



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

FACOLTA' DI FARMACIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXI

SINTESI E STUDIO DI POLIETEROCICLI AZOTATI AD ATTIVITA' ANTITUMORALE

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Ch.mo Prof. Adriana Chilin

Dottorando: Giovanni Marzaro

INDICE

1.	RIASSUNTO	pag 1
2.	ABSTRACT	pag 3
3.	INTRODUZIONE.....	pag 5
	3.1. LE TIROSINCHINASI DI MEMBRANA.....	pag6
	3.1.1. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR).....	pag 8
	3.1.2. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTORS (VEGFR)	pag 8
	3.1.3. STRATEGIE PER L'INIBIZIONE DI EGFR E VEGFR-2	pag 10
	3.2. STRATEGIE DI SINTESI DI DERIVATI 4- ANILINOCHINAZOLINICI	pag 15
	3.3. GENERALITA' SULLE RETI COMPLESSE	pag 17
4.	OBIETTIVO.....	pag 21
5.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	pag 23
	5.1. NUOVA STRATEGIA PER LA SINTESI DI DERIVATI 4-ANILINOCHINAZOLINICI.....	pag 23
	3.1.1. PREPARAZIONE DI SCAFFOLD CHINAZOLINICI: STUDIO DEL MECCANISMO DI REAZIONE.....	pag 24
	3.1.2. PREPARAZIONE DI SCAFFOLD CHINAZOLINICI: EFFETTO DELLE MICROONDE.....	pag 34
	3.1.3. NUOVA STRATEGIA PER L'OTTENIMENTO DI DERIVATI 4- ANILINOCHINAZOLINICI: SINTESI DI PD153035.....	pag 38

5.2.	SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DI EGFR	pag 43
5.2.1.	SINTESI DI DERIVATI 6,7-ETILENDIOSSICHINAZOLINICI	pag 44
5.2.2.	SINTESI DI DERIVATI 6,7-METILENDIOSSICHINAZOLINICI.....	pag 48
5.2.3.	SINTESI DI DERIVATI 6,7-(1',3'-PROPILENDIOSSI)CHINAZOLINICI	pag 50
5.2.4.	TENTATIVO DI SINTESI DI DERIVATI 6,7-bis(2'-N,N-DIMETILAMMINO-ETOSI)CHINAZOLINICI	pag 52
5.2.5.	SINTESI DI DERIVATI BENZO[h]CHINAZOLINICI	pag 54
5.2.6.	TENTATIVO DI SINTESI DI DERIVATI BEZO[f]CHINAZOLINICI	pag 56
5.3.	VALUTAZIONE BIOLOGICA	pag 59
5.3.1.	EFFETTO CITOTOSSICO DEI COMPOSTI SINTETIZZATI.....	pag 60
5.3.2.	DETERMINAZIONE DELLA REVERSIBILITA' DELL'INIBIZIONE DELLA CRESCITA CELLULARE.....	pag 62
5.3.3.	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PRO-APOPTOTICO IN VITRO	pag 63
5.3.4.	EFFETTO SULLA CRESCITA CELLULARE STIMOLATA DA EGF.....	pag 64
5.3.5.	EFFETTO SULL'ATTIVITA' TIROSINCHINASICA.....	pag 66
5.4.	APPROCCIO CN-QSAR PER LO STUDIO DI INIBITORI TIROSINCHINASICI.....	pag 67
5.4.1.	GENERAZIONE DEI MODELLI DI CLASSIFICAZIONE QSAR.....	pag 67
5.4.2.	GENERAZIONE DELLE RETI COMPLESSE (CN).....	pag 72
5.4.3.	CONFRONTO FRA CN.....	pag 75
5.4.4.	VALIDAZIONE DELLA PCN _{5.0µM}	pag 77
6.	PARTE SPERIMENTALE	pag 79
6.1.	SINTESI DI DERIVATI CHINAZOLINICI	pag 79
6.1.1.	MATERIALI	pag 79

6.1.2.	STRUMENTAZIONE	pag 79
6.1.3.	METODI	pag 80
6.1.3.1.	SINTESI DI 6-METILCHINAZOLINA	pag 80
6.1.3.2.	SINTESI DI ETIL CARBAMMATI DI ANILINE COMMERCIALI	pag 85
6.1.3.3.	SINTESI DI CHINAZOLINE DA ETIL CARBAMMATI DI ANILINE COMMERCIALI	pag 94
6.1.3.4.	SINTESI DI PD153035.....	pag 104
6.1.3.5.	SINTESI DI NUOVI DERIVATI 4-ANILINOCHINAZOLINICI	pag 111
6.2.	GENERAZIONE DI MODELLI CN-QSAR.....	pag 175
6.2.1.	MATERIALI E STRUMENTI.....	pag 175
6.2.2.	COSTRUZIONE DEI MODELLI QSAR.....	pag 176
6.2.2.1.	CALCOLO DEI DESCRITTORI MOLECOLARI.....	pag 176
6.2.2.2.	GENERAZIONE DEI MODELLI DI CLASSIFICAZIONE QSAR	pag 177
6.2.3.	COSTRUZIONE DELLE RETI COMPLESSE.....	pag 181
6.2.3.1.	COSTRUZIONE DELLA RETE COMPLESSA REALE (OBSERVED COMPLEX NETWORK, OCN)	pag 181
6.2.3.2.	COSTRUZIONE DELLE RETI COMPLESSE PREDETTE (PREDICTED COMPLEX NETWORKs, PCN _{cut-off})	pag 182
6.2.3.3.	COMPARAZIONE DI OCN E PCN _{cut-off}	pag 183
6.2.3.4.	COSTRUZIONE DI RETI COMPLESSE ALEATORIE (RANDOM COMPLEX NETWORKs, RCN).....	pag 185
7.	APPENDICI	pag 187
7.1.	SPETTRI ¹ H-NMR DI DERIVATI 4-ANILINOCHINAZOLINICI	pag 187
7.2.	SINTESI ORGANICA ASSISTITA DA MICROONDE	pag 197
7.2.1.	MODALITA' DI AZIONE DELLE MICROONDE.....	pag 199
7.2.2.	TIPOLOGIE DI REATTORI A MICROONDE.....	pag 203

7.3.	APPLICAZIONI DELLA SINTESI ASSISTITA DA MICROONDE: N-ALCHILAZIONE DI ANILINE	pag 205
7.3.1.	METODICA GENERALE DI SINTESI E DATI SPETTROSCOPICI	pag 212
8.	PUBBLICAZIONI E PROCEEDINGS	pag 217
8.1.	PUBBLICAZIONI	pag 217
8.2.	PROCEEDINGS	pag 218
9.	BIBLIOGRAFIA.....	pag 221

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.	<i>Struttura generale dei composti sintetizzati.</i>	pag 2
Figura 2.	<i>Struttura generale dei derivati progettati ma non sintetizzati.</i>	pag 2
Figura 3.	<i>Rappresentazione schematica di una RTK.</i>	pag 6
Figura 4.	<i>Meccanismo di attivazione di una RTK.</i>	pag 7
Figura 5.	<i>Schematizzazione delle strategie di inibizione di RTK.</i>	pag 10
Figura 6.	<i>Meccanismi di resistenza all'inibizione delle RTK.</i>	pag 11
Figura 7.	<i>Strutture di inibitori 4-anilinochinazolinici, selettivi per EGFR.</i>	pag 12
Figura 8.	<i>Punti di interazione fra Erlotinib ed EGFR (a sinistra) e struttura di Erlotinib (a destra).</i>	pag 13
Figura 9.	<i>Schematizzazione dei risultati dello studio 3D-QSAR.</i>	pag 13
Figura 10.	<i>Struttura di Vandetanib.</i>	pag 14
Figura 11.	<i>Esempi di farmaci a struttura chinazolinica.</i>	pag 15
Figura 12.	<i>Esempio di CN (a sinistra) per la rappresentazione dell'anilina (a destra).</i>	pag 18
Figura 13.	<i>Struttura generale dei composti progettati</i>	pag 22
Figura 14.	<i>Possibili alternative per l'ottenimento dell'intermedio chinazolinico.</i>	pag 23
Figura 15.	<i>Meccanismo di formazione dell'intermedio N-carbamoil-diidrochinazolinico.</i>	pag 26
Figura 16.	<i>Possibili strutture per l'intermedio N-carbamoil-diidrochinazolinico.</i>	pag 26
Figura 17.	<i>Spettro ¹H-NMR NOESY di etile (6-metil-2H-chinazolin-1-il)carbammato.</i>	pag 27
Figura 18.	<i>Possibili geometrie di condensazione per carbammati meta sostituiti ed effetto dell'ingombro sterico del sostituito.</i>	pag 33
Figura 19.	<i>Reversibilità dell'effetto antiproliferativo.</i>	pag 62
Figura 20.	<i>Valutazione dell'effetto pro-apoptotico.</i>	pag 63
Figura 21.	<i>Effetto sulla crescita cellulare stimolata da EGF.</i>	pag 65
Figura 22.	<i>Effetto sull'attività tirosinchinasica</i>	pag 66.
Figura 23.	<i>Scaffold dei diversi inibitori delle TK saggiati solo contro una TK</i>	pag 68
Figura 24.	<i>Scaffold dei diversi inibitori delle TK saggiati contro un ristretto pannello di TK</i>	pag 68
Figura 25.	<i>Scaffold dei diversi inibitori delle TK saggiati contro un vasto pannello di TK</i>	pag 69

Figura 26.	Approccio TOPS-MODE per il calcolo dei descrittori molecolari.	pag 70
Figura 27.	Approccio per la costruzione delle CN.	pag 73
Figura 28.	Esempio di superficie per la valutazione della variabile S.	pag 75
Figura 29.	Crava ROC ottenuta dalla sovrapposizione fra OCN e PCN _{5,0µM}	pag 77
Figura 30.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.	pag 187
Figura 31	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.	pag 187
Figura 32.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato.	pag 187
Figura 33.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato.	pag 188
Figura 34.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato.	pag 188
Figura 35.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato.	pag 188
Figura 36.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonammidofenil)ammina cloridrato.	pag 189
Figura 37.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina cloridrato.	pag 189
Figura 38.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina.	pag 189
Figura 39.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina.	pag 190
Figura 40.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.	pag 190
Figura 41.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato.	pag 190
Figura 42.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato.	pag 191
Figura 43.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato.	pag 191
Figura 44.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato.	pag 191
Figura 45.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonammidofenil)ammina cloridrato.	pag 192
Figura 46.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina cloridrato.	pag 192
Figura 47.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina.	pag 192
Figura 48.	Spettro ¹ H-NMR di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina.	pag 193

Figura 49.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.	pag 193
Figura 50.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-metilfenil)ammina cloridrato.	pag 193
Figura 51.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-trifluorometilfenil)-ammina cloridrato.	pag 194
Figura 52.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-cloro-4'-fluoro-fenil)ammina cloridrato.	pag 194
Figura 53.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(4'-bromo-2'-fluoro-fenil)ammina cloridrato.	pag 194
Figura 54.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(m-bifenil)ammina cloridrato.	pag 195
Figura 55.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.	pag 195
Figura 56.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato.	pag 195
Figura 57.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato.	pag 196
Figura 58.	Spettro elettromagnetico.	pag 197
Figura 59.	Confronto fra il riscaldamento in-situ dovuto alle microonde (a sinistra) e il metodo di riscaldamento classico (a destra).	pag 198
Figura 60.	Schematizzazione di un'onda elettromagnetica.	pag 199
Figura 61.	Variatione del valore della costante dielettrica in funzione della temperatura per alcuni dei principali solventi utilizzati nella sintesi organica.	pag 201
Figura 62.	Effetto del riscaldamento MW sulla costante cinetica di reazione.	pag 202
Figura 63.	A sinistra: reattore monomodale self-tuning. A destra: sistema toroidale utilizzato per focalizzare le MW direttamente nel campione, presente al centro dello strumento.	pag 203
Figura 64.	Esempi di farmaci contenenti una porzione N,N-dialchilamminoalchilamminica (evidenziata in rosso).	pag 209

INDICE DEGLI SCHEMI

Schema 1.	<i>Analisi retrosintetica per l'ottenimento di derivati 4-anilinochinazolinici.....</i>	<i>pag 16</i>
Schema 2.	<i>Sintesi del nucleo chinazolinonico secondo la reazione di Niementowsky.....</i>	<i>pag 17</i>
Schema 3.	<i>Sintesi di 6-metilchinazolina.....</i>	<i>pag 25</i>
Schema 4.	<i>Prodotti di reazione ottenibili da 4-metilacetanilide.....</i>	<i>pag 29</i>
Schema 5.	<i>Formazione e struttura del derivato formammidinico, ottenibile per trattamento della diidrochinazolina in ambiente acido.....</i>	<i>pag 30</i>
Schema 6.	<i>Sintesi di chinazoline.....</i>	<i>pag 31</i>
Schema 7.	<i>Meccanismo di ossidazione e clorurazione del nucleo chinazolinico.....</i>	<i>pag 38</i>
Schema 8.	<i>Sintesi di PD153035.....</i>	<i>pag 39</i>
Schema 9.	<i>Sintesi di PD153035 riportata in letteratura.....</i>	<i>pag 41</i>
Schema 10.	<i>Strategia di sintesi per l'ottenimento dei composti progettati.....</i>	<i>pag 44</i>
Schema 11.	<i>Sintesi di derivati etilendiossichinazolinici.....</i>	<i>pag 45</i>
Schema 12.	<i>Sintesi di 3-fenilanilina.....</i>	<i>pag 46</i>
Schema 13.	<i>Tentativo di sintesi di 2-ammino-5-bromotiofene.....</i>	<i>pag 47</i>
Schema 14.	<i>Sintesi di derivati 6,7-metilendiossichinazolinici.....</i>	<i>pag 48</i>
Schema 15.	<i>Sintesi di derivati 6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolinici.....</i>	<i>pag 51</i>
Schema 16.	<i>Tentativo di sintesi di derivati bis(dimetilammioetossi)chinazolinici.....</i>	<i>pag 52</i>
Schema 17.	<i>Sintesi di derivati benzo[h]chinazolinici.....</i>	<i>pag 54</i>
Schema 18.	<i>Tentativo di sintesi di derivati benzo[f]chinazolinici.....</i>	<i>pag 56</i>
Schema 19.	<i>Reazione fra chinazoline e reattivi di Grignard (in alto) e prodotto ottenuto dalla reazione con 2-butilmagnesiobromuro.....</i>	<i>pag 57</i>
Schema 20.	<i>Strategie per l'ottenimento di N-alchilaniline.....</i>	<i>pag 205</i>

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.	<i>Carbammati di partenza, chinazoline ottenute e relative rese per la valutazione dell'estendibilità del protocollo di sintesi.....</i>	<i>pag 32</i>
Tabella 2.	<i>Ottimizzazione della reazione di formazione dell'intermedio 3.....</i>	<i>pag 35</i>
Tabella 3.	<i>Ottimizzazione della reazione di formazione del composto 5.....</i>	<i>pag 36</i>
Tabella 4.	<i>Confronto fra le rese di ottenimento di derivati chinazolinici mediante tecnica classica e mediante il protocollo "misto" MAOS-riflusso.....</i>	<i>pag 37</i>
Tabella 5.	<i>Struttura e numero di identificazione dei composti sintetizzati.....</i>	<i>pag 59</i>
Tabella 6.	<i>Valori di citotossicità (μM) misurata per i composti saggati e per lo standard di riferimento.....</i>	<i>pag 60</i>
Tabella 7.	<i>Confronto fra OCN, PCN e relative RCN.....</i>	<i>pag 78</i>
Tabella 8.	<i>Simboli e descrizioni dei descrittori molecolari calcolati.....</i>	<i>pag 176</i>
Tabella 9.	<i>Confronto fra i valori di costante dielettrica e di dielettric loss per alcuni dei principali solventi utilizzati nella sintesi organica.....</i>	<i>pag 200</i>
Tabella 10.	<i>Ottimizzazione della reazione fra 4-metilnilina e benzilcloruro.....</i>	<i>pag 206</i>
Tabella 11.	<i>Effetto di basi e catalizzatori sul decorso della reazione.....</i>	<i>pag 207</i>
Tabella 12.	<i>Alchilazione di 4-metilnilina con alogenuri alchilici.....</i>	<i>pag 208</i>
Tabella 13.	<i>Alchilazione di ammine aromatiche con 2-cloro-N,N-dimetiletilammina cloridrato.....</i>	<i>pag 210</i>
Tabella 14.	<i>Alchilazione di fenilendiammine e ammino fenoli con 2-cloro-N,N-dimetiletilammina cloridrato.....</i>	<i>pag 211</i>
Tabella 15.	<i>Dati spettroscopici relativi ai derivati alchilati ottenuti.....</i>	<i>pag 212</i>

ABBREVIAZIONI

AcOH	Acido acetico
Ac ₂ O	Anidride acetica
BINAP	2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftolo
CAN	Cerio ammonio nitrato
C	Classification (Classificazione)
CA	Corrected Activity (Attività corretta)
CE	Cicloesano
CN	Complex networks (Reti Complesse)
DCE	Dicloroetano
DEP	Drug Enzyme Pair (coppia farmaco – enzima)
DMF	Dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
ESI-TOF	Electrospray Ionization – Time of Flight (Ionizzazione Elettrospray – Tempo di Volo)
EtOAc	Etile acetato
EtOH	Etanolo
HMTA	Hexamethylenetetramine (Urotropina)
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione)
LDA	Linear Discriminant Analysis (Analisi Discriminante Lineare)
MAOS	Microwave Assisted Organic Synthesis (Sintesi Organica Assistita da Microonde)
MeOH	Metanolo
MW	Microonde
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Risonanza Magnetica Nucleare)
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement

NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OCN	Observed Complex Network (Rete Complessa Osservata)
ORCN	Observed Random Complex Network (Rete Complessa Aleatoria basata sulla Rete Osservata)
OTV	Observed Treshold Value (Valore Soglia per la Rete Complessa Osservata)
Pact	Probabilità di attività
PCN	Predicted Complex Network (Rete Complessa Predetta)
PDEP	Pair of Drug Enzyme Pair (Coppie di Coppie Farmaco – Enzima)
Pinact	Probabilità di inattività
PRCN	Predicted Random Complex Network (Rete Complessa Aleatoria basata sulla Rete Predetta)
PTV	Predicted Treshold Value (Valore Soglia per la Rete Complessa Predetta)
ⁱ PrOH	Isopropanolo
QSAR	Quantitative Structure – Activity Relationship (Relazioni Quantitative Struttura – Attività)
RCN	Random Complex Networks (Reti Complesse Aleatorie)
RTK	Receptor Tyrosine Kinase (Tirosinchinasi Recettoriali)
S	Suitability
SD	Standard Deviation (Deviazione Standard)
TA	Temperatura ambiente
TEA	Trietilamina
THF	Tetraidrofurano
TK	Tyrosine Kinases (Tirosinchinasi)
TKI	Tyrosine kinase inhibitors (Inibitori delle Tirosinchinasi)
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografia su Strato Sottile)
TFA	Acido trifluoroacetico
TMS	Tetrametilsilano
TV	Treshold Value (Valore Soglia)

d	doppietto
dd	doppietto di doppietti
dt	doppietto di tripletti
<i>i</i>	numero di TKI considerati
<i>k</i>	passo di calcolo
<i>m</i>	numero di casi considerati
m	multipletto
p.f.	punto di fusione
q	quartetto
quint	quintetto
s	singoletto
s all	singoletto allargato
t	tripletto

1. RIASSUNTO

Nell'ambito della ricerca di nuovi composti ad attività antitumorale, una particolare importanza è rivestita dalla classe degli inibitori dei recettori tirosinchinasici, enzimi chiave nella regolazione della progressione del ciclo cellulare. Questi enzimi di membrana, a seguito del legame con specifici fattori di crescita, attivano i meccanismi di crescita cellulare e arresto dell'apoptosi: una loro deregolazione o iperespressione è spesso collegata all'insorgenza di patologie tumorali. Fra i diversi inibitori ATP-mimetici, un ruolo chiave è rivestito dai farmaci a struttura 4-anilinochinazolinica, in quanto composti in grado di interagire in particolare con EGFR e VEGFR-2, due importanti recettori tirosinchinasici.

In questo lavoro si è quindi deciso di prendere in considerazione diversi aspetti riguardanti l'individuazione e la sintesi di nuovi composti a potenziale attività antiproliferativa. In una prima parte della tesi è stata messa a punto una nuova e vantaggiosa strategia per la sintesi di composti 4-anilinochinazolinici, basata sulla preparazione come intermedio chiave di un adeguato derivato chinazolinico. L'efficienza della nuova strategia di sintesi è stata validata mediante la sintesi di un noto inibitore di EGFR e confrontando la resa complessiva ottenuta con quella riportata in letteratura. Quindi, partendo dai dati disponibili in letteratura e dalla struttura di inibitori noti dei recettori tirosinchinasici sono state sintetizzate quattro diverse classi di potenziali agenti antiproliferativi (Figura 1). È stata tentata la sintesi anche di altre due classi di derivati, senza tuttavia riuscire a ottenere i composti progettati (Figura 2).

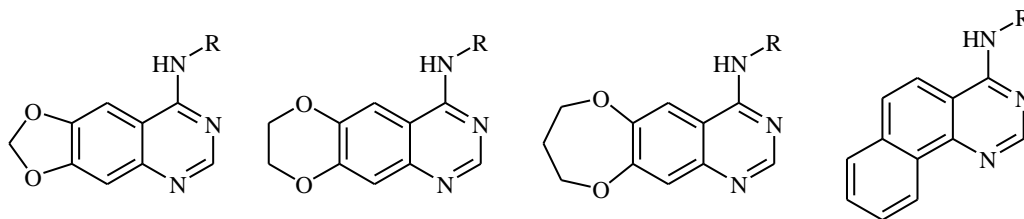


Figura 1. Struttura generale dei composti sintetizzati.

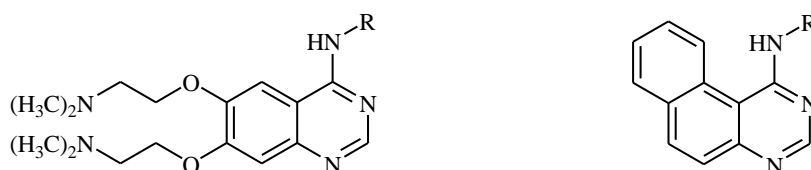


Figura 2. Struttura generale dei derivati progettati ma non sintetizzati.

L'attività antiproliferativa dei derivati ottenuti è stata valutata nei confronti di due diverse linee cellulari (A431 e NIH3T3) in grado rispettivamente di sovraesprimere e non esprimere EGFR.

L'ultima parte del lavoro ha invece riguardato la messa a punto di un approccio computazionale per lo studio del complesso sistema costituito dalle diverse tirosinchinasi e i relativi inibitori. In particolare, è stata valutata la possibilità di utilizzare l'output di modelli di classificazione multi-target QSAR per la generazione di reti complesse per lo studio delle interazioni quali-quantitative fra inibitori e targets.

2. ABSTRACT

Receptor tyrosine kinases inhibitors play an essential role in the research of new molecules with anticancer activity. This type of enzymes is fundamental in the cell cycle progression. As a consequence of the binding with specific growth factors, they activate cellular growth mechanisms and stop apoptosis: their deregulation or over-expression is often related to the tumor onset. Among several ATP-mimetic inhibitors, 4-anilinoquinazoline derivatives play a crucial role, being able to interact with EGFR and VEGFR-2, two important tyrosine kinases. In this work several aspects regarding the identification and the synthesis of novel compounds with potential anti-proliferative activity are presented. In the first part of this thesis an innovative and useful strategy for the synthesis of 4-anilinoquinazoline derivatives has been performed, based on the preparation of quinazolines as key intermediates. The efficiency of this novel approach has been evaluated synthesizing a known EGFR inhibitor and comparing the obtained yield with that reported in literature. Then, starting from literature data and from known tyrosine kinases inhibitors, four different classes of anti-proliferative compounds have been synthesized (Figure 1). The synthesis of other two classes of derivatives has been attempted without obtaining the designed compounds (Figure 2).

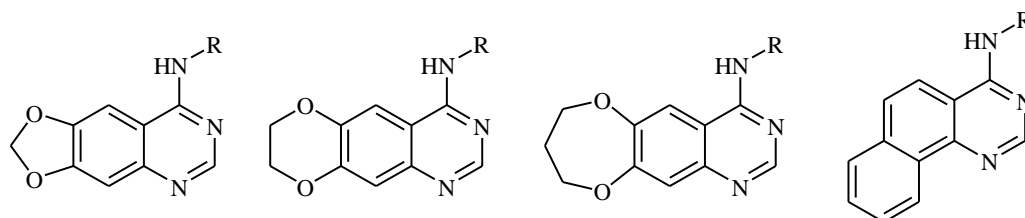


Figure 1. General structures of synthesized compounds.

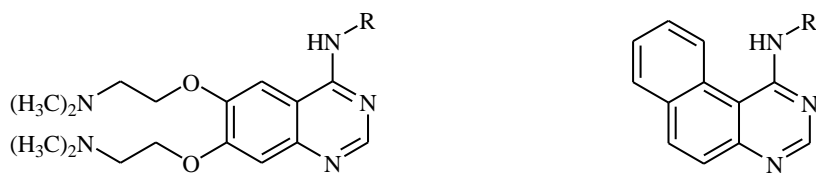


Figure 2. Structures of designed but not synthesized compounds.

Anti-proliferative activity of the synthesized compounds has been evaluated against two different cell lines (A431 and NIH3T3) which over-express and not express EGFR respectively.

In the last part of the work, the development of a computational approach to study the complex system constituted by several tyrosine kinases and relative inhibitors was reported. In particular the feasibility of using the multi-target classification QSAR models outputs for the generation of complex networks with qualitative and quantitative information has been evaluated.

3. INTRODUZIONE

La patologia tumorale non costituisce, attualmente, la principale causa di morte nel mondo. Tuttavia le notevoli risorse che l'industria farmaceutica investe nel campo della ricerca di nuovi agenti antitumorali è una chiara indicazione di quale sia la ricaduta in termini socio-economici di tale malattia. Dalla scoperta dei primi agenti antiproliferativi (le mostarde azotate¹) fino ad oggi, la comunità scientifica ha individuato un numero sempre crescente di potenziali target per la terapia anticancro; parallelamente, l'avanzamento delle conoscenze biologiche, chimiche e funzionali alla base dello sviluppo di malattie neoplastiche, ha permesso l'individuazioni di composti sempre più specifici, sia di sintesi che di origine naturale, da utilizzare in terapia. D'altro canto, molto lavoro è ancora da fare per poter individuare farmaci a bassa tossicità e in grado di resistere ai fenomeni di resistenza che le cellule tumorali sviluppano nel corso delle terapie.

Attualmente, infatti, la maggior parte delle strategie anticancro utilizza farmaci non selettivi nei confronti delle cellule cancerose, portando sia alla regressione della massa tumorale che alla distruzione dei tessuti sani, con forti ricadute fisiche sul paziente².

Fra i target più interessanti per lo sviluppo di farmaci antitumorali si annoverano le chinasi, un'ampia famiglia di proteine di membrana con la funzione di trasferire un gruppo fosfato dall'ATP o dal GTP a substrati proteici contenenti specifici residui amminoacidici come serina, treonina e tirosina; pertanto, a seconda dell'amminoacido fosforilato, le proteinchinasi vengono classificate in serin-treoninchinasi o tirosinchinasi³. Le chinasi utilizzano questo processo di fosforilazione per attivare la via di trasduzione del segnale intracellulare: quando una proteinchinasi viene fosforilata, a sua volta essa fosforila un'altra chinasi e così via, fino a generare una cascata di reazioni che portano all'amplificazione del segnale iniziale, allo scopo di mettere le cellule nelle condizioni di adattarsi alle modificazioni dell'ambiente circostante e quindi di sopravvivere. Non sorprende, quindi come una sovraespressione o una deregolazione di questi enzimi possa essere causa di malattie iperproliferative, come appunto il cancro.

Fra le diverse classi di chinasi, negli ultimi anni particolare attenzione è stata posta nei confronti delle tirosinchinasi.

3.1. LE TIROSINCHINASI DI MEMBRANA⁴

Le tirosinchinasi (TK) sono delle proteine ad attività chinastica con la peculiarità di fosforilare residui tirosinici nelle catene proteiche di specifici substrati. Tali enzimi possono a loro volta venir divisi in due classi, le TK citoplasmatiche (fra cui ricordiamo c-src, lck e c-abl) e le TK di membrana (o Recettoriali, RTK, fra cui ricordiamo EGFR, VEGFR-2 e PDGFR).

I recettori tirosinchinasici (Figura 3) possiedono un dominio extracellulare dove è presente il sito di legame per il ligando, un dominio transmembrana, e un dominio intracellulare ad attività chinastica che si può dividere in due porzioni: un dominio catalitico con i siti di legame per l'ATP e per il substrato e una porzione carbossi-terminale, dove sono presenti i residui tirosinici per l'autofosforilazione.

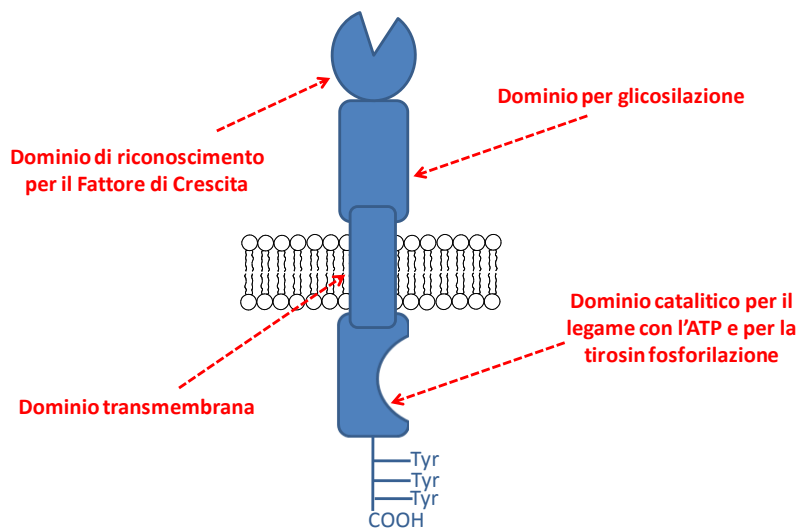


Figura 3. Rappresentazione schematica di una RTK.

