

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa della Scuola di Dottorato

XXII CICLO DELLA

Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie

Chimiche e Farmaceutiche

PROGETTAZIONE, SINTESI ED AFFINITA' RECETTORIALE DI NUOVI LIGANDI SIGMA

Settore scientifico disciplinare CHIM08

DOTTORANDO

Dott. Erik Laurini

DIRETTORE DELLA SCUOLA

Prof. Enzo Alessio

TUTORE

Prof.ssa Maria Grazia

Mamolo

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

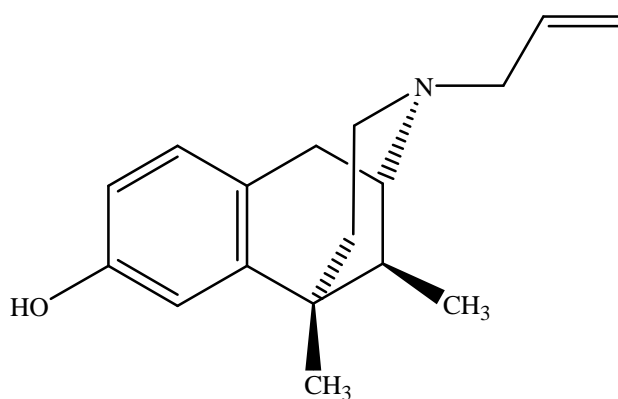
Introduzione

Lo sviluppo delle conoscenze del ruolo dei neurotrasmettitori e dei neuromodulatori nei diversi sistemi recettoriali è uno degli stimoli principali dello studio sulla progettazione di farmaci per curare malattie neurodegenerative o che comunque riguardino il S.N.C., sfruttando la possibilità che l'attivazione dei suddetti sistemi recettoriali porti ad un effetto neuroprotettivo, ritardando, di conseguenza, l'insorgere della patologia.

L'interesse per i recettori σ e la ricerca di ligandi sempre più potenti e selettivi nasce proprio da questo contesto; la convinzione, infatti, è che essi rappresentino una nuova frontiera di un possibile trattamento farmacologico dei disordini sia affettivi che motori, dei deficit del S.N.C. e nella diagnosi e cura di alcuni tipi di tumori.

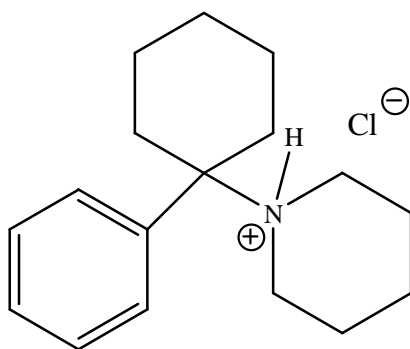
Nonostante l'identificazione dei recettori σ come siti di legame singolare nel cervello e negli organi periferici sia stata appurata già verso la fine degli anni settanta, molteplici aspetti e meccanismi sono ancora da chiarire soprattutto per quanto riguarda il sottotipo recettoriale σ_2 visto la scarsa conoscenza di ligandi selettivi.

Le prime ipotesi avanzate classificavano erroneamente i recettori σ come un sottotipo di recettori oppioidi tenendo in considerazione gli effetti psicotomimetici di vari ligandi oppioidi, come la N-allilnormetazocina (SKF 10,047) **1** e di altri benzomorfanici correlati^[1].



1

Grazie alla risoluzione degli enantiomeri si riuscì successivamente ad evidenziare che gli isomeri (-) dimostravano un'alta affinità per il recettore oppioidi a differenza degli isomeri (+) i quali avevano una modesta affinità per i siti oppioidi ma una significativa affinità per i siti di interazione della fenciclidina (PCP) **2** e per siti che non rispondevano ad antagonisti oppioidi come il naloxone o il naltrexone : tali molecole, infatti, non bloccavano né in vivo né in vitro gli effetti comportamentali prodotti da (+)-NANM **1**.



2

Successivamente emerse l'ipotesi di identificare i recettori σ come il sito di interazione della fenciclidina nel canale del recettore NMDA (N-metil-D-aspartato) che ha come agonista endogeno il glutammato^[2]. **(Figura 1 e 2)**

Tale possibilità venne smentita in quanto il legame dell'isotopo triziato del fenciclidina risultava ridotto in presenza di certi cationi a differenza di quello con [³H]-(+)-NANM.

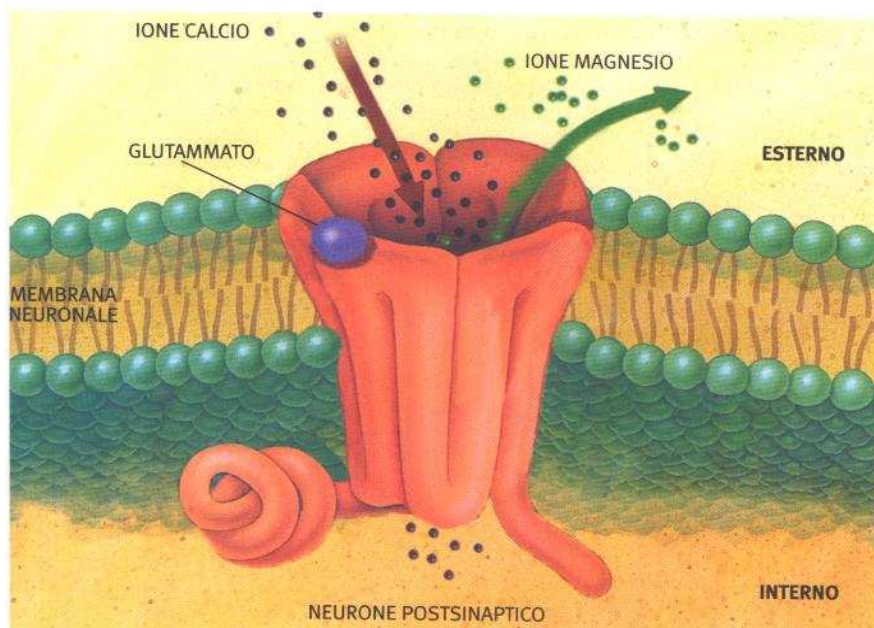


Figura 1. Il recettore NMDA del glutammato è associato a un canale ionico. E' un canale ligando dipendente che, quando è aperto, consente al Ca⁺² e al Na⁺ di fluire all'interno della cellula e al K⁺ di fuoriuscire. Viene bloccato dagli ioni magnesio con un meccanismo voltaggio-dipendente mentre la fenciclidina (PCP) **2** è un suo antagonista specifico e produce un'inibizione voltaggio-indipendente.

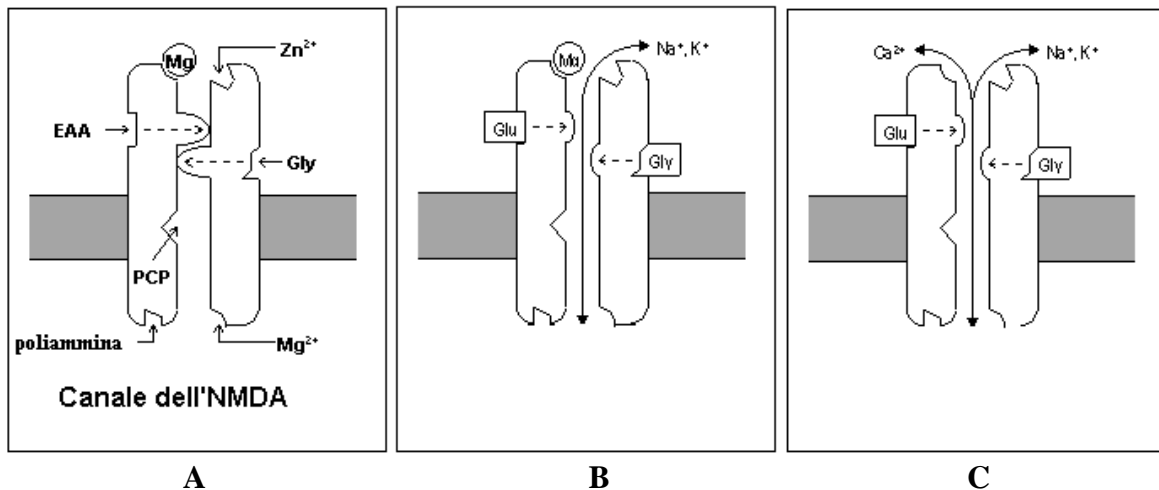


Figura 2. A. Canale del recettore NMDA. B. Parzialmente aperto. C. totalmente aperto.

Oggi risulta chiaro che i siti σ sono indipendenti e distinti dai siti di legame degli oppioidi e della PCP.

Attraverso la caratterizzazione farmacologica, la distribuzione anatomica ed i differenti pesi molecolari sono stati identificati almeno due sottotipi di siti di legame sigma, σ_1 e σ_2 [2,3,4] ed è stato proposto il sottotipo σ_3 sensibile all'azione di derivati fenilamminotetralinici (PATs) [5].

La localizzazione cellulare ed anatomica dei recettori σ non si riferisce esclusivamente al S.N.C. [6-8] ma anche a tessuti periferici come i vasi sanguigni, ghiandole surrenali, testicoli, ovaie e sistema immunitario [9].

Classificazione dei recettori σ

In base alla collocazione dei recettori σ nelle diverse aree della corteccia celebrale (**Figura 3**) e la loro significativa concentrazione nelle vie mesolimbiche si ipotizza un ruolo di tali siti di legame nella regolazione di alcuni comportamenti dell'uomo e nell'animale da esperimento ed una loro disfunzione in alcune patologie psichiatriche [10].

Siti σ , infatti, sono stati identificati in regioni limbiche correlate all'eziologia e alla terapia della schizofrenia [2,8,10].

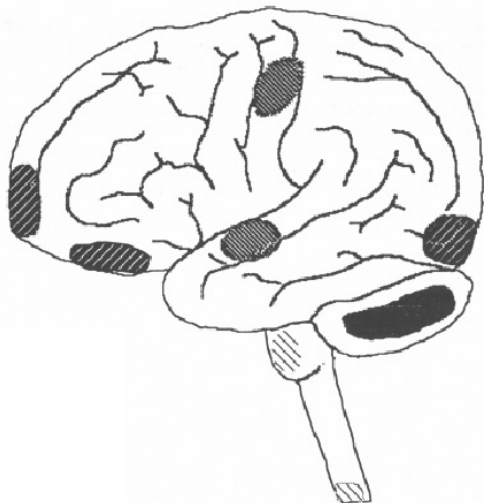


Figura 3. In questa immagine sono evidenziati i diversi livelli di densità recettoriale nelle differenti aree della corteccia cerebrale: alti nei lobi frontale e occipitale, medi nei lobi parietale e temporale e bassi a livello del ponte e del midollo allungato. La più alta densità si trova in corrispondenza della corteccia cerebellare.

I recettori σ_1 sono concentrati inoltre nel sistema limbico in particolar modo nell'ippocampo e nello strato granulare del giro dentato; si trovano nelle aree anteriori del cervello compreso il setto, il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo e il nucleo talamico anterodorsale e ancora in diverse regioni del cervello medio e posteriore come il rafe dorsale, la *substantia nigra* e il *locus coeruleus* nonché nel cervelletto. I recettori σ_2 si trovano maggiormente concentrati in aree del cervello coinvolte nel controllo della postura e del movimento.

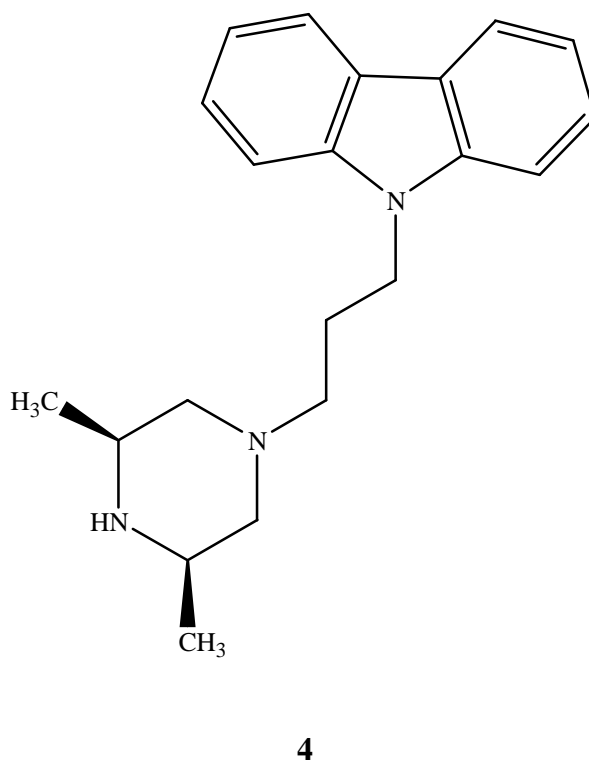
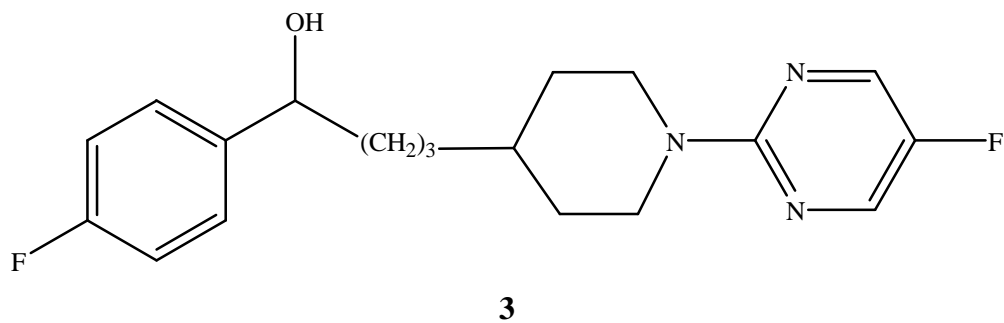
Numerose evidenze danno credito all'ipotesi che i recettori σ abbiano un ruolo neuromodulatorio nel SNC e siano coinvolti in varie patologie come l'ansia, la schizofrenia, la depressione o la neurotossicità a livello delle cellule gliali. Inoltre siti σ -recettoriali sono stati correlati all'eziologia di malattie psichiatriche e motorie ^[11].

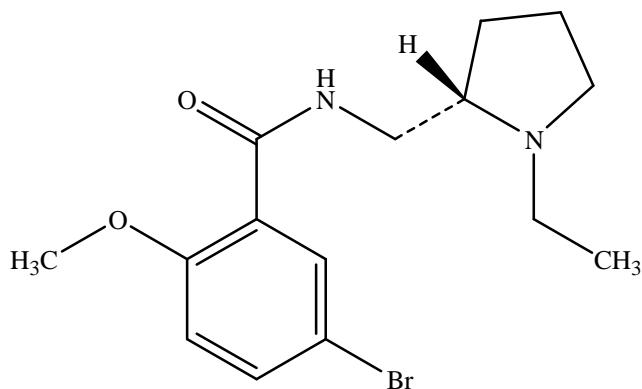
Tale teoria è avvalorata da molteplici prove farmacologiche, alcuni ligandi σ -recettoriali hanno potenziale attività antipsicotica e numerosi neurolettici quali flufenazina, triflufenazina e aloperidolo producono effetti neurotossici a livello delle cellule gliali (come variazioni morfologiche, citostasi e morte cellulare) ^[12] ed allo stesso tempo dimostrano una significativa affinità di legame verso i siti σ .

E' stata inoltre dimostrata la correlazione tra l'entità degli effetti tossici sul SNC da parte di alcuni composti ad attività antipsicotica e la loro affinità σ -recettoriale.

Neurolettici senza affinità σ ed altri ligandi di siti centrali non σ , infatti, non producono alcun genere di risposte neurotossiche.

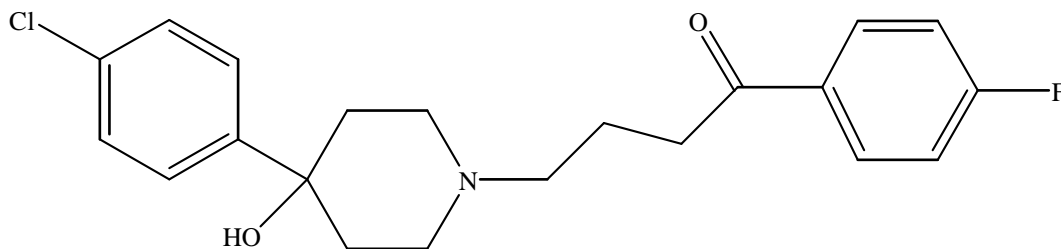
Numerosi neurolettici classici con notevole attività antipsicotica hanno elevata affinità per i recettori σ ma alcuni di essi come BMY-1482 **3**, rimcazolo **4**, remoxipride **5** dimostrano una bassa affinità D_2 -recettoriale ^[13-15].





5

Un ulteriore esempio viene fornito dal composto neurolettico aloperidolo **6**. Studi post-mortem hanno rilevato una riduzione significativa di recettori σ cerebrali in individui schizofrenici. Molti di questi soggetti erano stati trattati cronicamente con aloperidolo, ligando σ e neurolettico quindi non si può con certezza dimostrare che la riduzione dei siti σ sia alla base dell'eziologia della malattia in quanto questo evento può essere il risultato di una down-regulation recettoriale mediata dall'aloiperidolo stesso.

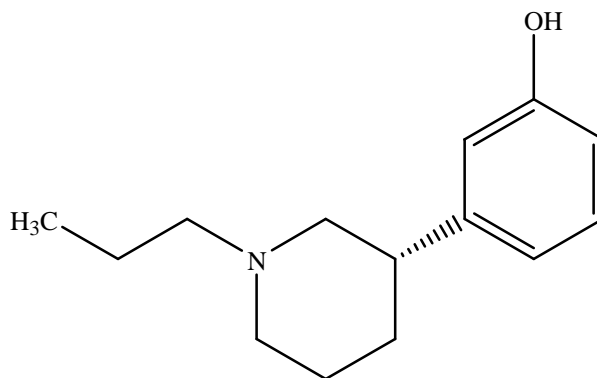


6

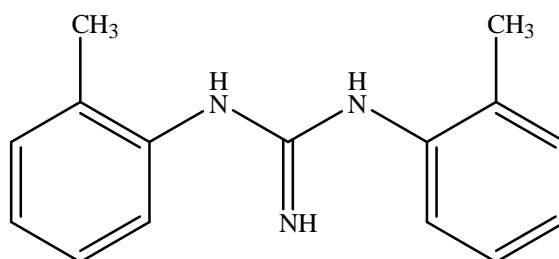
Ciò che comunque è emerso è che l'aloiperidolo è caratterizzato da un'elevata affinità verso i siti σ maggiore rispetto a quella verso la componente D₂-recettoriale ed i recettori σ comprendono almeno la metà dei siti di legame dell'aloiperidolo suggerendo in maniera aggiuntiva che i recettori σ possono avere un ruolo peculiare nell'eziologia e nella conseguente terapia di alcune psicosi ^[16].

Inibendo il legame della NANM con una K_i di 4 nM^[17], cioè con una potenza dieci volte maggiore rispetto a quella esibita nei confronti dei recettori D₂ dopaminergici, l'aloiperidolo porta a definire i siti σ come "aloiperidolo-sensibili e naloxone insensibili".

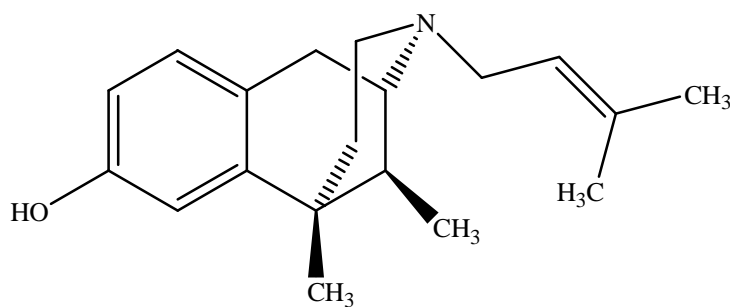
L'aloiperidolo, inoltre, assieme ad altri ligandi σ come la (+)-3-(3-idrossifenil)-N-(1-propil)piperidina **7** antagonizzano l'effetto di alcuni agonisti σ ad alta affinità come la 1,3-di(2-tolil)guanidina (DTG) **8** e (+)-pentazocina **9** che producono un potenziamento dose-dipendente del "firing" dei neuroni piramidali indotto da NMDA^[18,19] dimostrato dal fatto che il "firing" era stimolato, appunto, dalla somministrazione locale di DTG **8** e (+)-NANM **1**^[20].



7



8



9

I recettori σ potrebbero anche avere un possibile ruolo in patologie neuromotorie quali la distonia e la discinesia ^[21], nel cervello, infatti, sono state identificate aree ad alta densità di recettori σ associate al controllo del movimento anche dei muscoli facciali ^[21].

Vari (+)-benzomorfolani che legano recettori nel ratto producono distonia. Questi effetti sono correlati con l'affinità di legame per i siti σ [³H]-DTG marcati ^[22].

Inoltre, la somministrazione di DTG e (+)-pentazocina, potenti agonisti σ , nei ratti produce un significativo aumento dei livelli extracellulari striatali di dopamina.

I recettori σ , in base ad altri studi effettuati ^[23], avrebbero una parte importante nella mediazione degli effetti collaterali extrapiramidali (quelli similparkinsoniani) prodotti da quei neurolettici che hanno affinità per siti σ DTG-marcati uguale o maggiore rispetto a quella per recettori D₂, come ad esempio l'aloiperidolo.

Sottotipo recettoriale σ_1

Nonostante attualmente si abbiano informazioni strutturali dettagliate solo per il sottotipo recettoriale σ_1 si possono chiaramente distinguere ulteriori classi recettoriali non solo in base allo loro attività ma anche attraverso le differenti caratteristiche farmacologiche e per il loro diverso peso molecolare.

A livello di SNC, gli esperimenti condotti dal gruppo di Mc Cann^[24] hanno indicato una rilevante presenza di [³H]-(+)-NANM nella frazione microsomiale del cervello di ratto. Ulteriori studi dimostrano che è proprio nella frazione microsomiale si ha la più alta distribuzione di siti σ , sia σ_1 che σ_2 , mentre nella frazione mitocondriale la concentrazione dei σ_1 è almeno doppia rispetto a quella dei σ_2 .

La proteina σ_1 -recettoriale è stata purificata e clonata da numerose specie animali e dall'uomo^[25,26] (**Figura 4**). Ha una distribuzione specifica nel SNC ed ha una sequenza amminoacidica composta da 223 amminoacidi per un peso molecolare di 25 KDa.

Recenti studi hanno chiarito che la proteina consta di 2 domini transmembrana collegati da un lungo loop extracellulare.

Non presenta alcuna omologia strutturale con recettori associati ad altri neurotrasmettitori umani ma mostra un omologia di sequenza con un Δ_8 - Δ_7 isomerasi fungina ^[27].

Il gene che la codifica è localizzato sul cromosoma 9 sulla banda p13, regione che sembra essere associata con diversi disordini di natura psichiatrica.

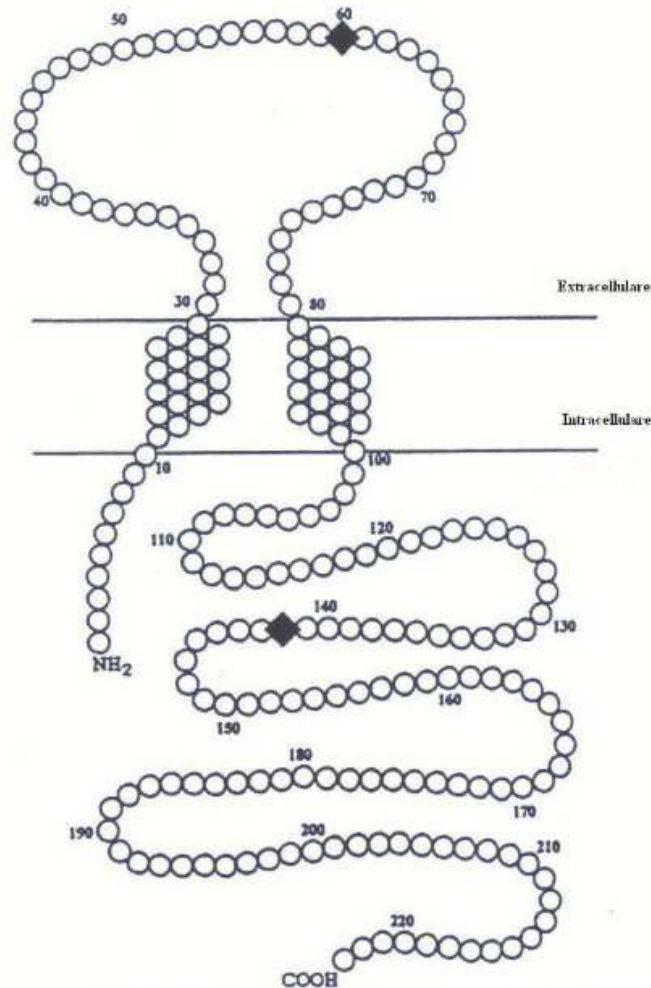
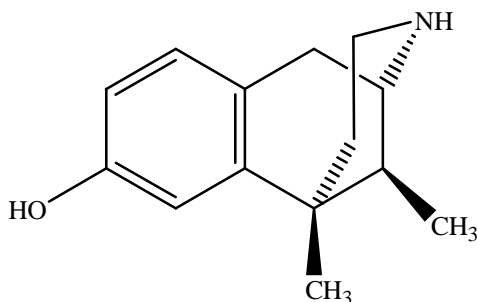


Figura 4. Modello strutturale per il recettore σ_1 . Il gene per il recettore σ_1 è localizzato sul cromosoma 9 sulla banda p13, regione nota per essere associata con disordini psichiatrici, ed è lungo ca.7 Kbp. La proteina è costituita in tutto da 223 amminoacidi, corrispondente a 25.3 KDa. Da studi recenti sembra essere costituita da due domini transmembrana risultanti in un loop extracellulare di circa 50 amminoacidi e in una sequenza C-terminale intracellulare di circa 125 amminoacidi. In accordo con questo modello, la sequenza N-terminale è molto corta e sempre localizzata nella porzione intracellulare. La sequenza amminoacidica non corrisponde a quella dei recettori accoppiati alle proteine G e ciò mette in dubbio l'ipotesi che i recettori σ appartengano a questa classe ^[28].

◆ I due residui di lisina nel recettore σ_1 del porcellino d'India. Nel recettore σ_1 di ratto il residuo 60 è arginina, per cui gli unici gruppi aminici primari sono il gruppo aminico della lisina ed il gruppo aminico terminale

Il recettore σ_1 dimostra un'elevata affinità per gli isomeri destrogiri dei derivati della cis-normetazocina **10**, (+)-pentazocina **9** e (+)-N-allilnormetazocina (SKF 10,047) **1**, mentre ha molto scarsa affinità verso i rispettivi enantiomeri (-).



10

I (+)-benzomorfolani come la (+)-pentazocina **8** e la (+)-NANM **1** hanno un'alta affinità per il sottotipo σ_1 ($K_i = 10^{-9}$ M) ma solo una debole affinità ($K_i = 10^{-6}$ M) per il sottotipo σ_2 , mentre gli isomeri levogiri (-) hanno una selettività per i siti σ_2 ma bassa affinità per entrambi.

Si può supporre un coinvolgimento dei recettori σ_1 in funzioni neuroendocrine, come la sintesi ed il metabolismo di steroidi neuroattivi, vista l'alta densità di siti σ a livello di SNC e nei tessuti coinvolti nella produzione di steroidi neuroattivi [29].

Un approfondimento di questa teoria ha confermato la partecipazione dei recettori σ_1 nella biosintesi degli steroli ed un'inibizione da parte di un antagonista σ porterebbe, quindi, a delle modificazioni nella composizione lipidica delle membrane cerebrali con conseguente alterazione dell'eccitabilità neuronale [27].

Sono state descritte numerosi possibili funzioni fisiologiche mediate dai recettori σ_1 , quali :

- Modulazione della sintesi e del rilascio dei neurotrasmettitori acetilcolina e dopamina [30,31];
- Effetti neuromodulatori su sistemi glutamminergici di tipo NMDA [2,14] e su sistemi oppioidi [32];
- Attenuazione dell'effetto indotto da cocaina [33];
- Effetti anti-amnesiaci.

Attualmente il meccanismo molecolare coinvolto in questi effetti non è stato ancora chiarito in maniera esauriente. Uno studio recente ipotizza che un possibile modo d'azione potrebbe essere la modulazione del livello di Ca^{2+} da parte del complesso recettore-ankirina-1,4,5-trifosfato ^[34].

Inoltre sulla base delle loro funzioni neuroregolatrici ^[35] e neuroprotettive ^[36] agonisti σ_1 hanno un potenziale impiego per il trattamento di disturbi psichiatrici, dell'amnesia e delle difficoltà di apprendimento ^[37].

Possono anche essere coinvolti in un possibile trattamento della depressione avendo un ruolo determinante per l'effetto di numerosi antidepressivi che dimostrano un'elevata affinità per i siti σ_1 .

Sottotipo recettoriale σ_2

Il recettore σ_2 non è ancora ben caratterizzato rispetto al σ_1 in quanto non è stata ancora clonata la proteina corrispondente ed inoltre manca un numero sufficientemente elevato di molecole selettive ad alta affinità che lo definirebbero in maniera più completa.

La sequenza amminoacidica è, quindi, ancora ignota; si conosce però il peso molecolare che è di 18-21 KDa. Presenta una bassa affinità per la (+)-N-allilnormetazocina **1** e per la (+)-pentazocina **9** mentre dimostra una buona affinità nei confronti di neurolettici tipici come l'aloiperidolo **6** e per la DTG **8**.

Per quanto riguarda la loro distribuzione anatomica, i recettori σ_2 sono distribuiti nel SNC con una concentrazione maggiore rispetto al sottotipo σ_1 ed inoltre sono situati in zone del SNC strettamente coinvolte nel controllo motorio. Inoltre i tipici effetti collaterali extrapiramidali indotti da numerosi farmaci neurolettici che, come ad esempio l'aloiperidolo **6**, dimostrano una certa affinità per i siti σ_2 portano all'evidenza che i recettori σ_2 sono coinvolti nel controllo motorio e, quindi, nel trattamento di possibili patologie correlate ad esso.

È stato, infatti, dimostrato che antagonisti σ_2 limitano gli effetti motori extrapiramidali indotti dai tipici agenti antipsicotici ^[35] ed attenuano le convulsioni causate da cocaina ^[38,39].

I ligandi σ nel trattamento dei tumori

L'elevata espressione dei recettori σ_2 in differenti linee cellulari di tumori del seno, dei polmoni, della prostata e di melanomi ha suggerito un importante ruolo di questi siti nella proliferazione tumorale e nella vita cellulare ^[40].

Inoltre, si è dimostrata la funzione regolatoria che i recettori σ_2 esibiscono nei confronti del controllo della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} ; nonostante lo scarso numero a disposizione di ligandi selettivi ad alta affinità, infatti, è risultato evidente il loro coinvolgimento nel rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico e dalla membrana mitocondriale ^[41].

Come conseguenza di ciò si ipotizza il possibile legame tra l'attivazione dei recettori σ_2 e la morte cellulare programmata (apoptosi) ^[41].

In particolare, è stato dimostrato che il trattamento cronico con agonisti σ_2 su varie linee cellulari produce modificazioni morfologiche e apoptosi la quale si realizza in maniera indipendente rispetto all'attivazione di caspasi conosciute ^[12,42]. In realtà si è provato che gli agonisti σ_2 promuovono la deplezione del Ca^{2+} dai depositi intracellulari con successiva morte cellulare causata da apoptosi caspasi-indipendente; infatti, utilizzando degli inibitori delle caspasi attualmente note, la risposta apoptotica indotta dal legame tra recettori σ_2 e suoi ligandi agonisti è risultata invariata nell'intensità. Probabilmente interviene un meccanismo nel quale viene coinvolto la p-53 e non, come avviene in altri meccanismi caspasi-indipendente, tramite l'implicazione di danni diretti al DNA o attraverso stimoli antineoplastici o apoptotici di diversa natura ^[43]. **(figura 5)**

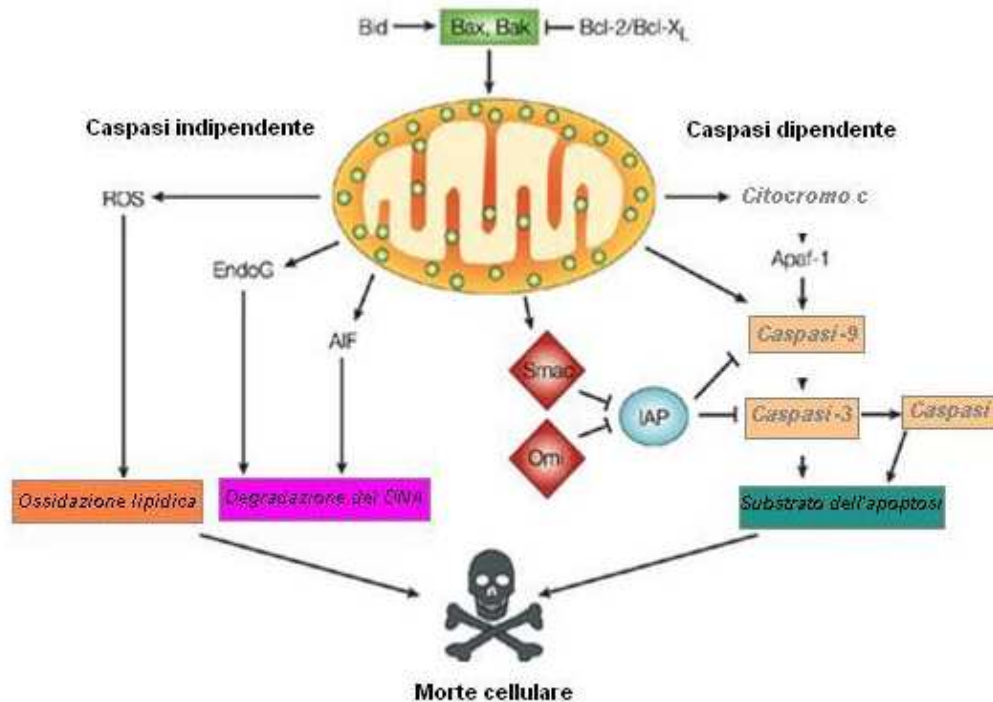


Figura 5. Schema della via mitocondriale dell'apoptosi : i geni *Bid* e *Bcl-2* sono dei “modulatori” dell'apoptosi attivati da stimoli recettoriali provenienti dalla membrana cellulare. Il primo è un agente proapoptotico che a sua volta rende operanti altri due geni, *Bax* e *Bak*, promotori del fenomeno apoptotico; il secondo invece è un'antiapoptotico che blocca *Bax* e *Bak*. Una volta attivati, *Bax* e *Bak* provocano una modificazione del potenziale della membrana mitocondriale e la conseguente apertura di canali che permettono la fuoriuscita di altre molecole apoptotiche come il *citocromo c* e *Apaf-1* che è un “adattatore” cioè un'ATPasi che si lega, tramite dei domini particolari, alla *caspasi-9* che a sua volta attiva la *caspasi-3*, vero e proprio “effettore” della via dell'apoptosi caspasi dipendente. Fuoriescono dal mitocondrio anche altre molecole come *Smac*, un attivatore di caspasi mitocondriale, e *Omi* una serin-proteasi che blocca l'inibitore di caspasi *IAP* e che quindi favoriscono l'apoptosi caspasi dipendente. La via caspasi indipendente prevede, invece, che gli “effettori” siano altri tipi di molecole rilasciate dal mitocondrio : le endonucleasi *EndoG* e *AIF* che promuovono la degradazione del DNA e i radicali liberi dell'ossigeno (i *ROS*) che provocano l'ossidazione dei fosfolipidi.

