



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Dipartimento di Chimica e Farmacia

Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche

Corso di Dottorato in Scienze Farmaceutiche

XXVI ciclo

Sintesi e valutazione biologica di carbossammidi pirazoliche tricicliche contenenti cicloalchili quali nuovi ligandi cannabinergici.

Candidato
Dott. ssa Valeria Deiana

Tutor
Prof. Gerard A. Pinna

Direttore *Prof. Stefano Enzo*

INDICE

Introduzione	3
• Sistema Endocannabinoide	6
• Ligandi Cannabinergici	22
Chimica	35
Biologia	42
Parte Sperimentale Chimica	44
• Procedure Generali	45
• Metodo generale per la sintesi delle carbossammidi	46
• Metodo generale per la sintesi degli acidi	99
• Metodo generale per la sintesi dei pirazolesteri	105
• Metodo generale per la sintesi dei β -dichetoesteri	111
• Metodo generale per la sintesi dei chetoni	116
• Sintesi 5-ciclopentil-2,3-diidro-1 <i>H</i> -inden-1-one	119
Parte Sperimentale Biologica	120
• Procedure Generali	121
• Saggi di Binding Recettoriale	122
• Saggio di Neuroinfiammazione con LPS	132
Risultati e Discussione	136
Bibliografia	151

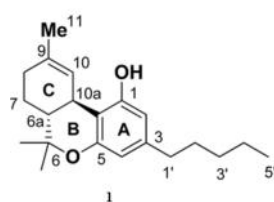
INTRODUZIONE

Per centinaia di anni la marijuana e l'hashish, i nomi con cui comunemente si indicano le infiorescenze femminili e le resine disseccate della *Cannabis Sativa L.* (Figura 1), sono stati usati a scopo terapeutico e ricreazionale¹. La loro assunzione determina un ampio spettro di effetti fisiologici come l'attività analgesica, antiinfiammatoria, immunosoppressiva ed anticonvulsivante ma anche svariate alterazioni psicotropiche quali sedazione, catalessi, ipotermia e allucinazione².

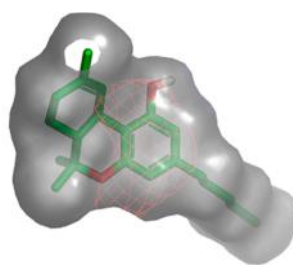


Figura 1: *Cannabis Sativa*

A partire dagli ultimi decenni del secolo scorso gli effetti biochimici e fisiologici dei cannabinoidi sono stati ampiamente indagati e nel 1964 due chimici israeliani, Gaoni e Mechoulam, isolarono il principale componente psicoattivo della *Cannabis* delucidandone la struttura come Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC)³ (1) e stabilendone la configurazione assoluta^{4,5} (Figura 2)⁶. Questi hanno rappresentato i primi importanti passi verso la scoperta del meccanismo attraverso il quale la *Cannabis* agisce sulla nostra mente e sul nostro corpo⁷. Più recentemente questa ricerca ha messo in luce la presenza di un vero e proprio sistema endocannabinoide nell'organismo umano la cui organizzazione biologica include due sottotipi



Δ^9 -THC
 K_i CB₁ = 40.7 nM
 K_i CB₂ = 36.4 nM



recettoriali CB1⁸ e CB2⁹, i loro ligandi endogeni o endocannabinoidi e le loro multiple cascate metaboliche¹.

Figura 2: *Struttura e affinità recettoriale del Δ^9 -THC.*

Negli ultimi venti anni il sistema endocannabinoide è stato implicato in un grande numero di funzioni fisiologiche sia nel sistema nervoso centrale e periferico sia negli organi periferici (Tabella 1)¹⁰. Pertanto composti in grado di agire su questo sistema avrebbero un

potenziale terapeutico in svariate condizioni patologiche fra cui, ad esempio, obesità e sindrome metabolica¹¹, disturbi dell'umore ed ansia¹², dolore neuropatico¹³, sclerosi multipla (SM)¹⁴ e sclerosi laterale amiotrofica (SLA)¹⁵, morbo di Alzheimer¹⁶ e di Parkinson¹⁷, malattia di Huntington¹⁸ ed ancora aterosclerosi, infarto del miocardio, ipertensione¹⁹, cancro²⁰, osteoporosi²¹, glaucoma²² e tante altre.

Tabella 1: Funzioni in cui è coinvolto il sistema endocannabinoide in normali condizioni fisiologiche.

Funzioni	Descrizione delle risposte mediate dal sistema endocannabinoide
Funzioni cognitive superiori	Attenzione, memoria, apprendimento Emozioni Capacità di prendere decisioni (decision making) e controllo del comportamento
Controllo motorio	Controllo e coordinazione del movimento Mantenimento della postura corporea e dell'equilibrio
Percezione del dolore e gratificazione	Sensibilità agli stimoli dolorosi Sensibilità agli stimoli piacevoli
Neuroprotezione	Azione protettiva del SNC dalla sovrastimolazione o sovrainibizione esercitata da altri neurotrasmettitori
Sviluppo cerebrale	Sviluppo neuronale Controllo della plasticità sinaptica
Funzioni immunitarie	Attività immunomodulatoria Infiammazione
Funzioni sessuali e fertilità	Processi di maturazione degli spermatozoi Interazioni con la funzione ovarica Effetti sulla libido
Gestazione	Attecchimento dell'embrione Meccanismi che regolano le prime fasi della gravidanza
Equilibrio energetico	Regolazione dell'assunzione di cibo Modulazione dell'omeostasi metabolica
Regolazione dell'appetito	Modulazione della sensazione di sazietà Sensibilità viscerale, nausea e vomito
Funzioni endocrine	Modulazione della secrezione di ghiandole endocrine
Funzioni cardiovascolari	Risposta vascolare (azione vasodilatatoria e ipotensiva)
Regolazione cellule neoplastiche	Ruolo del sistema endocannabinoide nella regolazione dei processi di proliferazione cellulare alla base della crescita dei tumori

Sistema Endocannabinoide

Gli endocannabinoidi

I cannabinoidi endogeni o endocannabinoidi sono molecole di segnale lipofile ampiamente distribuite nel sistema nervoso centrale ed in tutto il corpo. Questi composti sono ammidi, esteri od eteri di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena²³ e le loro strutture sono rappresentate in Figura 3. La N-arachidonoiletanolamina (AEA)²⁴ o anandamide (**2**) ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG)^{25,26,27} (**3**) sono i derivati meglio caratterizzati delle principali famiglie di endocannabinoidi, le N-aciletanolamine (NAE) ed i monoacilgliceroli (MAG) rispettivamente. Più recentemente sono stati individuati altri endocannabinoidi tra cui il 2-arachidonoilgliceril etero (2-AGE, noladina) (**4**)²⁸, la O-arachidonoiletanolamina (virodamina) (**5**)²⁹, la N-arachidonoildopamina (NADA) (**6**)³⁰ ed altri ancora.

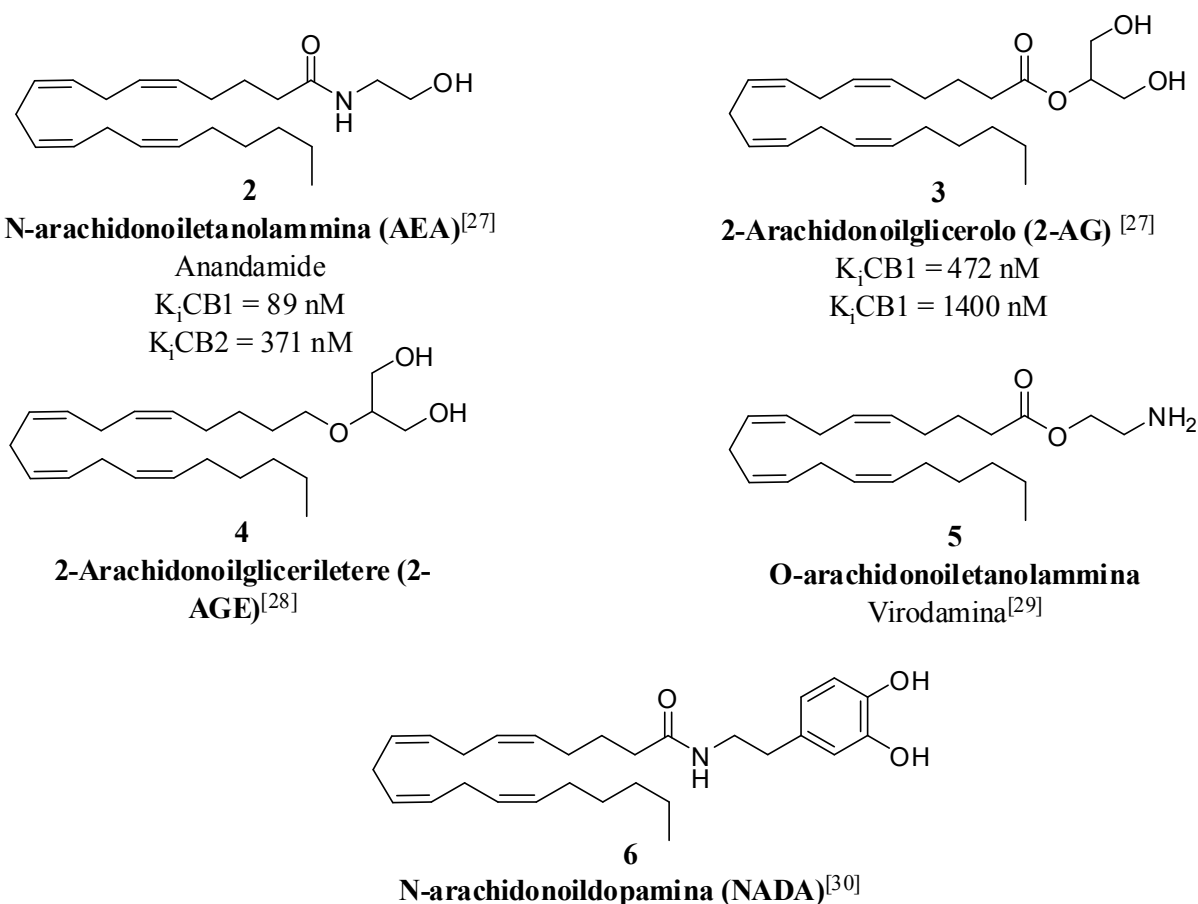


Figura 3: *Struttura chimica dei principali endocannabinoidi.*

L'anandamide è considerata al giorno d'oggi un importante modulatore di molte funzioni fisiologiche non soltanto all'interno del sistema nervoso autonomo ma anche in quello immunitario, endocrino, gastrointestinale e riproduttivo. Essa infatti produce analgesia,

controlla l'attività motoria, riduce l'emesi, stimola l'appetito ed ancora induce ipotermia ed effetti antiproliferativi. L'anandamide è in grado di legare entrambi i recettori cannabinergici comportandosi da agonista parziale²⁷. E' stato inoltre dimostrato che l'AEA interagisce con altri target molecolari come il recettore per i vanilloidi TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) ed il recettore della famiglia PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors)²³.

TRPV1 è un recettore canale attivato dalla capsaicina, il principio attivo del peperoncino, e da stimoli come acidi, protoni extracellulari, alte temperature, tossine di piante ed altri agonisti vanilloidi; la sua stimolazione determina un'azione bifasica sui nervi, cioè dapprima vi è un'eccitazione seguita da un durevole periodo refrattario di analgesia durante il quale il neurone non riesce a rispondere a stimoli nocicettivi di diversa natura³¹. Dati recenti suggeriscono che alcune azioni farmacologiche in vitro ed in vivo dell'anandamide sono dovute all'attivazione di TRPV1, suggerendo un possibile ruolo di endovanilloide da parte dell'AEA²³.

I PPARs sono una famiglia di recettori nucleari costituita da differenti isoforme (α , β/δ e γ) e coinvolta nella regolazione di molti processi biologici come il metabolismo energetico, la proliferazione cellulare e l'infiammazione. L'attivazione dei PPARs da parte dell'AEA renderebbe conto di molti effetti biologici dei cannabinoidi, come l'azione antiinfiammatoria, il comportamento alimentare e l'analgesia²³.

Il 2-arachidonoilglicerolo è un agonista pieno di entrambi i recettori cannabinergici²⁷, attiva i PPAR γ ma non i TRPV1²³.

Sia l'AEA che il 2-AG vengono 1) sintetizzati "on demand" in seguito all'aumento della concentrazione intracellulare degli ioni Ca^{2+} da precursori lipidici presenti nella membrana citoplasmatica di neuroni postsinaptici, 2) rilasciati nello spazio extracellulare così da poter interagire con i recettori cannabinergici, 3) internalizzati attraverso diffusione, trasportatori di membrana o endocitosi e 4) eliminati da processi idrolitici nello spazio intracellulare²³ (Figura 4).

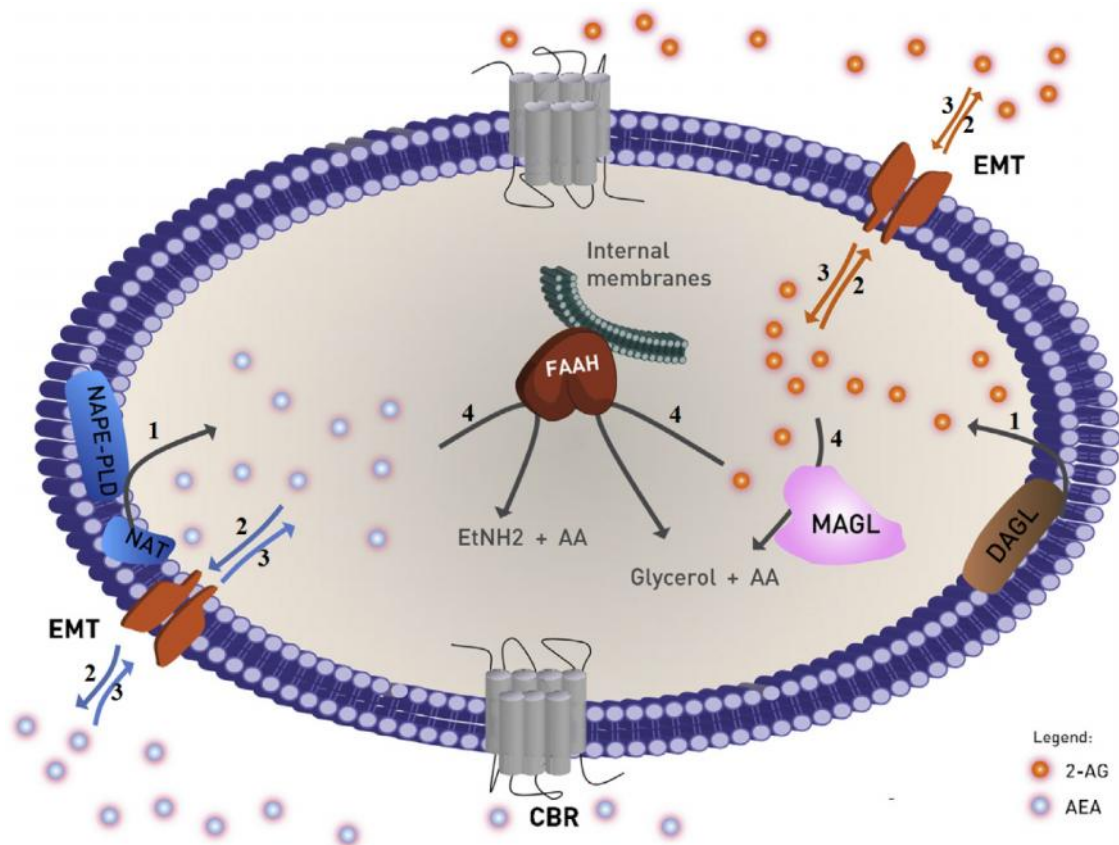


Figura 4²³: *Ciclo biologico degli endocannabinoidi. NAT: N-aciltransferasi; NAPE-PLD: N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipasi; DAGL: diacilglicerolo lipasi; EMT: trasportatore di membrana degli endocannabinoidi; FAAH: idrolasi ammidi acidi grassi; MAGL: monoacilglicerolo lipasi.*

L'AEA viene prodotta per idrolisi del fosfolipide N-arachidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) da parte di una specifica fosfolipasi D (NAPE-PLD)³² situata sul versante interno della membrana cellulare. Il precursore NAPE è a sua volta sintetizzato dalla N-acil-transferasi (NAT) che catalizza il trasferimento dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana all'amminogruppo della fosfatidiletanolamina²³ (Figura 5).

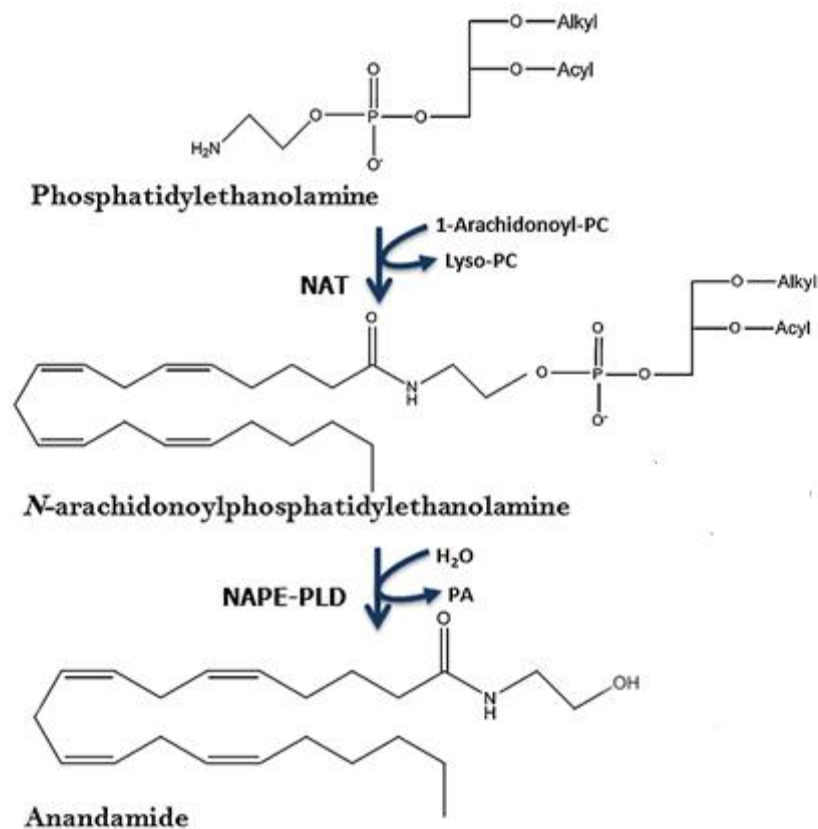


Figura 5²³: Biosintesi dell'anandamide.

Per quanto concerne il 2-acilglicerolo la via biosintetica maggiormente accreditata è l'idrolisi via fosfolipasi C (PLC) dei fosfolipidi di membrana a dare l'1,2-diacilglicerolo (DAG) che viene successivamente convertito a 2-AG attraverso una diacilglicerolo-lipasi (DAGL)²³ (Figura 6).

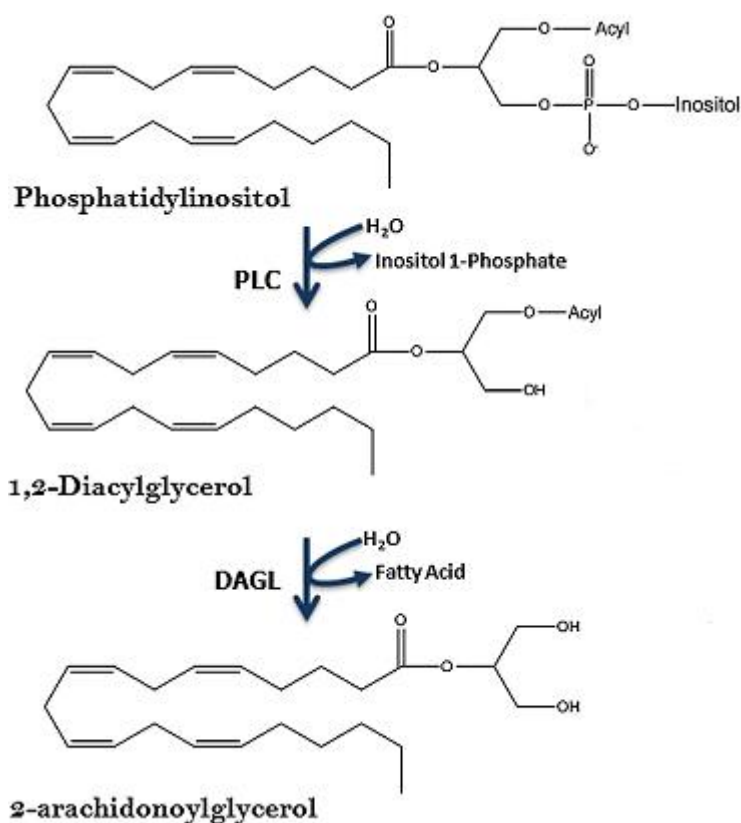


Figura 6²³: Biosintesi del 2-arachidonoilglicerolo.

In seguito alla loro biosintesi gli endocannabinoidi vengono rilasciati nello spazio extracellulare e vanno ad attivare i recettori cannabinergici al terminale presinaptico attraverso un meccanismo di trasmissione retrograda²³.

Il meccanismo principale attraverso cui avviene il reuptake degli endocannabinoidi è il trasporto mediato da un carrier comunemente indicato EMT (endocannabinoid membrane transporter). Altre modalità di reuptake ipotizzate prevedono la diffusione semplice secondo gradiente di concentrazione attraverso la membrana citoplasmatica, l'endocitosi ed il sequestro degli endocannabinoidi da parte di proteine intracellulari AIBP (anandamide intracellular binding proteins)²³ (Figura 7).

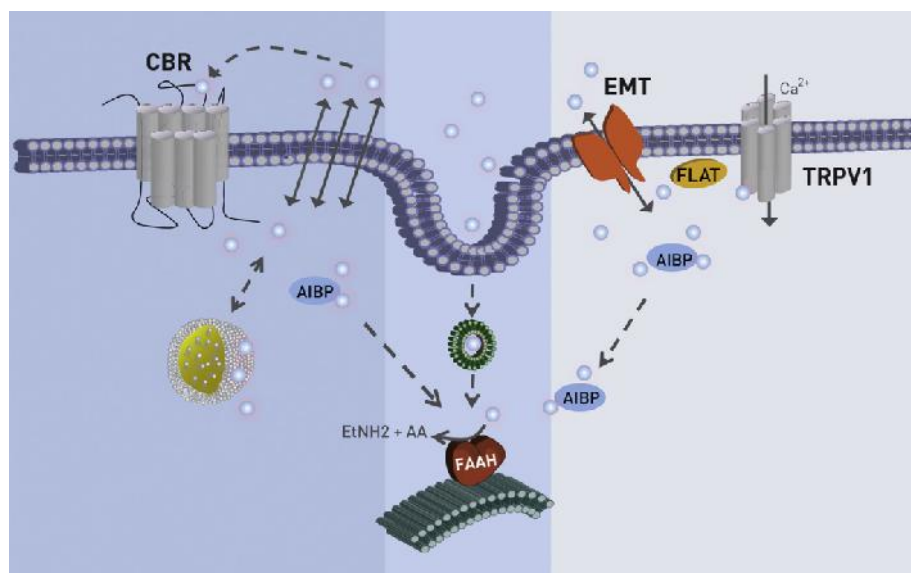


Figura 7²³: *Principali meccanismi di reuptake per l'AEA.*

Una volta all'interno della cellula gli endocannabinoidi vengono metabolizzati da specifici enzimi in molecole che possono essere riciclate ed usate per sintetizzare nuovi composti endogeni. L'AEA viene principalmente degradata dalle FAAH (fatty-acid-amide-hydrolase) per idrolisi in acido arachidonico ed etanolamina^{33,34} (Figure 4 e 7). Sebbene le FAAH possano metabolizzare il 2-AG in glicerolo ed acido arachidonico, il principale enzima responsabile della sua inattivazione è la monoacilglicerolo-lipasi (MAGL), un enzima citosolico appartenente alla famiglia delle serina-idrolasi³⁵ (Figura 4).

I recettori cannabinergici

Ad oggi sono stati identificati due recettori cannabinergici denominati CB1⁸ e CB2⁹ clonati rispettivamente dal ratto nel 1990 e dalla linea cellulare di leucemia promielocitica umana HL-60 nel 1993. Entrambi i sottotipi appartengono alla superfamiglia di recettori accoppiati alle proteine G (GPCR) che inibiscono l'accumulo dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) all'interno della cellula attraverso le proteine G_{i/o} loro associate³⁶.

I recettori CB1 si trovano principalmente sulle cellule nervose di encefalo, midollo spinale e sistema nervoso periferico, ma sono presenti anche in alcuni organi e tessuti periferici tra cui ghiandole endocrine e salivari, leucociti, milza, adipociti, muscolo scheletrico, pancreas, cuore ed ancora apparato riproduttivo, urinario e gastrointestinale. Molti recettori CB1 sono espressi sulle terminazioni nervose centrali e periferiche a livello presinaptico ed inibiscono il rilascio di altri neurotrasmettitori attraverso il signaling retrogrado. In questo modo l'attivazione dei recettori CB1 protegge il sistema nervoso centrale da sovrastimolazione o sovrainibizione da parte di neurotrasmettitori. I recettori CB1

sono espressi particolarmente in quelle regioni dell'encefalo che sono responsabili del movimento (gangli basali, cervelletto), dei processi mnestici (ippocampo, corteccia cerebrale), delle emozioni e della memoria (amigdala) e della modulazione del dolore (alcune zone del midollo spinale, la sostanza grigia periacquiduttale)³⁷ (Figura 8).

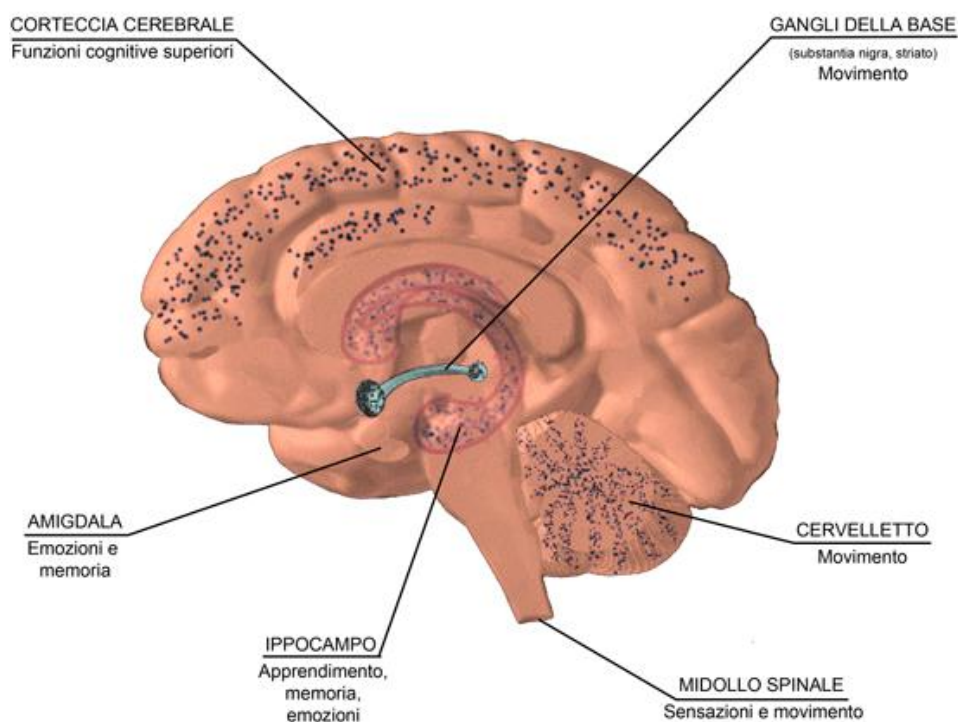


Figura 8¹⁰: Distribuzione dei recettori CB1 nell'encefalo.

I recettori CB1, una volta attivati, innescano una complessa cascata di eventi intracellulari e in particolare:

- attraverso l'inibizione dell'adenilato ciclasi (AC) riducono i livelli di cAMP, regolano la fosforilazione della proteina chinasi A (PKA) e controllano l'attività cellulare;
- fosforilano ed attivano varie chinasi intracellulari come la chinasi mitogeno-attivata p38 (p38 MAPK), di adesione focale (FAK), la c-Jun N-terminale (JNK) e la chinasi regolata da segnali extracellulari (ERK) che regolano la funzione cellulare e la trascrizione genica;
- determinano la chiusura dei canali del Ca^{2+} di tipo N e P/Q e l'apertura dei canali del K^+ inward-rectifier e di tipo A, effetti associati con la depressione dell'eccitabilità neuronale e del rilascio di trasmettitori;

- regolano il metabolismo di sfingolipidi attraverso l'incremento dei livelli cellulari di ceramide, un secondo messaggero ubiquitario di natura lipidica che controlla il grasso cellulare in differenti siti^{23,38} (Figura 9).

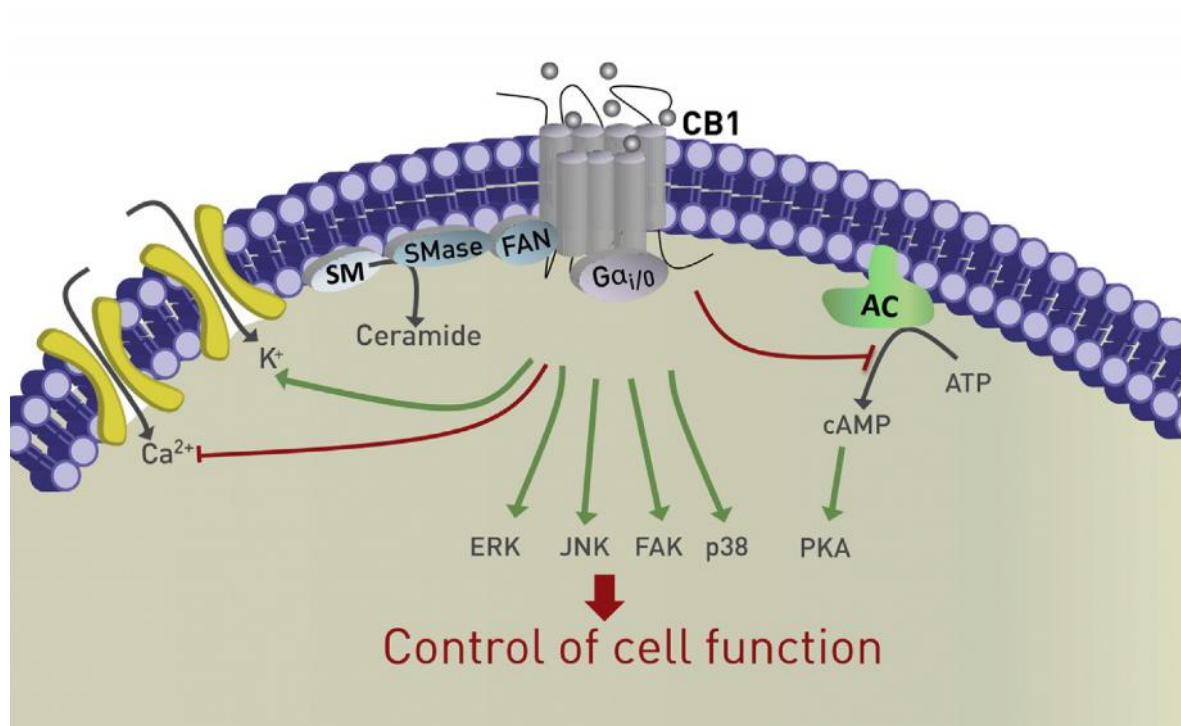


Figura 9²³: *Meccanismo di trasduzione del segnale del recettore CB1*

L'attivazione dei recettori CB1 nelle aree del cervello e del midollo spinale che sono coinvolte nella trasmissione del dolore induce un'intensa analgesia. Tuttavia l'utilità clinica di agonisti CB1 è limitata dalla stretta finestra terapeutica in relazione agli effetti psicotropi³⁹. In tempi relativamente recenti è emerso che il recettore CB1 è un importante target per il trattamento di disordini metabolici come l'obesità e il diabete in quanto gioca un notevole ruolo nel controllo dell'appetito, della secrezione endocrina e del metabolismo energetico⁴⁰ (Figura 10). L'antagonismo CB1, che nel sistema nervoso centrale produce effetti secondari psicotropi avversi, a livello periferico induce lipolisi, aumento dell'ossidazione degli acidi grassi, regressione della steatosi epatica, maggiore tolleranza al glucosio e migliore sensibilità a insulina e leptina⁴¹.

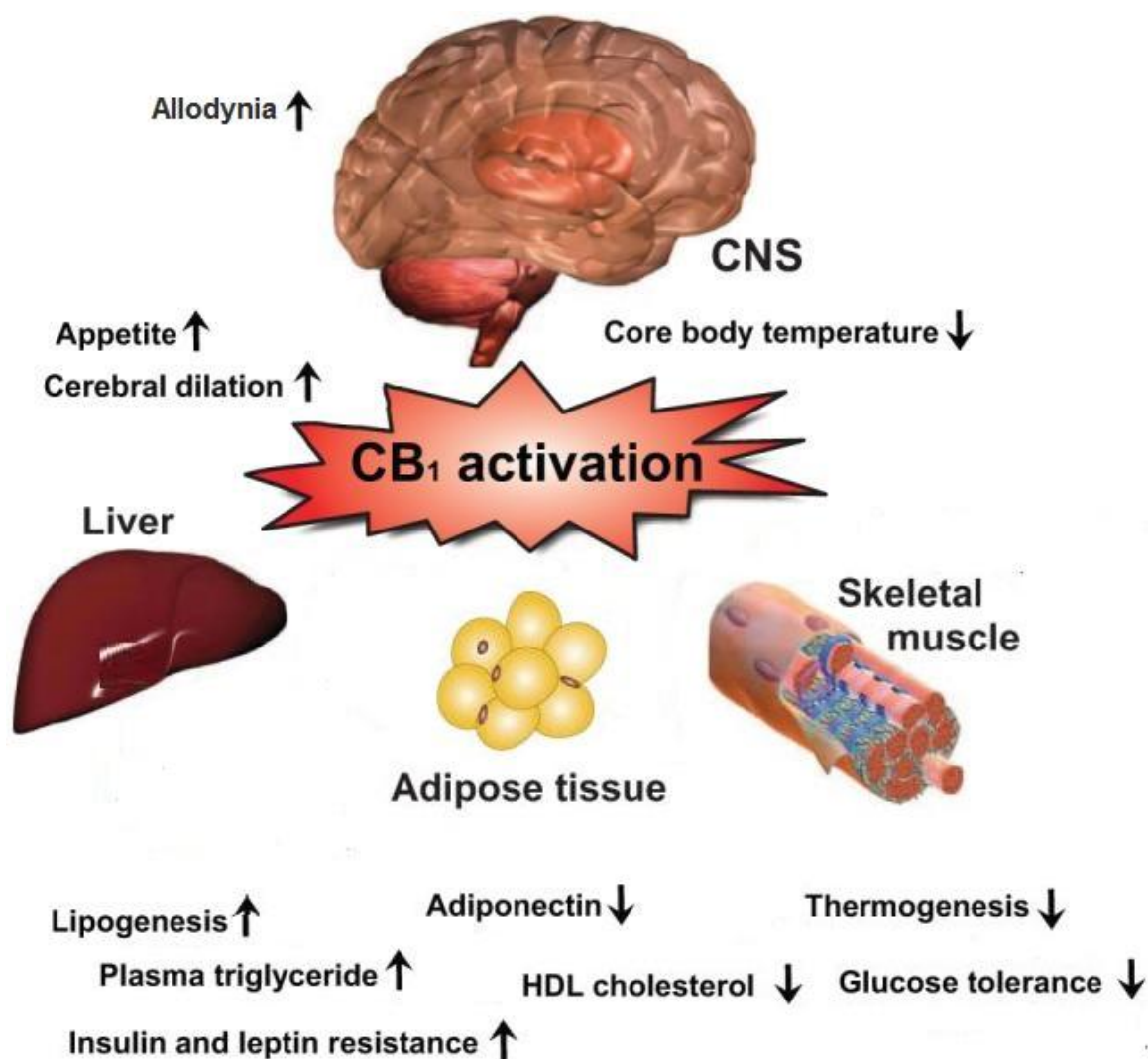


Figura 10: Effetti biologici conseguenti all'attivazione dei recettori CB₁.

I CB₂, spesso denominati “recettori cannabinergici periferici”, sono altamente espressi sulle cellule del sistema immunitario (mastociti, linfociti B, linfociti T4 e T8, cellule microgliali e natural killer, monociti e neutrofilii polimorfonucleati)⁴² e sono localizzati in abbondanza nei tessuti del sistema linfoide inclusi timo, tonsille, midollo osseo e in minor misura in altre strutture periferiche come la retina, l'apparato gastrointestinale, il fegato, il pancreas, le ossa ed il sistema riproduttivo⁴³. A lungo si è ritenuto che i recettori CB₂ si trovassero esclusivamente in periferia ma un recente studio ha invece mostrato la loro presenza anche nel sistema nervoso centrale e in particolare nel tronco encefalico, nel cervelletto e nella corteccia sugli astrociti. Nei pazienti affetti da malattie neurodegenerative o da dolore neuropatico i recettori CB₂ vengono espressi anche dalle cellule microgliali⁴⁴.

Il meccanismo di trasduzione del segnale dei recettori CB2 riflette quello dei CB1, ma, diversamente da questi ultimi, non prevede la modulazione dei canali ionici²³ (Figura 11).

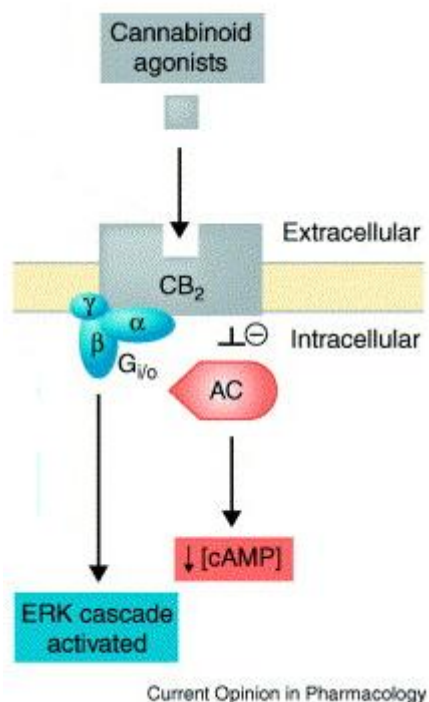


Figura 11: *Signaling del recettore CB2.*

I recettori CB2 giocano un importante ruolo nella risposta immune ed infiammatoria poiché quando attivati modulano la migrazione cellulare, bloccano la liberazione di specie radicaliche e ossido di azoto, molecole di adesione, chemochine e citochine pro-infiammatorie

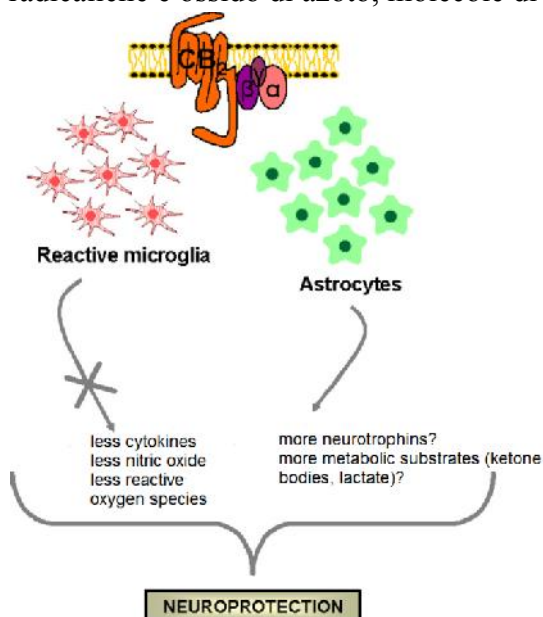


Figura 12^[44]: *Ruolo delle cellule microgliali nella neuroprotezione mediata dai recettori CB2.*

ed algogene come IL-1 β , TNF- α e la subunità p40 dell'IL-12 e IL-23 da parte di microglia e macrofagi mentre inducono il rilascio di fattori di neuroprotezione e di citochine antiinfiammatorie come IL-4 e IL-10 (Figure 12 e 13). Inoltre i recettori CB2 esplicano un effetto morfino-simile promuovendo il rilascio di β -endorfina²¹. Grazie alla possibilità di mediare effetti neuroprotettivi, antiinfiammatori ed antiossidanti i recettori

CB2 rappresentano dei potenziali target terapeutici per il trattamento delle malattie

neurodegenerative (morbo di Alzheimer e di Parkinson, sclerosi multipla, sclerosi laterale amiotrofica e malattia di Huntington) caratterizzate dall'iperreattività della microglia che secerne un grande numero di citochine pro ed antiinfiammatorie, chemochine, glutammato, prostanoidei, fattori neurotrofici e radicali liberi all'ossigeno (ROS) ed ossido di azoto che determinano un intenso stress ossidativo.

