVM115) (72)



Il composto **79** (0.053 g, 0.38 mmol) è solubilizzato in 6 mL di CH₂Cl₂ anidro, a 0°C, si aggiunge Et₃N (0.06 mL, 0.4 mmol) e infine **75** (0.033 g, 0.16 mmol). Dopo 20 minuti la miscela è lasciata in agitazione a temperatura ambiente monitorandola con

TLC di gel di silice su alluminio usando l'eluente 17. Trascorse 3 ore a temperatura ambiente si porta a riflusso per 1 ora e poi si effettua la lavorazione. La miscela è diluita con ulteriore CH₂Cl₂ e lavata con Na₂CO₃ soluzione satura. La fase acquosa viene quindi ripresa e lavata con CH₂Cl₂ (10 mL x 2 volte). Le fasi organiche vengono poi riunite, anidificate su Na₂SO₄ e portate a secco sotto vuoto. Si ottiene il composto desiderato pulito in seguito a purificazione cromatografica usando l'eluente 17.

Solido bianco, p.f. = 223°C.

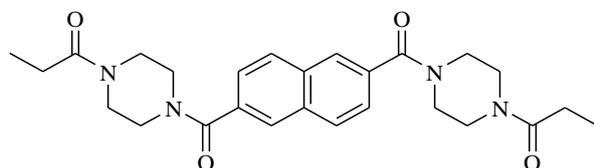
Resa: 30%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.07 (t, J= 7.2 Hz, 6H, CH₃); 2.27-2.29 (m, 4H, CH₂CH₃); 3.34-3.67 (m, 16H, CH₂ piperazina); 7.39 (s, 4H, Ar) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 9.31 (CH₃); 26.43 (CH₂CH₃); 41.63, 45.23 (CH₂ piperazina); 127.38 (CH Ar); 136.85 (C); 169.52, 172.47 (CO) ppm.

IR (KBr) v: 1628 (C=O) cm⁻¹.

5.2.100. 1-{4-[6-(4-propanoilpiperazin-1-carbonil)naftalen-2-carbonil]piperazin-1-il}propan-1-one (MVM122) (73)



Il composto **79** (0.185 mg, 1.3 mmol) è solubilizzato in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro, a 0°C, si aggiunge Et₃N (0.22 mL, 1.6

mmol) e infine **77** (0.135 mg, 0.53 mmol). Dopo 20 minuti la miscela è lasciata in agitazione a temperatura ambiente monitorandola con TLC di gel di silice su alluminio usando l'eluente 17. Trascorse 4 ore a temperatura ambiente si diluisce con ulteriore CH_2Cl_2 e si lava la miscela con NaHCO_3 soluzione satura (10 mL x 2 volte). La fase acquosa viene quindi ripresa e lavata con CH_2Cl_2 (10 mL). Le fasi organiche vengono poi riunite, anidificate su Na_2SO_4 e portate a secco sotto vuoto. Si ottiene il composto desiderato pulito in seguito a purificazione cromatografica usando l'eluente 17.

Solido bianco, p.f. 244-260°C con decomposizione.

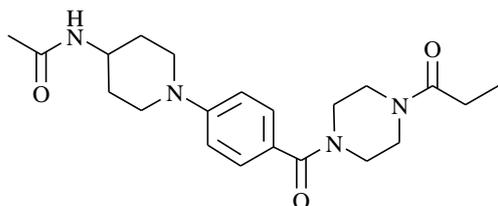
Resa: 31%.

[^1H]-NMR CDCl_3 δ : 1.11 (t, $J=7.2$ Hz, 6H, CH_3); 2.31-2.35 (m, 4H, CH_3CH_2); 3.34-3.67 (m, 16H, CH_2 piperazina); 7.51 (d, $J=9.6$ Hz, 2H, H-4 + H-8); 7.89 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, H-3 + H-7); 7.90 (s, 2H, H-1 + H-5) ppm.

[^{13}C]-NMR CDCl_3 δ : 9.34 (CH_3); 26.50 (CH_3CH_2); 41.63, 45.31 (CH_2 piperazina); 125.18 (C-4 + C-8); 126.95 (C-5 + C-9); 129.08 (C-3 + C-7); 133.09 (C-1 + C-5); 133.94 (C-2 + C-6); 170.14, 172.53 (CO) ppm.

IR (KBr) ν : 1625 (C=O) cm^{-1} .

5.2.101. N-(1-(4-(4-propionilpiperazina-1-carbonil)fenil)piperidin-4-il)acetamide (MVM144) (**74**)



Il prodotto **91** (0.022 g, 0.06 mmol) viene solubilizzato in 3 mL di CH_2Cl_2 anidro ai quali vengono aggiunti Et_3N (0.01 mL, 0.08 mmol), e acetil cloruro (0.004 mL, 0.06 mmol). La reazione è lasciata sotto agitazione a

temperatura ambiente per 5 ore. Dopo la miscela viene diluita con ulteriore CH_2Cl_2 e lavata con una soluzione satura di NaHCO_3 (10 mL x 2v.); la fase organica viene quindi anidrificata su Na_2SO_4 e il solvente allontanato sotto vuoto. Il residuo ottenuto viene purificato tramite colonna cromatografica su gel di silice usando come eluente 15.

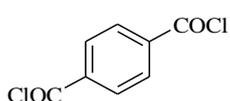
Gomma bianca.

Resa quantitativa.

[^1H]-NMR CDCl_3 δ : 1.14 (t, $J=7.6$ Hz, 3H, CH_3CH_2); 1.47 (td, $J=12.0$ Hz, 4.0 Hz, 2H, CHHCH_2N); 1.97 (s, 3H, CH_3CO); 1.99 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, CHHCH_2N); 2.35 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CO); 2.90 (td, $J=14.0$ Hz, 2.4 Hz, 2H, CHHN); 3.47-3.64 (m, 8H, piperazina); 3.70 (d, $J=12.8$ Hz, 2H, CHHN); 3.92-3.96 (m, 1H, CH); 5.73 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, NHCO); 6.86 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.32 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-3 + H-5) ppm.

[^{13}C]-NMR CDCl_3 δ : 9.40 (CH_3CH_2); 23.47 (CH_3CO); 26.53 (CH_2CH_3); 31.58 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 41.69, 45.35 (CH_2 piperazina); 46.57 (CH); 47.60 (CH_2N); 114.93 (C-2 + C-6); 124.53 (C-1); 129.15 (C-3 + C-5); 152.21 (C-4); 169.55, 170.98, 172.56 (CO) ppm.

5.2.102. Dicloruro acilico dell'acido tereftalico (MVM110) (**75**)



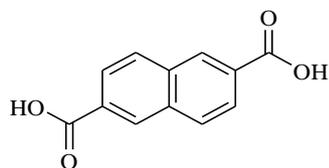
L'acido tereftalico commerciale (0.1 g, 0.6 mmol) è sospeso in 5 mL di SOCl_2 e posto a riflusso (76°C). Dopo 18 ore la miscela

appare limpida, si allontana il SOCl_2 tramite vuoto. Il residuo ottenuto è triturato in etere dietilico, filtrato e seccato e costituisce il prodotto desiderato pulito.

Solido giallo.

Resa quantitativa.

5.2.103. Acido 2,6-naftalendicarbossilico (MVM116) (76)



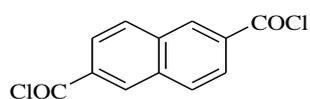
Il dimetil-2,6-naftalendicarbossilato (0.300 g, 1.2 mmol) viene solubilizzato in 5 mL di MeOH al quale viene aggiunto NaOH (0.288 g, 7.2 mmol) finemente triturato e 0.5 mL di H_2O . La reazione è lasciata sotto agitazione a riflusso a 65°C . La reazione è monitorata tramite TLC di gel di silice su alluminio usando come eluente 17. Dopo 1 ora la miscela viene portata a pH acido per aggiunta di HCl 2N e il precipitato bianco che si è formato viene filtrato su buckner rilavando con acqua. Il solido viene raccolto e seccato e costituisce il prodotto desiderato.

Solido bianco.

Resa quantitativa.

^1H -NMR DMSO- d_6 δ : 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-4 + H-8); 8.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3 + H-7); 8.63 (s, 2H, H-1 + H-5) ppm.