È stato oltre più dimostrato che le modificazioni morfologiche e l'apoptosi indotte dall'esposizione cronica di diverse linee cellulari agli agonisti σ_2 , si realizza indipendentemente dallo stato del tumore ^[12,42].

Inoltre, l'attivazione di recettori σ_2 in cellule di neuroblastoma umano SK-N-SH determina

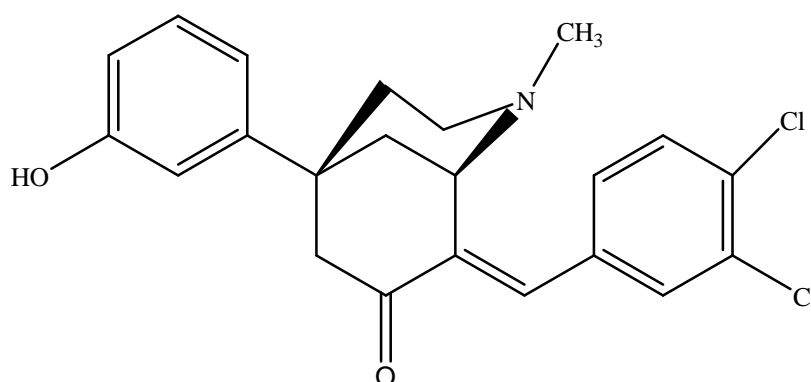
un aumento della concentrazione di calcio citosolico ($[Ca^{2+}]_i$) indipendente dall'inositolo-3-fosfato (IP_3) grazie ad un rapido e transitorio rilascio da un deposito taspigargina-sensibile nel reticolo endoplasmatico ^[41]. Successivamente segue un rilascio più lento e sostenuto da un deposito taspigargina-insensibile dai mitocondri con conseguente attivazione della cascata dei fenomeni apoptotici. In questa maniera si è spiegato il coinvolgimento dei recettori σ_2 nella regolazione della crescita e della proliferazione cellulare.

L'apoptosi può essere indotta in cellule tumorali tramite la regolazione delle vie sintetiche dei fosfolipidi ^[44].

Gli sfingolipidi, infatti, hanno un ruolo molto importante nella proliferazione cellulare. La ceramide, ad esempio, può provocare sia aumento della proliferazione che arresto della crescita ed inoltre può indurre apoptosi a seconda del tipo di cellula e delle vie di traduzione del segnale attivate ^[45].

Oltre a ciò, basi sfingoidi come sfingosina-1-fosfato e sfingosilfosforilcolina hanno effetti sulla ($[Ca^{2+}]_i$) sia IP_3 -dipendente che IP_3 -indipendente. La ceramide si può formare tramite diverse vie biosintetiche dalla sintesi "de novo" all'idrolisi da parte di sfingomielinasi della sfingomielina.

Un recente studio di Crawford e Coll., basato sugli effetti che i recettori σ hanno sui livelli di ceramide e sfingomielina in cellule di tumore al seno, ha dimostrato che il composto CB-184 **11** (agonista σ_2 selettivo e potente induttore di apoptosi) produce un significativo aumento dose-dipendente dei livelli di $[^3H]$ -ceramide accompagnato da una concomitante diminuzione della concentrazione di $[^3H]$ -sfingomielina ^[44].



11

Il composto AC927 (N-fenetilpiperidina ossalato), un antagonista σ che attenua la citotossicità e l'aumento della ($[Ca^{2+}]_i$) indotti dagli agonisti σ_2 recettoriali, invece, elimina in parte l'aumento di [3H]-ceramide indotto da CB-184 ed abolisce completamente la diminuzione dell'isotopo triziato della sfingomielinea.

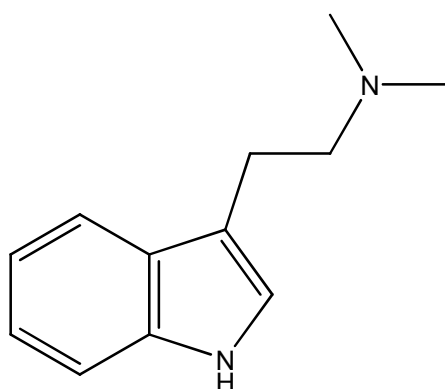
Numerosi altri induttori di apoptosi provocano un aumento dei livelli di ceramide che ha come target preferenziale la proteina CAPP ossia una fosfatasi ceramide attivata ^[45].

L'acido okadaiko è un inibitore della CAPP e blocca, nelle cellule tumorali oggetto dello studio, completamente la citotossicità indotta dall'agonismo σ_2 ribadendo come la ceramide e la conseguente attivazione della CAPP possono essere coinvolte nel processo apoptotico σ_2 -mediato. I risultati suggeriscono che i recettori σ_2 possono utilizzare prodotti di sfingolipidi per influenzare segnali del calcio, proliferazione e sopravvivenza cellulare. Sono in corso di studio gli enzimi regolati da recettori σ_2 e la sorgente di ceramide.

Si è inoltre provata l'iperpressione di recettori σ_2 a livello cellulare, ad esempio nel caso del tumore alla prostata raggiungendo valori molto elevati (1.0-1.5 milioni di recettori per cellula). Oltre al loro potenziale impiego come nuovi potenziali farmaci antineoplastici, ligandi σ_2 altamente specifici e selettivi, possono quindi essere utilizzabili come "tracers" per la visualizzazioni *in vivo* di recettori σ_2 , come biomarkers della proliferazione tumorale^[46] e per la "imaging tumor diagnosis" con scintigrafia SPECT ^[47,48] e analisi PET ^[49].

Ligando endogeno dei recettori σ_1

Nonostante negli ultimi anni si siano fatti notevoli progressi nello studio dei recettori σ , la scoperta di un loro ligando endogeno risale solamente a qualche mese fa ^[50]. In particolare, in seguito a studi biochimici fisiologici e comportamentali è emerso che il possibile ligando endogeno dei recettori σ_1 è la N,N-dimetiltriptamina (DMT) **12**, un'indolilalchilammina di origine naturale caratterizzata dai suoi forti effetti allucinogeni ^[50].



12

La DMT è un composto che veniva utilizzato per il suo potere allucinogeno già nei tempi antichi dagli sciamani del Sud America nei loro rituali. Questo composto è prodotto nei roditori a livello del sistema nervoso centrale, mentre nei mammiferi essa viene prodotta da alcuni enzimi presenti nei polmoni ^[50]. Nonostante non siano ancora stati effettuati degli studi conclusivi sulla concentrazione di DMT endogena a causa del suo rapido metabolismo, molte prove sostengono l'ipotesi che la DMT sia localmente sequestrata nelle vescicole di deposito cerebrale di altri neurotrasmettitori. Inoltre, è stato accertato che la concentrazione di DMT nel cervello di ratto aumenta sotto forti stress comportamentali ^[50].

Una decina di anni fa è stata scoperta una famiglia di recettori eterodimerici accoppiati a proteine G (GPCRs) noti come TARs (trace amine receptors) cioè recettori per le amine elusive, delle quali fanno parte molecole come la triptamina e la tiramina, molecole strutturalmente molto simili alla DMT e che possono avere dei target di binding comuni. Per questo motivo si è voluto analizzare l'affinità di questi composti nei confronti dei recettori σ .

Dal modello farmacoforico di Glennon ^[51-53], infatti, i ligandi σ hanno in comune un atomo di azoto basico e dei centri idrofobici separati da uno spaziatore alchilico. Le indolilalchilammine ed altre ammine endogene hanno una struttura chimica in grado di

mappare adeguatamente questo modello. Sulla base dei risultati ottenuti dai saggi di competizione contro i radioligandi σ (PTZ per i σ_1 e DTG per i σ_2), è emerso che tra tutti i derivati amminici testati solo la N,N-dimetiltriptamina possiede un'alta affinità per i recettori σ_1 ($K_d=14.75 \mu\text{M}$), una buona selettività nei confronti del sottotipo σ_2 ed induce in altri test biologici e comportamentali un potenziamento degli effetti σ dipendenti ^[50].

In attesa di ulteriori verifiche, comunque, la scoperta della DMT come possibile ligando endogeno risulta essere di indubbio interesse per la ricerca di nuove ed importanti informazioni sul ruolo biologico dei recettori σ , il quale non è stato ancora completamente chiarito soprattutto dal punto di vista dei meccanismi d'azione.

Inoltre, lo scaffold indolilalchilamminico della N,N-dimetiltriptamina potrà essere sfruttato nella progettazione e nella successiva sintesi di nuovi ligandi σ sempre più attivi e selettivi.

Modelli farmacoforici

I primi modelli farmacoforici proposti per i ligandi σ_1 sono quelli di Glennon ^[51-53] (Figura 6) e di Gund ^[54] (Figura 7).

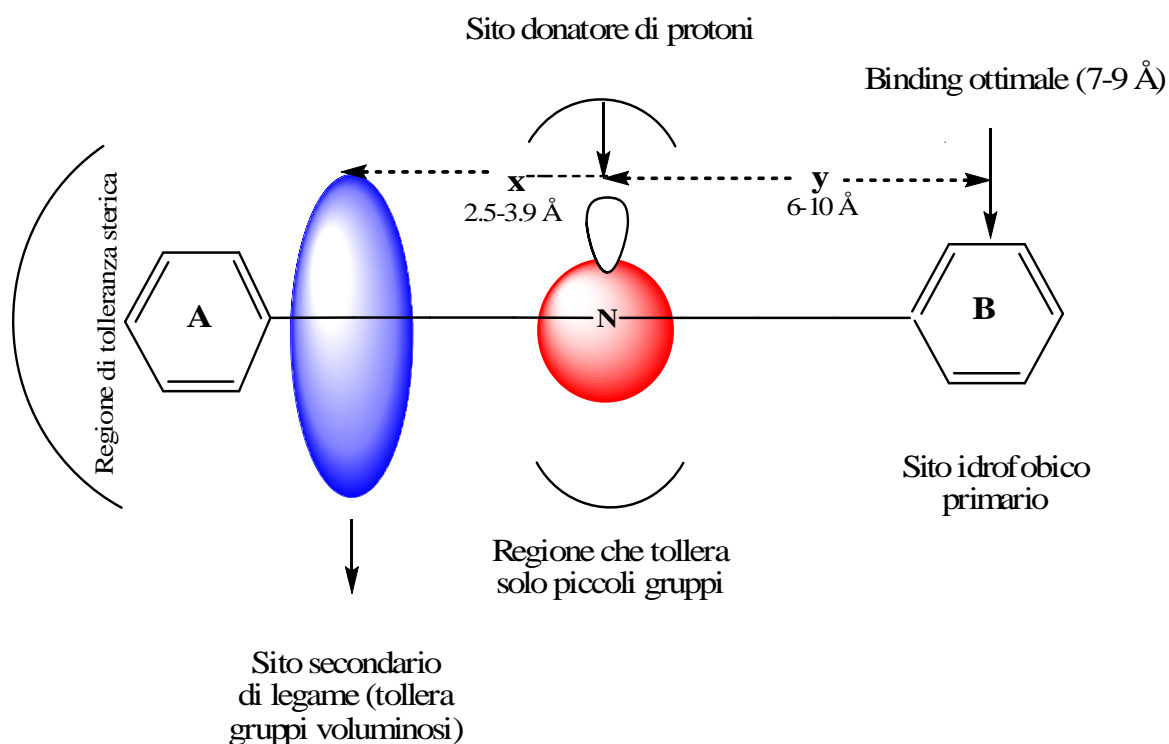
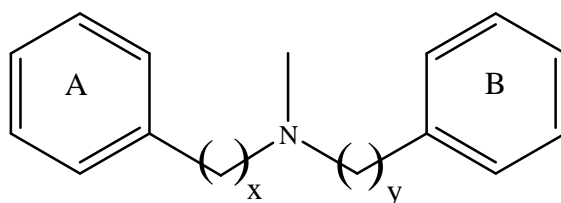


Figura 6. Modello σ_1 -farmacoforico di Glennon: rappresentazione grafica delle caratteristiche proposte per i ligandi σ_1 . Glennon e Coll. ^[51] hanno messo in evidenza correlazioni struttura-attività in una serie di ligandi σ_1 fenilalchilaminici N-sostituiti **13**. In questo modello la catena pentilica **y** corrispondente ad una distanza di 8.3 Å tra il centro del raggruppamento aromatico ed il gruppo amminico, appare ottimale. La presenza del fenile-B è importante per l'affinità di legame. In contrasto, la distanza **x** tra il gruppo amminico ed il fenile A non appare importante per l'affinità. Inoltre, sembra che la catena alchilica **y** non sia un semplice spaziatore ma interagisca attivamente nel legame con il recettore. Il modello propone, infine, l'esistenza di una regione secondaria di legame, di natura idrofobica e capace di tolleranza sterica, ad una distanza di 3.9 Å dal sito amminico che consente l'adattamento ottimale della catena **y** ed è in grado di tollerare caratteristiche strutturali varie e catene di diversa lunghezza.



13

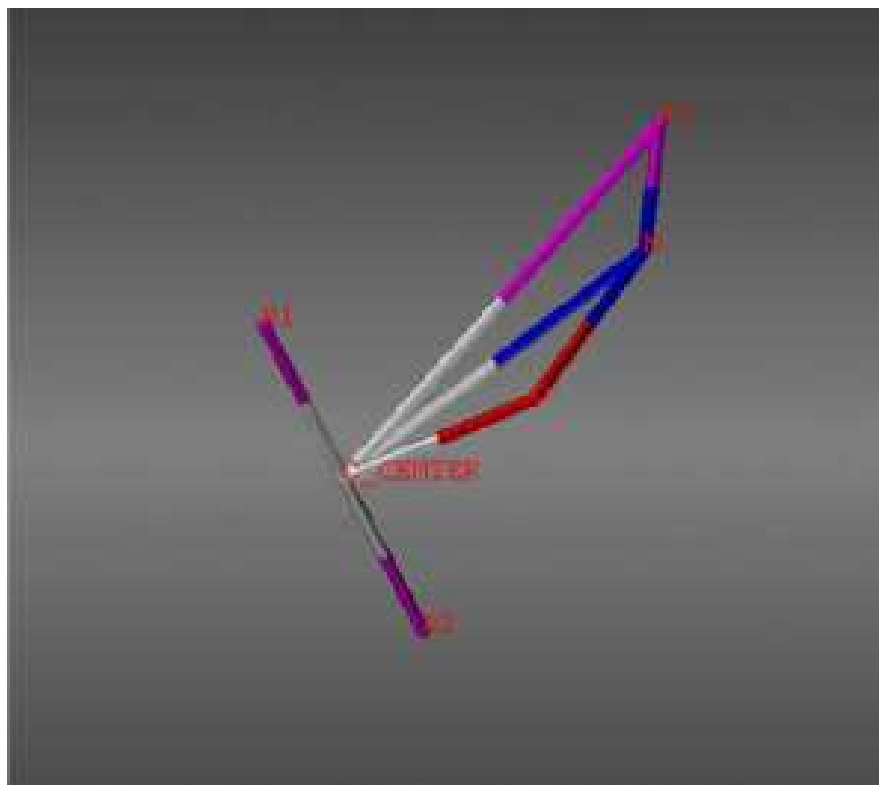


Figura 7. Rappresentazione schematica del modello di Gund. Il modello è stato sviluppato ottimizzando, in base ai livelli minimi di energia, la struttura di alcune molecole particolarmente affini e selettive nei confronti del sito σ_1 . In base ai dati conformazionali e le proprietà elettrostatiche di ciascun ligando, sono emerse delle somiglianze strutturali tali da permettere di individuare alcune parti chiave nella struttura molecolare per l'interazione con il recettore σ_1 .

Come per Glennon, si è data particolare importanza alla presenza di un atomo di azoto basico che, grazie al lone pair, ha la possibilità di effettuare dei legami idrogeno con il recettore (R_3). Inoltre sono stati individuati altri 3 punti chiave nella struttura di un possibile ligando σ_1 : R_1 ed R_2 rappresentano una zona idrofobica costituita da un anello fenilico indispensabile per il legame σ_1 e che, assieme all'atomo di azoto costituiscono il gruppo farmacoforo primario; il centroide (in figura rappresentato da C_CENTER) non è strettamente indispensabile ai fini del legame ma è stato scelto per evidenziare con maggiore facilità distanze ed angoli di torsione. In aggiunta a ciò, è emersa un'altra porzione della molecola che influenzerebbe il legame: un'area elettronegativa rappresentata da un atomo di ossigeno o zolfo (raffigurata in rosso) posta tra la zona idrofobica e l'atomo di azoto e che costituisce il sito secondario di legame.

Recentemente, inoltre, è stato proposto un ulteriore modello farmacoforico per i recettori σ_1 da Laggner ^[55] (**Figura 8**), sviluppato utilizzando una serie di composti di diversa natura chimica e funzione farmacologica ma dotati di affinità nei confronti del recettore σ_1 . Il modello ottenuto risulta abbastanza semplice, ma in accordo con quelli precedentemente illustrati, ed evidenzia le proprietà strutturali basilari al fine del legame σ .

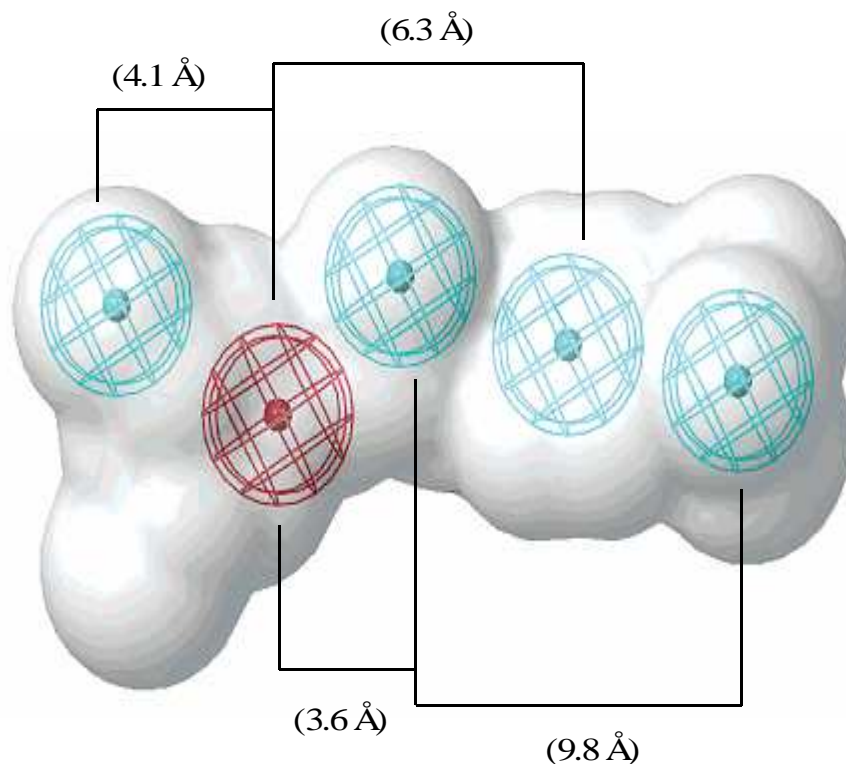


Figura 8. Modello farmacoforico per i recettori σ_1 di Laggner: rappresentazione grafica delle caratteristiche proposte per i ligandi σ_1 . Le sfere azzurre rappresentano delle features idrofobiche, mentre quella rossa indica un atomo positivo ionizzabile, cioè un atomo di azoto basico. Le distanze tra le varie componenti idrofobiche e l'atomo di azoto basico risultano in linea con i modelli precedentemente citati. Rispetto al modello di Glennon, però, viene evidenziata un'ulteriore feature idrofobica, nel sito primario, a 3.6 Å dall'atomo di azoto.

Ciò non si è potuto fare per il sottotipo σ_2 in quanto i ligandi σ_2 attualmente noti non garantiscono un adeguato profilo di selettività soprattutto nei confronti dei recettori σ_1 . Risulta, quindi, necessario una maggiore ricerca di ligandi σ_2 selettivi ad alta affinità al fine di aumentare le informazioni che permetterebbero uno studio più approfondito sulla natura e sulle funzioni di questo recettore.

Conclusione

Nonostante vi sia la necessità di ulteriori studi ed informazioni per delinearne il preciso meccanismo d'azione e la conferma del ligando endogeno, i recettori σ rappresentano un bersaglio farmacologico particolarmente interessante; considerando i processi biochimici e fisiologici in cui sono coinvolti, infatti, dei loro ligandi selettivi potrebbero essere coinvolti nel trattamento di numerose patologie di origine centrale, quali la schizofrenia, la depressione, le carenze cognitive e di memoria, gli effetti prodotti dall'abuso di sostanze stupefacenti, la discinesia tardiva, il potenziamento dell'analgesia e altri tipi di malattie.

Agonisti σ_2 sono potenziali agenti tumorali (mentre non vi sembra essere un coinvolgimento nella citotossicità da parte dei recettori σ_1) quindi, oltre al loro potenziale impiego come farmaci antineoplastici, ligandi σ_2 selettivi possono avere un ruolo importante come “tracers” per la visualizzazione in vivo di recettori σ_2 , come biomarkers della proliferazione tumorale ^[46] e per la “imaging tumor diagnosis” con scintigrafia SPECT^[47,48] e PET ^[49].

La scoperta di nuovi ligandi σ è di importanza primaria perché nuovi ligandi con alta affinità e selettività, in aggiunta a quelli già noti attualmente, possono rappresentare nuovi tools farmacologici per la classificazione dei recettori e per l'approfondimento delle conoscenze riguardo le loro funzioni biologiche. Inoltre, nuovi ligandi σ possono trovare importanti impieghi terapeutici.

I composti che si legano selettivamente ai recettori σ_1 sono piuttosto numerosi ed è stato, quindi, possibile elaborare un modello farmacoforico dei recettori σ_1 . Sfortunatamente, il numero di ligandi σ_2 selettivi attualmente conosciuti è ancora particolarmente scarso condizionato soprattutto dalla bassa selettività nei confronti dei recettori σ_1 .

La scoperta di nuovi ligandi σ_1 e σ_2 ad alta affinità e selettività è, dunque, un target stimolante nell'area di ricerca sui recettori σ . Lo studio delle correlazioni tra la struttura chimica e l'affinità di legame recettoriale può fornire informazioni importanti sugli elementi strutturali che determinano la preferenza per un sottotipo recettoriale e suggerire il disegno e la sintesi di nuovi ligandi selettivi.

***CREAZIONE DI UN MODELLO
FARMACOFORICO CON ACCELRY'S CATALYST
4.9^[56]***

La definizione ufficiale IUPAC di “farmacoforo” risale al 1998 ^[57]: “un farmacoforo è l’insieme delle caratteristiche steriche ed elettroniche necessarie a garantire le migliori interazioni sovramolecolari con una specifica struttura biologica target, al fine di aumentare o bloccare la sua risposta biologica” ^[58].

Il programma Accelrys Catalyst 4.9 (**Figura 9**) rappresenta un approccio relativamente nuovo allo studio dei modelli farmacoforici, che si basa sulla modellazione dell’interazione farmaco-recettore dal punto di vista del recettore, usando però informazioni derivate soltanto dal farmaco (dai dati riguardanti la sua affinità biologica in vitro).

Le strutture molecolari vengono trattate come modelli caratterizzati da funzioni chimiche posizionate strategicamente (**features**), che andranno a legarsi a funzioni complementari del recettore.

La flessibilità conformazionale viene studiata creando molti conformeri della stessa molecola, che vengono trattati simultaneamente durante le fasi di generazione del modello.

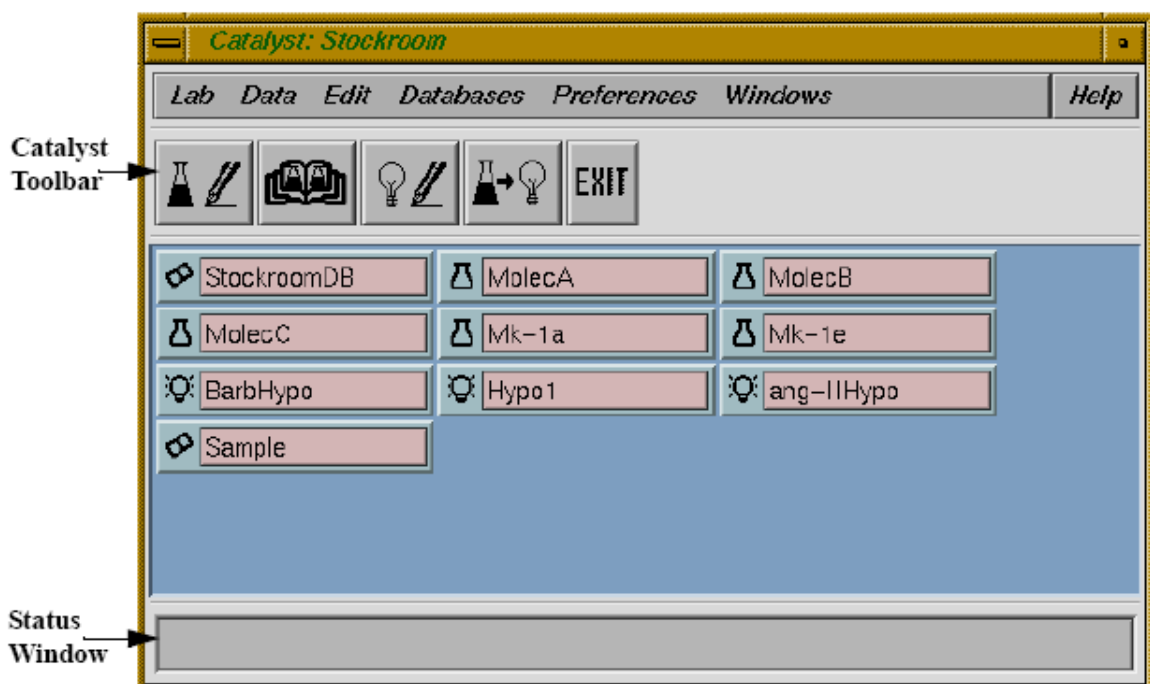


Figura 9. Catalyst Stockroom: schermata iniziale del programma, da cui si eseguono tutte le operazioni basilari di creazione e modifica di progetti.

Per la generazione di un modello farmacoforico è dapprima importante la corretta scelta di un **training set** di composti, di cui siano note le affinità biologiche in vitro. Tutti i composti usati devono potersi legare allo stesso recettore e sostanzialmente nello stesso modo. I composti che presentano più interazioni di legame con il recettore sono più attivi

di quelli che ne hanno poche. Il set deve essere ampiamente popolato (comprendendo almeno **16** molecole) e deve includere composti con diverse caratteristiche strutturali, che coprano un range di attività di almeno **4** ordini di grandezza.

Le molecole vengono inserite nel programma mediante **Catalyst 2D/3D Visualizer** (Figure 10, 11 e 12).

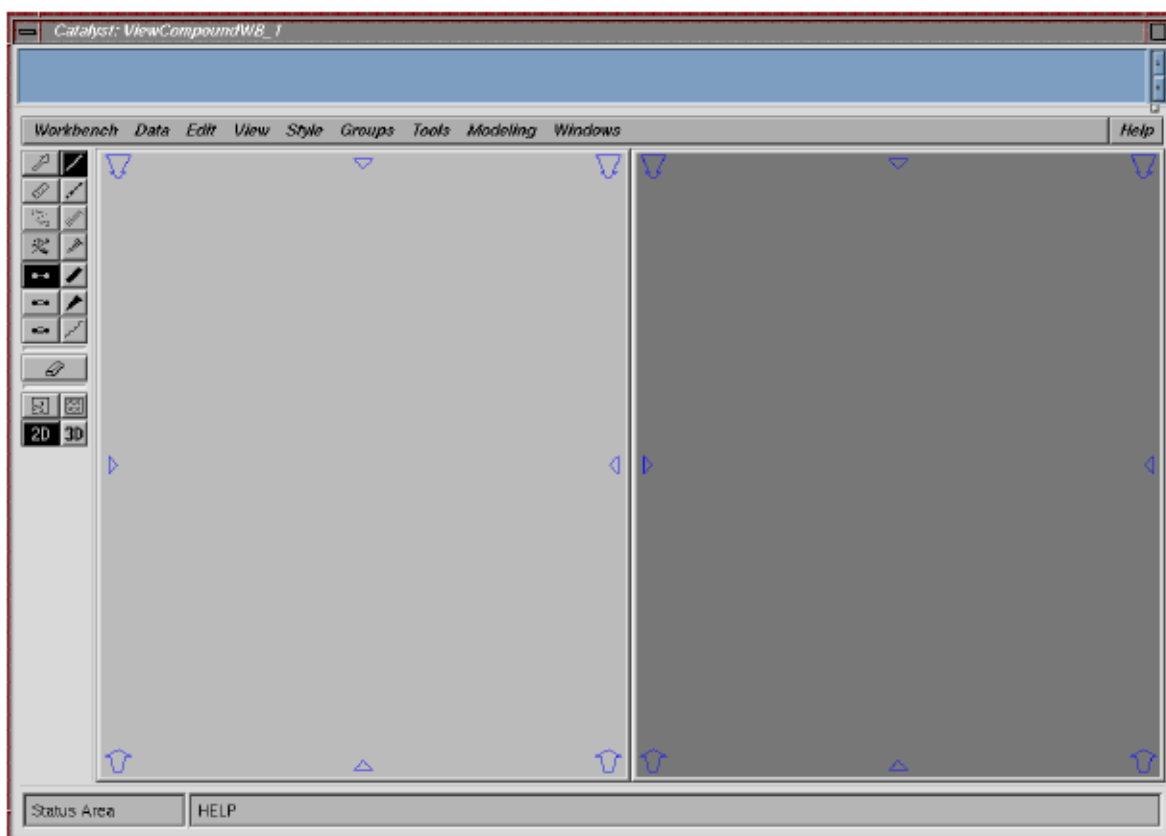


Figura 10. Catalyst 2D/3D Visualizer: mediante questa maschera si possono introdurre le strutture molecolari 2D (a sinistra) o 3D (a destra).

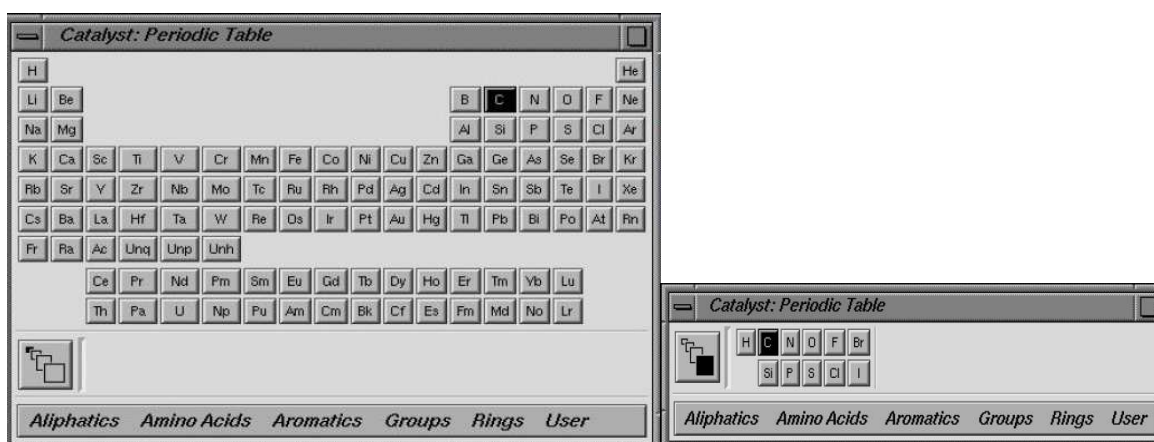


Figura 11. Catalyst Periodic Table: consente l'inserimento di qualsiasi elemento della tavola periodica.

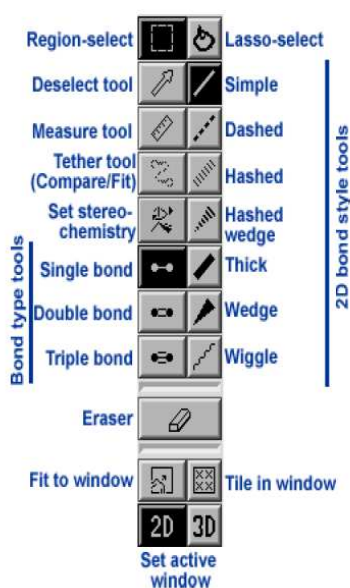


Figura 12. Barra degli strumenti che consente molteplici funzioni di modifica di legami e di visualizzazione.

Si possono disegnare sia in forma bidimensionale che in forma tridimensionale (**Figura 13**): in entrambi i casi si potranno migliorare mediante le funzioni **2d beautify** (ottimizza la visualizzazione bidimensionale della molecola) e **3d minimize** (parziale generazione di un conformero che corrisponde ad un minimo locale di energia, ma che non coincide necessariamente con il minimo globale).

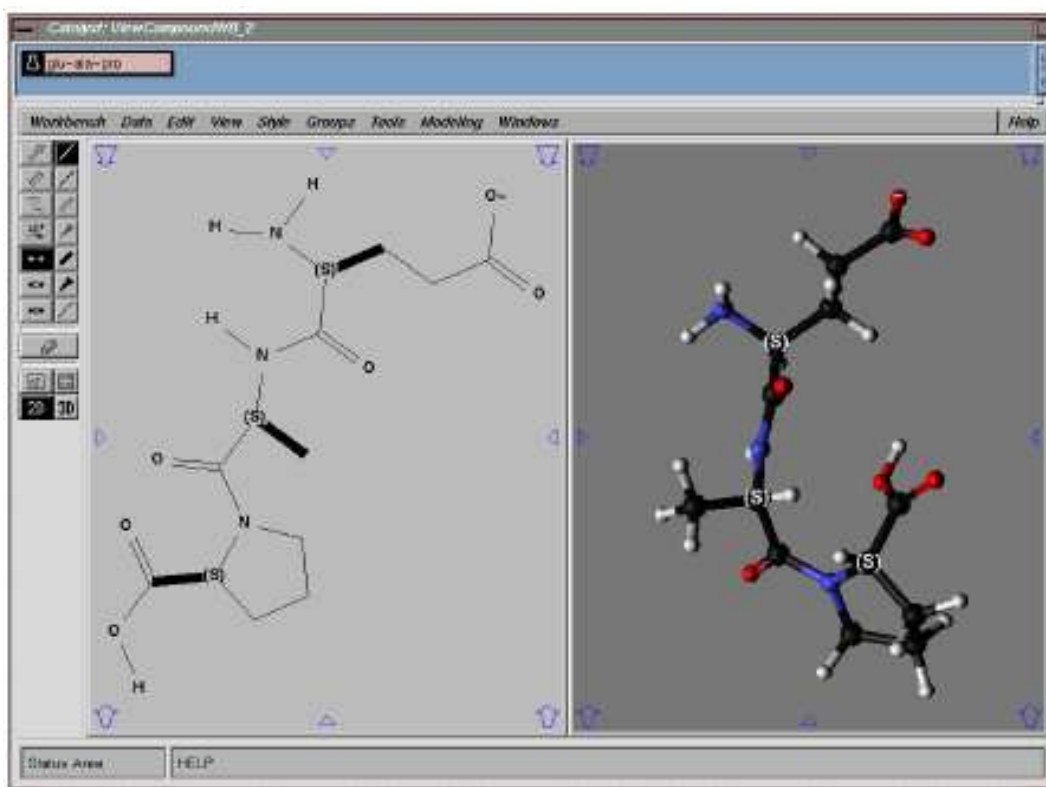


Figura 13. Esempio di inserimento di una molecola.