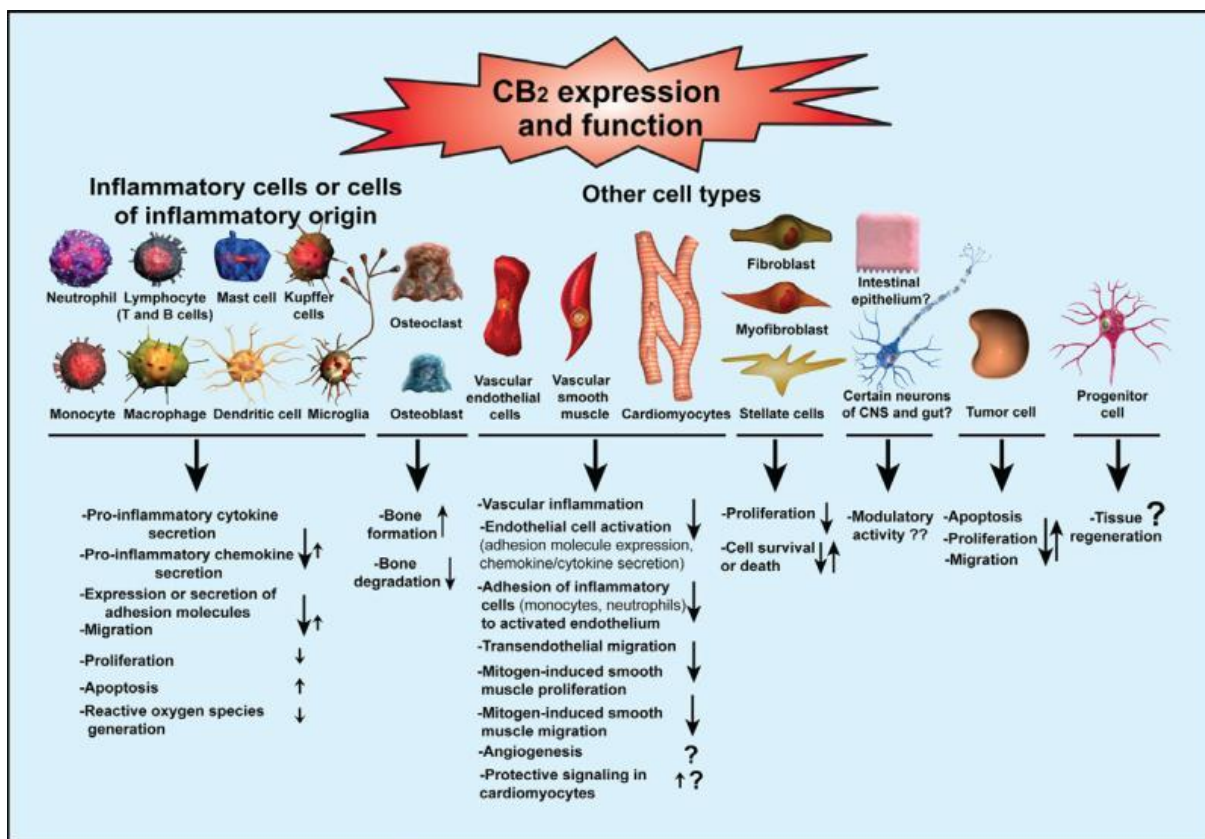


Figura 13⁴⁵: Espressione e funzioni biologiche dei recettori CB2.

Gli agonisti CB2 possiedono un notevole potenziale terapeutico per il trattamento di cancro, diabete, osteoporosi, aterosclerosi, glaucoma e di numerose patologie infiammatorie e neurodegenerative di diversa eziologia tra cui sclerosi multipla, sclerosi laterale amiotrofica, morbo di Alzheimer e Parkinson, malattia di Huntington ed ancora dolore neuropatico ed infiammatorio^{21,46}. Inizialmente l'interesse verso i recettori cannabinergici quali possibili targets per il dolore cronico era ristretto al recettore CB1 con lo scopo d'identificare un agonista idoneo per essere immesso sul mercato come farmaco. Sfortunatamente l'analgesia indotta da agonisti CB1 è associata ad effetti centrali indesiderati che ostacolano lo sviluppo clinico di queste molecole. Oggi il recettore CB2 rappresenta un'interessante alternativa al CB1 nella terapia di dolore ed altre patologie e la separazione fra gli effetti terapeutici e quelli

avversi nel sistema nervoso centrale può essere realizzata da un incremento di selettività per CB2 rispetto a CB1¹³.

La conoscenza della struttura 3D dei recettori cannabinergici potrebbe essere di grandissimo aiuto per un razionale design di specifici e selettivi ligandi e a tal proposito sono stati portati avanti numerosi studi biochimici, farmacologici e computazionali⁴⁷.

I recettori CB1 e CB2 appartengono entrambi alla famiglia α -rodopsina dei GPCRs e condividono la stessa struttura fondamentale: un dominio N-terminale extracellulare ed uno C-terminale intracellulare, sette eliche transmembrana unite fra loro da tre anse extracellulari e tre anse intracellulari²¹. Le principali caratteristiche e differenze tra CB1 e CB2 riguardano le seguenti regioni:

- *Dominio N-terminale*: il recettore CB1 ha una coda extracellulare più lunga approssimativamente di settanta residui amminoacidici rispetto a CB2 e a tutti gli altri GPCR. Questa lunga estremità N-terminale regola la stabilità e l'espressione superficiale di CB1 ma non sembra giocare un ruolo importante nel riconoscimento del ligando;
- *seconda ansa extracellulare (EL2)*: in questo loop sono presenti due cisteine (C187 e C194 in CB1, C174 e C179 in CB2) che in base alla loro reciproca distanza potrebbero essere coinvolte nella formazione di un ponte disolfuro caratteristico di tutta la famiglia di GPCR;
- *terza ansa intracellulare (IL3)*: nel recettore CB1 in corrispondenza di questa regione è posizionato un residuo di serina che viene fosforilato dalla proteina chinasi C (PKC). Tale residuo è assente in CB2⁴⁸ (Figura 14).

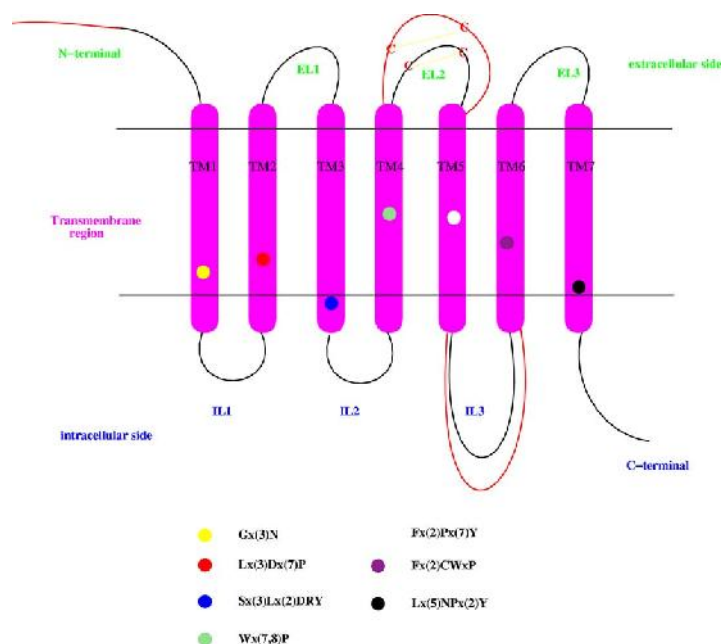


Figura 14⁴⁸: *Struttura bidimensionale dei recettori CB1 e CB2. I cerchi colorati rappresentano le regioni amminoacidiche conservate all'interno della famiglia dei GPCR.*

Vari modelli tridimensionali dei recettori cannabinergici CB1 e CB2 (Figura 15) sono stati costruiti per mezzo di procedure di modeling molecolare usando la struttura a raggi X della rodopsina bovina che, cristallizzata da Palczewsky nel 2000, ha consentito una prima diretta visualizzazione di un recettore a sette domini transmembrana accoppiato alle proteine G nello stato inattivo⁴⁹.

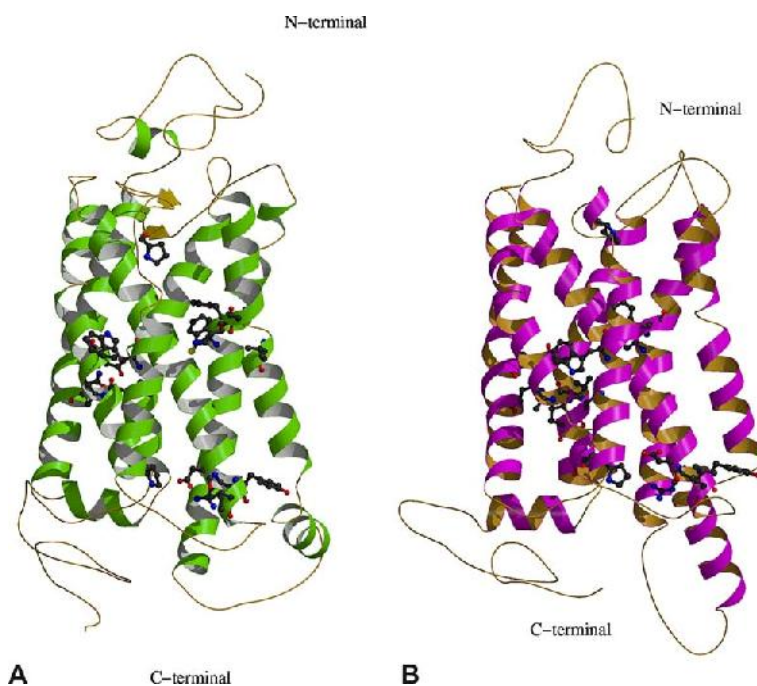


Figura 15⁴⁸: *Modello tridimensionale del recettore CB1 (A) e del recettore CB2 (B). Le regioni conservate sono mostrate attraverso i modelli a sfere e bastoncini.*

Lo sviluppo di questi modelli è reso difficile dal fatto che i recettori CB1 e CB2 condividono solo il 21% ed il 20% d'identità con la rodopsina e solo il 44% fra di loro⁴⁸.

I recettori cannabinergici, come tutti i GPCRs, possono esistere in due conformazioni diverse. La teoria del “*two state model of receptor activation*” (teoria del doppio stato recettoriale) (Figura 16) propone che, in assenza del ligando naturale o agonista, i recettori esistano in equilibrio tra uno stato attivo (R^*) in grado di innescare la risposta biologica e uno stato silente (R). In assenza dell'agonista, l'equilibrio fra (R^*) e (R) definisce l'attività basale del recettore. Un farmaco può legarsi ad entrambi gli stati conformazionali in base alle costanti di equilibrio K_d e K_d^* per la formazione del complesso farmaco-recettore con la forma silente ($F \cdot R$) ed attiva ($F \cdot R^*$) rispettivamente. Gli agonisti pieni si legano ad (R^*) e spostano l'equilibrio completamente verso lo stato attivo determinando la risposta massima; gli agonisti inversi spostano l'equilibrio totalmente verso lo stato silente (R) provocando un'“efficacia negativa”, ossia un decremento dell'attività basale; gli antagonisti, avendo lo stesso grado di affinità per entrambe le conformazioni, non influenzano né l'equilibrio fra (R) e (R^*) né l'attività basale⁵⁰. Il meccanismo attualmente accettato per la transizione da (R) a (R^*) prevede che il segmento citoplasmatico di TM6 si muova in avanti e lontano dal core del recettore ruotando in senso orario. A questo si accompagna una piccola rotazione di TM3 sempre in direzione oraria⁴⁷.

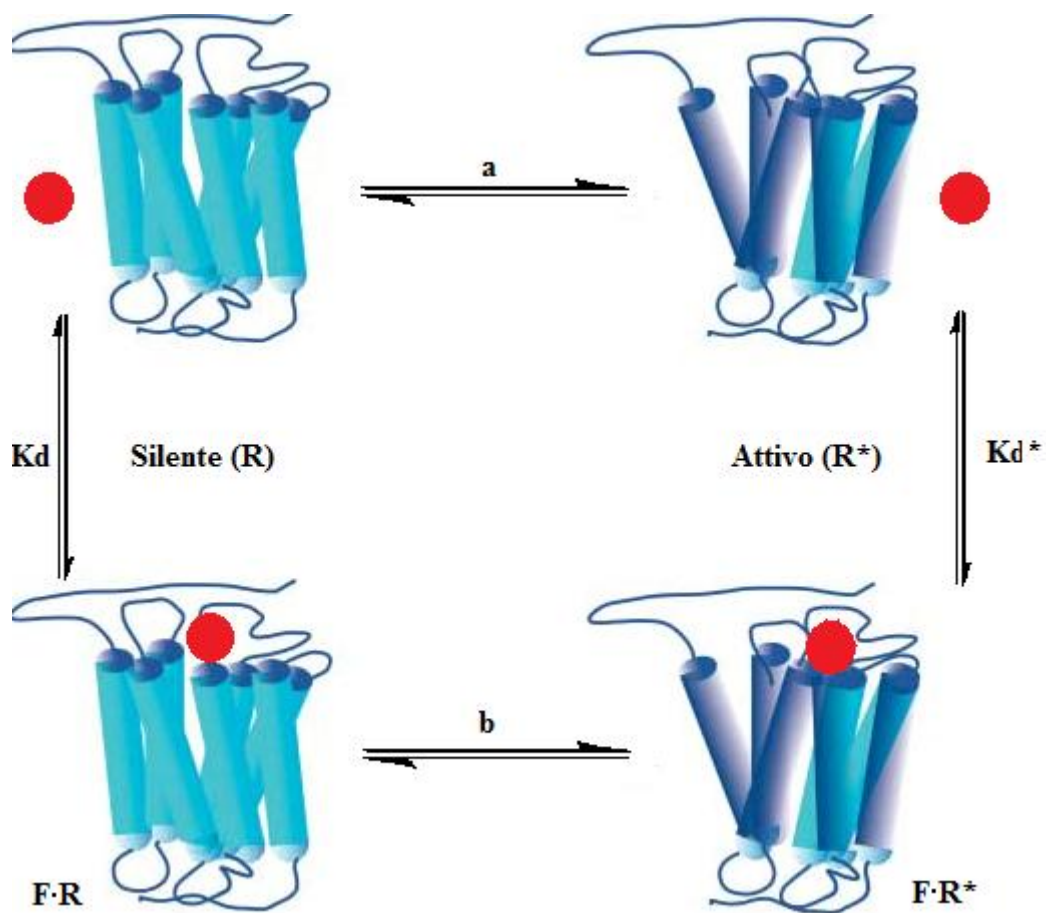
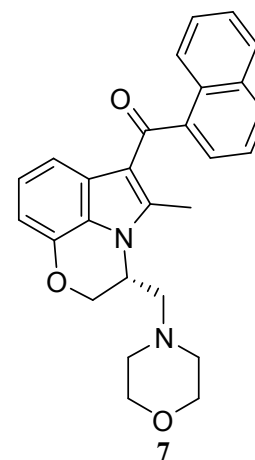


Figura 16: Teoria del doppio stato recettoriale; a e b sono gli equilibri fra lo stato silente e attivo del recettore.

Il sito di legame dei recettori cannabinergici sembrerebbe essere localizzato all'interno di una tasca lipofila creata dai segmenti transmembrana TM3, TM5, TM6 e TM7. Studi di docking hanno suggerito che il binding di questi recettori con il ligando avviene attraverso diverse interazioni quali i ponti a idrogeno e le interazioni a trasferimento di carica tra anelli aromatici diversamente sostituiti e le differenze tra CB1 e CB2 sono dipendenti da variazioni in corrispondenza di specifici sottodomini di legame all'interno di questa tasca. In passato sono stati costruiti i modelli tridimensionali di CB1 e CB2 nella loro forma attivata ed è stata analizzata l'interazione con il WIN55212-2 (Figura 17). Quest'ultimo è un amminoalchilindolo acilato in posizione 3 moderatamente selettivo per il recettore CB2 e le sue distinte proprietà di binding rispetto ai classici cannabinoidi hanno rappresentato un punto di partenza per lo sviluppo di agonisti CB2 selettivi. Nel recettore CB1 il sito di legame è caratterizzato da un primo sottodominio lipofilo delimitato dagli amminoacidi F3.36(200), W5.43(279) e W6.48(356) che interagiscono con gli anelli aromatici naftalenico ed indolico del ligando; un secondo sottodominio lipofilo formato da L3.26(190), P4.60(251) e L4.61(252) accoglie la porzione morfolinica del ligando. Il sito ortosterico di CB2, simile a quello di CB1, è caratterizzato da due peculiari amminoacidi, assenti sul recettore CB1, che stabilizzano il complesso con il WIN 55212-2 [F5.46(197) e S3.31(112)]. Questi risultati suggeriscono che la CB2/CB1 selettività potrebbe essere incrementata dalla presenza nei ligandi di un gruppo lipofilo in grado di interagire all'interno del recettore CB2 con F5.46 e di un gruppo idrofilico che formi un legame ad idrogeno con S3.31⁴⁷.



WIN 55212-2⁵⁹

K_i CB1 = 1.9 nM

K_i CB2 = 0.3 nM

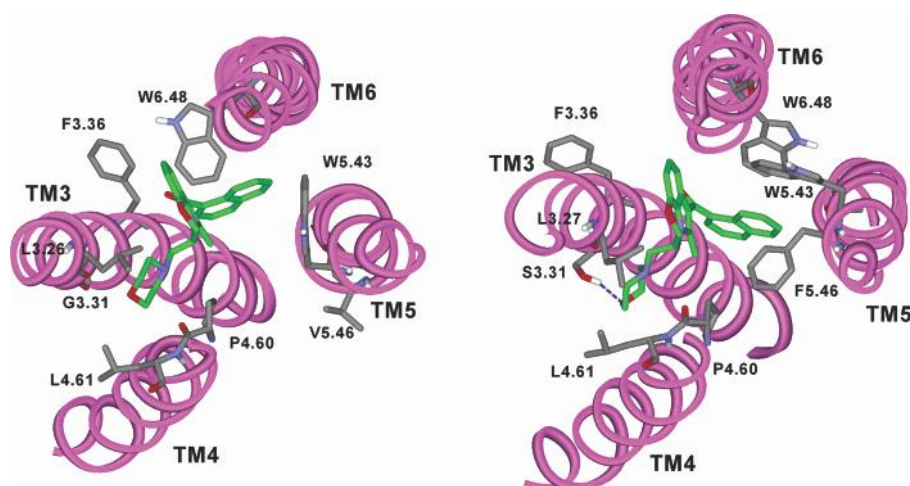


Figura 17⁴⁷: *Visione extracellulare del docking di WIN 55212-2 con il recettore CB1 (sinistra) e CB2 (destra).*

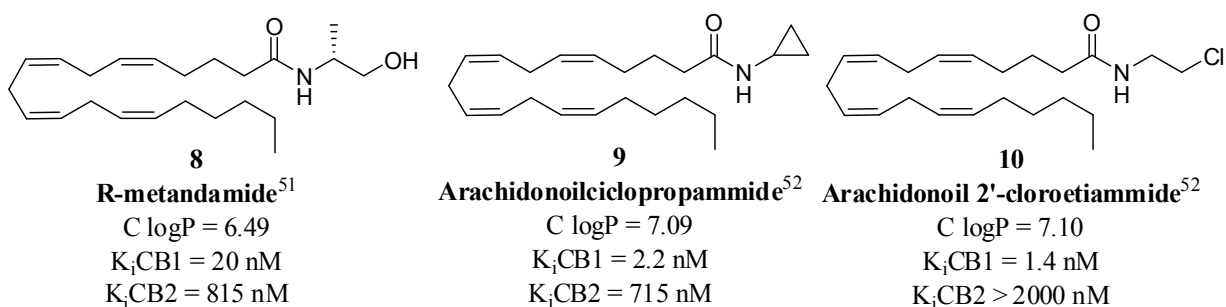
Ligandi cannabinergici

I ligandi per i recettori cannabinergici possono essere distinti da un punto di vista chimico in tre gruppi fondamentali ossia:

- *cannabinoidi endogeni*;
- *fitocannabinoidi* (classici e non classici);
- *cannabinoidi sintetici* tra cui indoli e benzimidazoli, imidazopiridine, naftiridine, pirazoli biciclici, diarilpirazoli ed analoghi triciclici etc.

Cannabinoidi endogeni ed altri derivati degli acidi grassi

Questa classe comprende gli endocannabinoidi AEA (**2**), 2-AG (**3**), 2-AGE (**4**), virodamina (**5**) e NADA (**6**) ampiamente descritti in precedenza ed i loro analoghi sintetici, disegnati e prodotti in seguito a studi di correlazione struttura-attività (SAR) con l'obiettivo di migliorare la stabilità metabolica e la selettività verso CB1, congeneri dei ligandi naturali. Le marginali affinità e selettività per CB1 dell'AEA (**2**) furono significativamente migliorate attraverso la preparazione dei derivati **8**⁵¹, **9** e **10**⁵² sintetizzati in base all'osservazione che l'aumento della lipofilia dell'ammide determinerebbe una maggiore CB1-affinità. Il composto **8** si è inoltre dimostrato più stabile nei confronti dell'inattivazione idrolitica da parte delle FAAH.



Fitocannabinoidi: cannabinoidi classici

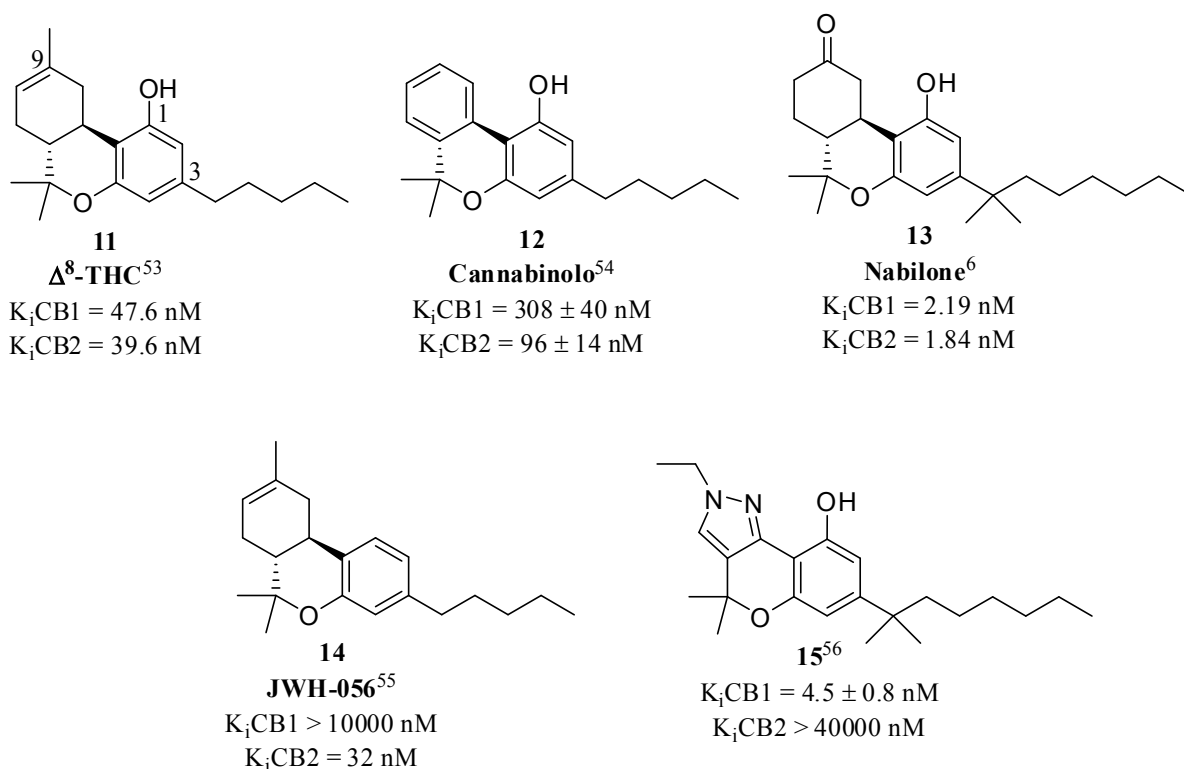
I cannabinoidi classici sono terpenoli triciclici il cui prototipo è rappresentato dal Δ^9 -THC (**1**) (Figura 1). Questo composto naturale lega sia i recettori CB1 che CB2 con un'affinità simile approssimativamente di 40 nM ed esibisce un ampio spettro di effetti fisiologici terapeuticamente interessanti quali analgesia, azioni antiinfiammatoria ed immunosoppressiva, anticonvulsivante, antiemetica e proprietà orexigeniche. Il suo uso è stato tuttavia regolamentato a causa dei suoi effetti psicotropi e la sua associazione con l'abuso di droghe illecite. Il Δ^9 -THC sintetico, conosciuto come *dronabinolo* (Marinol®), è attualmente approvato negli Stati Uniti per il trattamento di nausea e vomito in pazienti sottoposti a chemioterapia⁶. Il composto **1** in condizioni acide isomerizza rapidamente a Δ^8 -THC (**11**)⁵³ che conserva un simile livello di affinità su entrambi i recettori. Un altro importante fitocannabinoidi presente nella *Cannabis* come prodotto di ossidazione del Δ^9 -THC è rappresentato dal cannabinolo (**12**)⁵⁴ che, nonostante esibisca una minore affinità per i recettori cannabinergici, produce nocicezione con minimi effetti psicomimetici.

In questa classe di composti la natura del sostituente nelle posizioni C1, C3 e C9 gioca un ruolo critico nel binding ai recettori cannabinergici. Gli studi SAR hanno dimostrato che la lunghezza ottimale della catena sul C3 è sette atomi di carbonio e che gruppi alchilici ramificati comportano un miglioramento dell'affinità recettoriale. Per esempio il Nabilone (**13**) è un ligando sintetico venti volte più potente del Δ^9 -THC immesso sul mercato negli Stati Uniti per il trattamento della nausea indotta da chemioterapia⁶.

L'importanza del sostituente idrossilico al C1 differisce fra i due sottotipi recettoriali: l'affinità verso il recettore CB1 è assolutamente dipendente da questo gruppo viceversa la preferenziale attivazione del recettore CB2 viene ottenuta proprio attraverso la rimozione del sostituente fenolico come si può vedere dai valori di K_i del composto **14**⁵⁵.

Di recente un gruppo di ricerca spagnolo ha sintetizzato una serie di composti a struttura cromenopirazolica per sostituzione dell'anello fenilico del cannabinolo **12** con un pirazolo al fine di esplorare l'effetto di questo eterociclo sull'attività cannabinergica. Alcuni

di questi nuovi ligandi, esemplificati dal composto **15**⁵⁶, si sono rivelati selettivi per il recettore CB1 ed attivi in diversi modelli di dolore.



Fitocannabinoidi: cannabinoidi non classici

I cannabinoidi non classici sono analoghi biciclici o triciclici del Δ⁹-THC caratterizzati dalla rimozione dell'anello piranico. Le correlazioni struttura-attività di questa classe di composti sono simili a quelle descritte per i cannabinoidi classici. Il CP-55940 (**16**)⁵⁷, sviluppato dalla Pfizer nel 1974, è un agonista duale CB1/CB2 con affinità simile di circa 0.6 nM e dotato di un'eccellente attività analgesica superiore ad **1**. Il composto (**16**) e il corrispondente isotopo [³H]**16** radiomarcato sono tra i composti più utilizzati nella scoperta e nella caratterizzazione dei ligandi cannabinergici⁶.

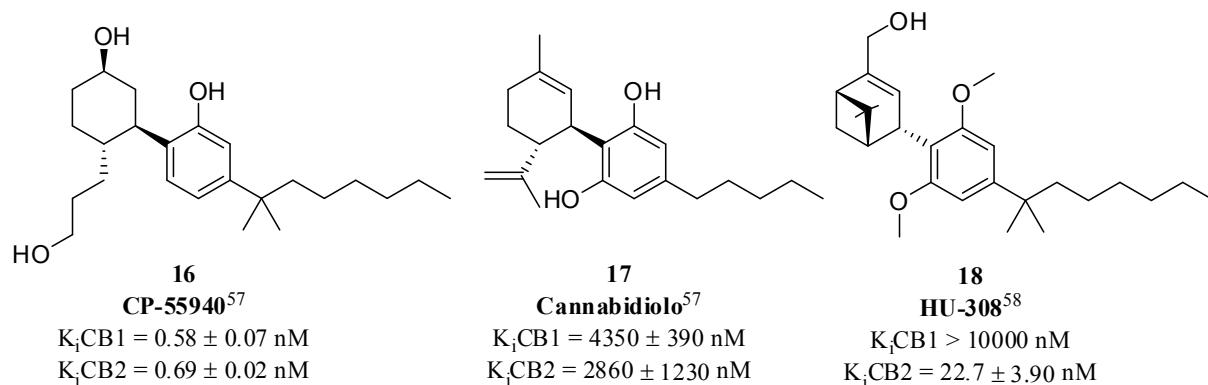
Il cannabidiolo (**17**)⁵⁷ è uno dei maggiori componenti della *Cannabis sativa*. Esso si comporta da agonista inverso CB1/CB2, è privo di proprietà psicotrope e si è rivelato potenzialmente utile per il trattamento di infiammazione, ansia, nausea così



come per l'inibizione della crescita delle cellule tumorali. La combinazione di cannabidiolo e

Δ^9 -THC è stata immessa per la prima volta in commercio in Canada nel 2005 con il nome di Sativex® per alleviare il dolore associato alla sclerosi multipla e al cancro⁶. Sativex® è stato il primo farmaco a base di cannabinoidi ad essere stato approvato in Italia nel 2013.

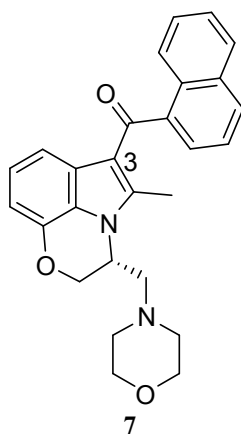
L' HU-308 (**18**)⁵⁸, privo del gruppo fenolico, ha esibito un'eccellente selettività per il recettore CB2 e una buona attività analgesica ed antiinfiammatoria nel modello murino d'infiammazione indotta da formalina⁶.



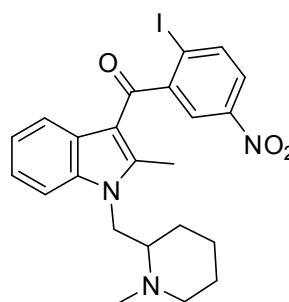
Cannabinoidi sintetici: Indoli e benzimidazoli

Gli amminoalchilindoli classici sono caratterizzati da un core indolico sostituito in posizione 3 con un gruppo aroilipofilico e in N-1 con una catena laterale amminoalchilica. Il composto meglio caratterizzato di questa classe è il WIN 55212-2 (**7**)⁵⁹ che insieme al suo analogo radiomarcato è stato ampiamente utilizzato come strumento farmacologico nella ricerca sui cannabinoidi. Esso è un potente agonista CB1/CB2 con una leggera selettività verso CB2 ed esibisce tutti gli effetti *Cannabis-like*⁶.

L'AM-1241 (**19**)⁶⁰ è un agonista 500 volte più selettivo su CB2, attivo sul dolore neuropatico. Curiosamente tale ligando inibisce il dolore anche attraverso un meccanismo dipendente dal recettore per gli oppioidi. Inoltre è interessante sottolineare che la somministrazione di questo derivato indolico in modelli murini di SLA hSOD1^{G93A}, in seguito alla comparsa dei primi sintomi, rallenta la progressione della malattia⁶¹.

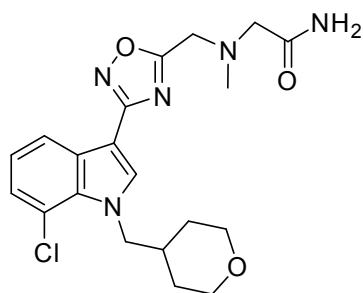


7
WIN 55212-2⁵⁹
 K_i CB1 = 1.9 nM
 K_i CB2 = 0.3 nM



19
AM-1241⁶⁰
 K_i CB1 = 580 nM
 K_i CB2 = 7.1 nM

In un recente lavoro un gruppo di ricerca del Lanarkshire ha sintetizzato una serie di composti 3-ossadiazol-indolici e 3-tiadiazol-indolici quali ligandi dei recettori CB1 con scarso grado di penetrazione della barriera emetoencefalica (BEE) sulla base di una serie di studi che hanno confermato che gli agonisti CB1 possono indurre antinocicezione tramite siti d'azione periferici. In questa serie il composto **20** ha rivelato una buona disponibilità orale, scarsa distribuzione a livello del sistema nervoso centrale e discrete proprietà analgesiche in modelli di dolore neuropatico³⁹.

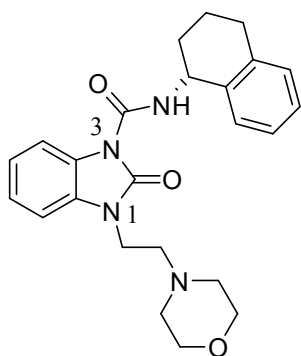


20³⁹

K_i CB1 = 19 nM

K_i CB2 = 50 nM

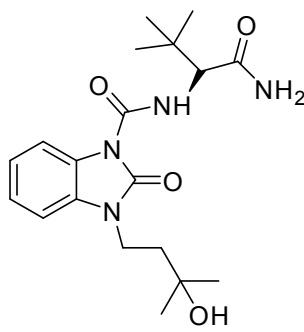
Nell'intento di migliorare la selettività al recettore CB2 la Pfizer assunse **7** e **19** quali composti di riferimento e sostituì il core indolico con un benzimidazolone o con un 3,4-diidro-2(1H)-chinazolinone conservando il pendaglio amminico in 1 ed il motivo strutturale lipofilico in 3. Il derivato **21** è risultato un potente e selettivo agonista CB2 tuttavia caratterizzato da scarsa stabilità metabolica. Dopo aver individuato negli anelli tetraidronaftalenico e morfolinico i principali siti metabolici venne sviluppato il composto **22** che si comporta da potente agonista CB2 attivo per via orale nel modello di allodinia viscerale. Interessantemente l'analogo chinazolinonico di **19**, il composto **23**, ha mostrato un buon profilo di binding sul recettore CB2 ma agisce da agonista inverso².



21²

K_i CB1 = 1730 nM

K_i CB2 = 7 nM

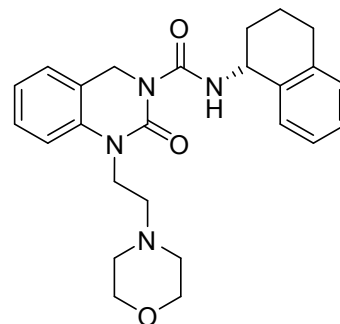


22²

PF-03550096

K_i CB1 = 1459 nM

K_i CB2 = 8 nM



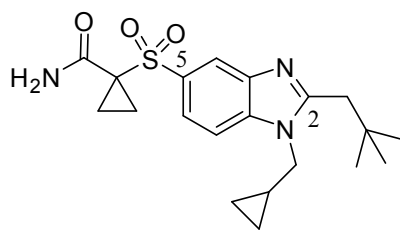
23²

K_i CB1 = 1510 nM

K_i CB2 = 9 nM

agonista inverso

Sempre la Pfizer ha sintetizzato una serie di benzimidazoli 1,2,5-trisostituiti contenenti pendagli neopentilici in 2 ed un gruppo solfonico in 5. Il composto **24**⁶ è il migliore della serie in termini di selettività e potenza CB2.

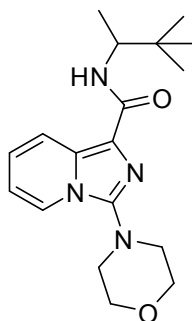


24⁶

EC₅₀ CB2 = 0.15 nM

Cannabinoidi sintetici: imidazopiridine

La Merck ha descritto una serie di imidazopirididine come agonisti CB2 efficaci nei modelli di dolore infiammatorio e osteoartrite. Il derivato **25⁶²** si è rivelato il migliore in termini di potenza, efficacia e selettività.

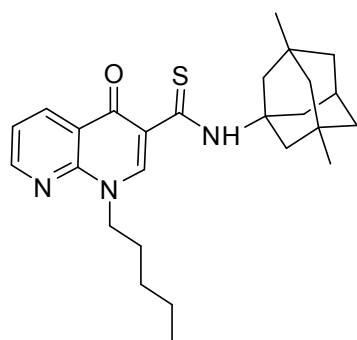


25⁶²

EC₅₀ CB2 = 5.4 nM

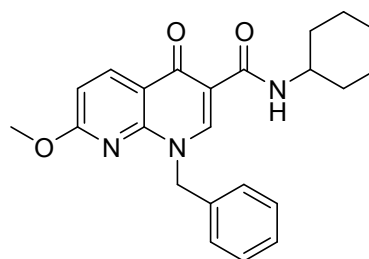
Cannabinoidi sintetici: naftiridine

Molti gruppi accademici hanno pubblicato una serie di agonisti CB2 selettivi basati su uno scheletro naftiridinico recante in C3 una funzione carbotioammidica o carbossammidica come i derivati **26⁶³**, **27⁶⁴** e **28⁶⁵** rispettivamente dell'Università di Lille, Pisa e Siena. In un successivo lavoro è stato descritto come la migrazione del carbonile dalla posizione C4 alla C2 dello scaffold naftiridinico (**29⁶⁶**) determini un aumento della selettività verso il recettore CB2 (K_i CB1/ K_i CB2 = 262) rispetto all'analogo 4-osso-naftiridina **27** (K_i CB1/ K_i CB2 = 50.9).



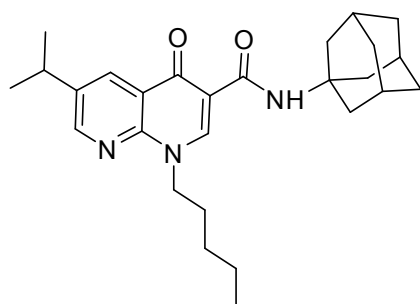
26⁶³

K_i CB1 = 35% spiazzamento
 K_i CB2 = 18.2 nM



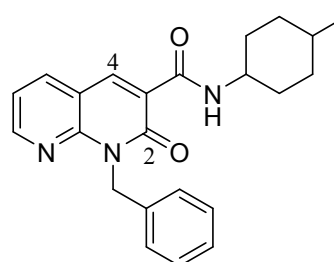
27⁶⁴

K_i CB1 = 560 nM
 K_i CB2 = 11 nM
 K_i CB1/ K_i CB2 = 50.9



28⁶⁵

K_i CB1 = 1220 nM
 K_i CB2 = 6.3 nM

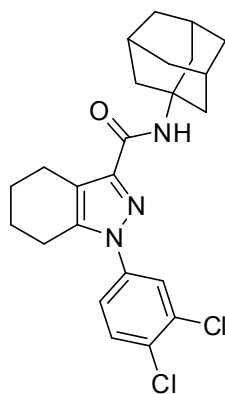


29⁶⁶

K_i CB1 = 1520 nM
 K_i CB2 = 5.8 nM
 K_i CB1/ K_i CB2 = 262

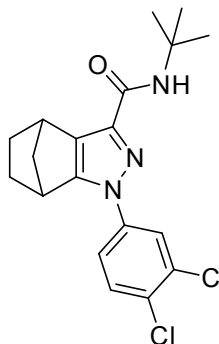
Cannabinoidi sintetici: pirazoli biciclici

Derivati biciclopirazolici sono stati sviluppati da molte industrie farmaceutiche come modulatori dei recettori cannabinergici. Tra i derivati che hanno suscitato maggiore interesse si riportano il composto **30** della Sanofi-Aventis e il suo analogo pontato **31**. Quest'ultimo è dotato di una spiccata affinità verso il recettore CB2 ($K_i = 0.61$ nM) e ha completato gli studi clinici di fase I in Europa per il trattamento di dolore neuropatico e osteoartritico⁶.



30⁶

EC₅₀ CB1 = 37 nM
EC₅₀ CB2 = 2.7 nM

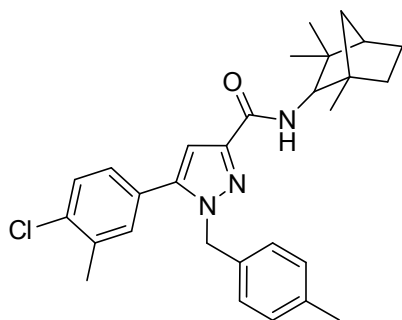


31⁶

EC₅₀ CB1 = 854 nM
EC₅₀ CB2 = 0.61 nM

Cannabinoidi sintetici: diarilpirazoli ed analoghi triciclici

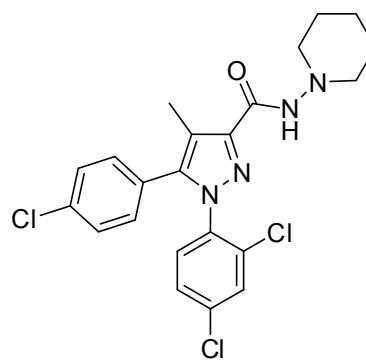
L'SR144528 (**32**)⁶⁷ della Sanofi-Aventis ha rappresentato il primo potente e selettivo antagonista CB2. Lo sviluppo di questo ligando ha contribuito notevolmente allo studio delle funzioni biologiche del recettore CB2. Un altro rappresentante di questa classe di composti è l'SR141716A (**33**)⁶⁸ (Rimonabant). Tale derivato è un agonista inverso del recettore CB1 introdotto sul mercato con il nome di Acomplia® nel 2006 come farmaco anoressizzante e ritirato dal commercio nel 2008 a causa dei suoi effetti collaterali quali depressione, ansia, agitazione psicomotoria, disturbi del sonno e ideazione suicida.



32

SR144528⁶⁷

K_iCB1 = 400 nM
K_iCB2 = 0.6 nM



33

SR141716A⁶⁸

K_iCB1 = 1.8 nM
K_iCB2 = 514 nM

In passato un gruppo di ricerca del Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università di Sassari ha riportato i risultati su sintesi ed attività cannabinergica di una serie di pirazoli triciclici (**34**, **35** e **36**)⁶⁹ sviluppati per irrigidimento della porzione

fenilpirazolica del Rimonabant. Alcuni di questi composti erano dotati di eccellenti potenze e selettività per i due sottotipi recettoriali CB1 e CB2 (Figura 18).

