

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



FACOLTA' DI FARMACIA
DIPARTIMENTO DI CHIMICA FARMACEUTICA E TOSSICOLOGICA

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZA DEL FARMACO
XXI CICLO

**PROGETTAZIONE E SINTESI DI PIRROLDERIVATI AD
ATTIVITA' ANALGESICA**

Coordinatore
Ch.ma Prof.ssa M.V. D'Auria

Tutor
Ch.ma Prof.ssa M.V. Diurno

Candidato
Dott. Giovanni Esposito

*"Solo il proprio dolore, quello che
è stato provato personalmente, mette
nelle condizioni di immedesimarsi
nel dolore altrui..."*

J.W.v. Goethe

*Ai miei due angeli in cielo,
mia mamma e mia nonna, e
ai miei due angeli in terra,
mio padre e Daniela.*

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 5
IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA	Pag. 25
PARTE CHIMICA	
• Sintesi dei derivati morfolinici	Pag. 32
• Sintesi dei derivati piperidinici	Pag. 36
• Sintesi dei derivati amminoalcolici	Pag. 36
• Sintesi dei derivati ftalimmidici	Pag. 41
• Sintesi dei derivati piridinici	Pag. 45
• Sintesi dei derivati dialchilpirrolici	Pag. 48
FARMACOLOGIA	Pag. 53
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	Pag. 55
PARTE ANALITICO-STRUMENTALE	Pag. 70
FARMACOLOGIA SPERIMENTALE	Pag. 72
PARTE SPERIMENTALE	Pag. 77
BIBLIOGRAFIA	Pag. 104

INTRODUZIONE

IL DOLORE

Secondo la definizione della IASP (International Association for the Study of Pain-1986) e secondo l'associazione dell'O.M.S, il dolore è un'esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole associata a danno tissutale, in atto o potenziale, o descritta in termini di danno. Esso non può essere descritto meramente come un fenomeno sensoriale, bensì deve essere visto come la composizione:

- di una parte percettiva (la nocicezione) che costituisce la modalità sensoriale che permette la ricezione e il trasporto al sistema nervoso centrale di stimoli potenzialmente lesivi per l'organismo;
- di una parte esperienziale (quindi del tutto privata, la vera e propria esperienza del dolore) che è lo stato psichico collegato alla percezione di una sensazione spiacevole.

Il dolore è fisiologico, un sistema di difesa essenziale per evitare un danno, quando rappresenta un segnale d'allarme per una lesione tissutale; diventa patologico quando si autosostiene, perdendo il significato iniziale e diventando a sua volta una malattia (sindrome dolorosa)¹.

Prima di giungere alla corteccia cerebrale, dove viene elaborata la sensazione del dolore, lo stimolo muta in tre eventi: trasduzione, trasmissione e modulazione².

Infatti, come tutti gli impulsi, anche quello nocicettivo si propaga come un'onda depolarizzante voltaggio-dipendente. La propagazione dello stimolo nocicettivo interessa le fibre nervose di tipo C e A δ ; le prime sono connesse ai nocicettori presenti sia nella cute che nei tessuti profondi e nei visceri e sono di tipo amielinico e di piccolo diametro, mentre le fibre A δ sono associate soltanto

ai meccanorecettori presenti nella cute e conducono l'impulso a una maggiore velocità, essendo fibre mielinizzate.

A livello cellulare, la genesi e la conduzione dello stimolo dolorifico si verificano in seguito all'apertura dei canali del sodio e al conseguente aumento del potenziale citosolico fino al raggiungimento di un determinato valore, definito potenziale di soglia. Tale potenziale consente l'apertura dei canali del calcio e la comparsa di un potenziale d'azione, cui consegue il rilascio di neurotrasmettitori che legano recettori postsinaptici. L'attivazione di questi recettori comporta l'apertura di canali del sodio sul neurone successivo e così la propagazione lungo tutta la fibra (figura 1).

Bloccando o inibendo uno di questi step di propagazione nervosa si determina una caduta di potenziale da cui deriva un blocco o una diminuzione della conduzione dello stimolo e quindi della percezione dolorifica.

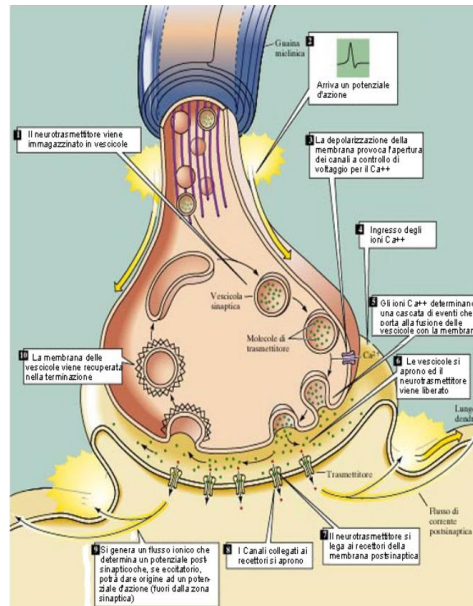


Figura 1. Conduzione sinaptica dello stimolo nocicettivo.

La somministrazione di sostanze in grado di agire diminuendo o annullando la sensazione dolorifica è una pratica nota da millenni, ed è iniziata con l'impiego di alcune sostanze di origine prevalentemente naturale. Lo sviluppo della ricerca ha poi prodotto nel tempo una serie di classi di composti di sintesi in grado di controllare più efficacemente e a dosi sempre minori il dolore e che vengono classificati come "agenti analgesici".

Da più di 3000 anni sono note le proprietà dell'oppio, ottenuto dalle capsule immature del *Papaver Somniferum* e contenente circa venti alcaloidi, tra cui il più importante dal punto di vista terapeutico è senza dubbio la morfina. L'attivazione dei recettori μ , κ o δ da parte di questi alcaloidi, provoca una diminuzione della sintesi e della liberazione del neurotrasmettitore coinvolto nella propagazione dell'impulso dolorifico³.

La morfina è tra gli analgesici più potenti fino ad oggi conosciuti, ma l'attività antidolorifica è accompagnata da gravi effetti collaterali tra cui la depressione del centro cardiorespiratorio a livello bulbare e l'assuefazione.

Tale farmaco è inoltre in grado di attivare un circuito cerebrale definito circuito della gratificazione, dove incrementa la genesi di potenziali d'azione, i quali vengono tradotti in sensazione di benessere. Questa duplice attività spiega l'utilizzo tossico-manigero di questo farmaco, che ne ha riservato l'impiego solo per il trattamento di dolori da malattie degenerative.

Per questi motivi, il trattamento del dolore dovuto ad infezioni o infiammazioni viene usualmente effettuato con una classe di farmaci più maneggevole anche se meno efficace rispetto alla morfina: gli antinfiammatori.

Questa classe comprende due tipologie di agenti analgesici, differenziate in base alla struttura chimica e al meccanismo d'azione: gli antinfiammatori non steroidei (FANS) e gli antinfiammatori steroidei (FAS).

Le prospettive nell'approccio terapeutico delle varie tipologie di dolore e nello studio dei loro meccanismi, particolarmente attente agli attuali sviluppi nel campo dei FANS, hanno tuttavia consentito l'individuazione e la

caratterizzazione di nuovi targets molecolari come ad esempio i recettori del sistema endocannabinoide.

FARMACI ANTIINFIAMMATORI NON STERODEI (FANS)

I FANS costituiscono una categoria eterogenea di composti, spesso non chimicamente correlati, che presentano accanto alla loro attività antiflogistica, una notevole attività antidolorifica ed antipiretica, e rappresentano una valida alternativa ai farmaci morfino-simili per il trattamento del dolore.

Il capostipite dei FANS è l'acido acetilsalicilico, un derivato dell'acido salicilico estratto per la prima volta dalla corteccia di salice nel 1899 ed entrato in commercio con il nome di aspirina.

Gli antinfiammatori non steroidei⁴ provocano l'inibizione della ciclossigenasi (COX), enzima responsabile del metabolismo dell'acido arachidonico a prostaglandine, implicate nella propagazione dell'impulso dolorifico e come mediatori del processo infiammatorio. Le prostaglandine, però, svolgono numerose altre funzioni nel nostro organismo, tra cui il controllo della produzione di muchi basici nelle cellule parietali gastriche, la regolazione del lume dei vasi e della contrattilità uterina. L'inibizione della COX provoca così anche un calo delle funzioni fisiologiche svolte dalle prostaglandine e una serie di conseguenti effetti collaterali, tra cui quello di maggior rilievo è rappresentato dalla comparsa di ulcere gastriche, causate dalla mancata produzione di muchi basici nello stomaco.

La scoperta dell'esistenza di una diversa isoforma enzimatica della ciclossigenasi, denominata ciclossigenasi indotta COX2 per distinguerla dalla ciclossigenasi costitutiva COX1, ha dato nuovo impulso allo studio dei farmaci antiinfiammatori per la soppressione degli effetti collaterali.

Infatti, durante il processo infiammatorio, l'isoforma COX1 non è più sufficiente ad ossidare l'acido arachidonico liberato, pertanto viene indotta la sintesi di COX2, responsabile dell'aumentata formazione di prostaglandine coinvolte esclusivamente nel processo infiammatorio. Con l'inibizione selettiva dell'isoforma COX2, quindi, si può conservare l'attività antiinfiammatoria, preservando le funzioni fisiologiche svolte dalle prostaglandine e riducendo l'entità degli effetti collaterali suddetti.

Le due isoforme della ciclossigenasi presentano un grado di omologia strutturale di circa il 60%. Ciò nonostante, una minima differenza nella composizione spaziale del sito enzimatico ciclossigenasico, quale la sostituzione di una Valina nella COX1 con un'Isoleucina nella COX2, è stata sufficiente a giustificare lo studio e lo sviluppo di farmaci COX2-selettivi a partire dalla struttura chimica dei classici FANS non selettivi.

L'indometacina, uno dei FANS di maggior impiego terapeutico, pur privo di selettività verso la COX2, ha costituito uno dei punti di partenza per la ricerca di farmaci COX2-selettivi. Tra questi ricordiamo il celecoxib (figura 2).

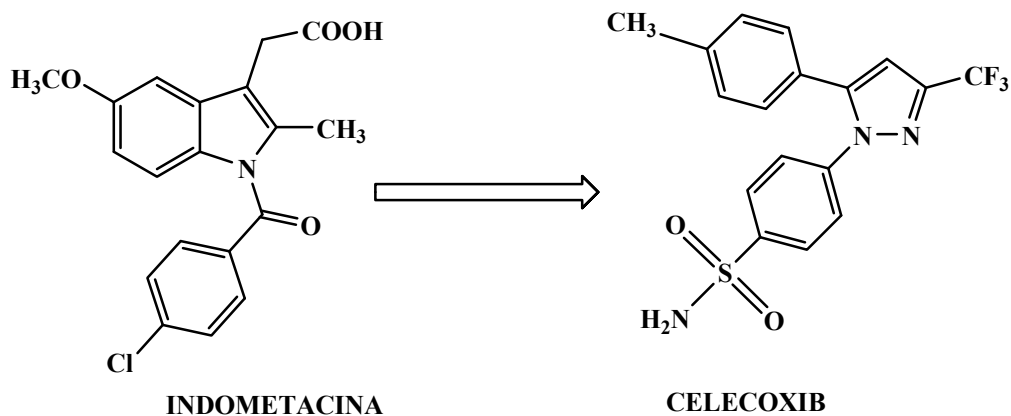


Figura 2. Dall'indometacina ai FANS COX2 selettivi.

Gli inibitori dell'isoforma COX2, grazie all'aspettativa di ridurre gli effetti collaterali a livello gastrointestinale, hanno rappresentato una novità per la terapia a lungo termine. Tuttavia studi osservazionali e studi randomizzati hanno riportato un aumentato rischio cardiovascolare associato al loro utilizzo.

Parallelamente allo sviluppo dei FANS di seconda generazione, o COX2-selettivi, la ricerca continua nel campo dei farmaci antinfiammatori ha prodotto una serie di modifiche sulla struttura base dell'indometacina, approdando a una nuova classe di molecole, che ha suscitato un notevole interesse, in quanto si sono dimostrate meno selettive per il sito attivo della ciclossigenasi, ma dotate di elevato potere analgesico.

I più importanti esponenti di queste molecole, chiamate amminoalchilindoli (AAI)^{5,6}, sono la pravadolina e il suo analogo costretto WIN 55212-2 (figura 3).

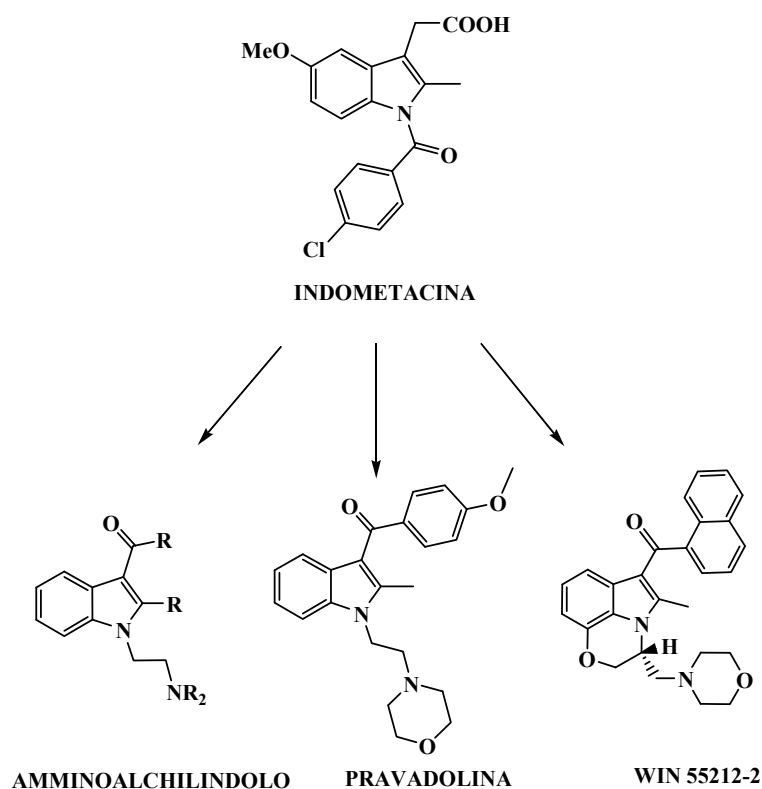


Figura 3. Indometacina e gli AAI ad essa correlati.

Gli AAI possono essere di fatto considerati dei derivati dell'indometacina, con la quale condividono alcuni requisiti strutturali come l'anello indolico, una catena alchilica e una funzione aroilica; tuttavia presentano una funzione amminica terziaria invece di una funzione carbossilica.

L'attività antidolorifica degli AAI fu, in un primo momento, attribuita ad un'interazione con il sistema oppioide, ma tale ipotesi fu smentita successivamente in quanto il nalossone, uno dei più potenti antagonisti dei recettori oppioidi, non produceva una reversione dell'effetto⁷.

Allo stesso modo, per escludere una possibile affinità di queste molecole verso target recettoriali di altri neuromodulatori endogeni, fu dimostrato che gli effetti inibitori sulle contrazioni elettrostimolate su vaso deferente di topo (MVD) persistevano anche con la contemporanea somministrazione di antagonisti purinergici P1(8-PT), di α -2 antagonisti (es. yohimbina) e di 5-HT antagonisti quali metisergide o ketanserina. Infatti molti agonisti di queste vie neuronali sono in grado di evocare effetti simili a quelli osservati per gli AAI in preparazioni isolate di MVD.

Successivi studi hanno chiarito che l'attività antinocicettiva degli amminoalchilindoli è dovuta ad un agonismo sui recettori dei cannabinoidi.

Negli ultimi anni è stata inoltre descritta l'attività cannabinomimetica di una nuova classe di molecole, denominate non-amminoalchilindoli (*nonAAI*)⁸ che supportano catene laterali a carattere non più basico, ma neutro; inoltre alcuni di essi presentano, al posto dell'anello indolico, un nucleo pirrolico. I composti JWH-015 e JWH-030 ne sono due tipici esempi (figura 4).

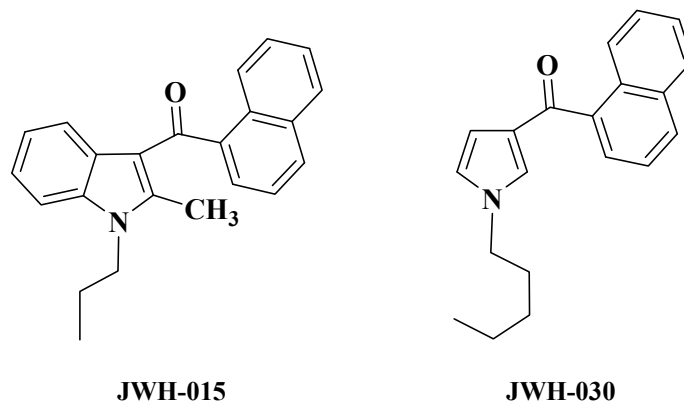


Figura 4. *JWH-015 e JWH-030, non-amminoalchilindoli.*

Il passaggio dal nucleo indolico a quello pirrolico, tra l'altro, è un tema che era stato precedentemente proposto anche per i FANS. Infatti la semplificazione strutturale della molecola dell'indometacina aveva portato alla sintesi di farmaci come la Tolmetina e lo Zomepirac, caratterizzati da un anello pirrolico. Queste molecole avevano mostrato una buona affinità verso la ciclossigenasi, anche se risultavano prive di selettività tra le due isoforme enzimatiche (figura 5).

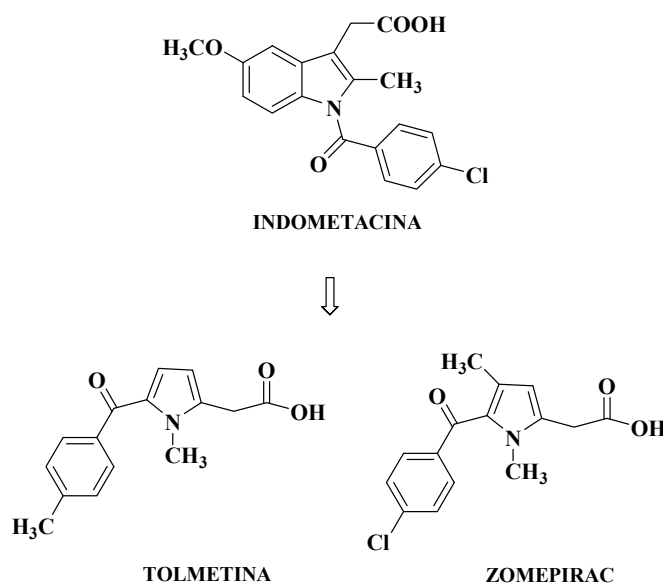


Figura 5. *Passaggio dall'Indometacina ai FANS a nucleo pirrolico.*

Mentre le correlazioni struttura-attività di agenti cannabinomimetici a nucleo indolico (AAI) sono stati estensivamente studiate, molto tuttavia rimane da fare nel campo dei cannabinoidi a nucleo pirrolico.

Queste scoperte hanno dato notevole impulso allo sviluppo di nuovi composti che hanno permesso di chiarire il ruolo fisiologico dei recettori cannabinoidi e dei loro ligandi endogeni e di caratterizzare ulteriormente la farmacologia dei recettori cannabinoidi, generando un rinnovato interesse nel loro potenziale terapeutico⁹.

CANNABINOIDI E CANNABINOMIMETICI

Il termine “cannabinoidi” individua, per definizione, una classe di composti diterpenici a 21 atomi di carbonio estratti dai peli ghiandolari della *Cannabis Sativa*, i loro acidi carbossilici e gli analoghi semi-sintetici. Essi sono anche detti fitocannabinoidi o cannabinoidi “classici” e sono il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (1), il Δ^8 -tetraidrocannabinolo (2), il cannabidiolo (3) e il cannabinolo (4) (Figura 6)¹⁰.

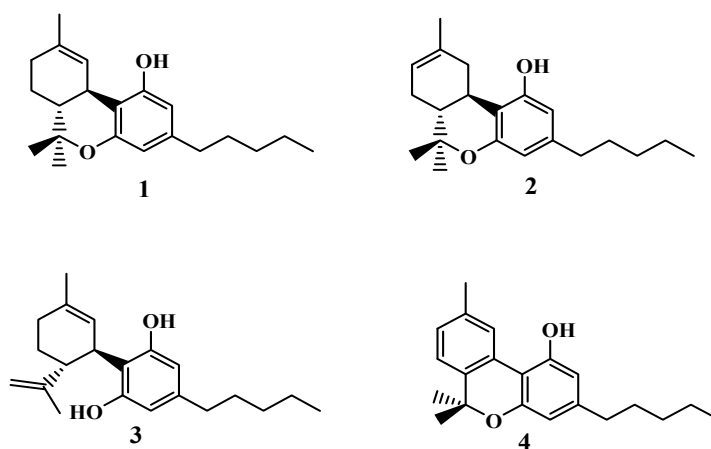


Figura 6. Principali cannabinoidi di origine vegetale.

Verso la metà del novecento la Cannabis fu tolta dal commercio a causa delle sue proprietà stimolanti sul sistema nervoso centrale, ma negli ultimi decenni si è risvegliato l'interesse nei confronti delle sue attività farmacologiche, ascrivibili al contenuto in cannabinoidi.

I cannabinoidi vengono infatti impiegati come antiemetici in chemioterapia, nel trattamento del glaucoma, nell'attenuazione degli spasmi associati alla sclerosi multipla¹¹ e nei disturbi causati dal morbo di Alzheimer¹², ma soprattutto vengono utilizzati come analgesici¹³⁻¹⁵.

L'individuazione del Δ^9 -THC come principale componente psicotropo della Cannabis, la sua determinazione stereochimica e la sua stereoselettività farmacologica hanno immediatamente suggerito l'esistenza di un sistema endocannabinoide costituito da target recettoriali specifici e da ligandi endogeni¹⁰.

I recettori cannabinoidi vengono classificati come CB₁ e CB₂. Il recettore CB₁ è espresso abbondantemente in diverse aree del cervello che includono gangli basali, cervelletto, ippocampo e corteccia, e in tessuti periferici come testicoli, occhi, vescica urinaria, ileo e adipociti (figura 7). Al contrario il recettore CB₂ è espresso principalmente a livello periferico, nelle cellule del sistema immunitario, di timo, tonsille, midollo osseo, milza, pancreas, terminazioni nervose periferiche, cellule della microglia e in cellule tumorali^{16,17}.

Sebbene alcuni dati sperimentali suggeriscano l'esistenza di altri sottotipi recettoriali, non sono attualmente disponibili informazioni che possano validare tale ipotesi.

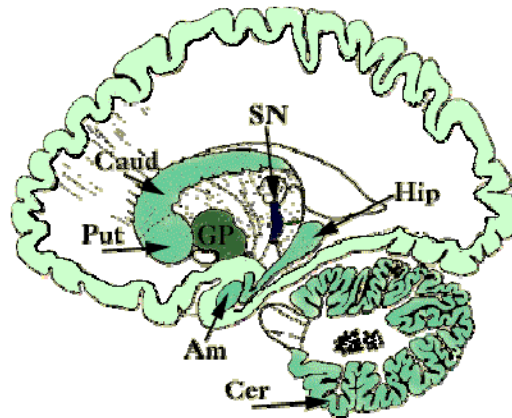


Figura 7. Siti di azione dei cannabinoidi.

Entrambe le isoforme sono presenti abbondantemente nelle fibre di tipo A, in misura maggiore rispetto ai recettori oppioidi, mentre nelle fibre di tipo C si ha una distribuzione inversa. Ciò potrebbe in parte spiegare la maggiore potenza dei cannabinoidi nel dolore di tipo neuropatico rispetto agli oppioidi, in cui le fibre coinvolte sono preferenzialmente quelle di tipo A.

I recettori CB condividono un'omologia strutturale pari al 44%, e il sito di legame per i cannabinoidi è collocato all'esterno della membrana. Essi appartengono alla famiglia dei recettori metabotropici (figure 8 e 9) e sono costituiti da sette eliche transmembrinarie accoppiate ad una proteina G_i/G_0 , la cui attivazione determina una riduzione della produzione di cAMP e quindi di tutti i processi intracellulari cAMP dipendenti.

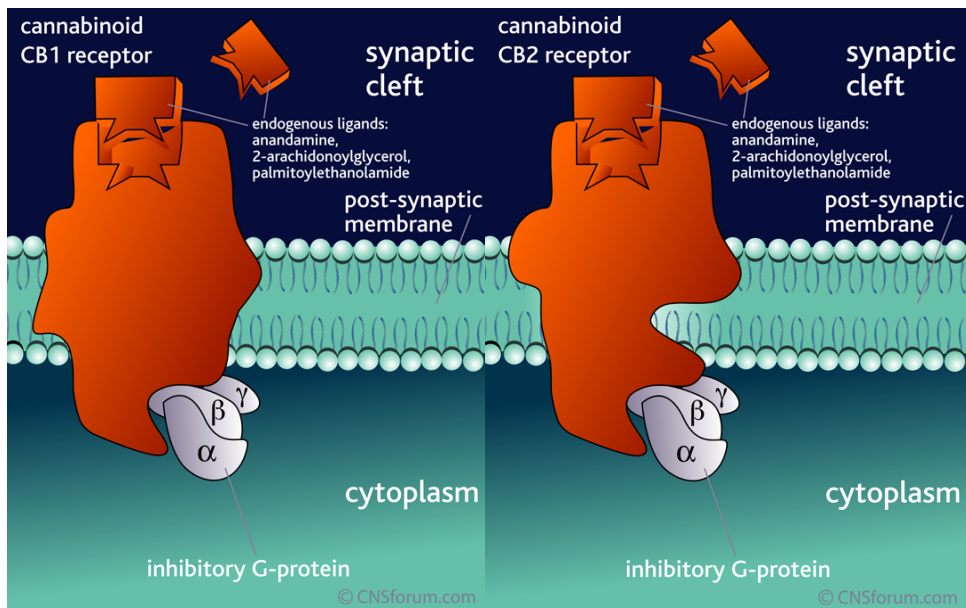


Figura 8. Recettori CB_1 e CB_2 .

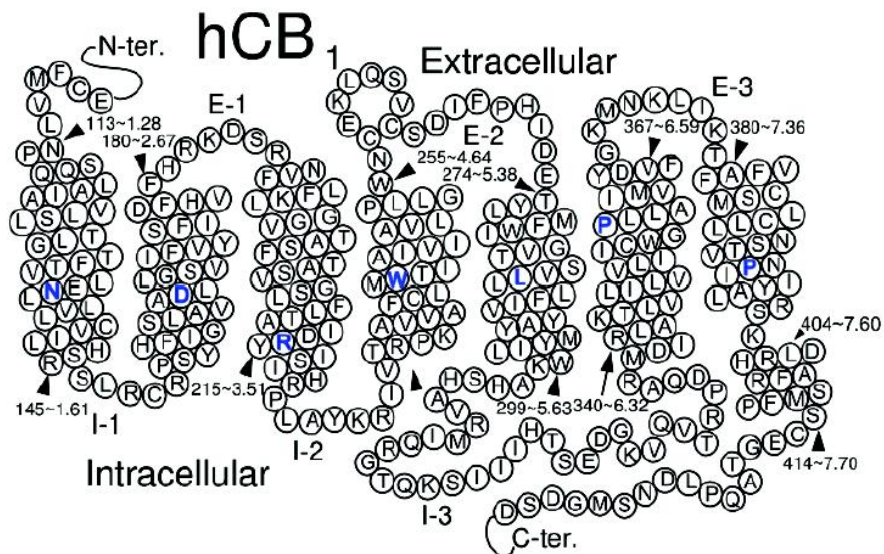


Figura 9. Recettore CB_1 umano.

La loro attivazione inoltre determina una iperpolarizzazione della membrana per fuoriuscita di ioni potassio. Entrambi questi eventi generano un

progressivo decadimento della trasmissione nervosa con conseguente riduzione della sensazione dolorifica (figura 10).

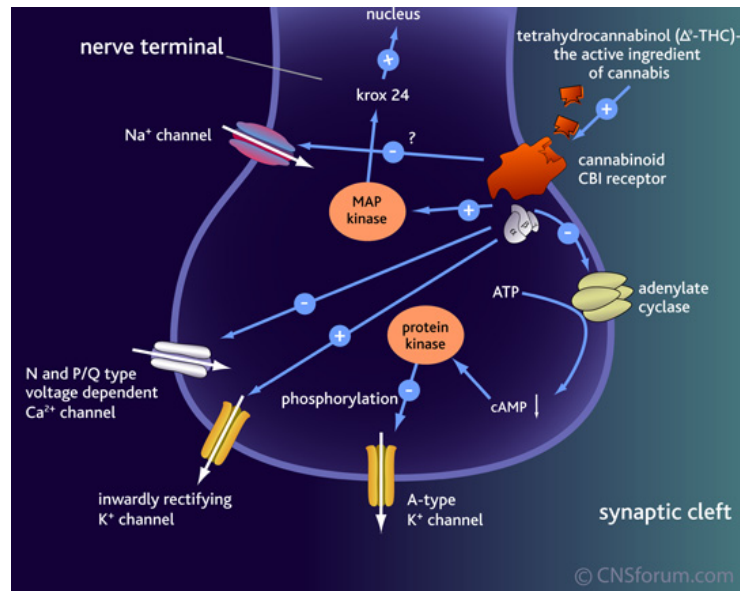


Figura 10. Effetti biologici dell'attivazione del recettore CB_1 .

I cannabinoidi possono anche modulare l'infiammazione neurogena inibendo la secrezione del peptide pro-infiammatorio CGRP e di altri eicosanoidi pro-infiammatori.

Inoltre l'azione antinocicettiva dei cannabinoidi sembrerebbe legata alla disinibizione indiretta del rilascio di:

- dopamina sui recettori D_2
- noradrenalina sui recettori adrenergici
- peptidi oppioidi sui recettori μ cerebrali e k spinali per gli oppioidi.

E' stato anche dimostrato un sinergismo tra cannabinoidi e oppioidi mediato dai recettori a livello spinale e sovra spinale: a livello spinale gli oppioidi attivano i recettori μ e δ , mentre i cannabinoidi attivano i recettori k ; a livello sovraspinale il sinergismo è mediato dai soli recettori μ .

L'identificazione dei recettori CB nel nostro organismo è stata assunta come presupposto dell'esistenza di ligandi endogeni che fisiologicamente agissero allo stesso modo dei cannabinoidi¹⁸.

I ligandi endogeni dei recettori CB sono costituiti da una famiglia di composti polinsaturi derivati principalmente dall'acido arachidonico, un acido grasso lipofilo, a 20 atomi di carbonio, con 4 insaturazioni nella catena acilica. Il primo cannabinoide endogeno, identificato e purificato in un estratto di cervello di maiale nel 1992, è stato l'anandamide (Figura 11)^{19,20}, prodotta per idrolisi enzimatica dell'*N*-arachidonil-fosfatidil-etanolamina e derivante formalmente dalla condensazione dell'acido arachidonico con l'etanolamina.