Ciascun composto viene rappresentato da un certo numero di conformeri, indicanti una diversa area di spazio conformazionale accessibile ad una molecola entro un dato range di energia. Si generano quindi i modelli conformazionali per ciascun composto del training set, mediante un algoritmo di tipo **Monte Carlo** (Figura 14).

Catalyst prevede la scelta di due tipi di analisi conformazionale: **Fast conformer generation** e **Best conformer generation**. Il primo rappresenta il metodo di elezione per la generazione di database di composti, in quanto si possono ricercare i conformeri di un gran numero di molecole (anche 100.000) in un tempo relativamente breve; chiaramente alcune caratteristiche strutturali (ad esempio la flessibilità degli anelli aromatici) verranno in parte trascurate. L'altro metodo consente una precisione maggiore e si utilizza per creare i conformeri che andranno a generare un'ipotesi di modello farmacoforico. L'analisi conformazionale si ferma automaticamente quando la differenza minima dei vari parametri conformazionali non può più essere rispettata: in questo modo, nel caso di piccole molecole rigide saranno generati pochi conformeri, mentre composti più complessi ed altamente flessibili ne produrranno molti. Anche se non vi è un numero massimo di conformeri generabili, la creazione di un'ipotesi di modello farmacoforico può accettarne al massimo 255 (il valore di default è 250): in tal senso sarà opportuno specificare un valore inferiore a

questo numero, e lasciare che il programma stesso decida quanti siano i conformeri realmente rilevanti.

Viene permessa una diversità conformazionale con energia di soglia inferiore a **20 kcal/mol** al di sopra del minimo globale stimato usando il **forcefield CHARMM**.

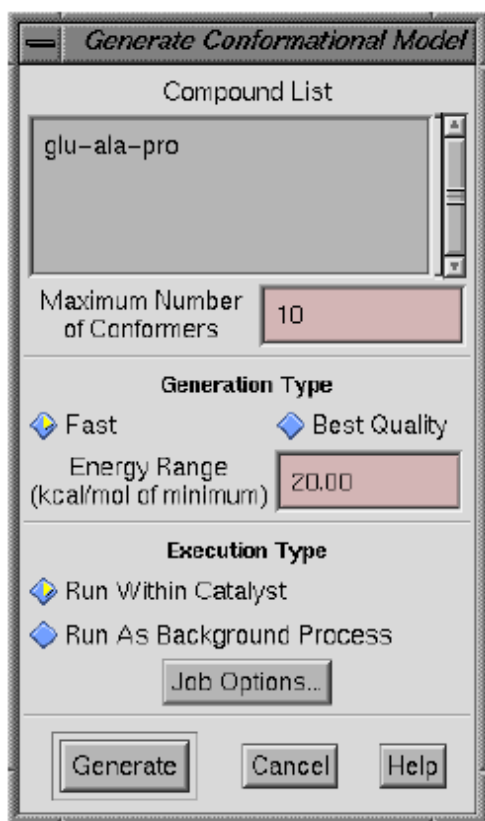


Figura 14. Maschera in cui si selezionano le varie opzioni per la generazione dei conformeri.

Un modello farmacoforico è la rappresentazione di caratteristiche molecolari generalizzate che includono strutture **3D** (gruppi idrofobici, gruppi carichi/ionizzabili, accettori o donatori di legami idrogeno), **2D** (sottostrutture), e **1D** (dati fisici e biologici, responsabili dell'attività biologica desiderata).

Mediante il **Catalyst Generate Hypothesis Workbench (Figura 15)**, e soltanto dopo aver generato i conformeri delle molecole inserite, si possono inserire i dati sperimentali di affinità biologica in vitro.

Row	Name	Actv	Uncert	Color	Estimate	Error	MW	Principal	MaxCofield
1	ni1	0.0100	3.0	Red			224.233	2	0
2	ni2	0.0104	3.0	Green			243.262	2	0
3	ni3	0.00	3.0	Blue			220.233	1	1
4	ni4	0.0100	3.0	Yellow			218.184	1	1
5	ni5	0.1	3.0	Cyan			219.255	1	1
6	ni6	0.11	3.0	Magenta			205.180	1	1
7	ni7	0.12	3.0	Orange			213.233	1	1
8	ni8	10	3.0	Purple			174.217	0	1
9	ni9	20	3.0	Teal			270.291	0	1

Figura 15. Catalyst Generate Hypothesis Workbench: foglio elettronico in cui vengono inseriti i dati, riguardanti ciascuna molecola, necessari per la generazione del modello farmacoforico.

Nel foglio di lavoro vengono inseriti:

Nome (Name) (quando si trascina il composto nel foglio di lavoro, il programma lo aggiunge automaticamente)

Attività (Activ) (attività/affinità biologica in vitro)

Incertezza (Uncert) (per default è pari a **3.0** e rappresenta il grado di incertezza collegato ai dati sperimentali: nel caso in cui il range delle attività biologiche dei composti superi di poco i 4 ordini di grandezza è consigliabile usare il valore **1.1**).

Colore (Color) (per distinguere visivamente le molecole)

Attività Stimata (Estimate) (valore di attività/affinità stimata del composto calcolato in base all'ipotesi)

Errore (Error) (valore che sta ad indicare lo scarto dell'attività misurata da quella stimata dall'ipotesi)

Peso Molecolare (MolWt) (calcolato dal programma)

Risulta poi necessario definire le caratteristiche strutturali essenziali al fine dell'attività (**Figura 16**): queste sono descritte da appropriate funzioni chimiche, che contengono informazioni relative a posizioni e orientazioni spaziali, tolleranza spaziale e importanza relativa: tutto ciò va a costituire i parametri base, chiamati **features** dell'**ipotesi** di modello farmacoforico, che ciascun composto deve presentare al fine di avere una buona affinità per il recettore.

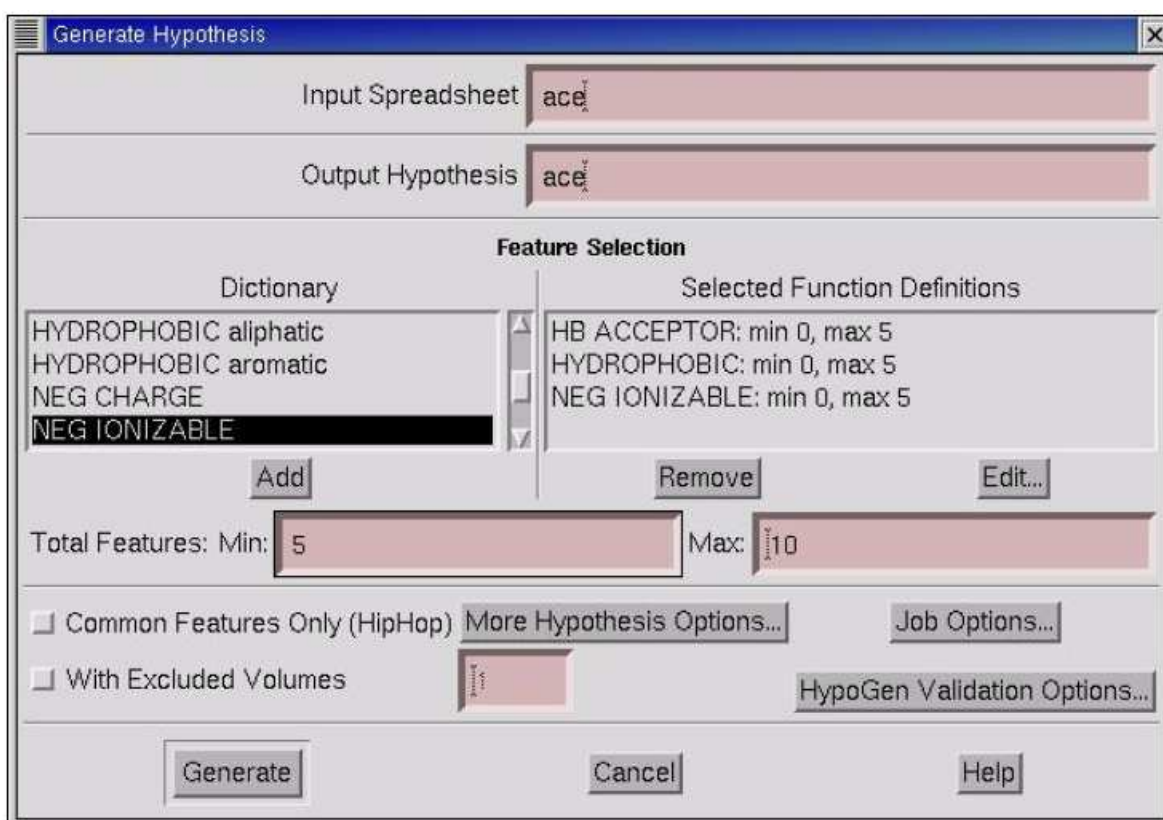


Figura 16. Maschera di generazione dell'ipotesi, in cui si specificano le varie features e il peso relativo di ciascuna.

Il programma contiene una serie di features standard (**Feature Dictionary**) i cui parametri possono essere modificati. A seconda della natura chimica dei composti, al fine di formare l'informazione essenziale nel processo di generazione dell'ipotesi, si potranno selezionare le seguenti **features**:

hb acceptor (lipid): per atomi di azoto, ossigeno, o zolfo che hanno un lone pair e carica inferiore o pari a 0. Questa feature include gli azoti basici e non esclude le piridine e gli imidazoli elettron-deficienti

hb donor: per idrossili non-acidi, tioli, idrogeni acetilenici, NH (tranne gli idrogeni dei tetrazoli e della trifluorometil solfonamide). Sono escluse le piridine elettrone ricche, gli imidazoli che potrebbero venir protonati e gli azoti protonabili in quanto basici

hydrophobic: per una serie contigua in un conformero di atomi lontani da atomi carichi o elettronegativi, aventi, quindi superficie accessibile. Sono inclusi i fenili, i carbocicli, gli isopropili ed il gruppo metile

hydrophobic aliphatic: questa feature è una sottocategoria della feature hydrophobic, che include soltanto gli atomi alifatici

hydrophobic aromatic: questa feature è una sottocategoria della feature hydrophobic, che include soltanto gli atomi aromatici

neg charge: per atomi con cariche negative non adiacenti a cariche positive

neg ionizable: per atomi o gruppi di atomi verosimilmente deprotonati a pH fisiologico, come gli idrogeni della trifluorometil solfonamide, gli acidi solfonici (centroide dei tre ossigeni), acidi fosfonici (centroide dei tre ossigeni), acidi solfinici, carbossilici o fosfinici (centroide dei due ossigeni), tetrazoli, e cariche negative non adiacenti ad una carica positiva

pos charge: per cariche positive non adiacenti a cariche negative

pos ionizable: per atomi o gruppi di atomi verosimilmente protonati a pH fisiologico, come ammine basiche, amidine basiche secondarie, amidine basiche primarie, tranne le guanidina, guanidine basiche, cariche positive non adiacenti ad una carica negativa. Sono esclusi gli azoti aromatici debolmente basici come quelli della piridina e dell'imidazolo. (Questa caratteristica è stata usata per allargare la ricerca agli atomi di azoto protonati e deprotonati a pH fisiologico)

ring aromatic: per anelli aromatici a 5 o 6 termini

Dopo aver scelto le features opportune, mediante il comando **Generate Hypotesys**, il programma produce 10 ipotesi di modello farmacoforico diverse, ordinate dalla migliore (la 1) alla peggiore (la 10) in base al coefficiente di correlazione (**Figura 17**).

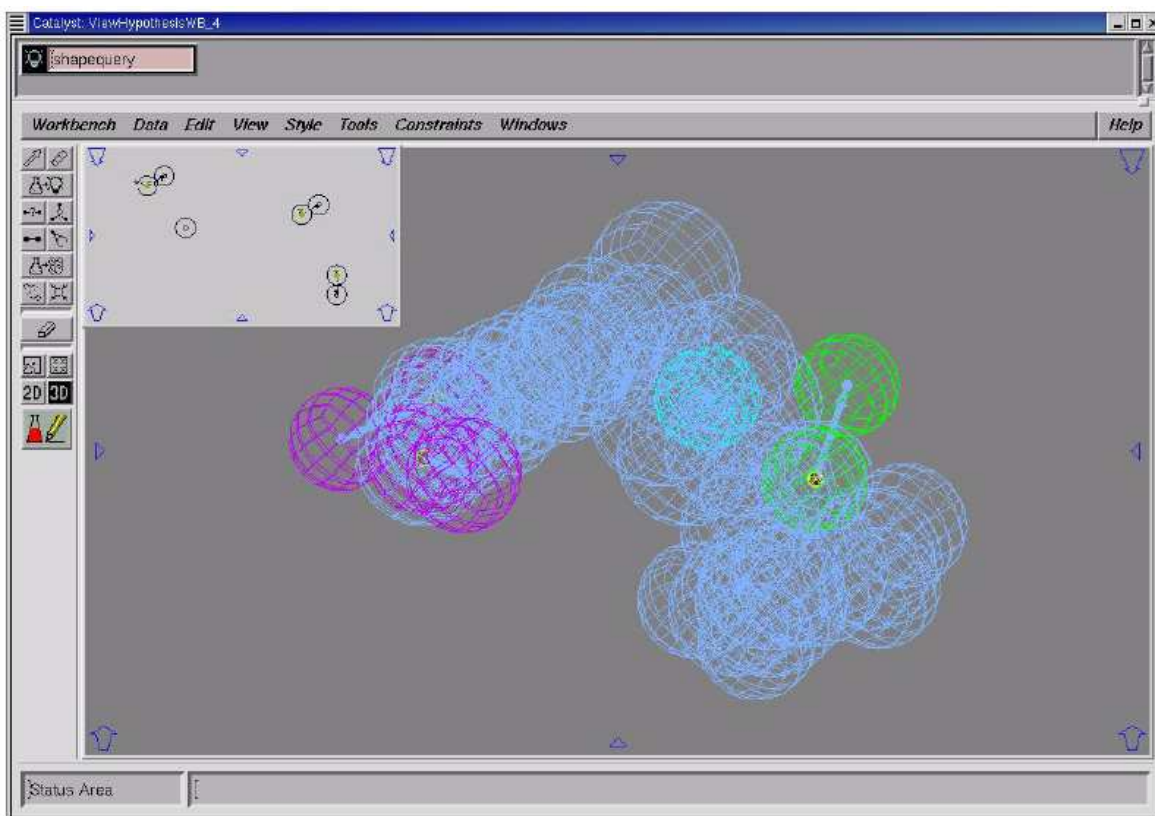


Figura 17. Visualizzazione spaziale di un'ipotesi.

Sarà poi possibile sovrapporre i vari composti (o meglio, i conformeri relativi ai vari composti) del training set, come pure altri composti non training set (anche dal punto di vista grafico) in modo da valutarne l'aderenza al modello (si legge un valore chiamato **fit**), stimarne l'attività (**estimate**) e il valore di energia corrispondente (**Figura 18**). Ciò si fa mediante la funzione **Compare/Fit** (**Figura 19**).

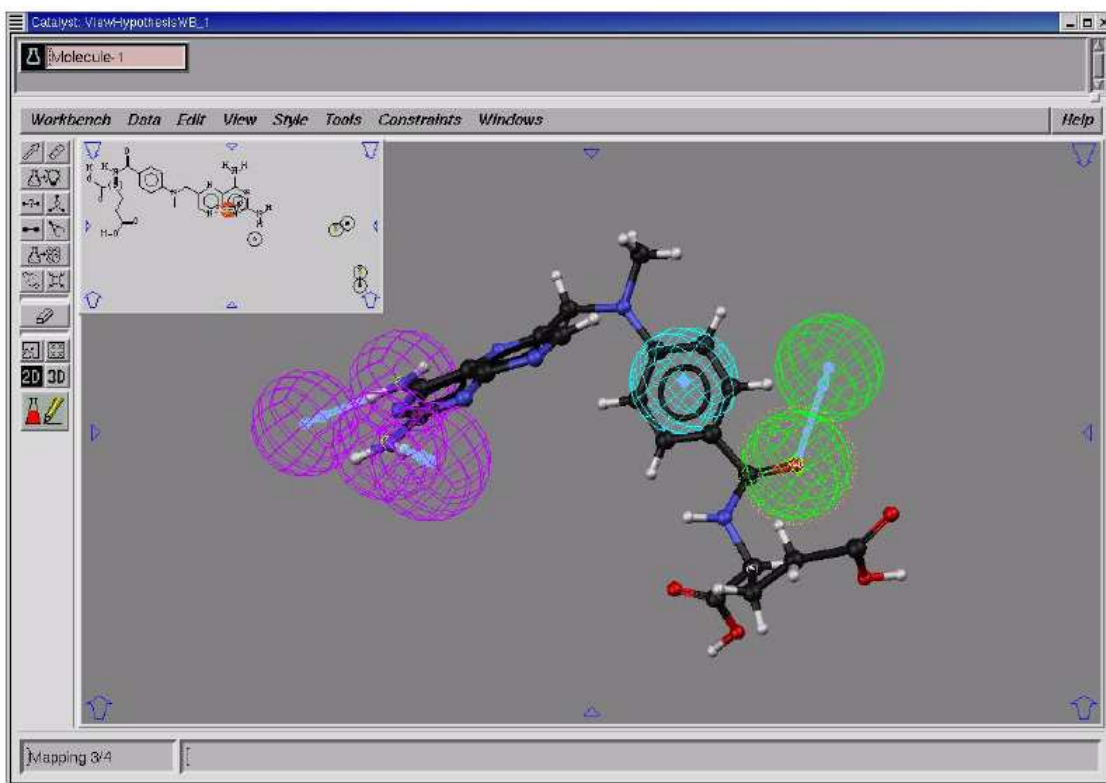
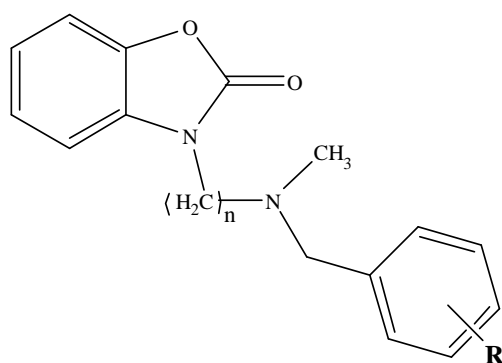


Figura 18. Esempio di sovrapposizione di un composto ad un'ipotesi.

Figura 19. Funzione Compare/Fit.

**MODELLO FARMACOFORICO
PER I RECETTORI σ_1**



n = 3 (**15 a-k**), 4 (**16 a-k**)

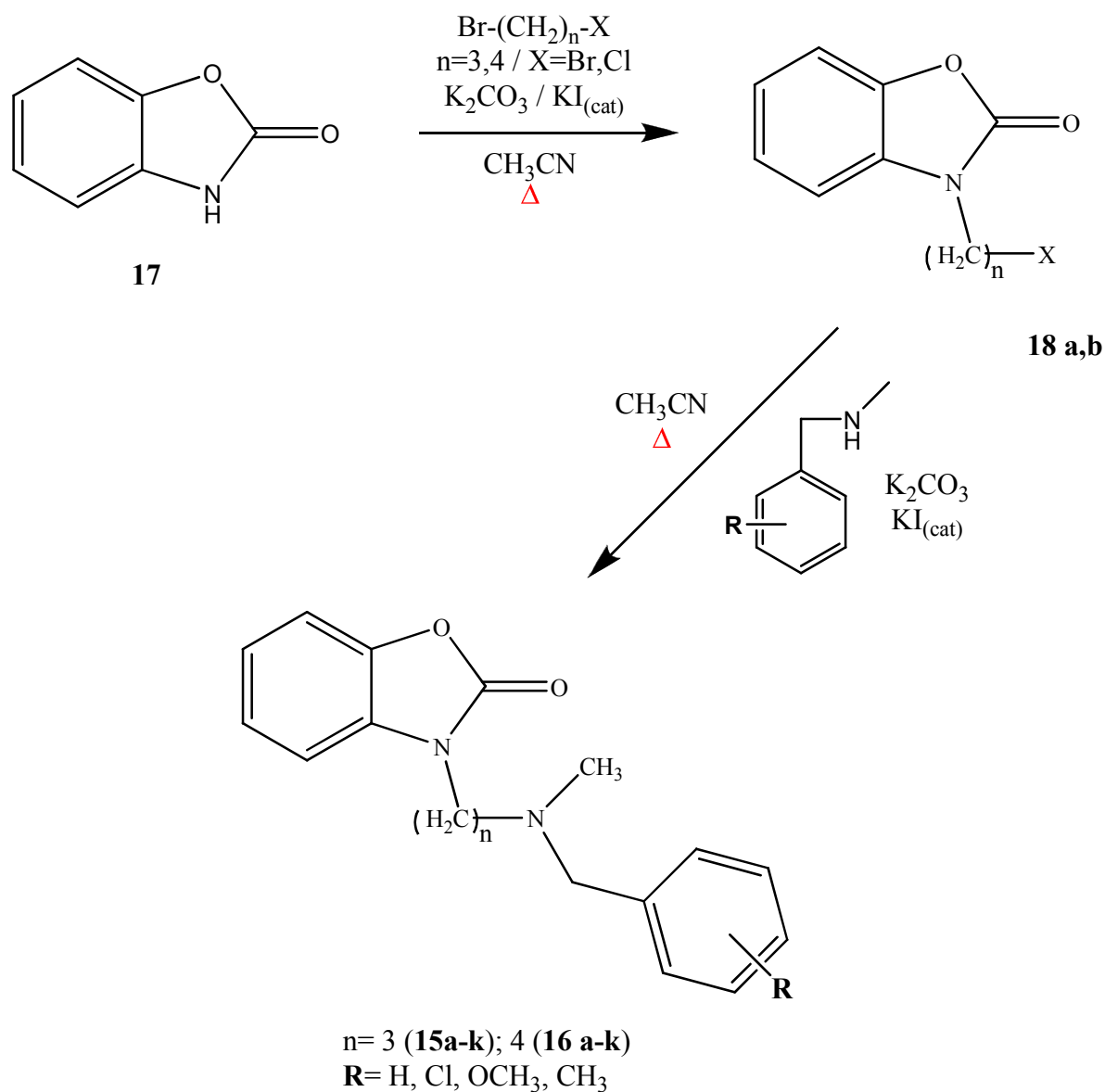
R = H, Cl, OCH₃, CH₃

R	Comp. n=3	m.p. (°C)*	Yield (%)	Comp. n=4	m.p. (°C)	Yield (%)*
H	15 a	180-182	30	16 a	145-147	30
2-Cl	15 b	129-131	33	16 b	115-117	23
3-Cl	15 c	166-168	27	16 c	168-170	23
4-Cl	15 d	192-194	30	16 d	162-164	46
2-OCH ₃	15 e	145-147	15	16 e	127-129	15
3-OCH ₃	15 f	168-170	18	16 f	154-156	19
4-OCH ₃	15 g	179-183	21	16 g	98-100	55
2-CH ₃	15 h	167-169	10	16 h	212-214	11
3-CH ₃	15 i	156-158	39	16 i	169-171	49
4-CH ₃	15 j	195-197	41	16 j	138-140	42
2,4-(CH ₃) ₂	15 k	127-130	53	16 k	103-105	40

Tabella 1. * I punti di fusione si riferiscono ai composti come sali dell'acido ossalico.

Il nucleo 4-piperidin-il-metilico è stato sostituito da uno spaziatore alchilico meno rigido, quindi, dotato di una maggiore libertà conformazionale. La scelta della catena propilica e di quella butilica è dettata dal fatto che entrambe rientrano nel range ottimale di distanza tra l'atomo di azoto basico e il sito idrofobico primario nel modello recettoriale di Glennon ^[51-53].

Schema 1



Per trattamento del benzo[d]ossazol-2(3*H*)-one **17** con bromo-(alchil)-cloruro, K_2CO_3 e KI in CH_3CN sono stati sintetizzati i 3-bromoalchil derivati corrispondenti **18 a-b** ($n = 3,4$) da cui sono stati ottenuti, per reazione con *N*-Benzilmetilamine variamente sostituite, K_2CO_3 e KI in CH_3CN i composti **15 a-k** e **16 a-k**.

Tutti i composti ottenuti sono stati saggati al fine di valutare la loro affinità e selettività nei confronti dei recettori σ (**Tabella 2**).

Composto	R	n	K_iσ₁ nM	K_iσ₂ nM	K_iσ₂/ K_iσ₁
14 a	H	-	3.58	246	69
14 b	2-Cl	-	60.9	299	4.9
14 c	4-Cl	-	0.098	427	4357
14 d	2,4-Cl	-	258	340	1.3
14 e	2-CH ₃	-	29.8	227	7.6
14 f	4-CH ₃	-	3.07	116	38
14 g	2,4-CH ₃	-	30.2	259	9.2
14 h	2,4,6-CH ₃	-	6210	2880	0.46
14 i	4-Ph	-	394	> 10 μM	> 25.4
14 j	naftil	-	1017	833	0.82
15 a	H	3	223	1121	5.0
15 b	2-Cl	3	2492	456	0.18
15 c	3-Cl	3	3233	1119	0.35
15 d	4-Cl	3	1147	456	0.40
15 e	2-OCH ₃	3	1947	192	0.10
15 f	3-OCH ₃	3	8550	2130	0.16
15 g	4-OCH ₃	3	83	2602	31.3
15 h	2-CH ₃	3	901	1347	1.5
15 i	3-CH ₃	3	1835	2716	1.5
15 j	4-CH ₃	3	871	991	1.1
15 k	2,4-(CH ₃) ₂	3	1833	2064	1.1
16 a	H	4	2.6	120	46.2
16 b	2-Cl	4	843	37.4	0.04
16 c	3-Cl	4	302	-	-
16 d	4-Cl	4	7.1	36.2	5.1
16 e	2-OCH ₃	4	594	-	-
16 f	3-OCH ₃	4	297	187	0.6
16 g	4-OCH ₃	4	21	20.8	1
16 h	2-CH ₃	4	-	-	-
16 i	3-CH ₃	4	102	31.8	0.31
16 j	4-CH ₃	4	97	22.9	0.20
16 k	2,4-(CH ₃) ₂	4	239	6.94	0.03

Tabella 2. Valori di affinità di legame (K_i) dei derivati benzossazolonici nei confronti dei recettori σ₁ e σ₂. I radioligando utilizzati sono, rispettivamente la [³H]-(+)-PTZ e la [³H]-DTG. I dati sono espressi come media di 2-4 esperimenti.

Dai risultati ottenuti (**Tabella 2**), appare chiaro come il sostituente sull'anello fenilico moduli fortemente l'affinità di binding di questi composti verso i recettori σ_1 e σ_2 . I derivati con lo spaziatore butilico **16a-k** hanno espresso un'affinità maggiore rispetto ai corrispondenti propilen derivati **15a-k**. La catena butilica determina la distanza ottimale tra le regioni idrofobiche primaria "B" e secondaria "A" proposte dal modello di Glennon^[51-53]. Il composto con la più alta affinità è il butilen derivato **16a**, con un valore di $K_i\sigma_1$ di 2.6 nM ed un interessante rapporto di selettività $K_i\sigma_2/K_i\sigma_1=46.2$. Il composto para-sostituito **16d** (R=4-Cl), invece, mantiene ancora un'apprezzabile affinità σ_1 recettoriale ma con una selettività ($K_i\sigma_2/K_i\sigma_1=5.1$) decisamente inferiore al derivato non sostituito.

A differenza dei derivati benzossazolonic **14a-l** precedentemente sintetizzati, il composto **16g** (R=4-OCH₃) non possiede selettività in quanto esibisce una moderata affinità per entrambi i recettori. Al contrario, i composti **16b e 16i-k** mostrano una discreta preferenza nei confronti del sottotipo recettoriale σ_2 . Specificatamente, il composto **16k** (R=2,4-(CH₃)₂) ha il più alto valore di affinità ($K_i\sigma_2 = 6.94\text{nM}$) e di selettività ($K_i\sigma_2/K_i\sigma_1 = 0.03$) verso i recettori σ_2 tra le molecole di questa serie.

Generazione di un modello farmacoforico per i recettori σ_1

Con lo scopo di definire un modello farmacoforico tridimensionale per il recettore σ_1 , lo studio di modellistica molecolare è stato eseguito con l'impiego dei composti sintetizzati caratterizzati da un intervallo ottimale di affinità σ_1 recettoriale, con valori di K_i compresi tra 0,1 nM e 8,9 μM .

I composti **15 a-k** e **16 a-k**, assieme ai derivati benzossazolonic **14 a-i** e **14 j** precedentemente sintetizzati, sono stati utilizzati, con il loro valore di K_i , per comporre il "training set" di 31 molecole (il composto **16 h** non si è potuto utilizzare per la mancanza di un valore di K_i attendibile) necessario al fine della generazione dell'ipotesi del modello.

La generazione di un modello farmacoforico è un ottimo approccio per esplorare in maniera quantitativa caratteristiche comuni nella struttura chimica in una serie di composti a struttura differente. Per raggiungere un buon risultato, cioè per rendere sfruttabile il modello farmacoforico al fine di progettare una seconda generazione di ligandi, è necessario rispettare alcune regole fondamentali della generazione di modelli 3D-QSAR (three-dimensional quantitative structure-activity relationship): i) il training set deve essere costituito da un numero di composti abbastanza elevato (almeno 16) dotati di un'affinità

che copra almeno 4 ordini di grandezza; ii) il composto più attivo della serie deve essere assolutamente incluso nel training set; iii) tutti i dati di attività o affinità devono essere ottenuti da procedure omogenee ^[61-62].

Nel nostro caso il training set consiste di 31 composti dotati di una adeguata diversità strutturale e con dei valori di affinità che coprono 6 ordini di grandezza (**Tabella 3**).

I calcoli per sviluppare questo modello sono stati eseguiti sfruttando il programma *Accelrys Catalyst 4.9* ^[56].

Le molecole sono state inserite nel programma mediante **Catalyst 2D/3D Visualizer**; per ciascuna di esse è stata effettuata la ricerca conformazionale mediante un algoritmo di tipo **Monte Carlo**, consentendo una differenza di energia di soglia al massimo pari a **20 kcal/mol**, e con l'utilizzo del **forcefield CHARMM**. Inoltre, è stata selezionata l'opzione **Best conformer generation** e il numero massimo di conformeri generabili è stato fissato a **250**. Mediante il **Catalyst Generate Hypothesis Workbench**, sono stati inseriti i dati sperimentali di affinità biologica in vitro dei vari composti, e per ciascuno di essi il parametro di incertezza è stato fissato a **1.1**. Al fine di generare l'ipotesi mediante la funzione **Generate Hypotesys**, sono state selezionate nel **Feature Dictionary** le **features hb acceptor, hydrophobic, hydrophobic aromatic, hydrophobic aliphatic e pos ionizable**. Le altre features sono state omesse perché non potevano essere mappate vista la natura chimica dei nostri composti. Per tutte le features scelte si è mantenuto il valore di default, tranne per la **pos ionizable**, il cui parametro selezionato costringeva il programma a sceglierne almeno una. Queste scelte sono basate sulla struttura molecolare dei nostri composti e sulle informazioni note in letteratura sui ligandi σ_1 .

Il programma produce 10 ipotesi di modello farmacoforico diverse, ordinate dalla migliore (la 1) alla peggiore (la 10) in base al coefficiente di correlazione. L'ipotesi 1 (**Figura 20**) è stata scelta sia grazie a questo criterio sia perché soddisfa altre parametri statistici che l'elaboratore tiene conto durante la generazione di questo tipo di modelli.

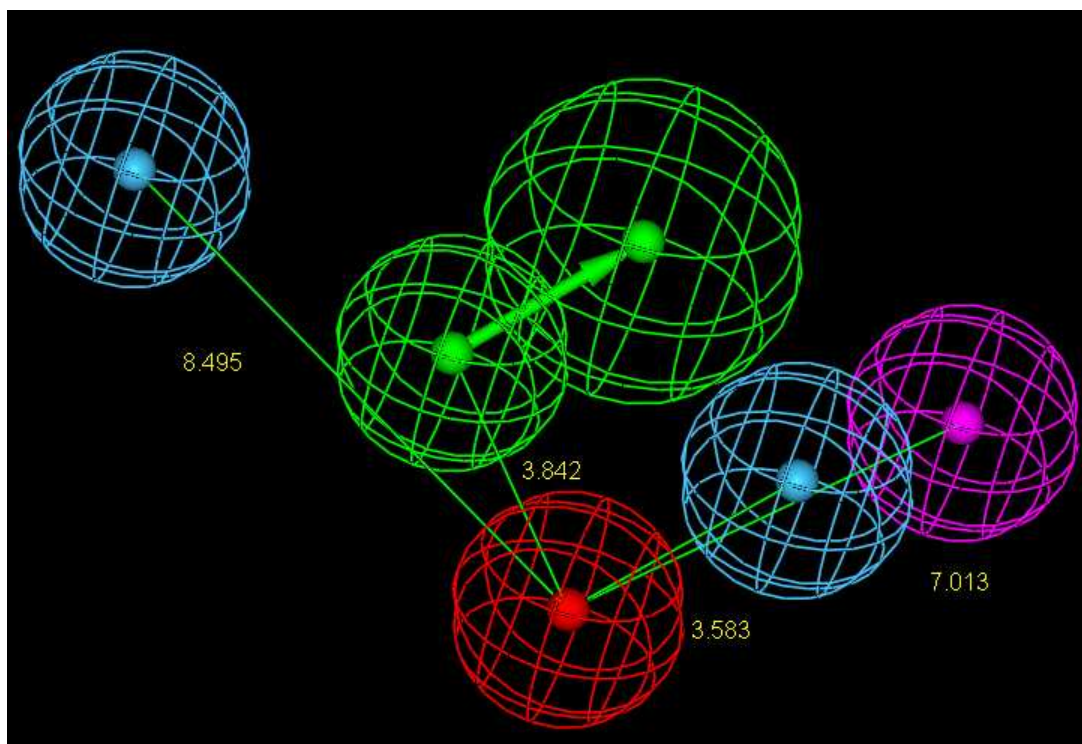


Figura 20. Modello farmacoforico per ligandi σ_1 : rappresentazione schematica delle caratteristiche strutturali necessarie al legame σ_1 . Sono state individuate dal modello 5 features: un positivo ionizzabile (rosso) che si riferisce all'atomo di azoto basico; 2 features idrofobiche aromatiche (azzurro); un accettore di legami idrogeno (verde) descritto dall'atomo di ossigeno ed un'ulteriore componente idrofobica (viola) che non sembrerebbe essere indispensabile ai fini del legame ma risulterebbe utile, in base al sostituito presente sull'anello benzenico, ad ottimizzarlo.