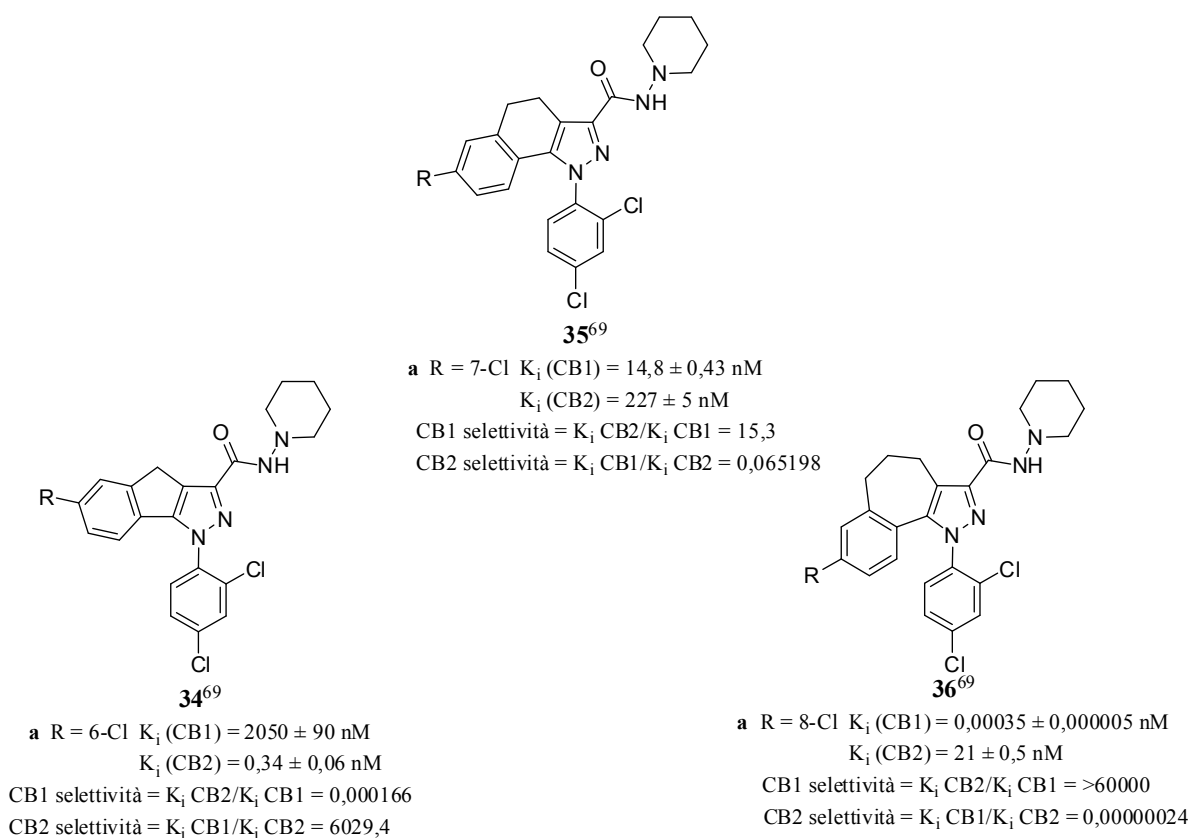


Figura 18. *Composti rappresentativi di tricyclopirazoli sintetizzati presso il Dipartimento di Chimica e Farmacia-Università degli Studi di Sassari: struttura ed affinità recettoriale.*

Inoltre alcuni di questi derivati avevano dimostrato un'interessante attività farmacologica in modelli di transito intestinale, come i derivati a struttura benzoindazolica **35** e cicloeptapirazolica **36**, ed in vitro in modelli di leucemia promielocitica umana, come i ligandi **34** caratterizzati dallo scheletro indenopirazolico.

Durante il corso di questi studi è stato osservato che la topografia del sistema tricyclico orientava l'attività biologica verso un particolare sottotipo recettoriale. Il composto **36a**, in cui gli anelli clorofenilico e pirazolico deviano in maniera significativa dalla planarità, esibiva notevoli attività e selettività verso il recettore CB1. Tali proprietà, seppur in misura ridotta, venivano conservate dal derivato **35a** in cui il ponte dimetilenico costringe i due anelli sopra riportati in disposizione quasi planare. Il composto **34a**, dotato di un sistema tricyclico completamente planare, si rivelava un potente e selettivo ligando per il recettore CB2.

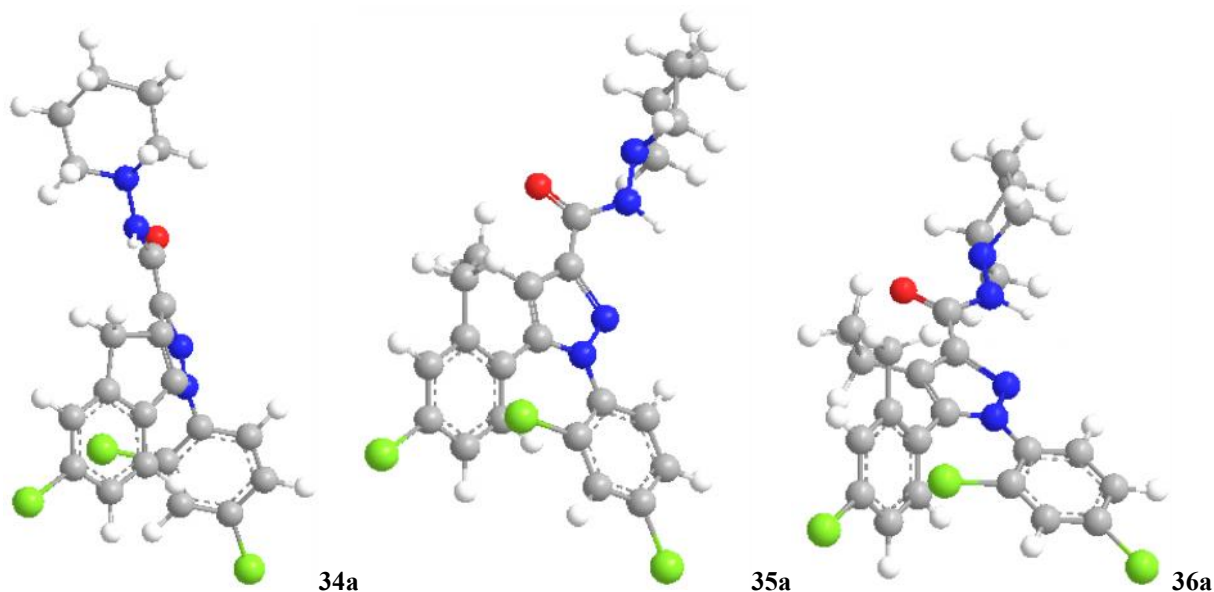
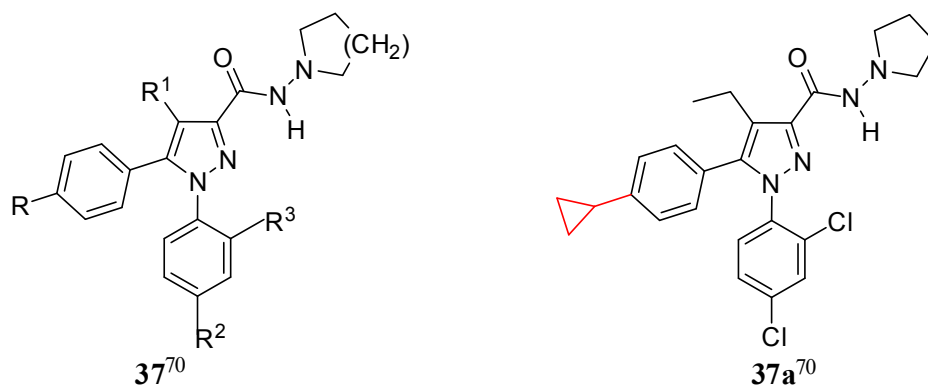


Figura 19: *Struttura tridimensionale a sfera e bastoncini dei pirazoli triciclici 34a, 35a e 36a.*

In un ulteriore sforzo volto all'individuazione di nuovi pirazoli triciclici dotati di spiccate caratteristiche cannabinergiche si è ritenuto utile esplorare l'effetto della sostituzione dell'anello benzenico dello scaffold triciclico con gruppi ciclo alchilici, in particolar modo ciclopropilico. Questo elemento strutturale si ritrova comunemente in composti biologicamente attivi per via delle sue uniche proprietà geometriche ed elettroniche. Inoltre i pendagli ciclopropilici sono generalmente più stabili nei confronti dell'ossidazione microsomiale rispetto ad altri gruppi alifatici.

L'ipotesi di un possibile efficace ruolo di carbocicli nello sviluppo farmacologico è supportata da un recente studio volto alla sintesi e alla valutazione biologica di diarilpirazoli analoghi del Rimonabant contenenti cicloalchili (ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile e cicloesile) (**37**, Figura 20)⁷⁰ come nuovi antagonisti CB1 con significativi effetti antiobesità in modelli animali. Tra questi analoghi il composto **37a** ha mostrato una buona affinità verso il recettore CB1 accompagnata ad una notevole stabilità metabolica ed ad un ottimo profilo farmacologico in modelli animale di obesità.



R= ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, cicloesile

R₁= H, Me, Et, MeO

R₂= Cl, F, H, Br

R₃= Cl, F, H

n= 1,2

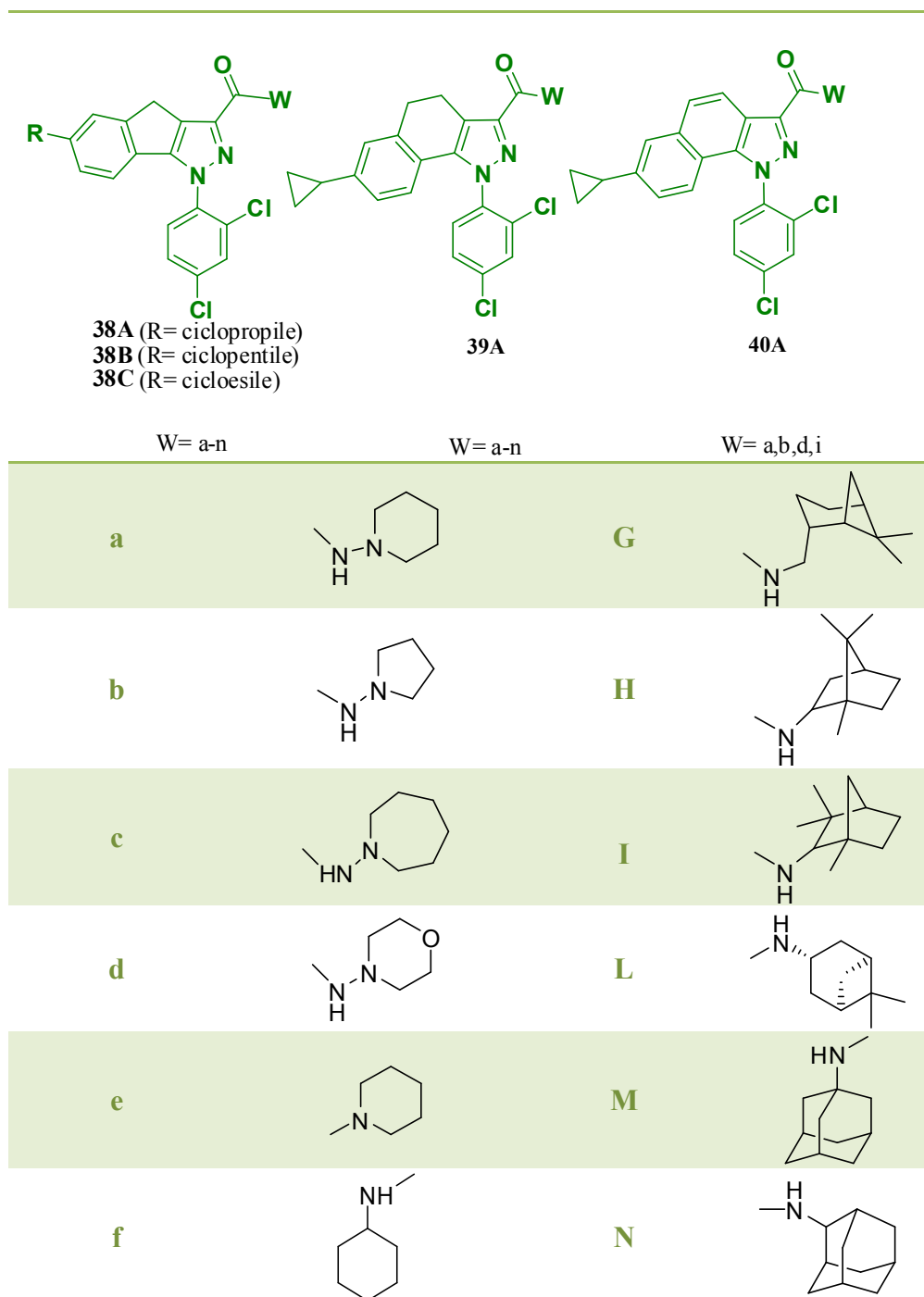
$K_i\text{CBI} = 4 \pm 0,2 \text{ nM}$

Figura 20: *Cicloalchilcongeneri del Rimonabant.*

Pertanto i derivati **34a** e **35a** (Figura 18) ed il composto **37a** (Figura 20) sono stati assunti come prototipi per la progettazione di nuovi derivati triciclopirazolici sostituiti sulla porzione benzenica dello scaffold triciclico con gruppi cicloalchilici al fine di studiare l'effetto di sostituenti carbociclici a diverso ingombro sterico sul profilo farmacobiologico. Tali presupposti hanno costituito il razionale sul quale si è basato il lavoro sperimentale di questa tesi di dottorato.

Lo sviluppo del progetto ha previsto in una prima fase la sintesi di nuovi composti indenopirazolici **38Aa-n**, **38Ba-n** e **38Ca-n** e benzoindazolici **39Aa-n** contenenti un ciclopropile, un ciclopentile o un cicloesile e recanti sulla funzione carbamoilica ammine diversamente ingombrate. In questo contesto sono stati sintetizzati anche i composti a maggior grado d'insaturazione di **39A**, i derivati *1H*-benzo[g]indazolici **40Aa,b,d,i** di conformazione planare. E' infatti noto che i termini coplanari di pirazoli triciclici preferiscano interagire con i recettori CB2 come dimostrato per i derivati indenopirazolici. Le cinque serie di composti sintetizzati sono illustrate in Tabella 2. In un secondo momento è stato delineato il profilo di binding di alcuni composti sintetizzati al fine di acquisire nuove informazioni dal punto di vista delle correlazioni struttura-attività sui pirazoli triciclici.

Tabella 2: *Composti sintetizzati a struttura triciclopirazolica.*

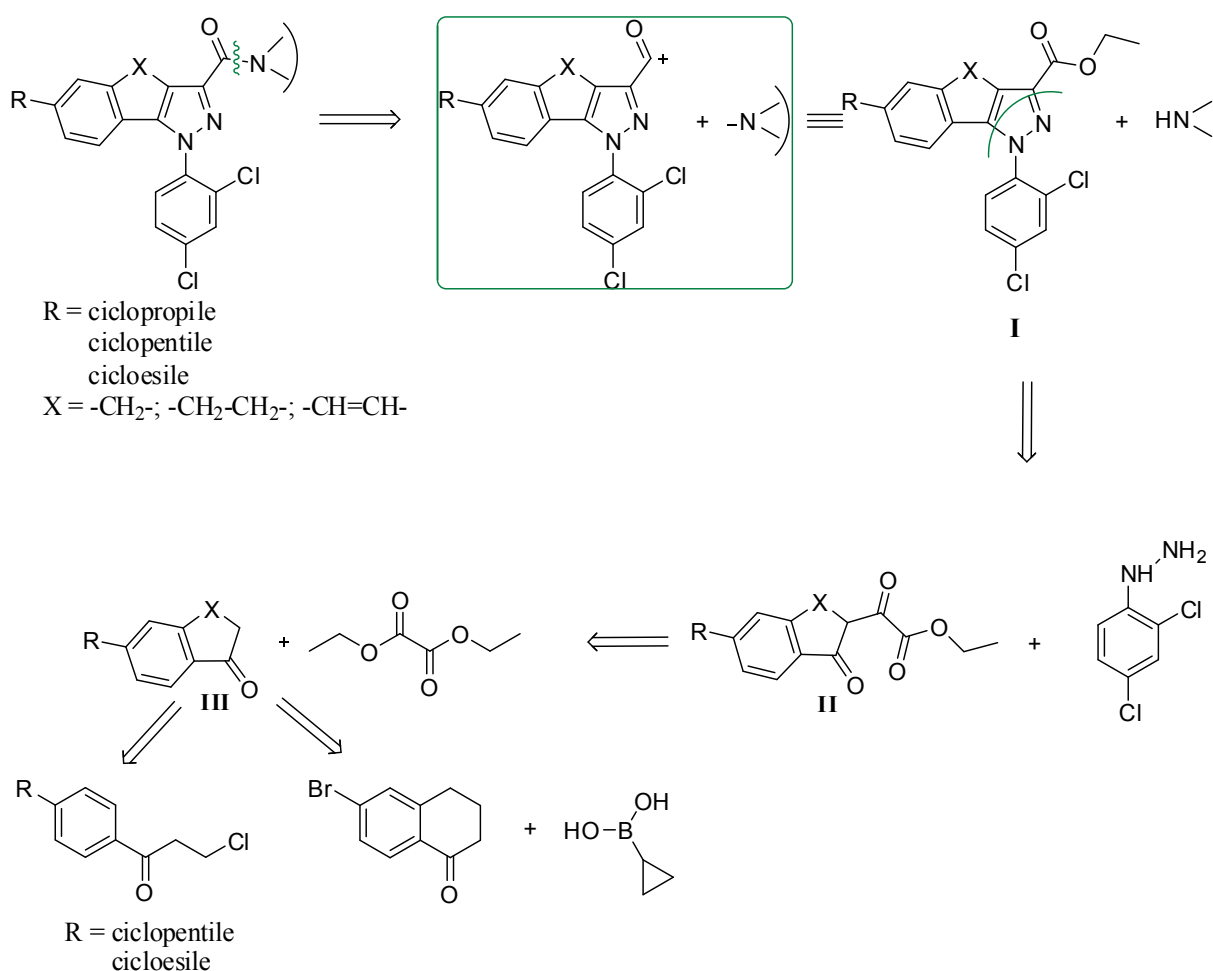


I nuovi composti sono designati da un gruppo di tre caratteri topografici: il primo (**38**, **39** e **40**) indica lo scheletro ed il livello di ossidazione del sistema triciclico; il secondo (**A**, **B** e **C**) indica il tipo di sostituente cicloalchilico presente sull'anello aromatico del triciclo; il terzo (**a**, **b**, **c**, etc) si riferisce alla specifica funzione carbamoilica presente.

CHIMICA

L'analisi retrosintetica dei prodotti progettati inizia con la disconnessione del legame ammidico della funzione carbamoilica in C₃ fornendo i sintoni acilio i cui equivalenti sintetici sono rappresentati dagli esteri **I**. Gli esteri **I** possono essere a loro volta ottenuti dagli appropriati β-dichetoesteri **II** per reazione di condensazione con diclorofenilidrazina. Una reazione di Claisen, come in precedenza sperimentato, è stata individuata per costruire i β-dichetoesteri **II**, intermedi chiave del processo sintetico, a partire dai necessari indanoni e benzociclanoni **III**. Infine la preparazione dei chetoni **III** sarebbe stata realizzata attraverso una reazione di Suzuki palladio-catalizzata di un bromoindanone o di un bromobenzociclanone con acido ciclopropilboronico o in alternativa tramite una reazione di acilazione di Friedel-Craft dell'opportuno alchilbenzene con 3-cloropropionilcloruro (Schema 1).

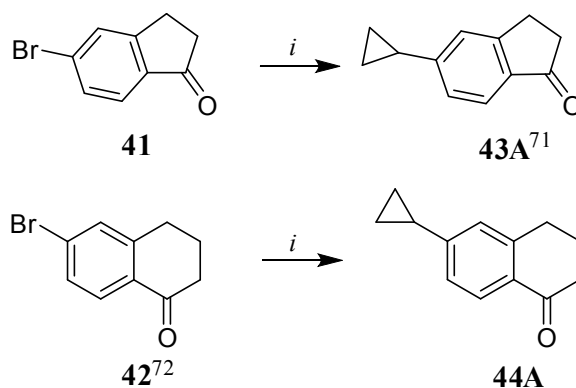
Schema 1



Schema retrosintetico dei prodotti **38Aa-n**, **38Ba-n**, **38Ca-n**, **39Aa-n** e **40Aa,b,d,i**.

Il 5-ciclopropilindanone **43A**⁷¹ e il 6-ciclopropilbenzociclanone **44A** sono stati facilmente preparati rispettivamente dal 5-bromoindanone **41** e 6-bromotetralone **42**⁷² nelle tipiche condizioni di reazione di Suzuki in presenza di fosfato di potassio come base, tricicloesilfosfina come ligando e palladio diacetato come catalizzatore con rese fra il 62% e 65% (Schema 2).

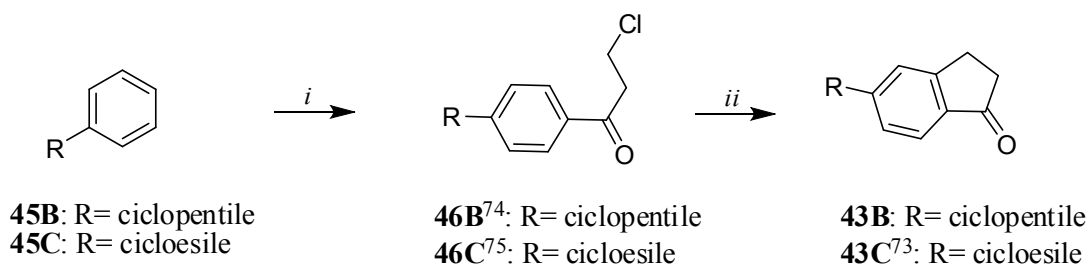
Schema 2



Reagenti e condizioni: *i*) $C_3H_5B(OH)_2$, K_3PO_4 , $P(C_6H_{11})_3$, $Pd(CH_3COO)_2$, toluene, H_2O , 100 °C, 4 ore.

Alternativamente il residuo sull'indanone può anche essere un ciclopentile (**43B**) o un cicloesile (**43C**). Una pratica sintesi dei chetoni **43B** e **43C**⁷³ utilizza una sequenza a due stadi di reazioni standard: l'iniziale acilazione di Friedel-Craft a cloropropionil derivato (**46B**⁷⁴ e **46C**⁷⁵) e la successiva ciclizzazione a dare i desiderati chetoni (Schema 3).

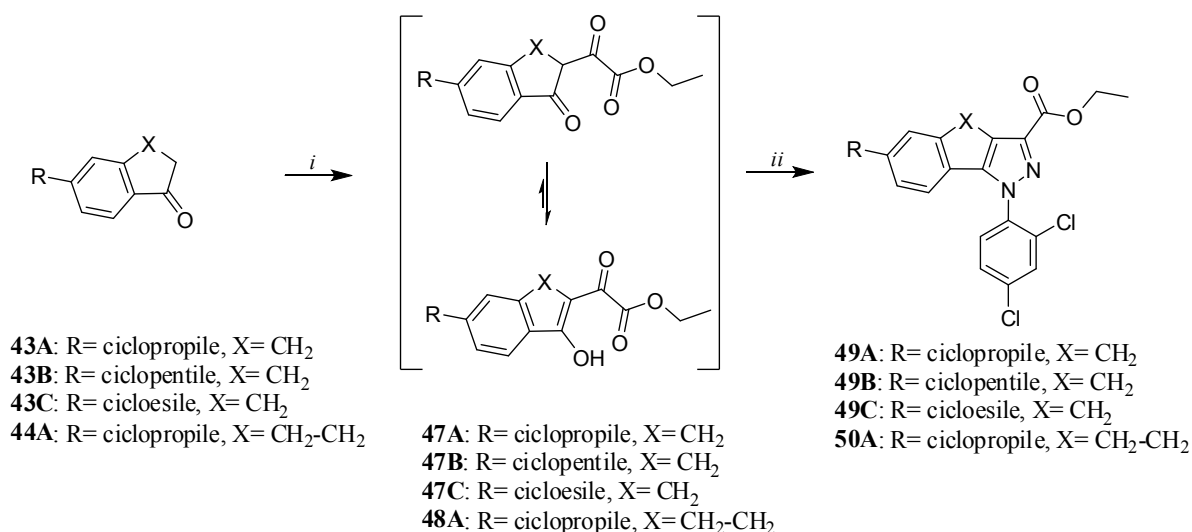
Schema 3



Reagenti e condizioni: *i*) $ClCH_2CH_2COCl$, $AlCl_3$, DCM, temperatura ambiente, 5 ore; H_2SO_4 concentrato, 90 °C, 90 minuti.

Gli 1,3-dichetoesteri **47A**, **47B**, **47C** e **48A**, come equilibrio tautomerico spostato verso la forma enolica, sono stati preparati facendo reagire gli opportuni chetoni **43A**, **43B**, **43C** e **44A** secondo Claisen in etanolo assoluto in presenza di sodio etossido prodotto in situ e dietilossalato. La formazione del tautomero enolico è stata evidenziata attraverso l'analisi degli spettri $^1\text{H-NMR}$, in cui non compare il segnale relativo al protone in α ai due carbonili chetonici, e $^{13}\text{C-NMR}$ APT (Attached Proton Test) che evidenzia come il C-2 sia un carbonio quaternario con valori di chemical shift δ_{C} 116.91, δ_{C} 116.94, δ_{C} 116.98, δ_{C} 108.92 rispettivamente per **47A**, **47B**, **47C** e **48A**. I β -dichetoesteri intermedi sono stati ciclizzati con la 2,4-diclorofenilidrazina a dare, con rese comprese fra l'85% e il 97%, i corrispondenti pirazolesteri **49A**, **49B**, **49C** e **50A** (Schema 4).

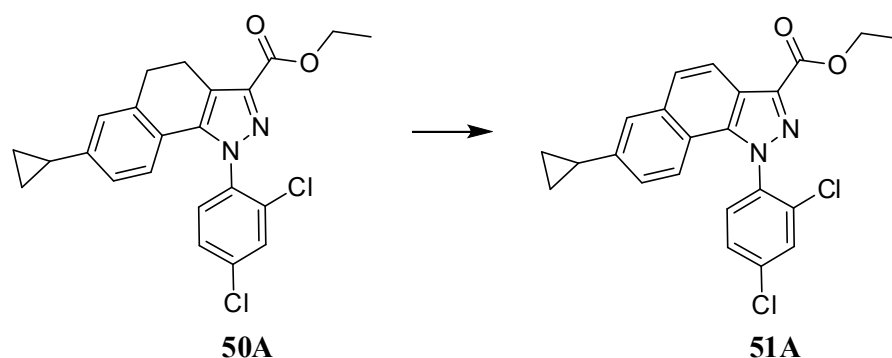
Schema 4



Reagenti e condizioni: i) Na^o, EtOH, (COOEt)₂, temperatura ambiente, 5 ore; ii) 2,4-Cl₂-C₆H₃-NH₂NH₂ HCl, EtOH, 80 °C, 24 ore.

Il pirazolo triciclico **51A** è stato ottenuto a partire dal pirazoloestere **50A** per reazione di ossidazione di quest'ultimo con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzochinone (DDQ) (Schema 5).

Schema 5

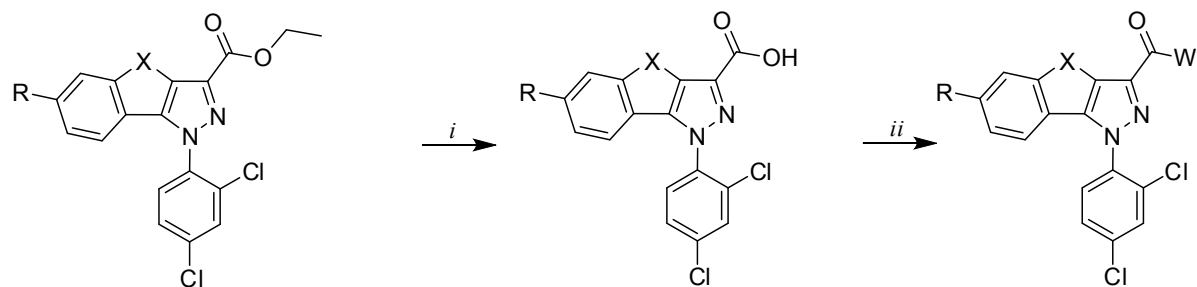


Reagenti e condizioni: DDQ, DCM, 30 °C, 12 ore.

La struttura di **51A** è stata delucidata attraverso lo spettro ^1H NMR in cui è possibile distinguere otto protoni nella regione aromatica rappresentati da un singoletto (δ_{H} 7.68), un doppietto (δ_{H} 7.58) ed un doppietto di doppietti (δ_{H} 7.51) relativi alla porzione diclorofenilica, un singoletto (δ_{H} 7.67), un doppietto (δ_{H} 7.19) ed un doppio doppietto (δ_{H} 7.08) riconducibili all'anello benzenico e quindi due doppietti (δ_{H} 8.24 e δ_{H} 7.64) perfettamente compatibili con i due nuovi protoni aromatici del ponte etilenico. Nella regione alifatica si osservano il quartetto (δ_{H} 4.57) ed il tripletto (δ_{H} 1.51) della funzione esterea ed i tre multipletti (δ_{H} 2.00-2.08, δ_{H} 1.02-1.08, δ_{H} 0.76-0.82) dell'anello ciclopropilico. Inoltre, ad ulteriore conferma dell'avvenuta ossidazione, nello spettro ^{13}C NMR si possono distinguere otto segnali relativi agli otto carboni di tipo metinico aromatico (δ_{C} 119.73, δ_{C} 120.71, δ_{C} 125.05, δ_{C} 125.36, δ_{C} 125.50, δ_{C} 128.41, δ_{C} 130.50, δ_{C} 131.07).

Gli esteri **49A**, **49B**, **49C**, **50A** e **51A** sono stati idrolizzati ad acidi carbossilici **52A**, **52B**, **52C**, **53A** e **54A** per reazione con idrossido di potassio in etanolo. Gli acidi, previa attivazione a cloruri acilici con cloruro di tionile in toluene, sono stati sottoposti a reazione di coupling con l'opportuna ammina o idrazina in presenza di trietilammina così da ottenere gli attesi prodotti finali **38Aa-n**, **38Ba-n**, **38Ca-n**, **39Aa-n** e **40Aa,b,d,i** (Schema 6).

Schema 6



49A: R= ciclopropile, X= CH₂

49B: R= ciclopentile, X= CH₂

49C: R= cicloesile, X= CH₂

50A: R= ciclopropile, X= CH₂-CH₂

51A: R= ciclopropile, X= CH=CH

52A: R= ciclopropile, X= CH₂

52B: R= ciclopentile, X= CH₂

52C: R= cicloesile, X= CH₂

53A: R= ciclopropile, X= CH₂-CH₂

54A: R= ciclopropile, X= CH=CH

38Aa-n

38Ba-n

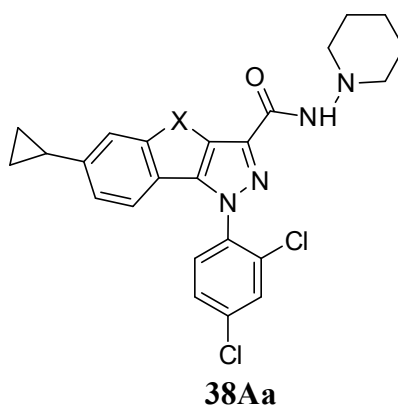
38Ca-n

39Aa-n

40Aa,b,d,i

Reagenti e condizioni: i) KOH, EtOH, 80 °C, 2 ore; ii) a: SOCl₂, toluene, 110 °C, 5 ore; b: ammina/idrazina, Et₃N, DCM, temperatura ambiente, 12 ore.

Le strutture di tutti i prodotti finali sono state delucidate attraverso gli spettri ¹H NMR e ¹³C NMR con l'ausilio dell'esperimento 2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence). A titolo d'esempio è stato riportato lo spettro bidimensionale del composto **38Aa**.



38Aa

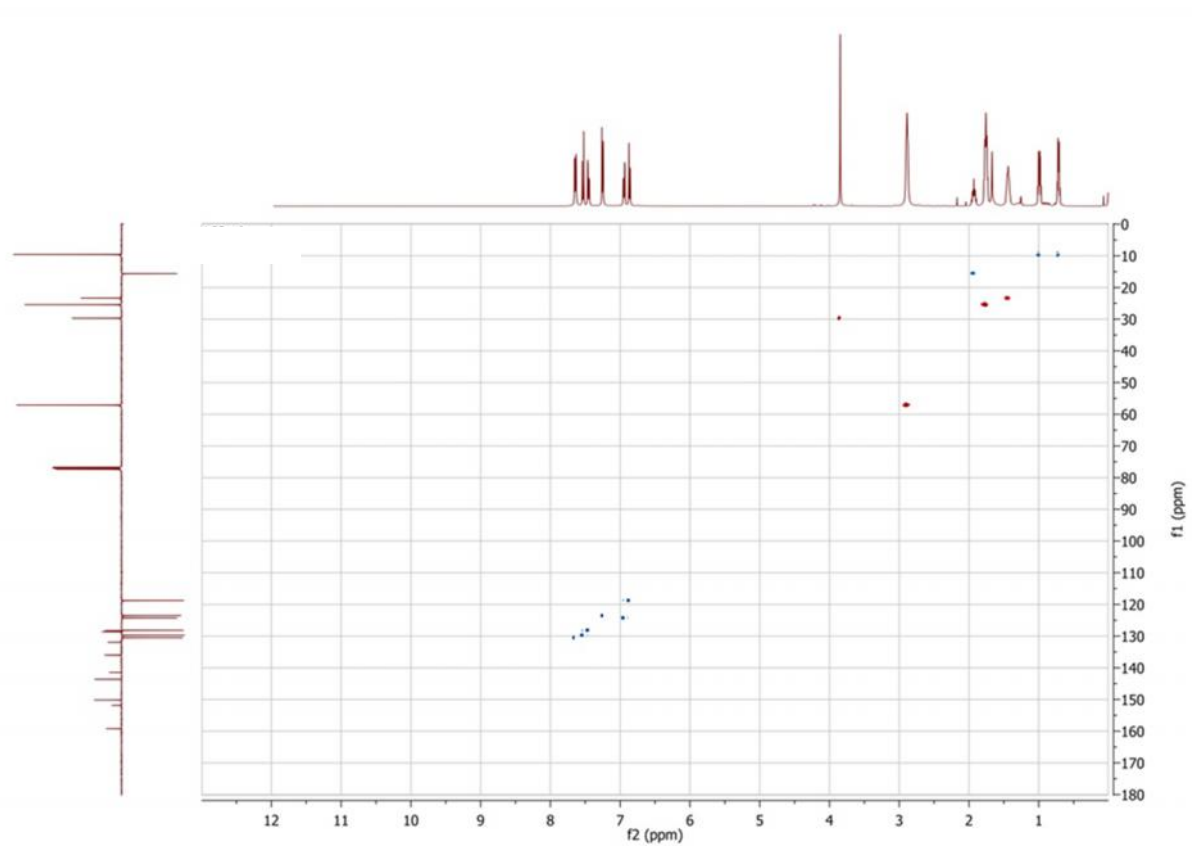


Figura 20: Spettro bidimensionale del derivato **38Aa**.

BIOLOGIA

I saggi di binding e di attività intrinseca dei composti finali sono stati eseguiti dalla scrivente presso il Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid nei laboratori del Prof. Javier Fernandez-Ruiz.

L'affinità dei composti per i recettori cannabinergici CB1 e CB2 è stata valutata attraverso membrane che esprimono solo uno dei due recettori cannabinoidei. Tali saggi si basano sulla competizione per l'occupazione del recettore tra il CP-55940 (**16**) marcato radioattivamente con ^3H ed i nuovi ligandi.

Inizialmente è stato fatto uno screening primario usando un'unica concentrazione saturante di $40\mu\text{M}$ del composto da analizzare ed il CP-55940 marcato con ^3H . Con questa prova preliminare è stata misurata l'affinità dei composti analizzati verso il recettore espressa in termini di percentuale di unione. Solo i prodotti che hanno esibito una percentuale di unione maggiore del 60% sono stati sottoposti ad uno screening secondario in quanto è stato osservato che i ligandi con un'affinità inferiore non forniscono una K_i al di sotto del range delle micromoli e sono pertanto farmacologicamente poco interessanti.

Lo screening secondario consiste in un saggio di competizione fra il composto in esame a differenti concentrazioni (da 10^{-5} a 10^{-11}M) ed il [^3H]CP-55940 così da ottenere una curva sigmoide della percentuale di spiazzamento del [^3H]CP-55940 esercitato dal nuovo ligando in funzione della sua concentrazione.

Da questa curva è possibile estrapolare il valore dell K_i dei nuovi ligandi. I dati sperimentali ottenuti dagli esperimenti di binding, sia dalle curve di saturazione che da quelle di competizione sono stati analizzati con il programma GraphPad Prism 5.

I composti con valori di K_i inferiori a 100nM sono stati saggiati su cellule microgliali al fine di determinare l'attività intrinseca. Tali colture cellulari sono state esposte all'azione del lipopolisaccaride batterico in modo da innescare una reazione neuroinfiammatoria. L'attività di agonismo, antagonismo o agonismo inverso dei composti in esame è stata determinata in base all'effetto che essi esplicano sulla quantità di prostaglandina E2 prodotta dalle cellule. La concentrazione di PGE2 è stata misurata attraverso un saggio immunoenzimatico competitivo. I risultati sono stati analizzati attraverso il software GraphPad Prism 5.

PARTE SPERIMENTALE

CHIMICA

Procedure generali.

I punti di fusione sono stati determinati con l'apparecchio Kopfler e non sono stati corretti.

Per la cromatografia su strato sottile sono state utilizzate lastre di gel di silice del tipo Poligram® SIL N-HR/HV254 e SIL G-25 UV254.

I composti sono stati purificati sgranandoli con opportuni solventi o per flash cromatografia (FC) su gel di silice (SiO₂) Merck® 60 (230-400 mesh ASTM) o mediante Flash Master Personal (Biotage) utilizzando cartucce preimpaccate sottovuoto (SNAP cartridges, KP-SIL, 10-100 g, 20/cs), eluendo con appropriate miscele di solventi.

Gli spettri infrarossi (IR) degli oli sono stati registrati in film mentre quelli dei solidi in emulsione con nujol o in film da soluzioni cloroformiche su lenti di NaCl, utilizzando uno spettrofotometro Jasco FT/IR 460 plus e gli assorbimenti sono stati indicati in numeri d'onda ν (cm⁻¹).

Nelle reazioni con microonde è stato utilizzato il sintetizzatore Microwave Initiator Eight (Biotage) versione software 2,5.

Gli spettri ¹H-NMR e ¹³C-NMR APT sono stati registrati a temperatura ambiente con uno spettrofotometro tipo Bruker AVANCE III Nanoboy 400 MHz, usando come standard interno il TMS.

I chemical shifts sono stati espressi in unità δ o ppm e le costanti di accoppiamento J in Hz.

Le molteplicità sono state indicate come s (singoletto), bs (singoletto allargato), d (doppio), t (tripletto), dd (doppio doppietto), q (quadrupletto), m (multipletto). I dati spettroscopici concordano con le strutture attribuite.

I poteri rotatori sono stati determinati con il Polarimeter 241 (Perkin Elmer, Germany).

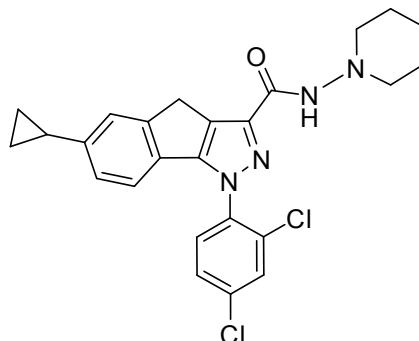
Tutte le reazioni che impiegavano reagenti sensibili all'aria o all'umidità sono state eseguite in atmosfera inerte di azoto o di argon.

Tutti i materiali, i solventi e i reagenti necessari per la preparazione dei composti finali sono stati acquistati da fornitori specializzati; gli intermedi **46B**⁷⁶, **46C**⁷⁷ e **43C**⁷³ sono stati preparati secondo quanto descritto in letteratura.

Metodo generale per la preparazione delle carbossammidi 38Aa-n, 38Ba-n, 38Ca-n, 39Aa-n e 40Aa,b,e,i.

Ad una sospensione dell'acido **52A**, **52B**, **52C**, **53A**, **54A** (0.469 mmol) in toluene (3 mL) è stato aggiunto il cloruro di tionile (1.408 mmol, 0.103 mL) ed il tutto è stato fatto refluire a 110 °C per tre ore. La soluzione ottenuta è stata concentrata a pressione ridotta ed il residuo ripreso più volte con toluene per allontanare il cloruro di tionile in eccesso. Il residuo è stato disciolto in diclorometano (3 mL) e alla soluzione, raffreddata con un bagno di ghiaccio, sono state aggiunte l'opportuna ammina o idrazina (0.704 mmol) e la trietilammina (0.704 mmol, 0.098 mL). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 12 ore. La soluzione è stata quindi lavata con una soluzione satura di NaCl e la fase organica seccata su Na₂SO₄ e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo così ottenuto è stato purificato per flash cromatografia per dare le ammidi desiderate.

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(piperidin-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Aa)



Solido marroncino. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 7:3).

Resa: 52.7%.

Rf: 0.21 (etere di petrolio/acetato di etile 7:3).

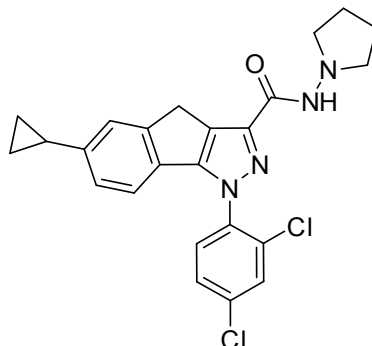
P.f.: 214-216 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.69-0.74 (m, 2H), 0.96-1.02 (m, 2H), 1.39-1.48 (m, 2H), 1.71-1.80 (m, 4H), 1.89-1.99 (m, 1H), 2.84-2.93 (m, 4H), 3.85 (s, 2H), 6.87 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.94 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.25 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.53 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.63 (s, 1H, NH scambia con D₂O), 7.65 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.58 (CH₂ x2), 15.64 (CH), 23.35 (CH₂), 25.42 (CH₂ x2), 29.69 (CH₂), 57.10 (CH₂ x2), 118.77 (CH), 123.52 (CH), 124.27 (CH), 128.18 (CH), 128.29 (C), 128.61 (C), 129.72 (CH), 130.51 (CH), 131.93 (C), 135.98 (C), 136.04 (C), 141.46 (C), 143.62 (C), 150.16 (C), 151.84 (C), 159.22 (C).

IR (cm⁻¹): 1679 (C=O), 3315 (NH).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(pirrolidin-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ab)



Solido marroncino. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

Resa: 34%.

Rf: 0.21 (etere di petrolio/acetato di etile 7:3).

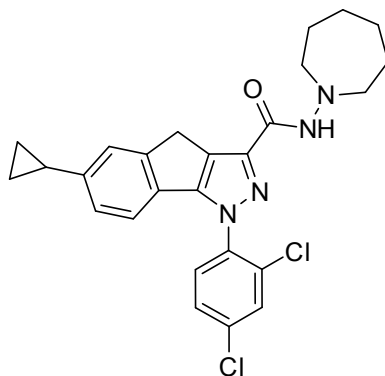
P.f.: 202-204 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.69-0.74 (m, 2H), 0.96-1.02 (m, 2H), 1.87-1.97 (m, 5H), 3.00-3.07 (m, 4H), 3.86 (s, 2H), 6.86 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.94 (dd, 1H, J_o=7.2 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.25 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.53 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.62 (s, 1H, NH scambia con D₂O), 7.65 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.58 (CH₂ x2), 15.64 (CH), 22.33 (CH₂ x2), 29.72 (CH₂), 55.48 (CH₂ x2), 118.76 (CH), 123.55 (CH), 124.26 (CH), 128.14 (C), 128.18 (CH), 128.57 (C), 129.72 (CH), 130.51 (CH), 131.96 (C), 136.01 (C x2), 141.33 (C), 143.65 (C), 150.15 (C), 151.87 (C), 160.11 (C).

