

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Farmacia

Dottorato di Ricerca in Chimica del Farmaco XXI ciclo

Settore Scientifico-Disciplinare: CHIM/08



**SINTESI DI NUOVI COMPOSTI AD ATTIVITA' ANTIMALARICA
CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AI DERIVATI DELLA
4-AMMINOCHINOLINA.**

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Anna SPARATORE

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Marina CARINI

Tesi di Dottorato di:

Dott. Manolo Casagrande

Matr.: R06564

Indice

Introduzione	2
Chimica	27
Risultati e discussione	45
Conclusioni	53
Parte sperimentale chimica	55
Saggi farmacologici	212
Bibliografia	217

Introduzione

Cenni storici sulla malaria.

Il termine *malaria* ha un'etimologia italiana: storicamente con *mal'aria* si indicava lo stato febbrile causato dall'esposizione a vapori e aria cattiva (mal'aria) provenienti dalle paludi che circondavano i centri cittadini. Nel XX secolo il termine evolse in *malaria* e fu riconosciuto universalmente.

La malaria è causata da un protozoo parassitario intracellulare obbligato del genere *Plasmodium*, di cui quattro specie possono causare l'insorgere della malattia nell'uomo (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*). Il *P. falciparum* è responsabile della maggior parte delle infezioni in Africa. Gli epicentri originari dei plasmodi furono le zone centrali ed occidentali dell'Africa (c.a 10000 anni fa). A causa degli spostamenti dell'uomo per motivi migratori e commerciali, la malaria venne diffusa nella Mesopotamia, nel sud-est asiatico, nella penisola indiana (10000-5000 anni fa), successivamente in Cina (5000 anni fa), nelle aree mediterranee (2.500-2000 anni fa) e, attraverso i viaggi trans-oceanici, in America (fine del XV secolo), divenendo nel XIX secolo una malattia a diffusione globale.¹

Ciclo vitale del plasmodio.

La malaria viene trasmessa all'uomo da differenti specie di zanzara anofele femmina che inocula mediante saliva gli *sporozoiti*, cioè cellule protozoarie allo stadio terminale del ciclo sessuato o sporogonico che si svolge nella zanzara. Dopo una breve permanenza nel circolo ematico, gli *sporozoiti* invadono le cellule parenchimali epatiche (*ciclo esoeritrocitario*). Il *P. ovale* ed il *P. vivax* possono rimanere quiescenti nel fegato per molti mesi; ricadute della malattia causate dalla persistenza di parassiti nell'organo in questione possono apparire dopo mesi e, occasionalmente, fino a quattro anni dopo l'esposizione. Si ha poi il primo ciclo di moltiplicazione asessuata con produzione di uno *schizonte plurinucleato*, che rompendosi libera nel sangue nuovi *merozoiti mononucleati*, i quali infettano i globuli rossi (*ciclo eritrocitario*). All'interno del globulo rosso avviene il secondo ciclo asessuato: il *merozoite* muta in *trofozoite*, poi in schizonte per produrre altri merozoiti (dai 6 ai 36 per ogni schizonte) che rompono i globuli rossi, infettandone altri, quindi il ciclo si ripete. A seconda del plasmodio infettante il ciclo si ripete ad intervalli regolari: ogni 48 ore per *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* ed ogni 72 ore per *P. malariae*.

Dopo vari cicli alcuni trofozoiti si differenziano in forme eritrocitarie sessuate, i gametociti, che permettono il mantenimento del ciclo del plasmodio nell'ambiente; il microgametocita "maschio" ed il macrogametocita "femmina" vengono ingeriti dalla zanzara quando questa punge l'individuo infettato. Il ciclo sessuato nella zanzara è detto sporogonico. Nello stomaco dell'insetto, i gametociti escono dal globulo rosso che li ospita: subiscono diverse trasformazioni sino a che un flagellato (microgametocita maschio) feconda una macrogametocita femmina generando lo zigote. Questo crescendo di misura raggiunge l'intestino della zanzara dove diventa oocisti, si rompe e libera sporozoiti che, per mezzo della saliva della zanzara, infettano nuovi individui.²

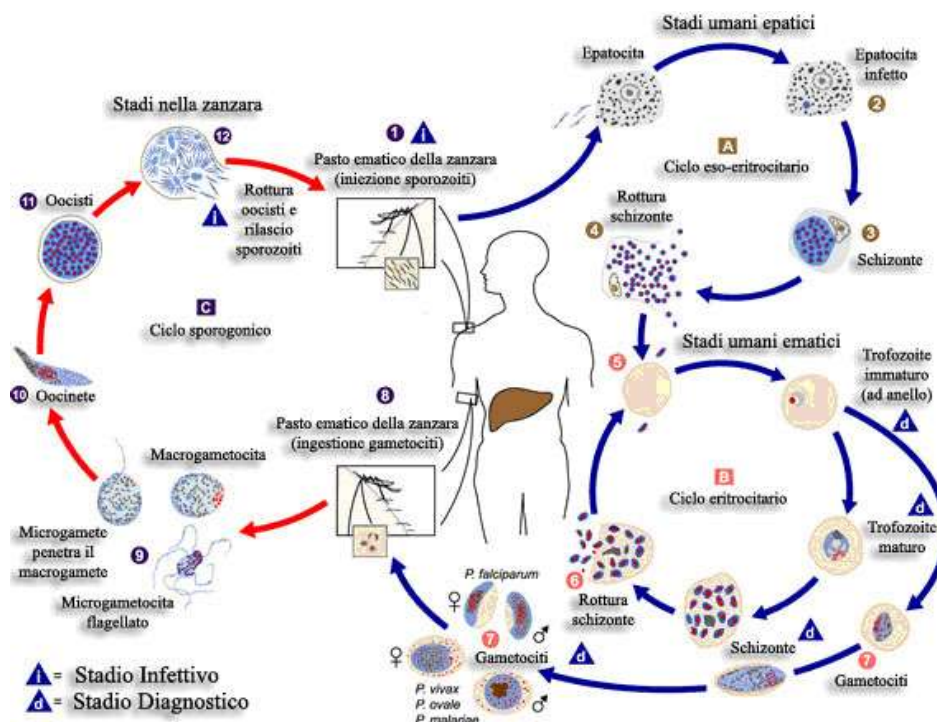


Fig. 1: ciclo vitale del plasmodio.²

Sintomi della malaria.

La sintomatologia è aspecifica, generalmente si presenta come una sindrome simil influenzale (febbre, tremori e sudorazione). La febbre, quasi sempre ciclica, si manifesta con il rialzo della temperatura corporea causato dal rilascio di materiale proteico, citochine pro-infiammogene ed ossido nitrico in seguito alla lisi dei globuli rossi.³⁻⁵

La ciclicità della febbre è legata al tipo di plasmodio coinvolto: nei casi di *P. falciparum* (terzana maligna), *P. vivax* e *P. ovale* (terzana benigna) il ciclo si ripete ogni 48 ore, mentre nel caso di *P. malariae* (malaria quartana) ogni 72 ore.

La distruzione dei globuli rossi provoca anemia, mentre la loro aggregazione ed adesione nel microcircolo di diversi organi vitali porta a un'ostruzione dei vasi sanguigni causando la

mancata ossigenazione di organi quali fegato, reni e, nel caso di *P. falciparum*, cervello (malaria cerebrale), provocando la morte.²

Mappatura della malaria e dati economici.

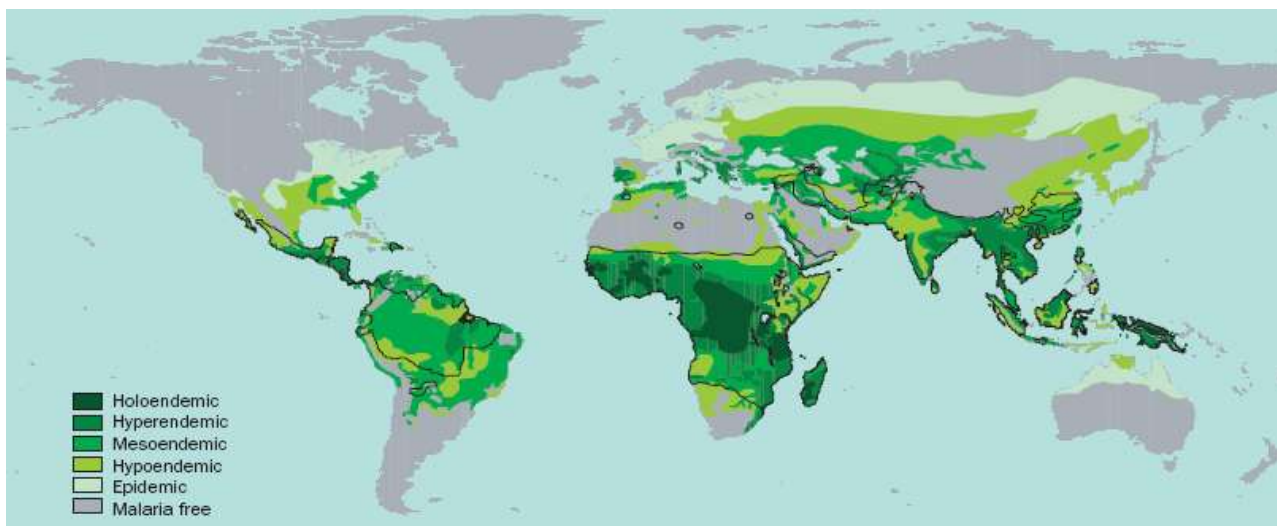


Fig. 2: distribuzione endemica della malaria: le aree in verde chiaro rappresentano le zone a minore diffusione (meno del 11% di rischio), mentre il verde scuro le aree a maggiore diffusione (in queste aree il rischio supera il 50%). Le aree in giallo rappresentano zone in cui il tasso di rischio è minore del 5%.⁶

Si stima che nel 2002 tre miliardi di persone distribuite in oltre 90 nazioni siano state esposte alla minaccia della malaria e che si siano verificati circa 500 milioni di casi clinici, con circa 1-3 milioni di decessi, specialmente tra i bambini dell'Africa sub-Sahariana. Il 70% dei casi di contagio si è concentrato infatti nell'Africa sub-Sahariana, mentre il 25% nel sud-est asiatico. Nell'ultimo secolo la popolazione a livello globale è cresciuta da uno a sei miliardi di abitanti. Questo dato demografico ha un'importante implicazione sul numero di esseri umani esposti al rischio: se infatti la percentuale della popolazione mondiale esposta alla minaccia della

malaria è diminuita, negli anni compresi tra il 1900 ed il 2002, dal 77% al 48% (con un'invariata distribuzione geografica del fenomeno), in termini assoluti però il numero di uomini e donne a rischio è aumentato costantemente da 0,9 a tre miliardi nello stesso periodo.

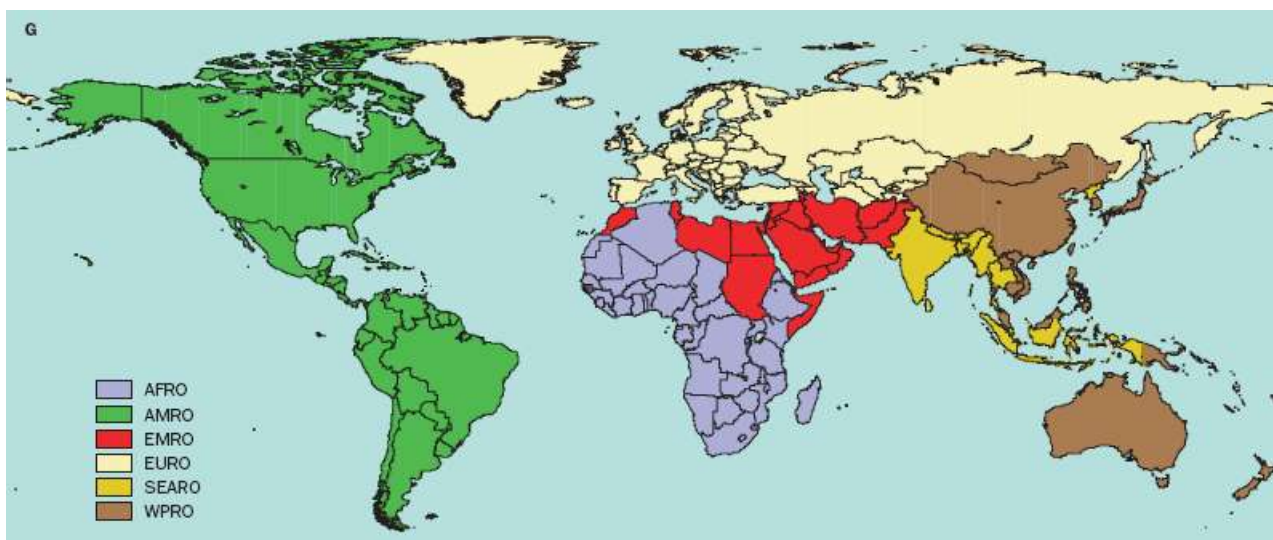


Fig. 3: suddivisione delle popolazioni a rischio di contagio secondo l'OMS.⁶

Inoltre, se nell'area euro-asiatica (EURO) si è verificato un costante calo del numero di abitanti esposti al rischio di contagio e nelle americhe (AMPRO) si è registrato una sostanziale stabilizzazione del fenomeno, nel continente africano (AFRO) e nell'area del sud-est asiatico (SEARO e WPRO) si è osservato un contemporaneo incremento nel numero di persone esposte. Si stima che nel 2010 circa il 48 % della popolazione esposta alla malaria vivrà in aree classificate ad alta trasmissione (oloendemiche e iperendemiche), mentre il 52% in aree a bassa trasmissione (mesoendemiche e ipoendemiche). Proprio le popolazioni che vivono in queste ultime aree sono i principali catalizzatori dello sviluppo di ceppi di plasmodio resistenti agli antimalarici. La diffusione di parassiti farmaco-resistenti dal sud-est asiatico (area considerata a bassa trasmissione) all'Africa sub-Sahariana ha incrementato la

mortalità causata dalla malattia.^{6,7} La malaria ha importanti ripercussioni sulla salute e sul benessere delle nazioni e degli individui. Attualmente in Africa questa patologia è avvertita sia come malattia connessa alla povertà che come causa di povertà: essa presenta costi elevati sia diretti che indiretti e si dimostra essere un vincolo allo sviluppo economico; infatti la crescita economica annuale evidenzia come ci sia una forte disparità economica tra paesi colpiti e quelli liberi dal fenomeno.

Molti economisti ritengono che la malaria sia responsabile di una ‘growth penalty’ pari all’1,3% del PIL in alcuni paesi africani.

I costi diretti includono una combinazione di spese sia personali sia pubbliche per la prevenzione e il trattamento della malattia, come i costi per insetticidi, zanzariere, medici e soprattutto farmaci antimalarici, assorbendo fino al 50% delle spese di sanità pubblica in alcune nazioni ad alta diffusione malarica. I costi indiretti includono la mancata produttività e i mancati redditi associati alla malattia e alla morte. Socialmente il prezzo pagato alla malaria è molto alto: nei bambini i danni neurologici permanenti causati dalla malattia ne impediscono la scolarizzazione. Dal punto di vista degli investimenti, per debellare la malaria c’è ancora un allarmante divario tra i fondi necessari e le risorse assegnate: si stima che annualmente a livello mondiale si investano circa un miliardo di dollari.⁸

Terapia antimalarica.

La terapia della malaria si è basata per lungo tempo sull'uso della chinina, estratto dalla corteccia della china (la pianta è di origini andine, già nota ai nativi americani ed in seguito coltivata nelle regioni monsoniche del sud-est asiatico) la quale fin dal '600 veniva utilizzata per le sue proprietà antifebbrili ed antimalariche.

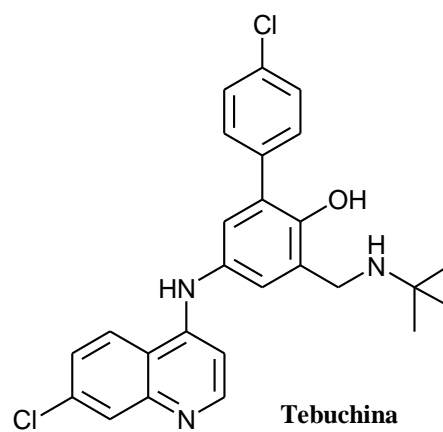
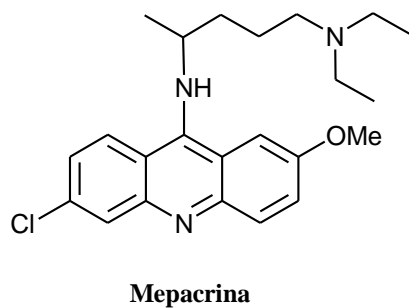
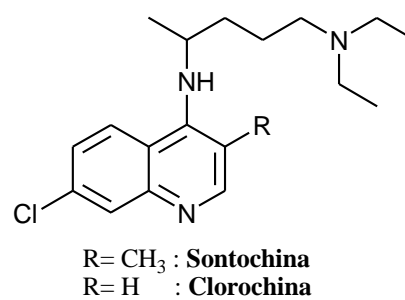
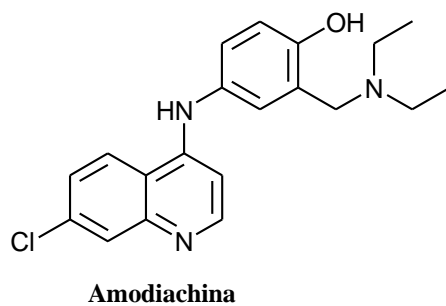
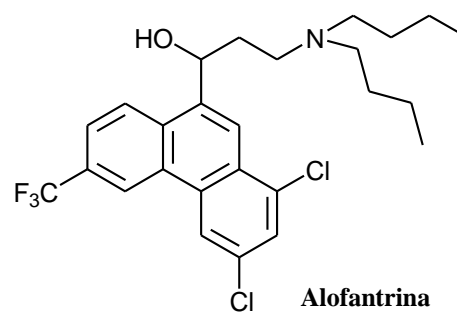
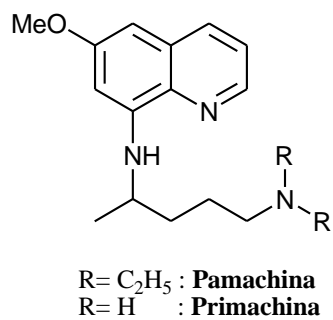
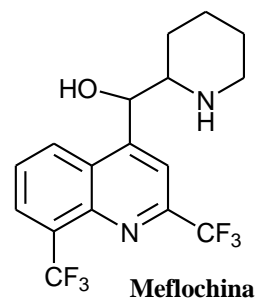
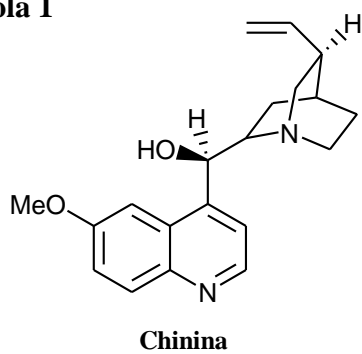
In seguito agli eventi bellici che segnarono la prima metà del secolo scorso e a causa della mancanza di rifornimenti di china che tali eventi comportavano, si cercarono vari sostituti di sintesi facilmente producibili e a basso costo. Nella sola Germania nel periodo tra il 1920 ed il 1945 si saggiarono molte migliaia di molecole, giungendo alla *pamachina*, alla *mepacrina* e alla *clorochina*, tutte a nucleo chinolinico.

Anche gli USA e la Gran Bretagna negli anni del secondo conflitto mondiale svilupparono molecole efficaci nel trattamento della malaria, giungendo sia a rivalutare l'uso della clorochina, fino ad allora poco utilizzata per la sua maggiore tossicità rispetto agli altri farmaci utilizzati, sia a sintetizzare il *cloroproguanile*.

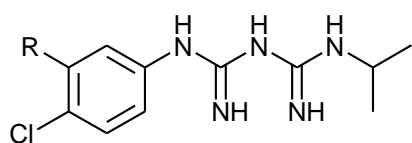
Lo sviluppo dei farmaci antimalarici è proseguito anche nei decenni successivi al termine del secondo conflitto mondiale: negli USA tale necessità è stata dettata da motivi bellici, in quanto sia in Corea che in Vietnam la malaria si presentava come un fattore di rischio per le truppe inviate a combattere. Le ricerche sono poi proseguite nell'arco di tutto il secolo portando alla scoperta di numerosi farmaci tra cui *alofantrina*, *amodiachina*, *artemisina*, *atovaquone*, *meflochina*, *pirimetamina*, *primachina*, *sulfadossina* e la *tebuchina* a cui si devono aggiungere più recenti derivati chinolonici e tetraciclinici.

L'insieme dei composti è mostrato nella **Tavola 1**.

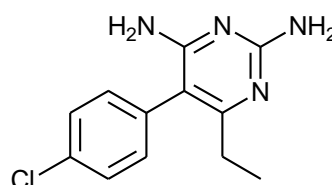
Tavola 1



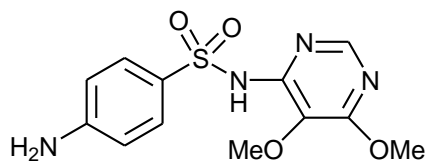
Segue Tavola 1



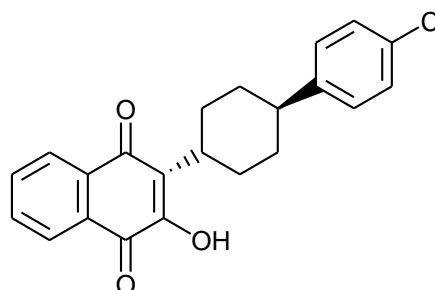
R= H : **Proguanile**
R= Cl : **Cloroproguanile**



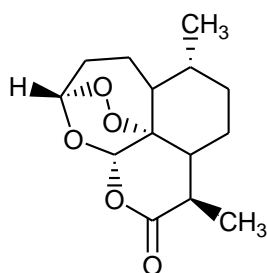
Pirimetamina



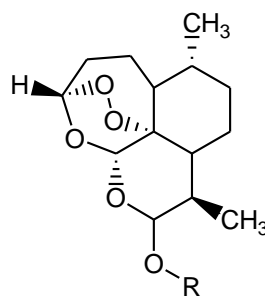
Sulfadossina



Atovaquone



Artemisinina



R= CH₃ : **Artemetere**
R= COCH₂CH₂COONa : **Artesunato**

Nella seconda metà del novecento il farmaco d'elezione nel trattamento della malaria è stata la *cloroquina* (CQ). Negli ultimi anni, l'uso diffuso e indiscriminato di tutti gli antimalarici ha indotto lo sviluppo di parassiti con elevati livelli di resistenza verso tutte le classi di farmaci, ad eccezione dei derivati dell'artemisinina. L'OMS ha quindi stabilito nuove strategie terapeutiche che prevedono l'utilizzo combinato di antimalarici con diverso meccanismo d'azione allo scopo di prevenire l'insorgere di nuove resistenze o di rallentarne l'esordio. Una combinazione di questo genere già largamente utilizzata è *artemetere-lumefantrina*, che ha dato risultati incoraggianti in Asia e promette di avere una buona efficacia anche in Africa. Anche l'associazione *artesanato-amodiachina* si è dimostrata efficace in quelle zone dove la resistenza all'amodiachina è modesta.⁹⁻¹⁴

Inoltre nelle regioni del sud-est asiatico la resistenza alla *meflochina* può essere limitata dalla combinazione con l'*artemisinina*. Sebbene le scelte attuali di trattamenti combinati a base di artemisinina (ACTs) siano limitate, il futuro è incoraggiante, con una serie di nuovi farmaci in vari stadi di sviluppo, tra i quali due particolarmente promettenti: il primo è una combinazione *diidroartemisinina-piperachina* che viene già utilizzata in via sperimentale in alcuni paesi del sud-est asiatico,¹⁵ il secondo è una combinazione di *artesanato* con *cloroproguanide-dapsone*; tale associazione è a buon mercato, ben tollerata, e si è dimostrato efficace nelle zone dove la combinazione *sulfadossina-pirimetamina* ha fallito.

Il maggior ostacolo a un largo utilizzo degli ACTs è stato il loro costo, essendo circa dieci volte più costosi delle monoterapie. Negli ultimi anni sono stati presi accordi con le industrie farmaceutiche per ridurre i costi di vendita nei paesi a basso reddito e rendere più accessibile la terapia combinata, favorendone così la diffusione nella pratica clinica. Occorre inoltre non sottovalutare il rischio di insorgenza di farmaco-resistenza nei confronti dei derivati dell'artemisinina e l'impatto che ciò porterebbe nella pratica clinica. Recentemente sono stati

pubblicati in letteratura studi in cui si è riportato come stia emergendo tolleranza alla combinazione *meflochina-artesunato* già largamente in uso nelle aree del sud-est asiatico;¹⁶ Afonso *et al.* hanno inoltre isolato un clone di *P. chabaudi chabaudi* resistente in modo permanente all'artemisinina e ai suoi derivati.¹⁷ Lo stato attuale delle ricerche su nuovi antimalarici, sia di sintesi che di origine naturale, e le conoscenze sui loro meccanismi d'azione sono illustrate in alcune monografie, cui si rimanda.¹⁸⁻²⁵

Tra le soluzioni proposte e in attesa di un efficace vaccino, quella attualmente più economica e più promettente è la preparazione di nuovi derivati a nucleo chinolinico che trae vantaggio dall'acquisizione sempre più profonda dei meccanismi d'azione della cloroquina e delle cause che determinano la resistenza dei plasmodi a tale farmaco.

Meccanismo di formazione dell'emozoina.

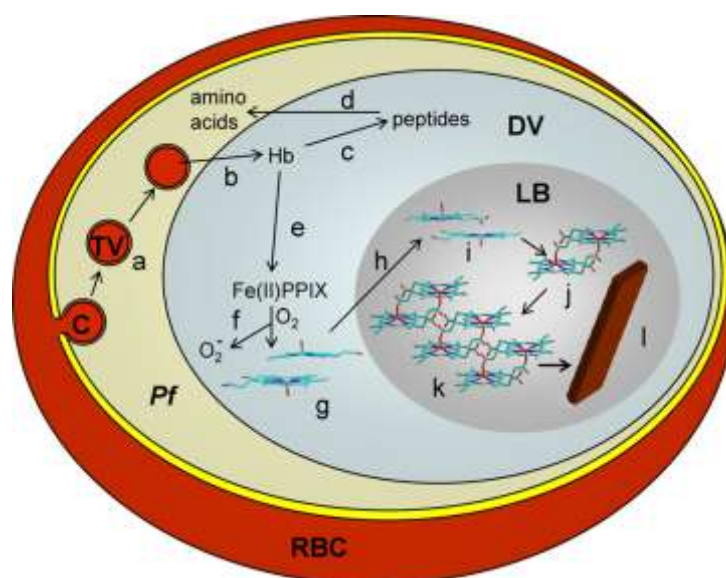


Fig.4: rappresentazione dei processi coinvolti nel processo di formazione dell' emozoina nel *P.falciparum* (fase eritrocitaria).²⁶

In seguito all'ingresso del parassita, porzioni di citoplasma dell'eritrocita vengono trasportate nel vacuolo digestivo in cui avviene la degradazione dell'emoglobina ad opera di una serie di enzimi proteolitici tra cui la plasmepsina I, II, IV e la proteasi istoaspartica (HAP). Le catene peptidiche ottenute vengono successivamente degradate ad aminoacidi da parte di aminopeptidasi.

Il gruppo eme Fe(II)PPIX (ferriprotoporfina IX) rilasciato dall'emoglobina subisce un processo di ossidazione ad opera dell'ossigeno molecolare generando Fe(III)PPIX ed anioni superossido (O_2^-). L'ambiente acido del vacuolo digestivo favorisce la reazione spontanea di dismutazione dell'anione superossido in O_2 e H_2O_2 ed infine a O_2 e H_2O che a sua volta si complessa con il Fe(III)PPIX formatosi, originando l'*ematina* ($H_2O/HO-Fe(III)PPIX$). Sebbene questo complesso sia relativamente insolubile in soluzione acquosa al pH acido del vacuolo, sembra però essere in grado di diffondere attraverso le membrane lipidiche e provocarne la perossidazione. Per difendersi da questo meccanismo, il parassita mette in atto un processo di detossificazione che consiste nel trasformare l'*ematina* monomerica in una forma cristallina compatta ed insolubile chiamata *emozoina* ($[Fe(III)PPIX]_2$).^{26,27}

L'emozoina consiste in cristalli formati da dimeri ciclici di ferriprotoporfina IX (Fe(III)PPIX) in cui il gruppo propionato di ogni monomero di Fe(III)PPIX coordina l'atomo di Fe(III) dell'altro monomero. Più dimeri interagiscono tra di loro mediante la formazione di legami idrogeno

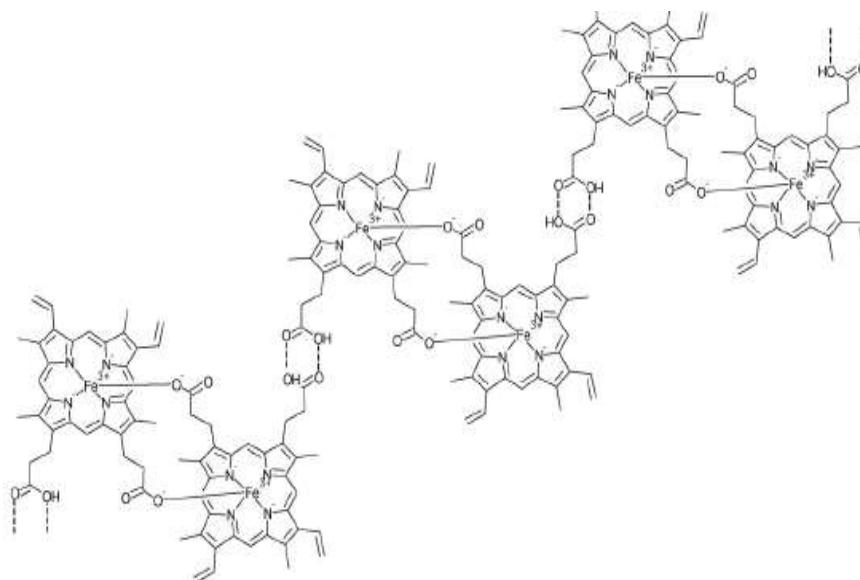


Fig. 5: cristalli di emozoina.

Meccanismo d'azione della cloroquina.

Si ritiene che la cloroquina si accumuli selettivamente (fino a concentrazioni migliaia di volte superiori a quelle ematiche) nel vacuolo digestivo del parassita, ove ha luogo la degradazione dell'emoglobina.

Questo accumulo è spiegato con le deboli proprietà basiche della cloroquina: a pH neutro la cloroquina come base libera diffonde facilmente attraverso le membrane, ma al pH acido del vacuolo digestivo viene protonata e non può più diffondere indietro.

La cloroquina impedisce la polimerizzazione dell'ematina ($\text{H}_2\text{O}/\text{HO}-\text{Fe}(\text{III})\text{PPIX}$) a emozoina o β -ematina ($[\text{Fe}(\text{III})\text{PPIX}]_2$) mediante la formazione di un addotto π - π con l'ematina che risulta tossico per il plasmodio. La conversione della cloroquina nell'addotto

con l'ematina, diminuendone la concentrazione, ne favorisce l'ulteriore entrata e l'accumulo nel vacuolo digestivo.

La tossicità del complesso π - π tra cloroquina ed ematina è legata a uno stress ossidativo che porta alla perossidazione dei lipidi di membrana del parassita. In tale contesto l'ossigeno molecolare avrebbe un ruolo importante, ma sussistono dubbi al riguardo.

La causa della clorochino-resistenza sembrerebbe essere associata con l'alterazione dei processi di trasporto attraverso la membrana del plasmodio, cioè con una ridotta entrata o un accresciuto efflusso del farmaco.²⁸

Recentemente è stato dimostrato come la CQ-resistenza sia legata alla mutazione di tre tipi di trasportatori localizzati a livello della membrana del vacuolo digestivo: PfCRT, Pgh1 e PfMRP. Questi trasportatori possono agire come canali che riducono l'accumulo del farmaco.

La CQ-resistenza nei ceppi di *P. falciparum* può essere paragonata alla "multi drug resistance" già osservata nelle cellule tumorali umane. Anche in questo caso si è infatti osservato che numerosi farmaci tra cui verapamile, desipramina, propranololo, cloropromazina e loro più recenti analoghi, sono in grado di invertire tale resistenza. Inoltre anche l'abbassamento del pH del vacuolo digestivo contribuisce allo sviluppo della CQ-resistenza in quanto pH fortemente acidi influenzano la solubilità dell'ematina non polimerizzata nel vacuolo.^{29,30}

Appaiono di notevole importanza le osservazioni che composti strettamente analoghi alla cloroquina siano attivi su ceppi cloroquina-resistente, confermando che la resistenza non è attribuibile a modifiche del "target" del farmaco, ma composto-specifica.

Va comunque osservato che il progredire delle conoscenze sulla conversione eme-emozoina, attraverso varie fasi, rende complessa la definizione del vero target e dell'origine della resistenza.³¹

In tale situazione, la cloroquina-resistenza potrà essere superata, da una parte, con la realizzazione di composti capaci di agire sulla proteina coinvolta nell'efflusso del farmaco, dall'altra, con la messa a punto di derivati chinolinici, agenti con lo stesso meccanismo della cloroquina, ma che non siano riconosciuti dalla proteina di trasporto.

La preparazione di nuovi analoghi della cloroquina può comportare variazioni della parte aromatica o variazioni della catena basica. Analoghi della cloroquina recanti catene più corte della novoldiammina che la caratterizza e già descritti in passato, sono stati ora brevettati come attivi sui ceppi resistenti.^{32,33}

Altri analoghi^{34,35} con catene sia più corte che più lunghe della novoldiammina sono risultati attivi su *P. falciparum* CQ-sensibile e CQ-resistenti, sempre che in posizione 7 siano presenti cloro, bromo o iodio.

I 7-fluoro- e i 7-trifluorometil-derivati sono pressochè inattivi a meno che sia presente una catena con 10-12 metileni.

In generale la presenza di residui *n*-propilico o *n*-etilico come spaziatori tra la testa basica e la porzione 4-amminochinolinica risulta ottimale ai fini dell'attività antimalarica, anche se la conformazione e la struttura della testa basica possono influenzare in modo significativo la lunghezza del linker richiesto per ottimizzare l'attività.

Importante è inoltre la natura della testa basica alifatica che deve essere resistente alla metabolizzazione, come per esempio un residuo terbutilamminico o un residuo isopropilico o un ciclo pirrolidinico o piperidinico, confermando quanto già osservato in passato.^{36, 37}

Recentemente J. K. Natarajan et al. hanno osservato, attraverso la sintesi di una serie di analoghi della cloroquina, che la presenza di una *N*-etilammina alla fine della catena laterale di una 4-ammino-7-cloroquinolina riduce l'attività antimalarica del composto rispetto ai corrispondenti derivati *N,N*-diethylamminici specialmente sui ceppi CQ-R, mentre una tale

discrepanza non si nota sui ceppi CQ-S.³⁸ Tale fenomeno è spiegabile ipotizzando una differente affinità dei trasportatori responsabili della resistenza per le due differenti tipologie di ammine.

Di particolare importanza appaiono le correlazioni struttura-attività evidenziate da Egan e coll.,^{39, 40} secondo le quali il sostituente in posizione 7 influenza sia la basicità (pKa) dell'azoto chinolinico che quella dell'azoto terziario della catena, anche se ciò può apparire piuttosto sorprendente. Da questo studio risulta ottimale un sostituente con moderate proprietà elettron-attraenti: se il gruppo è troppo fortemente elettron-attrattore si ha un forte abbassamento del pKa dell'azoto chinolinico e troppo poco composto si accumula nel vacuolo digestivo del plasmodio. D'altra parte se il sostituente non è sufficientemente elettron-attrattore non si ha un'abbastanza forte inibizione della formazione di emozoina. Inoltre il gruppo presente in 7 deve essere lipofilo, poiché questa caratteristica condiziona l'associazione con l'ematina e l'inibizione della formazione dell'emozoina.

In generale, un incremento del numero di residui protonabili sulla catena laterale influenza in modo positivo l'attività antimalarica, sostenendo l'ipotesi che il meccanismo d'azione di tali composti sia legato all'accumulo nel vacuolo digestivo del plasmodio. Catene lineari mantenenti comunque centri basici terziari si sono rivelate in questo caso ottimali ai fini dell'attività antimalarica rispetto a catene simmetricamente ramificate.⁴¹

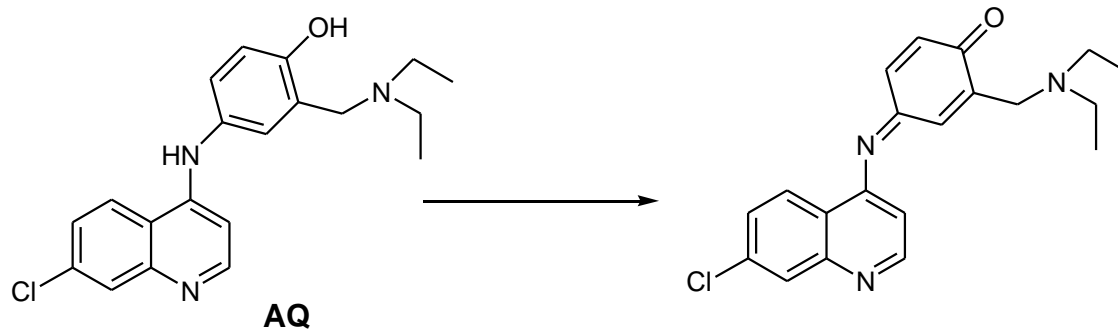
V. Raja Salomon *et al.* hanno però osservato come la sostituzione della testa basica con differenti nuclei lattamici sia associata al mantenimento di una buona attività antimalarica, ipotizzando così la non necessità del centro protonabile sulla catena laterale.⁴²

J. K. Natarajan *et al.* hanno recentemente analizzato l'effetto della sostituzione dell'azoto in posizione 4 della chinolina con altri eteroatomi quali zolfo e ossigeno.

La sostituzione dell'azoto con ossigeno e zolfo causa una diminuzione della basicità dell'azoto chinolinico e una conseguente riduzione della attività antimalarica, confermando i dati già presenti in letteratura.⁴³ Sono però risultati interessanti i dati ottenuti dai derivati 4-O sostituiti i quali hanno mostrato un buon indice di selettività nei confronti dei ceppi CQ-R presentando, in taluni casi, attività paragonabile alla cloroquina.³⁸

Ricerca di nuovi farmaci a nucleo 4-amminochinolinico.

Un'altra variazione della catena basica della cloroquina è rappresentata dall'incorporazione di un residuo fenilico, che dà luogo all'*amodiachina* (AQ), brevettata nel 1949. Dopo un uso abbastanza diffuso è stata abbandonata nel corso degli anni '80 poiché alcuni studi correlarono l'insorgenza di agranulocitosi e di epatite con il suo uso come profilattico. In verità l'*amodiachina* non è più tossica della cloroquina quando usata per la malaria da *P. falciparum* non complicata. La sua tossicità si manifesta solo nei casi di prolungata profilassi e appare dovuta all'ossidazione a derivato chinonimminico che si lega alle proteine cellulari ed è eliminato come derivato mercapturico dopo coniugazione con glutazione.



Poiché l'AQ è ancora attiva su vari ceppi di *P. falciparum* CQ-resistenti, essa è stata recentemente reintrodotta in terapia in associazione, o con sulfadossina/pirimetamina o con artesunato, nel trattamento a breve termine della malaria non complicata in differenti paesi africani⁴⁴ ed è inoltre apparsa un interessante punto di partenza per creare nuove molecole meno tossiche.

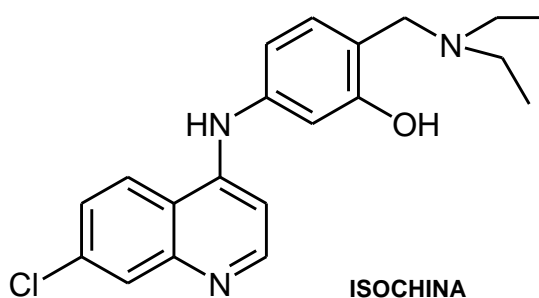
La sostituzione della catena dietilamminica con un residuo pirrolidinico (amopirochina) o ter-butilamminico fornisce composti più attivi della AQ sui ceppi CQ-resistenti.

Da queste osservazioni con progressive modifiche strutturali si è giunti alla *tebuchina*, altamente attiva.^{45,46} Purtroppo anche questo composto ha dato luogo a fenomeni di tossicità cronica, probabilmente connessi con la sua lunghissima emivita e con la possibilità di subire ossidazione metabolica a chinonimmine tossiche. Composti ancora molto attivi sono stati ottenuti rimpiazzando il residuo clorofenilico con semplici alchili, in particolare propile e isopropile.⁴⁷

L'ingombro spaziale in tutti questi composti rallenta la trasformazione a derivati chinonimminici.

Questa trasformazione non può avere luogo sostituendo l'ossidrile con altri gruppi come il fluoro, ma ciò comporta perdita di attività.