I ligandi naturali per le RTKs vengono anche definiti fattori di crescita, in quanto a seguito del loro legame con il dominio recettoriale extracellulare viene attivata una cascata di segnali che portano la cellula alla proliferazione. In particolare, la loro azione si esplica consentendo il passaggio della cellula dalla fase G0 (quiescenza) alla fase G1 del ciclo cellulare.

Una volta attivata, la RTK va in contro alla formazione di un dimero capace di autofosforilare i propri residui tirosinici presenti nella porzione carbossi terminale (Figura 4), diventando così in grado di fosforilare un'ulteriore chinasi⁵.

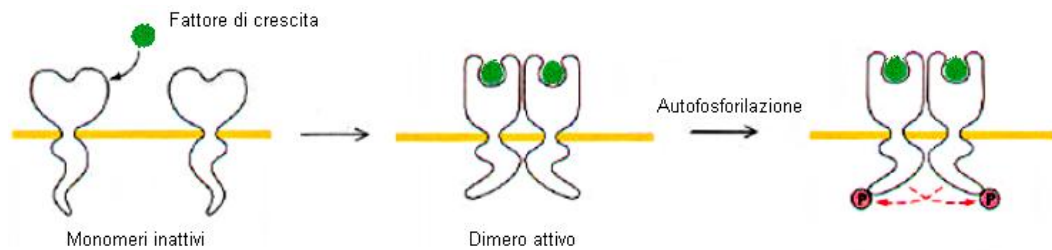


Figura 4. Meccanismo di attivazione di una RTK.

La maggior parte delle RTK è codificata da proto-oncogeni, e mutazioni in grado di portare alla sovraespressione di questi recettori o alla produzione di forme costitutivamente attive sembra essere una delle cause principali dell'insorgenza di malattie tumorali.

Poichè studi recenti hanno messo in luce come le RTK siano fondamentali per lo sviluppo fetale e adolescenziale e per il cancro, ma perdano di importanza nell'organismo adulto sano, la loro inibizione mirata può costituire una valida strategia antitumorale a basso impatto in termini di tossicità per i tessuti sani⁶.

3.1.1. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)^{7,8}

EGFR è una RTK di 170 KDa appartenente alla famiglia ErbB/Her, costituita da 4 membri: Her-1 (EGFR appunto), Her-2, Her-3 ed Her-4. Il dominio extracellulare è poco conservato fra i 4 membri della famiglia, e questo spiega perchè i recettori presentano una diversa affinità per i ligandi appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita epidermici (EGF).

Il processo di dimerizzazione recettoriale a seguito dell'attivazione può portare sia alla formazione di omodimeri (costituiti dall'unione di due recettori uguali tra loro) che di eterodimeri (costituiti dall'unione di due recettori diversi). Tale processo è in grado di aumentare l'efficienza della trasmissione del segnale, ma ha conseguenze drammatiche nella terapia antitumorale basata sull'inibizione di EGFR. Questa RTK, infatti, risulta sovraespressa nella maggior parte dei tumori solidi, e in particolare nel tumore al polmone non a piccole cellule (Non Small Cells Lung Cancer, NSCLC) e nel tumore mammario, dove l'espressione del recettore passa da 40.000 – 100.000 unità per cellula (nei tessuti sani) a 2.000.000 unità per cellula.

3.1.2. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTORS (VEGFR)⁹

In alcuni tumori solidi umani è spesso evidenziabile una sovraespressione di un'altra famiglia di recettori tirosinchinasici: i Vascular Endothelial Growth Factor Receptors (VEGFR). Questi recettori, una volta attivati, danno inizio ad una serie di fenomeni intracellulari, che portano alla proliferazione delle cellule endoteliali.

I VEGFR sono di tre tipi (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) e sono i principali regolatori del fenomeno dell'angiogenesi, un processo che porta alla formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli già esistenti. Tale fenomeno gioca un ruolo importante sia dal punto di vista fisiologico (formazione della placenta,

ovulazione e rigenerazione dei tessuti), sia dal punto di vista patologico, poiché l'iperproliferazione vasale è alla base di numerose malattie, come la psoriasi, la retinopatia diabetica, l'artrite reumatoide e il cancro: una ricca vascolarizzazione infatti aiuta la crescita della massa tumorale ed è una delle cause del fenomeno della metastasi. La principale RTK coinvolta nel cancro è VEGFR-2 (o KDR), ma studi attuali hanno messo in luce come anche VEGFR-1 possa essere coinvolto nella patogenesi tumorale, anziché essere solamente un *decoy-receptor* per VEGF, come inizialmente supposto¹⁰.

Appare quindi evidente l'importanza dello sviluppo di farmaci con attività anti-angiogenica: questi, infatti, inibiscono la crescita dei vasi raggiungendo senza difficoltà l'endotelio, bloccando la crescita del tumore e il processo di metastasi.

In letteratura sono riportate diverse strutture di farmaci inibitori di VEGFR-2 e alcuni di questi presentano lo stesso scaffold chinazolinico degli inibitori di EGFR. Le vie metaboliche regolate dai due recettori sono tra di loro interconnesse: recenti studi hanno dimostrato che l'inibizione di VEGFR-2 è in grado di aumentare la sensibilità del tumore agli inibitori di EGFR e che l'inibizione dell'azione mediata da EGF porta alla riduzione della secrezione di VEGF (il ligando naturale per i VEGFR).

L'associazione farmacologica di inibitori dei due recettori è un argomento di grande attualità, in quanto questo tipo di terapia consente di colpire il tumore sotto diversi fronti:

- ✓ l'inibizione di EGFR porta all'arresto della crescita della massa tumorale (inibizione diretta della progressione cancerosa);
- ✓ l'inibizione di VEGFR-2 porta al blocco della vascolarizzazione tumorale, impedendo così l'arrivo di nutrienti alla massa neoplastica (inibizione indiretta della progressione cancerosa);
- ✓ l'arresto dell'angiogenesi porta ad una minor probabilità di metastasi, essendo i vasi sanguigni tumorali il primo veicolo per la disseminazione delle cellule metastatiche nell'organismo.

La possibilità di avere degli inibitori duali renderebbe possibile evitare di dover ricorrere ad associazioni di più farmaci.

3.1.3. STRATEGIE PER L'INIBIZIONE DI EGFR E VEGFR-2

La ricerca nel campo dell'inibizione delle RTK ha portato all'individuazione di tre possibili strategie terapeutiche¹¹ (Figura 5), costituite dall'uso di:

1. *anticorpi monoclonali*, impiegati come singoli farmaci o come vettori di radionuclidi, tossine, o profarmaci; agiscono legandosi al dominio extracellulare delle RTK, impedendo l'interazione con il fattore di crescita;
2. *piccole molecole organiche*, che fungono da inibitori competitivi ATP-mimetici;
3. *oligonucleotidi antisenso e ribozimi*, che agiscono bloccando i meccanismi deputati alla produzione delle RTK.

Attualmente, le strategie terapeutiche sono basate solo su farmaci appartenenti alle prime due classi sopracitate.

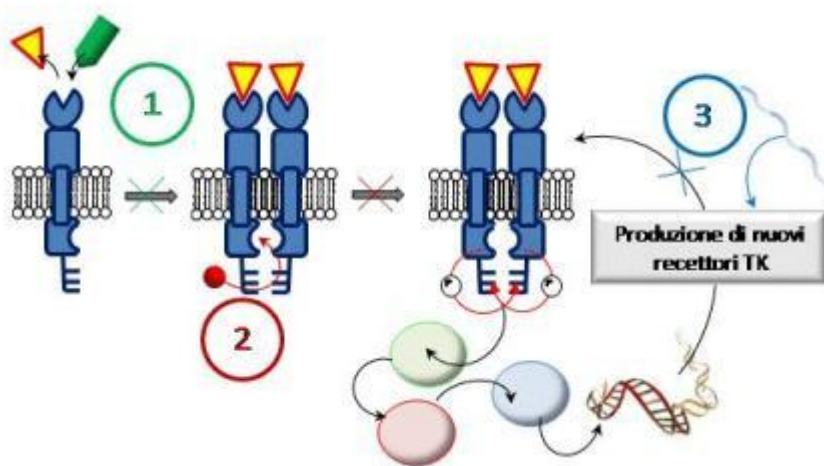


Figura 5. Schematizzazione delle strategie di inibizione di RTK.

- 1 = anticorpi monoclonali;
- 2 = inibitori ATP-mimetici;
- 3 = oligonucleotidi antisenso.

Tuttavia, le cellule possono sviluppare diverse strategie per acquisire resistenza alla terapia adottata (Figura 6) e attualmente per ovviare a questo problema ci si basa su terapie multi-farmaco.

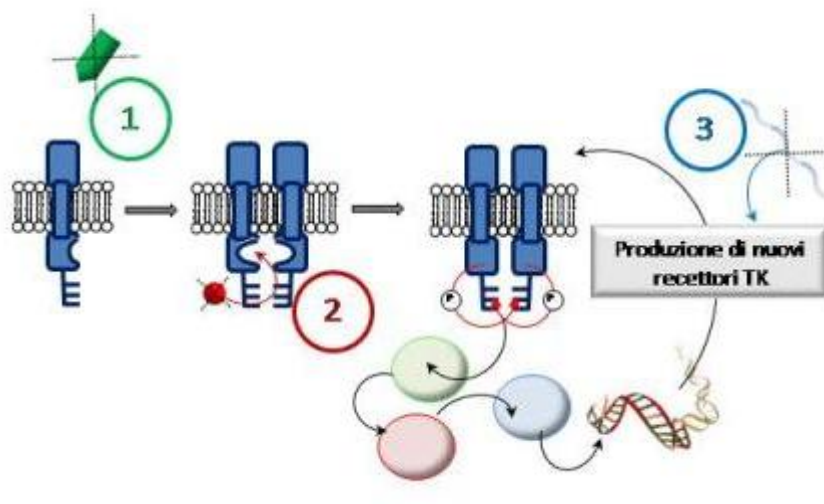


Figura 6. Meccanismi di resistenza all'inibizione delle RTK.

- 1 = resistenza agli anticorpi monoclonali;
 2 = resistenza agli inibitori competitivi ATP-mimetici;
 3 = resistenza agli oligonucleotidi antisense.

Quindi, in funzione del tipo di strategia di inibizione adottata, la cellula può diventare resistente secondo uno o più dei seguenti meccanismi:

1. modifica del recettore che diventa costitutivamente attivo e in grado di dimerizzare senza intervento del fattore di crescita;
2. modifica strutturale della tasca di interazione con l'ATP che diventa meno sensibile all'azione degli inibitori ATP-mimetici;
3. mutazioni genetiche e variazione dell'mRNA per la codifica delle TK.

In ogni caso, fra le diverse strategie inibitorie, la più promettente risulta attualmente quella basata sugli inibitori competitivi dell'ATP (TKI), sia per la maggior facilità di somministrare piccole molecole organiche rispetto a strutture proteiche o nucleiche, sia per la possibilità di individuare TKI multitarget, cioè in grado di inibire contemporaneamente e in maniera efficace più RTK. Va inoltre

considerato che i TKI mantengono la loro attività inibitoria anche in presenza di mutazioni alle RTK che le rendano costitutivamente attive.

I TKI possono presentare scaffold estremamente diversi e a seconda della classe di composti che si utilizzano ci si può indirizzare verso l'inibizione dell'una o l'altra RTK. Di particolare interesse sono risultati i derivati 4-anilinochinazolinici, in grado di inibire EGFR o VEGFR-2 (a seconda della decorazione dello scaffold) già a concentrazioni nanomolari.

Fra gli inibitori selettivi di EGFR a struttura chinazolinica vanno menzionati Erlotinib¹² (approvato nel novembre del 2004 dall'FDA per la cura del NSCLC, primo inibitore selettivo di EGFR a entrare in terapia), Gefitinib¹³ e PD153035¹⁴ (Figura 7).

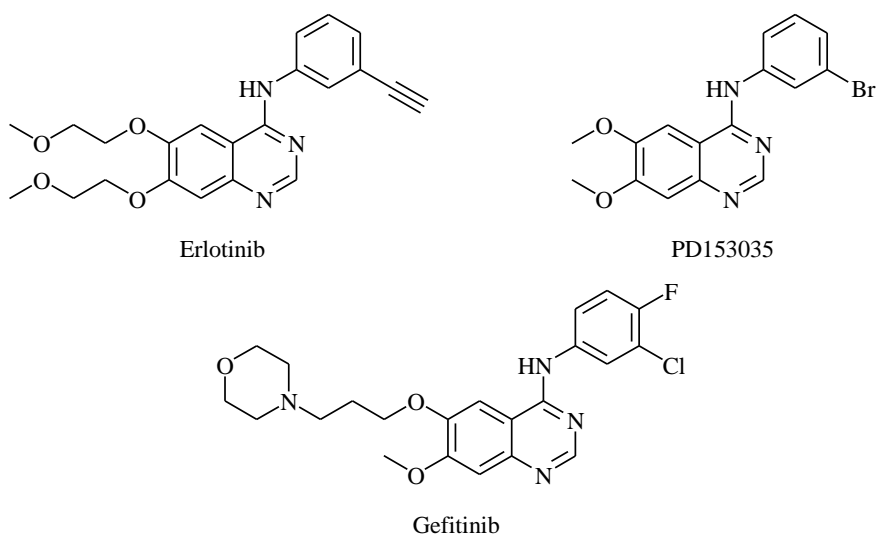


Figura 7. Strutture di inibitori 4-anilinochinazolinici, selettivi per EGFR.

L'analisi cristallografica del complesso EGFR-Erlotinib (Figura 8) ha permesso di individuare i punti di interazione fra inibitore e recettore, evidenziando che l'azoto in posizione 1 interagisce con il gruppo ammidico della Met⁷⁶⁹, l'azoto in 3 interagisce con la Thr⁷⁶⁶ attraverso un ponte idrogeno mediato da una molecola di acqua, le catene alcossiliche in posizione 6 e 7 si trovano esposte al solvente e,

infine, la porzione acetilenica si inserisce in una tasca idrofobica non presente in altre chinasi (come ad esempio le CDK), conferendo selettività verso EGFR¹⁵.

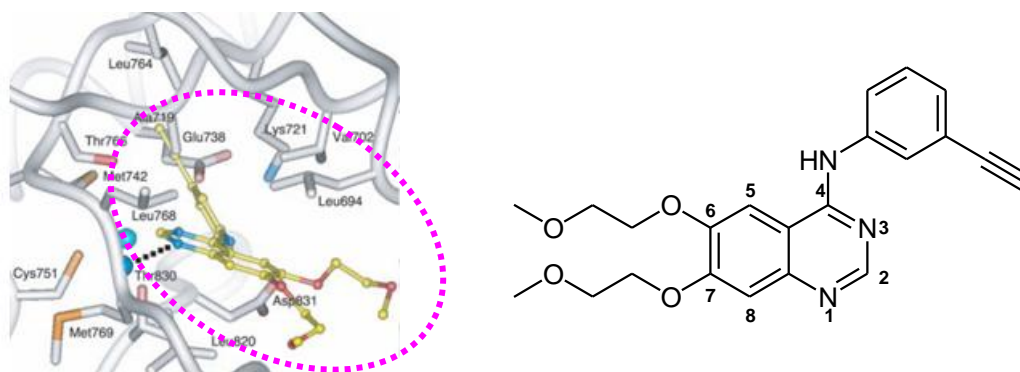


Figura 8. Punti di interazione fra Erlotinib ed EGFR (a sinistra) e struttura di Erlotinib (a destra).

In letteratura, accanto alle osservazioni spettroscopiche, compaiono anche numerosi studi virtuali per la progettazione e lo studio in silico di derivati 4-anilinochinazolinici come inibitori selettivi di EGFR.

In particolare, uno studio 3D-QSAR eseguito su una vasta libreria di derivati (174 molecole), si è occupato di identificare i requisiti sterici, idrofobici e idrofilici che devono avere i sostituenti per funzionalizzare adeguatamente lo scaffold chinazolinico¹⁶ (Figura 9).

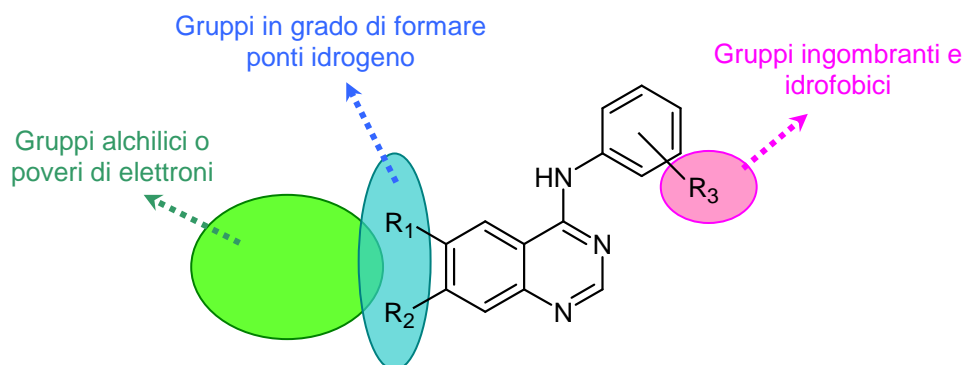


Figura 9. Schematizzazione dei risultati dello studio 3D-QSAR.

Dallo studio emerge che:

- ✓ l'azoto anilिनico non deve avere sostituenti: già la presenza di un metile porta ad una netta riduzione di attività;
- ✓ R₃ deve essere un gruppo idrofobico, meglio se in posizione *meta* rispetto all'azoto anilिनico. In particolare nella serie degli alogeni l'ordine della potenza è il seguente: Br > Cl > I > F;
- ✓ R₁ e R₂ devono contenere atomi elettronegativi legati a catene idrofobiche, formando ad esempio derivati amminici o alcossilici;
- ✓ un gruppo ingombrante vicino a R₁, R₂ o R₃ potrebbe diminuire la potenza inibitoria.

Di più recente scoperta rispetto ad Erlotinib è, invece, un derivato 4-anilinochinazolinico (Vandetanib, Figura 10) in grado di inibire in maniera efficiente sia EGFR che VEGFR-2: attualmente Vandetanib è l'unico TKI duale in fase di sperimentazione clinica¹⁷.

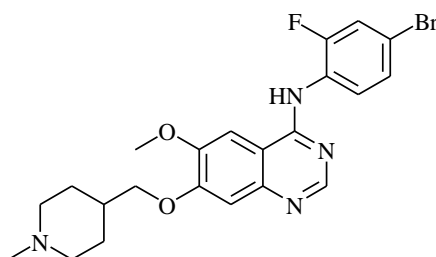


Figura 10. Struttura di Vandetanib.

Anche dopo questa scoperta, pur essendo ben nota la grande importanza di un approccio multitarget e nonostante EGFR e VEGFR-2 ben si prestino a questo tipo di strategia, in letteratura compaiono quasi esclusivamente TKI valutati per la loro attività altamente selettiva e, ad oggi, non esistono studi computazionali per il design razionale di inibitori duali. Inoltre, molto lavoro è ancora da fare per la comprensione esaustiva del meccanismo attraverso cui l'inibizione delle TK porta alla regressione del tumore e per la valutazione della sinergia d'azione di inibitori selettivi. L'aumento delle conoscenze della complessa via di trasduzione del

segnale correlata a questi recettori potrebbe, inoltre, aprire la strada a nuove applicazioni terapeutiche per i TKI, ad esempio l'utilizzo per la differenziazione selettiva delle cellule staminali, come recentemente riportato¹⁸.

3.2. STRATEGIE DI SINTESI DI DERIVATI 4-ANILINOCHINAZOLINICI

Il nucleo chinazolinico rappresenta un importante e diffuso farmacoforo: oltre ai già citati TKI, molte molecole ad attività biologica, sia di origine naturale che di sintesi, presentano al loro interno questa struttura di base¹⁹ (Figura 11).

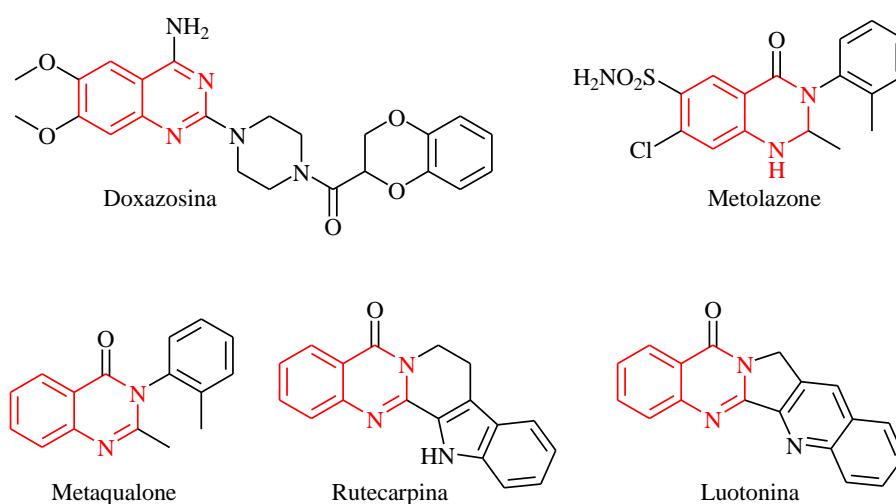
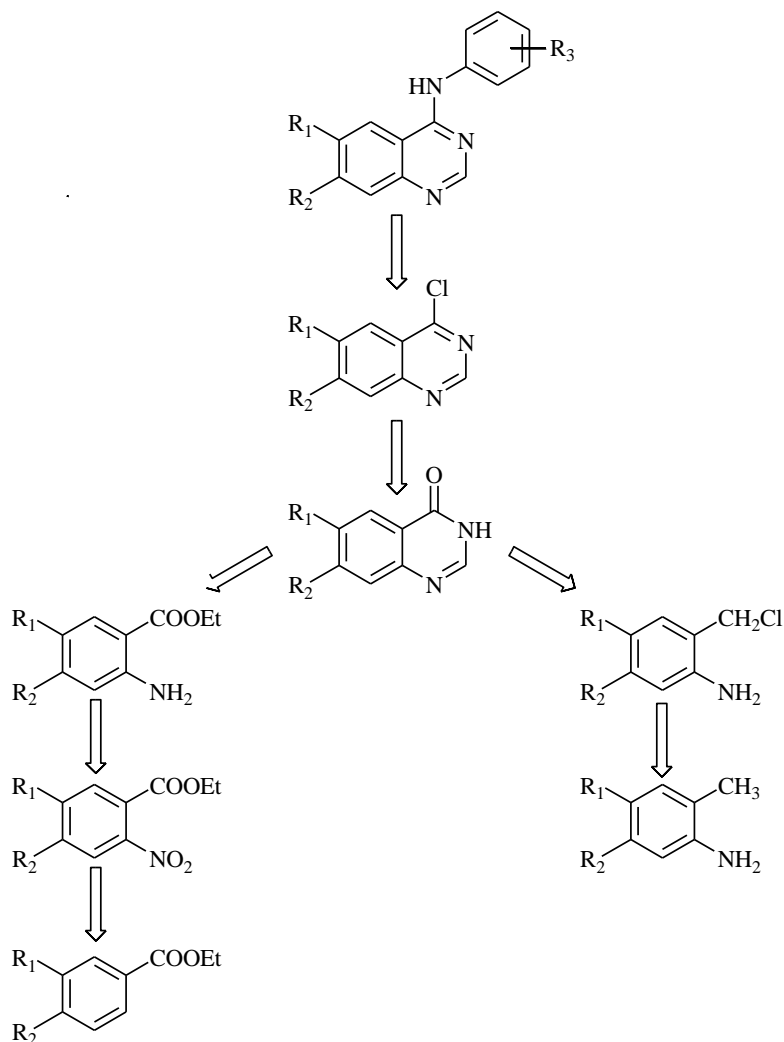


Figura 11. Esempi di farmaci a struttura chinazolinica.

Se consideriamo l'analisi retrosintetica per l'ottenimento di derivati 4-anilinochinazolinici, si può notare come le metodiche sintetiche già note in letteratura siano fortemente condizionate da diversi inconvenienti, fra cui la

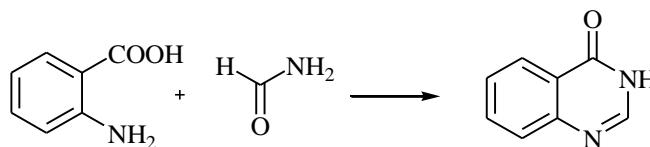
necessità di avvalersi di sintesi multi-step e la scarsa reperibilità di prodotti di partenza adeguati²⁰ (Schema 1).



Schema 1. Analisi retrosintetica per l'ottenimento di derivati 4-anilinochinazolinici.

Intermedio chiave nella sintesi di questi composti è, infatti, un opportuno sintone chinazolinonico, che viene normalmente ottenuto a partire da derivati dell'acido antranilico o dell'*o*-alometilanilina, spesso non disponibili commercialmente e difficilmente ottenibili con buone rese e con pochi passaggi sintetici. Attualmente, la strategia sintetica maggiormente utilizzata si basa sulla sintesi di Niementowsky del nucleo chinazolinonico, in cui un derivato dell'acido

antranilico viene condensato con un adeguato derivato formammidico²¹ (Schema 2).



Schema 2. Sintesi del nucleo chinazolinonico secondo la reazione di Niementowsky.

Composti come PD153035 o Erlotinib possono venir ottenuti con rese complessive del 10 – 15%, a partire dal primo composto commercialmente disponibile²². Risulta, quindi, evidente l'utilità di ricercare nuove strategie sintetiche per ridurre il numero di passaggi sintetici e aumentare le rese complessive per l'ottenimento di questa tipologia di derivati.

3.3. GENERALITA' SULLE RETI COMPLESSE

Se fino a qualche anno fa si riteneva che la miglior strategia di inibizione delle RTK fosse quella basata su TKI selettivi nei confronti di un solo enzima, oggi si ritiene più conveniente utilizzare associazioni farmacologiche di TKI diretti verso diverse RTK o cercare di ottenere farmaci in grado di inibire in maniera significativa più target contemporaneamente²³. Per poter affrontare il problema della progettazione di TKI multipotenti, è necessario avvalersi di tecniche virtuali per lo studio di sistemi complessi ed eterogenei.

Negli ultimi anni, l'avanzamento delle tecniche computazionali ha portato all'impiego delle reti complesse (Complex Networks, CN) per studiare i più svariati sistemi multi-connessi, da internet alla società ai sistemi biomolecolari²⁴.

Lo studio delle reti è la parte dominante di una branca della matematica, nota come *teoria dei grafi*, postulata già nel 1736 dal matematico svizzero Leonhard Euler²⁵.

Una CN è una rete la cui struttura è irregolare, complessa ed evolve nel tempo, ed è costituita essenzialmente da due componenti: i nodi, che rappresentano gli oggetti in studio, e gli archi, che rappresentano il modo in cui gli oggetti sono correlati. A seconda del significato che viene dato ai nodi si possono studiare sistemi differenti, mentre a seconda del significato che si dà agli archi si possono studiare proprietà diverse dello stesso sistema. La rappresentazione di una molecola, ad esempio, altro non è che una rete complessa in cui ogni nodo è costituito da un atomo e ogni arco rappresenta un legame chimico (Figura 12).

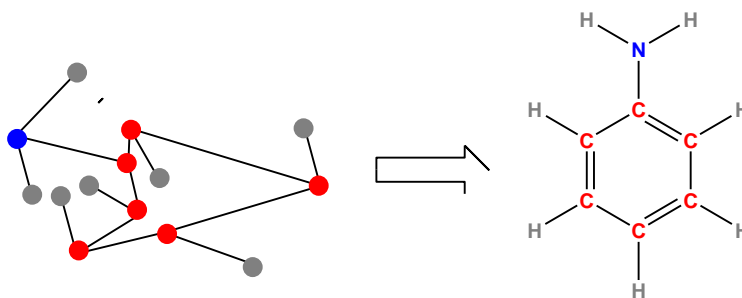


Figura 12. Esempio di CN (a sinistra) per la rappresentazione dell'anilina (a destra).

I meccanismi e le regole che governano le CN non sono ancora stati del tutto chiariti; tuttavia, appare chiaro che in qualunque sistema complesso ogni nodo interagisce solo con un numero discreto di altri componenti, ma può comunque essere influenzato da nodi anche molto lontani. Inoltre, mentre inizialmente Erdős e Rényi ritenevano che l'architettura delle CN fosse *casuale* (e quindi il numero di connessioni fra i nodi avesse un andamento a campana), oggi si sa che la situazione è molto differente e che la distribuzione dei nodi è esponenziale (*scale-free networks*)²⁶.

Nelle CN casuali si nota come la maggior parte dei nodi abbia lo stesso numero di legami; in quelle scale-free la maggior parte dei nodi ha poche connessioni, e solo pochi ne hanno un numero elevato.

Attualmente, l'algoritmo di Erdős-Rényi viene utilizzato proprio per la generazione di CN casuali per verificare la non sovrapposizione (e quindi l'attendibilità) di una CN costruita per studiare un certo fenomeno o sistema²⁷.

Le CN scale-free, quindi, sono caratterizzate dalla presenza di molti nodi con poche connessioni e da pochi nodi multi-connessioni, che vengono anche detti *hub*. Gli hub costituiscono i nodi più importanti della rete: una perturbazione di tali nodi può destabilizzare completamente una CN. Se immaginiamo, ad esempio, che il genoma umano abbia un'architettura del genere, possiamo facilmente capire perchè la mutazione di alcuni geni non causi modificazioni del fenotipo cellulare, mentre la mutazione di altri (che possiamo definire come geni hub) possa determinare l'insorgenza di gravi patologie.

