

UNIVERSITÀ DI PISA



Dipartimento di Farmacia

*Corso di Laurea Specialistica in Chimica e
Tecnologia Farmaceutiche*

Tesi di Laurea:

LIGANDI SELETTIVI DEL RECETTORE CANNABINOIDE CB2: PROGETTAZIONE E SINTESI DI DERIVATI PIRIDIN-2-ONI-3 CARBOSSIAMMIDICI

Relatori:

Prof.ssa Clementina Manera

Dott.ssa Chiara Arena

Dott. Andrea Chicca

Candidato:

Federica Mariani

(matricola N° 437062)

Settore Scientifico Disciplinare: **CHIM-08**

ANNO ACCADEMICO 2013–2014

INDICE

Introduzione generale	2
• Cannabis	3
• Tassonomia	6
• Cannabinoidi	7
• Il sistema cannabinoide	8
• Endocannabinoidi	9
• Biosintesi e metabolismo degli endocannabinoidi	10
• Recettori cannabinoidi	18
• Distribuzione tissutale dei recettori cannabinoidi	19
• Meccanismi di trasduzione del segnale	21
• Ligandi dei recettori cannabinoidi	23
▪ Agonisti CB1 selettivi	26
▪ Agonisti CB2 selettivi	27
▪ Antagonisti/agonisti inversi CB1-selettivi	28
▪ Antagonisti/agonisti inversi CB2-selettivi	29
▪ Antagonisti neutrali dei recettori cannabinoidi	29
• Usi terapeutici dei derivati cannabinoidi	30
Introduzione alla parte sperimentale	33
Risultati e discussione	56
Parte sperimentale	61
Bibliografia	93

INTRODUZIONE GENERALE

Cannabis

La Cannabis è una pianta indigena dell'Asia centrale ed occidentale, cresce in numerose regioni tropicali e temperate, e viene coltivata in India, Medio oriente, Nord Africa.

La pianta pur essendo erbacea può raggiungere notevoli dimensioni, fino ai 2 metri di altezza. I fusti sono eretti e più o meno ramificati, sottili e scanalati longitudinalmente. Le foglie (la cui iconografia rappresenta la droga) sono palmato-composte con penne lanceolate allungate e strette, di colore verde scuro, e con margine seghettato; sono di diverso tipo a seconda del loro inserimento nel fusto: alla base sono opposte e composte da 5-7 foglioline seghettate, scorrendo verso l'apice sono alterne, semplici o tri-segmentate (Figura 1 e 2).

I fiori sono piccoli e poco appariscenti, raggruppati in infiorescenze maschili e femminili portati su individui diversi, la pianta è infatti generalmente dioica anche se sono stati evidenziati esemplari ermafroditi. I fiori maschili (staminiferi) sono riuniti in racemi ascellari ed hanno 5 sepali e 5 stami. I fiori femminili (pistilliferi) sono riuniti in spighe glomerulate, disposti a paia all'ascella di una brattea, hanno calice urceolato che circonda l'ovario uniovulato. Il frutto è un achenio ovoidale.

La droga è costituita dalle infiorescenze femminili e dalle loro brattee, munite di peli secretori.

Attraverso il microscopio è possibile vedere che anche su entrambe le facce della foglia c'è la presenza di numerosi peli protettori unicellulari con estremità ricurva, e peli secretori con piede pluricellulare e testa globosa secretrice e pluricellulare; questi ultimi sono piuttosto rari nelle foglie ma molto numerosi

nelle brattee delle infiorescenze, e sono ricchi in olio essenziale resinoso, caratteristica peculiare della droga. Tale resina contiene diversi composti non azotati e fenolici, tra i più interessanti i *Cannabinoidi* (cannabinolo, cannabidiolo, Δ^9 -tetraidrocannabinolo).

La pianta germina in primavera e fiorisce in estate inoltrata. L'impollinazione è anemofila e in autunno compaiono i frutti duri e globosi, ciascuno dei quali contenente un seme.^{1,2}

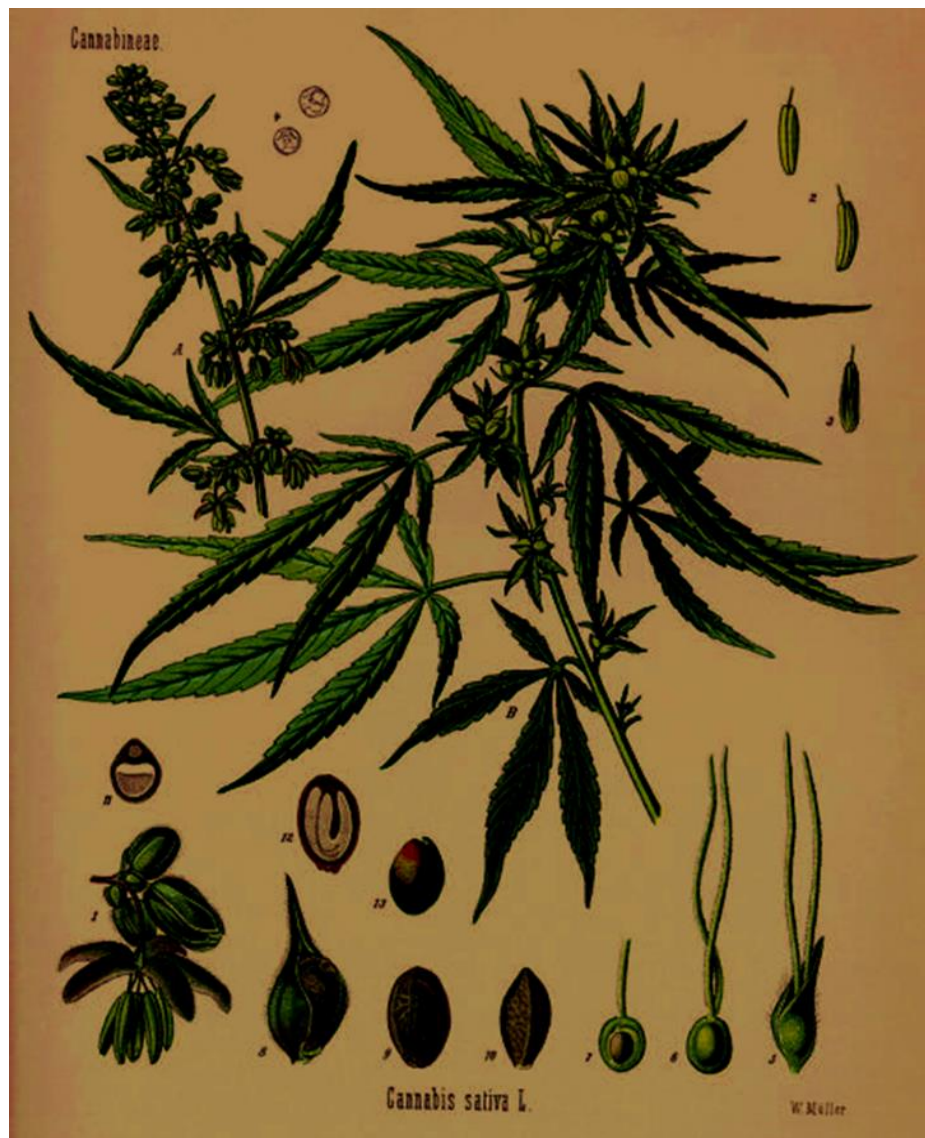


Figura 1 e Figura 2 (pagina accanto). *Illustrazione della Cannabis sativa L.*

Cannabis sativa L.



The various parts of the marijuana plant: (1) male plant in flower; (2) female plant in fruit; (3) seedling; (4) leaf (enlarged); (5) buds and mature male flower; (6) female flower with protruding stigmas; (7) fruit enclosed in bract, or pod; (8) fruit (lateral view); (9) fruit (end view); (10) secretory, glandular hair with multicellular stalk; (11) glandular hair with single-celled stalk (not visible); and (12) cross section of protective hair.

Tassonomia

La *Cannabis* è una pianta appartenente alla famiglia delle *Cannabinaceae* o *Cannabaceae*. La prima classificazione tassonomica fu operata da C. Linneo che considerava un solo genere, avente un'unica specie: *Cannabis sativa* L. Successivamente sono stati identificati altri tipi di piante del genere *Cannabis*, classificate come specie e sottospecie.

Small e Cronquist distinguono una specie con due sottospecie, ciascuna delle quali comprende due varietà:

Cannabis sativa L.

- *ssp. indica* (Lam) E. Small & Cronquist, var. *indica*, var. *kafiristanica* Vavilov
- *ssp. sativa*, var. *indica*, var. *kafiristanica* Vavilov.

Shultes divide il genere in tre specie:

- *Cannabis sativa* (volg. canapa)
- *Cannabis indica* (volg. indiana)
- *Cannabis ruderalis* (volg. ruderale o russa o americana)

Nel 2002 Clarke e Watson proposero che la specie *Cannabis sativa* comprendeva tutti gli individui, ad eccezione di alcune varietà usate per la produzione di hashis e marijuana in Afghanistan e Pakistan, che sarebbero comprese nella specie *Cannabis indica*.

Esistono controversie anche sull'appartenenza alla famiglia *Cannabinaceae*. Il sistema Cronquist colloca la pianta secondo questa tassonomia: Magnoliophyta – Magnolopsida – Hamamelidea – Urticales – Cannabaceae, invece secondo la classificazione APG (Angiosperm Phylogeny Group) del 1998 la pianta viene collocata in questo modo: Magnolophyta – Eudicotiledoni – Eudicotiledoni centrali – Rosidi – Rosales –

Cannabaceae.

Cannabinoidi

Con il termine Cannabinoidi si intendono non solo tutti quei composti naturali, più propriamente detti fitocannabinoidi, (Figura 3), ma anche quelli ottenuti per sintesi che interagiscono con i recettori cannabinoidi.

Tra i fitocannabinoidi sono stati identificati una settantina di composti, molti dei quali non ancora studiati.

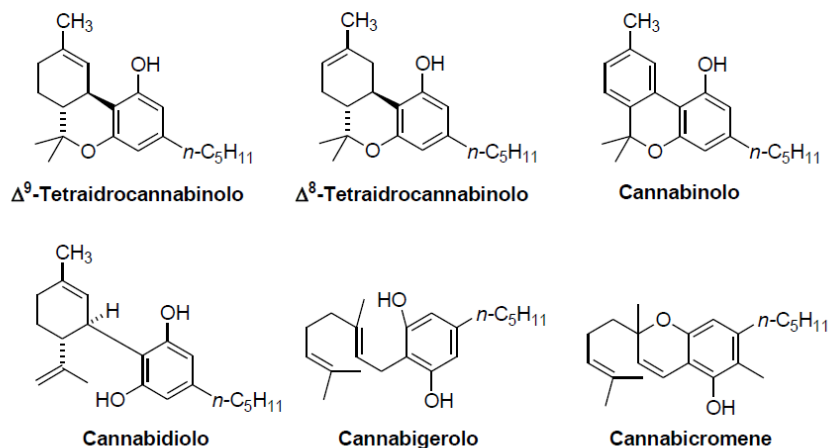


Figura 3. Struttura dei principali fitocannabinoidi.

Il più importante rappresentante è il Δ^9 -tetraidrocannabinolo o Δ^9 -THC, un olio rosso-marroncino viscoso, che come detto prima, è maggiormente contenuto nei peli ghiandolari della Cannabis sativa L. Diversi sono i sistemi di numerazione degli atomi di carbonio dei cannabinoidi che implicano quindi una diversa

nomenclatura. Uno considera la struttura chimica di base come derivato monoterpenco, e quindi il principale cannabinoide è definito Δ^1 -THC; per l'altro è il Δ^9 -THC poiché considera la struttura come derivato benzopiranico. Il secondo sistema è in accordo con la presunta biosintesi del composto e può essere applicato anche ai composti cannabinoidi a struttura non benzopiranic, per tale ragione è il più usato (Figura 4).²

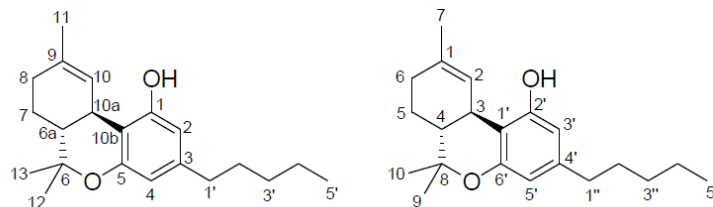


Figura 4. Numerazione dibenzopiranic e terpenoide del THC.

Il sistema cannabinoide

Il sistema endocannabinoide include i recettori cannabinoidi CB1 e CB2, i loro ligandi endogeni, fra i principali e più studiati anandamide (AEA) e 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Figura 5), gli enzimi responsabili della loro biosintesi, e gli enzimi responsabili della degradazione, quali acidi grassi ammidolasi (FAAH) e monoacilglicerolo lipasi (MAGL), considerati i principali.³

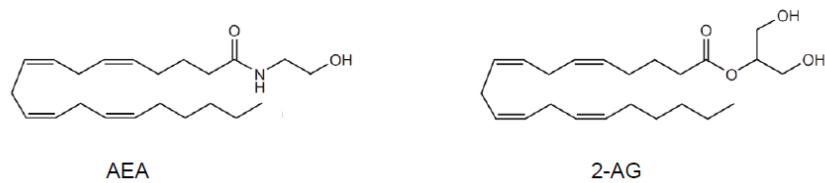


Figura 5. *Struttura dei principali endocannabinoidi.*

Il sistema endocannabinoide non è limitato al cervello ed è coinvolto in diversi processi come il controllo del dolore, l'assunzione di cibo, lo sviluppo neuronale, la riproduzione e la motilità intestinale ed altri ancora. Per queste ragioni negli ultimi anni il sistema cannabinoide è stato il nucleo di molte ricerche come potenziale target per interventi terapeutici.⁴

In realtà è più appropriato parlare del sistema endocannabinoide come un complesso sistema che include non solo gli endocannabinoidi classici, e i suoi principali enzimi metabolici, ma anche i mediatori endocannabinoide-simili, in questo ultimo decennio sono state infatti identificate nuove molecole come nuovi membri del sistema endocannabinoide.⁵

Endocannabinoidi

La scoperta e la clonazione dei recettori cannabinoidi ha permesso l'identificazione dei loro ligandi endogeni: gli endocannabinoidi, classe di composti di natura lipidica, capaci di interagire con i suddetti recettori.

Nel 1992 fu scoperta l'anandamide o N-arachidonoil-etanolamina o etanolammide dell'acido arachidonico o AEA;⁶

successivamente fu osservato che anche il 2-arachidonoil-glicerolo o 2-AG mostrava affinità per i recettori CB1 e CB2.^{7,8} Negli anni successivi sono stati identificati altri endocannabinoidi (Figura 6) fra cui: 2-arachidonoil-glicerolo-etere o noladin etere,⁹ N-arachidonoil-dopamina o NADA,^{10,11} O-arachidonoil-etanolamina o virodamina,¹² e N-oleil-dopamina o OLDA,¹³ il cui ruolo metabolico e farmacologico non è stato ancora chiarito. Infatti, i più studiati e noti AEA e 2-AG, sono considerati gli endocannabinoidi maggiori.

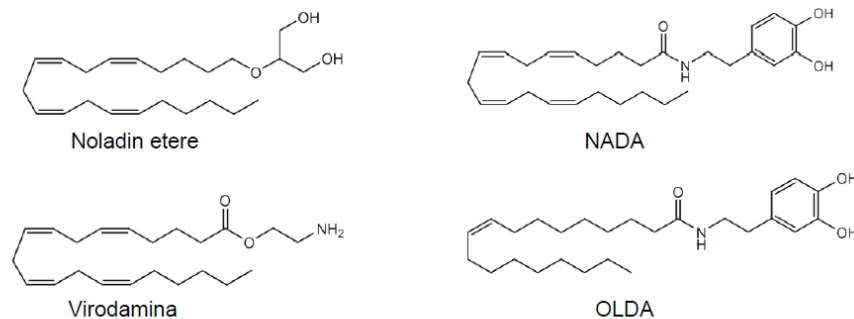


Figura 6. *Struttura degli endocannabinoidi.*

Di recente è stato identificato un potente ligando endogeno che funge da antagonista/agonista inverso nei confronti del recettore CB1. Esso è un nonapeptide definito emopressina che è stato isolato da diversi tessuti, incluso il cervello, del quale sono necessari ulteriori studi per validare il suo ruolo farmacologico.¹⁴

Biosintesi e metabolismo degli endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi sono prodotti all'interno delle cellule neuronali attraverso vie biosintetiche multiple e, a differenza degli

altri neurotrasmettitori, non vengono immagazzinati in vescicole ma vengono sintetizzati "on demand" a partire da precursori fosfolipidici. Il processo di biosintesi è attivato da uno stimolo che provoca depolarizzazione della membrana cellulare.¹⁵

Il precursore dell'anandamide è N-arachidonoilfosfatidiletanolamina (NarPE)¹⁶ prodotta a partire da fosfolipi e fosfatidiletanolamina, mediante una N-aciltransferasi calcio-dipendente e una calcio-indipendente (NATs). In pratica NarPE è prodotta per trasferimento dell'acido arachidonico dalla posizione sn-1 dei fosfolipidi all'atomo di azoto della fosfatidiletanolamina,¹⁷ poi una fosfolipasi D N-acilfosfatidiletanolamina-specifica (NAPE-PLD) converte direttamente NarPE in anandamide (Figura 7).^{18,19}

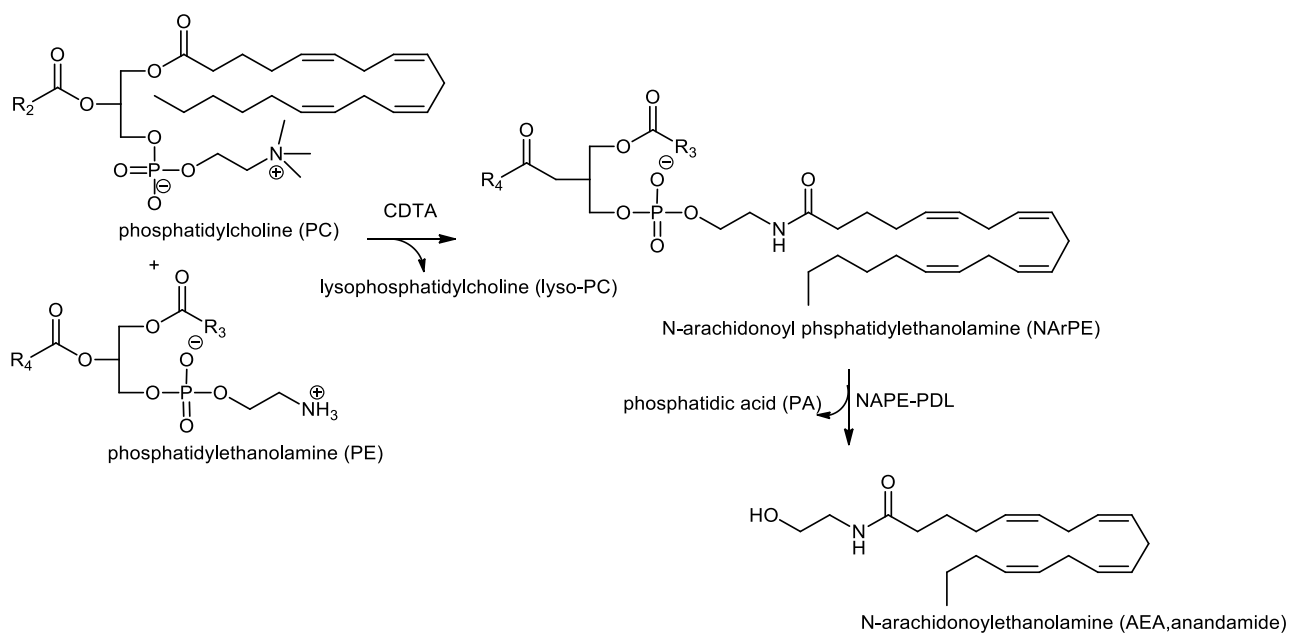


Figura 7. Biosintesi diretta dell'anandamide.

Altre acidi grassi etanolammidi possono essere formate attraverso queste vie, che non necessariamente si legano ai recettori CB con alta affinità e agiscono su differenti recettori, ad

esempio composti come la palmitoiletanolammide (PEA), ad azione anti-infiammatoria e l'oleoiletanolammide (OEA), mediatore anoressizzante (Figura 8).²⁰

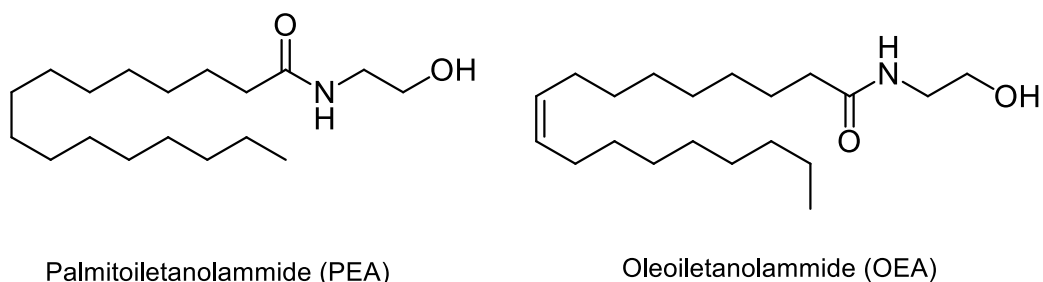


Figura 8. *Palmitoiletanolammide e Oleoiletanolammide.*

La scoperta che nei topi NAPE-PLD-“knock out” i livelli tissutali di anandamide non sono ridotti ha suggerito l'esistenza di altre vie biosintetiche con enzimi alternativi.²¹ Si presume che AEA possa essere prodotta per idrolisi sequenziale di NarPE in *liso*-NarPE e in glicerofosfo-ammide, ad opera di un α,β -idrolasi 4 (ABHD4) (Figura 9, step 2), seguita da un'ulteriore idrolisi ad opera della glicerofosfodiesterasi-1 (GDE1).²² La formazione di *liso*-NarPE sembra imputabile anche alla fosfolipasi A₂ solubile, seguita dalla conversione diretta in anandamide, catalizzata dalla *liso*-fosfolipasi D (Figura 9, step 4).²³ Un'altra possibile via biosintetica prevede la formazione di fosfo-anandamide dall'idrolisi di NarPE mediante fosfolipasi C e successiva conversione in anandamide tramite la proteina fosfatasi N22 o la inositolo fosfatasi SHIP2 (Figura 9, step 6).²⁴

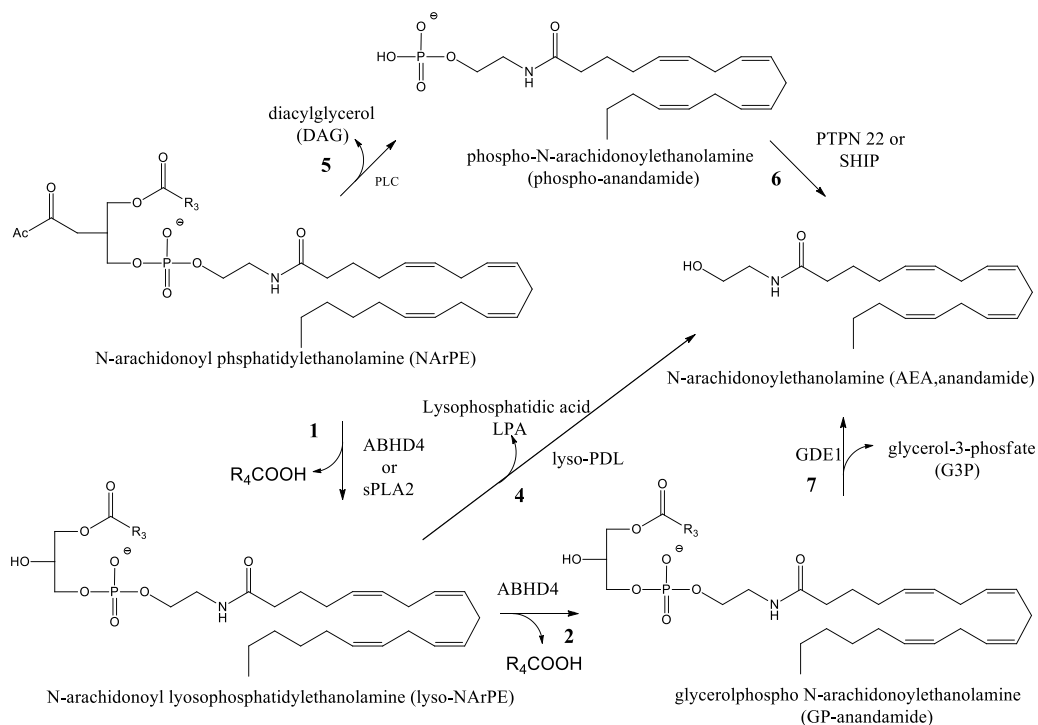


Figura 9. Meccanismi alternativi per la biosintesi dell'anandamide (Blankman J. L. et al. *Pharmacol Rev* 65:849–871, April 2013).