IR (cm⁻¹): 1660 (C=O), 3311 (NH).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(omopiperidin-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ac)



Solido color pesca. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 8:2).

Resa: 50.8%.

Rf: 0.26 (etere di petrolio/acetato di etile 8:2).

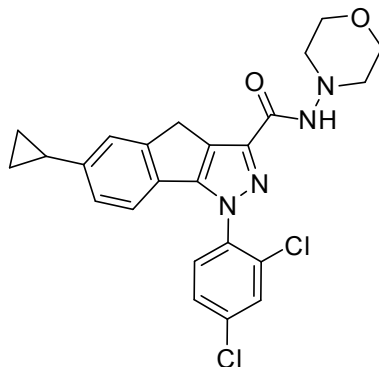
P.f.: 183-187 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.70-0.74 (m, 2H), 0.97-1.01 (m, 2H), 1.60-1.80 (m, 8H), 1.88-1.96 (m, 1H), 3.18 (t, 4H, J=5.6 Hz), 3.85 (s, 2H), 6.87 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 6.94 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.25 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.53 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2 Hz), 8.08 (s, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.57 (CH₂ x2), 15.64 (CH), 26.41 (CH₂ x2), 27.05 (CH₂ x2), 29.68 (CH₂), 58.31 (CH₂ x2), 118.76 (CH), 123.53 (CH), 124.28 (CH), 128.16 (CH), 128.19 (C), 128.63 (C), 129.70 (CH), 130.50 (CH), 131.91 (C), 135.94 (C), 136.06 (C), 141.49 (C), 143.59 (C), 150.15 (C), 151.80 (C), 159.60 (C).

IR (cm⁻¹): 1678 (C=O), 3402 (NH).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(morfolin-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ad)



Solido marroncino. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 55:45).

Resa: 46.5%.

Rf: 0.23 (etere di petrolio/acetato di etile 55:45).

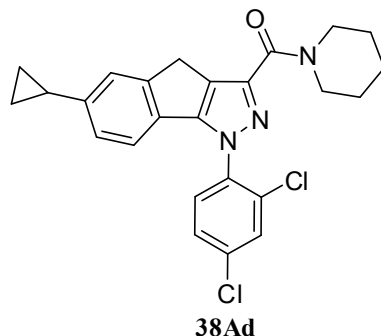
P.f.: 181-183 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.67-0.76 (m, 2H), 0.96-1.04 (m, 2H), 1.89-1.94 (m, 1H), 2.98 (t, 4H, J=4.4 Hz), 3.85 (s, 2H), 3.87 (t, 4H, J=4.4 Hz), 6.87 (d, 1H, J_o=8 Hz), 6.95 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 7.25 (s, 1H), 7.46 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2 Hz), 7.53 (d, 1H, J_o=8 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2 Hz), 7.70 (s, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.61 (CH₂ x2), 15.65 (CH), 29.66 (CH₂), 56.05 (CH₂ x2), 66.51 (CH₂ x2), 118.80 (CH), 123.54 (CH), 123.33 (CH), 128.23 (CH), 128.27 (C), 128.51 (C), 129.69 (CH), 130.55 (CH), 131.95 (C), 135.94 (C), 136.12 (C), 141.10 (C), 143.76 (C), 150.09 (C), 151.99 (C), 159.44 (C).

IR (cm⁻¹): 1674 (C=O), 3418 (NH).

(6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazol-3-il)(piperidin-1-il)metanone (38Ae)



Solido color salmone. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile (85:15)).

Resa: 53.2%.

Rf: 0.11 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

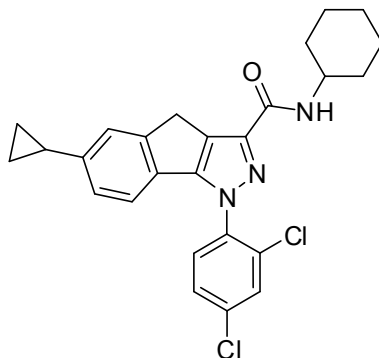
P.f.: 170-172 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.69-0.74 (m, 2H), 0.96-1.02 (m, 2H), 1.60-1.75 (m, 6H), 1.89-1.97 (m, 1H), 3.75 (bs, 2H), 3.77 (s, 2H), 4.01 (bs, 2H), 6.90 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 6.95 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 7.23 (s, 1H), 7.43 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.52 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.63 (d, 1H, J_m=2 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.52 (CH₂ x2), 15.63 (CH), 24.77 (CH₂), 25.77 (CH₂), 26.83 (CH₂), 29.75 (CH₂), 43.59 (CH₂), 48.12 (CH₂), 118.71 (CH), 123.47 (CH), 124.25 (CH), 128.05 (CH), 128.78 (C), 129.12 (C), 129.60 (CH), 130.51 (CH), 131.84 (C), 135.56 (C), 136.24 (C), 142.83 (C), 143.31 (C), 149.89 (C), 150.57 (C), 162.38 (C).

IR (cm⁻¹): 1616 (C=O).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(cicloesil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Af)



Solido marroncino. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 43.0%.

Rf: 0.20 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

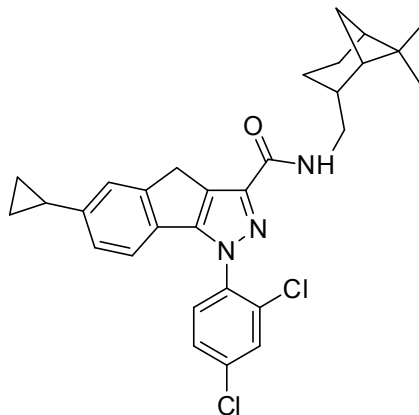
P.f.: 116-119 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.60-0.69 (m, 2H), 0.90-0.96 (m, 2H), 1.22-1.30 (m, 2H), 1.34-1.48 (m, 2H), 1.58-1.68 (m, 2H), 1.71-1.81 (m, 2H), 1.75-1.83 (m, 1H), 1.99-2.08 (m, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.93-4.03 (m, 1H), 6.80 (d, 1H, J=8 Hz, NH scambia con D₂O), 6.87 (d, 1H, J_o=8 Hz), 6.96 (dd, 1H, J_o=7.2 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.25 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2 Hz), 7.54 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.55 (CH₂ x2), 15.64 (CH), 25.00 (CH₂ x2), 25.60 (CH₂), 29.70 (CH₂), 33.21 (CH₂ x2), 48.11 (CH), 118.74 (CH), 123.52 (CH), 124.28 (CH), 127.80 (C), 128.17 (CH), 128.73 (C), 129.77 (CH), 130.48 (CH), 131.97 (C), 135.93 (C), 136.12 (C), 142.30 (C), 143.52 (C), 150.15 (C), 151.94 (C), 161.04 (C).

IR (cm⁻¹): 1621 (C=O), 3382 (NH).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(mirtanil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ag)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1)

Resa: 38.1%.

Rf: 0.39 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 210-212 °C.

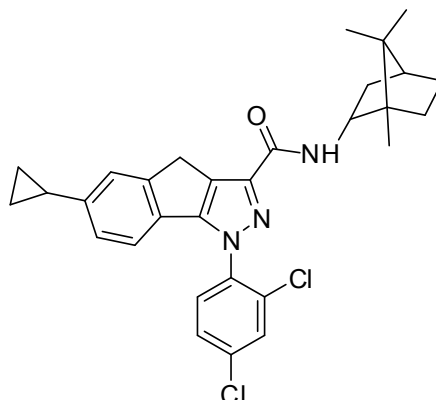
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.69-0.75 (m, 2H), 0.90 (d, 1H, J=9.6 Hz), 0.96-1.02 (m, 2H), 1.09 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.82-2.04 (m, 7H), 2.27-2.40 (m, 2H), 3.35-3.55 (m, 2H), 3.85 (s, 2H), 6.87 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 6.91-6.97 (m, 2H, NH scambia con D₂O), 7.25 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2 Hz), 7.53 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.56 (CH₂ x2), 15.64 (CH₃), 19.89 (CH₂), 23.24 (CH₃), 26.05 (CH₂), 28.00 (CH), 29.70 (CH₂), 33.31 (CH₂), 38.73 (C), 41.40 (CH), 41.55 (CH), 43.85 (CH), 44.76 (CH₂), 118.73 (CH), 123.54 (CH), 124.29 (CH), 127.71 (C), 128.16 (CH), 128.70 (C), 129.71 (CH), 130.51 (CH), 131.97 (C), 135.94 (C), 136.10 (C), 142.15 (C), 143.54 (C), 150.13 (C), 151.95 (C), 161.93 (C).

IR (cm⁻¹): 1662 (C=O), 3419 (NH).

[α_D]: -0.36° (CHCl₃, c = 0.084 g/100mL, t = 30 °C).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(bornil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ah)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 68.5%.

Rf: 0.34 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 125-128 °C.

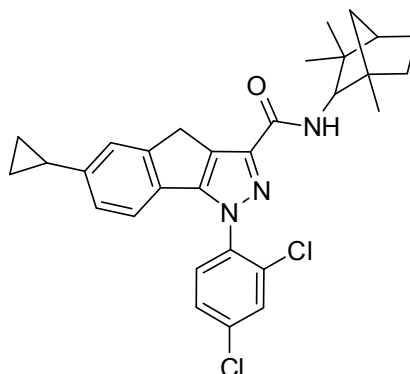
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.68-0.73 (m, 2H), 0.85-0.88 (m, 2H), 0.91 (d, 6H, J=4.8 Hz), 0.93-0.98 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 1.20-1.30 (d, 2H), 1.66-1.72 (m, 2H), 1.89-1.97 (m, 1H), 2.37-2.47 (m, 1H), 3.84 (s, 2H), 4.43-4.51 (m, 1H), 6.88 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 6.93-6.98 (m, 2H, NH scambia con D₂O), 7.25 (s, 1H), 7.46 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2 Hz), 7.56 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.54 (CH₂ x2), 13.87 (CH₃), 15.64 (CH₃), 18.68 (CH₃), 19.88 (CH), 28.11 (CH₂), 28.41 (CH₂), 29.70 (CH₂), 37.48 (CH₂), 45.00 (CH), 48.23 (C), 49.73 (C), 53.59 (CH), 118.75 (CH), 123.51 (CH), 124.28 (CH), 127.77 (C), 128.14 (CH), 128.78 (C), 129.84 (CH), 130.47 (CH), 131.94 (C), 135.88 (C), 136.17 (C), 142.21 (C), 143.48 (C), 150.15 (C), 151.92 (C), 162.10 (C).

IR (cm⁻¹): 1662 (C=O), 3412 (NH).

[α_D]: -0.23° (CHCl₃, c = 0.086 g/100mL, t = 30 °C).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(fenchil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ai)



Solido arancione. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 63%.

Rf: 0.35 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 118-120 °C.

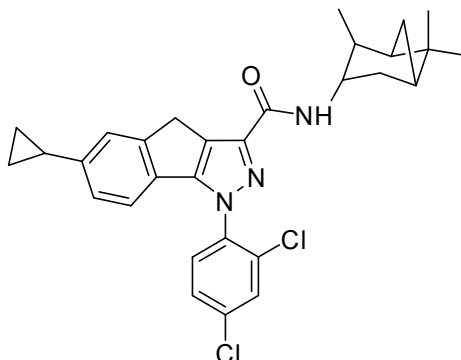
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.69-0.76 (m, 2H), 0.82-0.87 (m, 2H), 0.88 (s, 3H), 0.95-1.02 (m, 2H), 1.12 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.37-1.54 (m, 2H), 1.67-1.75 (m, 2H), 1.79 (bs, 1H), 1.89-1.97 (m, 1H), 3.82 (dd, 1H, J=8 Hz, J=1.6 Hz), 3.85 (s, 2H), 6.89 (d, 1H, J_o=8 Hz), 6.95 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.02 (d, 1H, J=9.6 Hz, NH scambia con D₂O), 7.25 (s, 1H), 7.46 (dd, 1H, J_o=6 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.56 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.54 (CH₂ x2), 15.64 (CH₃), 19.80 (CH₃), 21.33 (CH₃), 26.00 (CH₂), 27.35 (CH₂), 29.70 (CH₂), 30.97 (CH), 39.53 (CH₂), 42.75 (C), 48.20 (CH), 48.68 (C), 63.18 (CH), 118.74 (CH), 123.52 (CH), 124.23 (CH), 127.56 (C), 128.07 (CH), 128.81 (C), 129.74 (CH), 130.49 (CH), 131.87 (C), 135.73 (C), 136.22 (C), 142.14 (C), 143.41 (C), 150.13 (C), 151.85 (C), 162.55 (C).

IR (cm⁻¹): 1669 (C=O), 3452 (NH).

[α]_D: -0.52° (CHCl₃, c = 0.084 g/100mL, t = 30 °C).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(isopinocanfenil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38A1)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 27.0%.

Rf: 0.39 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 194-196 °C.

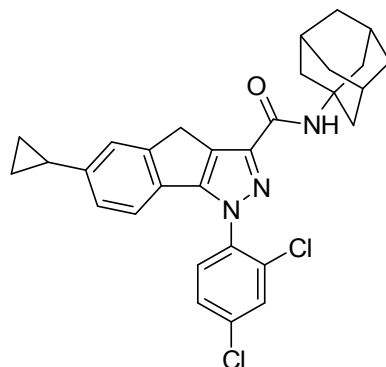
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.69-0.76 (m, 2H), 0.92-1.03 (m, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.18 (d, 3H, J=7.2 Hz), 1.25 (s, 3H), 1.66-1.75 (m, 1H), 1.83-2.02 (m, 4H), 2.38-2.46 (m, 1H), 2.63-2.74 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 4.48-4.59 (m, 1H), 6.80-6.89 (m, 2H), 6.95 (d, 1H, J_o=8 Hz), 7.48 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.56 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.6 Hz), 7.66 (s, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.56 (CH₂ x2), 15.65 (CH₃), 20.88 (CH₃), 23.38 (CH₃), 28.11 (CH), 29.72 (CH₂), 35.26 (CH₂), 37.07 (CH₂), 38.56 (C), 41.68 (CH), 45.93 (CH), 47.61 (CH), 47.90 (CH), 118.75 (CH), 123.53 (CH), 124.30 (CH), 127.89 (C), 128.19 (CH), 128.73 (C), 129.81 (CH), 130.49 (CH), 131.98 (C), 135.97 (C), 136.11 (C), 142.24 (C), 143.54 (C), 150.16 (C), 151.99 (C), 161.44 (C).

IR (cm⁻¹): 1660 (C=O), 3405 (NH).

[α_D]: -1.52° (CHCl₃, c = 0.084 g/100mL, t = 30 °C).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(adamantan-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Am)



Solido color argilla. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 95:5).

Resa: 57.6%.

Rf: 0.49 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

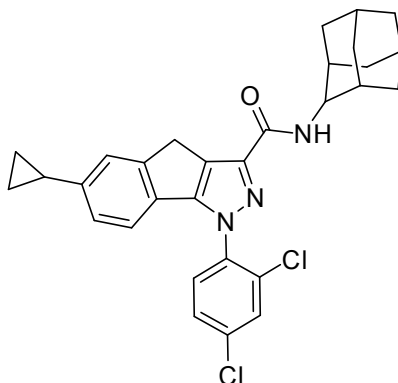
P.f.: 129-133 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.70-0.74 (m, 2H), 0.96-1.01 (m, 2H), 1.68-1.76 (m, 6H), 1.88-1.97 (m, 1H), 2.10-2.18 (m, 9H), 3.83 (s, 2H), 6.69 (s, 1H, NH scambia con D₂O), 6.86 (d, 1H, J_o=8 Hz), 6.94 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.24 (s, 1H), 7.44 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2 Hz), 7.53 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.64 (d, 1H, J_m=2 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.53 (CH₂ x2), 15.64 (CH), 29.53 (CH x3), 29.72 (CH₂), 36.43 (CH₂ x3), 41.74 (CH₂ x3), 51.99 (C), 118.72 (CH), 123.53 (CH), 124.26 (CH), 127.69 (C), 128.14 (CH), 128.77 (C), 129.81 (CH), 130.45 (CH), 131.94 (C), 135.87 (C), 136.13 (C), 142.98 (C), 143.45 (C), 150.20 (C), 151.98 (C), 161.78 (C).

IR (cm⁻¹): 1668 (C=O), 3396 (NH).

6-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(adamantan-2-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38An)



Solido marroncino. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 55.2%.

Rf: 0.28 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

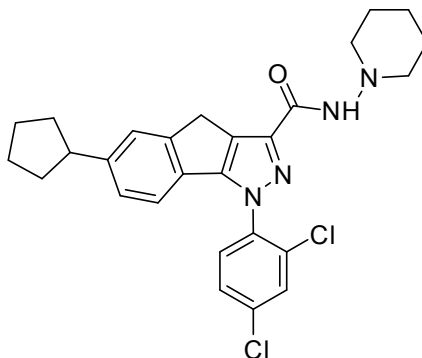
P.f.: 177-180 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.70-0.75 (m, 2H), 0.95-1.02 (m, 2H), 1.63-1.70 (m, 2H), 1.80 (s, 2H), 1.84-1.96 (m, 9H), 2.07 (s, 2H), 3.84 (s, 2H), 4.23-4.31 (m, 1H), 6.88 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 6.95 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 7.25 (s, 1H), 7.29 (d, 1H, J=8.4 Hz, NH scambia con D₂O), 7.45 (dd, 1H, J_o=6 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.56 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.54 (CH₂ x2), 15.63 (CH), 27.20 (CH), 27.30 (CH), 29.69 (CH₂), 30.01 (CH₂ x2), 32.10 (CH x2), 37.21 (CH₂ x2), 37.59 (CH₂), 53.15 (CH), 118.75 (CH), 123.50 (CH), 124.28 (CH), 127.73 (C), 128.10 (CH), 128.81 (C), 129.83 (CH), 130.44 (CH), 131.92 (C), 135.81 (C), 136.20 (C), 142.32 (C), 143.45 (C), 150.14 (C), 151.89 (C), 161.19 (C).

IR (cm⁻¹): 1666 (C=O), 3417 (NH).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(piperidin-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ba)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 75:25).

Resa: 59.6%.

Rf: 0.11 (etere di petrolio/acetato di etile 8:2).

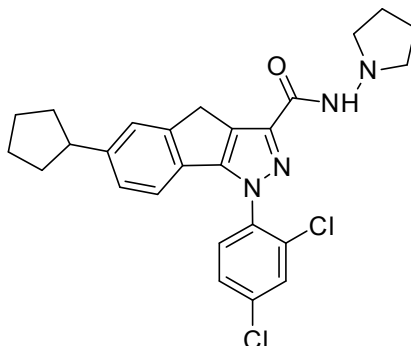
P.f.: 213-214 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.44 (bs, 2H), 1.65-1.86 (m, 10H), 2.03-2.12 (m, 2H), 2.89 (s, 4H), 2.97-3.07 (m, 1H), 3.87 (s, 2H), 6.90 (s, 1H, J_o=8 Hz), 7.10 (d, 1H, J_o= 7.6Hz), 7.43-7.48 (m, 2H), 7.52 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2.4 Hz), 7.66 (s, 1H, NH scambia con D₂O).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 23.32 (CH₂), 25.39 (CH₂ x2), 25.51 (CH₂ x2), 29.72 (CH₂), 34.76 (CH₂ x2), 46.06 (CH), 57.07 (CH₂ x2), 118.69 (CH), 125.10 (CH), 125.57 (CH), 128.13 (CH), 128.40 (C), 128.83 (C), 129.69 (CH), 130.48 (CH), 131.95 (C), 135.95 (C), 136.02 (C), 141.44 (C), 146.06 (C), 150.04 (C), 151.86 (C), 159.20 (C).

IR (cm⁻¹): 1668 (C=O), 3341 (NH).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(pirrolidin-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Bb)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

Resa: 33.0%.

Rf: 0.24 (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

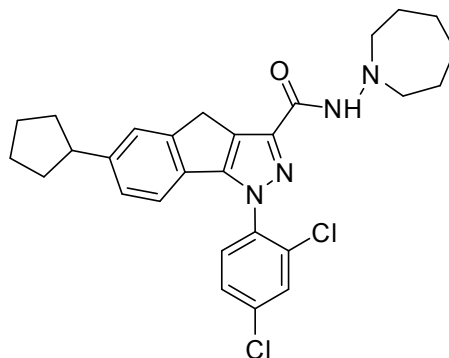
P.f.: 175-177 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.55-1.85 (m, 6H), 1.89-1.95 (m, 4H), 2.03-2.12 (m, 2H), 2.98-3.08 (m, 5H), 3.88 (s, 2H), 6.90 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.11 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.43-7.48 (m, 2H), 7.52 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.63 (bs, 1H, NH scambia con D₂O), 7.66 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 22.33 (CH₂ x2), 25.54 (CH₂ x2), 29.79 (CH₂), 34.80 (CH₂ x2), 46.10 (CH), 55.49 (CH₂ x2), 118.71 (CH), 125.15 (CH), 125.61 (CH), 128.17 (CH), 128.27 (C), 128.83 (C), 129.71 (CH), 130.51 (CH), 132.02 (C), 136.02 (C), 136.03 (C), 141.36 (C), 146.12 (C), 150.06 (C), 151.93 (C), 160.12 (C)

IR (cm⁻¹): 1675 (C=O), 3311 (NH).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(omopiperidin-1-il)--1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Bc)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 8:2).

Resa: 50.8%.

Rf: 0.24 (etere di petrolio/acetato di etile 8:2).

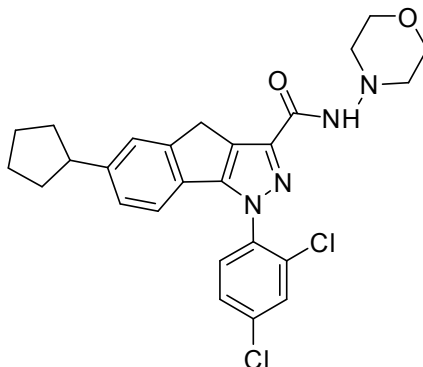
P.f.: 175-176 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.62-1.85 (m, 14H), 2.03-2.12 (m, 2H), 2.97-3.08 (m, 1H), 3.18 (t, 4H, J=5.6 Hz), 3.87 (s, 2H), 6.90 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.10 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.44-7.47 (m, 2H), 7.52 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2 Hz), 8.09 (s, 1H, NH scambia con D₂O).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 25.51 (CH₂ x2), 26.37 (CH₂ x2), 27.01 (CH₂ x2), 29.71 (CH₂), 34.77 (CH₂ x2), 46.07 (CH), 58.29 (CH₂ x2), 118.68 (CH), 125.11 (CH), 125.57 (CH), 128.11 (CH), 128.28 (C), 128.84 (C), 129.66 (CH), 130.48 (CH), 131.93 (C), 135.91 (C), 136.03 (C), 141.45 (C), 146.04 (C), 150.02 (C), 151.83 (C), 159.58 (C).

IR (cm⁻¹): 1668 (C=O), 3343 (NH).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(morfolino)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Bd)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 1:1).

Resa: 46.3%.

Rf: 0.13 (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

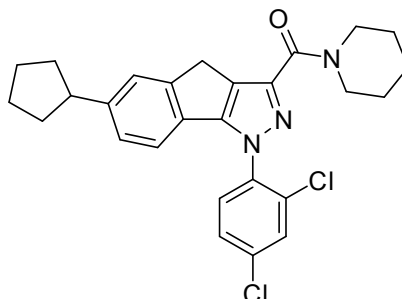
P.f.: 188-189 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.55-1.86 (m, 6H), 2.05-2.12 (m, 2H), 2.95-3.08 (m, 5H), 3.85-3.89 (m, 6H), 6.90 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.11 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.44-7.48 (m, 2H), 7.53 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.4 Hz), 7.70 (s, 1H, NH scambia con D₂O).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 25.54 (CH₂ x2), 29.72 (CH₂), 34.80 (CH₂ x2), 46.10 (CH), 56.05 (CH₂ x2), 66.52 (CH₂ x2), 118.76 (CH), 125.15 (CH), 125.67 (CH), 128.21 (CH), 128.40 (C), 128.77 (C), 129.69 (CH), 130.55 (CH), 132.00 (C), 135.96 (C), 136.13 (C), 141.11 (C), 146.23 (C), 150.00 (C), 152.05 (C), 159.46 (C).

IR (cm⁻¹): 1687 (C=O). 1334 (NH).

(6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazol-3-il)(piperidin-1-il)metanone (38Be)



Solido beige. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 85:15).

Resa: 69.4%.

Rf: 0.10 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

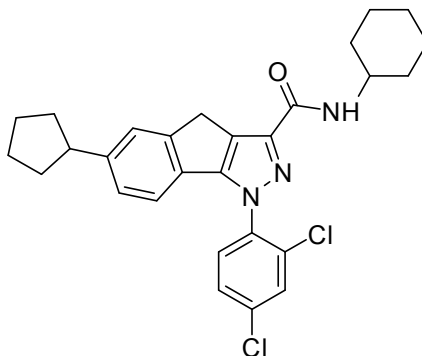
P.f.: 130-132 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.57-1.89 (m, 12H), 2.03-2.12 (m, 2H), 2.97-3.08 (m, 1H), 3.76 (bs, 2H), 3.79 (s, 2H), 4.00 (bs, 2H), 6.93 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.10 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.41-7.45 (m, 2H), 7.52 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.64 (d, 1H, J_m=7.64 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 24.77 (CH₂), 25.54 (CH₂ x2), 25.78 (CH₂), 26.83 (CH₂), 29.82 (CH₂), 34.80 (CH₂ x2), 43.59 (CH₂), 46.09 (CH), 48.12 (CH₂), 118.67 (CH), 125.05 (CH), 125.56 (CH), 128.04 (CH), 129.02 (C), 129.22 (C), 129.60 (CH), 130.52 (CH), 131.89 (C), 135.57 (C), 136.25 (C), 142.84 (C), 145.81 (C), 149.79 (C), 150.61 (C), 162.41 (C).

IR (cm⁻¹): 1617 (C=O).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(cicloesil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Bf)



Solido color crema. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 49.8%.

Rf: 0.28 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

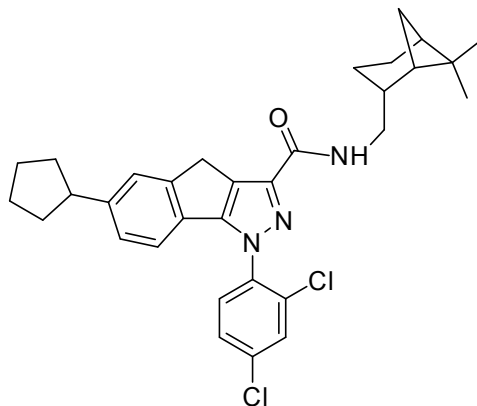
P.f.: 206-208 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.16-1.33 (m, 4H), 1.35-1.50 (m, 2H), 1.57-1.86 (m, 8H), 1.99-2.13 (m, 4H), 2.97-3.08 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.92-4.03 (m, 1H), 6.81 (d, 1H, J=8.4 Hz, NH scambia con D₂O), 6.90 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.10 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.44-7.47 (m, 2H), 7.53 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 25.00 (CH₂ x2), 25.55 (CH₂ x2), 25.60 (CH₂), 29.77 (CH₂), 33.21 (CH₂ x2), 34.80 (CH₂ x2), 46.10 (CH), 48.12 (CH), 118.69 (CH), 125.13 (CH), 125.60 (CH), 127.93 (C), 128.16 (CH), 128.98 (C), 129.76 (CH), 130.49 (CH), 132.02 (C), 135.94 (C), 136.13 (C), 142.30 (C), 146.00 (C), 150.06 (C), 152.00 (C), 161.07 (C).

IR (cm⁻¹): 1652 (C=O), 3410 (NH).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(mirtanil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Bg)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 38.0%.

Rf: 0.44 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 213-215°C.

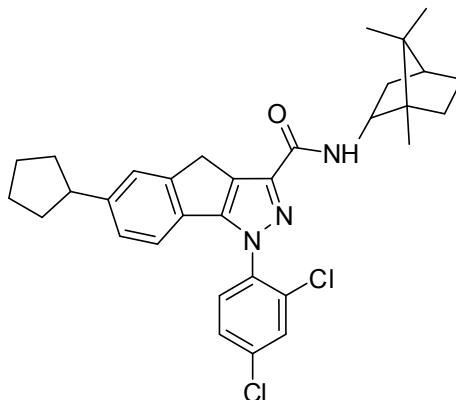
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.09 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.18-1.31 (m, 9H), 1.52-2.03 (m, 8H), 2.97-3.08 (m, 1H), 3.36-3.56 (m, 2H), 3.87 (s, 2H), 6.90 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.96 (t, 1H, J=6.0 Hz, NH scambia con D₂O), 7.10 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.42-7.47 (m, 2H), 7.53 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 19.89 (CH₂), 23.24 (CH₃), 25.55 (CH₂ x2), 26.05 (CH₂), 28.00 (CH₃), 29.76 (CH₂), 33.31 (CH₂), 34.80 (CH₂ x2), 38.74 (C), 41.40 (CH), 41.55 (CH), 43.86 (CH), 44.77 (CH₂), 46.11 (CH), 118.68 (CH), 125.14 (CH), 125.61 (CH), 127.84 (C), 128.15 (CH), 128.95 (C), 129.71 (CH), 130.51 (CH), 132.03 (C), 135.95 (C), 136.11 (C), 142.15 (C), 146.03 (C), 150.04 (C), 152.01 (C), 161.96 (C).

IR (cm⁻¹): 1666 (C=O), 3416 (NH).

[α]_D: -1.34 (CHCl₃, c = 0.082 g/100mL, t = 30 °C).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(bornil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Bh)



Solido color pesca. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 95:5).

Resa: 69.1%.

Rf: 0.41 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 118-122 °C.

IR (cm⁻¹): 1663 (C=O), 3411 (NH).

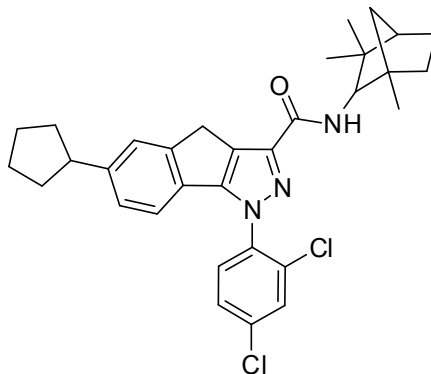
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.91 (d, 6H, J=5.6 Hz), 1.01 (s, 3H), 1.20-1.30 (m, 2H), 1.36-1.47 (m, 1H), 1.63-1.86 (m, 9H), 2.04-2.12 (m, 2H), 2.37-2.47 (m, 1H), 2.98-3.08 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 4.43-4.51 (m, 1H), 6.91 (d, 1H, J_o=8 Hz), 6.97 (d, 1H, J=9.2 Hz, NH scambia con D₂O), 7.11 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.44-7.48 (m, 2H), 7.56 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 13.88 (CH₃), 18.68 (CH₃), 19.88 (CH₃), 25.55 (CH₂ x2), 28.12 (CH₂), 28.41 (CH₂), 29.77 (CH₂), 34.80 (CH₂), 34.81 (CH₂), 37.48 (CH₂), 45.00 (CH), 46.10 (CH), 48.23 (C), 49.73 (C), 53.60 (CH), 118.70 (CH), 125.12 (CH), 125.59 (CH), 127.90 (C), 128.13 (CH), 129.03 (C), 129.84 (CH), 130.48 (CH), 131.99 (C), 135.89 (C), 136.18 (C), 142.21 (C), 145.96 (C), 150.06 (C), 151.98 (C), 162.12 (C).

IR (cm⁻¹): 1615 (C=O), 1314 (NH).

[α]_D: +0.24° (CHCl₃, c = 0.082 g/100mL, t = 30 °C).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(fenchil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Bi)



Solido color pesca. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 95:5).

Resa: 72%.

Rf: 0.44 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 208-211 °C.

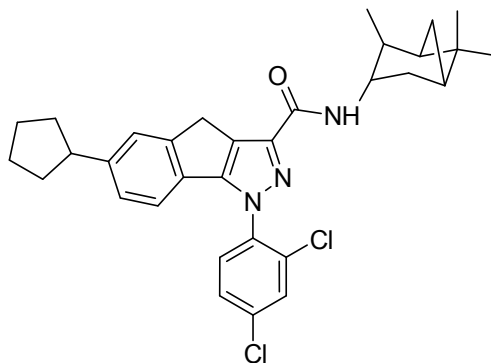
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.88 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.38-1.52 (m, 2H), 1.54-1.86 (m, 11H), 2.03-2.13 (m, 2H), 2.97-3.08 (m, 1H), 3.82 (dd, 1H, J₁=8 Hz, J₂=1.6 Hz), 3.87 (s, 2H), 6.92 (d, 1H, J_o=8 Hz), 7.03 (d, 1H, J=9.6 Hz, NH scambia con D₂O), 7.10 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.43-7.48 (m, 2H), 7.55 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 19.78 (CH₃), 21.30 (CH₃), 25.52 (CH₂ x2), 25.98 (CH₂), 27.33 (CH₂), 29.73 (CH₂), 30.94 (CH₃), 34.77 (CH₂ x2), 39.51 (CH₂), 42.73 (C), 46.08 (CH), 48.17 (CH), 48.65 (C), 63.15 (CH), 118.66 (CH), 125.08 (CH), 125.53 (CH), 127.66 (C), 128.02 (CH), 129.03 (C), 129.71 (CH), 130.47 (CH), 131.89 (C), 135.71 (C), 136.20 (C), 142.11 (C), 145.87 (C), 150.00 (C), 151.88 (C), 162.54 (C).

IR (cm⁻¹): 1668 (C=O), 3418 (NH).

[α]_D: -0.73° (CHCl₃, c = 0.084 g/100mL, t = 30 °C).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(isopinocanfenil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38BI)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 58.9%.

Rf: 0.44 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 115-117 °C.

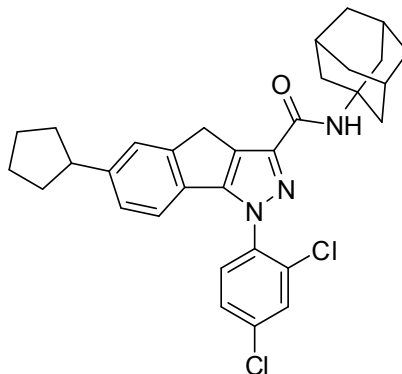
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.11 (s, 3H), 1.18 (d, 3H, J=7.2 Hz), 1.25 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.66-1.74 (m, 2H), 1.75-1.90 (m, 4H), 1.91-2.02 (m, 2H), 2.03-2.12 (m, 2H), 2.38-2.46 (m, 1H), 2.64-2.73 (m, 1H), 2.98-3.08 (m, 1H), 3.88 (s, 2H), 4.47-4.57 (m, 1H), 6.84 (d, 1H, J=8.8 Hz, NH scambia con D₂O), 6.90 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.11 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.44-7.47 (m, 2H), 7.55 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 20.88 (CH₃), 23.38 (CH₃), 25.55 (CH₂ x2), 28.10 (CH₃), 29.78 (CH₂), 34.81 (CH₂ x2), 35.26 (CH₂), 37.07 (CH₂), 38.56 (C), 41.68 (CH), 45.93 (CH), 46.11 (CH), 47.61 (CH), 47.90 (CH), 118.70 (CH), 125.14 (CH), 125.61 (CH), 128.02 (C), 128.06 (C), 128.18 (CH), 128.98 (C), 129.80 (CH), 130.50 (CH), 135.98 (C), 136.12 (C), 142.23 (C), 146.02 (C), 150.07 (C), 152.05 (C), 161.46 (C).

IR (cm⁻¹): 1651 (C=O), 3412 (NH).

[α]_D: -1.83 (CHCl₃, c = 0.082 g/100mL, t = 30 °C).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(adamantan-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Bm)



Solido color salmone. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 95:5).

Resa: 50.0%.

Rf: 0.48 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

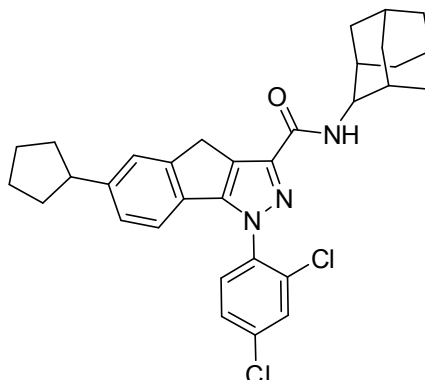
P.f.: 162-164 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.67-1.85 (m, 11H), 2.04-2.20 (m, 12H), 2.97-3.07 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 6.70 (s, 1H, NH scambia con D₂O), 6.89 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.10 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.43-7.46 (m, 2H), 7.52 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 25.55 (CH₂ x2), 29.53 (CH x3), 29.79 (CH₂), 34.81 (CH₂ x2), 36.43 (CH₂ x3), 41.75 (CH₂ x3), 46.11 (CH), 51.10 (C), 118.68 (CH), 125.12 (CH), 125.58 (CH), 127.82 (C), 128.13 (CH), 129.02 (C), 129.81 (CH), 130.45 (CH), 131.99 (C), 135.88 (C), 136.15 (C), 142.98 (C), 145.94 (C), 150.11 (C), 152.03 (C), 161.20 (C).

IR (cm⁻¹): 1667 (C=O), 3395 (NH).

6-Ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(adamantan-2-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Bn)



Solido color argilla. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 52.3%.

Rf: 0.39 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

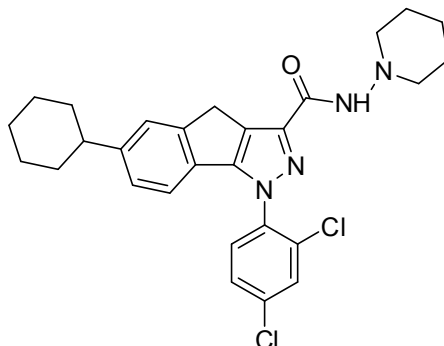
P.f.: 179-182 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.63-1.98 (m, 18H), 2.03-2.12 (m, 4H), 2.97-3.08 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 4.27 (d, 1H, J=8 Hz), 6.91 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.10 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.30 (d, 1H, J=8.0 Hz, NH scambia con D₂O), 7.43-7.47 (m, 2H), 7.55 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 25.55 (CH₂ x2), 27.21 (CH), 27.30 (CH), 29.75 (CH₂), 32.02 (CH₂ x2), 32.10 (CH x2), 34.80 (CH₂ x2), 37.21 (CH₂ x2), 37.59 (CH₂), 46.10 (CH), 53.16 (CH), 118.70 (CH), 125.12 (CH), 125.59 (CH), 127.86 (C), 128.09 (CH), 129.06 (C), 129.82 (CH), 130.45 (CH), 131.97 (C), 135.82 (C), 136.21 (C), 142.31 (C), 145.94 (C), 150.04 (C), 151.95 (C), 161.22 (C).

IR (cm⁻¹): 1672 (C=O), 3326 (NH).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(piperidin-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ca)



Solido bianco panna. Purificato per FC (etere di petrolio/acetato di etile 75:25)

Resa: 35%.

Rf: 1.16 (etere di petrolio/acetato di etile 85:15).

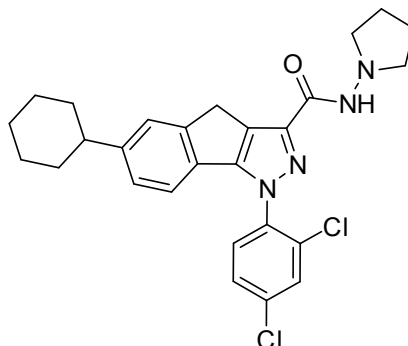
P.f.: 172-173 °C

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.36-1.47 (m, 6H), 1.70-1.94 (m, 10H), 2.54 (bs, 1H), 2.89 (s, 4H), 3.86 (s, 2H), 6.90 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.06 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.41 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.52 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.65 (1H, J_m=2 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 23.29 (CH₂), 25.36 (CH₂ x2), 26.04 (CH₂), 26.81 (CH₂ x2), 29.71 (CH₂), 34.50 (CH₂ x3), 44.71 (CH), 57.02 (CH₂), 118.75 (CH), 124.84 (CH), 125.30 (CH), 128.11 (CH), 128.9 (C), 128.75 (C), 129.66 (C), 130.46 (CH), 130.84 (CH), 135.99 (C), 141.36 (C), 147.58 (C), 150.03 (C x2) 151.86 (C), 159.20 (C).

IR (cm⁻¹): 1680 (C=O), 3250 (NH).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(pirrolidin-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Cb)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

Resa: 35.0%.

Rf: 0.24 (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

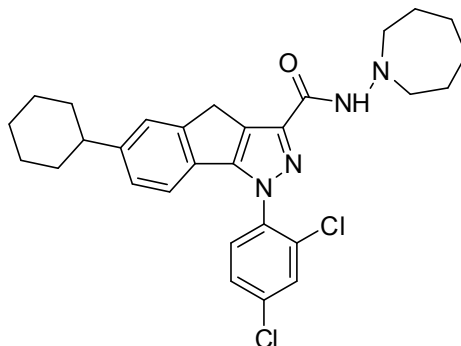
P.f.: 213-214 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.23-1.28 (m, 1H), 1.33-1.49 (m, 4H), 1.70-1.75 (m, 1H), 1.80-1.94 (m, 8H), 2.49-2.58 (m, 1H), 3.00-3.08 (m, 4H), 3.88 (s, 2H), 6.90 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.07 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.41 (s, 1H), 7.50 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.52 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.63 (s, 1H, NH scambia con D₂O), 7.66 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 22.31 (CH₂ x2), 26.07 (CH₂), 26.84 (CH₂ x2), 29.78 (CH₂), 34.53 (CH₂ x2), 44.74 (CH), 55.47 (CH₂ x2), 118.77 (CH), 124.88 (CH), 125.32 (CH), 128.14 (CH), 128.27 (C), 128.89 (C), 129.68 (CH), 130.50 (CH), 132.00 (C), 135.99 (C), 136.01 (C), 141.33 (C), 147.62 (C), 150.06 (C), 151.91 (C), 160.09 (C).

IR (cm⁻¹): 1689 (C=O), 3299 (NH).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)- N-(omopiperidin-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Cc)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 75:25).

Resa: 38%.