5.2.104. Dicloruro acilico dell'acido 2,6-naftalendicarbossilico (MVM119) (77)



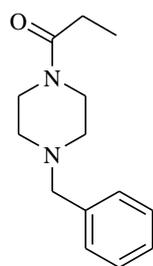
L'acido 2,6-naftalen dicarbossilico **76** (0.200 g, 0.9 mmol) è sospeso in 5 mL di SOCl_2 e posto a riflusso (76°C). Dopo 18 ore la miscela appare limpida, si allontana il SOCl_2 tramite vuoto. Il residuo ottenuto è triturato in etere dietilico, filtrato e seccato e costituisce il prodotto desiderato.

Solido bianco.

Resa quantitativa.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 8.12 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-4 + H-8); 8.18 (dd, J = 8.4 Hz, 1.6 Hz, 2H, H-3 + H-7); 8.78 (s, 2H, H-1 + H-5) ppm.

5.2.105. 1-(4-benzilpiperazin-1-il)propan-1-one (DM223) (78)



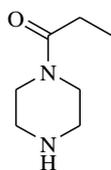
Ad una soluzione di 1-benzil-piperazina (0.49 g, 2.83 mmol) in 7 ml di CH_2Cl_2 viene aggiunta Et_3N (0.79 ml, 5.66 mmol) a 0°C mediante poi si aggiunge sgocciolando il propionilcloruro (0.35 ml, 4 mmol). Dopo 30 minuti si lascia in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente, monitorando la reazione tramite TLC (eluente 3). La fase organica viene lavata con una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 (10 mL x 3 volte), e anidrificata su Na_2SO_4 ; il solvente viene poi allontanato per evaporazione sotto vuoto. Si ottiene **78** come solido bianco che viene usato come tale nello step sintetico successivo.

Solido bianco.

Resa: 74%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.15 (t, J=7.6 Hz, 3H, CH₃); 2.32 (q, J=7.6 Hz, 2H, CH₂CH₃); 2.41 (t, J=5.2 Hz, 4H, CH₂N); 3.45 (t, J=5.2 Hz, 2H, CHHNCO); 3.49 (s, 2H, CH₂Ar); 3.62 (t, J=5.2 Hz, 2H, CHHNCO); 7.25-7.30 (m, 5H, Ar) ppm.

5.2.106. 1-(piperazin-1-il)propan-1-one (FV8) (**79**)



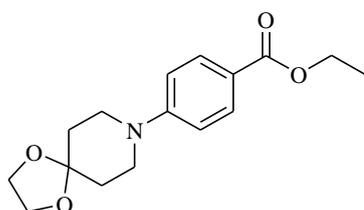
L'intermedio **78** (1.88 g, 8.10 mmol) viene solubilizzato in 30 ml di EtOH assoluto e si procede con la debenzilazione, usando il sistema Parr con Pd/C 10% (0.78 g), per 36 ore a temperatura ambiente, ad una pressione di 40 PSI. La reazione viene monitorata tramite TLC (eluente 3). Al termine della reazione la miscela viene filtrata e le acque madri portate a secco. Si ottiene **79** come olio.

Olio giallo.

Resa: 87% .

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.12 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH₃); 2.30 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂); 2.82-2.88 (m, 4H, CH₂N); 3.44 (t, J=5.2 Hz, 2H, CH₂NH); 3.61 (t, J=5.2 Hz, 2H, CH₂NH) ppm.

5.2.107. Etil 4-{1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-il}benzoato (MVM123) (**80**)



A 0.3 mL di piperidone etilchetale (3 mmol) solubilizzati in 2 mL di DMSO anidro, vengono aggiunti 0.39 mL di etil fluorobenzoato (2.7 mmol) e 0.537 g di K₂CO₃ (3.9 mmol). La miscela è poi portata a 120°C e lasciata a questa temperatura per 6 ore. Successivamente si lascia tornare la reazione a temperatura ambiente, si aggiungono 10 mL di H₂O e si lascia sotto forte

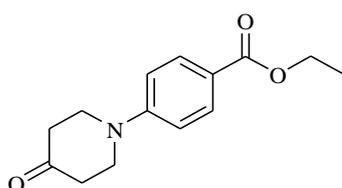
agitazione per 30 minuti. Si forma un voluminoso precipitato che viene filtrato e raccolto ^[153].

Solido giallo chiaro.

Resa: 63%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.34 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃); 1.74 (t, J= 5.6 Hz, 4H, CH₂CH₂N); 3.45 (t, J=5.6 Hz, 4H, CH₂N); 3.96 (s, 4H, CH₂O); 4.30 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂); 6.84 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.88 (d, J=9.2 Hz, 2H, H-3 + H-5) ppm.

5.2.108. Etil 4-(4-ossopiperidin-1-il)benzoato (MVM124) (**81**)



Il prodotto **80** (0.5 g, 1.7 mmol) viene solubilizzato in 3 mL di THF ai quali vengono aggiunti altri 3 mL di una soluzione acquosa al 10% di H₂SO₄. Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 60 ore. Dopo il solvente di reazione viene allontanato sotto vuoto e la miscela ripresa con Na₂CO₃ soluzione satura, questa fase acquosa è poi estratta con CH₂Cl₂ (10 mL x 3v.). La fase organica viene quindi anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente nuovamente eliminato ^[153].

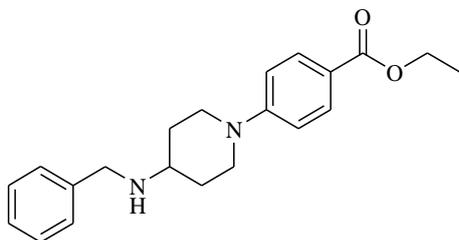
Olio giallo.

Resa quantitativa.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 1.25 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3); 2.42 (t, $J=6.4$ Hz, 4H, CH_2N); 3.60 (t, $J=6.0$ Hz, 4H, CH_2CO); 4.20 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_3CH_2); 6.76 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.83 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-3 + H-5) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 14.39 (CH_3); 40.14 (CH_2N); 46.40 (CH_2CO); 60.32 (CH_3CH_2); 113.01 (C-2 + C-6); 119.92 (C-1); 131.14 (C-3 + C-5); 151.89 (C-4); 166.37, 210.21 (CO) ppm.

5.2.109. Etil 4-[4-(benzilammino)peridin-1-il]benzoato (MVM125) (82)



Il chetone **81** (0.230 g, 0.9 mmol) è solubilizzato in 5 mL di CH_2Cl_2 anidro ai quali si aggiungono 0.10 mL (0.9 mmol) di benzilammina. La miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti, poi si aggiungono NaBH_4 (0.049 g, 1.3 mmol) e acido acetico glaciale (0.053 mL, 0.9 mmol) e si lascia ancora a reagire per 5 ore. Dopo la miscela viene diluita con etile acetato (5 mL) e

lavata con una soluzione satura di Na_2CO_3 (10 mL x 2 volte), a questo punto la fase organica è anidrificata su Na_2SO_4 e il solvente rimosso sotto vuoto. Il prodotto desiderato è ottenuto in seguito a purificazione cromatografica flash usando l'eluente 18.

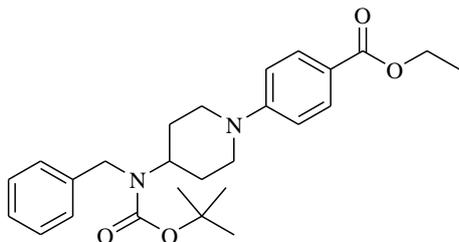
Solido bianco, p.f. 257 °C.

Resa: 67%.

^1H -NMR CDCl_3 δ : 1.35 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3); 1.48-1.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 1.87 (bs, 1H, NH); 1.99 (d, $J=14$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.71-2.79 (m, 1H, CH); 2.90 (td, $J=13.6$ Hz, 2.4 Hz, 2H, CH_2N); 3.81 (d, $J=13.2$ Hz, 2H, CH_2N); 3.84 (s, 2H, CH_2Ar); 4.30 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 6.84 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.24-7.33 (m, 5H, Ar); 7.89 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-3 + H-5) ppm.

^{13}C -NMR CDCl_3 δ : 14.46 (CH_3); 31.51 (CH_2N); 46.37 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 50.76 (CH_2Ar); 53.99 (CH); 60.28 (CH_2CH_3); 113.75 (C-2 + C-6); 119.47 (C-1); 127.09, 128.14, 128.52 (CH); 131.20 (C-3 + C-5); 140.18 (C); 153.98 (C-4); 166.75 (CO) ppm.