Una nuova generazione di antimalarici 4-amminochinolinici è stata ottenuta invertendo la posizione dei gruppi ossidrilico e dialchilamminometilico, passando dall'amodiachina all'*isochina*.⁴⁸

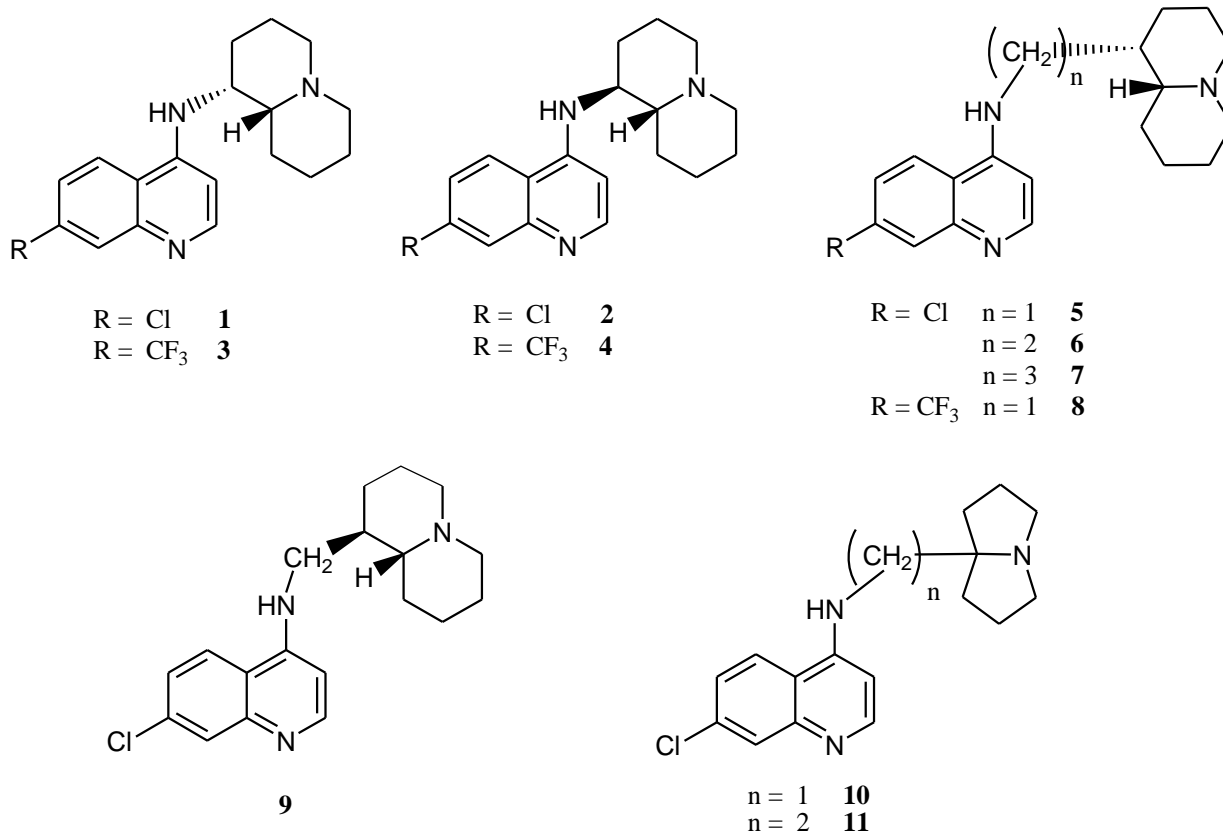


L'*isochina* presenta una $IC_{50} = 6,01$ nM verso il ceppo resistente K1. Essa subisce dealchilazione metabolica, ma non fornisce derivati chinonimminici e viene eliminata sotto forma di derivati glucuronici. Va ancora notato che la sostituzione del residuo dietilamminico con un *ter*-butilamminico diminuisce l'attività in vitro, anche se il prodotto risultante presenta un miglior profilo farmacocinetico ed una più elevata resistenza metabolica.^{48, 49}

Alla luce di quanto esposto e nell'intento di realizzare nuovi derivati 4-amminochinolinici, attivi sui ceppi CQ-resistenti del *P.falciparum*, nell'ambito del gruppo di ricerca della professoressa A. Sparatore presso il quale è stata realizzata la presente tesi, sono stati preparati nel corso degli ultimi anni numerosi composti analoghi della cloroquina recanti sull'azoto amminico catene basiche piuttosto peculiari costituite dai nuclei chinolizidinico o pirrolizidinico uniti direttamente o tramite uno o più metilene.

Queste catene sono caratterizzate da alta lipofilia, forte basicità, notevole ingombro spaziale e difficoltà di metabolizzazione.

Nel complesso le molecole preparate e saggiate contro ceppi di *P.falciparum* CQ-Sensibili e CQ-Resistenti sono le seguenti:



Tutti i composti hanno mostrato un elevato grado di attività sia sul ceppo D-10 (CQ-sensibile) sia sul ceppo W-2 (CQ-resistente) del *P. falciparum*. Tra i composti più attivi sono da citare i composti **5**, **10** e **11**, che testati *per os* in modelli murini infettati con *P. berghei*, sono risultati in grado di ridurre la parassitemia di oltre il 99%.⁵⁰

Più in particolare il composto (-)-AM1 (**5**), caratterizzato dalla presenza del nucleo chinolizidinico, ha esibito un'elevata attività *in vitro* sia sul ceppo D-10 (CQ-S, IC_{50} : $24,0 \pm 8,8$ nM) che sul ceppo W-2 (CQ-R, IC_{50} : $53,7 \pm 22,7$ nM), con un'attività sul ceppo

clorochino resistente 8,1 volte superiore alla cloroquina stessa, pur mantenendo una citotossicità paragonabile. Recentemente esso è stato testato in vivo presso la London School of Hygiene and Tropical Medicine su due differenti modelli di malaria murina: *P. berghei* e *P. yoelii*. Il composto è risultato in grado di rimuovere completamente la parassitemia nel modello con *P. berghei* quando somministrato per via intraperitoneale (i.p.) a dosi di 10 mg/Kg e con dosi di 25 mg/Kg per via orale (o.s.).

In tabella 1 vengono mostrati i risultati dell'esperimento dose-risposta effettuato per via orale e le relative ED₅₀ ed ED₉₀ valutate sia contro il *P. berghei* che contro il *P. yoelii*.

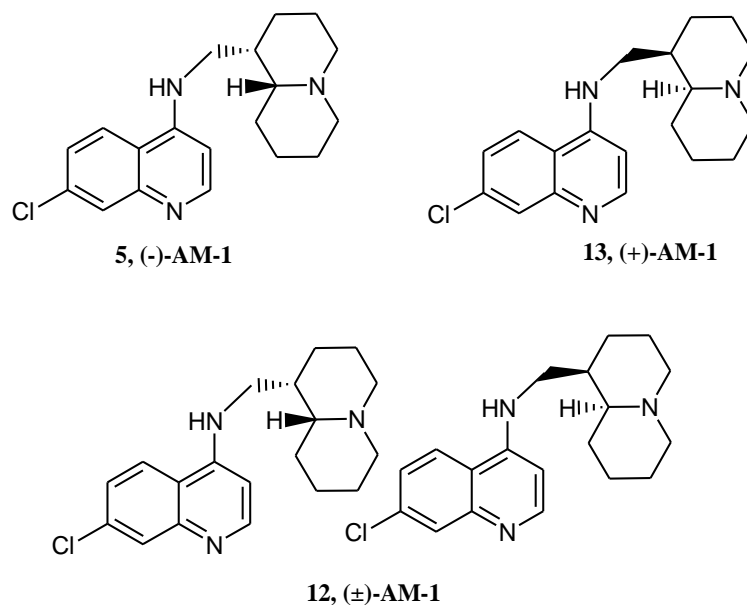
Tabella 1: attività in vivo di (-)-AM1 (5) in due modelli di malaria murina dopo somministrazione in dose ripetuta per 4 giorni.

Comp.	<i>P. berghei</i> (CQ-S)		<i>P. yoelii</i> (CQ-R)	
	ED ₅₀ (mg/Kg)	ED ₉₀ (mg/Kg)	ED ₅₀ (mg/Kg)	ED ₉₀ (mg/Kg)
(-)-AM1 (5)	5,19	8,16	1,6	4,75
CQ	4,95	9,82	>3	49,04

Per questo interessante profilo farmacologico, lo studio preclinico di questa molecola è entrato a far parte di un più ampio progetto finanziato dalla Comunità Europea, il cui scopo è stabilire un portfolio di nuovi farmaci antimalarici, facilmente sintetizzabili e a basso costo, utilizzabili nel trattamento della malaria in quei paesi in via di sviluppo dove tale patologia risulta essere endemica. Il derivato (-)-AM1 (5) presenta però un inconveniente di ordine economico: l'(-)-amminolupinano necessario per la sintesi di questo composto è infatti ottenuto per semisintesi dall'alcaloide naturale (-)-lupinina, estratta dai semi di *lupinus luteus*. Ciò significa avere una materia prima con disponibilità limitata ed a costi relativamente

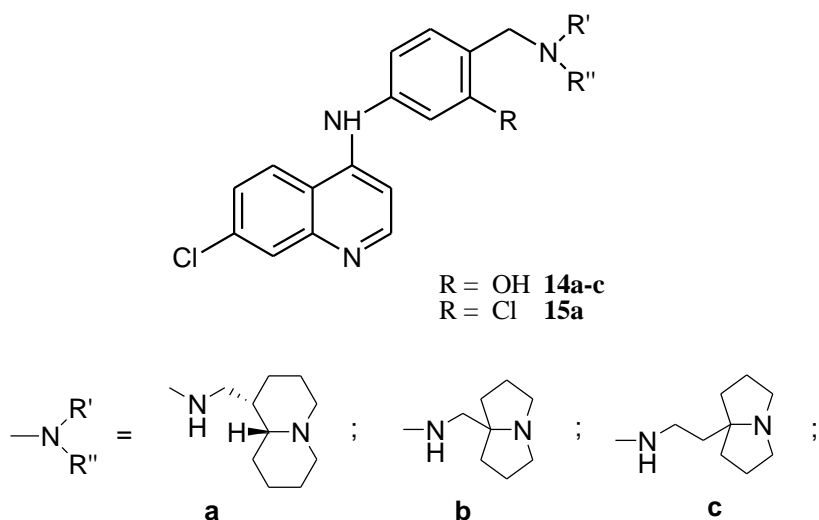
elevati e sicuramente poco compatibili per un potenziale farmaco che si rivolge ad un'utenza vasta, ma molto povera quale è la popolazione del terzo mondo.

Dato che l'attività delle 4-amminochinoline non sembrerebbe legata all'interazione con alcun substrato chirale, la presenza di una determinata configurazione assoluta dei due centri chirali sulla testa basica non dovrebbe essere indispensabile. Si è così deciso di valutare la possibilità di sviluppare a fini terapeutici la miscela racema di **AM1** la cui porzione chinolizidinica può essere ottenuta per sintesi totale, garantendo così sia una riduzione dei costi di produzione, che l'indipendenza dalla fonte naturale. Come previsto da precise disposizioni internazionali, lo sviluppo di un farmaco racemo è subordinato alla dimostrazione dell'equivalenza dell'attività, del metabolismo, della tossicità e della farmacocinetica dei due singoli enantiomeri. Oggetto della presente tesi è stato quindi la messa a punto della strategia sintetica che permettesse l'ottenimento di **AM1** in forma racema ((±)-**AM1**, **12**) ma anche la progettazione e realizzazione della sintesi dell'enantiomero destrogiro **13**.



Parallelamente allo sviluppo del progetto riguardante **AM1** abbiamo indagato l'effetto sull'attività antimalarica della sostituzione della testa basica dietilaminica dell'isochina con le voluminose (pirrolizidin-7a-il)alchilamine e (chinolizidin-1α-il)metilamina (**14a-c**), già presenti nei nostri analoghi della cloroquina precedentemente illustrati.

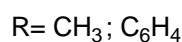
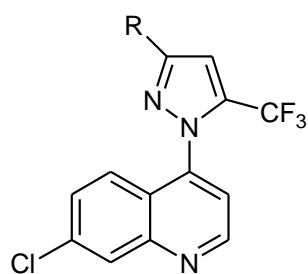
Abbiamo ipotizzato che l'alta lipofilia di questi sostituenti possa incrementare la permeabilità cellulare dei composti, mentre la presenza di un centro basico aggiuntivo ne favorirebbe l'accumulo nel vacuolo digestivo del plasmodio.



Sulla base di dati riportati in letteratura che hanno dimostrato che la 4'-deidrossi-4'-fluoroamodiachina mantiene la stessa attività dell'amodiachina sia sui ceppi CQ-S che CQ-R di *P. falciparum*, pur risultando metabolicamente più stabile all'ossidazione,⁵¹ si è pensato di verificare l'importanza della funzione idrossilica aromatica del composto **14a**, risultato essere il più attivo degli analoghi dell'isochina, sostituendolo con un atomo di cloro (**15a**).

Abbiamo inoltre valutato la possibilità di sostituire l'intero nucleo fenolico tipico dell'AQ e dei suoi analoghi con differenti nuclei aromatici.

Recentemente Cunico *et al.*⁵² hanno descritto una serie di derivati a nucleo 4-(pirazol-1-il)-7-clorochinolinico, che sono risultati essere scarsamente attivi contro il ceppo W-2 CQ-R di *P. falciparum*, con $IC_{50} = 13,8 \mu M$ per il composto migliore.



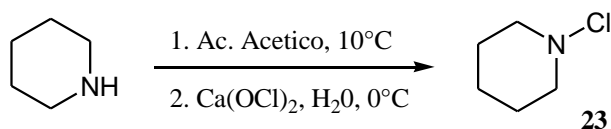
4-(Pirazol-1-il)-7-clorochinolina

In questi composti il nucleo pirazolico è connesso al nucleo chinolinico senza l'usuale gruppo intercalante NH. Questo supporta l'ipotesi che la risonanza tra l'atomo di d'azoto del gruppo amminico e quello della chinolina sia fondamentale per spiegare l'associazione dei farmaci CQ-simili con l'ematina e quindi la loro attività antimalarica.³⁹ Sulla base di questi presupposti, abbiamo progettato di sostituire il nucleo fenolico dell'AQ con un nucleo pirrolico, ancora connesso alla porzione chinolinica attraverso l'usuale gruppo NH (composti **16-20**). L'anello pirrolico è stato scelto in quanto mantiene l'alta reattività del fenolo, risultando adatto alle reazioni di Mannich utilizzate per introdurre le teste basiche nei composti **16a-e**. Sulla base dei dati ottenuti e al fine di valutare l'importanza dell'interazione diretta tra il nucleo aminochinolinico ed il nucleo pirrolico che si realizza nei sopracitati composti attraverso il legame azoto-azoto, abbiamo deciso di interporre una catena propilica tra il nucleo pirrolico e l'azoto della porzione 4-amminochinolinica sintetizzando i composti **21a** e **21b**.

Chimica

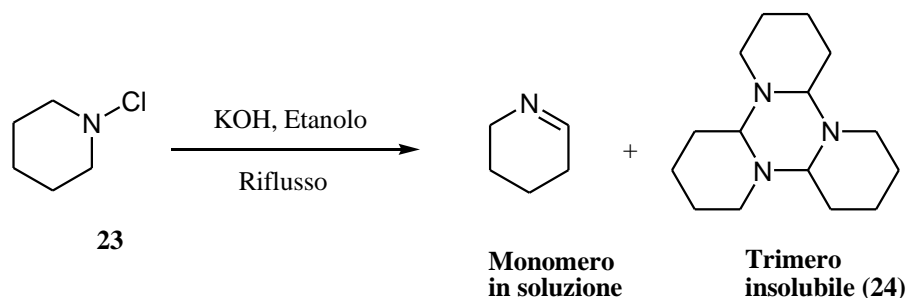
Sintesi di (\pm)-AMI (12).

L'(\pm)-amminolupinano necessario è stato ottenuto utilizzando un approccio sintetico già descritto in letteratura il cui intermedio chiave risulta essere la *trans*-tetraidroanabasina racema bromidrato (**25**) a sua volta ottenibile partendo dalla poco costosa e facilmente disponibile piperidina.^{53,54} Come indicato nello schema 1, la piperidina, precedentemente salificata con acido acetico, viene convertita mediante uso di ipoclorito di calcio nella più reattiva e poco stabile *N*-cloropiperidina (**23**).

Schema 1.

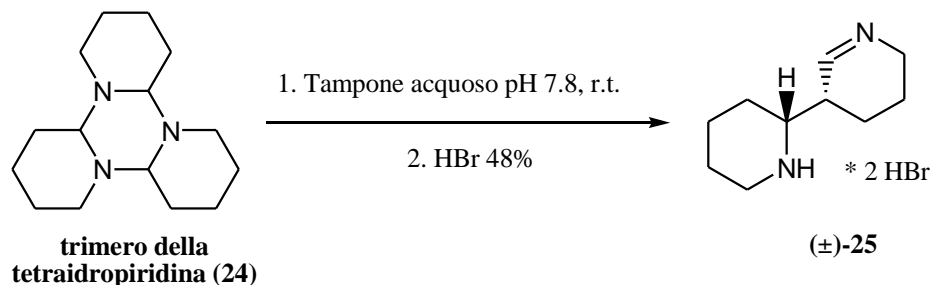
L'aggiunta di **23** direttamente in una soluzione etanolica bollente di KOH causa la perdita di una molecola di HCl con la formazione di 2,3,4,5-tetraidropiridina monomero, solubile nella miscela di reazione, il quale spontaneamente tende nell'arco di 24 ore a polimerizzare nel più stabile ed insolubile trimetro **24** (*Schema 2*).⁵³

Schema 2.



Il trimero della 2,3,4,5-tetraidropiridina viene quindi trattato con una soluzione tampone a pH 7.8, permettendo così il riarrangiamento della molecola. Il prodotto principale che si ottiene risulta essere la *trans*-tetraidroanabasina racema (**25**), salificata mediante l'uso di una soluzione di HBr (schema 3).⁵⁴

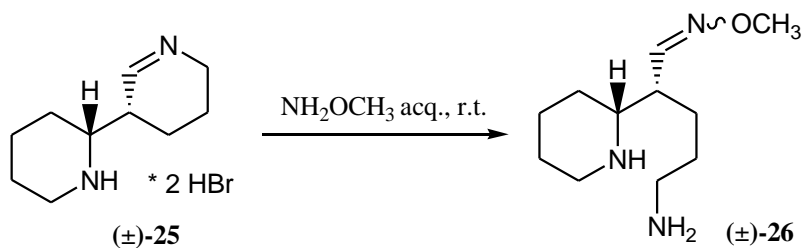
Schema 3.



La successiva ricristallizzazione in isopropanolo del sale bromidato risulta, a differenza dei dati riportati in letteratura,⁵⁴ difficile e con basse rese.

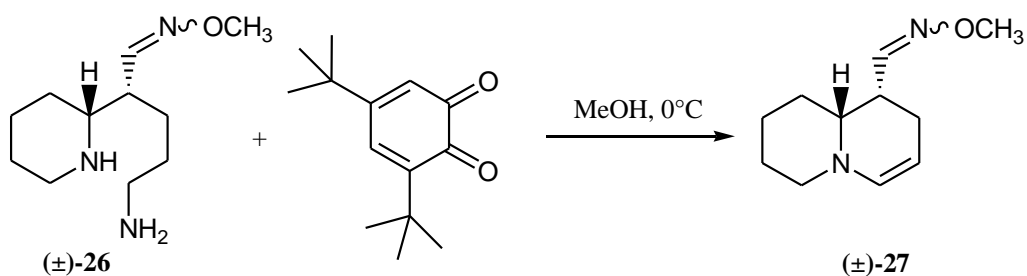
I cristalli della *trans*-tetraidroanabasina racema vengono quindi trattati con una soluzione acquosa di *O*-metilidrossilamina, permettendo la conversione del prodotto **25** nella corrispettiva *O*-metilossima **26** (schema 4),⁵⁵ isolabile come una miscela racema *sin/anti* in cui la stereochimica intorno al legame C-C è preservata.

Schema 4.



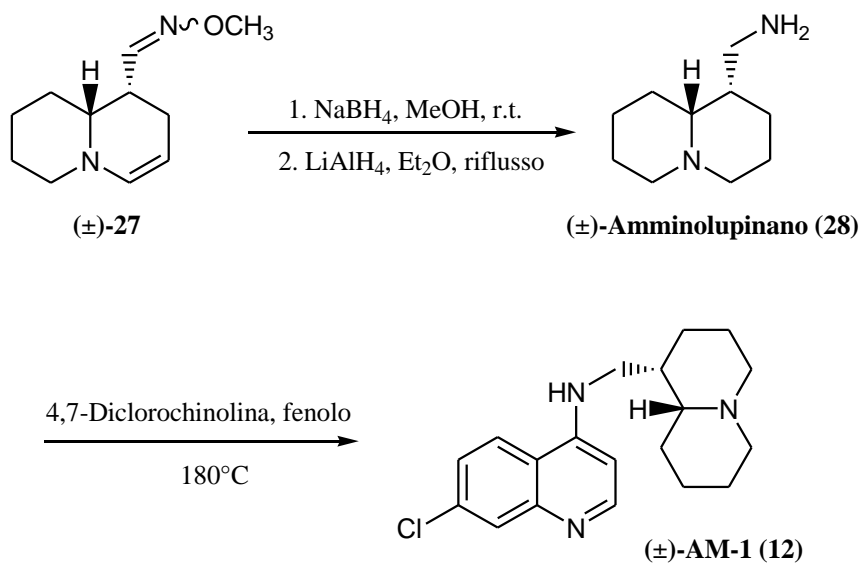
L'ossima ottenuta subisce un processo di deaminazione ossidativa attraverso l'uso del 3,5-di-*ter*-butil-*O*-benzoquinone. Si ottiene così una condensazione intramolecolare che porta alla formazione del composto a nucleo chinolizidinico **27** (schema 5).

Schema 5.



La riduzione del **27** con NaBH_4 in metanolo e successivo trattamento con LiAlH_4 dell'intermedio ottenuto genera l'amminolupinano racemo (**28**), il quale viene scaldato con 4,7-diclorochinolina in presenza di fenolo per generare l'(\pm)-**AM1** (**12**) (schema 6).

Schema 6.



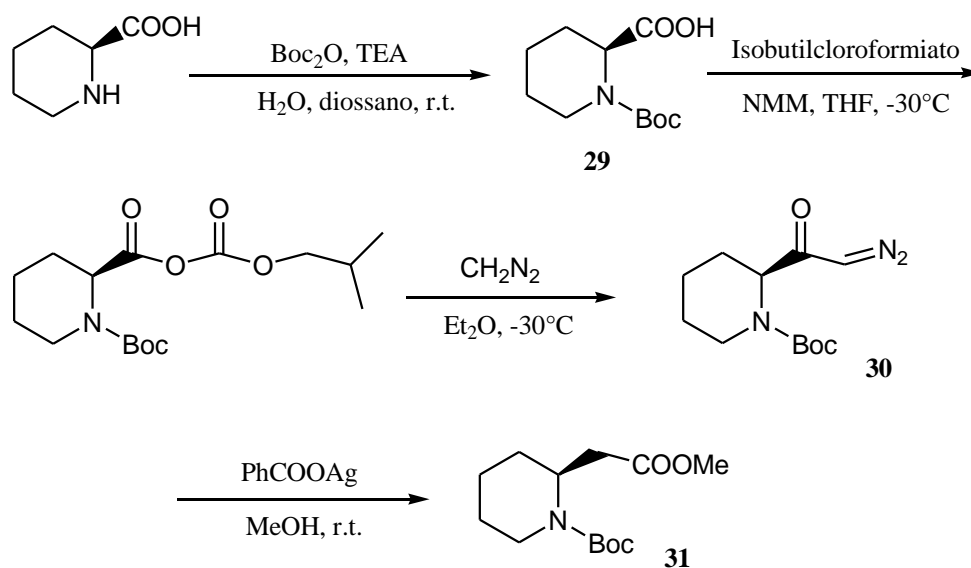
A differenza di quanto descritto in letteratura,⁵⁵ lo schema di reazione proposto non ha condotto al solo amminolupinano racemo ma anche alla formazione in quantità paragonabili del suo epimero e di conseguenza alla formazione della forma epimerica dell'AM-1, dimostrando di non essere diastereoselettivo.

Sintesi di (+)-AM1 (13).

Anche in questo caso la sintesi del (+)-aminolupinano si è basata su una sintesi enantioselettiva già descritta in letteratura,^{56,57} che utilizza un sintone chirale quale l'acido L-pipecolico, sul quale si effettua la sintesi del secondo anello tipico del nucleo chinolizidinico. Punto di partenza della sintesi è l'acido Boc-L-pipecolico (**29**), ottenuto trattando l'aminoacido corrispondente con la Boc anidride in una miscela TEA/H₂O/diossano. Segue il trattamento dell'intermedio con isobutilcloroformiato a -30°C al fine di attivare la funzione

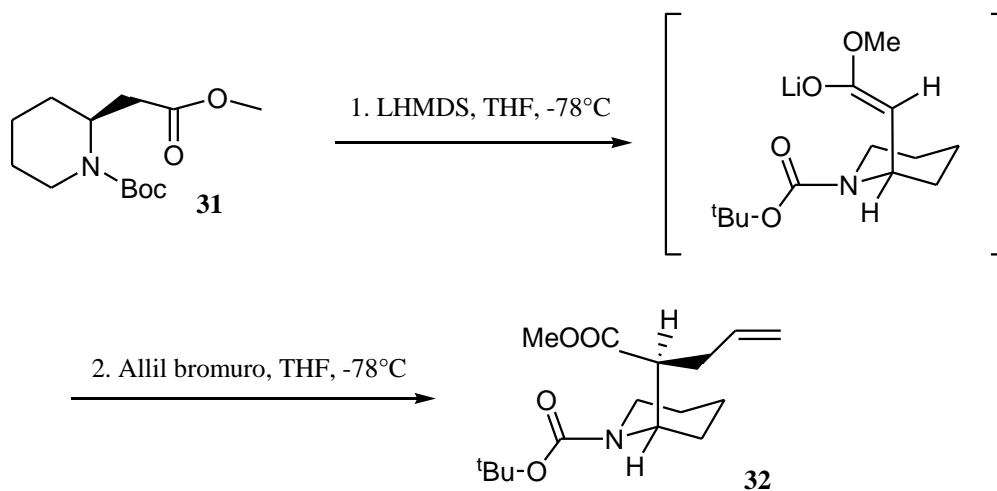
carbossilica, e successiva reazione con una soluzione eterea di diazometano, con conseguente formazione del diazometilchetone **30** (schema 7), il quale viene convertito nell'estere metilico dell'omologo superiore dell'acido L-pipecolico (**31**) attraverso una reazione di Arndt-Eistert che utilizza l'argento benzoato in soluzione metanolica.

Schema 7.



Segue una allilazione diretta mediante l'uso di LHMDS e di bromuro d'allile in THF a -78°C . Questo risulta essere il passaggio sintetico chiave in quanto si forma in netta prevalenza il diastereoisomero desiderato. Una possibile spiegazione per l'alto livello di diastereoselettività nella formazione del legame C-C è basata sulla conformazione assunta dall'intermedio enolato che si forma dopo trattamento con la base. Infatti è probabile che tale enolato abbia geometria "e" a causa dell'interazione energeticamente favorevole tra l'anione ed il gruppo N-Boc. Tale conformazione favorirebbe così l'ingresso sulla faccia "sin" dell'elettrofilo allil bromuro per dare in maggioranza l'enantiomero (S,S) (**32**) (schema 8).

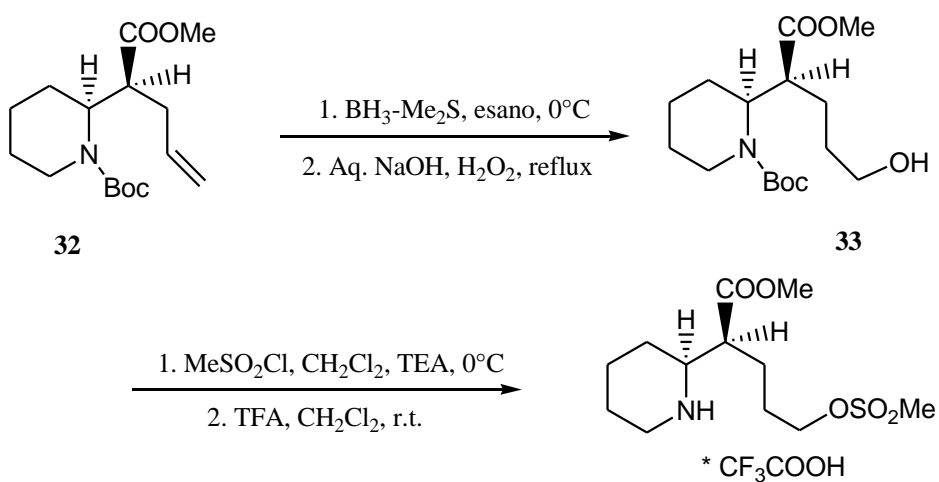
Schema 8.



Dalla reazione si ottiene comunque una piccola percentuale del diastereoisomero (S,R) che viene separato dal prodotto desiderato mediante cromatografia su gel di silice.

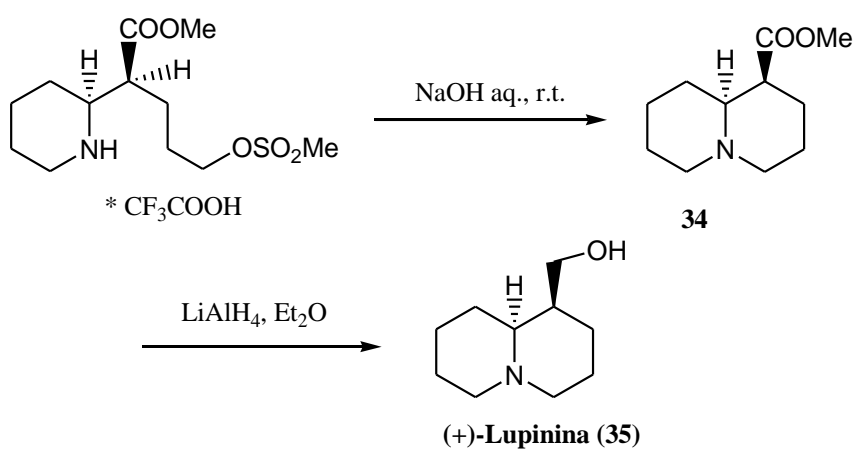
L'idroborazione dell'allil derivato è stata effettuata mediante il complesso borano-dimetilsulfuro generando l'alcol (**33**) con ottime rese. Segue mesilazione della funzione idrossilica e rimozione del gruppo protettore Boc utilizzando acido trifluoroacetico (schema 9).

Schema 9.



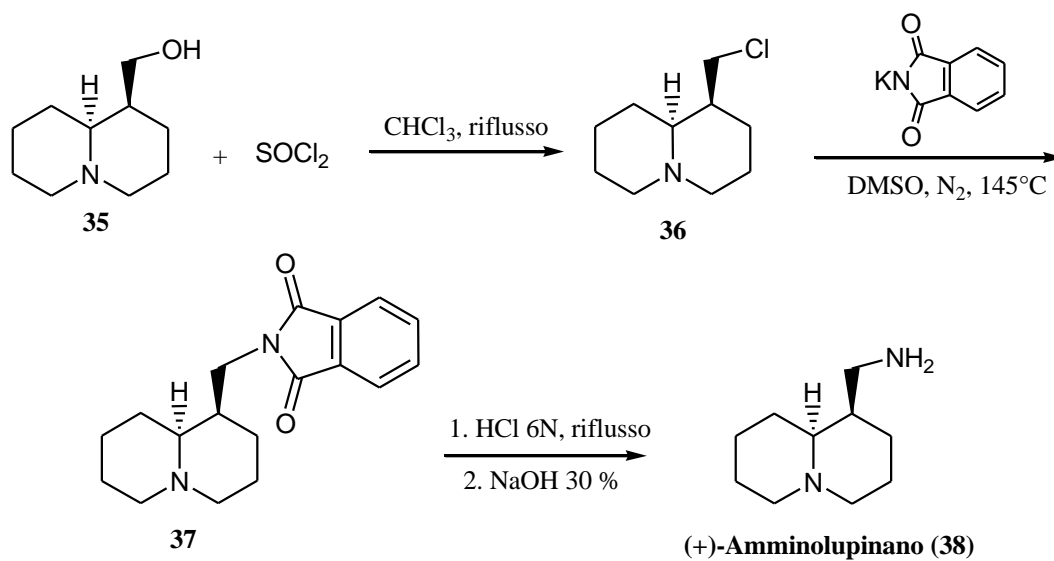
Il trattamento del sale trifluoroacetico con una soluzione acquosa di NaOH porta ad una spontanea ciclizzazione dell'intermedio nell'estere chinolizidinico **34**, il quale viene ridotto mediante uso di LiAlH_4 a (+)-lupinina (**35**) (schema 10) che è stata poi utilizzata direttamente, senza ulteriore purificazione, per la preparazione del (+)-amminolupinano (**38**) secondo il procedimento descritto da F. Sparatore *et al.* (schema 11).⁵⁸

Schema 10.



E' comunque da sottolineare che la lupinina grezza ottenuta ha un $[\alpha]_D^{25} +7,5$ (c=1, EtOH) quindi molto differente da quanto riportato in letteratura per l'enantiomero levogiro $[\alpha]_D^{25} - 21$ (c=1, EtOH).^{57,59} Questo dato non sembra del tutto giustificato dalla presenza di impurezze ma sembra piuttosto dimostrare come lo schema adottato non sia completamente enantioselettivo, generando una non trascurabile quantità di enantiomero levogiro.

Schema 11.

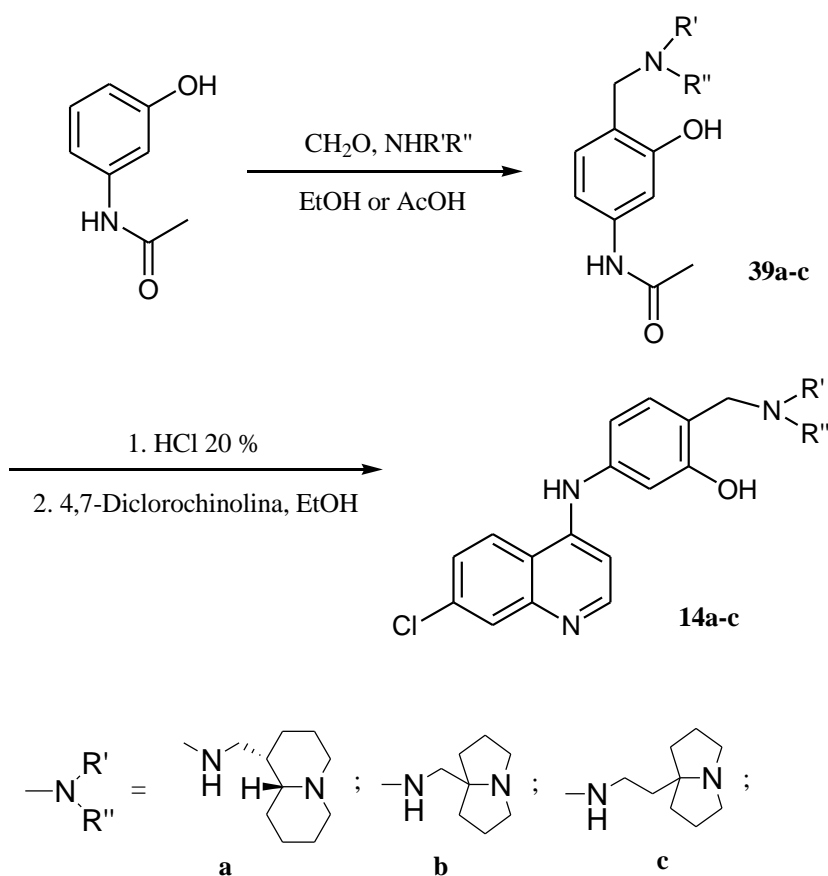


Infine il (+)-AM1 (13) è stato ottenuto seguendo lo stesso schema sintetico utilizzato per la sintesi dell'(\pm)-AM1 (12) (schema 6). La purezza ottica finale del prodotto viene incrementata attraverso una cristallizzazione frazionata da una miscela di CH_2Cl_2 /etere etilico, sfruttando la diversa solubilità del racemo, che risulta meno solubile, rispetto all'enantiomero puro che tende a concentrarsi nelle madri di cristallizzazione. Eseguendo due o tre successive ricristallizzazioni si riesce ad ottenere un campione di prodotto con un eccesso enantiomerico (e.e.) variabile, a seconda del numero di cristallizzazioni, dal 80% al 87%.

Sintesi degli analoghi dell'isochina.

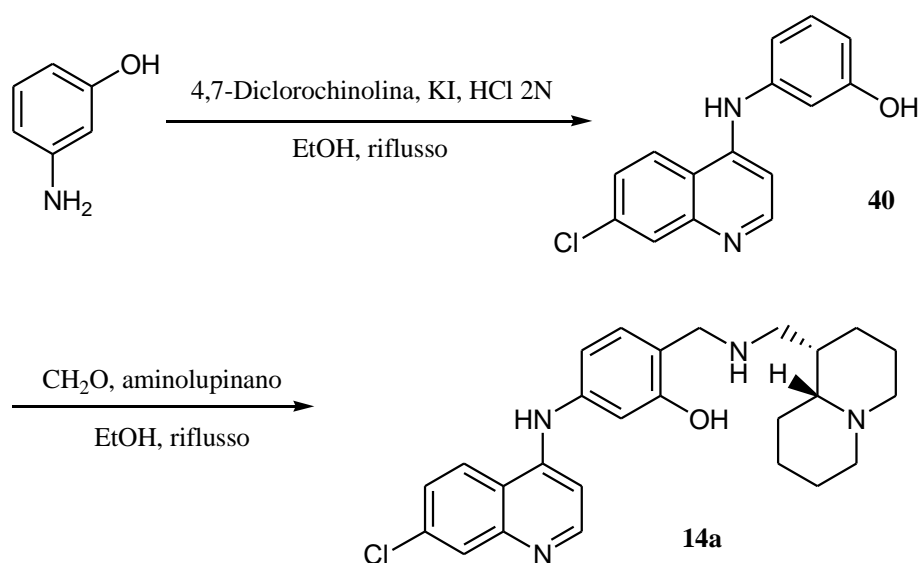
I composti **14a-c** sono stati sintetizzati attraverso uno schema sintetico che prevede due passaggi, il primo dei quali è una reazione di Mannich condotta utilizzando 3-acetamidofenolo, formaldeide e l'ammina che si intende introdurre come testa basica.⁶⁰ Le reazioni sono state condotte o utilizzando acido acetico a temperatura ambiente o utilizzando etanolo assoluto, in questo caso scaldando la miscela di reazione a riflusso. Il secondo passaggio prevede l'idrolisi della funzione amidica per riscaldamento con HCl 20% con formazione dell'ammina cloridrata corrispondente che, senza ulteriori purificazioni, viene fatta reagire direttamente con 4,7-diclorochinolina per riscaldamento in etanolo (schema 12).

Schema 12.



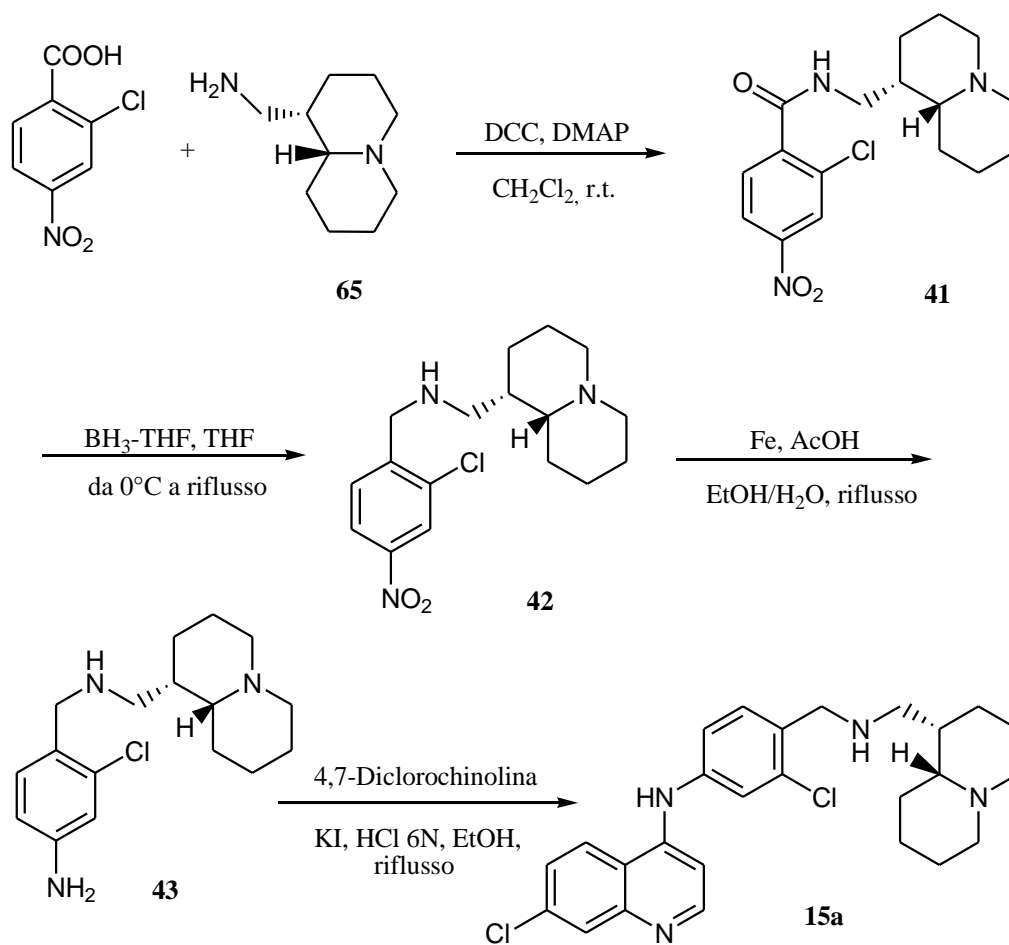
In alternativa, al fine di ridurre il consumo di (-)-amminolupinano (**65**), è stata approntata una differente strategia sintetica per il composto **14a** (schema 13). In questo caso la 4,7-diclorochinolina viene fatta reagire con 3-aminofenolo in presenza di KI⁶¹ per generare l'intermedio **40** il quale subisce una successiva reazione di Mannich in presenza di formaldeide e l'(-)-amminolupinano.

Schema 13.



Il composto **15a** è stato ottenuto attraverso una prima reazione di coupling tra l'acido 2-cloro-4-nitrobenzoico e l'(-)-amminolupinano (**65**) in presenza di DCC (**41**); l'amide ed il nitrogruppo sono stati ridotti rispettivamente utilizzando BH₃ in THF e ferro in acido acetico.^{62,63} Il derivato aminico aromatico **43** è stato scaldato in etanolo con la 4,7-diclorochinolina in presenza di KI e HCl 6N (schema 14).

Schema 14.

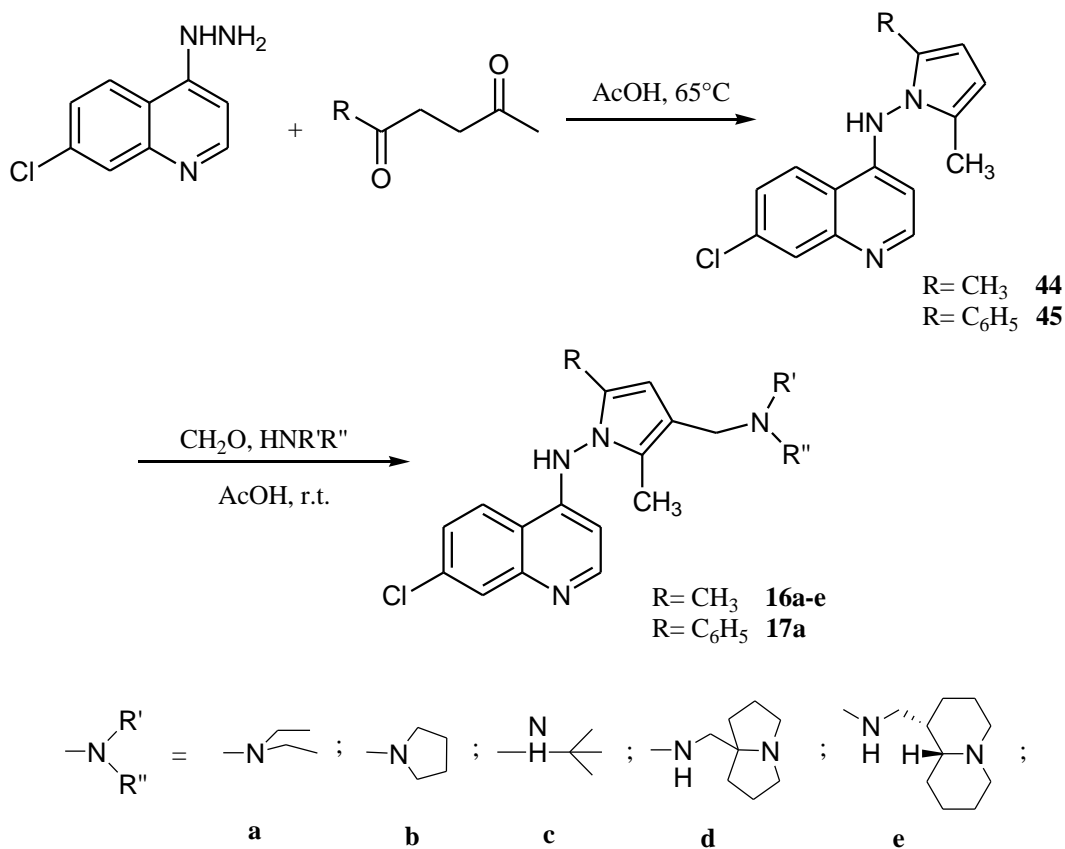


Sintesi delle 4-(pirrol-1-il)aminochinoline.