Le CN sono, inoltre, caratterizzate da una serie di parametri che ne definiscono più in dettaglio l'organizzazione²⁸. Fra questi parametri, ricordiamo:

1. *indice di Wiener*: somma di tutte le connessioni all'interno della rete;
2. *diametro della rete*: massima distanza fra due nodi;
3. *distanza media*: numero medio di connessioni necessarie per passare da un nodo ad un altro.

Le CN possono venir utilizzate sia per lo studio di un sistema in sè che per lo studio di interconnessioni fra sistemi. In letteratura appaiono sempre più frequentemente lavori relativi all'uso di reti complesse per lo studio e la predizione di nuove interazioni fra farmaci noti e recettori^{29,30}. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, si tratta di accoppiamenti fra due CN diverse, una relativa allo "spazio chimico" (ligandi) e una allo "spazio biologico" (targets), dalla cui sovrapposizione si ricava uno "spazio farmacologico" (possibili interazioni). Studi di questo genere si basano su matrici di similarità, cioè partono dal concetto che molecole strutturalmente simili potranno interagire con target strutturalmente simili. Tale approccio è prettamente qualitativo, ma per poter utilizzare le CN per il novel drug design è necessario poter ricavare delle informazioni quantitative: la ricerca di nuove teorie ed applicazioni è in quest'ottica un argomento di grande attualità.

4. OBIETTIVO

Negli ultimi anni, nell'ambito della ricerca di nuovi agenti antitumorali, un grande interesse è stato posto nella sintesi e studio di piccole molecole organiche ATP-mimetiche, come inibitori di tirosinchinasi, enzimi sovraespressi nelle patologie iperproliferative. Il complesso sistema costituito dalle tirosinchinasi e dai loro inibitori costituisce un campo di grande interesse scientifico, sia riguardo alla comprensione dei meccanismi biochimici regolati da tali enzimi, sia riguardo alla progettazione e individuazione di nuovi composti.

L'obiettivo di questa ricerca si è focalizzato su 3 punti fondamentali:

1. la messa a punto di una nuova strategia per la sintesi di derivati 4-anilinochinazolinici;
2. la sintesi di nuovi potenziali agenti antiproliferativi a struttura 4-anilinochinazolinica e la loro preliminare valutazione biologica;
3. l'individuazione di una nuova metodica per lo studio e la progettazione di inibitori delle tirosinchinasi.

La nuova strategia sintetica sarà basata sulla possibilità di avvalersi di prodotti commercialmente disponibili o di semplice realizzazione, e dovrà portare ad un miglioramento complessivo rispetto ai metodi già noti in letteratura. Pertanto, la validità del metodo verrà valutata mediante la sintesi di un noto inibitore selettivo di EGFR, PD153035 (Figura 7).

Quindi, utilizzando come modello i composti Erlotinib, PD153035 e Gefitinib (Figura 7) e i dati di letteratura riguardanti studi 3D-QSAR, verranno individuate diverse tipologie di composti, caratterizzate da:

1. struttura di base chinazolinica;
2. condensazione in posizione 6 e 7 di una porzione alchilidossilica, con un numero variabile di atomo di carbonio (da 1 a 3), oppure:
3. sostituzione in posizione 6 e 7 con catene dilachilamminoalcolossiliche, oppure:
4. condensazione di un terzo anello aromatico in posizione 7,8 (strutture benzo[*h*]chinazolinica o benzo[*f*]chinazolinica);

5. funzionalizzazione in posizione 4 con un sostituito anilino o amminoeteroarilico, opportunamente sostituiti con gruppi idrofobici.

La struttura generale dei composti considerati è riportata in Figura 13.

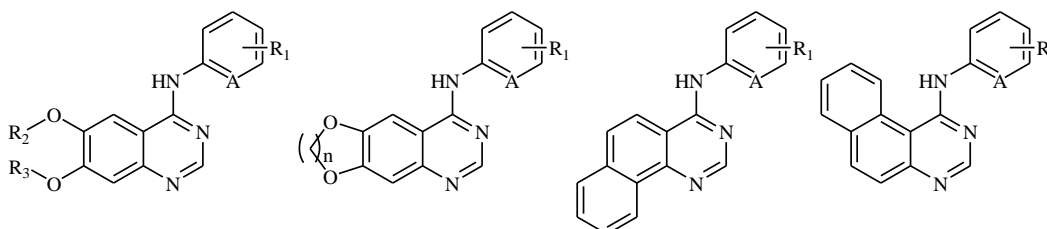


Figura 13. Struttura generale dei composti progettati.
 $A = CH, N; n = 0 - 3.$

Tutti i composti sintetizzati verranno sottoposti a saggi biologici di valutazione preliminare, fra cui la valutazione della citotossicità su linee cellulari in grado di rispettivamente di sovraesprimere e non esprimere EGFR.

Infine, partendo dai dati disponibili in letteratura riguardanti gli inibitori di 10 tirosinchinasi diverse coinvolte nella patologia tumorale, si verificherà la possibilità di generare dei modelli multitarget QSAR di classificazione. L'output di tali modelli, quindi, verrà utilizzato per la generazione di reti complesse per lo studio dell'intero sistema costituito dalle 10 tirosinchinasi e dai relativi inibitori.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1. NUOVA STRATEGIA PER LA SINTESI DI DERIVATI 4-ANILINOCHINAZOLINICI

La sintesi di derivati 4-anilinochinazolinici è attualmente basata sulla strategia di Niementowsky, che prevede la reazione fra un derivato dell'acido antranilico e un derivato formammidico a dare il corrispondente intermedio chinazolinonico, che può successivamente venir clorurato e funzionalizzato con un adeguato sostituente anilino (Schema 1). Analizzando il processo retrosintetico risulta evidente come lo step chiave per l'ottenimento di questi composti sia proprio il derivato chinazolinonico, la cui preparazione è tuttavia fortemente limitata dalla scarsa reperibilità o accessibilità di derivati dell'acido antranilico. E' però possibile ottenere l'intermedio chinazolinonico anche da derivati dell'*o*-alometilanilina o per ossidazione del nucleo chinazolinico (Figura 14): sfortunatamente, la prima alternativa presenta le stesse problematiche della sintesi di Niementowsky (i derivati dell'*o*-alometilanilina non sono di semplice ottenimento) e per l'accesso diretto al nucleo chinazolinico non esistono in letteratura strategie sintetiche vantaggiose.

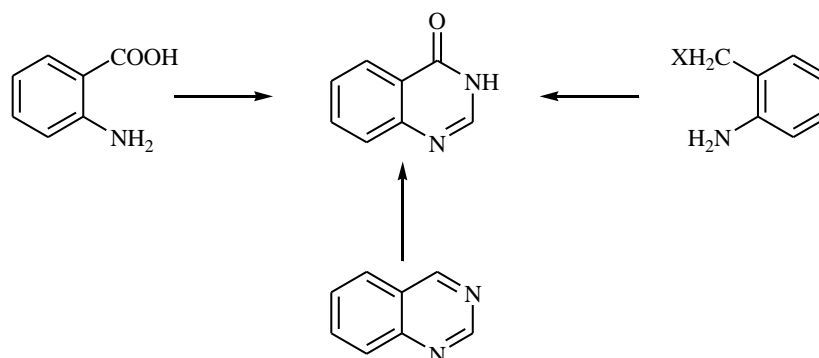
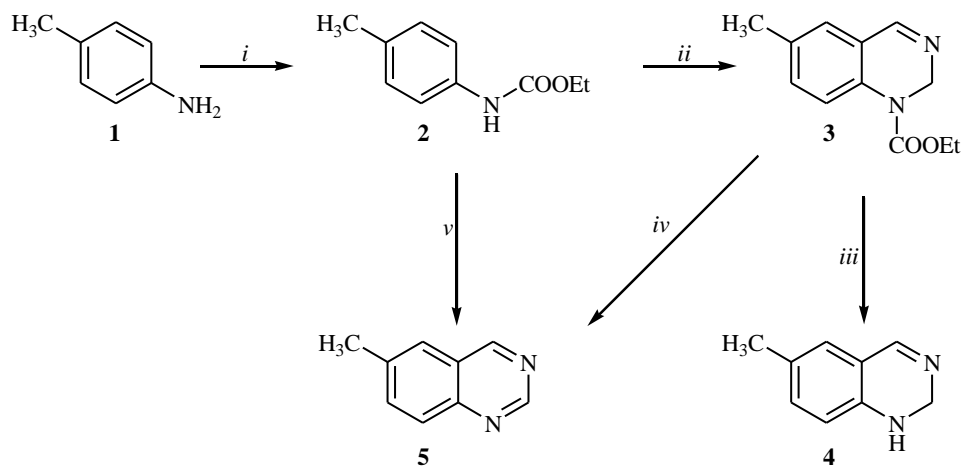


Figura 14. Possibili alternative per l'ottenimento dell'intermedio chinazolinonico.

La messa a punto di una nuova metodica per l'ottenimento di derivati chinazolinici benzosostituiti, quindi, può costituire una valida alternativa per la sintesi di derivati 4-anilinochinazolinici.

5.1.1. PREPARAZIONE DI SCAFFOLD CHINAZOLINICI: STUDIO DEL MECCANISMO DI REAZIONE

La prima parte del lavoro di tesi si basa sull'osservazione che, trattando gli etil carbammati di semplici naftilammine con urotropina (hexamethylenetetramine, HMTA) in acido trifluoroacetico (TFA) e successivamente con potassio ferricianuro in potassa idroalcolica, si ottengono le corrispondenti benzochinazoline, attraverso la formazione di un derivato *N*-carbamoil-diidrobenzochinazolinico che non viene isolato dalla miscela di reazione per comodità operative³¹. L'individuazione di una nuova strategia di accesso al nucleo chinazolinico ha destato da subito notevole interesse: per verificare l'estendibilità del metodo ai carbammati di aniline e per lo studio delle adeguate condizioni e del meccanismo di reazione, si è scelto come prodotto di riferimento la 4-metilanilina (**1**) (Schema 3).



Schema 3. Sintesi di 6-metilchinazolin-2(1H)-one. Condizioni di reazione:

- i* ClCOOEt , TEA, THF anidro, TA, 30 minuti, resa quantitativa.
- ii* HMTA, TFA, riflusso, 1 ora, resa 80%.
- iii* KOH 10%, EtOH/H₂O 1/1, riflusso, 2 ore, resa 92%.
- iv* KOH 10%, K₃Fe(CN)₆, EtOH/H₂O 1/1, riflusso, 4 ore, resa 35%.
- v* 1) HMTA, TFA, riflusso, 1 ora;
2) KOH 10%, K₃Fe(CN)₆, EtOH/H₂O 1/1, riflusso, 4 ore, resa 49%.

Il gruppo amminico del composto **1** è stato protetto sotto forma di etil carbammato (**2**), mediante l'uso di etile cloroformiato in THF anidro in presenza di trietilammina. Il carbammato **2** è stato quindi riflussato in TFA in presenza di HMTA, portando all'ottenimento dell'etile (6-metil-2*H*-chinazolin-1-il)carbammato (**3**). Tale prodotto origina da una doppia amminometilazione (probabilmente concertata) sul carbonio in *orto* all'azoto e sull'atomo di azoto stesso. La successiva spontanea deidrogenazione della funzione *o*-amminometilenica a funzione aldimminica promuove una ciclizzazione intramolecolare, che porta alla formazione dell'anello *N*-carbamoil-diidropirimidinico con perdita di ammoniacca (Figura 15).

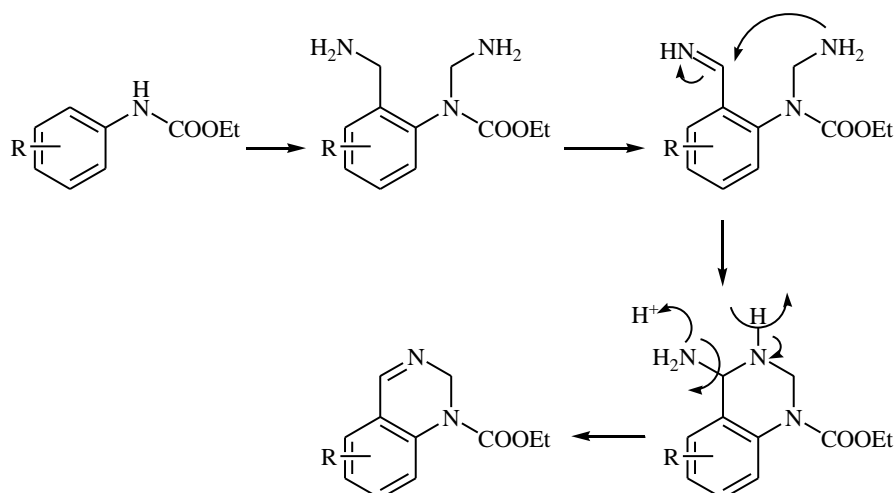


Figura 15. Meccanismo di formazione dell'intermedio *N*-carbamoildiidrochinazolinico.

Tale meccanismo di reazione è stato ipotizzato anche sulla base dell'esatta struttura dell'intermedio diidrochinazolinico (che può avere due possibili strutture, Figura 16), risolta grazie all'uso della tecnica $^1\text{H-NMR}$ bidimensionale denominata NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), che sfrutta l'effetto NOE.

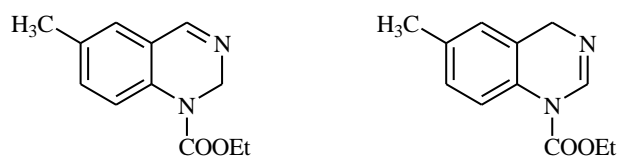


Figura 16. Possibili strutture per l'intermedio *N*-carbamoildiidrochinazolinico.

Il NOE fornisce informazioni sulle distanze internucleari; esso consiste nel saturare un segnale dello spettro (tramite irradiazione con la stessa radiofrequenza e con opportuna intensità) e nell'osservare le variazioni dell'intensità degli altri segnali. L'entità di variazione è funzione della distanza dal nucleo irradiato, precisamente è proporzionale a r^{-6} , dove r è la distanza internucleare. L'aumento dell'intensità di un protone x , in seguito ad irradiazione di un protone y , fornisce quindi informazioni sulla prossimità spaziale di x e y nella molecola,

indipendentemente dal numero di legami esistenti tra di essi. L'esperimento NOESY è l'equivalente bidimensionale della misura NOE: nello spettro NOE monodimensionale viene calcolata la variazione nell'assorbimento di protoni spazialmente vicini, mentre nella mappa bidimensionale NOESY compaiono segnali in fase al punto d'incrocio tra due picchi di assorbimento, quando i protoni che li hanno generati sono spazialmente correlati.

Lo spettro NOESY riporta una serie di segnali positivi, posti sulla diagonale, che corrispondono allo spettro normale del protone, e negativi (generalmente), posti fuori della diagonale all'incrocio dei picchi correlati da effetto NOE.

Con tale tecnica è stato quindi possibile determinare l'esatta posizione del doppio legame nell'anello diidropirimidinico, rilevando una correlazione spaziale fra il protone in posizione 4 e quello in posizione 5 (Figura 17).

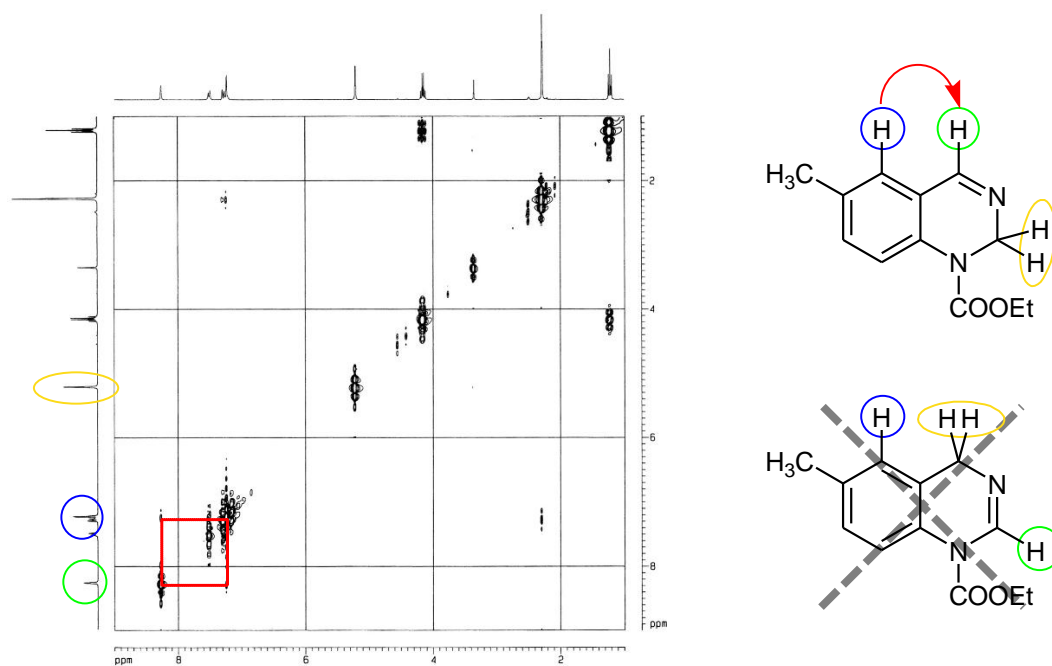


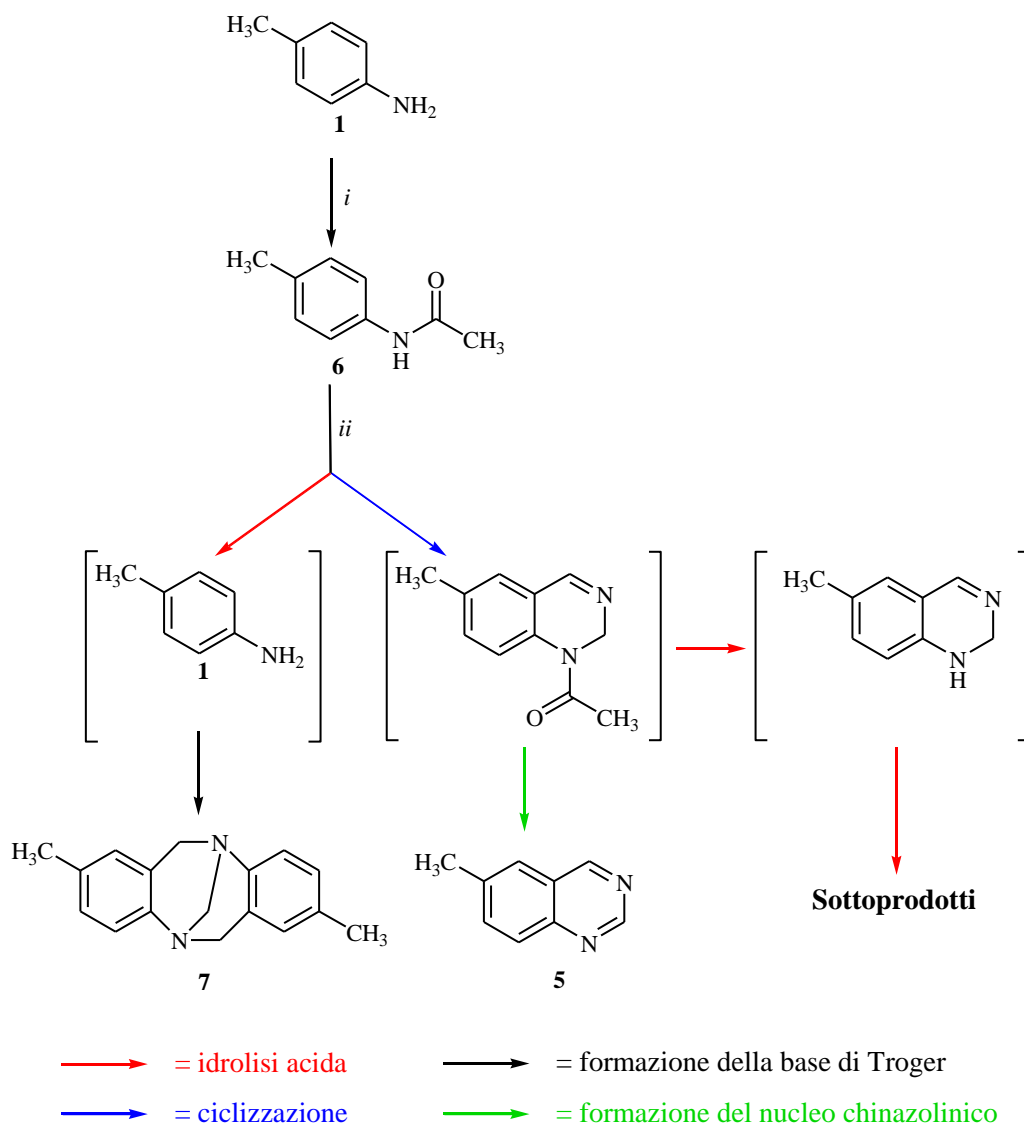
Figura 17. Spettro $^1\text{H-NMR}$ NOESY di etile (6-metil-2H-chinazolin-1-il)carbamato.

Il doppio legame si può formare in posizione 3-4 solo supponendo che sia proprio la funzione amminometilenica direttamente legata all'anello benzenico a subire spontanea ossidazione, osservazione in accordo anche con la maggior estensione del sistema π che si viene così ad ottenere.

Il successivo trattamento del composto **3** a riflusso con potassa idroalcolica ha portato alla deprotezione della funzione carbamoilica, ma la diidrochinazolina **4** è risultata essere particolarmente instabile, subendo ossidazione spontanea anche all'aria e portando alla formazione di numerosi sottoprodotti non identificabili: tale composto può venir conservato solamente in soluzione in solventi apolari (come il toluene) e comunque per brevi periodi di tempo. Tuttavia, se alla soluzione idroalcolica di potassa viene aggiunto direttamente l'agente aromatizzante (potassio ferricianuro) è possibile isolare dalla miscela di reazione direttamente la 6-metilchinazolina (**5**), con buona resa e senza la formazione di prodotti secondari.

Vista l'instabilità degli intermedi di reazione, è risultato quindi più vantaggioso eseguire entrambi gli step di reazione in maniera consecutiva. Il carbammato di partenza **2** è stato prima riflussato con HMTA in TFA e l'intermedio diidrochinazolinico **3** è stato purificato (ma non isolato) mediante precipitazione delle impurezze da HCl 4M. La soluzione acquosa è stata quindi concentrata a secchezza e il residuo solido (costituito dal cloridrato del composto **3**) è stato ripreso con una soluzione di potassa idroalcolica e potassio ferricianuro e convertito tramite riflusso nel composto **5**.

Allo scopo di verificare l'importanza del tipo di *N*-protezione, anche la 4-metilacetanilide (**6**), ottenuta per acetilazione con anidride acetica in acido acetico del composto **1** (Schema 4), è stata sottoposta a trattamento prima con HTMA in TFA e poi con potassio ferricianuro in potassa idroalcolica.



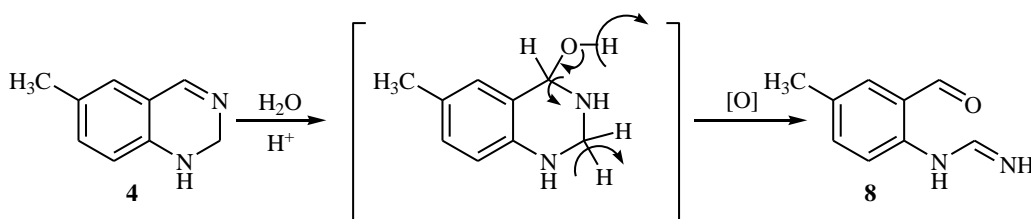
Schema 4. Prodotti di reazione ottenibili da 4-metilacetanilide. Condizioni di reazione:

- i Ac_2O , AcOH , riflusso, 45 minuti, resa 96%.
 ii 1) HMTA, TFA, riflusso, 1 ora;
 2) KOH 10%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1, riflusso, 4 ore.

In questo caso è stata però ottenuta una miscela complessa di prodotti, nella quale è stato possibile identificare, fra gli altri, la 6-metilchinazolinone **5** e la base di Tröger (**7**). È noto dalla letteratura che tale composto deriva dalla reazione con HMTA di un'anilina primaria in ambiente acido³²; si può quindi supporre che la reazione di ciclizzazione e quella di deprotezione del gruppo amminico risultino competitive in TFA per la 4-metilacetanilide: solo la porzione di molecole in cui la protezione resiste è infatti in grado di portare all'intermedio diidrocinazolinico

N-protetto. Tale osservazione non è però sufficiente a spiegare la formazione di un numero elevato di prodotti secondari: partendo dalle osservazioni sull'instabilità del derivato diidrocchinazolinico deprotetto, è possibile ipotizzare che se nel primo step di reazione delle anilidi si forma un intermedio *N*-acetildiidrocchinazolinico anche questo possa parzialmente andare in contro a idrolisi a causa dell'acidità dell'ambiente di reazione, generando quindi un intermedio deprotetto che si degrada rapidamente.

Per poter verificare l'attendibilità di tale ipotesi, il composto **4** è stato riflussato in acido acetico con formazione di una miscela complessa di prodotti, fra cui è stato possibile isolare sia la 6-metilchinazolina (**5**) sia il derivato formamidinico **8** (Schema 5), identificato sia mediante spettrometria di massa che spettroscopia ¹H-NMR.



Schema 5. Formazione e struttura del derivato formamidinico, ottenibile per trattamento della diidrocchinazolina in ambiente acido.

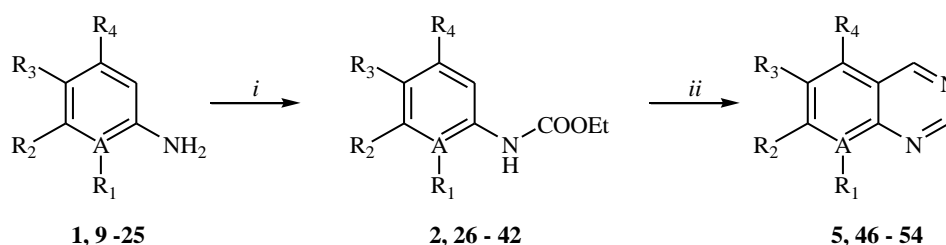
La formazione di entrambi questi derivati avviene con resa bassa (circa 10%) e deriva da una spontanea ossidazione, caratteristica delle diidrocchinazoline; i dati di letteratura però sono tutti riferiti alle 3,4-diidrocchinazoline, che mostrano una maggior stabilità, tanto da poter essere conservate in forma cristallina³³.

La protezione come etil carbammato, quindi, risulta essere fondamentale, in quanto tale gruppo funzionale è in grado di resistere nelle condizioni di acidità richieste dal primo passaggio della reazione.

Proprio l'influenza dell'acidità del mezzo nel primo passaggio di reazione è stato quindi il successivo parametro preso in considerazione: la reazione è stata tentata prima sostituendo il TFA con acido acetico, ma senza ottenere alcun prodotto diverso da quello di partenza, e poi con acido metansolfonico, ottenendo in questo

caso una miscela complessa di prodotti, analogamente a quanto ottenuto utilizzando l'acetanilide come prodotto di partenza. Anche diluendo l'acido metansolfonico con acido acetico è stata ottenuta una miscela complessa, mentre non si è ottenuta nessuna reazione quando la diluizione è stata tentata con solventi organici (come tetraidrofurano o metanolo). Non è, infine, stato possibile ridurre la quantità di TFA (la reazione non arriva a completezza), nè diluirlo con solventi (non si ha alcuna reazione).

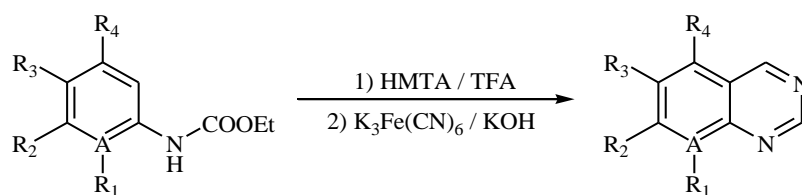
Una volta individuate le migliori condizioni di reazione, è stato valutato l'effetto dei sostituenti sull'anilina di partenza, sia in termini elettronici che di posizione relativa rispetto alla funzione amminica, eseguendo la reazione su un set di etil carbammati di semplici aniline commerciali (Schema 6). Tutti i carbammati sono stati ottenuti trattando l'opportuno derivato anilिनico di partenza con etile cloroformiato in tetraidrofurano anidro, a riflusso o a temperatura ambiente (a seconda del prodotto di partenza) e in presenza di trietilammina, tranne nel caso della sintesi dell'etile (4-idrossifenil)carbammato.



Schema 6. Sintesi di chinazoline. Condizioni di reazione:

- i* ClCOOEt, TEA, THF anidro, TA, 30 minuti per **2, 26, 27, 30 e 36**, resa quantitativa;
 ClCOOEt, TEA, THF anidro, riflusso, 1 ora per **28, 29, 32-35, 37-42**, rese da 40% a quantitativa;
 ClCOOEt, THF anidro, riflusso, 1 ora per **31**.
- ii* 1) HMTA, TFA, riflusso, 1 ora;
 2) KOH 10%, $K_3Fe(CN)_6$, EtOH/H₂O 1/1, riflusso, 4 ore.

I prodotti di partenza, quelli di arrivo e le relative rese ottenute sono riportate in Tabella 1.



A	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Resa %	n
C	H	H	CH ₃	H	49	5
C	H	H	H	H	<i>ap</i>	43
C	OCH ₃	H	H	H	<i>ap</i>	44, 45
C	NHCOOEt	H	H	H	<i>mc</i>	-
C	H	H	Cl	H	15	46
C	H	H	OCH ₃	H	19	47
C	H	H	OH	H	<i>mc</i>	-
C	H	H	OCOEt	H	24	48
C	H	H	NHCOOEt	H	54	49
C	H	H	NO ₂	H	<i>nr</i>	-
C	H	H	COOH	H	<i>nr</i>	-
C	H	OCH ₃	H	H	22	50
C	H	NHCOOEt	H	H	45	51
C	CH ₃	NHCOOEt	H	H	38	52
C	H	NHCOOEt	CH ₃	H	44	53
C	H	NHCOOEt	OCH ₃	H	44	54
N	-	H	CH ₃	H	<i>nr</i>	-
N	-	H	H	CH ₃	<i>nr</i>	-

Tabella 1. Carbammati di partenza, chinazoline ottenute e relative rese per la valutazione dell'estendibilità del protocollo di sintesi.

ap = altro prodotto; *mc* = miscela complessa; *nr* = nessuna reazione; *n* = numero del derivato ottenuto.