L'anandamide viene inattivata per idrolisi del gruppo ammidico ad opera dell'enzima acido grasso ammido idrolasi (FAAH: Fatty Acid Amide Idrolase) (Figura 10).²⁵

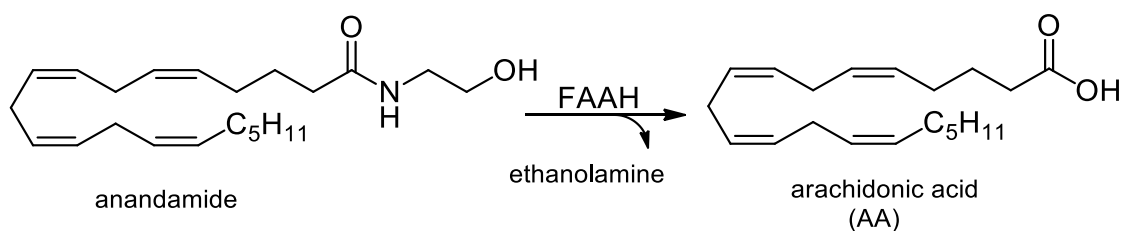


Figura 10. Nel sistema nervoso centrale, l'anandamide è principalmente inattivata dall'enzima acido grasso ammido idrolasi.

Il 2-arachidonoil-glicerolo o 2-AG è prodotto quasi esclusivamente dall'idrolisi di sn-1-acil-2-arachidonoilgliceroli (AAGs) ad opera sn-1-diacilglicerolo lipasi, DAGLa o DAGLβ (Figura 11). L'isoforma

α è più abbondante nei tessuti nervosi adulti, la β in quelli in via di sviluppo.¹⁸ Gli sn-1-acil-2-arachidonoilgliceroli (AAGs) sono prodotti a partire dai fosfatidilinositoli di membrana per mezzo della fosfolipasi C/ β .¹⁶

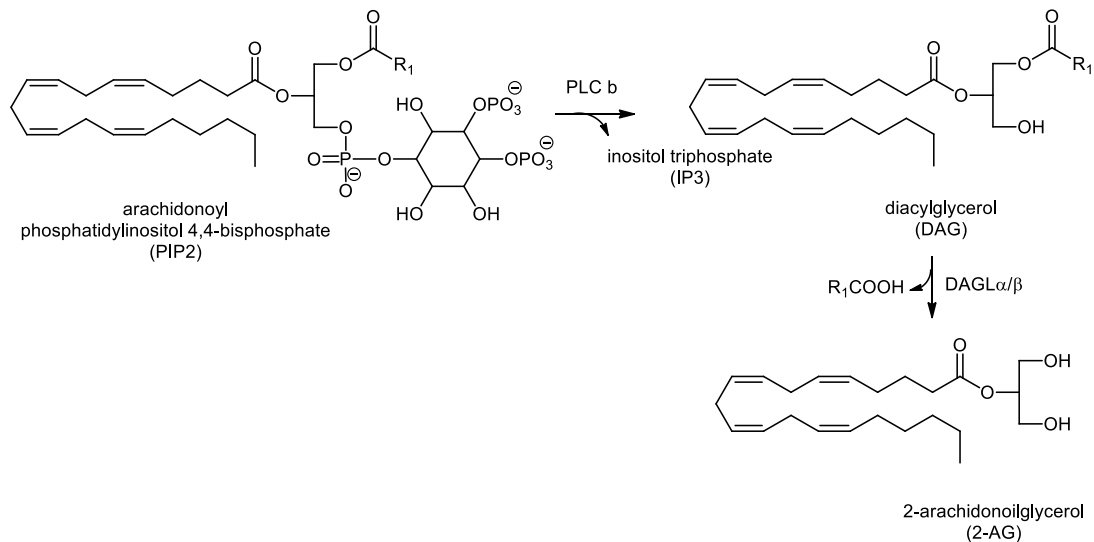


Figura 11. Biosintesi del 2-arachidonoilglicerolo (2-AG).

Il principale enzima responsabile dell'inattivazione di 2-AG, dopo il suo riassorbimento, è la monoacilglicerolo lipasi pre-sinaptica o MAGL (Figura 12); anche se, in certe condizioni, l'idrolisi di 2-AG è controllata da FAAH.²⁶

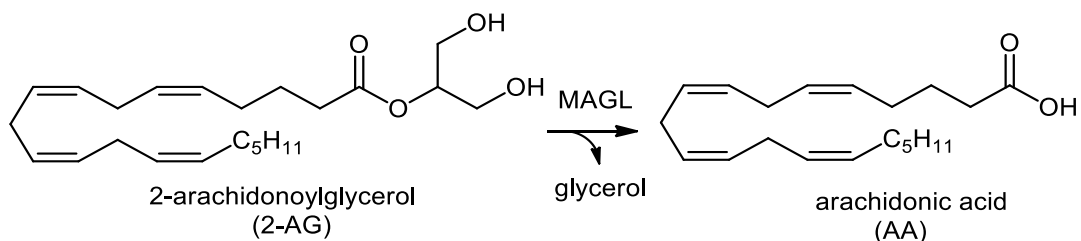


Figura 12. Inattivazione di 2-AG da parte di MAGL.

Di recente è stata individuata, a livello post-sinaptico, la presenza di α,β -idrolasi 6 (ABHD6) e 12 (ABHD12) capaci di controllare i livelli di 2-AG nei neuroni e nella microglia (Figura 13).

Inoltre anche gli enzimi della cascata dell'acido arachidonico, quali ciclossigenasi 2 (COX-2) e lipossigenasi (LOX) e gli enzimi del citocromo CP450 sembrano intervenire nei processi di inattivazione degli endocannabinoidi (Figure 13 e 14), quando in certe condizioni le vie cataboliche attraverso FAAH e MAGL sono sopresse.²⁷

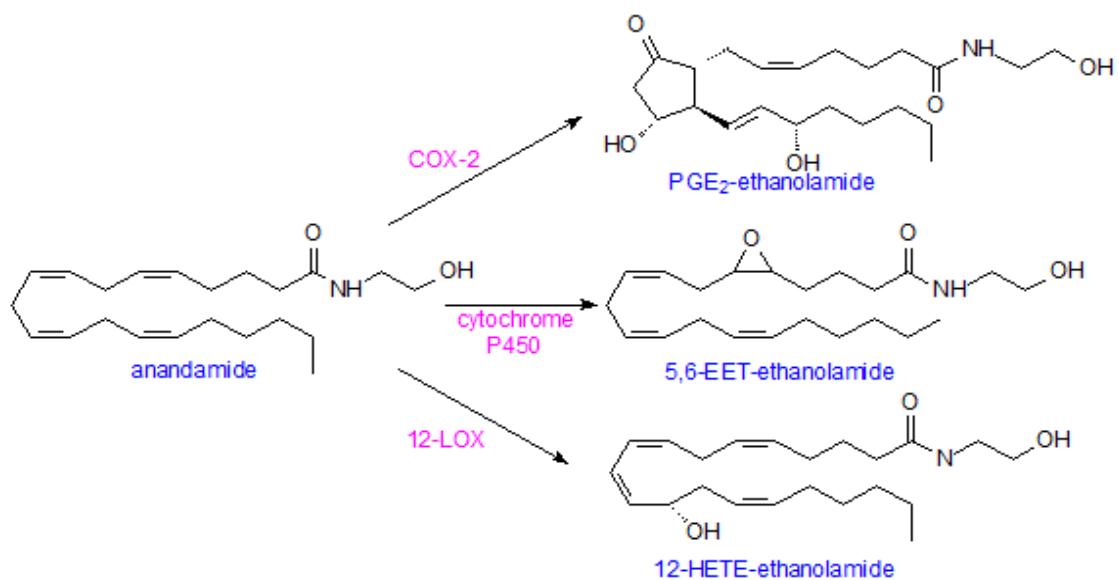


Figura 13. Meccanismi alternativi di idrolisi dell'anandamide.

L'ossidazione dell'anandamide ad opera di COX-2 e successivamente di varie prostaglandine sintetasi porta alle prostaglandin-etanolammidi o prostamidi,²⁸ che sono resistenti ad ulteriore idrolisi.²⁹ COX-2 è responsabile anche dell'inattivazione di 2-AG in prostaglandin-glicerolo-esteri o gliceril-prostaglandine,^{30,31}. In *vitro* AEA subisce ossigenazione sia da parte di LOX per dare i corrispondenti idroperossi- e idrossi

derivati,³²⁻³⁵ sia da parte di ossigenasi citocromo CP450 per dare epossieicosatetraenoil-anandamidi (Figura 13).^{36,37} Questi ultimi metaboliti si mostrano attivi nei confronti dei recettori cannabinoidi.

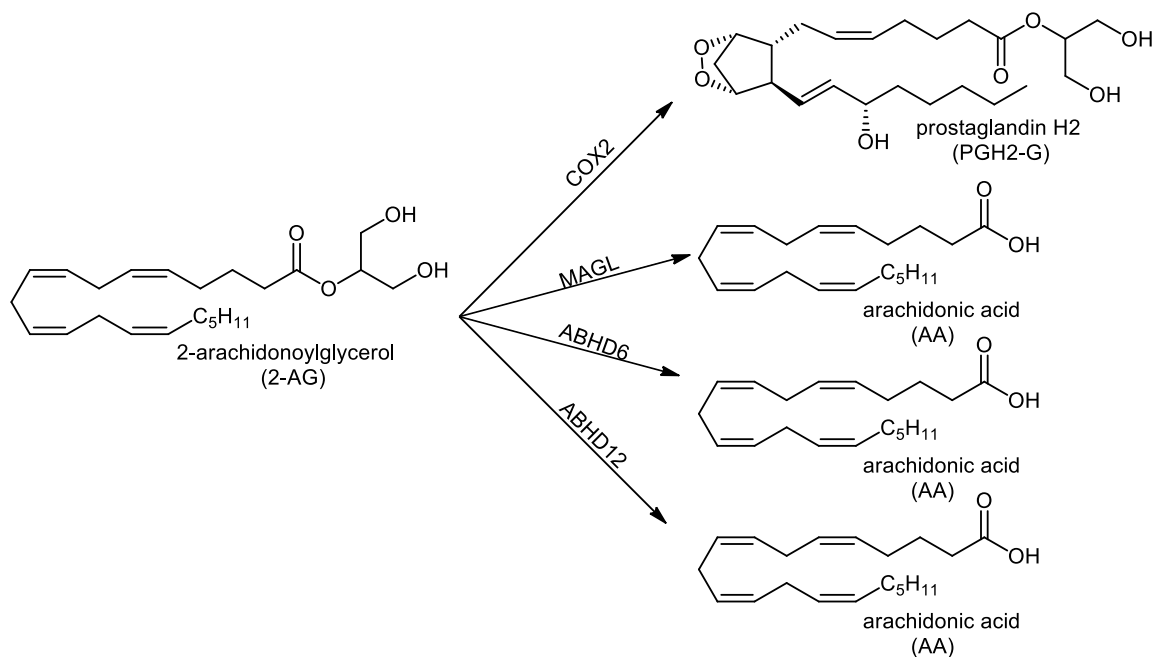


Figura 14. Meccanismi alternativi di idrolisi di 2-AG.

Gli endocannabinoidi sono rimossi dallo spazio extracellulare attraverso un processo di assorbimento all'interno della cellula e conseguente inattivazione metabolica. Sebbene gli enzimi responsabili del metabolismo sono stati ben caratterizzati, il processo di assorbimento è ancora oggetto di controversie. Recenti studi hanno identificato proteine trasportatrici intracellulari quali ad esempio: proteine leganti acidi grassi 5 e 7 (FABP5 e FABP7);³⁸ proteina "heat shock" 70 (Hsp70) e albumina;³⁹ e una proteina trasportatrice dell'anandamide acido grasso ammidasi (FAAH)-simile (FLAT),⁴⁰ cioè una variante

di FAAH inattiva cataliticamente ma capace di legare AEA. L'anandamide sembra essere assorbita dallo spazio extracellulare attraverso un processo di diffusione facilitato poiché l'assorbimento nella membrana, in cui il colesterolo gioca un ruolo fondamentale,⁴¹ e il suo accumulo all'interno della cellula non si è dimostrato né sodio né ATP-dipendente.⁴² Recenti studi condotti su linee cellulari U937 di monociti/macofagi umani, con analisi basate su molecole radiomarcate e quantificazioni eseguite con strumenti di gas massa, hanno supportato la presenza di un trasportatore di membrana per AEA e 2-AG in queste cellule. In realtà si può parlare di un trasportatore specifico per gli endocannabinoidi di natura eicosanoide (EMT): quindi non solo per AEA e 2-AG ma anche per NADA, virodamina, e noladin etere. Inoltre, anche se il trasportatore di membrana non è ancora stato identificato, si è dimostrato che il meccanismo di trasporto è indipendente dalla degradazione enzimatica intracellulare di AEA e dalle proteine intracellulari trasportatrici di AEA, e sembra avere funzione bidirezionale e anche mediare il rilascio di AEA e 2-AG.⁴³

Recettori cannabinoidi

Attualmente sono noti due tipi di recettori cannabinoidi: i CB1 con prevalente distribuzione centrale e i CB2 con prevalente distribuzione periferica.

Appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G e sono costituiti da sette domini transmembrana, con la porzione N-terminale sul lato extracellulare e la porzione C-terminale sul lato intracellulare (Figura 15).

Il recettore CB1, scoperto nel 1988,⁴⁴ è stato clonato dalla corteccia cerebrale di ratto,⁴⁵ dal cervello e testicoli umani⁴⁶ e dal cervello di topo.⁴⁷ Esso presenta un'omologia nella sequenza amminoacidica tra le specie pari al 97-99%. Il recettore CB1 umano, *hCB1*, è costituito da 472 amminoacidi, quello di ratto e di topo da 473 amminoacidi. Una variante del CB1 è stata isolata dal polmone umano ed è stata denominata CB1a.⁴⁸

Nel 1993 è stato clonato il recettore CB2 da cellule leucemiche umane HL-60 (human promyelocytic leukemia cells).⁴⁹ Il recettore CB2 umano, *hCB2*, è costituito da 360 amminoacidi ed è differente dal recettore *hCB1* per il suo dominio ammino-terminale più corto, dove non vi è sostanziale conservazione.

E' presente un'omologia nella sequenza amminoacidica del 68% fra CB1 e CB2 per quanto riguarda i domini transmembrana, e solo del 44% per quanto riguarda la totalità della proteina (Figura 15).⁴⁹

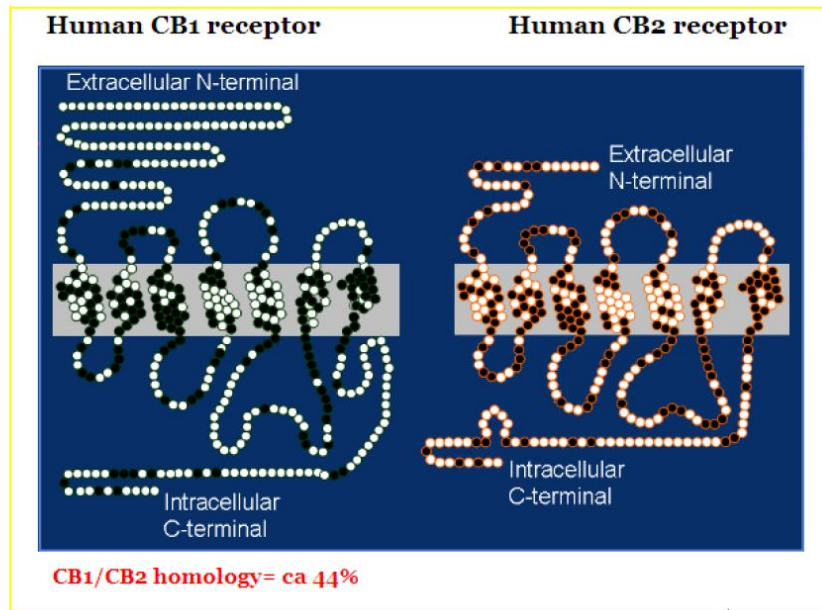


Figura 15. *Illustrazione del recettore CB1 e CB2 umani.*

Distribuzione tissutale dei recettori cannabinoidi

Il recettore CB1 è principalmente espresso a livello del sistema nervoso centrale, con alta densità nelle regioni dell'ippocampo, i gangli della base, la corteccia cerebrale, l'amigdala e il cervelletto; la cui attivazione spiega bene gli effetti di compromissione della memoria, della cognizione, della capacità di apprendimento e della coordinazione motoria indotti dai cannabinoidi.⁵⁰ Inoltre i CB1 sono espressi in aree coinvolte nella modulazione del dolore, attraverso le vie discendenti, quali il midollo rostrale ventrolaterale e zona grigia periacqueduttale, negli strati superficiali delle corna dorsali del midollo spinale e nei gangli delle radici dorsali. L'analgesia mediata dai recettori cannabinoidi ha

azione centrale, azione diretta spinale e azione sui nervi periferici.⁵¹

I recettori CB1 sono inoltre presenti anche in tessuti periferici tra cui milza, tonsille, e in quantità minore nella ghiandola surrenale, cuore, prostata, utero, ovaie e fegato.⁵² Interessante è la loro presenza nel corpo ciliare, nell'iride e nella retina, zone dell'occhio che controllano non solo le funzioni visive ma anche la produzione ed il deflusso dell'umor acqueo, la cui regolazione è fondamentale per mantenere a livelli ottimali la pressione endoculare, implicata nella patogenesi del glaucoma. A questo livello giocano un ruolo fondamentale gli agonisti CB1 che riducono i livelli pressori intraoculari e quindi aprono gli studi a possibili utilizzi terapeutici nel trattamento del glaucoma.⁵³

I recettori CB2 sono espressi principalmente nei tessuti periferici. Sono infatti presenti principalmente negli organi del sistema immunitario come milza, timo, tonsille e nelle cellule immunitarie del sangue: linfociti B e T, monociti e neutrofili.⁵⁴ Alcuni studi condotti nelle cellule immunitarie sia durante l'attività basale che a seguito della loro attivazione, hanno dimostrato che i recettori cannabinoidi hanno un ruolo biologico importante in determinati stadi dell'attivazione cellulare nelle cellule mieloidi e linfoidi.

Sebbene espressi a basse concentrazioni nel sistema nervoso centrale i CB2 sono infatti presenti nelle cellule della microglia e nei neuroni in condizioni normali, e possono essere indotti nelle cellule nervose in risposta a certe condizioni neuroinfiammatorie.⁵⁵

MECCANISMI DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

I recettori cannabinoidi sono accoppiati a proteine $G_{i/o}$, appartenenti alla famiglia delle proteine G, costituite dalle subunità α e $\beta\gamma$. L'attivazione della proteina G_i inibisce l'adenilato ciclasi e quindi la conversione di ATP in cAMP (Figura 16), con riduzione della concentrazione intracellulare di quest'ultimo, e inibizione della proteina chinasi A cAMP-dipendente, che controlla moltissimi processi cellulari. La stimolazione dei recettori cannabinoidi induce caratteristici eventi intracellulari come l'attivazione delle chinasi "mitogen activated", MAPK coinvolta nei processi di proliferazione cellulare.⁵⁶

Tipici eventi correlati all'attivazione del recettore CB1 sono l'inibizione dei canali del calcio voltaggio dipendenti VGCCs di tipo P/Q, N e L, e la stimolazione dei canali del potassio K_{ir} di tipo "inward rectifying" (Figura 16).^{56,57}

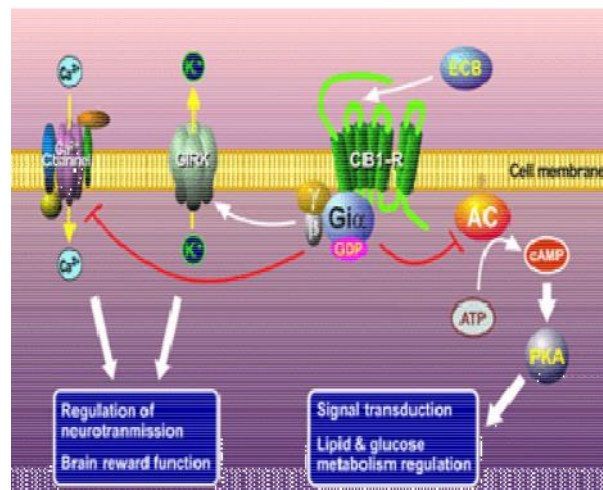


Figura 16. Meccanismi di trasduzione del segnale attivati dal CB1.