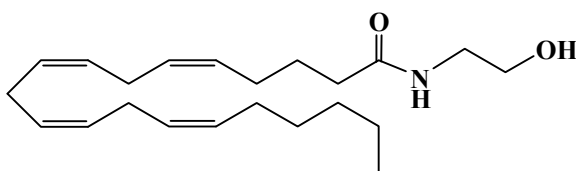


Figura 11. *Anandamide, il principale endocannabinoide.*

La breve durata d'azione di questo mediatore endogeno ne ha limitato lo studio dei meccanismi d'azione, infatti l'anandamide viene disattivata dalla Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)²¹ (figura 12) attraverso l'idrolisi del legame ammidico, oppure viene internalizzata nei neuroni e sottratta pertanto al circolo cerebrale.

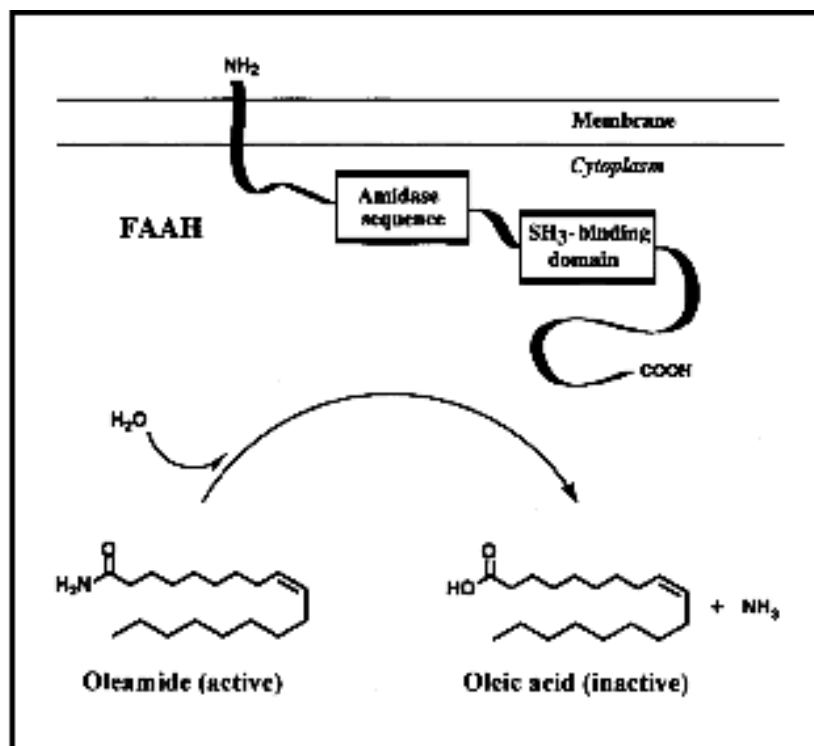


Figura 12. Meccanismo d'azione delle FAAH.

L'importanza del sistema endocannabinoide è oltremodo illustrata dalla recente scoperta che l'attività antinfiammatoria e analgesica dei FANS indometacina e tolmetina non è ristretta alla loro proprietà di inibire la ciclossigenasi, ma può parzialmente essere spiegata dalla loro interazione diretta con i recettori CB, o per inibizione dell'enzima FAAH²², al pari dei *non-AAI* precedentemente trattati (figura 13)^{8,23,24}.

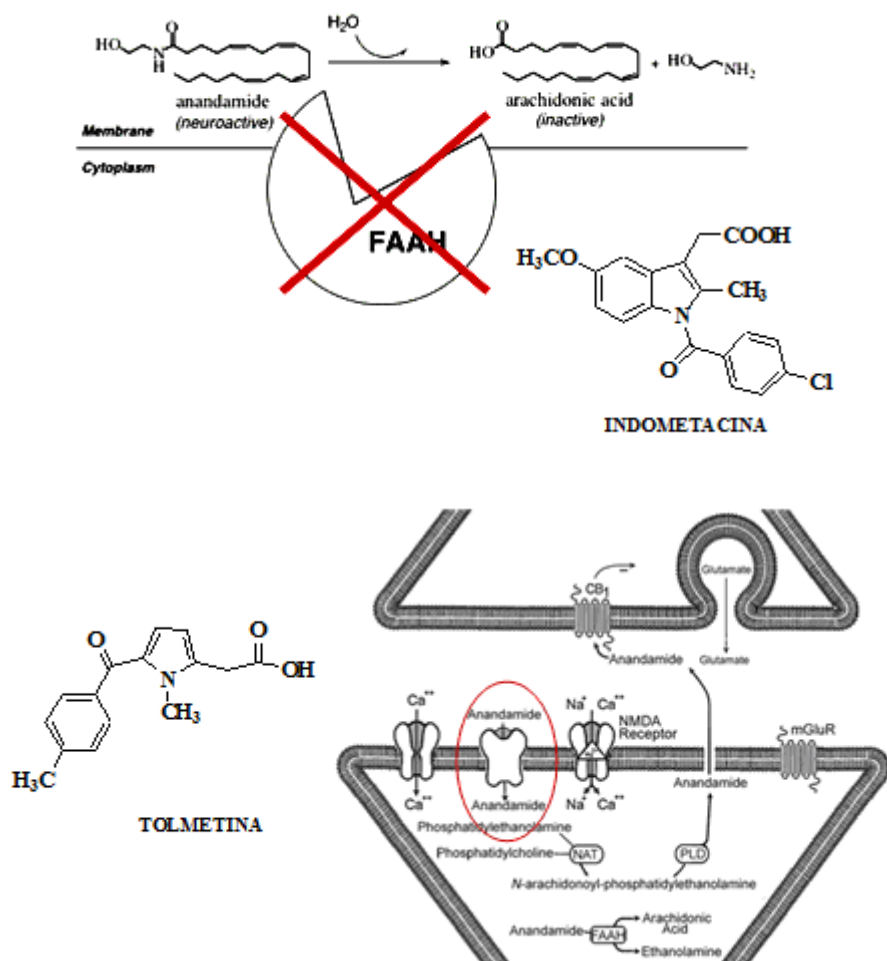


Figura 13. Interazioni tra FANS e sistema cannabinoide.

In seguito è stato messo in evidenza che l'anandamide non è l'unico ligando endogeno dei recettori dei cannabinoidi. Tra questi il più importante è il 2-arachidonil-glicerolo (2-AG)²⁵, dotato di un profilo sintetico e catabolico ben definito che chimicamente è correlato all'anandamide ed è espresso prevalentemente nel cervello (figura 14).

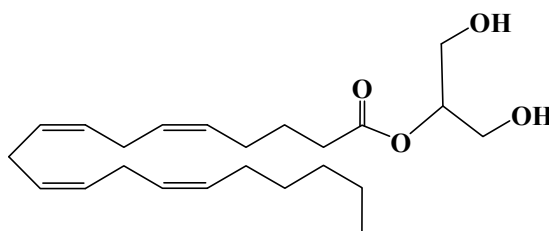


Figura 14. 2-arachidonilglicerolo (2-AG).

L'AEA, insieme alle altre aciletanolammidi endogene, può essere catalogata in una classe di agonisti CB, denominata “gruppo degli eicosanoidi”.

La ricerca ha di recente evidenziato l'esistenza di composti denominati “endocannabinoid-like”, in grado di agire come “entourage compounds”: essi in pratica non hanno un'affinità diretta per i recettori CB *in vitro*, ma sono in grado di potenziare l'azione del 2-AG e dell'anandamide. Tali effetti di entourage sono mediati da diversi meccanismi che includono una modulazione recettoriale e un'interferenza con la degradazione dei cannabinoidi, aumentandone la concentrazione nei siti d'azione e rafforzando così la loro azione biologica. I principali rappresentanti di questa categoria di composti sono: la palmitoiletanolammide (5), la stearoiletanolammide (6), l'oleoiletanolammide (7) e l'arachidonilglicina (8) (Figura 15)²⁶.

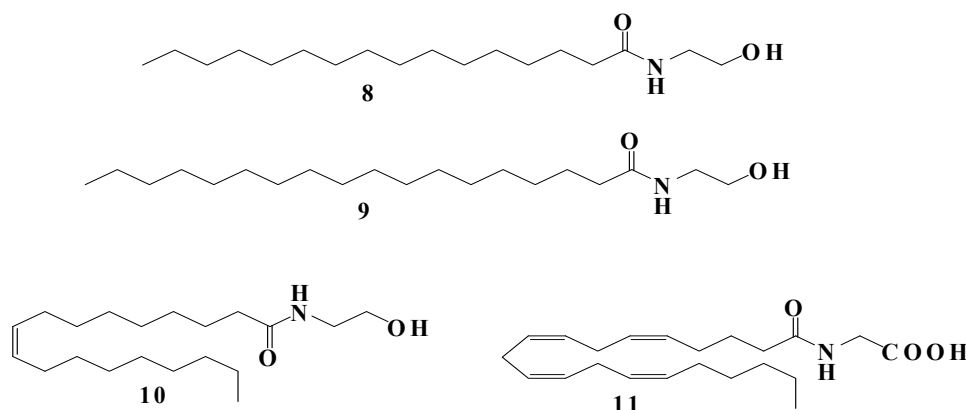


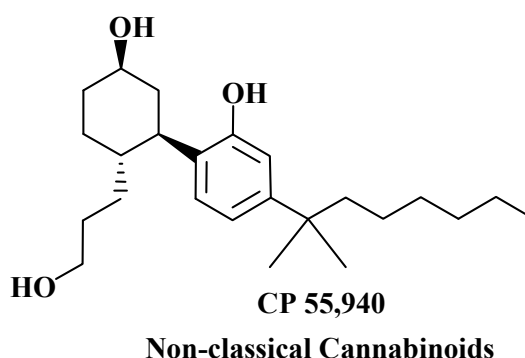
Figura 15. *Cannabinoidi endogeni ad azione mista.*

L'identificazione, la clonazione e la caratterizzazione biochimica dei recettori cannabinoidi, resa possibile dalla scoperta dei loro ligandi lipidici endogeni, ha dato nuovo impulso alla delucidazione della fisiologia di tale sistema²⁷ permettendo di estendere i bersagli farmacologici anche alle idrolasi e ad altre proteine trasportatrici^{28,29,30}.

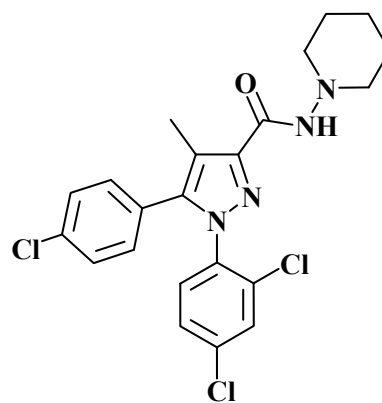
Queste scoperte hanno consentito, infatti, lo sviluppo di nuove generazioni di composti che hanno permesso sia di chiarire il ruolo fisiologico dei recettori cannabinoidi e dei loro ligandi endogeni, sia di caratterizzare ulteriormente la farmacologia dei recettori cannabinoidi, generando un rinnovato interesse nel loro potenziale terapeutico²².

Oltre agli AAI, ai fitocannabinoidi e agli eicosanoidi, possiamo così classificare altri importanti ligandi del recettore CB in ulteriori due classi, secondo la struttura chimica.

La prima classe è quella dei cosiddetti cannabinoidi “non classici”: consiste di analoghi biciclici e triciclici del Δ^9 -THC nei quali però manca l’anello piranico. Un importante membro di questo gruppo di composti è il CP 55,940, individuato nel 1988 e usato come radioligando triziato nei saggi di binding per i recettori cannabinoidi³¹.



La seconda classe è quella degli arilpirazoli, antagonisti del recettore CB₁. Il rimonabant (SR-141716a) ne è il principale esponente.



SR-141716A
Diarylpyrazoles

Nonostante le diversità strutturali, queste classi di molecole condividono una simile elevata lipofilia.

Per quanto riguarda la classe degli AAI, la definizione del modello farmacoforico e le ultime ipotesi di “docking” recettoriale forniscono la base per la progettazione di nuove molecole ad attività cannabinomimetica³².

Il modello che accomuna gli AAI tradizionali e i cannabinoidi classici prevede un sostituente aroilico in posizione 3 dell’indolo che mima il cicloesile del Δ^9 -THC, mentre la catena alchilica sull’azoto indolico e quella in posizione 3 dei tradizionali cannabinoidi sono coinvolte in interazioni lipofile nelle stesse regioni recettoriali. Non ci sono dati sufficienti in letteratura per stabilire se la porzione recettoriale con la quale interagiscono gli AAI e i *non*-AAI sia coincidente.

I più potenti analoghi degli AAI condividono tre porzioni farmacoforiche: un anello indolico, un gruppo amminico terziario e un gruppo naftilico. (Figura 16)²¹.

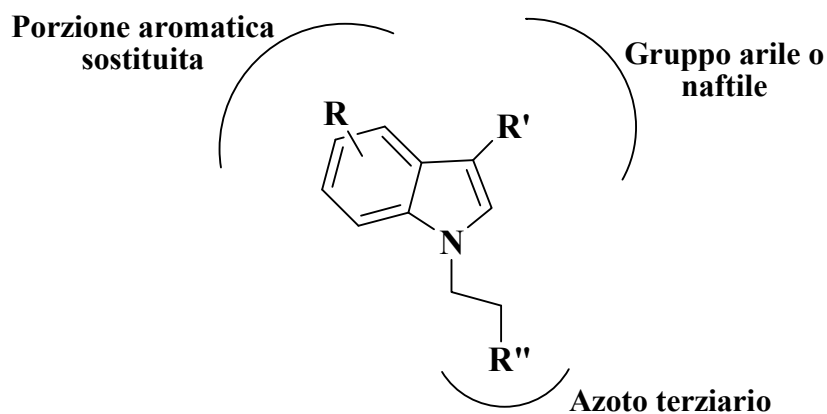


Figura 16. Requisiti strutturali degli amminoalchilindoli.

E' comunque da notare come i *non-AAI*, pur presentando una struttura che si allontana dai requisiti farmacoforici precedentemente determinati per gli amminoalchilindoli⁵, conservino la capacità di legare e attivare il recettore.

In accordo con queste ipotesi, il sito attivo del recettore CB₁ potrebbe quindi essere schematizzato come l'organizzazione di tre tasche lipofile distribuite intorno ad una porzione polare. (Figura 17)³³.

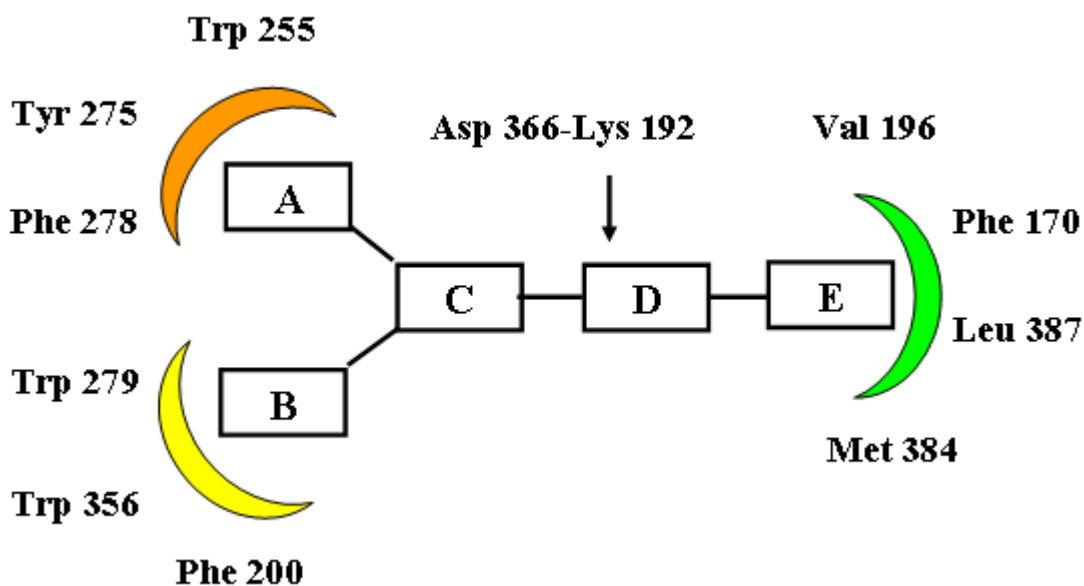


Figura 17. Organizzazione delle tasche del recettore CB₁.

IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

Sulla base dei requisiti strutturali dei più potenti amminoalchilindoli, il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente sintetizzato una serie di molecole che hanno mostrato una interessante attività analgesica mediata dalla interazione con i recettori CB₁ del sistema cannabinoide.

Tali composti erano caratterizzati da un nucleo indolico o indol-2,3-dionico, una catena alchilamminica o alchilamidica e una funzione imminoarilica o amminoarilica (figura 18).

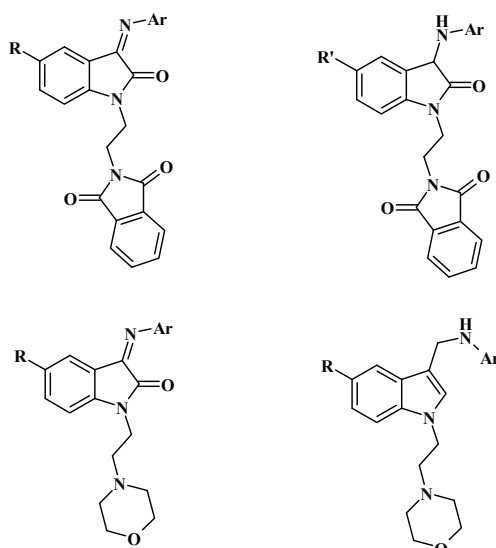


Figura 18. Molecole precedentemente sintetizzate.

Allo scopo di chiarire ulteriormente le correlazioni struttura attività di queste molecole, in questa tesi viene presentata la progettazione razionale e la sintesi di sei nuovi set di composti, in cui il nucleo indolico o indolonico viene invariabilmente sostituito dal nucleo pirrolico, coerentemente con la validità di questa sostituzione nel passaggio dagli AAI ai derivati *non*-AAI pirrolici (figura 19).

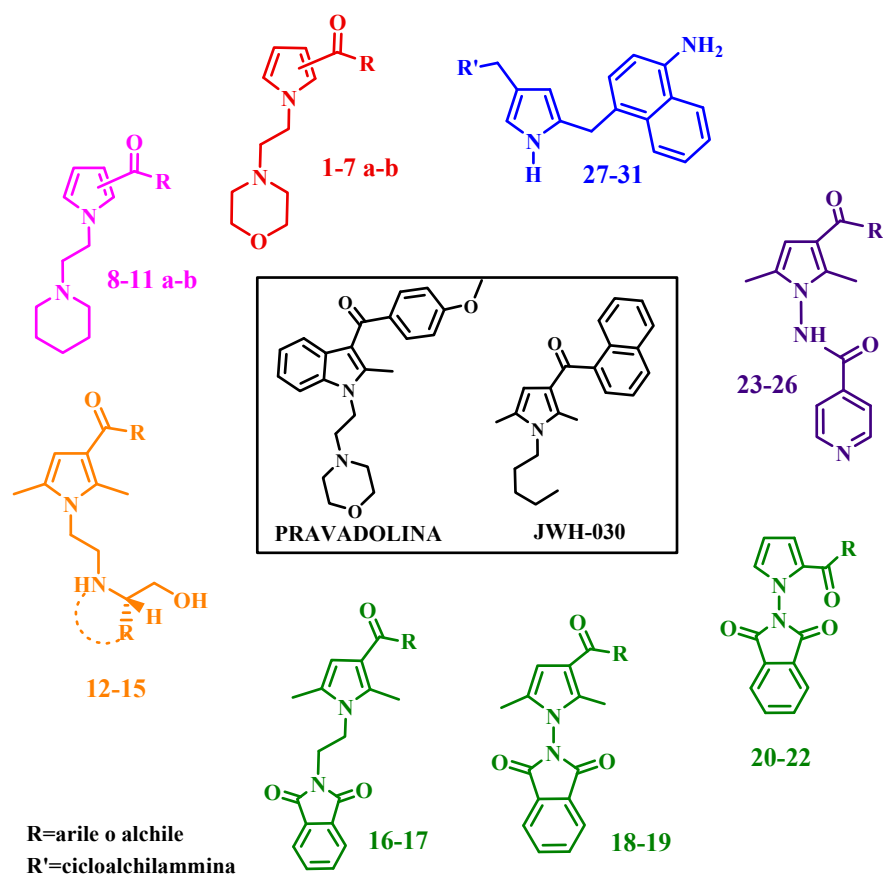


Figura 19. Molecole sintetizzate.

Nell'intento di aumentare la diversità molecolare di questi nuovi derivati pirrolici, i diversi set di composti sintetizzati variano nella natura chimica dei gruppi sostituenti sul nucleo di base e nella posizione reciproca.

Di seguito vengono illustrate le caratteristiche di ciascuna serie di composti.

I serie- derivati morfolinici 1-7a ed 1-7b: il nucleo pirrolico presenta un residuo aromatico o alifatico variabile in posizione 2 o 3 e un sostituito etilmorfolinico fisso in posizione 1 (figura 20), con lo scopo di studiare la relazione tra l'attività cannabinomimetica e l'orientazione e la natura chimica dei sostituenti e verificare l'importanza del nucleo morfolinico, tipico degli AAI più potenti ma non dei *nonAAI* pirrolici.

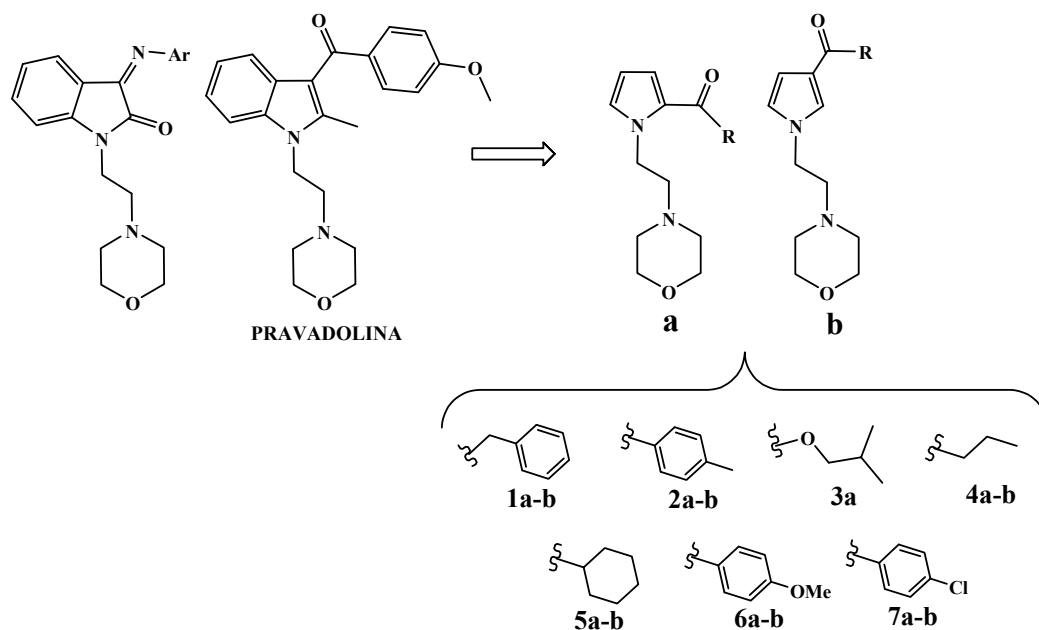


Figura 20. Struttura generale dei composti della serie morfolinica.

II serie- derivati piperidinici 8-11a ed 8-11b: per definire il ruolo dell'ossigeno morfolinico nei confronti del legame al sito recettoriale, il nucleo pirrolico presenta un sostituito etilpiperidinico fisso in posizione 1 e un residuo aromatico variabile in posizione 2 o 3 del pirrolo (figura 21).

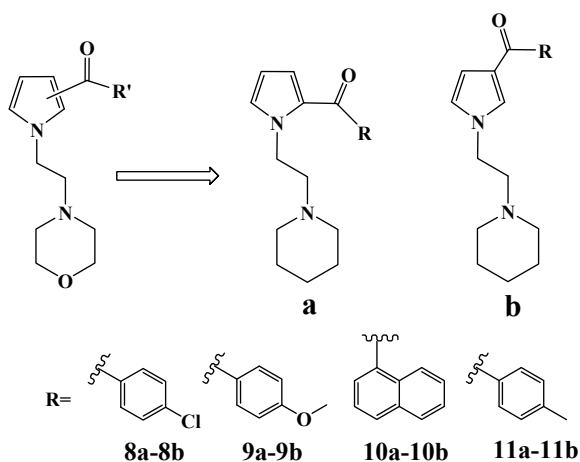


Figura 21. Struttura generale dei composti della serie piperidinica.

III serie- *derivati amminoalcolici* 12-15: in posizione 1 dell'anello pirrolico è presente una porzione N-etil- β -amminoalcolica chirale variabile derivata rispettivamente dagli amminoacidi L-Alanina, L-Valina, L-Prolina ed L-Fenilalanina.; la posizione 3 è occupata da un residuo *p*-metossibenzoilico fisso, in analogia alla Pravadolina (figura 22).

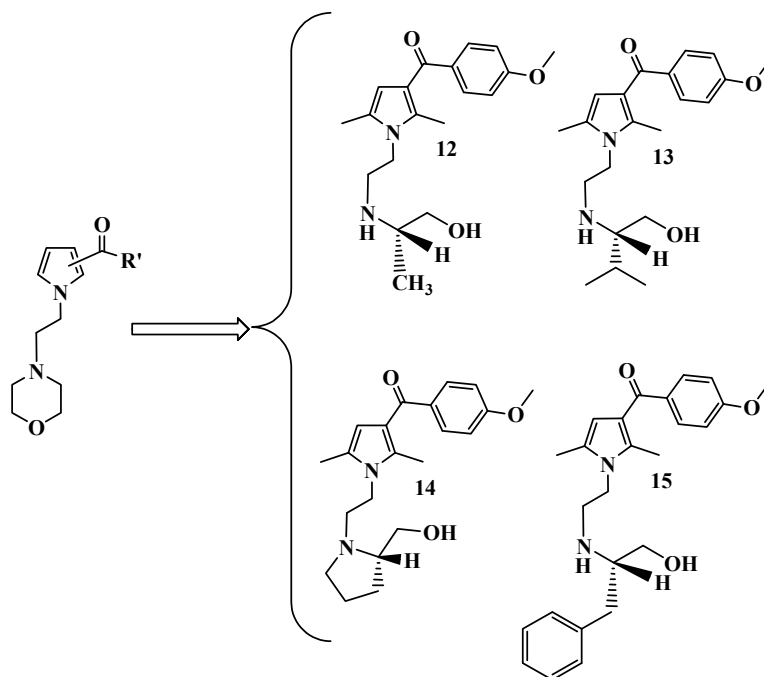


Figura 22. *Struttura generale dei composti della serie amminoalcolica.*

La porzione β -amminoalcolica chirale può rappresentare un'alternativa al nucleo morfolinico, poichè i doppietti liberi dell'N e dell'O conservano una simile disposizione spaziale; inoltre, l'introduzione di un centro chirale in questa porzione molecolare può contribuire a chiarire la disposizione spaziale dell'O in sede di interazione con il sito CB₁, favorendo l'instaurarsi di più forti legami idrogeno con il backbone di una delle tasche recettoriali (Figura 23).

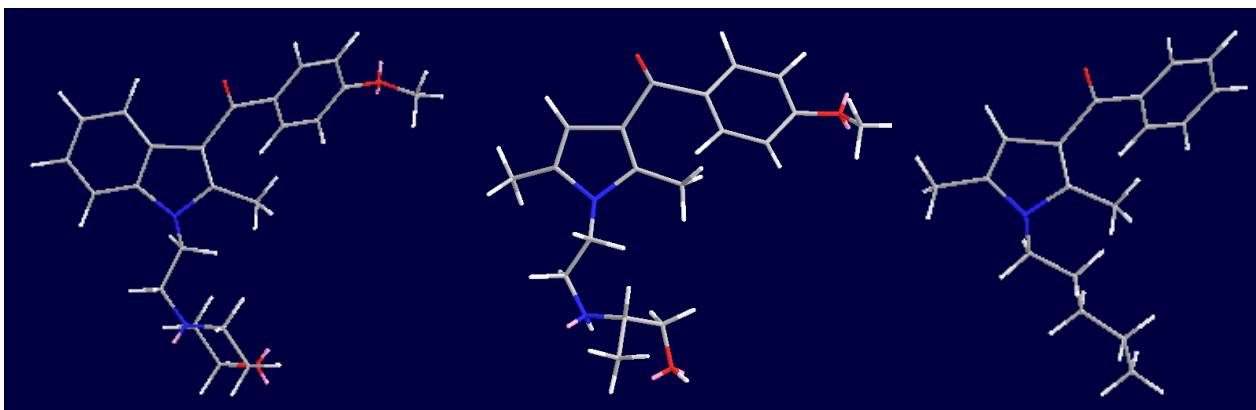


Figura 23. Confronto tra le strutture a minimo energetico della pravastatina, del composto 12 e del nonAAI-10b⁵, rispettivamente.

Infine, la differente struttura dei quattro β -amminoalcoli utilizzati consente di poter analizzare gli effetti della presenza di sostituenti diversi sulla interazione con il sito recettoriale, ad esempio l'eventuale possibilità di interazioni lipofile o π -stacking e la disponibilità di spazio occupabile nella tasca recettoriale.

IV serie- derivati ftalimmidici 16-22: l'anello pirrolico presenta un residuo aroilico variamente sostituito; in posizione 1 viene mantenuto il sostituente ftalimmidico caratteristico degli esponenti indolonici più attivi. In alcuni composti della serie è stata effettuata l'eliminazione del linker etilenico (figura 24).

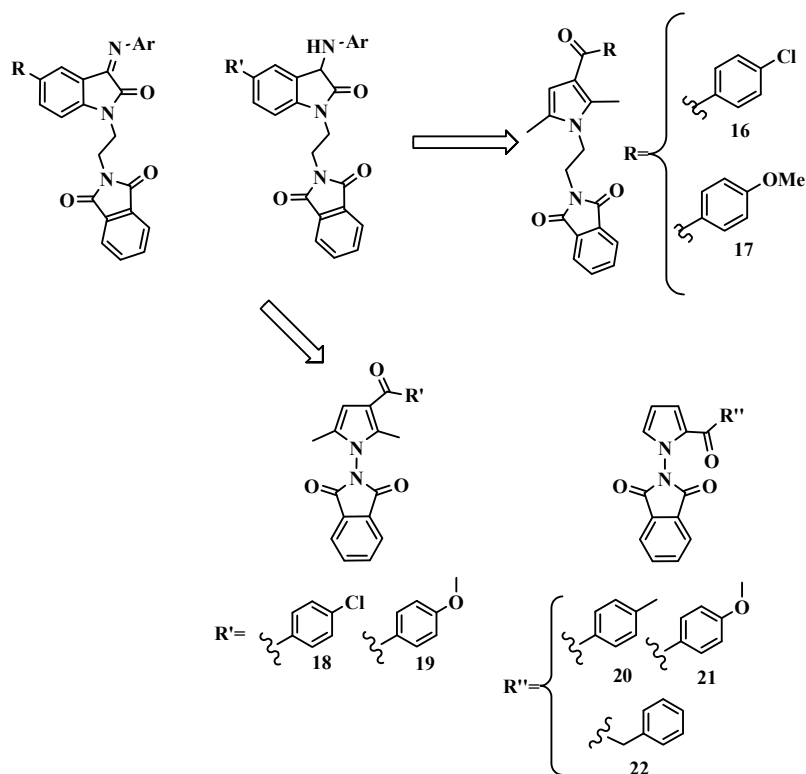


Figura 24. Struttura generale dei composti della serie falimimidica.