Rf: 0.15 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

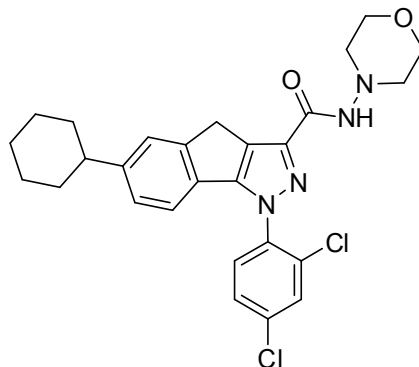
P.f.: 172-175 °C

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.34-1.89 (m, 18H), 2.50-2.56 (m, 1H), 3.73 (t, 2H, J=6 Hz), 3.80 (s, 2H), 3.99 (t, 2H, J=6 Hz), 6.94 (d, 1H, J_o= 7.6 Hz), 7.06 (dd, 1H, J_o= 6.4 Hz, J_m= 1.2 Hz), 7.40 (s, 1H), 7.43 (dd, 1H, J_o= 6Hz, J_m= 2.4 Hz), 7.51 (d, 1H, J_o= 8.4 Hz), 7.64 (d, 1H, J_m= 2Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 26.09 (CH₂), 26.84 (CH₂), 26.87 (CH₂ x2), 27.24 (CH₂), 27.32 (CH₂), 29.75 (CH₂), 29.97 (CH₂), 34.56 (CH₂ x2), 44.75 (CH), 47.23 (CH₂), 49.23 (CH₂), 118.69 (CH), 124.82 (CH), 125.22 (CH), 127.99 (CH), 129.13 (C), 129.45 (CH), 129.57 (C), 130.58 (CH), 131.84 (C), 135.45 (C), 136.33 (C), 143.18 (C), 147.28 (C), 149.88 (C), 150.41 (C), 163.66 (C).

IR (cm⁻¹): 1615 (C=O), 3450 (NH).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-N-morfolino-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Cd)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 1:1).

Resa: 58.3%.

Rf: 0.10 (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

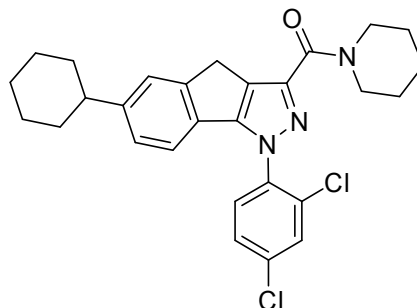
P.f.: 182-184 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.35-1.51 (m, 4H), 1.73-1.93 (m, 6H), 2.52-2.60 (m, 1H), 2.97-3.04 (m, 4H), 3.85-3.92 (m, 6H), 6.93 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.09 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.44 (s, 1H), 7.48 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.0 Hz), 7.55 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.69 (d, 1H, J_o=2.0 Hz), 7.73 (s, 1H, NH scambia con D₂O).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 26.05 (CH₂), 26.82 (CH₂ x2), 29.70 (CH₂), 34.51 (CH₂ x2), 44.73 (CH), 56.01 (CH₂ x2), 66.48 (CH₂ x2), 118.80 (CH), 124.88 (CH), 125.38 (CH), 128.17 (CH), 128.39 (C), 128.81 (C), 129.65 (CH), 130.52 (CH), 131.97 (C), 135.92 (C), 136.09 (C), 141.05 (C), 147.72 (C), 149.98 (C), 152.02 (C), 159.43 (C).

IR (cm⁻¹): 1675 (C=O), 3333 (NH).

(6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazol-3-il)(piperidin-1-il)metanone (38Ce)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 8:2).

Resa: 64.9%.

Rf: 0.29 (etere di petrolio/acetato di etile 0.29).

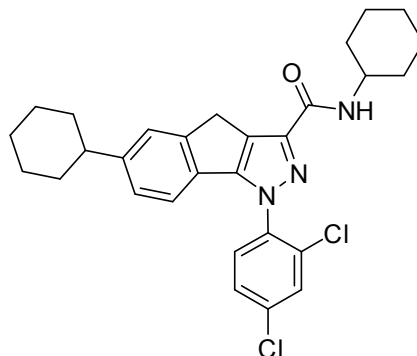
P.f.: 157-159 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.21-1.30 (m, 1H), 1.33-1.49 (m, 4H), 1.64-1.92 (m, 11H), 2.49-2.58 (m, 1H), 3.75 (bs, 2H), 3.79 (s, 2H), 4.00 (bs, 2H), 6.93 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.06 (dd, 1H, J_o=7.2 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.40 (s, 1H), 7.43 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.52 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.64 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 24.77 (CH₂), 25.77 (CH₂), 26.11 (CH₂), 26.83 (CH₂), 26.88 (CH₂ x2), 29.82 (CH₂), 34.57 (CH₂ x2), 43.58 (CH₂), 44.76 (CH), 48.12 (CH₂), 118.74 (CH), 124.82 (CH), 125.29 (CH), 128.03 (CH), 129.11 (C), 129.24 (C), 129.59 (CH), 130.53 (CH), 131.91 (C), 135.56 (C), 136.25 (C), 142.83 (C), 147.37 (C), 149.82 (C), 150.62 (C), 162.42 (C).

IR (cm⁻¹): 1628 (C=O).

N,6-dicicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Cf)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 44.5%.

Rf: 0.32 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

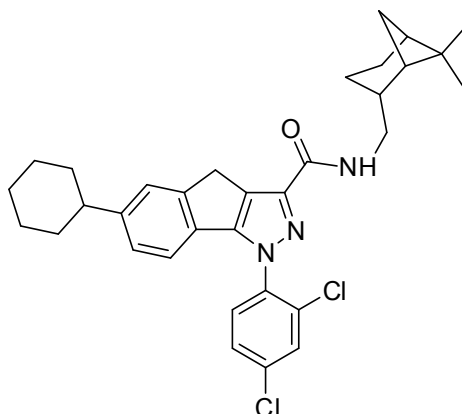
P.f.: 180-182 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.15-1.50 (m, 10H), 1.61-1.69 (m, 1H), 1.72-1.92 (m, 7H), 2.00-2.09 (m, 2H), 2.49-2.59 (m, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.93-4.04 (m, 1H), 6.82 (d, 1H, J=8.4 Hz, NH scambia con D₂O), 6.91 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.07 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.43 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.53 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 24.98 (CH₂ x2), 25.59 (CH₂), 26.08 (CH₂), 26.85 (CH₂ x2), 29.76 (CH₂), 33.19 (CH₂ x2), 34.54 (CH₂ x2), 44.75 (CH), 48.10 (CH), 118.76 (CH), 124.87 (CH), 125.32 (CH), 127.94 (C), 128.13 (CH), 129.05 (C), 129.74 (CH), 130.47 (CH), 132.00 (C), 135.91 (C), 136.11 (C), 142.28 (C), 147.51 (C), 150.06 (C), 151.98 (C), 161.04 (C).

IR (cm⁻¹): 1684 (C=O), 3296 (NH).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(mirtanil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Cg)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 28.0%.

Rf: 0.36 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 203-204 °C.

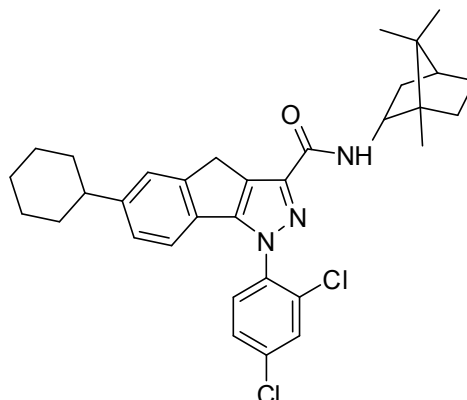
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.91 (d, 1H, J=9.6 Hz), 1.09 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.32-1.49 (m, 5H), 1.72-1.79 (m, 1H), 1.82-2.03 (m, 10H), 2.29-2.40 (m, 2H), 2.49-2.58 (m, 1H), 3.35-3.43 (m, 1H), 3.47-3.55 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 6.91 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.96 (t, 1H, J=6.0 Hz, NH scambia con D₂O), 7.06 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.52 (d, 1H J_o=8.4 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 19.89 (CH₂), 23.24 (CH₃), 26.05 (CH₂), 26.10 (CH₂), 26.87 (CH₂ x2), 28.00 (CH₃), 29.78 (CH₂), 33.31 (CH₂), 34.56 (CH₂ x2), 38.74 (C), 41.40 (CH), 41.56 (CH), 43.86 (CH), 44.76 (CH₂), 44.78 (CH), 118.76 (CH), 124.91 (CH), 125.34 (CH), 127.88 (C), 128.14 (CH), 129.04 (C), 129.70 (CH), 130.52 (CH), 132.04 (C), 135.94 (C), 136.12 (C), 142.15 (C), 147.56 (C), 150.07 (C), 152.02 (C), 161.95 (C).

IR (cm⁻¹): 1652 (C=O), 3256 (NH).

[α]_D: -0.48° (CHCl₃, c = 0.084 g/100mL, t = 30 °C).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(bornil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ch)



Solido giallo. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1)

Resa: 44.9%.

Rf: 0.44 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 145-147 °C.

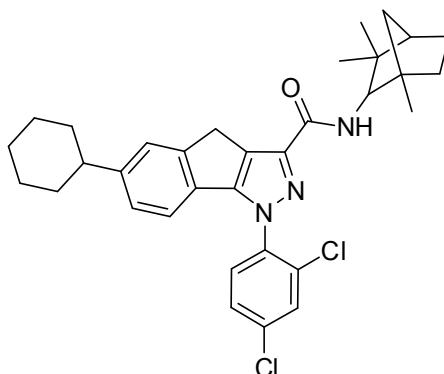
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.91 (d, 6H, J=5.6 Hz), 1.01 (s, 3H), 1.20-1.30 (m, 2H), 1.33-1.49 (m, 6H), 1.68-1.91 (m, 8H), 2.37-2.47 (m, 1H), 2.48-2.59 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 4.43-4.53 (s, 1H), 6.91 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.97 (d, 1H, J=8.8 Hz, NH scambia con D₂O), 7.06 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.46 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.55 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 13.78 (CH₃), 18.57 (CH₃), 19.78 (CH₃), 26.00 (CH₂), 26.77 (CH₂ x2), 28.01 (CH₂), 28.31 (CH₂), 29.67 (CH₂), 34.45 (CH₂), 34.47 (CH₂), 37.38 (CH₂), 44.67 (CH), 44.90 (CH), 48.13 (C), 49.63 (C), 53.50 (CH), 118.68 (CH), 124.79 (CH), 125.22 (CH), 127.83 (C), 128.02 (CH), 129.01 (C), 129.73 (CH), 130.38 (CH), 131.90 (C), 135.78 (C), 136.08 (C), 142.10 (C), 147.39 (C), 149.98 (C), 151.89 (C), 162.02 (C).

IR (cm⁻¹): 1678 (C=O), 3342 (NH).

[α_D]: +0.24° (CHCl₃, c = 0.084 g/100mL, t = 30 °C).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(fenchil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Ci)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 95:5).

Resa: 42.2%.

Rf: 0.48 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 192-194 °C.

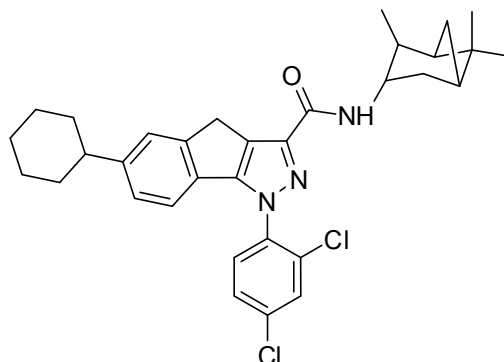
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.88 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.23-1.28 (m, 2H), 1.36-1.49 (m, 6H), 1.69-1.91 (m, 9H), 2.49-2.58 (m, 1H), 3.82 (dd, 1H, J₁=7.6 Hz, J₂=2.0 Hz), 3.86 (s, 2H), 6.93 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.02 (d, 1H, J=9.6 Hz, NH scambia con D₂O), 7.07 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.55 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 19.81 (CH₃), 21.32 (CH₃), 26.00 (CH₂), 26.11 (CH₂), 26.88 (CH₂ x2), 27.35 (CH₂), 29.76 (CH₂), 30.96 (CH₃), 34.56 (CH₂ x2), 39.54 (CH₂), 42.75 (C), 44.76 (CH), 48.20 (CH), 48.67 (C), 63.19 (CH), 118.77 (CH), 124.88 (CH), 125.28 (CH), 127.72 (C), 128.04 (CH), 129.13 (C), 129.72 (CH), 130.51 (CH), 131.93 (C), 135.73 (C), 136.23 (C), 142.12 (C), 147.44 (C), 150.05 (C), 151.92 (C), 162.58 (C).

IR (cm⁻¹): 1680 (C=O), 3334 (NH).

[α]_D: -0.71° (CHCl₃, c = 0.084 g/100mL, t = 30 °C).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(isopinocanfenil-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Cl)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 59.3%.

Rf: 0.46 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 186-187 °C.

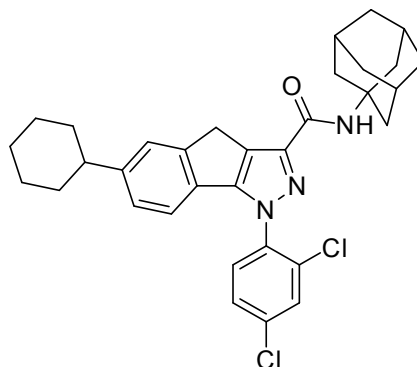
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.95-1.00 (m, 1H), 1.13 (s, 3H), 1.21 (d, 3H, J=7.2 Hz), 1.27 (s, 3H), 1.35-1.52 (m, 5H), 1.69-1.81 (m, 2H), 1.83-1.93 (m, 5H), 1.94-2.04 (m, 2H), 2.40-2.49 (m, 1H), 2.52-2.60 (m, 1H), 2.66-2.75 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 4.50-4.59 (m, 1H), 6.86 (d, 1H, J=8.8 Hz, NH scambia con D₂O), 6.93 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.09 (dd, 1H, J_o=7.2 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.45 (s, 1H), 7.48 (dd, 1H, J_o=7.2 Hz, J_m=2.0 Hz), 7.57 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.69 (d, 1H, J_m=8.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 20.87 (CH₃), 23.36 (CH₃), 26.08 (CH₂), 26.85 (CH₂ x2), 28.08 (CH₃), 29.77 (CH₂), 34.54 (CH₂ x2), 35.23 (CH₂), 37.04 (CH₂), 38.54 (C), 41.65 (CH), 44.75 (CH), 45.90 (CH), 47.59 (CH), 47.87 (CH), 118.76 (CH), 124.89 (CH), 125.32 (CH), 128.03 (C), 128.15 (CH), 129.04 (C), 129.77 (CH), 130.48 (CH), 132.02 (C), 135.95 (C), 136.10 (C), 142.20 (C), 147.53 (C), 150.07 (C), 152.03 (C), 161.44 (C).

IR (cm⁻¹): 1666 (C=O), 3399 (NH).

[α_D]: -1.43° (CHCl₃, c = 0.084 g/100mL, t = 30 °C).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(adamantan-1-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Cm)



Solido rosa. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 40%

Rf: 0.512 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

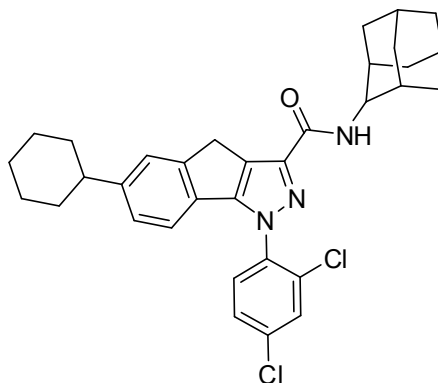
P.f.: 213-215 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.32-1.48 (m, 4H), 1.66-1.78 (m, 8H), 1.8-1.92 (m, 4H), 2,12 (s, 3H), 2.16 (s, 6H), 2.49-2.58 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 6.70 (s, 1H, NH scambia con D₂O), 6.90 (d, 1H, J_o=8 Hz), 7.06 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.44 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.52 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 26.09 (CH₂), 26.87 (CH₂ x2), 29.51 (CH x3), 29.78 (CH₂), 34.54 (CH₂ x2), 36.42 (CH₂ x3), 41.73 (CH₂ x3), 44.76 (CH), 51.98 (C), 118.74 (CH), 124.88 (CH), 125.29 (CH), 127.84 (C), 128.10 (CH), 129.08 (C), 129.78 (CH), 130.44 (CH), 131.99 (C), 135.85 (C), 136.13 (C), 142.96 (C), 147.47 (C), 150.12 (C), 152.03 (C), 161.19 (C).

IR (cm⁻¹): 1667 (C=O), 3400 (NH).

6-Cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(adamantan-2-il)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossamide (38Cn)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 55.0%.

Rf: 0.39 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

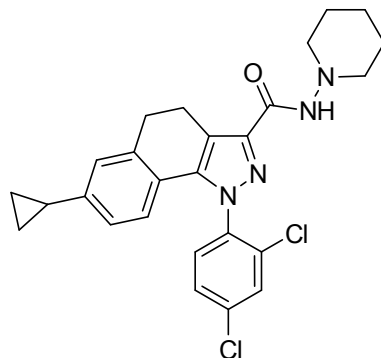
P.f.: 212-214 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.20-1.31 (m, 1H), 1.33-1.50 (m, 4H), 1.63-1.70 (m, 2H), 1.71-1.79 (m, 3H), 1.80-1.97 (m, 12H), 2.04-2.11 (m, 2H), 2.49-2.58 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 4.24-4.30 (m, 1H), 6.92 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.07 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.29 (d, 1H, J=8.4 Hz, NH scambia con D₂O), 7.42 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=7.45, J_m=2.0), 7.54 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 26.11 (CH₂), 26.88 (CH₂ x2), 27.21 (CH), 27.30 (CH), 29.75 (CH₂), 32.02 (CH₂ x2), 32.10 (CH x2), 34.57 (CH₂ x2), 37.21 (CH₂ x2), 37.59 (CH₂), 44.77 (CH), 53.16 (CH), 118.78 (CH), 124.88 (CH), 125.32 (CH), 127.89 (C), 128.08 (CH), 129.15 (C), 129.82 (CH), 130.46 (CH), 131.98 (C), 135.81 (C), 136.22 (C), 142.32 (C), 147.47 (C), 150.07 (C), 151.95 (C), 161.21 (C).

IR (cm⁻¹): 1656 (C=O), 3345 (NH).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(piperidin-1-il)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Aa)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 7:3).

Resa: 62.2%.

Rf: 0.43 (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

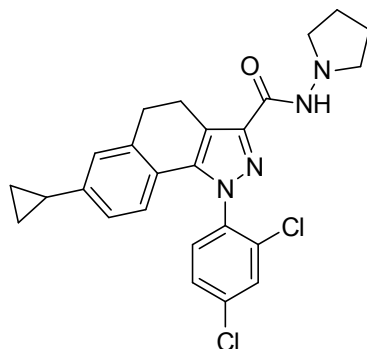
P.f.: 209-210 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.64-0.69 (m, 2H), 0.92-0.98 (m, 2H), 1.38-1.46 (m, 2H), 1.70-1.86 (m, 5H), 2.81-2.80 (m, 4H), 2.91-2.98 (m, 2H), 3.05-3.26 (m, 2H), 6.40 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.68 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.0 Hz), 6.99 (d, 1H, J_m=0.8 Hz), 7.44-7.46 (m, 2H), 7.59 (bs, 1H, NH scambia con D₂O), 7.60 (d, 1H, J_m=1.6 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.46 (CH₂ x2), 15.30 (CH), 19.56 (CH₂), 23.36 (CH₂), 25.42 (CH₂ x2), 30.22 (CH₂), 57.12 (CH₂ x2), 120.29 (C), 121.13 (CH), 123.22 (C), 123.62 (CH), 126.22 (CH), 128.30 (CH), 130.36 (CH), 130.61 (CH), 133.45 (C), 136.33 (C), 137.10 (C), 137.58 (C), 141.23 (C), 142.50 (C), 144.62 (C), 159.83 (C).

IR (cm⁻¹): 1669 (C=O), 3415 (NH).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(pirrolidin-1-il)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Ab)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 7:3).

Resa: 44.0%.

Rf: 0.11 (etere di petrolio/acetato di etile 7:3).

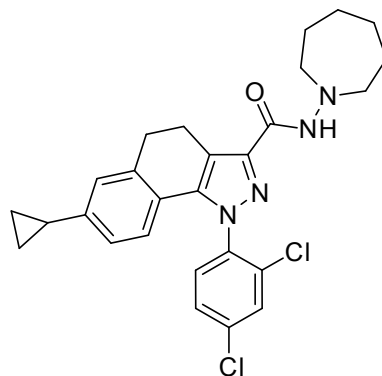
P.f. 210-212 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.63-0.69 (m, 2H), 0.92-0.98 (m, 2H), 1.78-1.86 (m, 1H), 1.87-1.94 (m, 4H), 2.90-3.04 (m, 6H), 3.07-3.26 (m, 2H), 6.40 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 6.69 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 6.99 (d, 1H, J_m=1.2 Hz), 7.44-7.46 (m, 2H), 7.57 (s, 1H, NH scambia con D₂O), 7.60 (d, 1H, J_m=1.6 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.46 (CH₂ x2), 15.30 (CH), 19.58 (CH₂), 22.28 (CH₂ x2), 30.21 (CH₂), 55.47 (CH₂ x2), 120.18 (C), 121.15 (CH), 123.21 (C), 123.64 (CH), 126.22 (CH), 128.30 (CH), 130.35 (CH), 130.61 (CH), 133.46 (C), 136.36 (C), 137.09 (C), 137.59 (C), 141.25 (C), 142.40 (C), 144.65 (C), 160.73 (C).

IR (cm⁻¹): 1674 (C=O), 3409 (NH).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(omopiperidin-1-il)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Ac)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 7:3).

Resa: 59.8%.

Rf: 0.44 (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

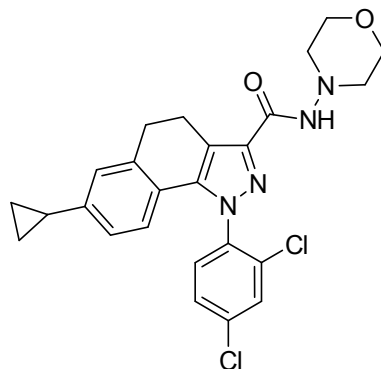
P.f.: 205-208 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.64-0.69 (m, 2H), 0.83-0.87 (m, 2H), 1.38-1.46 (m, 2H), 1.70-1.86 (m, 7H), 2.81-2.80 (m, 4H), 2.91-2.98 (m, 2H), 3.05-3.26 (m, 2H), 6.40 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.68 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.0 Hz), 6.99 (d, 1H, J_m=0.8 Hz), 7.44-7.46 (m, 2H), 7.59 (bs, 1H, NH scambia con D₂O), 7.60 (d, 1H, J_m=1.6 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.46 (CH₂ x2), 15.30 (CH), 19.56 (CH₂), 23.36 (CH₂), 25.42 (CH₂ x2), 30.22 (CH₂ x2), 57.12 (CH₂ x2), 120.29 (C), 121.13 (CH), 123.22 (C), 123.62 (CH), 126.22 (CH), 128.30 (CH), 130.36 (CH), 130.61 (CH), 133.45 (C), 136.33 (C), 137.10 (C), 137.58 (C), 141.23 (C), 142.50 (C), 144.62 (C), 159.83 (C).

IR (cm⁻¹): 1678 (C=O), 3452 (NH).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(morfolino)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Ad)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 55:45).

Resa: 68.2%.

Rf: 0.14 (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

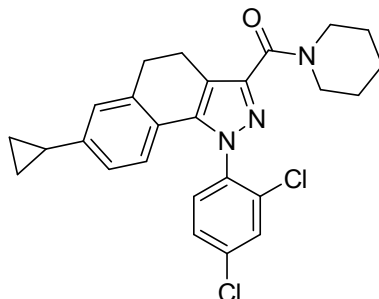
P.f.: 210-212 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.64-0.69 (m, 2H), 0.92-0.98 (m, 2H), 1.78-1.86 (m, 1H), 2.92-2.98 (m, 5H), 3.02-3.26 (m, 3H), 3.83-3.88 (m, 4H), 6.41 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.69 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 6.99 (s, 1H), 7.43-7.49 (m, 2H), 7.61 (d, 1H, J_m=1.6 Hz), 7.65 (s, 1H, NH scambia con D₂O).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.49 (CH₂ x2), 15.31 (CH), 19.54 (CH₂), 30.17 (CH₂), 56.07 (CH₂ x2), 66.50 (CH₂ x2), 120.32 (C), 121.16 (CH), 123.10 (C), 123.67 (CH), 126.24 (CH), 128.35 (CH), 130.31 (CH), 130.65 (CH), 133.43 (C), 136.46 (C), 137.01 (C), 137.54 (C), 141.38 (C), 142.15 (C), 144.76 (C), 160.04 (C).

IR (cm⁻¹): 1681 (C=O), 3407 (NH).

(7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazol-3-il)(piperidin-1-il)metanone (39Ae)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 75:25).

Resa: 57.7%.

Rf: 0.05 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

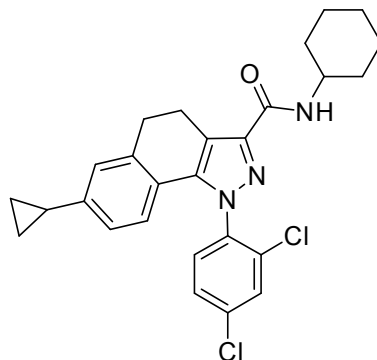
P.f.: 81-83 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.63-0.70 (m, 2H), 0.82-0.88 (m, 2H), 0.91-0.98 (m, 2H), 1.53-1.71 (m, 4H), 1.78-1.86 (m, 1H), 2.83-3.02 (m, 4H), 3.63-3.86 (m, 4H), 6.44 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 6.69 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 6.98 (d, 1H, J_m=1.2 Hz), 7.37-7.45 (m, 2H), 7.59 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.43 (CH₂ x2), 15.29 (CH), 19.51 (CH₂), 24.72 (CH₂), 25.73 (CH₂), 26.78 (CH₂), 30.29 (CH₂), 43.26 (CH₂), 48.31 (CH₂), 119.32 (C), 121.35 (CH), 123.41 (C), 123.64 (CH), 126.15 (CH), 128.16 (CH), 130.47 (CH), 130.51 (CH), 133.48 (C), 135.96 (C), 137.19 (C), 137.42 (C), 140.16 (C), 144.39 (C), 144.43 (C), 163.16 (C).

IR (cm⁻¹): 1684 (C=O).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(cicloesil)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Af)



Solido marroncino. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 47.0%.

Rf: 0.23 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

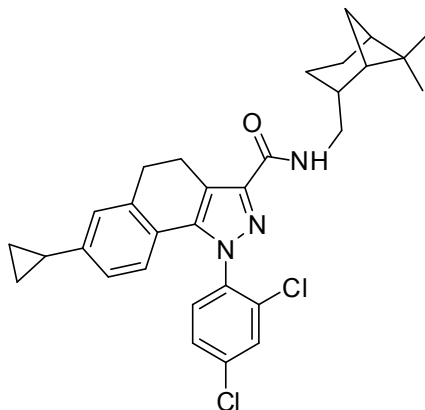
P.f.: 116-119 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.60-0.69 (m, 2H), 0.90-0.96 (m, 2H), 1.22-1.30 (m, 2H), 1.34-1.48 (m, 2H), 1.58-1.68 (m, 2H), 1.71-1.81 (m, 2H), 1.75-1.83 (m, 1H), 1.99-2.08 (m, 2H), 2.88-3.00 (m, 2H), 3.05-3.27 (m, 2H), 3.93-4.03 (m, 1H), 6.80 (d, 1H, J=8 Hz, NH scambia con D₂O), 6.87 (d, 1H, J_o=8 Hz), 6.96 (dd, 1H, J_o=7.2 Hz, J_m=0.8 Hz), 7.25 (s, 1H), 7.45 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2 Hz), 7.54 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.65 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.55 (CH₂ x2), 19.64 (CH), 25.00 (CH₂ x2), 23.41 (CH₂), 25.60 (CH₂), 29.70 (CH₂), 33.21 (CH₂ x2), 48.11 (CH), 118.74 (CH), 123.52 (CH), 124.28 (CH), 127.80 (C), 128.17 (CH), 128.73 (C), 129.77 (CH), 130.48 (CH), 131.97 (C), 135.93 (C), 136.12 (C), 142.30 (C), 143.52 (C), 150.15 (C), 151.94 (C), 161.04 (C).

IR (cm⁻¹): 1663 (C=O), 3349 (NH).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(mirtanil-1-il)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Ag)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 84.3%.

Rf: 0.30 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 93-96 °C.

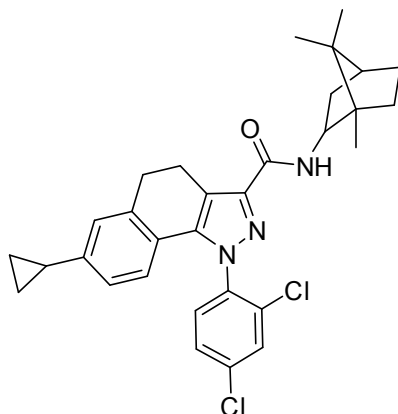
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.64-0.67 (m, 2H), 0.81-0.91 (m, 4H), 0.92-0.98 (m, 2H), 1.07 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.78-2.20 (m, 6H), 2.27-2.40 (m, 2H), 2.91-2.99 (m, 2H), 3.28-3.55 (m, 2H), 6.41 (d, 1H, J_o=6.41 Hz), 6.68 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 6.93 (bs, 1H, NH scambia con D₂O), 6.99 (d, 1H, J_m=1.2 Hz), 0.74-0.77 (m, 2H), 7.60 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.50 (CH₂ x2), 15.30 (CH₃), 19.68 (CH₂), 19.91 (CH₂), 23.24 (CH₃), 26.05 (CH₂), 28.00 (CH), 30.26 (CH₂), 33.32 (CH₂), 38.72 (C), 41.40 (CH), 41.52 (CH), 43.68 (CH), 44.60 (CH₂), 119.74 (C), 121.15 (CH), 123.33 (C), 123.62 (CH), 126.20 (CH), 128.28 (CH), 130.37 (CH), 130.60 (CH), 133.48 (C), 136.29 (C), 137.17 (C), 137.54 (C), 141.34 (C), 143.21 (C), 144.55 (C), 162.55 (C).

IR (cm⁻¹): 1666 (C=O), 3419 (NH).

[α_D]: -0.24° (CHCl₃, c = 0.085 g/100mL, t = 30 °C).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(bornil-1-il)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Ah)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 78.3%.

Rf: 0.35 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 112-115 °C.

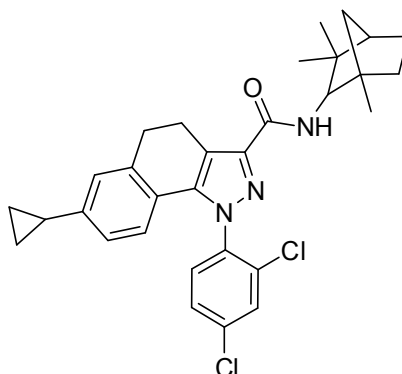
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.60-0.69 (m, 2H), 0.85-0.88 (d, 6H), 0.91-0.97 (m, 4H), 1.00 (s, 3H), 1.20-1.30 (d, 2H), 1.66-1.72 (m, 3H), 2.37-2.47 (m, 1H), 3.81-3.85 (m, 4H), 4.43-4.51 (m, 1H), 6.41 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.70 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 6.73 (s, 1H), 7.00 (d, 1H, J=8.4 Hz, NH scambia con D₂O), 7.43 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.45 (dd, 1H, J_o=4.8 Hz, J_m=3.6 Hz), 7.62 (s, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.43 (CH₂ x2), 15.28 (CH₃), 19.74 (CH₂), 19.80 (CH₃), 21.30 (CH₃), 26.00 (CH₂), 27.34 (CH₂), 30.30 (CH₂), 30.98 (CH), 39.51 (CH₂), 42.75 (C), 48.19 (CH), 48.67 (C), 62.96 (CH), 119.60 (C), 121.18 (CH), 123.58 (CH), 126.15 (CH), 128.14 (CH), 130.46 (CH), 130.55 (CH), 133.41 (C), 133.49 (C), 136.07 (C), 137.29 (C), 137.53 (C), 142.19 (C), 141.17 (C), 144.38 (C), 163.20 (C).

IR (cm⁻¹): 1656 (C=O), 3344 (NH).

[α_D]: -0.21° (CHCl₃, c = 0.085 g/100mL, t = 30 °C).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(fenchil-1-il)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Ai)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 89.9%.

Rf: 0.39 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 114-118 °C.

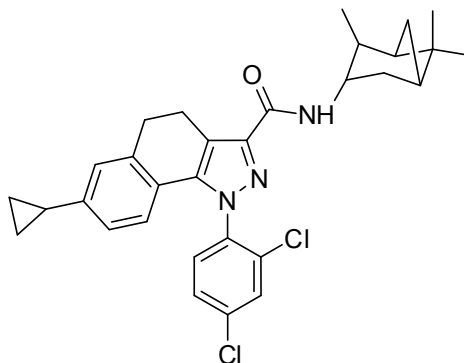
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.62-0.70 (m, 2H), 0.86 (s, 3H), 0.91-0.98 (m, 2H), 1.11 (s, 3H), 1.13-1.20 (m, 4H), 1.26 (s, 3H), 1.35-1.51 (m, 3H), 1.78-1.87 (m, 1H), 2.90-2.99 (m, 2H), 3.04-3.26 (m, 2H), 3.75-3.83 (m, 1H), 6.43 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.68 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 6.98 (s, 1H), 7.00 (d, 1H, J=8.4 Hz, NH scambia con D₂O), 7.43 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.48 (dd, 1H, J_o=4.8 Hz, J_m=3.6 Hz), 7.60 (s, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.43 (CH₂ x2), 15.29 (CH₃), 19.74 (CH₂), 19.80 (CH₃), 21.30 (CH₃), 26.00 (CH₂), 27.34 (CH₂), 30.30 (CH₂), 30.98 (CH), 39.51 (CH₂), 42.75 (C), 48.19 (CH), 48.67 (C), 62.96 (CH), 119.60 (C), 121.18 (CH), 123.58 (CH), 126.15 (CH), 128.14 (CH), 130.46 (CH), 130.55 (CH), 133.41 (C), 133.49 (C), 136.07 (C), 137.29 (C), 137.53 (C), 143.14 (C), 143.16 (C), 144.39 (C), 163.17 (C).

IR (cm⁻¹): 1656 (C=O), 3344 (NH).

[α]_D: -0.94° (CHCl₃, c = 0.085 g/100mL, t = 30 °C).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(isopinocanfenil-1-il)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Al)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 95:5).

Resa: 72.0%.

Rf: 0.41 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 106-108 °C.

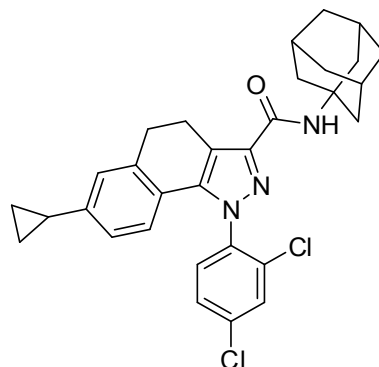
¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.64-0.69 (m, 2H), 0.90-0.98 (m, 2H), 1.10 (s, 3H), 1.16 (dd, 3H, J₁=5.2 Hz, J₂=1.6 Hz), 1.23 (s, 3H), 1.63-1.72 (m, 1H), 1.78-1.87 (m, 2H), 1.90-2.00 (m, 2H), 2.36-2.44 (m, 1H), 2.61-2.71 (m, 1H), 2.92-3.00 (m, 2H), 3.06-3.30 (m, 2H), 4.44-4.54 (m, 2H), 6.41 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.69 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=1.6 Hz), 6.81 (d, 1H, J=8.8 Hz, NH scambia con D₂O), 6.99 (d, 1H, J_m=0.8 Hz), 7.43-7.51 (m, 2H), 7.60 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.45 (CH₂ x2), 15.30 (CH₃), 19.71 (CH₂), 20.87 (CH₃), 23.38 (CH₃), 28.11 (CH), 30.28 (CH₂), 35.21 (CH₂), 37.06 (CH₂), 38.56 (C), 41.68 (CH), 45.90 (CH), 47.34 (CH), 47.89 (CH), 119.87 (C), 121.12 (CH), 123.36 (C), 123.62 (CH), 126.19 (CH), 128.31 (CH), 130.42 (CH), 130.60 (CH), 133.49 (C), 136.31 (C), 137.18 (C), 137.55 (C), 141.36 (C), 143.23 (C), 144.54 (C), 162.08 (C).

IR (cm⁻¹): 1671 (C=O), 3342 (NH).

[α]_D: -1.43° (CHCl₃, c = 0.098 g/100mL, t = 30 °C).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(adamantan-1-il)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39Am)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 95:5).

Resa: 39.7%.

Rf: 0.44 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

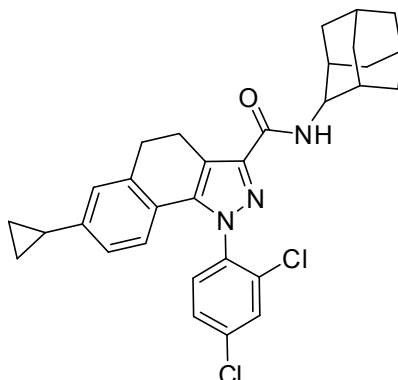
P.f.: 229-230 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.63-0.69 (m, 2H), 0.91-0.97 (m, 2H), 1.66-1.76 (m, 5H), 1.77-1.86 (m, 1H), 2.06-2.18 (m, 10H), 2.90-2.99 (m, 2H), 3.04-3.26 (m, 2H), 6.40 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 6.64-6.71 (m, 2H, NH scambia con D₂O), 6.98 (s, 1H), 7.41-7.48 (m, 2H), 7.59 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.43 (CH₂ x2), 15.29 (CH), 19.73 (CH₂), 29.52 (CH x3), 30.28 (CH₂), 36.44 (CH₂ x3), 41.72 (CH₂ x3), 51.89 (C), 119.67 (C), 121.10 (CH), 123.42 (C), 123.59 (CH), 126.15 (CH), 128.24 (CH), 130.42 (CH), 130.55 (CH), 133.46 (C), 136.20 (C), 137.21 (C), 137.51 (C), 141.32 (C), 143.86 (C), 144.46 (C), 161.88 (C).

IR (cm⁻¹): 1660 (C=O), 3419 (NH).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(adamantan-2-il)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (39An)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 31.1%.

Rf: 0.36 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

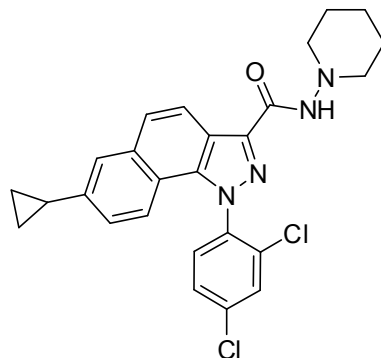
P.f.: 229-230 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.63-0.71 (m, 2H), 0.91-0.98 (m, 2H), 1.61-1.69 (m, 2H), 1.70-1.97 (m, 11H), 2.00-2.10 (s, 2H), 2.88-3.00 (m, 2H), 3.05-3.27 (m, 2H), 4.20-4.28 (m, 1H), 6.42 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.68 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.0 Hz), 6.99 (s, 1H), 7.27 (d, 1H, J=8.4 Hz, NH scambia con D₂O), 7.44 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.0 Hz), 7.48 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.60 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.43 (CH₂ x2), 15.29 (CH), 19.69 (CH₂), 27.21 (CH), 27.30 (CH), 30.30 (CH₂), 32.00 (CH₂ x2), 32.07 (CH), 32.11 (CH), 37.22 (CH₂ x2), 37.60 (CH₂), 52.95 (CH), 119.72 (C), 121.13 (CH), 123.45 (C), 123.60 (CH), 126.18 (CH), 128.18 (CH), 130.47 (CH), 130.52 (CH), 133.48 (C), 136.15 (C), 137.28 (C), 137.50 (C), 141.26 (C), 143.31 (C), 144.45 (C), 161.85 (C).

IR (cm⁻¹): 1666 (C=O), 3417 (NH).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(piperidin-1-il)-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (40Aa)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 7:3).

Resa: 36.5%.

Rf: 0.59 (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

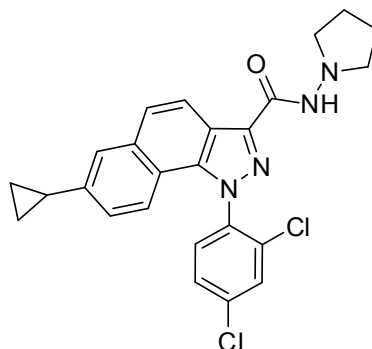
P.f.: 159-162 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.76-0.81 (m, 2H), 1.01-1.06 (m, 2H), 1.42-1.49 (m, 2H), 1.75-1.82 (m 4H), 1.99-2.07 (m, 1H), 2.91 (bs, 4H), 7.05 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.6 Hz), 7.15 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.53-7.55 (m, 2H), 7.60 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=1.6 Hz), 7.71 (d, 1H, J_m=1.6 Hz), 7.75 (s, 1H, NH scambia con D₂O), 8.40 (d, 1H, J_o=8.8 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.61 (CH₂), 9.63 (CH₂), 15.55 (CH), 23.37 (CH₂), 25.43 (CH₂ x2), 57.23 (CH₂ x2), 118.22 (C), 120.43 (C), 120.45 (CH), 120.67 (CH), 124.75 (CH), 124.95 (CH), 125.55 (CH), 128.50 (CH), 130.67 (CH), 130.98 (CH), 133.63 (C), 134.44 (C), 136.88 (C), 137.65 (C), 138.57 (C), 139.77 (C), 143.07 (C), 159.70 (C).

IR (cm⁻¹): 1678 (C=O), 3452 (NH).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(pirrolidin-1-il)-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (40Ab)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

Resa: 34.2%.

Rf: 0.40 (etere di petrolio/acetato di etile 6:4).