Inoltre entrambi favoriscono il rilascio di ossido nitrico NO⁵⁸ dalle cellule endoteliali vasali, con attivazione della guanilato ciclastasi e aumento dei livelli di cGMP.⁵⁹

Alcuni agonisti CB1, fra cui anandamide e 2-AG, agiscono direttamente attivando la fosfolipasi C β con conseguente idrolisi di PIP2 (fosfatidil-inositolo-difosfato) e rilascio di IP3 e aumento transitorio del calcio intracellulare, per mobilitazione dal reticolo endoplasmatico e per ingresso dall'ambiente extracellulare, con meccanismo G_{q/11}-mediati o G_{i/o}-mediati.⁶⁰

L'attivazione delle proteine G_{i/o} sembra modulare la cascata di eventi intracellulari, inclusa la via della proteina fosfatidilinositol 3-chinasi/Akt o PI3K/Akt, associata ad eventi a favore della sopravvivenza cellulare, ma che può essere di tipo positivo o negativo a seconda del tipo di cellula coinvolta.⁶¹

Il recettore CB2 induce la sintesi di ceramide, messaggero di natura sfingolipidica che è collegato agli effetti pro-apoptotici associati ai cannabinoidi.⁵⁶

Il recettore CB1 modula il rilascio di neurotrasmettitori: l'inibizione dei canali del calcio pre-sinaptici indotta dai cannabinoidi riduce il rilascio di neurotrasmettitori dagli stessi terminali pre-sinaptici che esprimono il recettore CB1 sulla membrana cellulare.⁵⁶

L'attivazione dei recettori CB2 sulle cellule del sistema immunitario sembra modulare il rilascio di citochine, mediatori dell'infiammazione, e quindi riduce la risposta immunitaria.⁶²

Ligandi dei recettori cannabinoidi

Numerosi sono i composti che possiedono affinità per i recettori cannabinoidi CB1 e CB2 e possono essere classificati in base alla loro struttura chimica in quattro gruppi principali: cannabinoidi classici, cannabinoidi non classici, amminoalchilindoli ed eicosanoidi.⁸⁸

I cannabinoidi classici (Figura 17) sono derivati tricyclici dibenzopiranicici o di origine naturale, quindi contenuti nella *Cannabis sativa* L., o di sintesi. I più importanti sono il (-)- Δ^9 -THC, (-)- Δ^8 -THC, 11-idrossi- Δ^8 -THC-dimetileptile (HU-210) e il desacetil-L-nantradolo. I primi due sono di origine naturale, i secondi due di sintesi. Il Δ^9 -THC si lega con uguale affinità ai CB1 e CB2, comportandosi da agonista parziale e ha maggior efficacia sul CB1; il Δ^8 -THC mostra lo stesso profilo del primo fitocannabinoide per efficacia e affinità recettoriale. HU-210 mostra potenza elevata e in vivo ha effetti farmacologici di lunga durata, presumibilmente imputabile alla catena laterale dimetileptilica al posto di quella pentilica presente nel THC.

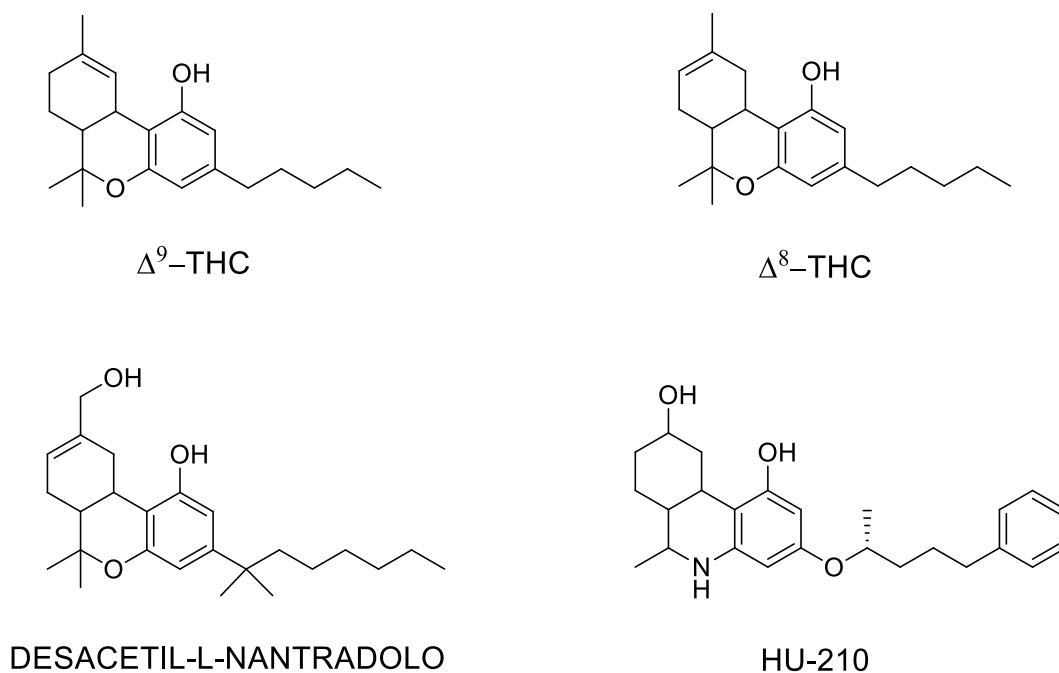


Figura 17. *Struttura dei cannabinoidi classici.*

I cannabinoidi non classici (Figura 18) sono analoghi biciclici e triciclici di Δ^9 -THC in cui manca l'anello piranico. Il composto principale (Figura Y) è il CP55940 o (-)-*cis*-3-[2-idrossi-4-(1,1-dimetileptile)fenil]-*trans*-4-(3-idrossipropil)cicloesano, con attività agonista su entrambi i recettori e più potente di Δ^9 -THC.

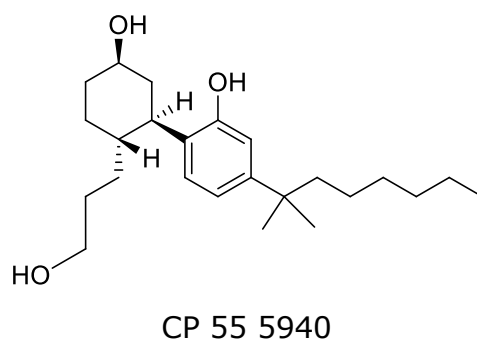
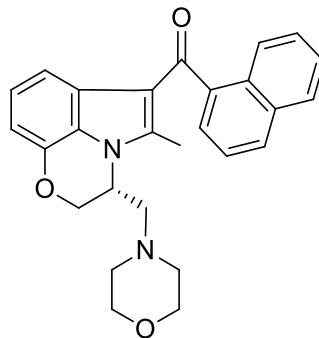


Figura 18. *Cannabinoidi non classici.*

Gli ammino alchil indoli si differenziano strutturalmente dai composti precedenti. Il più noto e usato nell'ambito della ricerca è l'R-(+)-[2,3-diidro-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzossano-6-il]-1naftalenilmetanone mesilato o R-(+)-WIN55 212-2 (Figura 19); agonista recettoriale più affine a CB2, rispetto a CB1, e con attività intrinseca simile a HU-210 e a CP55940.



WIN 55 212-2

Figura 19. Struttura degli ammino alchil indoli.

Infine, per quanto riguarda gli eicosanoidi, i maggiori rappresentati sono AEA e 2-AG. L'anandamide pur avendo affinità recettoriale minore del Δ^9 -THC, mostra come quest'ultimo, agonismo parziale su entrambi i recettori cannabinoidi, con minor efficacia sul CB2. 2-AG ha affinità recettoriale simili ad AEA ma a differenza di quest'ultima ha maggior efficacia su CB1 e CB2.

I CB1/CB2-agonisti non selettivi sono composti usati negli studi farmacologici per comprendere le funzioni dei recettori cannabinoidi, ma non rappresentano alcun prototipo su cui sviluppare nuovi farmaci, principalmente a causa degli effetti indesiderati a livello del sistema nervoso centrale a seguito dell'attivazione dei recettori CB1.

Agonisti CB1 selettivi

I primi agonisti CB1-selettivi hanno struttura eicosanoidica: R-(+)-metanandamide e il ciano-analogo, O-1812 (Figura 20). Questi ultimi ricalcano la struttura dell'anandamide nella quale per aumentare la selettività verso il recettore è stato inserito un gruppo metilico sul carbonio in posizione 2'. Questa modifica conferisce anche resistenza all'idrolisi da parte di FAAH. Altri agonisti CB1-selettivi, l'arachidonil-2'-cloroetilammide (ACEA) e la arachidonil-ciclopropilammide (ACPA) (Figura 20) pur avendo efficacia non sono resistenti alla FAAH. Questi composti sono utili, in studi in vivo e in vitro, per distinguere gli effetti dell'attivazione dei recettori CB1 da quelli dei CB2.

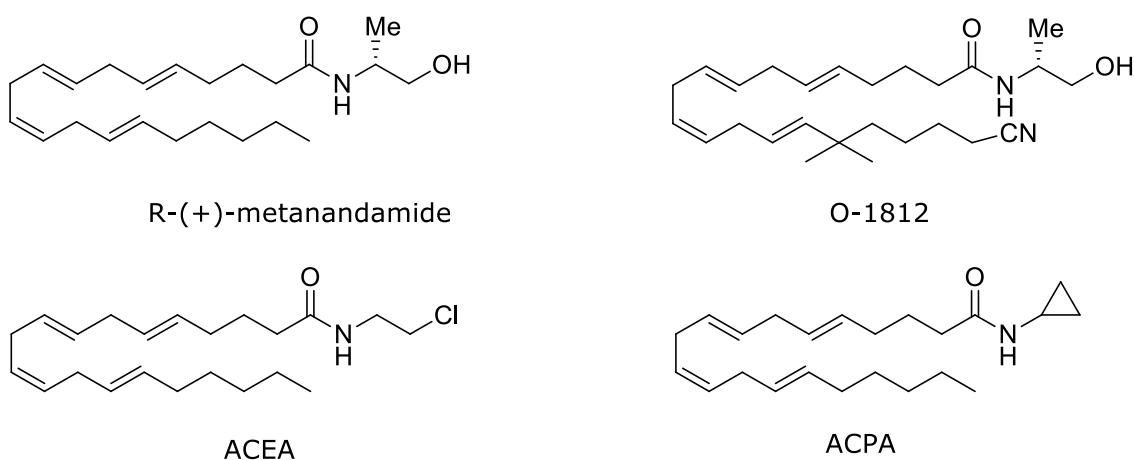
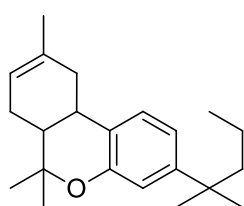


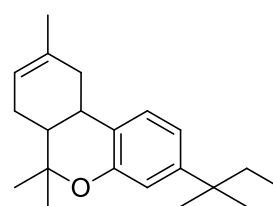
Figura 20. *Struttura degli agonisti CB1 selettivi.*

Agonisti CB2 selettivi

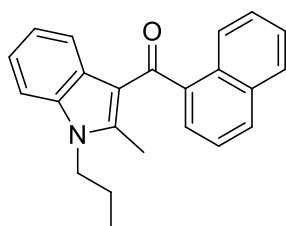
Alcuni agonisti CB2-selettivi hanno la struttura dei cannabinoidi classici: JWH-133 e JWH-139 (Figura 21). Altri hanno struttura dei cannabinoidi non classici come HU-308, e degli ammino alchil indoli JWH-015 e AM-1241 (Figura 21). Questi composti sono utili per studi in vitro ed in vivo per distinguere gli effetti dell'attivazione dei recettori CB2 rispetto a quelli dei CB1. Inoltre sono i prototipi da cui partire per lo sviluppo di farmaci analgesici ed antiinfiammatori privi di azione psicotropa. Alcuni composti CB2-selettivi sono stati recentemente riportati in letteratura per le proprietà analgesiche, immunomodulatrici e anti-cancro.^{63,64}



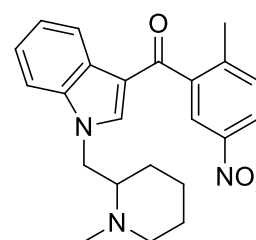
JWH-133



JWH-139



JWH-015



AM-1241

Figura 21. *Struttura degli agonisti CB2-selettivi.*

Antagonisti/agonisti inversi CB1 selettivi

Fra i principali rappresentanti ci sono il diarilpirazolo SR141716A (rimonabant) e AM-251 e AM-281, analoghi del primo; e il benzofurano LY32013 (Figura 22). Alcuni di essi sono stati utilizzati per il trattamento dell'obesità e per i disordini metabolici come diabete tipo 2 e dislipidemie, ma tolti dal mercato per gli effetti collaterali a livello comportamentale e psichico. Attualmente sono in corso studi per lo sviluppo di composti con attività antagonista/agonista inversa CB1-selettivo, incapaci di penetrare la BEE e quindi privi di attività centrale e utili per i disordini metabolici.⁶⁵

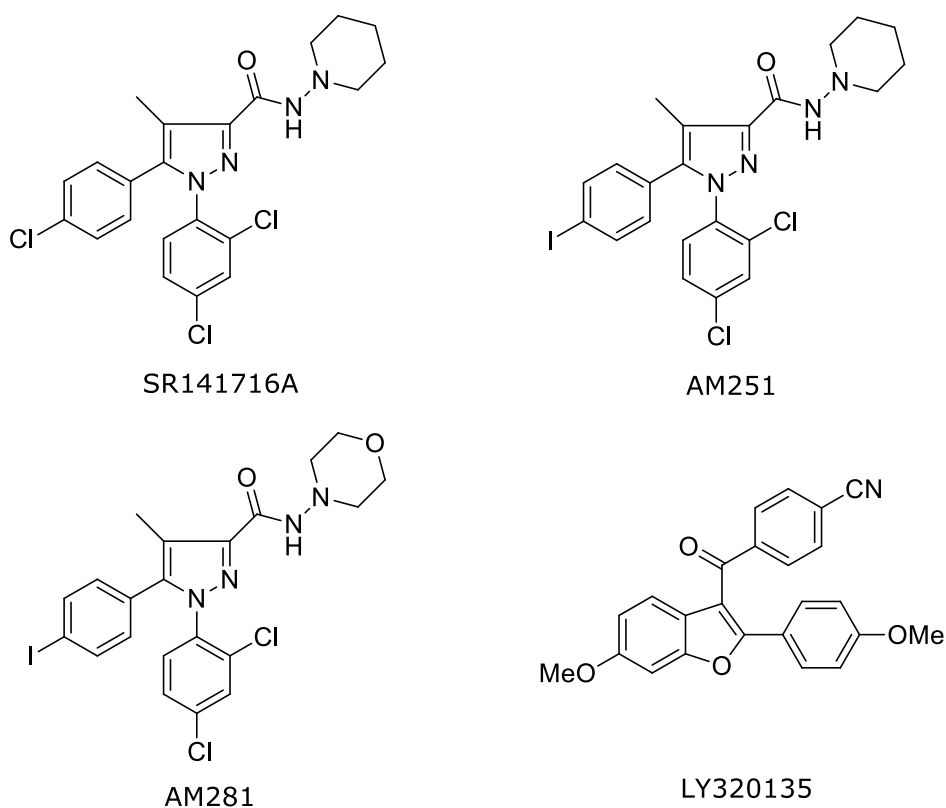


Figura 22. Struttura degli antagonisti/agonisti CB- selettivi.

Antagonisti/agonisti inversi CB2 selettivi

I principali composti di questa classe sono AM630⁶⁶ e SR144528⁶⁷(figura 23), pur mostrando attività di antagonismo sui CB2, sono considerati agonisti inversi perchè quando somministrati da soli, producono effetti cannabimimetici inversi nei tessuti che esprimono il recettore CB2.⁶⁸ Alcuni di essi sono stati sviluppati come antiinfiammatori ed analgesici.⁶⁹

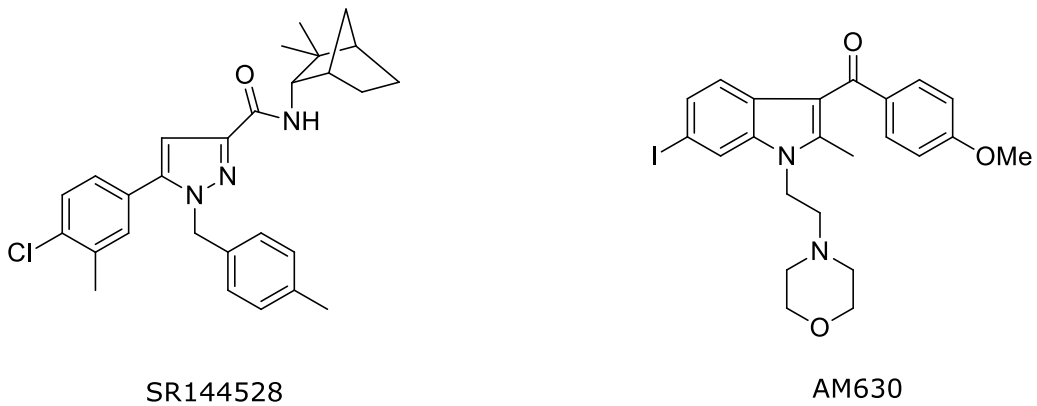


Figura 23. Struttura degli antagonisti/agonisti CB2-selettivi.

Antagonisti neutrali dei recettori cannabinoidi

Composti con attività di antagonismo inverso sono interessanti dal punto di vista farmacologico poichè producono effetti solo in presenza di elevati livelli di endocannabinoidi, si legano ai recettori CB con elevata affinità e non agiscono da agonisti o

agonisti inversi.

Attualmente non è stato ancora sviluppato un antagonista neutro per il recettore CB2, ma esistono antagonisti neutri CB1-selettivi: O-2654, O-2050 un analogo solfonammidico del Δ^8 -THC con catena laterale acetilenica, e VCHR analogo di SR141716A.⁷⁰

Usi terapeutici dei derivati cannabinoidi

Le proprietà medicinali della Cannabis sativa L. sono conosciute fin dai tempi antichi, per prime ricordate nella Cina della dinastia Shen Nung nel 2737 A.C., e ben conosciute e impiegate dai medici nella Gran Bretagna vittoriana per ridurre la sensibilità dolorifica ed ottenere l'azione analgesica.⁷¹ C'è voluto più di un secolo per identificare i componenti della pianta, oggi definiti cannabinoidi (nel 1964 furono caratterizzati il cannabidiolo e il Δ^9 -THC)⁷² e la scoperta e la clonazione fra il 1980 e il 1990 dei recettori cannabinoidi,⁷³⁻⁷⁵ per i quali esistono ligandi esogeni (i cannabinoidi) ha portato all'identificazione nei tessuti animali di ligandi endogeni, quali AEA ⁷⁶ e 2-AG,⁷⁷ gli endocannabinoidi e da qui si sono aperte le porte per lo studio del sistema endocannabinoide.

I cannabinoidi hanno effetti sul sistema nervoso centrale e alcuni di questi possono essere utilizzati a fini terapeutici, quali analgesia,⁷⁸ stimolazione dell'appetito, induzione del sonno, proprietà anticonvulsivanti, effetti sulla termoregolazione⁷⁹. Altri effetti a livello centrale sono, invece, indesiderati, di tipo psicotropo che inducono un potenziale di abuso e quindi un uso

illecito. Infatti questi effetti di euforia, di alterazioni cognitive sono ricercati fumando le parti aeree della Cannabis sativa L.^{80,1,2}

Attualmente sono tre i farmaci in commercio a base di derivati cannabinoidi : Cesamet®, Marinol® e Sativex® e sono utilizzati per l'azione anti-emetica,⁸¹ la stimolazione dell'appetito, per i disturbi metabolici,^{82,83} contro il dolore neuropatico.⁸⁴

Nel 1981 è stato approvato il nabilone (Cesamet®), analogo di sintesi del Δ^9 -THC per ridurre la nausea e il vomito a seguito di trattamento chemioterapico nei pazienti oncologici. E successivamente è stato approvato il dronabinol (Marinol®), altro analogo sintetico del Δ^9 -THC, come antiemetico. Inoltre il dronabinol nel 1992 è stato autorizzato come stimolante dell'appetito per trattare pazienti affetti da HIV o da cancro, in fasi avanzate della malattia.

L'antagonismo selettivo CB1 aveva mostrato in studi clinici buoni risultati nel trattamento dell'obesità. Infatti nel 2006 in Europa è stato messo in commercio il rimonabant (Acomplia®) o SR141617A, antagonista/agonista inverso CB1, come farmaco anti-obesità, ma nel 2008 l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) lo ha ritirato dal mercato per motivi di sicurezza. È stato riscontrato un aumento di casi di depressione e induzione al suicidio nei pazienti trattati con il rimonabant.⁸⁵

In Italia con decreto GU del 30 aprile 2013 è stato approvato il Sativex® per il trattamento della spasticità muscolare causata da sclerosi multipla, in pazienti che abbiano assunto altri trattamenti per la spasticità, ma senza aver ottenuto adeguati benefici e con eccessivi effetti collaterali. Sativex è uno spray orale contenente due estratti derivati dalla Cannabis sativa L.: Δ^9 -THC e

cannabidiolo (CBD). In uno studio di fase III è stato testato il Sativex su pazienti affetti da spasticità e che non rispondevano ai classici antispastici: circa il 42% dei partecipanti allo studio mostrava un miglioramento. Tre quarti di coloro che avevano risposto al trattamento avevano riportato un miglioramento superiore al 30% nel punteggio di valutazione della loro spasticità, entro quattro settimane rispetto a pazienti trattati con placebo. I risultati di questi studi clinici sono stati pubblicati sulla rivista scientifica *Multiple Sclerosis* nel 2010 (*Metanalysis of the efficacy and safety of sativex (nabiximols), on specific people with multiple sclerosis*, 2010; 16[6]: 707-14) a confermare l'efficacia del Sativex.