Per i composti **17a-e** si è seguito uno schema che, partendo dalla 7-cloro-4-idrazinochinolina, permette di ottenere i composti finali attraverso due step sintetici.

Il primo genera con ottime rese l'intermedio pirrolico **44** attraverso una reazione di Paal-Knor, che consiste nel far reagire a caldo, per tre ore, una soluzione di 7-cloro-4-idrazinochinolina in acido acetico glaciale con acetilacetone. Il secondo step permette l'ottenimento della base di Mannich attraverso l'addizione di una soluzione fredda dell'ammina prescelta (base libera o cloridrato), formaldeide al 37% ed acido acetico glaciale all'intermedio **44** e facendo reagire tale miscela per 2-3 ore a temperatura ambiente (schema 15).

Schema 15.

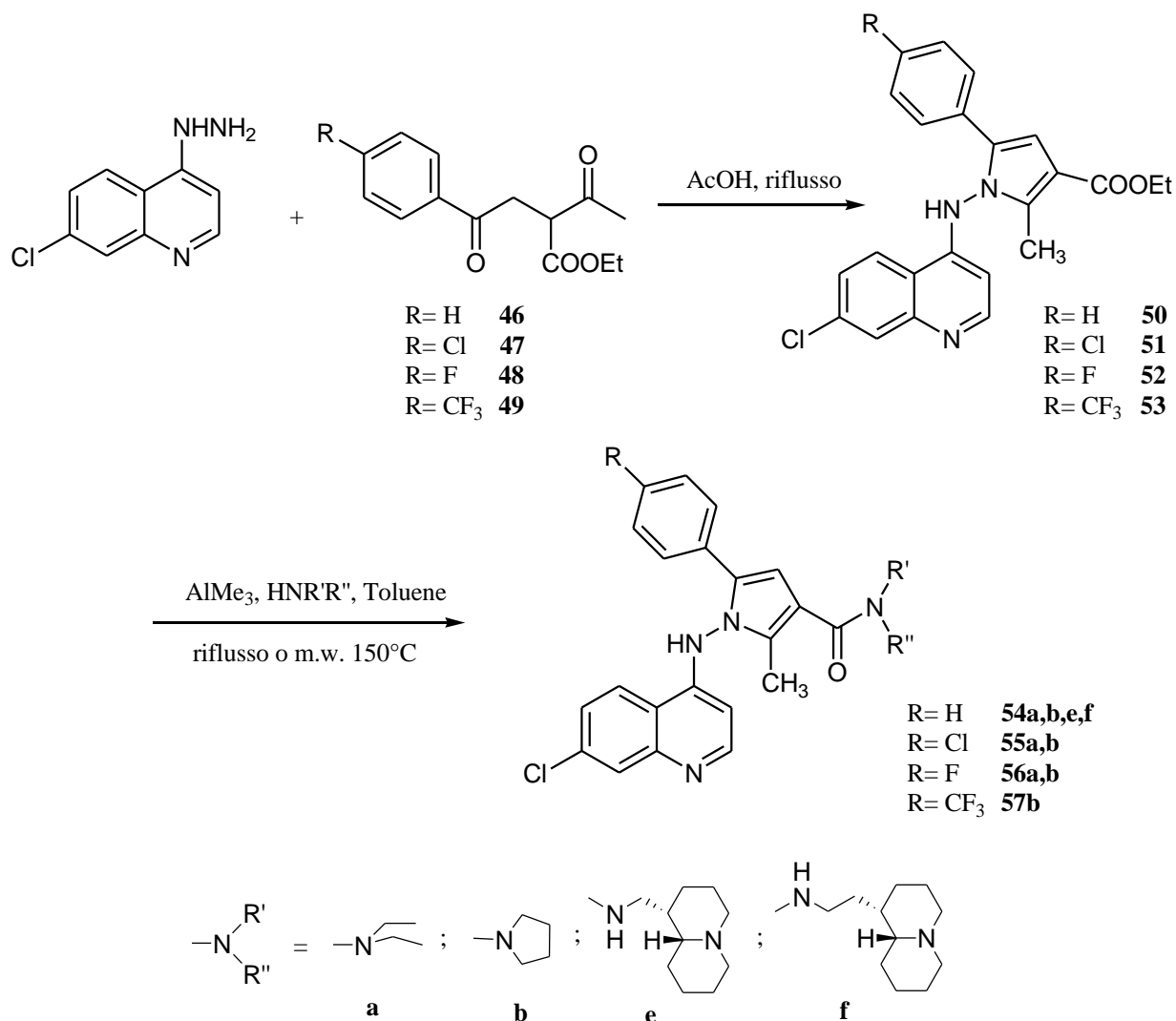


Partendo dall'intermedio pirrolico **45**, avente in posizione 2 e 5 differenti sostituenti ed ottenuto dal 1-fenil-1,4-pentandione, la reazione di Mannich con dietilamina ha portato ai due differenti isomeri 3- e 4-(dietilamino)metil sostituiti (come riportato dagli spettri N.M.R.) la cui separazione è risultata difficoltosa e tediosa; attraverso questa via sintetica è stato possibile isolare e purificare solo una piccola quantità dell' isomero 3-sostituito **17a**.

Di conseguenza, al fine di ottenere agevolmente i composti **17-20**, si è approntato un differente schema sintetico: la 7-cloro-4-idrazinochinolina è stata condensata con 2-acetil-4-osso-4-(4-sostituito)fenilbutanoato d'etile (**46-49**), e gli intermedi pirrolici ottenuti (**50-53**) sono stati convertiti ad amidi (**54-57**) attraverso una amidazione diretta che prevede l'uso di trimetilalluminio e dell'amina prescelta (schema 16).^{64,65}

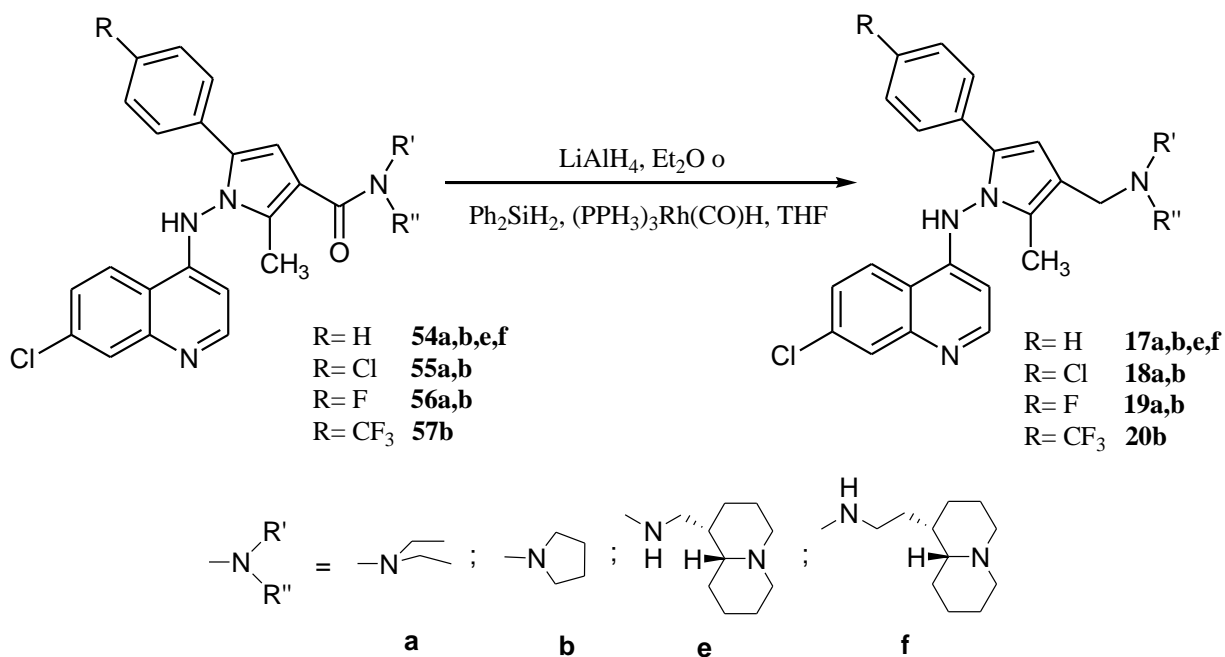
Per i derivati **50** e **51** l'amidazione diretta è stata condotta ponendo la miscela di reazione a riflusso di toluene per 24 ore, mentre nel caso dei composti **52** e **53** l'introduzione diretta della ammina sulla funzione carbossilica non ha permesso l'ottenimento dei prodotti desiderati con rese soddisfacenti, probabilmente a causa dell'effetto elettron-attrattore esercitato rispettivamente dall'atomo di fluoro e dal residuo trifluorometilico. Risultati decisamente migliori, sia in termini di resa che di tempi, si sono ottenuti realizzando questo tipo di reazione in un sintetizzatore a microonde (schema16).

Schema 16.



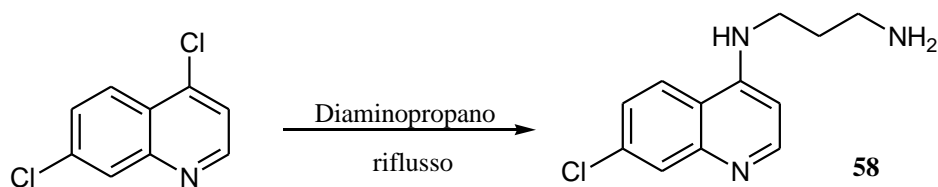
Le amidi, in fine, sono state ridotte alle corrispettive amine utilizzando o litio alluminio idruro o difenilsilano in presenza di tris(trifenilfosfina)rodio(I)carbonil idruro come catalizzatore^{66,67} al fine di prevenire la dealogenazione dell'anello fenilico nei derivati **55-57** (schema 17).

Schema 17.

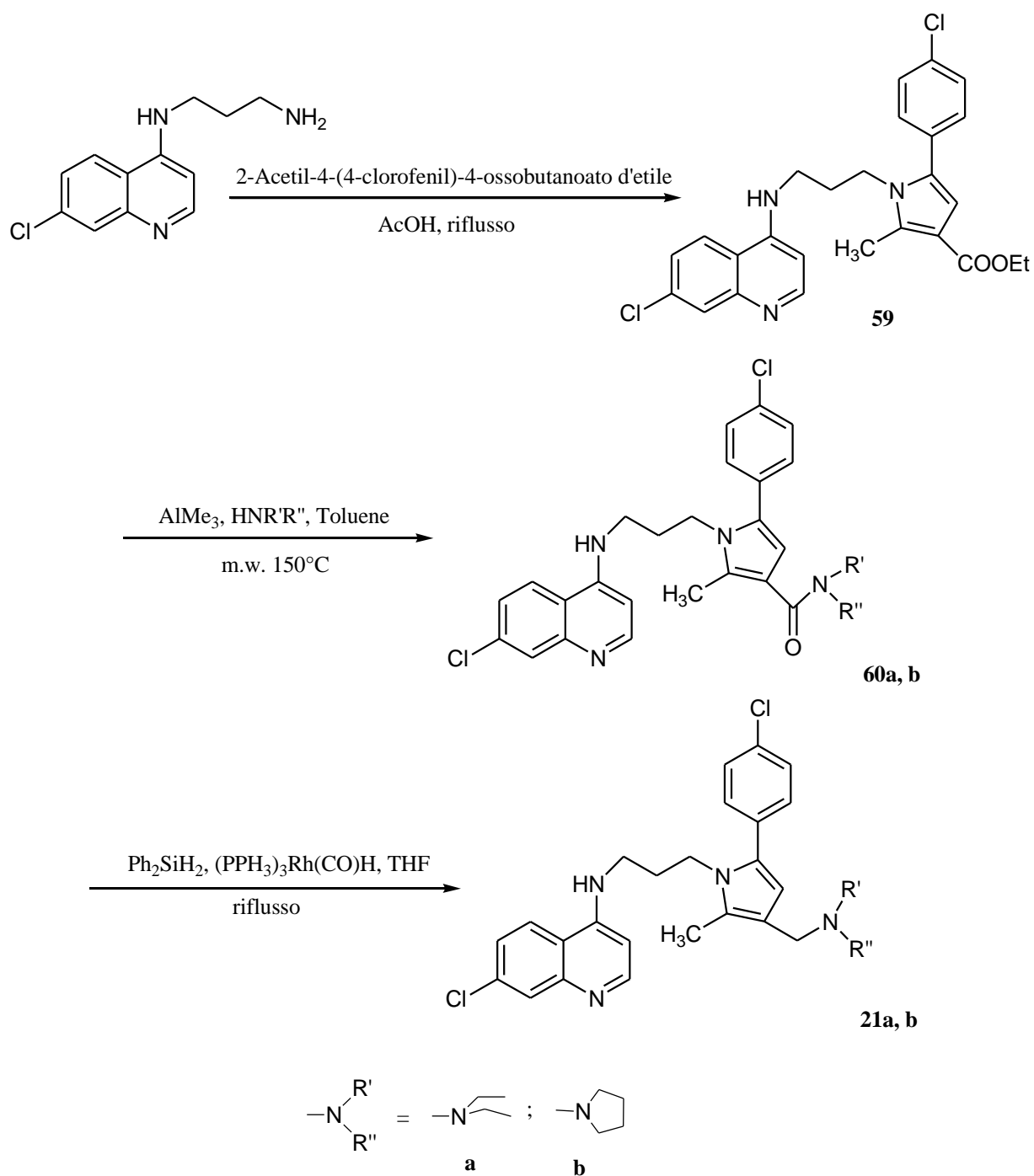


I composti **21a** e **21b** sono stati ottenuti (schema 19) attraverso la stessa via sintetica utilizzata per i composti **19-20**, salvo che utilizzare nel primo passaggio la *N*-(3-aminopropil)-4-amino-7-clorochinolina (**58**) ottenuta per reazione della 4,7-diclorochinolina con il diaminopropano (schema 18).

Schema 18.



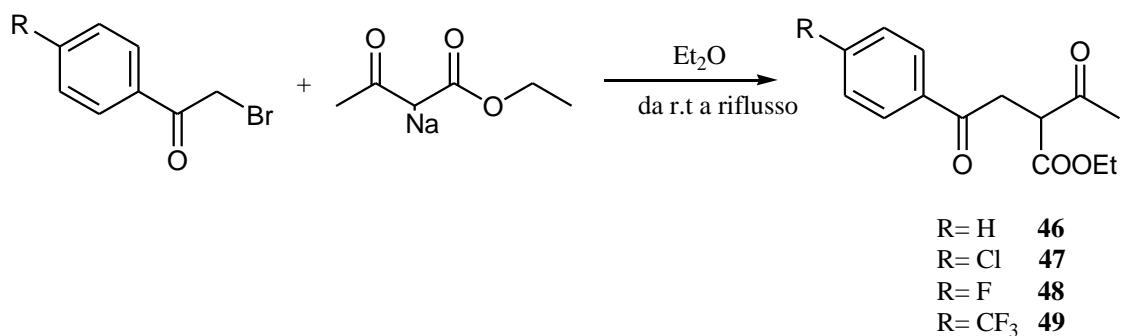
Schema 19.



Gli 1,4-dichetoni utilizzati nello schema 15 sono di origine commerciale, mentre i dichetoesteri utilizzati negli schemi 16 e 19 sono stati preparati in accordo con quanto

riportato in letteratura^{68,69} attraverso la reazione del fenacilbromuro o del 4-(sostituito)fenacilbromuro con il sodio acetoacetato (schema 20).

Schema 20.

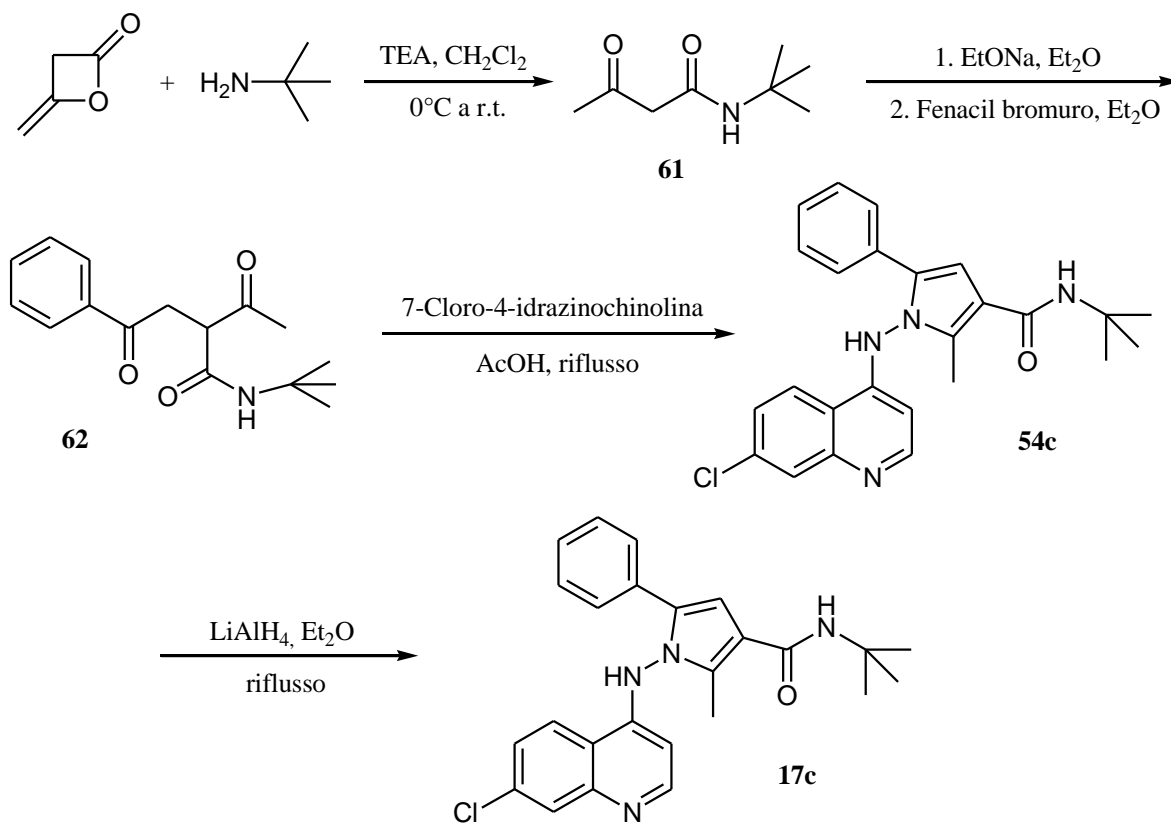


L'amide **54c**, probabilmente a causa di un eccessivo ingombro sterico dell'addotto tra il trimetilalluminio e la *ter*-butilamina, non può essere ottenuto attraverso la via sintetica utilizzata per ottenere le amidi sopraccitate; è stato quindi necessario realizzare un differente schema sintetico per ottenere il composto **17c** (schema 21).

La *ter*-butilamina è stata fatta reagire con dichetene per generare l'*N*-(*ter*-butil)acetoacetamide (**61**)⁷⁰ che con il fenacilbromuro porta all'1,4-dichetoestere **62** necessario per formare il derivato pirrolico **54c**; l'amide viene infine ridotta ad amina utilizzando litio alluminio idruro.

Infine, l' (esaidro-1*H*-pirrolizin-7*a*-il)metil- (**63**) e etilamina (**64**) e l' (1*S*,9*aR*)-(ottaidro-2*H*-chinolizin-1-il)metil- e etilamina ((-)-aminolupinano e *homo*-aminolupinano, **65** e **66**) necessarie per la sintesi dei derivati descritti, sono stati preparati, rispettivamente, come riportato da Oka *et al.*,⁷¹⁻⁷³ Sparatore *et al.*,⁵⁸ and Boido *et al.*⁷⁴

Schema 21.



Risultati e discussione

L'attività antimalarica dei composti preparati è stata valutata in vitro usando il saggio LDH (lattato deidrogenasi) contro i ceppi di *Plasmodium falciparum* D-10 (clorochino-sensibile, CQ-S), W-2 (clorochino-resistente, CQ-R) e Pf (ceppo selvaggio isolato dal sangue di un paziente colpito da malaria, CQ-R). Le IC₅₀ sono espresse come concentrazione nM e sono riportate in tabella 2 e 5. In tabella 5 sono riportati inoltre i rapporti tra i valori di IC₅₀ della cloroquina e di ciascun composto contro i ceppi D-10 e W-2, calcolati per ogni singolo esperimento (in quanto i composti non sono stati testati tutti simultaneamente), nonché i rapporti tra i valori di IC₅₀ di ciascun composto verso i ceppi CQ-R e CQ-S. Quest'ultimo valore è indicativo della suscettibilità del composto ai meccanismi di resistenza (fattore di resistenza). L'attività *in vivo* è stata testata utilizzando il test di Peters su modelli murini infettati con il *P.berghei* ANKA ed è riportata in tabella 3. La tossicità cellulare è stata valutata usando l'MTT test su quattro linee cellulari differenti: HMEC-1 (linea cellulare di endotelio microvascolare umano immortalizzata), K562 (linea cellulare di eritroleucemia umana), WEHI 13 (linea cellulare di fibrosarcoma murino) e HDF (linea cellulare di fibroblastoma dermale umano), ed è riportata in tabella 2 e 6. In tabella 6 è inoltre riportato il rapporto tra la citotossicità e l'attività (indice di selettività) calcolato per ogni singolo composto sulla base delle IC₅₀ ottenute sulle linee cellulari (HMEC-1 e WEHI-13) e delle attività antimalariche riscontrate sul ceppo W-2 di *P. falciparum*. La tossicità acuta è stata valutata su modelli murini CD1 trattati con una dose singola per via intraperitoneale a differenti dosi ed osservati in un intervallo variabile compreso fra gli 8 ed i 13 giorni ed i risultati sono riportati in tabella 4.

(+)-AM1 (13) e (±)-AM1 (12).

Sia l'enantiomero destrogiro **13** che il racemato **12** sono risultati attivi in vitro sui due ceppi di *P. falciparum* D-10 e W-2, con valori di IC₅₀ non significativamente differenti dall'enantiomero (-)-AM1 (**5**). Essi inoltre hanno presentato una bassa citotossicità sia sulla linea cellulare HMEC che sulla HDF; anche in questi casi essa è risultata analoga a quelle del composto **5** che è simile, se non inferiore, a quella mostrata dalla cloroquina stessa (tabella 2).

Tabella 2: attività antimalarica in vitro su ceppi D-10, W-2 e Pf di *P.falciparum* e citotossicità contro le linee cellulare HMEC-1 e HDF.

Comp.	D-10 IC ₅₀ (nM)	W-2 IC ₅₀ (nM)	Pf IC ₅₀ (nM)	HMEC IC ₅₀ (nM)	HDF IC ₅₀ (nM)
(-)-AM1 (5)	23,98 ± 8,83	53,67 ± 22,72	29,20 ± 3,77	>49000	22617 ± 10899
(±)-AM1 (12)	16,15 ± 5,18	35,44 ± 8,34	19,43 ± 8,64	>60000	24585 ± 10974
(+)-AM1 (13)	17,49 ± 8,85	35,77 ± 16,94	18,92 ± 8,82	>60000	26919 ± 7851
CQ	23,73 ± 14,00	473,62 ± 93,47	241,30 ± 41,13	>38000	>38000

Gli studi in vivo sul modello murino *P. berghei* hanno inoltre confermato i dati emersi dagli esperimenti condotti *in vitro* e cioè che i due singoli enantiomeri ed il racemato si comportano in modo analogo alla cloroquina quando somministrati per via orale, presentando una ED₅₀ compresa tra 1,98 e 1,33 mg/Kg (tabella 3).

Essi sono inoltre stati in grado di inibire, al pari della cloroquina, la parassitemia di oltre il 99,7 % dopo trattamento per quattro giorni a dose singola giornaliera, quando somministrati per via orale (p.o.) a dosi di 30 mg/Kg. (tabella 3).

Tabella 3: attività *in vivo* in seguito a somministrazione orale in ceppi di *P.berghei*.

Composto	P. berghei ANKA	
	% di inibizione a 30 mg/Kg	ED ₅₀ (mg/Kg)
(-)-AM1 (5)	100	1,98
(±)-AM1 (12)	99,7	1,50
(+)-AM1 (13)	100	1,33
CQ	99,7	1,07

Gli studi di tossicità acuta sul topo hanno mostrato come per via intraperitoneale (i.p.) la minima dose non tossica risulti di 125 mg/Kg per l'enantiomero destrogiro e per il racemato e di 100 mg/Kg per l'enantiomero levogiro (tabella 4).

Tabella 4: tossicità acuta in vivo in seguito a somministrazione per via i.p. a topi CD-1.

Composto	Massima dose non tossica
(-)-AM1 (5)	100 mg/kg
(±)-AM1 (12)	125 mg/kg
(+)-AM1 (13)	125 mg/kg
CQ	50 mg/kg

Analoghi dell'isochina e 4-(pirrol-1-il)aminochinoline.

Tutti i composti testati hanno mostrato un'attività da moderata ad elevata sui ceppi D-10 (CQ-S), con un' intervallo di IC₅₀ compreso tra 8,5 e 222.2 nM (tabella 5). L'IC₅₀ della cloroquina è 26,4 nM (con un range tra 15 e 39 nM), così che il rapporto tra la IC₅₀ dei composti e quello della cloroquina varia da 0,1 a 2,8.

Otto dei nuovi composti inoltre sono risultati molto attivi contro il ceppo W-2 (CQ-R), risultando da 5,0 a 28 volte più attivi della cloroquina, con una IC₅₀ compresa tra 14-59 nM (**14a**, **15a**, **17a**, **18a**, **18b**, **19a**, **19b**, **20b**). Altri cinque composti (**14b**, **14c**, **16e**, **17b** e **21a**) si sono mostrati da 4,2 a 2 volte più attivi della CQ, mentre i rimanenti composti hanno mostrato un'attività compresa tra 0,5 ed 1,7 volte la cloroquina sul ceppo W-2 (CQ-R) (tabella 5).

Inoltre, per i composti più attivi il fattore di resistenza è compreso tra 1.2 e 2.4, risultando circa dieci volte più basso di quello della cloroquina, suggerendo che questi prodotti non sono (o lo sono poco) soggetti ai meccanismi di resistenza.

Per quanto riguarda la relazione struttura-attività tra i composti isochino-simili, è stato osservato che il derivato chinolizidinilmetilaminico (**14a**) ha esibito una attività dieci volte maggiore rispetto agli analoghi pirrolizidinilalchilaminici **14b** e **14c**.

Questa differenza è risultata inaspettata, in quanto nei nostri analoghi della cloroquina precedentemente descritti,^{50,75} caratterizzati dalla presenza di queste peculiari teste basiche, i derivati pirrolizidinilalchilaminici sono risultati in taluni casi più attivi dei derivati chinolizidinilalchilaminici.

E' da osservare inoltre che la sostituzione del gruppo idrossilico del composto **14a** con un atomo di cloro (**15a**) ha leggermente incrementato l'attività contro il ceppo W-2 (CQ-R) di *P. falciparum* (confrontando il rapporto IC₅₀ CQ/comp.), supportando ulteriormente quanto

riportato in letteratura⁵¹ che l'idrossile è vantaggioso ma non assolutamente necessario per l'attività. O'Neill *at al.* hanno testato l'isochina contro il ceppo di *P. falciparum* K1 (CQ-R) differente da quello da noi utilizzato così da non permettere una comparazione diretta con i nostri composti. Questo confronto risulta ulteriormente difficoltoso in quanto l'isochina mostra un differente grado di attività quando saggiato come base libera o sale difosfato.

Perciò abbiamo preparato l'isochina in accordo con quanto riportato in letteratura⁵¹ e l'abbiamo testata come base libera sui medesimi ceppi CQ-S e CQ-R usati per i nostri composti.

Abbiamo potuto così osservare che l'isochina risulta essere 17.6 volte più attiva della CQ sul ceppo W-2, mentre i composti **14a** e **15a** sono, rispettivamente, 22 e 28 volte più attivi.

Tabella 5: attività antimalarica in vitro su ceppi D-10 e W-2.

Composto	D-10 IC ₅₀ (nM) ^a	Ratio IC ₅₀ CQ/Comp. ^b	W-2 IC ₅₀ (nM) ^a	Ratio IC ₅₀ CQ/Comp. ^b	Ratio IC ₅₀ W-2/D-10 ^c
14a	8,5 ± 1,9	2,8	14,3 ± 7,8	22,0	1,7
14b	81,9 ± 3,4	0,4	76,96 ± 14,6	2,2	0,9
14c	90,3 ± 48,5	0,3	153,1 ± 24,7	2,1	1,7
15a	23,6 ± 5,1	1,8	28,8 ± 4,5	28,0	1,2
16a	69,0 ± 25,3	0,2	192,9 ± 4,0	1,2	2,8
16b	80,7 ± 27,1	0,2	336,3 ± 64,3	0,7	4,2
16c	48,6 ± 10,5	0,3	255,2 ± 53,7	0,9	5,3
16d	222,2 ± 15,6	0,1	358,3 ± 20,6	0,5	1,6
16e	70,7 ± 5,3	0,4	53,4 ± 16,4	3,1	0,8
17a	42,7 ± 8,9	0,7	59,2 ± 27,4	9,9	1,4
17b	42,9 ± 13,0	0,7	139,5 ± 56,0	4,2	3,3
17c	63,5 ± 18,2	0,4	1176,1 ± 538,9	0,7	18,5
17e	36,5 ± 12,6	0,8	515,0 ± 252,8	1,1	14,1
17f	154,1 ± 37,5	0,2	776,2 ± 386,2	0,8	5,0
18a	26,1 ± 8,3	0,9	42,5 ± 19,1	18,5	1,6
18b	30,7 ± 4,3	0,8	49,6 ± 5,2	15,8	1,6
19a	61,6 ± 7,18	0,5	79,8 ± 18,0	5,0	1,3
19b	32,6 ± 2,7	0,8	78,1 ± 28,2	5,7	2,4
20b	58,0 ± 13,0	0,5	59,0 ± 16,6	6,7	1
21a	26,0 ± 6,9	0,7	179,6 ± 45,9	2,3	6,9
21b	22,7 ± 5,1	0,8	243,4 ± 52,4	1,7	10,7
Isoquine	23,7 ± 3,0	1,3	30,2 ^d	17,6	1,3
CQ	26,4 ± 6,9	-	459,7 ± 225,7	-	17,4

^a I risultati sono espressi come IC₅₀ ± SD di almeno tre differenti esperimenti ciascuno eseguito in duplicato.

^b Media dei rapporti tra l'IC₅₀ della cloroquina e quella di ogni singolo composto contro il ceppo D-10 o W-2 di *P. falciparum* calcolato per ogni singolo esperimento.

^c Rapporti tra i valori di IC₅₀ di ogni composto contro i due ceppi di *P. falciparum*.

^d Media di due esperimenti ciascuno eseguito in duplicato.

La sostituzione dell'anello fenolico, tipico dell'amodiachina, tebuchina e isochina con un anello pirrolico (**16-21**) è associata al mantenimento di una buona attività antimalarica ed ha portato all'ottenimento di derivati a nucleo 4-(pirrol-1-il)aminochinolinico che rappresentano una nuova classe di agenti antimalarici.

In questi composti si è osservato che l'attività aumenta con l'incremento della lipofilia, specie sul ceppo W-2 (CQ-R): infatti i derivati 5-aril-2-metilsostituiti (**17-19**) sono risultati più attivi dei corrispettivi derivati 2,5-dimetilsostituiti (**16**). Questa correlazione non risulta presente nel composto **20b**: dal confronto diretto tra i composti **17b**, **18b**, **19b** e **20b** aventi in comune la testa basica pirrolidinica, risulta che la relazione tra l'attività antimalarica ed il sostituente sul fenile va nella seguente direzione: $H < F < CF_3 < Cl$.

Valutando l'effetto delle teste basiche sull'attività, è stato osservato che i residui poco ingombranti dietilamminico e pirrolidinico sono più efficaci quando un sostituente fenilico è presente sull'anello pirrolico (**17a,b** e **16a,b**), mentre il residuo chinolizidinico è vantaggioso nei derivati 2,5-dimetilsostituiti (**16f** e **17f**).

L'introduzione del residuo *n*-propilico tra il nucleo pirrolico e quello 4-aminochinolinico nei derivati **21a** e **21b**, oltre a non aver portato ad alcun significativo incremento di attività nel confronto del ceppo D-10, ha causato una riduzione dell'attività antimalarica nei confronti del ceppo W-2 rispetto ai corrispondenti *p*-clorofenilderivati **18a** e **18b**, sottolineando l'importanza dell'interazione diretta tra i due nuclei eterociclici.

Tabella 6: tossicità contro linee cellulari umane HMEC-1, K562 e murina WEHI-13

Comp.	HMEC-1 IC ₅₀ (nM) ^a	Ratio IC ₅₀ HMEC/W-2 ^b	K652 IC ₅₀ (nM) ^a	WEHI IC ₅₀ (nM) ^a	Ratio IC ₅₀ WEHI/W-2 ^b
14a	7938 ± 1242	555	n.t.	4427 ± 655	310
14b	n.t.	-	n.t.	n.t.	-
14c	n.t.	-	n.t.	12211 ± 986	80
15a	5517 ± 1193	191	n.t.	2769 ± 1278	96
16a	n.t.	-	n.t.	n.t.	-
16b	n.t.	-	n.t.	n.t.	-
16c	n.t.	-	n.t.	n.t.	-
16d	n.t.	-	n.t.	n.t.	-
16e	5398 ± 841	101	n.t.	5508 ± 3827	103
17a	16694 ± 5919	282	3616 ± 1268	4380 ± 2105	74
17b	12874 ± 2824	92	2920 ± 866	3878 ± 638	28
17c	n.t.	-	n.t.	n.t.	-
17e	13451 ± 7111	26	1683 ± 394	7441 ± 1254	14
17f	14599 ± 5031	19	2614 ± 629	7219 ± 1325	9
18a	5812 ± 1511	137	n.t.	1446 ± 670	34
18b	7176 ± 1383	134	n.t.	2060 ± 125	41
19a	18606 ± 12518	233	2357 ± 641	3021 ± 595	38
19b	10070 ± 1356	129	1655 ± 368	2713 ± 414	35
20b	4701 ± 2928	80	1217 ± 454	2680 ± 206	45
21a	n.t.	-	n.t.	n.t.	-
21b	n.t.	-	n.t.	n.t.	-
CQ	>32000	-	>25000	>38000	-

^a Il saggio di citotossicità è eseguito in vitro su differenti linee cellulari usando l'MTT test.

^b Rappresenta l'indice di selettività del composto calcolato sulla base delle IC₅₀ ottenute sulle linee cellulari indicate e sul ceppo di *P. falciparum* W-2.

Tutti i composti più attivi (**14a**, **15a**, **16e**, **17a**, **18a**, **18b**, **19a**, **19b** e **20b**) mostrano una bassa tossicità contro tre differenti linee cellulari umane e murine con un indice di selettività (calcolato in funzioni dei valori di IC₅₀ riscontrati sul ceppo W-2) compreso tra 555 e 34.

Conclusioni

Nell'ambito degli studi relativi allo sviluppo preclinico di (-)-AM1 (**5**) come farmaco antimalarico è stato sintetizzato il corrispondente racemo (**12**, (\pm)-AM1) e l'enantiomero destrogiro (**13**, (+)-AM1) allo scopo di evidenziare eventuali differenze di attività o di tossicità tra i due enantiomeri.

Dagli studi *in vitro* ed *in vivo* fin'ora condotti, i due enantiomeri sono risultati avere attività antimalarica, citotossicità e tossicità acuta equivalenti.

Sarà comunque necessario disporre di ulteriori studi, soprattutto di farmacocinetica, prima di poter concludere che i due enantiomeri sono davvero equivalenti e che quindi è possibile sviluppare come farmaco il racemo (molto più economico) rispetto ad uno dei singoli enantiomeri.

Al fine di individuare nuove classi di agenti antimalarici, si è verificata la possibilità di sostituire il nucleo fenolico tipico dell'amodiachina, tebuchina ed isochina con differenti nuclei aromatici, sintetizzando una serie di 4-(pirrol-1-il)aminochinoline che si sono dimostrate tutte variamente attive e che rappresentano quindi una nuova classe di agenti antimalarici. Sette di questi composti (**16e**, **17a**, **18a**, **18b**, **19a**, **19b** e **20b**) hanno mostrato un'elevata attività contro il ceppo CQ resistente W-2, con IC₅₀ inferiore ai 100 nM.

Nuovi derivati sono stati ottenuti modificando la struttura dell'isochina è stata ulteriormente modificata attraverso la sostituzione del gruppo dietilaminico con teste basiche bicicliche difficilmente metabolizzabili; in particolare i derivati chinolizidinilmetilaminici **14a** e **15a** presentano un'attività nei confronti sia del ceppo D-10 che del W-2 di *P. falciparum*

leggermente superiore a quello dell'isochina stessa e con un rapporto IC_{50} CQ/comp. Che arriva a 28 quando il residuo idrossilico è sostituito con un atomo di cloro (**15a**).

Sulla base di questi risultati, si verificherà ulteriormente la possibilità di sostituire l'anello fenolico tipico dell'amodiachina e dei suoi analoghi con altri differenti nuclei eteroaromatici, così come pure si continuerà ad indagare gli effetti della sostituzione degli usuali gruppi basici con i nuclei pirrolizidinici e chinolizidinici.

Parte sperimentale chimica

I punti di fusione sono stati determinati con il metodo del capillare su un apparecchio Buchi B-540 e non sono corretti.

Le analisi elementari sono state eseguite presso il Laboratorio di Microanalisi del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Genova con uno strumento CE EA 1110 CHNS-O e, per tutte le sostanze descritte, i valori trovati sono risultati compresi entro il $\pm 0,4\%$ dei valori calcolati.

Gli spettri di massa sono stati eseguiti su uno spettrometro di massa LCQ Advantage (ThermoFinnigan) mentre gli spettri di massa ad alta risoluzione (HRMS) sono stati eseguiti su uno spettrometro di massa Bruker Daltonics APEX II ICR-FTMS con sorgente elettro spray (ESI) in positivo o negativo.

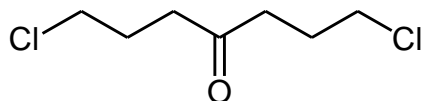
Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati eseguiti con uno spettrometro Varian Mercury 300, usando CDCl_3 o DMSO come solvente, gli spettri IR con uno spettrofotometro FT-IR Spectrometer Perkin-Elmer PARAGON 1000 PC.

Le reazioni a microonde sono state eseguite utilizzando un apparecchio Biotage Initiator o Cem Discover.

I poteri ottici rotatori calcolati con un Jasco P1010 utilizzando come sorgente una lampada a vapori di sodio a lunghezza d'onda di 589 nm.

Le caratteristiche dei prodotti preparati (P.M., p.f., solvente di cristallizzazione, rese delle reazioni) sono riportate nella tabella 7.

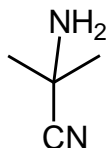
1,7-Dicloroheptanone



In un pallone a tre colli, equipaggiato con gorgogliatore, e dotato di un opportuno sistema di trappole contenenti NaOH 2N, si pongono 10,03 g (90 mmoli) di dicitlopropilchetone in cui si fa gorgogliare HCl gassoso. La reazione è condotta a temperatura ambiente per un tempo compreso tra le due e le tre ore, controllandone l'andamento tramite TLC su gel di silice, usando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:0,5), ed usando come rivelatore una soluzione di KMnO_4 .

Quando tutto il dicitlopropilchetone sembra aver reagito, si evapora a pressione ridotta il solvente e si procede alla purificazione del prodotto mediante distillazione a bolle a 70°C e a 0,08 mmHg. Si ottengono 14,95 g di 1,7-dicloroheptanone con una resa pari al 91%.

2-Ammino-2-metil-propionitrile



In un pallone a tre colli collegato con un opportuno sistema di trappole si pongono 14 g (164,5 mmoli) di 2-cianopropan-2-olo e mantenendolo in un bagno di ghiaccio, si fanno gorgogliare per tre ore 8 g di ammoniaca gassosa. Dopo aver riportato la miscela di reazione a temperatura ambiente si evapora l'eccesso di ammoniaca a pressione ridotta.

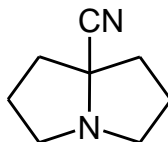
Si aggiunge un largo eccesso di KOH in pellet e si separa la fase acquosa sottostante dal prodotto oleoso che viene purificato attraverso distillazione in bolle a 65°C e a 20 mmHg ottenendo 10,71 g di prodotto puro con una resa del 77,4 %

IR (film) cm^{-1} : 3369 (N-H); 2224 (CN)

¹H-N.M.R. (CDCl₃):

δ = 1,80 (s, 2H, scompare per aggiunta di D₂O); 1,50 (s, 6H).

5-Ciano-1-azabicyclo[3.3.0]ottano



In un pallone a tre colli, equipaggiato con un opportuno sistema di trappole, contenente 52 ml di metanolo e raffreddato in un bagno di ghiaccio si fanno gorgogliare 40 g (2,53 moli) di ammoniaca gassosa. Si porta il pallone di reazione a 5°C e si aggiungono 7,37 g (40 mmoli) di 1,7-dicloroheptanone e 10,425 g (122,5 mmoli) di 2-ammino-2-metil-propionitrile. La miscela di reazione è lasciata in agitazione e.m. per 24 ore a temperatura ambiente; col passare del tempo si nota la formazione di un precipitato bianco. L'andamento della reazione viene monitorata mediante TLC su gel di silice utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10:1), e come rivelatore i vapori di iodio. Dopo aver evaporato a pressione ridotta l'ammoniaca ed il solvente, il residuo è ripreso con NaOH 5M. La soluzione acquosa basica è estratta per tre volte con CH₂Cl₂, poi saturata con NaCl e successivamente è estratta ancora per tre volte con CH₂Cl₂. Gli estratti organici riuniti sono seccati su Na₂SO₄ anidro ed evaporati a secchezza. Si ottiene un residuo oleoso che viene purificato per distillazione in bolle a 60-75°C e a 0,08 mmHg. Si ottengono 4,44 g di un olio incolore con resa del 81,4%.

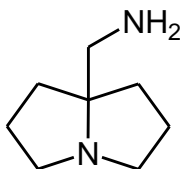
IR (film) cm⁻¹: 2970, 2871(C-H); 2231 (CN).