V serie- derivati piridinici 23-26: un nucleo pirrolico di base supportante in posizione 3 una porzione aromatica variamente sostituita, mentre in posizione 1 è stato posto un sostituito fisso di natura piridincarbossammidica. Questo per verificare l'effetto di una diminuzione della flessibilità di questa porzione della molecola sulla capacità di interagire con il recettore CB₁ e nel contempo consentire la formazione di eventuali legami H o π -stacking con la controparte recettoriale (figura 25).

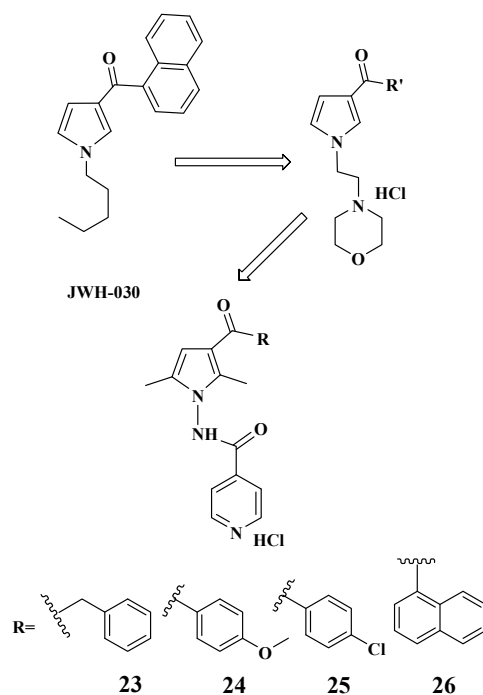
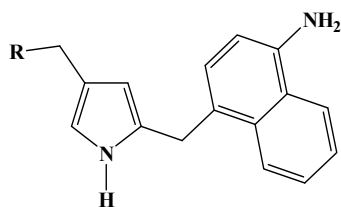


Figura 25. *Struttura generale dei composti della serie piridinica.*

VI serie- derivati dialchilpirrolici 27-31: un nucleo pirrolico sostituito in posizione 2 da un residuo fisso metilene-4-naftilamminico e diversamente sostituiti in posizione 4 con diverse ammine cicliche mediante un linker metilenico (Figura 26).



COMPOSTO	R
27	
28	
29	
30	
31	

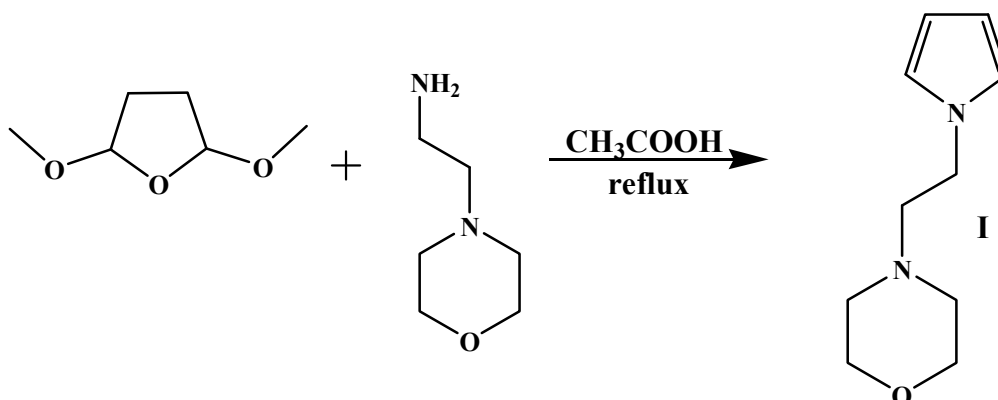
Figura 26. *Struttura generale dei 2,4-dialchilpirroli.*

PARTE CHIMICA

Sintesi dei derivati morfolinici (1-7a e 1-7b).

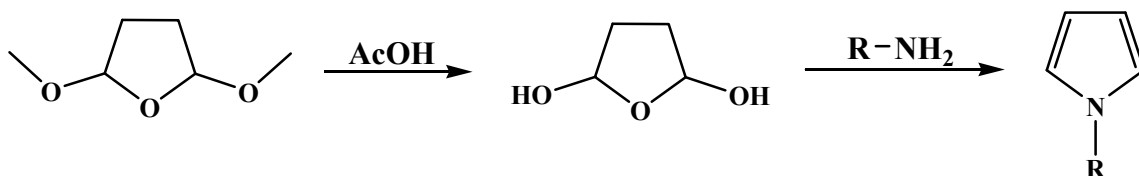
I prodotti di questa serie sono stati preparati in due step.

Il primo step prevede l'applicazione della metodica di Clauson-Kaas^{34,35,36,37}, che sfrutta la condensazione tra il 2,5-dimetossitetraidrofurano su una ammina primaria per produrre un nucleo pirrolico. In particolare, i composti sono stati preparati utilizzando la 1-(2-amminoetil)-morfolina come substrato di partenza comune. La reazione viene condotta in acido acetico glaciale a riflusso, come mostrato nella schema 1.



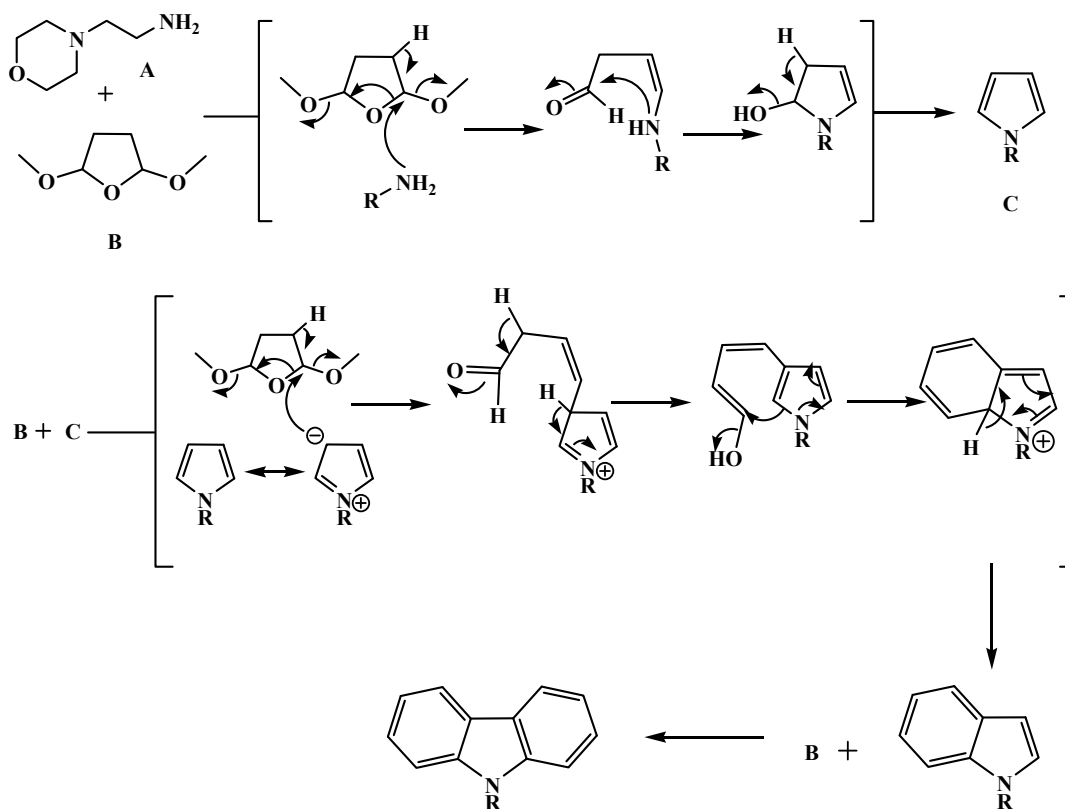
SCHEMA 1

In effetti l'unico ruolo dell'acido acetico sembra essere quello di promuovere l'idrolisi del 2,5-dimetossitetraidrofurano che porta alla formazione della dialdeide, più reattiva nel favorire l'attacco nucleofilo dell'ammina primaria con la successiva formazione del pirrolo (schema 2).



SCHEMA 2

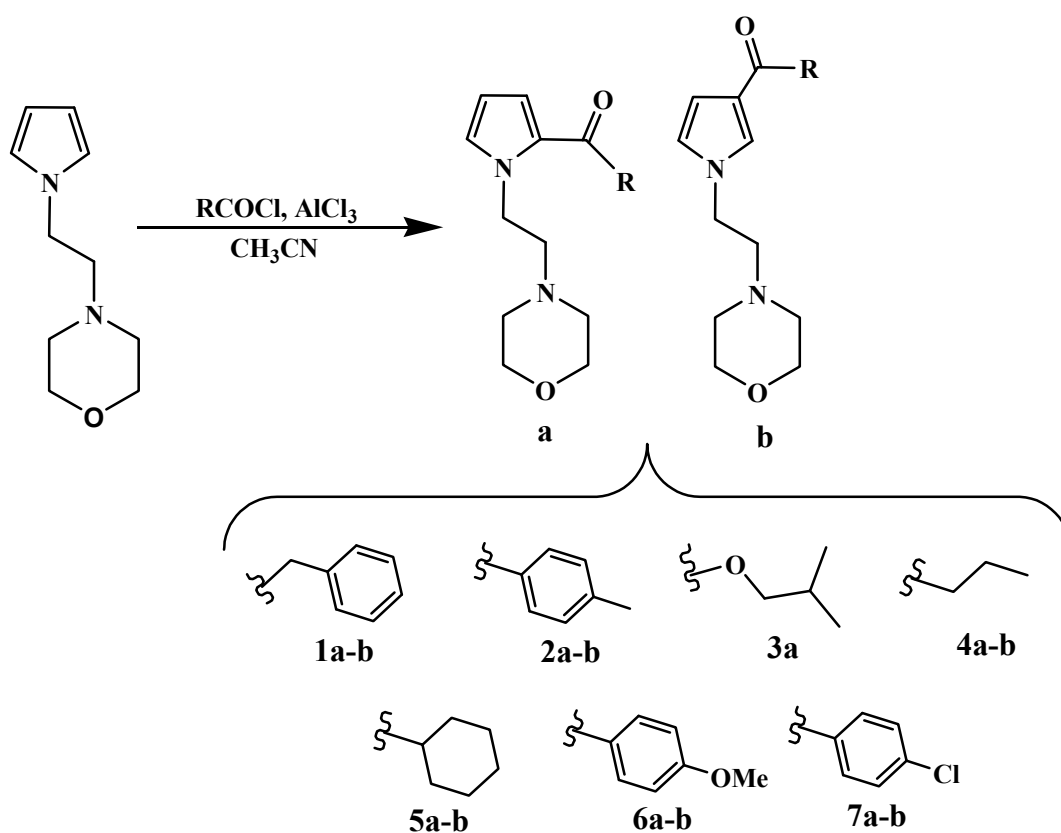
Il tentativo di aumentare le rese tramite l'uso di un eccesso di 2,5-dimetossitetraidrofurano ha portato alla formazione di prodotti a nucleo indolico e carbazolico, con un calo drastico delle rese in pirrolo, come mostrato nello schema 3.



SCHEMA 3

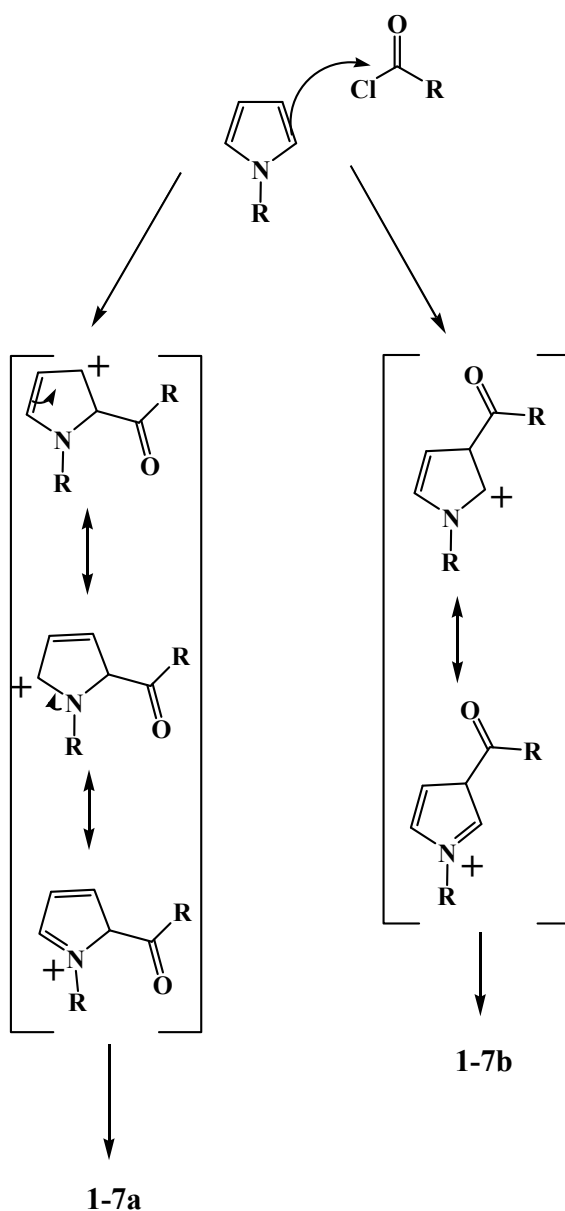
Le condizioni migliori per l'ottenimento dell'intermedio pirrolico hanno richiesto l'aggiunta goccia a goccia di 1 equivalente di 2,5-dimetossitetraidrofurano, in un intervallo di 30 minuti.

Il secondo step per la preparazione dei prodotti finali ha richiesto l'applicazione di una classica reazione di Friedel-Crafts^{38,39}, che ha consentito la sostituzione nelle posizioni 2 e 3 dell'anello pirrolico e l'ottenimento di due serie parallele di acilpirroli (schema 4).



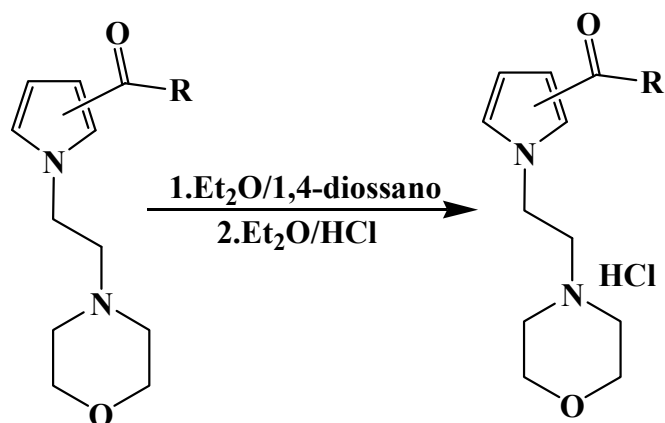
SCHEMA 4

La reazione ha fornito sempre con rese maggiori il prodotto sostituito in posizione 2 (serie a), come d'accordo con la diversa stabilità degli stati di transizione relativi alla sostituzione elettrofila aromatica nelle posizioni 2 e 3 del pirrolo (schema 5).



SCHEMA 5

Infine, per facilitare la valutazione dell'attività farmacologica, sono stati preparati i sali cloridati, solubilizzando i prodotti finali in una miscela di etere etilico e 1,4-diossano e aggiungendo goccia a goccia etere etilico saturo di acido cloridrico fino alla completa precipitazione del sale (schema 6).



SCHEMA 6

Sintesi dei derivati piperidinici (8-11a e 8-11b).

La sintesi dei composti 8-11a e 8-11b è analoga a quella dei composti della serie morfolinica e ha richiesto l'applicazione dei medesimi accorgimenti. La metodica sintetica è descritta, come per tutti i composti presentati, nella PARTE SPERIMENTALE.

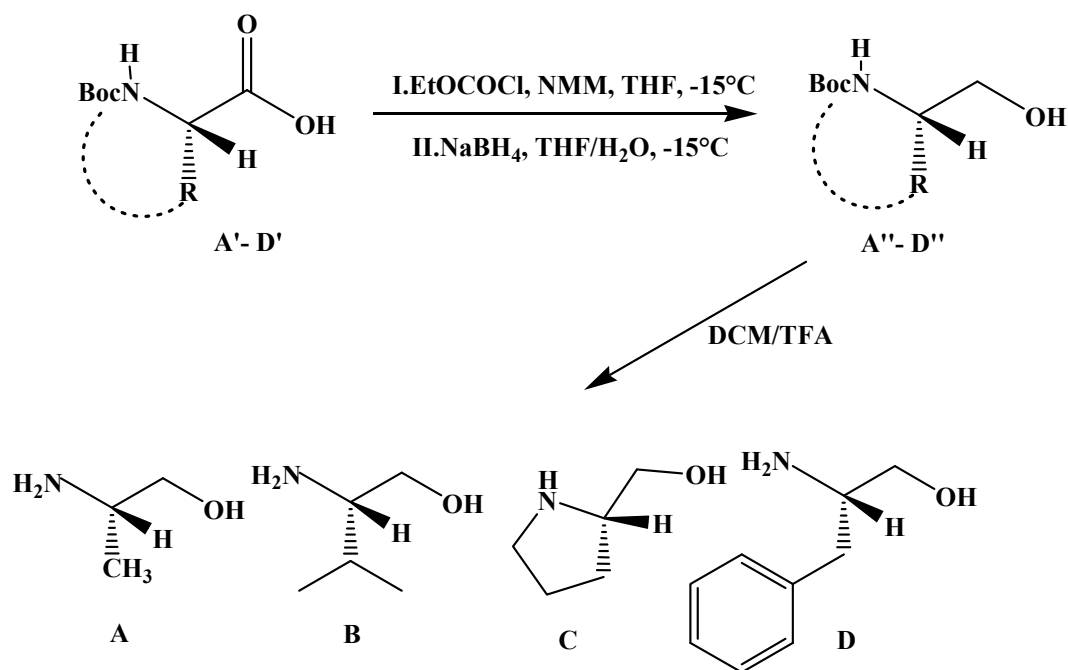
Sintesi dei derivati amminoalcolici (12-15).

La sintesi dei prodotti **12-15** prevede tre fasi.

La prima fase è costituita dalla riduzione dell'appropriato Boc-L- α -amminoacido mediante formazione di una anidride mista intermedia per reazione con etilcloroformiato e N-metimorfolina in THF a -15° C. Successivamente viene effettuata la riduzione *in situ* tramite l'aggiunta di una soluzione acquosa di NaBH_4 .

Tale metodica consente di ottenere un prodotto di riduzione enantiomericamente puro e con ottime rese.

Si prosegue con la deprotezione del gruppo amminico mediante la metodica generale per la rimozione del gruppo Boc e il grezzo è usato direttamente per la reazione di sostituzione nucleofila (schema 7).



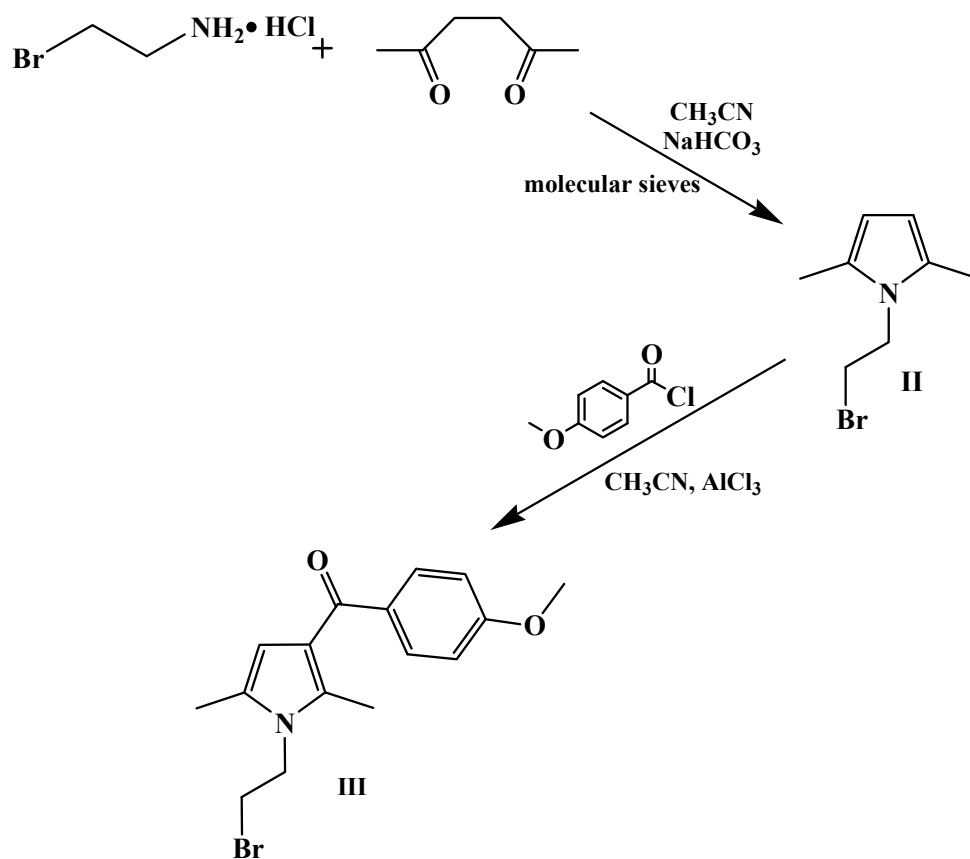
SCHEMA 7

La seconda fase della sintesi (schema 8) riguarda la preparazione del 3-*p*-anisoilpirrolo intermedio realizzata in due tempi:

- il primo step prevede la formazione del N-(2-bromo)-etil-2,5-dimetilpirrolo **II** attraverso la sintesi dei pirroli di Paal-Knorr^{40,41,42,43}, utilizzando come substrati la bromoetilammina bromidrato e l'acetone in presenza di NaHCO₃.

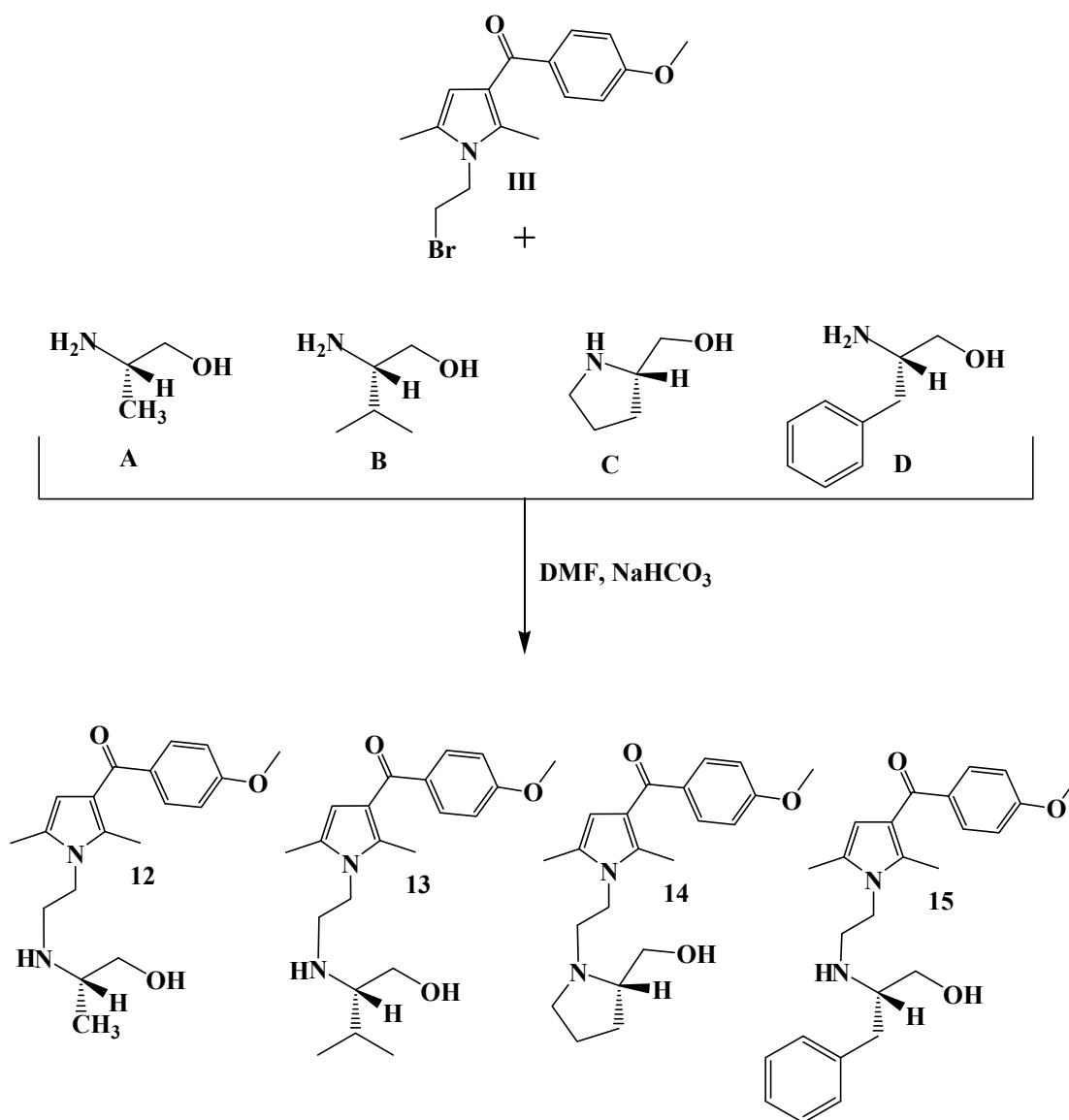
Durante questa reazione, la liberazione della bromoetilammina dal suo sale per mezzo del bicarbonato provoca in parte la formazione di prodotti collaterali dovuti alla sostituzione nucleofila tra le molecole dell'ammina (il bromo è un ottimo gruppo uscente anche in blande condizioni di reazione). L'aggiunta di setacci molecolari favorisce la formazione del pirrolo riducendo la formazione di composti secondari.

- Nel secondo step si procede alla derivatizzazione dell'intermedio pirrolico mediante una acilazione di Friedel-Crafts effettuata con il cloruro di *p*-anisoile in presenza di tricloruro di alluminio come catalizzatore. Il prodotto



SCHEMA 8

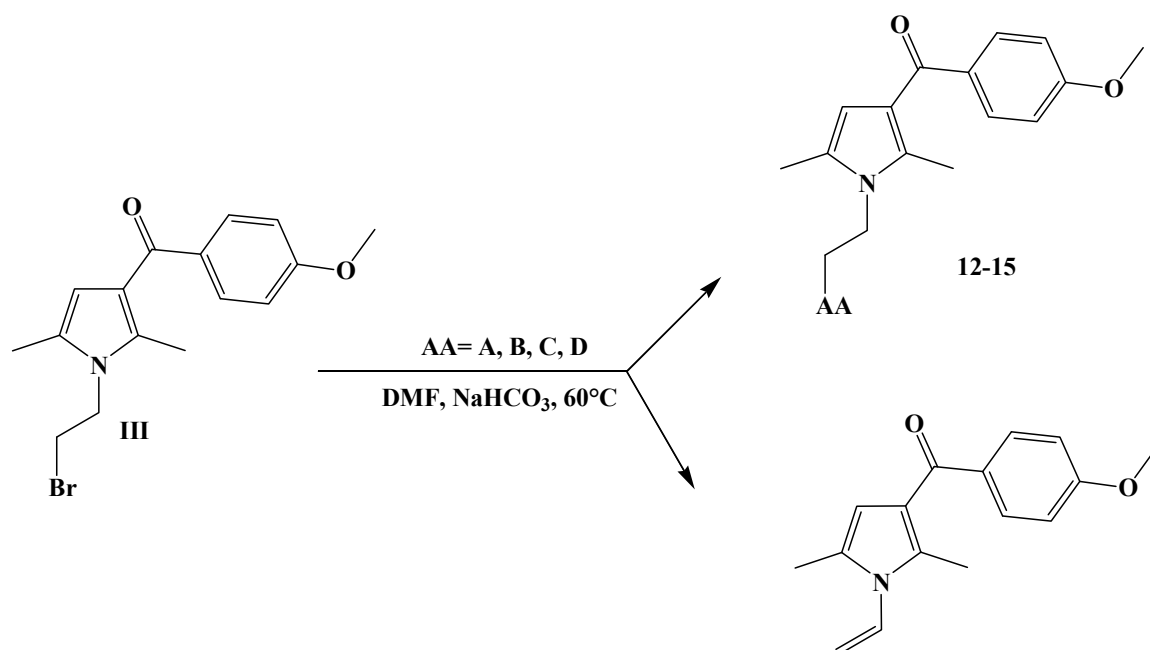
Il terzo ed ultimo step della sintesi prevede una sostituzione nucleofila^{44,45} tra gli intermedi prodotti nelle precedenti reazioni, come mostrato nello schema 9.



SCHEMA 9

Quest'ultima fase è risultata la più complessa ed ha richiesto un attento studio delle condizioni di reazione per aumentare le rese.

La maggiore difficoltà riscontrata consiste nell'inibire una reazione di eliminazione parallela (schema 10) che sottrae alla sostituzione una quota dell'intermedio **III**.



SCHEMA 10

La formazione del prodotto collaterale può essere convenientemente ridotta a beneficio dei prodotti finali mediante il controllo della temperatura, infatti l'eliminazione si realizza più lentamente e con minori rese quando la reazione viene condotta a temperature inferiori ai 60 °C.

Tuttavia, a tali temperature, i tempi per l'ottenimento dei prodotti finali variano da 1 a 3 giorni a seconda del substrato β -amminoalcolico utilizzato e ciò consente comunque la formazione di una abbondante quota del prodotto collaterale, risultando così cineticamente più favorita la reazione di eliminazione.