**INTRODUZIONE
ALLA PARTE SPERIMENTALE**

Gli effetti terapeutici della pianta *Cannabis sativa* L. erano conosciuti già nella Cina del 2700 A.C., e utilizzati dai medici nell'Inghilterra vittoriana come analgesico in vari stati dolorosi.⁷¹ Dapprima furono identificati i costituenti della pianta, i fitocannabinoidi, classe di derivati terpenoidi, fra cui il principale il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC identificato nel 1964),⁷² che è dotato di effetti psicotropi e vari effetti farmacologici come l'azione analgesica,^{50,85} antiemetica⁸¹ e la riduzione della pressione intraoculare.⁵³ Successivamente venne scoperta la presenza, nel cervello, di due recettori accoppiati a proteine G responsabili degli effetti dei cannabinoidi: di lì a poco furono clonati i recettori cannabinoidi CB1 (1988) e CB2 (1993).⁷²⁻⁷⁴ Questa scoperta suggerì l'esistenza di ligandi endogeni per tali recettori. Furono così successivamente isolati gli endocannabinoidi anandamide (AEA)⁷⁶ e 2-arachidonoilglicerolo (2-AG)⁷⁷ dal cervello suino e bovino. I recettori cannabinoidi e i loro ligandi, insieme agli enzimi coinvolti nella biosintesi, degradazione e trasporto di questi ultimi, costituiscono l'ormai ampiamente noto Sistema endocannabinoide (ECS), il quale risulta essere coinvolto in numerosi processi fisiopatologici.⁵

Il recettore CB1 è il principale responsabile degli effetti psicoattivi a livello centrale che induce anche il consumo illegale di Cannabis, quali euforia, sedazione, alterazione spazio-temporale, e aumento della sensibilità e della percezione.^{80,1,2,} Infatti il recettore CB1 è maggiormente espresso a livello del sistema nervoso centrale,⁴⁴ nell'ippocampo, nei gangli della base, nella corteccia cerebrale, nell'amigdala e nel cervelletto, regioni che controllano la memoria e l'apprendimento, la coordinazione motoria, i ricordi e le emozioni, alcune funzioni ormonali e la temperatura corporea.

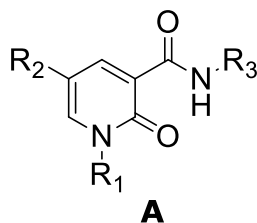
In realtà è ormai ampiamente risaputo che il recettore CB1 è presente anche in alcuni tessuti non neuronali⁸⁷ come fegato, tessuto adiposo, tratto gastrointestinale, polmone, cuore, pancreas.⁸⁸

Il recettore CB2 inizialmente si pensava fosse espresso esclusivamente nelle cellule e nei tessuti del sistema immunitario come milza, timo, tonsille,^{54,89} ma recenti studi hanno messo in evidenza la sua presenza anche a livello centrale.⁹⁰ In particolare, la stimolazione del recettore CB2 modula lo stato di attivazione delle cellule della microglia, senza interferire con le normali funzioni dei neuroni centrali. Per queste ragioni la ricerca si è indirizzata verso il recettore CB2 come potenziale target terapeutico per il trattamento degli stati di dolore infiammatorio e neuropatico,^{78,91} sclerosi multipla, malattia di Parkinson e di Alzheimer, stati infiammatori gastrointestinali, disturbi epatici, aterosclerosi, disturbi metabolici.¹⁵ Inoltre, studi *in vitro* ed *in vivo* su modelli animali hanno evidenziato l'azione anti-tumorale di agonisti CB2 selettivi nell'inibire la crescita tumorale, l'angiogenesi e la formazione di metastasi mediante l'induzione all'apoptosi cellulare.⁹²

Queste scoperte hanno spinto i ricercatori a sviluppare ligandi CB2 selettivi, con attività terapeutica e privi delle azioni centrali mediate dai recettori CB1.

Nel programma di ricerca svolto all'interno del laboratorio dove ho effettuato la mia tesi sperimentale, finalizzato alla scoperta di ligandi CB2 selettivi, è stata sviluppata una serie di derivati piridin-2-oni-3-carbossamidici, aventi struttura generale **A** (Figura 24).^{93,94} Questi composti sono caratterizzati dalla presenza di un "core" lipofilo centrale, rappresentato dal nucleo piridin-2-one, collegato, in posizione 3, con un gruppo carbossamidico non aromatico (R₃), in posizione 1, con un sostituito lipofilo (R₁) e

portante o meno un sostituito, anch'esso lipofilo, in posizione 5 (R_2).

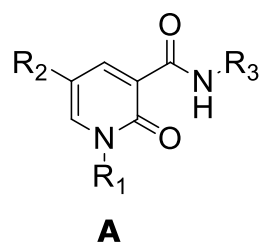


R_1 : etilmorfolina, *p*-fluorobenzile, *n*-butile
 R_2 : H, fenile, 4-metossifenile, 4-fluorofenile,
trans-vinilbenzene, etilacrilato
 R_3 : 4-metilcicloesile, cicloeptile

Figura 24. *Struttura generale dei derivati 2-piridinon-3-carbossammidici*

I derivati piridin-2-oni-3-carbossammidici **A** hanno mostrato dei dati di binding piuttosto variabili, sia per quanto riguarda il recettore CB1 ($1000 \text{ nM} < K_i < 43 \text{ nM}$) che per quanto riguarda il recettore CB2 ($7900 \text{ nM} < K_i < 7.8 \text{ nM}$) (Tabella 1).⁹⁴ L'affinità e la selettività di questi composti per il recettore CB2 sono risultate abbastanza significative e, in più, le caratteristiche di solubilità ottimali di questo tipo di composti si dimostrano sicuramente utili per la progettazione e lo sviluppo di ligandi CB2 caratterizzati da una buona biodisponibilità. Inizialmente erano stati preparati anche gli analoghi piridinici-3-carbossammidici sostituiti in posizione 2, ma questi ultimi hanno mostrato valori di affinità e selettività nei confronti dei recettori CB2 nettamente inferiori.^{93,94}

Tabella 1. Valori di binding dei principali derivati piridin-2-oni-3-carbossamidici A.⁹⁷



	R ₁	R ₂	R ₃	K _i (nM)		
				CB1	CB2	SI ^a
A1	<i>p</i> -fluorobenzile	H	cicloeptile	43	7.8	5.5
A2	benzile	H	cicloeptile	56 ± 2.8	8 ± 0.4	7
A3	<i>p</i> -clorobenzile	H	cicloeptile	55 ± 2.6	4.2 ± 0.2	13.1
A4	<i>p</i> -fluorobenzile	H	4-CH ₃ -cicloesile	70 ± 2.8	4.8 ± 1.8	14.6
A5	benzile	H	4-CH ₃ -cicloesile	386 ± 8.1	53 ± 2.6	7.3
A6	<i>n</i> -butile	H	4-CH ₃ -cicloesile	1623 ± 9.6	104 ± 2.1	15.6
A7	<i>p</i> -fluorobenzile	<i>p</i> -metossifenile	cicloeptile	63 ± 29	1.0 ± 0.03	63
A8	<i>p</i> -fluorobenzile	fenile	cicloeptile	35 ± 1.7	1.2 ± 0.07	1.8
A9	<i>p</i> -fluorobenzile	<i>p</i> -fluorofenile	cicloeptile	24 ± 0.1	2.8 ± 0.1	8.6
A10	etilmorfolino	<i>p</i> -fluorofenile	cicloeptile	2734 ± 13.3	63 ± 0.3	43.4
A11	<i>p</i> -fluorobenzile	<i>Trans</i> -vinilbenzene	cicloeptile	24	7.9	3.0
A12	<i>p</i> -fluorobenzile	etilacrilato	cicloeptile	24.8	13.7	1.8
A13	benzile	H	cicloeptile	1920 ± 9.5	481 ± 2.1	4
A14	<i>p</i> -fluorobenzile	H	4-CH ₃ -cicloesile	884 ± 4.4	80 ± 0.4	11
A15	benzile	H	4-CH ₃ -cicloesile	3093 ± 15.4	594 ± 2.8	5.2

^a *Indice di selettività per i recettori CB2 calcolata come rapporto Ki(CB1R)/Ki(CB2R).*

Da studi successivi, è inoltre emerso che il sostituente in posizione 5 dell'anello piridinico è il principale responsabile della modulazione dell'attività funzionale di tali ligandi nei confronti del

recettore CB2.⁹⁵ Sostituendo infatti l'atomo di idrogeno in posizione 5 con un gruppo fenilico o *p*-metossifenilico, l'attività sul recettore cambia da agonista ad agonista inverso nel primo caso o ad antagonista nel secondo caso⁹⁵ (Figura 25).

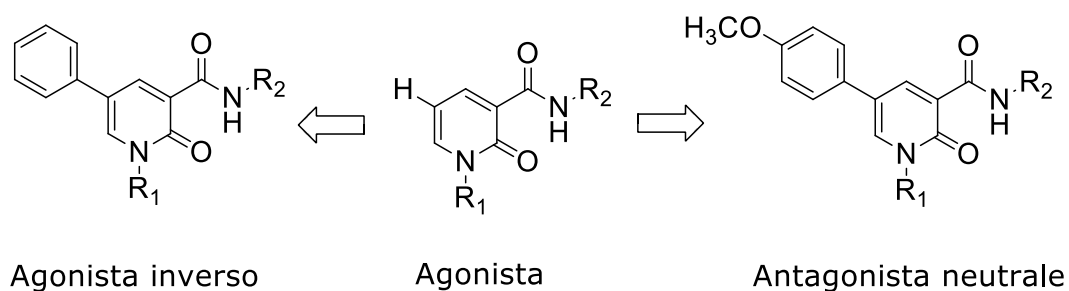
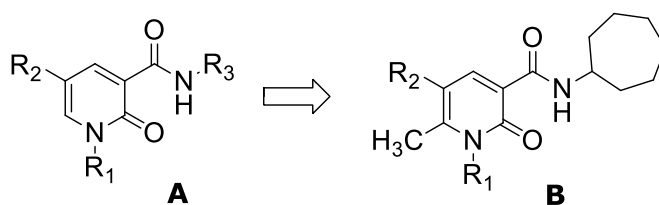


Figura 25. Il sostituente in posizione 5 modula l'attività funzionale dei composti piridin-2-oni-3-carbossammidici.

Successivamente, per approfondire ulteriormente le relazioni struttura attività di questa classe di composti, si è pensato di aggiungere un gruppo metilico in posizione 6 dell'anello piridin-2-one (composti con struttura generale **B**, Figura 26) in modo da valutare l'influenza dell'inserimento di un gruppo di piccole dimensioni nella suddetta posizione, sull'affinità e sull'attività nei confronti dei recettori CB2.

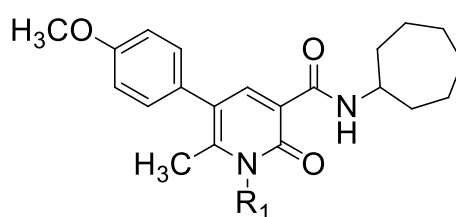


R_1 : *p*-fluorobenzile, etilmorfolina
 R_2 : H, fenile, *p*-metossifenile

Figura 26. Progettazione dei composti con struttura generale **B**.

Nella progettazione di questa nuova classe di potenziali ligandi ai recettori cannabinoidi, i sostituenti sono stati scelti in base ai risultati migliori ottenuti con la serie **A** (si veda Tabella 1). In particolare i nuovi composti presentano lo scaffold 6-metil-piridin-2-one con in posizione 1 un gruppo *p*-fluorobenzilico o etilmorfolinico (R_1); in posizione 3 un gruppo N-cicloeptilcarbrossammidico e in posizione 5 o un atomo di idrogeno o un gruppo fenilico o un gruppo *p*-metossifenilico (R_2).

Il mio lavoro di tesi si è inserito nell'ambito di questo progetto di ricerca e ha previsto, nella prima parte, la sintesi dei derivati 6-metil-piridin-2-oni-3-carbossammidici **1** e **2** (Figura 27). Tali composti presentano un gruppo *p*-metossifenilico in posizione 5 e un gruppo etilmorfolinico (**1**) o *p*-fluorobenzilico (**2**) in posizione 1 dell'anello piridinico e sono stati preparati per completare la serie dei derivati 6-metil-piridin-2-oni-3-carbossammidici **B** e quindi per avere un più completo confronto con la serie precedentemente studiata **A**.



- 1:** R_1 = etilmorfolina
2: R_2 = *p*-fluorobenzile

Figura 27. Derivati 6-metil-2-oxo-1,2-diidropiridinici **1** e **2**.

Durante il mio lavoro di tesi ho anche sintetizzato i composti **3-5** (Figura 28) derivanti dall'inserimento di un atomo di bromo in

posizione 5 del nucleo 6-metil-piridin-2-one (**B**) per quanto riguarda i composti **3-4** e dell'anello piridin-2-one (**A**) per quanto riguarda il composto **5**, allo scopo di valutare l'influenza dell'inserimento di un gruppo elettronattrattore, come il bromo, nella suddetta posizione, sull'affinità verso il recettore CB2.

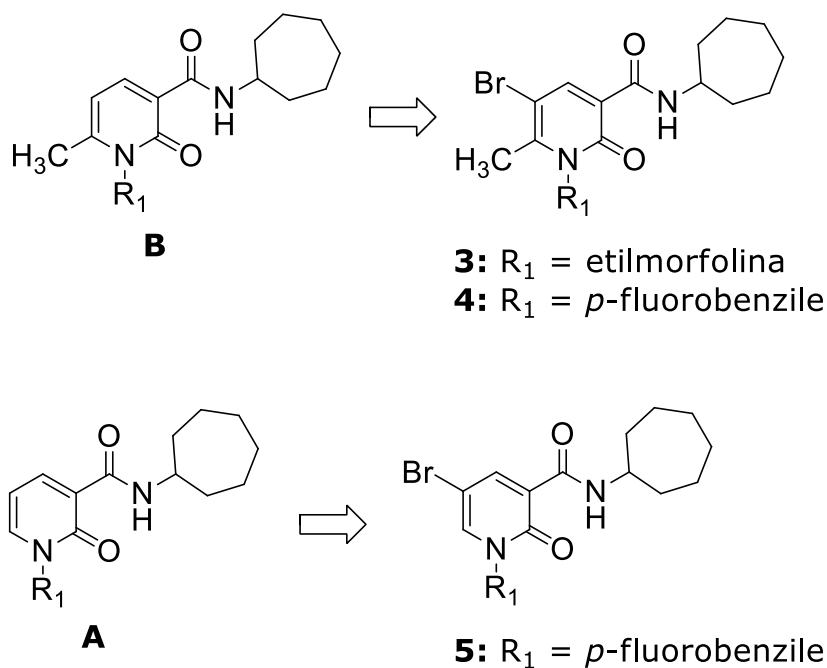


Figura 28. Progettazione dei composti **3-5** derivanti dall'inserimento di un atomo di bromo in posizione 5 dell'anello piridin-2-one **A** e 6-metil-piridin-2-one **B** rispettivamente.

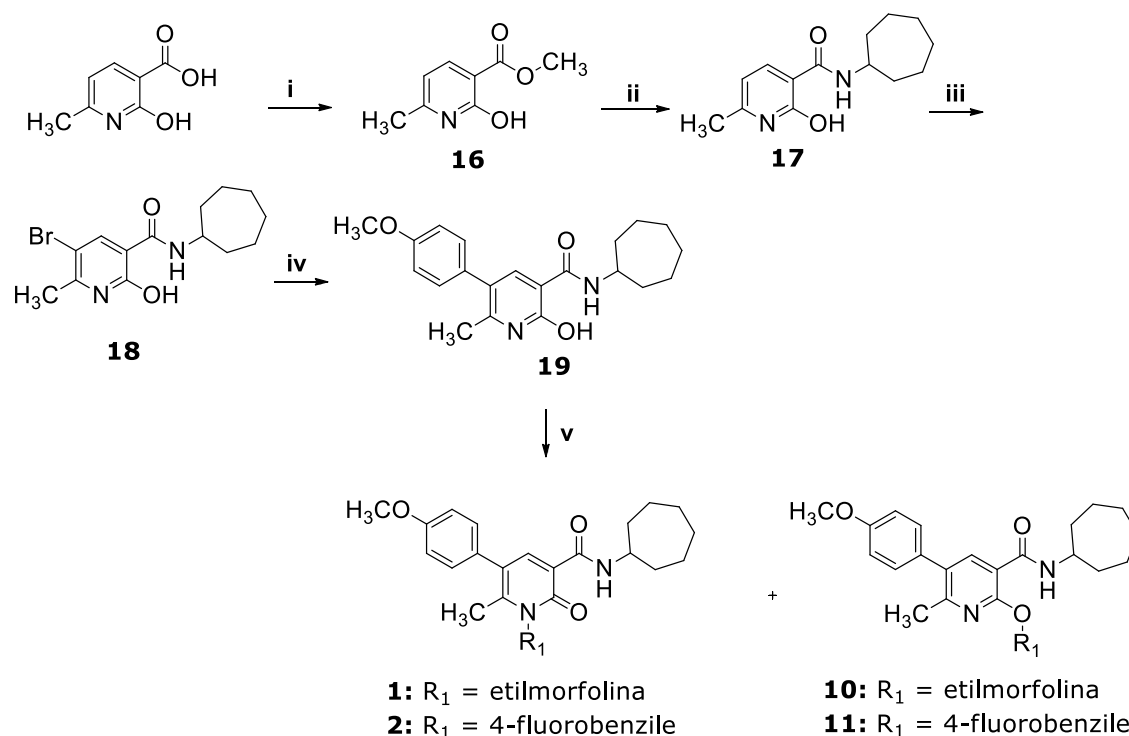
I composti **1-2** sono stati preparati (Schema 1) a partire dall'acido commerciale 2-idrossi-6-metilnicotinico il quale è stato scaldato al microonde (CEM) a 100 °C per 50 minuti (potenza: 200 W, pressione: 100 psi) in presenza di metanolo e acido solforico concentrato⁹⁵ per fornire il corrispondente metil-estere **16**. Quest'ultimo è stato poi convertito nel derivato 3-carbossammidico **17** per trattamento con cicloetilammina a 130 °C in microonde (CEM) per 30 minuti (potenza: 140 W, pressione: 100

psi).⁹⁴ La bromurazione del composto **17** in presenza di una soluzione di bromo in cloroformio⁹⁵ ha fornito il derivato **18**, il quale è stato poi sottoposto ad una reazione di cross-coupling, con l'acido *p*-metossifenilboronico, secondo le condizioni di Suzuki, utilizzando quindi tetrakis (trifenilfosfinopalladio(0)) come catalizzatore, preparato *in situ* e una soluzione 2 M di carbonato di sodio come base, a 110 °C in microonde (CEM) per 60 minuti (potenza: 200 W, pressione 125 psi).⁹⁴ Il derivato 5-sostituito **19** così ottenuto è stato, dunque, sottoposto ad una reazione di N-alchilazione con 4-(2-cloroetil)-morfolina cloridrato, in presenza di carbonato di cesio come base e DMF anidra come solvente, a 55 °C per 24 h.⁹⁶ Dalla reazione di N-alchilazione, oltre al prodotto desiderato (**1**) sostituito in posizione 1 (azoto piridinico), si ottiene, come sottoprodotto, l'isomero di posizione **10**, derivante dall'alchilazione dell'ossigeno in posizione 2 dell'anello piridinico. Il grezzo di reazione ottenuto è stato, dunque, purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice al fine di separare i due isomeri, ottenendo il composto N-alchilato **1** con resa del 18%, e il composto O-alchilato **10** con resa del 57%.

Il composto **2** è stato ottenuto in maniera del tutto simile (Schema 1), trattando però il derivato 5-sostituito **19**, con *p*-fluorobenzilcloruro, in DMF anidra e utilizzando il carbonato di cesio come base. Questa volta però la miscela di reazione è stata scaldata a 30 °C piuttosto che a 55 °C per ridurre la formazione del composto non desiderato derivante dall'alchilazione dell'ossigeno, ipotizzando che a temperature più alte sia favorita l'alchilazione dell'ossigeno in posizione 2 piuttosto che l'azoto in posizione 1. Anche in questo caso però sono stati ottenuti entrambi gli isomeri di posizione, che sono stati separati mediante flash cromatografia

su gel di silice ottenendo il derivato N-alchilato **2** con una resa del 25 % e il derivato O-alchilato **11** con una resa del 38%.

Schema 1. Sintesi dei composti 1-2 e degli analoghi O-alchilati 10-11.

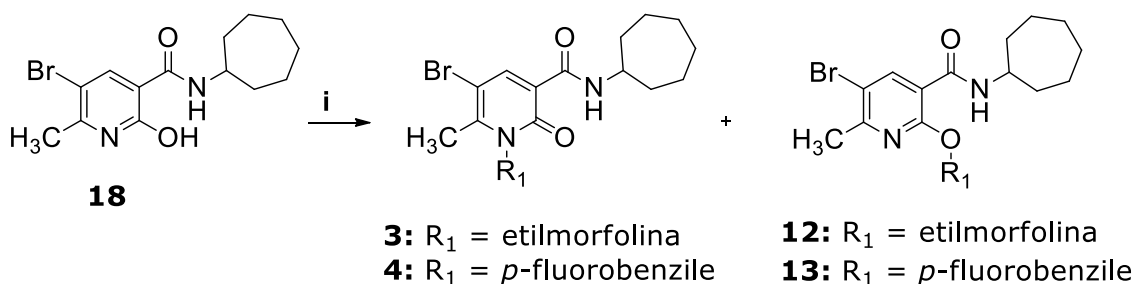


Reagenti e condizioni: (i) MeOH, H₂SO₄ conc., MW: 100 °C, 50 min., (200 W, 100 psi); (ii) cicloptilamina, MW: 130 °C, 30 min. (140 W, 5 bar); (iii) CHCl₃, Br₂, t.a., overnight. (iv) PPh₃, Pd(OAc)₂, 1,4-diossano dist., Na₂CO₃ 2M, acido 4-metosifenilboronico, MeOH, MW, 110 °C, 60 min. (200 W, 125 psi). (v) **1** Cs₂CO₃, DMF anidra, t.a. 1h; **2** R₁Cl, 55 °C, 24h-30 °C, overnight.

Per quanto riguarda i composti **3-4** essi sono stati ottenuti a partire dal composto **18** (Schema 1) il quale è stato sottoposto a reazione di N-alchilazione con 4-(2-cloroetil)morfolina cloridrato, per ottenere il composto **3** o con *p*-fluorobenzilcloruro per ottenere il composto **4**, in presenza di carbonato di cesio in DMF anidra a 30 °C (Schema 2). Anche in questi casi si è resa necessaria

la separazione mediante flash cromatografia su gel di silice dei derivati N-alchilati **3-4** dai corrispondenti isomeri di posizione **12-13**, ottenendo i primi rispettivamente con una resa del 35% e del 22% e i secondi con una resa del 28% e del 50%.