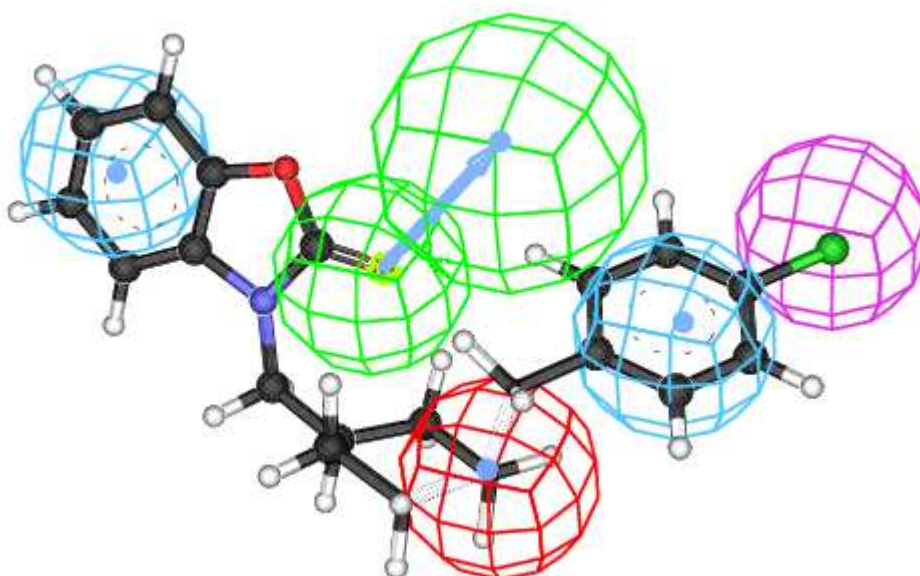


Figura 21. Fitting del lead compound (14 c, R=p-Cl).

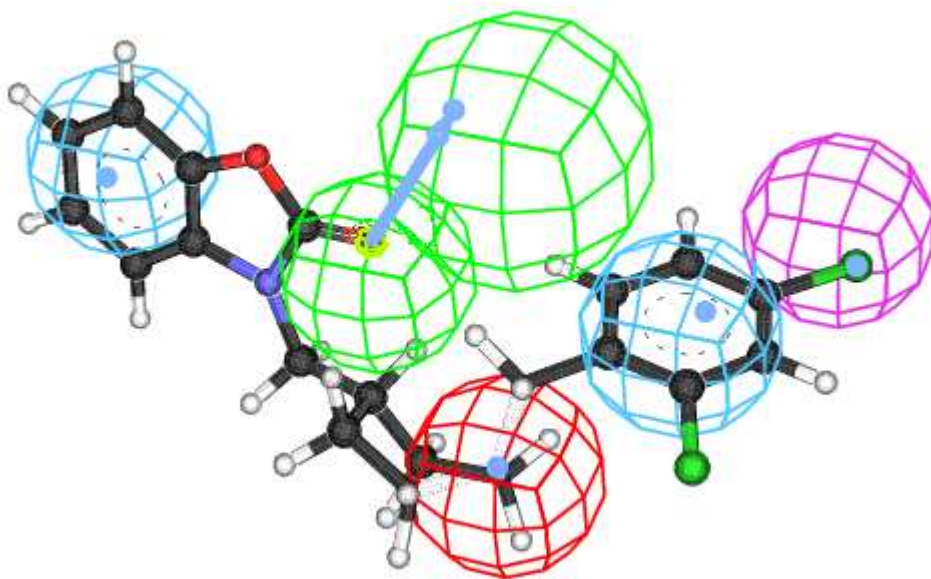


Figura 22. Fitting di un composto avente un valore di affinità intermedio (**14 d**, R=2,4-Cl).

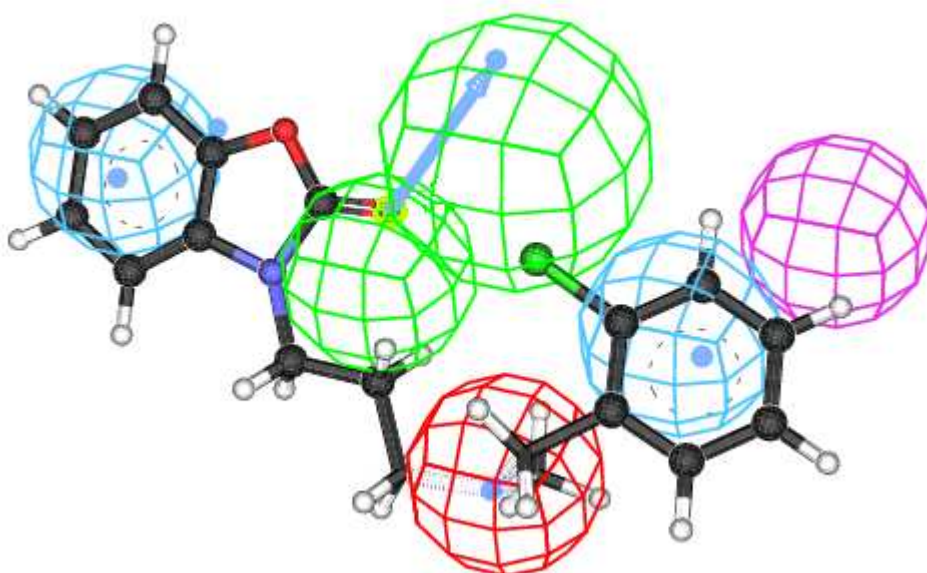


Figura 23. Fitting del composto avente l'affinità minore (**15 h**, n=3 R=2-CH₃).

Composto	$K_i\sigma_1$ nM (sperimentale)	$K_i\sigma_1$ nM (stimata)	Errore ^a	fit	energia conformazionale
14 a	3.58	18	5.0	15.55	6.17
14 b	60.9	60	-1.0	15.03	16.38
14 c	0.098	0,27	2.8	17.38	6.85
14 d	258	280	1.1	14.36	14.99
14 e	29.8	160	5.4	14.61	12.51
14 f	3.07	1	-3.1	16.81	5.91
14 g	30.2	210	7.0	14.48	10.80
14 h	6210	660	-9.4	13.99	11.39
14 i	394	230	-1.7	14.44	14.78
14 j	1017	670	-1.5	13.98	5.43
15 a	223	550	2.5	14.07	12.32
15 b	2492	6700	2.7	12.99	17.29
15 c	3233	1110	-2.9	13.77	4.16
15 d	1147	960	-1.2	13.83	5.12
15 e	1947	3600	1.8	13.25	5.37
15 f	8550	880	-9.7	13.87	11.99
15 g	830	560	-1.5	14.06	4.65
15 h	901	2000	2.2	13.51	6.73
15 i	1835	4000	2.2	13.21	5.09
15 j	871	410	-2.1	14.20	6.25
15 k	1833	1400	-1.3	13.67	12.69
16 a	2.6	24	9.2	15.43	9.68
16 b	843	140	-6.0	14.68	8.44
16 c	302	450	1.5	14.16	5.49
16 d	7.1	16	2.3	15.60	4.99
16 e	594	260	-2.3	14.40	5.38
16 f	297	140	-2.1	14.68	19.22
16 g	21	42	2.0	15.19	11.72
16 i	102	100	-1.0	14.80	2.23
16 j	97	270	2.8	14.37	4.19
16 k	239	860	3.6	13.88	2.21

Tabella 3. Valori di K_i nei confronti dei recettori σ_1 delle molecole che compongono il training set, a confronto con i valori predetti dal programma Catalyst. Per ciascun composto sono riportati, inoltre, i valori di energia conformazionale relativi al conformero che si adatta meglio al modello ed il corrispettivo valore di fitting.

^a I valori nella colonna degli errori rappresentano il rapporto tra l'affinità stimata e quella sperimentale o il suo inverso negativo se il rapporto è inferiore a 1.

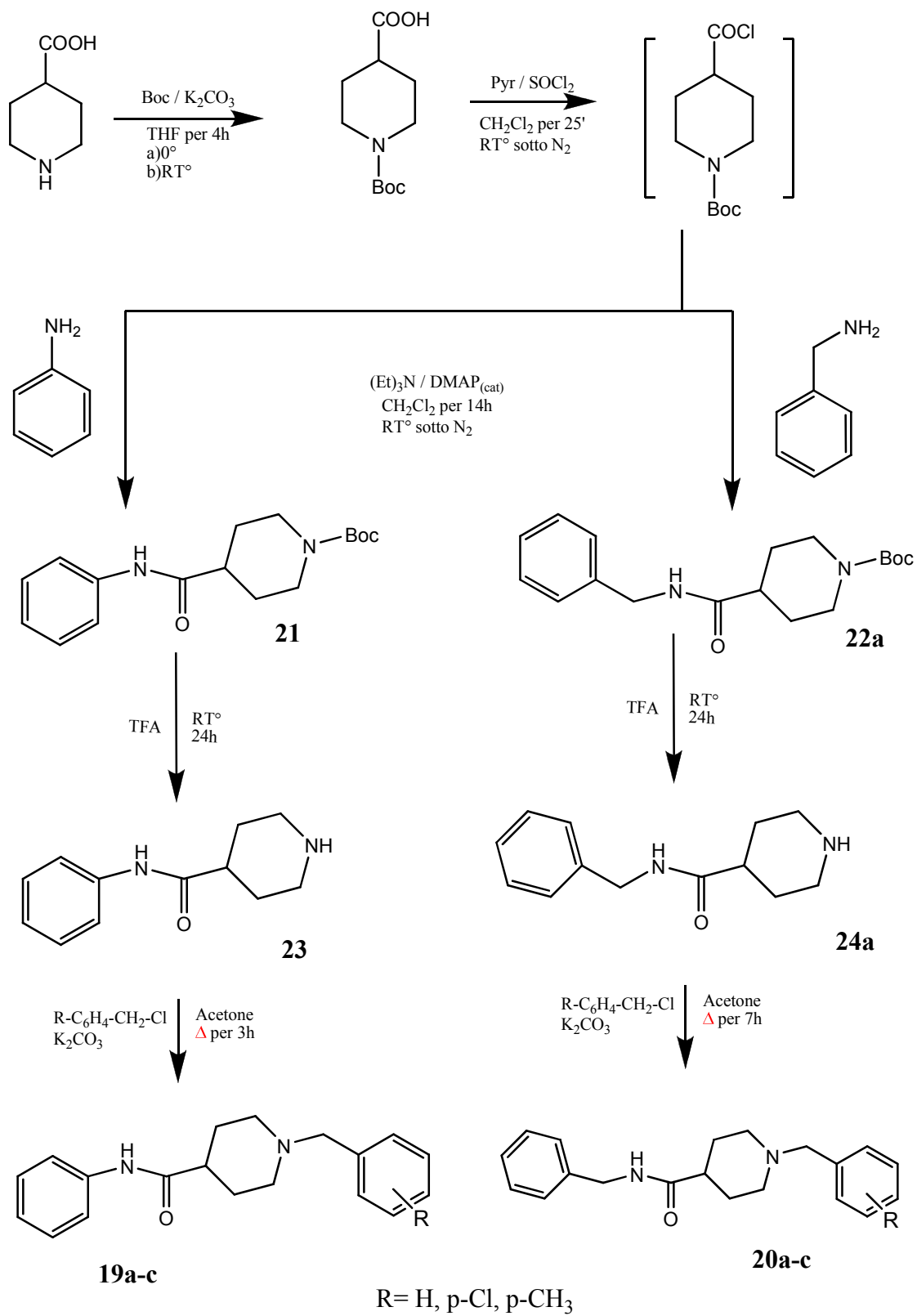
Il modello generato (**Figura 20**) risulta essere promettente; il coefficiente di correlazione, cioè il rapporto tra i valori di K_i sperimentali e quelli stimati dal modello (**Tabella 3**), è di **0.896** quindi decisamente positivo. Inoltre, le features individuate dall'ipotesi sono in accordo con i modelli precedentemente citati (Glennon^[51-53], Gund^[54] e Laggner^[55]) sia dal punto di vista qualitativo che spaziale.

La **Tabella 3** mostra chiaramente che 24 delle 31 molecole del nostro training set hanno un errore, tra affinità stimata e sperimentale, minore di 4, mentre le rimanenti 7 hanno un errore inferiore a 10.

Le **Figure 21, 22 e 23** rappresentano la mappatura sul modello farmacoforico rispettivamente dei composti **14c, 14d e 15h**. Come si può notare dalla **Figura 21**, nel caso del derivato **14c** l'anello aromatico del raggruppamento benzossazolonic mappo molto bene una delle due features idrofobiche aromatiche, mentre sull'altra si sovrappone l'anello fenilico del composto. Il gruppo carbonilico e l'atomo di azoto basico dell'anello piperidinico, invece, mappano rispettivamente le funzioni "accettore di legami idrogeno" e "positivo ionizzabile". Infine, la rimanente feature idrofobica viene mappata dall'atomo di cloro presente sull'anello benzenico. Un fitting molto analogo si può osservare per il composto **14d** (**Figura 22**); le differenze tra i due composti non sembrano facili da cogliere ma sono evidenziate dall'ottima capacità correlativa del modello ($K_i\sigma_{1(\text{sperimentale})}=0.098$ nM, $K_i\sigma_{1(\text{stimata})}=0.27$ nM per il composto **14c**; $K_i\sigma_{1(\text{sperimentale})}=258$ nM, $K_i\sigma_{1(\text{stimata})}=280$ per il composto **14d**).

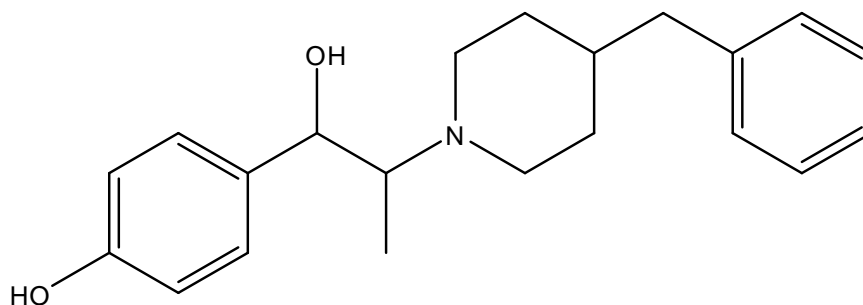
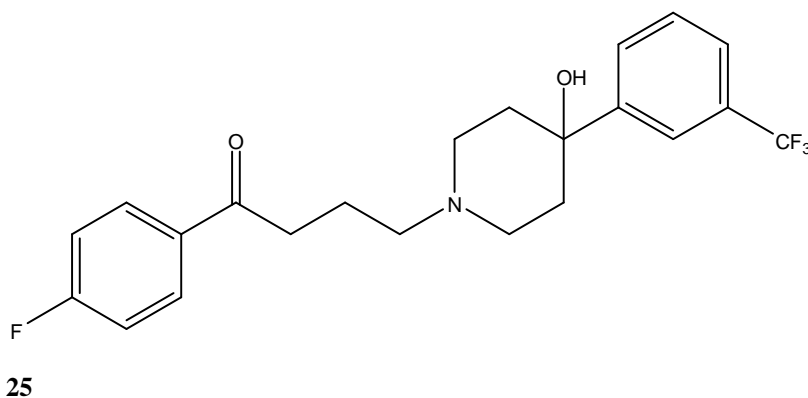
La **Figura 23**, concludendo, è un tipico esempio di come un composto poco affini mappi un modello farmacoforico. Coerentemente, il composto **15h** non mappa tutte le features che compongono il nostro modello; infatti, se sulle funzioni "idrofobiche aromatiche" e sulla feature "accettore di legami idrogeno" si sovrappongono rispettivamente i due nuclei aromatici ed il gruppo carbonilico della molecole, le rimanenti due features non sono mappate correttamente da nessun atomo del composto **15h**. In accordo con quanto spiegato, il derivato **15h** risulta essere giustamente predetto come uno dei meno affini della serie.

Schema 2



Per reazione tra l'acido piperidincarbossilico e Boc-anidride si ottiene l'acido *N*-Boc-piperidincarbossilico, il quale viene fatto reagire con piridina e cloruro di tionile in CH₂Cl₂ sotto atmosfera di N₂. Senza isolare l'acilcloruro, viene aggiunta una soluzione in CH₂Cl₂ di anilina, trietilammina ed una quantità catalitica di DMAP per ottenere *N*-fenil-1-(*ter*-butossicarbonil)piperidin-4-carbossammide **21**. Il composto **21** viene deprotetto in acido trifluoroacetico e viene isolata la *N*-fenil-piperidin-4-carbossammide **23**, che per reazione con benzilcloruro opportunamente sostituito, in acetone ed in presenza di K₂CO₃, da origine ai derivati carbossamidici **19a-c**. Il procedimento per ottenere i derivati **20a-c** risulta simile a quello appena descritto, viene utilizzata la Benzilammina al posto dell'anilina.

Inoltre, sono state introdotte nel test set anche altre 3 molecole note in letteratura ^[55] aventi affinità per i recettori σ_1 e con una struttura chimica simile a quella dei nostri composti. Tra queste troviamo l'aloiperidolo **6** e il trifluperidolo **25** e l'antagonista NMDA ifenprodil **26**.



In accordo con lo scopo prefissato, cioè quello di verificare che il nostro modello predica in maniera soddisfacente l'affinità dei composti del test set, tutte le molecole prese

in considerazione sono state testate al fine di valutare la loro affinità nei confronti dei recettori σ_1 .

Composto	R	IC ₅₀ ± SDnM σ_1	K _i σ_1 nM (sperimentale)	K _i σ_1 nM (stimata)	Errore ^a
19a	H	51.0 ± 3.50 nM	48.1	210	4.4
19b	4-Cl	47.7 ± 10.5 nM	45.0	140	3.1
19c	4-CH ₃	111 ± 8.82 nM	105	200	1.9
20a	H	23.9 ± 1.89 nM	22.5	37	1.6
20b	4-Cl	13.7 ± 4.63 nM	12.9	5.5	-2.3
20c	4-CH ₃	73.6 ± 23.4 nM	69.4	76	1.1
6	-	-	5.7	2.2	-2.6
25	-	-	0.8	4.6	5.8
26	-	-	2.0	19	9.5

Tabella 5. Valori di affinità di legame (IC₅₀ e K_i) dei derivati carbossamidici e dei tre composti noti ^[55] nei confronti dei recettori σ_1 . Il radioligando utilizzato è la [³H]-(+)-PTZ. I dati sono espressi come media ± SD di 2-4 esperimenti.

^a I valori nella colonna degli errori rappresentano il rapporto tra l'affinità stimata e quella sperimentale o il suo inverso negativo se il rapporto è inferiore a 1.

Il risultato ottenuto è particolarmente interessante in quanto è stato evidenziato un buon coefficiente di correlazione (0.882).

Come si può notare dai valori ottenuti (**Tabella 5**), il modello risulta essere particolarmente attendibile per quanto riguarda i derivati **19a-c** e **20a-c** da noi sintetizzati, dove i valori di K_i stimati dal modello sono paragonabili a quelli ottenuti per via sperimentale. Oltre a ciò, anche i tre farmaci scelti per il test set (**6**, **25**, **26**) fittano bene il nostro modello. In dettaglio si può notare che l'errore medio nella predizione dell'affinità delle molecole del test set è di 2.5; quindi, considerata l'intrinseca variabilità dei test biologici, possiamo concludere che la capacità del nostro modello 3D-farmacoforico nel predire l'affinità di nuovi ligandi σ_1 è abbastanza soddisfacente.

In particolare, la **Figura 24** mostra come l'aloiperidolo **6** ben si adatti al nostro modello; i 2 gruppi fenilici e l'atomo di cloro mappano le features idrofobiche mentre le funzioni "accettore di legame idrogeno" e "positivo ionizzabile" vengono mappate rispettivamente dall'ossigeno del carbonile e dall'atomo di azoto dell'anello piperidinico. Infine, confrontando i valori di affinità sperimentale e quella stimata (K_i σ_1 (sperimentale)=5.7 nM, K_i σ_1 (stimata)=2.2 nM) questi risultano essere perfettamente paragonabili.

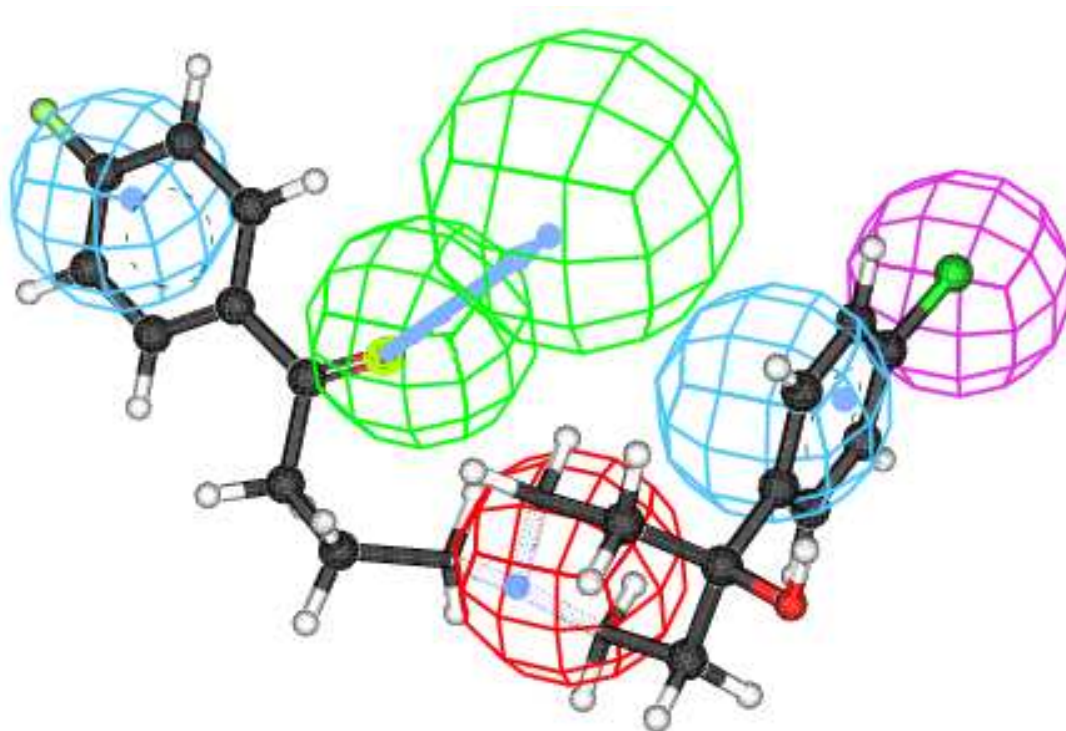


Figura 24. Fitting dell'aloperidolo 6.

Dopo aver superato la prova del test set abbiamo validato il modello con altri due test statistici, normalmente utilizzati a livello computazionale in questo genere di approccio. Entrambe le procedure utilizzate sono implementate nel pacchetto software di Catalyst 4.9.

Il primo metodo è basato sullo sfruttamento del test di Fisher e viene chiamato *CatScramble*: in pratica il computer mescola casualmente i composti del training set producendo nuove ipotesi di modello. Il test ha un esito statisticamente positivo nel caso in cui nessuna di queste nuove ipotesi risulti migliore rispetto a quella da noi originariamente elaborata.

Il secondo test è denominato *leave-one-out* e consiste nell'eliminare uno per volta un composto del training set al fine di accertare che la correlazione non sia influenzata da una particolare molecola. Anche in questo caso l'elaboratore crea nuove ipotesi da confrontare con quella nativa, le quali devono mantenere un coefficiente di correlazione molto simile rispetto a quest'ultima.

Il nostro modello ha soddisfatto, in maniera particolarmente positiva, tutti i criteri necessari al superamento dei test statistici sopracitati portando a compimento, quindi, il processo di validazione.

Concludendo, il modello descrive ed associa delle caratteristiche strutturali necessarie al fine del legame con il recettore σ_1 , basate sulla chimica dei nostri composti

ammettendo, quindi, delle modificazioni strutturali dei lead compounds abbastanza limitate.

In ogni caso, dai dati acquisiti e dalle validazioni effettuate, il nostro modello farmacoforico per il recettore σ_1 risulta essere un utile strumento predittivo da sfruttare nella progettazione e nella sintesi di nuovi ligandi σ sempre più attivi e selettivi.

Raggiunto l'obiettivo di creare un modello farmacoforico per il recettore σ_1 attendibile e sfruttabile a livello predittivo, siamo andati a sintetizzare nuove serie di molecole con degli scaffold capaci di adattarsi al nostro modello.

Lo scopo, a questo punto, sarà sfruttare i risultati appena ottenuti per cercare nuovi possibili ligandi σ che non siano dotati solo di un'ottima affinità ma anche di una buona selettività nei confronti di questo tipo di recettori.

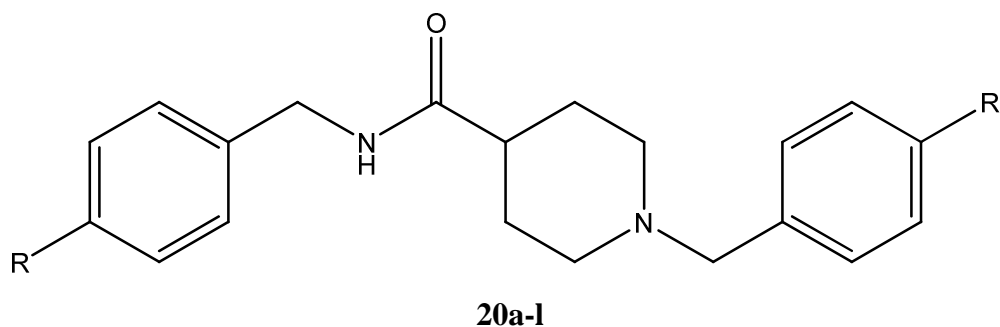
Nei capitoli successivi, quindi, presenterò le serie di composti che durante il corso del mio dottorato abbiamo sintetizzato ed i risultati conseguiti nei test biologici.

DERIVATI PIPERIDIN-4- CARBOSSAMMIDICI

“From 3D pharmacophore model to synthesis: a new series of 1-benzyl-piperidine-4-carboxylic acid benzylamide derivatives as new σ_1 ligands”; **Erik Laurini**, Maria Grazia Mamolo, Daniele Zampieri, Chiara Florio, Caterina Zanette, Sabrina Pricl, Maurizio Fermeglia, Luciano Vio; III Meeting-Workshop “Nuove Prospettive in Chimica Farmaceutica” 13-14 Febbraio 2009, Ciocco a Castelvechio Pascoli (LU).

Design&Sintesi

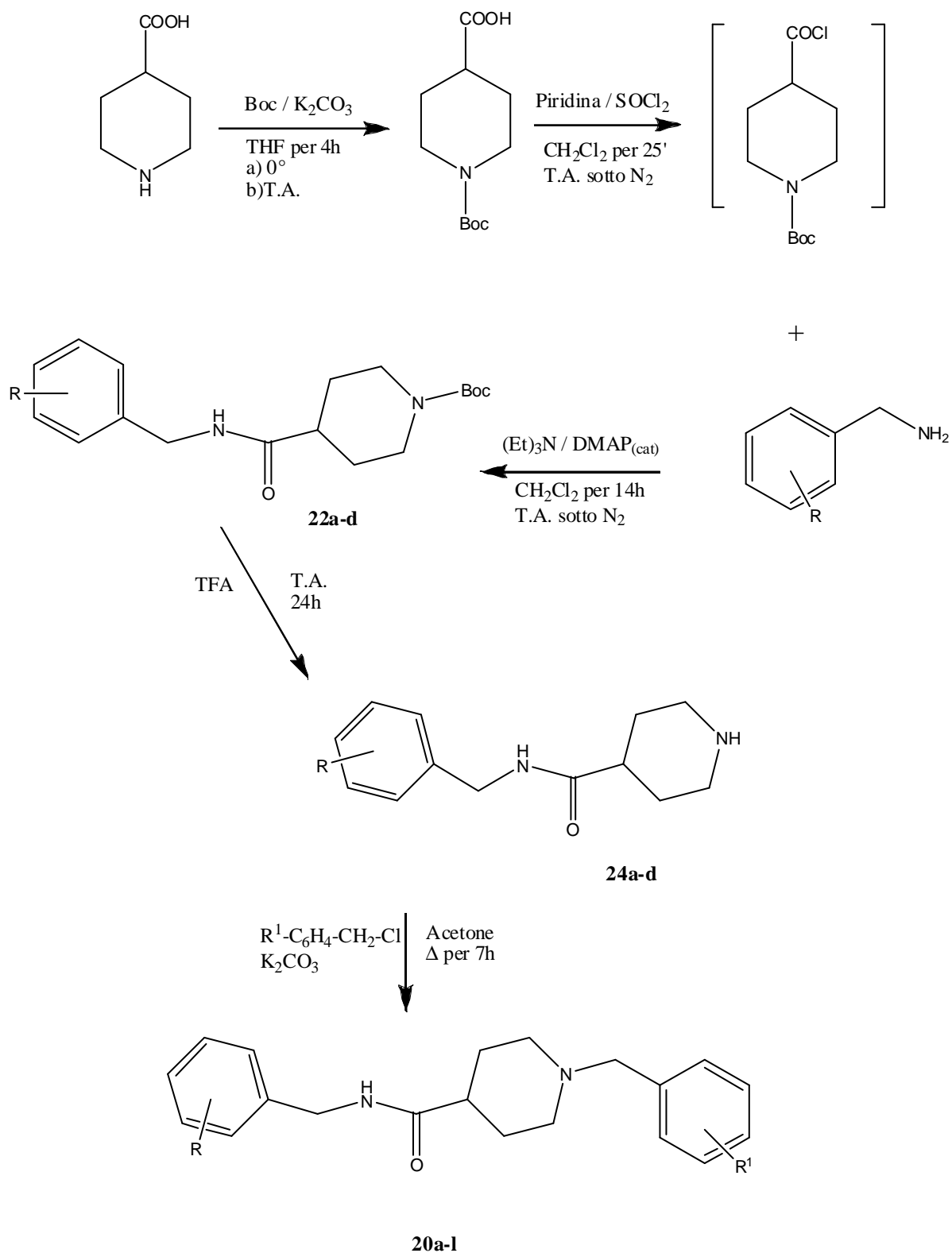
Sulla base dei risultati ottenuti dalla creazione del modello farmacoforico per i recettori σ_1 , è stata sintetizzata un'altra serie di derivati carbossamidici prendendo come lead compound il composto **20b** (Figura 25) al fine di valutare l'effetto sull'affinità σ_1 della sostituzione sull'anello N-benzilamidico (Tabella 6) (Schema 3).



Composto	R	R ¹	p.f. (°C)	Resa (%)	Anal.Elem.
20a	H	H	110-112	75.2	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O
20b	H	Cl	138-140	71.9	C ₂₀ H ₂₃ ClN ₂ O
20c	H	CH ₃	112-114	67.5	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O
20d	Cl	H	120-122	70.1	C ₂₀ H ₂₃ ClN ₂ O
20e	Cl	Cl	129-131	67.1	C ₂₀ H ₂₂ Cl ₂ N ₂ O
20f	Cl	CH ₃	100-102	63.8	C ₂₁ H ₂₅ ClN ₂ O
20g	CH ₃	H	105-107	43.2	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O
20h	CH ₃	Cl	155-157	48.8	C ₂₁ H ₂₅ ClN ₂ O
20i	CH ₃	CH ₃	118-120	69.0	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O
20j	OCH ₃	H	olio	54.7	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₂
20k	OCH ₃	Cl	107-109	59.9	C ₂₁ H ₂₅ ClN ₂ O ₂
20l	OCH ₃	CH ₃	74-76	74.0	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂

Tabella 6. Caratterizzazione dei composti **20a-l**.

Schema 3



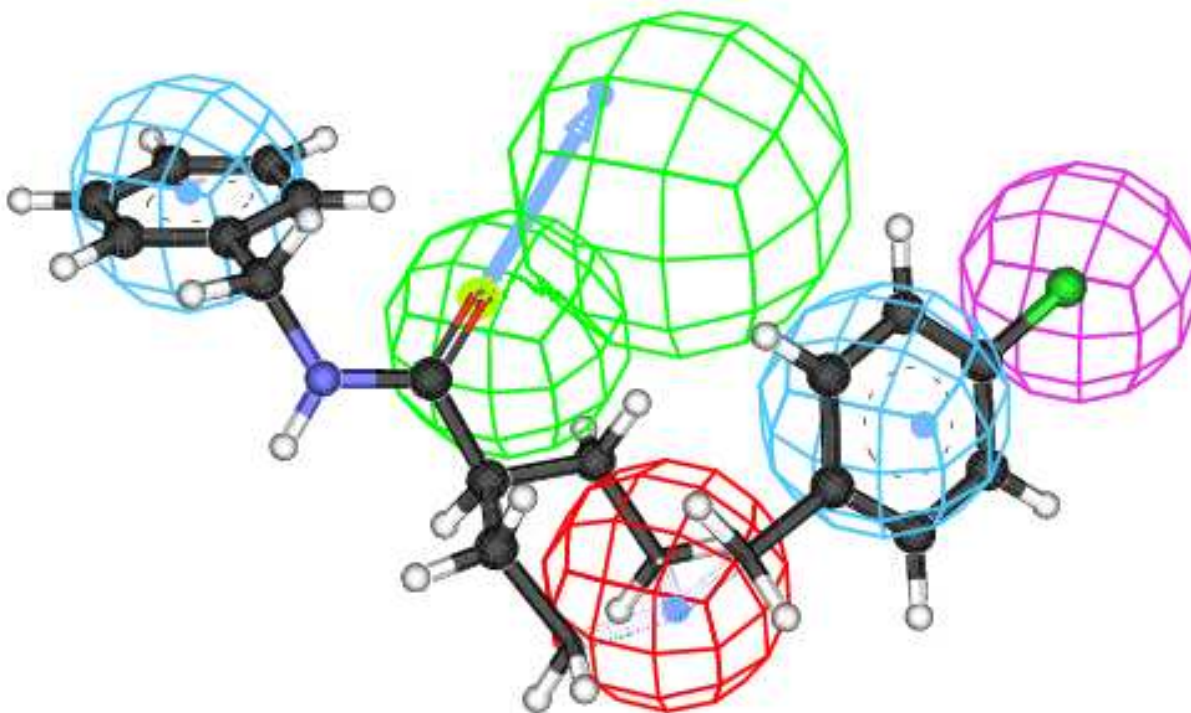


Figura 25. Fitting del derivato carbossamidico **20b** (R=H, R¹=Cl)

Dalla figura possiamo notare come il composto **20b** ben si adatti al nostro modello farmacoforico. In particolare, le funzioni “accettore di legame idrogeno” e “positivo ionizzabile” sono rispettivamente mappate dall’ossigeno del gruppo ammidico e dall’azoto basico del nucleo piperidinico. Inoltre, nelle sfere delle features idrofobiche si sovrappongono positivamente i due anelli aromatici e l’atomo cloro, sostituito del gruppo benzilico legato all’azoto piperidinico.

Oltre a ciò, dal modello si è ottenuto un’ottima predizione dell’affinità σ_1 di questa molecola ($K_i\sigma_{1(\text{sperimentale})}=12.9$ nM, $K_i\sigma_{1(\text{stimata})}=5.5$ nM, v. **Tabella 5**, pag.51), risultato che rafforza la possibilità di sfruttare questo tipo di struttura chimica per la ricerca di nuovi ligandi σ_1 .

Affinità&Selettività

Tutti i composti sono stati saggiati al fine di valutare la loro affinità nei confronti dei recettori σ_1 e σ_2 . Il valore di IC_{50} è stato calcolato utilizzando concentrazioni crescenti delle molecole verso il radioligando, [³H]-(+)-pentazocina per i σ_1 e [³H]-DTG per i σ_2 . Le relative costanti di inibizione (K_i) sono state calcolate a partire dalle rispettive IC_{50} tramite la formula di Cheng-Prusoff (**Tabella 7**).