5.2.110. tert-butil 1-[4-(etossicarbonil)fenil]piperidin-4-il -benzilcarbammato (MVM130) (83)



A 0.129 g di **82** (0.38 mmol) solubilizzati in 5 mL di CH_2Cl_2 anidro, vengono aggiunti 0.064 mL di Et_3N anidra (0.46 mmol) e 0.100 g di diterbutildicarbonato (0.46 mmol). La miscela viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 18 ore. Dopo la miscela viene diluita con CH_2Cl_2 e la fase organica che se ne ottiene

viene lavata con una soluzione satura di NaHCO_3 (10 mL x 3v.) e anidrificata su Na_2SO_4 . Dopo la rimozione del solvente a bassa pressione, il residuo viene purificato tramite cromatografia flash usando l'eluente 18.

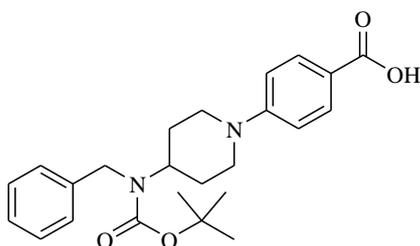
Olio trasparente.

Resa: 86%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.34(t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃); 1.39 (s, 9H, t-But); 1.70-1.72 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.82-2.84 (m, 2H, CH₂N); 3.85 (d, J= 12.4 Hz, 2H, CH₂N); 4.29 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃); 4.32-4.36 (m, 3H, CH₂Ar + CH); 6.79 (d, J=8.8 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.16-7.30 (m, 5H, Ar); 7.86 (d, J=9.2 Hz, 2H, H-3 e H-5) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 14.44 (CH₃); 28.37 (tBut); 29.69 (CH₂CH₂N); 46.28 (CH₂N); 60.30 (CH₂CH₃); 68.01 (CH); 80.09 (CH₂Ar+ C(CH₃)₃); 113.86 (C-2 + C-6); 119.74 (C-1); 126.72, 128.31 (CH); 131.21 (C-3 + C-5); 140.01 (C); 153.68 (CO); 155.75 (C-4); 166.66 (CO) ppm.

5.2.111. Acido 4-[4- benzil-(terbutossi)carbonil-ammino]piperidin-1-il-benzoico (MVM131) (**84**)



Il prodotto **83** (0.409 g, 0.93 mmol) viene solubilizzato in 8 mL di EtOH ai quali vengono aggiunti 0.056 g di NaOH (1.4 mmol), posto sotto agitazione a riflusso per 4 ore, successivamente alle quali viene lasciato a temperatura ambiente per altre 15 ore. Trascorso questo tempo la miscela viene acidificata e il solvente allontanato sotto vuoto. Il

residuo ottenuto viene estratto a secco con EtOH assoluto (15 mL x2 volte) e il solvente nuovamente allontanato. Il composto desiderato è ottenuto puro in seguito a purificazione cromatografica (eluente 22).

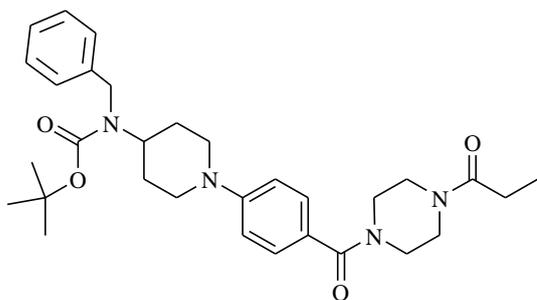
Solido bianco.

Resa: 65%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.41 (s, 9H, t-But); 1.70-1.74 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.85-2.88 (m, 2H, CH₂N); 3.91 (d, J= 12.8 Hz, 2H, CH₂N); 4.34-4.38 (m, 3H, CH₂Ar + CH); 6.81 (d, J=9.2 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.18-7.31 (m, 5H, Ar); 7.93 (d, J=8.8 Hz, 2H, H-3 e H-5) ppm.

[¹³C]-NMR (CPD) CDCl₃ δ: 28.38 (tBut); 29.67 (CH₂CH₂N); 46.46 (CH₂N); 53.60 (CH); 80.15 (CH₂Ar + C(CH₃)₃); 113.36 (C-2 + C-6); 119.44 (C-1); 126.74, 128.33 (CH); 131.97 (C-3 + C-5); 139.99 (C); 153.84 (CO); 155.79 (C-4); 172.29 (CO) ppm.

5.2.112. tertButil-N-benzil-N[1-4-(4-propanoilpiperazin-1-carbonil)fenil-piperidin-4-il]-carbammato (MVM133) (**85**)



A 0.056 g di **84** (0.14 mmol), solubilizzati in 3 mL di CH₂Cl₂ anidro, vengono aggiunti 0.058 g di **79** (0.4 mmol) sciolti in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro, 0.034 g di EDCi.HCl (0.18 mmol) e 0.024 g di HOBT (0.18 mmol), la miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 18 ore. La miscela viene poi diluita con dell'ulteriore CH₂Cl₂ e lavata con una soluzione satura di

NaHCO₃ (10 mL X 2 volte), la fase organica viene quindi anidrificata su Na₂SO₄ e il

solvente allontanato sotto bassa pressione. Il prodotto desiderato **85** è ottenuto puro in seguito a purificazione cromatografica (eluente 22).

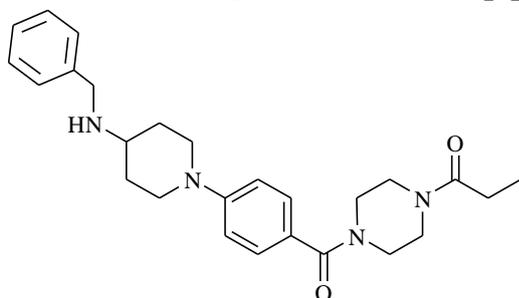
Olio giallo.

Resa: 31%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.14 (t, J= 7.6 Hz, 3H, CH₂CH₃); 1.41 (s, 9H, t-But); 1.71-1.74 (m, 4H, CH₂CH₂N); 2.36 (q, J= 7.2 Hz, 2H, (CH₂O)); 2.78-2.80 (m, 2H, CHHN); 3.47-3.61 (m, 8H, piperazina); 3.77 (d, J= 12.4 Hz, 2H, CHHN); 4.34-4.38 (m, 3H, CH₂Ar + CH); 6.83 (d, J=8.8 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.18-7.31 (m, 7H, Ar + H-3 + H-5) ppm.

[¹³C]-NMR (CPD) CDCl₃ δ: 9.38 (CH₃); 26.51 (CH₂CH₃); 28.36 (tBut); 29.76 (CH₂CH₂N); 41.72, 45.37 (CH₂ piperazina); 46.52 (CH); 48.48 (CH₂N); 80.09 (CH₂Ar + C(CH₃)₃); 114.89 (C-2 + C-6); 124.43 (C-1); 126.46, 126.71, 128.30 (CH, Bn); 129.16 (C-3 + C-5); 140.01 (C); 152.18 (CO); 155.77 (C-4); 171.04, 172.29 (CO) ppm.

5.2.113. 4-[4-(benzilammino-piperidin-1-il-benzoil)piperazin-1-il]-propanone (MVM134) (**86**)



A 0.115 g di **85** (0.22 mmol) solubilizzati in 2 mL di CH₂Cl₂ vengono aggiunti 2 mL di CF₃COOH; la miscela è lasciata sotto agitazione per 90 minuti poi il solvente viene allontanato sotto vuoto e il residuo ripartito tra CH₂Cl₂ e una soluzione satura di Na₂CO₃.

La fase organica è anidrificata su Na₂SO₄ e il

solvente nuovamente allontanato. Il composto desiderato è ottenuto in seguito a purificazione cromatografica (eluente 15).

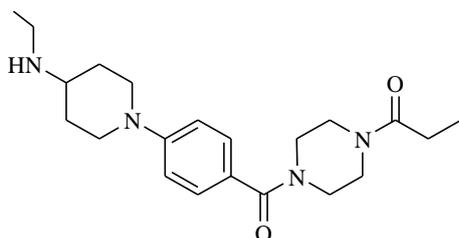
Olio giallo.

Resa: 43%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.14 (t, J= 7.6 Hz, 3H, CH₂CH₃); 1.54 (td, J= 11.2 Hz, 4.0 Hz, 2H, CHHCH₂N); 1.99 (d, J= 10.4 Hz, 2H, CHHCH₂N); 2.36 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂CO); 2.57 (bs, 1H, NH); 2.69-2.76 (m, 1H, CH); 2.86 (dt, J= 12.8 Hz, 2.4 Hz, 2H, CHHN); 3.47-3.61 (m, 8H, piperazina); 3.74 (d, J= 12.8 Hz, 2H, CHHN); 4.84 (s, 3H, CH₂Ar); 6.87 (d, J=8.8 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.22-7.34 (m, 7H, Ar + H-3 + H-5) ppm.