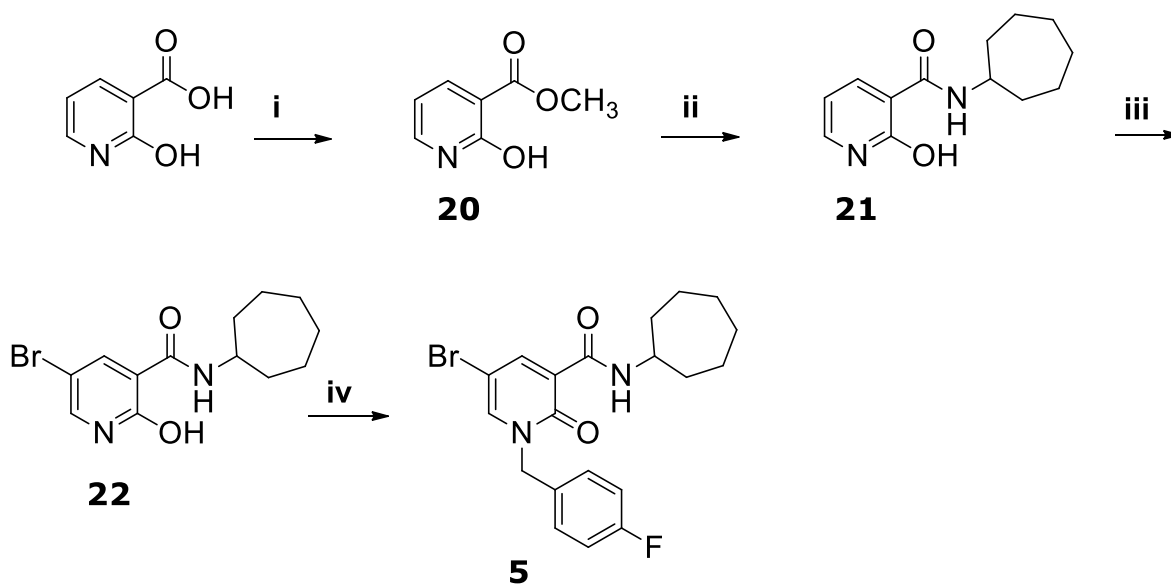
Schema 2. Sintesi dei composti 3-4 e degli analoghi O-alchilati 12-13.



Reagenti e condizioni: (i) **1)** Cs₂CO₃, DMF anidra, t.a. 1h; **2)** R₁Cl, 30 °C, overnight.

Il derivato **5** è stato ottenuto in maniera del tutto simile ai composti precedenti (Schema 3), partendo però dall'acido commerciale 2-idrossinicotinico che, per trattamento con metanolo in presenza dell'acido solforico concentrato, a 100 °C per 50 minuti in microonde (potenza: 200 W, pressione: 100 psi), ha fornito il corrispondente metil-estere **20**. Quest'ultimo è stato poi convertito nel derivato 3-carbossammidico **21** per trattamento con cicloepitilamina a 130 °C in microonde (CEM) per 30 minuti (potenza: 140 W, pressione: 100 psi). La bromurazione del composto **21** in presenza di una soluzione di bromo in cloroformio ha fornito il derivato **22**, il quale è stato trattato con *p*-fluorobenzilcloruro e carbonato di cesio in DMF anidra, per fornire il derivato N-alchilato **5** (resa: 10%).

Schema 3. Sintesi del composto 5.



Reagenti e condizioni: (i) MeOH, H₂SO₄ conc., MW: 100 °C, (200W, 100 psi), 50 min. (ii) cicloptilamina, MW, 130 °C, 30 min. (140 W, 100 psi); (iii) CHCl₃, Br₂, t.a., overnight. (iv) **1**) Cs₂CO₃, DMF anidra, t.a., 1h; **2**) p-fluorobenzilcloruro, 30 °C, 48h.

Successivamente, utilizzando i composti di struttura generale **A** come "building block", si è pensato di verificare l'effetto dello spostamento del sostituente dalla posizione 5 alla posizione 6 dell'anello piridinico, sull'affinità, selettività e attività funzionale verso il recettore CB2 (Figura 29).

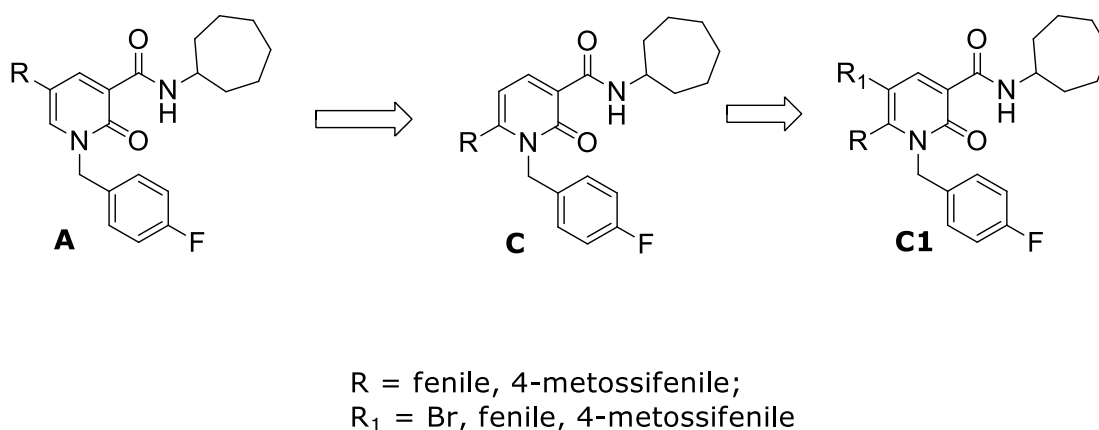
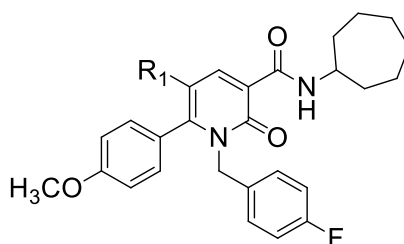


Figura 29. *Composti con struttura generale C e C1.*

Sono stati così progettati i composti 6-aril-piridin-2-oni-3-carbossiamidici con struttura generale **C** caratterizzati dalla presenza di un gruppo fenilico o *p*-metossifenilico in posizione 6 dell'anello piridinico e di un gruppo *p*-fluorobenzilico in posizione 1 (Figura 29). In seguito, a partire dai composti **C** sono stati progettati anche i derivati 6-aril-piridin-2-oni-3-carbossiamidici ulteriormente sostituiti in posizione 5 (**C1**, Figura 29). I sostituenti in 5 (Br, fenile e 4-metossifenile) sono stati scelti in base ai risultati migliori ottenuti con le serie precedenti.

La seconda parte della mia tesi sperimentale si è dunque inserita nell'ambito di questo progetto e ha previsto la sintesi dei composti **6-9** illustrati in Figura 30.



- 6:** R₁ = H;
- 7:** R₁ = Br;
- 8:** R₁ = fenile
- 9:** R₁ = *p*-metossifenile

Figura 30. *Composti 6-9.*

La sintesi del composto **6** (Figura 30) era stata inizialmente progettata a partire dall'acido **25** (Figura 31) il quale, una volta convertito nel corrispondente derivato ammidico, avrebbe fornito il composto **6** mediante una reazione di N-alcilazione, nelle stesse condizioni utilizzate per i composti precedenti.

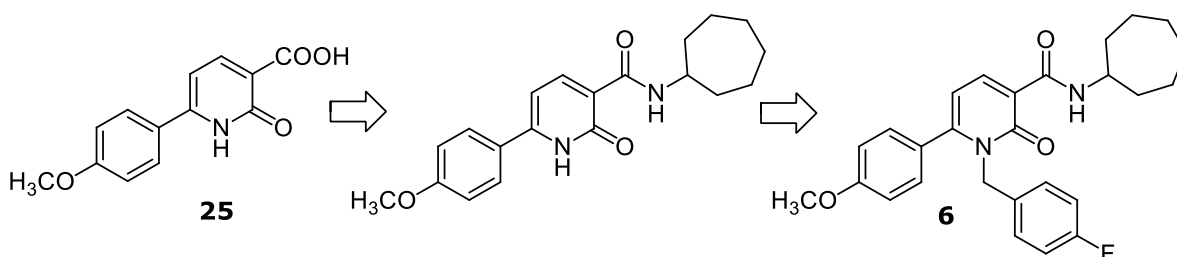
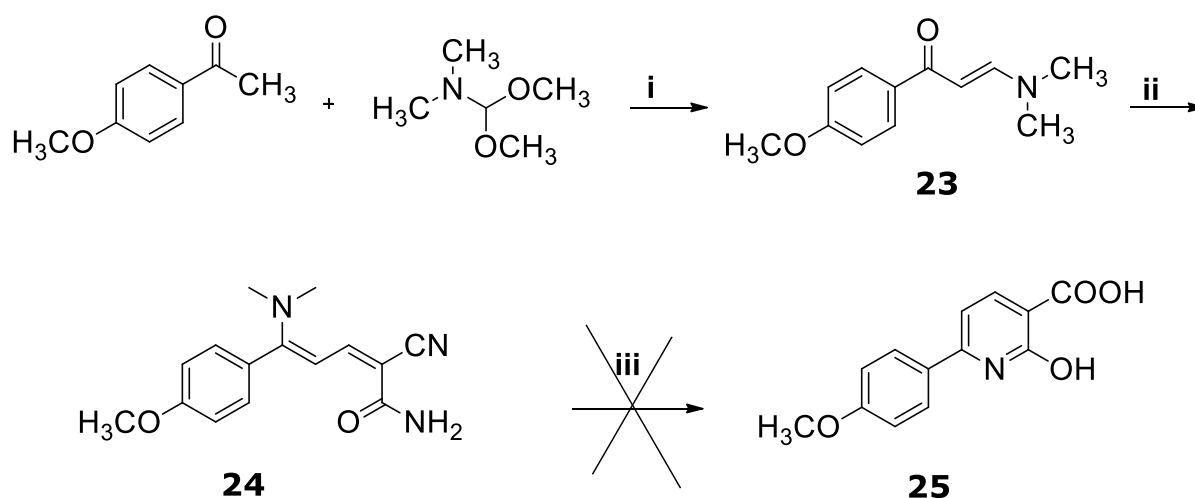


Figura 31. *Progettazione del composto 6.*

L'intermedio chiave di questa procedura sintetica è quindi il composto **25**, la cui preparazione è stata inizialmente tentata se-

guendo una procedura, riportata in letteratura per composti analoghi, e descritta nello Schema 4. Il *p*-metossiacetofenone è stato scaldato a refluxo con *N,N*-dimetilformammide-dimetilacetale in xilene per fornire il corrispondente enamminone **23**.⁹⁷

Schema 4. Tentativo di sintesi per la preparazione del composto 25.



Reagenti e condizioni: (i) xilene, 180 °C a refluxo, 48h; (ii) EtOH ass., malonitrile, piperidina, 80 °C, 5h; (iii): EtOH/HCl (3:1), 90 °C, 3h.

Quest'ultimo è stato trattato con malonitrile e qualche goccia di piperidina, in etanolo assoluto⁹⁸ per fornire, attraverso un particolare meccanismo di reazione (Figura 32), il composto **24**. Successivamente, in base alla procedura riportata da Alnajjar *et al.*⁹⁸, il derivato **24** scaldato a refluxo in EtOH/HCl 3:1 avrebbe dovuto fornire l'intermedio ciclizzato **25**. In realtà, notevoli difficoltà sono state riscontrate nella purificazione della miscela di reazione e il prodotto puro è stato ottenuto in rese piuttosto basse.

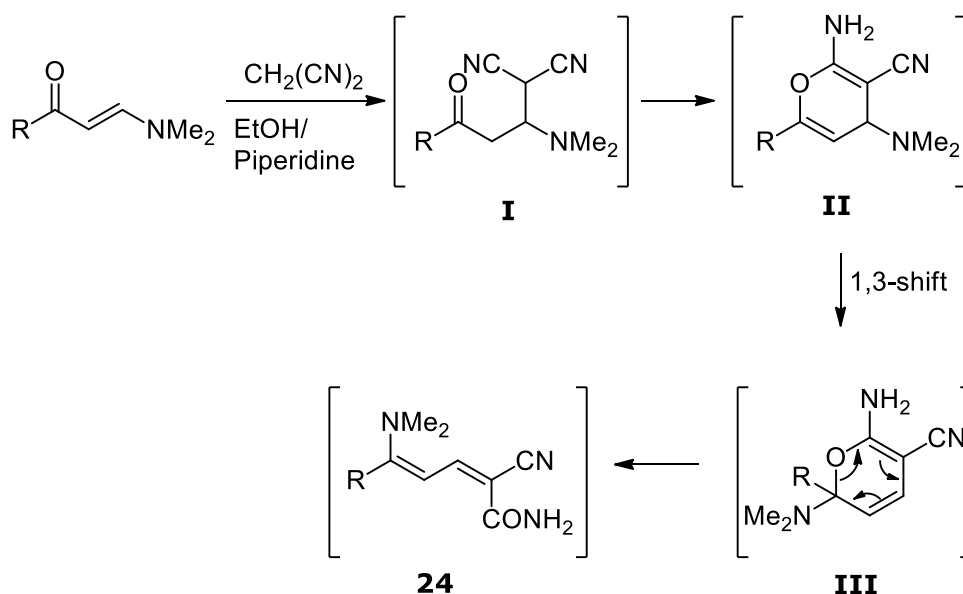
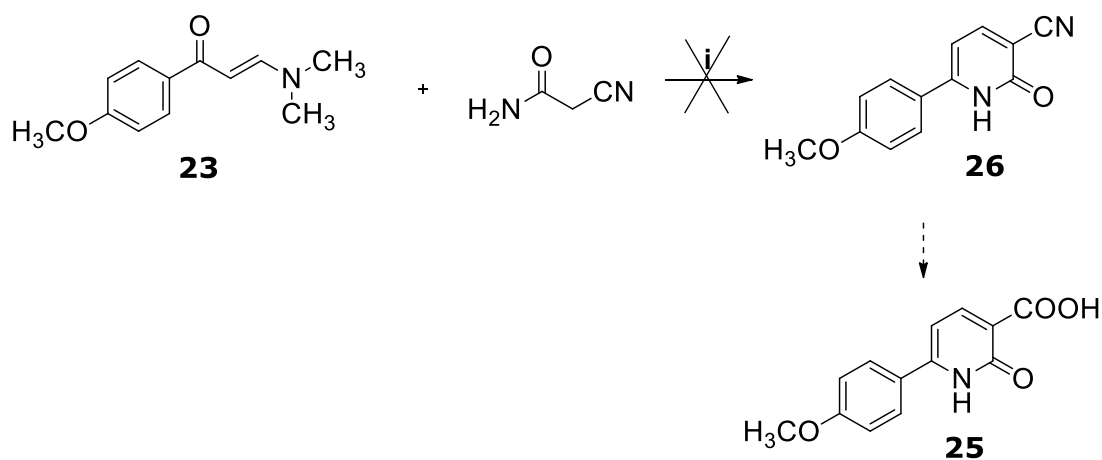


Figura 32. Meccanismo per la formazione dei derivati 2-ciano-5-(dimetilammino)-5-aryl-penta-2,4-dien-ammidici: l'iniziale addizione coniugata 1,4 del malononitrile al doppio legame dell'enamminone fornisce il derivato **I** che ciclizza a **II** il quale a sua volta è convertito in **III** attraverso uno shift 1,3 di un azoto. Infine l'intermedio **III** riarrangia fornendo il derivato **24**.⁶

Successivamente, si ipotizzò di ottenere l'acido **25** per idrolisi del suo precursore 3-carbonitrilico **26** (Schema 5).

Schema 5. Secondo tentativo per la preparazione derivato 25.

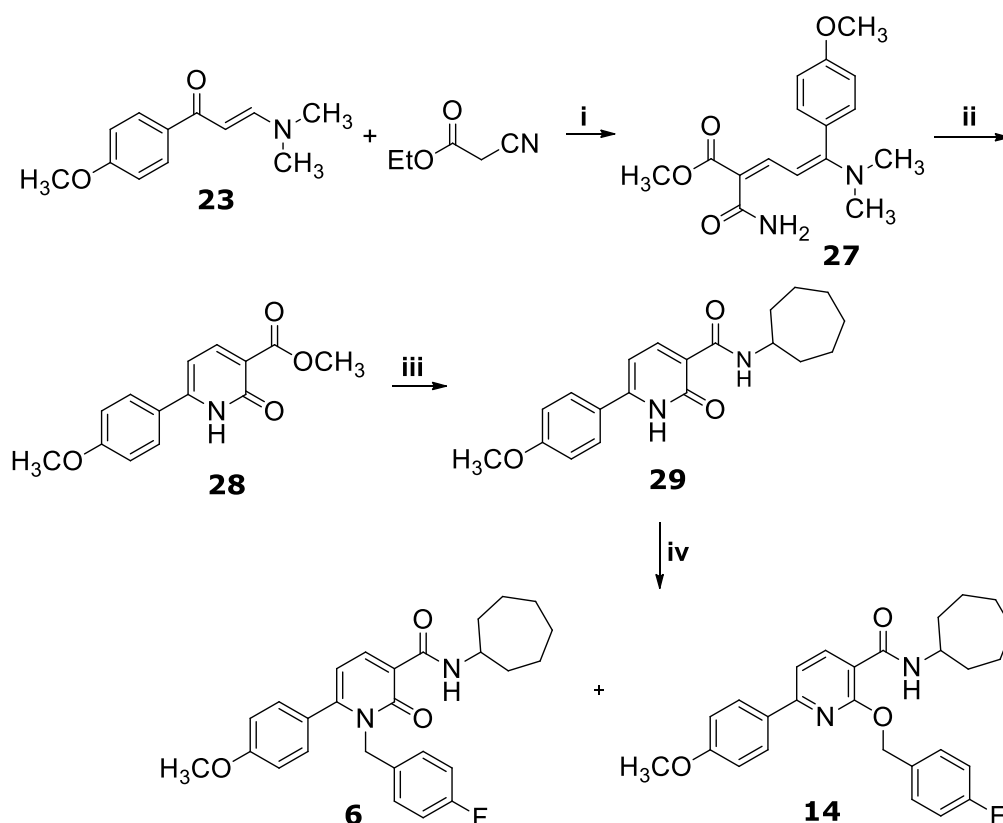


Reagenti e condizioni: (i) DMF anidra, NaH al 60%, 105 °C, per 2h oppure AcCN, MeONa al 25%, 85 °C a refluxo, 3h.

Per ottenere quest'ultimo, l'enamminone **23** è stato fatto reagire con la 2-cianacetammide in DMF anidra in presenza di NaH al 60%, a 105 °C⁹⁹ oppure in acetonitrile utilizzando come base il metossido di sodio 25%, a 85 °C (Schema 5).¹⁰⁰ In entrambi i casi si è ottenuta una miscela di reazione di difficile purificazione che non ha consentito l'ottenimento del composto **26** in rese accettabili per il proseguimento della procedura sintetica.

Infine, dopo diversi tentativi, è stata messa a punto una via sintetica per ottenere il composto **6** in rese soddisfacenti, sulla base di una procedura riportata in letteratura per composti analoghi (Schema 6).¹⁰¹

Schema 6. Via sintetica per la preparazione del composto 6.

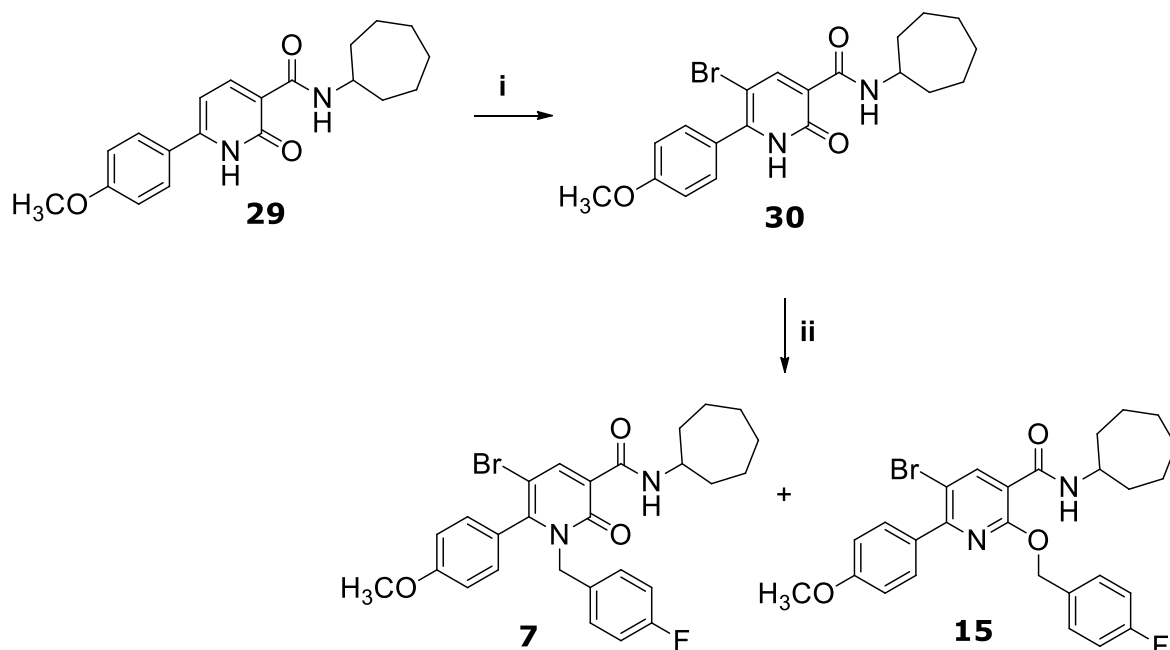


Reagenti e condizioni: (i) EtOH abs., 87 °C a refluxo, 24h. (ii) toluene dist., AcOH, 120 °C a refluxo, 24h. (iii) cicloeptilammina, MW: 130 °C, 30 minuti, (140 W, 100 psi) o 150 °C a refluxo, 48h. (iii) DMF, CsF, p-fluorobenzilcloruro, 30 °C, 24 h.