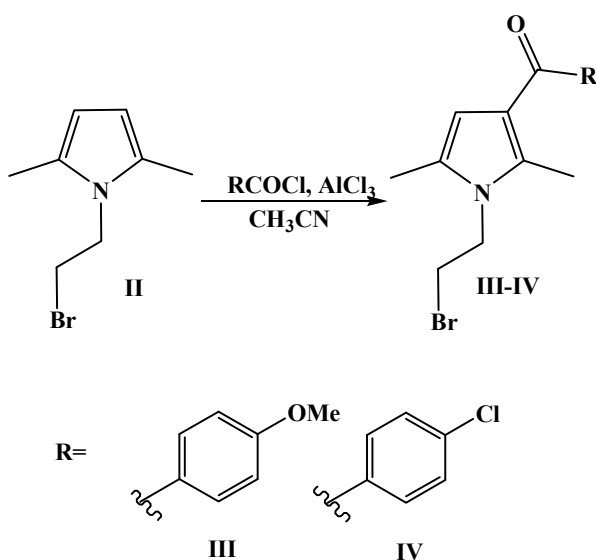
L'aggiunta di quantità catalitiche di NaI^{46} per favorire la reazione di sostituzione nucleofila, non ha comportato evidenti miglioramenti, inoltre il passaggio dal bromo al cloro ha consentito l'ottenimento del pirrolo con rese maggiori, ma non ha reso possibile la formazione dei prodotti finali, confermando il miglior carattere di gruppo uscente del bromo.

Le rese dei prodotti finali sono risultate fortemente dipendenti dalla struttura del substrato β -amminoalcolico, in particolar modo dall'ingombro

sterico. Infatti, le rese migliori sono state ottenute lavorando sui derivati di L-Alanina (**A**) ed L-Prolina (**C**). In quest'ultima, in particolare, l'N del nucleo pirrolidinico ha un carattere più nucleofilo poiché è un azoto secondario e il doppietto risulta più esposto e disponibile ad un attacco nucleofilo. Nel caso dei derivati di L-Valina (**B**) ed L-Fenilalanina (**D**), le rese sono state più basse e i tempi più lunghi probabilmente a causa del maggiore ingombro sterico dei residui rispettivamente isopropilico e benzilico.

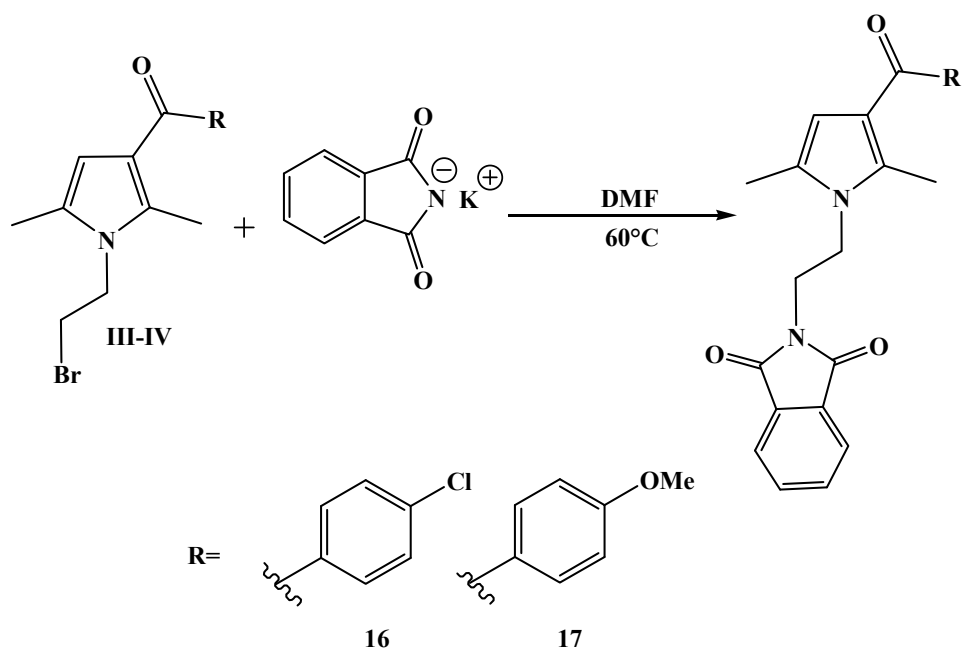
Sintesi dei derivati ftalimmidici (16-22).

La sintesi dei composti **16** e **17** prevede 3 fasi consecutive. Le prime due fasi consistono nella sintesi di Paal-Knorr dell'intermedio **II**, come precedentemente descritto, e nella successiva reazione di acilazione di Friedel-Crafts, per l'ottenimento dei prodotti **III** e **IV** (schema 11).



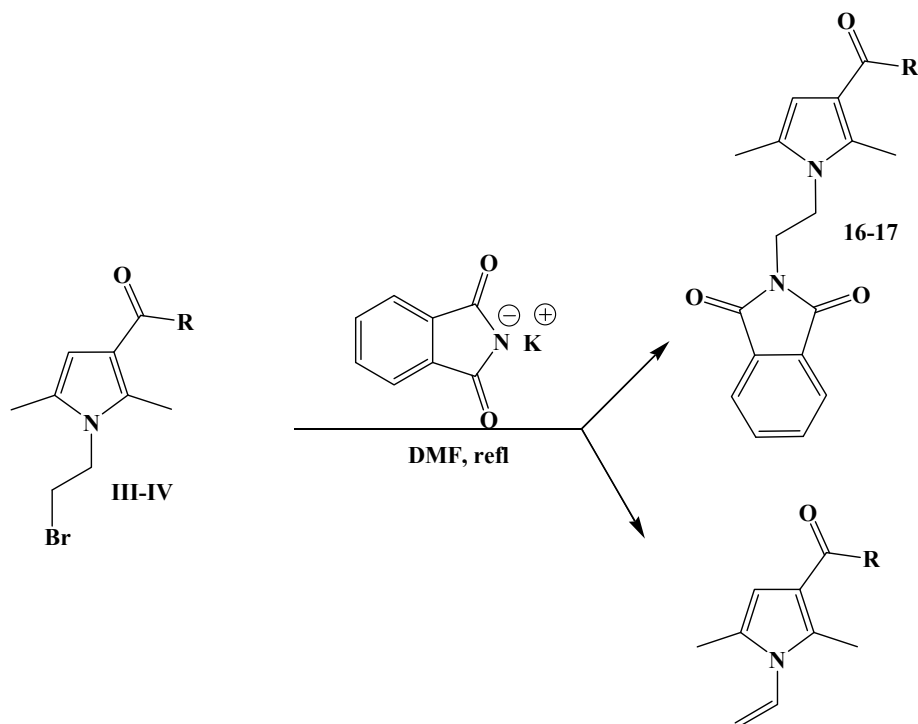
SCHEMA 11

La terza ed ultima fase per la preparazione dei prodotti finali prevede una sostituzione nucleofila tra la potassio ftalimmide e il bromoetilderivato pirrolico sintetizzato nei precedenti due passaggi, condotta in DMF (schema 12).



SCHEMA 12

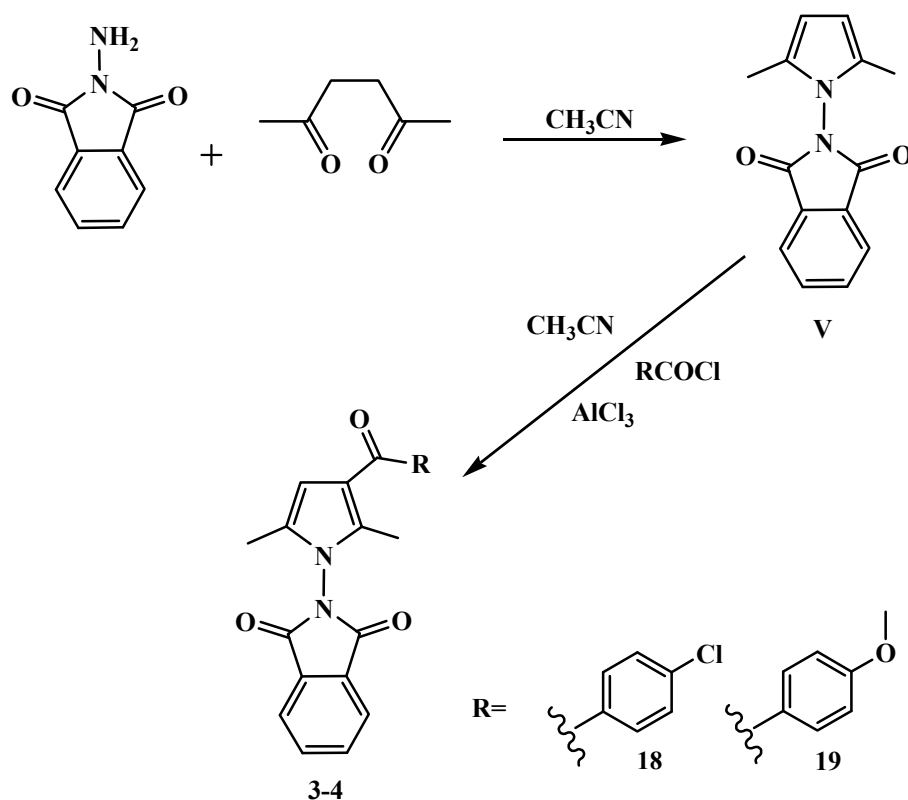
Per inibire la reazione di eliminazione parallela (schema 13), sono stati applicati gli accorgimenti precedentemente descritti.



SCHEMA 13

La preparazione dei prodotti **18** e **19** è analoga ai composti **16** e **17** e viene effettuata in due passaggi (schema 14).

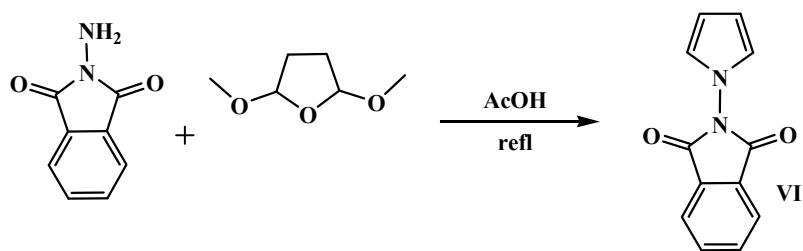
Il primo consiste nella reazione di Paal-Knorr condotta sulla N-amminofalimide per l'ottenimento dell'intermedio pirrolico **V** che, purificato tramite una filtrazione su gel di silice, viene sottoposto ad una reazione di acilazione di Friedel-Crafts (secondo passaggio).



SCHEMA 14

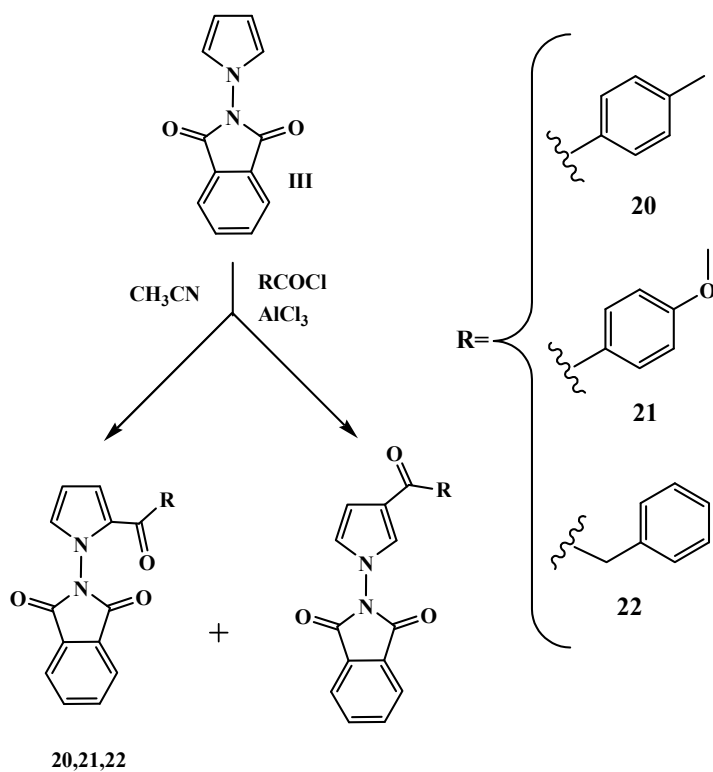
La preparazione dei composti **20-22** è analoga ai composti **1-7a** e **1-7b** e prevede l'applicazione di due passaggi.

Il primo prevede l'applicazione della metodica di Clauson-Kaas, utilizzando la N-amminofalimide come substrato di partenza comune (schema 15).



SCHEMA 15

Il secondo passaggio ha richiesto l'applicazione della reazione di Friedel-Crafts (schema 16). Come precedentemente descritto, la reazione consente la sostituzione dell'intermedio **VI** nelle posizioni 2 e 3 dell'anello pirrolico, tuttavia nelle condizioni sperimentali usate, non è stato possibile ottenere i 3-acilpirroli in quantità rilevanti. I prodotti **20**, **21** e **22** preparati sono a struttura 2-acilpirrolica.

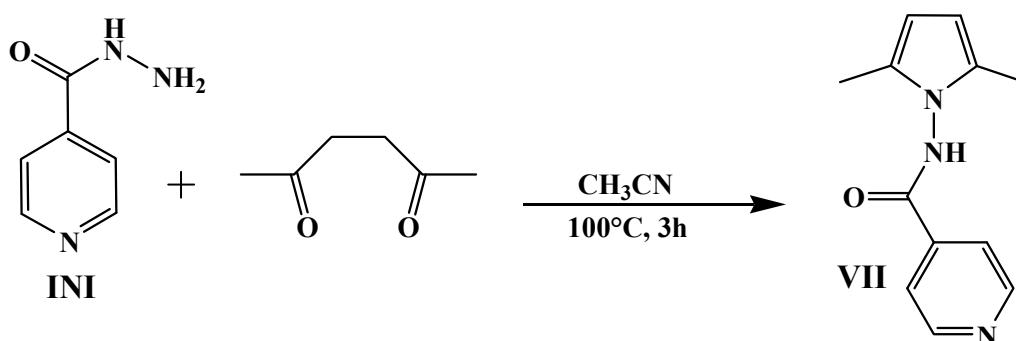


SCHEMA 16

Sintesi dei derivati piridinici (23-26).

La sintesi di questi composti si articola in due fasi.

La prima fase consiste in una classica reazione di Paal-Knorr condotta con acetilacetone sulla idrazide dell'acido isonicotinico (isoniazide-**INI**) in acetonitrile anidro come solvente e portando la miscela a temperatura di riflusso (schema 17).



SCHEMA 17

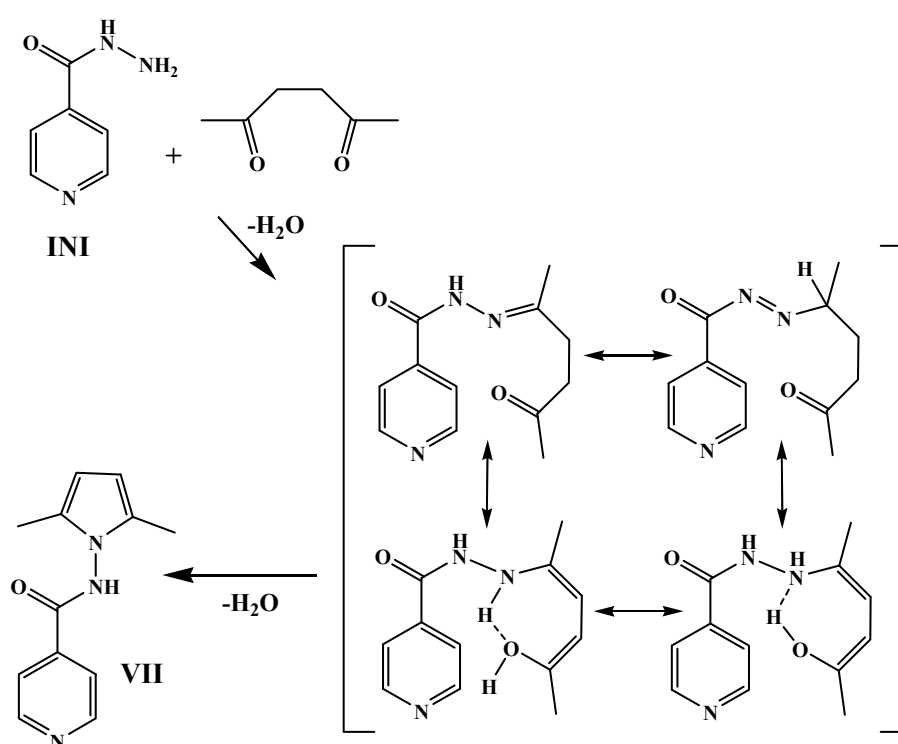
La scelta di tali condizioni dipende dalle caratteristiche di solubilità dell'isoniazide. Infatti la reazione, condotta a temperatura ambiente e in diversi solventi organici, non ha fornito il prodotto desiderato in misura apprezzabile a causa della mancata solubilizzazione del prodotto di partenza. Il riscaldamento a temperatura di ebollizione non ha portato ad incrementi significativi delle rese, con l'eccezione dell'acetonitrile, che ha permesso la solubilizzazione dell'INI, in presenza dell'acetilacetone.

Durante la reazione, tuttavia, si osserva un intorbidimento della soluzione dovuto alla riprecipitazione di una quota dell'isoniazide. Tale intorbidimento è però solo temporaneo, poiché, dopo pochi minuti la miscela di reazione ritorna ad essere limpida.

Il cambiamento nella solubilità dell'isoniazide è probabilmente legato alla presenza dell'acetilacetone e alle variazioni della sua concentrazione

nella miscela. Infatti, la presenza dell'acetilacetone nelle fasi iniziali della reazione favorisce la dissoluzione dell'isoniazide, fungendo probabilmente da cosolvente. Durante la reazione, la percentuale di acetilacetone in soluzione diminuisce, causando la riprecipitazione della isoniazide.

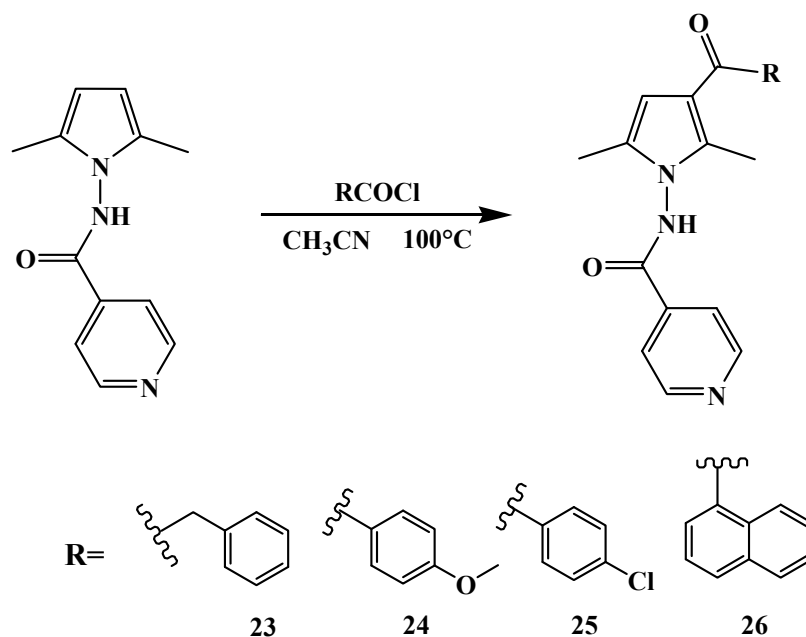
Tuttavia la reazione sembra comunque proseguire e la miscela riacquista le caratteristiche di una soluzione per la formazione del prodotto finale, solubile in acetonitrile (schema 18).



SCHEMA 18

Al termine di questa prima fase, la miscela di reazione viene raffreddata a -10°/-5°C in modo da precipitare l'isoniazide che non ha reagito. L'intermedio pirrolico così ottenuto ha un grado di purezza tale da consentirne l'utilizzo nella successiva fase, evitando l'uso di metodi cromatografici e riducendo i tempi di sintesi dei prodotti finali.

La seconda fase consiste in una classica acilazione di Friedel-Crafts (schema 19).

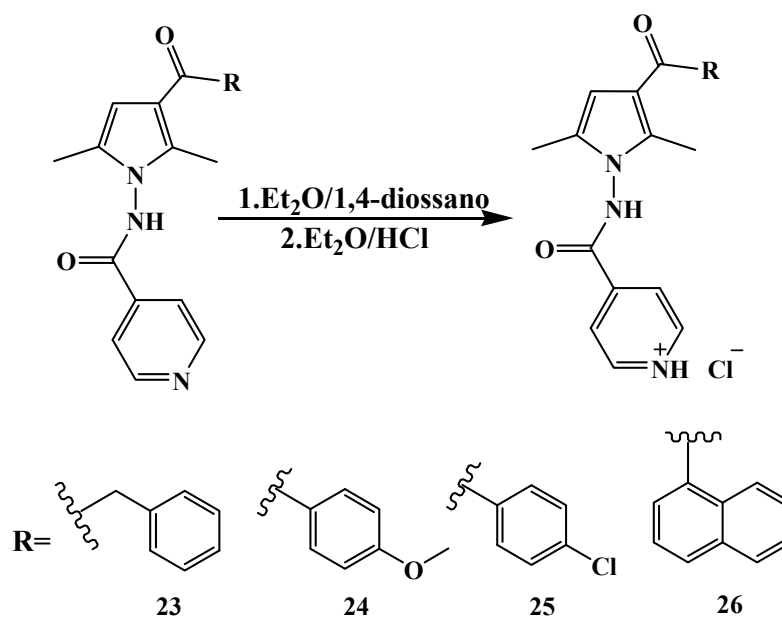


SCHEMA 19

La neutralizzazione finale dell' AlCl_3 con una soluzione acquosa satura di Na_2CO_3 e la successiva estrazione del prodotto finale con un solvente organico, secondo una metodica di work-up già utilizzata per la preparazione di analoghi acilpirroli, non ha consentito di ottenere il prodotto finale con rese accettabili, a causa della buona solubilità della molecola in acqua.

Per ovviare a tale problema, la miscela di reazione è stata posta sotto agitazione elettromagnetica in un bagno di ghiaccio e sale, e l' AlCl_3 è stato neutralizzato mediante l'aggiunta goccia a goccia di trietilammina. Il grezzo così ottenuto è pronto per essere sottoposto ad una purificazione cromatografica fornendo il prodotto finale con ottime rese.

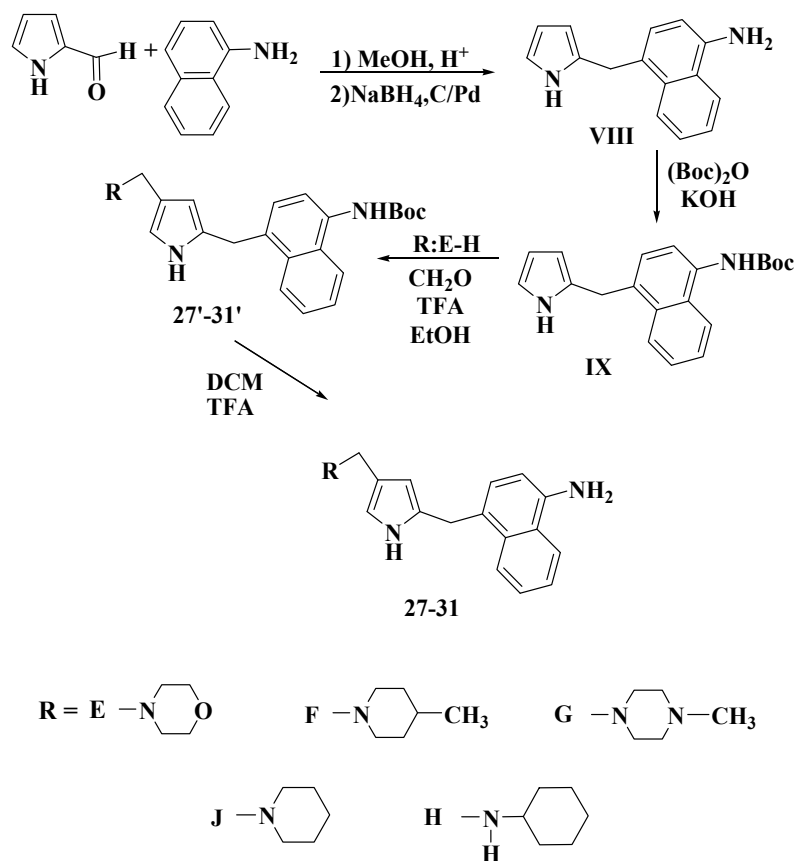
Infine, per aumentare la solubilità in acqua dei composti e quindi facilitarne la valutazione farmacologica, sono stati preparati i corrispettivi sali cloridati, come mostrato nello schema 20.



SCHEMA 20

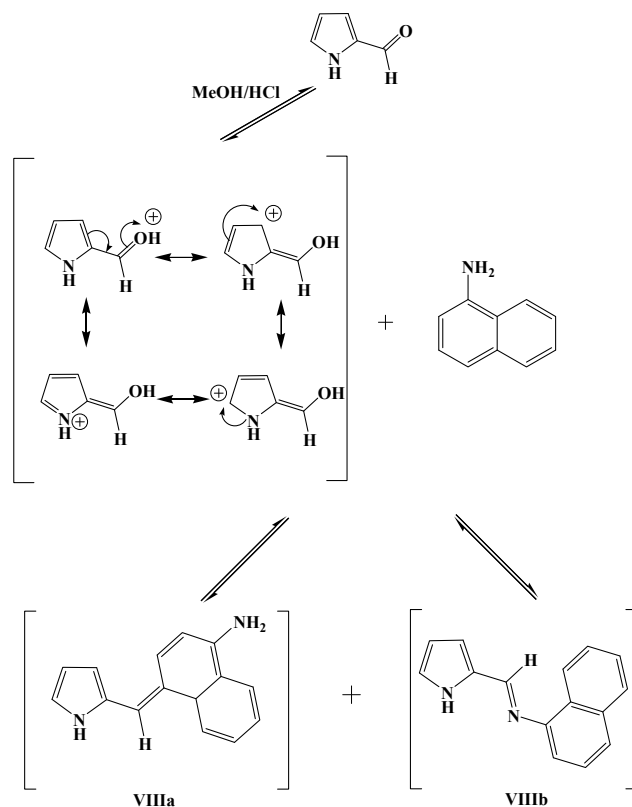
Sintesi dei derivati dialchilpirrolici (27-31).

La sintesi dei prodotti presentati avviene secondo lo schema 21 e prevede un primo step costituito da una condensazione tra la pirrolo-2-carbossialdeide e la α -naftilammina in ambiente acido.



SCHEMA 21

In condizioni sperimentali, la formazione del legame C=N (base di Schiff), dovuta alla condensazione dell'aldeide sull'N dell'ammina, compete con l'attacco del carbonile sul C in posizione 4 dell'anello aromatico attivato dall'azoto, formando un legame C=C, che porta alla formazione di un intermedio naftochinonimminico (Schema 22).



SCHEMA 22

Si ha così la formazione di una miscela di due intermedi instabili (**VIIIa**, **VIIIb**), sui quali si effettua la riduzione del doppio legame *in situ*.

La purificazione del grezzo per via cromatografica ha tuttavia condotto prevalentemente all'ottenimento del prodotto **VIII**, derivante dalla riduzione dell'intermedio naftochinonimminico **VIIIa**, mentre il prodotto di riduzione della base di Schiff risulta il derivato ottenuto con le rese più basse.

La spiccata reattività dell' α -naftilammina nei confronti dell'attacco da parte di specie elettrofile risulta evidente dalla quantità di prodotti collaterali che si forma durante la reazione nelle condizioni descritte.

Per la loro scarsa quantità, non si sono potuti caratterizzare completamente tutti i sottoprodotti, tuttavia è stato possibile isolare e caratterizzare un prodotto collaterale relativamente più abbondante, che è stato

identificato come derivato dall'attacco di due molecole di pirrolaldeide su una molecola di naftilammina (figura 27).

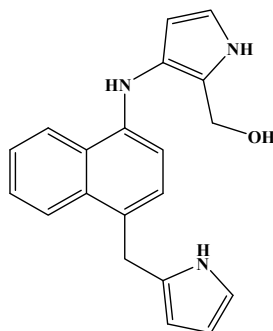
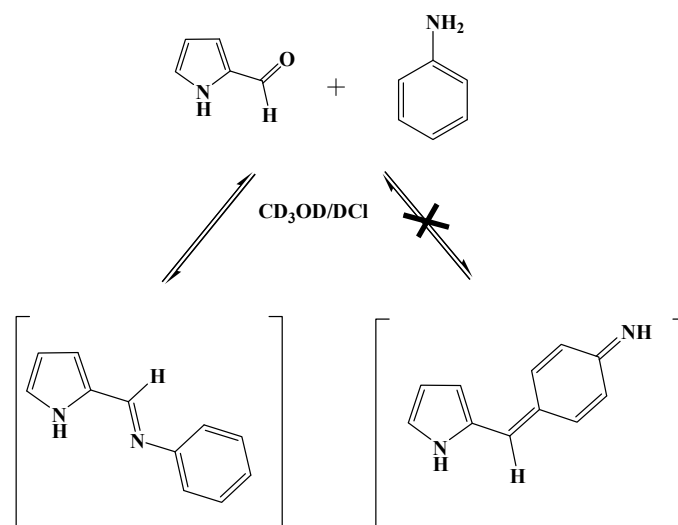


Figura 27. *Principale prodotto collaterale della reazione.*

Per verificare la particolare reattività della posizione 4 del nucleo naftilamminico, la reazione di condensazione è stata condotta sulla anilina, nelle stesse condizioni nel probe di un NMR 400MHz, in CD₃OD acido per DCl. Lo scopo di questo studio era quello di seguire la formazione degli analoghi dei due intermedi **VIIIa** e **VIIIb**, tramite la identificazione dei segnali relativi al protone azometinico (**VIIIb**), che risuona a δ 8.2 e, al protone chinonimminico (**VIIIa**), che risuona a δ 6.3. I segnali registrati dall'esperimento sono in accordo con la formazione di un unico derivato, corrispondente ad un intermedio a base di Schiff (schema 23).



SCHEMA 23

Simionescu et al.⁴⁷ riportano inoltre la sintesi della base di Schiff a partire dalla pirrolo-2-carbossaldeide e 1-naftilammina, in toluene a refluxo, in condizioni acide per acido *p*-toluensolfonico e in atmosfera inerte di azoto, con resa dell'85%. Risulta quindi evidente che le condizioni di reazione da noi sperimentate sono caratterizzate da un'elevata regioselettività, consentendo l'ottenimento in alte rese del derivato chinonimminico.

L'amminogruppo del residuo naftilico dell'intermedio **VIII** viene quindi sottoposto ad una reazione di protezione con il gruppo Boc (composto **IX**, schema 21), e quindi derivatizzato in posizione 4 dell'anello pirrolico con ammine varie utilizzando una reazione di Mannich⁴⁸. In queste condizioni la morfolina (**E**), 4-metilpiperidina (**F**), 4-metilpiperazina (**G**), piperidina (**J**) e cicloesilammina (**H**), hanno formato i corrispondenti composti **27'-31'** che, per successiva deprotezione dal gruppo Boc, hanno fornito i composti finali **27-31**.