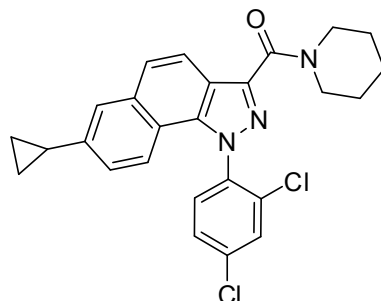
P.f.: 210-212 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.76-0.81 (m, 2H), 1.01-1.06 (m, 2H), 1.89-1.97 (m, 4H), 1.99-2.07 (m, 1H), 3.02-3.10 (m, 4H), 7.06 (dd, 1H, J_o=7.2 Hz, J_m=1.6 Hz), 7.15 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.53-7.55 (m, 2H), 7.60 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.66 (d, 1H, J_m=1.6 Hz), 7.71 (d, 1H, J_m=1.6 Hz), 7.73 (s, 1H, NH scambia con D₂O), 8.41 (d, 1H, J_o=8.8 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.61 (CH₂), 9.63 (CH₂), 15.55 (CH), 22.29 (CH₂ x2), 55.59 (CH₂ x2), 118.22 (C), 120.35 (C), 120.47 (CH), 120.67 (CH), 124.77 (CH), 124.94 (CH), 125.54 (CH), 128.50 (CH), 130.67 (CH), 130.96 (CH), 133.64 (C), 134.44 (C), 136.90 (C), 137.64 (C), 138.57 (C), 139.67 (C), 143.09 (C), 160.58 (C).

IR (cm⁻¹): 1684 (C=O), 3478 (NH).

(7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[g]indazol-3-il)(piperidin-1-il)metanone (40Ae)



Solido bianco. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 58.4%.

Rf: 0.07 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

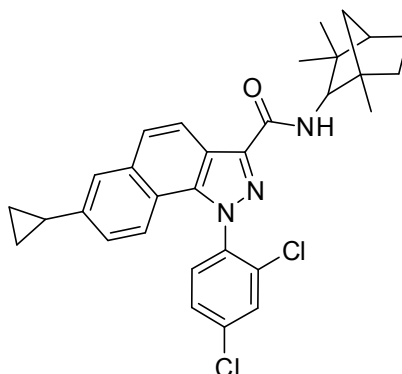
P.f.: 92-95 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.76-0.81 (m, 2H), 1.02-1.07 (m, 2H), 1.58-1.76 (m, 6H), 1.99-2.07 (m, 1H), 3.75-3.94 (m, 4H), 7.05 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.6 Hz), 7.19 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.50 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.0 Hz), 7.53-7.59 (m, 2H), 7.65 (d, 1H, J_m=1.2 Hz), 7.69 (d, 1H, J_m=2.4 Hz), 8.00 (d, 1H, J_o=8.8 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.59 (CH₂), 9.61 (CH₂), 15.55 (CH), 24.73 (CH₂), 25.81 (CH₂), 26.81 (CH₂), 43.55 (CH₂), 48.40 (CH₂), 118.25 (C), 119.71 (CH), 120.82 (C), 120.88 (CH), 124.22 (CH), 124.66 (CH), 125.47 (CH), 128.40 (CH), 130.60 (CH), 131.07 (CH), 133.63 (C), 134.48 (C), 136.55 (C), 137.79 (C), 137.84 (C), 141.79 (C), 142.88 (C), 162.59 (C).

IR (cm⁻¹): 1684 (C=O).

7-Ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-N-(fenchil-1-il)-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossamide (40Ai)



Solido rosa pallido. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 78.7%.

Rf: 0.46 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 118-120 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.76-0.81 (m, 2H), 0.89 (s, 3H), 1.02-1.06 (m, 2H), 1.14 (s, 3H), 1.21 (d, 3H, J=3.6 Hz), 1.25-1.30 (m, 2H), 1.40-1.54 (m, 2H), 1.71-1.77 (m, 2H), 1.79-1.82 (m, 1H), 1.99-2.07 (m, 1H), 3.88-3.93 (m, 1H), 7.06 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=2.0 Hz), 7.13-7.20 (m, 2H, NH scambia con D₂O), 7.53 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.57-7.61 (m, 2H), 7.65 (d, 1H, J_m=1.6 Hz), 7.71 (d, 1H, J_m=2.4 Hz), 8.42 (d, 1H, J_o=8.8 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.58 (CH₂), 9.60 (CH₂), 15.55 (CH₃), 19.80 (CH₃), 21.32 (CH₃), 26.04 (CH₂), 27.38 (CH₂), 31.02 (CH), 39.60 (C), 42.79 (CH₂), 48.21 (CH), 48.69 (C), 63.10 (CH), 118.35 (C), 119.97 (C), 120.60 (CH), 120.73 (CH), 124.65 (CH), 124.74 (CH), 125.50 (CH), 128.34 (CH), 130.59 (CH), 131.09 (CH), 133.56 (C), 134.54 (C), 136.68 (C), 137.86 (C), 138.71 (C), 140.43 (C), 142.87 (C), 163.00 (C).

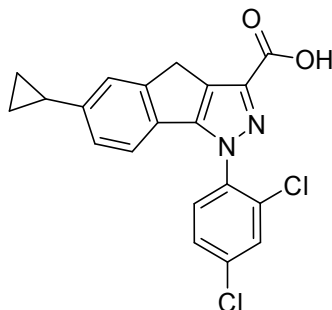
IR (cm⁻¹): 1665 (C=O), 3396 (NH).

[α]_D: -0.75° (CHCl₃, c = 0.080 g/100mL, t = 30 °C).

Metodo generale per la sintesi degli acidi 52A, 52B, 52C, 53A, 54A.

Ad una sospensione del pirazolestere (0.330 mmol) **49A, 49B, 49C, 50A, 51A** in etanolo (1.9 mL) è stata aggiunta una soluzione al 3% di KOH (0.660 mmol, 0.037 g) in etanolo (1.23 mL) ed il tutto è stato fatto refluire per due ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente la soluzione formatasi è stata versata in ghiaccio ed acidificata con HCl concentrato fino a neutralizzazione. Il precipitato è stato filtrato sotto vuoto e lasciato asciugare in stufa.

Acido 6-ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossilico (49A)



Solido marrone.

Resa: 80.4%.

Rf: 0.59 (cloroformio/metanolo 9:1).

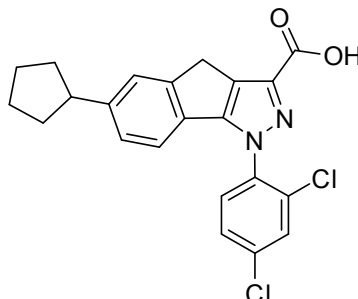
Pf: 230 °C.

¹H-NMR (DMSO, δ ppm): 0.65-0.73 (m, 2H), 0.93-1.00 (m, 2H), 1.92-2.00 (m, 1H), 3.76 (s, 2H), 6.81 (d, 1H, $J_o=8$ Hz), 7.01 (dd, 1H, $J_o=6.8$ Hz, $J_m=1.2$ Hz), 7.32 (s, 1H), 7.72 (dd, 1H, $J_o=6.4$ Hz, $J_m=2.4$ Hz), 7.80 (d, 1H, $J_o=8.4$ Hz), 8.04 (d, 1H, $J_m=2$ Hz), 13.08 (bs, 1H).

¹³C-NMR (DMSO, δ ppm): 9.62 (CH₂ x2), 15.25 (CH), 29.31 (CH₂), 118.32 (CH), 123.34 (CH), 124.31 (CH), 127.96 (C), 128.57 (C), 128.83 (CH), 130.14 (CH), 130.40 (CH), 130.87 (C), 135.25 (C), 135.63 (C), 139.40 (C), 143.18 (C), 149.22 (C), 150.84 (C), 162.89 (C).

IR (cm⁻¹): 1720 (C=O), 3400 (OH).

Acido 6-ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossilico (49B)



Solido marrone.

Resa: 94.4%.

Rf: 0.60 (cloroformio/metanolo 9:1).

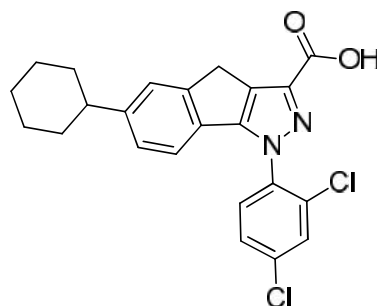
P.f.: 268-270 °C (decompone).

¹H-NMR (DMSO, δ ppm): 1.47-1.83 (m, 8H), 2.95-3.06 (m, 1H), 3.78 (s, 2H), 6.85 (d, 1H, $J_o=8.0$ Hz), 7.17 (d, 1H, $J_o=7.6$ Hz), 7.51 (s, 1H), 7.73 (dd, 1H, $J_o=6.4$ Hz, $J_m=2.0$ Hz), 7.81 (d, 1H, $J_o=8.4$ Hz), 8.05 (d, 1H, $J_m=2.0$ Hz).

¹³C-NMR (DMSO, δ ppm): 25.02 (CH₂ x2), 29.38 (CH₂), 34.35 (CH₂ x2), 45.41 (CH), 118.35 (CH), 125.10 (CH), 125.76 (CH), 128.38 (C), 128.76 (C), 128.83 (CH), 130.15 (CH), 130.40 (CH), 130.90 (C), 135.26 (C), 135.63 (C), 139.41 (C), 145.31 (C), 149.14 (C), 150.85 (C), 162.91 (C).

IR (cm⁻¹): 1718 (C=O), 3434 (OH).

Acido 6-cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossilico (49C)



Solido marrone.

Resa: 85.8%.

Rf: 0.55 (cloroformio/metanolo 9:1).

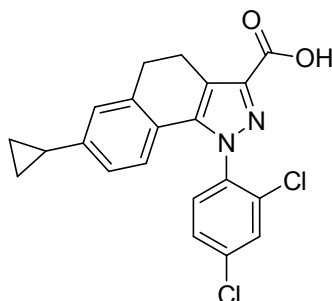
P.f.: 250°C (decomponere)

¹H-NMR (DMSO, δ ppm): 1.39 (s, 4H, J=10.4 Hz), 1.65-1.87 (m, 6H), 2.51 (s, 1H), 3.78 (s, 2H), 6.85 (d, 1H, J_o=8 Hz), 7.14 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.45 (s, 1H), 7.73 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2 Hz), 7.80 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 8.05 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (DMSO, δ ppm): 26.29 (CH₂ x4), 29.35 (CH₂ x2), 33.87 (C x3), 43.91 (CH x2), 118.42 (CH), 124.76 (CH), 128.71 (C), 130.15 (CH x2), 130.41 (CH), 130.94 (C), 135.27 (C), 135.65 (C), 146.16 (C), 149.93 (C), 162.92 (C).

IR (cm⁻¹): 1725 (C=O), 3443 (OH).

Acido 7-ciclopropil-1-(2,4-dichlorofenil)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossilico (50A)



Solido bianco.

Resa: 70.0%.

Rf: 0.36 (cloroformio/metanolo 9:1).

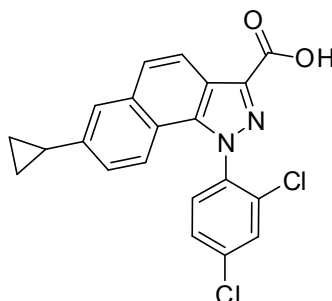
P.f.: 150-152 °C.

¹H-NMR (DMSO, δ ppm): 0.63-0.68 (m, 2H), 0.89-0.95 (m, 2H), 1.79-1.88 (m, 1H), 2.49-2.53 (m, 2H), 2.88-2.95 (m, 2H), 6.34 (d, 1H, $J_o=8.0$ Hz), 6.78 (dd, 1H, $J_o=6.8$ Hz, $J_m=1.6$ Hz), 7.09 (s, 1H), 7.71 (dd, 1H, $J_o=6.0$ Hz, $J_m=2.4$ Hz), 7.77 (d, 1H, $J_o=8.4$ Hz), 8.01 (d, 1H, $J_m=2.4$ Hz).

¹³C-NMR (DMSO, δ ppm): 9.48 (CH₂), 9.50 (CH₂), 14.94 (CH), 19.50 (CH₂), 29.29 (CH₂), 120.08 (C), 120.59 (CH), 122.57 (C), 123.56 (CH), 125.99 (CH), 128.96 (CH), 130.13 (CH), 131.06 (CH), 132.21 (C), 135.55 (C), 136.78 (C), 136.79 (C), 140.35 (C), 140.86 (C), 144.41 (C), 163.36 (C).

IR (cm⁻¹): 1713 (C=O), 3417 (OH).

**Acido 7-ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossilico
(51A)**



Solido rosa pallido.

Resa: 89.3%.

Rf: 0.41 (cloroformio/metanolo 9:1).

P.f.: 262-264 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.74-0.85 (m, 2H), 0.98-1.06 (m, 2H), 2.03-2.11 (m, 1H), 7.10 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.20 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=2.0 Hz), 7.75 (d, 1H, J_o=8.8 Hz), 7.82 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.85 (d, 1H, J_m=1.2 Hz), 7.95 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 8.13 (d, 1H, J_m=2.0 Hz), 8.16 (d, 1H, J_o=8.8 Hz).

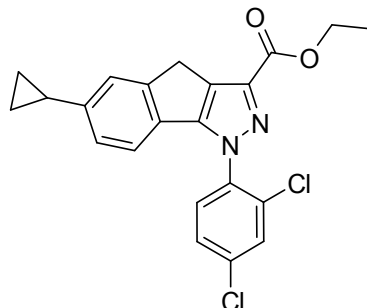
¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.83 (CH₂), 9.89 (CH₂), 15.19 (CH), 117.63 (C), 119.32 (CH), 120.03 (C), 120.19 (CH), 124.96 (CH x2), 125.28 (CH), 129.24 (CH), 130.27 (CH), 131.67 (CH), 132.81 (C), 133.06 (C), 136.17 (C), 137.21 (C), 137.78 (C), 137.91 (C), 143.17 (C), 163.33 (C).

IR (cm⁻¹): 1623 (C=O).

Metodo generale per la sintesi dei pirazolesteri 49A, 49B, 49C.

Ad una sospensione del β -dichetoestere **47A**, **47B**, **47C** (0.80 mmol) in etanolo (5 mL) è stata aggiunta la 2,4-diclorofenilidrazina cloridrato (0.915 mmol). La miscela è stata riscaldata a riflusso per ventiquattro ore. Il precipitato formatosi è stato filtrato sotto vuoto, lavato con etanolo e lasciato asciugare all'aria.

Etil 6-ciclopropil-1-(2,4-dichlorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossilato (49A)



Solido marrone chiaro.

Resa: 94.2%.

Rf: 0.23 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

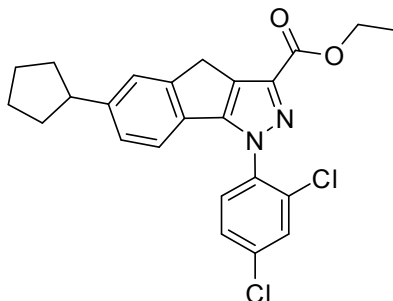
P.f.: 88-91 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.69-0.75 (m, 2H), 0.96-1.03 (m, 2H), 1.44 (t, 3H, J=7.2 Hz), 1.91-1.97 (m, 1H), 3.80 (s, 2H), 4.46 (q, 2H, J=7.2 Hz), 6.88 (d, 1H, J_o=8 Hz), 6.96 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.25 (s, 1H), 7.43 (dd, 1H, J_o=6.4 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.57 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.62 (d, 1H, J_m=2 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.60 (CH₂ x2), 14.45 (CH₃), 15.65 (CH), 29.77 (CH₂), 61.19 (CH₂), 118.90 (CH), 123.47 (CH), 124.43 (CH), 128.11 (CH), 128.70 (C), 129.17 (C), 130.00 (CH), 130.27 (CH), 131.96 (C), 136.06 (C), 136.08 (C), 139.33 (C), 143.69 (C), 149.56 (C), 151.74 (C), 162.36 (C).

IR (cm⁻¹): 1724 (C=O).

Etil 6-ciclopentil-1-(2,4-diclorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazolo-3-carbossilato (49B)



Solido marroncino.

Resa: 84.5%.

Rf: 0.38 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

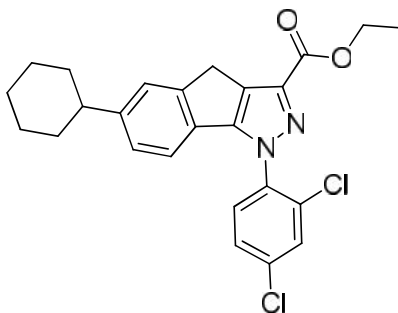
P.f.: 168-170 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.45 (t, 3H, J=7.2 Hz), 1.52-1.87 (m, 8H), 2.98-3.08 (m, 1H), 3.83 (s, 2H), 4.47 (q, 2H, J=7.2 Hz), 6.91 (d, 1H, J_o=7.6 Hz), 7.12 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.41-7.47 (m, 2H), 7.56 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.63 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 14.40 (CH₃), 25.09 (CH₂), 26.86 (CH₂ x2), 29.84 (CH₂), 34.56 (CH₂ x2), 44.77 (CH), 118.94 (CH), 124.81 (CH), 125.52 (CH), 128.08 (CH), 129.04 (C), 129.34(C), 130.03 (CH), 130.28 (CH), 132.04 (C), 136.05 (C x2), 139.33 (C), 147.69 (C), 149.50 (C), 152.35 (C), 162.35 (C).

IR (cm⁻¹): 1737 (C=O).

Etil 6-cicloesil-1-(2,4-diclorofenil)-1,4-diidroindeno[1,2-c]-pirazolo-3-carbossilato (49C)



Solido marron-arancio.

Resa: 97%

Rf: 0.63 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1)

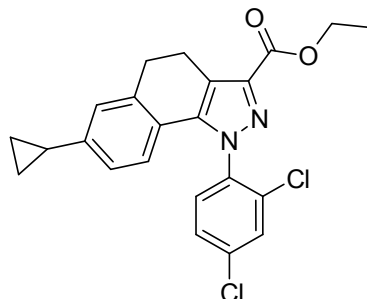
P.f.: 175-178 °C

¹H-NMR (CDCl₃): 1.37-1.49 (m, 8H), 1.87-1.91 (m, 5H); 2.54 (bs, 1H), 3.82 (s, 2H), 4.47 (q, 2H, J=7.2 Hz), 6.92 (d, 1H, J_o=8 Hz), 7.08 (dd, 1H, J_o=8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.43 (dd, 1H, J_o=8.8 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.56 (d, 1H, J_o=8.4Hz), 7.63 (d, 1H, J_m=2.4 Hz).

¹³C-NMR (δ ppm): 14.46 (CH₃), 26.09 (CH₂), 26.86 (CH₂ x2), 29.84 (CH₂), 34.56 (CH₂ x2), 44.77 (CH), 61.19 (CH₂), 118.94 (CH), 124.81 (CH), 125.52 (CH), 128.08 (CH), 129.04 (C), 129.34(C), 129.99 (CH), 130.28 (CH), 132.04 (C), 136.08 (C x2), 139.33 (C), 147.69 (C), 149.49 (C), 151.81 (C), 162.38 (C).

IR (cm⁻¹): 1716 (C=O).

Etil 7-ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-diidro-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossilato (50A)



Ad una sospensione del β -dichetoestere **48A** (0.80 mmol) in etanolo (5 mL) è stata aggiunta la 2,4-diclorofenilidrazina cloridrato (0.915 mmol). La miscela di reazione è stata fatta reagire al microonde per dodici ore a 80 °C a basso assorbimento. Il precipitato formatosi è stato filtrato sotto vuoto, lavato con etanolo fresco e lasciato asciugare all'aria. Il grezzo è stato purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 95:5) per ottenere un solido rosa chiaro.

Resa: 57.5%.

Rf: 0.26 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

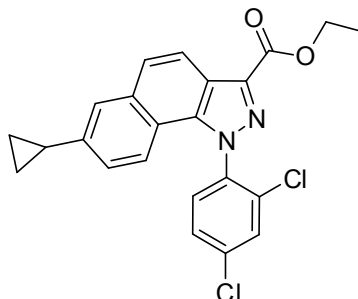
P.f.: 200-205 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.58-0.62 (m, 2H), 0.85-0.91 (m, 2H), 1.35 (t, 3H, J=7.2 Hz), 1.71-1.79 (m, 1H), 2.86-3.14 (m, 4H), 4.37 (qt, 2H, J=7.2 Hz), 6.37 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 6.63 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.0 Hz), 6.93 (d, 1H, J_m=1.6 Hz), 7.35 (dd, 1H, J_o=6.0 Hz, J_m=2.4 Hz), 7.43 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.50 (d, 1H, J_m=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 9.47 (CH₂), 9.48 (CH₂), 14.46 (CH₃), 15.30 (CH), 19.93 (CH₂), 30.12 (CH₂), 60.98 (CH₂), 121.09 (C), 121.19 (CH), 123.17 (C), 123.76 (CH), 126.18 (CH), 128.20 (CH), 130.40 (CH), 130.49 (CH), 133.52 (C), 136.37 (C), 137.13 (C), 137.23 (C), 140.87 (C), 141.18 (C), 144.73 (C), 162.74 (C).

IR (cm⁻¹): 1723 (C=O).

Etil 7-ciclopropil-1-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[g]indazolo-3-carbossilato
(51A)



Ad una soluzione di pirazolestere **50A** (0.469 mmol) in diclorometano (4 mL) è stato addizionato il DDQ (1.97 mmol) e la miscela di reazione è stata lasciata a riflusso per dieci ore. Quindi dopo raffreddamento la fase organica è stata lavata con una soluzione acquosa di NH_4OH al 3%, seccata e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto è stato purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 95:5).

Resa: 75.9%.

Rf: 0.34 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 138-140 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 0.76-0.82 (m, 2H), 1.02-1.08 (m, 2H), 1.51 (t, 3H, $J=6.8$ Hz), 2.00-2.08 (m, 1H), 4.57 (q, 2H, $J=7.2$ Hz), 7.08 (dd, 1H, $J_o=7.2$ Hz, $J_m=1.6$ Hz), 7.19 (d, 1H, $J_o=8.8$ Hz), 7.51 (dd, 1H, $J_o=6.4$ Hz, $J_m=2.0$ Hz), 7.58 (d, 1H, $J_o=8.4$ Hz), 7.64 (d, 1H, $J_o=8.8$ Hz), 7.67-7.69 (m, 2H), 8.24 (d, 1H, $J_o=8.8$ Hz).

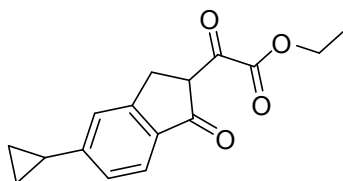
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 9.64 (CH_2), 9.69 (CH_2), 14.52 (CH_3), 15.56 (CH), 61.35 (CH_2), 118.32 (C), 119.73 (CH), 120.71 (CH), 120.80 (C), 125.05 (CH), 125.36 (CH), 125.50 (CH), 128.41 (CH), 130.50 (CH), 131.07 (CH), 133.47 (C), 134.47 (C), 136.93 (C), 137.64 (C), 138.01 (C), 138.55 (C), 143.23 (C), 162.67 (C).

IR (cm^{-1}): 1631 (C=C), 1715 (C=O).

Metodo generale per la sintesi dei β -dichetoesteri 47A, 47B, 47C, 48A.

Ad una soluzione di EtONa [Na° (5.56 mmol, 2 eq) in etanolo assoluto (2.34 mL)], in atmosfera inerte di argon, è stato aggiunto ossalato dietilico (2.78 mmol, 1 eq) e quindi gocciolata una soluzione dell'opportuno chetone **43A**, **43B**, **43C**, **44A** (2.78 mmol, 1 eq) in etanolo assoluto (3.34 mL). La miscela risultante è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per cinque ore al termine delle quali la soluzione è stata versata in ghiaccio ed acidificata con HCl 2N fino a pH neutro. Nel caso di ottenimento di un precipitato quest'ultimo è stato filtrato sotto vuoto ed essiccato all'aria alternativamente l'olietto ottenuto è stato estratto con diclorometano e quindi la fase organica è stata seccata su Na_2SO_4 anidro e concentrata a pressione ridotta.

Etil 2-(5-ciclopropil-1-osso-2,3-diidro-1H-inden-2-il)-2-ossoacetato (47A)



Solido marrone.

Resa: 62.4%.

Rf: 0.28 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

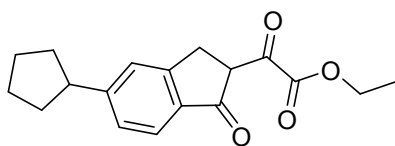
P.f.: 89-91 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.81-0.86 (m, 2H), 1.08-1.15 (m, 2H), 1.43 (t, 3H, J=7.2 Hz), 1.96-2.04 (m, 1H), 3.93 (s, 2H), 4.41 (qt, 2H, J=7.2 Hz), 7.10 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.19 (s, 1H), 7.74 (d, 1H, J_o=8.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 10.92 (CH₂ x2), 14.16 (CH₃), 16.41 (CH), 31.35 (CH₂), 62.13 (CH₂), 116.91 (C), 122.61 (CH), 123.90 (CH), 125.33 (CH), 134.78 (C), 151.06 (C x2), 153.33 (C), 162.85 (C), 198.32 (C).

IR (cm⁻¹): 1609 (C=O), 1661 (C=O), 1728 (C=O).

Etil 2-(5-ciclopentil-1-osso-2,3-diidro-1H-inden-2-il)-2-ossoacetato (47B)



Olio marroncino.

Resa: 97.6%.

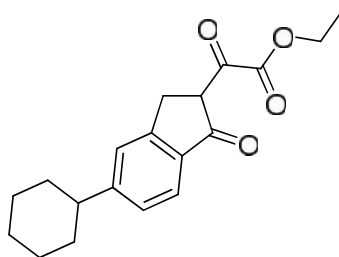
Rf: 0.38 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.43 (t, 3H, J=7.2 Hz), 1.57-1.89 (m, 6H), 2.08-2.16 (m, 2H), 3.05-3.15 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 4.42 (qt, 2H, J=7.2 Hz), 7.32 (d, 1H, J_o=8.4 Hz), 7.40 (s, 1H), 7.77 (d, 1H, J_m=8.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 14.19 (CH₃), 25.65 (CH₂ x2), 31.47 (CH₂), 34.69 (CH₂ x2), 46.58 (CH), 62.17 (CH₂), 116.94 (C), 123.89 (CH), 124.54 (CH), 127.23 (CH), 135.12 (C), 151.06 (C), 153.21 (C), 155.44 (C), 162.88 (C), 198.57 (C).

IR (cm⁻¹): 1612 (C=O), 1663 (C=O), 1725 (C=O).

Etil 2-(5-cicloesil-1-oxo-2,3-diidro-1H-inden-2-il)-2-ossoacetato (47C)



Solido marrone chiaro.

Resa: 88%

Rf: 0.38 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

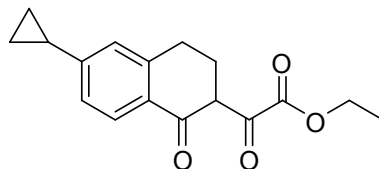
P.f.: 89-90 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): 1.25-1.53 (m, 8H), 1.73-1.95 (m, 5H), 2.56-2.66 (m, 1H), 3.94 (s, 2H), 4.41 (q, 2H, J=4Hz), 7.28 (d, 1H, J_o=7.2Hz), 7.36 (s, 1H), 7.77 (d, 1H, J_o=8Hz).

¹³C-NMR (δ ppm): 14.10 (CH₃), 26.29 (CH₂ x4), 29.35 (CH₂ x2), 46.46 (CH), 62.17 (CH₂), 116.98 (C), 122.87 (CH), 123.50 (CH), 128.23 (CH), 135.12 (C), 151.06 (C), 153.21 (C), 155.44 (C), 162.88 (C), 198.57 (C).

IR (cm⁻¹): 1719 (C=O), 1655 (C=O), 1608 (C=O).

Etil 2-(6-ciclopropil-1-osso-1,2,3,4-tetraidronaftalen-2-il)-2-ossoacetato
(48A)



Olietto marron-arancio. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 81.0%.

Rf: 0.48 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.76-0.86 (m, 2H), 1.02-1.11 (m, 2H), 1.40 (t, 3H, J=7.2 Hz), 1.87-1.96 (m, 1H), 2.81-2.86 (m, 2H), 2.88-2.94 (m, 2H), 4.37 (qt, 2H, J=7.2 Hz), 6.90 (s, 1H), 7.01 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.2 Hz), 7.88 (d, 1H, J_o=8.8 Hz).

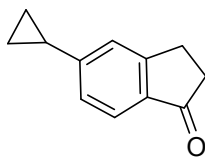
¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 10.56 (CH₂ x2), 14.11 (CH₃), 15.99 (CH), 22.69 (CH₂), 28.19 (CH₂), 61.99 (CH₂), 124.20 (CH), 124.83 (CH), 127.14 (CH), 108.92 (C), 128.81 (C), 142.76 (C), 151.42 (C), 163.10 (C), 168.11 (C), 187.63 (C).

IR (cm⁻¹): 1605 (C=O), 1674 (C=O), 1731 (C=O).

Metodo generale per la sintesi dei chetoni 43A e 44A.

Ad una miscela di bromochetone **41** o **41** (0.948 mmol, 1 eq), acido ciclopropilboronico (1.23 mmol, 1.3 eq), K_3PO_4 (3.32 mmol, 3.5 eq), tricicloesilfosfina (0.095 mmol, 0.1 eq), in toluene (3.3 mL) ed acqua (0.17 mL) è stato aggiunto, in corrente di argon, l'acetato di palladio (0.047 mmol, 0.05 eq). La miscela di reazione è stata agitata per 4 ore a 100 °C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente è stata aggiunta acqua e le due fasi sono state separate: quella acquosa è stata estratta con diclorometano. Le fasi organiche sono state riunite, lavate con acqua e NaCl acquoso saturo e concentrate a pressione ridotta per dare un grezzo che, purificato per flash cromatografia, ha consentito di isolare gli attesi chetoni **43A** e **44A**.

Etil 2-(5-ciclopropil-1-osso-2,3-diidro-1H-inden-2-il)-2-ossoacetato (43A)⁷¹



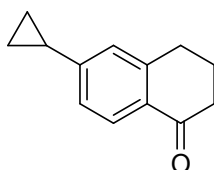
Solido marrone.

Resa: 90%.

Rf: 0.39 (etere di petrolio/acetato di etile 8:2).

P.f.: 57-60 °C (59-62 °C).

6-Ciclopropil-3,4-diidronaftalen-1(2H)-one (44A)



Olietto marrone. Purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

Resa: 63%

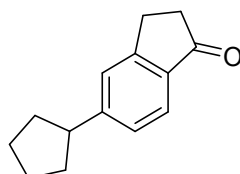
Rf: 0.39 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.75-0.80 (m, 2H), 1.01-1.07 (m, 2H), 1.85-1.94 (m, 1H), 2.11 (qp, 2H, J=6.4 Hz), 2.62 (t, 2H, J=6.4 Hz), 2.91 (t, 2H, J=6.0 Hz), 6.92 (s, 1H), 6.96 (dd, 1H, J_o=6.8 Hz, J_m=1.6 Hz), 7.92 (d, 1H, J_o=8.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 10.28 (CH₂ x2), 15.77 (CH), 23.36 (CH₂), 29.83 (CH₂), 39.11 (CH₂), 123.72 (CH), 125.48 (CH), 127.39 (CH), 130.32 (C), 144.58 (C), 150.68 (C), 198.06 (C).

IR (cm⁻¹): 1669 (C=O).

5-Ciclopentil-2,3-diidro-1H-inden-1-one (43B)



Al cloruro **46B** raffreddato a 0 °C con bagno di ghiaccio, è stato addizionato goccia goccia H₂SO₄ concentrato. La miscela di reazione è stata scaldata a 100 °C per due ore. Una volta raffreddata la soluzione è stata versata in acqua e ghiaccio ed è stata estratta con etere etilico. La fase organica è stata lavata con acqua e NaHCO₃ al 5%, seccata su Na₂SO₄ anidro e concentrato. Il grezzo ottenuto è stato purificato per flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 9:1) così da isolare il chetone **43B** come solido bianco.

Resa: 70%.

Rf: 0.49 (etere di petrolio/acetato di etile 9:1).

P.f.: 37-39 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.57-1.86 (m, 8H), 2.05-2.14 (m, 1H), 2.62-2.68 (m, 2H), 3.09 (t, 2H, J=6.0 Hz), 7.24 (d, 1H, J_o=8.0 Hz), 7.33 (s, 1H), 7.66 (d, 1H, J_o=8.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 25.46 (CH₂ x2), 25.58 (CH₂ x2), 34.48 (CH₂), 36.26 (CH₂), 46.18 (CH), 123.35 (CH), 124.80 (CH), 126.61 (CH), 134.91 (C), 154.38 (C), 155.53 (C), 206.47 (C).

IR (cm⁻¹): 1665 (C=O).

PARTE SPERIMENTALE

BIOLOGICA

Procedure generali

Per il binding recettoriale sono state impiegate membrane che esprimono recettori cannabinoidi umani (RBHCB1M400UA per CB1 e RBXCB2M400UA per CB2, Perkin Elmer).

Gli esperimenti di binding sono stati eseguiti in piastre da 96 pozzetti (Deepwell StorPlate per CB1 e OptiPlate per CB2, Perkin Elmer) che sono state filtrate su filtri GF/C (Printed Filtermat A x 1450 Microbeta, Perkin Elmer).

Come scintillatore solido sono stati adoperati fogli di MeltiLex A (Perkin Elmer) mentre la conta della radioattività è stata effettuata con un contatore Microbeta Trilux 1450 LSC&Luminescence Counter, Perkin Elmer).

Le colture cellulari sono state maneggiate in condizioni di sterilità con materiali sterili all'interno di una cappa a flusso laminare verticale dotata di filtro HEPA.

Le cellule sono state coltivate in un incubatore Heraus (Heracell).

La concentrazione di prostaglandina E2 è stata determinata attraverso il kit ELISA DetectX Prostaglandin E2 Enzyme ImmunoAssay kit (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA). Tutto il materiale ed i reattivi sono stati forniti con il kit. Le letture di assorbanza sono state eseguite con l'apparecchio Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Electron Corp, Waltham, MA, USA).

Tutti i reagenti necessari per la realizzazione dei saggi biologici sono stati acquistati da fornitori specializzati.

Saggi di binding recettoriale.

Al fine di valutare l'affinità per i recettori cannabinergici CB1 e CB2 sono stati selezionati alcuni dei nuovi prodotti sintetizzati (**38Aa**, **38Ab**, **38Ad**, **38Ae**, **38Ah**, **38Ai**, **38Am**, **38Ca**, **38Cb**, **38Ci**, **39Ag**, **39Ai**, **40Aa**, **40Ab** e **40Ae**) per sottoporli a binding recettoriale.

I saggi di binding sono stati realizzati in placche da 96 pozzetti in ciascuno dei quali è stato aggiunto:

- il tampone del saggio;
- il composto da analizzare alla concentrazione corrispondente;
- il CP-55940 (**16**) marcato radioattivamente con ^3H a una concentrazione costante;
- la membrana cellulare che sovraesprime il recettore desiderato (CB1 o CB2).

Inoltre in ogni singolo esperimento è stata misurata:

- la massima percentuale di unione del ^3H -CP al recettore senza interferenze da parte di altri ligandi cannabinergici;
- l'unione non specifica del ^3H -CP a qualsiasi altra cosa che non sia il recettore attraverso l'aggiunta dell'agonista WIN-55212 (**7**) ad una concentrazione saturante di 10 μM ;
- la radioattività esatta della placca.

Di tutti i composti analizzati sono state preparate le soluzioni stock in DMSO ad una concentrazione di 100 mM, 50 mM o 10 mM in modo che nel saggio di binding non venisse superato lo 0.1% di DMSO. A partire dalle soluzioni stock sono state realizzate le diluizioni seriali usando come solvente il tampone di incubazione del saggio.

Binding sul recettore CB1

Per i saggi di binding sul recettore CB1 sono state impiegate placche da 200 μL precedentemente siliconizzate. A 160 μL di tampone di incubazione a pH 7.4 (Tris-HCl 50 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM, EDTA 2.5 mM, albumina di siero bovino (BSA) 0.5 mg/mL) sono stati aggiunti 20 μL di una soluzione 0.4 mM o 100 μM del prodotto in esame (nello screening primario) o 20 μL di una serie di soluzioni da 10^{-5} M a 10^{-11} M del composto da analizzare (nello screening secondario) quindi 20 μL di una soluzione di ^3H -CP ad una concentrazione uguale a 0.8 per la K_d (costante di dissociazione del ligando per la membrana utilizzata), 20 μL di membrana CB1 ad una concentrazione 1:20 della soluzione stock. La

placca è stata incubata a 30 °C sotto costante agitazione per 90 minuti al termine dei quali è stata filtrata su un filtro preventivamente trattato con una soluzione di polietilenimina allo 0.05% e lavata con il tampone di incubazione. Il filtro è stato seccato in stufa, ricoperto con il liquido di scintillazione e dunque analizzato dal programma Microbeta per la conta delle disintegrazioni per minuto (dpm) attraverso la quale è stato possibile determinare la percentuale di unione nello screening primario o la percentuale di spiazzamento nello screening secondario.

Binding sul recettore CB2

I saggi di binding sul recettore CB2 sono stati eseguiti in placche da 600 µL preventivamente siliconizzate. A 540 µL di tampone di incubazione a pH 7.5 (Tris·HCl 50 mM, MgCl₂·6H₂O 5 mM, EGTA 2.5 mM, BSA 1mg/mL) sono stati addizionati 20 µL di una soluzione 0.4 mM o 100 µM del prodotto in esame (nello screening primario) o 20 µL di una serie di soluzioni da 10⁻⁵ M a 10⁻¹¹ M del composto da analizzare (nello screening secondario), quindi 20 µL di una soluzione di ³H-CP ad una concentrazione uguale a 0.8 per la K_d, 20 µL di membrana CB2 diluita 1:20 rispetto alla soluzione stock. Dopo aver preparato la placca per l'incubazione si è proceduto secondo quanto descritto per il binding sul recettore CB1.

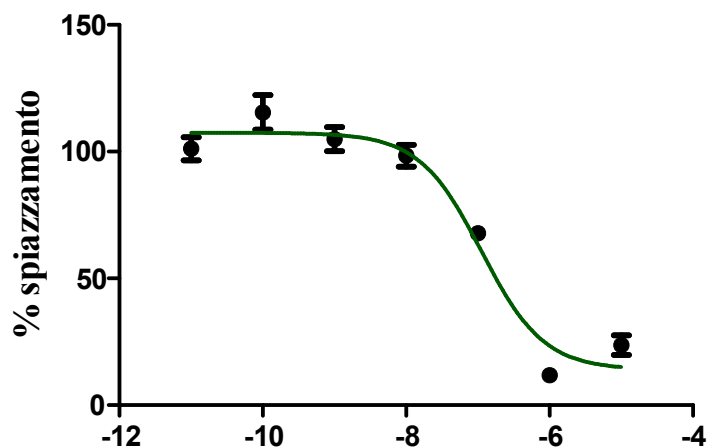
I valori di percentuale di unione ai recettori CB1 e CB2 dei composti analizzati sono riportati nella Tabella 3. I prodotti che hanno esibito una percentuale d'unione maggiore al 60% sono stati selezionati per uno screening secondario che consiste in un saggio di competizione tra il composto in esame a sette diverse concentrazioni (da 10⁻⁵ M a 10⁻¹¹ M) ed il ³H-CP ad una concentrazione costante uguale a 0.8 per la K_d. I dati ottenuti dal programma Microbeta sono stati analizzati attraverso il programma Graphpad che ha consentito di costruire le curve della percentuale di spiazzamento del ³H-CP esercitato dal prodotto analizzato in funzione della concentrazione del nuovo ligando cannabinergico. Dal punto di flesso di tale curva è stato possibile estrapolare il valore della K_i dei nuovi composti.

Tabella 3: Percentuale di unione ai recettori CB1 e CB2 per i composti analizzati.

COMPOSTO	% unione CB1	% unione CB2
38Aa (40 μ M)	77.4	64.4
38Ab (40 μ M)	74.3	97.6
38Ad (40 μ M)	88.5	96.8
38Ae (10 μ M)	57.3	93.2
38Ah (40 μ M)	39.1	61.0
38Ai (40 μ M)	49.1	78.0
38Am (10 μ M)	45.4	92.5
38Ca (10 μ M)	33.9	62.4
38Cb (40 μ M)	33.6	60.3
38Ci (10 μ M)	32.2	45.9
39Ag (10 μ M)	46.6	51.6
39Ai (40 μ M)	48.3	68.0
40Aa (40 μ M)	71.8	30.2
40Ab (40 μ M)	55.0	30.2
40Ae (40 μ M)	32.3	55.2

A seguire si riportano le curve semilogaritmiche di concentrazione-percentuale di spiazzamento dei composti che sono saggiati nello screening secondario.