Composto	R	R ¹	IC ₅₀ σ ₁ (nM)	IC ₅₀ σ ₂ (nM)	K _i σ ₁	K _i σ ₂	K _i σ ₂ /K _i σ ₁
20a	-	-	23.9 ± 1.89	2111 ± 1331	22.5	1832	81
20b	-	Cl	13.7 ± 4.63	5278 ± 789	12.9	4581	355
20c	-	CH ₃	73.6 ± 23.4	1859 ± 951	69.4	1613	23
20d	Cl	-	14.9 ± 5.1	3037 ± 1076	14.1	2636	187
20e	Cl	Cl	20.8 ± 2.7	1634 ± 525	19.6	1418	72
20f	Cl	CH ₃	15.8 ± 5.7	599 ± 274	14.9	520	35
20g	CH ₃	-	185 ± 46.7	6957 ± 2506	174	6037	35
20h	CH ₃	Cl	140 ± 17.6	4710 ± 737	132	4087	31
20i	CH ₃	CH ₃	134 ± 18.5	5645 ± 468	126	4899	39
20j	OCH ₃	-	283 ± 21.7	8880 ± 1318	267	7706	29
20k	OCH ₃	Cl	184 ± 47	4390 ± 721	174	3810	22
20l	OCH ₃	CH ₃	212 ± 72	4735 ± 1101	200	4109	21

Tabella 7. Valori di affinità di legame (IC₅₀ e Ki) dei composti **20a-l** nei confronti dei recettori σ₁ e σ₂ e relative selettività. I dati sono espressi come media ± SD di 2-4 esperimenti.

Dai risultati ottenuti si possono trarre già alcune considerazioni interessanti seppur parziali; l'obiettivo, infatti, è quello di ampliare la rosa dei sostituenti sull'anello N-benzilammidico per avere una panoramica completa dell'effetto di questi sull'affinità σ.

Comunque, tutti i composti hanno esibito una decisa selettività (almeno 20 volte superiore rispetto al sottotipo σ₂) nei confronti del recettore σ₁ oltre a possedere un'affinità mediamente discreta. Le molecole più interessanti sono il derivato **20b** (R=H, R¹=Cl; K_iσ₁=12.9 nM; K_iσ₂/K_iσ₁=355) ed il derivato **20d** (R=Cl, R¹=H; K_iσ₁=14.1 nM; K_iσ₂/K_iσ₁=187) i quali sono dotati di un'ottima affinità σ₁ ed una selettività nei confronti del recettore σ₂ pari ad almeno un ordine di grandezza.

Per contro, la metil o la metossi-sostituzione in posizione para dell'anello N-benzilammidico sembra sfavorire l'affinità di legame nei confronti del recettore σ₁, abbassandola di circa dieci volte.

Non sembra essere, in questo contesto, determinante la sostituzione sull'altro anello fenilico; i sostituenti scelti, infatti, derivano dall'ottimizzazione fatta con il modello farmacoforico, dove emergeva che i composti non sostituiti o quelli para-cloro e para-metil sostituiti garantivano una migliore affinità.

Sviluppi futuri

I primi dati raccolti con la serie di derivati piperidincarbossamidici **20a-1** dovranno essere completati sintetizzando altre molecole aumentando e variando la gamma di sostituenti sull'anello N-benzilico o utilizzando differenti nuclei arilici.

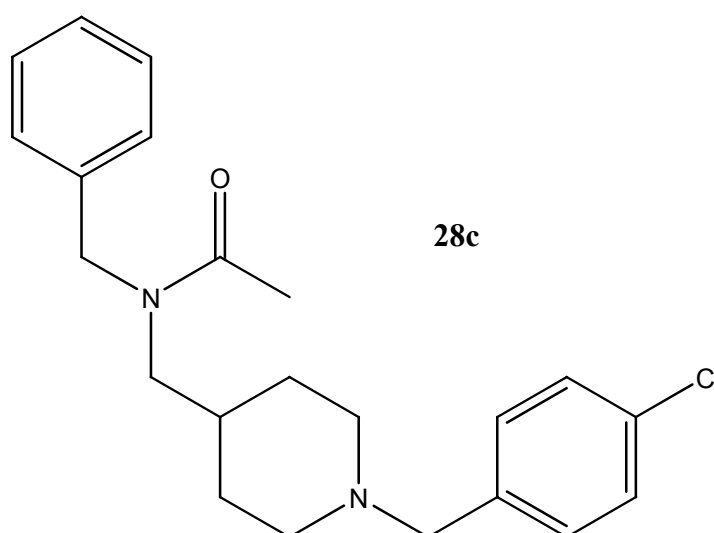
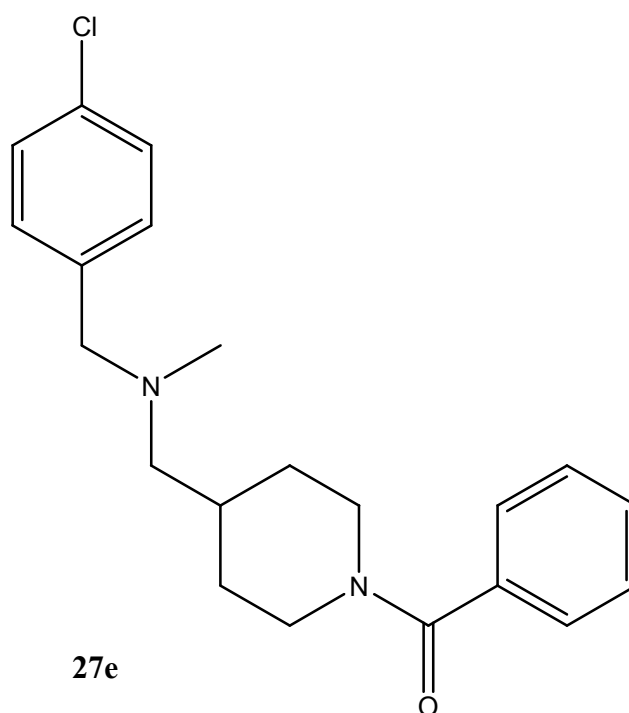
I composti più promettenti dal punto di vista dell'affinità e con un buon profilo di selettività saranno sottoposti ad ulteriori prove sia *in vitro* che *in vivo* al fine di ottenere maggiori informazioni sul ruolo biologico dei recettori σ .

***DERIVATI FENILMETANONICI
& ACETAMMIDICI***

“New perspectives in the design and in the synthesis of new sigma ligands: computational approach and classic way.”; **Erik Laurini**, Maria Grazia Mamolo, Daniele Zampieri, Simona Collina, Daniela Rossi, Luciano Vio; XXIII Congresso Nazionale S.C.I.; Sorrento, 5-10 luglio 2009.

Design&Sintesi

Appurato come il nostro modello farmacoforico per i recettori σ_1 possa risultare funzionale nella progettazione di nuovi ligandi, abbiamo provato a mappare su di esso i composti **27e** (Figura 26) e **28c** (Figura 27) per capire se le strutture di queste due molecole potesse adattarsi alle features del modello e diventare, quindi, possibili scaffold da ottimizzare.



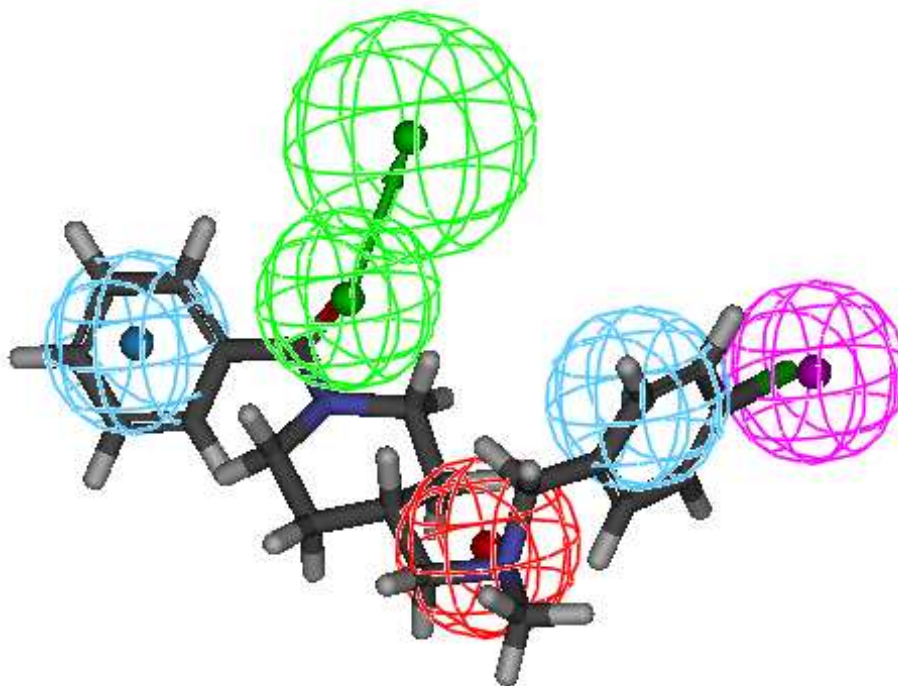


Figura 26. Fitting del composto **27e** (Ary=4-clorofenil; R¹=CH₃).

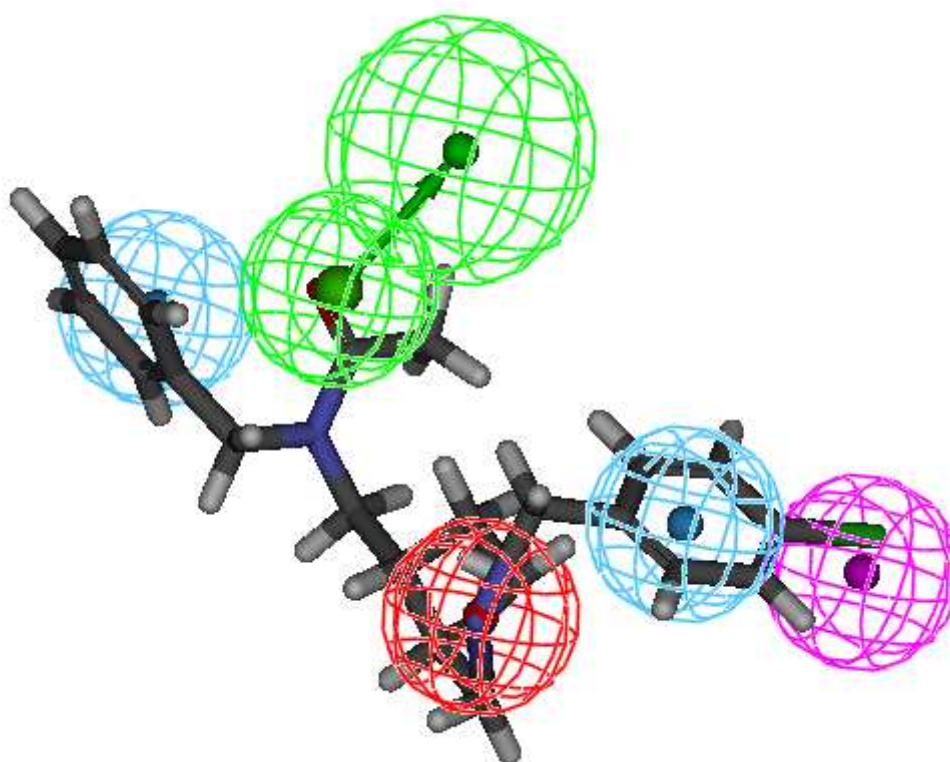
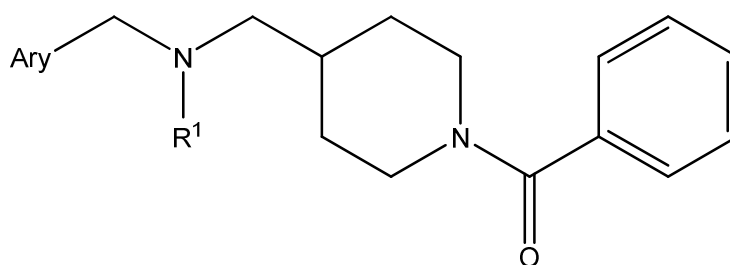


Figura 27. Fitting del composto **28c** (Ary=fenil; R¹=4-clorofenil; R²=CH₃)

Entrambi i composti riescono a sovrapporsi al nostro modello: gli anelli fenilici vanno a mappare le funzioni “idrofobiche aromatiche” mentre l’atomo di cloro, presente in entrambe le molecole, entra nella tasca idrofobica. Nel derivato **27e**, l’azoto basico non è più quello della piperidina bensì quello del raggruppamento N-benzilmetil amminico il quale va a mappare la features “positivo ionizzabile”. Per quanto riguarda il composto **28c**, questa funzione risulta essere invece mappata dall’azoto del nucleo piperidinico. Nell’ultima features, “accettore di legame idrogeno”, si sovrappongono per entrambe le molecole i gruppi carbonilici presenti nella loro struttura.

Oltre che dal punto di vista qualitativo, il modello ha predetto un valore di affinità molto promettente per entrambi i composti (le $K_i\sigma_1$ stimate sono sull’ordine del nM). Quindi si è deciso di sintetizzare due serie di composti aventi come lead compound i composti **27e**, capostipite della serie dei fenilmetanoni **27a-r** (Tabella 8) (Schema 4) e **28c** lead compound, invece dei derivati acetammidici **28a-l** (Tabella 10) (Schema 5).

Derivati fenilmetanonici

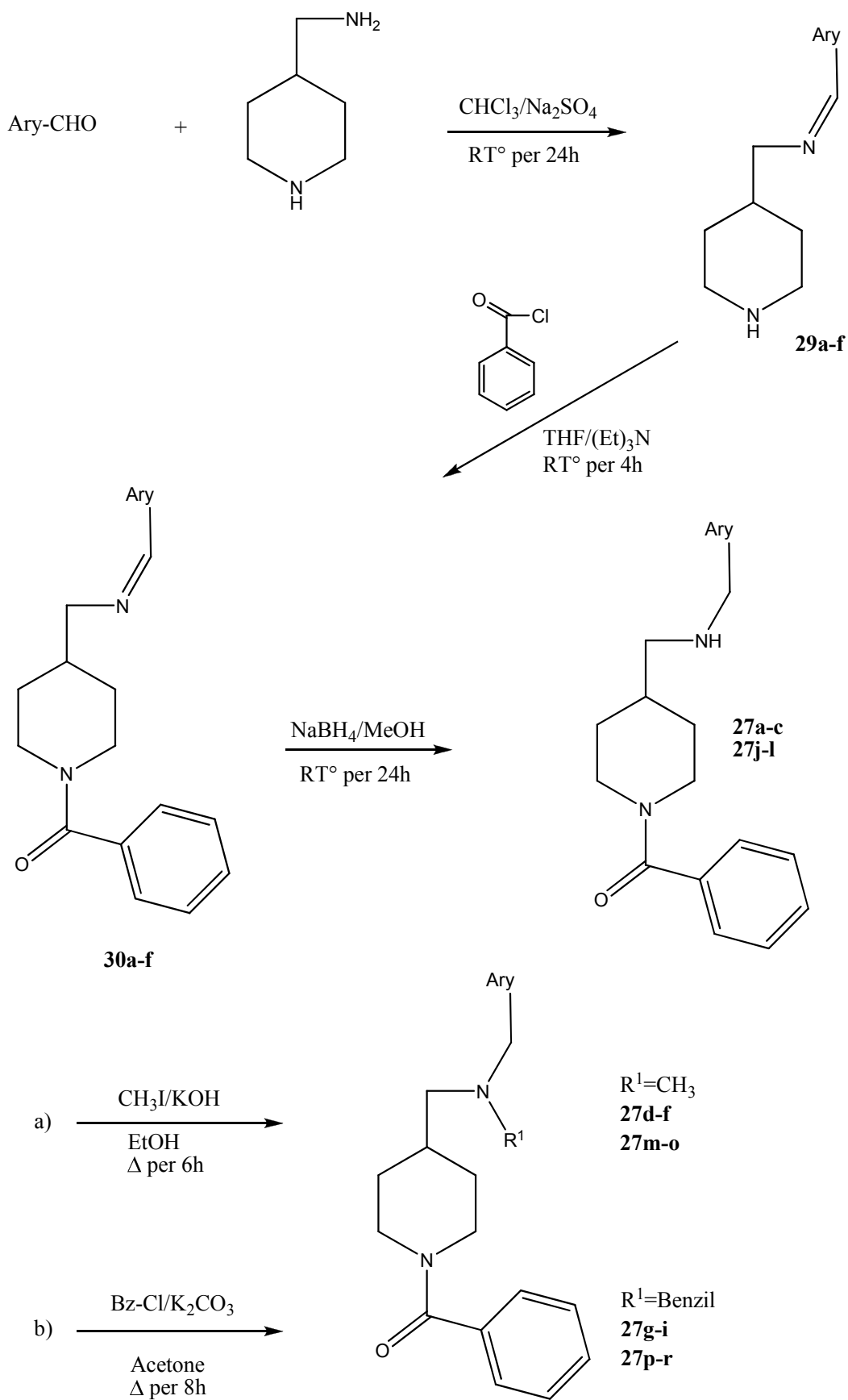


27a-r

Composto	Ary	R ¹	Resa (%)	Anal.Elem.
27a	fenil	H	69.2	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O
27b	4-clorofenil	H	83.1	C ₂₀ H ₂₁ ClN ₂ O
27c	4-metilfenil	H	66.2	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O
27d	fenil	CH ₃	76.2	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O
27e	4-clorofenil	CH ₃	76.3	C ₂₁ H ₂₅ ClN ₂ O
27f	4-metilfenil	CH ₃	96.8	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O
27g	fenil	Bz	56.2	C ₂₇ H ₃₀ N ₂ O
27h	4-clorofenil	Bz	66.7	C ₂₇ H ₂₉ ClN ₂ O
27i	4-metilfenil	Bz	74.1	C ₂₈ H ₃₂ N ₂ O
27j	piridin-2-il	H	71.4	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O
27k	piridin-3-il	H	55.6	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O
27l	piridin-4-il	H	73.7	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O
27m	piridin-2-il	CH ₃	94.1	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O
27n	piridin-3-il	CH ₃	52.6	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O
27o	piridin-4-il	CH ₃	78.9	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O
27p	piridin-2-il	Bz	80.0	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O
27q	piridin-3-il	Bz	67.3	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O
27r	piridin-4-il	Bz	66.7	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O

Tabella 8. Caratterizzazione dei composti **27a-r**.

Schema 4



Per reazione tra la 4-(amminometil)piperidina e l'opportuna aldeide, in CHCl_3 , si ottengono i derivati imminici (basi di Schiff) **29a-f**. Ad una soluzione di **29a-f** in THF ed in presenza di *triethylamina* viene aggiunta, gocciolando, una soluzione di *benzoyl cloruro* in THF per ottenere gli intermedi fenilmetanonici **30a-f**. I composti **30a-f** vengono ridotti alle rispettive ammine (**27a-c**, **27j-l**) per reazione con NaBH_4 in MeOH.

a): i derivati fenilmetanonici **27d-f**, **27m-o** sono stati ottenuti per alchilazione delle ammine secondarie precedentemente descritte per reazione con CH_3I in EtOH.

b): i derivati fenilmetanonici **27g-i**, **27p-r** sono stati ottenuti per alchilazione delle ammine secondarie precedentemente descritte per reazione con *benzil cloruro* in acetone.

Affinità&Selettività

Tutti i composti sintetizzati, una volta purificati e caratterizzati, sono stati preparati al fine di eseguire su di essi i test di binding necessari per valutarne la loro affinità e selettività nei confronti dei recettori σ (**Tabella 9**).

Composto	Ary	R ¹	IC ₅₀ σ_1 (nM)	IC ₅₀ σ_2 (nM)	K _i σ_1	K _i σ_2	K _i σ_2 /K _i σ_1
27a	fenil	H	121 ± 17.2	2619 ± 407	114	2273	20
27b	4-clorofenil	H	44.8 ± 5.32	801 ± 67.7	42.3	695	16
27c	4-metilfenil	H	147 ± 36.2	-	139	-	-
27d	fenil	CH ₃	80.0 ± 14.0	1166 ± 692	75.5	1012	13
27e	4-clorofenil	CH ₃	32.1 ± 3.91	462 ± 57.8	30.3	401	13
27f	4-metilfenil	CH ₃	38.6 ± 3.64	-	36.4	-	-
27g	fenil	Bz	155 ± 71.3	-	146	-	-
27h	4-clorofenil	Bz	-	-	-	-	-
27i	4-metilfenil	Bz	214 ± 36.4	-	201	-	-
27j	piridin-2-il	H	1764 ± 979	-	1664	-	-
27k	piridin-3-il	H	1140 ± 348	-	1031	-	-
27l	piridin-4-il	H	676 ± 240	-	638	-	-
27m	piridin-2-il	CH ₃	1383 ± 414	-	1305	-	-
27n	piridin-3-il	CH ₃	1673 ± 422	-	1578	-	-
27o	piridin-4-il	CH ₃	1130 ± 407	-	1066	-	-
27p	piridin-2-il	Bz	536 ± 92.7	-	506	-	-
27q	piridin-3-il	Bz	1485 ± 240	> 10 μM	1401	> 10 μM	> 6
27r	piridin-4-il	Bz	1081 ± 262	-	1020	-	-

Tabella 9. Valori di affinità di legame (IC₅₀ e K_i) dei composti **27a-r** nei confronti dei recettori σ_1 e σ_2 e relative selettività. I dati sono espressi come media ± SD di 2-4 esperimenti.

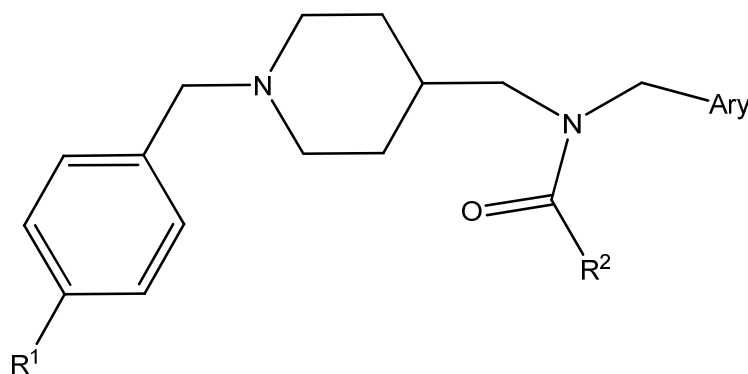
Come si può notare dalla **Tabella 9**, mancano ancora gran parte dei dati relativi all'affinità verso i recettori σ_2 essendo questi ancora in fase di esecuzione. Ciononostante, visto che siamo in possesso dello screening completo dell'affinità verso il sottotipo σ_1 , si possono proporre alcune considerazioni. In primis, non emerge all'interno di questa serie un composto con un'altissima affinità verso il recettore σ_1 ma alcune molecole sono dotate di un valore di K_i comunque considerabile; i composti **27e** (Ary=4-clorofenil, R=CH₃, $K_i\sigma_1=30.3$ nM) e **27f** (Ary=4-metilfenil, R=CH₃, $K_i\sigma_1=36.4$ nM) sono i migliori della serie e, confrontando i valori di affinità degli altri derivati, sembrano portare alla conclusione che il gruppo N-metilico sia preferibile ad un'ammina secondaria o ad un nucleo N-benzilico decisamente più ingombrante. Inoltre, la presenza in posizione para di un piccolo gruppo lipofilo, come appunto un atomo di cloro o il gruppo metile, sembra ottimizzare il legame con il recettore rispetto ad un anello privo di sostituito come già anticipato dal nostro modello farmacoforico.

Infine, la sostituzione dell'anello fenilico con quello piridinico provoca un deciso peggioramento dell'affinità di legame di questa serie di composti portando i valori di K_i al μ M. Si può ipotizzare che ciò può essere causato dal fatto che l'anello piridinico vada interagire con un zona del recettore particolarmente idrofobica e che, quindi, non interagisca favorevolmente con le caratteristiche basiche dell'atomo di azoto dell'eterociclo.

Derivati acetamidici

Questa serie è ancora in fase di sviluppo e nel corso di questa discussione verranno presentati solo i composti dei quali siamo in possesso di tutti i dati di caratterizzazione necessari per identificare la struttura e, soprattutto, il grado di purezza.

Inoltre, un'ulteriore precisazione deve essere fatta riguarda la nomenclatura utilizzata; infatti per semplicità e brevità ho definito questa serie come appartenente al tipo di struttura del suo capostipite, il derivato **28c**. In realtà, come si può facilmente notare dalla tabella sottostante, metà di questi composti sono dei derivati benzamidici e non acetamidici.

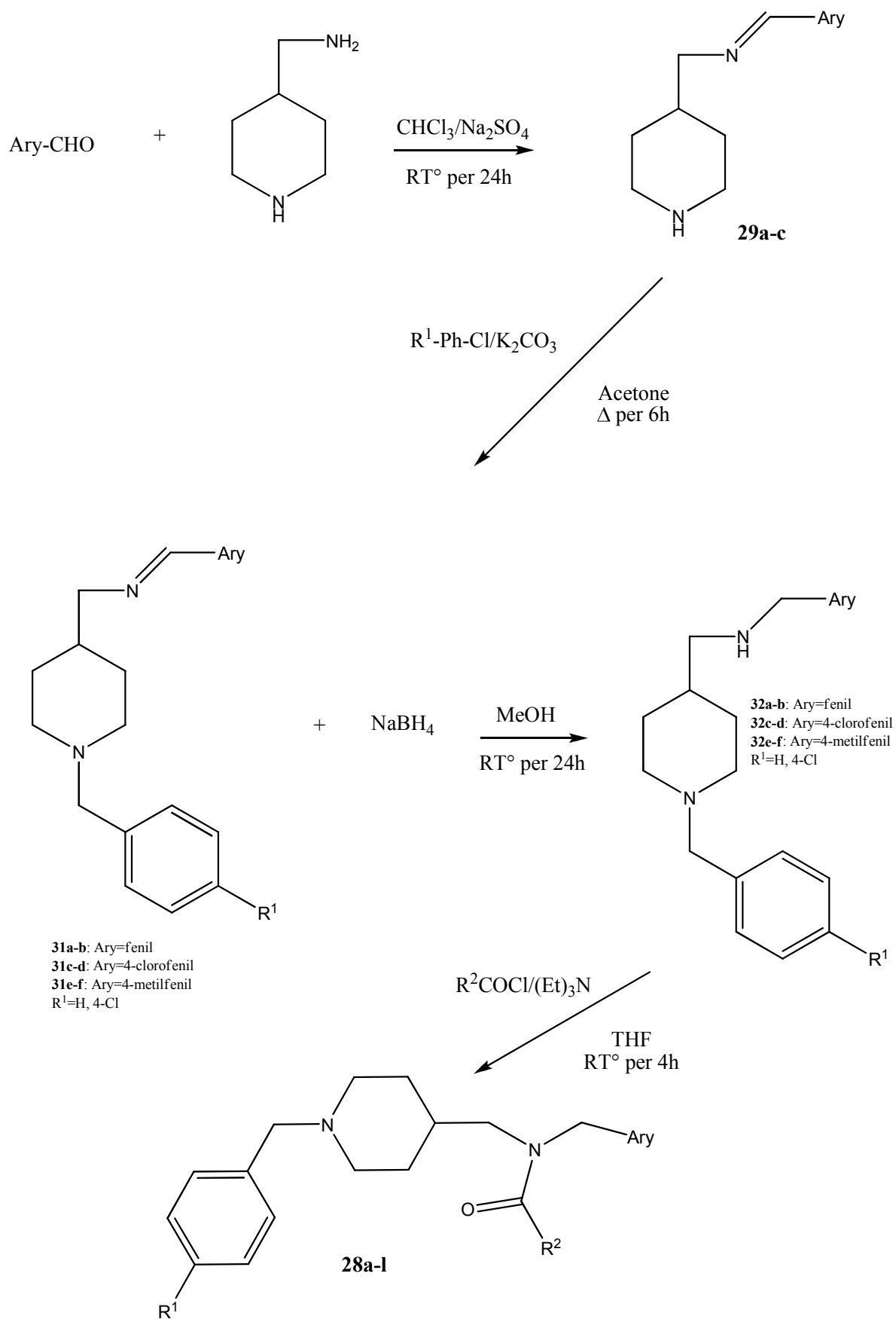


28a-l

Composto	Ary	R ¹	R ²	Resa (%)	Anal.Elem.
28a	fenil	H	CH ₃	76.3	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O
28b	fenil	H	fenil	93.5	C ₂₇ H ₃₀ N ₂ O
28c	fenil	Cl	CH ₃	85.7	C ₂₂ H ₂₇ ClN ₂ O
28d	fenil	Cl	fenil	78.8	C ₂₇ H ₂₉ ClN ₂ O
28e	4-clorofenil	H	CH ₃	89.3	C ₂₂ H ₂₇ ClN ₂ O
28f	4-clorofenil	H	fenil	98.1	C ₂₇ H ₂₉ ClN ₂ O
28g	4-clorofenil	Cl	CH ₃	83.0	C ₂₂ H ₂₆ Cl ₂ N ₂ O
28h	4-clorofenil	Cl	fenil	72.4	C ₂₇ H ₂₈ Cl ₂ N ₂ O
28i	4-metilfenil	H	CH ₃	97.6	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O
28j	4-metilfenil	H	fenil	91.5	C ₂₈ H ₃₂ N ₂ O
28k	4-metilfenil	Cl	CH ₃	90.9	C ₂₃ H ₂₉ ClN ₂ O
28l	4-metilfenil	Cl	fenil	83.6	C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O

Tabella 10. Caratterizzazione dei composti **28a-l**.

Schema 5



Per reazione tra la 4-(amminometil)piperidina e l'opportuna aldeide, in CHCl_3 ed in presenza di Na_2SO_4 , si ottengono i derivati imminici (basi di Schiff) **29a-c**. I composti **29a-c** vengono fatti reagire con una soluzione in acetone di *benzil cloruro* o *4-clorobenzil cloruro* in presenza di K_2CO_3 per ottenere gli intermedi **31a-f**, benzilati sull'atomo di azoto piperidinico. Questi ultimi sono successivamente ridotti alle rispettive ammine, **32a-f**, per reazione con NaBH_4 in MeOH.

Infine, i derivati **28a-l** sono sintetizzati a partire dagli intermedi **32a-f** utilizzando l'appropriato agente acilante (*acetil cloruro* o *benzoil cloruro*) in una soluzione di THF ed in presenza di *triethylamina*.

Affinità & Selettività

I composti appena descritti sono stati recentemente preparati per affrontare i test di binding e valutare, quindi, la loro affinità nei confronti dei recettori σ . Al momento non siamo ancora in possesso di dati definitivi per nessuno di questi composti, ma i primi risultati preliminari sui recettori σ_1 indicano come alcuni di questi derivati siano in possesso di un'affinità decisamente interessante ($K_i\sigma_1=2-20$ nM, per i più promettenti) migliorando di conseguenza i dati ottenuti dalla serie di derivati fenilmetanonici **27a-r** precedentemente descritti.

Sviluppi futuri

Per entrambe le serie di composti siamo in attesa di avere un profilo biologico completo sia dal punto di vista dell'affinità che della selettività verso i due sottotipi di recettore σ così da poter effettuare delle considerazioni più esatte riguardo le relazioni struttura-affinità.

Al momento i derivati fenilmetanonici **27a-r** hanno dimostrato di possedere una modesta affinità verso il recettore σ_1 indicando come le modificazioni fatte sulla struttura del lead compound (**27e**) non abbiano portato delle miglierie da questo punto di vista.

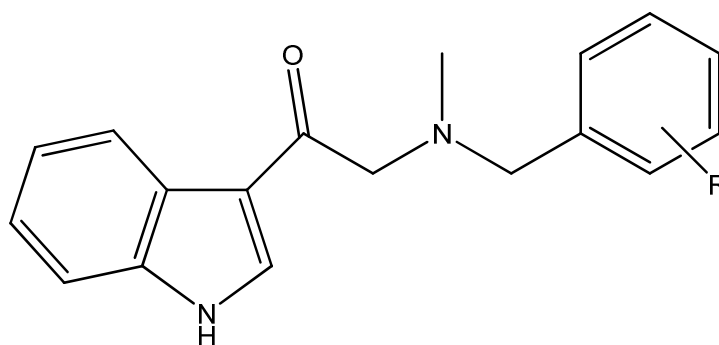
I derivati acetamidici **28a-l**, al contrario, sembrano essere decisamente più promettenti con dei valori di affinità, seppur ancora da confermare, tali da poter sfruttare le molecole migliori per ulteriori saggi biologici sia *in vitro* che *in vivo* al fine di ottenere un profilo farmacologico completo ed ottenere nuove ed importanti informazioni sul ruolo biologico dei recettori σ .

DERIVATI (INDOL-3-IL)ETANONICI

“New perspectives in the design and in the synthesis of new sigma ligands: computational approach and classic way.”; **Erik Laurini**, Maria Grazia Mamolo, Daniele Zampieri, Simona Collina, Daniela Rossi, Luciano Vio; XXIII Congresso Nazionale S.C.I.; Sorrento, 5-10 luglio 2009.

Design&Sintesi

L'ultima serie di composti, potenziali ligandi σ , che andrò a descrivere è quella dei derivati (indol-3-il)etanonici **33a-1** (Tabella 11) (Schema 6) recentemente sintetizzati presso il nostro laboratorio.



33a-1

L'idea di sviluppare delle molecole con questo tipo di struttura, nasce dalla recente scoperta del ligando endogeno per i recettori σ_1 [50], cioè la N,N-dimetiltriptamina (DMT) **12**. Le strutture del derivato **33a** (R=H) e della DMT, infatti, sono praticamente sovrapponibili (Figura 28) una volta minimizzate. Oltre a ciò, abbiamo voluto sfruttare alcune informazioni derivate dal modello farmacoforico da noi generato; infatti, abbiamo inserito un gruppo carbonilico in grado di accettare un possibile legame idrogeno da un residuo del recettore e abbiamo rimpiazzato un metile del gruppo amminico della DMT con un raggruppamento benzilico variamente sostituito al fine di valutare l'influenza della sostituzione sull'affinità di legame σ .

L'obiettivo che ci siamo prefissati con questo tipo di derivati è, ovviamente, ottenere dei valori di affinità paragonabili a quelli della DMT ma anche quello di cercare di aumentare la selettività nei confronti del sottotipo σ_2 che, per quanto riguarda il composto **12**, non appare così spiccata.

Al momento, comunque, queste molecole hanno appena finito i vari processi di purificazione e caratterizzazione e, quindi, non è ancora stato possibile avere nessun dato riguardo la loro attività biologica.