L'enamminone **23** è stato fatto reagire con cianoacetato di etile in etanolo, a refluxo per fornire il derivato ammidico **27**, che per reazione di ciclizzazione in presenza di acido acetico glaciale, in toluene a refluxo, ha portato al derivato estereo **28**. Quest'ultimo è stato poi convertito nel corrispondente derivato ammidico in modo simile a quanto visto per i composti precedenti, cioè per trattamento con cicloeptilammina a 130 °C in microonde (CEM) per 30 minuti (potenza: 140 W, pressione:100 psi). Infine, l'amide **29** è stata sottoposta ad una reazione di N-alchilazione con *p*-fluorobenzilcloruro per fornire il composto **6**. Questa volta, allo scopo di aumentare le rese dell'N-alchilato rispetto all'isomero O-alchilato, è stato utilizzato il fluoruro di cesio¹⁰² come base piuttosto che il carbonato di cesio. Anche in questo caso è stata ottenuta una miscela dei due isomeri posizionali purificati mediante cromatografia su gel di silice, ottenendo così i composti **6** e **14** rispettivamente con rese del 10% e del 28%.

Successivamente il composto bromurato **7** è stato ottenuto (Schema 7) per trattamento del composto **29** con una soluzione di bromo in cloroformio e successiva N-alchilazione del derivato **30** ottenuto, con *p*-fluorobenzilcloruro, in presenza di fluoruro di cesio, lasciando questa volta la reazione a temperatura ambiente (22-23 °C). Anche questa volta è stata ottenuta una miscela dei due isomeri posizionali e, di conseguenza, si è resa necessaria la loro separazione mediante cromatografia su colonna di gel di silice. I composti **7** e **15** sono stati ottenuti con una resa rispettivamente del 36 % e del 50 %.

Schema 7. Via sintetica per la preparazione del composto 7.

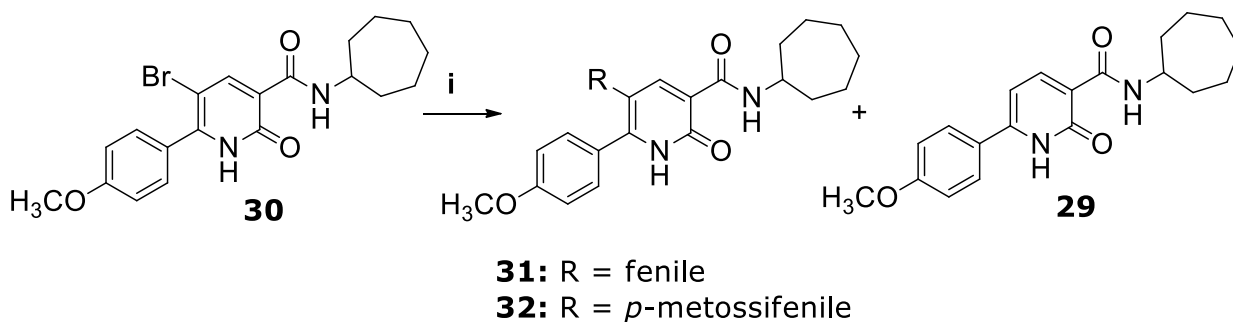


Reagenti e condizioni: (i) Br_2 , $CHCl_3$, t.a., 24h. (ii) CsF , p-fluorobenzilcloruro, DMF anidra, 22-23 °C, 24h.

A questo punto per ottenere i composti **8-9**, in base anche alle procedure sintetiche precedentemente utilizzate (si veda Schema 1), il composto bromurato **30** è stato sottoposto ad una reazione di cross-coupling con l'opportuno acido boronico in presenza del catalizzatore tetrakis preparato *in situ*, di una soluzione di carbonato di sodio 2 M come base, in una miscela di 1,4-diossano anidro e metanolo come solvente (Schema 8). La miscela di reazione è stata poi scaldata in microonde (CEM), a 110 °C per 1h (potenza: 200 W, pressione: 100 psi). In realtà, in entrambi i casi, dopo purificazione del grezzo di reazione mediante cromatografia su colonna di gel di silice, il prodotto di cross-coupling è stato ottenuto in rese troppo basse per poter proseguire con lo step

successivo di N-alchilazione. Inoltre, sorprendentemente, dalla purificazione del grezzo di reazione è stato isolato anche il derivato dealogenato di **30** (corrispondente al composto **29**, precedentemente sintetizzato).

Schema 8. Via sintetica per la preparazione dei composti 31-32.



Reagenti e condizioni: (i) PPh_3 , $Pd(OAc)_2$, 1,4-diossano dist., Na_2CO_3 2M, acido 4-metossifenilboronico, MeOH, MW, 110 °C, 60 min. (200 W, 125 psi).

La ragione della formazione del composto dealogenato come sottoprodotto può essere legata a diversi fattori, come ad esempio condizioni di reazione troppo spinte, quindi quantità eccessiva di catalizzatore e utilizzo del microonde, e in particolare alla presenza di solventi polari come acqua o alcoli che sono considerati "donatori di idruro".¹⁰³ In alcuni casi questi ultimi, durante il ciclo catalitico della reazione di Suzuki, possono causare la formazione del derivato dealogenato come sottoprodotto (Figure 33a e 33b).¹⁰³

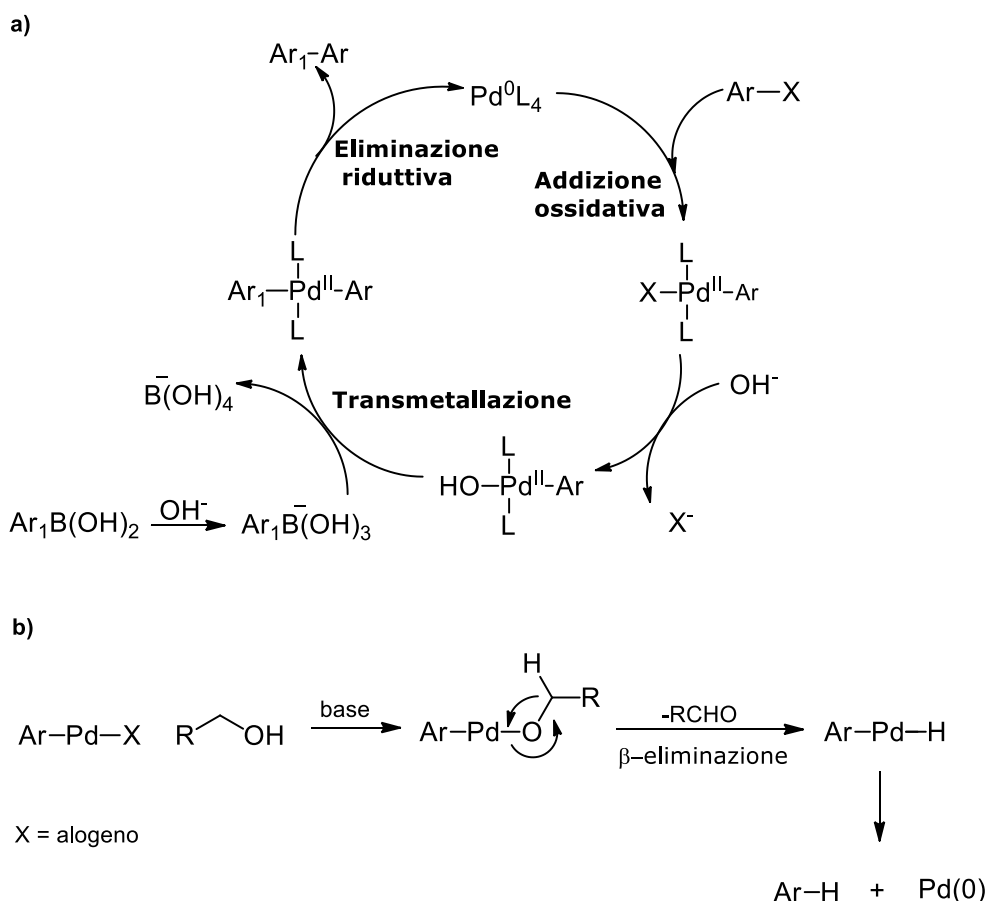


Figura 33. a) Ciclo catalitico della reazione di Suzuki; **b)** Possibile meccanismo di dealogenazione dell'alo-arile derivato mediata dai "donatori di idruro" durante la reazione di Suzuki¹¹.

Per tutti questi motivi sono state fatte diverse modifiche alla procedura di cross-coupling prima descritta. Innanzitutto è stata ridotta la quantità di catalizzatore, la reazione è stata svolta in condizioni termiche invece che al microonde ed è stato eliminato l'utilizzo di solventi polari, come metanolo o etanolo, in precedenza utilizzati per favorire la dissoluzione dell'acido boronico. Quindi, la suddetta cross-coupling, è stata effettuata utilizzando l'opportuno acido boronico, in presenza di 0.03 equivalenti di Pd(OAc)₂ (piuttosto che 0,1) e 0,15 equivalenti di PPh₃ (piuttosto che 0,5), in toluene anidro, a 110 °C, e utilizzando come base inizialmente

Na₂CO₃ acquoso e in seguito K₂CO₃ anidro, per evitare l'utilizzo dell'acqua (Figura 34).

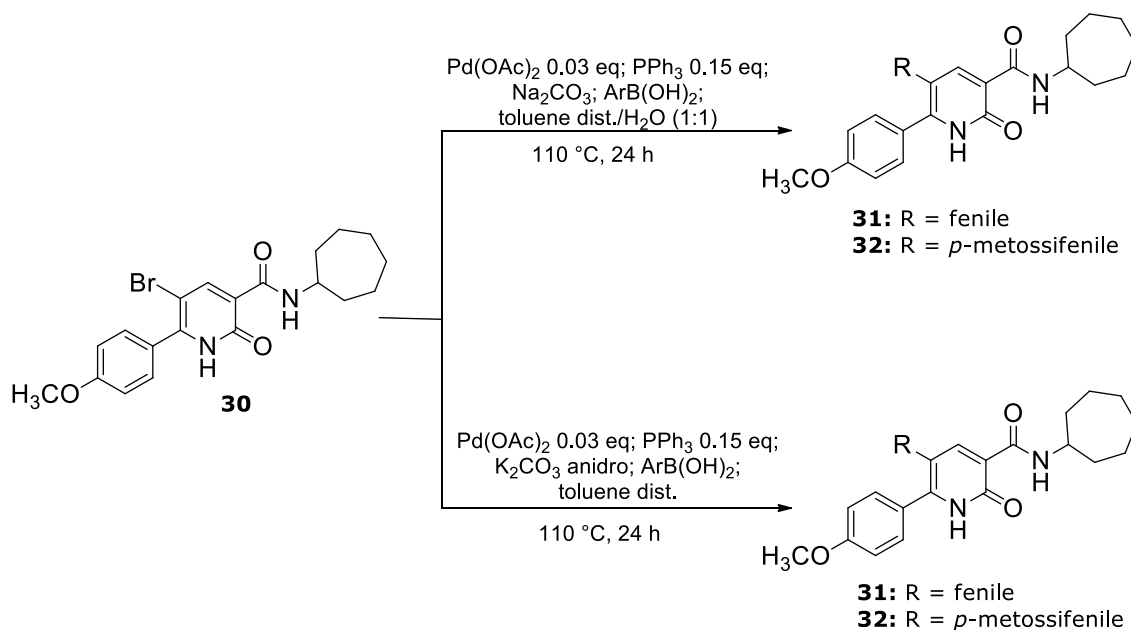


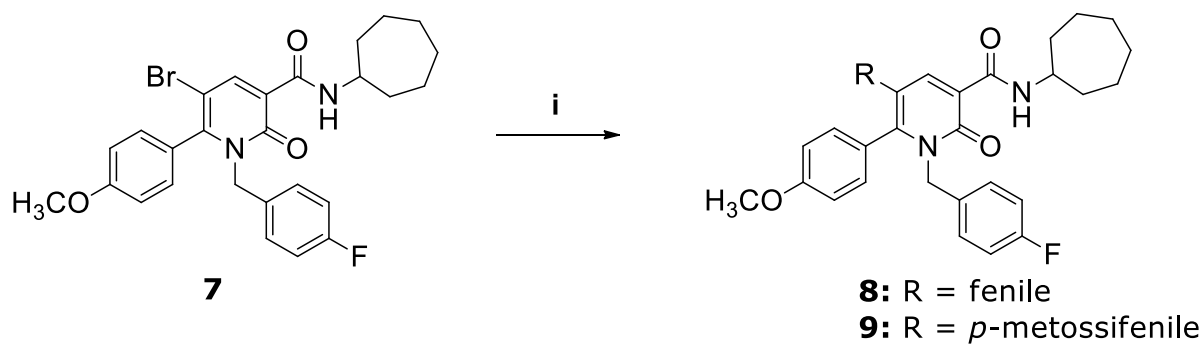
Figura 34. Ulteriori tentativi di ottenimento dei composti **31-32** mediante reazione di cross-coupling.

Nemmeno dopo questi ulteriori tentativi è stato possibile ottenere i prodotti di cross-coupling **30** e **31** in rese accettabili, sebbene migliori rispetto ai precedenti tentativi.

Per tutte queste ragioni si è poi pensato di effettuare la reazione di cross-coupling direttamente sul bromo-derivato N-sostituito **7**. Per cui, il composto **7** è stato trattato con l'acido fenilboronico o con l'acido *p*-metossifenilboronico, in presenza del catalizzatore tetrakis formato *in situ* da Pd(OAc)₂ e PPh₃, e utilizzando K₂CO₃ anidro come base e toluene distillato come solvente.¹⁰⁴ La miscela è stata poi scaldata a 110 °C per 24h (Schema 9). Dopo purificazione del grezzo mediante cromatografia su gel di silice i composti

8 e **9** sono stati ottenuti rispettivamente con una resa 84 % e del 58 %.

Schema 9. Via sintetica per la preparazione dei composti 8-9.



Reagenti e condizioni: (i) toluene dist., PPh_3 , $Pd(OAc)_2$, acido fenilboronico o acido *p*-metossifenilboronico, K_2CO_3 anidro, 110 °C, 24h.

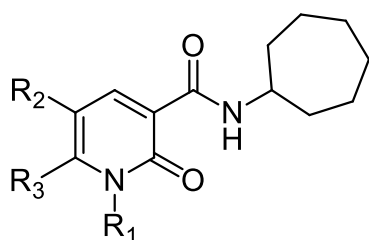
RISULTATI E DISCUSSIONE

Affinità verso i recettori CB1 e CB2

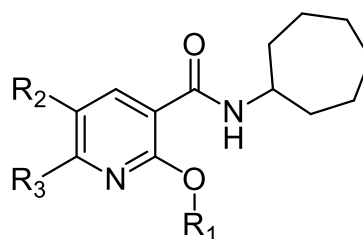
Il composto *N*-cicloetil-5-bromo-piridin-2-oni-3-carbossammidico **5** (appartenente alla serie **A**) e i derivati 6-metil-piridin-2-oni-3-carbossammidici (struttura generale **B**) da me sintetizzati (composti **1-4**), sono stati saggiati presso l'Università di Berna, nel laboratorio di ricerca del Dott. Jürg Gertsch e del Dott. Andrea Chicca.

L'affinità dei suddetti composti è stata determinata mediante esperimenti di binding del radioligando di riferimento [³H]CP-55,940, utilizzando membrane ottenute da cellule CHO-K1 stabilmente transfettate con i recettori *h*CB1 e *h*CB2. I risultati relativi al binding verso i recettori CB1 e CB2 sono illustrati nella Tabella 2, dove sono riportati anche i valori di binding dei composti analoghi, **B5-B11**, precedentemente sintetizzati nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi.

Tabella 2. Valori di binding dei derivati piridin-2-oni-3-carbossamidici.



1-5, B6-B9



10-13, B10-B12

	R ₁	R ₂	R ₃	K _i (nM)		
				CB1	CB2	SI ^a
1	etilmorfolino	<i>p</i> -metossifenile	CH ₃	306.44	96.93	3.16
2	<i>p</i> -fluorobenzile	<i>p</i> -metossifenile	CH ₃	9.85	26.22	0.38
3	etilmorfolino	Br	CH ₃	286.88	28.13	10.19
4	<i>p</i> -fluorobenzile	Br	CH ₃	8.87	2.82	3.14
5	<i>p</i> -fluorobenzile	Br	H	8.75	2.22	4
B6	etilmorfolino	H	CH ₃	≥1000	2.82	-
B7	<i>p</i> -fluorobenzile	H	CH ₃	13.11	4.52	2.9
B8	etilmorfolino	Fenile	CH ₃	247	26.51	9.32
B9	<i>p</i> -fluorobenzile	Fenile	CH ₃	112.51	3.76	29.92
10	etilmorfolino	<i>p</i> -metossifenile	CH ₃	654.6	296	2.21
11	<i>p</i> -fluorobenzile	<i>p</i> -metossifenile	CH ₃	≥1000	50.2	-
12	etilmorfolino	Br	CH ₃	≥1000	≥1000	-
13	<i>p</i> -fluorobenzile	Br	CH ₃	96.33	104.53	0.92
B10	<i>p</i> -fluorobenzile	H	CH ₃	27.91	21.32	1.31
B11	<i>p</i> -fluorobenzile	Fenile	CH ₃	≥1000	244	-
B12	etilmorfolino	Fenile	CH ₃	≥1000	303	-

^a Indice di selettività per i recettori CB2 calcolata come rapporto $K_i(\text{CB1R})/K_i(\text{CB2R})$.

Tali dati indicano che:

- tutti i composti testati mostrano generalmente una maggiore affinità verso i recettori CB2 rispetto ai recettori CB1;
- i derivati N-sostituiti sono più attivi rispetto ai corrispondenti derivati O-sostituiti;
- i composti presentanti in posizione 1 un gruppo *p*-fluorobenzilico possiedono valori di affinità e selettività verso i recettori CB2 migliori dei corrispondenti derivati 1-etilmorfolino-sostituiti;
- l'inserimento di un gruppo metilico in posizione 6 dell'anello piridin-2-one-3-carbossamidico non influenza né l'affinità né la selettività verso i recettori CB2 per quanto riguarda i composti che presentano in posizione 5 dell'anello piridinico un idrogeno (**B7**), un bromo (**5**) o un gruppo fenilico (**B9**) mentre comporta una lieve diminuzione dell'affinità verso i recettori CB2 dei composti con un gruppo *p*-metossifenilico nella medesima posizione (**2**)(si veda la Tabella 1 per il confronto).

Successivamente i composti che hanno mostrato i valori migliori di binding verso i recettori CB (**2**, **4**, **5**, **B7** e **B9**) sono stati testati mediante il saggio del [³⁵S]GTPγS per determinarne l'attività funzionale verso i recettori CB2.

I risultati ottenuti, riportati sulla tesi di Stefano Chicca, mostrano che l'inserimento del gruppo metilico in C6 non sembra influenzare il ruolo l'attività funzionale dei derivati che, invece, non presentano il gruppo metilico (Figura 35).

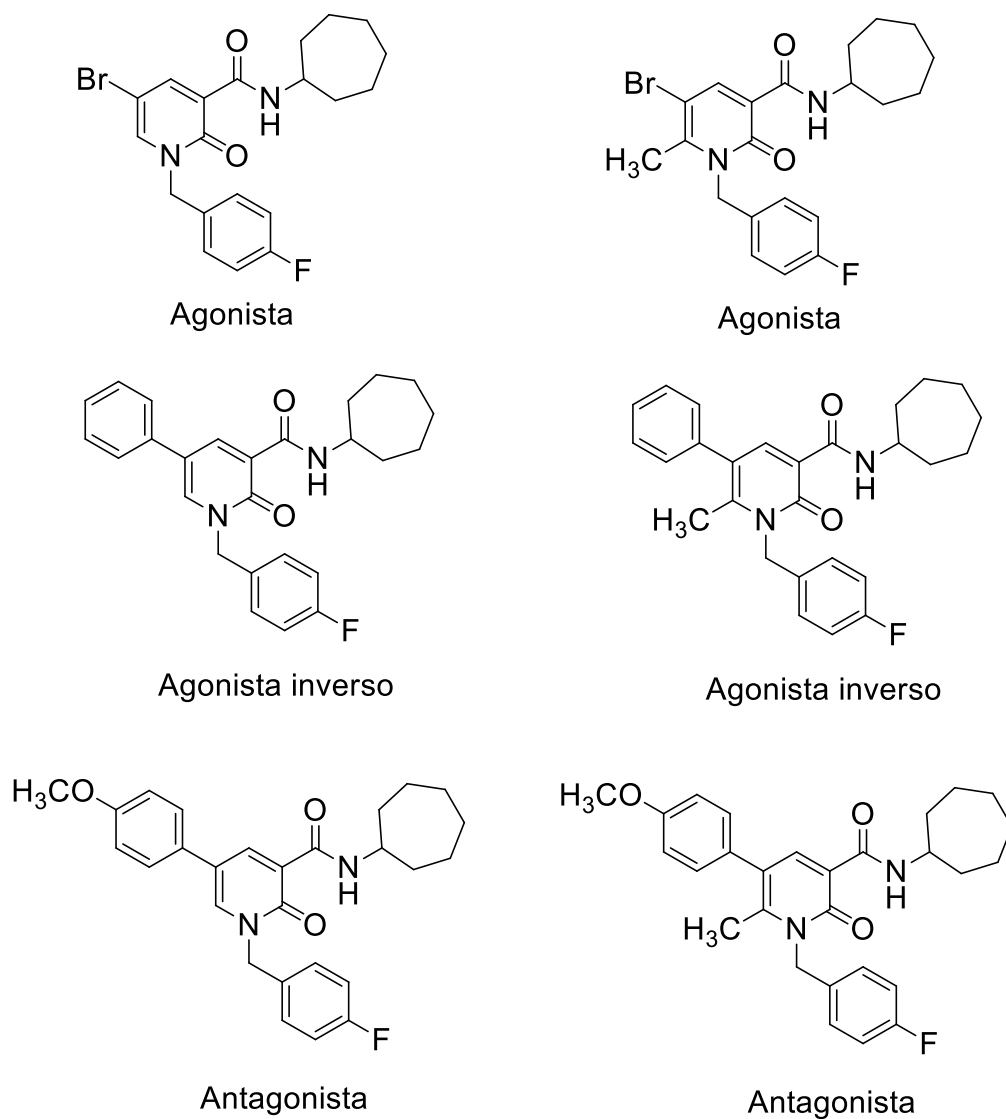


Figura 35. *L'inserimento del metile in C6 non influenza l'attività funzionale dei derivati non metil-sostituiti.*

PARTE SPERIMENTALE

Materiali e metodi

La struttura dei composti è stata confermata per mezzo della spettrometria di risonanza magnetica nucleare protonica ($^1\text{H-NMR}$). Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati utilizzando lo spettro Brucker Avance III TM 400, operante a 400 Hz e sono riferiti al segnale residuo del solvente. I chemical shift δ sono espressi in ppm e le costanti di accoppiamento J sono espresse in Hz.