FARMACOLOGIA

Uno dei metodi più rapidi per la valutazione dell'attività analgesica cannabinoide-simile e antinfiammatoria a livello periferico è il test della formalina (*paw-licking test*)⁴⁹.

Questo modello di valutazione del dolore consente di differenziare lo stimolo doloroso indotto dalla somministrazione locale (intraplantare) di formalina in due fasi: la prima, definita “fasica”, che si manifesta nei primi 15 minuti, in cui prevale la stimolazione delle fibre sensoriali C, che mediano il dolore viscerale o lento, e $A\delta$, che mediano il dolore di media velocità e la sensazione termica; la seconda, detta “tonica”, rilevabile a partire dal secondo quarto d'ora, che è correlata al dolore di tipo infiammatorio sostenuto dal rilascio di neuromediatori infiammatori e mediato da fibre mieliniche che trasmettono il dolore acuto e intenso.

La riduzione del dolore locale ad opera di un farmaco analgesico può interessare l'una, l'altra o entrambe le fasi. Un'attività analgesica rilevata in prima fase è riconducibile alla diretta interazione con i recettori CB_1 , mentre se tale attività si riscontra in seconda fase l'effetto analgesico risulta essere indice di un'azione indiretta sulla nocicezione mediata dall'inibizione della produzione di mediatori locali. In un secondo momento viene interessata anche la prostaglandina-sintetasi.

Quindi la riduzione del dolore in entrambe le fasi può indicare che la molecola agisce sia direttamente, per interazione col recettore CB_1 periferico, sia indirettamente, per inibizione della sintesi dei mediatori infiammatori.

L'assenza di risposta analgesica in seconda fase non necessariamente esclude un'attività inibitrice sul dolore infiammatorio: è questo il caso in cui la molecola subisca una rapida metabolizzazione. Inoltre, è possibile che un composto, se lentamente metabolizzato, possa evidenziare un'attività cannabinomimetica anche in seconda fase.

Un esempio di tale comportamento è dato dall'Anandamide (AEA), attiva in prima fase ma non in seconda, in quanto prontamente idrolizzata da esterasi. Al contrario la Palmitoiletanolammide (PEA), più resistente all'idrolisi, risulta attiva in entrambe le fasi.

Tutti i composti testati sono stati somministrati per via intraplantare e i risultati del *paw-licking* test sono espressi come riduzione percentuale del dolore provocato dalla somministrazione di formalina.

Per verificare l'attività analgesica centrale, il composto **2a** è stato sottoposto al saggio della piastra calda (*hot-plate* test), un saggio funzionale che consiste nel porre il topo a contatto di una superficie riscaldata. Dal tempo di latenza di una risposta al calore, è possibile dedurre l'attività e la potenza dell'analgesia di un composto. Tale risposta può consistere nel leccamento o retrazione della zampa posteriore, o nel salto dell'animale.

Per il tipo di dolore indotto (causato da stimolo termico) e per la durata dello stesso esperimento (60s), il saggio esclude l'insorgenza di un dolore dovuto a infiammazione. L'*hot-plate* test, infatti, è particolarmente indicato per verificare l'attività centrale di un agente analgesico, come ad esempio per gli oppioidi. In particolare, il composto **2a** è stato somministrato direttamente nel SNC, in maniera da superare eventuali ostacoli farmacocinetici.

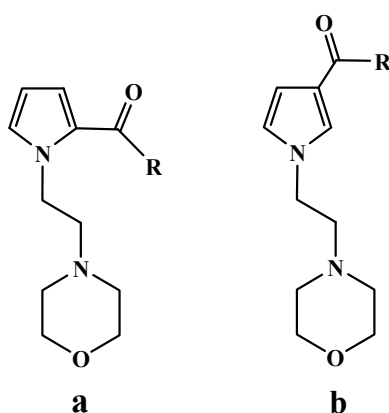
L'interazione con il recettore cannabinoide CB₁ è stata valutata, *in vivo* mediante il test dello spiazzamento, effettuato attraverso la somministrazione endovenosa di SR141716A, antagonista CB₁, *in vitro* attraverso saggio di binding sul recettore CB₁ murino confrontato con [³H]WIN 55212-2.

La valutazione dell'attività antinfiammatoria è stata effettuata per analisi dei livelli di PGE₂ indotti da somministrazione di lipopolisaccaride (LPS), mediante saggio EIA.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In tabella 1 sono mostrati i dati, espressi come costanti di dissociazione, relativi al saggio di binding sul recettore CB₁, eseguito sui composti della serie morfolinica **2a**, **2b**, **5a**, **5b**, **6b** e **7b** in confronto al composto di riferimento WIN 55212-2.

Tabella 1. Binding sul recettore CB₁ per la serie morfolinica.



COMPOSTO	R	K _d (nM)
1a-b		n.d.
2a-b		2a=16.6±1.4 2b=28.7±2.8
3a		n.d.
4a-b		n.d.
5a-b		5a=31.2±3.2 5b=23.5±2.4
6a-b		6b=1.2±0.1
7a-b		7b=9.6±0.8
WIN 55212-2		1.3±0.1

I composti **2a** e **5a**, gli unici esponenti 2-sostituiti per i quali è stato eseguito il saggio di binding, hanno fornito valori elevati di K_d . Il *paw-licking* test è stato effettuato sul composto **2a**, che tra i due presenta la più alta affinità recettoriale, e un valore di K_d più basso rispetto al suo analogo **2b** 3-sostituito.

I risultati sono illustrati in tabella 2.

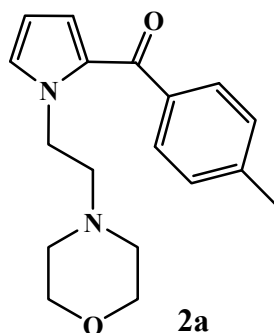


Tabella 2. *Paw-licking test per il composto 2a.*

COMPOSTI	I Fase *	II Fase *
2a	50**	40**
WIN	60**	63**

• *% di inibizione ** $P < 0.005$

Nonostante un'affinità 12 volte inferiore rispetto al riferimento, il composto **2a** ha mostrato una evidente risposta analgesica in I fase, seguita da una lieve riduzione dell'effetto in II fase. Questo comportamento potrebbe essere spiegato attraverso un duplice meccanismo: l'accumulo di mediatori analgesici come l'anandamide per effetto di inibizione delle FAAH; l'attivazione, seppur debole, del recettore cannabinoide.

Nell'intento di valutare un'attività analgesica centrale, il composto **2a** è stato sottoposto all'*hot-plate test*,^{50,51,52} per somministrazione diretta nei ventricoli cerebrali di topo.

I dati relativi all'esperimento sono riassunti in tabella 3, illustrati nel grafico 1 e riportati come incremento del tempo di resistenza al dolore, a intervalli di 30 minuti dalla somministrazione o del solo veicolo o del composto, in confronto al gruppo di topi di controllo. I valori ottenuti sono stati calcolati secondo l'equazione $\Delta t = t_{(\text{postdrug})} - t_{(\text{predrug})}$. Il leggero incremento ottenuto per il veicolo è dovuto alla somministrazione intracranica.

Tabella 3. *Tempi di latenza (sec.) sulla piastra calda dopo somministrazione del composto 2a.*

COMPOSTO	Tempo dopo la somministrazione (min)			
	30	60	90	180
2a	2.4±0.3	6.5±1.2	8.5±1.3	8.0±1.2
veicolo	2.0±0.5	3.5±0.6	1.5±0.8	2.5±0.5

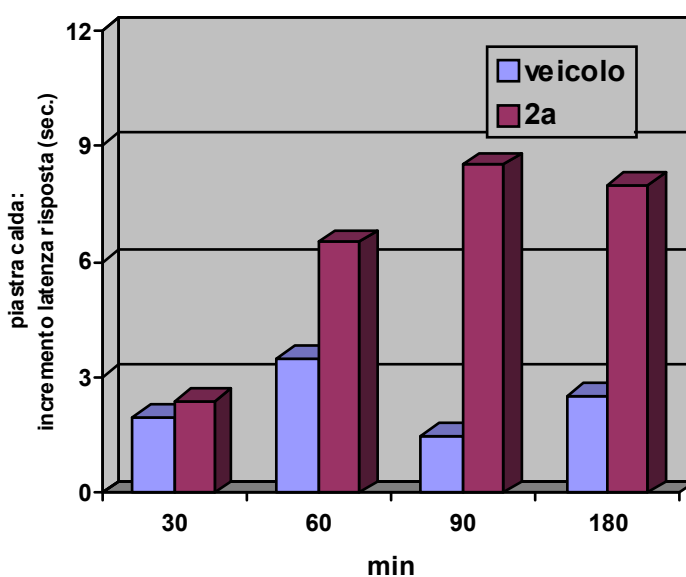
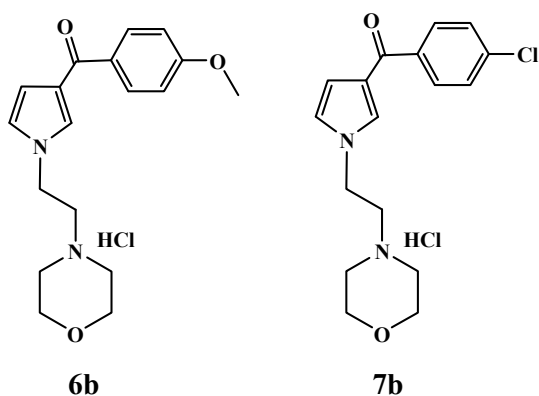


Grafico 1. *Hot-plate test del composto 2a dopo somministrazione i.c.v. nel topo.*

Dopo un'ora dalla somministrazione, viene rilevato un aumento della latenza sulla piastra calda associabile ad una riduzione della sensazione dolorifica, e l'attività sembra prolungarsi per le successive 2 ore. Questo effetto, non direttamente correlabile con l'agonismo sui recettori CB₁, è in accordo con l'ipotesi di inibizione delle FAAH.

I composti che hanno mostrato l'affinità più alta nei confronti del recettore CB₁ sono risultati il **6b** e il **7b**, con una K_d rispettivamente di 1.2 e 9.6 nM. Ciò è coerente con quanto riportato in letteratura circa il ruolo della porzione benzenica del nucleo indolico nell'interazione con il sito CB₁. Infatti tale porzione partecipa al legame con il sito recettoriale, ma non è farmacoforica e la sua assenza, caratteristica dei *nonAAI*, non influisce sensibilmente sull'attività. Tale ipotesi è confermata dai dati riportati in tabella 4, relativi al *paw-licking* test dei composti **6b** e **7b**.

Tabella 4. *Paw-licking* test per i composti **6b** e **7b**.



COMPOSTO	I Fase *	II Fase *
6b	65**	40**
7b	42**	16**
WIN	60**	63**

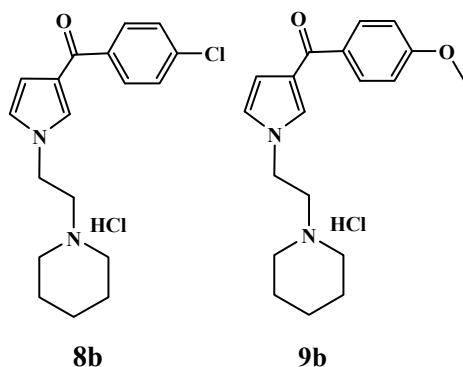
● *% di inibizione ** P<0.005

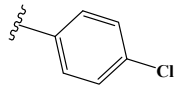
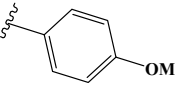
In accordo con l'affinità recettoriale, entrambi i composti hanno mostrato una più spiccata attività analgesica in I fase, correlabile al binding con il recettore CB₁ e sovrapponibile, nel caso del composto **6b**, a quella del composto di riferimento.

L'attività analgesica in II fase risulta ridotta, in maniera più spiccata per il composto **7b**. Questo dato potrebbe essere imputabile al mancato coinvolgimento di vie alternative della regolazione del dolore, come l'inibizione delle ciclossigenasi, e quindi evidenziare una certa selettività del meccanismo d'azione di questi composti. Non è comunque da escludere l'ipotesi di una ridotta attivazione recettoriale o di una farmacocinetica sfavorevole.

E' interessante il confronto di questi dati con quelli relativi agli analoghi della serie piperidinica **8b** e **9b**, riassunti in tabella 5.

Tabella 5. *Binding sul recettore CB₁ e paw-licking test per la serie piperidinica.*



COMPOSTO	R	K _d (nM)	I Fase *	II Fase *
8b		6.8±1.1	20**	16**
9b		3.2±0.9	50**	48**
WIN 55212-2		1.3±0.1	60**	63**

• *% di inibizione ** P<0.005

I composti testati hanno confermato la capacità di legare il sito recettoriale CB₁ con una affinità paragonabile ai derivati morfolinici e al WIN, mentre l'attività analgesica risulta essere proporzionalmente ridotta.

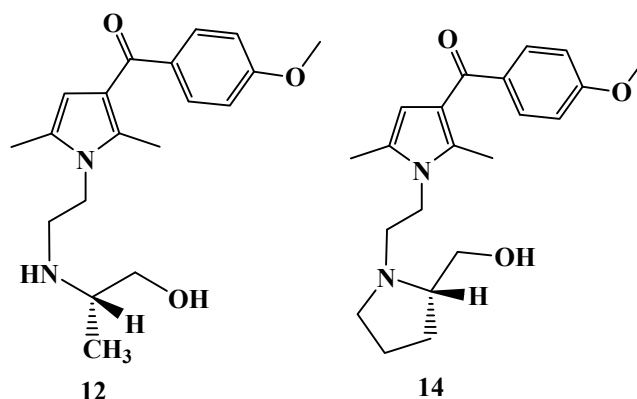
I risultati sembrano suggerire che, a parità di altri sostituenti sull'anello pirrolico, la scomparsa dell'ossigeno sull'anello cicloalchilamminico nel passaggio dalla serie morfolinica a quella piperidinica non influenzi la capacità di questi composti di legare il sito CB₁, ma abbia effetti più evidenti sull'attivazione recettoriale, forse per la mancata formazione di un legame H con una porzione del sito.

In accordo con quanto la letteratura riporta sulla SAR dei *non-AAI*, il sostituente sull'anello pirrolico che fornisce maggiore affinità e attività risulta essere sempre il *p*-metossibenzoile, e la posizione preferita è la 3. Per questo motivo, i composti più rappresentativi di ogni serie che sono stati sottoposti ai test farmacologici presentano questo tipo di sostituzione.

In ogni caso, l'attività cannabinomimetica è presente sia nei derivati N-alchilmorfolinici che nei derivati N-alchilici. Pertanto, la presenza dell' N sul residuo cicloalchilamminico (uno dei requisiti farmacoforici) non sembra essere essenziale per l'attività cannabinomimetica.

Lo studio della SAR di questa porzione molecolare è proseguito con l'analisi dell'attività dei composti **12** e **14** della serie amminoalcolica, i cui dati relativi al *paw-licking* test sono riportati in tabella 6.

Tabella 6. Paw-licking test sui composti 12 e 14.



COMPOSTO	I Fase *	II Fase *
12	23**	30**
14	0	20**
WIN	60**	63**

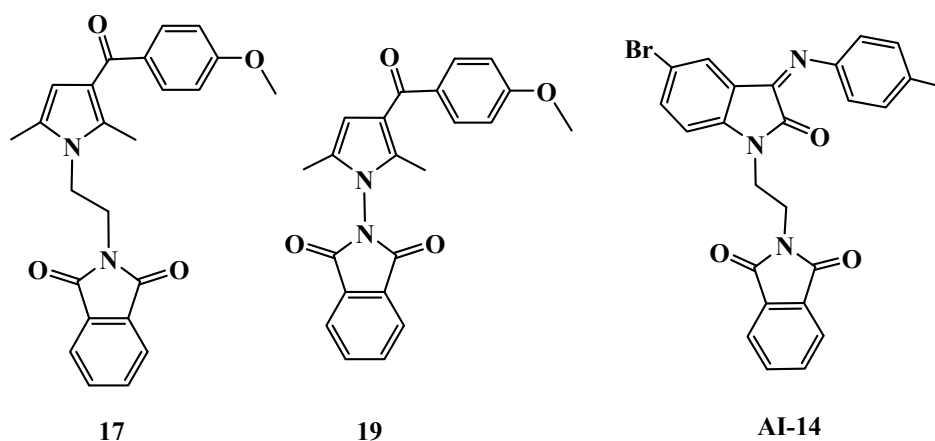
• *% di inibizione ** P<0.005

I risultati mostrano che, pur con il gruppo *p*-metossifenilico in posizione 3 dell'anello pirrolico, la presenza di un atomo di O di una funzione alcolica sulla porzione alchilamminica, in grado di formare legami H, comporti una drastica riduzione dell'attività analgesica.

Questi composti mancano dei dati relativi al binding recettoriale, ma non è da escludere che l'assenza di attività analgesica possa essere legata a una variazione strutturale così marcata da impedire una idonea interazione con il recettore. Non è da escludere che anche la chiralità possa essere responsabile del risultato ottenuto.

L'attività analgesica dei composti della serie ftalimmidica **17** e **19** è riassunta in tabella 7, nella quale i risultati del *paw-licking* test sono confrontati con quelli relativi al composto **AI-14** della serie indolonica di riferimento.

Tabella 7. Saggio di binding sul recettore CB₁ e *paw-licking* test per la serie ftalimmidica.



COMPOSTO	K _d (nM)	I Fase *	II Fase *
17	5.3±1.8	29**	30**
19	5.0±1.7	47**	58**
AI-14	3.2±0.7	60**	58**
WIN 55212-2	1.3±0.1	60**	63**

• *% di inibizione ** P<0.005

L'introduzione di una nuova porzione aromatica, quale la funzione ftalimmidica, non ha annullato la capacità di legame al recettore CB₁ né

l'attività analgesica, confermando la validità di questa porzione molecolare già presente nei composti di riferimento.

Per entrambi i composti testati, la sostituzione del nucleo indolonico con quello pirrolico ha comportato solo una lieve diminuzione dell'affinità recettoriale, comunque paragonabile agli altri composti presentati.

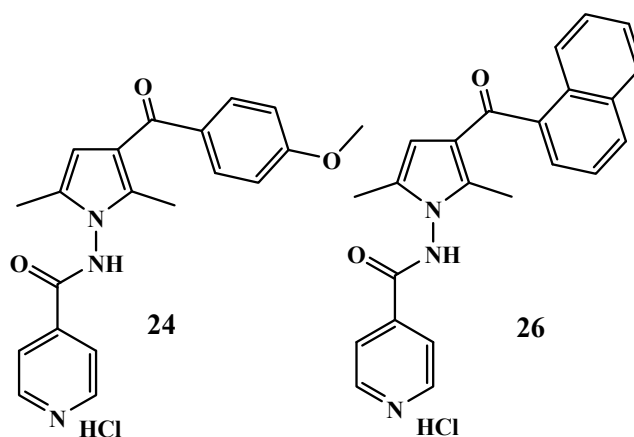
A differenza del composto **19**, il composto **17**, con un più alto grado di omologia strutturale nei confronti del riferimento **AI-14**, ha mostrato una più sensibile e inaspettata riduzione dell'attività analgesica sia in prima che in seconda fase.

I risultati sembrano quindi evidenziare che la scomparsa della porzione benzenica dell'indolo nel passaggio alla serie pirrolica possa avere un più marcato effetto negativo sull'attività analgesica se il sostituito ftalimmidico è presente sul linker etilenico. Inoltre in assenza del linker, tale effetto è meno pronunciato. Quindi il linker etilenico sembra quindi non influire sulla capacità di questi composti di legarsi al sito recettoriale, ma è probabile che una l'interazione avvenga attraverso un diverso *binding mode*, da cui potrebbe dipendere la differenza nella loro attività analgesica *in vivo*.

E' da notare che in questo confronto, non è possibile valutare l'importanza del sostituito aromatico in posizione 3 poiché di diversa natura, e il composto **AI-14** è stato scelto come riferimento poiché presenta tra i suoi congeneri la più alta analogia strutturale con i composti sottoposti all'analisi.

La versatilità di interazione del recettore CB₁ emerge anche dal confronto di questi dati con quelli relativi ai composti della serie piridinica **24** e **26**, riassunti in tabella 8.

Tabella 8. Saggio di binding sul recettore CB₁ e paw-licking test per la serie piridinica.



COMPOSTO	K _d (nM)	I Fase *	II Fase *
24	1.5±0.1	56**	43**
26	22±2.3	16**	0
WIN 55212-2	1.3±0.1	60**	63**

- *% di inibizione ** P<0.005

Dall'analisi dei dati relativi al composto **24**, che presenta ancora un residuo *p*-metossibenzoilico in posizione 3, sembra che l'irrigidimento del linker etilenico mediante sostituzione con la funzione carbossamidica, unitamente all'introduzione di un originale residuo piridinico, consentano comunque di conservare la capacità di interazione e attivazione recettoriali.

Infatti, per questo composto è stata evidenziata un'affinità sovrapponibile a quella del WIN, con una interessante attività analgesica in entrambe le fasi del test.

Il composto **26**, che differisce dal precedente per la presenza di un sostituente di tipo naftoilico invece che *p*-metossibenzoilico, ha mostrato una

caduta di affinità ed è praticamente privo di attività, sia in prima che in seconda fase. Questi risultati possono essere spiegati dal fatto che la presenza del residuo naftoilico, rigido e ingombrante, caratteristico del WIN 55212-2, influenza fortemente l'interazione con il recettore. Questa considerazione, unita alla evidente differenza strutturale rispetto ad altri composti attivi presentati in questa tesi, suggerirebbe anche per questi composti l'ipotesi di un differente *binding mode*.

Per quanto riguarda la serie dei dialchilpirroli, l'attività analgesica *in vivo* è stata valutata per il composto **27**.

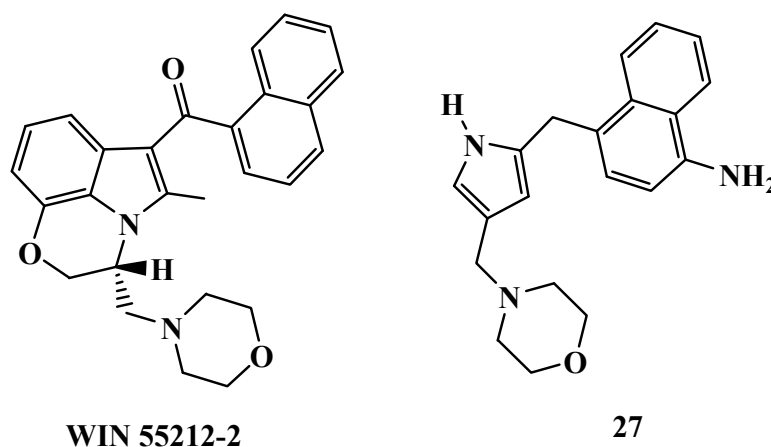


Tabella 9. Paw-licking test per il composto **27**.

COMPOSTO	I Fase *	II Fase *
27	25	55**
WIN 55212-2	60**	63**

• *% di inibizione ** P<0.005

Il risultato ottenuto per il composto **27**, riportato in tabella 9, evidenzia un'attività analgesica particolarmente rilevante in seconda fase, suggerendo un possibile coinvolgimento nei meccanismi che regolano il processo infiammatorio. Per verificare questa ipotesi antinfiammatoria, i composti **27-30** sono stati sottoposti alla valutazione della loro capacità di inibire la produzione di prostaglandine. L'attività è stata confrontata con quella dell'indometacina.

Per ciascuno dei composti testati è stata calcolata una stima dell'inibizione dell'isoforma COX2 attraverso il programma Autodock 3.0.5. I dati ottenuti sono confrontati nel grafico 2 e riassunti nella tabella 10.

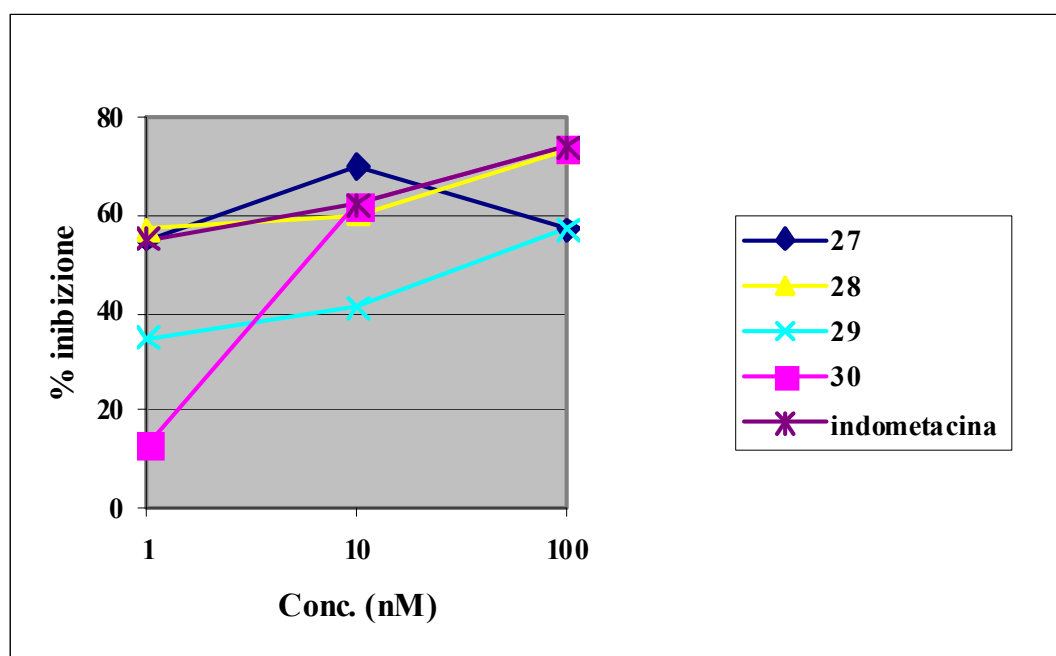


Grafico 2. *Inibizione della produzione di PGE₂.*

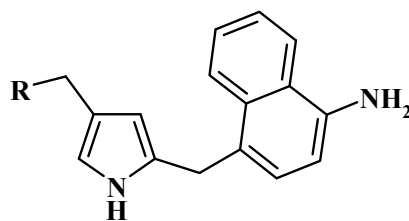

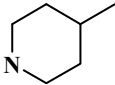
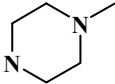

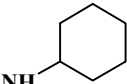


Tabella 10. Percentuale di inibizione della produzione di PGE₂.

COMPOSTO	R	Concentrazione (M)			K _i stimata (nM)
		1x10 ⁻⁹	1x10 ⁻⁸	1x10 ⁻⁷	
27		55	70	57	90
28		57	60	73	14
29		35	41	57	72
30		13	62	74	36
31		n.t.	n.t.	n.t.	n.c.
Indometacina		55	62	72	27

Le costanti di inibizione calcolate sono tutte dello stesso ordine di grandezza di quella dell'indometacina, con un range di variazione di circa 6 volte tra la K_i di 14 nM del composto **28** e la K_i 90 nM del composto **27**.

L'attività farmacologica *in vitro* non sembra seguire direttamente l'andamento dei dati di predizione delle K_i. Infatti, per i composti **28** e **29** si può evidenziare una buona correlazione tra il dato sperimentale e il dato di

inibizione calcolato (l'entità dell'inibizione è proporzionale alla K_i calcolata). Infatti, per entrambi i composti il profilo della curva dose/effetto risulta parallelo a quello dell'indometacina. Il composto **28**, con il valore più basso di K_i calcolata, risulta attivo quanto l'indometacina (le due curve sono sovrapposte). Il composto **29** ha un'attività ridotta rispetto al suo analogo. Probabilmente, la presenza di un eteroatomo in posizione 4 della cicloalchilammina determina una riduzione dell'attività. Infatti, anche il composto **27** ha un'attività ridotta e supporta un atomo di O in questa posizione. I dati di K_i calcolati sembrano essere in accordo con questa ipotesi.

I composti **27** e **30**, non mostrano una linearità nella curva dose/effetto e non è possibile trovare una diretta correlazione tra l'attività *in vitro* e i dati di K_i calcolati.

Comunque, è da considerare che i meccanismi coinvolti nell'inibizione della produzione di PGE_2 sono molteplici e non sempre si può predire il comportamento di un ipotetico inibitore semplicemente dal calcolo della costante di inibizione della ciclossigenasi. Il meccanismo di inibizione dell'indometacina, infatti, segue una cinetica complessa⁵³, e non è corretto effettuare un paragone diretto solo sulla base dei dati raccolti. Inoltre, bisognerebbe considerare l'ipotesi di un coinvolgimento di target alternativi alla ciclossigenasi (PGH_2 -sintasi), ad esempio l'inibizione della PGE_2 -sintasi. Sarebbe quindi necessario approfondire il discorso con opportuni saggi di binding sulla ciclossigenasi e l'estensione dei saggi farmacologici *in vivo* a tutti gli esponenti della serie, in modo da trarre delle conclusioni circa la validità dell'ipotesi antinfiammatoria.

I risultati dell'attività analgesica di tutti i composti della tesi sottoposti a valutazione farmacologica sono riassunti nel grafico 3, espressi come tempo di *paw-licking* in relazione al controllo e al WIN 55212-2.

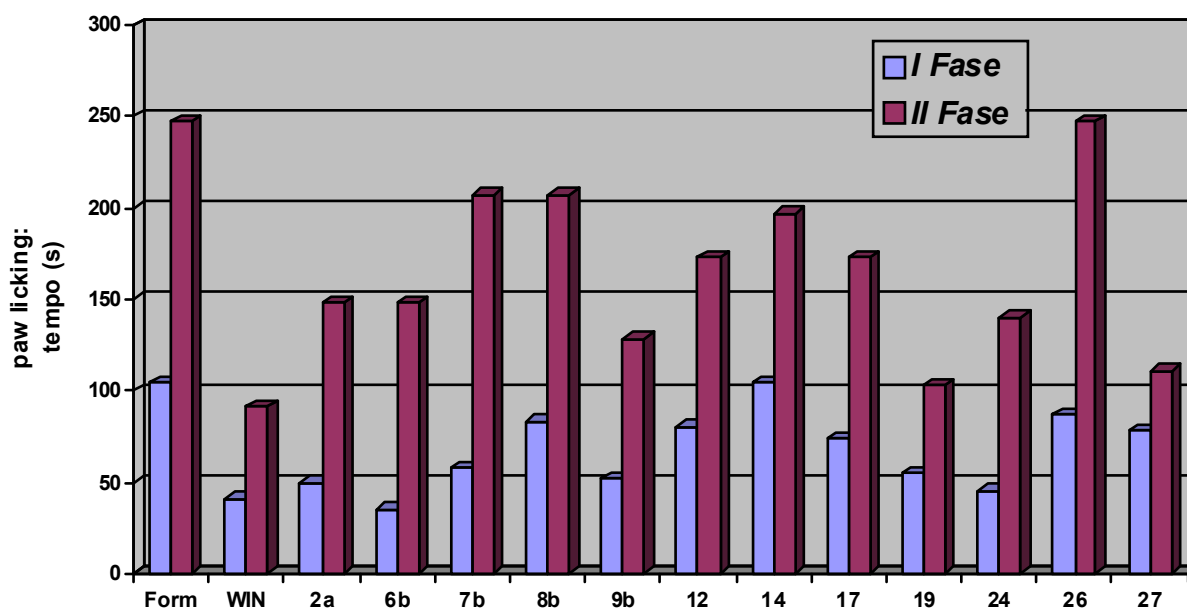


Grafico 3. Paw-licking times dei composti testati, in relazione alla somministrazione intraplantare di formalina e al WIN 55212-2.