Per poter avere la formazione del nucleo chinazolinico è necessario che l'anilina di partenza presenti almeno un sostituto e che questo sia presente in posizione

meta o *para*: l'anilina o aniline funzionalizzate solo in *orto* danno origine esclusivamente a miscele di prodotti di formilazione. La presenza di un sostituito in posizione 3 o 4, invece, porta alla sola formazione del derivato chinazolinico. Se nell'anilina di partenza sono presenti più gruppi amminici, questi devono tutti essere protetti come etil carbammati, ma in ogni caso si assiste alla ciclizzazione per una sola delle due funzioni amminiche; anche eventuali gruppi ossidrilici devono essere protetti (sottoforma di etilcarbonati) per evitare di ottenere miscele complesse di prodotti, mentre la presenza di sostituenti fortemente disattivanti (nitro gruppi, funzioni carbossiliche o atomi di azoto in anello) impediscono la formazione di prodotti di reazione.

E' interessante notare come la reazione mostri una totale regioselettività: anche quando nel carbammato di partenza sono presenti più siti di possibile condensazione si ottiene un'unica chinazolina isomera, cioè quella che porta ad avere dei sostituenti in posizione 6 o 7. Tale evidenza può venir spiegata sulla base dell'ingombro sterico generato da un eventuale sostituito in posizione *meta* (Figura 18). È estremamente interessante notare che i derivati 4-anilinochinazolinici inibitori delle TK presentano sempre sostituenti nelle posizioni 6 e 7 del nucleo chinazolinico.

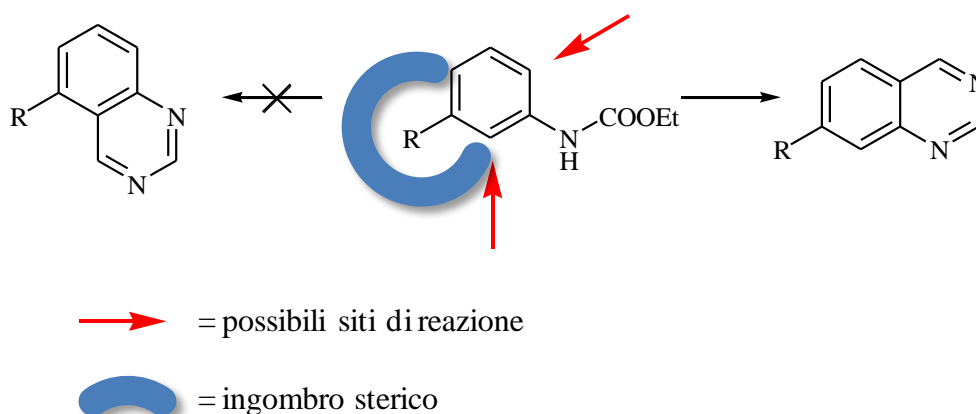


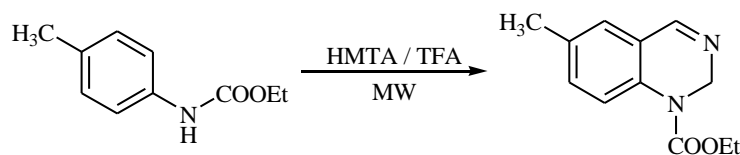
Figura 18. Possibili geometrie di condensazione per carbammati *meta* sostituiti ed effetto dell'ingombro sterico del sostituito.

5.1.2. PREPARAZIONE DI SCAFFOLD CHINAZOLINICI: EFFETTO DELLE MICROONDE

La procedura generale di sintesi dei nuclei chinazolinici prevede un rapporto HMTA/carbammato di 7/1 con rese variabili dal 15 al 54%. Allo scopo di ridurre la quantità di HMTA necessaria e contemporaneamente di aumentare le rese di reazione, si è deciso di esplorare l'effetto delle microonde sul decorso della reazione. L'utilizzo della sintesi organica assistita dalle microonde (Microwave Assisted Organic Synthesis, MAOS) ha avuto negli ultimi anni un notevole impatto nel campo della sintesi di composti a potenziale attività biologica, grazie alla possibilità di ridurre i tempi di reazione, diminuire la formazione di sottoprodotti e semplificare i processi di work-up, portando ad un complessivo miglioramento delle strategie sintetiche.

Ancora una volta, il carbammato **2** è stato utilizzato come composto standard per stabilire le adeguate condizioni di reazione. Inizialmente è stato preso in considerazione il solo primo step di reazione, modificando nell'ordine: temperatura, tempo di reazione e rapporti HMTA/carbammato e TFA/carbammato (Tabella 2).

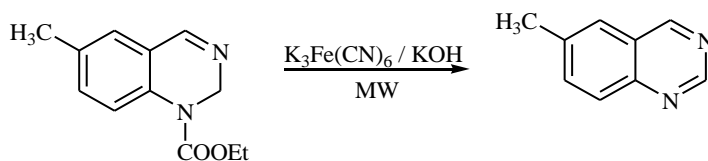
Mediante la MAOS, quindi, è stato possibile ridurre il tempo di reazione da 1 ora a 10 minuti ed è stato possibile utilizzare una minor quantità sia di HMTA (1 mmole anziché 7 per mmole di carbammato) che di TFA (3 ml anziché 7 per mmole di carbammato).



Temperatura °C	Tempo min	Rapporto HMTA/carbammato	Rapporto TFA/carbammato	Resa %
100	10	7/1	7/1	95
110	10	7/1	7/1	97
120	10	7/1	7/1	93
110	5	7/1	7/1	90
110	10	5/1	7/1	98
110	10	3/1	7/1	98
110	10	2/1	7/1	75
110	10	3/1	5/1	98
110	10	3/1	3/1	98
110	10	3/1	2/1	80

Tabella 2. Ottimizzazione della reazione di formazione dell'intermedio 3.

Grazie alla riduzione della quantità di TFA è stato possibile ridurre anche il volume di soluzione di potassa idroalcolica da utilizzare nel secondo step di reazione. Nello studio di questo secondo passaggio di reazione sono stati fondamentali sia la procedura di irraggiamento che la modalità di aggiunta dell'agente aromatizzante: è risultato, infatti, più vantaggioso aggiungere il potassio ferricianuro in 4 porzioni uguali, eseguendo dopo ogni aggiunta un ciclo di irraggiamento, piuttosto che aggiungerlo in un'unica porzione e sottoporre la miscela a tempi prolungati di reazione. Mediante tale protocollo, la resa di ottenimento del composto **5** è passata dal 49% al 93%. La procedura di ottimizzazione del secondo step di reazione è riassunta nella Tabella 3.

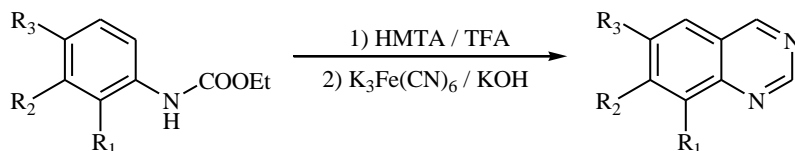


Temperatura °C	Tempo min	N° di cicli	Resa %
100	10	1	60
100	20	1	68
100	30	1	68
100	10	2	75
100	10	3	90
100	10	4	97

Tabella 3. Ottimizzazione della reazione di formazione del composto **5**.

Il maggior inconveniente nell'uso della MAOS risiede nella ridotta volumetria delle celle di reazione disponibili a causa dello scarso potere di penetrazione delle microonde (pochi centimetri). Nella strategia sintetica qui discussa, il limite volumetrico riguarda il secondo passaggio sintetico (deprotezione e aromatizzazione), a causa della grande quantità di potassa idroalcolica necessaria. Pertanto, si è deciso di verificare se fosse possibile utilizzare un protocollo "misto" MAOS/TFA/HMTA – tecnica classica/KOH/ $K_3Fe(CN)_6$ senza avere riduzione nella resa complessiva del processo. Il composto **2** è stato irradiato in TFA in presenza di HMTA nelle condizioni precedentemente determinate; la miscela di reazione è stata quindi ripresa con una soluzione idroalcolica di potassa, aggiunta di potassio ferricianuro e posta a riflusso, portando all'ottenimento della 6-metilchinazolina (**5**) con resa paragonabile a quella ottenuta eseguendo la reazione solo con l'ausilio delle microonde (95% contro 93%). Risulta pertanto evidente come il passaggio sintetico critico per la sintesi di derivati chinazolinici sia l'ottenimento dell'intermedio *N*-carbamoil-diidrochinazolinico, la cui formazione viene notevolmente aumentata applicando

la tecnologia a microonde. Il protocollo sintetico “misto” è stato quindi ulteriormente validato applicandolo all’intero set di carbammati utilizzato in precedenza. Il confronto fra le rese ottenute è riportato in Tabella 4.



R ₁	R ₂	R ₃	Resa % Tecnica classica	Resa % Protocollo misto	n
H	H	CH ₃	49	95	5
H	H	Cl	15	19* o 55**	46
H	H	OCH ₃	19	92	47
H	H	OCOOEt	24	86	48
H	H	NHCOOEt	54	90	49
H	OCH ₃	H	22	79	50
H	NHCOOEt	H	45	91	51
CH ₃	NHCOOEt	H	38	83	52
H	NHCOOEt	CH ₃	44	80	53
H	NHCOOEt	OCH ₃	44	84	54

Tabella 4. Confronto fra le rese di ottenimento di derivati chinazolinici mediante tecnica classica e mediante il protocollo “misto” MAOS-riflusso.

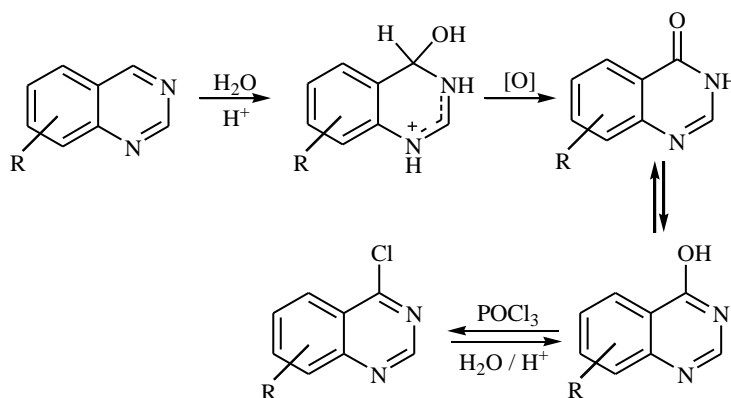
* = rapporto HMTA/carbammato 1/1; ** = rapporto HMTA/carbammato 9/1
n = numero del derivato chinazolinico ottenuto.

Dai risultati è possibile notare il vantaggio che il nuovo protocollo sintetico consente di ottenere in termini di rese, tutte al di sopra del 70%. Solo nel caso della 6-clorochinazolina (**46**) è stato necessario utilizzare un rapporto HMTA/carbammato di 9/1, irradiando per 3 volte la miscela di reazione per 25 minuti. Va ricordato però che gli alogeni hanno un effetto disattivante nelle reazioni di sostituzione elettrofila aromatica. Infine, nonostante l’ausilio delle microonde, non è stato possibile ottenere i derivati chinazolinici da aniline

fortemente disattivate (nitro e carbossi aniline ed amminopirimidine; dati non riportati in tabella).

5.1.3. NUOVA STRATEGIA PER L'OTTENIMENTO DI DERIVATI 4-ANILINOCHINAZOLINICI: SINTESI DI PD153035

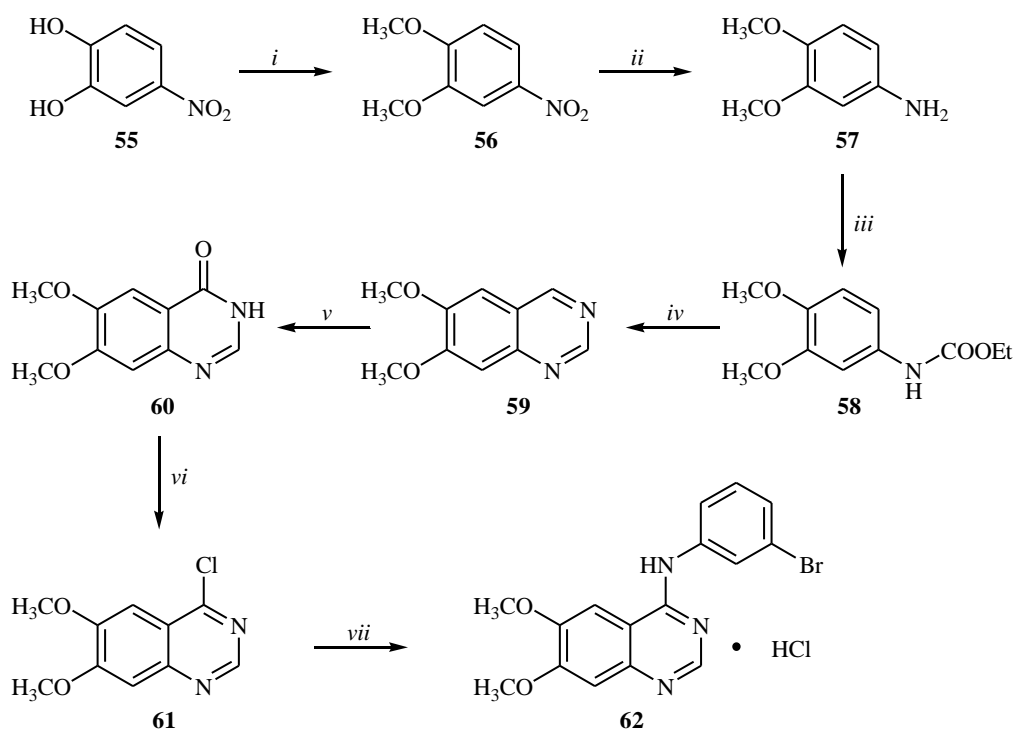
L'individuazione di una metodica innovativa e vantaggiosa per la sintesi del nucleo chinazolinico funzionalizzato nelle posizioni 6 e 7 è condizione indispensabile, ma non sufficiente per poter accedere ai derivati 4-anilinochinazolinici con rese migliori di quelle già note in letteratura. Infatti, come già ricordato all'inizio di questo capitolo, l'intermedio fondamentale per l'ottenimento di questa tipologia di derivati è il chinazolin-4-one, che a seguito di clorurazione può venir funzionalizzato con un adeguato sostituente anilिनico. Tuttavia, proprio perchè le strategie sintetiche classiche portano direttamente all'ottenimento dei chinazolinoni, la letteratura riguardante l'ossidazione delle chinazoline è particolarmente limitata, nonostante sia noto il meccanismo con cui questa avviene³⁴ (Schema 7).



Schema 7. Meccanismo di ossidazione e clorurazione del nucleo chinazolinico.

Va notato che l'ossidazione cui va incontro la chinazolina è peculiare di questo particolare derivato: la reazione, infatti passa attraverso la somma acido catalizzata di una molecola di acqua in posizione 4, a dimostrazione che il doppio legame in 3-4 ha carattere più vinilico che aromatico, giustificando buona parte della chimica di questi composti.

Pertanto, si è deciso di individuare le adeguate condizioni di ossidazioni per la sintesi utilizzando come composto di riferimento la 6,7-dimetossichinazolina. Quindi, dal 6,7-dimetossi-4(3*H*)-chinazolinone è stata completata la sintesi di PD153035 (Schema 8), un noto inibitore di EGFR (Figura 7).



Schema 8. Sintesi di PD153035. Condizioni di reazione:

- i Dimetilsolfato, K_2CO_3 , Acetone, riflusso, 2 ore, resa 96%.
- ii Ammonio formiato, Pd/C, EtOH, riflusso, 3 ore, resa quantitativa.
- iii $CICOEt$, TEA, THF anidro, TA, 30 minuti, resa quantitativa.
- iv 1) HMTA, TFA, MW, 10 minuti;
2) KOH 10%, $K_3Fe(CN)_6$, EtOH/ H_2O 1/1, riflusso, 4 ore, resa 81%.
- v CAN, AcOH, H_2O , TA, resa 80%.
- vi $POCl_3$, TEA, riflusso, 3 ore, resa 70%.
- vii *m*-Bromoanilina, $iPrOH$, MW, resa 81%.

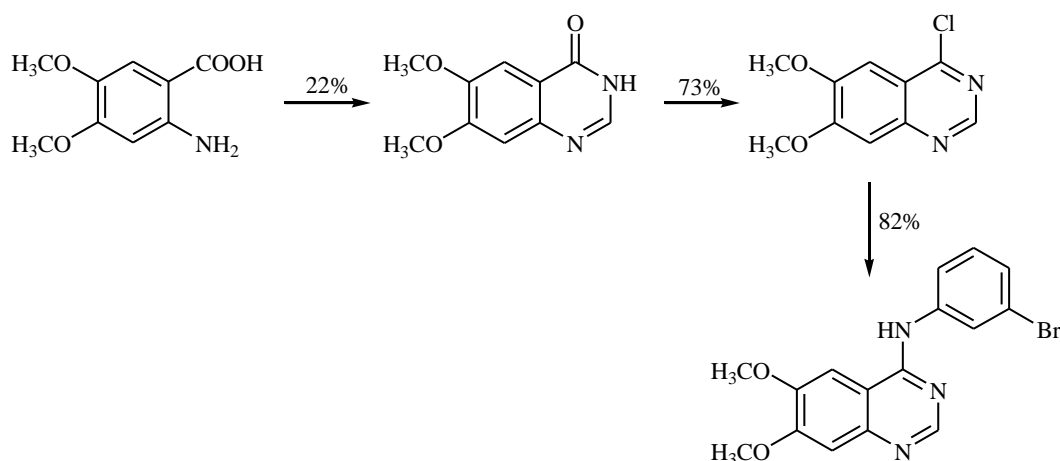
Il composto di partenza **55** è stato metilato con dimetilsolfato, portando all'ottenimento del 3,4-dimetossinitrobenzene (**56**), il cui nitro gruppo è stato sottoposto a riduzione a gruppo amminico per idrogenazione catalitica con ammonio formiato in etanolo a riflusso. Il derivato anilिनico **57** così ottenuto è risultato sufficientemente puro da poter essere sottoposto direttamente a protezione con etile cloroformiato in tetraidrofurano anidro in presenza di trietilammina. Il carbammato **58** è stato quindi sottoposto a reazione di condensazione del nucleo pirimidinico nelle condizioni descritte in precedenza, portando all'ottenimento della 6,7-dimetossichinazolina (**59**). Sul derivato **59** sono stati testati diversi protocolli di ossidazione, operando sempre in ambiente acido acquoso, caratteristica fondamentale per l'ossidazione di questi composti.

La 6,7-dimetossichinazolina è stata ossidata prima con acqua ossigenata al 30% in acido cloridrico 1M, ottenendo il 6,7-dimetossi-4(3*H*)-chinazolinone (**60**), ma con bassa resa (19%) e tempi di reazione molto lunghi (2 giorni). Un primo tentativo di ottimizzazione del metodo ha previsto l'uso di acqua ossigenata al 30% in acido solforico 4M, senza però ottenere il prodotto desiderato. Successivamente, è stato utilizzato come ossidante il sodio clorito in acido acetico, ma anche in questo caso senza ottenere alcun risultato. E' stata quindi tentata un'ulteriore metodica di ossidazione: la chinazolina in soluzione di acido acetico e acido solforico è stata trattata a temperatura ambiente con una soluzione acquosa di anidride cromica. In questo modo è stato ottenuto un netto miglioramento sia dal punto di vista del tempo di reazione (l'ossidazione avviene in circa 5 minuti), sia dal punto di vista della resa (35%). Tuttavia, al termine della reazione, è necessario trattare la miscela con idrossido di ammonio concentrato per ottenere la precipitazione del composto **60**. Tale processo di purificazione è risultato poco riproducibile e, nel suo complesso, la reazione si è rivelata estremamente sensibile alla quantità di chinazolina posta a reagire: se si tenta di eseguire l'ossidazione su grossi quantitativi (superiori ai 500 mg) si nota un drastico abbassamento della resa, che può scendere anche fino al 10 – 15%.

Per tentare di migliorare il protocollo sintetico, è stato utilizzato come agente ossidante il cerio ammonio nitrato (CAN): per trattamento del composto **59** con CAN in acido acetico e acqua è stato ottenuto il chinazolinone **60**, raccolto per

semplice filtrazione. Oltre ad ottenere una semplificazione della procedura operativa, l'ossidazione con il CAN ha portato anche ad un netto miglioramento della resa, raggiungendo l'80%, indipendentemente dalla quantità di prodotto di partenza. Il derivato chinazolinonico è stato quindi clorurato con ossicloruro di fosforo a riflusso in presenza di trietilammina³⁵, portando all'ottenimento della 4-cloro-6,7-dimetossichinazolina (**61**). Il cloroderivato è stato condensato con *m*-bromoanilina in alcol isopropilico mediante irraggiamento con microonde³⁶: per semplice raffreddamento della miscela di reazione al termine dell'irraggiamento è stata ottenuta la precipitazione del composto PD153035 sottoforma di cloridrato (**62**).

E' a questo punto possibile fare un confronto complessivo fra la strategia sintetica classica e il nuovo approccio qui presentato: passando attraverso la reazione di Niementowsky, PD153035 può venir ottenuto con una resa complessiva (cioè a partire dal primo composto commerciale) del 13% circa (Schema 9), nonostante in questo caso sia disponibile l'adeguato derivato dell'acido antranilico; mediante la sintesi *via* chinazolina lo stesso composto viene ottenuto con una resa complessiva del 32% e partendo da un derivato (il 4-nitrocatecolo) facilmente reperibile e di basso costo.



Schema 9. Sintesi di PD153035 riportata in letteratura.

Va evidenziato che in tutta questa via sintetica alternativa per l'ottenimento di derivati 4-anilinochinazolinici non sono necessarie operazioni di purificazione: tutte le reazioni mostrano totale regioselettività (non si assiste cioè alla formazione di miscele isomeriche) e tutti i prodotti vengono isolati mediante semplici operazioni di work-up senza bisogno di ulteriori purificazioni.

Il composto **62** è stato ottenuto con un grado di purezza (determinato mediante analisi elementare) tale da poterlo utilizzare direttamente nei saggi di valutazione biologica, come standard di riferimento.

5.2. SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DI EGFR

La seconda parte del progetto di dottorato ha previsto la sintesi di composti 4-anilinochinazolinici con potenziale attività inibitoria di EGFR, su modello di Erlotinib, PD153035 e Gefitinib (Figura 7).

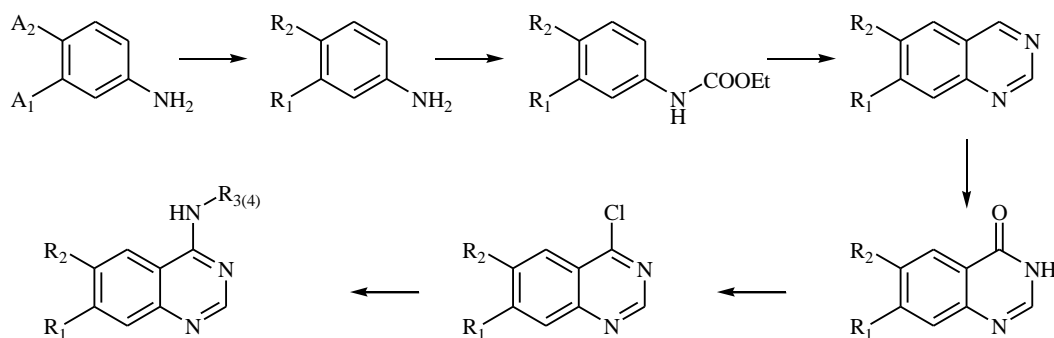
Le 4 classi di composti sintetizzate nel corso di questo lavoro di tesi sono riportate in Figura 1. Tali composti sono stati progettati in base ai dati disponibili in letteratura per valutare l'influenza di un terzo anello (aromatico o eteroalifatico) condensato sul nucleo chinazolinico e delle sue dimensioni (in particolare per quanto riguarda le tre classi dialcossiliche) sull'attività citotossica dei composti sintetizzati.

Sono state progettate altre due classi di composti (Figura 2), senza tuttavia realizzarne la sintesi.

La strategia sintetica utilizzata per la preparazione dei composti progettati prevede, in accordo con la nuova via sintetica messa a punto, i seguenti passaggi:

1. derivatizzazione di un adeguato derivato anilिनico di partenza con opportune funzionalizzazioni, che costituiranno i sostituenti in posizione 6 e 7 dei derivati finali;
2. protezione del gruppo amminico del prodotto di partenza come carbammato, mediante reazione a riflusso del derivato anilिनico con etile cloroformiato in tetraidrofurano in presenza di trietilammina;
3. ciclizzazione a derivato chinazolinico, mediante applicazione della tecnica "mista" MAOS/TFA/HTMA – riflusso/KOH/K₃Fe(CN)₆
4. ossidazione a chinazolin-4-one, mediante trattamento con CAN in soluzione acetica acquosa;
5. funzionalizzazione a derivato 4-clorochinazolinico, mediante trattamento a riflusso con POCl₃ in presenza di trietilammina;
6. ottenimento del prodotto finale per condensazione con opportuno derivato aminico, aromatico, eteroaromatico o etero alifatico.

La strategia descritta è riassunta nello Schema 10.

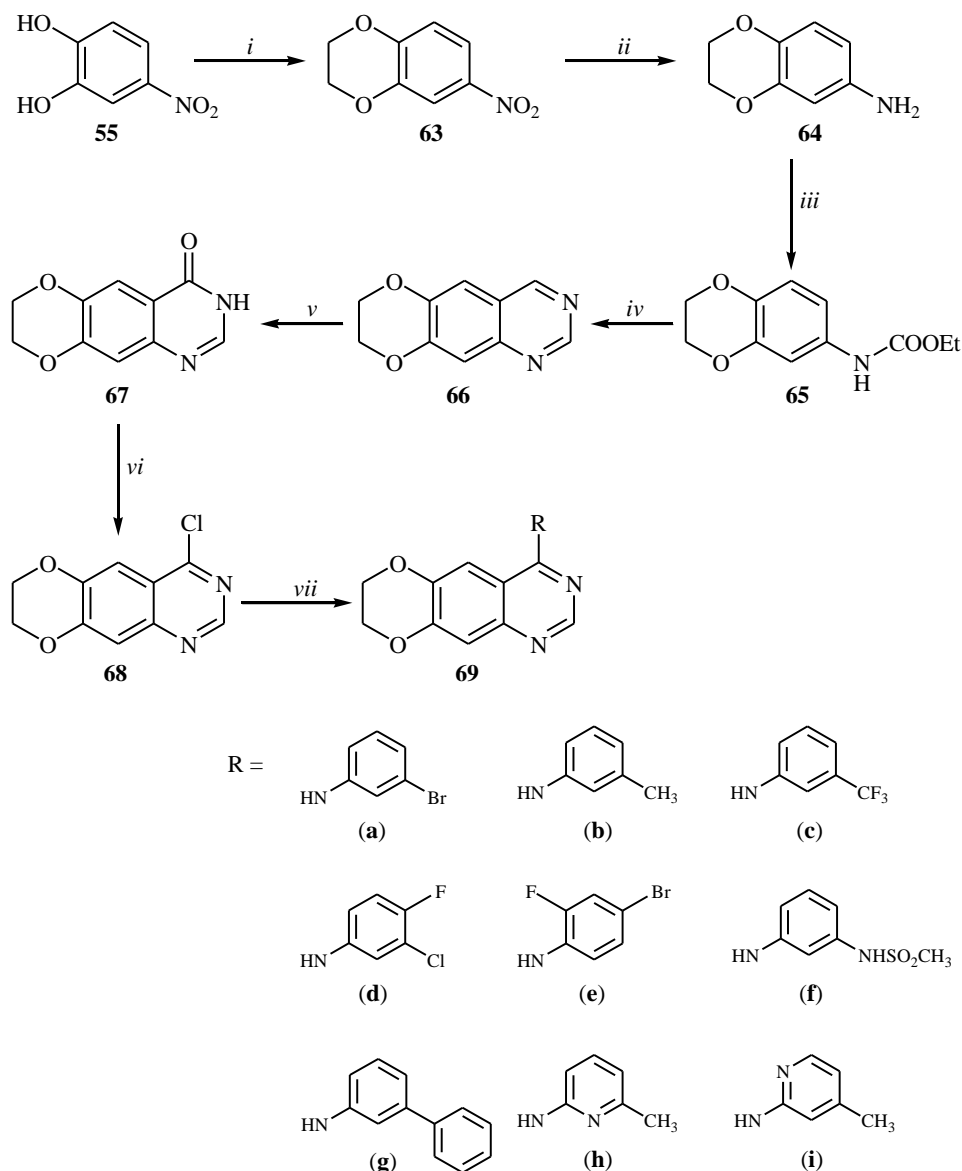


Schema 10. Strategia di sintesi per l'ottenimento dei composti progettati.

Eventuali modifiche puntuali ai passaggi di reazione sopra descritti verranno illustarti nel corso della discussione relativa allo step sintetico specifico.

5.2.1. SINTESI DI DERIVATI 6,7-ETILENDIOSSI-CHINAZOLINICI

Per la preparazione dei derivati etilendiossichinazolinici è stato utilizzato come prodotto di partenza il 4-nitrocatecolo (Schema 11). Il composto **55** è stato condensato con 1,2-dibromoetano, ottenendo il 3,4-etilendiossinitrobenzene (**63**). La reazione è stata dapprima tentata mediante irraggiamento con microonde: poiché la reazione è risultata notevolmente esotermica (e quindi non è stato possibile un controllo soddisfacente della temperatura), si è deciso di seguire la metodica di riscaldamento convenzionale a riflusso. Il nitroderivato, dopo cristallizzazione da etanolo, è stato ridotto con stagno cloruro a derivato amminico **64** che, senza ulteriori purificazioni, è stato sottoposto alla serie di reazioni precedentemente descritte per l'ottenimento della 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (**68**).