38Aa-CB1

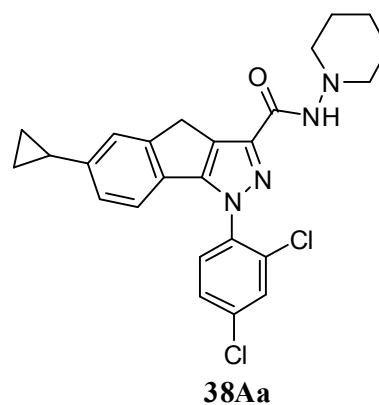


log concentrazione (M)

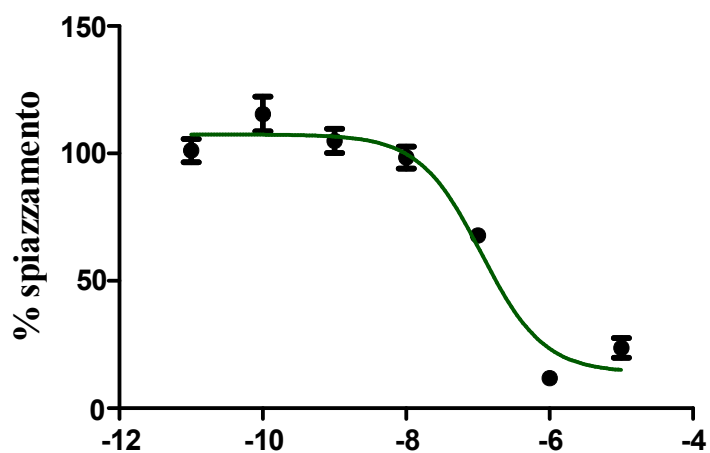
K_i CB1: $1,852 \cdot 10^{-6}$

Deviazione Standard: $8,214 \cdot 10^{-7}$

Errore Standard: $4,743 \cdot 10^{-7}$



38Aa-CB2

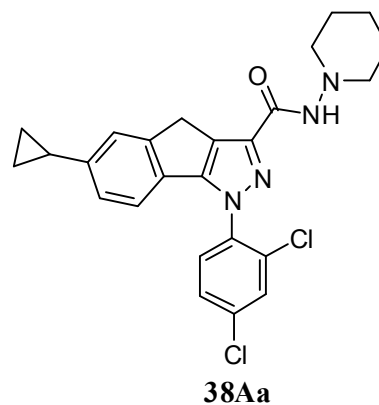


log concentrazione (M)

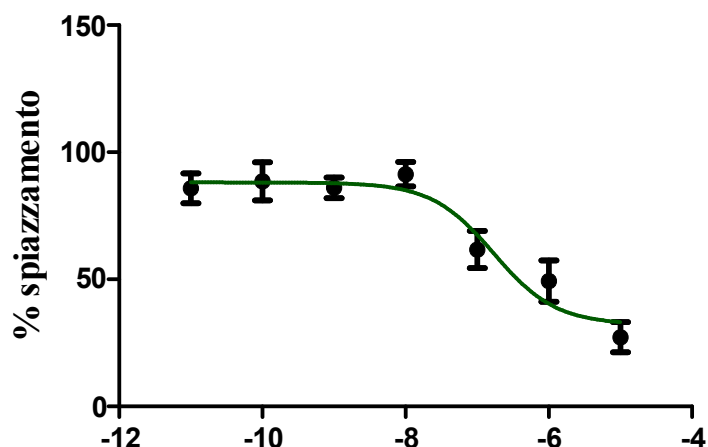
K_i CB2: $6,943 \cdot 10^{-8}$

Deviazione Standard: $5,511 \cdot 10^{-9}$

Errore Standard: $2,755 \cdot 10^{-9}$



38Ab-CB1

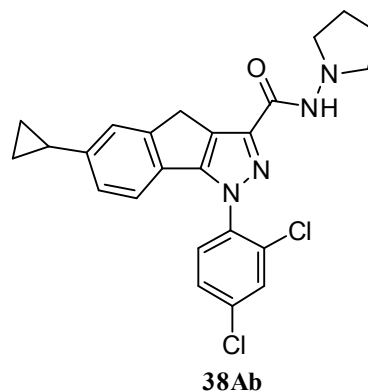


log concentrazione (M)

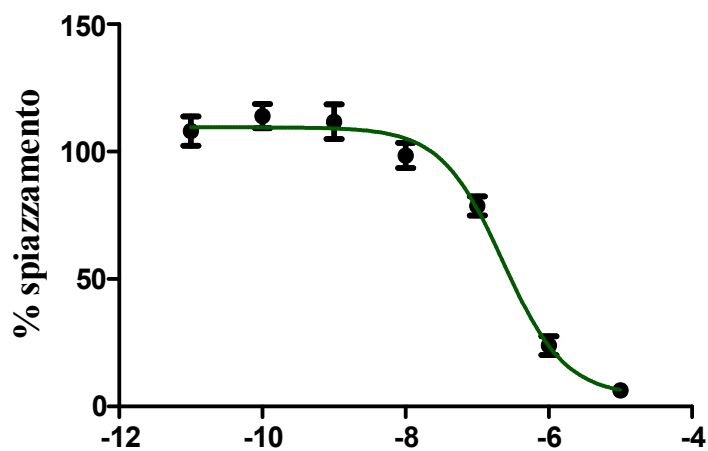
K_i CB1: $1,021 \cdot 10^{-6}$

Deviazione Standard: $1,710 \cdot 10^{-6}$

Errore Standard: $8,550 \cdot 10^{-7}$



38Ab-CB2

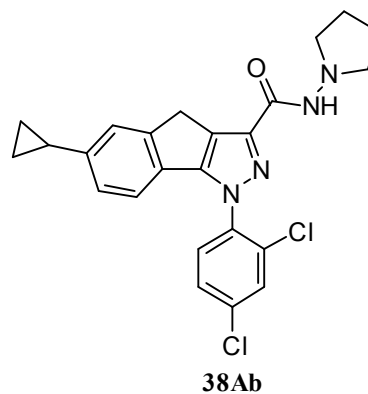


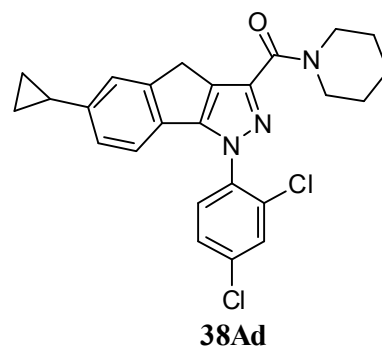
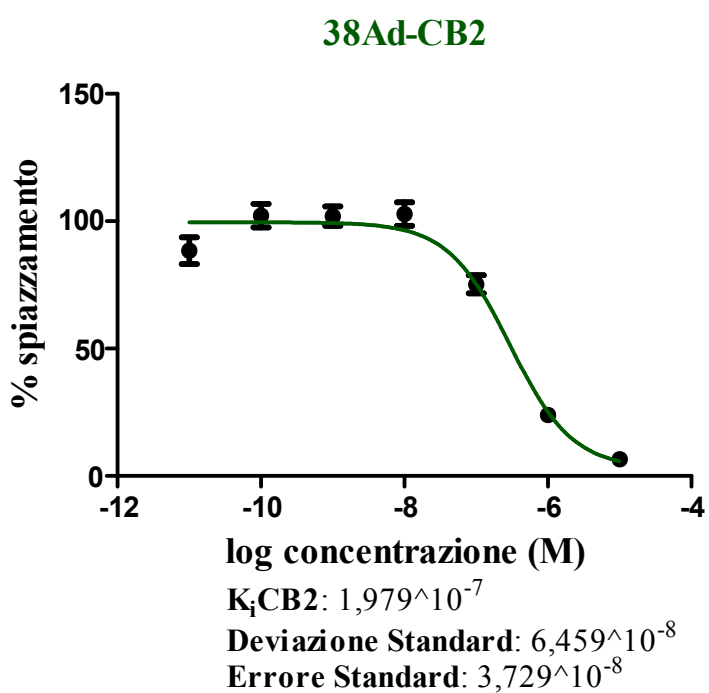
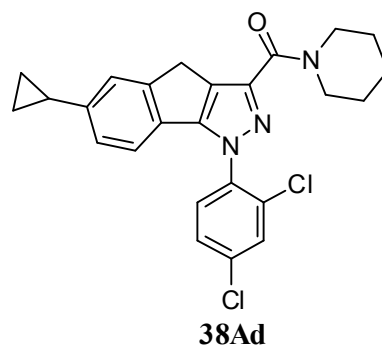
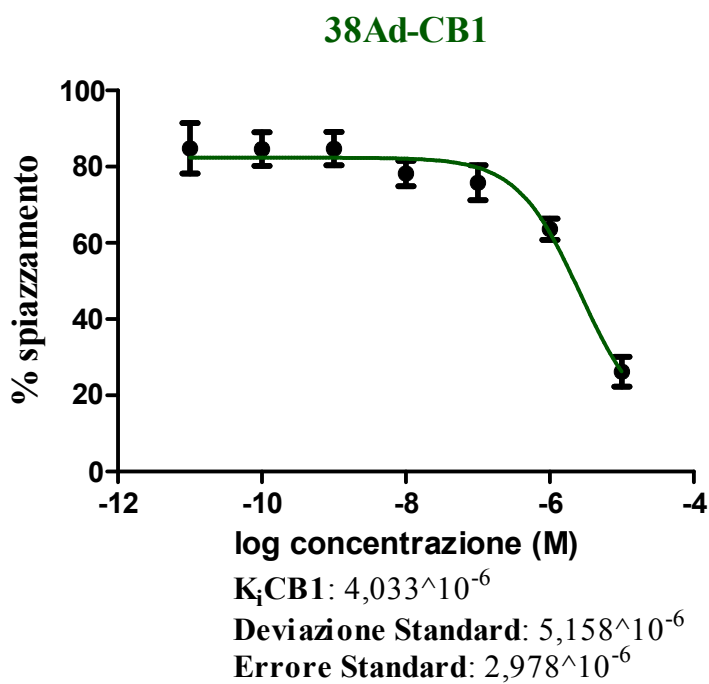
log concentrazione (M)

K_i CB2: $1,521 \cdot 10^{-7}$

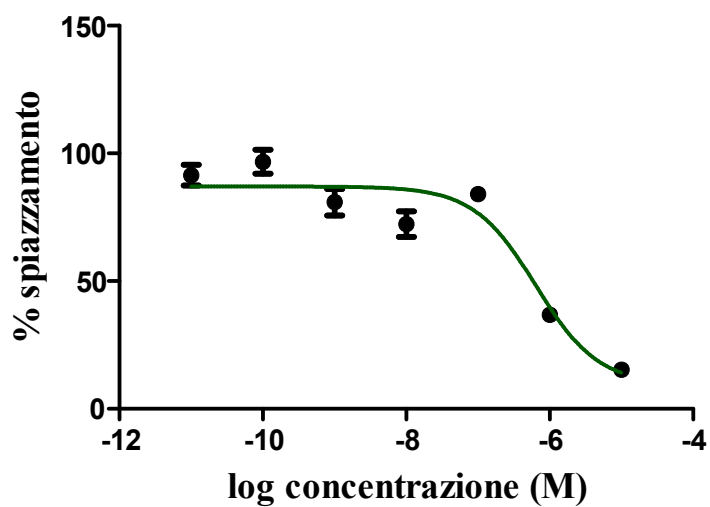
Deviazione Standard: $5,447 \cdot 10^{-8}$

Errore Standard: $2,723 \cdot 10^{-8}$





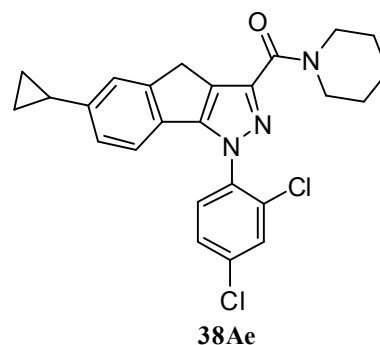
38Ae-CB2



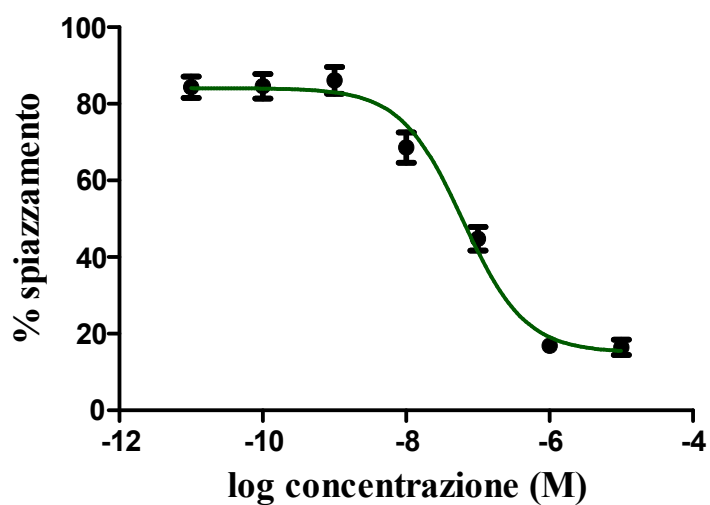
K_i CB2: $4,137 \cdot 10^{-7}$

Deviazione Standard: $1,156 \cdot 10^{-7}$

Errore Standard: $6,674 \cdot 10^{-8}$



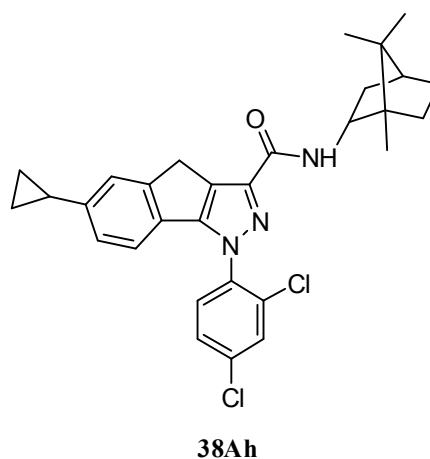
38Ah-CB2



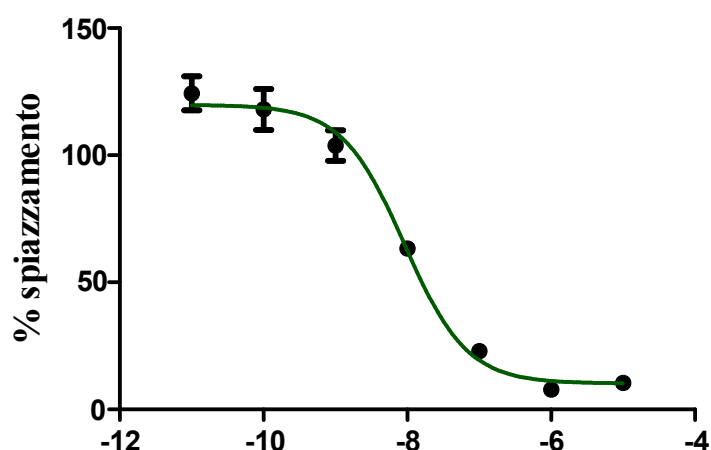
K_i CB2: $3,769 \cdot 10^{-8}$

Deviazione Standard: $1,657 \cdot 10^{-8}$

Errore Standard: $9,564 \cdot 10^{-9}$



38Ai-CB2

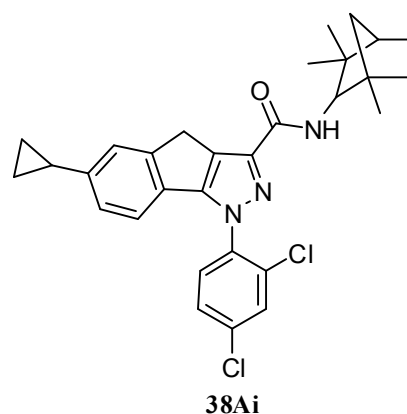


log concentrazione (M)

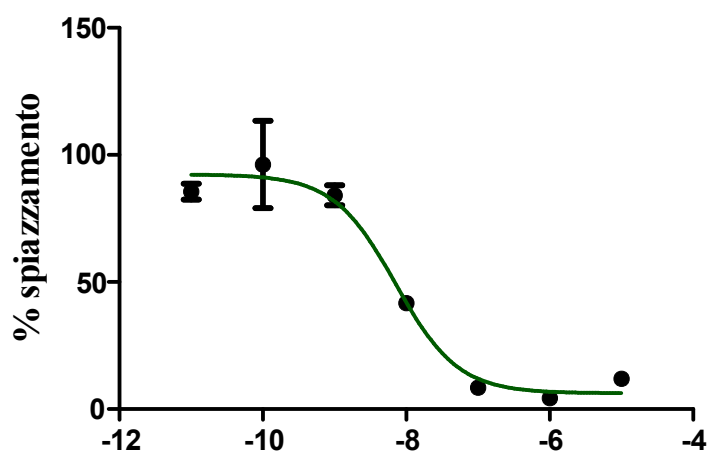
K_i CB2: $5,758 \cdot 10^{-9}$

Deviazione Standard: $2,585 \cdot 10^{-9}$

Errore Standard: $1,492 \cdot 10^{-9}$



38Am-CB2

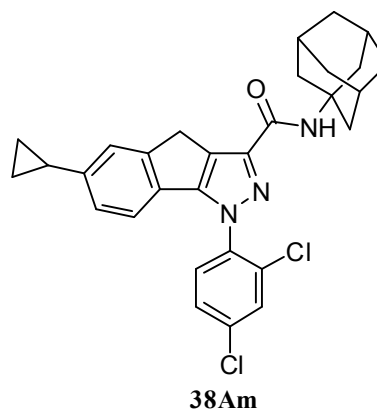


log concentrazione (M)

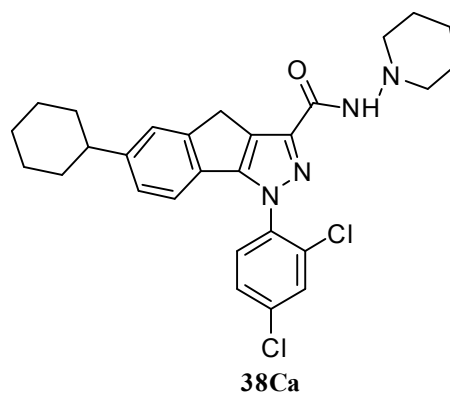
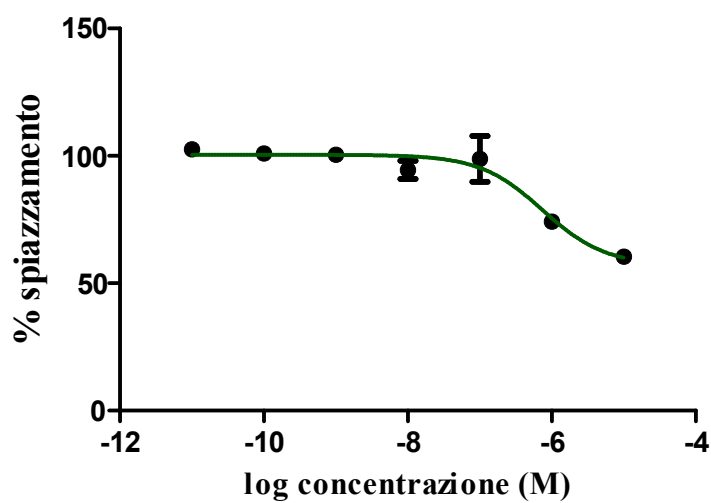
K_i CB2: $4,479 \cdot 10^{-9}$

Deviazione Standard: $1,143 \cdot 10^{-9}$

Errore Standard: $6,596 \cdot 10^{-10}$



38Ca-CB2

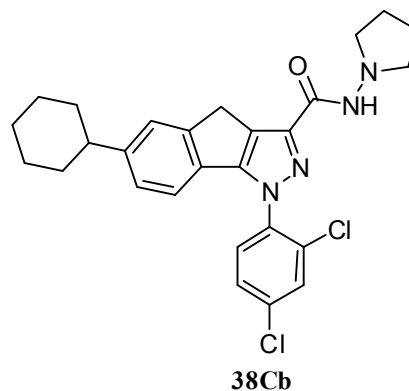
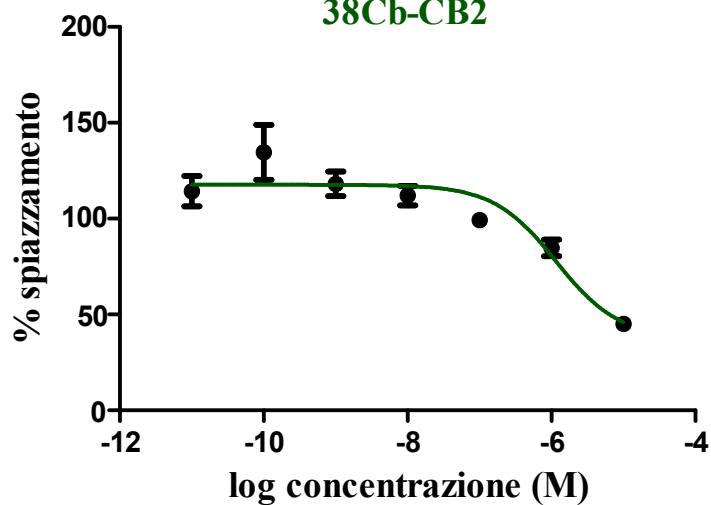


K_i CB2: $6,852 \cdot 10^{-7}$

Deviazione standard: $3,752 \cdot 10^{-7}$

Errore standard: $2,53 \cdot 10^{-7}$

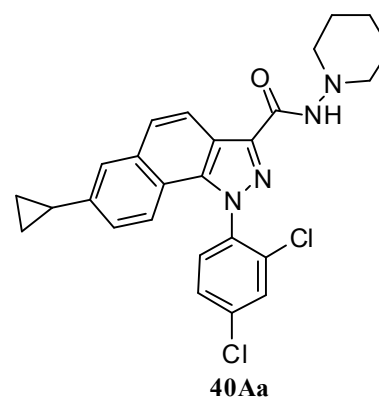
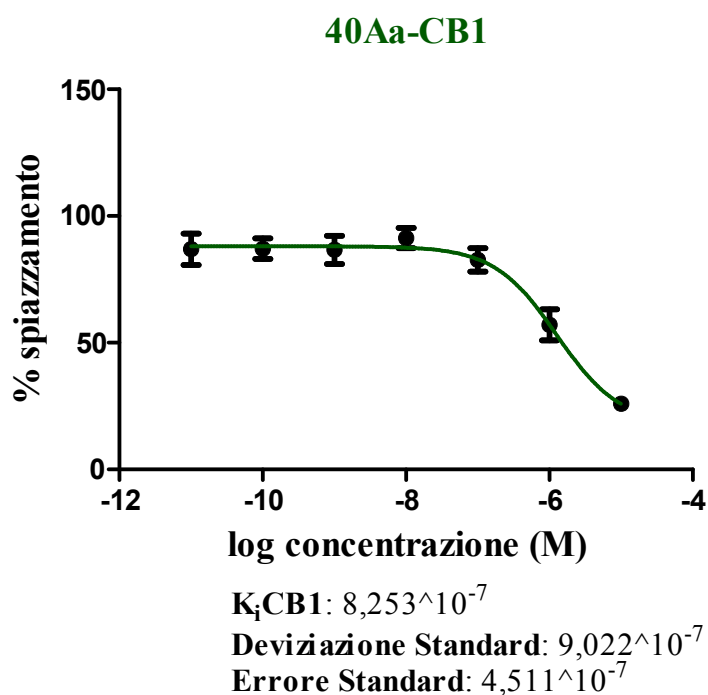
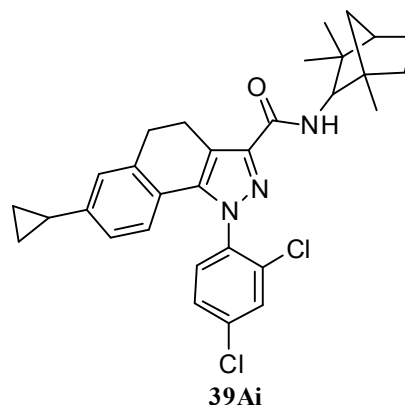
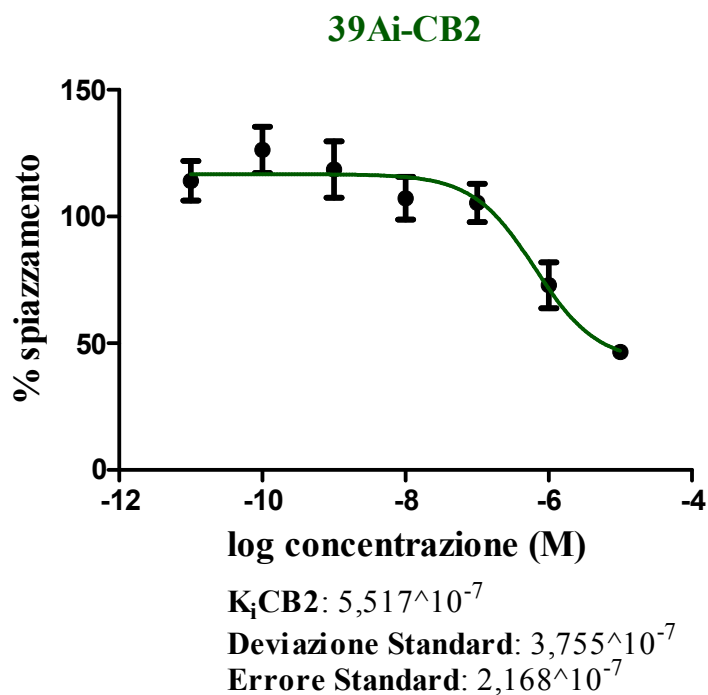
38Cb-CB2



K_i CB2: $5,151 \cdot 10^{-7}$

Deviazione standard: $7,766 \cdot 10^{-7}$

Errore standard: $4,484 \cdot 10^{-7}$



Per i composti **38Aa** (K_i CB2 = 69.43 nM), **38Ah** (K_i CB2 = 37.69 nM), **38Ai** (K_i CB2 = 5.76 nM) e **38Am** (K_i CB2 = 4.48 nM), che hanno esibito valori di K_i per il recettore CB2

inferiori a 100 nM, è stato definito il profilo funzionale di agonismo, antagonismo o agonismo inverso attraverso colture cellulari in vitro.

Saggio di neuroinfiammazione con LPS: determinazione dell'attività intrinseca sul recettore CB2.

Al fine di determinare l'attività intrinseca sul recettore CB2 dei composti **38Aa**, **38Ah**, **38Ai** e **38Am** è stato valutato il loro effetto sulla produzione di prostaglandina E2 (PGE2) in una reazione di neuroinfiammazione indotta per esposizione di cellule microgliali BV-2 di topo al lipopolisaccaride (LPS).

Le cellule BV2 sono state coltivate in fiasche da 75 cm² in 12 mL di mezzo completo "Dulbecco's modified Eagle Medium" (DMEM: 4.5 mg/L di glucosio privo di L-glutamina) addizionato dell'1% di L-glutamina, 10% di siero fetale bovino (FBS) e dell'1% di antibiotico (ampicillina-streptomicina) a 37 °C al 5% di CO₂ in un incubatore modificato fino all'80% di confluenza.

Prima di usare le cellule nell'esperimento sono stati eseguiti almeno due passaggi.

Ciascuna determinazione del saggio è stata realizzata in triplicato e l'esperimento completo è stato ripetuto tre volte in giorni diversi.

Il saggio si è articolato in quattro distinte fasi:

1. *Semina delle cellule*. Le piastre da dodici pozzetti sono state preventivamente trattate con una soluzione di poli-(L)-ornitina 15 µg/mL in tampone fosfato salino sterile (PBS: phosphate buffer saline) per almeno quattro ore per favorire l'adesione cellulare, lavate per tre volte con acqua distillata e fatte asciugare all'interno dell'incubatore. Le cellule sono state seminate in 1 mL di terreno di coltura completo ad una densità di 500000 cellule per pozzetto. Per la conta cellulare è stato eseguito il test della viabilità cellulare usando la camera di Neubauer e il Trypan Blue. La sospensione cellulare è stata diluita 1:10 in Trypan Blue e 10 µL di quest'ultima soluzione sono stati posti all'interno della camera: le cellule morte appaiono blu quelle vive riflettono la luce. Sono state contate le cellule vive di ogni quadrante e la media, moltiplicata per il fattore 10⁵, ha fornito il numero di cellule per millilitro di sospensione cellulare. Una volta avvenuta la semina delle cellule, le piastre sono state centrifugate a 800 rpm per cinque minuti a 4 °C ed incubate per sedici ore.
2. *Trattamento*. Le piastre sono state centrifugate a 800 rpm per cinque minuti a 4 °C. Quindi il terreno di coltura completo (FBS 10%) è stato sostituito con il mezzo FBS

1% e le piastre sono state poste nell'incubatore per un'ora. A questo punto è stato aggiunto l'antagonista/agonista inverso SR 144528 (**32**) o il composto da analizzare (**38Aa**, **38Ah**, **38Ai**, **38Am**). Le cellule sono state incubate per un'altra ora al termine della quale sono state trattate con l'agonista WIN 55212-2 (**7**) o il nuovo ligando cannabinergico (**38Aa**, **38Ah**, **38Ai**, **38Am**). Dopo un'ulteriore ora di incubazione è stata aggiunta la soluzione di tossina batterica (LPS di Escherichia Coli) 1 µg/mL in FBS 1% in tutti i pozzetti eccezion fatta per quelli del controllo DMSO (Tabella 4). Le piastre sono state lasciate nell'incubatore per sedici ore.

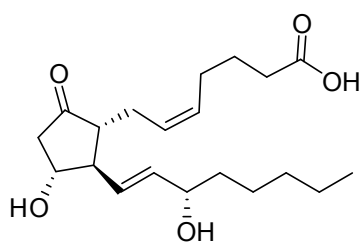
Tabella 4: Condizioni sperimentali di ogni esperimento. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

PIASTRA 1	PIASTRA 2	PIASTRA 3	PIASTRA 4
CONTROLLO DMSO 2 µL DMSO	TRATTAMENTO 38Aa 1 µL DMSO 1 µL 38Aa 691 µM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Ah + WIN 1 µL 38Ah 377 µM 1 µL WIN 10 mM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Ai + SR2 1 µL SR2 ^a 10 mM 1 µL 38Ai 5.76 µM 10 µL LPS 100 µg/mL
CONTROLLO LPS 2 µL DMSO 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Aa + WIN 1 µL 38Aa 691 µM 1 µL WIN 10 mM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Ah + SR2 1 µL SR2 ^a 10 mM 1 µL 38Ah 377 µM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Am 1 µL DMSO 1 µL 38Am 44.8 µM 10 µL LPS 100 µg/mL
CONTROLLO WIN 1 µL DMSO 1 µL WIN 10 mM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Aa + SR2 1 µL SR2 ^a 10 mM 1 µL 38Aa 691 µM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Ai 1 µL DMSO 1 µL 38Ai 5.76 µM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Am + WIN 1 µL 38Am 44.8 µM 1 µL WIN 10 mM 10 µL LPS 100 µg/mL
CONTROLLO SR2 1 µL SR2 ^a 10 mM 1 µL WIN 10 mM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Ah 1 µL DMSO 1 µL 38Ah 377 µM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Ai + WIN 1 µL 38Ai 5.76 µM 1 µL WIN 10 mM 10 µL LPS 100 µg/mL	TRATTAMENTO 38Am + SR2 1 µL SR2 ^a 10 mM 1 µL 38Am 44.8 µM 10 µL LPS 100 µg/mL

^aSR2 = SR 144528

3. Raccolta cellule. Il terreno di coltura, in cui è stata liberata la PGE₂, è stato trasferito da ciascun pozzetto in tubi eppendorf da 1.5 mL e quindi centrifugato a 13000 rpm per dieci minuti a 4 °C così da far precipitare i corpi cellulari. Il supernatante è stato separato dal pellet e congelato a -80 °C. Tutti i pozzetti delle piastre sono stati trattati con 200 µL di tampone RIPA (PBS 1%, nonilfenossipolietossietanolo (NP-40) 1%, deossicolato sodico 0.5%, sodio dodecil solfato (SDS) 0.1%, fenilmetansolfonil fluoruro (PMSF) 1 mM in acqua milli-Q) e raschiato. Il RIPA di ogni pozzetto è stato aggiunto al pellet dell'eppendorf corrispondente così da lisare i corpi cellulari e liberare il materiale proteico e quindi centrifugato a 13000 rpm per dieci minuti a 4 °C. Il pellet è stato scartato ed il supernatante congelato a -20 °C.

4. Determinazione quantitativa PGE₂. Per valutare l'effetto dei nuovi ligandi cannabinergici sulle cellule BV-2 esposte all'azione dell'LPS è stata misurata la

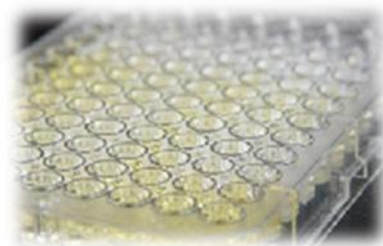


PGE₂

concentrazione di PGE₂ liberata nelle varie condizioni sperimentali attraverso un saggio immuno-assorbente legato ad un enzima (ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) competitivo. Per la realizzazione dell'ELISA sono state usate piastre da novantasei pozzetti dotati di un fondo chiaro per poter facilmente

misurare la densità ottica con strumenti specifici. Le piastre fornite nel kit sono state pretrattate con un anticorpo (l'anticorpo primario) anti-IgG di topo. Dopo aver eseguito delle prove con alcune diluizioni dei campioni di PGE₂ dell'esperimento ed aver costruito una retta di taratura dei valori di assorbanza vs concentrazione di soluzioni standard di PGE₂ si è stabilito di diluire i campioni contenenti solo cellule 1:10 e tutti gli altri 1:20 con FBS 1%. Nella piastra sono stati pipettati 100 µL di ciascun campione dell'esperimento, 125 µL e 100 µL di tampone del saggio diluito 1:5 con acqua deionizzata rispettivamente nei pozzetti dell'unione aspecifica e dell'unione massima, 25 µL del coniugato PGE₂-perossidasi in ciascun pozzetto e 25 µL di anticorpo monoclonale per la PGE₂ (anticorpo secondario) in tutti i pozzetti eccetto in quelli dell'unione inespecifica. La piastra è stata coperta con una pellicola di plastica e lasciata ad incubare sotto agitazione a temperatura ambiente per due ore. Ogni pozzetto è stato lavato quattro volte con 300 µL di tampone di lavaggio diluito 1:20 con acqua deionizzata per eliminare l'eccesso di coniugato che non si è legato e quindi trattato con 100 µL di TMB-substrato (il substrato per l'enzima perossidasi

coniugato alla PGE2). La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per trenta minuti durante i quali è avvenuta la reazione enzimatica tra la perossidasi coniugata alla PGE2 e il substrato, apprezzabile dalla comparsa di una colorazione azzurra ($A_{\max} = 370 \text{ nm}$ e 652 nm). Tale reazione è stata interrotta per aggiunta di $50 \mu\text{L}$ della soluzione stop HCl 1M in ogni pozzetto che ha provocato un viraggio di colore dal blu al giallo ($A_{\max} = 450 \text{ nm}$) la cui intensità è inversamente proporzionale alla concentrazione di PGE2. L'assorbanza del contenuto di ogni pozzetto è stata letta alla lunghezza d'onda di 450 nm attraverso l'apparecchio Varioskan Flash Multimode Reader che è uno spettrofotometro dotato di un sistema di filtri che permette la lettura ad un'unica lunghezza d'onda. I risultati sono stati analizzati mediante il software Graphpad Prism 5 capace di generare una curva logistica a quattro parametri (4 PLC) dei dati di assorbanza. I risultati sono stati espressi in microgrammi di PGE2 per millogrammo di proteina. L'analisi statistica One-way ANOVA e quella di varianza Student-Newman-Keuls Test sono state effettuate mediante l'impiego del software Graphpad Prism 5.



RISULTATI E DISCUSSIONE

L'obiettivo di questa tesi di Dottorato era di preparare le serie di pirazoli triciclici **38A**, **38B**, **38C**, **39A**, **40A** e di misurare la loro CB affinità. Si riteneva che la strategia di introdurre un residuo cicloalchilico nella piattaforma triclopirazolica di **34a** e **34b**, per formare nuovi analoghi cicloalchilsostituiti, potesse portare a composti con bassi valori di affinità per i sottotipi recettoriali dei cannabinoidi.

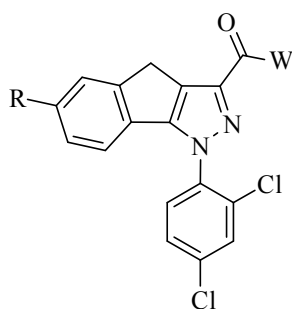
In generale, la più alta affinità è mostrata dai ligandi che hanno il sistema triciclico indenopirazolico unito ad un ciclopropile rispetto ai derivati che hanno come scaffold triciclico l'anello diidrobenczo[g]indazolico o benzo[g]indazolico.

Ai fini della presentazione delle correlazioni struttura-attività il termine fondamentale **38Aa**, che ha in C-3 una carbamoilpiperidina, in C-6 un ciclopropile e in N-1 un diclorofenile ed è caratterizzato da una CB1 affinità di 1852 nM e una CB2 affinità di 69.4 nM, viene utilizzato come conveniente riferimento per tutti gli altri derivati sintetizzati. Al pari di **38Aa**, i composti **38Ab** e **38Ad** hanno gruppi idrazidici contenenti un residuo pirrolidinico e morfolinico rispettivamente: i loro valori di K_i indicano che essi hanno minore affinità (2.2 e 2.8 volte inferiore) per il recettore CB2 rispetto a **38Aa** e nessuna significativa affinità per il recettore CB1 ($K_i > 40000$). I composti **38Ae**, **38Ah**, **38Ai** e **38Am** hanno un'ammide sostituita al posto della funzione carbamoilica di tipo idrazidico. Il piperidil derivato **38Ae** ha la più bassa CB2 affinità tra i quattro ammido-analoghi con una K_i circa 6 volte superiore rispetto a quella del termine di riferimento **38Aa**. La presenza sulla funzione carbamoilica di un'unità azotata di dimensione maggiore e forma diversa ha interessanti effetti sulla CB affinità e selettività. L'ammide **38Ah** con una funzione azotata di tipo bornilico esprime una modesta affinità per i recettori CB2 e nessuna CB1 affinità. Il fenchil derivato **38Ai** mostra un'elevata affinità recettoriale per CB2 e possiede un rapporto di CB2/CB1 selettività di 1061. Il composto adamantil-sostituito **38Am** dimostra un profilo di binding simile a quello di **38Ai** con una CB2 affinità pari a 4.48 nM e nel contempo esprime la più alta selettività ($K_iCB2/K_iCB1 = 2232$) (Tabella 5).

L'introduzione del pendaglio cicloesilico ha un drastico effetto sulla CB1 affinità con valori di $K_i > 10000$. Per contro i ligandi **38Ca** e **38Cb** presentano una CB2 affinità approssimativamente di 500 nM (Tabella 5).

Mentre a prima vista potrebbe apparire curioso osservare una così ampia diminuzione nella affinità per ciò che è apparentemente soltanto un piccolo cambiamento strutturale, l'introduzione del cicloesile evidentemente ha un effetto significativo sulla capacità d'interazione dei ligandi cicloesilsostituiti con i recettori dei cannabinoidi.

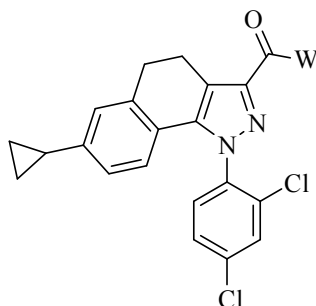
Tabella 5: Affinità di legame (K_i) per i recettori CB1 e CB2 dei composti della serie **38A** e **38B**.



COMPOSTO	R	W	K_i CB2 (nM)	K_i CB1 (nM)	K_i CB1/ K_i CB2
38Aa			69.43±2.76	1852±474.3	26.7
38Ab			152.1±27.23	4211±645.5	27.7
38Ad			197.9±37.29	4033±2978	20.4
38Ae			413.7±66.74	> 10000	> 24
38Ah			37.69±9.56	> 40000	43.95
38Ai			5.76±1.49	> 40000	> 1061
38Am			4.48±0.66	> 10000	2232
38Ca			509.1±89.15	> 10000	19.6
38Cb			515.1±44.84	> 10000	19.4
38Ci			> 10000	> 10000	-

I composti della serie **39A** con l'anello carbociclico centrale a sei termini si sono rivelati decisamente meno interessanti con valori di K_i per entrambi i sottotipi recettoriali superiori al range micromolare (Tabella 6).

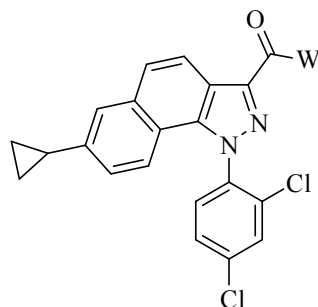
Tabella 6: Affinità di legame (K_i) per i recettori CB1 e CB2 dei composti della serie **39A**.



COMPOSTO	W	K_i CB1 (nM)	K_i CB2 (nM)	K_i CB1/ K_i CB2
39Ag		> 10000	> 10000	-
39Ai		> 40000	5517±216.8	7.25

Inaspettatamente la serie di derivati 5,6,6 completamente planari, esemplificati dal derivato **40Aa**, ha fatto registrare una drastica caduta di affinità su entrambi i recettori. I composti di questa serie hanno esibito $K_i > 40000$ nM per CB1 e CB2 ad eccezione di **40Aa** che per il recettore CB1 possiede una K_i di 825.3 nM (Tabella 7).

Tabella 7: Affinità di legame (K_i) per i recettori CB1 e CB2 dei composti della serie **40A**.



COMPOSTO	W	K_i CB1 (nM)	K_i CB2 (nM)	K_i CB1/ K_i CB2
40Aa		825.3±451.3	> 40000	< 0.02
40Ab		> 40000	> 40000	-
40Ad		> 40000	> 40000	-

Probabilmente un importante fattore che deve essere preso in considerazione per razionalizzare la drastica caduta di affinità fra i ligandi contenenti il sistema tricyclico indenopirazolico e quelli a struttura benzo[g]indazolico potrebbe essere la disposizione lineare dell'anello benzenico con l'anello pirazolico nel sistema indenopirazolico rispetto alla disposizione angolare del sistema benzo[g]indazolico che, secondo un calcolo teorico, discosterebbe il pendaglio alchilico di 37°. La disposizione lineare del core indenopirazolico orienterebbe favorevolmente il sostituente ciclopropilico a livello dell'importante tasca lipofila nel complesso ligando-recettore sopra menzionato (Figura 18). La tasca lipofila, inoltre, non sarebbe in grado di tollerare sostituenti di dimensioni superiori al ciclopropile. Approfonditi studi di molecular modeling potranno chiarire il preferenziale modo d'interazione tra questi ligandi ed il recettore cannabinoideo.

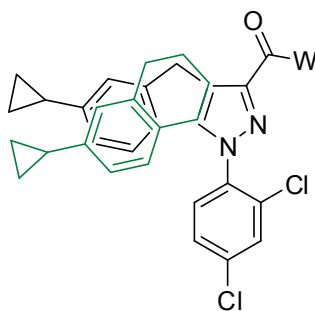


Figura 18: Sovrapposizione dei sistemi indenopirazolico e benzo[g]indazolico.

I derivati **38Aa** (K_i CB2 = 69.43 nM), **38Ah** (K_i CB2 = 37.69 nM), **38Ai** (K_i CB2 = 5.76 nM) e **38Am** (K_i CB2 = 4.48 nM) hanno esibito un buon profilo di binding in termini di affinità ($K_i < 100$ nM) e selettività recettoriali e sono stati pertanto selezionati per un'ulteriore indagine farmacologica volta all'individuazione della loro attività intrinseca sul recettore CB2. A tal fine, poiché i recettori CB2 sono coinvolti nella modulazione dell'infiammazione, è stato studiato l'effetto esercitato sulla produzione di prostaglandina E2 (PGE2) da **38Aa**, **38Ah**, **38Ai** e **38Am** in un saggio di neuroinfiammazione indotta dal lipopolisaccaride (LPS) sulla linea cellulare microgliale BV-2 di topo che esprime solo i recettori CB2. I risultati sono stati espressi come percentuale di prostaglandina liberata e visualizzati graficamente attraverso dei diagrammi a colonne.