¹H-N.M.R. (CDCl₃):

δ= 3.26-3.14 (m, 2H); 2.62-2.50 (m, 2H); 2.40-2.26 (m, 2H); 2.08-1.88 (m, 6H).

5-Amminometil-1-azabicilo[3.3.0]ottano (63).

(Esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)metilamina.



In un pallone a due colli munito di refrigerante a ricadere protetto con valvola al KOH si disciolgono 3,662 g (26,88 mmoli) di 5-ciano-1-azabiciclo[3.3.0]ottano in 170 ml di etere etilico.

Alla soluzione, mantenuta sotto flusso di azoto, agitazione e.m. e raffreddata in bagno di ghiaccio, si aggiungono a piccole porzioni 3,24 g (85,32 mmoli) di LiAlH_4 .

Terminate le aggiunte, la miscela di reazione è riportata a temperatura ambiente e lasciata in agitazione e.m. per circa cinque ore. L'andamento della reazione è seguita con TLC su gel di silice, usando come eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (10 : 3 : 0,3), come rivelatore vapori di iodio.

Dopo aver raffreddato la sospensione prima a temperatura ambiente, e poi in bagno di ghiaccio, si fanno gocciolare nel pallone 32,8 g di NaOH disciolti in 164 ml di acqua distillata; il precipitato formatosi di color grigio chiaro viene filtrato e lavato prima con acqua, quindi con abbondante etere etilico.

Il filtrato, formato da due fasi, viene riportato in imbuto separatore al fine di separare le fasi eteriche da quelle acquose; queste ultime vengono prima estratte con etere etilico, saturate con Na_2CO_3 ed estratte nuovamente con etere etilico.

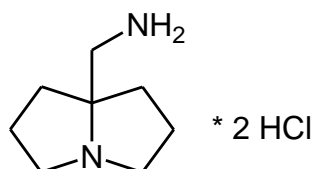
Dalle fasi eteree riunite, seccate su Na_2SO_4 anidro ed evaporate a secchezza, si ottengono 3,18 g di un olio giallo-arancio che vengono purificati mediante distillazione in bolle a 25-45°C a 0,1 mmHg.

Si ottengono 2,81 g olio incolore con una resa del 74,5%.

IR (film) cm^{-1} : 3367 (NH_2); 2951, 2864 (C-H).

5-Amminometil-1-azabicyclo[3.3.0]ottano dicloridrato.

(Esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)metilamina dicloridrato

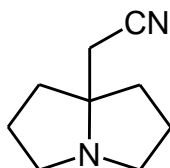


In un pallone a due colli munito di refrigerante a ricadere e posto in bagno di ghiaccio si pongono 2,81 g (20,02 mmoli) di 5-amminometil-1-azabicyclo[3.3.0]ottano disciolti in pochi ml di MeOH. A tale soluzione si aggiungono per gocciolamento 35,4 ml di HCl in MeOH 1,25N (di origine commerciale).

Terminata l'aggiunta si evapora il solvente a secchezza fino ad ottenere un prodotto di consistenza pastosa che viene ripreso con etanolo assoluto ed evaporato a secchezza. Il solido bianco che si ottiene viene lavato con pochi ml di etere etilico anidro, posto in essiccatore su KOH per un'intera nottata.

Si ottengono 4,21 gr di prodotto puro, con una resa del 98,6%.

5-Cianometil-1-azabicyclo[3.3.0]ottano



A una soluzione di 7,5 g (40,9 mmoli) di 1,7-dicloroottanone in circa 25 ml di NH₃ al 28%, posta in un pallone a due colli, si aggiungono 17,42 g di acido cianacetico (204,8 mmoli). La miscela è raffreddata in bagno di ghiaccio. Dopo aver munito il pallone di gorgogliatore, opportuni polmoni di sicurezza e trappola a HCl 2N, si fa gorgogliare NH₃ mantenendo la miscela di reazione a 0°C. Vengono fissati 13,5 g di NH₃.

Alla soluzione, riportata a temperatura ambiente, sono aggiunti 7,3 ml di *n*-esano; la miscela è lasciata in agitazione e.m. per 64 ore. L'andamento della reazione è controllato mediante uso di TLC su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/cicloesano (10:0,05), visualizzata con KMnO₄.

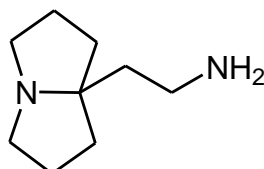
A reazione conclusa si evapora a pressione ridotta l'ammoniaca e si separa la fase acquosa da quella organica. La fase organica è lavata con H₂O, diluita con *n*-esano, seccata su Na₂SO₄ ed evaporata a secchezza. Le fasi acquose riunite vengono concentrate fino a completa eliminazione di NH₃. Il residuo è posto in un pallone munito di refrigerante a ricadere e scaldato a 70°C mantenendolo in agitazione e.m. per un tempo di circa due ore. L'andamento della reazione è controllato con TLC su gel di silice, miscela CH₂Cl₂/MeOH (10:1). La miscela di reazione è estratta per tre volte con etile acetato; quindi la fase acquosa è alcalinizzata con una soluzione 20% di NaOH ed estratta ancora per tre volte con etile acetato. Dagli estratti organici riuniti, seccati su Na₂SO₄ ed evaporati a secchezza, si ottiene un olio

giallino che viene purificato mediante distillazione in bolle a 110°C e a 7 mmHg ottenendo 2,28 g di olio incolore con resa pari al 37%.

IR (film) cm^{-1} : 2958, 2870 (C-H); 2246 (CN), conforme a quanto riportato da T. Suzuki e T. Usui.⁷³

5-(2-Amminoetil)-1-azabicyclo[3.3.0]ottano (64).

(2-(Esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)etilamina).

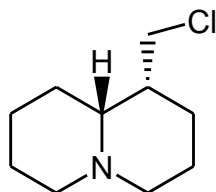


In un pallone a due colli munito di refrigerante a ricadere protetto con tubo a KOH si disciolgono 1,85 g (12,31 mmoli) di 5-cianometil-1-azabicyclo[3.3.0]ottano in 50 ml di etere etilico anidro. La miscela, mantenuta sotto flusso di azoto e agitazione e.m., viene raffreddata in un bagno di ghiaccio. Si aggiungono a piccole porzioni 1,41 g (37,2 mmoli) di LiAlH₄ e, terminate le aggiunte, la miscela di reazione è riportata a temperatura ambiente e lasciata in agitazione e.m. per circa tre ore. L'andamento della reazione è seguito con TLC su gel di allumina, miscela CH₂Cl₂/MeOH (10:1), sviluppata per esposizione a vapori di iodio.

Dopo aver raffreddato il pallone in un bagno di ghiaccio vi si fanno gocciolare dentro 71,5 ml di una soluzione di NaOH 5N. Il precipitato ottenuto è filtrato e lavato con abbondante etere etilico. Le due fasi vengono separate, e la fase acquosa viene estratta tre volte con etere etilico. La fase acquosa è quindi saturata con Na₂CO₃ e successivamente estratta ancora sei volte con etere etilico. Tutti gli estratti eterici vengono riuniti, seccati su Na₂SO₄ ed evaporati a secchezza. Si ottengono 1,687 g di olio incolore che, dopo distillazione in bolle a 70°C e a 0,08 mmHg, pesa 1,48 g. La reazione presenta una resa del 78,1%.

IR (film) cm⁻¹: 3355 (NH₂); 2953, 2866 (C-H) conforme a quanto riportato da T. Suzuki e T. Usui.⁷³

(-)-1-Clorolupinano.



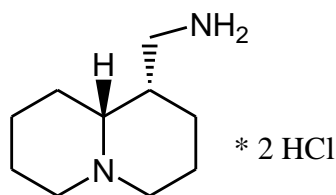
In un pallone a due colli contenente una soluzione ben fredda di 10 g (59,17 mmoli) di (-)-lupinina in 10 ml di cloroformio si aggiungono lentamente 25 ml (171,26 mmoli) di cloruro di tionile. Terminata l'aggiunta si lascia tornare a temperatura ambiente e quindi si scalda a riflusso per un ora, in atmosfera d'azoto e proteggendo il refrigerante con tubo al cloruro di calcio anidro.

Trascorso tale periodo, si allontana sotto il vuoto della pompa ad acqua l'eccesso di cloruro di tionile ed il cloroformio.

Si riprende il grezzo ottenuto con acqua fredda e la soluzione acquosa, dopo lavaggio con etere, viene alcalinizzata con KOH al 30% ed estratta ripetutamente con etere. Da questi ultimi estratti eterici, seccati con Na₂SO₄ anidro ed evaporati a secchezza, si ottiene un olio che viene distillato a circa 75°C a 0,08 mmHg.

Si ottengono 10,46 g di olio incolore con una resa del 95,6%.

(-)-Amminolupinano dicloridrato (66).



In un pallone a due colli da 250 ml si pongono 10,45 g (55,67 mmoli) di (-)-clorolupinano ed 10,8 g (58,3 mmoli) di potassio-ftalimide in 27 ml di DMSO e si scalda in bagno di silicone a 145°C, in corrente d'azoto e con agitazione e.m., per due ore.

Dopo raffreddamento si lascia a riposo la miscela per una notte in frigorifero. Si filtra il precipitato sotto vuoto, lavandolo prima con pochi ml di DMSO e poi con acqua.

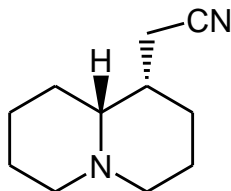
Dopo asciugatura del prodotto in stufa a 50°C per circa un ora e mezzo, si hanno 12,98 g di N-lupinilftalimide, con una resa del 78,2%.

La N-lupinilftalimide ottenuta viene disciolta in 103 ml di HCl 6N e scaldata a riflusso per dieci ore al termine delle quali la soluzione viene raffreddata in frigorifero per una notte. Si filtra l'acido ftalico che si è formato, lavandolo con pochi ml di acqua ghiacciata e la soluzione acida viene evaporata mediante rotavapor fino ad ottenere un prodotto di consistenza pastosa, che viene ripreso con etanolo assoluto ed evaporato a secchezza.

Il prodotto solido così ottenuto viene lavato con pochi ml di etanolo assoluto freddo e poi con etere etilico anidro e seccato in essiccatore su KOH.

Si ottengono 9,97 g di amminolupinano dicloridrato con resa del 95%.

Cianolupinano



In un pallone a tre colli da 50 ml si pongono 3 g (15,98 mmoli) di (-)-clorolupinano, 1,28 g (23,09 mmoli) di sodio cianuro e 6,2 ml di DMSO; si scalda la miscela di reazione a 150°C in corrente d'azoto e con agitazione e.m. per quattro ore, monitorando l'andamento della reazione mediante TLC su gel di silice, utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (9:1:0,1), sviluppando le macchie in camera di iodio.

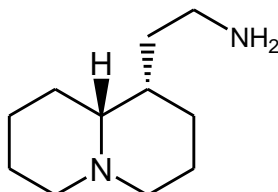
Terminata la reazione si raffredda la soluzione e vi si aggiungono cautamente alcuni ml di NaOH 2N. Si estraggono le fasi acquose con abbondante etere etilico e le fasi organiche sono controestratte prima con NaOH 2N e quindi con H_2O .

Le fasi eteree, anidificate e portate a secchezza, generano un olio giallo che viene distillato a circa 82°C a 0,055 mmHg.

Si ottengono 2,62 g di prodotto, con resa del 92%.

2-[(1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il]etanamina (66).

(*homo*-Amminolupinano)



In un pallone a tre colli da 250 ml munito di refrigerante a ricadere protetto da valvola al CaCl_2 si pongono 100 ml di etere etilico anidro e 2,62 g (14,69 mmol) di cianolupinano. Alla soluzione formatasi si aggiungono in piccole porzioni 1,69 g (44,42 mmol) di LiAlH_4 ; terminata l'aggiunta si scalda la sospensione a riflusso in atmosfera d'azoto e sotto agitazione e.m. per 4,5 h, monitorando l'andamento della reazione mediante TLC su gel di silice, utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (9:1:0,1), sviluppando le macchie in camera di iodio. Dopo aver raffreddato la sospensione in bagno di ghiaccio, si aggiungono attentamente alcuni ml di NaOH 5N ed il solido formatosi, rimosso mediante filtrazione, viene lavato abbondantemente con etere etilico.

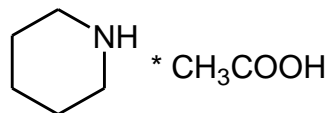
Le fasi organiche vengono separate dalle fasi acquose, le quali, saturate con Na_2CO_3 , vengono nuovamente estratte per tre volte con etere etilico.

Le fasi organiche riunite, anidificate su pellets di KOH e portate a secchezza, generano un residuo oleoso trasparente che viene distillato a 0,075 mmHg a 71°C .

Si ottengono 2,3 g di prodotto, con resa del 85%.

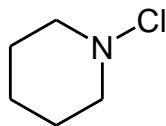
$^1\text{H-N.M.R.}$: conforme a quanto riportato da Boido *et al.*⁷⁴

Piperidina acetato.



In un pallone a due colli munito di termometro e di imbuto gocciolatore si pongono 22,03 g (260 mmoli) di piperidina e 15 ml di acqua. Nella soluzione, mantenuta sotto agitazione e.m. e raffreddata alla temperatura di -10°C, vengono fatti gocciolare 15,61 g (260 mmoli) di acido acetico glaciale, assicurandosi che la temperatura della soluzione non superi i 10°C. Terminata l'aggiunta, la soluzione è portata a temperatura ambiente ed utilizzata direttamente nello step successivo.

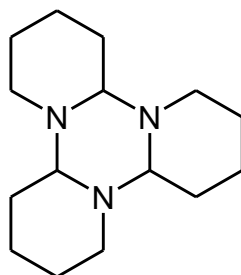
N-Cloropiperidina (23).



In un pallone a due colli da un litro, munito di imbuto gocciolatore e termometro, vengono posti 400 ml di una soluzione acquosa di $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (preparata sciogliendo 40 g di calcio ipoclorito tecnico in 400 ml di acqua e filtrando poi la miscela torbida e di colore grigio su Celite, al fine di rimuovere i residui insolubili). Nella soluzione, precedentemente raffreddata a -20°C mediante bagno di ghiaccio e sale, vengono fatti gocciolare lentamente 15 ml di soluzione acquosa di piperidina acetato, assicurandosi che la temperatura della miscela di reazione non superi gli 0°C . Terminata l'aggiunta, si lascia reagire per 15/20 minuti a temperatura ambiente.

Le fasi acquose vengono estratte per 5 volte con abbondante etere etilico e le fasi organiche ottenute, seccate su Na_2SO_4 , vengono concentrate ad una temperatura minore di 60°C , evitando di evaporare completamente il solvente, per prevenire così una rapida e spontanea decomposizione che condurrebbe ad una completa perdita del prodotto. Il residuo oleoso giallo-arancio viene conservato in frigorifero e utilizzato direttamente nello step successivo.

Trimerico di α -2,3,4,5-tetraidropiridina (24).



In un pallone a due colli da 250 ml, munito di refrigerante a ricadere con valvola al CaCl_2 e di un imbuto gocciolatore, sono posti 120 ml di etanolo assoluto e 34,02 g (609 mmoli) di KOH finemente tritata; la miscela viene scaldata a riflusso per favorire la dissoluzione della potassa. La soluzione ottenuta appare di colore arancio e viene mantenuta a riflusso ed in forte agitazione e.m. La soluzione dell' *N*-cloropiperidina preparata in precedenza, ripresa con 10 ml di etere etilico, viene posta nell'imbuto gocciolatore e fatta gocciolare direttamente nella potassa etanolica bollente nell'arco di 1 ora. Terminata l'aggiunta, si interrompe il riscaldamento e la miscela è lasciata prima in agitazione per due ore e quindi lasciata a riposo a temperatura ambiente per 20 ore durante le quali si ha la trimerizzazione della tetraidropiridina.

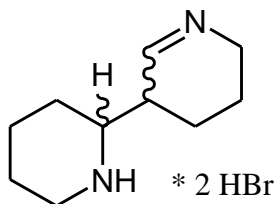
Il solido formatosi viene filtrato e lavato con abbondante etanolo; le fasi etanoliche (madri di filtrazione ed etanolo di lavaggio) sono riunite ed evaporate a secchezza, permettendo così l'eliminazione del monomero non polimerizzato che evapora con l'etanolo. Il residuo ottenuto viene aggiunto al solido precedentemente filtrato e disciolto nella minima quantità possibile di acqua. La soluzione acquosa viene estratta per 4 volte con abbondante etere etilico e le fasi organiche riunite, seccate su Na_2SO_4 , sono evaporate a pressione ridotta ed a 30°C . Si ottiene

un residuo oleoso giallo-arancio che viene ripreso con 6 ml di acetone analitico e la soluzione viene lasciata in freezer per una notte. Non essendosi formati cristalli, la cristallizzazione è innescata la mattina successiva grattando l'interno del pallone con una bacchetta di vetro. Il precipitato giallino che si ottiene è lavato con acetone raffreddato a -20°C . Si ottiene una prima frazione solida di 1,90 g con p.f. di $60-60,5^{\circ}\text{C}$. Dalle madri concentrate si ottiene una seconda porzione di solido del peso di 2,34 g con p.f. di $57,5-59,4^{\circ}\text{C}$. Un'ulteriore frazione di solido del peso di 2,4 g (p.f.: $55,7-56,9^{\circ}\text{C}$) viene ricavato dalle madri dell'ultima cristallizzazione. La reazione presenta una resa del 30,5% calcolata sulle moli di piperidina inizialmente utilizzate. La purezza dei cristalli ottenuti viene controllata mediante TLC su allumina, utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1).

$^1\text{H-N.M.R.}$ (CDCl_3):

$\delta = 3.18-3.05$ (m, 3H); $2.88-2.70$ (m, 3H); $2.10-1.87$ (m, 3H); $1.80-1.40$ (m, 15H); $1.40-1.18$ (m, 3H).

***trans*-Tetraidroanabasina idrobromuro racema (25).**



In una beuta da 500 ml raffreddata in bagno di ghiaccio si pongono 3g (12,0 mmoli) di trimero di α -2,3,4,5-tetraidropiridina che vengono disciolti in 3,6 ml di HCl 10N. Alla miscela ottenuta, mantenuta a 0°C, si aggiungono 150 ml di soluzione tampone a pH 7,8 (preparata sciogliendo 6,9 g di $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ed 100 mg di acido citrico in 150 ml di acqua) e si riporta il pH ad un valore di circa 7,8 aggiungendo NaOH 10N. Si lascia reagire a temperatura ambiente e sotto agitazione e.m. per 5 h, terminate le quali la fase acquosa viene saturata con K_2CO_3 ed estratta 6 volte con abbondanti porzioni di etere etilico.

Le fasi organiche sono anidrificate con Na_2SO_4 e concentrate fino ad un volume di circa 10 ml. In un pallone a 2 colli si pongono 10 ml di HBr 48% mantenuti in agitazione e.m. e raffreddati a -20°C. Quando la fase acida raggiunge la temperatura indicata, viene rimossa dal bagno e mantenuta in forte agitazione; a questa si aggiunge in modo rapido la fase eterea precedentemente ottenuta. Si realizza così una reazione fortemente esotermica con evaporazione istantanea delle fasi eterree. La miscela ottenuta è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 45 minuti, al termine dei quali si controlla la reazione mediante TLC su allumina, utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:0,5).

L'eccesso di HBr viene eliminato mediante pompa ad acqua e le fasi acquose vengono evaporate al rotavapor. Si ottiene un solido schiumoso rosso, estremamente igroscopico, che

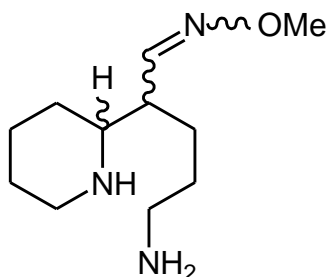
viene sottoposto a digestione con 8 ml di alcol isopropilico a 70°C per un'intera notte. La mattina seguente la sospensione formatasi viene filtrata e i cristalli lavati successivamente con alcol isopropilico e con etere etilico. Si ottengono 1,5 g di cristalli bianchi con p.f.: 149-155°C.

La resa della reazione è del 38,5%.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆ + 2 gocce D₂O):

δ = 4.65-4.45 (m, 1H); 3.30-3.05 (m, 3H); 3.05-2.70 (m, 3H); 1.92-1.20 (m, 10H).

5-Amino-2-(piperidin-2-il)pentanal *O*-metilossima racema (26).

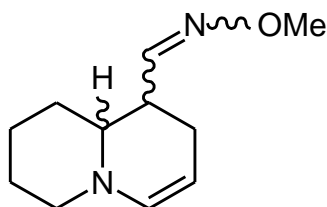


In un pallone da 100 ml contenente 18 ml di MeOH si introducono 1,2 gr (3,66 mmoli) di tetraidroanabasina bromidrata e 3,1 ml (10,97 mmoli) di una soluzione acquosa al 30% di NH₂OMe cloridrata. La soluzione così ottenuta viene lasciata in agitazione e.m. a temperatura ambiente per una notte. Il giorno seguente si aggiungono 1,8 ml di H₂O e abbondante K₂CO₃ per neutralizzare l'eccesso di acido, si lascia reagire per 15 minuti al termine dei quali si anidrifca con Na₂SO₄ e si mantiene in agitazione per un'altra ora prima di procedere con la filtrazione. Dopo aver lavato abbondantemente con etere etilico il solido sul filtro, si concentra la fase organica prolungando l'evaporazione per 2 ore (45°C, 20 mbar) fino ad ottenere 761 mg di un olio la cui purezza viene valutata mediante TLC su allumina, utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10:0,5). La resa della reazione è del 97,5%. Il prodotto è composto da una miscela syn:anti in rapporto 1:2, calcolato sulla base delle integrazioni dei picchi dell'¹N.M.R.⁵⁵

¹H-N.M.R. (CDCl₃):

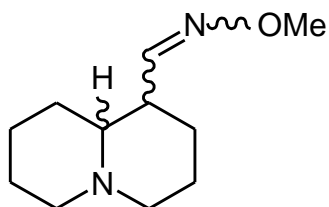
δ= 7.25-7.18 (m, 1H, anti ossima); 6.55-6.42 (m, 1H, syn ossima); 3.80 (s, 6H); 3.10-2.90 (m, 1H); 2.75-2.40 (m, 4H); 2.25-2.05 (m, 1H); 1.90-1.10 (m, 10H).

2,6,7,8,9,9a-Esaidro-1*H*-chinolizin-1-carbaldeide
***O*-metilossima racema (27).**



In un pallone a due colli da 100 ml, munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 e di un imbuto gocciolatore, si sciolgono 750 mg (3,51 mmoli) di 5-amino-2-(piperidin-2-il)pentanal *O*-metilossima racema in 30 ml di MeOH anidro . Dopo aver raffreddato con un bagno di ghiaccio , si gocciolano, nell'arco di 5 minuti, 970 mg (4,39 mmoli) di 3,5-di-*ter*-butil-*O*-benzochinone sciolti in 8,8 ml di THF. Terminata l'aggiunta, si lascia reagire a 0°C per 10 minuti e a temperatura ambiente per altri 15 minuti al termine dei quali si evapora rapidamente il MeOH facendo attenzione che la temperatura del bagno non superi i 30°C . Il residuo ottenuto viene ripreso con 88 ml di una soluzione di HCl 5% e 88 ml di etere etilico. Si separa la fase organica che viene quindi lavata 2 volte con HCl 5% le fasi acquose riunite vengono controstrate con etere etilico, alcalinizzate con K_2CO_3 fino a saturazione ed estratte a fondo con etere etilico. Da quest'ultima fase eterea, anidrificata su Na_2SO_4 e portata a secchezza, si ottengono 620 mg di un olio che viene utilizzato come tale nella reazione successiva e la cui purezza viene valutata mediante TLC su allumina, utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:0,5). La resa della reazione è del 91%.

Ottaidro-1*H*-chinolizin-1-carbaldeide *O*-metilossima racema.

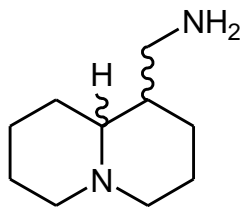


Ad una soluzione formata da 620 mg (3,2 mmoli) di 2,6,7,8,9,9a-esaidro-1*H*-chinolizin-1-carbaldeide *O*-metilossima racema in 16 ml di MeOH, mantenuta in atmosfera di azoto, si aggiungono 378 mg (10 mmoli) di NaBH₄. La miscela viene lasciata in agitazione e.m. a temperatura ambiente per 3 ore e monitorata mediante TLC su gel di silice, utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10:1,5) Terminata la reazione ed evaporato il solvente, il residuo viene ripreso con HCl 1 N e la soluzione ottenuta viene alcalinizzata con K₂CO₃ ed estratto con etere etilico. Le fasi organiche riunite vengono infine andrificate e concentrate e forniscono 700 mg di prodotto grezzo, che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, usando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (98:2). Si ottengono 250 mg di un olio con una resa del 40%. Il prodotto è composto da una miscela syn:anti in rapporto 1:2, calcolato sulla base delle integrazioni dei picchi dell’N.M.R.⁵⁵

¹H-N.M.R. (CDCl₃):

δ= 7.79 (d, *J*= 8.80 Hz, 1H); 7.15 (d, *J*= 8.80 Hz, 1H); 3.90-3.75 (m, 6H); 3.00-1.15 (m, 16H).

(±)-Amminolupinano (28).



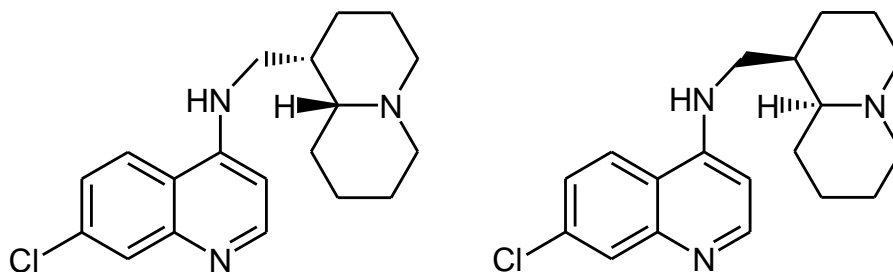
In un pallone a due colli da 25 ml munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 contenente una soluzione formata da 230 mg (17 mmoli) di ottaidro-1*H*-chinolizin-1-carbaldeide *O*-metilossima racema in 9 ml di etere etilico anidro, si aggiungono 380 mg (10 mmoli) di LiAlH_4 . La reazione viene scaldata a riflusso per 6 ore al termine delle quali la reazione viene trattata con soluzione acquosa di NaOH 2 N . La sospensione ottenuta viene rapidamente filtrata avendo cura di lavare a fondo con etere il solido indisciolto e le due fasi separate. La fase organica viene infine seccata su KOH in pastiglie ed evaporata a secchezza. Si ottengono 165 mg di olio incolore che viene utilizzato come tale nella reazione successiva.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) :

$\delta = 4.10-4.20$ (m, 1H); 3.70 (d, $J = 10.72$ Hz, 1H); 2.90-2.78 (m, 2H); 2.25-1.20 (m, 15H).

(±)-AM1 (12).

(±)-7-Cloro-4-[N-(ottaidro-1*H*-chinolizin-1-il)-metil]amminochinolina.



In un pallone da 25 ml a due colli munito di refrigerante a ricadere protetto con valvola a CaCl_2 si pongono 218 mg (1,1 mmoli) di 4,7-diclorochinolina, 165 mg (0,98 mmoli) di aminolupinano racemo e 688 mg di fenolo. La miscela viene scaldata a 180°C per 4 ore mantendola sotto agitazione e.m. e in atmosfera di azoto. La reazione viene monitorata mediante TLC su gel di silice utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (10:1:0,1). Dalle TLC di controllo si osserva la formazione sia del prodotto desiderato, ovvero di AM-1 racemo, sia del suo epimero.

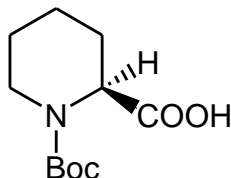
Terminato il riscaldamento, la miscela di reazione viene ripresa con pochi ml di NaOH 2N fino ad ottenere una sospensione avente pH basico che viene estratta per 5 volte con abbondante etere etilico. Dalle fasi organiche, anidrificate ed portate a secchezza, si ottengono 352 mg di prodotto grezzo che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97:3). Dalla cromatografia si isolano una frazione costituita da AM-1 racemo (63 mg) ed una frazione dell'epimero (102,5 mg), che dopo lavaggio con etere etilico pesano rispettivamente 37,1 mg (p.f.: $171,3\text{-}173,8^\circ\text{C}$) e 35 mg (p.f.: $171,8\text{-}173,6^\circ\text{C}$).

La resa della reazione calcolata per AM-1 racemo è del 17,42%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) :

$\delta = 8.83$ (s, 1H); 8.47 (d, $J = 5.51$ Hz, 1H); 7.97 (d, $J = 1.93$ Hz, 1H); 7.67 (d, $J = 9.08$ Hz, 1H);
 7.34 (dd, $J = 9.08, 2.20$ Hz, 1H); 6.24 (d, $J = 5.78$ Hz, 1H); 3.65 - 3.50 (m, 1H); 3.40 - 3.20 (m,
1H); 3.10 - 2.95 (m, 2H); 2.30 - 1.00 (m, 14H).

Acido N-Boc-pipecolinico (29).



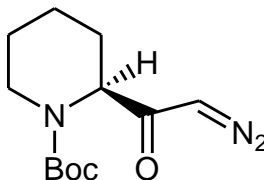
In un pallone ad un collo da 100 mL, munito di valvola al CaCl_2 , vengono sospesi 5,5 g (42,6 mmoli) di acido L-pipecolinico in 35 ml di diossano e 7 ml di H_2O . Alla sospensione si aggiungono 6 ml di trietilammina (TEA) e 10,22 g (46,84 mmoli) di BOC-anidride. La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 20 ore durante le quali la reazione è monitorata mediante TLC su silice, utilizzando come eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (10:1:0,5). Dopo evaporazione del diossano, la fase acquosa, raffreddata con un bagno di ghiaccio e sale, viene acidificata con HCl 3N fino a pH 2-3 ed estratta 3 volte con acetato di etile. Le fasi organiche riunite vengono anidrificate con Na_2SO_4 ed evaporate a secchezza. Si ottengono 8,7 g di solido bianco con p.f. di 117-120°C. Resa = 89%.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -46,31 \text{ (c= 1 ; MeOH)}$$

$^1\text{H-N.M.R.}$ (DMSO- d_6):

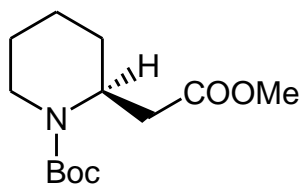
$\delta =$ 4.65-4.45 (m, 1H); 3.87-3.70 (m, 1H); 3.00-2.65 (m, 1H); 2.20-1.95 (m, 1H); 1.67-1.47 (m, 3H); 1.35 (s, 9H); 1.28-1.00 (m, 2H).

(S)-*ter*-Butil 2-(2-diazoacetil)piperidina-1-carbossilato (30).



In un pallone a 3 colli munito di refrigerante con valvola a CaCl_2 si pongono 9 g (39,3 mmoli) di acido *N*-Boc-pipecolinico sciolti in 150 ml di THF anidro e 4,97 ml (45,1 mmoli) di *N*-metilmorfolina. La soluzione, mantenuta in atmosfera di azoto, viene raffreddata a -30°C e, dopo l'aggiunta di 5,65 ml (43 mmoli) di isobutilcloroformiato, viene mantenuta a tale temperatura per 1 ora. Successivamente, facendo attenzione che la temperatura non superi 0°C , vengono fatti gocciolare 250 ml di soluzione eterea di diazometano (preparati partendo da 43 g di diazogen) e la miscela di reazione viene lasciata in agitazione per una notte a temperatura ambiente. Il giorno seguente, si aggiungono goccia a goccia 5 ml di CH_3COOH per distruggere l'eccesso di diazometano, e si evapora il solvente. Il residuo viene ripreso con etere etilico e lavato con acqua. La fase organica viene infine anidrificata su Na_2SO_4 ed evaporata a secchezza. Si ottengono 11,45 g di residuo oleoso grezzo che viene purificato mediante flash cromatografia su silice, utilizzando una miscela eluente cicloesano/acetato di etile (80:20). Si ottengono 7,38 g di olio giallo con una resa del 74%.

(S)-*ter*-Butil 2-(2-metossi-2-ossoetil)piperidina-1-carbossilato (31).



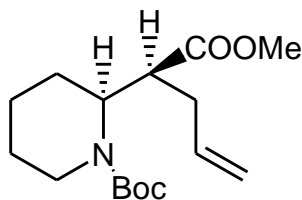
Ad una soluzione di 7,38 g (28,90 mmoli) di (S)-*ter*-butil 2-(2-diazoacetil)piperidina-1-carbossilato in 80 ml di MeOH anidro vengono aggiunti 830 mg (3,6 mmoli) di argento benzoato. La sospensione, che dopo pochi minuti diventa nera, viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 3 ore e monitorata mediante TLC (la miscela eluente CH₂Cl₂/acetato d'etile 9,5:0,5). Gli RF del reagente e del prodotto di reazione sono molto simili ma il prodotto di reazione può essere distinto in quanto si colora di giallo se scaldato con acido fosfomolibdico se esposto ai vapori di iodio. Al termine della reazione, si aggiungono 40 ml di una soluzione satura di NaCl e la miscela viene filtrata su Celite. Dalla soluzione filtrata viene eliminato il MeOH per evaporazione e la fase acquosa rimanente viene estratta 3 volte con acetato di etile. Le fasi organiche riunite vengono infine anidificate con Na₂SO₄ ed evaporate a secchezza. Si ottengono 7 g di grezzo che viene purificato mediante flash cromatografia su silice, utilizzando come eluente CH₂Cl₂/acetato d'etile (9,5:0,5). Si ottengono 5,1 g di un olio incolore con una resa del 68%.

$$[\alpha]_D^{25} = -12,56 \text{ (c= 4,54 ; CHCl}_3\text{)}$$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) :

$\delta = 4.75\text{-}4.65$ (m, 1H); $4.05\text{-}3.95$ (m, 1H); 3.65 (s, 3H); $2.85\text{-}2.70$ (m, 1H); $2.65\text{-}2.45$ (m, 2H);
 $1.70\text{-}1.40$ (m, 15H).

(2S,2'S)-Metil 2-(*N*-*ter*-butossicarbonilpiperidin-2'-il)-pent-4-enoato (32).



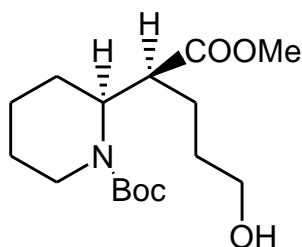
In un pallone a 3 colli da 100 ml contenente una soluzione di 3,84 g (23 mmoli) di litio esametilidisilazide in 25 ml di THF anidro, raffreddata a -78°C e mantenuta in atmosfera di azoto, vengono fatti gocciolare 5,38 g (20,9 mmoli) di (*S*)-*ter*-butil 2-(2-metossi-2-ossotil)piperidine-1-carbossilato sciolti in 21 ml di THF anidro. Dopo 30 minuti, si aggiunge lentamente una soluzione di 1,8 ml (20,9 mmoli) di allilbromuro in 13 ml di THF anidro e la miscela è lasciata in agitazione per altri 30 minuti. Al termine della reazione, si aggiungono 25 ml di acqua e si estrae 3 volte con etere etilico. Dalle fasi organiche riunite, anidrificate con Na_2SO_4 ed evaporate a secchezza, si recuperano 5,9 g di grezzo che viene purificato mediante flash cromatografia su silice, utilizzando come eluente una miscela CH_2Cl_2 /acetato d'etile (10:0,5). Si ottengono 2,64 g di un olio incolore. La resa della reazione è del 45%.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20,6 \text{ (c= 2,83 ; CHCl}_3\text{)}$$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) :

$\delta = 5.85\text{-}5.65$ (m, 1H); $5.15\text{-}4.95$ (m, 2H); $4.48\text{-}4.30$ (m, 1H); $4.10\text{-}3.87$ (m, 1H); 3.61 (s, 3H); $3.07\text{-}2.83$ (m, 2H); $2.55\text{-}2.25$ (m, 1H); $2.25\text{-}2.11$ (m, 1H); $1.81\text{-}1.28$ (m, 15H).

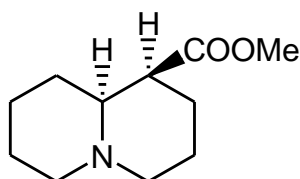
**(2S,2'S)-Metil 2-(N-ter-butossicarbonilpiperidin-2'-il)-
5-idrossipentanoato (33).**



In un pallone a 3 colli munito di refrigerante a ricadere vengono disciolti 2,6 g (9,17 mmoli) di (2S,2'S)-metil-2-(N-ter-butossicarbonilpiperidin-2'-il)-pent-4-enoato in 55 ml di esano anidro. Nella soluzione, raffreddata con un bagno di ghiaccio e mantenuta in atmosfera di azoto, si fa gocciolare una soluzione di 0,28 ml (3,15 mmoli) di BH_3 in SMe_2 . La miscela è mantenuta in agitazione e.m. a 0°C per 30 minuti e poi a temperatura ambiente per 3 ore e monitorata mediante TLC su silice, usando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1).

A reazione ultimata si aggiungono 19 ml di etanolo, 14,7 ml di una soluzione di NaOH 1% e 1,9 ml di H_2O_2 . Dopo aver scaldato a riflusso per 1 ora, si lascia raffreddare, si diluisce con 45 ml di H_2O e si estrae 3 volte con etere etilico. Le fasi organiche riunite, anidificate ed evaporate a secchezza, forniscono 2,8 g di un olio giallo che viene utilizzato come tale nel passaggio successivo. La resa della reazione è del 96%.

(1S,9aS)-Metil ottaidro-1*H*-chinolizin-1-carbossilato (34).



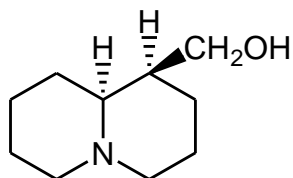
In un pallone a 3 colli da 100 ml vengono disciolti 1,6 g (5,07 mmoli) di (2*S*,2'*S*)-metil 2-(*N*-tert-butossicarbonilpiperidin-2'-il)-5-idrossipentanoato in 0,84 ml (6,08 mmoli) di TEA anidra ed in 38 ml di CH₂Cl₂ anidro. Nella soluzione, raffreddata con un bagno di ghiaccio e mantenuta in atmosfera di azoto, si fanno gocciolare 0,47 ml (6,08 mmoli) di cloruro di mesile. La reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2 ore, monitorandone l'andamento mediante TLC su silice, usando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (10:1:0.1). Successivamente, la miscela viene diluita con CH₂Cl₂ e lavata 2 volte con acqua. La fase organica viene poi anidrificata e concentrata fino a raggiungere un volume di pochi ml ai quali si aggiungono 7,25 ml di CF₃COOH. La soluzione risultante è mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per un'ora e poi nuovamente concentrata fino ad ottenere un residuo che, dopo raffreddamento in bagno di ghiaccio, viene trattato con una soluzione di NaOH 2 N (12 ml) e CH₂Cl₂. Le due fasi vengono separate e la fase acquosa estratta 4 volte con CH₂Cl₂. Le fasi organiche riunite, anidificate ed evaporate a secchezza, forniscono 1 g di grezzo che, viene purificato con flash cromatografia su silice, eluendo con CH₂Cl₂/MeOH (10:1). Si ottengono 320 mg di olio incolore. La resa della reazione è del 32%.

$$[\alpha]_D^{20} = +9,27 \text{ (} c = 2,9 \text{ ; CHCl}_3 \text{)}$$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) :

$\delta = 3.61$ (s, 3H); 2.97-2.78 (m, 2H); 2.70-2.50 (m, 1H); 2.25-1.10 (m, 13H).

(+)-Lupinina (35).



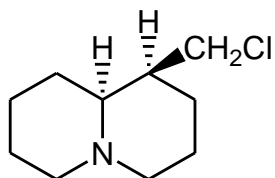
Una soluzione di 500 mg (2,5 mmoli) di (1S,9aS)-metil ottaidro-1*H*-chinolizin-1-carbossilato in etere etilico (15 ml) e THF (4,5 ml) anidri è aggiunta lentamente ad una sospensione di 120,4 mg (3,17 mmoli) di LiAlH_4 in 30 ml di etere etilico anidro mantenuta in atmosfera di azoto. La miscela viene scaldata a riflusso per 4 ore e monitorata mediante TLC, usando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ (10:1:0,1). Al termine della reazione, dopo aver raffreddato con un bagno di ghiaccio, si aggiungono in successione 0,43 ml di acqua, 0,43 ml di NaOH 15% e altri 1,2 ml di acqua. La fase acquosa viene quindi estratta sei volte con etere etilico e le fasi organiche riunite, anidrificate ed evaporate, forniscono 350 mg di un olio che tende a cristallizzare dopo l'aggiunta di qualche goccia di n-esano. Resa = 81%.

Il prodotto viene usato tal quale per la reazione successiva.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):

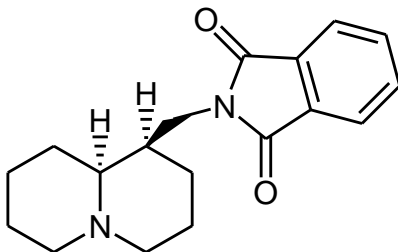
δ = 4.10-4.20 (m, 1H); 3.70 (d, J = 10.72 Hz, 1H); 2.90-2.78 (m, 2H); 2.25-1.20 (m, 15H).

(+)-1-Clorolupinano (36).



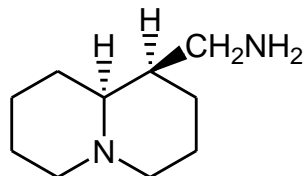
In un pallone a 3 colli da 10 ml vengono posti 223 mg (1,32 mmoli) di (+)-lupinina grezza in 3 ml di CHCl_3 . Nella soluzione, raffreddata con un bagno di ghiaccio, si gocciolano 0,3 ml di SOCl_2 . La miscela viene scaldata a riflusso per 1 ora. Al termine della reazione si utilizza la pompa ad acqua per eliminare l'eccesso di SOCl_2 e il solvente e il residuo ottenuto viene ripreso con alcuni ml di acqua fredda ed estratto tre volte con etere etilico. La fase acquosa viene alcalinizzata con una soluzione di KOH 15% ed estratta sei volte con etere etilico. Le fasi organiche riunite vengono anidificate ed evaporate a secchezza si ottengono 218 mg di un olio arancione (resa 80%) che viene utilizzato come tale nella reazione successiva.

(+)-Lupinilftalimmide (37).



Una soluzione di 218 mg di clorolupinano (1,16 mmoli) e 226 mg di potassio ftalimmide (1,22 mmoli) in 0,6 ml di DMSO viene scaldata, sotto agitazione e in atmosfera di N₂, a 145°C per 1 h e 45'. Dopo raffreddamento, si lascia a riposo la miscela di reazione in frigo per una notte. Il giorno seguente si filtra il precipitato, lavandolo prima con pochi ml di DMSO poi con acqua e si secca il residuo in stufa a 50°C fino a peso costante. Si ottengono 263 mg di prodotto con una resa del 76%.