Schema 11. Sintesi di derivati etilendiosichinazolinici. Condizioni di reazione:

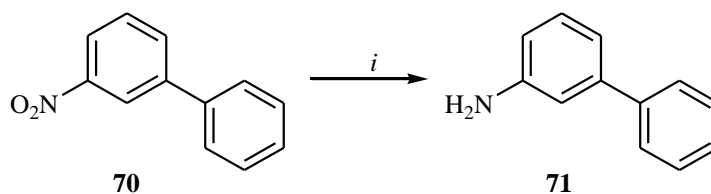
- i* 1,2-Dibromoetano, K_2CO_3 , glicole etilenico, $120^\circ C$, 4 ore, resa 82%.
- ii* $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, EtOH, riflusso, 2 ore, resa 70%.
- iii* $CICOOEt$, TEA, THF anidro, TA, 30 minuti, resa 77%.
- iv* 1) HMTA, TFA, MW, 10 minuti;
2) KOH 10 %, $K_3Fe(CN)_6$, EtOH/ H_2O 1/1, riflusso, 4 ore, resa 86%.
- v* CAN, AcOH, H_2O , TA, resa 65%.
- vi* $POCl_3$, TEA, riflusso, 3 ore, resa 87%.
- vii* RNH_2 , iPrOH , MW per **69a** – **69g**, rese da 72% a 88%;
 RNH_2 , NaH, THF anidro, riflusso, 1.5 ore, per **69h** e **69i**, rese 65% e 75%.

Quindi è stata effettuata la condensazione di diverse catene amminiche (aromatiche o eteroaromatiche) in posizione 4, mediante irraggiamento con microonde di una miscela di derivato 4-clorochinazolinico e appropriato derivato

amminico in isopropanolo. Con questa strategia sintetica sono stati ottenuti i cloridrati dei seguenti composti:

- ✓ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina (**69a**);
- ✓ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina (**69b**);
- ✓ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina (**69c**);
- ✓ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina (**69d**);
- ✓ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina (**69e**);
- ✓ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonamidofenil)ammina (**69f**);
- ✓ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina (**69g**).

Per l'ottenimento di quest'ultimo prodotto è stata utilizzata la 3-fenilanilina, che non è un prodotto commercialmente disponibile. È stato quindi necessario sintetizzare il composto **71** a partire dal 3-fenilnitrobenzene (**70**), per idrogenazione catalitica con ammonio formiato in etanolo a refluxo (Schema 12).



Schema 12. Sintesi di 3-fenil-anilina. Condizioni di reazione:
i Ammonio formiato, Pd/C 10%, EtOH abs, refluxo, 40 ore, resa 95%.

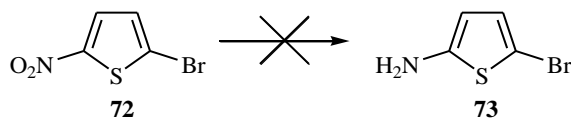
La condensazione delle funzioni amminopicoliniche **h** e **i** ha invece richiesto una via sintetica alternativa, utilizzando sodio idruro in tetraidrofurano anidro a refluxo. Non è stato infatti possibile ottenere questi ultimi composti mediante irraggiamento con microonde in isopropanolo, a causa della minor reattività del gruppo amminico delle amminopicoline: l'attivazione di questo gruppo funzionale richiede infatti la presenza di una base forte (come un idruro), che favorisce la formazione del corrispondente sale sodico, aumentando la velocità di condensazione con eliminazione di sodio cloruro.

Mediante questa tecnica, quindi, sono stati ottenuti i seguenti derivati:

- ✓ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina (**69h**);
- ✓ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina (**69i**).

Il prodotto **69h** è stato ottenuto anche mediante l'utilizzo di una particolare miscela di catalizzatori costituita da palladio acetato, BINAP e cesio carbonato nelle condizioni di Buchwald – Hartwig³⁷. Con questa metodica si aumenta la velocità d'uscita del cloro della chinazolina per azione del palladio, favorendo la condensazione della catena. Poiché la reazione richiede un work-up più complicato e porta a minor resa, si è preferito utilizzare le condizioni precedentemente descritte.

Il progetto prevedeva anche la condensazione con 2-ammino-5-bromotiofene, che non è un prodotto commerciale. Partendo quindi dal 2-nitro-5-bromotiofene si sono tentate varie strategie di sintesi per ridurre il nitrogruppo (Schema 13).

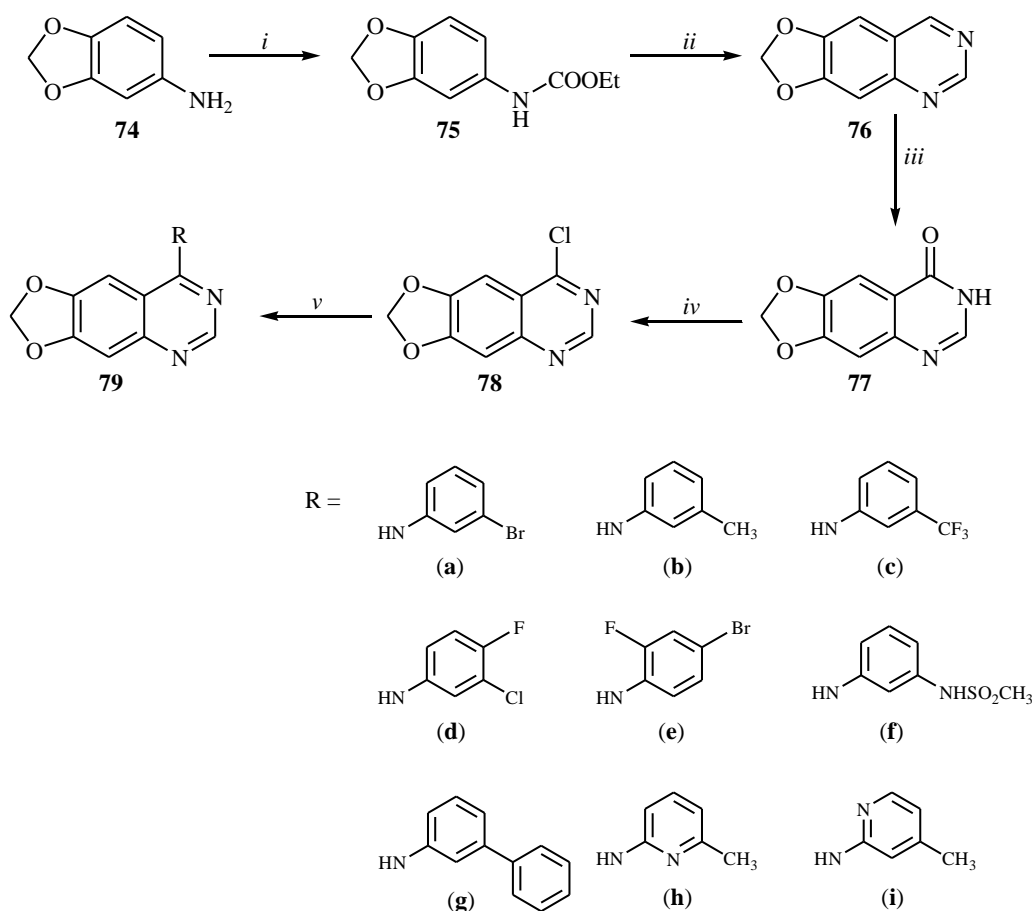


Schema 13. Tentativo di sintesi di 2-ammino-5-bromotiofene.

Nessuna prova eseguita ha portato all'ottenimento dell'amminoderivato: alcuni metodi di riduzione si sono rivelati insoddisfacenti (non è cioè stato ottenuto alcun prodotto), mentre in altri casi è stata ottenuta una miscela troppo complessa di prodotti. Si può presumere che il derivato amminotiofenico, qualora si formi, vada incontro a reazioni di degradazione, che ne rendono impossibile l'isolamento in quantità sufficienti a sottoporlo a reazione di condensazione.

5.2.2. SINTESI DI DERIVATI 6,7-METILENDIOSSI-CHINAZOLINICI

Per la sintesi dei derivati 6,7-metilendioossichinazolinici è stato scelto come prodotto di partenza la 3,4-metilendiossianilina (Schema 14), che è stata sottoposta senza variazioni al protocollo sintetico standard.



Schema 14. Sintesi di derivati 6,7-metilendioossichinazolinici. Condizioni di reazione:

- i* ClCOOEt , TEA, THF anidro, TA, 30 minuti, resa quantitativa.
- ii* 1) HMTA, TFA, MW, 10 minuti;
2) KOH 10%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, EtOH/ H_2O 1/1, riflusso, 4 ore, resa 83%.
- iii* CAN, AcOH, H_2O , TA, resa 68%.
- iv* POCl_3 , TEA, riflusso, 3 ore, resa 72%.
- v* RNH_2 , $^i\text{PrOH}$, MW per **79a** – **79g**, rese da 72% a 91%;
- vi* RNH_2 , NaH, THF, riflusso, 1.5 ore per **79h** e **79i**, rese 75 e 68%.

La 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina (**78**) è stato poi funzionalizzata con le appropriate catene amminiche, mediante irraggiamento con microonde in isopropanolo, ottenendo i cloridrati dei seguenti composti:

- ✓ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina (**79a**);
- ✓ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina (**79b**);
- ✓ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina (**79c**);
- ✓ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina (**79d**);
- ✓ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina (**79e**);
- ✓ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonamidofenil)ammina (**79f**);
- ✓ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina (**79g**).

Trattando il derivato **78** con gli opportuni derivati piridinici in tetraidrofurano anidro a refluxo in presenza di sodio idruro sono invece stati ottenuti i seguenti composti:

- ✓ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina (**79h**);
- ✓ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina (**79i**).

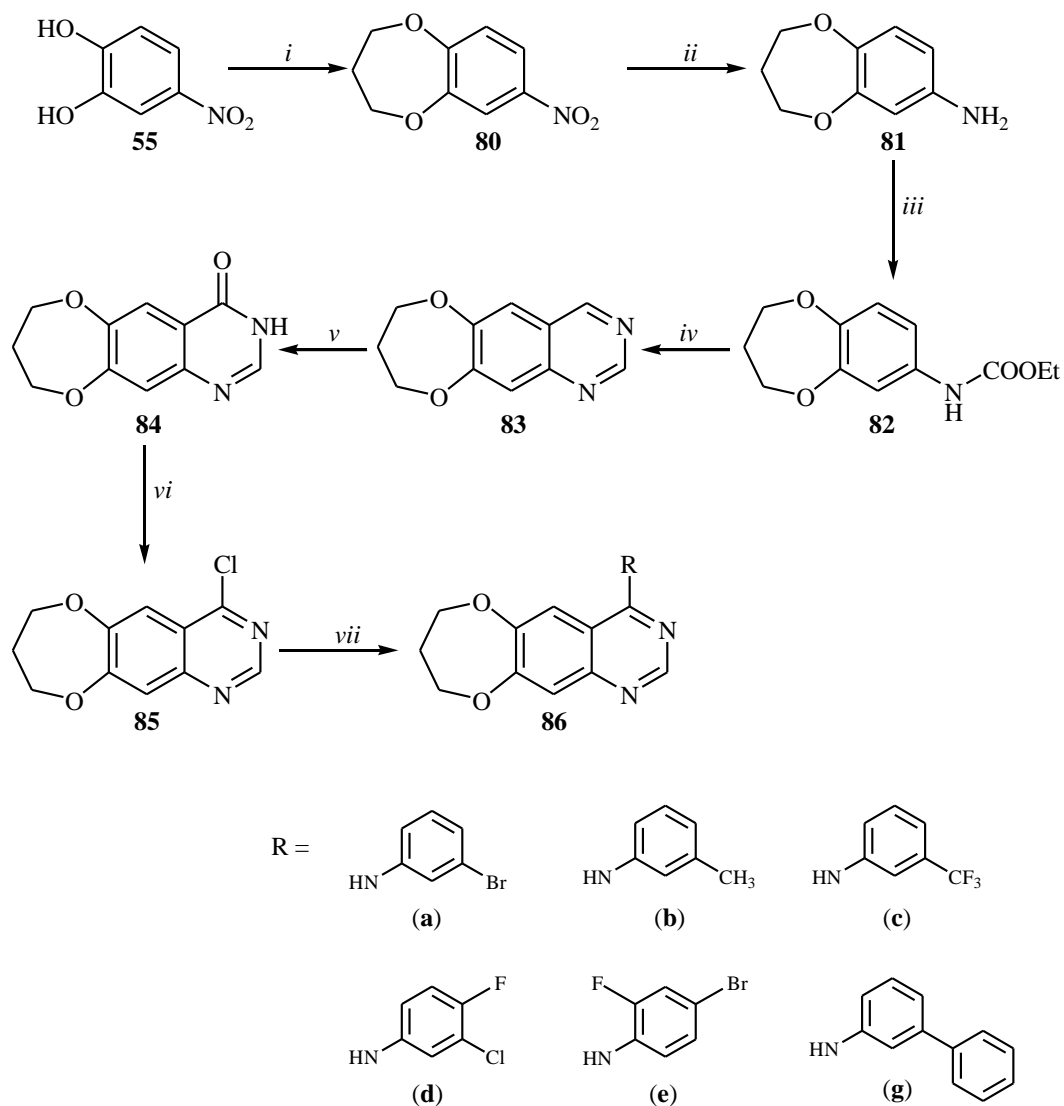
5.2.3. SINTESI DI DERIVATI 6,7-(1',3'-PROPILENDIOSSI)-CHINAZOLINICI

Come prodotto di partenza per la sintesi di questa classe di derivati è stato utilizzato il 4-nitrocatecolo (Schema 15).

Il composto **55** è stato condensato a riflusso con 1,3-dibromopropano in atmosfera di azoto, ottenendo, a seguito di sublimazione e ricristallizzazione da etanolo, il 3,4-(1',3'-propilendiossi)nitrobenzene (**80**). Il nitroderivato è stato sottoposto a idrogenazione catalitica, ottenendo la 3,4-(1',3'-propilendiossi)anilina (**81**), che non ha richiesto ulteriori processi di purificazione, ed è stata sottoposta alla consueta serie di reazioni, fino all'ottenimento del composto clorurato (**85**).

Infine è stata effettuata la condensazione delle diverse catene amminiche aromatiche in posizione 4, mediante irraggiamento con microonde. Con questa strategia sintetica sono stati ottenuti i cloridrati dei seguenti composti:

- ✓ [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-bromofenil)ammina (**86a**);
- ✓ [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-metilfenil)ammina (**86b**);
- ✓ [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-trifluorometilfenil)ammina (**86c**);
- ✓ [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina (**86d**);
- ✓ [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina (**86e**);
- ✓ [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(*m*-bifenil)ammina (**86g**).



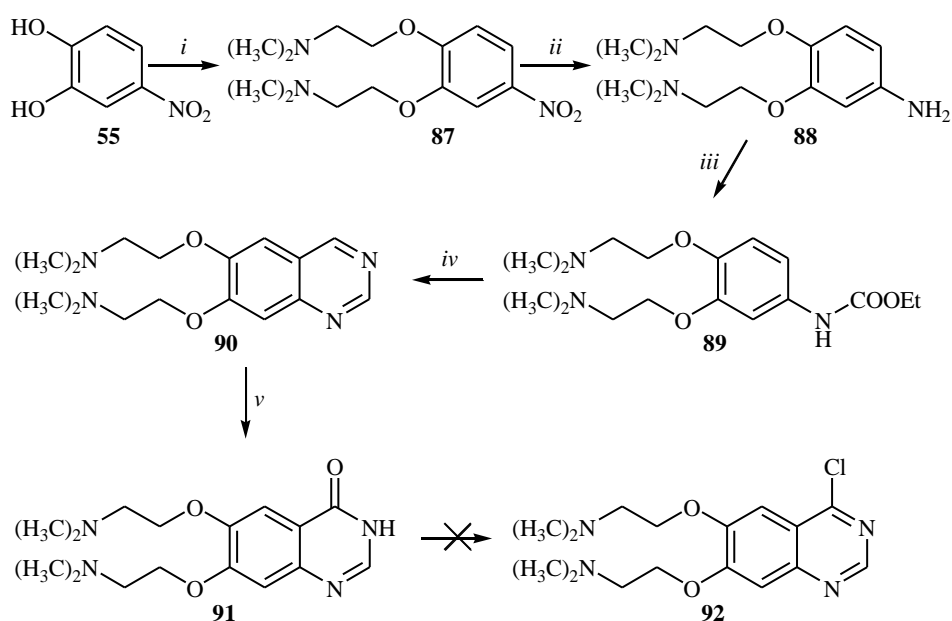
Schema 15. Sintesi di derivati 6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolinici. Condizioni di reazione:

- i* 1,3-Dibromopropano, K_2CO_3 , glicole etilenico, $120^\circ C$, 2 giorni, resa 60%.
- ii* H_2 , Pd/C 10%, EtOH assoluto, TA, 17 ore, resa quantitativa.
- iii* $ClCOOEt$, TEA, THF anidro, TA, 30 minuti, resa quantitativa
- iv* 1) HMTA, TFA, MW, $110^\circ C$, 10 minuti;
2) KOH 10 %, $K_3Fe(CN)_6$, EtOH/ H_2O 1/1, refluxo, 20 ore, resa 89%.
- v* CAN, AcOH, H_2O , TA, resa 73%.
- vi* $POCl_3$, TEA, refluxo 3 ore, resa 92%.
- vii* RNH_2 , iPrOH , MW, rese da 36 a 89%.

5.2.4. TENTATIVO DI SINTESI DI DERIVATI 6,7-bis(2'-*N,N*-DIMETILAMMINOETOSSI)CHINAZOLINICI

Anche per la sintesi di questa classe di composti è stato utilizzato come prodotto di partenza il 4-nitrocatecolo (Schema 16).

Il composto di partenza **55** è stato condensato con *N,N*-dimetilamminoetilcloruro cloridrato, ottenendo il 3,4-bis(2'-*N,N*-dimetilamminoetossi)nitrobenzene (**87**).



Schema 16. Tentativo di sintesi di derivati bis(dimetilamminoetossi)chinazolinici.

Condizioni di reazione:

- i* *N,N*-dimetilamminoetilcloruro cloridrato, K_2CO_3 , Bu_4NBr , acetone, riflusso, 16 ore, resa 56%.
- ii* Ammonio formiato, Pd/C 10%, EtOH, riflusso, 30 minuti, resa quantitativa.
- iii* ClCOOEt, TEA, THF anidro, TA, 1 ora, resa 67%.
- iv* 1) HMTA, TFA, MW, 10 minuti; KOH 10 %, 2) $K_3Fe(CN)_6$, EtOH/ H_2O 1/1, riflusso, 4 ore, resa 65%.
- v* CAN, AcOH, H_2O , TA, resa 76%.

Il composto **87** è stato ridotto a 3,4-bis(2'-*N,N*-dimetilamminoetossi)anilina (**88**) per idrogenazione catalitica con ammonio formiato. Il prodotto ottenuto è stato sottoposto a protezione con etile cloroformiato, ottenendo l'etile [3,4-bis(2'-*N,N*-dimetilamminoetossi)fenil]carbammato (**89**), che è stato ciclizzato a derivato

chinazolinico **90** e ossidato con cerio ammonio nitrato ottenendo il corrispondente chinazolinone (**91**).

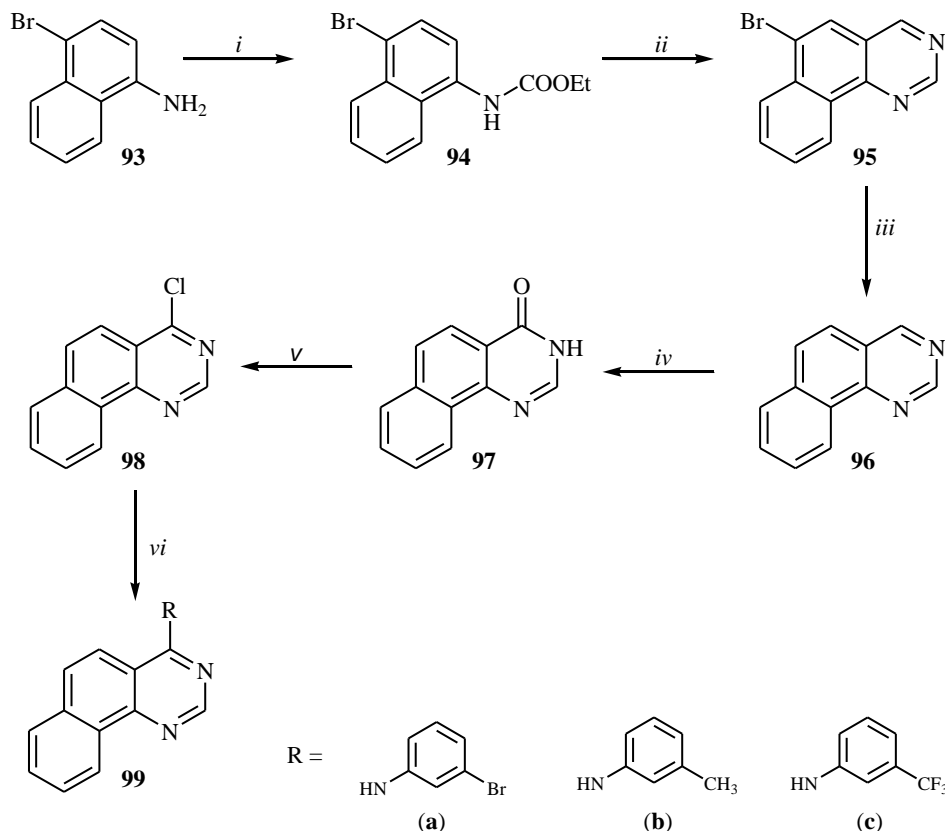
A differenza dei prodotti di ossidazione fino ad ora ottenuti, che risultano facilmente isolabili in quanto precipitano direttamente dalla miscela di reazione, il prodotto **91** ha richiesto un work-up particolare, data la sua elevata solubilità in acqua sia a pH acido (per la presenza delle due porzioni amminiche terziarie facilmente protonabili), sia a pH alcalino (a causa della salificazione dell'ossidrile fenolico in tautomeria con l'anello diidropirimidonic). Il composto presenta inoltre uno scarso coefficiente di ripartizione, rendendo impossibile un'estrazione diretta della molecola dalla miscela di reazione. Il 6,7-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)-4(3H)-chinazolinone è stato quindi estratto con estrattore Soxhlet per 40 ore, utilizzando come solvente etile acetato, dopo aver neutralizzato e concentrato a secchezza la miscela di reazione.

Sul prodotto ossidato **91** è stata tentata la clorurazione in posizione 4 con fosforo ossicloruro e trietilammina a refluxo, senza però ottenere il prodotto desiderato. Un secondo tentativo è stato effettuato con trifenilfosfina e carbonio tetracloruro in dicloroetano³⁸, sia mediante irraggiamento con microonde che con riscaldamento classico, ma senza mai ottenere il derivato **92**.

Poiché dai diversi tentativi di clorurazione sono sempre state ottenute miscele complesse di reazione, si è ipotizzato che la porzione dimetilamminica possa andare incontro a reazioni di idrolisi o di riarrangiamento; per questa ragione, la sintesi di questa classe di derivati è stata abbandonata.

5.2.5. SINTESI DI DERIVATI BENZO[h]CHINAZOLINICI

Per la sintesi dei derivati benzo[h]chinazolinici si è reso necessario utilizzare come prodotto di partenza la 4-bromo-1-naftilammina (Schema 17).



Schema 17. Sintesi di derivati benzo[h]chinazolinici. Condizioni di reazione:

- i* ClCOOEt , NaH , DMF anidra, TA, 30 minuti, resa quantitativa.
- ii* 1) HMTA , TFA , MW, 10 minuti;
2) KOH 10%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1, riflusso, 4 ore, resa 65%.
- iii* NaOEt 21% in EtOH , MW, 15 minuti, resa quantitativa%.
- iv* CAN , AcOH , H_2O , TA, resa quantitativa%.
- v* POCl_3 , TEA , riflusso 3 ore, resa 63%.
- vi* RNH_2 , ${}^i\text{PrOH}$, MW, rese da 56 a 75%.

Infatti, se si fosse partiti dal carbammato della 1-naftilammina si sarebbe ottenuto come unico prodotto la 4-formil-1-naftilammina, analogamente a quanto accade eseguendo la reazione sul carbammato dell'anilina. Il bromo in posizione 4, invece, consente di impedire tale reazione e al tempo stesso risulta essere un

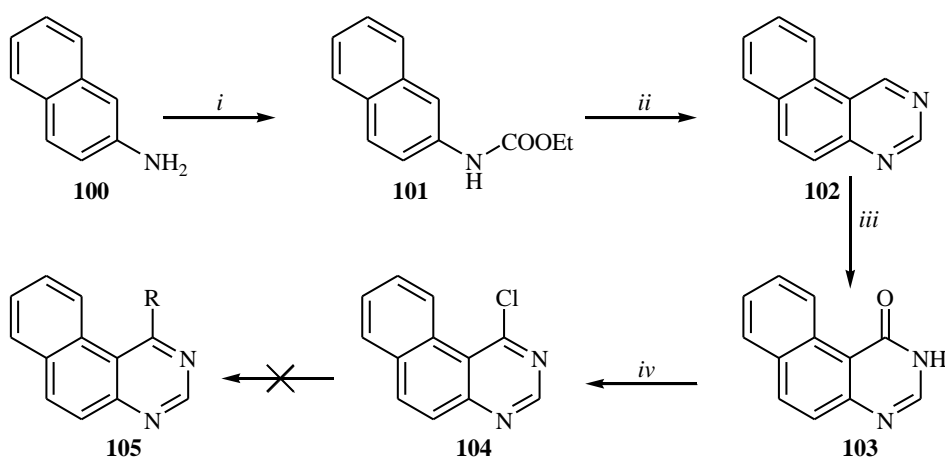
gruppo funzionale facilmente eliminabile. In questo caso, cioè, il bromo può essere visto in qualche modo come un gruppo protettore.

Seguendo l'ormai consolidato protocollo di sintesi, il composto **93** è stato protetto con etile cloroformiato, ma in dimetilformamide a riflusso in presenza di sodio idruro, in modo da rendere più drastiche le condizioni di reazione rispetto all'uso di trietilammina in tetraidrofurano, a causa della disattivazione del bromo. Il carbammato **94** è stato quindi sottoposto a reazione di formazione dell'anello pirimidinico (in presenza di un eccesso di urotropina rispetto alla metodica convenzionale) e la 6-bromobenzo[*h*]chinazolina è stata quindi dealogenata in etilato sodico al 21% in etanolo mediante irraggiamento con microonde. Il composto **96** così ottenuto è stato sottoposto ad ossidazione e successiva clorurazione. La 4-clorobenzo[*h*]chinazolina è stata quindi condensata con gli opportuni sostituenti anilinici in isopropanolo mediante irraggiamento a microonde, portando all'ottenimento dei cloridrati dei seguenti composti:

- ✓ (benzo[*h*]chinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina (**99a**);
- ✓ (benzo[*h*]chinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina (**99b**);
- ✓ (benzo[*h*]chinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina (**99c**);

5.2.6. TENTATIVO DI SINTESI DI DERIVATI BENZO[f]CHINAZOLINICI

Per il tentativo di sintesi dei derivati benzo[f]chinazolinici si è potuto partire direttamente dalla 2-naftilammina (Schema 18).



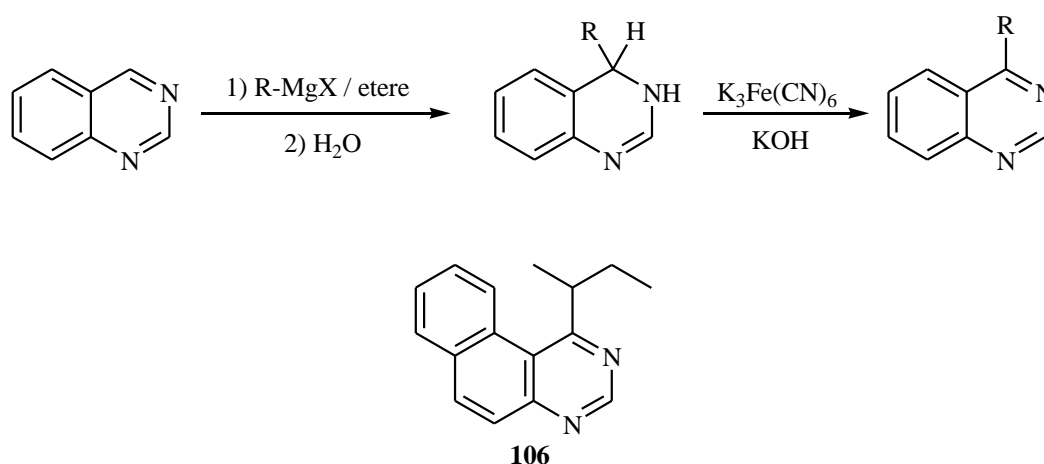
Schema 18. Tentativo di sintesi di derivati benzo[f]chinazolinici. Condizioni di reazione:

- i* ClCOOEt , TEA, THF anidro, TA, 30 minuti, resa 95%.
- ii* 1) HMTA, TFA, MW, 10 minuti;
2) KOH 10%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, EtOH/ H_2O 1/1, riflusso, 4 ore, resa 98%.
- iii* CAN, AcOH, H_2O , TA, resa 98%.
- iv* Trifenilfosfina, CCl_4 , CH_2Cl_2 , riflusso, 3 ore, resa 48%.