Le evaporazioni sono state eseguite sotto vuoto in evaporatore rotante. Le TLC analitiche sono state eseguite usando lastre di gel di silice 60 F254 (MERK) contenenti un indicatore fluorescente, e le varie macchie sono state valutate per mezzo di una lampada U.V. (254 nm). Per la cromatografia su colonna è stato usato gel di silice 60 (0.040-0.063 nm) (MERK).

Le procedure assistite dal microonde sono state effettuate con un Biotage iniziator e un CEM Discover[®] LabMateTM Microwave.

Metil 6-metil-piridin-2-one-3-carbossilato (**16**)

776 mg del composto commerciale acido 2-idrossi-6-metil-piridin-3-carbossilico (5 mmol) sono stati sospesi in 3 mL di MeOH (75 mmol) e successivamente è stato aggiunto 1 mL di H₂SO₄ concentrato, sotto agitazione magnetica e in ghiaccio. La miscela è stata scaldata al microonde (CEM) a 100 °C (potenza:200 W, pressione:100 psi) sotto agitazione per 50 minuti. Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata neutralizzata con una soluzione satura di NaHCO₃ fino a pH 8 e poi estratta con CH₂Cl₂. La fase organica è stata essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata fino ad ottenere 618 mg (3,7 mmol) di composto **16** come polvere bianca.

Resa: 74%

¹H-NMR: (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.96 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H₄ Py), 6.08 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H₅ Py), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.01 (s, 3H, CH₃).

***N*-cicloetil-6-metil-piridin-2-one-3-carbossiammide
(17)**

Una miscela di 500 mg del composto **16** (2,99 mmol) e 2,5 mL di cicloeptilammina (6,5 mmol) è stata scaldata al microonde (Biotage®) a 130 °C per 30 minuti in agitazione (potenza: 140 W, pressione 5 bar). Successivamente la reazione è stata raffreddata in ghiaccio e neutralizzata con HCl al 10 % fino a pH = 4. Il precipitato solido ottenuto è stato poi filtrato, lavato ripetutamente con H₂O e anidrificato sottovuoto fornendo 554 mg (2,23 mmoli) di composto **17** puro come solido bianco-giallastro.

Resa: 75%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 13.11 (bs, 1H, NH), 9.63 (bd, 1H, scambiabile), 8.52 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₄ Py), 6.34 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₅ Py), 4.21-4.18 (m, 2H, NCH), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.97-1.55 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-5-bromo-6-metil-piridin-2-one-3-carbossiamide (18)**

Ad una soluzione di **17** (646 mg, 2,6 mmol) in 4,3 mL di CHCl₃ è stata aggiunta, gocciolando lentamente, una soluzione di di Br₂ (0,1 mL, 2,6 mmol) in CHCl₃ (2,6 mL). La miscela di reazione è stata tenuta in agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. Successivamente la reazione è stata diluita con CHCl₃ e lavata con una soluzione satura di Na₂S₂O₃ (x3) e con brine (x1). La fase organica è stata, poi, essiccata su Na₂SO₄, filtrata ed evaporata per ottenere 815 mg (2,5 mmoli) di composto **18** come solido beige.

Resa: >90%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 13.39 (bs, 1H, NH), 9.44 (bd, 1H, scambiabile), 8.65 (s, 1H, H₄ Py), 4.31-4.11 (m, 1H, NCH), 2.53 (s, 3H, CH₃), 1.97-1.58 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-5-(4-metossifenil)-6-metil-piridin-2-one-3-carbossiammide (19)**

2,4 mL di 1,4-diossano, 162,6 mg di trifenilfosfina (0,62 mmol) e 27,8 mg di palladio acetato (0,12 mmol) sono stati aggiunti, in successione, sotto flusso di azoto, all'interno di una fiala da microonde. La miscela è stata quindi lasciata sotto agitazione, a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente sono stati aggiunti, sempre sotto flusso d'azoto, 403 mg di composto **18** (1,24 mmol), 376,9 mg di acido 4-metossibenzenboronico (2,48 mmol), 2,4 mL di Na₂CO₃ e 2,4 mL di MeOH. La miscela di reazione è stata scaldata al microonde (CEM), a 110 °C per 60 minuti, sotto agitazione (potenza: 200 W, pressione: 125 psi).

La miscela di reazione dopo raffreddamento è stata diluita CHCl₃ e lavata con H₂O. La fase organica è stata poi essiccata su Na₂SO₄ anidra, filtrata ed evaporata. Il grezzo così ottenuto è stato purificato su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una miscela *n*-esano/acetato di etile 7:3. Le opportune frazioni, raccolte e riunite, sono state evaporate e hanno fornito 227,9 mg (0,7 mmoli) di composto **19** come solido beige-marroncino.

Resa: 56%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 13.15 (bs, 1H, NH, scambiabile), 9.67 (bd, 1H, scambiabile), 8.54 (s, 1H, H₄ Py), 7.20 (AA'XX', 2H, *J*_{AX} = 6.8 Hz, *J*_{AA'XX'} = 2.6 Hz, Ar), 6.96 (AA'XX', 2H, *J*_{AX} = 6.4 Hz, *J*_{AA'XX'} = 2.4 Hz, Ar), 4.31-4.19 (m, 1H, NCH), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.04-1.54 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-1-(etilmorfolina)-5-(4- metossifenil)-6-
metil-piridin-2-one-3-carbossiammide (1) e *N*-
cicloeptil-2-(etossimorfolina)-piridina-5-(4-
metossifenil)-6-metil-3-carbossiammide (10)**

Ad una soluzione di 200 mg del composto **19** (0,56 mmol) in 2 mL di DMF anidra sono stati aggiunti 365 mg di Cs₂CO₃ (1,12 mmol). La miscela così ottenuta è stata mantenuta in agitazione, a 25 °C per 1 ora. Poi, 156 mg di 4-(2-cloroetil)-morfolina cloridrata (0,84 mmol) sono stati aggiunti alla miscela di reazione che è stata quindi lasciata a 55 °C per 24 ore.

Dopo raffreddamento la reazione è stata triturrata con ghiaccio, ed estratta con CH₂Cl₂. La fase organica è stata raccolta, essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata. Il grezzo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice (flash) usando come eluente una miscela acetato di etile/*n*-esano in rapporto 7:3 per isolare il composto **10** e successivamente 8:2 per ottenere il composto **1**. Le opportune frazioni raccolte e riunite sono state evaporate per fornendo 52,6 mg (0,10 mmoli) del derivato O-sostituito **10** O-sostituito come olio giallo-ambra e 163,4 mg (0,32 mmoli) del derivato N-sostituito **1** N-sostituito come solido giallo-beige.

Resa composto **10**: 57%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 8.32 (s, 1H, Py), 8.10 (bd, 1H, NH), 7.23 (AA'XX', 2H, *J*_{AX} = 8.8 Hz, *J*_{AA'XX'} = 2.5 Hz, Ar), 6.94 (AA'XX', 2H, *J*_{AX} = 8.8 Hz, *J*_{AA'XX'} = 2.5 Hz, Ar), 4.63-4.61 (m, 2H, OCH₂), 4.19-4.11 (m, 1H, NCH), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.74-3.61 (m, 4H, morfolina), 2.74-2.71 (m, 2H, NCH₂), 2.54-2.51 (m, 4H, morfolina), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.03-1.55 (m, 12H, cicloeptile).

Resa composto **1**: 18%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.79 (bd, 1H, NH), 8.41 (s, 1H, Py), 7.13 (AA'XX', 2H, $J_{AX} = 8.8$ Hz, $J_{AA'XX'} = 2.4$ Hz, Ar), 6.94 (AA'XX', 2H, $J_{AX} = 8.7$ Hz, $J_{AA'XX'} = 2.5$ Hz, Ar), 4.32-4.29 (m, 2H, NCH₂), 4.18-4.09 (m, 1H, NCH), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.73-3.68 (m, 4H, morfolina), 2.73-2.71 (m, 2H, NCH₂), 2.58-2.57 (m, 4H, morfolina), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.04-1.51 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-1-(4-fluorofenil)-5-(4- metossifenil)-6-
metil-piridin-2-one-3-carbossiammide (2) e *N*-
cicloeptil-2-(4-fluorofenil)-piridina-5-(4-
metossifenil)-6-metil-3-carbossiammide (11)**

Una miscela di 230 mg di composto **19** (0,65 mmol) e 423 mg di CsCO₃ (1,3 mmol) in 2 ml DMF anidra è stata lasciata in agitazione a 30 °C per 1 ora. Successivamente sono stati aggiunti 0,1 mL di 4-fluorobenzilcloruro (0,98 mmol) e tale miscela è stata lasciata a 30 °C per tutta la notte.

Dopo raffreddamento la reazione è stata triturrata in ghiaccio ed estratta con CHCl₃. La fase organica raccolta è stata essiccata su Na₂SO₄, filtrata ed evaporata. Il grezzo ottenuto è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (flash), usando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 8:2. Le opportune frazioni, raccolte e riunite, sono state evaporate fino ad ottenere 116,1 mg (0,25 mmoli) di derivato O-sostituito **11** come solido bianco-beige e 75,2 mg (0,16 mmoli) di derivato N-sostituito **2**.

Resa composto **11**: 38%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 8.35 (s, 1H, Py), 7.92 (bd, 1H, NH), 7.50-7.46 (m, 2H, Ar), 7.23 (AA'XX', 2H, J_{AX} = 8.8 Hz, J_{AA'XX'} = 2.6 Hz, Ar), 7.14-7.01 (m, 2H, Ar), 6.95 (AA'XX', 2H, J_{AX} = 8.8 Hz, J_{AA'XX'} = 2.5 Hz, Ar), 5.49 (s, 2H, OCH₂), 4.17-4.11 (m, 1H, NCH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 1.87-1.25 (m, 12H, cicloeptile).

Resa composto **2**: 25%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.79 (bd, 1H, NH), 8.50 (s, 1H, Py), 7.16-7.12 (m, 4H, Ar), 7.07-7.01 (m, 2H, Ar), 6.92 (AA'XX', 2H, J_{AX} = 8.8 Hz, J_{AA'XX'} = 2.6 Hz, Ar), 5.46 (s, 2H, NCH₂), 4.18-4.11 (m, 1H, NCH),

3.83 (s, 3H, OCH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.01-1.51 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-1-(etilmorfolina)-5-bromo-6-metil-
piridin-2-one-3-carbossiammide (3)
e *N*-cicloeptil-2-(etossimorfolin)-piridina-5-bromo-6-
metil-3-carbossiammide (12)**

Una miscela di 290 mg di composto **18** (0,88 mmol) e 801 mg di Cs₂CO₃ (5,01 mmol) in 3,9 mL di DMF anidra, è tenuta per 1 ora in agitazione magnetica a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 330 mg di 4-(2-cloroetil)-morfolina cloridrato (2,14 mmol) e la reazione è stata scaldata a 30 °C in bagnetto ad olio per 48 h.

Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata trattata con ghiaccio ed estratta con CH₂Cl₂. La fase organica è stata essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata. Il grezzo ottenuto è stato purificato attraverso cromatografia su colonna di gel di silice, usando come miscela eluente *n*-esano/acetato di etile in rapporto 7:3, e successivamente utilizzando solo acetato di etile. Le opportune frazioni sono state raccolte, riunite, ed evaporate per ottenere 120 mg (0,25 mmol) del derivato O-sostituito **12**, e 150 mg (0,31 mmol) del derivato N-sostituito **3**.

Resa composto **12**: 28%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 8.54, (s, 1H, Py), 8.00 (bd, 1H, NH), 4.61-4.48 (m, 2H, OCH₂), 4.28-4.09 (m, 1H, NCH), 3.81-2.69 (m, 4H, morfolina), 2.84-2.75 (m, 2H, NCH₂), 2.65-2.43 (m, 7H, CH₃/morfolina), 2.15-1.18 (m, 12H, cicloeptile).

Resa composto **3**: 35%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.61 (bd, 1H, NH), 8.58, (s, 1H, Py), 4.37-4.01 (m, 3H, NCH₂/NCH), 3.80-3.55 (m, 4H, morfolina), 2.75-2.41 (m, 4H, NCH₂/morfolina), 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.01-1.18 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-1-(4-fluorobenzil)-5-bromo-6-metil-piridin-2-one-3-carbossiammide (4) e *N*-cicloeptil-2-(4-fluorobenzilossi)-piridina-5-bromo-6-metil-3-carbossiammide (13)**

Ad una soluzione di 300 mg di composto **18** (0,92 mmol) in 1 mL di DMF anidra sono stati aggiunti 599 mg di Cs₂CO₃ (1,84 mmol), tale miscela di reazione è stata scaldata a 30 °C in bagnetto ad olio, per 1 ora, sotto agitazione magnetica. Successivamente sono stati aggiunti 0,2 mL di 4-fluorobenzilcloruro (1,38 mmol) e la reazione è stata lasciata a 30 °C per 24 ore.

Dopo raffreddamento la reazione è stata triturrata con ghiaccio ed estratta con CH₂Cl₂. La fase organica raccolta è stata essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata. Il grezzo ottenuto è stato purificato su colonna di gel di silice (flash) utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 9:1 e, successivamente in rapporto 8:2. Le opportune frazioni raccolte, riunite ed evaporate hanno fornito 216,1 mg (0,5 mmoli) del derivato O-sostituito **13**, come polvere biancastra, e 86,2 mg (0,20 mmoli) del derivato N-sostituito **4** come solido bianco-giallino.

Resa composto **13**: 50%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 8.56 (s, 1H, Py), 7.80 (bd, 1H, NH), 7.47-7.42 (m, 2H, Ar), 7.13-7.08 (m, 2H, Ar), 5.41 (s, 2H, OCH₂), 4.16-4.07 (m, 1H, NCH), 2.59 (s, 3H, CH₃), 1.85-1.50 (m, 12H, cicloeptile).

Resa composto **4**: 22%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.60 (bd, 1H, NH), 8.65 (s, 1H, Py), 7.12-7.02 (m, 4H, Ar), 5.40 (s, 2H, NCH₂), 4.15-4.10 (m, 1H, NCH), 2.52

(s, 3H, CH₃), 2.04-1.52 (m, 12H, cicloeptile).

Metil piridin-2-one-3-carbossilato (**20**)

800 mg del composto commerciale acido 2-idrossinicotinico (5,75 mmol) sono stati disciolti in 3,5 mL di MeOH. Successivamente alla miscela sono stati aggiunti, gocciolando lentamente, 1,2 mL di H₂SO₄ concentrato. La reazione è stata poi scaldata al microonde (CEM) a 100 °C per 50 minuti sotto agitazione (potenza: 200W, pressione: 100 psi). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata neutralizzata con una soluzione satura di NaHCO₃ fino a pH = 8 e poi estratta con CH₂Cl₂. La fase organica è stata raccolta, essiccata con Na₂SO₄, filtrata ed evaporata fino ad ottenere 636 mg (4,15 mmol) di composto **20** come solido bianco.

Resa: 72%

¹H-NMR: (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.07 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, H₄ Py), 7.68 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, H₆ Py), 6.29-6.18 (m, 1H, H₅ Py), 3.39 (s, 3H, OCH₃).

N-cicloeptil-piridin-2-one-3-carbossiammde (21)

Una miscela di 636 mg di composto **20** (4,15 mmol) e 3,4 mL di cicloeptilammina (6,5 mmol) è stata scaldata al microonde (CEM) a 130 °C per 30 minuti sotto agitazione (potenza: 140 W, pressione: 100 psi). Dopo raffreddamento la reazione è stata posta in ghiaccio e neutralizzata con HCl al 10% fino a pH = 4. Il precipitato solido è stato raccolto per filtrazione, lavato con H₂O, e anidrificato sottovuoto. Sono stati ottenuti 424,6 mg (1,85 mmoli) di composto **21** come solido bianco-beige.

Resa: 45%

¹H-NMR: (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.88 (d, 1H, NH), 8.32 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, H₄ Py), 7.71 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, H₆ Py), 6.48-6.39 (m, 1H, H₅ Py), 4.21-3.96 (m, 1H, NCH), 2.10-1.48 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-5-bromo-piridin-2-one-3-carbossiammide (22)**

Ad una soluzione di 423 mg di composto **21** (1,81 mmol) in 3 mL di CHCl₃ è stata aggiunta, gocciolando lentamente, una soluzione di Br₂ (0,1 mL, 1,81 mmol) in 2,3 mL di CHCl₃. La miscela è stata lasciata a temperatura ambiente e in agitazione overnight. In seguito, la reazione è stata lavata con una soluzione satura di Na₂S₂O₃ ed estratta con CHCl₃. La fase organica raccolta, è stata poi essiccata su Na₂SO₄, filtrata ed evaporata, fino ad ottenere 359 mg (1,25 mmoli) di composto **22**.

Resa: 64%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.60 (bd, 1H, NH), 8.54 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, H₄ Py), 7.54 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, H₆ Py), 4.11-3.98 (m, 1H, NCH), 2.10-1.48 (m, 12H, cicloeptile).

3-carbossiammide (**5**)

359 mg di composto **21** (1,15 mmol) e 749,4 mg di Cs_2CO_3 (2,3 mmol) sono stati dissolti in 1 mL di DMF anidra. La miscela così ottenuta è stata lasciata sotto agitazione, per un'ora a 30°C. Successivamente, sono stati aggiunti 0,2 mL di 4-fluorobenzilcloruro (1,72 mmol) e la reazione è stata lasciata a 30°C per 48 ore.

Dopo raffreddamento la reazione è stata triturrata con ghiaccio ed estratta con CH_2Cl_2 . La fase organica è stata poi essiccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata. Il grezzo ottenuto è stato purificato su colonna di gel di silice (flash) utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile in rapporto 7:3. Le opportune frazioni raccolte, riunite ed evaporate hanno fornito 29,7 mg (0,12 mmol) di composto **5** puro come solido giallino.

Resa composto **5**: 10%

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3) δ (ppm): 9.61 (bd, 1H, NH), 8.54 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, H_4 Py), 7.54 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, H_5 Py), 7.30-7.28 (m, 2H, Ar), 7.09-7.05 (m, 2H, Ar), 5.40 (s, 2H, NCH_2), 4.15-4.10 (m, 1H, NCH), 2.52 (s, 3H, CH_3), 2.04-1.52 (m, 12H, cicloeptile).

***E*-3-(dimetilammino)-1-(4-metossifenil)-prop-2-ene-1-one (23)**

1 g di 4-metossiacetofenone (6,66 mmol) sono stati scaldati a reflusso in 8 mL di xilene insieme a 1,8 mL di N,N-dimetilformammide-dimetilacetale (13,32 mmol). Dopo 48 ore, la reazione è stata raffreddata fino a temperatura ambiente e il solvente è stato rimosso per evaporazione. Il residuo solido ottenuto è stato triturato con etere di petrolio e filtrato sotto vuoto fornendo 986,6 mg (4,8 mmoli) di composto **23** come solido marrone.

Resa:72%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 7.90 (AA'XX', 2H, $J_{AX} = 9.2$ Hz, $J_{AA'XX'} = 2.6$ Hz, Ar), 7.79 (d, 1H, $J = 12.4$ Hz, CH=), 6.91 (AA'XX', 2H, $J_{AX} = 9.2$ Hz, $J_{AA'XX'} = 2.6$ Hz, Ar), 5.71 (d, 1H, $J = 12.4$ Hz, CH=), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.15 (bs, 3H, NCH₃), 2.92 (bs, 3H, NCH₃).

(2Z,4Z)-2-ciano-5-(dimetilammino)-5-(4-metossifenil)-penta-2,4-dienammide (24)

1,5 g di composto **23** (7,31 mmol) e 482 mg di malononitrile (7,31 mmol) sono stati scaldati a refluxo a 87 °C, per 5 ore in 7 mL di EtOH ass. insieme a 2-3 gocce di piperidina come catalizzatore. Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata trattata con diossano e il solido precipitato è stato poi raccolto per filtrazione, fornendo il composto **24** come solido marrone di 316,7 mg (1,17mmoli).

Resa: 16%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 7.48 (d, 1H, H₃, *J* = 12.8 Hz), 7.11 (AA'XX', 2H, *J*_{AX} = 8.8 Hz, *J*_{AA'XX'} = 2.4 Hz), 6.95 (AA'XX', 2H, *J*_{AX} = 8.8 Hz, *J*_{AA'XX'} = 2.4 Hz), 5.79 (d, 1H, H₄, *J* = 12.8 Hz), 5.69-5.31 (bs, 2H, NH₂), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (bs, 3H, NCH₃), 2.86 (bs, 3H, NCH₃).

Acido 6-(4-metossifenil)-piridin-2-one-3-carbossilico (25)

271 mg di composto **24** (1 mmol) sono stati scaldati a 90 °C per 3 ore con 1 mL di EtOH/HCl 3:1. Dopo raffreddamento il solido formatosi è stato filtrato sottovuoto e lavato con EtOH, fornendo un solido giallo la cui analisi mediante ¹H-NMR ha evidenziato la presenza di numerose impurità. Non è stato dunque possibile ottenere il composto **25** sufficientemente puro da poter proseguire con la procedura sintetica.

L'EtOH/HCl 3:1 è stato preparato fresco in un pallone a 3 colli contenente NaCl e in cui è stato fatto gocciolare lentamente H₂SO₄ concentrato, così da permettere la formazione di HCl gassoso, che è stato fatto gorgogliare in una bottiglia, raffreddata in ghiaccio, contenente una quantità pesata di EtOH assoluto.

Resa: < 2%

¹H-NMR: ¹H-NMR: (DMSO-d₆) δ (ppm): 12.57 (bs, 1H, protone scambiabile), 8.11 (d, 1H, H₄, J = 7.6 Hz), 7.79 (AA'XX', 2H, J_{AX} = 8.8 Hz, J_{AA'XX'} = 2.4 Hz), 7.05 (AA'XX', 2H, J_{AX} = 9.0 Hz, J_{AA'XX'} = 2.4 Hz), 6.70 (d, 1H, H₅, J = 7.3 Hz), 3.81 (s, 3H, OCH₃).

6-(4-metossifenil)-piridin-2-one-3-nitrile (26)

Metodo 1:

Ad una soluzione di 360 mg di composto **23** (1,78 mmoli) in 3,4 mL di DMF anidra, sono stati aggiunti, a 0 °C, 85,4 mg di NaH al 60% (3,56 mmol), seguiti da 150 mg di cianoacetammide (1,78 mmol). La miscela di reazione è stata scaldata a 105 °C per 2 ore. Successivamente il solvente è stato rimosso mediante evaporazione e il residuo ottenuto è stato sospeso in H₂O, addizionato di acido acetico fino a pH = 5 e poi scaldato a 70 °C. Le numerose difficoltà nel purificare il grezzo di reazione ottenuto, non hanno consentito di isolare il composto desiderato. In questo caso pur mettendola in ghiaccio non si è mai avuta precipitazione e quindi non è stato possibile separare il composto **26** dalla miscela di reazione.