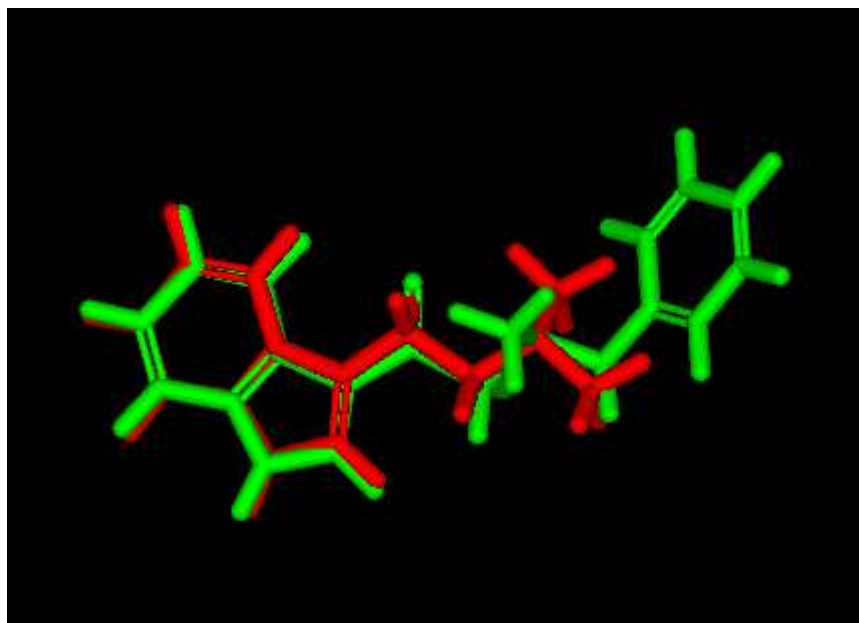
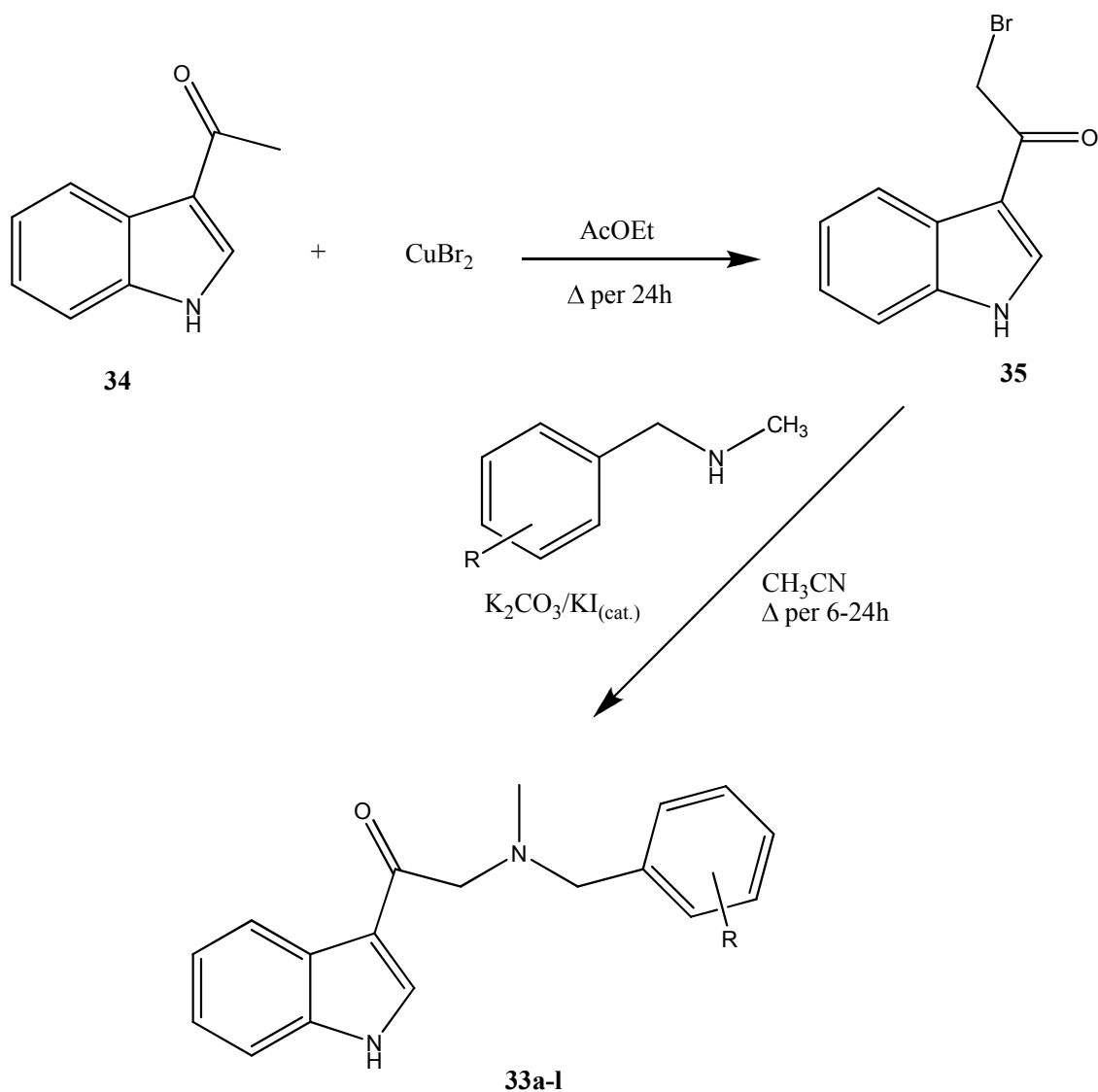


Figura 28. Sovrapposizione delle strutture della DMT **12** (in rosso) e del capostipite della serie dei derivati indoliletanonici **33a** (in verde). Le strutture sono state minimizzate utilizzando il force field CHARMM fino a soddisfare un gradiente di 0.1 kcal/mol.

Composto	R	p.f. (°C)	Resa (%)	Anal.Elem.
33a	H	164-166	32.1	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O
33b	2-Cl	olio	14.8	C ₁₈ H ₁₇ ClN ₂ O
33c	4-Cl	168-170	10.9	C ₁₈ H ₁₇ ClN ₂ O
33d	2,4-(Cl) ₂	olio	15.5	C ₁₈ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O
33e	2-CH ₃	olio	18.1	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O
33f	4-CH ₃	148-150	16.5	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O
33g	2,4-(CH ₃) ₂	58-60	24.8	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O
33h	2-OCH ₃	olio	13.9	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂
33i	4-OCH ₃	olio	10.0	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂
33j	2,4-(OCH ₃) ₂	161-163	26.3	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃
33k	4-Ph	191-193	22.3	C ₂₄ H ₂₂ N ₂ O
33l	naftil	olio	23.4	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O

Tabella 11. Caratterizzazione dei composti **33a-l**.

Schema 6



Ad una soluzione di 1-(1H-indol-3-il)etanone **34** in CHCl_3 , sotto costante agitazione viene aggiunta una soluzione di CuBr_2 in AcOEt per ottenere l'intermedio bromurato **35**. L'opportuna *N*-benzilmetilammina sostituita, separatamente preparata, viene fatta reagire con **35** in CH_3CN e con l'aggiunta di K_2CO_3 ed una quantità catalitica di KI per dare i derivati indoliletanonici **33a-l**.

Tutti i composti finali sono stati ottenuti come oli grezzi e, pertanto, sono stati purificati attraverso metodologie cromatografiche.

PARTE SPERIMENTALE

Chimica

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio capillare Buchi 510 e non sono stati corretti. Gli spettri infrarossi sono stati eseguiti in nujol su uno spettrofotometro Jasco FT 200. Gli spettri di risonanza magnetica nucleare del protone ($^1\text{H-NMR}$) sono stati determinati tramite uno spettrometro Varian Gemini 200, i chemical shifts sono riportati come δ (ppm) in soluzione di CDCl_3 . Le reazioni sono state monitorate tramite cromatografia su strato sottile (TLC) su gel di silice F254 Merck piastre. Gli spettri di massa ESI-MS sono stati registrati con uno spettrometro API 1 (P-E) a 5.6 KV, Skimmer 60 eV e solvente MeOH. Le analisi elementari (C, H, N) sono state effettuate su un analizzatore Carlo Erba e i valori analitici sono compresi entro $\pm 0.3\%$ dei valori calcolati teoricamente.

Sintesi benzossazoloni (Schema 1, pag.40)

3-(3-Cloropropil)benzo[d]ossazol-2(3H)-one 18a

Una miscela di *Benzo[d]ossazol-2(3H)-one 17* (3.0 g, 22.22 mmoli) e K_2CO_3 (7.7 g, 55.55 mmoli) viene sciolta in 50 ml di ACN e la soluzione viene posta sotto reflusso per 10 minuti. *1-Bromo-3-cloropropano* (8.7 g, 55.55 mmoli) ed una quantità catalitica di KI vengono aggiunti e la miscela viene agitata a reflusso per altre 3 ore. Il sale inorganico viene filtrato ed il solvente eliminato sotto pressione. Si recupera con acqua distillata (50 ml) e si estrae con CHCl_3 (3x 100 ml). La fase organica viene separata ed essiccata con Na_2SO_4 anidro. La soluzione filtrata viene concentrata a pressione ridotta e l'olio ottenuto viene cristallizzato da n-esano per dare un solido giallo. Resa 4.01 g (85 %); punto di fusione 62-64°C.

I.R. cm^{-1} (nujol): 1791 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 2.30 (m, 2H, CH_2 -**CH** $_2$ - CH_2 , $J = 5.9$ - 6.6 Hz); 3.63 (t, N-**CH** $_2$, $J = 6.6$ Hz); 4.00 (t, 2H, **CH** $_2$ -Cl, $J = 5.9$ Hz); 7.00-7.30 (m, 4H arom.). MS: m/z 211 [MH^+] 213 [$\text{MH}^+ + 2$]. Anal. calc. per $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$ (PM 211.04): C, 56.75; H, 4.66; N, 6.62%; trovato: C, 56.70; H, 4.69; N, 6.57%.

3-(4-Bromobutil)benzo[d]ossazol-2(3H)-one 18b

Questo intermedio è stato ottenuto in modo analogo utilizzando *1,4-dibromobutano*. Resa 2.99 g (60 %); punto di fusione 42-45°C.

I.R. cm^{-1} (nujol): 1747 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.80 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 3.63 (m, N- CH_2); 4.00 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$); 7.10-7.40 (m, 4H arom.). MS: m/z 270 [MH^+] 271 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrNO}_2$ (PM 270.12): C, 48.91; H, 4.48; N, 5.19%; trovato: C, 48.80; H, 4.65; N, 5.27%.

3-[3-(N-Benzil-N-metilamino)propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15a

Una soluzione di **18 a** (0.60 g, 2.84 mmol), *N*-metilbenzilamina (0.28 g, 2.27 mmol), K_2CO_3 anidro (2.19 g, 15.9 mmol) ed una quantità catalitica di KI vengono sciolti in 50 ml di ACN e la soluzione posta sotto reflusso e monitorata alla TLC. Il sale inorganico viene filtrato ed il solvente eliminato a pressione ridotta. Si recupera con acqua distillata (50 ml) e si estrae con CHCl_3 (3x 100 ml). La fase organica viene separata ed essiccata con Na_2SO_4 anidro. La soluzione filtrata viene concentrata a pressione ridotta e l'olio ottenuto viene trattato con una quantità equimolare di acido ossalico in etanolo assoluto per dare l'ossalato che viene filtrato e lavato con etanolo a freddo. Resa 0.26 g (0.20 g di base libera, 30 %); punto di fusione 180-182°C.

I.R. cm^{-1} (nujol): 1772, 2697 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 2.01 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.7\text{-}7.3$ Hz); 2.21 (s, 3H, N- CH_3); 2.49 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.7$ Hz); 3.51 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 3.93 (t, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.95-7.40 (m, 9H, arom.). MS: m/z 297 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ (PM 296.36): C, 72.95; H, 6.80; N, 9.45%; trovato: C, 73.19; H, 7.03; N, 9.20%.

I composti **15b-k** sono stati sintetizzati in modo analogo.

3-[3-[N-(2-Clorobenzil)-N-metilamino]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15b

I.R. cm^{-1} (nujol): 1764, 2721 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.97 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.6\text{-}7.3$ Hz); 2.15 (s, 3H, CH_3); 2.46 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.51 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 3.84 (t, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.89-7.37 (m, 8H, arom.). MS: m/z 330 [MH^+] 332 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (PM 330.81): C, 65.35; H, 5.79; N, 8.47%; trovato: C, 65.45; H, 5.85; N, 8.60%.

3-[3-[N-(3-Clorobenzil)-N-metilamino]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15c

I.R. cm^{-1} (nujol): 1767, 2673 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.95 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.6\text{-}7.3$ Hz); 2.15 (s, 3H, CH_3); 2.45 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.43 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 3.86 (t, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.92-7.30

(m, 8H, arom.). MS: m/z 330 [MH⁺] 332 [MH⁺+2]. Anal. calc. per C₁₈H₁₉ClN₂O₂ (PM 330.81): C, 65.35; H, 5.79; N, 8.47%; trovato: C, 65.30; H, 5.76; N, 8.50%.

3-[3-[N-(4-Clorobenzil)-N-metilamino]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15d

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1770, 2677 cm⁻¹. ¹H-NMR (base libera, CDCl₃-TMS) ppm (δ): 2.05 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂, J = 6.6-7.3 Hz); 2.17 (s, 3H, N-CH₃); 2.45 (t, 2H, CH₂-N(CH₃)-CH₂-Ar, J = 6.6 Hz); 3.46 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 3.90 (t, 2H, N-CH₂-(CH₂)₂-, J = 7.3 Hz); 6.95-7.30 (m, 8H, arom.). MS: m/z 330 [MH⁺] 332 [MH⁺+2]. Anal. calc. per C₁₈H₁₉ClN₂O₂ (PM 330.81): C, 65.35; H, 5.79; N, 8.47%; trovato: C, 65.46; H, 5.82; N, 8.52%.

3-[3-[N-(2,4-Dimetilbenzil)-N-metilamino]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15e

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1777, 2725 cm⁻¹. ¹H-NMR (base libera, CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.97 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂, J = 6.7-7.3 Hz); 2.21 (s, 3H, N-CH₃); 2.33 (s, 3H, CH₃); 2.35 (s, 3H, CH₃); 2.50 (t, 2H, CH₂-N(CH₃)-CH₂-Ar, J = 6.7 Hz); 3.43 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 3.86 (t, 2H, N-CH₂-(CH₂)₂-, J = 7.3 Hz); 6.95-7.30 (m, 7H, arom.). MS: m/z 325 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₀H₂₄N₂O₂ (PM 324.42): C, 74.04; H, 7.46; N, 8.64%; trovato: C, 73.82; H, 7.18; N, 8.83%.

3-[3-[N-(2-Metossibenzil)-N-metilamino]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15f

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1771, 2673 cm⁻¹. ¹H-NMR (base libera, CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.87-2.00 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂, J = 6.6-7.3 Hz); 2.14 (s, 3H, CH₃); 2.43 (t, 2H, CH₂-N(CH₃)-CH₂-Ar, J = 6.6 Hz); 3.45 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 3.87 (t, 2H, N-CH₂-(CH₂)₂-, J = 7.3 Hz); 6.79-7.25 (m, 8H, arom.). MS: m/z 326 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₉H₂₂N₂O₃ (PM 326.39): C, 69.92; H, 6.79; N, 8.58 %; trovato: C, 70.05; H, 6.75; N, 8.46%.

3-[3-[N-(3-Metossibenzil)-N-metilamino]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15g

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1770, 2676 cm⁻¹. ¹H-NMR (base libera, CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.83-1.97 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂, J = 6.6-7.3 Hz); 2.12 (s, 3H, CH₃); 2.40 (t, 2H, CH₂-N(CH₃)-CH₂-Ar, J = 6.6 Hz); 3.39 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 3.74 (s, 3H, OCH₃); 3.84 (t, 2H, N-CH₂-(CH₂)₂-, J = 7.3 Hz); 6.70-7.21 (m, 8H, arom.). MS: m/z 326 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₉H₂₂N₂O₃ (PM 326.39): C, 69.92; H, 6.79; N, 8.58 %; trovato: C, 70.15; H, 6.66; N, 8.56%.

3-[3-[N-(4-Metossibenzil)-N-metilamino]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15h

I.R. cm^{-1} (nujol): 1771, 2685 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.98 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.7\text{-}7.3$ Hz); 2.20 (s, 3H, CH_3); 2.43 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.7$ Hz); 3.45 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.84 (s, 3H, OCH_3); 3.91 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.85-7.30 (m, 8H, arom.). MS: m/z 326 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ (PM 326.39): C, 69.92; H, 6.79; N, 8.58 %; trovato: C, 70.12; H, 6.57; N, 8.30%.

3-[3-[N-Metilamino-N-(2-metilbenzil)]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15i

I.R. cm^{-1} (nujol): 1766, 2723 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.82-1.96 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.6\text{-}7.3$ Hz); 2.14 (s, 3H, CH_3); 2.30 (s, 3H, CH_3); 2.44 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.40 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.78 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.86-7.23 (m, 8H, arom.). MS: m/z 310 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ (PM 310.39): C, 73.52; H, 7.14; N, 9.03%; trovato: C, 73.65; H, 7.05; N, 8.96%.

3-[3-[N-Metilamino-N-(3-metilbenzil)]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15j

I.R. cm^{-1} (nujol): 1770, 2676 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.84-1.98 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.6\text{-}7.3$ Hz); 2.12 (s, 3H, CH_3); 2.26 (s, 3H, CH_3); 2.40 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.38 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.84 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.91-7.18 (m, 8H, arom.). MS: m/z 310 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ (PM 310.39): C, 73.52; H, 7.14; N, 9.03%; trovato: C, 73.55; H, 7.15; N, 8.98%.

3-[3-[N-Metilamino-N-(4-metilbenzil)]propil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 15k

I.R. cm^{-1} (nujol): 1766, 2675 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.85-1.99 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.6\text{-}7.3$ Hz); 2.14 (s, 3H, CH_3); 2.27 (s, 3H, CH_3); 2.42 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.43 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.82 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.92-7.20 (m, 8H, arom.). MS: m/z 310 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ (PM 310.39): C, 73.52; H, 7.14; N, 9.03%; trovato: C, 73.50; H, 7.11; N, 9.00%.

4.1.7 3-[3-(N-Benzil-N-metilamino)butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 16a

Una soluzione di **18b** (0.25 g, 0.926 mmoli), *N*-metilbenzilammina (0.089 g, 0.741 mmoli), K_2CO_3 anidro (0.72 g, 5.19 mmoli) ed una quantità catalitica di KI vengono sciolti in 50 ml di ACN e la soluzione posta sotto reflusso e monitorata alla TLC. Il sale inorganico viene filtrato ed il solvente eliminato a pressione ridotta. Si recupera con acqua distillata (50 ml) e si estrae con CHCl_3 (3x 100 ml). La fase organica viene separata ed essiccata con Na_2SO_4 anidro. La soluzione filtrata viene concentrata a pressione ridotta e l'olio ottenuto viene

trattato con una quantità equimolare di acido ossalico in etanolo assoluto per dare l'ossalato che viene filtrato e lavato con etanolo a freddo. Resa 0.12 g (0.09 g di base libera, 30 %); punto di fusione 145-150°C.

I.R. cm^{-1} (nujol): 1772, 2668 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.50-2.00 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.7\text{-}7.3$ Hz); 2.20 (s, 3H, N-CH_3); 2.40 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.7$ Hz); 3.45 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.85 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.90-7.40 (m, 9H, arom.). MS: m/z 311 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ (PM 310.39): C, 73.52; H, 7.14; N, 9.03%; trovato: C, 73.71; H, 7.24; N, 9.21%.

I composti **16b-k** sono stati sintetizzati in modo analogo.

3-[4-[N-(2- Clorobenzil)-N-metilamino]butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one **16b**

I.R. cm^{-1} (nujol): 1770, 2674 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.49-1.90 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.13 (s, 3H, CH_3); 2.39 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.40 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.81 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.90-7.25 (m, 8H, arom.). MS: m/z 344 [MH^+] 346 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (PM 344.84): C, 66.18; H, 6.14; N, 8.12 %; trovato: C, 66.10; H, 6.37; N, 8.06%

3-[4-[N-(3- Clorobenzil)-N-metilamino]butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one **16c**

I.R. cm^{-1} (nujol): 1766, 2670 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.49-1.90 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.14 (s, 3H, CH_3); 2.39 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.40 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.82 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.91-7.27 (m, 8H, arom.). MS: m/z 344 [MH^+] 346 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (PM 344.84): C, 66.18; H, 6.14; N, 8.12 %; trovato: C, 66.26; H, 6.07; N, 8.15%.

3-[4-[N-(4-Clorobenzil)-N-metilamino]butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one **16d**

I.R. cm^{-1} (nujol): 1768, 2676 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.50-1.65 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.75-1.90 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.15 (s, 3H, CH_3); 2.36-2.43 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.42 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.79-3.86 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.93-7.29 (m, 8H, arom.). MS: m/z 344 [MH^+] 346 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (PM 344.84): C, 66.18; H, 6.14; N, 8.12 %; trovato: C, 66.15; H, 6.25; N, 8.06%.

3-[3-[N-(2,4-Dimetilbenzil)-N-metilamino]butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one **16e**

I.R. cm^{-1} (nujol): 1779, 2724 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.50-1.88 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.7\text{-}7.3$ Hz); 2.17 (s, 3H, N-CH_3); 2.32 (s, 6H, 2x CH_3); 2.42 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.7$ Hz); 3.40 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.82 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.90-7.30 (m, 7H, arom.). MS: m/z 339 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ (PM 338.94): C, 74.52; H, 7.74; N, 8.28%; trovato: C, 74.31; H, 7.58; N, 8.39%.

3-[4-[N-(2-Metossibenzil)-N-metilamino]butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 16f

I.R. cm^{-1} (nujol): 1770, 2673 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.53-1.90 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.20 (s, 3H, CH_3); 2.45 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.48 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.79 (s, 3H, CH_3); 3.87 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.83-7.30 (m, 8H, arom.). MS: m/z 340 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ (PM 340.42): C, 70.56; H, 7.11; N, 8.23 %; trovato: C, 70.35; H, 7.25; N, 8.26%.

3-[4-[N-(3-Metossibenzil)-N-metilamino]butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 16g

I.R. cm^{-1} (nujol): 1769, 2674 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.54-1.91 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.19 (s, 3H, CH_3); 2.44 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.49 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.79 (s, 3H, CH_3); 3.86 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.81-7.28 (m, 8H, arom.). MS: m/z 340 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ (PM 340.42): C, 70.56; H, 7.11; N, 8.23 %; trovato: C, 70.47; H, 7.16; N, 8.03%.

3-[3-[N-(4-Metossibenzil)-N-metilamino]butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 16h

I.R. cm^{-1} (nujol): 1774, 2724 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.53-1.90 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 6.7\text{-}7.3$ Hz); 2.18 (s, 3H, CH_3); 2.40 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.7$ Hz); 3.42 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.86 (m, 5H, OCH_3 and $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.84-7.30 (m, 8H, arom.). MS: m/z 340 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ (PM 340.42): C, 70.56; H, 7.11; N, 8.23 %; trovato: C, 70.28; H, 6.92; N, 8.18%.

3-[4-(N-Metilamino-N-(2-metilbenzil)butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 16i

I.R. cm^{-1} (nujol): 1769, 2668 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.49-1.90 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.15 (s, 3H, CH_3); 2.33 (s, 3H, CH_3); 2.41 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.41 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.79 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.89-7.25 (m, 8H, arom.). MS: m/z 324 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ (PM 324.42): C, 74.04; H, 7.46; N, 8.64%; trovato: C, 74.18; H, 7.49; N, 8.58%.

3-[4-(N-Metilamino-N-(3-metilbenzil)butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 16j

I.R. cm^{-1} (nujol): 1770, 2666 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.50-1.91 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.15 (s, 3H, CH_3); 2.31 (s, 3H, CH_3); 2.38 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.40 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.81 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.92-7.22 (m, 8H, arom.). MS: m/z 324 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ (PM 324.42): C, 74.04; H, 7.46; N, 8.64%; trovato: C, 74.12; H, 7.52; N, 8.52%.

3-[4-(N-Metilamino-N-(4-metilbenzil)butil]benzo[d]ossazol-2(3H)-one 16k

I.R. cm^{-1} (nujol): 1769, 2674 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (base libera, $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.51-1.92 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.16 (s, 3H, CH_3); 2.33 (s, 3H, CH_3); 2.39 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-Ar}$, $J = 6.6$ Hz); 3.43 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 3.82 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$, $J = 7.3$ Hz); 6.93-7.23 (m, 8H, arom.). MS: m/z 324 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ (PM 324.42): C, 74.04; H, 7.46; N, 8.64%; trovato: C, 74.25; H, 7.37; N, 8.76%.

Sintesi piperidin-4-carbossammidi (Schema 2, pag.49 e Schema 3, pag.56)

N-Fenil-1-(ter-butossicarbonil)piperidin-4-carbossammide 21

Ad una soluzione di *acido N-Boc-4-piperidincarbossilico* (2.12g, 9.22 mmoli), piridina (1.90ml, 23,6 mmoli) e CH_2Cl_2 (15 ml) viene aggiunto, sotto N_2 ed a t.a., SOCl_2 (0.80ml, 11.0 mmoli) sotto agitazione. Dopo 25 minuti, si aggiunge gocciolando e sotto agitazione una soluzione in CH_2Cl_2 (15 ml) di *anilina* (1.30g, 10.2 mmoli), Et_3N (4.50ml, 32.3 mmoli) ed una quantità catalitica di DMAP. La reazione viene monitorata alla TLC. Dopo 14 ore, si lava la fase organica con HCl 1N (2x20ml) ed acqua distillata (2x20ml), si anidrifica con Na_2SO_4 e si elimina il solvente sotto pressione. Si ottengono 2.06g (65.9%) di solido brunastro; punto di fusione 182-184°C.

I.R. cm^{-1} (nujol): 1656, 1685, 3257 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.44 (s 9H, CH_3 , Boc); 1.60-1.93 (m, 4H, $\text{H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}$, pip.); 2.36 (m, 1H, H_4 , pip.); 2.76 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 4.17 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 7.05-7.52 (m, 6H, arom. + NH scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 305 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ (MW 304.38): C, 67.08; H, 7.95; N, 9.20%; trovato: C, 67.25; H, 7.87; N, 9.14%.

Il composto **22a** è stato sintetizzato allo stesso modo utilizzando *Benzilammina* invece dell'*anilina*. Resa : 1.52 g (52%).

N-Benzil-1-(ter-butossicarbonil)piperidin-4-carbossammide 22a

I.R. cm^{-1} (nujol): 1634, 1681, 3251 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.38 (s, 9H, CH_3 , Boc); 1.45-1.77 (m, 4H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$, pip.); 2.21 (m, 1H, H_4 , pip.); 2.65 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 4.06 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 4.36 (s, 2H, Ar- CH_2 -N-CO); 5.90 (s.broad, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata); 7.08-7.30 (m, 5H, arom.). MS: m/z 318 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ (MW 318.41): C, 67.90; H, 8.23; N, 8.80%; trovato: C, 67.76; H, 8.45; N, 8.62%.

Il composto **22b** è stato sintetizzato allo stesso modo utilizzando *4-Clorobenzilammina* invece dell'anilina. Resa : 3.70 g (92%).

N-4-Clorobenzil-1-(ter-butossicarbonil)piperidin-4-carbossammide 22b

I.R. cm^{-1} (nujol): 1632, 1681, 3249 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.45 (s, 9H, CH_3 , Boc); 1.52-1.85 (m, 4H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$, pip.); 2.27 (m, 1H, H_4 , pip.); 2.72 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 4.13(m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 4.40 (s, 2H, Ar- CH_2 -N-CO); 6.04 (s.broad, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata); 7.15-7.33 (m, 4H, arom.). MS: m/z 353 [MH^+] 355 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_3$ (MW 352.86): C, 61.27; H, 7.14; N, 7.94%; trovato: C, 61.36; H, 6.99; N, 8.05%.

Il composto **22c** è stato sintetizzato allo stesso modo utilizzando *4-Metilbenzilammina* invece dell'anilina. Resa : 3.68 g (98%).

N-4-Metilbenzil-1-(ter-butossicarbonil)piperidin-4-carbossammide 22c

I.R. cm^{-1} (nujol): 1630, 1681, 3245 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.43 (s, 9H, CH_3 , Boc); 1.53-1.86 (m, 4H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$, pip.); 2.22 (m, 1H, H_4 , pip.); 2.34 (s, 3H, CH_3); 2.65 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 4.13 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 4.39 (s, 2H, Ar- CH_2 -N-CO); 5.73 (s.broad, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata); 7.15-7.27 (m, 4H, arom.). MS: m/z 332 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$ (MW 332.44): C, 68.65; H, 8.49; N, 8.43%; trovato: C, 68.76; H, 8.29; N, 8.61%.

Il composto **22d** è stato sintetizzato allo stesso modo utilizzando *4-Metossibenzilammina* invece dell'anilina. Resa : 2.80 g (71%).

N-4-Metossibenzil-1-(ter-butossicarbonil)piperidin-4-carbossammide 22d

I.R. cm^{-1} (nujol): 1638, 1680, 3253 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.45 (s, 9H, CH_3 , Boc); 1.52-1.85 (m, 4H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$, pip.); 2.24 (m, 1H, H_4 , pip.); 2.72 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 4.15 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 4.36 (s, 2H, Ar- CH_2 -N-CO); 5.82 (s.broad, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata); 6.84-7.20 (m, 4H, arom.). MS: m/z 318

[MH⁺]. Anal. calc. per C₁₉H₂₈N₂O₄ (MW 348.44): C, 65.49; H, 8.10; N, 8.04%; trovato: C, 65.36; H, 8.22; N, 8.12%.

N-Fenilpiperidin-4-carbossammide 23

Il composto **21** (1.00 g, 3.24 mmoli) viene deproteetto con 2ml di acido trifluoro acetico a temperatura ambiente per 24 ore. La soluzione viene concentrata a pressione ridotta, si recupera il residuo con acqua distillata e si basifica con una soluzione di NaOH al 10% (pH=10). Si estrae con AcOEt (3x25ml). La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ ed il solvente viene eliminato a pressione ridotta. Il solido ottenuto verrà utilizzato senza ulteriori purificazioni : 0.60 g (89%); punto di fusione 105-107°C.

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1655, 3258 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.57-1.96 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}, pip. + NH scompare in H₂O deuterata); 2.33 (m, 1H, H₄, pip.); 2.57 (m, 2H, H₂-H₆, pip.); 3.13 (m, 2H, H₂-H₆, pip.); 7.04-7.50 (m, 6H, arom. + NH scompare in H₂O deuterata). MS: m/z 205 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₂H₁₆N₂O (MW 204.27): C, 70.56; H, 8.31; N, 13.71%; trovato: C, 70.32; H, 8.01; N, 13.89%.

Il composto **24a** è stato sintetizzato allo stesso modo a partire da **22a** (1.2 g). Resa : 0.75 g (91%); punto di fusione 115-117°C.

N-Benzilpiperidin-4-carbossammide 24a

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1634, 3248 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.50-1.78 (m, 4H, H_{3,3'}-H_{5,5'}, pip.); 2.11-2.26 (m, 2H, H₄, pip. + NH scompare in H₂O deuterata); 2.52 (m, 2H, H₂-H₆, pip.); 3.05 (m, 2H, H₂-H₆, pip.); 4.32 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 6.13 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 7.10-7.34 (m, 5H, arom.). MS: m/z 218 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₃H₁₈N₂O (MW 218.29): C, 71.53; H, 8.31; N, 12.83%; trovato: C, 71.39; H, 8.45; N, 12.68%.

Il composto **24b** è stato sintetizzato allo stesso modo a partire da **22b** (3.70 g). Resa : 1.80 g (68%); punto di fusione 114-116°C.

N-(4-Clorobenzil)piperidin-4-carbossammide 24b

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1635, 3250 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.55-1.73 (m, 4H, H_{3,3'}-H_{5,5'}, pip.); 2.18-2.32 (m, 2H, H₄, pip. + NH scompare in H₂O deuterata); 2.63 (m, 2H, H₂-H₆, pip.); 3.15 (m, 2H, H₂-H₆, pip.); 4.40 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.86 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 7.17-7.32 (m, 4H, arom.). MS: m/z 253

[MH⁺] 255 [MH⁺+2]. Anal. calc. per C₁₃H₁₇ClN₂O (MW 252.74): C, 61.78; H, 6.78; N, 11.08%; trovato: C, 61.89; H, 6.85; N, 10.92%.

Il composto **24c** è stato sintetizzato allo stesso modo a partire da **22c** (3.68 g). Resa : 0.76 g (29%); punto di fusione 140-145°C.

N-Metilbenzilpiperidin-4-carbossammide 24c

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1635, 3246 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.53-1.87 (m, 4H, H_{3,3'}-H_{5,5'}, pip.); 2.16-2.30 (m, 2H, H₄, pip. + NH scompare in H₂O deuterata); 2.34 (s, 3H, CH₃); 2.61 (m, 2H, H₂-H₆, pip.); 3.14 (m, 2H, H_{2'}-H_{6'}, pip.); 4.39 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.69 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 7.15-7.26 (m, 4H, arom.). MS: m/z 233 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₄H₂₀N₂O (MW 232.32): C, 72.38; H, 8.68; N, 12.06%; trovato: C, 72.27; H, 8.76; N, 12.21%.

Il composto **24d** è stato sintetizzato allo stesso modo a partire da **22d** (3.70 g). Resa : 0.42 g (16%); punto di fusione: olio cromatograficamente puro.

N-Metossibenzilpiperidin-4-carbossammide 24d

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1632, 3250 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.57-1.89 (m, 4H, H_{3,3'}-H_{5,5'}, pip.); 2.13-2.31 (m, 2H, H₄, pip. + NH scompare in H₂O deuterata); 2.65 (m, 2H, H₂-H₆, pip.); 3.15 (m, 2H, H_{2'}-H_{6'}, pip.); 3,80 (s, 3H, OCH₃); 4.37 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.76 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 6.84-7.21 (m, 4H, arom.). MS: m/z 249 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₄H₂₀N₂O₂ (MW 248.32): C, 67.71; H, 8.21; N, 11.28%; trovato: C, 67.58; H, 8.30; N, 11.35%.

N-Fenil-1-benzilpiperidin-4-carbossammide 19a

Una soluzione di **23** (0.17 g, 0.84 mmoli), K₂CO₃ (0.14 g, 1.00 mmoli) benzilcloruro (0.11 g, 0.84 mmoli) in 50 ml di acetone viene agitata a refluxo per 5 ore. Dopo raffreddamento, il sale organico viene filtrato ed il solvente eliminato a pressione ridotta. Il residuo viene lavato prima con acqua distillata e successivamente con etere etilico per dare **19a** come un solido cromatograficamente puro : resa 0.18 g (66%); punto di fusione 138-140°C.

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1657, 3318 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.80-2.32 (m, 7H, H₂-H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₆-H₄, pip.); 3.02 (m, 2H, H_{2'}-H_{6'}, pip.); 3.57 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 7.06-7.55 (m, 11H, arom. + NH scompare in H₂O deuterata). MS: m/z 295 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₉H₂₂N₂O (MW 294.39): C, 77.52; H, 7.53; N, 9.52%; trovato: C, 77.61; H, 7.37; N, 9.64%.

I composti **19b** e **19c** sono stati sintetizzati allo stesso modo.

I composti **20a-c** sono stati sintetizzati allo stesso modo a partire da **24a**.

N-Fenil-1-(4-Clorobenzil)piperidin-4-carbossammide 19b

I.R. cm^{-1} (nujol): 1656, 3301 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.63-2.26 (m, 7H, $\text{H}_2\text{-H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}\text{-H}_6\text{-H}_4$, pip.); 2.93 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.47 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 7.06-7.53 (m, 10H, arom. + **NH** scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 329 [MH^+] 331 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 328.84): C, 69.40; H, 6.44; N, 8.52%; trovato: C, 69.61; H, 6.63; N, 8.35%.

N-Fenil-1-(4-Metilbenzil)piperidin-4-carboxamide 19c

I.R. cm^{-1} (nujol): 1654, 3292 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.62-2.29 (m, 7H, $\text{H}_2\text{-H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}\text{-H}_6\text{-H}_4$, pip.); 2.34 (s, 3H, CH_3); 2.97 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.48 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 7.10-7.53 (m, 10H, arom. + **NH** scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 309 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ (MW 308.42): C, 78.22; H, 8.13; N, 8.69%; trovato: C, 78.08; H, 8.25; N, 8.85%.