La strategia sintetica applicata fino all'ottenimento del derivato benzo[f]chinazolinico **103** non ha mostrato alcun inconveniente, mentre numerosi tentativi sono stati necessari per ottenere l'1-clorobenzo[f]chinazolina (**104**). Nelle condizioni di reazione già usate in precedenza, cioè riflussando il derivato chinazolinico in ossicloruro di fosforo in presenza di trietilammina, non è stato possibile ottenere alcun prodotto diverso da quello di partenza. Si è infatti notato come, nonostante dal monitoraggio della reazione mediante TLC si assistesse alla formazione di un nuovo prodotto con R_f superiore, al termine del work-up l'unico composto che si riusciva ad isolare era il benzochinazolinone di partenza. È noto che le clorochinazoline possono andare rapidamente in contro ad idrolisi in ambiente acido, ed evidentemente tale reazione di idrolisi risulta

notevolmente accelerata nel caso della benzo[*f*]chinazolina, tanto da renderne impossibile l'isolamento dalla miscela di reazione. Per evitare di operare in ambiente acido acquoso, la clorurazione è stata eseguita in diclorometano in presenza di tetracloruro di carbonio e trifenilfosfina, mediante irraggiamento con microonde. In questo modo, mediante purificazione per cromatografia su colonna, è stato isolato il derivato **104**. Tuttavia, l'elevata tendenza all'idrolisi del composto ha portato all'impossibilità di funzionalizzare il nucleo con i sostituenti anilini: sia irradiando la 1-clorobenzo[*f*]chinazolina in presenza di *m*-bromoanilina in isopropanolo, che sottoponendo i due composti a reazione nelle condizioni di Buchwald l'unico prodotto di reazione ottenuto è stato nuovamente il chinazolinone **103**.

Allo scopo di verificare ulteriormente che la ragione di tale insuccesso sintetico risiedesse solo nella peculiare tendenza a idrolizzare del composto **104**, la benzo[*f*]chinazolina è stata condensata con 2-butilmagnesiobromuro. E' infatti noto che il nucleo chinazolinico è in grado di sommare sali di Grignard sull'anello pirimidinico, portando, a seguito di aromatizzazione, a derivati alchilchinazolinici³⁹ (Schema 19).



Schema 19. Reazione fra chinazoline e reattivi di Grignard (in alto) e prodotto ottenuto dalla reazione con 2-butilmagnesiobromuro.

Dalla reazione è stato possibile ottenere e isolare il 2-(benzo[*f*]chinazolin-1-il)-butano (**106**), che è stato caratterizzato sia mediante spettro ¹H-NMR monodimensionale che NOESY, e mediante spettrometria di massa. La sintesi di tale derivato sembra escludere che l'impossibilità di ottenere derivati anilino-benzo[*f*]chianzolinici possa essere dovuta all'ingombro sterico generato dal terzo anello aromatico.

5.3. VALUTAZIONE BIOLOGICA

Tutti i composti sintetizzati sono stati testati per valutare la loro attività antiproliferativa. In questo capitolo verranno presentati alcuni dei risultati ottenuti dalle sperimentazioni biologiche. Come composto di riferimento è stato utilizzato il composto PD153035 (**62**). I composti sintetizzati sono riassunti in Tabella 5.

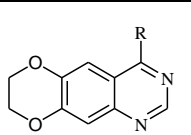
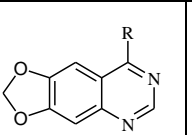
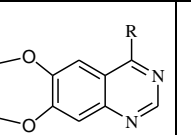
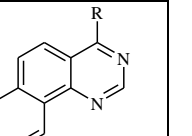
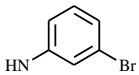
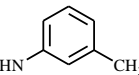
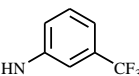
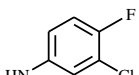
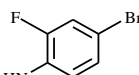
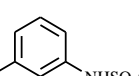
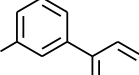
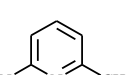
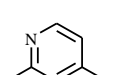
				
	69a	79a	86a	99a
	69b	79b	86b	99b
	69c	79c	86c	99c
	69d	79d	86d	-
	69e	79e	86e	-
	69f	79f	-	-
	69g	79g	86g	-
	69h	79h	-	-
	69i	79i	-	-

Tabella 5. Struttura e numero di identificazione dei composti sintetizzati.

5.3.1. EFFETTO CITOTOSSICO DEI COMPOSTI SINTETIZZATI

Tutti i composti sono stati saggiati per la loro citotossicità nei confronti di due linee cellulari, le A431 (carcinoma vulvare squamoso) e le NIH3T3 (fibroblasti embrionali di topo). Tali linee cellulari sono state appositamente scelte in quanto in grado di sovraesprimere e non esprimere, rispettivamente, EGFR. In questo modo, dalla comparazione dei valori di IC₅₀ si può fare una prima ipotesi di selettività nei confronti del recettore considerato. I dati di citotossicità espressi come IC₅₀ (\pm SD), misurati mediante MTT test dopo 72 ore di trattamento, sono riportati in Tabella 6.

n	69		79		86		99	
	A431	NIH3T3	A431	NIH3T3	A431	NIH3T3	A431	NIH3T3
a	0.75 \pm 0.09	>10	7.16 \pm 1.11	>10	8.17 \pm 0.76	n.d.	>10	>10
b	0.67 \pm 0.11	5.80 \pm 0.58	6.69 \pm 0.92	>10	6.29 \pm 0.62	n.d.	>10	>10
c	0.77 \pm 0.09	7.10 \pm 0.60	8.46 \pm 0.87	>10	4.73 \pm 0.56	n.d.	>10	>10
d	>10	>10	>10	>10	7.13 \pm 0.63	n.d.	-	-
e	6.28 \pm 0.46	5.40 \pm 0.20	>10	>10	> 10	n.d.	-	-
f	>10	>10	>10	>10	-	-	-	-
g	0.08 \pm 0.01	0.60 \pm 0.20	0.81 \pm 0.06	0.60 \pm 0.02	0.66 \pm 0.08	n.d.	-	-
h	n.d.	n.d.	>10	>10	-	-	-	-
i	5.17 \pm 0.84	6.60 \pm 1.07	n.d.	n.d.	-	-	-	-
std	PD153035		4.40 \pm 1.30	>10				

Tabella 6. Valori di citotossicità (μ M) misurata per i composti saggiati e per lo standard di riferimento. (n.d. = non ancora determinata).

Da questi dati emerge chiaramente come i derivati diossanici rappresentino la classe di composti di maggiore interesse, mentre i derivati benzo[h]chinazolinici non hanno mostrato attività citotossica. In particolare, mentre il composto **69a** presenta una buona selettività nei confronti delle cellule A431, i composti **69e** (che presenta la stessa porzione anilina di Vandetanib) e **69i** sembrano comportarsi da inibitori non selettivi, con un valore di citotossicità nei confronti delle cellule A431 paragonabile allo standard di riferimento. I derivati più interessanti, in ogni caso, sono quelli caratterizzati dalla presenza del sostituente amminobifenilico (**69g**, **79g** e **86g**): all'interno delle vari classi di composti, infatti, la presenza di questo sostituente aumenta la potenza citotossica di un ordine di grandezza rispetto agli altri derivati.

Alla data di stesura di questa tesi di dottorato, è ancora in corso la determinazione della citotossicità della classe delle propilendiossichinazoline sulle cellule NIH3T3.

Sui composti che hanno presentato una citotossicità apprezzabile, appartenenti alla classe delle etilendiossi e delle metilendiossichinazoline, sono stati quindi eseguiti ulteriori saggi biologici allo scopo di comprendere maggiormente il reale meccanismo di azione dei composti. Tali risultati verranno discussi nei capitoli seguenti.

5.3.2. DETERMINAZIONE DELLA REVERSIBILITA' DELL'INIBIZIONE DELLA CRESCITA CELLULARE

La valutazione della reversibilità dell'effetto inibitorio dei composti sintetizzati è stata valutata trattando le cellule A431 con due diversi protocolli e confrontando i dati ottenuti. Nel primo protocollo la misura della vitalità cellulare mediante MTT test è stata determinata dopo trattamento per 72 ore con i diversi inibitori ad una concentrazione fissa di 10 μ M. Nel secondo le cellule sono state trattate con i composti alla stessa concentrazione solo per 4 ore, rimuovendo quindi il medium di coltura e sostituendolo con terreno fresco (cioè privo di sostanze citotossiche) per 68 ore, misurando poi la vitalità cellulare. I risultati sono stati espressi come variazioni percentuali rispetto al controllo (culture cellulari non trattate), posto uguale a zero (\pm SD), determinate mediante almeno tre esperimenti indipendenti. I dati ottenuti sono riportati in Figura 19.

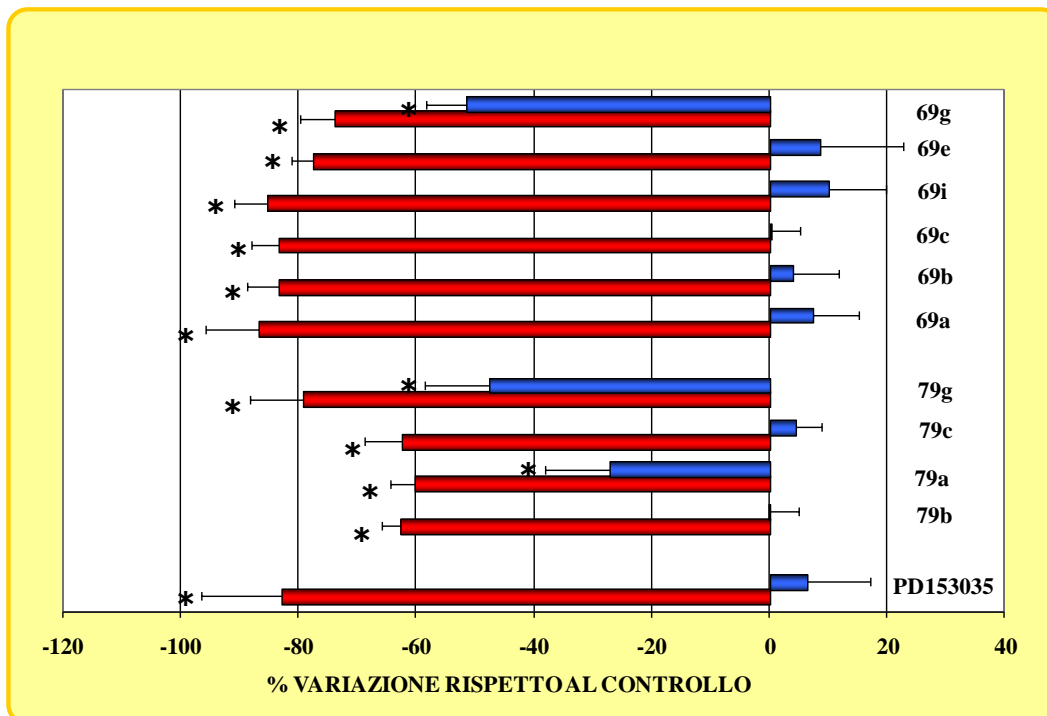


Figura 19. Reversibilità dell'effetto antiproliferativo.

Barre rosse = trattamento per 72 ore; barre blu = trattamento per 4 ore più 68 ore di recupero.

* = $p < 0.05$ vs cultura di controllo, test t di Student.

La maggior parte dei composti mostra un'azione reversibile, in quanto dopo eliminazione degli inibitori nel terreno di cultura (barre in blu) si ha una ripresa della vitalità cellulare. Tale comportamento sembra indicare un'attività citostatica. D'altro canto, i composti **69g**, **79g** e **79a** mantengono parzialmente la loro attività antiproliferativa, a conferma della loro probabile maggior affinità nei confronti di EGFR rispetto agli altri derivati saggiati.

5.3.3. VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PRO-APOPTOTICO IN VITRO

L'effetto pro-apoptotico dei composti è stato valutato trattando le cellule A431 per 24 ore con gli inibitori alle concentrazioni indicate nella Figura 20.

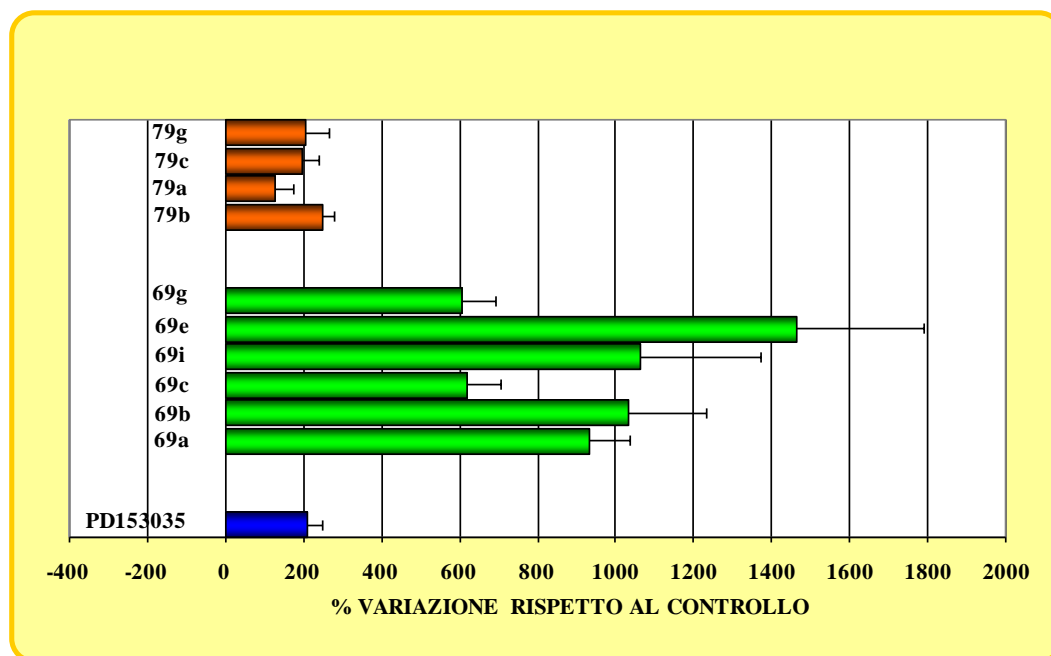


Figura 20. Valutazione dell'effetto pro-apoptotico.
 $p < 0.05$ vs cultura di controllo, test *t* di Student.
 Concentrazioni: **PD153035**, **69i**, **69e**, **79a**, **79b** e **79c** = 10 μ M;
69a, **69b**, **69c**, **79g** = 1 μ M; **69g** = 0.1 μ M.

Al termine del trattamento, le cellule sono state lisate e la quantità di mono- e oligo-nucleosomi è stata misurata mediante saggio immunoenzimatico. I risultati sono espressi come variazioni percentuali rispetto al controllo (culture cellulari non trattate), posto uguale a zero (\pm SD), determinate mediante almeno tre esperimenti indipendenti.

Tutti i composti mostrano un significativo aumento dell'apoptosi rispetto al controllo. È interessante notare come tutti i composti della classe delle etilendiossichinazoline mostrano un maggior effetto pro-apoptotico rispetto allo standard di riferimento, pur essendo stati saggiati a concentrazioni uguali se non nettamente inferiori (da 10 a 100 volte).

5.3.4. EFFETTO SULLA CRESCITA CELLULARE STIMOLATA DA EGF

Anche per la valutazione dell'effetto sulla crescita cellulare mediata da EGF sono stati utilizzati e confrontati due diversi protocolli. In un primo saggio (Figura 21A), le cellule A431 sono state trattate per 24 ore con gli inibitori a concentrazioni non citotossiche; quindi, il terreno di cultura è stato rimosso e sostituito con medium fresco contenente EGF alla concentrazione di 5 ng/ml e le cellule sono state incubate in queste condizioni per 72 ore. Nel secondo saggio (Figura 21B) le cellule A431 sono state incubate per 72 ore con gli inibitori alle stesse concentrazioni utilizzate in precedenza e contemporaneamente con EGF alla concentrazione di 5 ng/ml. Al termine di entrambi i protocolli di saggio, è stata misurata la vitalità cellulare mediante MTT test. I risultati sono espressi come variazioni percentuali rispetto al controllo (culture cellulari non trattate), posto uguale a zero (\pm SD) determinate mediante almeno tre esperimenti indipendenti.

Analogamente a PD153035, anche i composti **69g**, **79g** e **79c** sono in grado di abolire completamente l'effetto stimolatorio di EGF sulla crescita cellulare, rendendo le cellule insensibili alla stimolazione da parte del fattore di crescita.

Tale effetto, inoltre, non viene contrastato da EGF nemmeno dopo l'eliminazione dal medium di cultura degli inibitori.

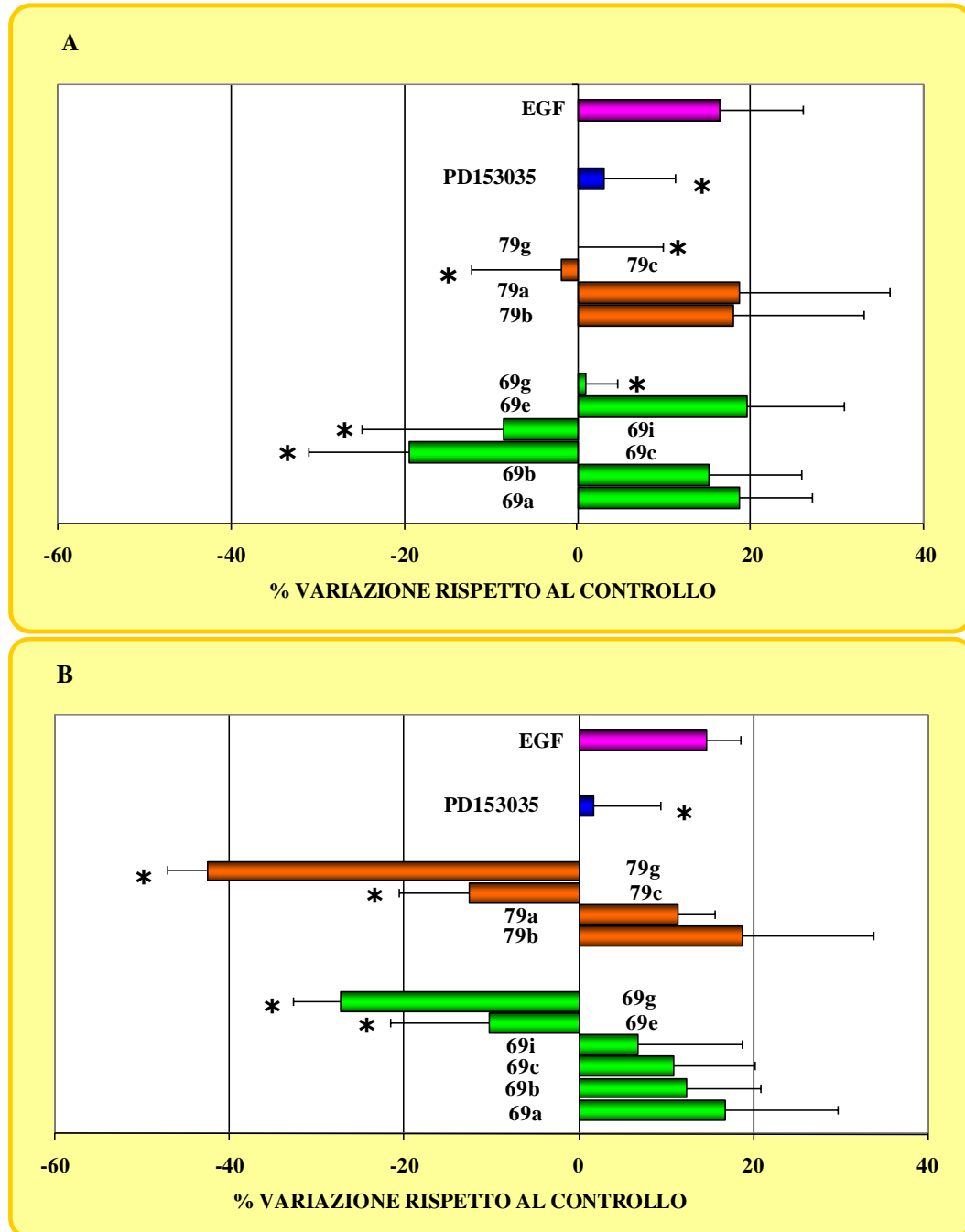


Figura 21. Effetto sulla crescita cellulare stimolata da EGF.
 A) trattamento con gli inibitori per 24 ore e poi con solo EGF per 72 ore.
 B) trattamento con inibitori ed EGF contemporaneamente per 72 ore.
 * = $p < 0.05$ vs cultura di controllo, test t di Student.
 Concentrazioni: PD153035, 69a, 69b, 69i, 69e e 69g = 0.01 μM ;
 79a, 79b, 79g e 69c = 0.1 μM ; 79c = 1.0 μM .

5.3.5. EFFETTO SULL'ATTIVITA' TIROSINCHINASICA

L'effetto sull'attività tirosinchinasica è stato determinato sui soli composti **69c**, **79c**, **69g** e **79g**. In particolare, è stata determinata l'inibizione della fosforilazione di un peptide sintetico [poli(Glu, Tyr) 4:1], dopo trattamento per 1 ora delle cellule A431 con gli inibitori ad una concentrazione di 10^{-8} μ M e precipitazione della frazione tirosinchinasica (Figura 22). I risultati sono espressi come variazioni percentuali rispetto al controllo (cellule trattate con PD153035), posto uguale a zero (\pm SD), determinate mediante almeno tre esperimenti indipendenti.

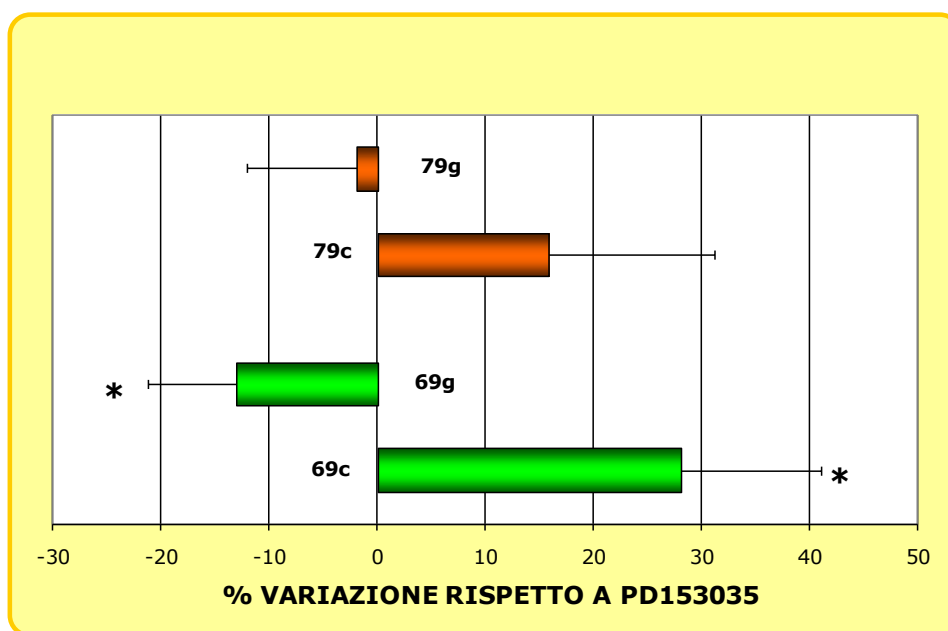


Figura 22. Effetto sull'attività tirosinchinasica.
* = $p < 0.05$ vs cultura di controllo, test t di Student.

Dai dati emerge ancora una volta come i composti caratterizzati dal sostituente amminobifenilico siano dei potenti inibitori di EGFR, mostrando un'attività maggiore (soprattutto per il composto **69g**) rispetto allo standard di riferimento anche sull'inibizione dell'attività tirosinchinasica.

5.4. APPROCCIO CN-QSAR PER LO STUDIO DI INIBITORI TIROSINCHINASICI

La parte terminale del lavoro qui presentato ha riguardato la messa a punto di una nuova strategia computazionale per lo studio e la progettazione di nuovi inibitori delle TK, basato su un approccio combinato Complex Networks – Quantitative Structure Activity Relationship. Infatti, nonostante l'importanza dello studio dell'intero complesso sistema costituito dalle TK e dai TKI, attualmente in letteratura appaiono solamente studi biologici o computazionali che prendono in considerazione una sola classe di composti e un solo target.

5.4.1. GENERAZIONE DEI MODELLI DI CLASSIFICAZIONE QSAR

Per migliorare le conoscenze in questo ambito, si è deciso di costruire un modello QSAR di classificazione basato sui dati disponibili in letteratura, prendendo in considerazione le strutture 2D e i valori di IC_{50} o pIC_{50} dei diversi TKI noti.

In particolare, sono stati considerati 1630 composti (appartenenti a più di 25 tipologie differenti di scaffold; Figure da 23 a 25) saggiati nei confronti di almeno una fra 10 delle TK coinvolte nella patologia tumorale⁴⁰.

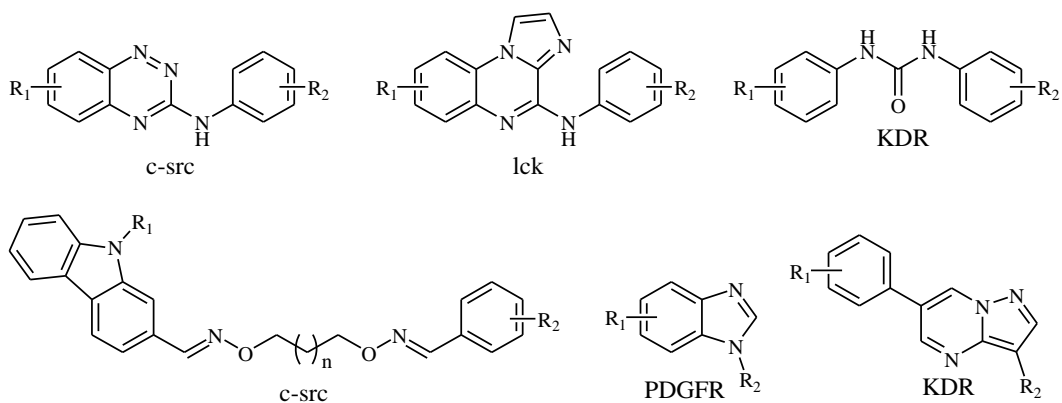


Figura 23. Scaffold dei diversi inibitori delle TK saggiati solo contro una TK (riportata sotto agli scaffold).

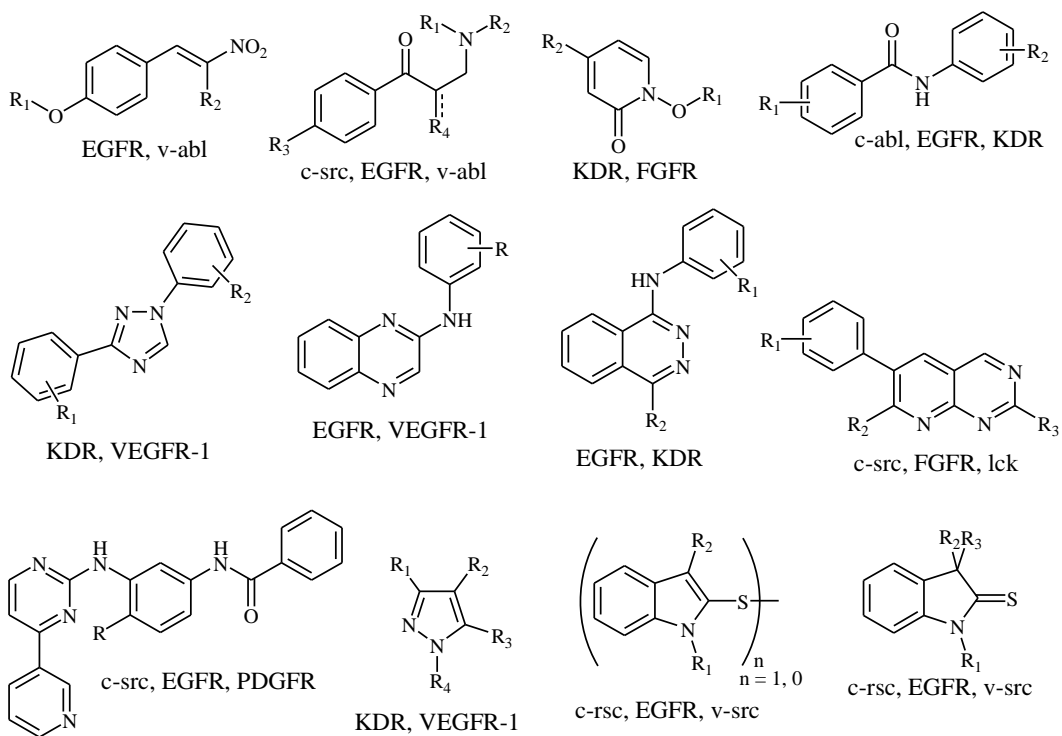


Figura 24. Scaffold dei diversi inibitori delle TK saggiati contro un ristretto pannello di TK (riportatae sotto agli scaffold).