Metodo 2:

In alternativa, a 3,56 mL di MeONa al 25% (3,56 mmol) dissolti in 7 mL di acetonitrile, è stata gocciolata lentamente, a 0 °C, una miscela di 150 mg di composto cianoacetammide (1,78 mmol) in 1,5 mL di acetonitrile, seguita da una miscela di 327 mg di composto **23** (1,62 mmol) anch'esso dissolto in acetonitrile (1,2 mL). La miscela ottenuta è stata scaldata a 85 °C per 3 ore. Successivamente la miscela di reazione è stata acidificata fino a pH = 4 con HCl 2N e lasciato in agitazione per 30 minuti. Il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con acqua, *n*-esano e EtOH. Lo spettro ¹H-NMR del solido ottenuto ha mostrato numerose impurità. Di conseguenza, non avendo ottenuto puro il composto **26** desiderato, non si è reso possibile il proseguimento della procedura sintetica.

(2E-4Z)-etil-2-carbamoil-5(dimetilamino)-4-(4-metossifenil)penta-2,4-dienoato (27)

1 g di composto **23** (4,88 mmol) e 0,6 mL di etilcianoacetato (5,36 mmol) sono stati dissolti in 5 mL di EtOH assoluto. La miscela di reazione, così ottenuta, è stata scaldata a refluxo per 48 ore. Dopo raffreddamento, il precipitato ottenuto è stato raccolto per filtrazione e lavato con etere etilico e acetato di etile fornendo 806 mg (2,5 mmoli) di composto **27** come polvere di color giallo acceso.

Resa: 54%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 8.40 (bs, 1H, NH), 7.50-7.50 (m, 4H, Ar), 7.27-7.15 (m, 2H, 3,4 CH=), 5.27 (bs, 1H, NH), 2H, $J_{AX} = 8.8$ Hz, $J_{AA'XX'} = 2.4$ Hz), 5.79 (d, 1H, H₄, $J = 12.8$ Hz), 5.69-5.31 (bs, 2H, NH₂), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 4.43 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, OCH₂CH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 1.42 (t, 3H, OCH₂CH₃).

Etil 6 (4-metossifenil)-piridin-2-one-3-carbossilato (28)

700 mg di composto **27** (2,2 mmol) sono stati sospesi in 8 mL di toluene anidro e addizionati di 0,1 mL di AcOH (2,2 mmol). La miscela di reazione è stata scaldata a refluxo per 24 ore, mediante un'apparecchiatura di Dean-Stark. Dopo raffreddamento, la reazione è stata posta in ghiaccio per favorire la precipitazione del composto desiderato. Il solido ottenuto è stato raccolto per filtrazione fornendo 495,6 mg (1,81 mmol) di composto **28** come solido giallo-marrone chiaro.

Resa: 82%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 8.23 (d, 1H, *J* = 8 Hz, H₄ Py), 7.96-7.99 (m, 2H, Ar), 7.13 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₅ Py), 7.00 (AA'XX', 2H, *J*_{AX} = 8.8 Hz, *J*_{AA'XX'} = 2.6 Hz, Ar), 4.43 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 1.42 (t, 3H, OCH₂CH₃).

***N*-cicloeptil-6-(4-metossifenil)-piridin-2-one-3-carbossiamide (29)**

444 mg di composto **28** (1,4 mmol) e 1,2 mL di cicloeptilamina (9,1 mmol) sono stati scaldati al microonde (CEM) a 130°C per 30 minuti (potenza:140 W, pressione:100 psi). Dopo raffreddamento, la reazione è stata raffreddata in ghiaccio e acidificata con HCl al 10% fino a pH = 4. Il precipitato solido ottenuto è stato raccolto per filtrazione e lavato con H₂O, e anidrificato sottovuoto, fornendo 445 mg (1,30 mmoli) di composto **29** come solido bianco-beige.

Resa: >90%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 8.60 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₄ Py), 7.67 (AA'XX', 2H, *J*_{AX} = 8.9 Hz, *J*_{AA'XX'} = 2.6 Hz, Ar), 7.05 (AA'XX', 2H, *J*_{AX} = 8.9 Hz, *J*_{AA'XX'} = 2.6 Hz, Ar), 6.68 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₅ Py), , 5.62 (s, 1H, NCH₂), 4.13-4.06 (m, 1H, NCH), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 1.95-1.51 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-1-(4 fluorobenzil)-6-(4-metossifenil)-
piridin-2-one-3-carbossiammide (6) e
N-cicloeptil-2-(4-fluorobenzilossi)-6-(4-
metossifenil)piridina-3-carbossiammide (14)**

200 mg di composto **29** (0,52 mmol) sono stati dissolti in 1,5 mL di DMF anidra. Poi, 237 mg di CsF (1,56 mmol) sono stati aggiunti alla miscela di reazione la quale è stata poi lasciata, sotto agitazione magnetica, per un'ora a 25 °C. Successivamente sono stati aggiunti 0,2 mL di 4-fluorobenzilcloruro (1,56 mmol) e la miscela di reazione è stata scaldata a 30°C per 24 ore, sotto agitazione. Dopo raffreddamento la reazione è stata trattata con ghiaccio ed estratta con CH₂Cl₂. La fase organica è stata essiccata su Na₂SO₄, filtrata ed evaporata. Il grezzo ottenuto è stato purificato su colonna di gel di silice (flash) usando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 8:2. Le opportune frazioni raccolte sono state riunite ed evaporate per fornire 171,5 mg (0,38 mmoli) del derivato O-sostituito **14** come solido giallo chiaro e 20,8 mg (0,05 mmoli) del derivato N-sostituito **6** come olio giallo.

Resa composto **29**: 28%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 8.53 (d, 1H, *J* = 8 Hz, H₄ Py), 8.05-8.02 (m, 2H, Ar), 7.93 (bd, 1H, NH), 7.51-7.45 (m, 3H, H₅ Py/Ar), 7.14-7.08 (m, 2H, Ar), 7.01-6.98 (m, 2H, Ar), 5.57 (s, 2H, OCH₂), 4.17-4.13 (m, 1H, NCH), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 1.87-1.42 (m, 12H, cicloeptile).

Resa composto **6**: 10%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.79 (bd, 1H, NH), 8.55 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₄ Py), 7.05-7.03 (m, 2H, Ar), 6.95-6.85 (m, 6H, Ar), 6.33 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₅ Py), 5.21 (s, 2H, NCH₂), 4.20-4.11 (m, 1H, NCH), 3.83 (s,

3H, OCH₃), 1.67-1.25 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-5-bromo-6-(4-metossifenil)-piridin-2-one-3-carbossiammide (30)**

A 670 mg di composto **28** (1,73 mmol) in CHCl₃, è stata aggiunta, gocciolando lentamente, una soluzione di Br₂ (1 mL, 1,73 mmol) in mL di CHCl₃. La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente, tutta la notte. Successivamente la miscela di reazione è stata diluita con CHCl₃ e lavata con una soluzione satura di Na₂S₂O₃. La fase organica è stata poi essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata per ottenere 475 mg (1,13 mmoli) di composto **30** come solido bianco-beige.

Resa:65%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.04 (bd, 1H, NH), 8.71 (s, 1H, Py), 7.56-7.54 (m, 2H, Ar), 7.03-7.01 (m, 2H, Ar), 4.13-4.00 (m, 1H, NCH), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 1.95-1.51 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-1-(4-fluorobenzil)-5-bromo-6-(4-metossifenil)-piridin-2-one-3-carbossiammide (7) e
N-cicloeptil-2-(4-fluorobenzilossi)-5-bromo-6-(4-metossifenil)piridina-3-carbossiammide (15)**

A 150 mg di composto **30** puro (0,36 mmol) dissolti in 1mL di DMF anidra, sono stati aggiunti 164 mg di CsF (1,08 mmol) e il tutto è stato lasciato in agitazione a temperatura ambiente per un'ora. Successivamente sono stati aggiunti 0,1 mL di 4-fluorobenzilcloruro (1,08 mmol) e la miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per 24 ore. La reazione è stata trattata con ghiaccio ed estratta con CHCl₃. Poi la fase organica è stata essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata. Il grezzo ottenuto è stato purificato su colonna di gel di silice usando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 9:1 e successivamente 8:2. Le opportune frazioni raccolte e riunite sono state evaporate fornendo 94,4 mg (0,18 mmoli) del derivato O-sostituito **15**, come solido biancastro; e 69,6 mg (0,13 mmoli) del derivato N-sostituito **7** come solido oleoso giallo.

Resa composto **15**: 50%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 8.73 (s, 1H, Py), 7.85 (bd, 1H, NH), 7.79 (AA'XX', 2H, $J_{AX} = 8.8$ Hz, $J_{AA'XX'} = 2.4$ Hz, Ar), 7.46-7.42 (m, 2H, Ar), 7.00 (AA'XX', 2H, $J_{AX} = 8.8$ Hz, $J_{AA'XX'} = 2.4$ Hz, Ar), 5.46 (s, 2H, NCH₂), 4.21-4.19 (m, 1H, NCH), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 1.87-1.19 (m, 12H, cicloeptile).

Resa composto **7**: 36%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.71 (bd, 1H, NH), 8.73 (s, 1H, Py), 6.94-6.88 (m, 2H, Ar), 6.81-6.79 (m, 6H, Ar), 5.14 (s, 2H, NCH₂), 4.20-4.11 (m, 1H, NCH), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 2.03-1.36 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-5-fenil-6-(4-metossifenil)-piridin-2-one-3-carbossiammide (31)**

3,5 mL di toluene anidro, 14,20 mg di trifenilfosfina (0,05 mmol) e 2,7 mg di palladio acetato (0,01 mmol) sono stati posti all'interno di una fiala e lasciati sotto agitazione magnetica, sotto flusso di azoto. Dopo 15 minuti sono stati aggiunti, sempre sotto flusso di azoto, 152 mg di composto **30** (0,36 mmol), 87,8 mg di acido fenilboronico (0,72 mmol) e 74,6 mg di K₂CO₃ anidro (0,54 mmol). La miscela di reazione è stata scaldata in bagnetto ad olio a 110°C per 24 ore. Il solvente è stato poi rimosso sottovuoto e il grezzo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 8:2. Le opportune frazioni, raccolte e riunite, sono state evaporate per fornire il composto **31** (17,2 mg). Il composto, analizzato mediante ¹H-NMR, è stato ottenuto in resa insufficiente e ad una purezza non soddisfacente per proseguire con la procedura sintetica.

Dal grezzo di reazione è stato isolato anche il composto **29** (derivato debromurato di **30**).

***N*-cicloeptil-5,6-di(4-metossifenil)-piridin-2-one-3-carbossiammide (32)**

6 mL di toluene anidro, 36,7 mg di trifenilfosfina (0,14 mmol) e 7,34 mg di palladio acetato (0,03 mmol) sono stati posti all'interno di una fiala e lasciati sotto agitazione magnetica, sotto flusso di azoto. Dopo 15 minuti sono stati aggiunti, sempre sotto flusso di azoto, 400 mg di composto **30** (0,95 mmol), 288,7 mg di acido 4-metossifenilboronico (1,90 mmol), 196,3 mg di K₂CO₃ anidro (1,42 mmol). La miscela di reazione è stata scaldata in bagnetto ad olio a 110°C per 24 ore. Il solvente è stato poi rimosso sottovuoto e il grezzo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 8:2. Le opportune frazioni, raccolte e riunite, sono state evaporate per fornire il composto **32** (54,8 mg), che a seguito di triturazione in etere etilico ha fornito 27,7 mg di composto **32**. Il composto, analizzato mediante ¹H-NMR, è stato ottenuto in resa insufficiente e ad una purezza non soddisfacente per proseguire con la procedura sintetica.

Dal grezzo di reazione è stato isolato anche il composto **29** (derivato debromurato di **30**).

***N*-cicloeptil-1-(4-fluorobenzil)-5-fenil-6-(4-metossifenil)-piridin-2-one-3-carbossiammide
(8)**

1 mL di toluene anidro, 7,9 mg di trietilfosfina (0,03 mmol) e 1,5 mg di palladio acetato (0,006 mmol) sono stati posti all'interno di una fiala e lasciati sotto agitazione magnetica, sotto flusso di azoto. Dopo 15 minuti sono stati aggiunti, sempre sotto flusso di azoto, 100 mg di composto **7** (0,19 mmol) disciolti in 1 mL di toluene anidro, 47,5 mg di acido fenilboronico (0,38 mmol), 36,7 mg di K₂CO₃ anidro (0,28 mmol). La miscela di reazione è stata scaldata in bagnetto ad olio a 110°C per 24 ore. Il solvente è stato poi rimosso sottovuoto e il grezzo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 8:2. Le opportune frazioni raccolte e riunite sono state evaporate per fornire 81,7 mg (0,16 mmoli) di composto **8** come polvere giallo scura.

Resa: 84%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.86 (bd, 1H, NH), 8.67 (s, 1H, Py), 7.14-7.09 (m, 3H, Ar), 6.96-6.93 (m, 4H, Ar), 6.89-6.85 (m, 2H, Ar), 6.84-6.78 (m, 2H, Ar), 6.69-6.67 (m, 2H, Ar), 5.22 (s, 2H, NCH₂), 4.21-4.11 (m, 1H, NCH), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.05-1.51 (m, 12H, cicloeptile).

***N*-cicloeptil-1-(4-fluorobenzil)-5,6-di(4-metossifenil)-piridin-2-one-3-carbossiammide (9)**

1 mL di toluene anidro, 7,9 mg di trietilfosfina (0,03 mmol) e 1,5 mg di palladio acetato (0,006 mmol) sono stati posti all'interno di una fiala e lasciati sotto agitazione magnetica, sotto flusso di azoto. Dopo 15 minuti sono stati aggiunti, sempre sotto flusso di azoto, 100 mg di composto **7** (0,19 mmol) disciolti in 1 mL di toluene anidro, 57,7 mg di acido *p*-metossifenilboronico (0,38 mmol), 36,7 mg di K₂CO₃ anidro (0,28 mmol). La miscela di reazione è stata scaldata in bagnetto ad olio a 110°C per 24 ore. Il solvente è stato poi rimosso sottovuoto e il grezzo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 8:2. Le opportune frazioni raccolte e riunite sono state evaporate per fornire 62,7 mg (0,11 mmoli) composto **9** come polvere giallo scura.

Resa: 58%

¹H-NMR: (CDCl₃) δ (ppm): 9.88 (bd, 1H, NH), 8.67 (s, 1H, Py), 6.96-6.79 (m, 8H, Ar), 6.72-6.68 (m, 4H, Ar), 5.23 (s, 2H, NCH₂), 4.24-4.18 (m, 1H, NCH), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.06-1.52 (m, 12H, cicloeptile).

BIBLIOGRAFIA

1. Maugini E., *Manuale di botanica farmaceutica*, **1993**.
2. Gunnar S., *Farmacognosia-farmaci di origine naturale*, **2002**.
3. Raitio K. et al., *Current medicinal chemistry*, **2005**, 12,1217-37.
4. Fowler C. J., *Trends in Pharmacological Science*, **2012**, 33, 181-5.
5. Maione S. et al., *Pain*, **2013**, 154, 87-93.
6. Devane W.A. et al., *Science*, **1992**, 258, 1946-9.
7. Mechoulam R., *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, 50, 83-90.
8. Suigiura T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, 215, 89-97.
9. Hanus L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 3662-5.
10. Bisogno T. et al., *Biochem. J.*, **2000**, 351, 817-24.
11. Huang S.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 8400-5.
12. Porter A.C. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 301, 1020-4.
13. Pertwee, *AAPS J.* **2005**, 7, 625-654.
14. Heimann A.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 20588-93.
15. Di Marzo V., *Natur Publishing Group*, **2008**, 7, 438-55.
16. Di Marzo, *Nature Sci.* **2011**, 14, 9-15.
17. Cadas H. et al., *J. Neurosci.*, **1997**, 17, 1226-42.
18. Di Marzo V., et al., *Curr. Opin. Lipidol.*, **2007**, 18, 129-140.
20. Liu J. et al., *Neuropharmacology*, **2008**, 54, 1-7.
20. Kirkham T.C. et al., *J. Pharmacol.*, 2002, 136, 550-57.
21. Leung D. et al., *Biochemistry*, **2006**, 45, 4720-6.
22. Simon G. M. et al., *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281, 26465-72.
23. Sun Y. X. et al., *Biochem. J.*, **2004**, 380, 749-56.
24. Liu J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, 13345-50.
25. Cravatt B.F. et al., *Nature*, 1996, 384, 83-7.
26. Blankman J. L. et al., *Chem. Biol.*, **2007**, 14, 1347-56.
27. Mulder A. M. et al., *Biochemistry*, **2006**, 45, 11267-77.

28. Woodward D. F. *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, 153, 410-9.
29. Matias I. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, 309, 745-57.
30. Kozak K. R. *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **2000**, 275, 33744-9.
31. Kozak K.R. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 44877-85.
32. Ueda N. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1254, 127-
33. Edgmond W. S. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **1998**, 54, 180-8.
34. Van der Stelt M. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3709-20.
35. Bornheim L. M. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, 50, 677-86.
36. Snider N. T. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2008**, 327, 538-45.
37. Shire D. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 3726-31.
38. Kaczocha M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106, 6375-80.
39. Oddi S. *et al.*, *Chem. Biol.*, **2009**, 44, 1790-94.
40. Fu J. *et al.*, *Nat. Neurosci.*, **2012**, 15, 64-69.
41. Fowler C. J., *Febs J.*, **2013**, 280, 1895-1904.
42. Hillard C.J., *J. Neurochem*, **1997**, 69, 631-38.
43. Chicca A. *et al.*, *J. Biological Chemistry*, 2012, 287, 34600-82.
44. Devane *et al.*, *Mol. Pharmacol.* **1998**, 34, 605-613.
45. Matsuda *et al.*, *Nature* **1990**, 346, 561-562.
46. Gerar *et al.*, *Biochem. J.* **1991**, 279, 129-134.
47. Chakrabarti *et al.*, *DNA Sequence* **1995**, 5, 385-388.
48. Shire *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 3726-3731.
49. Munro *et al.*, *Nature* **1993**, 365, 61-65.
50. Demuth D. G., Molleman A., *Life Sci.*, **2006**, 78, 549-63.
51. Walker J. M., Huang S. M., *Pharmacol. Ther.*, **2002**, 95, 127-135.
52. Demuth D. G., Molleman A., *Life Sci.*, **2006**, 87, 449-73.
53. Järvinen T. *et al.*, *Pharmacol. Ther.*, **2002**, 95, 203-220.
54. Piomelli D., *Nat.Rev.Neurosci.*, **2003**, 4, 873.

55. Ashton J. C., Glass M., *Curr. Neuropharmacol.*, **2007**, 5, 73–80.
56. Howlet A.C. *et al.*, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2005**, 168, 53–79.
57. Gebremedhin D. *et al.*, *Am. J. Physiol.*, **1999**, 276, 2085–93.
58. Stefano G.B. *et al.*, *Med. Sci. Monit.*, **2003**, 9, RA63–75.
59. Newman Z. *et al.*, *Eur. J. Neurosci.*, **2007**, 25, 1619–30.
60. Sugiura T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, 229, 58–64.
61. Esposito I. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **2008**, 74, 1678–86.
62. Pertwee., *J. Pharmacology* **2009**, 156, 397–411.
63. Manera C. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 3644–51.
64. Pasquini S. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 5075–84.
65. Kunos G. *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2009**, 30, 1–7.
66. Ross *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* **1999**, 126, 665–672.
67. Rinaldi *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, 284, 644–650.
68. Pertwee., *Curr. Med. Chem.* **1999**, 6, 635–664.
69. Di Marzo V., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, 7, 438–55.
70. Ruiu *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 306, 363–370.
71. Katarzyna S. *et al.*, *Europ. Journal Pharmacol.*, **2013**, 716, 41–53.
72. Gaoni Y. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1646–47.
73. Devane W. A. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **1988**, 34, 605–613.
74. Matsuda L. A. *et al.*, *Nature*, **1990**, 346, 561–4.
75. Munro S. *et al.*, *Nature*, **1993**, 365, 61–5.
76. Devane W. A. *et al.*, *Science*, **1992**, 258, 1946–49.
77. Mechoulam R. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, 50, 83–90.
78. Ibrahim, M. M.; *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, 100, 10529–10533.
79. Pertwee R.G., *Phil Trans R Soc. B*, **2012**, 367, 3353–63.
80. Bruni A., *Farmacognosia generale e applicata*, **1999**.
81. Mechoulam R., *Br J. Pharmacol.*, **2005**, 146, 913–15.

82. Cota D., *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **2006**, 23, 507-17.
83. Matias I. et al., *Trends Endocrinol. Metab.*, **2007**, 18, 27-37.
84. Roche M. et al., *Special Edition on Cannabinoid in Pharmaceuticals*, **2010**, 3, 2517-53.
85. Van Gaal L.F. et al., *Lancet*, **2005**, 365, 1389-1397.
86. Hohman A.G. et al., *AAPS J.*, **2005**, 8, 693-708.
87. Tokanovic S. et al., *Br. J. Pharmacol.*, **2007**, 150, 227-234.
88. Howlet A.C. et al., *Pharmacol. Rev.*, **2002**, 54, 161-202.
89. Di marzo V. et al., *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2004**, 3, 771-784.
90. Stoll G. et al., *Prog. Neurobiol.*, **1999**, 58, 233-247.
91. Oka S. et al., *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 18488-97.
92. Bifulco M. et al., *Br. J. Pharmacol.*, **2006**, 148, 123-135.
93. Manera C. et al., *Eur. J. Pharm.*, **2012**, 52, 284-294.
94. Lucchesi V. et al., *Eur. J. Pharm.*, **2014**, 74, 524-532.
95. Gisch N. et al., *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 1658-1667.
96. Lucchesi V. et al. *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 8777-8791.
97. Arioli F. et al., *Chem. Med. Chem.*, **2011**, 6, 2009-2018.
98. Alnajjar A. et al., *Molecules*, **2009**, 14, 68-77.
99. Myung-Hwa K. et al, PCT Int. Appl. 2012077932, **2012**.
100. Witherington J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 3055-3057.
101. Bondavalli F. et al., *Synthesis*, **1999**, 7, 1169-1174.
102. Sato T., *Synlett*, **1995**, 8, 845-846.
103. Ghosez L. et al., *Can. J. Chem.*, **2001**, 79, 1827-1839.