[¹³C]-NMR (CPD) CDCl₃ δ: 9.39 (CH₃); 26.52 (CH₂CH₃); 31.37 (CH₂CH₂N); 41.72, 45.38 (CH₂ piperazina); 47.23 (CH₂N); 50.44 (CH₂Ar); 54.11 (CH); 114.79 (C-2 + C-6); 124.29 (C-1); 127.37, 128.39, 128.58 (CH, Bn); 129.16 (C-3 + C-5); 140.02 (C); 152.34 (C-4); 171.06, 172.55 (CO) ppm.

5.2.114. 4-[4-(etilammino-piperidin-1-il-benzoil)piperazin-1-il]-propanone (MVM136) (**87**)



A 0.030 g di **86** (0.07 mmol) sciolti in 10 mL di EtOH assoluto vengono aggiunti 0.015 g di Pd/C 10% e la miscela è lasciata sotto H₂ a 53 psi in idrogenatore PARR. Dopo 3 ore la miscela è filtrata e il solvente allontanato sotto vuoto. Il

composto **87** è ottenuto in seguito a purificazione cromatografica (eluente 15).

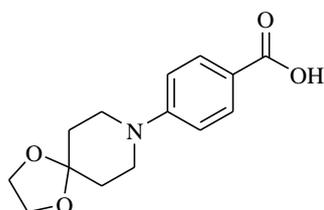
Olio trasparente.

Resa: 46%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.13 (t, J= 7.2 Hz, 3H, COCH₂CH₃); 1.16 (t, J= 7.6 Hz, 3H, NCH₂CH₃); 1.54 (td, J= 11.2 Hz, 2.8 Hz, 2H, CHHCH₂N); 1.89 (bs, 1H, NH); 1.99 (d, J= 12.4 Hz, 2H, CHHCH₂N); 2.36 (q, J= 7.6 Hz, 2H, CH₂CO); 2.69-2.76 (m, 3H, CH + CH₂NH); 2.84 (dt, J= 14.8 Hz, 2.4 Hz, 2H, CHHN); 3.47-3.61 (m, 8H, piperazina); 3.76 (d, J= 12.8 Hz, 2H, CHHN); 6.88 (d, J=8.8 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.33 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-3 + H-5) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 9.38 (CH₃); 15.28 (CH₃); 26.53 (CH₂CH₃); 31.91 (CH₂CH₂N); 40.87 (CH₃CH₂NH); 41.72, 45.39 (CH₂ piperazina); 47.43 (CH₂N); 54.75 (CH); 114.77 (C-2 + C-6); 124.19 (C-1); 129.15 (C-3 + C-5); 152.43 (C-4); 171.08, 172.55 (CO) ppm.

5.2.115. Acido 4-{1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-il}benzoico (MVM140) (**88**)



A 0.101 g di **80** (0.35 mmol) sciolti in 5 mL di EtOH viene aggiunta una soluzione 1.5 M di NaOH. La miscela è posta a riflusso per 2 ore, poi lasciata tornare a temperatura ambiente e diluita con H₂O, acidificata ed estratta con CH₂Cl₂ (10 mL x 3 volte). La fase organica è poi anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente allontanato sotto bassa pressione, lasciando come residuo il prodotto desiderato.

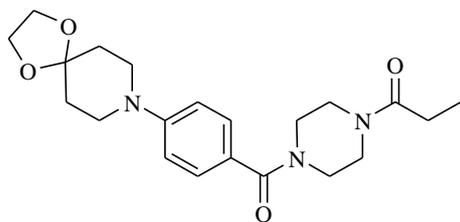
Solido giallo chiaro.

Resa: 63%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.81 (t, J= 5.6 Hz, 4H, CH₂CH₂N); 3.52 (t, J=5.6 Hz, 4H, CH₂N); 3.99 (s, 4H, CH₂O); 6.88 (d, J= 9.2 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.97 (dd, J= 6.8 Hz, 1.6 Hz, 2H, H-3 + H-5) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 34.28 (CH₂CH₂N); 45.85 (CH₂N); 64.44 (CH₂O); 107.09 (C); 113.57 (C-2 + C-6); 118.02 (C-1); 132.10 (C-3 + C-5); 153.96 (C-4); 172.09 (CO) ppm.

5.2.116. (4-{1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-il}benzoil)piperazin-1-il-propan-1-one (MVM141) (**89**)



A 0.090 g di **88** (0.34 mmol), sciolti in in 5 mL di CH₂Cl₂ anidro, vengono aggiunti 0.049 g di **79** (0.34 mmol) sciolti in 2 mL di CH₂Cl₂ anidro, 0.079 g di EDCi.HCl (0.41 mmol) e 0.055 g di HOBT (0.41 mmol), la miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 18 ore. La miscela viene poi diluita con dell'ulteriore CH₂Cl₂

e lavata con una soluzione satura di NaHCO₃ (10 mL X 2 volte), la fase organica viene quindi anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente allontanato sotto bassa pressione. Il prodotto desiderato **89** è ottenuto in seguito a purificazione cromatografica (eluente 4).

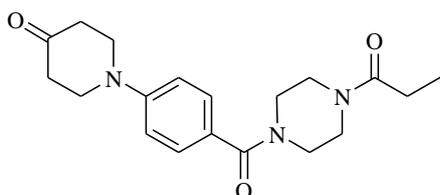
Solido giallo chiaro.

Resa: 43%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.11 (t, J= 7.6 Hz, 3H, CH₃); 1.76 (t, J= 5.2 Hz, 4H, CH₂CH₂N); 2.32 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂CO); 3.37 (t, J= 6.0 Hz, 4H, CH₂N); 3.56-3.58 (m, 8H, piperazina); 3.94 (s, 4H, CH₂O); 6.85 (d, J=8.8 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.29 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-3 + H-5) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 9.37 (CH₃); 26.49 (CH₂CH₃); 34.22 (CH₂CH₂N); 41.68, 45.35 (CH₂ piperazina); 46.58 (CH₂N); 64.36 (CH₂O); 107.02 (C); 114.79 (C-2 + C-6); 124.22 (C-1); 129.17 (C-3 + C-5); 151.86 (C-4); 170.99, 172.51 (CO) ppm.

5.2.117. 1-[4-(4-propanoilpiperazina-1-carbonil)-fenil]-piperidin-4-one (MVM142) (90)



A 0.050 g di **88** (0.13 mmol) solubilizzati in 2 mL di una miscela 1:1 di acetone/H₂O, vengono aggiunti 0.023 g di acido p-toluensolfonico (0.13 mmol). La miscela di reazione viene posta a 50°C per 3 ore al termine delle quali si aggiunge H₂O e

si porta a pH basico. La fase acquosa viene estratta con CH₂Cl₂ (10 mL x 3 volte), la fase organica anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente allontanato sotto vuoto lasciando come residuo il prodotto desiderato, che verrà usato per i passaggi successivi senza ulteriori purificazioni.

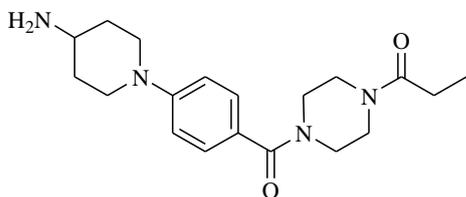
Olio giallino.

Resa: 82%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.16 (t, J= 7.6 Hz, 3H, CH₃); 2.33 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂CO); 2.52 (t, J= 5.2 Hz, 4H, CH₂CH₂N); 3.56-3.58 (m, 8H, piperazina); 3.70 (t, J= 6.4 Hz, 4H, CH₂N); 6.93 (d, J=8.8 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.37 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-3 + H-5) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 9.38 (CH₃); 26.52 (CH₂CH₃); 40.38 (CH₂CH₂N); 41.70, 45.34 (CH₂ piperazina); 47.44 (CH₂N); 114.69 (C-2 + C-6); 124.93 (C-1); 129.71 (C-3 + C-5); 150.23 (C-4); 170.79, 172.57 (CO) ppm.