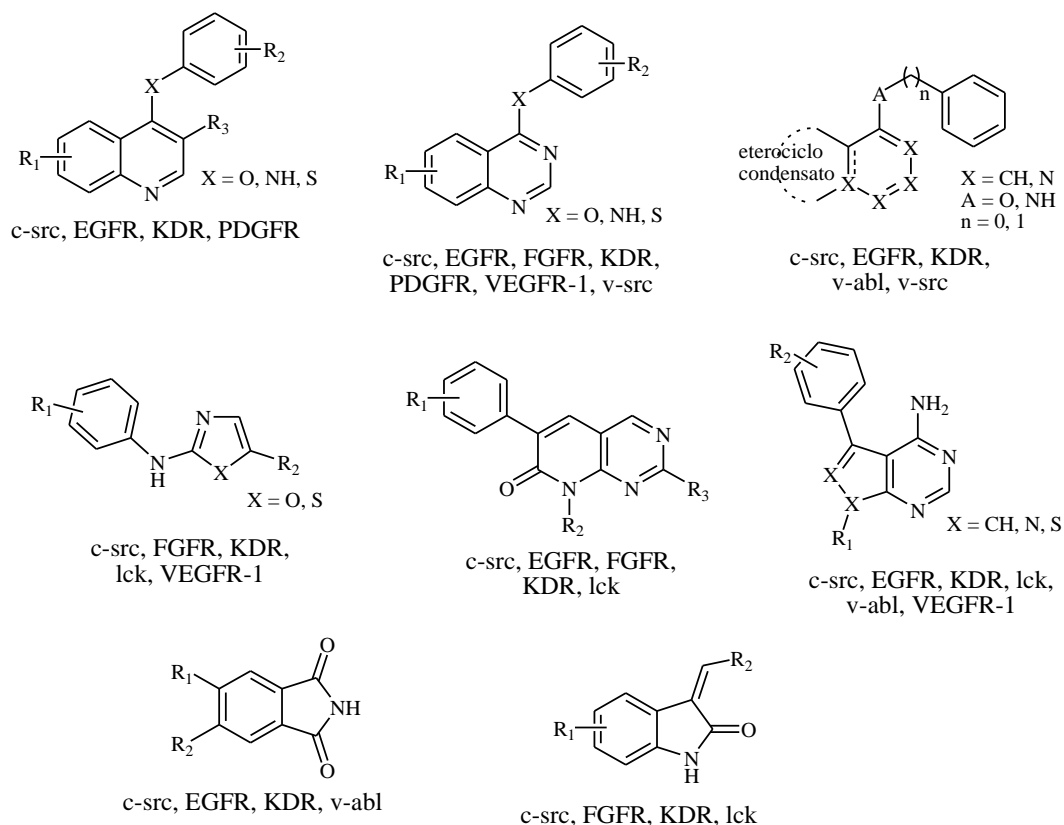


Figura 25. Scaffold dei diversi inibitori delle TK saggiati contro un vasto pannello di TK (riportate sotto gli scaffold).

Le TK considerate possono venir suddivise in due categorie: TK di membrana (o recettoriali: EGFR, FGFR, PDGFR, VEGFR-1 e VEGFR-2 o KDR) e TK citosoliche (o non recettoriali: c-abl, c-src, lck, v-abl e v-src). I TKI sono stati selezionati solamente sulla base del tipo di saggio biologico: sono infatti stati considerati solamente i composti valutati per la loro capacità di inibire la fosforilazione di un peptide sintetico poli-tirosinico. Poichè alcuni composti erano stati saggiati su più TK, in pratica sono stati presi in considerazione 2536 casi, o coppie di farmaco – enzima (Drug Enzyme Pair, DEP).

Dato l'ampio range di attività dei composti (da 120 μ M a 20 pM), si è deciso di considerare i composti come attivi o inattivi (generando cioè una variabile dipendente chiamata Class, C, che può assumere solo i valori 0 e 1) a seconda che la loro IC₅₀ fosse maggiore o minore di un certo valore (cut-off di attività). In particolare, sono stati considerati 7 diversi valori di cut-off, generando per ognuno un modello QSAR. Tutte le strutture molecolari dei TKI sono state ridisegnate e

trasformate nei corrispondenti codici SMILES, che sono stati utilizzati per calcolare un set di momenti spettrali da utilizzare come variabili indipendenti nei modelli.

Per il calcolo dei descrittori ci si è avvalsi dell'approccio TOPS-MODE del software *MODESLAB*⁴¹: a partire dal codice SMILES viene generata una matrice di adiacenza, in cui ogni elemento matriciale viene pesato sulla base del tipo di descrittore considerato, secondo un algoritmo matematico funzione del passo di calcolo k . Il valore finale del descrittore viene calcolato come sommatoria degli elementi appartenenti alla diagonale della matrice stessa.

Per ogni descrittore molecolare, quindi, viene calcolato un set di valori: tutti i descrittori molecolari al passo $k = 0$ hanno lo stesso valore, che corrisponde al numero di connessioni interatomiche, escludendo gli idrogeni. All'aumentare del passo di calcolo, aumentano le differenze di valore del descrittore molecolare fra isomeri strutturali (Figura 26): in questo modo, i descrittori molecolari possono venir considerati come degli indici topologici. Nell'esempio viene riportato il valore della superficie polare dei tre possibili isomeri della diazina.

$k = 1$	25.78	25.78	25.78
$k = 2$	261.23	178.15	178.15
$k = 3$	2831.80	1225.53	1225.53
$k = 4$	33751.77	8765.30	8599.15
$k = 5$	421695.96	63994.28	61317.16
$k = 6$	5411103.51	475763.51	443210.81

Figura 26. Approccio TOPS-MODE per il calcolo dei descrittori molecolari.

Avendo preso in considerazione più target, e poichè i diversi composti potevano essere (ad un dato cut-off) attivi su alcune chinasi e inattivi su altre, si è reso

necessario calcolare anche dei descrittori molecolari relativi agli enzimi. Per evitare di dover applicare degli algoritmi di minimizzazione dell'energia, si è deciso di non impiegare l'uso di descrittori ottenibili a partire dalla struttura 3D, anche perchè non tutte le strutture tridimensionali delle 10 TK sono state risolte. Quindi i set di descrittori molecolari associati ad ogni TK sono stati calcolati come media dei momenti spettrali dei relativi TKI attivi al cut-off di attività considerato. Ad esempio, al cut-off di 1.0 μM il momento dipolare (d) al passo $k = 4$ per EGFR vale:

$$\langle {}^d\mu_{4,EGFR} \rangle_{1.0 \mu\text{M}} = \sum_{k,i}^n {}^d\mu_{k,i} / n$$

in cui n è il numero di composti saggiati contro EGFR e aventi $C = 1$.

Infine, ad ogni DEP è stato associato un altro set di descrittori, calcolato come differenza fra il corrispondente descrittore associato al composto i e il momento spettrale medio associato alla TK. Ad esempio, per il caso $m = 500$ (che risulta essere associato a EGFR), la differenza del momento dipolare al cut-off di 1.0 μM e al passo $k = 4$ vale:

$$\Delta({}^d\mu_{4,500})_{1.0 \mu\text{M}} = {}^d\mu_{4,i} - \langle {}^d\mu_{4,EGFR} \rangle_{1.0 \mu\text{M}}$$

In questo modo, mediante l'utilizzo di un apposito software per l'analisi statistica, sono state ottenute 7 equazioni lineari del tipo $y = a \cdot \mu_1 + b \cdot \mu_2 + \dots + z$ da cui è stato possibile ricavare matematicamente la probabilità di attività (in una scala da 0 a 1) ad un dato cut-off, generando così i 7 modelli QSAR di classificazione. Sono stati predetti come attivi ad un dato cut-off i composti il cui valore di probabilità di attività sia risultato maggiore o uguale a 0.5.

Per la generazione dei modelli, si è operato in modo che almeno una delle variabili contenuta nell'equazione contenesse informazioni riguardanti le TK, così che il modello fosse in grado di discriminare fra i composti attivi nei confronti di un enzima e inattivi verso un altro. La scelta dei migliori descrittori molecolari da utilizzare nelle equazioni è stata fatta mediante l'algoritmo *forward stepwise* del modulo LDA del software *STATISTICA*⁴². Secondo tale algoritmo, ad ogni step di calcolo viene inserita la variabile indipendente con il maggior peso statistico sul modello e viene valutata la possibilità di rimuovere variabili già presenti, purchè non si abbia una riduzione della bontà del modello stesso. La procedura di calcolo

termina quando l'introduzione o l'eliminazione di variabili non porta ad un miglioramento del modello stesso o quando viene raggiunto il numero massimo di step di calcolo impostati. Va notato che il numero massimo di variabili che possono entrare in un modello generato mediante questo algoritmo corrisponde al numero di passaggi massimi concessi; nei modelli qui generati, il numero di passaggi limite è stato impostato a 8. Tutti i modelli di classificazione generati hanno mostrato un'Accuratezza totale del 72% circa, e la loro rilevanza statistica è stata determinata calcolando il livello di errore p mediante test F.

5.4.2. GENERAZIONE DELLE RETI COMPLESSE (CN)

Anzichè limitarsi alla sola generazione dei modelli QSAR, è stato affrontato un approccio innovativo basato sulla costruzione di CN per la descrizione-predizione del sistema costituito da TK e TKI. L'utilizzo di tali strumenti per lo studio di farmaci è ampiamente documentato in letteratura, ma fino ad oggi la costruzione delle CN è stata basata solamente su approcci puramente qualitativi. Per sopperire alla carenza di informazioni quantitative di questi approcci, si è deciso di valutare se fosse possibile utilizzare l'output dei modelli QSAR per costruire una serie di CN (una per ogni valore di cut-off) in grado di descrivere la reale complessità del sistema, cioè la CN basata sui reali valori di IC_{50} . Nell'approccio che si è deciso di affrontare, ogni nodo delle CN è costituito da un DEP e due nodi possono essere connessi solo se presentano un elemento in comune, cioè lo stesso TKI o la stessa TK. Questo modo di rappresentare una CN è un'elaborazione matematica delle Drug – Target CN (DT-CN) qualitative già utilizzate in letteratura, in cui si possono distinguere due tipologie di nodi: quelli che rappresentano un farmaco e quelli che rappresentano un bersaglio. Nelle CN classicamente utilizzate, il DEP è ciò che si ottiene connettendo due nodi: l'approccio qui proposto può quindi venir considerato come la prima derivazione del grafo DT-CN. E' chiaro quindi che la modalità di rappresentazione grafica non è da considerare come l'obiettivo principale del lavoro qui descritto.

Per arricchire di informazioni quantitative le CN sono state fatte due considerazioni:

1. per poter distinguere tra di loro due nodi è necessario introdurre un valore minimo (Treshold Value, TV) di differenza di IC_{50} (per la costruzione della CN reale) o di probabilità di inattività (per la costruzione delle CN basate sui modelli QSAR). Se la differenza di attività (o la probabilità di inattività) è inferiore al TV, la rete non è in grado di distinguere i due nodi e quindi di generare una connessione. Va notato che è necessario utilizzare la probabilità di inattività (uguale a 1 meno la probabilità di attività) perchè segue lo stesso andamento dell' IC_{50} : maggiore il valore, minore l'attività;
2. anzichè utilizzare dei semplici archi fra i nodi sono stati utilizzati dei vettori, in modo da poter distinguere le connessioni in entrata da quelle in uscita.

Un esempio esplicativo del processo di costruzione delle CN è riportato in Figura 27.

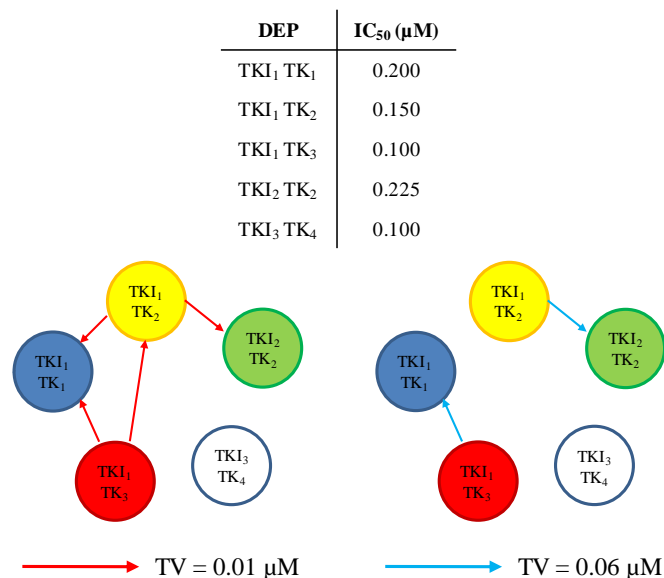


Figura 27. Approccio per la costruzione delle CN.

Come si vede nella figura, il nodo rappresentato in bianco non può essere connesso a nessun altro DEP in quanto non presenta nè lo stesso TKI nè la stessa TK di nessun altro nodo. Inoltre, in funzione del valore di TV si ha variazione del numero di nodi tra di loro connessi: il valore ottimale di TV per ogni rete è stato individuato tenendo conto che valori troppo bassi avrebbero portato ad un numero eccessivo di connessioni (rendendo così la CN troppo densa), mentre valori troppo alti avrebbero generato un numero elevato di nodi disconnessi.

Mediante questo tipo di approccio, le informazioni che la CN è in grado di fornire sono due:

1. se sono connessi due nodi che presentano lo stesso TKI, l'inibitore è più attivo nei confronti della TK connessa in uscita rispetto a quella connessa in entrata;
2. se sono connessi due nodi che presentano la stessa TK, l'enzima viene meglio inibito dal TKI entrante.

Generalizzando si può quindi dire che in queste CN l'elemento non in comune ai due nodi presente nel DEP connesso in uscita è in grado di interagire meglio con l'elemento in comune. La CN così costruita può essere considerata come una rete di spiazzamento teorico o, allo stesso tempo, di selettività.

Quindi, avvalendosi dell'approccio appena descritto, sono state costruite una CN basata sui valori di $IC_{50}/IC_{50\text{massima}}$ dei composti (Observed Complex Network, OCN) e 7 CN (Predicted Complex Networks, PCN), una per ciascun valore di cut-off, basate sui valori di probabilità di inattività estrapolati dai modelli di classificazione QSAR. Per la OCN non sono stati utilizzati direttamente i valori di IC_{50} ma una sorta di "attività normalizzata" in modo da poter utilizzare dei valori di TV paragonabili a quelli delle PCN.

5.4.3. CONFRONTO FRA CN

Ciascuna PCN è stata matematicamente sovrapposta alla OCN, variando in maniera indipendente i TV (rispettivamente indicati con OTV per la OCN e PTV per la PCN), fino a raggiungere la massima sovrapposizione possibile. Tale parametro è stato valutato non solo in termini di Sensibilità, Specificità e Accuratezza, ma è stato tenuto conto anche del numero di connessioni in entrata e in uscita e del numero di nodi disconnessi risultanti dai valori soglia utilizzati. Per la determinazione della massima sovrapposizione in assoluto ci si è avvalsi di un approccio statistico, raccogliendo i diversi parametri di valutazione in una variabile denominata Suitability (S) e correlandola con i valori di OTV e PTV ai diversi cut-off. La variabile S è stata quindi rappresentata per ogni cut-off come una superficie, e il massimo assoluto delle diverse superfici (Figura 28) è stato considerato associato al miglior set di valori di cut-off, OTV e PTV.

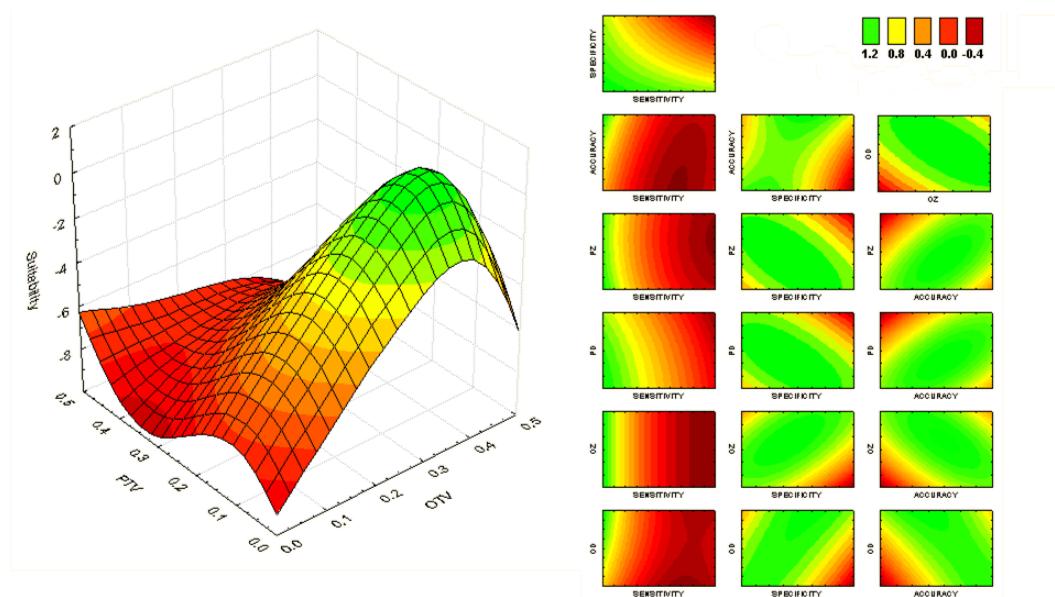


Figura 28. Esempio di superficie per la valutazione della variabile S. A sinistra è riportata la superficie 3D come funzione di OTV e PTV per il cut-off di $5.0 \mu\text{M}$. A destra sono rappresentati i diversi contributi dei parametri utilizzati per la definizione di S. Verde = alti valori di S; rosso = bassi valori di S.

La miglior sovrapposizione fra la OCN e le PCN è stata ottenuta con un cut-off di $5.0\mu\text{M}$, utilizzando per OTV e PTV rispettivamente i valori 0.415 e 0.110. Con questi parametri la PCN ottenuta ha presentato una bassa percentuale di nodi disconnessi (0.3%) ed un numero medio di connessioni di 265 (cioè mediamente ogni DEP è risultato essere connesso con il 10% circa del totale dei nodi). La PCN considerata è in grado di classificare correttamente il 72.60% dei nodi connessi e il 71.63% dei nodi non connessi, con un'Accuratezza totale del 71.69%. E' da notare che tale valore di Accuratezza coincide con quella del modello QSAR utilizzato per la sua generazione, ad indicare che nel passare dall'out-put del modello di classificazione alla generazione della rete non si ha perdita di informazioni.

5.4.4. VALIDAZIONE DELLA PCN_{5.0μM}

Per la validazione della PCN_{5.0μM} sono state eseguite sia l'analisi della curva ROC (Receiver Operating Characteristic) che il confronto con reti complesse aleatorie (Random Complex Networks, RCN).

L'analisi della curva ROC è un test per la valutazione di sistemi di classificazione in cui il numero dei soggetti "attivi" e di quelli "non attivi" variano in funzione di un certo valore soglia⁴³. In particolare, nel grafico della curva ROC vengono riportati i valori di Sensibilità/100 del classificatore vs (100-Specificità)/100, calcolati ai diversi valori soglia. In un classificatore casuale, la curva ROC coincide con una retta a 45°, generando quindi un'area sottesa dalla curva pari a 0.5, mentre un classificatore ideale dovrebbe sottendere un'area pari a 1.

La curva ROC ottenuta dalla sovrapposizione della OCN e della PCN_{5.0μM} calcolata variando OTV e PTV è riportata in Figura 29. L'area sottesa dalla curva è pari a 0.7.

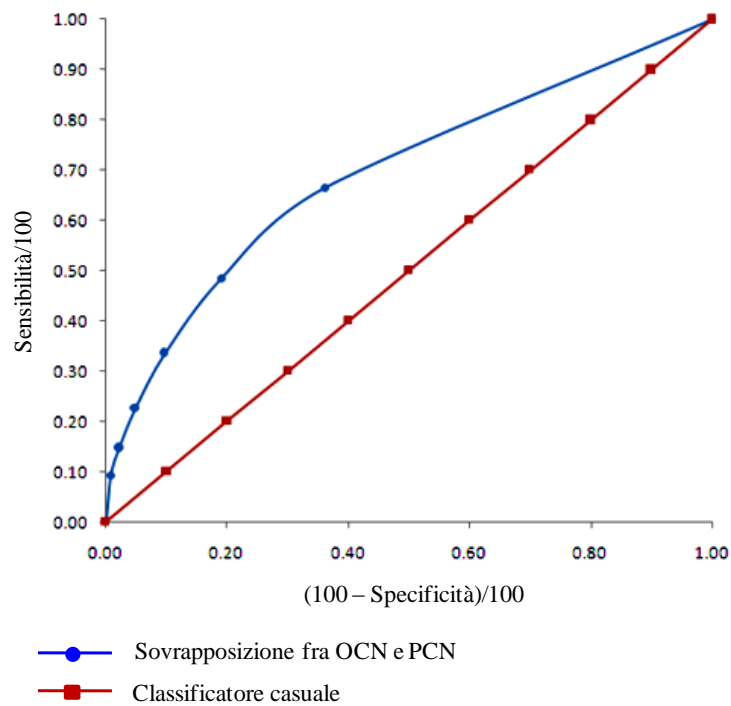


Figura 29. Curva ROC ottenuta dalla sovrapposizione fra OCN e PCN_{5.0μM}.

Infine, utilizzando l'algoritmo di Erdos-Renyi, sono state generate due CN aleatorie (rispettivamente ORCN e PRCN), una basata sul numero di connessioni indirette della OCN e una sul numero di connessioni indiette della PCN. Per dimostrare che la PCN si sovrappone in maniera non casuale alla OCN sono quindi stati calcolati e confrontati una serie di parametri caratteristici delle CN (Tabella 7).

OCN	Parametri	ORCN
2536	m	2536
66052	e	65677
17740754	W	14911400
9	D	3
3.68	Dist	2.32

PCN_{5.0μM}	Parametri	PRCN_{5.0μM}
2536	m	2536
335967	e	335623
20482170	W	12186274
6	D	2
3.22	Dist	1.90

Tabella 7. *Confronto fra OCN, PCN e relative RCN.*
m = numero di nodi; e = numero di connessioni dirette;
W = indice di Wiener; D = diametro della rete; Dist = distanza media.

Come si può notare, in tutti i casi i valori relativi alle RCN sono significativamente diversi da quelli delle CN considerate in questo lavoro di tesi. In particolare, è interessante notare come il diametro delle reti aleatorie sia sensibilmente inferiore rispetto a quello trovato nella OCN e nella PCN.

6. PARTE SPERIMENTALE

6.1. SINTESI DI DERIVATI CHINAZOLINICI

6.1.1. MATERIALI

I prodotti ed i reagenti impiegati (*Acros* ed *Aldrich*) sono stati utilizzati come tali, senza purificazioni.

La purezza dei solventi organici (*Carlo Erba* e *Lab Scan*) è di grado analitico.

I solventi deuterati utilizzati per NMR (*Isotec*) presentano grado di purezza isotopica minimo 99.5%.

La cromatografia su strato sottile è stata effettuata su lastre al gel di silice 60 F₂₅₄ (0.2 mm, *Merck*), eluendo come indicato volta per volta.

La cromatografia su colonna è stata eseguita utilizzando gel di silice 60 (0.063-0.100 mm, *Merck*), eluendo con i solventi di volta in volta indicati.

6.1.2. STRUMENTAZIONE

I punti di fusione sono stati determinati in capillare aperto, utilizzando un apparecchio per punto di fusione Gallenkamp MFB-595-010M.

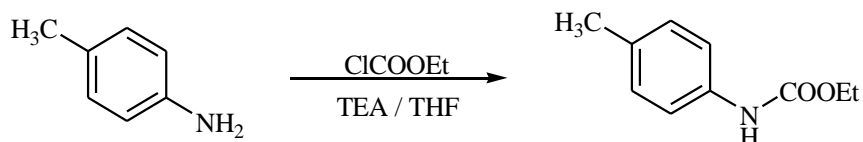
Gli spettri ¹H-NMR sono stati eseguiti con spettrometro Bruker 300-AMX, utilizzando TMS come standard interno ($\delta = 0$) ed i solventi deuterati di volta in volta indicati; i valori di assorbimento sono espressi in δ e le costanti in Hz.

Gli spettri di massa sono stati realizzati su spettrometro Applied Biosystem Mariner System 5220 per iniezione diretta del campione.

6.1.3. METODI

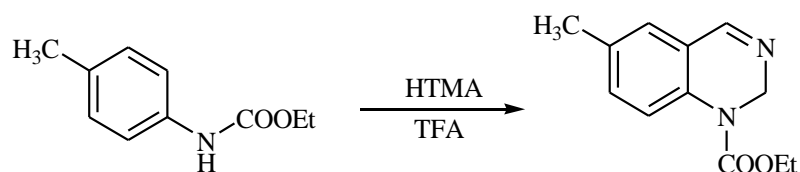
6.1.3.1. SINTESI DI 6-METILCHINAZOLINA

Sintesi di etile (4-metilfenil)carbammato



Ad una soluzione di 4-metilanilina (5.2 g, 48.5 mmoli) in THF anidro (500 ml) e TEA (13.5 ml, 97.1 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (9.3 ml, 97.1 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'etile (4-metilfenil)carbammato (8.7 g, resa quantitativa), di consistenza oleosa.

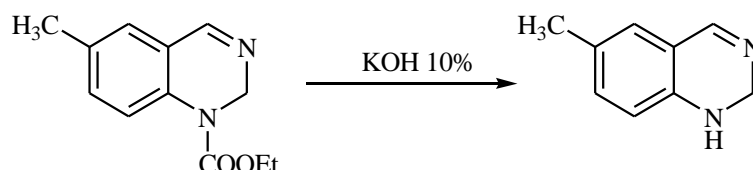
¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.37 (d, J = 8.2, 2 H, 3-H e 5-H o 2-H e 6-H); 7.13 (d, J = 8.2, 2 H, 3-H e 5-H o 2-H e 6-H); 4.22 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃); 2.33 (s, 3 H, CH₃); 1.35 (t, J = 7.1, 3 H, NHCOOCH₂CH₃).

Sintesi di etile (6-metil-2H-chinazolin-1-il)carbossilato

Ad una soluzione di etile (4-metilfenil)carbammato (1.0 g, 5.6 mmoli) in TFA (40 ml) è stata aggiunta HMTA (5.5 g, 39.1 mmoli), e la miscela di reazione è stata posta a riflusso per 1 ora (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata ripresa con HCl 4M (320 ml) e il residuo insolubile è stato allontanato per filtrazione. La soluzione acquosa limpida è stata concentrata a secchezza, il residuo solido è stato ripreso con H₂O (320 ml) e la soluzione è stata neutralizzata con NaHCO₃ ed estratta a fondo con EtOAc (3 x 200 ml). La fase organica è stata concentrata, anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo l' **etile (6-metil-2H-chinazolin-1-il)carbossilato** (1.0 g, resa 80%), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.32 (t, J = 2.0, 1 H, 4-H); 7.58 (d, J = 8.3, 1 H, 8-H); 7.35 (dd, J = 8.3, J = 1.6, 1 H, 7-H); 7.29 (d, J = 1.6, 1 H, 5-H); 5.29 (d, J = 2.0, 2 H, 2-H_a e 2-H_b); 4.23 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃); 2.35 (s, 3 H, CH₃); 1.29 (t, J = 7.1, 3 H, NHC₂H₅).

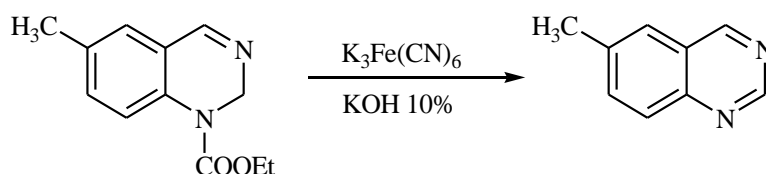
Sintesi di 6-metil-1,2-diidrochinazolina



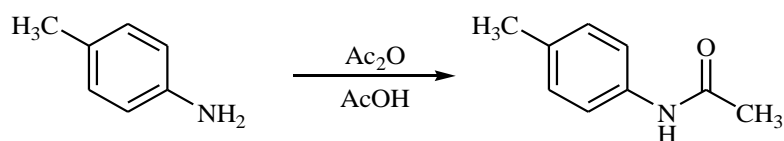
Una soluzione di (etile 6-metil-2*H*-chinazolin-1-il)carbossilato (1.0 g, 4.5 mmoli) in KOH 10% in EtOH/H₂O 1/1 (200 ml) è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela è stata estratta con toluene (3 x 100 ml) e la fase organica è stata concentrata, anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **6-metil-1,2-diidrochinazolina** (0.6 g, resa 92%), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.95 (t, *J* = 1.6, 1 H, 4-H); 6.96 (dd, *J* = 8.1, *J* = 1.5, 1 H, 7-H); 6.92 (d, *J* = 1.5, 1 H, 5-H); 6.45 (d, *J* = 8.1, 1 H, 8-H); 5.86 (s, 1 H, NH); 4.77 (d, *J* = 1.6, 2 H, 2-H_a e 2-H_b); 2.14 (s, 3 H, CH₃).

Sintesi di 6-metilchinazolina dall'intermedio *N*-carbamoildiidrochinazolinico

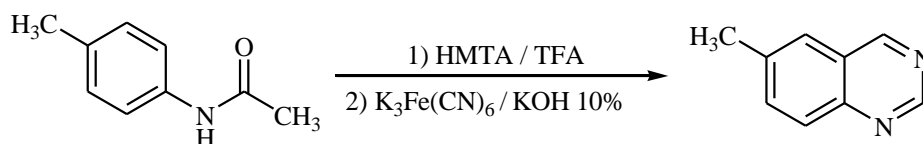


Ad una soluzione di etile (6-metil-2*H*-chinazolin-1-il)carbossilato (0.2 g, 1.0 mmole) in KOH 10% in EtOH/H₂O 1/1 (30 ml) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (2.6 g, 8.0 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (30 ml) ed estratta a fondo con EtOAc (3 x 30 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **6-metilchinazolina** (50 mg, resa 35%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Sintesi di 4-metilacetanilide

Una soluzione di 4-metilanilina (1.1 g, 10.0 mmoli) in AcOH (10 ml) e Ac₂O (10 ml) è stata posta a riflusso per 45 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata lentamente versata in H₂O e ghiaccio (100 ml), ottenendo un abbondante precipitato che è stato raccolto per filtrazione e lavato con abbondante acqua, ottenendo la **4-metilacetanilide** (1.4 g, resa 96%), con p.f. 149 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.36 (d, J = 7.1, 2 H, 2-H e 6-H); 7.08 (d, J = 7.1, 2 H, 3-H e 5-H); 2.29 (s, 3 H, CH₃); 2.11 (s, 3 H, COCH₃).