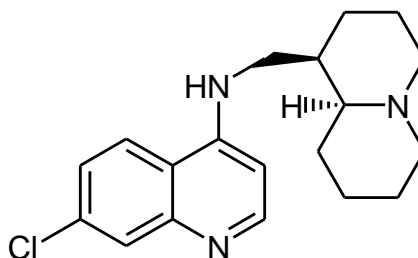
(+)-Aminolupinano (38).



Una soluzione di 263 mg (0,88 mmoli) di lupinil-ftalimide in 2 ml di HCl 6N, mantenuta in agitazione, viene scaldata a riflusso per 10 ore al termine delle quali la miscela di reazione viene raffreddata in frigorifero per una notte. Il giorno seguente si filtrano i cristalli di acido ftalico separatisi, lavandoli con pochi ml di acqua ghiacciata. Il filtrato viene quindi alcalinizzato con una soluzione di NaOH 30% ed estratto una prima volta con etere etilico. Dopo aver saturato la fase acquosa con K₂CO₃, si prosegue con le estrazioni, raccogliendo gli estratti eteri in una beuta contenente KOH in pastiglie. Dalla fase organica filtrata ed evaporata a secchezza. Si ottengono 110 mg di olio giallo (resa 74 %) che viene utilizzato come tale nella reazione successiva.

(+)-AM1 (13).

(+)-7-Cloro-4-[N-(ottaidro-1*H*-chinolizin-1-il)-metil]aminochinolina.



Un pallone a 3 colli da 10 ml contenente 166 mg (0,98 mmoli) di (+)-amminolupinano, 204 mg (1,03 mmoli) di 4,7-diclorochinolina e 645 mg (6,86 mmoli) di fenolo, mantenuto in agitazione e in atmosfera di azoto, viene scaldato a 180°C per 3 ore. La reazione è monitorata mediante TLC su silice utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (10:1:0,1). Dopo raffreddamento, si riprende la miscela con CH₂Cl₂ e si effettua un lavaggio con una soluzione di NaOH 2 N. Dalla fase organica, anidrificata e portata a secchezza, si ottengono 360 mg di prodotto solido grezzo. La purificazione, eseguita tramite flash cromatografia su silice, eluendo con CH₂Cl₂/MeOH (96:4), fornisce 156 mg di solido che viene cristallizzato e lavato in etere etilico per dare cristalli del peso di 103 mg.

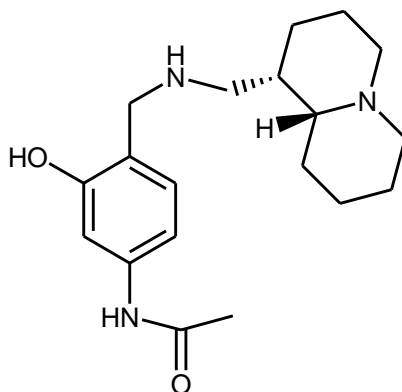
Si procede quindi ad un arricchimento enantiomerico attraverso ricristallizzazione del solido in CH₂Cl₂/etere etilico. Il solido ottenuto viene filtrato, e le madri di filtrazione, evaporate a secchezza, generano un solido cristallino che risulta arricchito nell'enantiomero destrogiro. Ripetendo tale procedimento per 3 volte si ottiene una frazione di 32 mg avente p.f. di 147,5-151,2 °C ed un e.e del 87%. La resa della reazione è del 10%.

$$[\alpha]_D^{25} = +21 \text{ (c=1 ; EtOH)}$$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) :

$\delta = 8.83$ (s, 1H); 8.47 (d, $J = 5.51$ Hz, 1H); 7.97 (d, $J = 1.93$ Hz, 1H); 7.67 (d, $J = 9.08$ Hz, 1H);
 7.34 (dd, $J = 9.08, 2.20$ Hz, 1H); 6.24 (d, $J = 5.78$ Hz, 1H); 3.65 - 3.50 (m, 1H); 3.40 - 3.20 (m,
1H); 3.10 - 2.95 (m, 2H); 2.30 - 1.00 (m, 14H).

***N*-[3-Idrossi-4-[[((1*S*,9*aR*)-ottaidro-2*H*-chinolizin-1-il)metilamino]metil]fenil]-acetamide (39a).**



In un palloncino da 10 ml raffreddato in ghiaccio si pongono 1,45 g (6 mmoli) di (-)-amminolupinano dicloridrato, 0,54 ml (6 mmoli) di formaldeide soluzione acquosa al 37% ed 1,8 ml di acido acetico glaciale. La sospensione ottenuta viene lasciata reagire a temperatura ambiente, per circa 5-10 minuti, con agitazione e.m. e fino alla completa dissoluzione dell'ammina. La soluzione ottenuta viene trasferita in un pallone da 100 ml a due colli in cui precedentemente erano stati posti 926 mg (6 mmoli) di 3-acetamidofenolo. Si lascia reagire il tutto a 25°C per due ore sotto flusso di azoto e sotto agitazione e.m.; sul pallone viene posta una valvola al calcio cloruro anidro.

Si segue la reazione mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (9:1:0,1). Terminata la reazione, la miscela viene alcalinizzata con NH₃ conc. fino a pH 8-9, osservando la formazione di un precipitato. Tale sospensione viene trasferita in imbuto separatore ed estratta con abbondante CH₂Cl₂ per quattro volte.

Le frazioni organiche riunite vengono anidrificate con Na₂SO₄ anidro ed evaporate a secchezza. Il solido ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂, MeOH e NH₃ conc. (da 96:3,6:0,4 a 92:7,2:0,8).

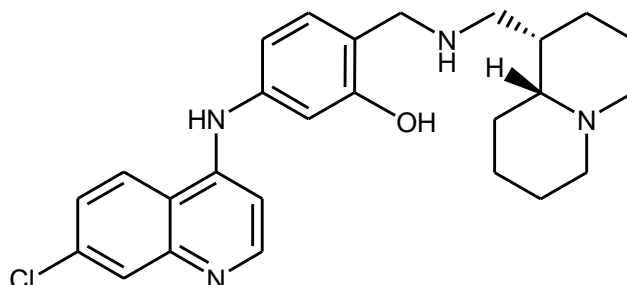
Dalla cromatografia si ottiene una frazione pulita di 322 mg (p.f. 121,3-124,7°C) con resa del 16,2%.

HRMS (ESI) m/z calcd per C₁₉H₃₀N₃O₂ [M+H]⁺: 332.23325; trovato: 332.23328.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆):

δ= 7.20 (s, 1H); 7.05 (dd, J = 8.20, 1.92 Hz, 1H); 6.88 (d, J = 8.20 Hz, 1H); 6.80 (d, J = 1.92 Hz, 1H); 3.90 (s, 2H); 2.90–2.70 (m, 4H); 2.10 (s, 3H); 2.10–1.40 (m, 14H).

5-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-[[((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il)metilamino]metil]fenolo (14a).



Una soluzione di 322 mg (0,97 mmoli) di *N*-[3-idrossi-4-[[((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il)metilamino]metil]fenil]-acetamide in 3,3 ml di HCl 20% è scaldata a riflusso in atmosfera d'azoto e con agitazione e.m. per un'intera notte; la mattina seguente si controlla l'andamento dell'idrolisi attraverso TLC su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2) visualizzando l'ammina mediante esposizione della lastrina a vapori di iodio. Si evapora l'acido a pressione ridotta, si aggiungono pochi ml di etanolo assoluto e si evapora nuovamente a secchezza.

Si scioglie il residuo in 3,2 ml di etanolo assoluto, alla soluzione si aggiungono 212 mg (1,07 mmoli) di 4,7-diclorochinolina e si scalda a riflusso per cinque ore. La reazione è monitorata mediante TLC su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2).

Al termine delle cinque ore si evapora il solvente a secchezza ed il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH in gradiente fino al 6%.

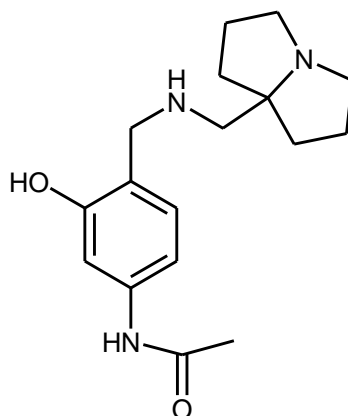
Il solido ottenuto, disciolto in acqua ed alcalinizzato con NaHCO_3 , è estratto con CH_2Cl_2 . Le fasi organiche, anidificate con Na_2SO_4 ed evaporate a secchezza, producono 142 mg di prodotto solido che dopo lavaggio con etere etilico analitico ha p.f. 135,7-137,3°C. La reazione ha una resa pari al 32%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{Cl}_1\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 451.22592; trovato: 451.22538.

$^1\text{H-N.M.R.}$ (CDCl_3):

δ = 8.53 (d, J = 5.50 Hz, 1H); 8.00 (d, J = 1.93 Hz, 1H); 7.88 (d, J = 9.07 Hz, 1H); 7.45 (dd, J = 1.93, 9.08 Hz, 1H); 7.10–6.90 (m, 2H); 6.75 (s, 1H); 6.70 (dd, J = 1.92, 7.70 Hz, 1H); 4.00 (s, 2H); 3.00–2.80 (m, 4H); 2.40–1.20 (m, 14H).

***N*-[4-[[*(*Esaidro-1*H*-pirrolizin-7*a*-il)metilamino]metil]-
3-idrossifenil]acetamide (39b).**



In un palloncino da 10 ml raffreddato in ghiaccio si pongono 1,28 g (6 mmoli) di (esaidro-1*H*-pirrolizin-7*a*-il)metilamina dicloridrato, 0,54 ml (6 mmoli) di formaldeide al 37% e 1,8 ml di acido acetico glaciale. La sospensione ottenuta viene lasciata reagire a temperatura ambiente, per circa 5-10 minuti, con agitazione e.m. e fino alla completa dissoluzione dell'ammina. La soluzione ottenuta viene trasferita in un pallone da 100 ml a due colli in cui precedentemente erano stati posti 926 mg (6 mmoli) di 3-acetamidofenolo. Si lascia reagire il tutto a 25°C per due ore sotto flusso di azoto e sotto agitazione e.m. ; sul pallone viene posta una valvola al calcio cloruro anidro.

Si segue la reazione mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2).

Terminata la reazione, la miscela viene alcalinizzata con NH₃ conc. fino a pH 8-9, osservando la formazione di un precipitato. Tale sospensione viene trasferita in imbuto separatore, estratta

con abbondante CH_2Cl_2 per quattro volte e dopo saturazione della fase acquosa con NaHCO_3 , estratta nuovamente con CH_2Cl_2 .

Le frazioni organiche riunite vengono anidificate con Na_2SO_4 anidro ed evaporate a secchezza. Il solido ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, eluendo con una miscela di $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (da 93:6,3:0,7 a 90:9:1).

Dalla cromatografia si ottiene una frazione pulita di 141 mg ed una frazione impura di 284 mg che viene nuovamente cromatografata con le stesse modalità precedentemente utilizzate. Da questa seconda cromatografia si ottengono 190 mg di composto puro. Le due frazioni sono riunite e lavate con etere etilico per dare un solido amorfo.

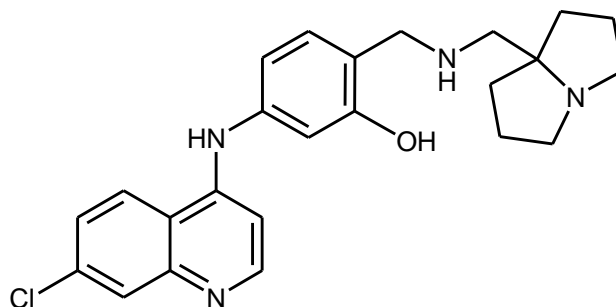
In totale si sono quindi ottenuti 330 mg di solido puro con una resa del 18,1%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 304.20195; trovato: 304.20222.

$^1\text{H-N.M.R.}$ (DMSO-d_6):

$\delta =$ 9.72 (s, 1H); 7.02 (d, $J = 1.92$ Hz, 1H); 6.95 (d, $J = 8.20$ Hz, 1H); 6.85 (dd, $J = 8.20, 1.92$ Hz, 1H); 3.72 (s, 2H); 2.90–2.75 (m, 2H); 2.33 (s, 2H); 1.98 (s, 3H); 1.80–1.35 (m, 10H).

5-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-[[[esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)metilamino]metil]fenolo (14b).



Una soluzione di 310 mg (1,02 mmol) di *N*-[4-[[[esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)metilamino]metil]-3-idrossifenil]acetamide in 3,3 ml di HCl 20% è scaldata a riflusso in atmosfera d'azoto e con agitazione e.m. per otto ore; si controlla l'andamento dell'idrolisi attraverso TLC su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2) visualizzando l'ammina mediante esposizione della lastrina a vapori di iodio.

Si evapora l'acido a pressione ridotta, si aggiungono pochi ml di EtOH assoluto e si evapora nuovamente a secchezza.

Si scioglie il residuo in 3 ml di EtOH assoluto, alla soluzione si aggiungono 224 mg (1,13 mmol) di 4,7-diclorochinolina e si scalda a riflusso per otto ore. La reazione è seguita mediante TLC su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2).

Al termine delle otto ore si evapora il solvente a secchezza, si scioglie il solido ottenuto in acqua, si alcalinizza con NH₃ conc. fino ad un pH di circa 8-9 e si estrae con abbondante di CH₂Cl₂.

Le fasi organiche, seccate su Na₂SO₄ anidro, sono evaporate a secchezza ed il grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH in gradiente fino al 17%.

Poiché dalla cromatografia non si riesce ad ottenere il prodotto completamente puro, le frazioni più ricche in prodotto vengono ulteriormente purificate su TLC preparativa su gel di silice (Kieselgel 60 F₂₅₄, 1 mm), miscela eluente CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₃ conc. (10:2:0,2).

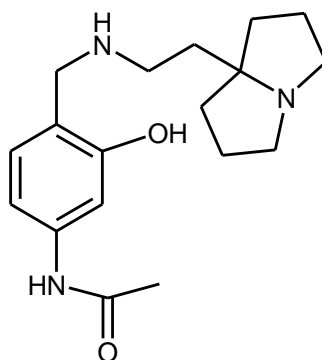
Si ottengono 25 mg (resa del 5,8%) di prodotto solido con p.f. compreso tra i 109°C ed i 120,5°C.

HRMS (ESI) m/z calcd per C₂₄H₂₈Cl₁N₄O [M+H]⁺: 423.19462; trovato: 423.19524.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆):

δ= 9.80 (s, 1H); 8.45–8.25 (m, 2H); 7.85 (s, 1H); 7.53 (d, J = 9.07 Hz, 1H); 7.07 (d, J = 9.07 Hz, 1H); 6.90 (s, 1H); 6.60–6.75 (m, 2H); 3.80 (s, 2H); 2.90–2.80 (m, 2H); 2.36 (s, 2H); 1.80–1.00 (m, 10H).

***N*-[4-[[2-(Esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)etilammino]metil]-3-idrossifenil]acetamide (39c).**



Ad una soluzione di 752 mg (4,87 mmoli) di (esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)etilamina e di 736 (4,87 mmoli) di 3-acetamidofenolo in 3,7 ml di etanolo assoluto, si aggiungono 0,32 ml di soluzione acquosa al 37 % di formaldeide. La miscela di reazione viene scaldata a 88 °C per 24 ore, in agitazione e.m. e proteggendo il refrigerante a ricadere con una valvola al KOH.

L'andamento della reazione viene seguito attraverso TLC su gel di silice, utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (8:2:0,2).

Terminato il riscaldamento, la miscela di reazione viene evaporata a secchezza ed il grezzo così ottenuto è purificato con flash cromatografia su gel di silice, eluendo una miscela di CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (fino a 77:22:1).

Le frazioni contenente il prodotto vengono riprese con etanolo assoluto ed evaporate a secchezza ed il residuo solido ottenuto viene lavato con una miscela di etere etilico/CH₂Cl₂ (1:1). Si ottengono 214,4 mg di solido con resa totale pari al 14%.

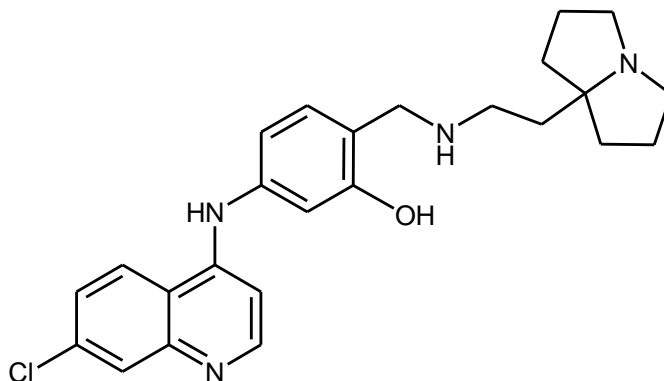
Il prodotto fonde con decomposizione in un intervallo ampio (124,6-154 °C).

MS (ESI): m/z 318 [M+H]⁺.

¹H-N.M.R. (CDCl₃):

δ = 6.87 (dd, J = 8.20, 1.92 Hz, 1H); 6.62 (d, J = 8.20 Hz, 1H); 6.50 (d, J = 1.92 Hz, 1H); 3.90 (s, 2H); 3.00-2.90 (m, 2H); 2.65-2.50 (m, 2H); 2.15 (s, 3H); 1.90-1.35 (m, 12H).

5-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-[[2-(esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)etilamino]metil]fenolo (14c).



In un pallone a due colli 175 mg (0,55 mmoli) di *N*-[4-[[2-(esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)etilamino]metil]-3-idrossifenil]acetamide vengono sciolti in 3 ml di HCl 20%.

La soluzione è scaldata a riflusso, in atmosfera d'azoto e con agitazione e.m. per 8 ore. Si controlla l'andamento della reazione mediante TLC su gel di silice, utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:3:0,25).

Si conferma inoltre l'avvenuta reazione di deacetilazione effettuando un saggio di diazotazione e copulazione con β-naftolo su una piccola aliquota della miscela di reazione.

Si evapora l'acido a pressione ridotta, si aggiungono pochi ml di etanolo assoluto e si evapora nuovamente a secchezza.

Si scioglie il residuo ottenuto in 3 ml di etanolo assoluto, alla soluzione si aggiungono 109 mg (0,55 mmoli) di 4,7-diclorochinolina e si scalda a riflusso per 18 ore in atmosfera di azoto.

Si evapora a secchezza il solvente; il residuo viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂ contenente dal 5% al 12% di MeOH.

Le frazioni contenenti il prodotto vengono disciolte nella minima quantità di acqua e la soluzione portata a pH 8-9 con NH₃ conc. ed estratta con CH₂Cl₂.

Dalle fasi organiche riunite, anidrificate con Na₂SO₄ ed evaporate a secchezza, si ottengono 125,4 mg di prodotto (resa del 38%).

Il solido viene ricristallizzato da una miscela CH₂Cl₂/etere etilico, ottenendo 92 mg di prodotto con p.f. : 204–206.7°C.

Una parte del prodotto ricristallizzato è disciolto in 3 ml HCl 1M in EtOH e la soluzione è portata a secchezza.

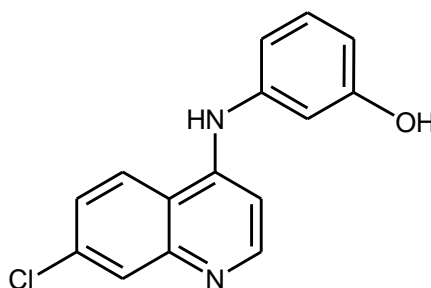
Il sale triclorigrato ottenuto è lavato con una miscela di etere etilico/EtOH (7,5:2,5) ottenendo 43 mg di prodotto cristallino con p.f.: (235) 247,2-251°C.

HRMS (ESI) m/z calcd per C₂₅H₃₀Cl₁N₄O [M+H]⁺: 437.21027; trovato: 437.21110.

¹H-N.M.R. (CDCl₃):

δ= 8.50 (d, J = 5.50 Hz, 1H); 8.00 (d, J = 1.93 Hz, 1H); 7.80 (d, J = 9.07 Hz, 1H); 7.40 (dd, J = 1.93, 9.08 Hz, 1H); 7.10–6.80 (m, 3H); 6.70 (dd, J = 1.92, 7.70 Hz, 1H); 4.00 (s, 2H); 3.00–2.80 (m, 2H); 2.80–2.40 (m, 4H); 1.70–1.40 (m, 10H).

3-(7-Clorochinolin-4-ilamino)fenolo (40).



In un pallone a due colli munito di refrigerante a ricadere protetto con valvola a CaCl_2 si pongono 20 ml di etanolo assoluto, 1 ml di HCl 2N ed 2,18 g (11 mmoli) di 4,7-diclorochinolina. Alla soluzione formatasi, mantenuta sotto agitazione e.m. ed in atmosfera d'azoto, si aggiungono 1,30 g (12 mmoli) di 3-aminofenolo e 91 mg (0,55 mmoli) di KI.

La miscela è scaldata a riflusso per l'intera notte, durante la quale si ha la formazione di un precipitato giallo. La mattina successiva la reazione viene monitorata mediante TLC su gel di silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1). La sospensione viene filtrata ed il solido, dopo lavaggio con etanolo, viene sospeso in acqua. La sospensione viene alcalinizzata con NH_3 conc. ed il precipitato formatosi viene filtrato e lavato con pochi ml di acqua. Il solido ottenuto, posto in essiccatore e quindi lavato con pochi ml di etere etilico, pesa 2,86 g con p.f. di 276,1-279,3°C.

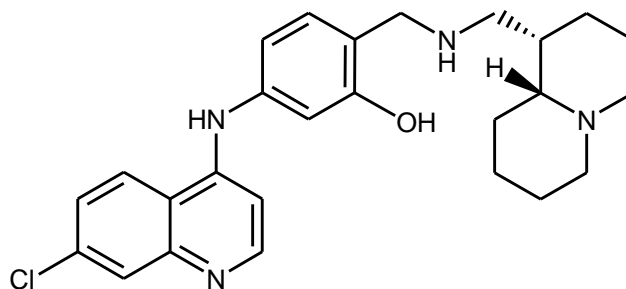
La resa della reazione è pari al 96%.

$^1\text{H-N.M.R.}$ (DMSO- d_6):

$\delta = 9.53$ (s, 1H); 8.98 (s, 1H); 8.45-8.38 (m, 2H); 7.87 (d, $J = 1.92$ Hz, 1H); 7.53 (dd, $J = 2.20$, 9.08 Hz, 1H); 7.20-7.15 (m, 1H); 6.94 (d, $J = 5.50$ Hz, 1H); 6.78-6.75 (m, 2H); 6.57-6.53 (m, 1H).

5-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-[[[(1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il)metilamino]metil]fenolo (14a).

(Metodo alternativo).



410 mg (1,7 mmoli) di (-)-amminolupinano dicloridrato vengono sciolti nella minima quantità di acqua ed alcalinizzati con una soluzione acquosa di NaOH 30%.

La soluzione acquosa viene inizialmente estratta per tre volte con etere etilico, saturata con NaHCO₃, e nuovamente estratta con altre tre porzioni di etere etilico.

Le fasi eteree riunite vengono seccate su pastiglie di KOH e portate a secchezza.

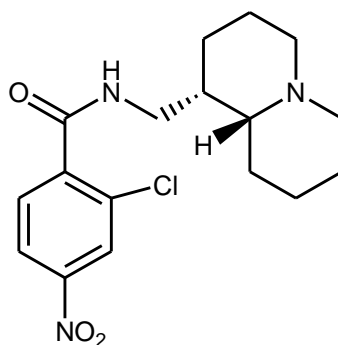
L'amminolupinano base libera così ottenuto (252,4 mg, 1,5 mmoli) viene ripreso con 10 ml di etanolo assoluto e trasferito in un pallone a due colli munito di refrigerante a ricadere protetto da protetto con valvola a CaCl₂. Alla soluzione posta in agitazione e.m. ed in atmosfera d'azoto, vengono aggiunti 0,14 ml (1,5 mmoli) di formaldeide in soluzione acquosa al 37%, 406 mg (1,5 mmoli) di 3-(7-clorochinolin-4-ilamino)fenolo ed altri 5 ml di etanolo assoluto.

La miscela è posta a riflusso per 6 ore, durante il quale l'andamento della reazione è monitorata mediante TLC su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2).

Dopo raffreddamento, l'etanolo viene evaporato ed il residuo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (96:3,6:0,4).

Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un solido che dopo lavaggio con una miscela etere di petrolio/etere etilico (90:10) pesa 270 mg con p.f. di 139-142°C. La reazione presenta una resa del 40%.

2-Cloro-4-nitro-N-[(1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il]metil]benzamide (41).



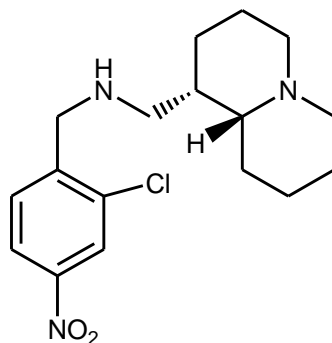
In un pallone a tre colli munito di imbuto gocciolatore si pongono 12 ml di CH_2Cl_2 anidro e 900 mg (4.46 mmoli) di acido 2-cloro-4-nitrobenzoico. Alla soluzione si aggiungono 1,06 g (5.13 mmoli) di DCC e 16.5 mg (0,134 mmoli) di DMAP. La soluzione viene mantenuta in agitazione e.m. per 15 min. in atmosfera d'azoto, durante i quali viene introdotta nell'imbuto gocciolatore una soluzione formata da 750 mg (4.46 mmoli) di (-)-amminolupinano disciolti in 4 ml di CH_2Cl_2 anidro. Si gocciola lentamente la soluzione di ammina e quindi si lascia la miscela in agitazione e.m. per 4 ore a temperatura ambiente, durante la quale si osserva la formazione di un precipitato. La reazione è monitorata mediante TLC su gel di silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (10:1:0,1). Dopo rimozione del solido mediante filtrazione, le fasi organiche sono lavate prima con NaOH 2N, quindi con una soluzione satura di NaCl . Il residuo grezzo ottenuto dopo anidificazione e rimozione sotto vuoto del solvente viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (da 97:3 a 92:8). Dalle frazioni contenente il prodotto si ottiene un residuo cristallino che dopo lavaggio con etere etilico pesa 805 mg e presenta un p.f. di 126,1-128,3°C. La reazione presenta una resa del 52%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{17}H_{23}Cl_1N_3O_3$ $[M+H]^+$: 352.14225; trovato: 352.14330.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 8.78 (s, 1H); 8.30 (s, 1H); 8.15 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 7.75 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 3.75–3.55 (m, 2H); 2.90–2.70 (m, 2H); 2.40–1.15 (m, 14H).

***N*-(2-Cloro-4-nitrobenzil)((1*S*,9*aR*)-ottaidro-2*H*-chinolizin-1-il)metanammia (42).**



In un pallone a tre colli da 50 ml munito di refrigerante a ricade ed imbuto gocciolatore, sono posti 17 ml (17 mmoli) di BH_3 1N in THF. Alla soluzione raffreddata in un bagno di ghiaccio viene gocciolata lentamente una soluzione formata da 380 mg (1,08 mmoli) di 2-cloro-4-nitro-*N*-[[(1*S*,9*aR*)-ottaidro-2*H*-chinolizin-1-il)metil]benzamide in 3 ml di THF anidro. Terminata l'aggiunta, la soluzione è posta a riflusso per 6 ore in atmosfera d'azoto, trascorsi i quali alla soluzione, nuovamente raffreddata a 0°C, si aggiungono attentamente 7 ml di HCl 10N. La miscela viene scaldata a riflusso per 10 minuti, monitorando la reazione mediante TLC su gel di silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (10:1:0,1).

L'eccesso di HCl e il THF vengono rimossi a pressione ridotta e la fase acquosa acida, raffreddata in bagno di ghiaccio, viene alcalinizzata mediante l'uso di NaOH solido ed estratta per tre volte con CH_2Cl_2 . Le fasi organiche, anidificate e evaporate a secchezza generano un prodotto oleoso che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (da 98:2 a 94:6). L'olio risultante, contaminato dalla presenza di tracce di reattivo di partenza, viene ripreso con etere di petrolio. La parte

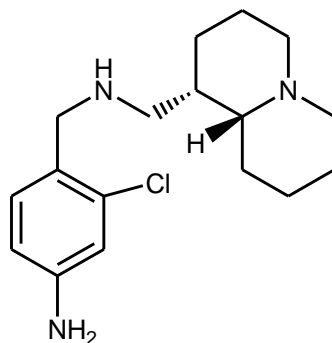
insolubile viene filtrata e le fasi organiche, evaporate, generano 316 mg di olio denso. La reazione presenta una resa del 87%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{17}H_{25}Cl_1N_3O_2$ $[M+H]^+$: 338.16298; trovato: 338.16309.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 8.22 (s, 1H); 8.10 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 7.70 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 3.95 (s, 2H); 2.95-2.65 (m, 4H); 2.25-1.00 (m, 14H).

3-Cloro-4-[[((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il)metilammino]metil]benzenamine (43).



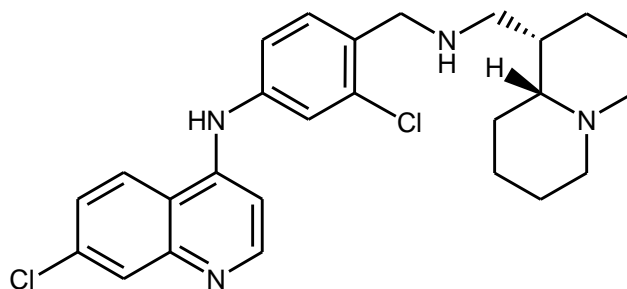
In un pallone a due colli da 25 ml munito di refrigerante a ricadere protetto da valvola al CaCl_2 vengono posti 8,7 ml di una soluzione etanolo/acqua (2:1) nei quali sono sciolti 400 mg (1,18 mmoli) di *N*-(2-cloro-4-nitrobenzil)((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il)metanammia. Si aggiungono in seguito 270 mg (4,8 mmoli) di ferro in polvere, precedentemente lavato con HCl 1N e acqua, e quindi 0,3 ml di acido acetico glaciale. La miscela viene posta a riflusso in atmosfera d'azoto e sotto energica agitazione e.m. per 20 min., monitorando la reazione mediante TLC su gel di silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (10:2:0,2). Terminato il riscaldamento si alcalinizza la sospensione con ammoniaca conc. e si filtra la parte insolubile su un pad di Celite®. Le madri del filtrato sono concentrate sotto vuoto, diluite con acqua ed estratte per tre volte con acetato d'etile. Le fasi organiche, dopo essere state anidificate ed evaporate a secchezza, generano un olio che viene purificato mediante cromatografia su gel d'allumina (grado III), utilizzando come miscela eluente cicloesano/acetato d'etile (70:30). Dalle frazioni contenente il prodotto si ottengono 270 mg di prodotto oleoso con una resa pari al 75%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{17}H_{27}Cl_1N_3$ $[M+H]^+$: 308.18880; trovato: 308.18917.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 7.10 (d, J = 9.05 Hz, 1H); 6.65 (s, 1H). 6.50 (d, J = 9.05 Hz, 1H); 3.78-3.50 (m, 4H); 2.90-2.55 (m, 4H); 2.18-1.00 (m, 14H).

7-Cloro-4-[N-[3-cloro-4-[[((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il)metilamino]metil]fenil]amino]chinolina (15a).



In un pallone a due colli da 10 ml vengono posti 4 ml di etanolo assoluto ed 181 mg (0,92 mmoli) di 4,7-diclorochinolina. Alla soluzione così ottenuta si aggiungono 0,33 ml di HCl 6N, 270 mg (0,88 mmoli) di 3-cloro-4-[[((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il)metilammino]metil]benzenamine e 2 mg di KI. La miscela di reazione viene posta a riflusso per una notte in atmosfera d'azoto e sotto agitazione e.m., monitorando la reazione mediante TLC su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1).

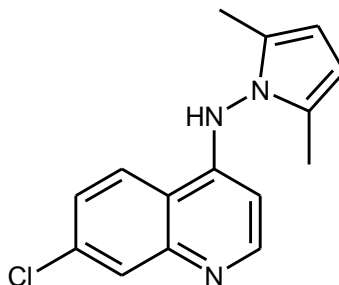
Terminato il riscaldamento il solvente viene evaporato sotto vuoto ed il residuo sospeso in NaOH 2N ed estratto per tre volte con acetato d'etile. Le fasi organiche, anidificate ed evaporate, generano un residuo solido che viene purificato mediante uso di flash cromatografia su gel di silice utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (da 92:8:0 a 90:9,5:0,5). Dalle frazioni contenente il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un solido che dopo lavaggio con etere etilico pesa 270 mg e presenta p.f. di 140,3-142,4°C. La reazione ha una resa pari al 79%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{26}H_{31}Cl_2N_4$ $[M+H]^+$: 469.19203; trovato: 469.19200.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 8.60 (d, J = 5.23 Hz, 1H); 8.04 (d, J = 1.93 Hz, 1H); 7.85 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 7.50-7.40 (m, 2H); 7.30 (d, J = 2.20 Hz, 1H); 7.15 (dd, J = 8.25, 2.20 Hz, 1H); 6.97 (d, J = 5.22 Hz, 1H); 6.65 (s, 1H); 3.85 (s, 2H); 2.90-2.75 (m, 4H); 2.15-1.35 (m, 14H).

7-Cloro-4-[N-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)amino]chinolina (44).



Ad una soluzione, formata da 5,6 ml di acido acetico glaciale e da 1,084 g (5,6 mmoli) di 7-cloro-4-idrazinochinolina si aggiungono 767 mg (6,72 mmoli) di 2,5-esandione. La soluzione viene scaldata a 65°C per tre ore sotto agitazione e.m. ed in atmosfera d'azoto proteggendo il refrigerante mediante un tubo al calcio cloruro.

Si segue la reazione tramite TLC su gel di silice, utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1).

Al termine delle tre ore si evapora l'eccesso di acido acetico tramite rotavapor.

Il grezzo ottenuto viene ripreso con circa 50 ml di acqua ed alcalinizzato con NH₃ conc. fino a pH 8-9; si forma un precipitato che viene separato mediante filtrazione sotto vuoto e lavato con acqua ben fredda.

Tale solido viene purificato con flash cromatografia su gel di silice utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂ contenente lo 0,5-1% di MeOH.

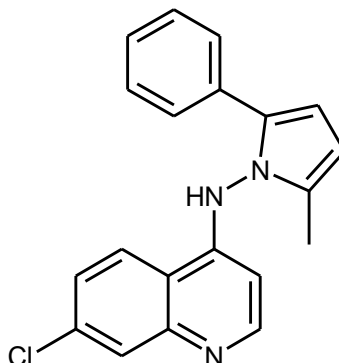
Le frazioni contenenti il prodotto vengono riunite, ed evaporate a secchezza ed dal residuo lavato con etere etilico, si ottengono 1,34 g di prodotto cristallino puro con p.f. 225,8-227,5°C, con una resa pari al 89,4 %.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{15}H_{15}Cl_1N_3$ $[M+H]^+$: 272.09490; trovato: 272.09469.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.33 (s, 1H); 8.44 (d, J = 4.95 Hz, 1H); 8.31 (d, J = 9.07 Hz, 1H); 7.90 (d, J = 1.92 Hz, 1H); 7.57 (dd, J = 9.08, 1.93 Hz, 1H); 5.83 (s, 2H); 5.61 (d, J = 5.03 Hz, 1H); 1.95 (s, 6H).

7-Cloro-4-[N-(2-metil-5-fenil-1H-pirrol-1-il)amino]chinolina (45).



Ad una soluzione di 774 mg (4 mmoli) di 7-cloro-4-idrazinochinolina in 4 ml di acido acetico glaciale si aggiungono 846 mg (4,8 mmoli) di 1-fenil-1,4-pentandione. La miscela viene scaldata a riflusso per due ore sotto agitazione e.m. ed in atmosfera d'azoto proteggendo il refrigerante mediante un tubo al calcio cloruro. Si segue la reazione tramite TLC su silice, miscela CH₂Cl₂/MeOH (10:1). Al termine delle due ore si evapora l'eccesso di acido acetico tramite rotavapor. Si riprende il grezzo ottenuto (che presenta una colorazione bruna scura) con CH₂Cl₂ e la fase organica viene lavata prima con NaOH 2N e poi con acqua, e dopo anidificazione con Na₂SO₄ anidro, evaporate a secchezza.

Il residuo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di metanolo fino al 4%.

Dalle frazioni contenenti il prodotto si ricava un solido violaceo che viene ulteriormente purificato mediante cromatografia su allumina neutra (Grado I) utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/cicloesano in gradiente (da 90:10 a 95:5).

Da questa cromatografia si ottengono due frazioni dello stesso composto: un solido bianco, del peso di 498 mg con p.f. di 195,5-196,2°C ed un solido giallo-arancio che, dopo lavaggio con una miscela di etere etilico ed etere di petrolio, diventa un prodotto rosa pallido del peso di 93 mg e con p.f. 193,1-193,6°C.

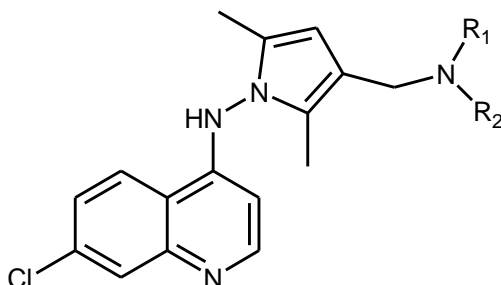
La resa finale della reazione è del 44,3 %.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{20}H_{17}Cl_1N_3$ $[M+H]^+$: 334.11055; found: 334.11143

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

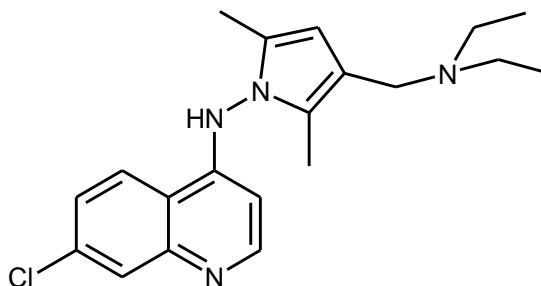
δ = 10.60 (s, 1H); 8.39 (d, J = 4.70 Hz, 1H); 8.30 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 7.85 (s, 1H); 7.61 (d, J = 8.53 Hz, 1H); 7.50 (d, J = 7.70 Hz, 2H); 7.18 (t, J = 7.43 Hz, 2H); 7.07 (d, J = 7.15 Hz, 1H); 6.40 (d, J = 3.30 Hz, 1H); 6.10 (s, 1H); 5.60 (d, J = 4.40 Hz, 1H); 2.02 (s, 3H).

7-Cloro-4-[N-[2,5-dimetil-3-[(N-sostituito)aminometil]-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina: metodo generale.



In un pallone da 5 ml vengono posti 0,5 ml di acido acetico glaciale, formaldeide in soluzione acquosa al 37% (1,5 mmoli per le ammine secondarie, 1,65 mmoli per le ammine primarie) e l'ammina prescelta (come base libera o dicloridrata: 1,5 mmoli per le ammine secondarie, 1,65 mmoli per le ammine primarie). La soluzione che si ottiene viene lasciata in agitazione e.m. per 2-3 minuti, quindi trasferita in un secondo pallone contenente 407,6 mg (1,5 mmoli) di 7-cloro-4-[N-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)amino]chinolina e lasciata a reagire in atmosfera d'azoto per 2 ore sotto agitazione e.m.. Si aggiungono quindi 15 ml di acqua, si alcalinizza la miscela con NaOH 2N e si estraggono le fasi acquose con CH₂Cl₂ per 3 volte. Le fasi organiche, anidificate ed evaporate a secchezza, generano un solido grezzo che viene purificato con flash cromatografia su gel di silice (condizioni di eluizione indicate per ogni singolo composto).

7-Chloro-4-[N-[3-((dietilamino)metil)-2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina (16a).



Reagenti:

- 7-Cloro-4-[N-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)amino]chinolina: 407,6 mg (1,5 mmoli).
- Dietilammina: 0,16 ml (1,5 mmoli).
- Formaldeide soluzione acquosa al 37%: 0,13 ml (1,5 mmoli).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[N-[2,5-dimetil-3-[(N-sostituito)aminometil]-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina.

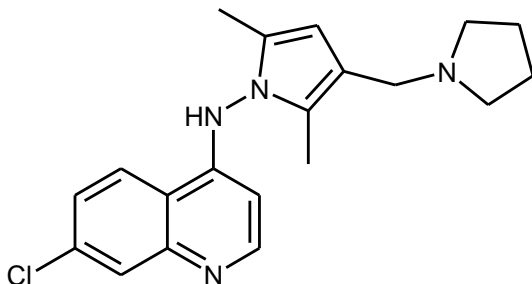
L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂, MeOH e NH₃ conc. (da 97:2,7:0,3 a 95:4,5:0,5). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un solido che, dopo lavaggio con una miscela etere etilico/etere di petrolio (70:30), pesa 342,6 mg con p.f. 248-251°C (con dec). La resa finale della reazione è pari al 64,5 %.

Anal. Calcd per $C_{20}H_{25}Cl_1N_4 + H_2O$: C, 64.07; H, 7.25; N, 14.94. Trovato: C, 63.68; H, 7.52; N, 14.71.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 8.51 (d, J = 4.67 Hz, 1H); 8.04 (s, 1H); 7.92 (d, J = 8.25 Hz, 1H); 7.80 (s, 1H); 7.48 (dd, J = 9.07, 1.92 Hz, 1H); 5.94 (s, 1H); 5.81 (d, J = 4.95 Hz, 1H); 3.45 (s, 2H); 2.55 (q, J = 6.88 Hz, 4H); 2.15-1.95 (m, 6H); 1.10 (t, J = 6.82 Hz, 6H).

7-Chloro-4-[N-[2,5-dimetil-3-((pirrolidin-1-il)metil)-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina (16b).



Reagenti:

- 7-Cloro-4-[N-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)amino]chinolina: 407,6 mg (1,5 mmoli).
- Pirrolidina: 0,13 ml (1,5 mmoli).
- Formaldeide soluzione acquosa al 37%: 0,13 ml (1,5 mmoli).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto la 7-cloro-4-[N-[2,5-dimetil-3-[(N-sostituito)aminometil]-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂, MeOH (da 95:5 a 88:12). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un solido che, dopo lavaggio con una miscela etere etilico/etanolo pesa 340 mg con p.f. di 160,5-162,5°C.

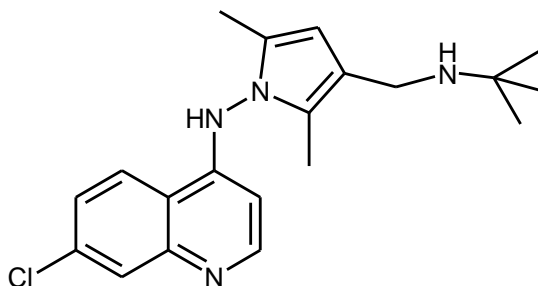
La resa finale della reazione è pari al 64%.