5.2.118. 1-[4-(4-amminopiperidin-1-il)-benzoil-piperazin-1-il]-propan-1-one (MVM143) (91)



Il prodotto **90** (0.036 g, 0.1 mmol) viene solubilizzato in 3 mL di MeOH anidro ai quali vengono aggiunti NaBH₃CN (0.005 g, 0.07 mmol), e ammonio acetato (0.080 g, 1 mmol).

La reazione è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Trascorso questo tempo il solvente viene allontanato sotto vuoto e il residuo che se ne ottiene viene purificato tramite colonna cromatografica su gel di silice usando come eluente 6.

Gomma bianca.

Resa: 37%.

[¹H]-NMR CDCl₃ δ: 1.16 (t, J= 7.6 Hz, 3H, CH₃); 1.47 (td, J= 12.4 Hz, 2.8 Hz, 2H, CHHCH₂N); 1.81 (bs, 2H, NH₂); 1.92 (d, J= 11.2 Hz, 2H, CHHCH₂N); 2.37 (q, J= 7.2

Hz, 2H, CH₂CO); 2.82-2.89 (m, 3H, CHHN + CH); 3.47-3.66 (m, 8H, piperazina); 3.75 (d, J= 12.4 Hz, 2H, CHHN); 6.89 (d, J=8.8 Hz, 2H, H-2 + H-6); 7.33 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-3 + H-5) ppm.

[¹³C]-NMR CDCl₃ δ: 9.40 (CH₃); 26.54 (CH₂CH₃); 35.22(CH₂CH₂N); 41.73, 45.38 (CH₂ piperazina); 47.47 (CH₂N); 48.63 (CH); 114.78 (C-2 + C-6); 124.16 (C-1); 129.18 (C-3 + C-5); 152.41 (C-4); 171.07, 172.54 (CO) ppm.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1]. Brown D A; Forward A; Marsh S. Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. *Br J Pharmacol.* 1980; 71: 362-364.
- [2]. Hammer R; Giachetti A. Muscarinic receptor subtypes: M1 and M2 biochemical and functional characterization. *Life Sci.* 1983; 31: 2991-2998.
- [3]. Hulme E C; Curtis C A M; Wheatley M; Aitken A, Harris A C. Localization and structure of the muscarinic receptor ligand binding site. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990, suppl: 22-25.
- [4]. Roszkowski A P. An unusual type of sympathetic ganglionic stimulant. *J Pharmacol Exp Ther.* 1961; 132: 156-170.
- [5]. Barlow R B; Berry K J; Glenton P A; Nilolaou N M; Soh K S. A comparison of affinity constants for muscarine-sensitive acetylcholine receptors in guinea-pig atrial pacemaker cells at 29 degrees C and in ileum at 29 degrees C and 37 degrees C. *Br J Pharmacol.* 1976; 58: 613-620.
- [6]. Bonner T I; Buckley N J; Young A C; Brann M R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science.* 1987; 237: 527-532.
- [7]. Peralta E G; Ashkenazi A; Wislow J W; Smith D H. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* 1987; 6: 3923-3929.
- [8]. Bonner T I; Young A C; Brann M R; Buckley N J. Cloning and expression of the human and rat M5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron.* 1988; 1: 403-410.
- [9]. Caulfield M P. Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* 1993; 58: 319-379.
- [10]. Levey A I. Immunological localization of M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissue and brain. *Life Sci.* 1993, 52: 441-448.
- [11]. Vilaro M T; Mengod G; Palacios J M. Advances and limitations of the molecular neuroanatomy of cholinergic receptors: the example of multiple muscarinic receptors. *Prog Brain Res.* 1993; 98: 95-101.
- [12]. Wolfe B B; Yasuda R P. Development of selective antisera for muscarinic cholinergic receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 757: 186-193.
- [13]. Wess J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 423-450.
- [14]. Eglen R M; Choppin A; Watson N. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22: 409-414.
- [15]. Wess J; Eglen R M; Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nature Rev Drug Discover.* 2007; 6: 721-733.
- [16]. Jones S V; Heilman C J; Brann M R. Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol.* 1991; 40: 242-247.
- [17]. Caulfield M P; Birdsall N J M. International union of Pharmacology XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 279-290.
- [18]. Nathanson N M. A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 6245-6247.

- [19]. Lanzafame A A; Christopoulos A; Mitchelson F. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetyl-choline receptors. *Recept Chann.* 2003; 9: 241–260.
- [20]. Kristiansen. Molecular mechanism of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther.* 2004; 103: 21-80.
- [21]. Christopoulos A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1: 198-210.
- [22]. Kenakin T. Efficacy as a vector the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol Pharmacol.* 2004; 65: 2-11.
- [23]. May L T; Leach K; Sexton P M; and Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 1-51.
- [24]. Monod J; Changeux J P; Jacob F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol.* 1963; 6: 306-329.
- [25]. Milligan G & Smith N J. Allosteric modulation of heterodimeric G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28: 615-620.
- [26]. Bohr C; Hasselbalch K A; Krogh A. Ubereinen in Biologischen Beziehung Wichtigen Einfluss, Den Die Kohlen-Sauerspannung Des Blutes Auf Dessen Sauerstoffbindung. *Ubt Skand Arch Physiol.* 1904; 16: 402-412.
- [27]. Wyman J; and Allen D. The Problem of Heme Interactions in Haemoglobin and the Basis for the Bohr Effect. *J Polymer Sci.* 1951; 7: 499-518.
- [28]. Ehlert F J. The relationship between muscarinic receptor occupancy and adenylate cyclase inhibition in the rabbit myocardium. *Mol Pharmacol.* 1985; 28: 410-421.
- [29]. Christopoulos A & Kenakin T. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev.* 2002; 54: 323-374.
- [30]. Birdsall J M N; Lazareno N; Popham A; Saldanha J. Multiple allosteric sites on muscarinic receptors. *Life sciences.* 2001; 68: 2517-2524.
- [31]. Ehlert F J. Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol.* 1988; 33: 187-194.
- [32]. Conn P J; Christopoulos A; Lindsley C W. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nature Reviews, Drug Discovery.* 2009; 8.
- [33]. May L T; Avlani V A; Langmead C J; Herdon H J; Wood M D; Sexton P M; and Christopoulos A. Structure-function studies of allosteric agonism at M2 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 2007; 72: 463-476.
- [34]. Bruns R F; and Fergus J H. Allosteric Enhancement of Adenosine A1 Receptor Binding and Function by 2-Amino-3-Benzylthiophenes. *Mol Pharmacol.* 1990; 38: 939-949.
- [35]. Langmead C J; Fry V A; Forbes I T; Branch C L; Christopoulos A; Wood M D; and Herdon H J. Probing the molecular mechanism of interaction between 4-n-butyl-1-[4- (2- methylphenyl)-4-oxo-1-butyl]-piperidine (AC-42) and the muscarinic M1 receptor: direct pharmacological evidence that AC-42 is an allosteric agonist. *Mol Pharmacol.* 2006; 69: 236-246.
- [36]. Sachpatzidis A; Benton B K; Manfredi J P; Wang H; Hamilton A; Dohlman H G; and Lolis E. Identification of Allosteric Peptide Agonists of CXCR4. *J Biol Chem.* 2003; 278: 896-907.
- [37]. Whiting P J. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today.* 2003; 8: 445-450.