N,1-Dibenzilpiperidin-4-carbossammide 20a

I.R. cm^{-1} (nujol): 1634, 3248 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.65-2.13 (m, 7H, $\text{H}_2\text{-H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}\text{-H}_6\text{-H}_4$, pip.); 2.84 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.40 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 4.40 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-N-CO}$); 5.75 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata); 7.13-7.36 (m, 10H, arom.). MS: m/z 308 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ (MW 308.42): C, 77.89; H, 7.84; N, 9.08%; trovato: C, 77.68; H, 7.79; N, 8.82%.

N-Benzil-1-(4-clorobenzil)piperidin-4-carbossammide 20b

I.R. cm^{-1} (nujol): 1633, 3247 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.62-2.20 (m, 7H, $\text{H}_2\text{-H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}\text{-H}_6\text{-H}_4$, pip.); 2.87 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.43 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 4.37 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-N-CO}$); 5.78 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata); 7.14-7.32 (m, 9H, arom.). MS: m/z 342 [MH^+] 344 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 342.86): C, 70.06; H, 6.76; N, 8.17%; trovato: C, 70.18; H, 6.69; N, 8.24%.

N-Benzil-1-(4-metilbenzil)piperidin-4-carbossammide 20c

I.R. cm^{-1} (nujol): 1636, 3251 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.80-2.29 (m, 7H, $\text{H}_2\text{-H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}\text{-H}_6\text{-H}_4$, pip.); 2.41 (s, 3H, CH_3); 3.00 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.53 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$); 7.10-7.53 (m, 10H, arom. + **NH** scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 309 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ (MW 308.42): C, 78.22; H, 8.13; N, 8.69%; trovato: C, 78.08; H, 8.25; N, 8.85%.

Ar); 4.51 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.84 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 7.18-7.45 (m, 9H, arom.). MS: m/z 322 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₁H₂₆N₂O (MW 322.44): C, 78.22; H, 8.13; N, 8.69%; trovato: C, 78.08; H, 8.25; N, 8.85%.

I composti **20d-f** sono stati sintetizzati allo stesso modo a partire da **24b**.

N-4-Clorobenzil-1-benzilpiperidin-4-carbossammide 20d

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1636, 3250 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.75-2.18 (m, 7H, H₂-H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₆-H₄, pip.); 2.96 (m, 2H, H_{2'}-H_{6'}, pip.); 3.53 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 4.39 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.90 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 7.16-7.35 (m, 9H, arom.). MS: m/z 343 [MH⁺] 345 [MH⁺+2]. Anal. calc. per C₂₀H₂₃ClN₂O (MW 342.86): C, 70.06; H, 6.76; N, 8.17%; trovato: C, 69.90; H, 6.59; N, 8.35%.

N,1-bis(4-clorobenzil)piperidin-4-carbossamide 20e

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1635, 3246 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.68-2.18 (m, 7H, H₂-H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₆-H₄, pip.); 2.90 (m, 2H, H_{2'}-H_{6'}, pip.); 3.45 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 4.40 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.84 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 7.16-7.32 (m, 8H, arom.). MS: m/z 377 [MH⁺] 379 [MH⁺+2]. Anal. calc. per C₂₀H₂₂Cl₂N₂O (MW 377.31): C, 63.67; H, 5.88; N, 7.42%; trovato: C, 63.54; H, 6.00; N, 7.61%.

N-4-Clorobenzil-1-(4-metilbenzil)piperidin-4-carbossammide 20f

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1632, 3245 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.73-2.24 (m, 7H, H₂-H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₆-H₄, pip.); 2.33 (s, 3H, CH₃); 2.97 (m, 2H, H_{2'}-H_{6'}, pip.); 3.51 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 4.38 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.95 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 7.10-7.30 (m, 8H, arom.). MS: m/z 357 [MH⁺] 359 [MH⁺+2]. Anal. calc. per C₂₁H₂₅ClN₂O (MW 356.89): C, 70.67; H, 7.06; N, 7.85%; trovato: C, 70.52; H, 7.19; N, 7.76%.

I composti **20g-i** sono stati sintetizzati allo stesso modo a partire da **24c**.

N-4-Metilbenzil-1-benzilpiperidin-4-carbossammide 20g

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1635, 3246 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.68-2.14 (m, 7H, H₂-H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₆-H₄, pip.); 2.33 (s, 3H, CH₃); 2.93 (m, 2H, H_{2'}-H_{6'}, pip.); 3.49 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 4.38 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.68 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata);

7.14-7.30 (m, 9H, arom.). MS: m/z 323 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₁H₂₆N₂O (MW 322.44): C, 78.22; H, 8.13; N, 8.69%; trovato: C, 78.13; H, 8.24; N, 8.79%.

N-4-Metilbenzil-1-(4-clorobenzil)piperidin-4-carbossammide 20h

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1637, 3250 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.65-2.14 (m, 7H, H₂-H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₆-H₄, pip.); 2.33 (s, 3H, CH₃); 2.89 (m, 2H, H₂'-H₆', pip.); 3.44 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 4.38 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.69 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 7.14-7.26 (m, 8H, arom.). MS: m/z 357 [MH⁺] 359 [MH⁺+2]. Anal. calc. per C₂₁H₂₅ClN₂O (MW 356.89): C, 70.67; H, 7.06; N, 7.85%; trovato: C, 70.78; H, 7.01; N, 7.97%.

N,1-bis(4-metilbenzil)piperidin-4-carbossamide 20i

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1631, 3246 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.67-2.19 (m, 7H, H₂-H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₆-H₄, pip.); 2.33 (s, 6H, CH₃); 2.89 (m, 2H, H₂'-H₆', pip.); 3.45 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 4.39 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.69 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 7.10-7.28 (m, 8H, arom.). MS: m/z 337 [MH⁺] 359. Anal. calc. per C₂₂H₂₈N₂O (MW 336.47): C, 78.53; H, 8.39; N, 8.33%; trovato: C, 78.69; H, 8.46; N, 8.27%.

I composti **20j-1** sono stati sintetizzati allo stesso modo a partire da **24d**.

N-4-Metossibenzil-1-benzilpiperidin-4-carbossammide 20j

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1634, 3250 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.70-2.23 (m, 7H, H₂-H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₆-H₄, pip.); 2.97 (m, 2H, H₂'-H₆', pip.); 3.56 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 3.79 (s, 3H, OCH₃); 4.35 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.84 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 6.83-7.34 (m, 9H, arom.). MS: m/z 339 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₁H₂₆N₂O₂ (MW 338.44): C, 74.52; H, 7.74; N, 8.28%; trovato: C, 74.39; H, 7.92; N, 8.35%.

N-4-Metilbenzil-1-(4-clorobenzil)piperidin-4-carbossammide 20k

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1634, 3251 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.72-2.18 (m, 7H, H₂-H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₆-H₄, pip.); 2.89 (m, 2H, H₂'-H₆', pip.); 3.44 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 3.80 (s, 3H, OCH₃); 4.36 (s, 2H, Ar-CH₂-N-CO); 5.66 (largo spettro, 1H, NH, scompare in H₂O deuterata); 5.83-7.33 (m, 8H, arom.). MS: m/z 373 [MH⁺] 375 [MH⁺+2]. Anal. calc. per C₂₁H₂₅ClN₂O₂ (MW 372.89): C, 67.64; H, 6.76; N, 7.51%; trovato: C, 67.82; H, 6.60; N, 7.61%.

N-4-Metossibenzil-1-(4-metilbenzil)piperidin-4-carbossammide **201**

I.R. cm^{-1} (nujol): 1631, 3252 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.60-2.14 (m, 7H, H_2 - $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_6 - H_4 , pip.); 2.33 (s, 3H, CH_3); 2.95 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.47 (s, 2H, N- CH_2 -Ar); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 4.36 (s, 2H, Ar- CH_2 -N-CO); 5.69 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata); 6.83-7.27 (m, 8H, arom.). MS: m/z 353 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$ (MW 352.47): C, 74.97; H, 8.01; N, 7.95%; trovato: C, 75.11; H, 7.88; N, 8.12%.

Sintesi derivati fenilmetanonici (Schema 4, pag.65)

N-Benziliden-1-(piperidin-4-il)metanamina **29a**

Ad una soluzione di 4-(amminometil)piperidina (0.25 g, 2.19 mmoli) e benzaldeide (0.23 g, 2.19 mmoli) in 100 ml di CHCl_3 viene aggiunto Na_2SO_4 (0.33 g, 2.32 mmoli) sotto costante agitazione ed a temperatura ambiente. Dopo circa 24 ore la soluzione viene filtrata su cotone per eliminare il sale inorganico. Si porta la soluzione al rotavapor eliminando il solvente a pressione ridotta per ottenere **29a** come un solido cromatograficamente puro : resa 0.42 g (96%).

I.R. cm^{-1} (nujol): 1692, 3389 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.61-1.84 (m, 6H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip. + **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.62 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.09 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.48 (d, 2H, CH_2); 7.36-7.69 (m, 5H, arom.); 8.20 (s, 1H, N= CH -Ar). MS: m/z 203 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2$ (MW 202.30): C, 77.18; H, 8.97; N, 13.85%; trovato: C, 77.32; H, 9.05; N, 13.63%.

I composti **29b-f** sono stati sintetizzati seguendo la medesima procedura utilizzando l'opportuna aldeide di partenza.

N-(4-Clorobenziliden)-1-(piperidin-4-il)metanamina **29b**

I.R. cm^{-1} (nujol): 1690, 3393 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.60-1.89 (m, 6H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip. + **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.65 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.15 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.46 (d, 2H, CH_2); 7.30-7.70 (m, 4H, arom.); 8.22 (s, 1H, N= CH -Ar). MS: m/z 237 [MH^+] 239 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{ClN}_2$ (MW 236.74): C, 65.95; H, 7.24; N, 11.83%; trovato: C, 66.11; H, 7.16; N, 11.72%.

N-(4-Metilbenziliden)-1-(piperidin-4-il)metanamina **29c**

I.R. cm^{-1} (nujol): 1689, 3382 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.55-1.83 (m, 6H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip. + **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.32 (s, 3H, CH_3); 2.69 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.06 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.40 (d, 2H, CH_2); 7.22-7.69 (m, 4H, arom.); 8.19 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH-Ar}$). MS: m/z 217 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2$ (MW 216.32): C, 77.73; H, 9.32; N, 12.95%; trovato: C, 77.58; H, 9.22; N, 13.20%.

N-(piridin-2-ilmetilen)-1-(piperidin-4-il)metanamina 29d

I.R. cm^{-1} (nujol): 1691, 3393 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.35-1.93 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.28 (largo spettro, 1H, **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.73 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.12 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.56 (d, 2H, CH_2); 7.28-7.80 (m, 3H, arom.); 8.34 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH-Ar}$); 8.64 (m, 1H, arom.). MS: m/z 204 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3$ (MW 203.28): C, 70.90; H, 8.43; N, 20.67%; trovato: C, 71.04; H, 8.25; N, 20.71%.

N-(piridin-3-ilmetilen)-1-(piperidin-4-il)metanamina 29e

I.R. cm^{-1} (nujol): 1680, 3387 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.39-1.95 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.30 (largo spettro, 1H, **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.71 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.10 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.52 (d, 2H, CH_2); 7.36-7.92 (m, 3H, arom.); 8.30 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH-Ar}$); 8.86 (m, 1H, arom.). MS: m/z 204 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3$ (MW 203.28): C, 70.90; H, 8.43; N, 20.67%; trovato: C, 70.79; H, 8.48; N, 20.73%.

N-(piridin-4-ilmetilen)-1-(piperidin-4-il)metanamina 29f

I.R. cm^{-1} (nujol): 1685, 3392 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.34-1.86 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.25 (largo spettro, 1H, **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.75 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.15 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.61 (d, 2H, CH_2); 7.86 (m, 2H, arom.); 8.30 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH-Ar}$); 8.60 (m, 2H, arom.). MS: m/z 204 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3$ (MW 203.28): C, 70.90; H, 8.43; N, 20.67%; trovato: C, 71.03; H, 8.21; N, 20.76%.

(4-((Benzilidenammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 30a

Ad una soluzione di **29a** (0.38 g, 1.90 mmoli) e *trietilammina* (0.23 g, 2.28 mmoli) in 10 ml di THF viene aggiunta, a 0°C e tramite imbuto gocciolatore, una soluzione in 5 ml di THF di *benzoil cloruro* (0.27 g, 1.90 mmoli). Dopo circa 4 ore, si elimina il solvente a pressione ridotta e si riprende il residuo con CHCl_3 . La fase organica viene lavata con acqua distillata fino a neutralità. Una volta eliminato il solvente al rotavapor, si ottiene **30a** come un olio cromatograficamente puro: resa 0.51 g (87%).

I.R. cm^{-1} (nujol): 1642, 1715 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.61-1.90 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.95-3.23 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}$ - $\text{H}_{6,6'}$, pip.) ; 3.54 (d, 2H, CH_2); 7.36-8.01 (m, 10H, arom.); 8.21 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH-Ar}$). MS: m/z 307 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ (MW 306.40): C, 78.40; H, 7.24; N, 9.14%; trovato: C, 78.18; H, 7.42; N, 9.31%.

I composti **30b-f** sono stati preparati seguendo la stessa metodologia sintetica.

(4-((4-Chlorobenzilidenammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 30b

I.R. cm^{-1} (nujol): 1645, 1718 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.58-1.92 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.98-3.21 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}$ - $\text{H}_{6,6'}$, pip.) ; 3.58 (d, 2H, CH_2); 7.38-8.06 (m, 9H, arom.); 8.25 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH-Ar}$). MS: m/z 341 [MH^+] 343 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 340.85): C, 70.48; H, 6.21; N, 8.22%; trovato: C, 70.61; H, 6.07; N, 8.44%.

(4-((4-Metilbenzilidenammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 30c

I.R. cm^{-1} (nujol): 1641, 1716 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.50-1.97 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.32 (s, 3H, CH_3); 2.90-3.15 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}$ - $\text{H}_{6,6'}$, pip.) ; 3.42 (d, 2H, CH_2); 7.30-7.97 (m, 9H, arom.); 8.16 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH-Ar}$). MS: m/z 321 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ (MW 320.43): C, 78.71; H, 7.55; N, 8.74%; trovato: C, 78.90; H, 7.72; N, 8.51%.

Fenil(4-((piridin-2-ilmetilenammino)metil)piperidin-1-il)metanone 30d

I.R. cm^{-1} (nujol): 1651, 1720 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.53-2.00 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.82-3.12 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}$ - $\text{H}_{6,6'}$, pip.) ; 3.53 (d, 2H, CH_2); ; 7.28-7.91 (m, 8H, arom.); 8.32 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH-Ar}$); 8.65 (m, 1H, arom.). MS: m/z 308 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ (MW 307.39): C, 74.24; H, 6.89; N, 13.67%; trovato: C, 74.03; H, 7.01; N, 13.76%.

Fenil(4-((piridin-3-ilmetilenammino)metil)piperidin-1-il)metanone 30e

I.R. cm^{-1} (nujol): 1650, 1718 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.51-1.99 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.81-3.08 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}$ - $\text{H}_{6,6'}$, pip.) ; 3.52 (d, 2H, CH_2); ; 7.28-8.04 (m, 8H, arom.); 8.11 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH-Ar}$); 8.60 (m, 1H, arom.). MS: m/z 308 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ (MW 307.39): C, 74.24; H, 6.89; N, 13.67%; trovato: C, 74.16; H, 6.80; N, 13.85%.

Fenil(4-((piridin-4-ilmetilenammino)metil)piperidin-1-il)metanone 30f

I.R. cm^{-1} (nujol): 1653, 1722 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.53-2.00 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}\text{-H}_4$, pip.); 2.82-3.12 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}\text{-H}_{6,6'}$, pip.) ; 3.53 (d, 2H, CH_2); ; 7.31-8.05 (m, 7H, arom.); 8.17 (s, 1H, N=CH-Ar); 8.70 (m, 2H, arom.). MS: m/z 308 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ (MW 307.39): C, 74.24; H, 6.89; N, 13.67%; trovato: C, 74.37; H, 6.82; N, 13.81%.

(4-((Benzilammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27a

Ad una soluzione di **30a** (0.52 g, 1.73 mmoli) in 25 ml di MeOH viene aggiunto a porzioni NaBH_4 (0.13 g, 3.47 mmoli). Dopo aver lasciato in agitazione over night, si elimina il solvente a pressione ridotta ed il residuo viene ripreso con AcOEt. La fase organica viene lavata con acqua distillata fino a neutralità. Una volta eliminato il solvente al rotavapor, si ottiene **27a** come un olio cromatograficamente puro: resa 0.38 g (69%).

I.R. cm^{-1} (nujol): 1725, 3255 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.26-1.74 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}\text{-H}_4$, pip.); 1.99 (largo spettro, 1H, **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.50 (d, 2H, CH_2); 2.77-2.97 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}\text{-H}_{6,6'}$, pip.); 3.75 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$) 7.21-7.39 (m, 10H, arom.). MS: m/z 309 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ (MW 308.42): C, 78.40; H, 7.24; N, 9.14%; trovato: C, 78.18; H, 7.42; N, 9.31%.

I composti **27b-c** e **27j-l** sono stati sintetizzati con la stessa procedura a partire dai relativi intermedi.

(4-((4-Clorobenzilammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27b

I.R. cm^{-1} (nujol): 1723, 3258 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.28-1.72 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}\text{-H}_4$, pip.); 2.01 (largo spettro, 1H, **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.52 (d, 2H, CH_2); 2.80-2.99 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}\text{-H}_{6,6'}$, pip.); 3.77 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$) 7.25-7.41 (m, 9H, arom.). MS: m/z 343 [MH^+] 345 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 342.86): C, 70.06; H, 6.76; N, 8.17%; trovato: C, 69.83; H, 6.91; N, 8.30%.

(4-((4-Metilbenzilammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27c

I.R. cm^{-1} (nujol): 1722, 3250 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.26-1.69 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}\text{-H}_{5,5'}\text{-H}_4$, pip.); 2.05 (largo spettro, 1H, **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.33 (s, 3H, CH_3); 2.40 (d, 2H, CH_2); 2.79-3.01 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}\text{-H}_{6,6'}$, pip.); 3.43 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$) 7.14-

7.39 (m, 9H, arom.). MS: m/z 323 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₁H₂₆N₂O (MW 322.44): C, 78.22; H, 8.13; N, 8.69%; trovato: C, 78.46; H, 7.97; N, 8.45%.

(4-((Piridin-2-ilmetilammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27j

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1720, 3261 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.23-1.54 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 2.05 (largo spettro, 1H, NH scompare in H₂O deuterata); 2.59 (d, 2H, CH₂); 2.63-3.02 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.90 (s, 2H, N-CH₂-aril) 7.27-7.65 (m, 8H, arom.); 8.55 (m, 1H, arom.). MS: m/z 310 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₉H₂₃N₃O (MW 309.41): C, 73.76; H, 7.49; N, 13.58%; trovato: C, 73.63; H, 7.60; N, 13.41%.

(4-((Piridin-3-ilmetilammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27k

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1719, 3265 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.26-1.60 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 1.85 (largo spettro, 1H, NH scompare in H₂O deuterata); 2.58 (d, 2H, CH₂); 2.69-3.04 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.81 (s, 2H, N-CH₂-aril) 7.27-7.78 (m, 8H, arom.); 8.52 (m, 1H, arom.). MS: m/z 310 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₉H₂₃N₃O (MW 309.41): C, 73.76; H, 7.49; N, 13.58%; trovato: C, 73.85; H, 7.69; N, 13.32%.

(4-((Piridin-4-ilmetilammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27l

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1722, 3266 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.20-1.51 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 1.89 (largo spettro, 1H, NH scompare in H₂O deuterata); 2.64 (d, 2H, CH₂); 2.70-3.01 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.49 (s, 2H, N-CH₂-aril) 7.27-7.48 (m, 8H, arom.); 8.61 (m, 1H, arom.). MS: m/z 310 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₉H₂₃N₃O (MW 309.41): C, 73.76; H, 7.49; N, 13.58%; trovato: C, 73.59; H, 7.38; N, 13.77%.

(4-((Benzil(metil)ammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27d

Il composto **27a** (0.18 g, 0.61 mmoli) viene sciolto in 10 ml di EtOH ed addizionato di KOH (0.07 g, 1.22 mmoli) e CH₃I (0.09 g, 0.61 mmoli). La reazione viene scaldata a refluxo di solvente e sotto agitazione. Dopo circa 6 ore, si elimina il solvente al rotavapor ed il residuo viene recuperato con CHCl₃. La fase organica viene lavata tre volte con acqua distillata ed il solvente viene successivamente eliminato a pressione ridotta. Si ottiene il derivato **27d** come un olio cromatograficamente puro: resa 0.20 g (76%).

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1719 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.20-1.65 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 2.19 (d, 2H, CH₂); 2.23 (s, 3H, CH₃); 2.80-3.01 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.79 (s, 2H, N-CH₂-aril) 7.27-7.50 (m, 10H, arom.). MS: m/z 323 [MH⁺]. Anal. calc. per

C₂₁H₂₆N₂O (MW 322.44): C, 78.22; H, 8.13; N, 8.69%; trovato: C, 78.41; H, 7.97; N, 8.57%.

Lo stesso procedimento sintetico è stato effettuato per ottenere i composti **27e-f** e **27m-o** partendo dai relativi intermedi.

(4-(((4-Clorobenzil)(metil)ammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27e

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1722 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.26-1.80 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 2.17 (d, 2H, CH₂); 2.22 (s, 3H, CH₃); 2.71-3.02 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.75 (s, 2H, N-CH₂-aril) 7.26-7.49 (m, 9H, arom.). MS: m/z 357 [MH⁺] 359 [MH⁺+2]. Anal. calc. per C₂₁H₂₅ClN₂O (MW 356.89): C, 70.67; H, 7.06; N, 7.85%; trovato: C, 70.53; H, 7.16; N, 7.78%.

(4-(((4-Metilbenzil)(metil)ammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27f

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1720 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.27-1.68 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 2.18 (d, 2H, CH₂); 2.23 (s, 3H, CH₃); 2.33 (s, 3H, Ph-CH₃); 2.69-2.97 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.79 (s, 2H, N-CH₂-aril) 7.18-7.51 (m, 9H, arom.). MS: m/z 337 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₂H₂₈N₂O (MW 336.47): C, 78.53; H, 8.39; N, 8.33%; trovato: C, 78.47; H, 8.20; N, 8.19%.

(4-((metil(piridin-2-ilmetil)ammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27m

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1718 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.25-1.72 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 2.20 (d, 2H, CH₂); 2.25 (s, 3H, CH₃); 2.70-3.00 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.64 (s, 2H, N-CH₂-aril) 7.26-7.80 (m, 8H, arom.); 8.51 (m, 1H, arom.). MS: m/z 324 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₀H₂₅N₃O (MW 323.43): C, 74.27; H, 7.79; N, 12.99%; trovato: C, 74.51; H, 7.56; N, 13.12%.

(4-((metil(piridin-3-ilmetil)ammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27n

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1723 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.28-1.81 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 2.19 (d, 2H, CH₂); 2.23 (s, 3H, CH₃); 2.72-3.05 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.49 (s, 2H, N-CH₂-aril) 7.27-7.75 (m, 8H, arom.); 8.58 (m, 1H, arom.). MS: m/z 324 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₀H₂₅N₃O (MW 323.43): C, 74.27; H, 7.79; N, 12.99%; trovato: C, 74.16; H, 7.93; N, 12.87%.

(4-((metil(piridin-4-ilmetil)ammino)metil)piperidin-1-il)(fenil)metanone 27o

I.R. cm^{-1} (nujol): 1723 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.28-1.80 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.18 (d, 2H, CH_2); 2.24 (s, 3H, CH_3); 2.78-3.10 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}$ - $\text{H}_{6,6'}$, pip.); 3.48 (s, 2H, N- CH_2 -aril) 7.25-7.83 (m, 8H, arom.); 8.55 (m, 1H, arom.). MS: m/z 324 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$ (MW 323.43): C, 74.27; H, 7.79; N, 12.99%; trovato: C, 74.47; H, 7.68; N, 13.21%.

(4-((Dibenzilammino)metil) piperidin-1-il)(fenil)metanone 27g

Il composto **27a** (0.25 g, 0.85 mmoli) viene sciolto in 25 ml di acetone ed addizionato di K_2CO_3 (0.23 g, 1.70 mmoli) e *benzil cloruro* (0.13 g, 1.02 mmoli). La reazione viene scaldata a refluxo di solvente e sotto agitazione. Dopo circa 8 ore, la soluzione viene filtrata a caldo per eliminare il sale inorganico. Si elimina, quindi, il solvente al rotavapor ed il residuo viene recuperato con AcOEt. La fase organica viene lavata tre volte con acqua distillata ed il solvente viene successivamente eliminato a pressione ridotta. Si ottiene il derivato **27g** come un olio cromatograficamente puro: resa 0.19 g (56%).

I.R. cm^{-1} (nujol): 1716 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.18-1.76 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.29 (d, 2H, CH_2); 2.85-3.08 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}$ - $\text{H}_{6,6'}$, pip.); 3.80 (s, 4H, N- CH_2 -aril); 7.28-7.86 (m, 15H, arom.). MS: m/z 399 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ (MW 398.54): C, 81.37; H, 7.59; N, 7.03%; trovato: C, 81.46; H, 7.72; N, 6.85%.

I composti **27h-i** e **27p-r** sono stati ottenuti con la stessa procedura partendo dai relativi intermedi.

(4-((Benzil(4-clorobenzil)ammino)metil)(fenil)metanone 27h

I.R. cm^{-1} (nujol): 1721 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.26-1.81 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.53 (d, 2H, CH_2); 2.80-3.01 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}$ - $\text{H}_{6,6'}$, pip.); 3.81 (s, 4H, N- CH_2 -aril); 7.22-7.87 (m, 14H, arom.). MS: m/z 433 [MH^+] 435 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 432.98): C, 74.90; H, 6.75; N, 6.47%; trovato: C, 75.09; H, 6.90; N, 6.31%.

(4-((Benzil(4-metilbenzil)ammino)metil)(fenil)metanone 27i

I.R. cm^{-1} (nujol): 1722 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.30-1.75 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.34 (s, 3H, CH_3); 2.43 (d, 2H, CH_2); 2.89-3.12 (m, 4H, $\text{H}_{2,2'}$ - $\text{H}_{6,6'}$, pip.); 3.72 (s, 4H, N- CH_2 -aril); 7.30-7.81 (m, 14H, arom.). MS: m/z 413 [MH^+]. Anal. calc. per

C₂₇H₃₂N₂O (MW 412.57): C, 81.51; H, 7.82; N, 6.79%; trovato: C, 81.33; H, 8.02; N, 7.01%.

(4-((Benzil(piridin-2-ilmetil)amino)metil) piperidin-1-il)(fenil)metanone 27p

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1723 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.22-1.81 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 2.27 (d, 2H, CH₂); 2.78-3.02 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.63 (s, 2H, N-CH₂-fenil); 3.74 (s, 2H, N-CH₂-piridina); 7.28-7.78 (m, 13H, arom.); 8.55 (m, 1H, arom.). MS: m/z 400 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₆H₂₉N₃O (MW 399.53): C, 78.16; H, 7.32; N, 10.52%; trovato: C, 78.33; H, 7.54; N, 10.29%.

(4-((Benzil(piridin-3-ilmetil)amino)metil) piperidin-1-il)(fenil)metanone 27q

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1720 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.23-1.79 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 2.31 (d, 2H, CH₂); 2.76-3.00 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.56 (s, 2H, N-CH₂-fenil); 3.81 (s, 2H, N-CH₂-piridina); 7.27-7.83 (m, 13H, arom.); 8.56 (m, 1H, arom.). MS: m/z 400 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₆H₂₉N₃O (MW 399.53): C, 78.16; H, 7.32; N, 10.52%; trovato: C, 78.28; H, 7.24; N, 10.61%.

(4-((Benzil(piridin-4-ilmetil)amino)metil) piperidin-1-il)(fenil)metanone 27r

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1725 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 1.27-1.82 (m, 5H, H_{3,3'}-H_{5,5'}-H₄, pip.); 2.30 (d, 2H, CH₂); 2.75-3.07 (m, 4H, H_{2,2'}-H_{6,6'}, pip.); 3.58 (s, 2H, N-CH₂-fenil); 3.80 (s, 2H, N-CH₂-piridina); 7.25-7.91 (m, 13H, arom.); 8.58 (m, 1H, arom.). MS: m/z 400 [MH⁺]. Anal. calc. per C₂₆H₂₉N₃O (MW 399.53): C, 78.16; H, 7.32; N, 10.52%; trovato: C, 78.01; H, 7.49; N, 10.70%.

Sintesi derivati acetammidici (Schema 5, pag.69)

Le basi di Schiff generate nel primo step del processo sintetico sono le stesse descritte per i derivati fenilmetanonici e corrispondono agli intermedi **29a-c**.

***N*-Benziliden-1-(1-benzilpiperidin-4-il)metanamina 31a**

Ad una soluzione di **29a** (0.40 g, 2.01 mmoli) e K₂CO₃ (0.33 g, 2.41 mmoli) in 20 ml di acetone viene aggiunta una soluzione in 5 ml di acetone di *benzil cloruro* (0.25 g, 2.01 mmoli). Dopo circa 4 ore, si filtra a caldo e si elimina il solvente a pressione ridotta e riprendo il residuo con CHCl₃. Lavo la fase organica con acqua distillata fino a neutralità.

Una volta eliminato il solvente al rotavapor si ottiene **31a** come un olio cromatograficamente puro: resa 0.42 g (72%).

I.R. cm^{-1} (nujol): 1640. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.63-2.02 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.15-2.26 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.83-3.06 (m, 2H, H_2' - H_6' , pip.) 3.48 (d, 2H, CH_2); 3.60 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 7.22-7.74 (m, 10H, arom.); 8.23 (s, 1H, N= CH -Ar). MS: m/z 293 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2$ (MW 292.42): C, 82.15; H, 8.27; N, 9.58%; trovato: C, 82.30; H, 8.23; N, 9.47%.

I derivati **31b-f** sono stati ottenuti seguendo la stessa procedura ed utilizzando l'opportuna basi di Schiff **29a-c** fatta reagire con *benzil cloruro* o *4-clorobenzil cloruro*.

N-Benziliden-1-(1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metanamina 31b

I.R. cm^{-1} (nujol): 1640. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.58-1.99 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.16-2.28 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.81-3.02 (m, 2H, H_2' - H_6' , pip.) 3.46 (d, 2H, CH_2); 3.63 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 7.25-7.79 (m, 9H, arom.); 8.27 (s, 1H, N= CH -Ar). MS: m/z 327 [MH^+] 328 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClN}_2$ (MW 326.86): C, 73.49; H, 7.09; N, 8.57%; trovato: C, 73.22; H, 7.18; N, 8.69%.

N-(4-Clorobenziliden)-1-(1-benzilpiperidin-4-il)metanamina 31c

I.R. cm^{-1} (nujol): 1636. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.61-2.04 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.19-2.31 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.75-2.99 (m, 2H, H_2' - H_6' , pip.) 3.48 (d, 2H, CH_2); 3.65 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 7.24-7.82 (m, 9H, arom.); 8.21 (s, 1H, N= CH -Ar). MS: m/z 327 [MH^+] 328 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClN}_2$ (MW 326.86): C, 73.49; H, 7.09; N, 8.57%; trovato: C, 73.62; H, 7.24; N, 8.37%.

N-(4-Clorobenziliden)-1-(1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metanamina 31d

I.R. cm^{-1} (nujol): 1640. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.50-1.98 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.20-2.31 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.85-3.10 (m, 2H, H_2' - H_6' , pip.) 3.50 (d, 2H, CH_2); 3.66 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 7.30-7.77 (m, 8H, arom.); 8.34 (s, 1H, N= CH -Ar). MS: m/z 361 [MH^+] 363 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2$ (MW 361.31): C, 73.49; H, 7.09; N, 8.57%; trovato: C, 73.56; H, 6.88; N, 8.76%.

N-(4-Metilbenziliden)-1-(1-benzilpiperidin-4-il)metanamina 31e

I.R. cm^{-1} (nujol): 1638. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.55-1.97 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.08-2.21 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.33 (s, 3H, CH_3); 2.70-2.93 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.) 3.42 (d, 2H, CH_2); 3.57 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 7.21-7.79 (m, 9H, arom.); 8.23 (s, 1H, N= CH -Ar). MS: m/z 307 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2$ (MW 306.44): C, 82.31; H, 8.55; N, 9.14%; trovato: C, 82.16; H, 8.47; N, 9.37%.

N-(4-Metilbenziliden)-1-(1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metanamina 31f

I.R. cm^{-1} (nujol): 1641. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.56-2.03 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 2.05-2.20 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.32 (s, 3H, CH_3); 2.68-2.94 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.) 3.44 (d, 2H, CH_2); 3.61 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 7.28-7.75 (m, 8H, arom.); 8.27 (s, 1H, N= CH -Ar). MS: m/z 341 [MH^+] 343 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{ClN}_2$ (MW 340.89): C, 73.99; H, 7.39; N, 8.22%; trovato: C, 74.17; H, 7.51; N, 8.01%.

N-Benzil-1-(1-benzilpiperidin-4-il)metanamina 32a

Ad una soluzione di **31a** (0.50 g, 1.71 mmoli) in 25 ml di MeOH viene aggiunto a porzioni NaBH_4 (0.12 g, 3.42 mmoli). Dopo aver lasciato in agitazione over night, si elimina il solvente a pressione ridotta ed il residuo viene ripreso con AcOEt. La fase organica viene lavata con acqua distillata fino a neutralità. Una volta eliminato il solvente al rotavapor, si ottiene **32a** come un olio cromatograficamente puro: resa 0.35 g (69%).

I.R. cm^{-1} (nujol): 3257. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.33-1.63 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.88-2.05 (m, 3H, H_2 - H_6 , pip. + NH scompare in H_2O deuterata); 2.53 (d, 2H, CH_2); 2.80-2.93 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.49 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 3.77 (s, 2H, NH- CH_2 -fenil); 7.23-7.50 (m, 10H, arom.). MS: m/z 295 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2$ (MW 294.43): C, 81.59; H, 8.90; N, 9.51%; trovato: C, 81.43; H, 9.01; N, 9.56%.

I composti **32b-f** sono stati ottenuti per riduzione con NaBH_4 dai relativi intermedi.

N-Benzil-1-(1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metanamina 32b

I.R. cm^{-1} (nujol): 3261. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.38-1.71 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.89-2.11 (m, 3H, H_2 - H_6 , pip. + NH scompare in H_2O deuterata); 2.51 (d, 2H, CH_2); 2.78-2.94 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.50 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 3.79 (s, 2H, NH- CH_2 -fenil); 7.23-7.62 (m, 9H, arom.). MS: m/z 329 [MH^+] 331 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClN}_2$ (MW 328.88): C, 73.04; H, 7.66; N, 8.52%; trovato: C, 72.89; H, 7.90; N, 8.82%.

N-(4-Clorobenzil)-1-(1-benzilpiperidin-4-il)metanammina **32c**

I.R. cm^{-1} (nujol): 3261. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.39-1.70 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.90-2.09 (m, 3H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip. + **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.52 (d, 2H, CH_2); 2.81-2.93 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.51 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-fenil}$); 3.80 (s, 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-fenil}$); 7.25-7.61 (m, 9H, arom.). MS: m/z 329 [MH^+] 331 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClN}_2$ (MW 328.88): C, 73.04; H, 7.66; N, 8.52%; trovato: C, 73.11; H, 7.79; N, 8.44%.