La valutazione dell'attività analgesica, associata alle considerazioni sulla affinità nei confronti del target biologico, non esclude, almeno per alcuni dei composti presentati, una capacità di modulare il dolore attraverso un contemporaneo interessamento di diverse vie di trasduzione della sensazione dolorifica. Infatti, la presenza di una attività in II fase indica una interferenza tardiva e prolungata con la modulazione del dolore che potrebbe essere spiegata non solo con un'inibizione della produzione di prostaglandine (dunque con un meccanismo antinfiammatorio), ma anche con un meccanismo di inibizione delle FAAH, e/o, analogamente al WIN, con una protratta attivazione recettoriale legata a resistenza metabolica.

Per questo scopo sono previsti ulteriori saggi farmacologici, estesi anche a nuove molecole appositamente sintetizzate, rivolti alla valutazione dell'attività degli altri esponenti di ciascuna serie e ad approfondire lo studio sui loro meccanismi d'azione, mediante il completamento dei saggi di binding per il recettore CB₁ e valutando la capacità di inibizione delle COX o delle FAAH.

PARTE ANALITICO-STRUMENTALE

Le strutture dei composti sintetizzati sono state confermate in base alle loro proprietà analitiche e spettroscopiche. I controlli cromatografici sono stati eseguiti mediante cromatografia analitica su strato sottile (TLC 0.25 mm di gel di silice 60 PF254 Merck), mentre la TLC preparativa è stata effettuata su lastre dello spessore di 0.5 mm di gel di silice PF254 Merck.

Per la cromatografia è stato usato gel di silice Merck 60 (300-400 mesh). Gli spettri di massa ESI sono stati registrati a ± 5000 V con uno spettrometro a triplo quadrupolo API 2000. Gli spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR sono stati ottenuti con uno spettrometro Varian 400 operante a 400 MHz. I valori di chemical shifts sono riportati in δ (ppm) utilizzando Me_4Si come riferimento interno ed i valori di J sono riportati in Hertz (Hz).

I punti di fusione sono stati determinati in capillari aperti utilizzando un apparecchio Gallenkamp e non sono corretti.

Il confronto tra le strutture a minimo energetico della pravadolina, del composto **12** e del *nonAAI-10b* (figura 23) è stato realizzato utilizzando il programma Chem3D del pacchetto ChemOffice 2004.

La predizione delle costanti di inibizione di COX2 per i composti **27-30** è stata effettuata con il programma AutoDock 3.0.5 su una macchina Dell Precision 780. Il modeling molecolare e le manipolazioni grafiche sono state eseguite usando il software package InsightII (Accelrys, San Diego, CA) su una Silicon Graphics Octane2 workstation e su una macchina Dell Precision 780, con un processore dual-core Pentium D 3800 GHz, e Linux Fedora 4.0 come sistema operativo. Gli studi di docking automatizzato sono stati eseguiti usando AutoDock versione 3.0.5 su una macchina Dell Precision 780. Nelle simulazioni, è stato usato il complesso co-cristallizzato dell'indometacina in COX2 (PDB entry code 4COX). Le coordinate spaziali sono state ritrovate nella Protein Data Bank. Per il file PDB, il ligando e tutte le molecole d'acqua

sono state rimosse. Gli idrogeni mancanti e le cariche parziali atomiche del CVFF (Consistent-Valence Force Field) sono state aggiunte utilizzando il modulo Builder del programma InsightII.

Per i composti sintetizzati **27-30** è stata usata la stessa procedura descritta, eccetto per il fatto che le strutture 3D sono state costruite usando il modulo Builder del software InsightII e poi ottimizzate tramite dinamica molecolare per mezzo di un *annealing method* simulato, *in vacuo*, usando il campo di forze CVFF dei software InsightII/Discover. Le energie usate e riportate da AutoDock devono essere distinte tra *docked energies*, che includono le energie delle interazioni inter- ed intramolecolari, che sono usate durante il docking, e le energie libere predette, che includono le energie libere intermolecolare e torsionale, e sono solo riportate alla fine di un docking. E' stato deciso di usare entrambe le energie finali di docking (FDE: sommatoria dell'energia libera finale intermolecolare e torsionale) riportate per ogni docking e verificare quale avesse la migliore correlazione con i valori sperimentali.

E' stata infine applicata la conversione della ΔG in K_i usando l'equazione $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln K_i$, dove R è la costante dei gas ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), e T è la temperatura assoluta, assunta come la temperatura ambiente, 298.15 K.

FARMACOLOGIA SPERIMENTALE

La sperimentazione farmacologica per l'attività analgesico-cannabinomimetica (*paw-licking test*, *hot-plate test*, binding sul recettore CB₁) e gli studi di docking sono stati effettuati rispettivamente presso il Dipartimento di Farmacologia Sperimentale e il Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Il test di inibizione della sintesi di prostaglandine è stata effettuato presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Salerno.

Paw-licking test - Il test della formalina viene effettuato su topi collocati singolarmente in una camera di osservazione per 45 minuti prima degli esperimenti. Vengono poi somministrati 10 µl di una soluzione di formalina al 5% nella superficie plantare della zampa destra posteriore. Gli animali vengono quindi introdotti in un cilindro di Plexiglas (20x30cm) per l'osservazione. Il dolore viene quantificato attraverso la determinazione del tempo (s) intercorso tra la somministrazione di formalina e il momento in cui il topo si lecca la zampa per 40-60 min utilizzando 5 min di intervallo.

Vengono osservate due fasi di "leccamenti" successivi all'iniezione di formalina. L'intervallo compreso tra 0 e 15 min viene definito Fase I, mentre l'intervallo compreso tra il 15° e il 40° min viene definito Fase II.

I criteri di esclusione dallo studio includono un'iniezione incompleta di formalina, o un eccessivo sanguinamento dal sito di iniezione. I dati vengono presentati come la media \pm S.E.M. di intervalli di 5 min fino a 40 min.

I composti **2a**, **6b**, **7b**, **8b**, **9b**, **12**, **14**, **17**, **19**, **24**, **26**, **27**, e il WIN 55212-2, sono stati sciolti in dimetilsolfossido (DMSO) e cosomministrati insieme alla formalina al 5% in soluzione fisiologica (contenente il 10% di DMSO qualora il composto non è solubile in acqua), per via intraplantare (i.pl.), nella zampa posteriore destra del topo per un volume pari a 10 µl (contenenti 100 µg di

composto o di controllo), mentre per la somministrazione endovenosa (i.v.) ed intraperitoneale (i.p.), laddove il saggio lo richiedeva, è stato iniettato un volume di 1 ml/kg. Il tempo di *paw-licking* è stato registrato in sec. tra 0-15 min. per la prima fase e tra 15-30 min. per la seconda.

Per i risultati di questo test i dati relativi alla fase I e alla fase II vengono considerati separatamente. In ogni caso la risposta viene valutata singolarmente per ogni animale e espressa come percentuale rispetto al controllo. I valori della risposta e i loro intervalli di confidenza al 95% vengono calcolati usando analisi di regressione lineare⁵⁴.

Il test dello spiazzamento viene effettuato attraverso la somministrazione endovenosa di SR141716A, antagonista CB₁ (e SR144528, antagonista CB₂, i cui dati non sono riportati in questa tesi) alcuni minuti prima della somministrazione dei composti testati.

I derivati amminoalchilindolici precedentemente sintetizzati dal mio gruppo di ricerca, presentavano una sensibile attività in prima fase, erano dotati di buona selettività verso i recettori CB₁ e la loro azione era revertita da antagonisti CB₁ (ma non dai CB₂), confermando una attività cannabinoido-simile.

Hot-plate test – Il composto **2a** (10µg) è stato sciolto in acqua distillata autoclavata contenente il 5% di tween 80 ed il 10% di PEG e iniettato nel ventricolo cerebrale del topo.

Il riflesso del dolore in risposta allo stimolo termico è stato misurato utilizzando l'Hot Plate Test (Ugo Basile, Italia).

La superficie della piastra calda è stata riscaldata ad una temperatura costante di 55,5 (± 0.2)°C per dare un tempo di latenza di 18-20 secondi. I topi con risposte basali superiori o inferiori sono stati esclusi dall'esperimento. Gli animali selezionati venivano invece assegnati ai diversi gruppi sperimentali in modo casuale.

I topi sono stati posti sulla piastra calda, circondata da una gabbia acrilica trasparente.

La latenza della risposta, consistente nel leccamento o scuotimento della zampa posteriore, o salto, è stata misurata in secondi. Il valore di *cut-off* era fissato a 60 sec per evitare un possibile danno tissutale. Gli animali sono stati testati uno alla volta e non sono stati abituati al sistema sperimentale prima del test. Ogni animale è stato testato solo una volta.

L'effetto analgesico è espresso come incremento di latenza in seguito a trattamento: $\Delta t = t_{(\text{postdrug})} - t_{(\text{predrug})}$ (latenza dopo trattamento – latenza prima del trattamento).

Iniezioni intracerebroventricolari - I topi sono stati sottoposti ad una leggera anestesia mediante enflurano. Il composto **2a** è stato solubilizzato in acqua distillata autoclavata contenente il 5% di tween 80 ed il 10% di PEG , immediatamente prima dell'esperimento. Per ogni animale è stata iniettata una dose di 10 μ g in 2 μ L, utilizzando una microsiringa in vetro da 25 μ L (Hamilton) secondo le seguenti coordinate stereotassiche (2 mm caudale, 2 mm laterale dal bregma; 2 mm di profondità).

Animali - Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi maschi di razza albina del ceppo Swiss, del peso di 20-25 gr., che sono stati forniti dalla ditta Harlan (Italia). Gli animali sono stati tenuti in gabbie di acciaio inossidabile in una stanza tenuta a 22 \pm 1 $^{\circ}$ C, in un ciclo di luce:buio di 12h:12h. I topi sono stati acclimatati al loro ambiente per una settimana e hanno ricevuto cibo e acqua *ad libitum*.

Gli esperimenti sono stati eseguiti nella stessa fascia oraria diurna e condotti in accordo con la guida per la Manutenzione e l'Uso di Laboratori Animali pubblicata dall'istituto Nazionale della Salute e dell'Etica

dell'Associazione Internazionale per lo Studio del Dolore (D.M. 116192), e secondo le regole dell'EEC (O.J. of E.C. L 358/1 12/18/1986).

Analisi Statistica - I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. Le misure vengono confrontate usando l'analisi della varianza (ANOVA) piú il test di Dunnett ed i risultati considerati significativi per $P < 0.005$.

Test di binding sul recettore CB₁ - I saggi di binding sono stati eseguiti sui composti **2a-b**, **5a-b**, **6b**, **7b**, **8b**, **9b**, **17**, **19**, **24**, **26** utilizzando [³H]WIN 55212-2 (Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts) come ligando. Gli studi di binding sono stati effettuati a 25°C con 20 µg del recettore in un buffer di 20mM HEPES/1mM MgCl (pH=7.4) con [³H]WIN 55212-2 ad una concentrazione di 10nM. Il volume finale è stato di 500 µL e il tempo di incubazione è stato di 20 minuti. La quota di [³H]WIN 55212-2 legata al recettore è stata separata dal [³H]WIN 55212-2 libero per filtrazione. Il filtro è stato lavato due volte con 200 µL del buffer da saggio freddo e analizzato per mezzo del liquido di scintillazione.

Test di inibizione della produzione di Prostaglandine - Il test farmacologico condotto sui composti **27-30** è stato effettuato inducendo la produzione di prostaglandine con lipopolisaccaride (LPS), previa somministrazione delle molecole da testare, quindi si è proceduto con l'analisi dei livelli di prostaglandine mediante saggio EIA condotto sul surnatante delle cellule prelevato 24h dopo la somministrazione di LPS.

Il lipopolisaccaride di *Escherichia Coli* (LPS, sierotipo 0111:B4, attività 6×10^{-6} u/mg) è stato acquistato alla Fluka, i sali e i reagenti per le colture cellulari sono stati comprati alla Sigma Chemical Co., i metaboliti radioattivi provengono dalla Amersham International plc, gli anticorpi monoclonali di topo per la ciclossigenasi sono stati ottenuti dai laboratori di trasduzione (Lexington,

U.K.). Il kit EIA per le prostaglandine E_2 è stato acquistato presso la Cayman, mentre il mezzo di Dulbecco modificato (DMEM) e i supplementi provengono dall'Hy Clone.

Analisi per la produzione di prostaglandine E_2 - Le cellule (1.5×10^6 cellule/P30) vengono attivate con LPS (6×10^{-3} unità/ml) in presenza del reattivo di Griess.

I livelli di PGE_2 nei macrofagi vengono quantificati attraverso il kit EIA in accordo con le istruzioni del kit stesso. I dati vengono espressi come percentuale di inibizione di PGE_2 (ng/ml).

PARTE SPERIMENTALE

Sintesi di 1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-2-acilpirrolo (1-7a) e 1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-3-acilpirrolo (1-7b).

Sintesi di 1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-pirrolo (I).

Ad una soluzione in acido acetico glaciale (15 mL) di 1-(2-amminoetil)-morfolina (7,8 mmol) viene aggiunta goccia a goccia una soluzione in acido acetico glaciale (5 mL) di 2,5-dimetossi-2,3,4,5-tetraidrofurano (7,8 mmol) e la miscela è posta sotto agitazione elettromagnetica e a riflusso per 3 ore e monitorata su TLC utilizzando diclorometano come eluente.

L'acido acetico viene allontanato per evaporazione sotto vuoto. Il grezzo viene risolubilizzato in diclorometano e la fase organica viene lavata con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ per allontanare l'acido acetico residuo.

Il solvente organico viene anidrificato su Na₂SO₄ ed allontanato per evaporazione sotto vuoto. Il grezzo viene quindi sottoposto ad una purificazione cromatografica su gel di silice utilizzando diclorometano come eluente.

Il prodotto **I** viene ottenuto come un olio giallo con una resa del 90-95%.

Metodica generale per la sintesi dei prodotti finali (1-7a e 1-7b).

L'intermedio **I** (7 mmol) viene solubilizzato in acetonitrile anidro (15 mL) e alla soluzione si aggiungono AlCl₃ (70 mmol) e l'opportuno cloruro acilico (21 mmol).

La reazione prosegue sotto agitazione elettromagnetica e a riflusso per 3 ore.

In seguito vengono aggiunti rispettivamente 5 ml di acqua distillata e 20 ml di una soluzione acquosa satura di Na₂CO₃. La fase acquosa viene estratta 5 volte con AcOEt, e il solvente organico viene anidrificato su Na₂SO₄ ed evaporato sotto vuoto.

Il grezzo viene sottoposto a purificazione mediante cromatografia su gel di silice utilizzando come eluente una miscela di diclorometano e metanolo nel rapporto di 4:1 (**2a-2b**) o n-esano e acetato di etile nel rapporto di 3:1.

I prodotti **1-7a** e **1-7b** vengono ottenuti come oli gialli con rese comprese rispettivamente tra il 28 e il 48% e tra il 5 e il 18%.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-2-fenilacetilpirrolo (1a): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 2.46 (m, 4H, 2CH₂); δ 2.63 (t, 2H, CH₂, $J= 6.8\text{Hz}$); δ 3.6 (m, 4H, 2CH₂); δ 4.3 (s, 2H, CH₂); δ 4.4 (t, 2H, CH₂, $J= 6.8\text{Hz}$); δ 6.19 (t, 1H, CH-4, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.90 (d, 1H, CH-5, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.13 (d, 1H, CH-3, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.30 (m, 5H, 5CH). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 46.47 (1CH₂); 47.14 (1CH₂); 53.97 (2CH₂); 60 (1CH₂); 67.10 (2CH₂); 108.1 (CH-4); 120 (CH-5); 126.94 (CH-3); 127.2-128.7-128.9-129.5-131.53 (5C-Ph); 127.21 (C-2); 135.85 (C1-Ph); 188.39 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%) calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ 298.17, trovato 299.5.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-3-fenilacetilpirrolo (1b): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 2.46 (m, 4H, 2CH₂); δ 2.62 (t, 2H, CH₂, $J= 6.8\text{Hz}$); δ 3.63 (m, 4H, 2CH₂); δ 3.90 (t, 2H, CH₂, $J= 6.8\text{Hz}$); δ 3.98 (s, 2H, CH₂); δ 6.58 (s, 1H, CH-2); δ 6.64 (d, 1H, CH-5); δ 7.35 (CH-4); δ 7.30 (m, 5H, 5CH). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) : 46.87 (1CH₂); 47.84 (1CH₂); 53.95 (2CH₂); 59.31 (1CH₂); 67.11 (2CH₂); 109.9 (CH-2); 122.72 (CH-4); 126.65 (CH-5); 126.6-128.7-128.9-129.5 (5C-Ph); 135.96 (C1-Ph); 142.08 (C-3); 193.1 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%) calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ 298.17, trovato 299.63.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-2-*p*-metilbenzoilpirrolo (2a): FC DCM/MeOH 4:1, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 2.42 (s, 3H, CH₃);

δ 2.51 (m, 4H, 2CH₂); δ 2.74 (t, 2H, CH₂, J = 6.8Hz); δ 3.6 (m, 4H, 2CH₂); δ 4.5 (t, 2H, CH₂, J = 6.8Hz); δ 6.16 (t, 1H, CH-4, J = 2Hz); δ 6.71 (d, 1H, CH-5, J = 2Hz); δ 7.01 (d, 1H, CH-3, J = 2Hz); δ 7.24 (d, 2H, 1CH₂, J = 7.6Hz); δ 7.71 (d, 2H, 1CH₂, J = 7.6Hz). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 21.82 (CH₃); 46.71 (1CH₂); 54.09 (2CH₂); 59.9 (1CH₂); 67.19 (2CH₂); 108.47 (CH-4); 123.07 (CH-5); 128.95 (C3-Ph); 129.67 (C2-Ph); 130.37 (C4-Ph); 130.93 (CH-3); 137.45 (C1-Ph); 142.22 (C-2); 186.21 (C=O). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₁₈H₂₂N₂O₂ 298.17, trovato 299.0.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-3-*p*-metilbenzoilpirrolo (2b): FC DCM/MeOH 4:1, olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.42 (s, 3H, CH₃); δ 2.46 (m, 4H, 2CH₂); δ 2.72 (t, 2H, CH₂, J = 6.8Hz); δ 3.69 (m, 4H, 2CH₂); δ 4.01 (t, 2H, CH₂, J = 6.8Hz); δ 6.57 (s, 1H, CH-2); δ 6.71 (d, 1H, CH-5, J = 2Hz); δ 7.24 (d, 1H, CH-4, J = 2Hz); δ 7.26 (d, 2H, 1CH₂, J = 7.6Hz); δ 7.74 (d, 2H, 1CH₂, J = 7.6Hz). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 21.82 (CH₃); 47.74 (1CH₂); 53.93 (2CH₂); 59.42 (1CH₂); 67.14 (2CH₂); 111.12 (CH-2); 122.63 (CH-4); 128.43 (CH-5); 129.05 (2CH₂-Ph); 129.33 (2CH₂-Ph); 130.83 (C4-Ph); 137.53 (C1-Ph); 142.08 (C-3); 193.14 (C=O). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₁₈H₂₂N₂O₂ 298.17, trovato 299.5.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-2-isobutilossicarbonilpirrolo (3a): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.98 (d, 6H, 2CH₃, J = 7.2Hz); δ 2.01 (m, 1H, CH); δ 2.49 (m, 4H, 2CH₂); δ 2.68 (t, 2H, CH₂, J = 6.8Hz); δ 3.68 (m, 4H, 2CH₂); δ 3.98 (d, 2H, CH₂, J = 6.4Hz); δ 4.44 (t, 2H, CH₂, J = 6.8Hz); δ 6.11 (t, 1H, CH-4, J = 2Hz); δ 6.87 (d, 1H, CH-5, J = 2Hz); δ 6.95 (d, 1H, CH-3, J = 2Hz). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 19.45 (2CH₃); 28.16 (1CH); 46.55 (1CH₂); 54.05 (2CH₂); 59.7 (1CH₂); 67.21 (2CH₂); 70.15 (CH₂); 108.26 (CH-4); 118.21 (CH-5); 128.26 (CH-3); 142.5 (C-2); 187.3 (C=O). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₁₅H₂₄N₂O₃ 280.18, trovato 281.3.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-2-butirrilpirrolo (4a): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.96 (t, 3H, CH_3 , $J= 8\text{Hz}$); δ 1.71 (m, 2H, CH_2); δ 2.53 (m, 4H, 2 CH_2); δ 2.70 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.2\text{Hz}$); δ 2.73 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.6\text{Hz}$); δ 3.70 (m, 4H, 2 CH_2); δ 4.49 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.2\text{Hz}$); δ 6.12 (t, 1H, CH-4, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.90 (d, 1H, CH-5, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.97 (d, 1H, CH-3, $J= 2\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 14.23 (CH_3); 19.03 (1 CH_2); 41.44 (1 CH_2); 47.02 (1 CH_2); 54.03 (2 CH_2); 59.53 (1 CH_2); 67.05 (2 CH_2); 108.37 (CH-4); 119.91 (CH-5); 130.86 (CH-3); 143.7 (C-2); 185.2 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%) calc. per $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ 250.17, trovato 251.3.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-3-butirrilpirrolo (4b): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.96 (t, 3H, CH_3 , $J= 8\text{Hz}$); δ 1.71 (m, 2H, CH_2); δ 2.53 (m, 4H, 2 CH_2); δ 2.70 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.2\text{Hz}$); δ 2.73 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.6\text{Hz}$); δ 3.70 (m, 4H, 2 CH_2); δ 4.01 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.2\text{Hz}$); δ 6.56 (s, 1H, CH-2); δ 6.66 (d, 1H, CH-5, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.33 (d, 1H, CH-4, $J= 2\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 14.29 (CH_3); 18.73 (1 CH_2); 41.44 (1 CH_2); 47.77 (1 CH_2); 53.99 (2 CH_2); 59.47 (1 CH_2); 67.06 (2 CH_2); 109.44 (CH-2); 122.64 (CH-4); 125.97 (CH-5); 142.7 (C-3); 183.2 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%) calc. per $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ 250.17, trovato 251.8.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-2-cicloesanoilpirrolo (5a): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.20-1.82 (m, 10H, 5 CH_2); δ 2.48 (m, 4H, 2 CH_2); δ 2.63 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.2\text{Hz}$); δ 3.05 (m, 1H, CH); δ 3.67 (m, 4H, 2 CH_2); δ 4.43 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.2\text{Hz}$); δ 6.11 (t, 1H, CH-4, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.88 (d, 1H, CH-5, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.97 (d, 1H, CH-3, $J= 2\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 26.13 (CH_2); 26.16 (2 CH_2); 30.18 (2 CH_2); 47.20 (1 CH_2); 47.26 (CH); 54.04 (2 CH_2); 59.62 (1 CH_2); 67.21 (2 CH_2); 108.22 (CH-4); 119.41 (CH-5); 129.7 (C-2); 131.03 (CH-3); 194.2 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%) calc. per $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ 290.2, trovato 291.3.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-3-cicloesanoilpirrolo (5b): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.22-1.82 (m, 10H, 5 CH_2); δ 2.45 (m, 4H, 2 CH_2); δ 2.69 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.2\text{Hz}$); δ 2.87 (m, 1H, CH); δ 3.68 (m, 4H, 2 CH_2); δ 3.98 (t, 2H, CH_2 , $J= 7.2\text{Hz}$); δ 6.56 (s, 1H, CH-2); δ 6.65 (d, 1H, CH-5, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.33 (d, 1H, CH-4, $J= 2\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 26.22 (3 CH_2); 29.87 (2 CH_2); 47.77 (1 CH_2); 47.85 (CH); 53.98 (2 CH_2); 59.42 (1 CH_2); 67.15 (2 CH_2); 109.55 (CH-2); 122.54 (CH-4); 125.93 (CH-5); 142.7 (C-3); 212.2 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$,100%) calc. per $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ 290.2, trovato 291.5.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-2-*p*-metossibenzoilpirrolo (6a): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 2.39 (m, 4H, 2 CH_2); δ 2.62 (t, 2H, CH_2 , $J= 6.8\text{Hz}$); δ 3.57 (m, 4H, 2 CH_2); δ 3.75 (s, 3H, OCH_3); δ 4.4 (t, 2H, CH_2 , $J= 6.8\text{Hz}$); δ 6.16 (t, 1H, CH-4, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.61 (d, 1H, CH-5, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.82 (d, 2H, 1 CH_2 , $J= 7.6\text{Hz}$); δ 6.9 (d, 1H, CH-3, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.79 (d, 2H, 1 CH_2 , $J= 7.6\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 46.71 (1 CH_2); 54.09 (2 CH_2); 55.9 (OCH_3); 59.9 (1 CH_2); 67.19 (2 CH_2); 106.58 (CH-4); 114.4 (C3-Ph); 121.05 (CH-5); 127.45 (C1-Ph); 128.81 (CH-3); 139.76 (C-2); 139.77 (C2-Ph); 163.46 (C4-Ph); 188.77 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$,100%) calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ 314.2, trovato 315.6.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-3-*p*-metossibenzoilpirrolo (6b): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 2.42 (m, 4H, 2 CH_2); δ 2.64 (t, 2H, CH_2 , $J= 6.8\text{Hz}$); δ 3.63 (m, 4H, 2 CH_2); δ 3.8 (s, 3H, OCH_3); δ 4.0 (t, 2H, CH_2 , $J= 6.8\text{Hz}$); δ 6.16 (t, 1H, CH-4, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.61 (d, 1H, CH-5, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.62 (s, 1H, CH-2); δ 6.69 (d, 1H, CH-5, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.9 (d, 2H, 1 CH_2 , $J= 7.6\text{Hz}$); δ 7.23 (d, 1H, CH-4, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.82 (d, 2H, 1 CH_2 , $J= 7.6\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 46.71 (1 CH_2); 54.09 (2 CH_2); 55.9 (OCH_3); 59.9 (1 CH_2); 67.19 (2 CH_2); 106.58 (CH-4); 114.4 (C3-Ph); 121.05

(CH-5); 127.45 (C1-Ph); 128.81 (CH-2); 139.76 (C-3); 139.77 (C2-Ph); 163.46 (C4-Ph); 188.77 (C=O). ES-MS m/z ($M+H^+$, 100%) calc. per $C_{18}H_{22}N_2O_3$ 314.2, trovato 315.4.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-2-*p*-clorobenzoilpirrolo (7a): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 2.52 (m, 4H, 2CH₂); δ 2.74 (t, 2H, CH₂, $J= 6.8$ Hz); δ 3.66 (m, 4H, 2CH₂); δ 4.52 (t, 2H, CH₂, $J= 6.8$ Hz); δ 6.17 (t, 1H, CH-4, $J= 2$ Hz); δ 6.90 (d, 1H, CH-5, $J= 2$ Hz); δ 7.03 (d, 1H, CH-3, $J= 2$ Hz); δ 7.42 (d, 2H, 1CH₂, $J= 7.6$ Hz); δ 7.73 (d, 2H, 1CH₂, $J= 7.6$ Hz). ^{13}C NMR (400MHz, $CDCl_3$): 46.73 (1CH₂); 54.05 (2CH₂); 59.9 (1CH₂); 67.16 (2CH₂); 108.83 (CH-4); 123.55 (CH-5); 128.6 (C3-Ph); 129.38 (C1-Ph); 130.86 (C2-Ph); 131.63 (CH-3); 138.54 (C-2); 165.93 (C4-Ph); 188.92 (C=O). ES-MS m/z ($M+H^+$, 100%) calc. per $C_{17}H_{19}N_2O_2Cl$ 318.2, trovato 319.8.

1-(2-(morfolin-1-il)-etil)-3-*p*-clorobenzoilpirrolo (7b): FC n-esano/AcOEt 3:1, olio giallo. 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 2.42 (m, 4H, 2CH₂); δ 2.64 (t, 2H, CH₂, $J= 6.8$ Hz); δ 3.63 (m, 4H, 2CH₂); δ 4.0 (t, 2H, CH₂, $J= 6.8$ Hz); δ 6.62 (s, 1H, CH-2); δ 6.75 (d, 1H, CH-5, $J= 2$ Hz); δ 7.23 (d, 1H, CH-4, $J= 2$ Hz); δ 7.42 (d, 2H, 1CH₂, $J= 7.6$ Hz); δ 7.82 (d, 2H, 1CH₂, $J= 7.6$ Hz). ^{13}C NMR (400MHz, $CDCl_3$): 46.78 (1CH₂); 54.3 (2CH₂); 59.5 (1CH₂); 67.6 (2CH₂); 106.58 (CH-4); 114.4 (C3-Ph); 121.05 (CH-5); 128.54 (C1-Ph); 128.81 (CH-2); 139.76 (C-3); 132.83 (C2-Ph); 164.76 (C4-Ph); 188.77 (C=O). ES-MS m/z ($M+H^+$, 100%) calc. per $C_{18}H_{22}N_2O_3$ 318.2, trovato 318.8.

Sintesi di 1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-2-acilpirrolo (8-11a) e 1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-3-acilpirrolo (8-11b).

La sintesi dei composti **8-11a** e **8-11b** segue la stessa procedura descritta per i composti **1-7a** ed **1-7b** e utilizza la 1-(2-amminoetil)-piperidina come ammina di partenza e gli opportuni cloruri aroilici come agenti acilanti.

La purificazione è stata effettuata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando come eluente una miscela di diclorometano e metanolo nel rapporto 9:0,5 (**8a-8b** e **9a-9b**) o 9:0,75 (**10a-10b** e **11a-11b**) e ha fornito i prodotti **8-11a** e **8-11b** come oli gialli con rese comprese rispettivamente tra il 30 e il 38% e tra il 10 e il 19%.