- [38]. Lu Z L; Saldanha J W; Hulme E C. Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23: 140-146.
- [39]. Hulme E C; Lu Z L; Saldanha J W; and Bee M S. Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 29–34.
- [40]. Christopoulos A., Sorman J.L., Mitchelson F., El-Fakahany E.E.: Characterization of the subtype selectivity of the allosteric modulator heptane-1,7-bis-(dimethyl-3'-phthalimidopropyl)ammonium bromide (C7/3-phth) at cloned muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* (1999) 57, 171-179.
- [41]. Birdsall N J; Farries T; Gharagozloo P; Kobayashi S; Lazareno S; Sugimoto M. Subtype selective positive cooperative interactions between brucine analogs and acetylcholine at muscarinic receptors: functional studies. *Mol Pharmacol.* 1999; 55: 778-786.
- [42]. Birdsall J M N; Lazareno S; Matsui H. Allosteric regulation of muscarinic receptor. *Prog Brain Res.* 1996; 109: 147-151.
- [43]. Felder C C; Bymaster F P; Ward J; and DeLapp N. Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem.* 2000; 43: 4333–4353.
- [44]. Eglén R M; Choppin A; Dillon M P; and Hegde S. Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. *Curr Opin Chem Biol.* 1999; 3: 426–432.
- [45]. Lullmann H; Ohnesorge F K; Schauwecker G C; Wasserman O. Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol.* 1969; 6: 241-247.
- [46]. Clark A L; Mitchelson F. The inhibitory effects of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol.* 1976; 58: 323-331.
- [47]. Mohr K; Trankle C; Holzgrabe U. Structure/activity relationships of M2 muscarinic allosteric modulators. *Recept Channels.* 2003; 9: 229-240.
- [48]. Birdsall N J M; and Lazareno S. Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms. *Mini Rev Med Chem.* 2005; 5: 523-543.
- [49]. Waelbroeck M. Allosteric drugs acting at muscarinic acetylcholine receptors. *Neurochem Res.* 2003; 28: 419-22.
- [50]. Leppik R A; Miller R C; Eck M; Paquet J L. Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the M2 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 1994; 45: 983-990.
- [51]. Voigtlander U; Jöhren K; Mohr M; Raasch A; Trankle C; Buller S; Ellis J; Holtje H D; Mohr K. Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M2 receptor that account entirely for the M2/M5 subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in Nmethylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol.* 2003; 64: 21-31.
- [52]. Huang X P; Prilla S; Mohr K; Ellis J. Critical amino acid residues of the common allosteric site on the M2 muscarinic acetylcholine receptor: more similarities than differences between the structurally divergent agents gallamine and bis(ammonio)alkane-type hexamethylene-bis-[dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammonium] dibromide. *Mol Pharmacol.* 2005; 68: 769-778.
- [53]. Gnagey A L; Seidenberg M; Ellis J. Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 1999; 56: 1245-1253.
- [54]. Krejci A and Tucek S. Changes of cooperativity between N-methylscopolamine allosteric modulators alcuronium and gallamine induced by mutations loops of muscarinic M(3) receptors. *Mol Pharmacol.* 2001; 60: 761-767.

- [55]. Jakubik J; Krejci A; Dolezal V. Asparagine, valine, and threonine in the third extracellular loop of muscarinic receptor have essential roles in the positive cooperativity of strychnine-like allosteric modulators. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 313: 688-696.
- [56]. Buller S; Zlotos D P; Mohr K; Ellis J. Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: a single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol.* 2002; 61: 160-168.
- [57]. Ballesteros J A; Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci.* 1995; 25: 366-428.
- [58]. Prilla S; Schrobang J; Ellis J; Holtje H D; Mohr K. Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M242Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. *Mol Pharmacol.* 2006; 70: 181-193.
- [59]. Avlani V A; Gregory K J; Morton C J; Parker M W; Sexton P M; Christopoulos A. Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *J Biol Chem.* 2007; 282: 25677-25686.
- [60]. Huang X P & Ellis J. Mutational disruption of a conserved disulfide bond in muscarinic acetylcholine receptors attenuates positive homotropic cooperativity between multiple allosteric sites and has subtype-dependent effects on the affinities of muscarinic allosteric ligands. *Mol Pharmacol.* 2007; 71: 759-768.
- [61]. Riker W F and Wescoe W C. The pharmacology of Flaxedil, with observations on certain analogs. *Ann N Y Acad Sci.* 1951; 54: 373-394.
- [62]. Li C K and Mitchelson F. The selective antimuscarinic action of stercuronium. *Br J Pharmacol.* 1980; 70: 313-321.
- [63]. Stockton J M; Birdsall N J M; Burgen A S V; Hulme E C. Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol Pharmacol.* 1983; 23: 551-557.
- [64]. Lazareno S and Birdsall N J M. Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol.* 1995; 48: 362-378.
- [65]. Lazareno S; Gharagozloo P; Kuonen D; Popham A; Birdsall N J M. Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies. *Mol Pharmacol.* 1998; 53: 573-589.
- [66]. Proska J and Tucek S. Competition between positive and negative allosteric effectors on muscarinic receptors. *Mol Pharmacol.* 1995; 48: 696-702.
- [67]. Jakubik J; Bacakova L; el-Fakahany E E; Tucek S. Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 1997; 52: 172-179.
- [68]. Trankle C and Mohr K. Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M2 receptors. *Mol Pharmacol.* 1997; 51: 674-682.
- [69]. Zahn K; Eckstein N; Trankle C; Sadee W; Mohr K. Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 301: 720-728.
- [70]. Ellis J and Seidenberg M. Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol.* 1992; 42: 638-41.

- [71]. Waelbroeck M. Identification of drugs competing with D-tubocurarine for an allosteric site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*. 1994; 46: 685-692.
- [72]. Tucek S and Proska J. Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1995; 16: 205-212.
- [73]. Hejnova L; Tucek S; el-Fakahany E E. Positive and negative allosteric interactions on muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol*. 1995; 291: 427-430.
- [74]. Gharagozloo P; Lazareno S; Popham A; Birdsall N J M. Allosteric interactions of quaternary strychnine and brucine derivatives with muscarinic acetylcholine receptors. *J Med Chem*. 1999; 42: 438-445.
- [75]. Baig A; Leppik R; Birdsall N J M. The Y82A mutant of the M1 receptor has increased affinity and cooperativity with acetylcholine for WIN 62,577 and WIN 51,708. *Proceedings of the British Pharmacological Society* at pA2online. 2005; 3: 119P.
- [76]. Lazareno S; Dolezal V; Popham A; Birdsall N J M. Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M4 receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. *Mol Pharmacol*. 2004; 65: 257-266.
- [77]. Langmead C J; Watson J; Reavill C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther*. 2008; 117: 232-243.
- [78]. Spalding T A; Trotter C; Skjaerbaek N; Messier T L; Currier E A; Burstein E S; Li D; Hacksell U; Brann M R. Discovery of an ectopic activation site on the M1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol*. 2002; 61: 1297-1302.
- [79]. Marlo J E; Niswender C M; Days E L; Bridges T M; Xiang Y; Rodriguez A L; Shirey J K; Brady A E; Nalywajko T; Luo Q. Discovery and characterization of novel allosteric potentiators of M1 muscarinic receptors reveals multiple modes of activity. *Mol Pharmacol*. 2009; 75: 577-588.
- [80]. Abdul-Ridha A; Lopez L; Keov P; Thal D M; Mistry S N; Sexton P M; Lane J R; Canals M and Christopoulos A. Signal transduction: Molecular determinants of allosteric modulation at the M1 Muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem*. 2014; 289: 6067-6079.
- [81]. Marion W; Guangping X; Michelle P; Susan G; Scott D; John J R; Andrew D; Christopher P R; Guy R S and William J R. In vivo pharmacodynamic effects of BQCA, a novel selective allosteric M1 receptor modulator. *Alzheimers Dement* 4. 2008; (Suppl 1):T770.
- [82]. Chan W Y; McKinzie D L; Bose S; Mitchell S N; Witkin J M; Thompson R C; Christopoulos A; Lazareno S; Birdsall N J M; Bymaster F P; Felder C C. Allosteric modulation of the muscarinic M4 receptor as an approach to treating schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 10978-10983.
- [83]. Gregory K J; Sexton P M and Christopoulos A. Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol*. 2007; 5: 157-167.
- [84]. Gregory K J; Hall N E; Tobin A B; Sexton P M and Christopoulos A. Identification of orthosteric and allosteric site mutations in M2 muscarinic acetylcholine receptors that contribute to ligand-selective signaling bias. crystallography. *J Biol Chem*. 2010; 285: 7459-7474.
- [85]. Tahtaoui C; Parrot I; Klotz P; Guillier F; Galzi J L; Hibert M; Ilien B. Fluorescent pirenzepine derivatives as potential bitopic ligand of the human M₁ muscarinic receptor. *J Med Chem*. 2004; 47: 4300-4315.
- [86]. Holzgrabe U; De Amici M and Mohr K. Allosteric modulators and selective agonist of muscarinic receptors. *J Mol Neurosci*. 2006; 30: 165-168.