N-(4-Clorobenzil)-1-(1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metanammina **32d**

I.R. cm^{-1} (nujol): 3261. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.37-1.72 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.91-2.11 (m, 3H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip. + **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.52 (d, 2H, CH_2); 2.82-2.97 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.52 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-fenil}$); 3.77 (s, 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-fenil}$); 7.25-7.65 (m, 8H, arom.). MS: m/z 363 [MH^+] 363 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_2$ (MW 363.32): C, 73.04; H, 7.66; N, 8.52%; trovato: C, 73.11; H, 7.79; N, 8.44%.

N-(4-Metilbenzil)-1-(1-benzilpiperidin-4-il)metanammina **32e**

I.R. cm^{-1} (nujol): 3259. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.39-1.75 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.88-2.10 (m, 3H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip. + **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.32 (s, 3H, CH_3); 2.50 (d, 2H, CH_2); 2.80-2.99 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.50 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-fenil}$); 3.71 (s, 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-fenil}$); 7.22-7.63 (m, 9H, arom.). MS: m/z 309 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2$ (MW 308.23): C, 81.77; H, 9.15; N, 9.08%; trovato: C, 81.68; H, 9.02; N, 9.30%.

N-(4-Metilbenzil)-1-(1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metanammina **32f**

I.R. cm^{-1} (nujol): 3258. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.35-1.69 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.85-2.07 (m, 3H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip. + **NH** scompare in H_2O deuterata); 2.33 (s, 3H, CH_3); 2.47 (d, 2H, CH_2); 2.77-3.01 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.48 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-fenil}$); 3.69 (s, 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-fenil}$); 7.26-7.68 (m, 8H, arom.). MS: m/z 343 [MH^+] 345 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClN}_2$ (MW 342.91): C, 73.56; H, 7.94; N, 8.17%; trovato: C, 73.44; H, 8.12; N, 8.31%.

N-Benzil-*N*-((1-benzilpiperidin-4-il)metil)acetammide **28a**

Ad una soluzione di **32a** (0.55 g, 1.90 mmoli) e *triethylammina* (0.23 g, 2.28 mmoli) in 10 ml di THF viene aggiunta, a 0°C e tramite imbuto gocciolatore, una soluzione in 5 ml di THF di *acetil cloruro* (0.15 g, 1.90 mmoli). Dopo circa 4 ore, si elimina il solvente a pressione ridotta e si riprende il residuo con CHCl_3 . La fase organica viene lavata con

acqua distillata fino a neutralità. Una volta eliminato il solvente al rotavapor, si ottiene **28a** come un olio cromatograficamente puro: resa 0.49 g (76%).

I.R. cm^{-1} (nujol): 1740 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.28-1.71 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.85-2.07 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.29 (s, 3H, -CO- CH_3); 2.77-3.01 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.27 (d, 2H, CH_2); 3.49 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 4.51 (s, 2H, CO-N- CH_2 -fenil); 7.12-7.40 (m, 10H, arom.). MS: m/z 337 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$ (MW 336.47): C, 78.53; H, 8.39; N, 8.33%; trovato: C, 78.37; H, 8.20; N, 8.54%.

I restanti composti **28b-f** sono stati sintetizzati con la medesima procedura a partire dal relativo intermedio **32a-f** ed utilizzando *acetil cloruro* o *benzoil cloruro*.

N-Benzil-N-((1-benzilpiperidin-4-il)metil)benzammide 28b

I.R. cm^{-1} (nujol): 1721 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.29-1.75 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.90-2.03 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.97-3.20 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.46 (d, 2H, CH_2); 4.50 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 4.78 (s, 2H, CO-N- CH_2 -fenil); 7.11-8.02 (m, 15H, arom.). MS: m/z 399 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ (MW 398.54): C, 81.37; H, 7.59; N, 7.03%; trovato: C, 81.50; H, 7.33; N, 7.21%.

N-Benzil-N-((1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metil)acetammide 28c

I.R. cm^{-1} (nujol): 1741 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.30-1.77 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.84-2.08 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.30 (s, 3H, -CO- CH_3); 2.75-3.00 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.26 (d, 2H, CH_2); 3.54 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 4.53 (s, 2H, CO-N- CH_2 -fenil); 7.12-7.52 (m, 9H, arom.). MS: m/z 371 [MH^+] 373 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 370.92): C, 71.24; H, 7.34; N, 7.55%; trovato: C, 71.39; H, 7.15; N, 7.68%.

N-Benzil-N-((1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metil)benzammide 28d

I.R. cm^{-1} (nujol): 1723 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 1.26-1.78 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.91-2.02 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 2.97-3.15 (m, 2H, H_2 - H_6 , pip.); 3.48 (d, 2H, CH_2); 4.46 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 4.81 (s, 2H, CO-N- CH_2 -fenil); 7.19-8.03 (m, 14H, arom.). MS: m/z 433 [MH^+] 435 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 432.98): C, 74.90; H, 6.75; N, 6.47%; trovato: C, 74.74; H, 6.59; N, 6.65%.

N-4-Clorobenzil-N-((1-benzilpiperidin-4-il)metil)acetammide 28e

I.R. cm^{-1} (nujol): 17420 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.31-1.76 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.83-2.06 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 2.31 (s, 3H, $-\text{CO-CH}_3$); 2.73-2.99 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.22 (d, 2H, CH_2); 3.50 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-fenil}$); 4.59 (s, 2H, $\text{CO-N-CH}_2\text{-fenil}$); 7.19-7.55 (m, 9H, arom.). MS: m/z 371 [MH^+] 373 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 370.92): C, 71.24; H, 7.34; N, 7.55%; trovato: C, 71.43; H, 7.51; N, 7.33%.

N-4-Clorobenzil-N-((1-benzil)piperidin-4-il)metil)benzammide 28f

I.R. cm^{-1} (nujol): 1719 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.25-1.79 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.93-2.04 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 2.93-3.12 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.49 (d, 2H, CH_2); 4.43 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-fenil}$); 4.77 (s, 2H, $\text{CO-N-CH}_2\text{-fenil}$); 7.20-8.05 (m, 14H, arom.). MS: m/z 433 [MH^+] 435 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 432.98): C, 74.90; H, 6.75; N, 6.47%; trovato: C, 74.80; H, 6.96; N, 6.53%.

N-4-Clorobenzil-N-((1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metil)acetammide 28g

I.R. cm^{-1} (nujol): 1738 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.34-1.75 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.83-2.06 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 2.29 (s, 3H, $-\text{CO-CH}_3$); 2.75-3.03 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.24 (d, 2H, CH_2); 3.51 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-fenil}$); 4.58 (s, 2H, $\text{CO-N-CH}_2\text{-fenil}$); 7.27-7.78 (m, 8H, arom.). MS: m/z 405 [MH^+] 407 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$ (MW 405.36): C, 65.19; H, 6.46; N, 6.91%; trovato: C, 64.97; H, 6.62; N, 7.12%.

N-4-Clorobenzil-N-((1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metil)benzammide 28h

I.R. cm^{-1} (nujol): 1721 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.29-1.80 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.94-2.10 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 2.90-3.15 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.52 (d, 2H, CH_2); 4.39 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-fenil}$); 4.65 (s, 2H, $\text{CO-N-CH}_2\text{-fenil}$); 7.23-8.02 (m, 13H, arom.). MS: m/z 467 [MH^+] 469 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$ (MW 467.43): C, 69.38; H, 6.04; N, 5.99%; trovato: C, 69.11; H, 6.27; N, 6.17%.

N-4-Metilbenzil-N-((1-benzil)piperidin-4-il)metil)acetammide 28i

I.R. cm^{-1} (nujol): 1736 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.31-1.77 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.82-2.01 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 2.32 (s, 3H, $-\text{CO-CH}_3$); 2.33 (s, 3H, CH_3); 2.75-3.02 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 3.21 (d, 2H, CH_2); 3.46 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-fenil}$); 4.46 (s, 2H, $\text{CO-N-CH}_2\text{-fenil}$); 7.12-7.51 (m, 9H, arom.). MS: m/z 351 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ (MW 350.50): C, 78.82; H, 8.63; N, 7.99%; trovato: C, 78.67; H, 8.71; N, 8.13%.

N-4-Metilbenzil-N-((1-benzilpiperidin-4-il)metil)benzammide 28j

I.R. cm^{-1} (nujol): 1718 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.26-1.80 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.92-2.05 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 2.33 (s, 3H, CH_3); 2.91-3.12 (m, 2H, $\text{H}_2'\text{-H}_6'$, pip.); 3.42 (d, 2H, CH_2); 4.49 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 4.72 (s, 2H, CO-N- CH_2 -fenil); 7.18-8.01 (m, 14H, arom.). MS: m/z 413 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}$ (MW 412.57): C, 81.51; H, 7.82; N, 6.79%; trovato: C, 81.32; H, 7.73; N, 6.98%.

N-4-Metilbenzil-N-((1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metil)acetammide 28k

I.R. cm^{-1} (nujol): 1741 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.36-1.81 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.86-2.03 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 2.33 (s, 6H, CH_3); 2.71-3.04 (m, 2H, $\text{H}_2'\text{-H}_6'$, pip.); 3.22 (d, 2H, CH_2); 3.49 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 4.51 (s, 2H, CO-N- CH_2 -fenil); 7.25-7.76 (m, 8H, arom.). MS: m/z 385 [MH^+] 387 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 384.94): C, 71.76; H, 7.69; N, 7.28%; trovato: C, 71.93; H, 7.75; N, 7.39%.

N-4-Metilbenzil-N-((1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metil)benzammide 28l

I.R. cm^{-1} (nujol): 1722 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 1.31-1.78 (m, 5H, $\text{H}_{3,3'}$ - $\text{H}_{5,5'}$ - H_4 , pip.); 1.91-2.15 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-H}_6$, pip.); 2.34 (s, 3H, CH_3); 2.93-3.18 (m, 2H, $\text{H}_2'\text{-H}_6'$, pip.); 3.48 (d, 2H, CH_2); 4.36 (s, 2H, N- CH_2 -fenil); 4.71 (s, 2H, CO-N- CH_2 -fenil); 7.26-8.06 (m, 13H, arom.). MS: m/z 447 [MH^+] 449 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}$ (MW 447.01): C, 75.23; H, 6.99; N, 6.27%; trovato: C, 75.42; H, 7.14; N, 6.03%.

Sintesi derivati (indol-3-il)etanonici (Schema 6, pag.74)

2-Bromo-1-(1H-indol-3-il)etanone 35

Ad una soluzione di *1-(1H-indol-3-il)etanone 34* (1.20 g, 7.54 mmoli) in CHCl_3 , sotto costante agitazione, viene aggiunta una soluzione di CuBr_2 (2.02 g, 9.04 mmoli) in 10 ml di AcOEt. La miscela viene riscaldata a ricadere per 24 ore, alla fine delle quali la soluzione viene raffreddata fino a temperatura ambiente. La soluzione viene filtrata sotto vuoto ed il solvente viene eliminato a pressione ridotta. Il residuo viene ripreso con AcOEt e viene lavato con acqua distillata. La fase organica viene raccolta e portata al rotavapor per eliminare il solvente. Si ottiene **35** come una polvere brunastra cromatograficamente pura: resa 0.67 g (37%); p.f. ($^\circ\text{C}$): 205-207.

I.R. cm^{-1} (nujol): 1751 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (Acetone-TMS) ppm (δ): 4.41 (s, 2H, CO- CH_2 -Br); 7.10-7.43 (m, 3H, indolo); 8.21 (m, 1H, indolo); 8.45 (s, 1H, H_2 , indolo) 10.59 (largo

spettro, 1H, **NH**, scompare in H₂O deuterata). MS: m/z 238 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₀H₈BrNO (MW 238.08): C, 50.45; H, 3.39; N, 5.88%; trovato: C, 50.32; H, 3.54; N, 6.01%.

2-(Benzil(metil)ammino)-1-(1H-indol-3-il)etanone 33a

Il derivato **35** (0.40 g, 1.68 mmoli) viene sciolto in CH₃CN ed addizionato di *N*-benzilmetilammina (0.17 g, 1.40 mmoli). Viene aggiunta una soluzione in CH₃CN di K₂CO₃ (1.26 g, 9.10 mmoli) con una quantità catalitica di KI. La miscela viene scaldata a refluxo di solvente e viene mantenuta sotto agitazione. Dopo 6 ore si elimina il solvente a pressione ridotta e si riprende il residuo con CHCl₃. La fase organica viene lavata con acqua distillata sino a neutralità e, successivamente, portata al rotavapor per eliminare il solvente. Si ottiene un olio grezzo che viene purificato tramite colonna cromatografica per dare **33a** come una polvere gialla: resa 0.15 g (32%); p.f. (°C): 164-166.

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1760 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 2.23 (s, 3H, CH₃); 3.66 (s, 2H, CO-CH₂-N); 3.68 (s, 2H, N-CH₂-aril); 7.28-8.43 (m, 10H, arom.); 9.19 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H₂O deuterata). MS: m/z 279 [MH⁺]. Anal. calc. per C₁₈H₁₈N₂O (MW 278.35): C, 77.67; H, 6.52; N, 10.06%; trovato: C, 77.81; H, 6.37; N, 10.16%.

I derivati **33b-1** sono stati ottenuti attraverso lo stesso processo sintetico utilizzando l'opportuna *N*-benzilmetilammina variamente sostituita.

2-((2-Clorobenzil)(metil)ammino)-1-(1H-indol-3-il)etanone 33b

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1759 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 2.22 (s, 3H, CH₃); 3.61 (s, 2H, CO-CH₂-N); 3.70 (s, 2H, N-CH₂-aril); 7.26-8.51 (m, 9H, arom.); 9.62 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H₂O deuterata). MS: m/z 313 [MH⁺] 315[MH⁺+2]. Anal. calc. per C₁₈H₁₇ClN₂O (MW 312.79): C, 69.12; H, 5.48; N, 8.96%; trovato: C, 68.96; H, 5.63; N, 9.08%.

2-((4-Clorobenzil)(metil)ammino)-1-(1H-indol-3-il)etanone 33c

I.R. cm⁻¹ (nujol): 1761 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-TMS) ppm (δ): 2.24 (s, 3H, CH₃); 3.62 (s, 2H, CO-CH₂-N); 3.68 (s, 2H, N-CH₂-aril); 7.28-8.52 (m, 9H, arom.); 9.54 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H₂O deuterata). MS: m/z 313 [MH⁺] 315[MH⁺+2]. Anal. calc. per C₁₈H₁₇ClN₂O (MW 312.79): C, 69.12; H, 5.48; N, 8.96%; trovato: C, 69.24; H, 5.65; N, 8.77%.

2-((2,4-Diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(1H-indol-3-il)etanone 33d

I.R. cm^{-1} (nujol): 1758 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 2.23 (s, 3H, CH_3); 3.60 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$); 3.70 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$); 7.22-8.48 (m, 8H, arom.); 9.72 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 347 [MH^+] 349 [MH^++2]. Anal. calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$ (MW 347.24): C, 62.26; H, 4.64; N, 8.07%; trovato: C, 62.04; H, 4.87; N, 8.22%.

1-(1H-Indol-3-il)-2-(metil(2-metilbenzil)ammino)etanone 33e

I.R. cm^{-1} (nujol): 1763 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 2.21 (s, 3H, CH_3); 2.33 (s, 3H, CH_3); 3.65 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$); 3.69 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$); 7.22-8.41 (m, 9H, arom.); 9.35 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 293 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ (MW 292.37): C, 78.05; H, 6.89; N, 9.58%; trovato: C, 78.29; H, 6.71; N, 9.64%.

1-(1H-Indol-3-il)-2-(metil(4-metilbenzil)ammino)etanone 33f

I.R. cm^{-1} (nujol): 1761 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 2.20 (s, 3H, CH_3); 2.34 (s, 3H, CH_3); 3.64 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$); 3.71 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$); 7.21-8.43 (m, 9H, arom.); 9.38 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 293 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ (MW 292.37): C, 78.05; H, 6.89; N, 9.58%; trovato: C, 78.15; H, 7.00; N, 9.43%.

1-(1H-Indol-3-il)-2-(metil(2,4-dimetilbenzil)ammino)etanone 33g

I.R. cm^{-1} (nujol): 1761 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 2.22 (s, 3H, CH_3); 2.33 (s, 6H, CH_3); 3.61 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$); 3.66 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$); 7.27-8.51 (m, 8H, arom.); 9.43 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 307 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ (MW 306.40): C, 78.40; H, 7.24; N, 9.14%; trovato: C, 78.55; H, 7.08; N, 8.97%.

1-(1H-Indol-3-il)-2-(metil(2-metossibenzil)ammino)etanone 33h

I.R. cm^{-1} (nujol): 1757 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 2.24 (s, 3H, CH_3); 3.61 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$); 3.70 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$); 3.81 (s, 3H, OCH_3); 7.30-8.46 (m, 9H, arom.); 9.78 (largo spettro, 1H, **NH**, scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 309 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ (MW 308.37): C, 74.00; H, 6.54; N, 9.08%; trovato: C, 73.82; H, 6.78; N, 9.31%.

1-(1H-Indol-3-il)-2-(metil(4-metossibenzil)ammino)etanone 33i

I.R. cm^{-1} (nujol): 1758 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 2.23 (s, 3H, CH_3); 3.64 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$); 3.71 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 7.28-8.47 (m, 9H, arom.); 9.80 (largo spettro, 1H, NH , scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 309 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ (MW 308.37): C, 74.00; H, 6.54; N, 9.08%; trovato: C, 73.87; H, 6.43; N, 9.24%.

1-(1H-Indol-3-il)-2-(metil(2,4-dimetossibenzil)ammino)etanone 33j

I.R. cm^{-1} (nujol): 1757 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 2.21 (s, 3H, CH_3); 3.65 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$); 3.70 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$); 3.82 (s, 6H, OCH_3); 7.32-8.41 (m, 9H, arom.); 9.75 (largo spettro, 1H, NH , scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 339 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ (MW 338.40): C, 70.99; H, 6.55; N, 8.28%; trovato: C, 71.11; H, 6.63; N, 6.09%.

2-((Bifenil-4-ilmetil)(metil)ammino)-1-(1H-indol-3-il)etanone 33k

I.R. cm^{-1} (nujol): 1762 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 2.25 (s, 3H, CH_3); 3.59 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$); 3.65 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$); 7.28-8.41 (m, 14H, arom.); 9.79 (largo spettro, 1H, NH , scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 355 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ (MW 354.44): C, 81.33; H, 6.26; N, 7.90%; trovato: C, 81.46; H, 6.50; N, 7.78%.

1-(1H-Indol-3-il)-2-(metil(naftalen-2-ilmetil)ammino)etanone 33l

I.R. cm^{-1} (nujol): 1763 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) ppm (δ): 2.24 (s, 3H, CH_3); 3.61 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$); 3.71 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-aril}$); 7.50-8.43 (m, 12H, arom.); 9.83 (largo spettro, 1H, NH , scompare in H_2O deuterata). MS: m/z 329 [MH^+]. Anal. calc. per $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ (MW 328.41): C, 80.46; H, 6.14; N, 8.53%; trovato: C, 80.61; H, 5.97; N, 8.65%.

Farmacologia

Radio Ligand Binding Assays

Il saggio di binding viene effettuato su cellule di fegato di ratto in accordo con il metodo di Hellewell ^[63] con delle leggere modifiche descritte in un nostro precedente lavoro ^[59]. Per i recettori σ_1 , 250 μg di omogenato di fegato di ratto vengono incubati per 120 min a 37°C con 1 nM [^3H]-(+)-pentazocina (PerkinElmer, attività specifica 34.9 Ci/mmoli) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mL di volume finale. Il legame non specifico viene definito in

presenza di 10 μM di aloperidolo. Raggiunto l'equilibrio, si filtra sotto vuoto attraverso dei filtri GF/B a fibra di vetro pretrattati con 0.5% di polietilenimina, seguito da un lavaggio rapido con 2 mL di buffer freddo. Al filtro si aggiungono 3 mL di liquido di scintillazione e la radioattività determinata tramite uno scintillatore.

Per il recettori σ_2 , 150 μg di omogenato di fegato di ratto vengono incubati per 120 min a t.a. con 3 nM [^3H]-DTG (PerkinElmer, attività specifica 58.1 Ci/mmol) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mL di volume finale. (+)-Pentazocina (100 nM) e aloperidolo (10 μM) sono aggiunti, rispettivamente, come agente σ_1 mascherante e per definire il legame aspecifico.

Le curve di competizione sono state fatte usando almeno 11 differenti concentrazioni di ligando. Come controllo interno, sono state incluse tre concentrazioni decrescenti di (+)-pentazocina (recettori σ_1) o DTG (recettori σ_2) non marcate. I composti sono stati preparati da una soluzione madre in 100% di DMSO ad una concentrazione di 10 mM. La concentrazione finale di DMSO è mantenuta al 0.1%.

I valori di IC_{50} sono stati calcolati tramite un algoritmo del software "SigmaPlot" e rappresentano la media \pm la deviazione standard di 2-4 esperimenti diversi riprodotti in duplicato. Il corrispondente valore di K_i è stato calcolato tramite l'equazione di Cheng-Prusoff:

$$K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [X]/K_d)$$

usando come K_d il valore ottenuto sperimentalmente su omogenato di fegato di ratto e precedentemente riportato ^[59].

Molecular modeling

Catalyst Software Package

I modelli di struttura delle molecole del training e del test set sono stati costruiti usando il modulo "Catalyst 2D-3D sketcher" ^[56]. Ogni struttura è stata sottoposta ad un protocollo di minimizzazione usando il force field CHARMM fino a soddisfare un gradiente di 0.05 kcal/mole. Le strutture minimizzate sono state usate come punto di partenza per la successiva generazione dei modelli conformazionali. La ricerca conformazionale è stata condotta con l'algoritmo di Poling ^[64-66] implementato nel software Catalysy 4.9, con un cut off energetico di 20 kcal/mole e con un massimo di 250 modelli conformazionali raccolti per ciascuna molecola.

Sulla base delle conformazioni di ciascun composto, il modulo HypoGen di Catalyst 4.9 è stato utilizzato per la generazione del modello farmacoforico. Durante la generazione delle ipotesi, il software tenta di minimizzare una funzione di costo di due termini principali: il primo impone una penalizzazione alle deviazioni tra l'affinità stimata ed il corrispondente valore sperimentale, mentre il secondo termine penalizza la complessità dell'ipotesi.

Il parametro "incertezza", invece, è il valore che il software sfrutta al fine di tener conto dell'intrinseco errore sperimentale nella valutazione dell'affinità ed influenza il primo step della generazione del modello, la così detta fase costruttiva. Nel nostro caso è stato scelto un valore di 1.1.

Dopo un'analisi dei gruppi funzionali che caratterizzano tutti i composti del training set, sono state scartate alcune delle features che il software mette a disposizione per descrivere il modello. Quindi le features scelte sono state le seguenti: idrofobico aromatico (HYAr) e alifatico (HYAl), idrofobico (HY), accettore di legame idrogeno (HBA), positivo ionizzabile (PI) e anello aromatico (RAr).

Una volta scelta l'ipotesi migliore, 3 procedure di validazioni sono state effettuate su di essa: predizione di una serie di composti esterni al training set, detto test set; il metodo CatScramble e la procedura leave-one-out.

Il primo test è stato eseguito mappando ciascun composto del test set sull'ipotesi di modello scelta e confrontando il valore di affinità stimato con quello sperimentale. Si ottiene un coefficiente di correlazione che identifica la qualità predittiva del modello farmacoforico.

La procedura CatScramble, invece, si basa sul test di randomizzazione di Fischer ^[67]. Questo viene fatto mescolando in maniera casuale le strutture dei composti del training set e le loro affinità, generando ulteriori ipotesi farmacoforiche con gli stessi parametri utilizzati per la creazione del modello originale. La rilevanza statistica è calcolata in accordo con la seguente formula:

$$\text{significance} = 100 \times [1 - (1 + x/y)]$$

dove x è il numero di ipotesi aventi un costo minore dell'originale e y è il numero totale dell'ipotesi generate (originale + random).

Nel nostro caso è stato eseguito lanciando altre 49 ipotesi con HypoGen ottenendo, quindi, un livello di confidenza pari al 98%.

Infine, il leave-one-out test è stato eseguito creando altri 31 training set di 30 molecole, escludendo sequenzialmente un composto dal training set originale. Quindi, sono stati

lanciati altri 31 moduli HypoGen sfruttando le stesse condizioni di partenza ed andando ad osservare i nuovi coefficienti di correlazione ottenuti.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Martin W.R., Eades C.G., Thompson J.A., Huppler R.E., Gilbert P.E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1976, **197**, 517-532.
- [2] Walker J.M., Bowen W.D., F.O., Matsumoto R.R., De Costa B., Rise K.C., *Pharmacol Rev.* 1990, **42**, 355-402.
- [3] Debonnel G., De Monatigny C., *Life Sci.* 1996, **58**, 72-734.
- [4] Lin Z., Kabada P.K., *Med.Res.Rev.* 1997, **17**, 537-572.
- [5] Booth R.C., Owens C.E., Brown R.L., Wyrick S.D., *Brain Research* 1999, **837**, 95-105.
- [6] McLean S., Weber E., *Neuroscience* 1988, **25**, 259-269.
- [7] Matsumoto R.R., Hemstreet M.K., Lai N.L., Thurkauf A., De Costa B.R., Rice K.C., Helleweel S. B., Bowen W.D., Walker J.M., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1990, **36**, 151-155.
- [8] Wolfe Jr.S.A., Culp S.G., De Souza E.B., *Endocrinology* 1989, **124**, 1160-1172.
- [9] Su T.P., London E.D., Jaffe J.H., *Science* 1988, **240**, 219-221.
- [10] Roman F.J., Pascaud X., Chomette G., Bueno L., Junien J.L., *Gastroenterology* 1989, **97**, 76-82.
- [11] Marazzo A., Prezzavento O., Pappalardo M.S., Bousquet E., Iadanza M., Pike V.W., Ronsisvalle G., *Il Farmaco* 2002, **57**, 45-53.
- [12] Vilner B.J., De Costa B.R., Bowen W.D., *J. Neurosci* 1995, **15**, 117-34.
- [13] Freeman A.S., Zhang J, *NPP Books: Ann Arbor, MI* 1992, 227-40.
- [14] Gewirtz G.R., Gorman J.M., Volavka J., Macaluso J., Gribkoff G., Taylor D.P., *Neuropsychopharmacology* 1994, **10**, 37-40.
- [15] King D.J., Blomqvist M., Cooper S.J., Doherty M.M., Mitchell M.J., Montgomery R.C., *Psychopharmacology* 1992, **107**, 175-9.
- [16] Taylor D.P., Eison M.S., Moon S.L., Yocca F.D., *Schltz,S.C.(Eds). Raven Press: New York* 1989, 1-19.
- [17] Junien J.L., Leonard B.E., *Clin. Neuropharmacol.* 1989, **12**, 353-374.
- [18] Monnet F.P., Debonnel G., Junien J.L., De Monatigny C., *Eur J Pharmacol* 1990, **179**, 441-5.
- [19] Debonnel G., Monnet F.P., De Monatigny C., *FASEB J* 1990, **4**, A330.
- [20] Kim M., Bickford P.C., *Neuropharmacology* 1992, **31**, 77-83.

- [21] Patrick S.L., Walker J.M., Perkel J.M., Lockwood M., Patrick R.L., *Eur J Pharmacol* 1993, **231**, 243-9.
- [22] Matsumoto R.R., Hemstreet M.K., Lai N.L., et al. *Pharmacol Biochem Behav* 1990, **36**, 151-5.
- [23] Weissman A.D., McCann D.J., Lorden J.F., Su T.P., *Eur J Pharmacol* 1993, **250**, 321-32.
- [24] Wyrick S.D., Booth R.C., *Drugs Future* 1995, **20**, 1033-1044. [25] Hanner M., Moebius F.F., Flandorfer A., Knaus H.G., Striessnig J., Kempner E., Glossmann H., *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 1996, **93**, 8072-77.
- [26] Keruda R., Prasad P.D., Fei Y., Leibach F.H., Ganapathy V., *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 1996, **229**, 553-558.
- [27] Moebius M., Striessnig J., Glossmann H., *Trends Pharmacol Sci* 1997, **18**, 67-70.
- [28] Aydar E. *Neuron*, 2002, **34**, 399-410.
- [29] Alonso G., Phan V.L., Guillemain I., Saunier M., Legrand A., Anoaï M., Maurice T., *Neuroscience* 2000, **97**, 155-170.
- [30] Lavastre P.R., Floutard S., Floutard D., Canat R., Casellas P., Le-Fur G., Breliere J.C., *J Neuroimmunol.* 1994, **52**, 183-192.
- [31] Walker J.M., Hohmann A.G., Hemstreet M.K., Martin W.J., Beierlein M., Roth J.S., Patrick S.L., Carrol F.I., Patrick R.L., *Aspect of Synaptic Transmission* 1993, **II**, 91-112.
- [32] King M., Pan Y.X., Mei J., Chang A., Xu J., Pasternak G.W., *Eur J Pharmacol.* 1997, **331**, R5-R6.
- [33] Romieu P., Martin-Fardon R., Maurice T., *Neuroreport* 2000, **13**, 2885-88.
- [34] Hayashi T., Su T.P., *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**, 491-96.
- [35] Bowen W.D., *Pharma. Acta Helv.* 2000, **74**, 211-218.
- [36] Maurice T., *Drug News Perspect* 2002, **15**, 617-625.
- [37] Maurice T., *Eur J Pharmacol* 2001, **431**, 223-227.
- [38] Foster A., Wu H., Williams W., Bowen W., Matsumoto R.R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, **13**, 749-751.
- [39] Matsumoto R.R., Mack A.L., *Eur J Pharmacol* 2001, **417**, R1-2.

- [40] Crawford K.W., Vilner B.J., Bowen W.D., *Proc. Am.Ass.Cancer Research* 1999, **40**, 166
- [41] Vilner B.J., Bowen W.D., *J Pharmacol Exp* 2000, **292**, 900-911
- [42] Crawford K.W., Bowen W.D., *Cancer Research* 2002, **62**, 313-322.
- [43] John C.S., Vilner B.J., *Bioconjug Chem.* 1997, **8**, 304-309.
- [44] Crawford K.W., Coop K.W., Bowen W.D., *Eur J Pharmacol.* 2002, **443**, 207-209.
- [45] Kolesnick R.N., Kronke M., *Annu. Rev. Physiol.* 1998, **60**, 643-665.
- [46] John C.S., Vilner B.J.; *Cancer Research* 1999, **59**, 4578-4583.
- [47] Friebe M., Mahmood A., Bolzati C., Drews A., Johannsen B., Eisenhut M., Kraemer M., Davison A., Jones A.G., *J Med Chem* 2001, **44**, 3132-40.
- [48] Choi S.R., Yang B., Plossi K., Chumpradit S., Wey S.P., Acton P.D., Wheeler K., Mach R.H., Kung H.F., *Nucl Med Biol* 2001, **28**, 657-66.
- [49] Mach R.H., Huang Y., Bucheimer N., Kuhner R., Wu L., Morton T.E., Wuang L.M., Ehrenkaufner R.L., Wallen C.A., Wheeler K.T., *Nucl Med Biol.* 2001, **28**, 451-58.
- [50] D. Fontanilla, M. Johannessen, A.R. Hajipour, N.V. Cozzi, M.B. Jackson, A.E. Ruoho, *Science* 2009, **323**, 934-37.
- [51] R.A. Glennon, S.Y. Ablordeppey, A.M. Ismaiel, M.B. El-Ashmawy, J.B. Fischer, Burke K. Howie, *J. Med. Chem.* 37 (1994) 1214-19.
- [52] S.Y. Ablordeppey, J.B. Fischer, H. Law, R.A. Glennon, *Bioorg. Med. Chem.* 10 (2002) 2759- 2765.
- [53] R. A. Glennon, *Minirew. Med. Chem.* 5 (2005) 927-940.
- [54] Gund T.M. et al., *J Molec Graph Model* 2004, **22**, 221-230.
- [55] Laggner, C.; Schieferer, C.; Fiechtner, B.; Poles, G.; Hoffmann, R. D.; Glossmann, H.; Langer, T.; Moebius, F. F. *J. Med. Chem.* 18 (2005) 4754–4764.
- [56] *Catalyst 4.9*; Accelrys: San Diego, CA, 2003.
- [57] Wermuth, C.G. *et al.* (1998) Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1997). *Annu. Rep. Med. Chem.* 33, 385-395.
- [58] Wermuth, C.G. (2006) Pharmacophores: historical perspective and viewpoint from a medicinal chemist. In *Pharmacophores and Phamacophore Searches*, (vol.32) (Langer, T. and Hoffmann, R.D., eds) pp. 3-13, Wiley-VCH.

- [59] Zampieri D., Mamolo M.G., Laurini E., Zanette C., Florio C., Collina S., Rossi D., Azzolina O., *Eur. J.Med.Chem.* 2009, **44**, 124-30.
- [60] Zampieri D, Mamolo MG, Laurini E, Florio C, Zanette C, Fermeglia M, Posocco P, Paneni MS, Pricl S, Vio L., *J Med Chem.* 2009; **52**, 5380-93.
- [61] Wang, H.; Duffy, R.A.; Boykow, G.C.; Chackalamannil, S.; Madison, V.S., *J. Med. Chem.* 2008; **51**, 2493-96.
- [62] Guner, O.; Clement, O.; Kurogi, Y., *Curr. Med. Chem.* 2004; **11**, 2991-3005.
- [63] Hellewell S. B., A. Bruce, G. Feinstein, J. Orringer, W. Williams, W. D. Bowen, *Eur. J. Pharmacol., Mol. Pharmacol. Sec.* 268 (1994) 9–18.
- [64] Smellie, A.; Teig, S. L.; Towbin, P. Poling. *J. Comput. Chem.* 1994; **16**, 171-187.
- [65] Smellie, A.; Kahn, S. D.; Teig, S. L., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1995; **35**, 285-294.
- [66] Smellie, A.; Kahn, S. D.; Teig, S. L., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1995, **35**, 295-304.
- [67] Fisher, R. *The Design of Experiments*; Hafner Publishing, New York, NY, USA, 1966.

INDICE

•	INTRODUZIONE	pag. 2
	- Classificazione dei recettori σ	pag. 6
	- Sottotipo recettoriale σ_1	pag. 11
	- Sottotipo recettoriale σ_2	pag. 14
	- I ligandi σ nel trattamento dei tumori	pag. 15
	- Ligando endogeno dei recettori σ_1	pag. 19
	- Modelli farmacoforici	pag. 20
	- Conclusione	pag. 24
•	CREAZIONE DI UN MODELLO FARMACOFORICO CON ACCELRY'S CATALYST	pag. 25
•	MODELLO FARMACOFORICO PER I RECETTORI σ_1	pag. 37
	- Generazione di un modello farmacoforico per i recettori σ_1	pag. 42
	- Validazione del modello farmacoforico	pag. 48
•	DERIVATI PIPERIDIN-4-CARBOSSAMMIDICI	pag. 54
•	DERIVATI FENILMETANONICI & ACETAMMIDICI	pag. 61
•	DERIVATI (INDOL-3-IL)ETANONICI	pag. 71
•	PARTE SPERIMENTALE	pag. 75
	- Sintesi benzossazoloni	pag. 76
	- Sintesi piperidin-4-carbossammidi	pag. 82
	- Sintesi derivati fenilmetanonici	pag. 89
	- Sintesi derivati acetammidici	pag. 96
	- Sintesi derivati (indol-3-il)etanonici	pag. 102
	- Radioligand Binding Assays	pag. 105
	- Catalyst Software Package	pag. 106
•	BIBLIOGRAFIA	pag. 109