Anal. Calcd per $C_{20}H_{23}Cl_1N_4 + \frac{1}{2}H_2O$: C, 66.01; H, 6.65; N, 15.40. Trovato: C, 65.84; H, 6.43; N, 15.42.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 8.50 (d, J = 4.67 Hz, 1H); 8.03 (s, 1H); 7.90 (d, J = 8.25 Hz, 1H); 7.47 (dd, J = 9.08, 1.92 Hz, 1H); 5.95 (s, 1H); 5.80 (d, J = 4.95 Hz, 1H); 3.45 (s, 2H); 2.55 (s, 4H); 2.15-1.95 (m, 6H); 1.80 (s, 4H).

7-Chloro-4-[N-[3-((*ter*-butilamino)metil)-2,5-dimetil-1*H*-pirrol-1-il]amino]chinolina (16c).



Reagenti:

- 7-Cloro-4-[N-(2,5-dimetil-1*H*-pirrol-1-il)amino]chinolina: 407,6 mg (1,5 mmoli).
- *ter*-Butilamina: 0,17 ml (1,65 mmoli).
- Formaldeide soluzione acquosa al 37%: 0,14 ml (1,65 mmoli).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto la 7-cloro-4-[N-[2,5-dimetil-3-[(*N*-sostituito)aminometil]-1*H*-pirrol-1-il]amino]chinolina.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂, MeOH e NH₃ conc. (da 96:3,6:0,4 a 94:5,4:0,6). Dalla cromatografia si ottengono diverse frazioni contenenti il prodotto ancora impuro, tra le quali una da 127 mg che viene ripresa con una miscela di etere etilico/cicloesano (50:50) e filtrata. Dopo evaporazione a secchezza del solvente organico si ottengono 97 mg di prodotto con p.f. 103,5-107,5°C. Il residuo solido rimasto sul filtro

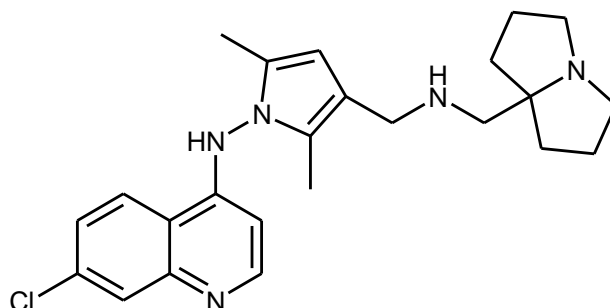
viene riunito alle altre frazioni impure ottenute dalla cromatografia e sottoposto a nuova flash cromatografia su gel di silice, utilizzando lo stesso sistema eluente usato precedentemente. La frazione contenente il prodotto viene ripresa con una miscela cicloesano/etere etilico (50:50), si filtra il residuo insolubile e si evapora la soluzione a secchezza, ottenendo 46 mg di prodotto con un p.f. di 101,2-103,5°C. La resa totale della reazione è del 26,7 %.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{20}H_{26}Cl_1N_4$ $[M+H]^+$: 357.18405; trovato: 357.18396.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 8.50 (d, J = 4.67 Hz, 1H); 8.03 (s, 1H); 7.90 (d, J = 8.25 Hz, 1H); 7.70 (br s, 1H); 7.47 (dd, J = 9.08, 1.92 Hz, 1H); 5.97 (s, 1H); 5.86 (d, J = 4.95 Hz, 1H); 3.60 (s, 2H); 2.10-1.90 (m, 6H); 1.22 (s, 9H).

7-Chloro-4-[N-[2,5-dimetil-3-[[esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)metilamino]metil]-1*H*-pirrol-1-il]amino]chinolina (16d).



Reagenti:

- 7-Cloro-4-[N-(2,5-dimetil-1*H*-pirrol-1-il)amino]chinolina: 407,6 mg (1,5 mmoli).
- (Esaidro-1*H*-pirrolizin-7a-il)metilamina*2 HCl: 351,7 mg (1,65 mmoli).
- Formaldeide soluzione acquosa al 37%: 0,14 ml (1,65 mmoli).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto la 7-cloro-4-[N-[2,5-dimetil-3-[(*N*-sostituito)aminometil]-1*H*-pirrol-1-il]amino]chinolina.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂, MeOH, NH₃ conc. (da 96:3,6:0,4 a 94:5,4:0,6). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un solido che, dopo lavaggio con una miscela etere etilico pesa 144 mg con p.f. di 92-97°C (con dec.).

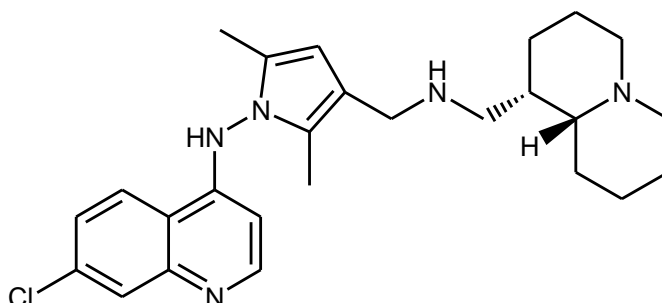
La resa finale della reazione è pari al 23%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{24}H_{31}Cl_1N_5$ $[M+H]^+$: 424.22625; trovato: 424.22695.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 8.56 (s, 1H); 8.45 (d, J = 4.67 Hz, 1H); 8.00 (s, 1H); 7.90 (d, J = 8.25 Hz, 1H); 7.47 (dd, J = 9.08, 1.92 Hz, 1H); 5.90 (s, 1H); 5.86 (d, J = 4.95 Hz, 1H); 3.62 (s, 2H); 3.35-3.15 (m, 2H); 3.10 (br s, 1H); 2.75-2.60 (m, 2H); 2.20-1.50 (m, 16H).

7-Cloro-4-[N-[2,5-dimetil-3-[[[(1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il]metil]amino]metil]-1H-pirrol-1-il]amino]-chinolina (16c).



Reagenti:

- 7-Cloro-4-[N-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)amino]chinolina: 543,5 mg (2 mmoli).
- (-)-Amminolupinano *2 HCl: 530,1 mg (2,2 mmoli).
- Formaldeide soluzione acquosa al 37% : 0,19 ml (2,2 mmoli).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto la 7-cloro-4-[N-[2,5-dimetil-3-[(N-sostituito)aminometil]-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂, MeOH, NH₃ conc. (da 96:3,6:0,4 a 94:4,5:0,5). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un solido che, dopo lavaggio con una miscela etere etilico pesa 318 mg con p.f. di 187,8-190,7°C.

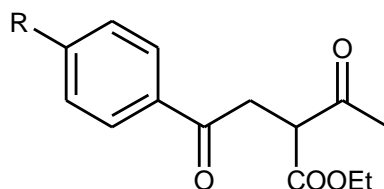
La resa finale della reazione è pari al 35%.

Anal. Calcd per $C_{26}H_{34}Cl_1N_5$: C, 69.08; H, 7.58; N, 15.49. Trovato: C, 69, 07; H, 7.22; N, 15.26.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

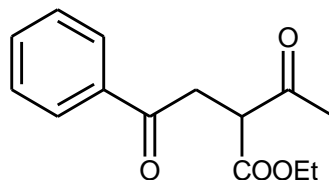
δ = 8.40 (d, J = 4.59 Hz, 1H); 8.10-7.80 (m, 2H); 7.40 (d, J = 9.08, 1H); 5.97-5.65 (m, 2H); 3.65-3.30 (m, 2H); 3.30-2.95 (m, 2H); 2.95-2.65 (m, 2H); 2.65-0.60 (m, 20H).

**2-Acetil-4-osso-4-[(4-sostituito)fenil]butanoato d'etile:
metodo generale.**



Ad un sospensione di sodio etossido o sodio idruro (10 mmoli) in 20 ml di etere etilico anidro mantenuti in agitazione e.m. e posti in un pallone a tre colli munito di refrigerante a ricadere protetto con valvola al CaCl_2 , si gocciola lentamente una soluzione di acetoacetato d'etile (12 mmoli) sciolti in 2 ml di etere etilico anidro. Si lascia reagire la sospensione formatasi per 15 minuti in atmosfera d'azoto e sotto vigorosa agitazione e.m., quindi alla sospensione si aggiunge lentamente mediante imburo gocciolatore una soluzione formata da fenacilbromuro o 2-bromo-4'-(sostituito)acetofenone (10 mmoli) in 20 ml di etere etilico anidro. Si scalda la sospensione per 2 ore a riflusso. Dopo raffreddamento, il NaBr formatosi viene filtrato e lavato abbondantemente con etere etilico, e le fasi eteree riunite vengono evaporate per dare un prodotto grezzo che viene purificato con flash cromatografia su gel di silice (condizioni di eluizione indicate per ogni singolo composto).

2-Acetil-4-osso-4-fenilbutanoato d'etile (46).



Reagenti:

- NaOEt: 680,5 mg (10 mmoli).
- Acetoacetato d'etile: 1,56 g (12 mmoli).
- Fenacilbromuro: 1,99 g (10 mmoli).

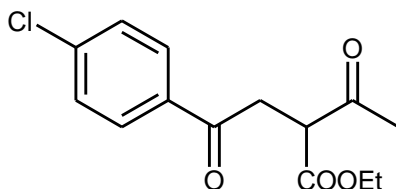
La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 2-acetil-4-osso-4-[(4-sostituito)fenil]butanoato d'etile.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/acetato d'etile (10:1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di cicloesano/CH₂Cl₂ (da 60:40 a 40:60). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un olio del peso di 2,30 g. La resa finale della reazione è pari al 93%.

¹H-N.M.R. (CDCl₃):

δ= 7.97 (d, *J*= 7.43 Hz, 2H); 7.58 (t, *J*= 7.43 Hz, 1H); 7.48 (t, *J*= 7.43 Hz, 2H); 4.25-4.18 (m, 3H); 3.67 (dd, *J*= 18.43, 8,25 Hz, 1H); 3.43 (dd, *J*= 18.43, 8,25 Hz, 1H); 2,43 (s, 3H); 1.30 (t, *J*= 6.82 Hz, 3H).

2-Acetil-4-(4-clorofenil)-4-ossobutanoato d'etile (47).



Reagenti:

- NaOEt: 680,5 mg (10 mmoli).
- Acetoacetato d'etile: 1,56 g (12 mmoli).
- 2-Bromo-4'-cloroacetofenone: 2,34 g (10 mmoli).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 2-acetil-4-osso-4-[(4-sostituito)fenil]butanoato d'etile.

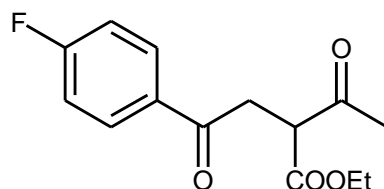
L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/acetato d'etile (10:1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di cicloesano/acetato d'etile (60:40). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo lavaggio con una miscela di etere petrolio/etere etilico (80:20), pesa 2,30 g con p.f. di 64,8-66,6°C. La reazione presenta una resa del 81%.

HRMS (ESI) m/z calcd per C₁₄H₁₅Cl₁O₄Na₁ [M+Na]⁺: 305.05511; trovato: 305.05570.

$^1\text{H-N.M.R.}$ (CDCl_3):

$\delta = 7.92$ (dd, $J = 1.93, 6.88$ Hz, 2H); 7.43 (dd, $J = 1.93, 6.88$ Hz, 2H); 4.25 - 4.18 (m, 3H); 3.67 (dd, $J = 18.40, 8.25$ Hz, 1H); 3.43 (dd, $J = 18.40, 8.25$ Hz, 1H); 2.43 (s, 3H); 1.30 (t, $J = 6.82$ Hz, 3H).

2-Acetil-4-(4-fluorofenil)-4-ossobutanoato d'etile (48).



Reagenti:

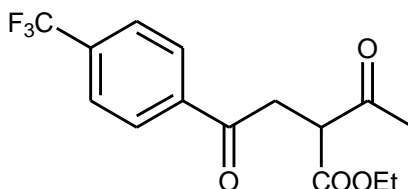
- NaOEt: 680,5 mg (10 mmol).
- Acetoacetato d'etile: 1,56 g (12 mmol).
- 2-Bromo-4'-fluoroacetofenone: 2,17 g (10 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 2-acetil-4-osso-4-[(4-sostituito)fenil]butanoato d'etile. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH_2Cl_2 /acetato d'etile (10:1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di cicloesano/acetato d'etile (80:20). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo oleoso che viene cristallizzato in frigorifero per aggiunta di alcune gocce di etere etilico. Il solido ottenuto, in seguito a lavaggio con etere di petrolio, pesa 1,57 g con p.f. di 56,5-58°C. La reazione presenta una resa del 59%.

$^1\text{H-N.M.R.}$ (CDCl_3):

δ = 8.03-7.98 (m, 2H); 7.16-7.10 (m, 2H); 4.26-4.19 (m, 3H); 3.68 (dd, J = 8.25, 18.43 Hz, 1H); 3.47 (dd, J = 5.78, 18.43 Hz, 1H); 2.44 (s, 3H); 1.29 (t, J = 7.15 Hz, 3H).

2-Acetil-4-[4-(trifluorometil)fenil]-4-ossobutanoato d'etile (49).



Reagenti:

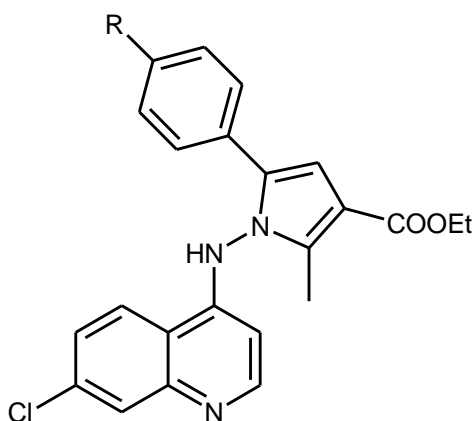
- NaH: 398,6 mg (10 mmol).
- Acetoacetato d'etile: 1,56 g (12 mmol).
- 2-Bromo-4'-(trifluorometil)acetofenone: 2,67 g (10 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 2-acetil-4-osso-4-[(4-sostituito)fenil]butanoato d'etile. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/acetato d'etile (10:1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di cicloesano/acetato d'etile (93:7). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo oleoso che viene cristallizzato in frigorifero dopo aggiunta di alcune gocce di etere etilico. Il solido ottenuto, in seguito a lavaggio con etere di petrolio, pesa 2,47 g con p.f. di 63,8-66,7°C. La reazione presenta una resa del 78%.

¹H-N.M.R. (CDCl₃)

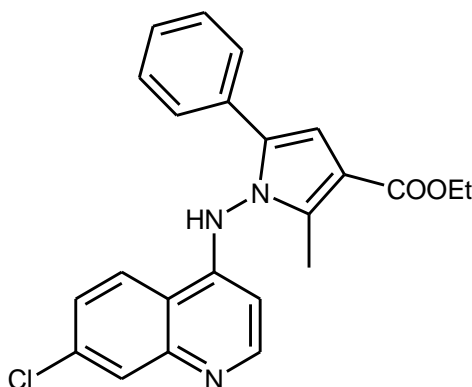
δ= 8.08 (d, *J*= 7.98 Hz, 1H); 7.73 (d, *J*= 8.26 Hz, 1H); 4.27-4.20 (m, 3H); 3.72 (dd, *J*= 8.25, 18.43 Hz, 1H); 3,50 (dd, *J*= 5.77, 18.47 Hz, 1H); 2.45 (s, 3H); 1.30 (t, *J*= 7.15 Hz, 3H).

1-[(7-Clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-5-[(4-sostituito)fenil]-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile: metodo generale.



In un palloncino a tre colli munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 sono posti 10 ml di acido acetico glaciale nel quale viene sciolta la 7-cloro-4-idrazinochinolina (6,2 mmoli). Alla soluzione ottenuta, mantenuta sotto agitazione e.m. ed in atmosfera di azoto, è aggiunto il 2-acetil-4-osso-4-fenilbutanoato d'etile o il corretto 2-acetil-4-(4-(sostituito)fenil)-4-ossobutanoato d'etile (6,2 mmol). La miscela viene scaldata a riflusso per due ore. Durante il riscaldamento la soluzione vira da una colorazione giallo-arancio ad una colorazione rosso-viola. Terminata la reazione, si concentra la soluzione tramite rotavapor, ottenendo un residuo viscoso che viene raffreddato in bagno di ghiaccio, ripreso con pochi ml di acqua ed alcalinizzato con NaOH 2N. Le fasi acquose sono infine estratte tre volte con acetato d'etile. Dalle fasi organiche, anidificate e portate a secchezza, si ottiene un solido grezzo che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice (condizioni di eluizione indicate per ogni singolo composto).

1-[(7-Clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-5-fenil-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile (50).



Reagenti:

- 7-Cloro-4-idrazinochinolina: 1,2 g (6,2 mmol).
- 2-Acetil-4-osso-4-fenilbutanoato d'etile: 1,54 g (6,2 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 1-[(7-clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-5-[(4-sostituito)fenil]-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente acetato d'etile/cicloesano (70:30). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di acetato d'etile/cicloesano (40:60). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che viene ricristallizzato in frigorifero sciogliendolo nella minima quantità di etere etilico ed aggiungendovi alcune gocce di etere di petrolio. Il solido ottenuto, filtrato e lavato con una

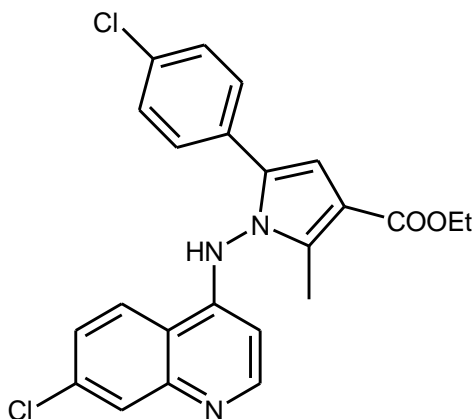
miscela di etere di petrolio/etere etilico (90:10), pesa 1,98 g con p.f. di 165-168°C. La reazione presenta una resa del 79%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{23}H_{21}Cl_1N_3O_2$ $[M+H]^+$: 406.13168; trovato: 406.13256.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6)

δ = 11.55 (s, 1/2 H); 10.83 (s, 1/2 H); 8.41 (s, 1H); 8.30 (s, 1/2 H); 7.90 (s, 1/2 H); 7.75-7.00 (m, 7H); 6.75 (s, 1H); 5.65 (s, 1/2 H); 5.20 (s, 1/2 H); 4.20 (q, J = 6.87 Hz, 2H); 2.30 (s, 3H); 1.30 (t, J = 6.87 Hz, 3H).

5-(4-Clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-1*H*-pirrol-3-carbossilato d'etile (51).



Reagenti:

- 7-Cloro-4-idrazinochinolina: 1,2 g (6,2 mmol).
- 2-Acetil-4-(4-clorofenil)-4-ossobutanoato d'etile: 1,75 g (6,2 mmol).

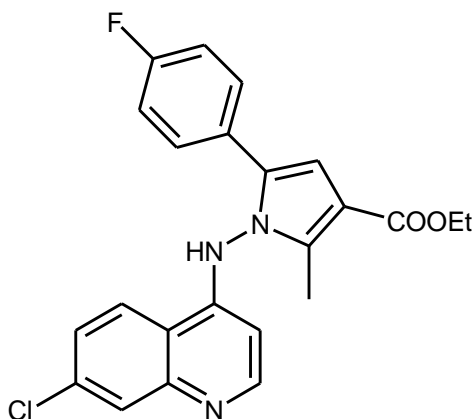
La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 1-[(7-clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-5-[(4-sostituito)fenil]-1*H*-pirrol-3-carbossilato d'etile. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente acetato d'etile/cicloesano (70:30). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di acetato d'etile/cicloesano (30:70). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo schiumoso che viene cristallizzato in frigorifero sciogliendolo nella minima quantità di etere etilico ed aggiungendovi alcune gocce di etere di petrolio. I cristalli vengono filtrati e dopo lavaggio con etere etilico pesano 2,02 g con p.f. di 210-212°C. La resa della reazione è del 74%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{23}H_{20}Cl_2N_3O_2$ $[M+H]^+$: 440.09271; trovato: 440.09350.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6)

δ = 11.55 (s, $\frac{1}{2}$ H); 10.83 (s, $\frac{1}{2}$ H); 8.41 (s, 1H); 8.30 (s, $\frac{1}{2}$ H); 7.90 (s, $\frac{1}{2}$ H); 7.70-7.10 (m, 6H); 6.75 (s, 1H); 6.55 (s, $\frac{1}{2}$ H); 5.18 (s, $\frac{1}{2}$ H); 4.20 (q, J = 6.82 Hz, 2H); 2.30 (s, 3H); 1.30 (t, J = 6.82 Hz, 3H).

1-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-5-(4-fluorofenil)-2-metil-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile (52).



Reagenti:

- 7-Cloro-4-idrazinochinolina: 1,2 g (6,2 mmol).
- 2-Acetil-4-(4-fluorofenil)-4-ossobutanoato d'etile: 1,65 g (6,2 mmol).

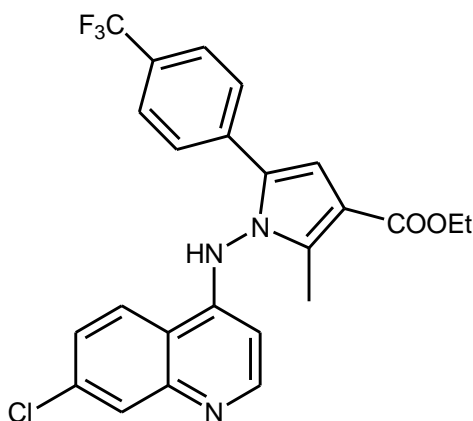
La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 1-[(7-clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-5-[(4-sostituito)fenil]-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente acetato d'etile/cicloesano (40:60). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di acetato d'etile/cicloesano (20:80). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo schiumoso che, dopo aggiunta di alcune gocce di etere etilico, viene fatto cristallizzare in frigorifero. I cristalli vengono filtrati e dopo lavaggio con etere di petrolio/etere etilico (70:30) pesa 2,0 g con p.f. di 186,4-188,7°C. La resa della reazione è pari al 76%.

$^1\text{H-N.M.R.}$ (CDCl_3):

$\delta = 8.17\text{-}8.14$ (m, 2H); 7.87 (s, 1H); 7.44 (dd, $J = 1.93, 9.08$ Hz, 1H); 7.39-7.34 (m, 2H); 6.90-6.85 (m, 2H); 6.71 (s, 1H); 5.83 (d, $J = 5.77$ Hz, 1H); 4.29 (q, $J = 7.15$ Hz, 2H); 2.40 (s, 3H); 1.36 (t, $J = 7.15$ Hz, 3H).

1-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-5-[4-(trifluorometil)fenil]-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile (53).



Reagenti:

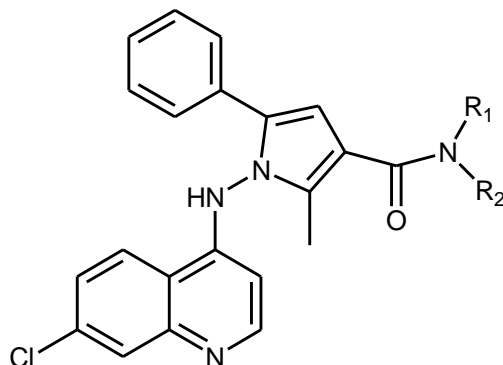
- 7-Cloro-4-idrazinochinolina: 1,2 g (6,2 mmol).
- 2-Acetil-4-[4-(trifluorometil)fenil]-4-ossobutanoato d'etile: 1,96 g (6,2 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 1-[(7-clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-5-[(4-sostituito)fenil]-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente acetato d'etile/cicloesano (40:60). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di acetato d'etile/cicloesano (15:85). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo schiumoso che viene cristallizzato in frigorifero sciogliendolo nella minima quantità di etere etilico ed aggiungendovi alcune gocce di etere di petrolio. I cristalli vengono filtrati e dopo lavaggio con una miscela etere etilico/etere di petrolio (50:50) pesano 2,03 g con p.f. di 191,0-193,0°C. La resa della reazione è pari al 69%.

$^1\text{H-N.M.R. (CDCl}_3\text{)}$

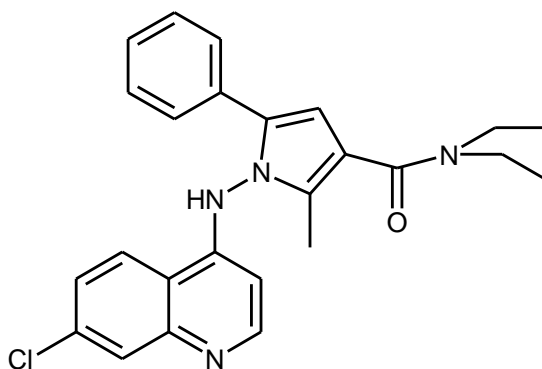
$\delta = 8.31$ (d, $J = 8.81$ Hz, 1H); 7.94 (bs, 1H); 7.80 (s, 1H); 7.61 (d, $J = 7.97$ Hz, 2H); 7.47 - 7.40 (m, 3H); 6.86 (s, 1H); 5.73 (d, $J = 6.06$ Hz, 1H); 4.30 (q, $J = 6.88$ Hz, 2H); 2.41 (s, 3H); 1.37 (t, $J = 6.88$ Hz, 3H);

1-[(7-Cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1H-pirrol-3-(N-sostituito)carbossiamide: metodo generale.



In un palloncino a tre colli da 25 ml munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 vengono posti 10 ml di toluene anidro e l'ammina prescelta (1,25 mmol). La soluzione, mantenuta in agitazione e.m. ed in atmosfera di azoto, viene raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio. Attraverso un tappo forabile posto su uno dei colli laterali del palloncino vengono aggiunti lentamente 0,625 ml (1,25 mmol) di una soluzione 2M di $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ in toluene. Dopo circa 30 minuti, durante i quali la soluzione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente, si aggiunge l'1-[(7-cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile (1 mmol). La sospensione così formata viene scaldata a riflusso per 24 ore, raffreddata, diluita con acetato d'etile e quindi trattata con una soluzione acquosa di NaOH 2N. Il precipitato che si forma viene filtrato e lavato quattro volte con acetato d'etile; le fasi organiche riunite sono anidificate ed evaporate. Il solido che si ottiene viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice (condizioni di eluizione indicate per ogni singolo composto).

1-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-*N,N*-dietil-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-carbossiamide (54a).



Reagenti:

- 1-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-carbossilato d'etile: 405,9 mg (1mmol);
- Dietilamina: 0,13 ml (1,25 mmol);
- Trimetilalluminio 2N in Toluene: 0,625 ml (1,25 mmol);

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 1-[(7-cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-(*N*-sostituito)carbossiamide. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10:0,5). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂/MeOH (95:5). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo lavaggio con una miscela etere etilico/etanolo (95:5) pesa 220 mg con p.f. di 252,7-254,3°C. La resa della reazione è pari al 51%.

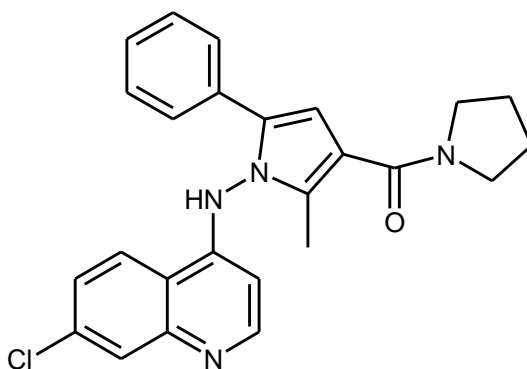
HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{26}Cl_1N_4O_1[M+H]^+$: 433.17897; trovato: 433.18035.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.83 (br s, 1H); 8.41 (s, 1H); 7.90 (s, 1H); 7.70-7.00 (m, 7H); 6.50 (s, 1H); 5.66 (s, 1H);

3.41 (q, J = 6.82 Hz, 4H); 2.03 (s, 3H); 1.10 (t, J = 6.82 Hz, 6H).

[1-[(7-Cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-il](pirrolidin-1-il)metanone (54b).



Reagenti:

- 1-[(7-Cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-carbossilato d'etile: 405,9 mg (1mmol);
- Pirrolidina: 0,10 ml (1,25 mmol);
- Trimetilalluminio 2N in Toluene: 0,625 ml (1,25 mmol);

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 1-[(7-cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-(*N*-sostituito)carbossiamide.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10:0,5). Durante la reazione si forma una sospensione che viene filtrata. Il solido ottenuto risulta essere una porzione di prodotto e viene riunito alla frazione ottenuta alla fine della procedura. Il solido grezzo che si ottiene viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂/MeOH (98:2). Dalle frazioni contenenti il

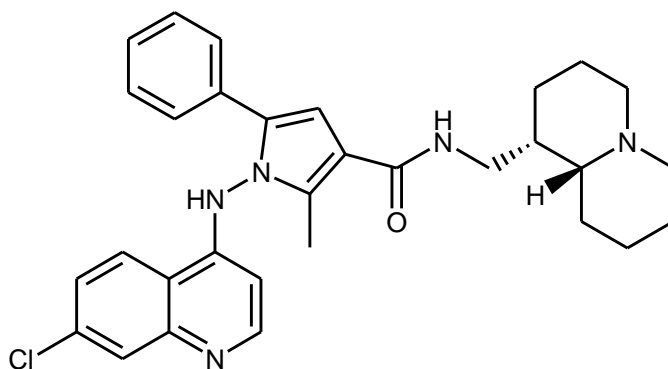
prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido del peso di 370 mg con p.f. di 306-308,5°C. La resa della reazione è pari al 86%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{24}Cl_1N_4O_1$ $[M+H]^+$: 431.16332; trovato: 431.16457.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.80 (br s, 1H); 8.30 (s, 1H); 7.90 (s, 1H); 7.70-7.00 (m, 7H); 6.70 (s, 1H); 5.66 (s, 1H); 3.65 (s, 2H); 3.41 (s, 2H); 2.18 (s, 3H); 1.85 (s, 4H).

[1-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-*N*-[[(1*S*,9*aR*)-ottaidro-2*H*-chinolizzin-1-il)metil]-carbossiamide (54e).



Reagenti:

- 1-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-carbossilato d'etile: 405,9 mg (1mmol);
- Amminolupinano: 210,35 mg (1,25 mmol);
- Trimetilalluminio 2N in Toluene: 0,625 ml (1,25 mmol);

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 1-[(7-cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-(*N*-sostituito)carbossiamide.

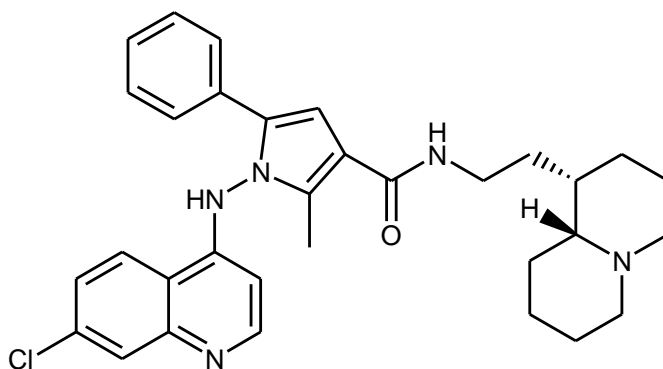
L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ con. (10:1:0,1). Durante la reazione si forma una sospensione. Il prodotto solido viene filtrato, lavato due volte con toluene, ed usato direttamente nello step successivo senza ulteriore purificazione. Si ottengono 464,7 mg di solido con p.f. di 291,5-293,0°C. La reazione presenta una resa del 88%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{31}H_{35}Cl_1N_5O_1$ $[M+H]^+$: 528.25246; trovato: 528.25451.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.75 (br s, 1H); 8.35 (s, 1); 8.10 (s, 1H); 7.90-7.65 (m, 2H); 7.65-7.00 (m, 6H); 6.90 (s, 1H); 5.50 (s, 1H); 3.35 (s, 2H); 2.85-2.60 (m, 2H); 2.30 (s, 3H); 2.00-1.10 (m, 14H).

[1-[(7-Cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-*N*-[2-((1*S*,9*aR*)-ottaidro-2*H*-chinolizzin-1-il)etil]-carbossiamide (54f).



Reagenti:

- 1-[(7-Cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-carbossilato d'etile: 405,9 mg (1mmol);
- 2-[(1*S*,9*aR*)-Ottaidro-1*H*-chinolizin-1-il]etanamina: 227,9 mg (1,25 mmol);
- Trimetilalluminio 2N in Toluene: 0,625 ml (1,25 mmol);

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 1-[(7-cloroquinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-(*N*-sostituito)carbossiamide. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ con. (10:2:0,2). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂/MeOH (da 94:6 a 90:10). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo lavaggio con una miscela CH₂Cl₂/etere etilico (30:70) pesa 211,4 mg con p.f. di 197.6-200.5°C. La resa della reazione è pari al 39%.

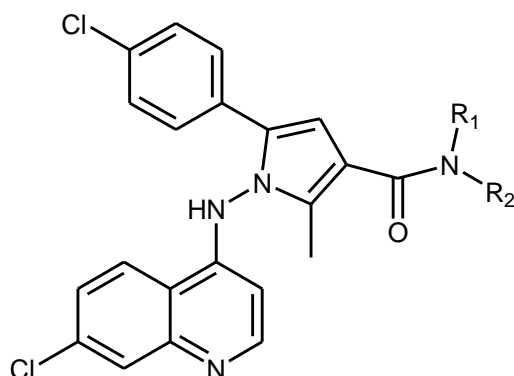
HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{32}H_{37}Cl_1N_5O_1$ $[M+H]^+$: 542.26811; trovato: 542.26899.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.77 (br s, 1H); 8.40 (s, 1H); 8.30 (s, 1H); 7.90 (s, 2H); 7.70-7.00 (m, 6H); 6.90 (s, 1H);

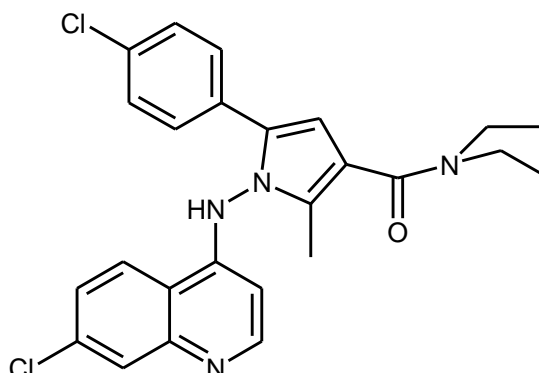
5.66 (s, 1H); 3.30-3.00 (m, 2H); 2.80-2.58 (m, 2H); 2.25 (s, 3H); 2.10-1.10 (m, 16H).

5-(4-Clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-1H-pirrol-3-(N-sostituito)carbossamide: metodo generale.



In un palloncino a tre colli da 25 ml munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 vengono posti 10 ml di toluene anidro e l'ammina prescelta (1,25 mmol). La soluzione, mantenuta in agitazione e.m. ed in atmosfera di azoto, viene raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio. Attraverso un tappo forabile posto su uno dei colli laterali del palloncino vengono aggiunti lentamente 0,625 ml (1,25 mmol) di una soluzione 2M di $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ in toluene. Dopo circa 30 minuti, durante i quali la soluzione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente, si aggiunge 5-(4-clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile (1 mmol). La sospensione così formata viene scaldata a riflusso per 24 ore, raffreddata, diluita con acetato d'etile e quindi trattata con una soluzione acquosa di NaOH 2N. Il precipitato che si forma viene filtrato e lavato quattro volte con acetato d'etile; le fasi organiche riunite sono anidificate ed evaporate. Il solido che si ottiene viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice (condizioni di eluizione indicate per ogni singolo composto).

5-(4-Clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)]amino]-2-metil-1H-pirrol-3-(N,N-dietil)carbrossiamide (55a).



Reagenti:

- 5-(4-Clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)]amino]-2-metil-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile: 440,33 mg (1mmol);
- Dietilamina: 0,13 ml (1,25 mmol);
- Trimetilalluminio 2N in Toluene: 0,625 ml (1,25 mmol);

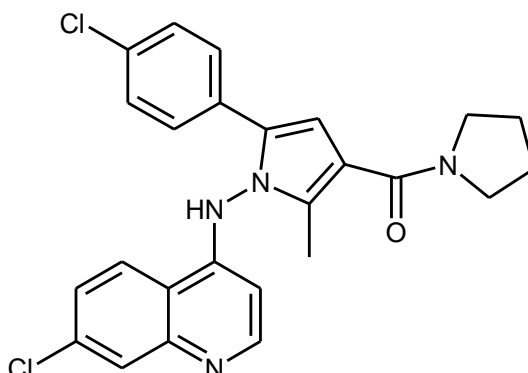
La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 5-(4-clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)]amino]-2-metil-1H-pirrol-3-(N-sostituito)carbrossiamide. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10:0,5). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂/MeOH (99:1). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo lavaggio con etere etilico, pesa 285,1 mg con p.f. di 261,5-263,8°C. La resa della reazione è pari al 61%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{25}Cl_2N_4O_1$ $[M+H]^+$: 467.13999; trovato: 467.14081.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.75 (br s, 1H); 8.45-8.15 (m, 2H); 7.90 (s, 1H); 7.65-7.35 (m, 3H); 7.21 (d, J = 8.25 Hz, 2H); 6.48 (s, 1H); 5.61 (s, 1H); 3.45 (q, J = 6.90 Hz, 4H); 2.05 (s, 3H); 1.12 (t, J = 6.90 Hz, 6H).

**[5-(4-Clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)]amino]-2-metil-1H-pirrol-3-il]
(pirrolidin-1-il)metanone (55b).**



Reagenti:

- 5-(4-Clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)]amino]-2-metil-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile: 440,33 mg (1mmol);
- Pirrolidina: 0,10 ml (1,25 mmol);
- Trimetilalluminio 2N in Toluene: 0,625 ml (1,25 mmol);

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 5-(4-clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)]amino]-2-metil-1H-pirrol-3-(N-sostituito)carbossiamide. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10:0,5). Durante la reazione si forma una sospensione che viene filtrata. Il solido ottenuto risulta essere una porzione di prodotto e viene riunito alla frazione ottenuta alla fine della procedura. Il solido grezzo che si ottiene viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂/MeOH (98:2). Dalle

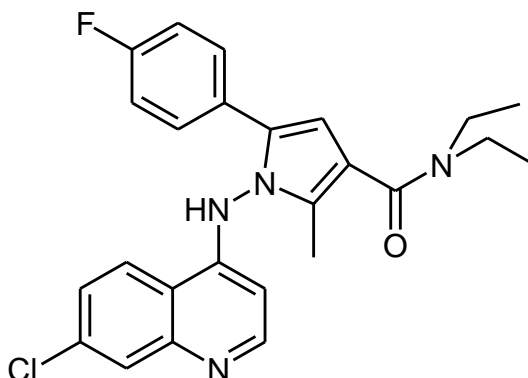
frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido del peso di 428,2 mg con p.f. di 324,5-326,5°C (dec). La resa della reazione è pari al 92%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{23}Cl_2N_4O_1$ $[M+H]^+$: 465.12434; trovato: 465.12561.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 11.00 (br s, 1H); 8.45-8.15 (m, 2H); 7.75 (s, 1H); 7.65-7.40 (m, 3H); 7.30 (d, J = 8.25 Hz, 2H); 6.75 (s, 1H); 5.50 (s, 1H); 3.70 (br s, 2H); 3.40 (br s, 2H); 2.15 (s, 3H); 1.81 (s, 4H).

5-(4-Fluorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-1H-pirrol-3-(N,N-dietil)carbrossiamide (56a).



In una provetta per microonde vengono posti 3 ml di toluene anidro. Dopo aver raffreddato con un bagno di ghiaccio, vengono aggiunti, attraverso un tappo forabile, 0,11 ml di dietilammina (1,05 mmol) e dopo qualche minuto, lentamente, 0,525 ml (1,05 mmol) di una soluzione 2M di $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ in toluene. La soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti e successivamente vengono introdotti 300 mg (0,7 mmol) di 1-[(7-clorochinolin-4-il)amino]-5-(4-fluorofenil)-2-metil-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile. La provetta viene poi chiusa con l'apposito tappo e posta nel forno a microonde dove la reazione viene condotta ad una temperatura di 140°C e una potenza di 150 Watt, con un ramp time pari ad 1 minuto e un hold time di 35 minuti. La reazione viene monitorata mediante TLC su silice, utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90:10).

La miscela di reazione ottenuta, che si presenta come una sospensione, viene trasferita in una beuta e ripresa prima con acetato di etile e poi con una soluzione di NaOH diluita. Lentamente si osserva la precipitazione di un solido bianco che viene filtrato e lavato con abbondante acetato d'etile. Le due fasi vengono separate e dalla fase organica, anidrificata ed evaporata a

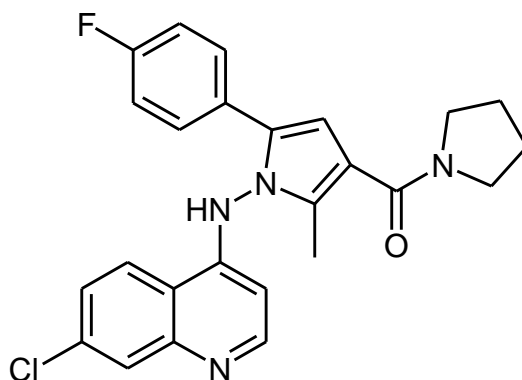
secchezza si ottiene un residuo grezzo di 300 mg che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (98,5:1,5)

Si ottengono 220 mg di un solido giallo pallido che dopo lavaggio con etere etilico si riducono a 195 mg di cristalli bianco panna aventi p.f. di 222-223 °C. La resa della reazione è pari a 62%.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆):

δ= 10.69 (s, 1H); 8.44 (d, *J*= 4.67 Hz, 1H); 8.27 (d, *J*= 9.36 Hz, 1H); 7.91 (s, 1H); 7.64-7.35 (m, 3H); 7.12-6.98 (m, 2H); 6.49 (s, 1H); 5.69 (d, *J*= 5.23 Hz, 1H); 3.40 (q, *J*= 6.60 Hz, 4H); 1.13 (q, *J*= 6.60 Hz, 6H).

[5-(4-Fluorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-1H-pirrol-3-il](pirrolidinil-1-il)metanone (56b).



In un palloncino a tre colli da 25 ml munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 vengono posti 10 ml di toluene anidro ed 0,1 ml (1,18 mmol) di pirrolidina. La soluzione, mantenuta in agitazione e.m. ed in atmosfera di azoto, viene raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio. Attraverso un tappo forabile posto su uno dei colli laterali del palloncino vengono aggiunti lentamente 0,6 ml (1,18 mmol) di una soluzione 2M di $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ in toluene. Dopo circa 30 minuti, durante i quali la soluzione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente, si aggiungono 400 mg (0,944 mmol) di 1-[(7-clorochinolin-4-il)amino]-5-(4-fluorofenil)-2-metil-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile. La sospensione così formatasi viene scaldata a riflusso per 24 ore, durante le quali si osserva prima il passaggio in soluzione dell'estere e poi la formazione di un precipitato. L'andamento della reazione viene monitorata mediante TLC su gel di silice, utilizzando come eluente una miscela di $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1).