Il Diagramma 1 rappresenta il "controllo" dell'esperimento: la prima colonna mostra la produzione basale di PGE2, nella seconda è possibile osservare l'effetto che provoca la tossina batterica sulla coltura cellulare, la terza conferma che il noto agonista WIN 55212-2 attenua l'azione dell'LPS e la quarta mostra come l'azione del WIN venga invertito dall'antagonista/agonista inverso SR 144528.

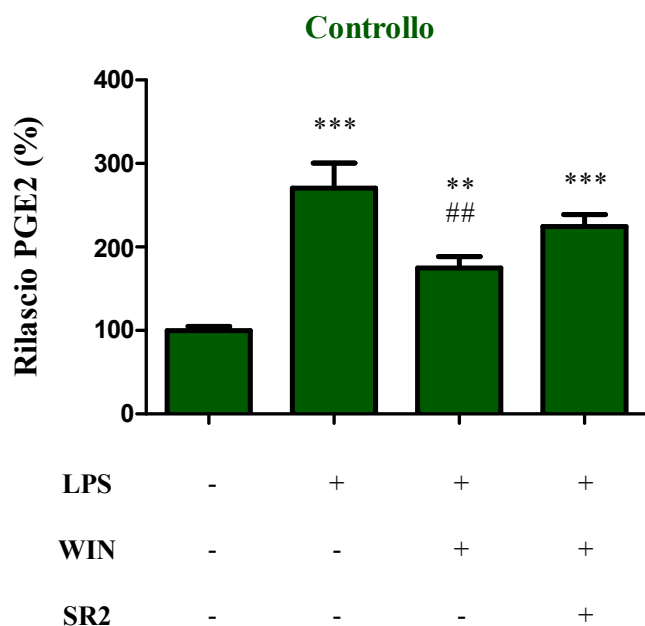


Diagramma 1: Diagramma di controllo dell'esperimento. Analisi statistica: One-way-ANOVA; analisi di varianza: Student-Newman-Keuls test. $**p < 0.01$ vs DMSO, $***p < 0.005$ vs DMSO, $##p < 0.01$ vs LPS. SR2 = SR 144528.

Nel Diagramma 2 è stata confrontata l'azione del WIN con quella del composto **38Aa**: da questa prima analisi sembrerebbe che il nuovo ligando CB2 espliciti un'attività intrinseca da agonista poiché, come è possibile vedere dal grafico, **38Aa** riduce i livelli di PGE2 in maniera del tutto simile al WIN. Tale ipotesi è stata confermata attraverso il Diagramma 3: quando le cellule BV-2 vengono trattate con **38Aa** e SR 144528 insieme, quest'ultimo inverte l'azione di **38Aa**. La N-piperidincarbossammide **38Aa** è dunque un agonista dei recettori CB2.

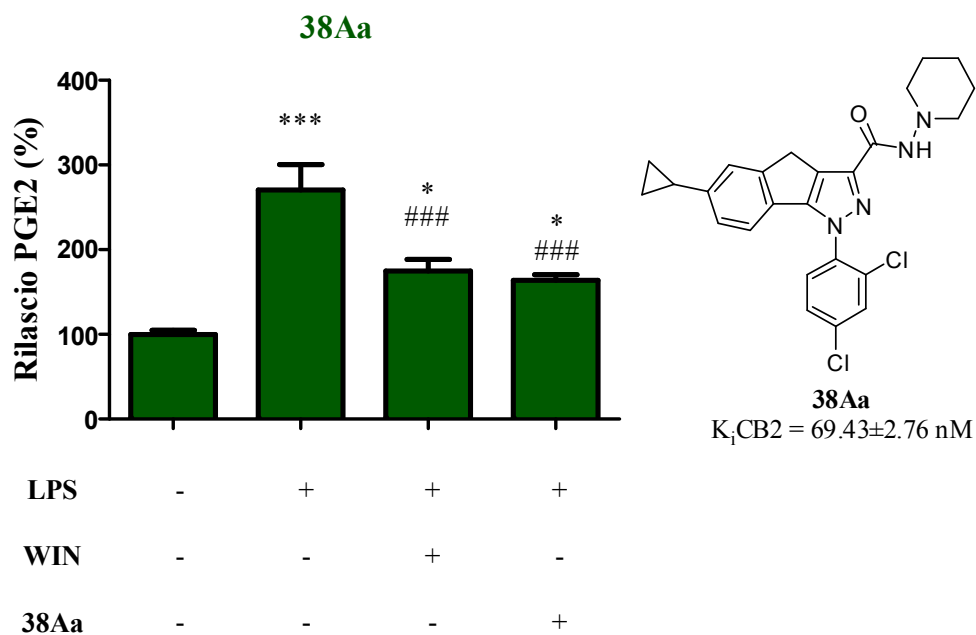


Diagramma 2: Diagramma del composto 38Aa. Analisi statistica: One-way-ANOVA; analisi di varianza: Student-Newman-Keuls test. * $p < 0.05$ vs DMSO, *** $p < 0.005$ vs DMSO, ### $p < 0.005$ vs LPS.

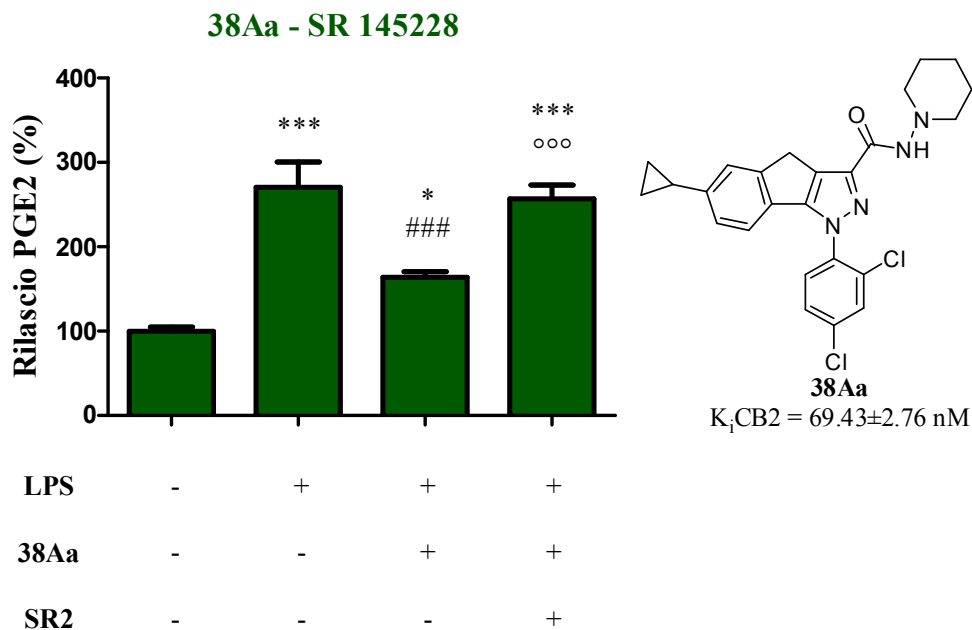


Diagramma 3: Diagramma del composto **38Aa** e **SR 145228**. Analisi statistica: *One-way-ANOVA*; analisi di varianza: *Student-Newman-Keuls test*. **p* < 0.05 vs *DMSO*, ****p* < 0.005 vs *DMSO*, ###*p* < 0.005 vs *LPS*, ooo*p* < 0.005 vs **38Aa**. *SR2* = *SR 144528*.

Nel Diagramma 4 è possibile vedere come il derivato **38Ah** non solo non riduce i livelli di PGE2 ma al contrario li incrementa leggermente rispetto alla colonna di controllo LPS, facendo presupporre un carattere da debole agonista inverso. Attraverso il Diagramma 5, esaminando la terza e la quarta colonna, si può constatare che il composto **38Ah** inverte l'azione del WIN 55212-2- E' possibile concludere che la N-bornilcarbossammide **38Ah** è un antagonista/agonista inverso dei recettori CB2.

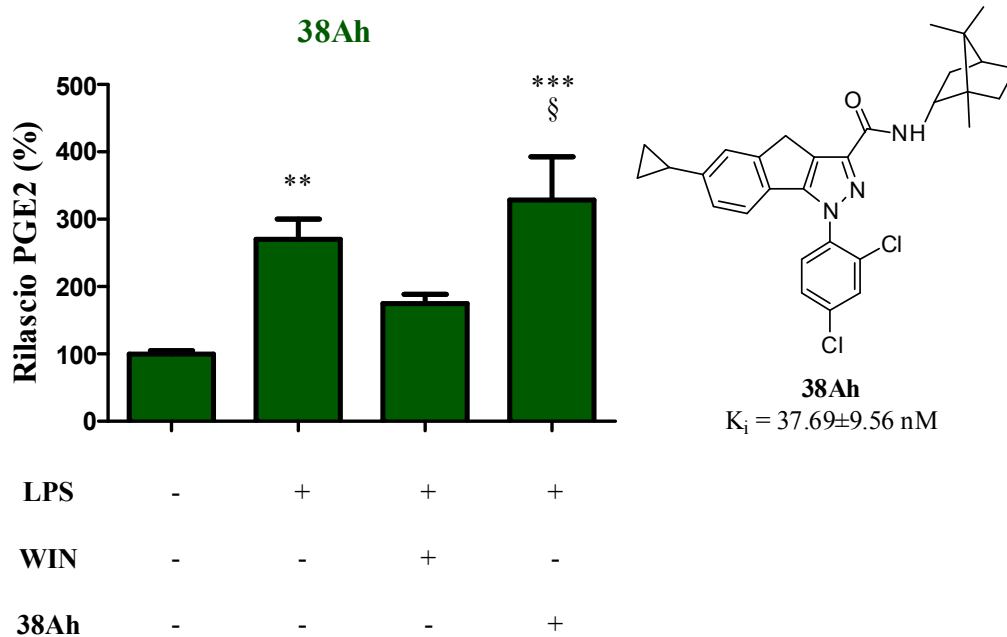


Diagramma 4: Diagramma del composto 38Ah. Analisi statistica: One-way-ANOVA; analisi di varianza: Student-Newman-Keuls test. ** $p < 0.01$ vs DMSO, *** $p < 0.005$ vs DMSO, § $p < 0.05$ vs WIN.

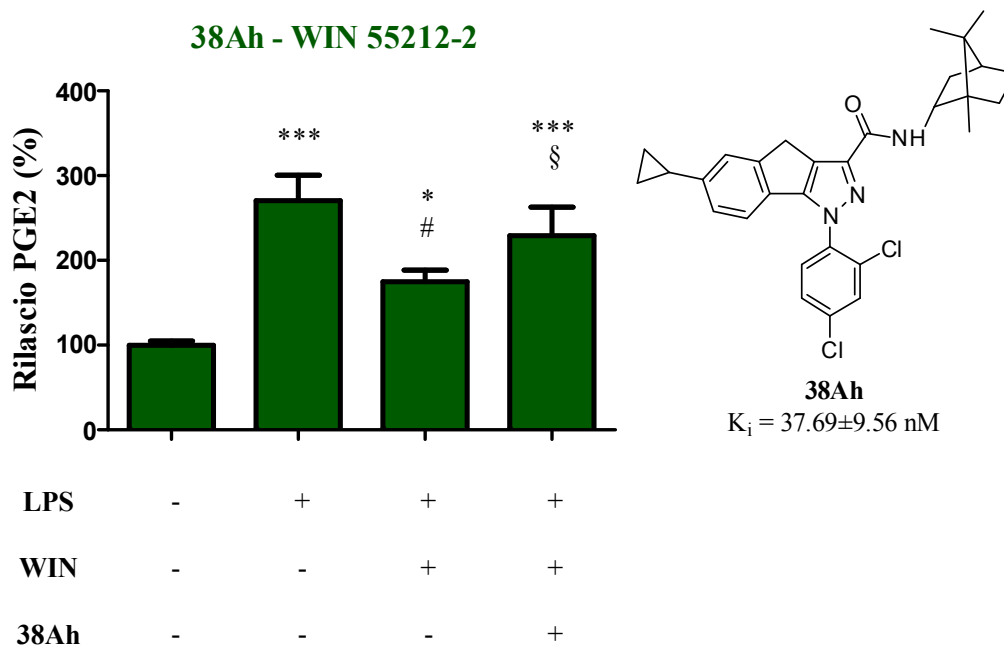


Diagramma 5: Diagramma del composto **38Ah** e **SR 145228**. Analisi statistica: One-way-ANOVA; analisi di varianza: Student-Newman-Keuls test. * $p < 0.05$ vs DMSO, *** $p < 0.005$ vs DMSO, # $p < 0.05$ vs LPS, § $p < 0.05$ vs WIN.

Come illustrato nel Diagramma 6, il composto **38Ai** aumenta la percentuale di prostaglandina E2 rilasciata rispetto al controllo LPS: anche in questo caso, pertanto, si ha a che fare con un agonista inverso. Trattando le cellule BV-2 contemporaneamente con **38Ai** e WIN 55212-2 (Diagramma 7) si constata che il ligando in esame antagonizza l'azione del WIN. La N-fenchilammina **38Ai** è un antagonista/agonista inverso dei recettori CB2.

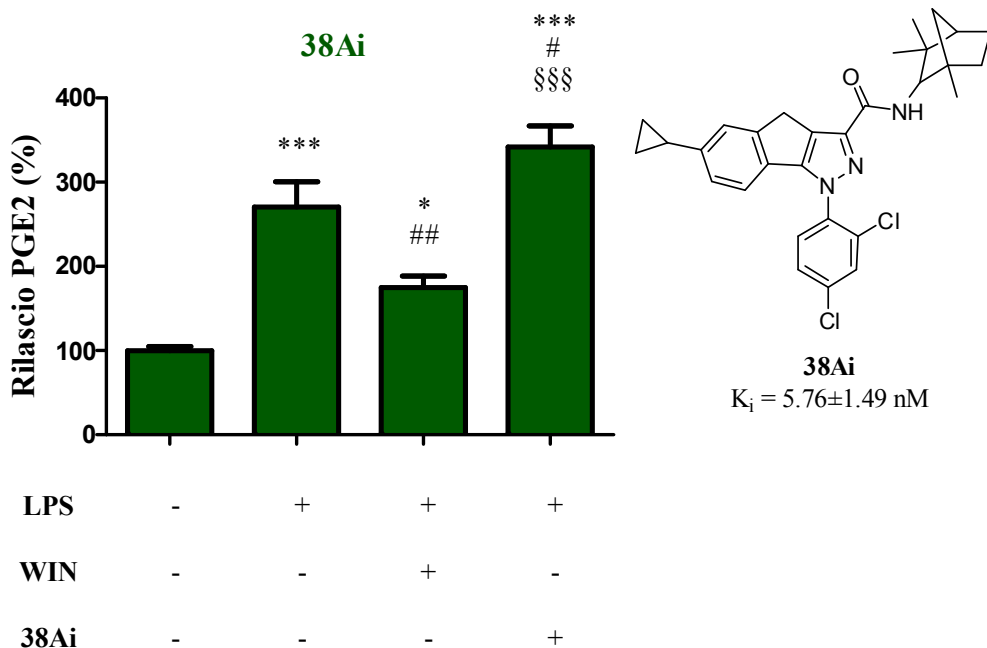


Diagramma 6: Diagramma del composto 38Ai. Analisi statistica: One-way-ANOVA; analisi di varianza: Student-Newman-Keuls test. * $p < 0.05$ vs DMSO, *** $p < 0.005$ vs DMSO, # $p < 0.05$ vs LPS, ## $p < 0.01$ vs LPS, §§§ $p < 0.005$ vs WIN.

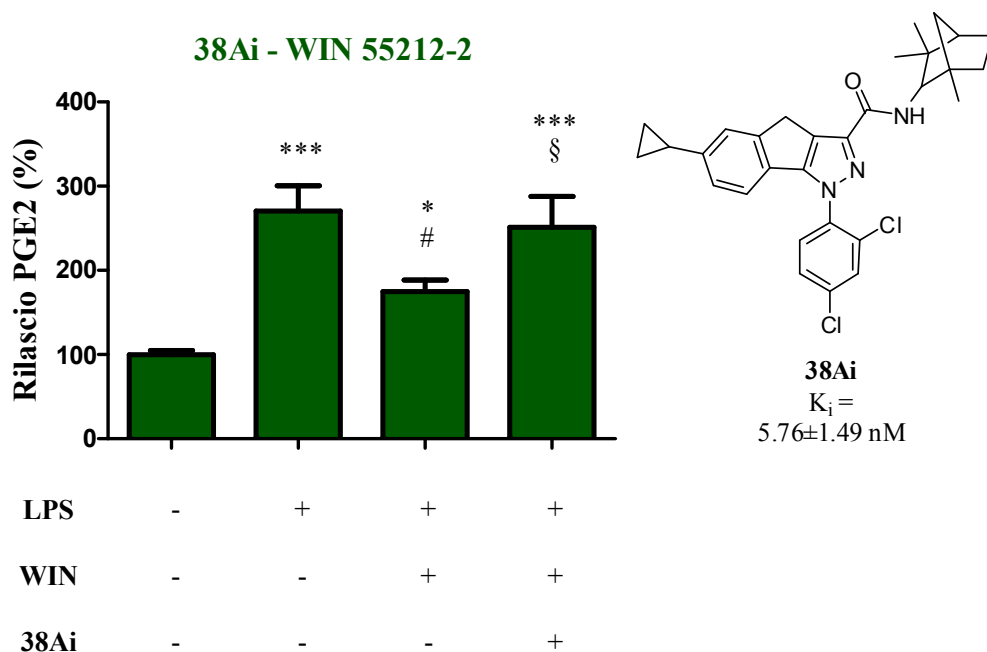


Diagramma 7: Diagramma del composto 38Ai e WIN 55212-2. Analisi statistica: One-way-ANOVA; analisi di varianza: Student-Newman-Keuls test. * $p < 0.05$ vs DMSO, *** $p < 0.005$ vs DMSO, # $p < 0.05$ vs LPS, § $p < 0.05$ vs WIN.

Il ligando **38Am** non induce notevoli variazioni dei livelli di PGE2 liberata rispetto all'LPS di controllo (Diagramma 8). Inoltre dal Diagramma 9 è possibile constatare che il derivato **38Am** inverte leggermente l'azione agonista del WIN 55212-2 in misura statisticamente non rilevante. Dunque la N-1-adamantancarbossammide **38Am** è presumibilmente un debole antagonista del recettore CB2.

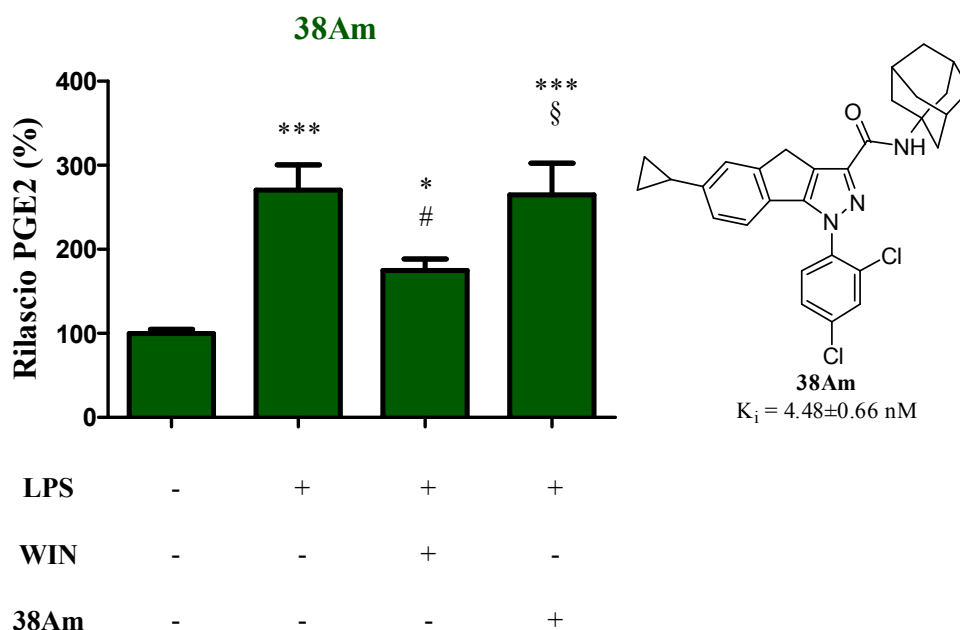


Diagramma 8: Diagramma del composto 38Am. Analisi statistica: One-way-ANOVA; analisi di varianza: Student-Newman-Keuls test. **p* < 0.05 vs DMSO, ****p* < 0.005 vs DMSO, #*p* < 0.05 vs LPS, §*p* < 0.05 vs WIN.

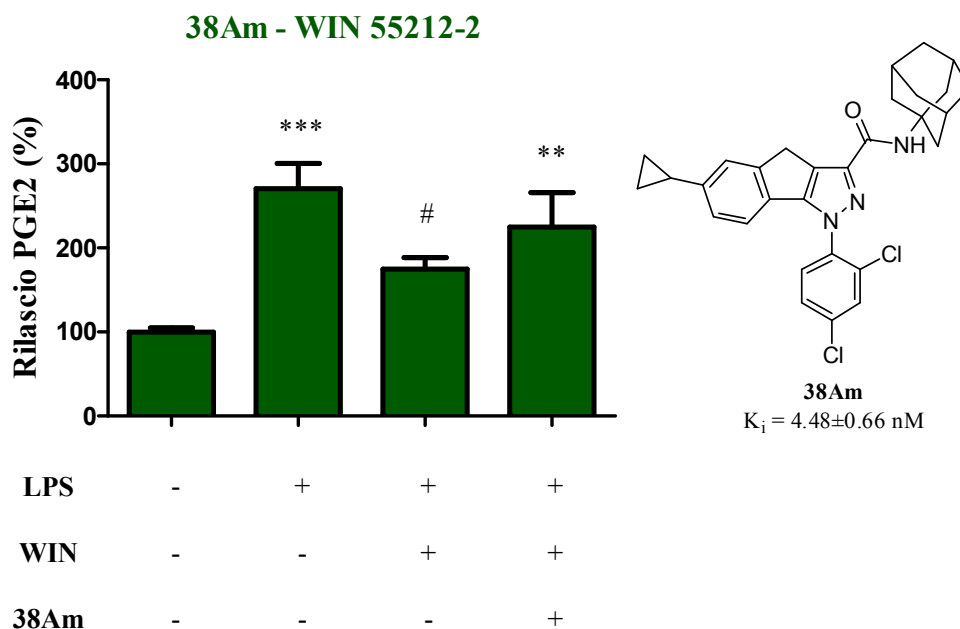


Diagramma 9: Diagramma del composto 38Am e WIN 55212-2. Analisi statistica: One-way-ANOVA; analisi di varianza: Student-Newman-Keuls test. ***p* < 0.01 vs DMSO, ****p* < 0.005 vs DMSO, #*p* < 0.05 vs LPS.

In conclusione, nella presente tesi sono state sintetizzate cinque serie di tricyclopirazoli a piattaforma indenopirazolica e benzo[g]indazolica contenenti un ciclopropile, un ciclopentile o un cicloesile e recanti sulla funzione carbamoilica ammine diversamente ingombrate. Alcuni derivati sono stati saggiati al fine di valutare l'affinità recettoriale ed acquisire nuove informazioni circa le correlazioni struttura-attività.

In generale, molti di questi ligandi possiedono alta affinità verso i recettori CB2 e poca o nessuna CB1 affinità.

Il composto migliore ha una piattaforma tricyclica planare indenopirazolica sostituita con un ciclopropile, un carbamoile la cui ammina è un adamantile e un diclorofenile.

In un saggio di neuroinfiammazione indotta dal lipopolisaccaride, la maggior parte dei composti saggiati è antagonista/agonista inverso (**38Ah**, **38Ai**, **38Am**) sul recettore CB2 mentre un composto (**38Aa**) è agonista pieno. Inoltre è interessante osservare come i composti che esibiscono un'attività intrinseca da antagonista o agonista inverso rechino in C-3 un'ammine caratterizzata da un'unità azotata voluminosa quale il bornile (**38Ah**), il fenchile (**38Ai**) e l'adamantile (**38Am**). Per contro, il composto **38Aa**, agonista pieno dei recettori CB2, ha in C-3 una carbamoilpiperidina.

BIBLIOGRAFIA

1. Murineddu, G.; Deligia, F.; Dore, A.; Pinna, G.; Asproni, B.; Pinna, G.A. Different Classes of CB2 Ligands Potentially Useful in the Treatment of Pain. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, **2013**, *8*, 42-69.
2. Worm, K.; Dolle, E.R. Simultaneous Optimization of Potency, Selectivity and Physicochemical Properties for Cannabinoid CB₂ Ligands. *Curr. Pharm. Des.*, **2009**, *15*, 3345-3366.
3. Gaoni, Y.; Mechoulam, R.. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 1646-1647.
4. Santavý, F. Notes on the structure of cannabidiol compounds. *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Med.*, **1964**, *35*, 5-9.
5. Mechoulam, R.; Gaoni, Y. The absolute configuration of Δ^1 -tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett.*, **1967**, *35*, 1109-1111.
6. Han, S.; Thatte, J.; Buzard, D.J.; Jones, R.M. Therapeutic Utility of Cannabinoid Receptor Type 2 (CB₂) Selective Agonists. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 8224-8256.
7. Hanuš, L.O.; Mechoulam, R. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 1341-1359.
8. Dewane, W.A.; Dysarz, F.A.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; Howlett, A.C. Determination and characterisation of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.*, **1988**, *34*, 605-613.
9. Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **1993**, *365*, 61-65.
10. <http://cannabis.dronet.org/danni.html>
11. Kirk Ham, T.C.; Williams, M.C. Endogenous cannabinoids and appetite. *Nutrition research reviews*, **2001**, *14*, 65-86.
12. Fogaça MV, Galve-Roperh I, Guimarães FS, Campos AC. Cannabinoids, Neurogenesis and Antidepressant Drugs: Is there a Link? *Curr. Neuropharmacol*, **2013**, *11*, 263-275.
13. Beltramo, M. Cannabinoid Type 2 Receptor as a Target for Chronic – Pain. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2009**, *9*, 11-25.
14. Svendsen; K.B.; Jensen T.S.; Bach, F.W. Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. *Br. Med. Journal* **2004** *329*, 253-257.

-
15. Rossi, S.; Bernardi, G.; Centonze, D. The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, **2010**, *224*, 92-102.
 16. Karl, T.; Cheng, D.; Garner, B.; Arnold, J.C. The therapeutic potential of the endocannabinoid system for Alzheimer's disease. *Expert. Opin. Ther. Targets*, **2012**, *16*, 407-420.
 17. García-Arencibia, M.; García, C.; Fernández-Ruiz, J. Cannabinoids and Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **2009**, *8*, 432-439.
 18. Sagredo, O.; Pazos, M.R.; Valdeolivas, S.; Fernandez-Ruiz, J. Cannabinoids: novel medicines for the treatment of Huntington's disease. *Recent Pat. CNS Drug Discov.*, **2012**, *41*, 41-48.
 19. Steffens S, Pacher P. Targeting cannabinoid receptor CB(2) in cardiovascular disorders: promises and controversies. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, *167*, 313-323.
 20. Alexander, A.; Smith, P.F.; Rosengren, J. Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Letters*, **2009**, *285*, 6-12.
 21. Ashton, J.C.; Wright, J.L.; McPartland, J.M.; Tyndall, J.D.A. Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor Ligand Specificity and the Development of CB2-Selective Agonists. *Curr. Med.Chem*, **2008**, *15*, 1428-1443.
 22. Pinar-Suiero, S.; Rodríguez-Puertas, R.; Vecino, E. Cannabinoid applications in glaucoma. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, **2011**, *86*, 16-23.
 23. Fonseca, B.M.; Costa, M.A.; Almada, M.; Correia-da-Silva, G.; Teixeira, N.A. Endogenous cannabinoids revisited: A biochemistry perspective. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **2013**, *102-103*, 13-30.
 24. Dewane, W.A.; Hanuš, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **1992**, *258*, 1946-1949.
 25. Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanuš, L.; Ligumsky, M.; Kaminsky, N.E.; Shatz, A.R.; Gobher, A.; Almog, S.; Martin, B.R.; Compton, B.R.; Pertwee, R.G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, T.; Vogel, Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, *50*, 83-90.
 26. Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itom, K.; Yamasita, A.; Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid ligand in the brain. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **1995**, *215*, 89-97.

-
27. McPartland, J.M.; Glass, M.; Pertwee R.G. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *Br. J. Pharmacol.*, **2007**, *152* 583-593.
28. Hanuš, L.; Abu-Lafi, S.; Fride, E.; Breuer, A.; Vogel, Z.; Shalev, D.E.; Kustanovich, I.; Mechoulam, R. 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Sci. USA*, **2001**, *98*, 3662-3665.
29. Porter, A.C.; Sauer, J.M.; Knierman, M.D.; Becker, G.W.; Berna, M.J.; Bao, J.; Nomikos, G.G.; Carter, P.; Bymaster, F.P.; Leese, A.B.; Felder, C.C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, *301*, 1020-1024.
30. Huang, S.M.; Bisogno, T.; Trevisani, M.; Al-Hayani, A.; De Petrocellis, L.; Fezza, F.; Tognetto, M.; Petros, T.J.; Krey, J.F.; Chu, C.J.; Miller, J.D.; Davies, S.N.; Geppetti, P.; Walker, J.M.; Di Marzo, V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Sci. USA*, **2002**, *99*, 8400-8405.
31. Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **1997**, *389*, 816-824.
32. Okamoto, Y.; Morishita, J.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 5298-5305.
33. Deutsch, D.G.; Chin, S.A. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 791-796.
34. Cravatt, B.F.; Giang, D.K.; Mayfield, S.P.; Boger, D.L.; Lerner, R.A.; Gilula, N.B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, **1996**, *384*, 83-87.
35. Dinh, T.P.; Freund, T.F.; Piomelli, D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem. Phys. Lipids*, **2002**, *121*, 149-158.
36. Pertwee, R.G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int. J. Obes. (Lond)*, **2006**, *Suppl. 1*, 13-18.
37. Grotenhermen, F. Cannabinoidi e Sistema Endocannabinoide, *Cannabinoids*. **2006**, *1*, 10-14.
38. Turu, G.; Hunyady, L. Signal transduction of the CB₁ cannabinoid receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, **2010**, *44*, 75-85.

-
39. Adam, J.M.; Clark, J.K.; Davies, K.; Everett, K.; Fields, R.; Francis, S.; Jeremiah, F.; Kiyoi, T.; Maidment, M.; Morrison, A.; Ratcliffe, P.; Prosser, A.; Schulz, J.; Wishart, G.; Baker, J.; Boyce, S.; Campbell, R.; Cottney, J.E.; Deehan, M.; Martin, I. Low brain penetrant CB1 receptor agonists for the treatment of neuropathic pain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 2932-2937.
40. O'Keefe, L.; Simcocks, A.C.; Hryciw, D.H.; Mathai, M.L.; McAinch, A.J. The cannabinoid receptor 1 and its role in influencing peripheral metabolism. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **2013**, 1-13.
41. Pacher, P.; Mukhopadhyay, P.; Mohanraj, R.; Godlewski, G.; Batkai, S.; Kunos, G. Modulation of the Endocannabinoid System in Cardiovascular Disease: Therapeutic Potential and Limitation. *Hypertension*, **2008**, *52*, 601-607.
42. Saito, V.S.; Rezende, R.M.; Teixeira, A.L. Cannabinoid Modulation of Neuroinflammatory Disorders. *Curr. Neuropharmacol.*, **2012**, *10*, 159-166.
43. Croxford, J.L.; Yamamura, T. Cannabinoids and the immune system: Potential for the treatment of inflammatory diseases? *Journal of Neuroimmunology*, **2005**, *166*, 3-18.
44. Fernández-Ruiz, J.; Pazos, M.R.; García-Arencibia, M.; Sagredo, O.; Ramos, J.A. Role of CB₂ receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2008**, *286S*, S91-S96.
45. Pacher, P.; Mechoulam, R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog. Lipid. Res.*, **2011**, *50*, 193-211.
46. Murineddu, G.; Asproni, B.; Ruiu, S.; Deligia, F.; Falzoi, M.; Pau, A.; Thomas, B.F.; Zhang, Y.; Pinna, G.A.; Pani, L.; Lazzari, P. Tricyclic Pyrazoles. Part 5. Novel 1,4-Dihydroindeno[1,2-c]pyrazole CB₂ Ligands Using Molecular Hybridization Based on Scaffold Hopping. *The Open Med. Chem. J.*, **2012**, *6*, 1-14.
47. Tuccinardi, T.; Ferrarini, P.L.; Manera, C.; Ortore, G.; Saccomanni, G.; Martinelli, A. Cannabinoid CB₂/CB₁ Selectivity. Receptor Modeling and Automated Docking Analysis. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 984-994.
48. Montero, C.; Campillo, N.E.; Goya, P.; Paez, J.A. Homology models of the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. A docking analysis study. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, *40*, 75-83.
49. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; Le Trong, I.; Teller, D.C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **2000**, *289*, 739-745.

-
50. Silverman, R. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. ELSEVIER, Academic Press, *second edition*, 73-74.
51. Khanolkar, A.D.; Abadji, V.; Lin, S.; Hill, W.A.G.; Taha, G.; Abouzid, K.; Meng, Z.; Fan, P.; Makriyannis, A. Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4515-4519.
52. Hillard, C.J.; Manna, S.; Greenberg, M.J.; Dicomelli, R.; Ross, R.A.; Stevenson, L.A.; Murphy, V.; Pertwee, R.G.; Campbell, W.B. Synthesis and Characterization of Potent and Selective Agonists of the Neuronal Cannabinoid Receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, *289*, 1427-1433.
53. Silverberg, L.J. Synthesis of Cannabinoids. *US7186850*, **2007**.
54. Mahadevan, A.; Siegel, C.; Martin, B.R.; Abood, M.E.; Beletskaya, I.; Razdan, R.K. Novel cannabinol probes for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. **2000**, *43*, 3778-3785.
55. Busch-Petersen, J.; Hill, W.A.; Fan, P.; Khanolkar, A.; Xie, X.Q.; Tius, M.A.; Makriyannis, A. Unsaturated side chain β -11-hydroxyhexahydrocannabinol analogs, *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 3790-3796.
56. Cumella, J.; Hernández-Folgado, L.; Girón, R.; Sánchez, E.; Morales, P.; Hurst, D.P.; Gómez-Cañas, M.; Gómez-Ruiz, M.; Pinto, D.C.G.A.; Goya, P.; Reggio, P.H.; Martin, M.I.; Fernández-Ruiz, J.; Silva, A.M.S.; Javerovic, N. Chromenopyrazoles: Non-psychoactive and Selective CB₁ Cannabinoid Agonists with Peripheral Antinociceptive Properties. **2012**, *7*, 452-463.
57. Showalter, V.M.; Compton, D.R.; Martin, B.R.; Abood, M.E. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB₂): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1996**, *278*, 989-999.
58. Hanuš, L.; Breuer, A.; Tchilibon, S.; Shiloah, S.; Goldenberg, D.; Horowitz, M.; Pertwee, R.G.; Ross, R.A.; Mechoulam, R.; Fride, E. HU-308: a specific agonist for CB₂, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, *96*, 14228-14233.
59. Compton, D.R.; Gold, L.H.; Ward, S.J.; Balster, R.L.; Martin, B.R. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1992**, *263*, 1118-1126.
60. Yao, B.B.; Mukherjee, S.; Fan, Y.; Garrison, T.R.; Daza, A.V.; Grayson, G.K.; Hooker, B.A.; Dart, M.J.; Sullivan, J.P.; Meyer, M.D. In vitro pharmacological characterization of

AM-1241: a protean agonist at the cannabinoid CB₂ receptor? *Br. J. Pharmacol.*, **2006**, *149*, 145-154.

61. Kim, K.; Moore, D.H.; Makriyannis, A.; Abood, M.E. AM1241, a cannabinoid CB₂ receptor selective compound, delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Pharmacol.*, **2006**, *542*, 100-105.

62. Bilodeau, M.T.; Burgey, C.S.; Deng, Z.J.; Hartnett, J.C.; Kett, N.R.; Melamed, J.; Munson, P.M.; Nanda, K.K.; Thomson, W.; Trotter, B.W.; Wu, Z. Imidazopyridine analogs as CB₂ receptor Modulators, Useful in the treatment of Pain, Respiratory and Non-Respiratory diseases. WO 2008085302, **2008**.

63. Stern, E.; Muccioli, G.G.; Bosier, B.; Hamtiaux, L.; Millet, R.; Poupaert, J.H. Pharmacomodulation around the 4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamides, a class of potent CB₂ selective cannabinoid receptor ligands: consequences in receptor affinity and functionality. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 5471-5484.

64. Manera, C.; Cascio, M.G.; Benetti, V.; Allara, M.; Tuccinardi, T.; Martinelli, A. New 1,8-naphthyridine and quinoline derivatives as CB₂ selective agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 6505-6510.

65. Pasquini, S.; Botta, L.; Semeraro, T.; Mugnaini, C.; Ligresti, A.; Palazzo, E. Investigation on the 4-quinolone-3-carboxylic acid motif: synthesis and structure-activity relationship of potent and selective cannabinoid-2 receptor agonists endowed with analgesic activity *in vivo*. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 5075-5084.

66. Manera, C.; Saccomanni, G.; Adinolfi, B.; Benetti, V.; Ligresti, A.; Cascio, M.G.; Tuccinardi, T.; Lucchesi, V.; Martinelli, A.; Nieri, P.; Masini, E.; Di Marzo, V.; Ferrarini, P.L. Rational design, synthesis and pharmacological properties of new 1,8-naphthyridin-2(1*H*)-on-3-carboxamide derivatives as highly selective cannabinoid-2-receptor agents. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 3644-3651.

67. Carmona, M.R.; Barth, F.; Millan, J.; Derucq, J.M.; Casellas, P.; Congy, C.; Oustric, D.; Sarran, M.; Bouabouala, M.; Calandra, B.; Portier, M.; Shire, D.; Brelière, J.C.; Le Fur, G. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1998**, *284*, 644-650.

68. Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Héaulme, M.; Alonso, R.; Shire, D.; Congy, C.; Soubrié, P.; Brelière, J.C.; Le Fur, G. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci.*, **1995**, *56*, 1941-1946

-
69. a) Ruiu, S.; Pinna, G.A.; Marchese, G.; Mussinu, J.M.; Saba, P.; Tambaro, S.; Casti, P.; Vargiu, R. and Pani, L. Synthesis and characterization of NESS0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, *306*, 363–370.
- b) Mussinu, JM; Ruiu, S.; Mulè, A.C.; Pau, A.; Carai, M.A.M.; Loriga, G.; Murineddu, G. and Pinna, G.A. TricyclicPyrazoles. Part 1; Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1,4-Dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-based Ligands for CB1 and CB2 Cannabinoid Receptor. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 251-263.
- c) Murineddu, G.; Ruiu, S.; Mussinu, J.M.; Loriga, G.; E. Grella, G.E.; Carai, M.A.M.; Lazzari, P.; Pani, L. and Pinna, G.A. Tricyclicpyrazoles. Part 2: Synthesis and biological evaluation of novel 4,5-dihydro-1H-benzo[g]indazole-based ligands for cannabinoid receptors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 3309-3320.
- d) Murineddu, G.; Ruiu, S.; Loriga, G.; Manca, I.; Lazzari, P.; Reali, R.; Pani, L.; Toma, L. and Pinna, G.A. TricyclicPyrazoles. Part 3. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modelling of Analogues of the Cannabinoid Antagonist 8-Chloro-1-(2',4'-dichlorophenyl)-N-piperidin-1-yl-1,4,5,6 tetrahydrobenzo[6,7]cyclohepta[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7351-7362.
- e) Murineddu, G.; Lazzari, P.; Ruiu, S.; Sanna, A.; Loriga, G.; Manca, I.; Falzoi, M.; Dessì, C.; Curzu, M.M.; Chelucci, G.; Pani, L. and Pinna, G.A. TricyclicPyrazoles. Part 4. Synthesis and Biological Evaluation of Analogues of the Robust and Selective CB2 Cannabinoid Ligand 1-(2'-4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-piperidin-1-yl-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7502-7512.
- f) Murineddu, G.;Asproni, B.; Ruiu, S.; Deligia, F.; Falzoi, M.; Pau, A.; Thomas, B.F.; Zhang, Y; Pinna, G.A.; Pani, L. and Lazzari, P. Tricyclic Pyrazoles. Part 5. Novel 1,4-Dihydroindeno[1,2-c]pyrazole CB2 Ligands Using Molecular Hybridization Based on Scaffold Hopping. *The Open Med. Chem. J.*, **2012**, *6*, 1-14.
70. Szabó, G.; Varga, B.; Páyer-Lengyel, D.; Szemzo, A.; Erdélyi, P.; Vukies, K.; Szikra, E.H.; Vastag, M.; Kiss, B.; Laszy, J.; Gyertyan, I.; Fisher, J. Chemical and Biological Investigation of Cyclopropyl Containing Diaryl-pyrazole-3-carboxamides as Novel and Potent Cannabinoid Type 1 Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 4329-4337.
71. Gagnon, A.; Duplessis, M.; Alsabeh, P.; Barabé, F. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Tricyclopropylbismuth with Aryl Halides and Triflates.

-
72. Niculescu-Duvaz, D.; Niculescu-Duvaz, I.; Pons, J.F.; Whittaker, S.; Marais, R.; Springer, C. Potent BRAF kinase inhibitors based on 2,4,5-trisubstituted imidazole with naphthyl and benzothiophene 4-substituents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 1284-1304.
73. Juby, P.F.; Goodwin, W.R.; Hudyma, T.W.; Partyka, R.A. Antiinflammatory activity of some indan-1-carboxylic acids and related compounds. *J. Med. Chem.*, **1972**, *15*, 1297-1306.
74. Takeda Chem. Ind. Patent: CH601188DE2330856, *Chem Abstr.*, **1974**, 80.
75. Lukáč, Š; Chmela, P.; Hrdlovič. The influence of alkyl substituents on Norrish type II reactions poly-4'-alkylacrylophenones. *J. Photochem.*, **1979**, *145*, 301.
76. Takeda Chem. Ind. Patent: CH601188DE2330856, *Chem Abstr.*, **1974**, 80.
77. Lukáč, Š; Chmela, P.; Hrdlovič. The influence of alkyl substituents on Norrish type II reactions poly-4'-alkylacrylophenones. *J. Photochem.*, **1979**, *145*, 301.