- [87]. Mohr K; Tränkle C; Kostenis E; Barocelli E; De Amici M; Holzgrabe U. Rational design of dualsteric GPCR ligands: quests and promise. *British journal of pharmacol.* 2010; 159: 997-1008.
- [88]. Valant C; Gregory K J; Hall N E; Scammells P J; Lew M J; Sexton P M; Christopoulos A. A novel mechanism of G protein-coupled receptor functional selectivity. Muscarinic partial agonist McN-A-343 as a bitopic orthosteric/allosteric ligand. *J Biol Chem.* 2008; 283: 29312-29321.
- [89]. Birdsall N J M; Burgen A S; Hulme E C; Stockton J M; Zigmund M J. The effect of McN-A-343 on muscarinic receptors in the cerebral cortex and heart. *Br J Pharmacol.* 1983; 78: 257-259.
- [90]. Christopoulos A. & Mitchelson F. Pharmacological analysis of the mode of interaction of McN-A-343 at atrial muscarinic M2 receptors. *Eur J Pharmacol.* 1997; 339: 153-156.
- [91]. Antony J; Kellershohn K; Mohr-Andrä M; Kebig A; Prilla S; Muth M; Heller E; Disingrini T; Dallanoce C; Bertoni S; Schrobang J; Tränkle C; Kostenis E; Christopoulos A; Höltje H D; Barocelli E; De Amici M; Holzgrabe U; Mohr K. Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. *Faseb J.* 2009; 23: 442-450.
- [92]. Davis B J; Christopoulos A and Scammells P J. Development of M₁ mAChR Allosteric and Bitopic Ligands: Prospective Therapeutics for the Treatment of Cognitive Deficits. *ACS Chem Neurosci.* 2013; 4(7): 1026-1048.
- [93]. Valant C; Sexton P M & Christopoulos A. Orthosteric/Allosteric bitopic ligands: going hybrid at GPCRs. *Mol Interv.* 2009; 9: 125-135.
- [94]. Steinfeld T; Mammen M; Smith J A; Wilson R D and Jasper J R. A novel multivalent ligand that bridges the allosteric and orthosteric binding sites of the M2 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol.* 2007; 72: 291-302.
- [95]. Sur C; Mallorga P J; Wittmann M; Jacobson M A; Pascarella D; Williams J B; Brandish P E; Pettibone D J; Scolnick E M and Conn P J. N-desmethylozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 13674-13679.
- [96]. Jones C K; Brady A E; Davis A A; Xiang Z; Bubser M; Tantawy M N; Kane A S; Bridges T M; Kennedy J P; Bradley S R; Peterson T E; Ansari M S; Baldwin R M; Kessler R M; Deutch A Y; Lah J J; Levey A I; Lindsley C W and Conn P J. Novel selective allosteric activator of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor regulates amyloid processing and produces antipsychotic-like activity in rats. *J Neurosci.* 2008; 28: 10422-10433.
- [97]. Langmead C J; Austin N E; Branch C L; Brown J T; Buchanan K A; Davies C H; Forbes I T; Fry V A; Hagan J J; Herdon H J; Jones G A; Jeggo R; Kew J N; Mazzali A; Melarange R; Patel N; Pardoe J; Randall A D; Roberts C; Roopun A; Starr K R; Teriakidis A; Wood M D; Whittington M; Wu Z; Watson J. Characterization of a CNS penetrant, selective M1 muscarinic receptor agonist, 77-LH-28-1. *Br J Pharmacol.* 2008; 154: 1104-1115.
- [98]. Lebon G; Langmead C J; Tehan B G and Hulme E C. Mutagenic mapping suggests a novel binding mode for selective agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 2009; 75: 331-341.
- [99]. Avlani V A; Langmead C J; Guida E; Wood M D; Tehan B G; Herdon H J; Watson J M; Sexton P M; Christopoulos A. Orthosteric and allosteric modes of interaction of novel selective agonists of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 2010; 78: 94-104.

- [100]. Langmead C J; Fry V A H; Forbes I T; Branch C L; Christopoulos A; Wood M D; Herdon H J. Probing the Molecular Mechanism of Interaction between 4-*n*-Butyl-1-[4-(2-methylphenyl)-4-oxo-1-butyl]-piperidine (AC-42) and the Muscarinic M₁ Receptor: Direct Pharmacological Evidence That AC-42 Is an Allosteric Agonist. *Mol Pharmacol*. 2006; 69: 236–246.
- [101]. Bradley S R; Lamah J; Ohrmund L; Son T; Bajpai A; Nguyen D; Friberg M; Burstein E S; Spalding T A; Ott T R; Schiffer H H; Tabatabaei A; McFarland K; Davis R E; Bonhaus D W. AC-260584, an orally bioavailable M₁ muscarinic receptor allosteric agonist, improves cognitive performance in an animal model. *Neuropharmacology*. 2010; 58: 365-373.
- [102]. Thomas D R; Dada A; Jones G A; Deisz R A; Gigout S; Langmead C J; Werry T D; Hendry N; Hagan J J; Davies C H; Watson J M. *N*-Desmethylozapine (NDMC) is an antagonist at the human native muscarinic M₁ receptor. *Neuropharmacology*. 2010; 58: 1206–1214.
- [103]. Manetti D; Ghelardini C; Bartolini A; Bellucci C; Dei S; Galeotti N; Gualtieri F; Romanelli MN; Scapecchi S; Teodori E. Design, synthesis and preliminary pharmacological evaluation of 1,4-diazabicyclo[4.3.0]nonan-9-ones as a new class of highly potent nootropic drugs. *J Med Chem*. 2000; 43: 1969-1974.
- [104]. Martini E; Norcini M; Ghelardini C; Manetti D; Dei S; Guandalini L; Melchiorre M; Pagella S; Teodori E; Romanelli M N; Scapecchi S. Design, synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new analogues of DM232 (unifiram) and DM235 (sunifiram) as cognition modulators. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16: 10034-42.
- [105]. Matsuoka M; Aigner T G. FK960 [N-(4-acetyl-1-piperazinyl)-p-fluorobenzamide monohydrate], a novel potential antidementia drug, improves visual recognition memory in rhesus monkeys: comparison with physostigmine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 280: 1201-09.
- [106]. Matsuoka M; Maeda N; Yamazaki M; Ohkubo Y; Yamagouchi I. Effect of FR121196, a novel cognitive enhancer, on the memory impairment of rats in passive avoidance and radial arm maze tasks. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992; 263: 444-63.
- [107]. Scapecchi S; Martelli C; Ghelardini C; Guandalini L; Martini E; Gualtieri F. 2-Pyrrolidinone moiety is not critical for the cognition-enhancing activity of piracetam-like drugs. *Farmacologia*. 2003; 58: 715-722.
- [108]. Malykh A G; Sadaie M R. Piracetam and Piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders. *Drugs*. 2010; 70: 287-312.
- [109]. Shorvon S. Pyrrolidone derivatives. *The Lancet*. 2001; 358: 1885-1892.
- [110]. Hitzenberger G; Rameis H; Manigley C. Pharmacological properties of piracetam: rational for use in stroke patients. *CNS Drugs*. 1998. 9 (suppl 1): 19-27.
- [111]. Ahmed A H; Oswald R E. Piracetam defines a new binding site for allosteric modulators of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) receptors. *J Med Chem*. 2010; 53: 2197-2203.
- [112]. Haria M; Balfour J A. Levetiracetam. *CNS Drugs*. 1997; 7: 159-164.
- [113]. de Groot M; Douw L; Sizoo E M; Bosma I; Froklage F E; Heimans J J; Postma T J; Klein M; Reijneveld J C; Levetiracetam improves verbal memory in high-grade glioma patients. *Neuro-Oncology*. 2013; 15: 216-223.
- [114]. Taylor S; Heinrichs R J; Janzen J M; Ehtisham A. Levetiracetam is Associated with Improved Cognitive Outcome for Patients with Intracranial Hemorrhage. *Neurocrit Care*, 2011; 15: 80-84.