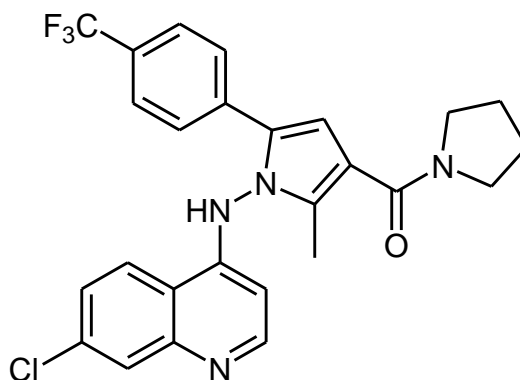
Terminato il riscaldamento, si lascia raffreddare la sospensione ed il solido viene filtrato e lavato bene con etere etilico. Si ottengono 423 mg di solido scuro, che viene purificato

mediante flash cromatografia su gel di silice, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (97:3). Dalle frazioni contenenti il prodotto, per evaporazione del solvente e successivo lavaggio del solido con etere etilico, si ottengono 190 mg di solido bianco con p.f. 310-313°C. La reazione presenta una resa del 45%.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆)

δ= 10.69 (s, 1H); 8.43 (d, *J*= 5.23 Hz, 1H); 8.27 (d, *J*= 8.81Hz, 1H); 7.91 (s, 1H); 7.64-7.35 (m, 3H); 7.11-6.98 (m, 2H); 6.70 (s, 1H); 5.70 (d, *J*= 4.96 Hz, 1H); 3.65 (bs, 2H); 3.44 (bs, 2H); 2.18 (s, 3H); 1.85 (bs, 4H).

[5-(4-(Trifluorometil)fenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-1H-pirrol-3-il](pirrolidinil-1-il)metanone (57b)



In una provetta per microonde vengono posti 3 ml di toluene anidro. Dopo aver raffreddato con un bagno di ghiaccio, vengono aggiunti, attraverso un tappo forabile, 0,05 ml di pirrolidina (0,63 mmoli) e dopo qualche minuto, lentamente, 0,31 ml (0,63 mmoli) di soluzione 2M di $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ in toluene. La soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti e successivamente vengono introdotti 200 mg (0,42 mmoli) di 1-[(7-clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-5-[4-(trifluorometil)fenil]-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile. La provetta viene poi chiusa con l'apposito tappo e posta nel forno microonde dove viene scaldata a 140°C e una potenza di 150 Watt, con un ramptime pari ad 1 minuto e un holdtime di 35 minuti. La reazione viene monitorata mediante TLC su silice, utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90:10).

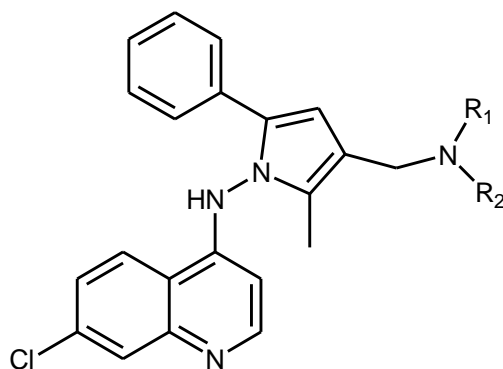
La sospensione ottenuta viene trasferita in una beuta e ripresa prima con acetato di etile e poi con una soluzione di NaOH diluita. Lentamente si osserva la precipitazione di un solido bianco che viene filtrato e lavato con abbondante acetato d'etile. Le due fasi vengono separate

e dalla fase organica, anidrificata ed evaporata a secchezza, si ottiene un residuo grezzo di 180 mg che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, eluendo con una miscela $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97,5:2,5).

Si isolano 120 mg di solido giallo pallido che dopo lavaggio con alcuni ml di etere etilico si riducono a 103 mg di un solido bianco panna con p.f. 318-320°C con decomposizione. La resa della reazione è pari a 49%.

Non è stato possibile eseguire lo spettro N.M.R. in quanto l'ammide non risulta solubile in alcun solvente deuterato.

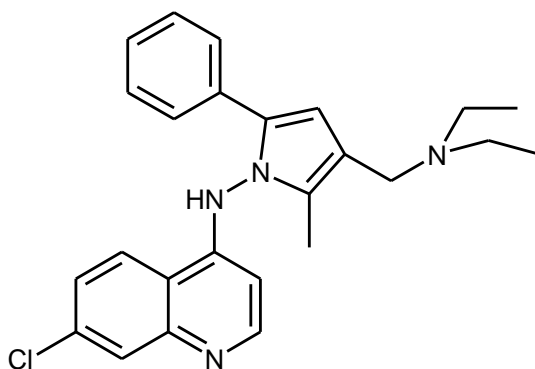
7-Cloro-4-[N-[2-metil-5-fenil-3-[(N-sostituito-amino)-metil]-1H-pirrol-1-il]-amino]chinolina: metodo generale.



In un pallone a due colli munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 vengono posti 43 ml di etere etilico anidro nei quali è sospesa l'amide che si vuole ridurre (1 mmol).

Mantenendo la miscela di reazione in atmosfera d'azoto e in vigorosa agitazione, viene aggiunto cautamente LiAlH_4 (7,8 mmol); la sospensione è scaldata a riflusso per 4 ore. Dopo raffreddamento, si aggiungono alcuni ml di NaOH 1N fino a pH nettamente basico, si filtra l'idrossido di alluminio formatosi ed il solido filtrato viene lavato per due volte con etere etilico. Le fasi organiche sono riunite, anidrificate ed evaporate a secchezza. Il residuo grezzo che si ottiene viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice (condizioni di eluizione indicate per ogni singolo composto).

7-Cloro-4-[N-[3-[(dietilamino)metil]-2-metil-5-fenil-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina (17a).



Reagenti:

- 1-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-*N,N*-dietil-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-carbossiamide:
432,96 mg (1 mmol);
- Litio alluminio idruro: 296 mg (7,8 mmol);

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[*N*-[2-metil-5-fenil-3-[(*N*-sostituito-amino)-metil]-1*H*-pirrol-1-il]-amino]chinolina.

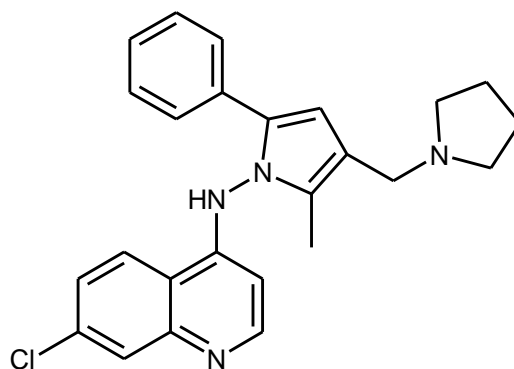
L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (95:5). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo cristallizzazione e lavaggio con una miscela etere etilico/etere di petrolio (40:60) pesa 276 mg e con p.f. di 156,5-160°C (dec.). La reazione presenta una resa del 66%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{28}Cl_1N_4 [M+H]^+$: 419.19970; trovato: 419.19963.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.63 (s, 1H); 8.41 (d, J = 5.22 Hz, 1H); 8.30 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 7.90 (s, 1H); 7.60 (d, J = 8.80 Hz, 1H); 7.50 (d, J = 7.43 Hz, 2H); 7.19 (t, J = 7.43 Hz, 2H); 7.08 (d, J = 7.30 Hz, 1H); 6.40 (s, 1H); 5.60 (d, J = 5.23 Hz, 1H); 3.45 (s, 2H); 2.01 (s, 3H); 1.02 (t, J = 6.87 Hz, 6H); quattro protoni sono mancanti probabilmente perchè coperti dal segnale del DMSO.

7-Cloro-4-[N-[2-metil-5-fenil-3-[(pirrolidin-1-il)metil]-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina (17b).



Reagenti:

- [1-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1H-pirrol-3-il](pirrolidin-1-il)metanone: 430,94 mg (1 mmol);
- Litio alluminio idruro: 296 mg (7,8 mmol);

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[N-[2-metil-5-fenil-3-[(N-sostituito-amino)-metil]-1H-pirrol-1-il]-amino]chinolina.

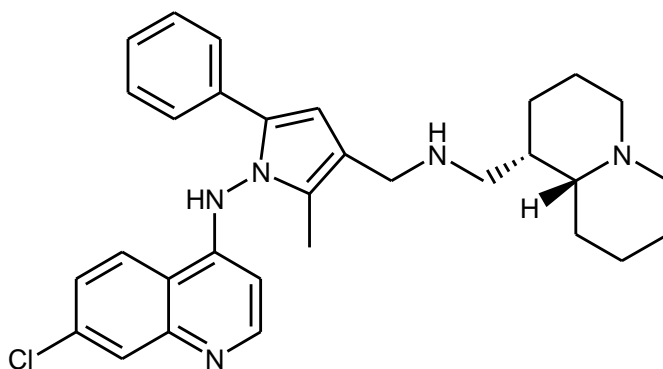
L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (10:1:0,1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (96:4). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo cristallizzazione e lavaggio con etere etilico pesa 212,6 mg e con p.f. di 172.5-176°C. La reazione presenta una resa del 51%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{26}Cl_1N_4 [M+H]^+$: 417.18405; trovato: 417.18410.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.65 (s, 1H); 8.40 (d, J = 5.22 Hz, 1H); 8.30 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 7.90 (s, 1H); 7.60 (d, J = 8.80 Hz, 1H); 7.50 (d, J = 7.43 Hz, 2H); 7.20 (t, J = 7.43 Hz, 2H); 7.09 (d, J = 7.30 Hz, 1H); 6.41 (s, 1H); 5.60 (d, J = 5.23 Hz, 1H); 3.55 (s, 2H); 2.65-2.50 (m, 4H); 2.02 (s, 3H); 1.85-1.55 (m, 4H).

7-Cloro-4-[N-[2-metil-3-[[((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il)metil]aminometil]-5-fenil-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina (17e).



Reagenti:

- [1-[(7-Clorochinoloin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1H-pirrol-3-N-[[((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizzin-1-il)metil]-carbossiamide: 528,1 mg (1 mmol);
- Litio alluminio idruro: 296 mg (7,8 mmol);

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[N-[2-metil-5-fenil-3-[(N-sostituito-amino)-metil]-1H-pirrol-1-il]-amino]chinolina.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (10:2:0,2). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante una duplice flash cromatografia, eluendo con una miscela $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (da 95:4,5:0,5 a 94:5,4:0,6). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo cristallizzazione e lavaggio con etere di petrolio pesa 164,5 mg e con p.f. di 93,5°C (dec). La reazione presenta una resa del 32%.

Una parte del prodotto è convertito in sale tricloridrato (p.f.:220-230°C dec.) per i test biologici.

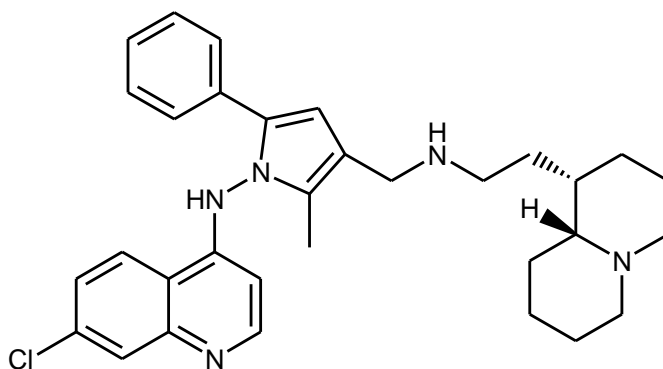
HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{31}H_{37}Cl_1N_5 [M+H]^+$: 514.27320; trovato: 514.27553.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 8.50 (s, 1H); 8.15–7.90 (m, 1H); 7.75-7.60 (m, 1H); 7.60-7.30 (m, 3H); 7.22-7.00 (m, 3H);

6.39 (s, 1H); 6.05 (s, 1H); 3.70 (s, 2H); 3.00-2.70 (m, 4H); 2.10 (s, 3H); 1.95-1.10 (m, 14H).

7-Cloro-4-[N-[2-metil-3-[2-((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizin-1-il)etil]aminometil]-5-fenil-1H-pirrol-1-il]amino]-chinolina (17f).



Reagenti:

- [1-[(7-Clorochinolizin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1H-pirrol-3-N-[2-((1S,9aR)-ottaidro-2H-chinolizzin-1-il)etil]-carbossiamide: 542,13 mg (1 mmol);
- Litio alluminio idruro: 296 mg (7,8 mmol);

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[N-[2-metil-5-fenil-3-[(N-sostituito-amino)-metil]-1H-pirrol-1-il]-amino]chinolina.

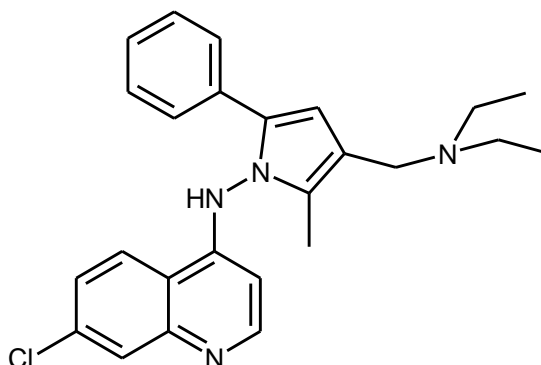
L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (10:2:0,2). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (93:7). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo cristallizzazione e lavaggio con etere di petrolio pesa 121,5 mg e con p.f. di 104-107°C (dec). La reazione presenta una resa del 23%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{31}H_{37}Cl_1N_5$ $[M+H]^+$: 528.28885; trovato: 528.28896.

1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

δ = 8.60-8.10 (m, 2H); 7.90 (s, 1H); 7.70-7.30 (m, 3H); 7.20-6.90 (m, 3H); 6.55 (s, 1H); 5.75 (s, 1H); 3.90-3.50 (m, 2H); 3.05-2.50 (m, 4H); 2.50-1.90 (m, 5H); 1.90-0.95 (m, 14H).

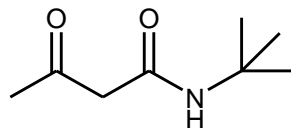
**(7-Cloro-chinolin-4-il)-(3-dietilaminometil-2-metil-5-fenil-pirrol-1-il)-
ammina (17a). Metodo alternativo.**



In un palloncino da 10 ml raffreddato in ghiaccio si pongono 0,16 ml (1,5 mmoli) di dietilammina, 0,13 ml (1,5 mmoli) di formaldeide soluzione acquosa al 37% e 0,5 ml di acido acetico glaciale. La soluzione ottenuta viene lasciata a reagire a 0°C per 3-4 minuti sotto agitazione e.m., al termine dei quali viene trasferita in un pallone da 50 ml a due colli in cui precedentemente erano stati posti 501 mg (1,5 mmoli) di 7-cloro-4-[N-(2-metil-5-fenil-1H-pirrol-1-il)amino]chinolina. Si lascia reagire il tutto a 25°C per un ora e mezza sotto flusso di azoto e sotto agitazione e.m.; sul pallone viene posta una valvola al calcio cloruro. Si segue la reazione mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1), visualizzando l'ammina mediante esposizione della lastrina a vapori di iodio. Il grezzo viene ripreso con acqua (10 ml) e alcalinizzato con NaOH 20%; la sospensione ottenuta viene trasferita in imbuto separatore, estratta con CH₂Cl₂ e le fasi organiche, dopo anidificazione con Na₂SO₄ anidro, sono evaporate a pressione ridotta. Si effettua la purificazione del solido ottenuto mediante flash cromatografia eluendo con una miscela di CH₂Cl₂ contenente il 7-10% di MeOH.

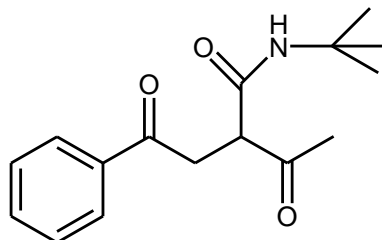
Dalla cromatografia si ottiene una frazione (470 mg) contenente i due isomeri strutturali in quantità apparentemente simili ed una piccola frazione di 18 mg contenente uno solo degli isomeri quasi puro che dallo spettro N.M.R. risulta essere il composto desiderato. La miscela dei due isomeri è sottoposta ad una seconda flash cromatografia, utilizzando le stesse condizioni usate in precedenza, ma anche in questo caso si riesce ad isolare solo una piccola frazione (20 mg) del composto voluto quasi puro, mentre le frazioni successive sono costituite sempre da una miscela dei due isomeri strutturali in rapporto circa 60 : 40 (calcolata sulla base dello spettro N.M.R.). Si riuniscono le due frazioni ricche dell'isomero desiderato e si effettua una nuova flash cromatografia su silice eluendo con CH_2Cl_2 contenente il 3,5-5% di MeOH. Si ottengono 28 mg di composto ragionevolmente puro (N.M.R.) con p.f. 153,3-157,5 con dec.

***N*-(*ter*-butil)acetoacetamide (61).**



In un pallone a tre colli da 25 ml munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 raffreddato in bagno di ghiaccio vengono posti 14 ml di CH_2Cl_2 anidro, 1,37 ml (13,08 mmol) di *ter*-butilamina e 2,18 ml (15,7 mmol) di trietilamina.

Alla miscela mantenuta in atmosfera di azoto e sotto vigorosa agitazione e.m. si gocciolano lentamente una soluzione formata da 1 ml (13,08 mmol) di dichetene in 2 ml di CH_2Cl_2 anidro. Si lascia in agitazione e.m. a temperatura ambiente per due ore, durante il quale l'andamento della reazione è monitorata mediante TLC su gel di silice, miscela eluente cicloesano/etile acetato (50:50). terminate le due ore, la miscela di reazione viene diluita con CH_2Cl_2 , lavata prima con 35 ml di HCl 5% p/p quindi con acqua. Le fasi organiche, anidificate e portate a secchezza, generano un residuo grezzo che viene purificato mediante uso di flash cromatografia su gel di silice utilizzando come miscela eluente cicloesano/acetato d'etile (90:10). Dalle frazioni contenente il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un solido cristallino che dopo lavaggio con una miscela etere etilico/etere petrolio (70:30) pesa 1,14 g con p.f. di 46,4-47,7°C. La reazione ha una resa pari al 56%.

***N*-tert-Butil-2-acetil-4-osso-4-fenilbutanamide (62).**

In un pallone a tre colli da 100 ml munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 vengono posti 14 ml di etere etilico anidro e 216 mg (3,18 mmol) di etossido di sodio. Alla sospensione, mantenuta a temperatura ambiente sotto atmosfera di azoto e vigorosa agitazione e.m., si gocciola una soluzione formata da 500 mg (3,8 mmol) di *N*-(*ter*-butil)acetoacetamide in 3 ml di etere etilico anidro. Dopo 10 minuti si gocciola lentamente una soluzione formata da 633 mg (3,18 mmol) di fenacil bromuro disciolti in 6 ml di etere etilico anidro e la miscela risultante è scaldata a riflusso per 2 ore, durante il quale l'andamento della reazione è monitorata mediante TLC su gel di silice, miscela eluente cicloesano/acetato d'etile (60:40). Terminato il riscaldamento, il NaBr formatosi viene filtrato, lavato per due volte con etere etilico e le fasi eterie riunite vengono evaporate a secchezza per generare un residuo grezzo che viene purificato mediante uso di flash cromatografia su gel di silice utilizzando come miscela eluente cicloesano/acetato d'etile (85:15). Dalle frazioni contenente il prodotto, evaporate a secchezza, si ottengono 650 mg di solido bianco cristallino con p.f. di 111,6-113,7°C. La resa della reazione è pari al 74%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{16}H_{21}N_1O_3Na_1 [M+Na]^+$: 298.14136; trovato: 298.14112.

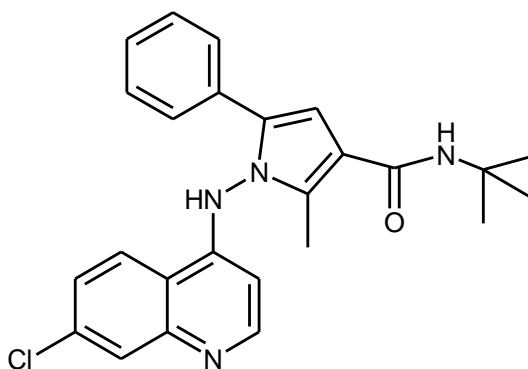
1H -N.M.R. ($CDCl_3$):

$\delta = 7.97$ (d, $J = 7.43$ Hz, 2H); 7.59 (t, $J = 7.43$ Hz, 1H); 7.47 (t, $J = 7.43$ Hz, 2H); 6.00 (s, 1H);

3.85 (t, $J = 6.50$ Hz, 1H); 3.67 (dd, $J = 18.42, 6.50$ Hz, 1H); 3.50 (dd, $J = 18.42, 6.50$ Hz, 1H);

2.35 (s, 3H); 1.35 (s, 9H).

1-[(7-Clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1H-pirrol-3-(*N*-*tert*-butil)carbrossiamide (54c).



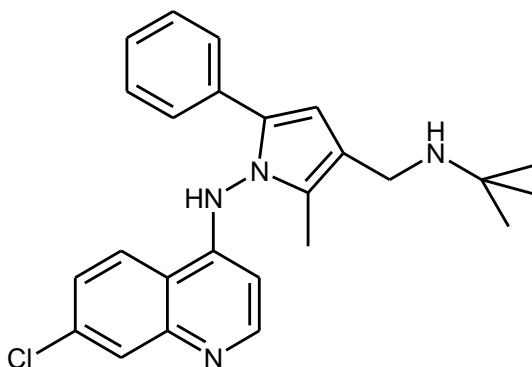
In un palloncino a tre colli munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 sono posti 3 ml di acido acetico glaciale e 352 mg (1,82 mmol) di 7-cloro-4-idrazinochinolina. Alla soluzione ottenuta, mantenuta sotto agitazione e.m. ed in atmosfera di azoto, sono aggiunti 500 mg (1,82 mmol) di *N*-*tert*-butil-2-acetil-4-osso-4-fenilbutanamide. La miscela viene scaldata a riflusso per due ore, durante il quale l'andamento della reazione è monitorata mediante TLC su gel di silice, miscela eluente cicloesano/acetato d'etile (40:60). Terminata il riscaldamento, durante la quale la soluzione è virata ad una colorazione rosso violacea, si concentra la soluzione tramite rotavapor, ottenendo un residuo viscoso che viene raffreddato in bagno di ghiaccio, ripreso con pochi ml di acqua ed alcalinizzato con NaOH 2N. Le fasi acquose sono infine estratte tre volte con CH_2Cl_2 . Dalle fasi organiche, anidificate e portate a secchezza, si ottiene un solido grezzo che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice utilizzando come miscela eluente cicloesano/acetato d'etile (80:20). Dalle frazioni contenente il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un solido cristallino che dopo lavaggio con una miscela etere etilico/etanolo (85:15) pesa 630 mg con p.f. di 266,3-269,1°C. La resa della reazione è pari al 80%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{26}Cl_1N_4O_1$ $[M+H]^+$: 433.17897; trovato: 433.18007.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.72 (s, 1H); 8.52-8.21 (m, 2H); 7.90 (s, 1H); 7.70-7.10 (m, 7H); 7.02 (s, 1H); 5.60 (s, 1H); 2.30 (s, 3H); 1.37 (s, 9H).

4-[N-[3-[(*tert*-Butilamino)metil]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-1-il]amino]-7-clorochinolina (17c).



In un pallone a due colli da 100 ml munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 vengono posti 70 ml di etere etilico anidro nei quali vengono sospesi 550 mg (1,27 mmol) di 1-[(7-clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-5-fenil-1*H*-pirrol-3-(*N*-*tert*-butil)carbrossiamide.

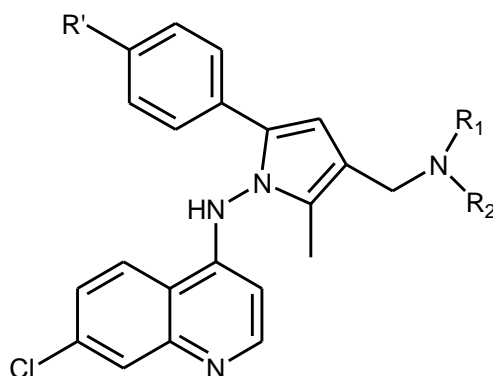
Mantenendo la miscela di reazione in atmosfera d'azoto e in vigorosa agitazione, vengono aggiunti cautamente 550 mg (14,5 mmol) di LiAlH_4 ; la sospensione è scaldata a riflusso per 5 ore, durante le quali la reazione è monitorata mediante uso di TLC su gel di silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ conc. (10:1:0,1). Terminato il riscaldamento, si aggiungono alcuni ml di NaOH 1N fino a pH nettamente basico, si filtra l'idrossido di alluminio formatosi ed il solido filtrato viene lavato per due volte con etere etilico. Le fasi organiche sono riunite, anidificate ed evaporate a secchezza. Il residuo grezzo che si ottiene viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice utilizzando come miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5). Dalle frazioni contenente il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un solido che dopo cristallizzazione e lavaggio con etere etilico pesa 150 mg con p.f. $>245^\circ\text{C}$ (dec). La resa della reazione è pari al 28%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{28}Cl_1N_4$ $[M+H]^+$: 419.19970; trovato: 419.20173.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.50 (s, 1H); 8.37 (d, J = 5.21, 1H); 8.30 (d, J = 9.08, 1H); 7.85 (s, 1H); 7.70 (s, 1H); 7.61-7.42 (m, 3H); 7.18 (t, J = 7.43, 1H); 7.05 (d, J = 7.30, 1H); 6.41 (s, 1H); 5.61 (d, J = 5.21, 1H); 3.55 (s, 2H); 2.01 (s, 3H); 1.10 (s, 9H).

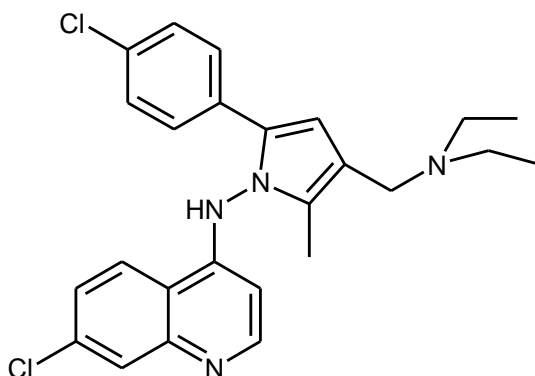
7-Cloro-4-[N-[5-[4-(sostituito)fenil]-3-[(N-sostituito-amino)-metil]-2-metil-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina: metodo generale.



In un pallone a tre colli da 50 ml si aggiungono 25 ml di THF anidro e l'amide che si vuole ridurre (1 mmol). Alla sospensione così ottenuta, scaldata a riflusso in atmosfera d'azoto, si aggiungono in cinque porzioni ripartite in due ore 45,94 mg (0,05 mmol) di tris(trifenilfosfina)rodio carbonil idruro e 3,3 ml (18 mmol) di difenilsilano. terminate le aggiunte la miscela è mantenuta in agitazione per ulteriori tre ore fino alla completa riduzione dell'amide. Dopo aver raffreddato la soluzione, il THF è evaporato e il residuo ripartito tra CH_2Cl_2 e HCl 0,5N. La fase acida viene alcalinizzata con una soluzione di NaOH 30% ed estratta con CH_2Cl_2 .

Le fasi organiche, anidificate e portate a secchezza, generano un residuo grezzo che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice (condizioni di eluizione indicate per ogni singolo composto).

7-Cloro-4-[N-5-(4-clorofenil)-3-[(dietilamino)-metil]-2-metil-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina (18a).



Reagenti:

- 5-(4-Clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)]amino]-2-metil-1H-pirrol-3-(N,N-dietil)carbossiamide: 467,4 mg (1 mmol);
- Difenilsilano: 3,3 ml (18 mmol);
- tris(trifenilfosfina)rodio carbonil idruo: 45,94 mg (0,05 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[N-[5-[4-(sostituito)fenil]-3-[(N-sostituito-amino)-metil]-2-metil-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (96:4). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo cristallizzazione e

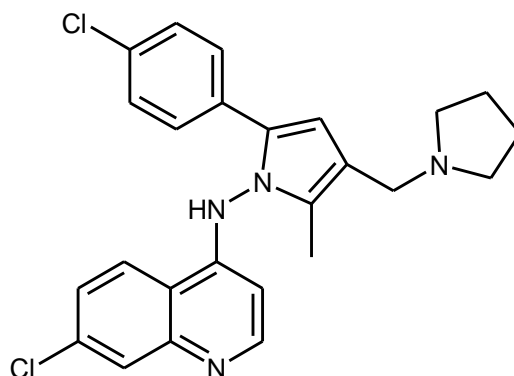
lavaggio con etere etilico pesa 276,6 mg e con p.f. di 215,6-220°C. La reazione presenta una resa del 61%. Una parte del prodotto viene convertito nel sale di cloridrato (p.f.: 185,5-191,8 dec.) per i saggi biologici.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{27}Cl_2N_4 [M+H]^+$: 453.16073; trovato: 453.16154.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6)

δ = 10.60 (s, 1H); 8.39 (d, J = 5.22 Hz, 1H); 8.30 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 7.90 (s, 1H); 7.61 (d, J = 8.80 Hz, 1H); 7.51 (d, J = 7.43 Hz, 2H); 7.21 (d, J = 8.25 Hz, 2H); 6.42 (s, 1H); 5.77 (d, J = 5.22 Hz, 1H); 3.45 (s, 2H); 2.10 (s, 3H); 1.15 (t, J = 6.87 Hz, 6H); quattro protoni sono mancanti probabilmente perchè coperti dal segnale del DMSO.

7-Cloro-4-[N-[5-(4-clorofenil)-2-metil-3-[(pirrolidin-1-il)metil]-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina (18b).



Reagenti:

- [5-(4-clorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)]amino]-2-metil-1H-pirrol-3-il](pirrolidin-1-il)metanone: 465,4 mg (1 mmol);
- Difenilsilano: 3,3 ml (18 mmol);
- tris(trifenilfosfina)rodio carbonil idruo: 45,94 mg (0,05 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[N-[5-[4-(sostituito)fenil]-3-[(N-sostituito-amino)-metil]-2-metil-1H-pirrol-1-il]amino]chinolina.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (96:4). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo cristallizzazione e lavaggio con etere etilico pesa 185,0 mg e con p.f. di 179-182,3°C. La reazione presenta una

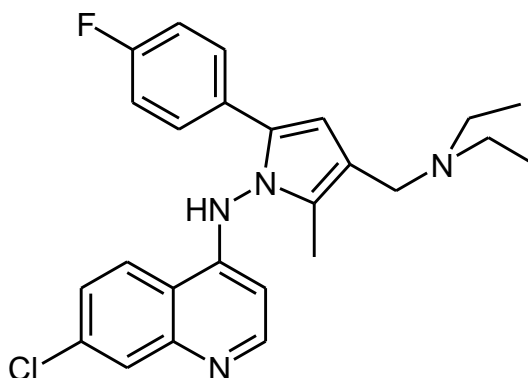
resa del 41%. Una parte del prodotto viene convertito nel sale di cloridrato (p.f.: 207,5-211,7°C dec.) per i saggi biologici.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{25}Cl_2N_4 [M+H]^+$: 451.14508 trovato: 451.14505

1H -N.M.R. (DMSO- d_6)

δ = 10.65 (s, 1H); 8.40 (d, J= 5.22 Hz, 1H); 8.30 (d, J= 9.08 Hz, 1H); 7.90 (s, 1H); 7.65 (d, J= 8.80 Hz, 1H); 7.52 (d, J= 8.25 Hz, 2H); 7.25 (d, J= 8.25 Hz, 2H); 6.45 (s, 1H); 5.60 (d, J= 5.22 Hz, 1H); 3.45 (s, 2H); 3.30 (s, 2H); 2.00 (s, 3H); 1.70 (s, 4H); quattro protoni sono mancanti probabilmente perchè coperti dal segnale del DMSO.

7-Cloro-4-[N-[5-(4-fluorofenil)-3-[(dietilammino)-metil]-2-metil-1H-pirrol-1-il]ammino]chinolina (19a).



Reagenti:

- 5-(4-Fluorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)amino]-2-metil-1H-pirrol-3-(*N,N*-dietil)carbrossiamide: 450,95 mg (1 mmol);
- Difenilsilano: 3,3 ml (18 mmol);
- tris(trifenilfosfina)rodio carbonil idruro: 45,94 mg (0,05 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[N-[5-[4-(sostituito)fenil]-3-[(*N*-sostituito-amino)-metil]-2-metil-1H-pirrol-1-il]ammino]chinolina.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (93,5:6,5). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo ricristallizzazione e

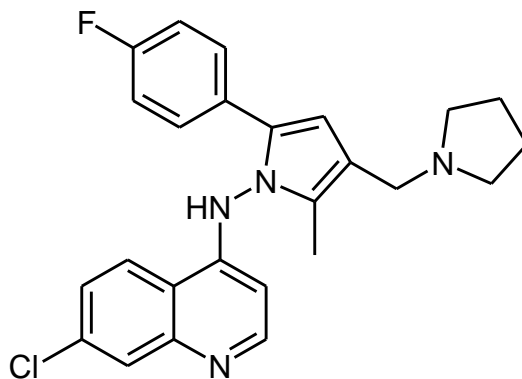
lavaggio con etere etilico pesa 43,7 mg e con p.f. di 225-229°C (dec.). La reazione presenta una resa del 10%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{27}Cl_1F_1N_4$ $[M+H]^+$: 437.19028 trovato: 437.19192

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.62 (s, 1H); 8.39 (d, J = 4.95 Hz, 1H); 8.28 (d, J = 8.80 Hz, 1H); 7.89 (s, 1H); 7.59 (d, J = 8.80 Hz, 1H); 7.53-7.42 (m, 2H); 7.04 (t, J = 8.80 Hz, 2H); 6.36 (s, 1H); 5.59 (d, J = 4.95 Hz, 1H); 3.44 (s, 2H); 2.01 (s, 3H); 1.00 (t, J = 6.60 Hz, 6H); quattro protoni sono mancanti probabilmente perchè coperti dal segnale del DMSO.

7-Cloro-4-[N-[5-(4-fluorofenil)-2-metil-3-[(pirrolidin-1-il)metil]-1H-pirrol-1-il]ammino] chinolina (19b).



Reagenti:

- [5-(4-Fluorofenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-1H-pirrol-3-il](pirrolidinil-1-il)metanone: 448,93 mg (1 mmol);
- Difenilsilano: 3,3 ml (18 mmol);
- tris(trifenilfosfina)rodio carbonil idruro: 45,94 mg (0,05 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[N-[5-[4-(sostituito)fenil]-3-[(N-sostituito-amino)-metil]-2-metil-1H-pirrol-1-il]ammino]chinolina.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (94:6). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo cristallizzazione e

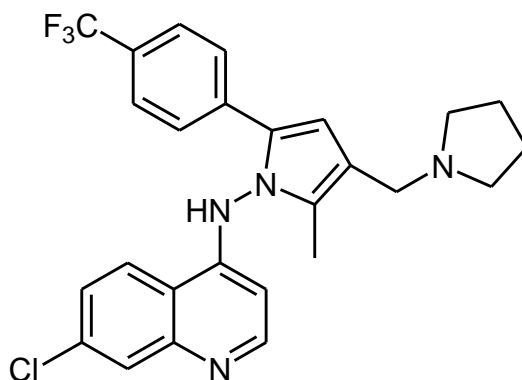
lavaggio con etere etilico pesa 113,1 mg e con p.f. di 170,5-173,5°C. La reazione presenta una resa del 26%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{25}H_{25}N_4FCl$ $[M+H]^+$: 437,17463; trovato: 437,17569.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.60 (s, 1H); 8.40 (d, J = 5.23 Hz, 1H); 8.28 (d, J = 9.07 Hz, 1H); 7.89 (s, 1H); 7.60 (d, J = 9.08 Hz, 1H); 7.53-7.48 (m, 2H); 7.04 (t, J = 9.08 Hz, 1H); 6.36 (s, 1H); 5.59 (d, J = 5.23 Hz, 1H); 3.46 (s, 2H); 2.01 (s, 3H); 1.68 (s, 4H); quattro idrogeni sono mancanti in quanto nascosti dal segnale del DMSO.

7-Cloro-4-[N-[5-(4-(trifluorometil)fenil)-2-metil-3-[(pirrolidin-1-il)metil]-1H-pirrol-1-il]ammino] chinolina (20b).



Reagenti:

- [[5-(4-(trifluorometil)fenil)-1-[(7-clorochinolin-4-il)ammino]-2-metil-1H-pirrol-3-il](pirrolidinil-1-il)metanone: 498,94 mg (1 mmol);
- Difenilsilano: 3,3 ml (18 mmol);
- tris(trifenilfosfina)rodio carbonil idruo: 45,94 mg (0,05 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-4-[N-[5-[4-(sostituito)fenil]-3-[(N-sostituito-amino)-metil]-2-metil-1H-pirrol-1-il]ammino]chinolina.

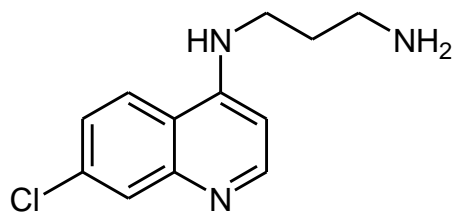
L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1). Il solido viene cristallizzato e lavato con una miscela etere etilico/etere di petrolio (50:50) pesa 97 mg con p.f. di 187,5-190,2°C. La reazione presenta una resa del 20%.

HRMS (ESI) m/z calcd per $C_{26}H_{25}N_4F_3Cl$ $[M+H]^+$: 485,17144; trovato: 485,17221.

1H -N.M.R. (DMSO- d_6):

δ = 10.70 (s, 1H); 8.40 (bs, 1H); 8.32 (d, J = 6.60 Hz, 1H); 7.90 (s, 1H); 7.73 (d, J = 7.98 Hz, 2H); 7.60-7.53 (m, 3H); 6.58 (s, 1H); 5.60 (bs, 1H); 3.47 (s, 2H); 2.02 (s, 3H); 1.68 (s, 4H);
quattro idrogeni sono mancanti in quanto nascosti dal segnale del DMSO.

***N*-(3-Aminopropil)-4-amino-7-clorochinolina (58).**



In un pallone a tre colli da 25 ml si pongono 10 ml (119,8 mmol) di diaminopropano e 2 g (10,1 mmol) di 4,7-diclorochinolina. La soluzione così ottenuta è scaldata a riflusso per 3,5 ore in atmosfera d'azoto e sotto vigorosa agitazione e.m.. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:2:0,2).

Terminato il riscaldamento si pone il pallone di reazione in bagno di ghiaccio e si alcalinizza attentamente la soluzione con NaOH 2N; il solido ottenuto viene filtrato e lavato prima con acqua quindi con abbondante etere etilico.

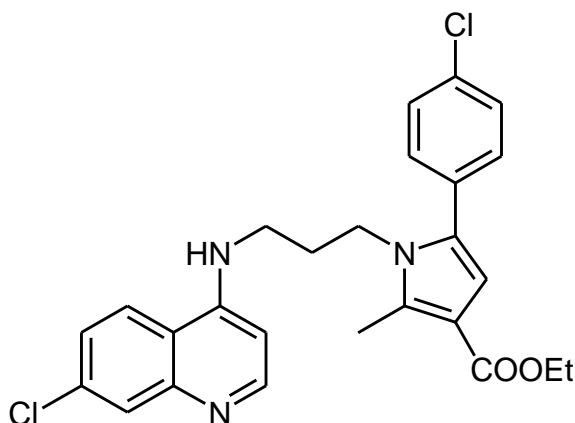
Il solido grezzo viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (da 80:18:2 a 75:22,5:2,5). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo essere stato posto in essiccatore per una intera notte ed essere stato lavato con etere etilico, pesa 1,83 g con p.f. di 80-83°C.

La reazione presenta una resa del 78%.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆):

δ= 8.30 (d, *J*= 5.50 Hz, 1H); 8.12 (d, *J*= 9.07 Hz, 1H); 7.74 (d, *J*= 2.20 Hz, 1H); 7.50 (br s, 1H); 7.38 (dd, *J*= 2.20, 9.08 Hz, 1H); 6.45 (d, *J*= 5.50 Hz, 1H); 3.50-3.00 (m, 4H); 2.57 (t, *J*= 6.88 Hz, 2H); 1.74-1.64 (m, 2H).

5-(4-Clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-2-metil-1*H*-pirrol-3-carbossilato d'etile (59).

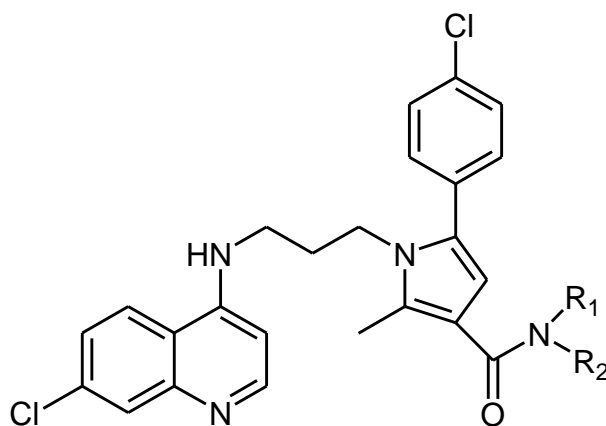


In un palloncino a tre colli munito di refrigerante a ricadere con valvola a CaCl_2 sono posti 9 ml di acido acetico glaciale e 660 mg (2,8 mmol) di *N*-(3-aminopropil)-4-amino-7-clorochinolina. Alla soluzione ottenuta, mantenuta sotto agitazione e.m. ed in atmosfera di azoto, sono aggiunti 520 mg (1,84 mmol) di 2-acetil-4-(4-clorofenil)-4-ossobutanoato d'etile. La miscela viene scaldata a riflusso per tre ore, monitorando la reazione mediante TLC su gel di silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1). Terminato il riscaldamento, si concentra la soluzione sotto vuoto, ottenendo un residuo viscoso che viene diluito in CH_2Cl_2 e lavato con NaOH 2N. Dalle fasi organiche, anidrificate e portate a secchezza, si ottiene un solido grezzo del peso di 840 mg che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98:2). Dalle frazioni contenente il prodotto si ottengono, dopo cristallizzazione con una miscela CH_2Cl_2 /etere etilico e lavaggio con etere etilico, 670 mg di solido bianco con p.f. di 148,5-151,5°C. La reazione presenta una resa del 75,5%.