1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-2-*p*-clorobenzoilpirrolo (8a): FC DCM/MeOH 9/0.5, olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.43 (m, 2H, 1CH₂ pip); δ 1,61 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.57 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.81 (t, 2H, CH₂-Npip, J= 6.8Hz); δ 4.57 (t, 2H, CH₂-Npirr, J= 6.8Hz); δ 6.15 (t, 1H, CH-4 pirr, J= 2Hz); δ 6.68 (d, 1H, CH-5 pirr, J= 2Hz); δ 7.07 (d, 1H, CH-3 pirr, J= 2Hz); δ 7.49 (d, 2H, 2CH 3 e 5 benz, J= 7.6Hz); δ 7.71 (d, 2H, 2CH 2 e 6 benz, J= 7.6Hz). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 24.13 (1CH₂ pip); 25.63 (2CH₂ pip); 46.66 (CH₂-Npip); 54.75 (2CH₂ pip); 59.68 (CH₂-Npirr); 108.93 (CH-4 pirr); 123.69 (CH-5 pirr); 128.2 (C4 benz); 128.56 (CH 3 e 5 benz); 130.81 (CH 2 e 6 benz); 131.9 (CC=O benz); 137.8 (C-2 pirr); 184.92 (C=O). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₁₈H₂₁ClN₂O 316.3, trovato 317.1.

1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-3-*p*-clorobenzoilpirrolo (8b): FC DCM/MeOH 9/0.5, olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.43 (m, 2H, 1CH₂ pip); δ 1,56 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.40 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.66 (t, 2H, CH₂-Npip, J= 6.8Hz); δ 3.99 (t, 2H, CH₂-Npirr, J= 6.8Hz); δ 6.62 (s, 1H, CH-2

pirr); δ 6.71 (d, 1H, CH-5 pirr, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.26 (d, 1H, CH-4 pirr, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.40 (d, 2H, 2CH 3 e 5 benz, $J= 7.6\text{Hz}$); δ 7.77 (d, 2H, 2CH 2 e 6 benz, $J= 7.6\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 24.37 (1CH₂ pip); 26.18 (2CH₂ pip); 48.13 (CH₂-Npip); 54.94 (2CH₂ pip); 59.77 (CH₂-Npirr); 110.03 (CH-2 pirr); 123.0 (CH-5 pirr); 124.2 (C4 benz); 128.63 (CH-4 pirr); 128.7 (CH 3 e 5 benz); 130.56 (CH 2 e 6 benz); 137.6 (C-3 pirr); 137.7 (CC=O benz); 189.5 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$,100%) calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}$ 316.3, trovato 317.0.

1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-2-*p*-metossibenzoilpirrolo (9a): FC DCM/MeOH 9/0.5, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.40 (m, 2H, 1CH₂ pip); δ 1.56 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.49 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.74 (t, 2H, CH₂-Npip, $J= 6.8\text{Hz}$); δ 3.84 (s, 3H, OCH₃); δ 4.52 (t, 2H, CH₂-Npirr, $J= 6.8\text{Hz}$); δ 6.13 (t, 1H, CH-4 pirr, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.68 (d, 1H, CH-5 pirr, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.92 (d, 2H, CH 3 e 5 benz, $J= 7.6\text{Hz}$); δ 7.01 (d, 1H, CH-3 pirr, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.80 (d, 2H, 1CH₂, $J= 7.6\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 24.37 (1CH₂ pip); 26.01 (2 CH₂ pip); 54.92 (2CH₂ pip); 46.8 (CH₂-Npip); 55.64 (CH₂-Npirr); 60.18 (OCH₃); 108.34 (CH-4 pirr); 113.5 (CH 3 e 5 benz); 122.61 (CH-5 pirr); 130.83 (CH-3 pirr); 130.27 (C1 benz); 131.71 (CH 2 e 6 benz); 132.8 (C-2 pirr); 162.62 (C4 benz); 185.31 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$,100%) calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ 312.2, trovato 313.6.

1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-3-*p*-metossibenzoilpirrolo (9b): FC DCM/MeOH 9/0.5, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.43 (m, 2H, 1CH₂ pip); δ 1.56 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.41 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.67 (t, 2H, CH₂-Npip, $J= 6.8\text{Hz}$); δ 3.85 (s, 3H, OCH₃); δ 4.02 (t, 2H, CH₂-Npirr, $J= 6.8\text{Hz}$); δ 6.63 (s, 1H, CH-2 pirr); δ 6.70 (d, 1H, CH-5 pirr, $J= 2\text{Hz}$); δ 6.93 (d, 2H, CH₂ 3 e 5 benz, $J= 7.6\text{Hz}$); δ 7.26 (d, 1H, CH-4 pirr, $J= 2\text{Hz}$); δ 7.86 (d, 2H, CH₂ 2 e 6 pirr, $J= 7.6\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 24.38 (1CH₂ pip); 26.18 (2CH₂ pip); 48.1 (CH₂-Npirr); 54.9 (2CH₂ pip); 59.9 (OCH₃); 59.9 (CH₂-

Npip); 110.99 (CH-2 pirr); 113.6 (CH 3 e 5 benz); 122.5 (CH-5 pirr); 124.6 (C-3 pirr); 128.1 (CH-4 pirr); 131.39 (CH 2 e 6 benz); 132.9 (C1 benz); 162.48 (C4 benz); 189.6 (C=O). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₁₉H₂₄N₂O₂ 312.2, trovato 313.4.

1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-2-nafto-1-il-pirrolo (10a): FC DCM/MeOH 9/0.75, olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.45 (m, 2H, CH₂ pip); δ 1.62 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.55 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.84 (t, 2H, CH₂-Npip, J= 6.8Hz); δ 4.69 (t, 2H, CH₂-Npirr, J= 6.8Hz); δ 6.1 (t, 1H, CH-4 pirr, J= 2Hz); δ 6.51 (d, 1H, CH-5 pirr, J= 2Hz); δ 7.06 (d, 1H, CH-3 pirr, J= 2Hz); δ 7.49 (t, 1H, CH-3 naft, J= 7.6Hz); δ 7.49 (t, 1H, CH-6 naft, J= 7.6Hz); δ 7.49 (t, 1H, CH-6 naft, J= 7.6Hz); δ 7.86 (d, 1H, CH-5 naft, J= 7.6Hz); δ 7.87 (d, 1H, CH-5 naft, J= 7.6Hz); δ 7.97 (t, 1H, CH-2 naft, J= 7.6Hz); δ 8.19 (d, 1H, CH-8 naft, J= 7.6Hz). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 24.49 (1CH₂ pip); 26.21 (2 CH₂ pip); 47.4 (CH₂-Npirr); 55.1 (2CH₂ pip); 60.25 (CH₂-Npip); 108.8 (CH-4 pirr); 124.52 (CH-5 pirr); 124.6 (CH-7 naft); 126.16 (CH-3 naft); 126.5 (CH-6 naft); 126.5 (CH-8 naft); 126.9 (CH-5 naft); 128 (CH-4 naft); 130.32 (CH-2 naft); 130.52 (CH-3 pirr); 130.8 (C-10 naft); 131.15 (C-2 pirr); 133.8 (C-9 naft); 192.3 (C=O). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₂₂H₂₄N₂O 332.2, trovato 333.5.

1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-3-nafto-1-il-pirrolo (10b): FC DCM/MeOH 9/0.75, olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.41 (m, 2H, 1CH₂ pip); δ 1.51 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.35 (m, 4H, 2CH₂ pip); δ 2.60 (t, 2H, CH₂-Npip, J= 6.8Hz); δ 3.92 (t, 2H, CH₂-Npirr, J= 6.8Hz); δ 6.69 (s, 1H, CH-2 pirr); δ 6.70 (d, 1H, CH-5 pirr, J= 2Hz); 7.10 (d, 1H, CH-4 pirr, J= 2Hz); δ 7.49 (t, 1H, CH-3 naft, J= 7.6Hz); δ 7.49 (t, 1H, CH-6 naft, J= 7.6Hz); δ 7.49 (t, 1H, CH-6 naft, J= 7.6Hz); δ 7.86 (d, 1H, CH-5 naft, J= 7.6Hz); δ 7.87 (d, 1H, CH-5 naft, J= 7.6Hz); δ 7.97 (t, 1H, CH-2 naft, J= 7.6Hz); δ 8.19 (d, 1H, CH-8 naft, J=

7.6Hz). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 24.38 (1 CH_2 pip); 26.18 (2 CH_2 pip); 48.1 (CH_2 -Npirr); 54.9 (2 CH_2 pip); 59.9 (CH_2 -Npip); 110.6 (CH-2 pirr); 123.2 (CH-5 pirr); 124.6 (CH-7 naft); 126.1 (CH-3 naft); 126.5 (CH-6 naft); 126.5 (CH-8 naft); 126.9 (CH-5 pirr); 128 (CH-4 naft); 129.3 (CH-4 pirr); 130.3 (CH-2 naft); 130.8 (C-10 naft); 133.9 (C-9 naft); 138.7 (C-3 pirr); 153.8 (C1 naft); 192.3 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%) calc. per $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ 332.2, trovato 333.7.

1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-2-*p*-metilbenzoilpirrolo (11a): FC DCM/MeOH 9/0.5, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.40 (m, 2H, 1 CH_2 pip); δ 1.54 (m, 4H, 2 CH_2 pip); δ 2.46 (m, 4H, 2 CH_2 pip); δ 2.71 (t, 2H, CH_2 -Npip, $J=6.8\text{Hz}$); δ 2.39 (s, 3H, CH_3); δ 4.51 (t, 2H, CH_2 -Npirr, $J=6.8\text{Hz}$); δ 6.12 (t, 1H, CH-4 pirr, $J=2\text{Hz}$); δ 6.69 (d, 1H, CH-5 pirr, $J=2\text{Hz}$); δ 7.00 (d, 1H, CH-3 pirr, $J=2\text{Hz}$); δ 7.22 (d, 2H, CH 3 e 5 benz, $J=7.6\text{Hz}$); δ 7.70 (d, 2H, 1 CH_2 , $J=7.6\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 21.77 (1 CH_2 pip); 24.48 (2 CH_2 pip); 26.19 (2 CH_2 pip); 47.05 (CH_2 -Npip); 54.99 (CH_3); 60.27 (CH_2 -Npirr); 108.38 (CH-4 pirr); 123.12 (CH-5 pirr); 128.91 (CH 3 e 5 benz); 129.64 (CH 2 e 6 benz); 131.08 (CH-3 pirr); 130.24 (C-2 pirr); 137.56 (C4 benz); 142.09 (C1 benz); 186.1 (C=O). ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%) calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ 296.2, trovato 297.5.

1-(2-(piperidin-1-il)-etil)-3-*p*-metilbenzoilpirrolo (11b): FC DCM/MeOH 9/0.5, olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.42 (m, 2H, 1 CH_2 pip); δ 1.54 (m, 4H, 2 CH_2 pip); δ 2.38 (m, 4H, 2 CH_2 pip); δ 2.38 (s, 3H, CH_3); δ 2.63 (t, 2H, CH_2 -Npip, $J=6.8\text{Hz}$); δ 3.97 (t, 2H, CH_2 -Npirr, $J=6.8\text{Hz}$); δ 6.63 (s, 1H, CH-2 pirr); δ 6.69 (d, 1H, CH-5 pirr, $J=2\text{Hz}$); δ 7.21 (d, 2H, CH_2 3 e 5 benz, $J=7.6\text{Hz}$); δ 7.25 (d, 1H, CH-4 pirr, $J=2\text{Hz}$); δ 7.73 (d, 2H, CH_2 2 e 6 pirr, $J=7.6\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 21.77 (1 CH_2 pip); 24.40 (2 CH_2 pip); 26.21 (2 CH_2 pip); 48.1 (CH_2 -Npirr); 54.94 (CH_3); 59.84 (CH_2 -Npip); 110.91 (CH-2 pirr); 122.7 (CH-5 pirr); 128.55 (CH-4 pirr); 129.01 (CH 3 e 5

benz); 129.3 (CH 2 e 6 benz); 130.21 (C4 benz); 137.6 (C-3 pirr); 141.93 (C1 benz); 190.58 (C=O). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₁₉H₂₄N₂O 296.2, trovato 297.4.

Sintesi di (S)-1-((N-2-(1-idrossi-2-alchil)-etil)-2-ammino)etil-3-*p*-metossibenzoil-2,5-dimetilpirrolo (12-15).

Boc-(S)-β-alchil-β-amminoalcoli (A''-D'')

Ad una soluzione dell'appropriato Boc-L-α-amminoacido (A'-D') (5 mmol) in THF anidro (15 ml) vengono aggiunti cloroformiato di etile (5,3 mmol) ed N-metilmorfolina (5,3 mmol). La miscela viene lasciata sotto agitazione elettromagnetica a -15 °C per 1,5 ore.

Successivamente i sali in sospensione vengono allontanati per semplice filtrazione e lavati con THF anidro (15 ml). Si aggiunge alla mistura NaBH₄ (25 mmol) in piccole porzioni e la reazione prosegue sotto agitazione elettromagnetica a -15 °C per 3 ore . In seguito si aggiunge goccia a goccia una soluzione acquosa satura di acido citrico fino a pH 7, e la miscela viene estratta 5 volte con acetato di etile.

La fase organica viene lavata con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃, anidrificata su Na₂SO₄ e infine il solvente viene evaporato sotto vuoto.

Il prodotto, ottenuto con una resa del 90-95% , si presenta sotto forma di un olio incolore (A''-C'') o di cristalli bianchi (D'').

(S)-β-alchil-β-amminoalcoli (A-D)

L'intermedio (A''-D'') (4,75 mmol) viene sciolto in una miscela (10 ml) di DCM e TFA 1:1 , con l'aggiunta di 2 gocce di (Et)₃SiH come scavenger. La

miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione elettromagnetica per 3 ore e monitorata su TLC utilizzando come camera AcOEt.

Successivamente, il solvente viene allontanato sotto vuoto e il grezzo viene lavato più volte con etere etilico al fine di allontanare il TFA.

Il prodotto viene quindi ottenuto come un olio (**A-C**) o come cristalli bianchi (**D**) con una resa di circa il 95%.

N-(2-bromo)-etil-2,5-dimetilpirrolo (II).

Ad una sospensione di 2-Bromoetilamina bromidrato (4,88 mmol) in acetonitrile (15 ml), si aggiungono sodio carbonato (4,88 mmol) e acetoniacetone (5 mmol). La reazione viene lasciata sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 3 ore.

Successivamente, i sali in sospensione vengono allontanati per semplice filtrazione e lavati con diclorometano. Il solvente viene quindi allontanato per evaporazione sotto vuoto e l'intermedio viene purificato mediante cromatografia su gel di silice utilizzando AcOEt come eluente.

Il prodotto **II** viene ottenuto come un olio incolore con una resa del 75-80%.

N-(2-bromo)-etil-3-p-metossibenzoil-2,5-dimetilpirrolo (III).

La sintesi dell'intermedio **III** è analoga a quella descritta nella metodica di preparazione dei derivati **1-7a** ed **1-7b** ed utilizza il cloruro di *p*-metossibenzoile come agente acilante.

Il prodotto **III** viene ottenuto come un olio giallo con una resa del 85-90%.

Metodica generale per la sintesi dei prodotti finali (12-15).

L'intermedio **III** (3,5 mmol) viene sciolto in DMF (5 ml) e alla soluzione si aggiungono NaHCO₃ (3,5 mmol) e l'appropriato (S)-β-alchil-β-amminoalcol

(A-D), sciolto anch'esso in DMF (5 ml). La reazione prosegue sotto agitazione elettromagnetica a 60 °C per 24-72 ore.

Successivamente i sali in sospensione vengono allontanati per semplice filtrazione, lavati con DCM e il solvente viene evaporato sotto vuoto.

Il grezzo viene sottoposto quindi ad una purificazione su TLC utilizzando come eluente una miscela di AcOEt-TEA 10:1 (12-13) o 10:2 (14-15).

Il prodotto finale viene ottenuto come un olio giallo con una resa di circa il 35% per i composti 13 e 15 e il 45% per i composti 12 e 14.

(S) 1-((N-2-(1-idrossi)-propil)-2-ammino)-etil-3-*p*-metossibenzoil-2,5-dimetilpirrolo (12): TLC AcOEt/TEA (10/1), olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.05 (d, 3H, CH₃, J =16 Hz); δ 2.39 (s, 3H, CH₃); δ 2.55 (s, 3H, CH₃); δ 2.81 (m, 1H, CH); δ 2.82 (m, 1H, CH₂NH); δ 3.10 (m, 1H, CH₂NH); δ 3.30 (m, 1H, CH₂OH); δ 3.60 (m, 1H, CH₂OH); δ 3.86 (s, 3H, OCH₃); δ 3.95 (t, 2H, CH₂); δ 6.08 (s, 1H, CH); δ 6.93 (d, 2H, 2CH, J=12Hz); δ 7.81 (d, 2H, 2CH, J=12Hz). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 12.24 (CH₃); 12.55 (CH₃); 17.27 (CH₃); 44.30 (CH₂); 46.69 (CH₂); 54.88 (CH); 55.55 (OCH₃); 65.82 (CH₂OH); 110.38 (CH); 113.37 (CH); 119.0 (CC=O); 127.0 (CCH₃); 131.56 (CH); 133.75 (CC=O); 135.0 (CCH₃); 162.28 (C-OCH₃); 191.37 (C=O). ES-MS m/z calc. per C₁₉H₂₆N₂O₄ 330.19, trovato 331.69.

(S) 1-((N-2-(1-idrossi-3-metil)-butil)-2-ammino)-etil-3-*p*-metossibenzoil-2,5-dimetilpirrolo (13): TLC AcOEt/TEA (10/1), olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.94 (d, 3H, CH₃, J =17 Hz); δ 1.06 (d, 3H, CH₃, J =17 Hz); δ 1.98 (m, 1H, CH); δ 2.27 (s, 3H, CH₃); δ 2.57 (s, 3H, CH₃); δ 2.65 (m, 1H, CH); δ 3.03 (m, 1H, CH₂NH); δ 3.08 (m, 1H, CH₂NH); δ 3.57 (m, 1H, CH₂OH); δ 3.75 (m, 1H, CH₂OH); δ 3.86 (s, 3H, OCH₃); δ 4.19 (t, 2H, CH₂); δ 6.09 (s, 1H, CH); δ 6.92 (d, 2H, 2CH, J=12Hz); δ 7.80 (d, 2H, 2CH, J=12Hz).

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 12.17 (CH_3); 12.56 (CH_3); 18.41 (CH_3); 19.75 (CH_3); 28.77 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 42.51 (CH_2); 46.80 (CH_2); 55.57 (OCH_3); 60.48 (CH_2OH); 66.09 (CH); 110.59 (CH); 113.39 (CH); 120.11 ($\text{CC}=\text{O}$); 127.21 (CCH_3); 131.59 (CH); 133.47 ($\text{CC}=\text{O}$); 135.66 (CCH_3); 162.36 (C-OCH_3); 191.33 ($\text{C}=\text{O}$). ES-MS m/z calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ 358.23, trovato 359.53.

(S) 1-(2(2-idrossimetilen)-pirrolidin-1-il)-etil-3-*p*-metossibenzoil-2,5-dimetilpirrolo (14): TLC AcOEt/TEA (10/2), olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.81-1.82 (m, 2H, 2CH); δ 1.85-1.86 (m, 2H, 2CH); δ 2.35 (s, 3H, CH_3); δ 2.4 (m, 1H, 1CH); δ 2.55 (s, 3H, CH_3); δ 2.6 (m, 1H, CH); δ 2.64 (m, 1H, CH_2NH); δ 2.96 (m, 1H, CH_2NH); δ 3.2 (m, 1H, CH); δ 3.36 (dd, 1H, CH_2OH); δ 3.51 (dd, 1H, CH_2OH); δ 3.86 (s, 3H, OCH_3); δ 3.93 (t, 2H, CH_2); δ 6.08 (s, 1H, CH); δ 6.92 (d, 2H, 2CH, $J=12\text{Hz}$); δ 7.80 (d, 2H, 2CH, $J=12\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 12.09 (CH_3); 12.49 (CH_3); 24.11 (CH_2); 27.28 (CH_2); 43.44 (CH_2); 54.73 (CH_2NH); 55.22 (CH_2); 55.58 (OCH_3); 62.75 (CH_2OH); 65.42 (CH); 110.38 (CH); 113.34 (CH); 120.11 ($\text{CC}=\text{O}$); 127.08 (CCH_3); 131.61 (CH); 133.75 ($\text{CC}=\text{O}$); 135 (CCH_3); 162.23 (C-OCH_3); 191.87 ($\text{C}=\text{O}$). ES-MS m/z calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$ 356.21, trovato 357.12.

(S) 1-((N-2-(1-idrossi-3-fenil)-propil)-2-ammino)-etil-3-*p*-metossibenzoil-2,5-dimetilpirrolo (15): TLC AcOEt/TEA (10/2), olio giallo. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 2.19 (s, 3H, CH_3); δ 2.51 (s, 3H, CH_3); δ 2.72 (d, 2H, CH_2Ph); δ 2.81 (m, 1H, CH); δ 2.88 (m, 2H, CH_2NH); δ 3.32 (m, 1H, CH_2OH); δ 3.59 (m, 1H, CH_2OH); δ 3.87 (s, 3H, OCH_3); δ 3.89 (t, 2H, CH_2); δ 6.06 (s, 1H, CH); δ 6.92 (d, 2H, 2CH, $J=12\text{Hz}$); δ 7.13 (d, 2H, 2CH, $J=12\text{Hz}$); δ 7.20 (m, 1H, CH); δ 7.30 (m, 2H, 2CH); δ 7.80 (d, 2H, 2CH, $J=12\text{Hz}$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 12.19 (CH_3); 12.24 (CH_3); 38.31 (CH_2Ph); 44.25 (CH_2); 44.95 (CH_2NH); 55.59 (OCH_3); 60.69 (CH); 63.11 (CH_2OH); 110.42 (CH); 113.35 (CH); 120.11 ($\text{CC}=\text{O}$); 126.8 (CCH_3); 131.58 (CH); 133.2 ($\text{CC}=\text{O}$);

135.5 (CCH₃); 162.69 (C-OCH₃); 191.4 (C=O). ES-MS m/z calc. per C₂₅H₃₀N₂O₃ 406.23, trovato 407.02.

Sintesi di N-(2-(N'-ftalimmido)-etil)-3-aroil-2,5-dimetil-1H-pirrolo (16-17).

N-(2-bromo)-etil-2,5-dimetilpirrolo (II).

La sintesi di questo intermedio è stata descritta nella metodica di preparazione dei derivati **12-15**.

N-(2-bromo)-etil-3-aroil-2,5-dimetil-1H-pirroli (III-IV).

La sintesi dell'intermedio **III** è stata descritta nella metodica di preparazione dei derivati **12-15**; la sintesi dell'intermedio **IV** è analoga ed utilizza il cloruro di *p*-clorobenzoile come agente acilante.

I prodotti **III-IV** vengono ottenuti come oli gialli con una resa del 85-90%.

Metodica generale per la sintesi dei prodotti finali (16-17).

La sintesi dei composti **16-17** è analoga a quella descritta per i derivati **12-15**, ed utilizza la potassio ftalimmide come agente nucleofilo.

La purificazione finale viene eseguita su TLC utilizzando una miscela di n-esano e acetato di etile nel rapporto di 2:1.

I prodotti finali **16-17** si presentano come oli gialli e vengono ottenuti con una resa del 20%.

Sintesi di (N'-ftalimmido)-N-il-3-aroil-2,5-dimetil-1H-pirrolo (18-19).

N-(N'-ftalimmido)-2,5-dimetil-1H-pirrolo (V).

La sintesi di questo intermedio è analoga a quella descritta per l'intermedio **II** nella metodica di preparazione dei derivati **12-15**, ed utilizza la N-amminoftalimmide come ammina di partenza. Il grezzo viene sottoposto ad una purificazione cromatografica su gel di silice utilizzando acetato di etile come eluente.

Il prodotto **V** viene ottenuto come un solido giallo con una resa del 45%.

Metodica generale per la sintesi dei prodotti finali (18-19).

La sintesi di questi intermedi è analoga a quella descritta per l'intermedio **V** nella metodica di preparazione dei derivati **1-7a** ed **1-7b**, ed utilizza il cloruro di *p*-clorobenzoile (**18**) o di *p*-anisoile (**19**) come agenti acilanti.

Il grezzo viene sottoposto a purificazione mediante cromatografia su gel di silice utilizzando come eluente una miscela di n-esano e acetato di etile nel rapporto di 2:1.

I prodotti **18-19** vengono ottenuti come oli gialli con una resa del 85-90%.

Sintesi di (N'-ftalimmido)-N-il-2-acil-1H-pirrolo (20-22).

(N'-ftalimmido)-N-1H-pirrolo (VI).

La sintesi di questo intermedio è analoga a quella descritta per l'intermedio **I** nella metodica di preparazione dei derivati **1-7a** ed **1-7b**, ed utilizza la N-amminoftalimmide come ammina di partenza.

Il grezzo viene sottoposto ad una purificazione cromatografica su gel di silice utilizzando diclorometano come eluente.

Il prodotto **VI** viene ottenuto come un solido giallo con una resa del 53%.

Metodica generale per la sintesi dei prodotti finali (20-22).

La sintesi dei composti **20-22** è analoga a quella descritta per la preparazione dei derivati **1-7a** e **1-7b**, ed utilizza il cloruro di *p*-toluoile (**20**) o di *p*-anisoile (**21**) o fenilacetile (**22**) come agenti acilanti.

Il grezzo viene sottoposto a purificazione mediante cromatografia su gel di silice utilizzando come eluente una miscela di *n*-esano e acetato di etile nel rapporto di 1:1.

I prodotti **20-22** vengono ottenuti come oli gialli con una resa del 35-45%.

N-(2-(N'-ftalimmido)-etil)-3-*p*-clorobenzoil-2,5-dimetil-1*H*-pirrolo

(16): TLC AcOEt/*n*-esano (1/2), olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.29 (s, 3H, CH₃-2 pirr); δ 2.57 (s, 3H, CH₃-5 pirr); δ 3.91 (t, 2H, CH₂-pirr); δ 4.10 (t, 2H, CH₂-ftal); δ 6.04 (s, 1H, CH pirr); δ 7.38 (d, 2H, CH benz 3 e 5, J=12Hz); δ 7.70 (d, 2H, CH benz 2 e 6, J=12Hz); δ 7.75 (m, 2H, CH ftal 3 e 4); δ 7.86 (m, 2H, CH ftal 3 e 6). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 11.98 (CH₃-2); 12.25 (CH₃-5); 37.13 (CH₂-pirr); 41.47 (CH₂-ftal); 110.56 (CH-4 pirr); 112 (C-2 pirr); 123.77 (CH ftal 3 e 6); 127.7 (C-5 pirr); 128.38 (CH benz 3 e 5); 130.71 (CH benz 2 e 6); 132.04 (C-3 pirr); 134.59 (CH ftal 4 e 5); 136.6 (C ftal); 137.3 (CC=O benz); 139.4 (C-Cl); 167.9 (C=O ftal); 197.37 (C=O benz). ES-MS m/z (M+H⁺, 100%) calc. per C₂₃H₁₉ClN₂O₃ 406.1, trovato 407.5.

N-(N'-ftalimmido)-etil-3-*p*-metossibenzoil-2,5-dimetil-1*H*-pirrolo

(17): TLC AcOEt/*n*-esano (1/1), olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.31

(s, 3H, CH₃-2 pirr); δ 2.55 (s, 3H, CH₃-5 pirr); δ 3.86 (s, 3H, OCH₃); δ 3.92 (t, 2H, CH₂-pirr); δ 4.13 (t, 2H, CH₂-ftal); δ 6.10 (s, 1H, CH pirr); δ 6.91 (d, 2H, CH benz 3 e 5, J=12Hz); δ 7.75 (m, 2H, CH ftal 4 e 5); δ 7.79 (d, 2H, CH benz 2 e 6, J=12Hz); δ 7.87 (m, 2H, CH ftal 3 e 6). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 11.78 (CH₃-2); 12.10 (CH₃-5); 37.26 (CH₂-pirr); 41.31 (CH₂-ftal); 55.48 (OCH₃); 110.86 (CH-4 pirr); 113.38 (CH benz 3 e 5); 113.4 (C-2 pirr); 123.64 (CH ftal 3 e 6); 127.18 (C-5 pirr); 131.46 (CH benz 2 e 6); 132.2 (C-3 pirr); 133.9 (CC=O benz); 134.38 (CH ftal 4 e 5); 135.5 (C ftal); 162.33 (C-OMe); 167.8 (C=O ftal); 195.17 (C=O benz). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₂₄H₂₂N₂O₄ 402.1, trovato 403.5.

(N'-ftalimmido)-N-il-3-p-clorobenzoil-2,5-dimetil-1H-pirrolo (18):
TLC AcOEt/n-esano (1/2), olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.02 (s, 3H, CH₃-5 pirr); δ 2.38 (s, 3H, CH₃-2 pirr); δ 6.21 (s, 1H, CH pirr); δ 7.42 (d, 2H, CH benz 3 e 5, J=12Hz); δ 7.78 (d, 2H, CH benz 2 e 6, J=12Hz); δ 7.84 (m, 2H, CH ftal 4 e 5); δ 8.1 (m, 2H, CH ftal 3 e 6). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 10.91 (CH₃-5); 11.08 (CH₃-2); 108.68 (CH-4 pirr); 118.9 (C-2 pirr); 124.68 (C-5 pirr); 124.87 (CH ftal 4 e 5); 128.6 (CH benz 3 e 5); 129.56 (C ftal); 130.78 (CH benz 2 e 6); 135.74 (CH ftal 3 e 6); 137.09 (C-3 pirr); 137.36 (CCl); 138.59 (CC=O benz); 164.1 (C=O ftal); 192.20 (C=O benz). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₂₁H₁₅N₂O₃ 378.08, trovato 379.4.

(N'-ftalimmido)-N-il-3-p-metossibenzoil-2,5-dimetil-1H-pirrolo (19):
TLC AcOEt/n-esano (1/2), olio giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.07 (s, 3H, CH₃-5 pirr); δ 3.87 (s, 3H, OCH₃); δ 2.33 (s, 3H, CH₃-2 pirr); δ 6.26 (s, 1H, CH pirr); δ 6.95 (d, 2H, CH benz 3 e 5, J=12Hz); δ 7.86 (d, 2H, CH benz 2 e 6, J=12Hz); δ 7.90 (m, 2H, CH ftal 4 e 5); δ 8.03 (m, 2H, CH ftal 3 e 6). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 10.98 (CH₃-5 pirr); 11.03 (CH₃-2 pirr); 55.65 (OCH₃); 108.78 (CH-4 pirr); 113.53 (CH benz 3 e 5); 118.9 (C-2 pirr); 124.84 (CH ftal 3

e 6); 127.9 (C-5 pirr); 129.6 (C ftal); 131.75 (CH benz 2 e 6); 132.84 (CC=O benz); 135.3 (C-3 pirr); 135.66 (CH ftal 4 e 5); 162.6 (COMe); 164.2 (C=O ftal); 191.1 (C=O benz). ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₂₂H₁₈N₂O₄ 374.13, trovato 375.3.