- [115]. Koo D L; Hwang K J; Kim D; Kim Y J; Kim J Y; Shin W; Kim M R; Joo E Y; Lee J M; Hong S B. Effects of Levetiracetam Monotherapy on the Cognitive Function of Epilepsy Patients. *European Neurology*. 2013; 70: 88-94.
- [116]. Ijff D M; Aldenkamp AD. Cognitive side-effects of antiepileptic drugs in children. *Handb Clin Neurol*. 2013; 111: 707-718.
- [117]. Romanelli M N; Galeotti N; Ghelardini C; Manetti D; Martini E; Gualtieri F. Pharmacological characterization of DM232 (unifiram) and DM235 (sunifiram), new potent cognition-enhancers. *CNS Drug Rev*. 2006; 1239-1252.
- [118]. Galeotti N; Ghelardini C; Pittaluga A; Pugliese A M; Bartolini A; Manetti D; Romanelli M N; Gualtieri F. AMPA-receptor activation is involved in the antiamnesic effect of DM232 (unifiram) and DM235 (sunifiram). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 2003; 368: 538-545.
- [119]. Darryl Pickering (Università di Copenhagen), comunicazione personale.
- [120]. Moriguchi S; Tanaka T; Tagashira H; Narahashi T; Fukunaga K. Novel nootropic drug sunifiram improves cognitive deficits via CaM kinase II and protein kinase C activation in olfactory bulbectomized mice. *Behavioural Brain Research*. 2013; 242: 150-157.
- [121]. Moriguchi S; Tanaka T; Narahashi T; Fukunaga K. Novel nootropic drug sunifiram enhances hippocampal synaptic efficacy via glycine-binding site of N-methyl-D-aspartate receptor. *Hippocampus*. 2013; 23942-23951.
- [122]. Raimondi L; Ghelardini C; Gualtieri F; Guandalini L; Manetti D; Martini E; Romanelli M N. DM232 and DM235, two potent cognition-enhancers, increase NO levels in rat adipocytes. *Frontiers in CNS and Oncology Medicinal Chemistry*. 2007; pp. 47.
- [123]. Ruud Zwart (Glaxo), comunicazione personale.
- [124]. Mondatori G J; Xie Y; Jaekel J. *Pharmacol Comm*. 1992; 2: 93.
- [125]. De Amici M; Dallanoce C; Holzgrabe U; Tränkle C and Mohr K. Allosteric ligands for G protein-Coupled Receptors : A novel strategy with attractive therapeutic opportunities. *Med Res Rev*. 2010; 30: 463-549.
- [126]. Mueller; Org. Synth. Coll. Vol. II. 1943; 537.
- [127]. Cumper C W N; Leton G B; Vogel A I. Physical properties and chemical constitution. Part XL. The electrical dipole moments of some cyclic diketones. *J Chem Soc*. 1965; 2067-2072.
- [128]. Zakharkin L I; Guseva V V; Pryanishnikov A P. Synthesis of 14-hydroxytetra- and 15-hydroxypentadecanoic acids. *Journal of Organic Chemistry USSR (English Translation)*. 1981; 17: 658 -661.
- [129]. King C. Cyclopolymerization of Aliphatic 1,2-Diisocyanates. *J Am Chem Soc*. 1964; 86: 437-440.
- [130]. Curtius, *Journal fur Praktische Chemie (Leipzig)*, 1915; 91: 23.
- [131]. Iwakura; Koyama; Kobunshi; Kagaku. 1951; vol 8: 306-308.
- [132]. Iwakura et al. *Nippon Kagaku Zasshi*, 1957; 78: 1504.
- [133]. Siefke W. Mono- und Polyisocyanate IV. Mitteilung über Polyurethane. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1949; 562: 75-136.
- [134]. Schmid O; Bilek L; Seifred W. Process for making bis-carbamic acid esters compounds. US2878279 (1959).
- [135]. Naylor A; Judd D B; Lloyd J E; Scopes D I C; Hayes A G; Birch P J A. Potent New Class of K-Receptor Agonist: 4-Substituted 1-(Arylacetyl)-2-([dialkylamino]methyl) piperazines. *J Med Chem*. 1993; 36: 2075-2083.
- [136]. Zindell R; Riether D; Thomson D; Hickey E R; Mushi I; Ermann R. Compounds which modulator CB2 receptors. WO2007/070760 A2.

- [137]. Chang Z Y; Coates R M. Enantioselective Synthesis of Primary Amines via Grignard Additions to Stereogenic N-(α -Phenyl- β -(benzyloxy)ethyl)nitrones. *J Org Chem.* 1990; 55: 3475-3483.
- [138]. Malkov AV; Gouriou L; Lloyd-Jones G C; Stary I; Langer V; Spoor P; Vinader V; Kocovsky P. Asymmetric Allylic Substitution Catalyzed by C1-Symmetrical Complexes of Molybdenum: Structural Requirements of the Ligand and the Stereochemical Course of the Reaction. *Chem Eur J.* 2006; 12: 6910-6929.
- [139]. Belokon YN; Hunt J; North M. Asymmetric catalysis of carbon-carbon bond forming reactions using amino acid-derived C1-symmetrical salen ligands. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2008. 19: 2804-2815.
- [140]. Belokon Y N; Pritula L K; Tararov V I; Bakhmutov V I; Struchkov Y T; Timofeeva T V; Belikov M. Synthesis of chiral atropisomeric square-planar nickel (II) and copper (II) complexes formed by macrocyclic ligands containing pendant polyether groups and a quaternary ammonium group. *J Chem Soc Dalton Trans.* 1990; 1867-1872.
- [141]. Cao S; Popovici-Muller J; Salituro F G; Saunders J; Tax X; Travins J; Yan S; Ye Z. Compounds, their pharmaceutical compositions and their uses as IDH1 mutants inhibitors for treating cancer. WO2012/171506 A1.
- [142]. Schmid O; Bilek L; Seifrie W. Process of making biscarbamic acid ester compounds. US2878279.
- [143]. Haga K; Kruse A C; Asada H; Yurugi-Kobayashi T; Shiroishi M; Zhang C; Weis W I; Okada T; Kobilka B K; Haga T; Kobayashi T. Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature.* 2012; 482: 547-51.
- [144]. Schroter A; Trankle C; Mohr K. Modes of allosteric interactions with free and [³H]Nmethylnicotinamide-occupied muscarinic M₂ receptors as deduced from buffer dependent potency shifts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2000; 362: 512-519.
- [145]. Tesi di laurea di Elisa Floriddia.
- [146]. Martini E; Di Cesare Mannelli L; Bartolucci G; Bertucci C; Dei S; Ghelardini C; Guandalini L; Manetti D; Scapecchi S; Teodori E; Romanelli M N. Synthesis and Biological Evaluation of 3,7-Diazabicyclo[4.3.0]2 nonan-8-ones as Potential Nootropic and Analgesic Drugs. *J Med Chem.* 2011. 54(7): 2512-2516.
- [147]. Guandalini L; Martini E; Di Cesare Mannelli L; Dei S; Manetti D; Scapecchi S; Teodori E; Ghelardini C; Romanelli M N. Influence of ring size on the cognition-enhancing activity of DM235 and MN19, two potent nootropic drugs. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22(5): 1936-1939.
- [148]. Martini E; Ghelardini C; Bertucci C; Dei S; Gualtieri F; Guandalini L; Manetti D; Scapecchi S; Teodori E; Romanelli M N. Enantioselective synthesis and preliminary pharmacological evaluation of the enantiomers of unifiram (DM232), a potent cognition-enhancing agent. *Med Chem.* 2005; 1(5): 473-80.
- [149]. Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- [150]. Cheng Y and Prusoff W H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 1973; 22: 3099-3108.
- [151]. Tesi di laurea di Irene Renzi.
- [152]. Masashi K; Hiroshi U. Novel propionic acid derivatives. 20040072690.
- [153]. Hrast M; Turk S; Sosič I; Knez D; Randall C P; Barreteau H; Contreras-Martel C; Dessen A; O'Neill A J; Mengin-Lecreulx D; Blanot D; Gobec S. Structure-activity

relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF. *Eur J Med Chem.* 2013; 66:32-45.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare la Prof.ssa M. Novella Romanelli che in questi anni mi ha guidata e incoraggiata a superare le difficoltà, è stato un grande onore per me lavorare con lei e seguire i suoi insegnamenti.

Un ringraziamento particolare va ai membri del gruppo di ricerca di cui ho avuto il piacere di fare parte: il Prof. Fulvio Gualtieri, la Prof.ssa Elisabetta Teodori, la Prof.ssa Dina Manetti, la Prof.ssa Silvia Dei, la Dott.ssa Cristina Bellucci.

Ringrazio anche la Prof.ssa Rosanna Matucci, il Prof. Gianluca Bartolucci, la Prof.ssa Carla Ghelardini e il Prof. Giulio Vistoli per la loro preziosa collaborazione.

Un ricordo speciale va alla Prof.ssa Serena Scapecchi che per prima mi ha accolta in questo cammino.

Grazie anche a tutti i vari studenti, dottorandi e assegnisti che negli anni si sono avvicinati nel nostro e negli altri laboratori, a Elisa, che è stata punto di riferimento e amica.

Per ultimi, ma non per importanza, ringrazio coloro che fuori dal laboratorio hanno ugualmente contribuito al realizzarsi di questa tesi: la mia adorata Famiglia che con immenso amore sempre mi sostiene nelle mie scelte e i miei Amici che, vicini o lontani che siano, saranno sempre parte fondamentale della mia esistenza.