$^1\text{H-N.M.R.}$ (CDCl_3):

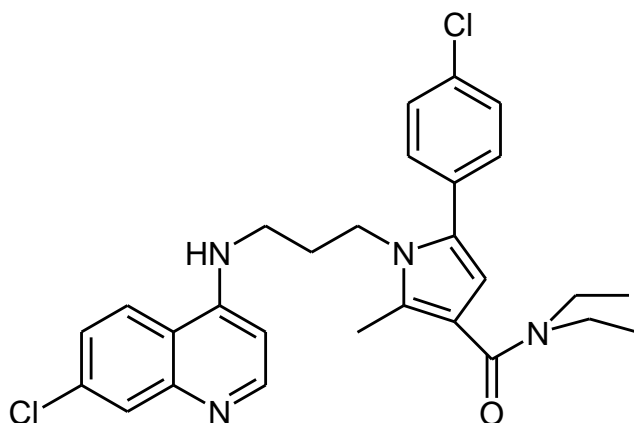
$\delta = 8.40$ (d, $J = 5.50$ Hz, 1H); 7.94 (s, 1H); 7.34 - 7.20 (m, 7H); 6.55 (s, 1H); 6.16 (d, $J = 5.50$ Hz, 1H); 4.27 (q, $J = 6.88$ Hz, 2H); 4.15 (t, $J = 6.60$ Hz, 2H); 3.14 - 3.08 (m, 2H); 2.62 (s, 3H); 1.98 - 1.90 (m, 2H); 1.34 (t, $J = 6.88$ Hz, 3H).

5-(4-Clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-*N,N*-(sostituito)-2-metil-1*H*-pirrol-3-carbossiamide: metodo generale.



In una provetta per microonde vengono posti 3 ml di toluene anidro. Dopo aver raffreddato con un bagno di ghiaccio, vengono aggiunti, attraverso un tappo forabile, l'ammina prescelta (1,5 mmol) e dopo qualche minuto, lentamente, una soluzione 2M di $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ in eptano (1,5 mmol). La soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti e successivamente viene introdotto il 5-(4-clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-2-metil-1*H*-pirrol-3-carbossilato d'etile (1 mmol). La provetta viene poi chiusa con l'apposito tappo e posta nel sintetizzatore a microonde dove viene scaldata a 150°C per 35 minuti. La miscela di reazione viene trasferita in una beuta e ripresa prima con acetato di etile e poi con una soluzione di NaOH diluita. Il precipitato bianco viene filtrato e lavato con abbondante acetato d'etile. Le fasi organiche sono riunite, anidrificate ed evaporate a secchezza, generando un residuo grezzo che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice (condizioni di eluizione indicate per ogni singolo composto).

5-(4-Clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-*N,N*-dietil-2-metil-1*H*-pirrol-3-carbossiamide (60a).



Reagenti:

- 5-(4-Clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-2-metil-1*H*-pirrol-3-carbossilato d'etile: 482,41 mg (1 mmol);
- Dietilamina: 0,16 ml (1,5 mmol);
- Trimetilalluminio 2N in Eptano: 0,75 ml (1,5 mmol);

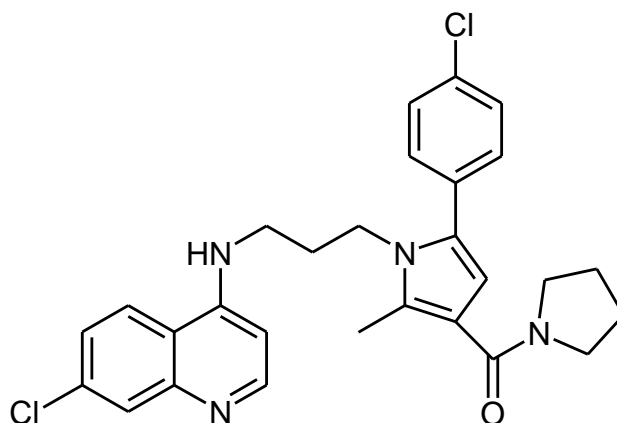
La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 5-(4-clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-*N,N*-(sostituito)-2-metil-1*H*-pirrol-3-carbossiamide.

L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10:1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂/MeOH (97:3). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo lavaggio con etere etilico pesa 433 mg con p.f. di 176,5-177,5°C. La resa della reazione è pari al 85%.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆):

δ= 8.33 (d, *J*= 5.23 Hz, 1H); 8,08 (d, *J*= 9.35 Hz, 1H); 7.76 (d, *J*= 1.92 Hz, 1H); 7.39 (dd, *J*= 1.93, 9.08 Hz, 1H); 7.25 (d, *J*= 8.53 Hz, 2H); 7.20-7.03 (m, 3H); 6.23 (d, *J*= 5.50 Hz, 1H); 6.08 (s, 1H); 4.10-4.00 (m, 2H); 3.32 (q, *J*= 6.90 Hz, 4H); 3.10-3.00 (m, 2H); 2.25 (s, 3H); 1.95-1.75 (m, 2H); 1.05 (t, *J*= 6.90 Hz, 6H).

[5-(4-Clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-2-metil-1H-pirrol-3-il](pirrolidin-1-il)metanone (60b).



Reagenti:

- 5-(4-Clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-2-metil-1H-pirrol-3-carbossilato d'etile: 482,41 mg (1 mmol);
- Pirrolidina: 0,13 ml (1,5 mmol);
- Trimetilalluminio 2N in Eptano: 0,75 ml (1,5 mmol);

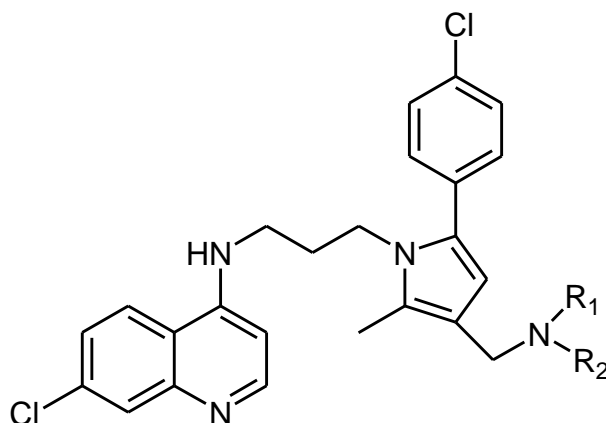
La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per il 5-(4-clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-*N,N*-(sostituito)-2-metil-1H-pirrol-3-carbossiamide. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10:1). Durante la reazione si forma una sospensione che viene filtrata. Il solido ottenuto risulta essere una porzione di prodotto e viene riunito alla frazione ottenuta alla fine della procedura. Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela di CH₂Cl₂/MeOH (96:4). Dalle frazioni

contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo lavaggio con etere etilico pesa 396 mg con p.f. di 253,7-237,0°C. La resa della reazione è pari al 78%.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆):

δ= 8.33 (d, *J*= 5.22 Hz, 1H); 8.08 (d, *J*= 9.07 Hz, 1H); 7.42 (d, *J*= 2.20 Hz, 1H); 7.40 (dd, *J*= 2.20, 9.07 Hz, 1H); 7.25 (d, *J*= 8,53 Hz, 2H); 7.17 (br s, 1H); 7.09 (d, *J*= 8.52 Hz, 2H); 6.28 (s, 1H); 6.24 (d, *J*= 5.50 Hz, 1H); 4.04 (t, *J*= 7.15 Hz, 2H); 3.60-3.30 (m, 4H); 3.15-3.00 (m, 2H); 2.38 (s, 2H); 1.77 (s, 4H).

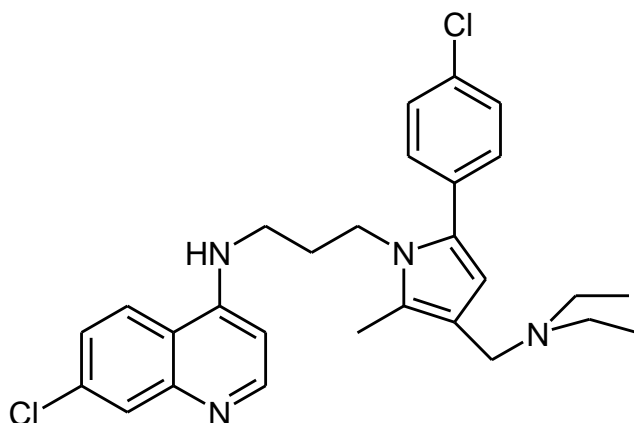
7-Cloro-N-[3-[5-(4-clorofenil)-3-[(N-sostituito-amino)metil]-2-metil-1H-pirrol-1-il)propil]chinolin-4-amina: metodo generale.



In un pallone a tre colli da 50 ml si aggiungono 25 ml di THF anidro e l'amide che si vuole ridurre (1 mmol). Alla sospensione così ottenuta, scaldata a riflusso in atmosfera d'azoto, si aggiungono in cinque porzioni ripartite in due ore 45,94 mg (0,05 mmol) di tris(trifenilfosfina)rodio carbonil idruro e 3,3 ml (18 mmol) di difenilsilano. terminate le aggiunte la miscela è mantenuta in agitazione per ulteriori tre ore fino alla completa riduzione dell'amide. Dopo aver raffreddato la soluzione, il THF è evaporato e il residuo ripartito tra CH_2Cl_2 e HCl 0,2 N. La fase acida viene alcalinizzata con una soluzione di NaOH 30% ed estratta con CH_2Cl_2 .

Le fasi organiche, anidificate e portate a secchezza, generano un residuo grezzo che viene purificato mediante flash cromatografia su gel di silice (condizioni di eluizione indicate per ogni singolo composto).

7-Cloro-*N*-[3-[5-(4-Clorofenil)-3-[(diethylamino)metil]-2-metil-1*H*-pirrol-1-il]propil]chinolin-4-amina (21a).



Reagenti:

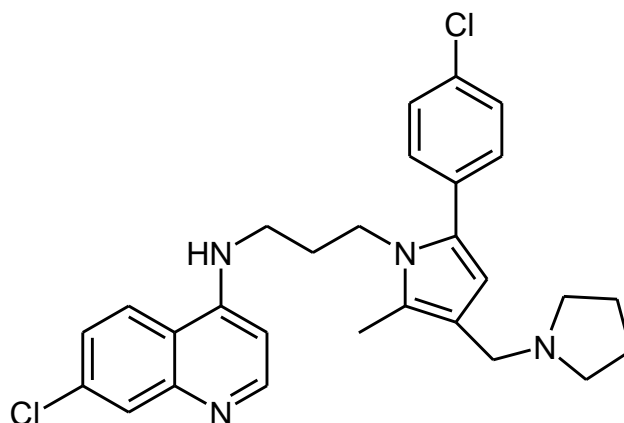
- 5-(4-Clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-*N,N*-dietil-2-metil-1*H*-pirrol-3-carbossiamide: 509,48 mg (1 mmol);
- Difenilsilano: 3,3 ml (18 mmol);
- tris(trifenilfosfina)rodio carbonil idruo: 45,94 mg (0,05 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-*N*-[3-[5-(4-clorofenil)-3-[(*N*-sostituito-amino)metil]-2-metil-1*H*-pirrol-1-il]propil]chinolin-4-amina. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (93,5:6,5). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo ricristallizzazione e lavaggio con etere etilico pesa 173,4 mg e con p.f. di 99,3-101,2°C. La reazione presenta una resa del 35%.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆):

δ= 8.32 (d, *J*=5.22 Hz, 1H); 8.08 (d, *J*= 9.07 Hz, 1H); 7.76 (d, *J*= 2.20 Hz, 1H); 7.39 (dd, *J*= 2.20, 9.07 Hz, 1H); 7.22 (d, *J*= 8.26 Hz, 2H); 7.15 (br s, 1H); 7.08 (d, *J*= 8.25 Hz, 2H); 6.20 (d, *J*= 5.50 Hz, 1H); 5.97 (s, 1H); 4.03 (t, *J*= 7.43 Hz, 2H); 3.30 (s, 2H); 3.10-2.95 (m, 2H); 2.39 (q, *J*= 6.88 Hz, 4H); 2.18 (s, 3H); 1.81 (t, *J*= 6.61 Hz, 2H); 0.92 (t, *J*= 6.88 Hz, 6H).

7-Cloro-*N*-[3-[5-(4-clorofenil)-2-metil-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1*H*-pirrol-1-il]propil]chinolin-4-amina (21b).



Reagenti:

- [5-(4-Clorofenil)-1-[3-(7-clorochinolin-4-ilamino)propil]-2-metil-1*H*-pirrol-3-il](pirrolidin-1-il)metanone: 507,47 mg (1 mmol);
- Difenilsilano: 3,3 ml (18 mmol);
- tris(trifenilfosfina)rodio carbonil idruo: 45,94 mg (0,05 mmol).

La reazione viene eseguita in accordo con lo schema di reazione generale precedentemente proposto per la 7-cloro-*N*-[3-[5-(4-clorofenil)-3-[(*N*-sostituito-amino)metil]-2-metil-1*H*-pirrol-1-il]propil]chinolin-4-amina. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC su silice, miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ conc. (10:1:0,1). Il solido grezzo ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (X:Y). Dalle frazioni contenenti il prodotto, evaporate a secchezza, si ottiene un residuo solido che dopo ricristallizzazione e lavaggio con etere etilico pesa 187,5 mg e con p.f. di 156,9-158,5°C. La reazione presenta una resa del 38%.

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆):

δ= 8.32 (d, J=5.22 Hz, 1H); 8.08 (d, J= 9.07 Hz, 1H); 7.76 (s, 1H); 7.40 (d, J= 9.07 Hz, 1H);
7.22 (d, J= 8.26 Hz, 2H); 7.13 (br s, 1H); 7.08 (d, J= 8.25 Hz, 2H); 6.21 (d, J= 5.50 Hz, 1H);
5.97 (s, 1H); 4.10-3.90 (m, 2H); 3.33 (s, 2H); 3.10-2.95 (m, 2H); 2.37 (s, 4H); 2.18 (s, 3H);
1.90-1.75 (m, 2H); 1.61 (s, 4H).

Tabella 7: caratteristiche dei nuovi derivati della 4-amminochinolina preparati.

Composto	Formula Bruta	PM (g/mol)	P.f.	Solvente di crystall. o di lavaggio.	Resa %
12	C ₁₉ H ₂₄ ClN ₃	330	171,3-173,8°C	Et ₂ O	17,4
13	C ₁₉ H ₂₄ ClN ₃	330	147,5-151,2 °C	Et ₂ O/CH ₂ Cl ₂	10
14a	C ₂₆ H ₃₁ OCIN ₄	451	135,7-137,3°C	Et ₂ O	32
14b	C ₂₄ H ₂₇ OCIN ₄	423	109-120,5°C	/	6
14c	C ₂₅ H ₂₉ OCIN ₄	437	204-206,7°C	Et ₂ O/CH ₂ Cl ₂	38
15a	C ₂₆ H ₃₀ Cl ₂ N ₄	469	140,3-142,4°C	Et ₂ O	79
16a	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₄	357	> 240°C con dec.	Et ₂ O/Et. Petrolio	64
16b	C ₂₀ H ₂₃ ClN ₄	355	164-166°C	EtOH/Et ₂ O	64
16c	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₄	357	103,5-107,5°C	Et ₂ O/Cicloesano	27
16d	C ₂₄ H ₃₀ ClN ₅	424	92-97°C (dec.)	Et ₂ O	23
16e	C ₂₆ H ₃₄ ClN ₅	452	188-191°C	Et ₂ O	35
17a	C ₂₅ H ₂₇ ClN ₄	419	156,5-160°C (dec.)	Et ₂ O/Et. Petrolio	66
17b	C ₂₅ H ₂₅ ClN ₄	417	172,5-176°C	Et ₂ O	51
17c	C ₂₅ H ₂₇ ClN ₄	419	>245°C	Et ₂ O	28
17e	C ₃₁ H ₃₆ ClN ₅	514	93,5°C (dec.)	Et. Petrolio	32
17f	C ₃₂ H ₃₈ ClN ₅	528	104-107°C (dec.)	Et. Petrolio	23
18a	C ₂₅ H ₂₆ Cl ₂ N ₄	453	215,6-220°C	Et ₂ O	61
18b	C ₂₅ H ₂₄ Cl ₂ N ₄	451	179-182,3°C	Et ₂ O	41
19a	C ₂₅ H ₂₆ ClFN ₄	436	225-229°C (dec.)	Et ₂ O	10
19b	C ₂₅ H ₂₄ ClFN ₄	435	170,5°-173,5°C.	Et ₂ O	26
20b	C ₂₆ H ₂₄ ClF ₃ N ₄	485	187,5-190,2°C	Et ₂ O/Et. Petrolio	20
21a	C ₂₈ H ₃₂ ClN ₄	495	99,3-101,2°C	Et ₂ O	35
21b	C ₂₈ H ₃₀ ClN ₄	493	156,9-158,5	Et ₂ O	38

Saggi farmacologici

Gli studi sull'attività antimalarica *in vitro* dei composti preparati sono stati eseguiti presso il laboratorio della Prof.ssa Donatella Taramelli del Dipartimento di Microbiologia dell'Università degli Studi di Milano.

Gli studi sull'attività antimalarica *in vivo* sono stati eseguiti presso la London School of Hygiene and Tropical Medicine.

Plasmodi e condizioni di coltura.

Nel corso dei nostri studi sono stati utilizzati tre differenti ceppi di *Plasmodium falciparum*, adattati a crescere in vitro: D10, clorochino sensibile (CQ-S), W2, clorochino-resistente (CQ-R) e Pf, ceppo selvaggio clorochino-resistente (CQ-R) isolato a Milano da un paziente colpito da malaria. I plasmodi sono stati coltivati in continuo, secondo il metodo di Trager e Jesen⁷⁶, utilizzando eritrociti umani A⁺ (gentilmente donati del Centro Trasfusionali dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano). Questi sono stati diluiti al 5% di ematocrito in terreno di coltura RPMI 1640 (GIBCO) addizionato con tampone HEPES 20mM, NaHCO₃ 24 mM, l-glutamina 2 mM, e 10% di plasma umano inattivato a 56°C. La coltura è stata mantenuta in fiasche di polistirene (COSTAR) in atmosfera all' 1% di O₂, 5% CO₂ e 94% di N₂. Per la normale crescita in coltura di *P. falciparum*, la parassitemia è stata mantenuta tra l'1% e il 5%.

La riduzione della parassitemia è stata effettuata diluendo un'aliquota di una precedente coltura in una sospensione fresca di eritrociti. La percentuale di parassitemia nelle colture di *P. falciparum* è stata valutata mediante l'esame dello striscio di sangue. I vetrini sono stati fissati con metanolo e colorati con una soluzione di GIEMSA (Merck) al 20% per venti minuti, per essere osservati con un obiettivo ad inversione a 100x. Con tale colorazione il citoplasma del parassita risulta azzurro, mentre la cromatina si presenta rossa. La parassitemia è stata determinata contando il numero in percentuale di globuli rossi parassitati rispetto al numero totale di globuli rossi (per ogni osservazione sono stati valutati almeno cinque campi ottici).

Saggio di inibizione della crescita dei plasmodi con antimalarici.

I saggi di sensibilità ai farmaci sono stati condotti utilizzando una sospensione di plasmodio con parassitemia compresa tra l'1,5% ed il 2% e con ematocrito all' 1% finale. I farmaci sono preparati alla concentrazione iniziale opportuna e dispensati in triplicato. Dieci diluizioni seriali 1:2 sono state fatte direttamente in piastra (# 3596 COSTAR) a novantasei pozzetti con fondo piatto, in un volume di 100 µl. Ai farmaci sono stati aggiunti 100 µl di sospensione di globuli rossi parassitati, precedentemente preparati; un appropriato controllo di globuli rossi non parassitato (controllo negativo) e un altro di globuli rossi parassitati in assenza di farmaco (controllo positivo) sono stati preparati per ogni piastra.

Le piastre sono state poi incubate per 72 ore a 37°C in un atmosfera contenente l'1% di O₂, il 5% di CO₂ e il 94% di N₂. La crescita dei parassiti è stata poi quantificata mediante la valutazione della lattato deidrogenasi del parassita (pLDH).⁷⁷

Il test permette di quantificare la crescita di *P. falciparum* grazie alla possibilità di distinguere l'attività della lattato deidrogenasi del parassita (pLDH), rispetto a quella dei globuli rossi umani. La lattato deidrogenasi del parassita è infatti in grado di utilizzare più velocemente la 3-acetilpiridin adenina dinucleotide (APAD), un analogo della adenina nicotinamide dinucleotide, come coenzima nella reazione che porta alla formazione di piruvato dal lattato.

Nei globuli rossi umani questa reazione in presenza della APAD avviene con una cinetica molto più lenta. Per lo sviluppo del test si è utilizzato il reagente MALSTAT[®] (Sigma) costituito da una soluzione in acqua distillata di acido lattico (Sigma) 130,2 mM, APAD (Sigma) 0,62 mM, Tris Buffer [tri(idrossimetil)aminometano] (Sigma) 34 mM, e Triton X-100 (polioxoetilene-10-isooctilcicloesil etere) (Sigma) 0,12%. La soluzione è stata portata da pH molto basico a pH 9 con HCl.

La soluzione NBT/PES è costituita da NBT (nitroblue tetrazolium) (Sigma) 1,96 mM e PES (fenazina etosolfato) (Sigma) 0,24 mM, in acqua. Dopo 72 ore di incubazione dei plasmodi in presenza di farmaci, i globuli rossi depositati sul fondo del pozzetto vengono risospesi e 20 µl trasferiti in una nuova piastra contenente 100 µl di MALSTAT[®] (Sigma) e 25 µl di NBT/PES. Le piastre sono quindi lette allo spettrofotometro (Molecular Devices) a 650 nm.

Per ogni concentrazione di farmaco è stata calcolata la percentuale di inibizione della crescita rispetto ai controlli e quindi la concentrazione di farmaco che provoca il 50% di inibizione della crescita (IC₅₀).

Saggio di Citotossicità.

La linea cellulare di endotelio microvascolare umano (HMEC-1), immortalizzata dall'antigene T grande di SV 40⁷⁸, è stata gentilmente donata dal Dr. Francisco J. Candal, Center for Disease Control, Atlanta, GA, USA.

Le cellule HMEC-1 sono state mantenute nel medium di cultura MCDB 131 (Invitrogen, Milano, Italia), al quale sono stati aggiunti il 10% di siero fetale bovino (HyClone, Logan, UT, USA), 10 ng/ml di fattore di crescita epidermico (PreproTech, Rocky Hill, NY, USA), 1 µg/ml di idrocortisone, 2 mM glutamina, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina e 20mM tampone Hepes (EuroClone, Pero, Italia).

Le cellule HDF di fibroblastoma dermale umano sono state mantenute in DMEM (EuroClone, Pero, Italia), al quale sono stati aggiunti il 10% di siero fetale bovino (HyClone, Logan, UT, USA), 2mM glutamina, 100 U/ml di penicillina and 100 µg/ml di streptomicina.

Le cellule K562 di eritroleucemia umana e le cellule WEHI Clone 13 di fibrosarcoma murino sono state cresciute in DMEM o RPMI 1640, rispettivamente, addizionati con 2 mM glutamina, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina e 10% di siero fetale bovino.

A meno di una diversa indicazione, tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Italia, Milano, Italia.

Per i saggi di citotossicità, le cellule sono state trattate con diluizioni seriali dei composti in esame e la proliferazione cellulare valutata attraverso il saggio con MTT, che misura la capacità delle cellule vive di ridurre i sali di tetrazolio in cristalli di formazano.⁷⁹

Le cellule sono state piastrate alla concentrazione di 10⁴ per pozzetto in piastre a 96 pozzetti. Le piastre sono state incubate per 72 ore a 37°C in un atmosfera contenente il 5% di CO₂, in presenza o meno dei composti da saggiare, quindi sono stati aggiunti 20 µL di una soluzione 5

mg/ml di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolo bromuro (MTT) (M-2128 Sigma) in PBS per un tempo addizionale di 3 ore, sempre a 37°C.

Al termine dell'incubazione, le piastre sono state centrifugate, il surnatante eliminato ed i cristalli blu di formazano sciolti usando 100 µL di soluzione lisante costituita da 20 % p/v di SDS (Sigma), 40 % di DMF (Merck) in acqua a pH 4,7 regolato con acido acetico all'80%.

I pozzetti sono stati quindi letti con un lettore di micropozzetti (Molecular Devices Co., Menlo Park, CA, USA) ad una lunghezza d'onda di 550 nm, utilizzando come riferimento il valore letto ad una lunghezza d'onda di 650 nm.

I risultati sono stati espressi come IC₅₀, pari alla concentrazione di composto necessaria per inibire la crescita cellulare del 50%.

Tutti i saggi sono stati eseguiti in triplicato per un minimo di tre volte.

Test di Peter.

I composti sono stati sciolti in una sospensione standard (SSV) costituita da 0,5 % di sodio carbossimetilcellulosa, 0,5 % di alcool benzilico, 0,4 % di Tween e 0,9% di NaCl.

I topi sono stati infettati per via endovenosa con 4×10^6 globuli rossi appartenenti ad un topo donatore. Il trattamento per via orale è stato effettuato somministrando 0,2 ml della soluzione dei composti da testare: 2, 24 , 48, 72 h dopo l'infezione. La parassitemia è stata determinata tramite esame microscopico dello striscio di sangue prelevato il quarto giorno dopo l'infezione ed i vetrini sono stati fissati e colorati con una soluzione di GIEMSA.

I risultati sono stati espressi come percentuale di inibizione ed ED₅₀.

Bibliografia

1. Carter, R.; Mendis, K. N. Evolutionary and historical aspects of the burden of Malaria. *Clin. Microbiol. Rev* **2002**, *15*(4), 564-94.
2. Parasite and Health, Malaria, www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Malaria.htm
3. Ekvall, H. Malaria and anemia. *Curr Opin. Hematol.* **2003**, *10*, 108-114.
4. Boutlis, C. S.; Weinberg, J. B.; Baker, J. *et al.* Nitric oxide production and nitric oxide synthase activity in malaria-exposed Papua New Guinean children and adults show longitudinal stability and no association with parasitemia. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 6932-6938.
5. Lyke, K. E.; Burges, R.; Cissoko Y.; *et al.* Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12 (p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy control. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 5630-5637.
6. Hay, S. I.; Guerra, C. A.; Tatem, A. J.; Noor, A. M.; Snow, R. W. *The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Lancet Infect. Dis.* **2004**, *4*, 327-336.
7. Snow, R. W.; Guerra, C. A.; Noor, A. M.; Myint, H. Y.; Hay, S. I. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature*, **2005**, *434*, 214-217.
8. Roll Back Malaria, Economic costs of malaria. www.Rbm.who.int.
9. Mayxay, M.; Khanthavong, M.; Lindegardh, N. *et al.* Randomized comparison of chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine versus artesunate plus mefloquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in the Lao People's Democratic Republic. *Clin. Infect. Dis.*, **2004**, *39*, 1139-1147.
10. Piola, P.; Fogg, C.; Bajunirwe, F. *et al.* Supervised versus unsupervised intake of six-dose artemether-lumefantrine for the treatment of acute, uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Mbarara, Uganda: a randomised trial. *Lancet*, **2005**, *365*, 1467-1473.
11. Mutabingwa, T.; Anthony, D.; Heller A. *et al.* Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children : a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet*, **2005**, *365*, 1474-1480.

12. Omari, A. A.; Preston, C.; Garner, P. Artemether-lumefantrine for treating uncomplicated falciparum malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2003**, 2, CD003125.
13. Adjui, M.; Agnamey, P.; Babiker, A. *et al.* Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in African children: randomised, multicentre trial. *Lancet*, **2002**, 359, 1365-1372.
14. Obonyo, C.O.; Ochieng, F.; Taylor, W. R. *et al.* Artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated malaria in Kenyan children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2003**, 97, 585-591.
15. Tran, T. H.; Dolecek, C.; Pham, P. M. *et al.* Dihydroartemisinin-piperaquine against multidrug-resistant P. falciparum malaria in Vietnam: Randomised clinical trial. *Lancet*, **2004**, 363, 18-22.
16. Wongsrichanalai, C; Meshnick, S. R. Declining Artesunate-Mefloquine efficacy against Falciparum Malaria on the Cambodia-Thailand Border. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, 14, 716-719.
17. Afonso, A.; Hunt, P.; Cheesman, S.; Alves, A. C.; Cunha, C. V.; do Rosario, V.; Cravo, P.; Malaria parasite can develop stable resistance to Artemisinin but Lack mutations in candidate genes atp6 (Encoding the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase), tctp, mdr1 and cg10. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 480-489.
18. O'Neill, P. M.; Posner, G. H. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related peroxides. *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 2945-2964.
19. Tang, Y.; Dong, Y.; Vermestrom, J. L. Synthetic peroxide as antimalarials. *Med. Res. Rev.*, **2004**, 24, 425-448.
20. O'Neill, P.M.; Ward, S. A.; Berry, N. G.; Jeyadevan, J. P.; Biagini, G. A.; Asadollaly, E.; Park, B. K.; Bray, P. G. A medicinal chemistry perspective on 4-Aminoquinoline Antimalarial Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2006**, 6, 479-507.
21. Kumar, A.; Katiyar, S. B.; Agarwal, A.; Chauhan, P. M. S. Perspectives in antimalarial chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, **2003**, 10, 1137-1150.
22. Sahu, N. K.; Sahu, S.; Kohli, D. V. Novel Molecular Targets Drug Development. *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, 71, 287-297.
23. Rawat, D. S.; Lumb, V.; Sharma, Y. D.; Pasha, S. T.; Sing, G. Histone as Future Drug Target for Malaria. *J. Commun. Dis.* **2007**, 39, 119-28.
24. Jefford, C. W. New Developments in Synthetic Peroxidic Drugs as Artemisinin Mimic. *Drug Discovery Today*, **2007**, Jun; 12 (11-12), 487-495.

25. Egan, T. J. *Structure-function relationships in chloroquine and related 4-aminoquinoline antimalarials. Min. Rev. Med. Chem.*, **2001**, *1*, 113-123.
26. Egan, T. J. Haemozoin formation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *157*, 127-136.
27. Egan, T. J. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1288-1299.
28. Ward, S.A.; Bray, P.G.; Ritchie, G.Y. Chloroquine transport in the malarial parasite *Plasmodium Falciparum*, in N.M. Georgopapadakon (Ed.), *Drug transport in antimicrobial and anticancer chemotherapy. Dekker, New York*, **1995**; p. 353-376.
29. Henry, M.; Alibert, S.; Rogier, C.; Barbe, J.; Pradines, B. Inhibition of Efflux of Quinolines as New Therapeutic Strategy in Malaria. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 563-578.
30. Carlton, J. M.; Fidock, D. A.; Dijmde, A.; Plowe, C.V.; Wellem, T. E. Conservation of a novel vacuolar transporter in *Plasmodium* species and its central role in chloroquine resistance in *P. Falciparum*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2001**, *4*, 415-420.
31. Ursos, L. M. B.; Roepe, P.D. Chloroquine resistance in the malarial parasite *P. Falciparum*. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 465-491.
32. Ridley, R. G.; Hofheinz, W.; Matile, H.; Jaquet, C.; Dorn, A.; Masciadri, R.; Jolidon S. *et al.* 4-aminoquinoline analog of chloroquine with shortened side-chain retain activity against chloroquine-resistant *P. falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, *40*, 1846-1854.
33. Hofheinz, W.; Jaquet, C.; Jolidon, S. Aminochinolin-derivate mit einer Wirksamkeit gegen Malaria erreg. *Eur. Patent. Appl.*, June **1995**.
34. De, D.; Krogstad, F. M.; Byers, L. D.; Krogstad, D. J. Structure-Activity Relationships for Antiplasmodial Activity among 7-Substituted 4-Aminoquinolines. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4918-4926.
35. Stocks, P. A.; Raynes, K. J.; Bray, P. G.; Park, B. K.; O'Neill, P.M.; Ward, C.A. Novel short chain chloroquine resistant K1 *P. falciparum*. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 4975-4983.
36. Darham, B. G. 7-chloro-4-(1-ethylpiperidylamino)quinoline. *USP 2485162*, **1949**. *Chem. Abstr.*, **1950**, *44*, 4045.
37. Singh, T.; Stein, R. G.; Koelling, H. H.; Hoops, J. F.; Biel, J. H. Antimalarial. Some quinuclidine derivatives of 7-chloro-4-aminoquinoline and 6-methoxy-8-aminoquinoline. *J. Med. Chem.*, **1969**, *12*, 524-526.

38. Natarajan, J. K.; Alumasa, J. N.; Yearick, K.; Ekoue-Kovi, K. A.; Casabianca, L. B.; de Dios, A. C.; Wolf, C.; Roepe, P. D. 4-N-, 4-S-, and 4-O-chloroquine analogues: influence of side chain length and quinolyl nitrogen pKa on activity vs chloroquine resistant malaria. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3466–3479.
39. Egan, T. J.; Hunter, R.; Kashula, C. H.; Marques, H.; Misplon, A.; Wolder, J. Structure-function relationships in 4-aminoquinoline. Effect of amino- and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of β -hematin formation and antiplasmodial activity. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 283-291.
40. Kashula, C. H.; Egan, T. J.; Hunter, R.; Basilico, N.; Parapini, S.; Taramelli, D.; Pasini, E.; Monti, D. Structure-activity relationships in 4-aminoquinoline antiplasmodial. The role of the group at the 7-position. *J. Med. Chem.*, **2000**, *45*, 3531-3539.
41. Yearick, K.; Ekoue-Kovi, K.; Iwaniuk, D. P.; Natarajan, J. K.; Alumasa, J.; de Dios, A. C.; Roepe, P. D.; Wolf, C. Overcoming Drug Resistance to Heme-Targeted Antimalarials by Systematic Side Chain Variation of 7-Chloro-4-aminoquinolines. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1995-1998.
42. Salomon, V. R.; Haq, W.; Srivastava, K.; Puri, S. K.; Katti, S. B. Synthesis and Antimalarial Activity of Side Chain Modified 4-Aminoquinoline Derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 394-398.
43. Cheruku, S. R.; Maiti, S.; Dorn, A.; Scorneaux, B.; Bhattacharjee, A. K.; Ellis, W. Y.; Vennerstrom, J. L. Carbon isosteres of the 4-aminopyridine substructure of chloroquine: effects on pK(a), hematin binding, inhibition of hemozoin formation, and parasite growth. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3166–3169.
44. Kiechel, J. R.; Pecoul, B. ASAQ, a breakthrough in the fight against malaria. *Med. Trop.* **2007**, *67*, 109-110.
45. Werbel, L. M.; Cook, P. D.; Eslager, E. F.; Hung, J. H. ; Johnson, J. L. ; Kenston, S. L. ; Mc Namara, D. J.; Ortwine, D. F. ; Worth, D. F. Syntesis, antimalarial activity and quantitative structure-activity relationships of tebuquine and a series of related 5-[7-(chloro-4-quinolinyl)amino]-3-[(alkylamino)methyl][1,1'-biphenyl]-2-ols and N. omega-oxides. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 924-939.
46. O'Neill, P. M.; Willock, D. J.; Hawley, S. R.; Bray, P. G.; Starr, R. C.; Ward, S. A.; Park, B. K. Syntesis, antimalarial activity and molecular modelling of tebuquine analogues. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 437-448.
47. Raynes, K. J.; Stocks, P. A.; O'Neill, P. M.; Park, B. K.; Ward, S. A. New 4-aminoquinoline Mannich base antimalarials: Effect of an alkyl substituent in the 5'-position of the 4'-hydroxyanilino side chain. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 2747-2751.

48. O'Neill, P. M.; Mukhtar, A.; Stocks, P. A.; Randle, L. E.; Hindley, S.; Ward, S. A.; Storr, R. C.; Bickley, J. F.; O'Neill, I. A.; Maggs, J. L.; Hughes, R. H.; Winstanley, P. A.; Bray, P. G.; Park, B. K. Isoquine and related amodiaquine analogues: a new generation of improved 4-aminoquinoline antimalarials. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 4933-4945.
49. Lawrence, R. M.; Dennis, K. C.; O'Neill, P. M.; Hahn, D. U.; Roeder, M.; Struppe, C. Development of a Scalable Synthetic Route to GSK369796 (N-tert-Butyl Isoquine), a Novel 4-Aminoquinoline Antimalarial Drug. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 294-297.
50. Sparatore, A.; Basilico, N.; Casagrande, M.; Parapini, S.; Taramelli, D.; Brun, R.; Wittlin, S.; Sparatore, F. Antimalarial activity of novel pyrrolizidinyl derivatives of 4-aminoquinoline. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3737-3740.
51. O'Neill, P.M.; Harrison, A. C.; Storr, R. C.; Hawley, S. R.; Ward, S. A.; Park, B. K. The Effect of Fluorine Substitution on the Metabolism and Antimalarial Activity of Amodiaquine. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1362-1370.
52. Cunico, W.; Cechinel, C. A.; Bonacorso, H. G.; Martius, M. A. P.; Zanatta, N.; De Souza, M. V. N.; Tretas, I. O.; Soares, R. P. P.; Krettei, A. K. Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl)-chloroquine analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 649-653.
53. Claxton, G. P.; Allen, L.; Grisar, J. M. 2,3,4,5-Tetrahydropyridine trimer. *Organic Syntheses, Coll. Vol. 6*, p.968 (**1988**); *Vol. 56*, p.118 (**1977**).
54. Schopf, C.; Braun, F.; Koop, H.; Werner, G. Liebigs. Ammodendrin, Orensine und N-Benzoyl- Δ^2 -tetrahydroanabasin aus Isotripiperidein. *Ann. Chem.* **1962**, *658*, 156.
55. Wanner, M. J.; Koomen, G. Evolution-Based Synthesis of Racemic Alkaloids. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5581-5586.
56. The synthesis of (S)-Lac-34hydrochloride from chiral starting material; *WO 2006/036936*.
57. Morley C.; Knight, D. W.; Share, A. C. Complementary enantioselective approaches to the quinolizidine alkaloids lupinine and epilupinine by enolate Claisen rearrangements or direct allylation of piperidin-2-ylacetic acid derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1994**, 2903 - 2907.
58. Sparatore, F.; Boido, V.; Preziosi, P.; Mule, E.; De Natale, G. Sintesi e proprietà farmacodinamiche di alcuni derivati lupinatici. *Farmaco Ed. Sci.* **1969**, *24*, 587-621.
59. Couch, J. F. Lupine studies. VIII. The alkaloids of *Lupinus Palmeri*, S. Wats. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 2434-2436.

60. O'Neill, P. M.; Mukhtar, A.; Stocks, P. A.; Randle, L. E.; Hindley, S.; Ward, S. A.; Storr, R. C.; Bickley, J. F.; O'Neill, I. A.; Maggs, J. L.; Hughes, R. H.; Winstanley, P. A.; Bray, P. G.; Park, B. K. Isoquine and related amodiaquine analogues: a new generation of improved 4-aminoquinoline antimalarials. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 4933-4945.
61. Barlin, G. B.; Ireland, S. J.; Nguyen, T. M. T.; Kotecka, B.; Rieckmann, K. H. Potential Antimalarials. XVIII. Some Mono- and Di-Mannich Bases of 3-[7-Chloro(and trifluoromethyl)quinolin-4-ylamino]phenol. *Aust. J. Chem.* **1993**, *46*, 1685-1693.
62. Glennon, R. A.; Dukat, M.; El Bermawy, M.; Law, H.; De Los Angeles, J.; Teitler, M.; King, A.; Herrich-Davis, K. Influence of amine substituents on 5-HT_{2A} versus 5-HT_{2C} binding of phenylalkyl- and indolylalkylamines. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1929-1935.
63. Smaill, J. B.; Rewcastle, G. W.; Loo, J. A.; Greis, K. D.; Chan, O. H.; Reyner, E. L.; Lipka, E.; Howalter, H. D. H.; Vincent, P. W.; Elliott, W. L.; Denny, W. A. Tyrosine kinase inhibitors. 17. Irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor: 4-(phenylamino)quinazoline- and 4-(phenylamino)pyrido[3,2-d]pyrimidine-6-acrylamides bearing additional solubilizing functions. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1380-1397.
64. Clark, R. D.; Nelson, J. T.; Repke, D. B. Stereospecific synthesis of the (3 α ,11 α ,12 α)-decahydrobenzo[a]pyrrolo[3,2-g]quinolizine ring system. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *30*, 829-831.
65. Basha, A.; Lipton, M.; Weinreb, S. M. A mild, general method for conversion of esters to amides. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *48*, 4171-4174.
66. Gerona-Navarro, G.; Bonache, M. A.; Alias, M.; Perez de Vega, M. J. *et al.* Simple access to novel azetidione-containing conformationally restricted amino acids by chemoselective reduction of β -lactams. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2193-2196.
67. Kuwano, R.; Takahoshi, M.; Jto, Y. Reduction of amides to amines via catalytic hydrosilylation by a rhodium complex. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1017-1020.
68. Scalzo, M.; Porretta, G. C.; Chimenti, F.; Casanova, M. C. Compounds with antibacterial and antifungal activity. Part IV. Synthesis and microbiological activity of new 1,5-diarylpyrrole derivatives. *Farmaco, Ed. Sci.* **1988**, *43*, 665-676.
69. Bijev, A.; Yaneva, D.; Bocheva, A.; Stoev, G. Ligand-based design, synthesis and primary in vivo screening of pyrrole derivatives as potential tricyclic anti-inflammatory agents. *Arzneimittel Forschung* **2006**, *56*, 753-759.
70. Goerdeler, J.; Lindner, C. *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 2499.

71. Oka, M.; Baba, K.; Nakamura, K.; Dong, L.; Hamajima, H.; Unno, R.; Matsumoto, Y. Synthesis of 1-Azabicyclic Systems by Double Cyclization. *J. Heterocycl. Chem.* **2003**, *40*, 177-180.
72. Oka, M.; Baba, K.; Suzuki, T.; Matsumoto, Y. The Novel Preparation Methods of 5-Substituted Methyl-1-azabicyclo-[3.3.0]octane. *Heterocycles* **1997**, *45*, 2317-2320.
73. Suzuki, T.; Usui, T.; Oka, M.; Suzuki, T.; Kataoka, T. Synthesis and muscarinic activity of a series of quinolines and naphthalenes with a 1-azabicyclo[3.3.0]octane moiety. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1265-1273.
74. Boido, V.; Boido, A.; Boido-Canu, C.; Sparatore, F. Quinolozidinylalkylamines with antihypertensive activity. *Farmaco, Ed. Sci.* **1979**, *34*, 673-687.
75. Sparatore, A.; Basilico, N.; Parapini, S.; Romeo, S.; Novelli, F.; Sparatore, F.; Taramelli, D. 4-Aminoquinoline quinolizidinyl- and quinolizidinylalkyl-derivatives with antimalarial activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5338-5345.
76. Trager W.; Jensen J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **1976**, *193*, 673-675.
77. Makler, M. T.; Hinrichs, D. J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am. J. Trop. Hyg.* **1993**, *48* (2), 205-210.
78. Ades, E. W.; Candal, F. J.; Swerlick, R. A.; George, V. G.; Summers, S.; Bosse, D. C.; Lawley, T. J. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *99*, 683-690.
79. D'Alessandro, S.; Gelati, M.; Basilico, N.; Parati, E. A.; Haynes, R. K.; Taramelli, D. Differential effects on angiogenesis of two antimalarial compounds, dihydroartemisinin and artemisone: implications for embryotoxicity. *Toxicology* **2007**, *241*, 66-74.