(N²-ftalimmido)-N-il-2-p-metilbenzoil-1H-pirrolo (20): TLC AcOEt/n-esano (1/1), polvere gialla. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.41 (s, 3H, CH₃); δ 6.42 (m, 1H, CH-4 pirr); δ 6.96 (m, 1H, CH-5 pirr); δ 7.10 (m, 1H, CH-3 pirr); δ 7.22 (d, 2H, CH benz 3 e 5, J=12Hz); δ 7.69 (d, 2H, CH benz 2 e 6, J=12Hz); δ 7.84 (m, 2H, CH ftal 4 e 5); δ 7.99 (m, 2H, CH ftal 3 e 6). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 21.78 (CH₃); 109.0 (CH-4 pirr); 121.65 (CH-5 pirr); 124.66 (CH ftal 4 e 5); 128.74 (C-2 pirr); 129.11 (CH benz 3 e 5); 129.59 (CH benz 2 e 6); 131.35 (CCH₃); 130.46 (CH-3 pirr); 135.12 (CH ftal 3 e 6); 135.97 (CC=O benz); 143.03 (C ftal); 165.1 (C=O ftal); 184.8 (C=O benz). Dec. a 218°C. ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₂₀H₁₄N₂O₃ 330.1, trovato 331.4.

(N²-ftalimmido)-N-il-2-p-metossibenzoil-1H-pirrolo (21): TLC AcOEt/n-esano (1/1), polvere gialla. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 3.81 (OCH₃); δ 6.41 (m, 1H, CH-4 pirr); δ 6.89 (d, 2H, CH benz 3 e 5, J=12Hz); δ 6.94 (m, 1H, CH-5 pirr); δ 7.09 (m, 1H, CH-3 pirr); δ 7.77 (d, 2H, CH benz 2 e 6, J=12Hz); δ 7.80 (m, 2H, CH ftal 4 e 5); δ 7.94 (m, 2H, CH ftal 3 e 6). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 55,67 (OCH₃); 108.92 (CH-4 pirr); 113.7 (CH benz 3 e 5); 121.4 (CH-5 pirr); 124.7 (CH ftal 3 e 6); 128.74 (C-2 pirr); 128.74 (C ftal); 130.17 (CH-3 pirr); 131.23 (CC=O benz); 131.8 (CH benz 2 e 6); 135.36 (CH ftal 4 e 5); 163.2 (COMe); 165.1 (C=O ftal); 183.9 (C=O benz). Dec. a 220°C. ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₂₀H₁₄N₂O₄ 346.1, trovato 347.5.

(N²-ftalimmido)-N-il-2-fenilacetil-1H-pirrolo (22): TLC AcOEt/n-esano (1/1), polvere gialla. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 4.06 (s, 2H, CH₂CO);

δ 6.40 (m, 1H, CH-4 pirr); δ 7.01 (m, 1H, CH-5 pirr); δ 7.18 (t, 1H, CH benz 4, J=12Hz); δ 7.22 (m, 1H, CH-3 pirr); δ 7.26 (d, 2H, CH benz 2 e 6, J=12Hz); δ 7.28 (t, 2H, CH benz 3 e 5, J=12Hz); δ 7.79 (m, 2H, CH ftal 4 e 5); δ 7.94 (m, 2H, CH ftal 3 e 6). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 46.05 (CH_2CO); 109.16 (CH-4 pirr); 119.48 (CH-3 pirr); 124.35 (CH ftal 3 e 6); 127.14 (CH benz 2 e 6); 128.50 (C-2 pirr); 128.8 (CH benz 3 e 5); 129.67 (CH benz 4); 130.34 (C ftal); 130.5 (CH-5 pirr); 134.66 (CCH_2 benz); 135.07 (CH ftal 4 e 5); 164.9 (C=O ftal); 187.5 (C=O pirr). P.f. 214°C. ES-MS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$,100%) calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ 330.1, trovato 331.4.

Sintesi di N-((2,5-dimetil-3-acil)-1H-pirrol-1-il)-isonicotinammide (23-26).

N-((2,5-dimetil)-1H-pirrol-1-il)-isonicotinammide (VII).

L'isoniazide (7,3 mmol) viene sospesa in acetonitrile anidro (20 mL) e posta sotto agitazione elettromagnetica a caldo (100°C) per consentirne la solubilizzazione. Alla soluzione si aggiunge acetone (7.5 mmol). La reazione procede a riflusso per circa 4 ore e viene monitorata su TLC usando come eluente acetato di etile.

Successivamente l'isoniazide non reagita viene fatta precipitare ponendo la miscela in un bagno di ghiaccio e sale e il surnatante viene privato del solvente per evaporazione *in vacuo*.

Il grezzo viene poi purificato dall'isoniazide residua mediante cristallizzazione frazionata utilizzando acetato di etile come solvente.

Il prodotto **VII** è stato ottenuto come un olio giallo con una resa del 90%.

Metodica generale per la sintesi dei prodotti finali (23-26).

L'intermedio VII (6,6 mmol) viene solubilizzato in acetonitrile anidro e alla soluzione vengono aggiunti AlCl₃ (66 mmol) e l'opportuno cloruro acilico (13,2 mmol) goccia a goccia.

La reazione viene posta sotto agitazione elettromagnetica e a riflusso per 3 ore.

Successivamente si pone la miscela in un bagno di ghiaccio e sale e si aggiunge trietilammina fino a pH 7.

Il solvente viene quindi allontanato per evaporazione sotto vuoto e il grezzo viene sottoposto ad una purificazione cromatografica utilizzando acetato di etile come eluente.

I prodotti **23-26** sono stati ottenuti come solidi gialli con rese comprese tra il 30 e il 72%.

N-((2,5-dimetil-3-(2-fenilacetil))-1H-pirrol-1-il)-isonicotinammide

(23): TLC AcOEt, solido giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.05 (s, 3H, CH₃-2 pirr); δ 2.13 (s, 3H, CH₃-5 pirr); δ 3.98 (s, 2H, CH₂-CO); δ 6.32 (s, 1H, CH pirr); δ 7.10 (d, 2H, CH 2 e 6 benz, J=12Hz); δ 7.12 (t, 1H, CH benz 4, J=12Hz); δ 7.15 (t, 2H, CH 3 e 5 benz, J=12Hz); δ 7.72 (m, 2H, CH 2 e 6 pirid); δ 8.65 (m, 2H, CH 3 e 5 pirid); δ 11.05 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 11.11 (CH₃-2); 11.16 (CH₃-5); 47.16 (CH₂-CO); 106.29 (CH-4 pirr); 118.2 (C-2 pirr); 121.81 (CH 2 e 6 pirid); 126.1 (CH 3 e 5 benz); 126.93 (CH-4 benz); 129.07 (C-1benz); 135.3 (C-3 pirr); 136.7 (C-1 pirid); 138.7 (C-5 pirr); 150.67 (CH 4 e 5 pirid); 164.9 (HNC=O benz); 196.1 (CC=O). Dec. 200°C circa. ES-MS m/z (M+H⁺, 100%) calc. per C₂₀H₁₉N₃O₂ 333.1, trovato 334.0.

N - ((2,5 - dimetil - 3 - p - metossibenzoil) - 1H - pirrol - 1 - il) - isonicotinammide (24): TLC AcOEt, solido giallo. ¹H NMR (400MHz,

CDCl₃): δ 1.87 (s, 3H, CH₃-2 pirr); δ 2.15 (s, 3H, CH₃-5 pirr); δ 3.87 (s, 2H, OCH₃); δ 6.06 (s, 1H, CH pirr); δ 6.93 (d, 2H, CH 3 e 5 benz, J=12Hz); δ 7.82 (d, 1H, CH 2 e 6 benz, J=12Hz); δ 8.00 (m, 2H, CH 2 e 6 pirid); δ 8.84 (m, 2H, CH 3 e 5 pirid); δ 11.08 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 10.19 (CH₃-2); 11.14 (CH₃-5); 55.77 (OCH₃); 107.40 (CH-4 pirr); 118.5 (C-2 pirr); 113.85 (CH 3 e 5 benz); 122.32 (CH 2 e 6 pirid); 128.73 (C-5 pirr); 131.35 (C-1benz); 132.72 (CH 2 e 6 benz); 136.2 (C-3 pirr); 139.1 (C-1 pirid); 163.67 (C-4 benz); 165.17 (HNC=O benz); 193.78 (CC=O). Dec. 200°C circa. ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₂₀H₁₉N₃O₃ 349.1, trovato 350.2.

N-((2,5-dimetil-3-*p*-clorobenzoil)-1*H*-pirrol-1-il)-isonicotinammide

(25): TLC AcOEt, solido giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.07 (s, 3H, CH₃-2 pirr); δ 2.15 (s, 3H, CH₃-5 pirr); δ 6.03 (s, 1H, CH pirr); δ 7.35 (d, 2H, CH 3 e 5 benz, J=12Hz); δ 7.59 (d, 1H, CH 2 e 6 benz, J=12Hz); δ 7.91 (m, 2H, CH 2 e 6 pirid); δ 8.73 (m, 2H, CH 3 e 5 pirid); δ 11.23 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 10.06 (CH₃-2); 11.08 (CH₃-5); 107.92 (CH-4 pirr); 117.7 (C-2 pirr); 121.9 (C-5 pirr); 121.9 (CH 2 e 6 pirid); 128.75 (CH-3 benz); 130.73 (CH 2 e 6 benz); 132.13 (C-1 pirid); 137.52 (C-3 pirr); 138.02 (C-4 benz); 138.98 (C-1 benz); 164.95 (HNC=O benz); 192.78 (CC=O). Dec. 200°C circa. ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₁₉H₁₆ClN₃O₂ 353.1, trovato 354.2.

N-((2,5-dimetil-3-nafto-1-il)-1*H*-pirrol-1-il)-isonicotinammide (26):

TLC AcOEt, solido giallo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.84 (s, 3H, CH₃-5 pirr); δ 2.14 (s, 3H, CH₃-2 pirr); δ 5.84 (s, 1H, CH pirr); δ 7.30 (t, 1H, CH-6 naft, J=12Hz); δ 7.38 (d, 1H, CH-5 naft, J=12Hz); δ 7.39 (t, 1H, CH-7 naft); δ 7.43 (t, 1H, CH-3 naft); δ 7.69 (m, 2H, CH 2 e 6 pirid); δ 7.81 (d, 1H, CH-4 naft); δ 7.85 (d, 1H, CH-2 naft); δ 7.95 (d, 1H, CH-8 naft); δ 8.51 (m, 2H, CH 3 e 5 pirid); δ 11.64 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 10.88 (CH₃-5); 11.40 (CH₃-2); 108.11 (CH-4 pirr); 118.47 (C-2 pirr); 121.85 (CH 2 e 6

pirid); 124.88 (CH-7 naft); 125.4 (CH-8 naft); 125.87 (CH-3 naft); 127.10 (CH-6 naft); 128.65 (CH-4 naft); 129.65 (C-5 pirr); 130.33 (C-1 naft); 133.92 (C-9 naft); 138.46(C-3 pirr); 134.13 (C-1 pirid); 138.70 (C-10 naft); 150.45 (CH 3 e 5 pirid); 165.01 (HNC=O benz); 195.13 (CC=O). Dec. 200°C circa. ES-MS m/z (M+H⁺,100%) calc. per C₂₃H₁₉N₃O₂ 369.1, trovato 370.2.

Sintesi di 4-((4-((cicloalchilammino)-metil)-1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammina (27-31).

4-((1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammina (VIII).

Ad una soluzione metanolica (20 ml) di pirrolo-2-carbossaldeide (5,26 mmol) si aggiunge in piccoli volumi MeOH saturo di HCl fino a raggiungere pH 4. Successivamente, si aggiunge α -naftilammina (4.21 mmol) e la miscela viene lasciata sotto agitazione elettromagnetica per circa 1 ora.

Successivamente, la miscela viene posta in un bagno di ghiaccio e sale e ad essa viene aggiunta goccia a goccia una dispersione di NaBH₄ (21.04 mmol) e C/Pd (0.526 mmol) in THF (10 ml).

La reazione viene lasciata sotto agitazione elettromagnetica per 2-3 ore e monitorata tramite TLC utilizzando come eluente DCM. Al termine della reazione, si neutralizza il NaBH₄ con MeOH saturo di HCl, si filtra sotto vuoto per allontanare il C/Pd, e il solvente viene allontanato sotto vuoto. Il grezzo viene successivamente sottoposto ad una filtrazione su silice utilizzando AcOEt e ad una successiva purificazione mediante cromatografia su colonna utilizzando DCM come eluente. Il prodotto *VIII* viene ottenuto come un olio con una resa di circa il 30%.

N-tert-butilossicarbonil-4-((1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammina.
(IX).

L'intermedio **VIII** viene solubilizzato in una miscela di acqua e diossano 1:1 (30 ml), e il pH della soluzione viene portato a 9 con l'aggiunta di piccoli volumi di una soluzione acquosa di KOH 1N.

Alla miscela viene successivamente aggiunta Boc₂O (4.16 mmol) e la reazione viene lasciata sotto agitazione elettromagnetica per 4 gg, monitorandola tramite TLC con una camera in DCM.

Il solvente viene quindi allontanato sotto vuoto, e il grezzo è sottoposto ad una cromatografia su gel di silice utilizzando DCM come eluente.

Il prodotto **IX** viene ottenuto come un olio con una resa del 50%.

N-tert-butilossicarbonil-4-((4-cicloalchilamminometil)-1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammina (27'-31').

Ad una soluzione dell'intermedio **IX** in etanolo (20 ml), si aggiunge goccia a goccia una soluzione etanolica dell'opportuna cicloalchilammina (**E-H**) (0.504 mmol), CH₂O (0.504 mmol) e TFA (0.504 mmol), e la reazione è lasciata sotto agitazione elettromagnetica per circa 2 ore, monitorandola su TLC con una camera di DCM.

Al termine della reazione, si aggiunge TEA fino a pH 9 e si allontana il solvente sotto vuoto. Il grezzo viene quindi sottoposto ad una colonna cromatografica, utilizzando DCM come eluente, per ottenere i prodotti **27'-31'** come oli con rese comprese tra il 20 e il 28%.

Metodica generale per la sintesi dei prodotti finali (27-31).

La sintesi dei composti **27-31** è analoga a quella descritta per gli intermedi **A-D** nella metodica di preparazione dei derivati **12-15**.

Il grezzo viene sottoposto ad una purificazione tramite colonna cromatografia, utilizzando come eluente una miscela di DCM/MeOH 4,5:0,5 (**27**, **28**, **29**, **31**) o una miscela di AcOEt/(CH₃)₂CO 4:1 (**30**).

Il prodotto finale (**27-31**) viene quindi ottenuto come un olio con una resa di circa l'80%.

4-((1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammina (VIII): FC : DCM. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 4.42 (s, 1H, CH₂); δ 6.08 (s, 1H, CH 3-pirrolo); δ 6.17 (s, 1H, CH 4-pirrolo); δ 6.63 (s, 1H, CH 5-pirrolo); δ 6.74 (d, 1H, CH 5-naftalene, J=19Hz); δ 7.15 (d, 1H, CH 8-naftalene, J=19Hz); δ 7.42-7.45 (m, 2H, 2CH 6,7-naftalene); δ 7.85 (d, 1H, CH 3-naftalene, J=24Hz); δ 7.95 (d, 1H, CH 2-naftalene, J=24Hz). ES-MS m/z calc. per C₁₅H₁₄N₂ 222.12 trovato 222.88.

N-tert-butilossicarbonil-4-((1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammina (IX): olio, FC DCM. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.6 (s, 9H, Boc); δ 4.42 (s, 1H, CH₂); δ 6.08 (s, 1H, CH 3-pirrolo); δ 6.17 (s, 1H, CH 4-pirrolo); δ 6.63 (s, 1H, CH 5-pirrolo); δ 6.74 (d, 1H, CH 5-naftalene, J=19Hz); δ 7.15 (d, 1H, CH 8-naftalene, J=19Hz); δ 7.42-7.45 (m, 2H, 2CH 6,7-naftalene); δ 7.85 (d, 1H, CH 3-naftalene, J=24Hz); δ 7.95 (d, 1H, CH 2-naftalene, J=24Hz). ES-MS m/z calc. per C₂₀H₂₂N₂O₂ 322.17 trovato 323.04.

4-((4-morfolinometil)-1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammina (27): olio, FC: DCM/MeOH (4,5:0,5). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.38 (m, 4H, 2 CH₂); δ 3.41 (s, 2H, CH₂); δ 3.61 (m, 4H, 2CH₂); δ 4.29 (s, 2H, CH₂); δ 5.86 (s, 1H, CH 5-pirrolo); δ 5.93 (s, 1H, CH 3-pirrolo); δ 6.74 (d, 1H, CH 5-naftalene, J=19Hz); δ 7.15 (d, 1H, CH 8-naftalene, J=19Hz); δ 7.42-7.45 (m, 2H, 2CH

6,7-naftalene); δ 7.85 (d, 1H, CH 3-naftalene, $J=24\text{Hz}$); δ 7.95 (d, 1H, CH 2-naftalene, $J=24\text{Hz}$). ES-MS m/z calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$ 321.18 trovato 321.88.

4-((4-((4-metilpiperidin-1-il)-1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammia (28): olio, FC: DCM/MeOH (4,5:0,5). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.98 (d, 3H, CH_3); δ 1.56 (m, 4H, 2CH_2); δ 1.75 (m, 1H, CH); δ 3.21 (m, 2H, CH_2); δ 3.82 (s, 2H, CH_2); δ 4.05 (m, 2H, CH_2); δ 4.21 (s, 2H, CH_2); δ 5.77 (s, 1H, CH 5-pirrolo, $J=19\text{Hz}$); δ 7.15 (d, 1H, CH 8-naftalene, $J=19\text{Hz}$); δ 7.42-7.45 (m, 3H, CH 6,7-naftalene); δ 7.88 (d, 1H, CH 3-naftalene, $J=24\text{Hz}$); δ 8.02 (d, 1H, CH 2-naftalene, $J=24\text{Hz}$). ES-MS m/z calc. per $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3$ 333.22 trovato 334.02.

4-((4-((4-metilpiperazin-1-il)-1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammia (29): olio, FC: DCM/MeOH (4,5:0,5). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 2.27 (s, 3H, CH_3); δ 2.4-2.6 (m, 8H, 4CH_2); δ 3.46 (s, 2H, CH_2); δ 4.29 (s, 2H, CH_2); δ 5.80 (s, 1H, CH 5-pirrolo); δ 5.92 (s, 1H, CH 3-pirrolo); δ 7.40 (d, 1H, CH 5-naftalene, $J=19\text{Hz}$); δ 7.15 (d, 1H, CH 8-naftalene, $J=19\text{Hz}$); δ 7.42-7.45 (m, 3H, CH 6,7-naftalene); δ 7.87 (d, 1H, CH 3-naftalene, $J=24\text{Hz}$); δ 8.00 (d, 1H, CH 2-naftalene, $J=24\text{Hz}$). ES-MS m/z calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4$ 334.22 trovato 335.05.

4-((4-piperidin-1-il)-1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammia (30): olio, FC: AcOEt/ $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (4:1). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.23 (m, 6H, 3CH_2); δ 1.8 (m, 4H, 2CH_2); δ 3.88 (s, 2H, CH_2); δ 4.31 (s, 2H, CH_2); δ 5.66 (s, 1H, CH 5-pirrolo); δ 5.98 (s, 1H, CH 3-pirrolo); δ 6.78 (d, 1H, CH 5-naftalene, $J^2=19\text{Hz}$); δ 7.15 (d, 1H, CH 8-naftalene, $J^2=19\text{Hz}$); δ 7.42-7.45 (m, 2H, 2CH 6,7-naftalene); δ 7.88 (d, 1H, CH 3-naftalene, $J^2=24\text{Hz}$); δ 8.02 (d, 1H, CH 2-naftalene, $J^2=24\text{Hz}$). ES-MS m/z calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3$ 319.20 trovato 320.88.

4-((4-((cicloesilammino)-metil)-1H-pirrol-2-il)-metil)-naftalen-1-ammina (31): olio, FC: DCM/MeOH (4,5:0,5). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.0-1.8 (m, 10H, 5CH₂); δ 3.82 (s, 2H, CH₂); δ 4.21 (s, 2H, CH₂); δ 5.77 (s, 1H, CH 5-pirrolo, J=19Hz); δ 7.15 (d, 1H, CH 8-naftalene, J=19Hz); δ 7.42-7.45 (m, 3H, CH 6,7 -naftalene); δ 7.88 (d, 1H, CH 3-naftalene, J=24Hz); δ 8.02 (d, 1H, CH 2-naftalene, J=24Hz). ES-MS m/z calc. per C₂₂H₂₇N₃ 333.22 trovato 334.15.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Mannion, R.J; Woolf, C. *The Clinical Journal of Pain*, **2000**.
- 2) Goodman Gilman, A.; Limbird, L.E.; Hardman, J.G..Le basi farmacologiche della terapia, X Ed., 23, 545-546.
- 3) Goodman Gilman, A.; Limbird, L.E.; Hardman, J.G..Le basi farmacologiche della terapia, X Ed., 23, 546-592.
- 4) Goodman Gilman, A.; Limbird, L.E.; Hardman, J.G..Le basi farmacologiche della terapia, XI Ed., 26, 673-706.
- 5) Bell, M.R.; D'Ambra, T.E.; Kumar, V.; Eissenstat, M.A.; Herrmann, J.L.; Wetzel, J.R.Jr.; Rosi, D.; Phillion, R.E.; Daum, S.J.; Hlasta, D.J.; Kulling, R.K.; Ackerman, J.H.; Haubrich, D.R.; Luttinger, D.A.; Baizman, E.R.; Miller, M.S.; Ward, S.J. Antinociceptive(amminoalkyl)indoles. *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 1099-1100.
- 6) Pacheco, M.; Childers, S.R.; Arnold, R.; Casiano, F.; Ward, S.J. Amminoalkylindoles: action on specific G-protein-linked receptors. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, **1991**, 257, 170-183.
- 7) Ward, S.J.; Mastriani, D.; Casino, F.; Arnold, R.; Pravadoline: profile in isolated tissue preparations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1990**, 255, 1230-1239.
- 8) Tarzia, G.; Duranti, A.; Tontini, A.; Spadoni, G.; Mor, M.; Rivara, S.; Plazzi, P.V.; Kathuria, S.; Pomelli, D. Synthesis and Structure-Activity Relationship of a Series of Pyrrole Cannabinoid Receptor Agonists. *Bioorganic and medicinal Chemistry*, **2003**, 11, 3965-3973.
- 9) Roger G. Pertwee -Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptors. *Pharmacol. Ther.*, **1997**, Vol. 74 No 2, 129-180.
- 10) Lambert, M.D.; Fowler, C.J. The Endocannabinoid System: Drug Targets, Lead Compounds, and Potential Therapeutic Applications. *J.Med. Chem.*, **2005**, 48, 16, 1-28.

11) Pertwee, G.R., Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol. Ther.*, **2002**, *95*, 165-174.

12) Benito, C.; Nunez, E.; Tolon, R.M.; Carrier, E.J.; Rabano, A.; Hillard, C.J.; Romero, J., Cannabinoid CB₂ Receptors and Fatty Acid Amide Hydrolase are Selectively Overexpressed in Neuritic Plaque-Associated Glia in Alzheimer's Disease Brains. *J. Neurosci.*, **2003**, *23*, 11136-11141.

13) Rice, A.S., Cannabinoids and pain. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **2001**, *2*, 399-414.

14) Di Carlo, G.; Izzo, A.A., Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin. Invest. Drugs*, **2003**, *12*, 39-49.

15) Porter, A.C.; Felder, C.C., The endocannabinoid nervous system: Unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.*, **2001**, 45-60.

16) Howlett, A.C.; Barth, F.; Bonner, T.I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W.A.; Felder, C.C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B.R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R.G. International Union of Pharmacology, XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol. Rev.*, **2002**, *54*, 161-202.

17) Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu, S.M. Molecular Characterization of a peripheral Receptor for Cannabinoids. *Nature*, **1993**, *365*, 61-65.

18) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffing F, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R.. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **1992**, *258*, 1946-1949.

19) Smith PB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R, Martin BR.. The pharmacological activity of anandamide, a putative

20) Childers S.R, Breivogel C.S. Cannabis and endogenous cannabinoid system. *Drug and Alcohol Dependence*, **1998**, *51*, 173-187.

21) Jos H.M. Lange and Chris G. Kruse.. Medicinal chemistry strategies to CB₁ cannabinoid receptor antagonists. *Drug Discovery Today*, **2005**, *10*, 693-702.

22) Lange, J.H.M.; Kruse, C.G. Medicinal Chemistry Strategies to CB₁ Cannabinoid Receptor Antagonists. *DDT*, **2005**, *10*, 10, 693-702.

23) Huffman, J.W. *Curr. Med. Chem.*, **1999**, *6*, 705.

24) Lainton, J. A. H.; Huffman, J.W.; Dai,D.; Martin, B.R.; Compton, D. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 563.

25) Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.S.A., Gopher A., Almong S., Martin B.R., Compton D., Pertwee R.G., Griffin G., Bayewitch M., Barg J., Vogel Z.. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, **1995**, *50*, 83-90.

26) Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Natane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K.; Yamashita, A.; Waku, K.; 2-Arachidonoylglycerol: a Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, *215*, 89-87.

27) Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I.; Structure of Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the cloned cDNA. *Nature*, **1990**, *346*, 561-564.

28) Di Marzo,V.; Bisogno, T.; De Petrocellis,L.; Melck, D.; Martin, B.R. Cannabinomimetic Fatty Acid derivatives: The Anandamide Family and Other Endocannabinoids. *Curr. Med. Chem.*, **1999**, *6*, 721-744.

29) Offertaler,L.; Mo,F.M.; Batkai, S.; Liu,J.; Begg,M.; Radzan, R.K.; Martin, B.R.; Bukoski, R.D.; Kunos, G. Selective Ligands and Cellular

30) Vogel, Z.; Barg, J.; Levy, R.; Saya, D.; Heldmann, E.; Mechoulam, R. Anandamide, a Brain Endogenous Compound, Interacts Specifically with Cannabinoid Receptors and Inhibits Adenylate-Cyclase. *J. Neurochem.*, **1993**, *61*, 352-355.

31) Khanolkar, D.A.; Palmer, S.L.; Makriyannis, A. Molecular probes for the cannabinoid receptors. *Chem. Phys. Lipids*, **2000**, *108*, 37-52.

32) Ooms F., Wouters J, Oscari O. Exploration of the Pharmacophore of 3-Alkyl-5Arylimidazolidinediones as New CB₁ Cannabinoid receptor Ligands and Potenzial Antagonists: Synthesis, Lipophilicity, Affinity, and Molecular Modelling. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1748-1756.

33) Knight, L. W.; Huffman, J.W.; Isherwood, M.L.; 2003, Pyrrole-based non-traditional cannabinoids. Symposium on the Cannabinoids, Cornwall, Ontario, Canada, June 25-28, **2003**. *International Cannabinoid Research Society*, vol. 69.

34) Gourlay, B.S.; Molesworth, P.P.; Ryan, J.H.; Smith, J.A. A new and high yielding synthesis of unstable pyrroles via a modified Clauson-Kaas reaction. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 799-801.

35) Kashima, C.; Hibi, S.; Maruyama, T.; Harada, K.; Omote, Y. A Convenient and One –pot Synthesis of 9-Substituted Carbazoles from Primary Amine Hydrochlorides and 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran. *J.Heterocyclic Chem.*, **1987**, *24*, 913.

36) Kashima, C.; Hibi, S.; Maruyama, T.; Harada, K.; Omote, Y. The Convenient and One –pot Synthesis of N-Substituted Carbazoles. *Tetrahedron Letters*, **1986**, *27*, 2131-2134.

37) Govindaraji, S.; Nakache, P.; Marks, V; Pomerantz, Z.; Zaban, A; Lellouche J.P. Novel Carboxylated Pyrrole- and Carbazole-Baed Monomers. Synthesis and Electro-Oxidation Features. *J.Org.Chem.*, **2006**, *71*, 9139-9143

- 38)** Arthur I. Vogel, D. Sc.(Lound.), DIC., F.R.I.C., *Chimica organica pratica* (con analisi organica qualitativa), Ed. **1967** Casa Editrice Ambrosiana, Milano, Par *IV*, 3-4.
- 39)** Zollo, F.; Pirroli, furani e tiofeni. *Chimica dei Composti Eterociclici*, **2004**, *6*, 84-89.
- 40)** Amarnath, V; Anthony, D.C.; Amarnath, K.; Valentine, W.M.; Wetterau, L.A.; Graham, D.G. Intermediates in the Paal-Knorr Synthesis of Pyrroles. *J.Org.Chem.*, **1991**, *56*, 6924-6931.
- 41)** Wasserman, H.H.; Gosselink, E.; Keith, D.D.; Nadelson, J.; Sykes, R.J. The synthesis of [9](2,4)pyrrolophanes. *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 1863-1866.
- 42)** Ballini, R.; Barboni, L.; Bosica, G.; Petrini, M. 2,5-Dialkylfurans and Nitroalkanes as Source of 2,3,5-Trialkylpyrroles. *Synlett.*, **2000**, *3*, 391-393.
- 43)** Minetto, G.; Raveglia, L.F.; Taddei, M. Microwave-Assisted Paal-Knorr Reaction. A Rapid Approach to Substituted Pyrroles and Furans. *Organic Letters*, **2004**, 389-392.
- 44)** Smith, M.B.; March, J..March's Advanced Organic Chemistry, Chapter *10*, 389-392.
- 45)** Smith, M.B.; March, J..March's Advanced Organic Chemistry, Chapter *10*, 513-514.
- 46)** Tatsuya Kato et al.; Novel Calcium Antagonists with Both Calcium Overload Inhibition and Antioxidant Activity. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 3135.
- 47)** Simionescu C.I.; Grigoras M.; Cianga I.; Olaru N. Synthesis of new conjugated polymers with Schiff base structure containing pyrrolyl and naphthalene moieties and HMO study of the monomers reactivity. *European Polymer Journal*, **1998**, *34*, 891-898.
- 48)** Loh, T-P.; Wei, L.L. Novel One-pot-Mannich-type Reaction in Water: Indium Trichloride-catalyzed Condensation of Aldehydes, Amines and

Silyl Enol Ethers for the Synthesis of β -Amino Ketones and Esters. *Tetrahedron letters*, **1998**, 39, 323.

49) Pierre Beaulieu, et al. Role of the endogenous cannabinoid system in the formaline test of persistent pain in the rat. *European Journal of Pharmacology*, **2000**, 396, 85-92.

50) Malmberg, A.B.; Bannon, A.W. Models of nociception hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, **1999**, 8.9.1-8.9.15.

51) Wilson, S.G.; Mogil, J.S. Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav. Brain Res.*, **2001**, 125, 65-73.

52) Mogil, J.S.; Wilson, S.G.; Bon, K; Lee, S.E.; Chung, K.; Raber, P.; Pieper, J.O.; Hains, H.S.; Belknap, J.K.; Hubert, L.; Elmer, G.I.; Chung, J.M; Devor, M. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*, **1999**, 80, 67-82.

53) Blobaum, A.L.; Marnett, L.J. Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, 50, 7, 1425-1441.

54) Dubuisson, D.; Dennis, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats, *Pain*, **1977**, 4, 161-174.