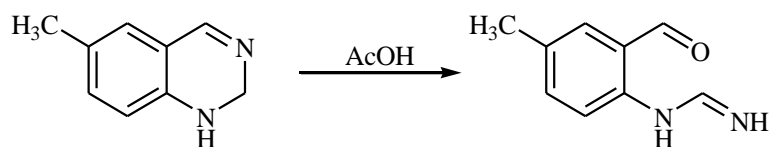
Sintesi di 6-metilchinazolina da 4-metilacetanilide

Ad una soluzione di 4-metilacetanilide (0.7 g, 4.7 mmoli) in TFA (30 ml) è stata aggiunta HMTA (4.6 g, 32.9 mmoli), e la miscela di reazione è stata posta a riflusso per 1 ora (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata ripresa con HCl 4M (240 ml) e il residuo insolubile è stato allontanato per filtrazione. La soluzione acquosa limpida è stata concentrata a secchezza, il residuo solido è stato ripreso con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1/1 (360 ml). Alla miscela (pH ≥ 10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (12.4 g, 37.6 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (360 ml) ed estratta a fondo con EtOAc (3 x 300 ml). La fase organica è stata

anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: CHCl_3), portando all'isolamento di piccole quantità di **6-metilchinazolina**, con p.f. e spettro $^1\text{H-NMR}$ uguali al composto precedentemente preparato e di **2,8-dimetil-5,11-metilen-5,6,11,12-tetraidro-dibenzo[*c,g*][1,5]diazocina (base di Tröger)**, con p.f. 136 °C.

$^1\text{H-NMR}_{\text{base di Tröger}}$ (CDCl_3-d): 7.02 (d, $J = 8.2$, 2 H, 3-H e 9-H o 4-H e 10-H); 6.95 (d, $J = 8.2$, 2 H, 3-H e 9-H o 4-H e 10-H); 6.70 (s, 2 H, 1-H e 7-H); 4.64 (d, $J = 16.6$, 2 H, 2 x CH_aN); 4.30 (s, 2 H, NCH_2N); 4.10 (d, $J = 16.6$, 2 H, 2 x CH_bN); 2.21 (s, 6 H, 2 x CH_3).

Sintesi di *N*-(2-formil-4-metilfenil)formammidina



Una soluzione di 6-metil-1,2-diidrochinazolina (0.6 g, 4.1 mmoli) in AcOH (30 ml) è stata posta a riflusso per 1 ora (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela è stata ripresa con H_2O (200 ml), neutralizzata con NaHCO_3 ed estratta con toluene (3 x 80 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza, e il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: CHCl_3), ottenendo la ***N*-(2-formil-4-metilfenil)formammidina** (86 mg, resa 13%), di consistenza oleosa.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3-d): 9.32 (s, 1 H, CHO o $\text{CH}=\text{N}$); 9.27 (s, 1 H, CHO o $\text{CH}=\text{N}$); 7.95 (d, $J = 8.6$, 1 H, 6-H); 7.76 (dd, $J = 8.6$, $J = 1.8$, 1 H, 5-H); 7.69 (d, $J = 1.8$, 1 H, 3-H); 2.58 (s, 3 H, CH_3).

6.1.3.2. SINTESI DI ETIL CARBAMMATI DI ANILINE COMMERCIALI

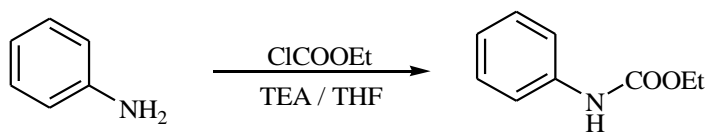
Metodica generale A

Ad una soluzione di derivato anilino (10.0 mmoli) in THF anidro (100 ml) e TEA (20.0 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (20.0 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: CE/EtOAc 1/1). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza, portando all'ottenimento del carbammato desiderato.

Metodica generale B

Ad una soluzione di derivato anilino (10.0 mmoli) in THF anidro (100 ml) e TEA (40.0 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (40.0 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a riflusso per 1 ora (TLC: CE/EtOAc 1/1). Dopo raffreddamento, il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza, portando all'ottenimento del carbammato desiderato.

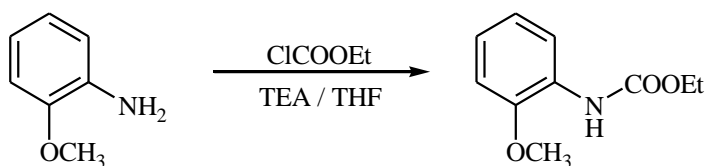
Sintesi di etile fenilcarbammato



Con il metodo A dall'anilina è stato ottenuto l'**etile fenilcarbammato** (resa 66%), di consistenza oleosa.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-}d$): 7.49 (d, $J = 7.7$, 2 H, 2-H e 6-H); 7.34 (t, $J = 7.7$, 2 H, 3-H e 5-H); 7.10 (t, $J = 7.7$, 1 H, 4-H); 4.28 (q, $J = 7.1$, 2 H, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$); 1.35 (t, $J = 7.1$, 3 H, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$).

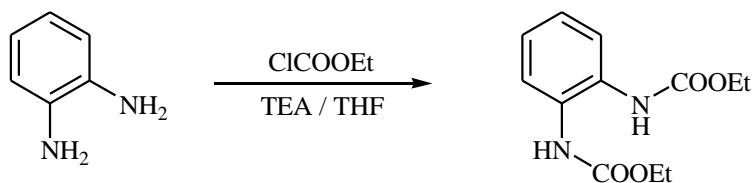
Sintesi di etile (2-metossifenil)carbammato



Con il metodo A dalla 2-metossianilina è stato ottenuto l'**etile (2-metossifenil)carbammato** (resa quantitativa), di consistenza oleosa.

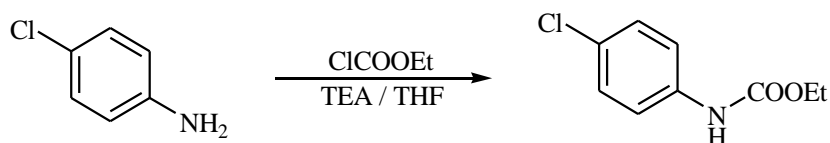
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -*d*): 7.29 – 7.15 (m, 1 H, 6-H); 6.98 – 6.88 (m, 2 H, 4-H e 5-H); 6.83 – 6.79 (m, 1 H, 3-H); 4.19 (q, $J = 7.1$, 2 H, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$); 3.80 (s, 3 H, OCH_3); 1.35 (t, $J = 7.1$, 3 H, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$).

Sintesi di etile (2-etossicarbonilamminofenil)carbammato



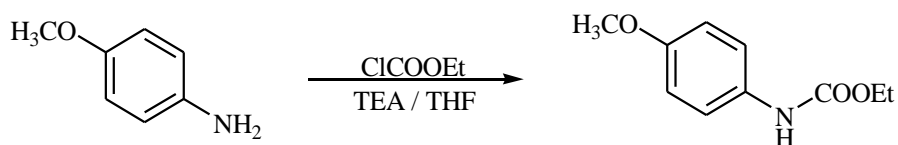
Con il metodo B dalla *m*-fenilendiammina è stato ottenuto l'**etile (2-etossicarbonilamminofenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 77 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -*d*): 7.62 – 7.49 (m, 2 H, 3-H e 6-H); 7.20 – 7.14 (m, 2 H, 4-H e 5-H); 4.28 (q, $J = 7.1$, 4 H, 2 x $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$); 1.36 (t, $J = 7.1$, 6 H, 2 x $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$).

Sintesi di etile (4-clorofenil)carbammato

Con il metodo B dalla 4-cloroanilina è stato ottenuto l'**etile (4-clorofenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 39 °C.

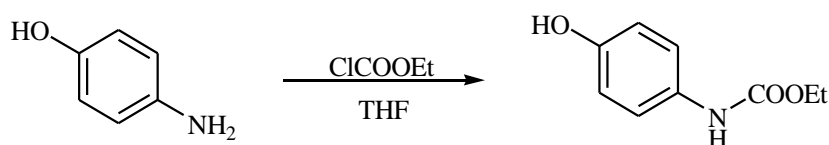
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3-d): 7.33 (d, $J = 8.9$, 2 H, 2-H e 6-H o 3-H e 5-H); 7.25 (d, $J = 8.9$, 2 H, 2-H e 6-H o 3-H e 5-H); 4.22(q, $J = 7.1$, 2 H, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$); 1.36 (t, $J = 7.1$, 3 H, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$).

Sintesi di etile (4-metossifenil)carbammato

Con il metodo A dalla 4-metossianilina è stato ottenuto l'**etile (4-metossifenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 69 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3-d): 7.33 (d, $J = 9.1$, 2 H, 2-H e 6-H o 3-H e 5-H); 6.87 (d, $J = 9.1$, 2 H, 2-H e 6-H o 3-H e 5-H); 4.18 (q, $J = 7.1$, 2 H, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$); 3.78 (s, 3 H, OCH_3); 1.32 (t, $J = 7.1$, 3 H, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_3$).

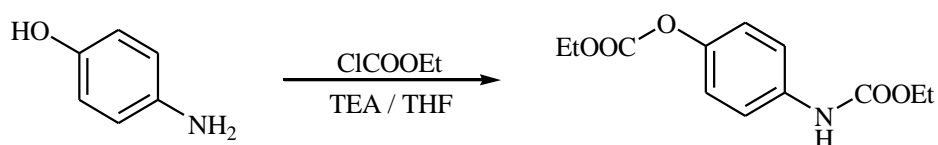
Sintesi di etile (4-idrossifenil)carbammato



Ad una soluzione di 4-idrossianilina (10.0 mmoli) in THF anidro (100 ml) è stato aggiunto etile cloroformiato (20.0 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora (TLC: CHCl₃/MeOH 1/1). Il residuo solido formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'**etile (4-idrossifenil)carbammato** (resa 45%), con p.f. 123 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.19 (d, J = 7.4, 2 H, 2-H e 6-H o 3-H e 5-H); 6.76 (d, J = 7.4, 2 H, 2-H e 6-H o 3-H e 5-H); 4.21 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃); 1.30 (t, J = 7.1, 3 H, NHCOOCH₂CH₃).

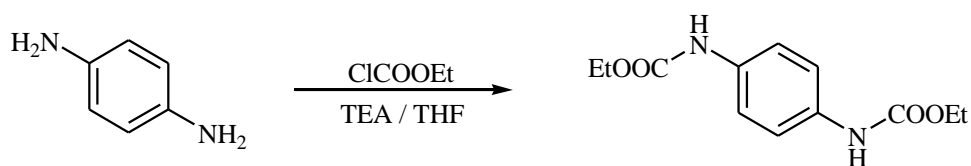
Sintesi di etile (4-etossicarbonilossifenil)carbammato



Con il metodo B dalla 4-idrossianilina è stato ottenuto l'**etile (4-etossicarbonilossifenil)carbammato** (resa 96%), con p.f. 97 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.38 (d, J = 9.0, 2 H, 2-H e 6-H o 3-H e 5-H); 7.10 (d, J = 9.0, 2 H, 2-H e 6-H o 3-H e 5-H); 6.69 (s all, 1 H, NH); 4.30 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃ o OCOO CH₂CH₃); 4.22 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃ o OCOO CH₂CH₃); 1.38 (t, J = 7.1, 3 H, NHCOOCH₂CH₃ o OCOOCH₂CH₃); 1.30 (t, J = 7.1, 3 H, NHCOOCH₂CH₃ o OCOOCH₂CH₃).

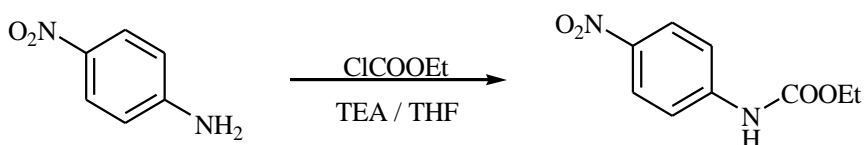
Sintesi di etile (4-etossicarbonilamminofenil)carbammato



Con il metodo B dalla *p*-fenilendiammina è stato ottenuto l'**etile (4-etossicarbonilamminofenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 184 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 7.31 (s, 4 H, 2-H, 3-H, 5-H e 6-H); 4.21 (q, J = 7.1, 4 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃); 1.30 (t, J = 7.1, 6 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃).

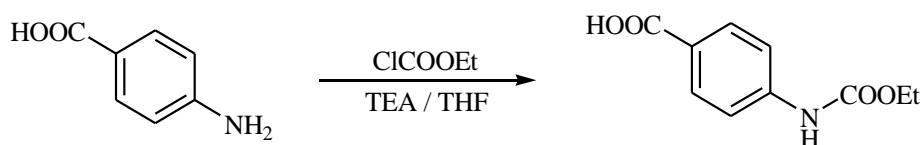
Sintesi di etile (4-nitrofenil)carbammato



Con il metodo B dalla 4-nitroanilina è stato ottenuto l'**etile (4-nitrofenil)carbammato** (resa 46%), con p.f. 160 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 8.19 (d, J = 8.7, 2 H, 3-H e 5-H); 7.55 (d, J = 8.7, 2 H, 2-H e 6-H); 4.26 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃); 1.33 (t, J = 7.1, 3 H, NHCOOCH₂CH₃).

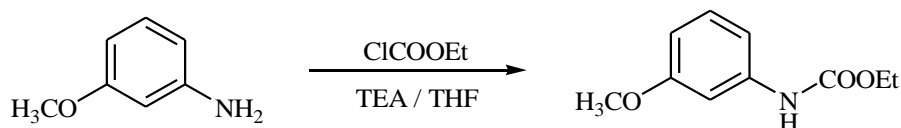
Sintesi di etile (4-carbossifenil)carbammato



Ad una soluzione di 4-carbossianilina (10.0 mmoli) in THF anidro (150 ml) e TEA (40.0 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (40.0 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a riflusso per 1 ora (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con TFA (20 ml) e posto a riflusso per 1 ora (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata diluita con H₂O (100 ml) e il precipitato ottenuto è stato raccolto per filtrazione, ottenendo l'**etile (4-carbossifenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 180 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.00 (s all, 1 H, COOH); 7.85 (d, J = 8.7, 2 H, 3-H e 5-H o 2-H e 6-H); 7.56 (d, J = 8.7, 2 H, 3-H e 5-H o 2-H e 6-H); 4.15 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃); 1.25 (t, J = 7.1, 3 H, NHCOOCH₂CH₃).

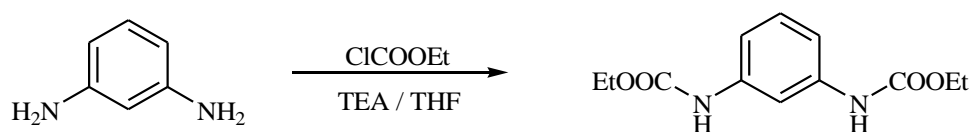
Sintesi di etile (3-metossifenil)carbammato



Con il metodo A dalla 3-metossianilina è stato ottenuto l'**etile (3-metossifenil)carbammato** (resa quantitativa), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 7.18 – 7.12 (m, 2 H, 2-H e 5-H); 6.91 (dd, J = 8.2, J = 1.1, 1 H, 6-H); 6.58 (dd, J = 8.2, J = 1.1, 1 H, 4-H); 4.19 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃); 3.74 (s, 3 H, OCH₃); 1.28 (t, J = 7.1, 3 H, NHCOOCH₂CH₃).

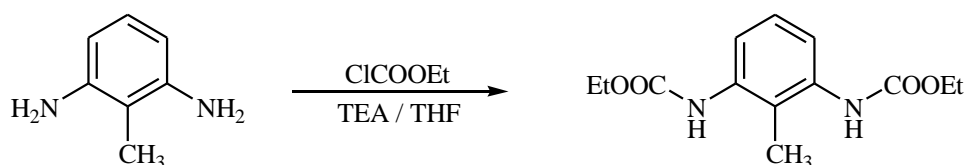
Sintesi di etile (3-etossicarbonilamminofenil)carbammato



Con il metodo B dalla *m*-fenilendiammina è stato ottenuto l'**etile (3-etossicarbonilamminofenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 99 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.54 (s all, 2 H, 2 x NH); 7.71 (s, 1 H, 2-H); 7.17 – 7.07 (m, 3 H, 4-H, 5-H e 6-H); 4.11 (q, J = 7.1, 4 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃); 1.32 (t, J = 7.1, 6 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃).

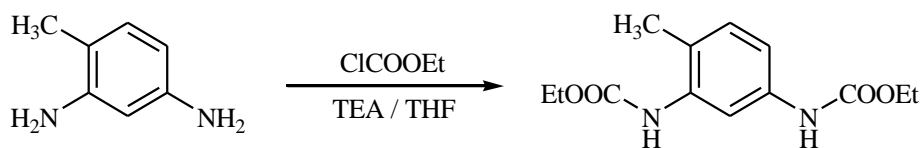
Sintesi di etile (3-etossicarbonilammino-2-metilfenil)carbammato



Con il metodo B dalla 2-metil-*m*-fenilendiammina è stato ottenuto l'**etile (3-etossicarbonilammino-2-metilfenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 115 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 9.46 (s all, 2 H, 2 x NH); 7.34 (t, J = 7.9, 1 H, 5-H); 7.14 (d, J = 7.9, 2 H, 4-H e 6-H); 4.32 (q, J = 7.1, 4 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃); 2.04 (s, 3 H, CH₃); 1.25 (t, J = 7.1, 6 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃).

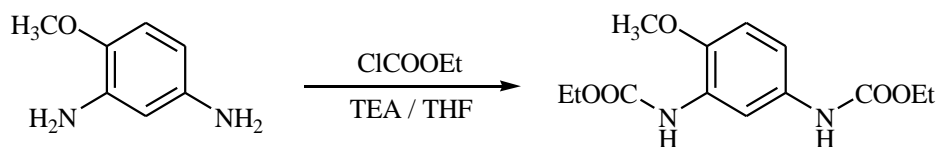
Sintesi di etile (3-etossicarbonilammino-4-metilfenil)carbammato



Con il metodo B dalla 4-metil-*m*-fenilendiammina è stato ottenuto l'**etile (3-etossicarbonilammino-4-metilfenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 129 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 7.78 (s, 1 H, 2-H); 7.23 (d, J = 8.2, 1 H, 5-H o 6-H); 7.07 (d, J = 8.2, 1 H, 5-H o 6-H); 4.28 – 4.15 (m, 4 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃); 2.19 (s, 3 H, CH₃); 1.35 – 1.26 (m, 6 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃).

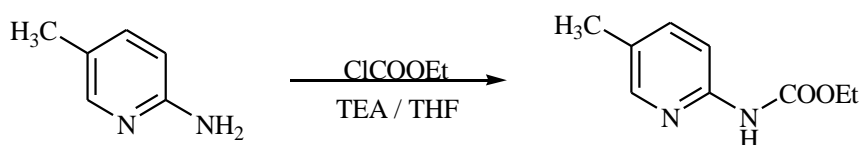
Sintesi di etile (3-etossicarbonilammino-4-metossifenil)carbammato



Con il metodo B dalla 4-metossi-*m*-fenilendiammina è stato ottenuto l'**etile (3-etossicarbonilammino-4-metossifenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 120 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.40 (s all, 1 H, NH); 8.27 (s all, 1 H, NH); 7.79 (d, J = 2.3, 1 H, 2-H); 7.13 (dd, J = 8.8, J = 2.3, 1 H, 6-H); 6.91 (d, J = 8.8, 1 H, 5-H); 4.13 – 4.05 (m, 4 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃); 3.74 (s, 3 H, OCH₃); 1.25 – 1.20 (m, 6 H, 2 x NHCOOCH₂CH₃).

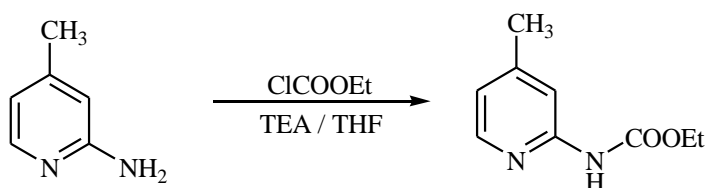
Sintesi di etile (5-metilpiridin-2-il)carbammato



Con il metodo B dalla 2-ammino-5-metilpiridina è stato ottenuto l'etile (**5-metilpiridin-2-il**)carbammato (resa 42%), con p.f. 120°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.72 (s all, 1 H, NH); 8.17 (s, 1 H, 6-H); 7.91 (d, J = 8.5, 1 H, 3-H o 4-H); 7.45 (d, J = 8.5, 1 H, 3-H o 4-H); 4.24 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃); 2.26 (s, 3 H, CH₃); 1.35 (t, J = 7.1, 3 H, NHCOOCH₂CH₃).

Sintesi di etile (4-metilpiridin-2-il)carbammato



Con il metodo B dalla 2-ammino-4-metilpiridina è stato ottenuto l'etile (**4-metilpiridin-2-il**)carbammato (resa 40%), con p.f. 130°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.31 (s all, 1 H, NH); 8.18 (d, J = 5.2, 1 H, 6-H); 7.86 (s, 1 H, 3-H); 6.80 (d, J = 5.2, 1 H, 5-H); 4.26 (q, J = 7.1, 2 H, NHCOOCH₂CH₃); 2.35 (s, 3 H, CH₃); 1.35 (t, J = 7.1, 3 H, NHCOOCH₂CH₃).

6.1.3.3. SINTESI DI CHINAZOLINE DA ETIL CARBAMMATI DI ANILINE COMMERCIALI

Metodica generale A

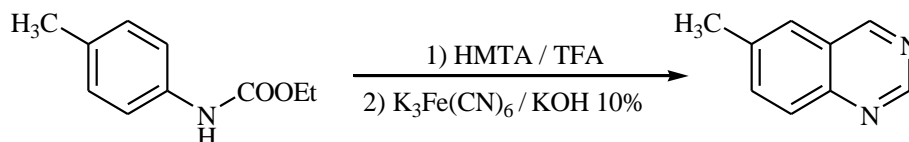
Una soluzione di carbammato (1.0 mmoli) e HMTA (7.0 mmoli) in TFA (7 ml) è stata posta a riflusso sotto agitazione per 1 ora (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata ripresa con HCl 4M (60 ml) e il residuo indisciolto è stato allontanato per filtrazione. La soluzione acquosa limpida è stata concentrata a secchezza e il residuo è stato ripreso con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1/1 (90 ml). Alla miscela (pH ≥ 10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (8.0 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela è stata diluita con H₂O (90 ml) ed estratta con solvente (3 x 50 ml); la fase organica è stata concentrata, anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la chinazolina desiderata.

Metodica generale B

Una soluzione di carbammato (1.0 mmoli) e HMTA (1.0 mmoli) in TFA (3 ml) è stata irradiata con microonde a 80W, raggiungendo la temperatura di 110°C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1/1 (30 ml). Alla miscela (pH ≥ 10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (8.0 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (30 ml) ed estratta a fondo con solvente (3 x 30 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la chinazolina desiderata.

Metodica generale C

Ad una soluzione di carbammato (1.0 mmoli) in TFA (3 ml) è stata aggiunta, in tre porzioni uguali, HMTA (9.0 mmoli). Dopo ogni aggiunta, la miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 80W, raggiungendo ogni volta la temperatura di 110°C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 25 minuti ad ogni ciclo mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1/1 (30 ml). Alla miscela (pH ≥ 10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (8.0 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (30 ml) ed estratta a fondo con toluene (3 x 30 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la chinazolina desiderata.

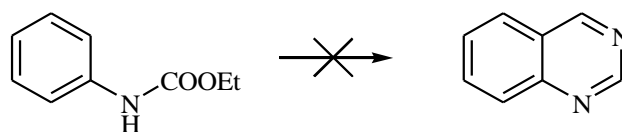
Sintesi di 6-metilchinazolina

Con il metodo A dall'etile (4-metilfenil)carbammato è stata ottenuta la **6-metilchinazolina** (resa 49%), con p.f. 62 °C. Solvente di estrazione: toluene.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.32 (s, 1 H, 4-H); 9.27 (s, 1 H, 2-H); 7.95 (d, J = 8.6, 1 H, 8-H); 7.76 (dd, J = 8.6, J = 1.8, 1 H, 7-H); 7.69 (d, J = 1.8, 1 H, 5-H); 2.58 (s, 3 H, CH₃).

Con il metodo B è stata ottenuta la **6-metilchinazolina** (resa 95%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

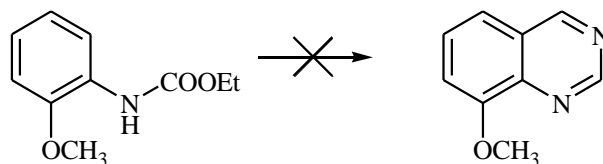
Tentativo di sintesi di chinazolina



Con il metodo A dall'etile fenilcarbammato è stata ottenuta in bassa quantità la **4-formilanilina**, di consistenza oleosa. Solvente di estrazione: EtOAc.

$^1\text{H-NMR}_{4\text{-formilanilina}}$ (DMSO- d_6): 9.91 (s, 1 H, CHO); 7.65 (d, $J = 8.8$, 2 H, 3-H e 5-H); 6.58 (d, $J = 8.8$, 2 H, 2-H e 6-H); 5.90 (s all, 2 H, NH_2).

Tentativo di sintesi di 8-metossichinazolina

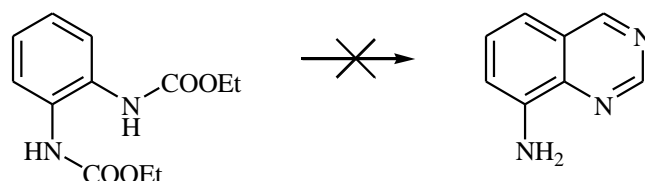


Con il metodo A dall'etile (2-metossifenil)carbammato è stata ottenuta una miscela equimolare non risolta di **5-formil-2-metossianilina** e **4-formil-2-metossianilina**. Solvente di estrazione: CHCl_3 .

$^1\text{H-NMR}_{5\text{-formil-2-metossianilina}}$ (DMSO- d_6): 9.85 (s, 1 H, CHO); 8.25 (d, $J = 1.9$, 1 H, 6-H); 7.66 (dd, $J = 8.4$, $J = 1.9$, 1 H, 4-H); 7.21 (d, $J = 8.4$, 1 H, 3-H); 3.90 (s, 3 H, OCH_3).

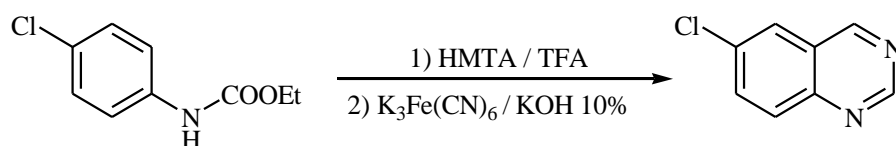
$^1\text{H-NMR}_{4\text{-formil-2-metossianilina}}$ (DMSO- d_6): 9.87 (s, 1 H, CHO); 8.07 (d, $J = 8.2$, 1 H, 6-H); 7.53 (dd, $J = 8.2$, $J = 1.5$, 1 H, 5-H); 7.45 (d, $J = 1.5$, 1 H, 3-H); 3.89 (s, 3 H, OCH_3).

Tentativo di sintesi di 8-amminochinazolina



Con il metodo A dall'etile (2-etossicarbonilamminofenil)carbammato è stata ottenuta una miscela complessa di prodotti.

Sintesi di 6-clorochinazolina



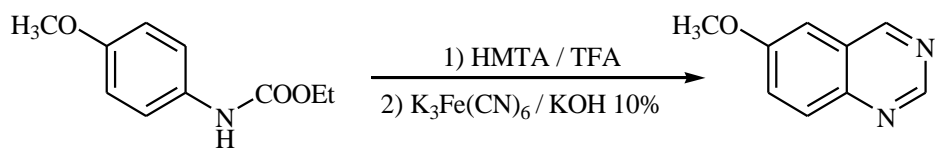
Con il metodo A dall'etile (4-clorofenil)carbammato . è stata ottenendo la **6-clorochinazolina** (resa 15%), con p.f. 72 °C. Solvente di estrazione: toluene.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.36(s, 1 H, 4-H); 9.34; (s, 1 H, 2-H); 8.02 (d, J = 9.0, 1 H, 8-H); 7.94 (d, J = 2.2, 1 H, 5-H); 7.87 (dd, J = 9 .0, J = 2.2, 1 H, 7-H)

Con il metodo B è stata ottenuta la **6-clorochinazolina** (resa 19%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Con il metodo C è stata ottenuta la **6-clorochinazolina** (resa 55%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Sintesi di 6-metossichinazolina

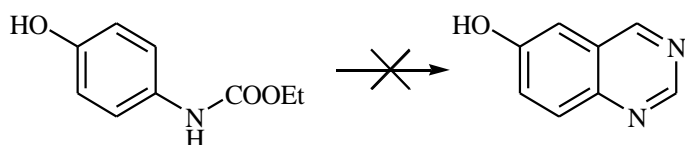


Con il metodo A dall'etile (4-metossifenil)carbammato è stata ottenuta la **6-metossichinazolina** (30 mg, resa 19%), con p.f. 43 °C. Solvente di estrazione: CE.

1H -NMR ($CDCl_3$ -*d*): 9.29 (s, 1 H, 4-H); 9.20 (s, 1 H, 2-H); 7.94 (d, J = 9.2, 1 H, 8-H); 7.56 (dd, J = 9.2, J = 2.8, 1 H, 7-H); 7.13 (d, J = 2.8, 1 H, 5-H); 3.95 (s, 3 H, OCH_3).

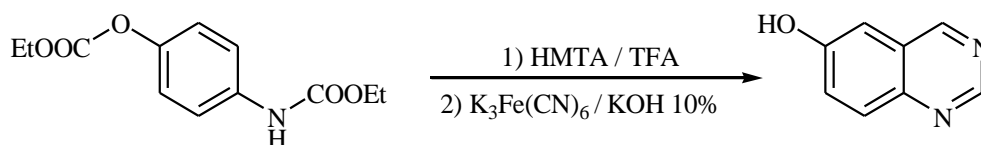
Con il metodo B è stata ottenuta la **6-metossichinazolina** (resa 92%), con p.f. e 1H -NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Tentativo di sintesi di 6-idrossichinazolina da etile (4-idrossifenil)carbammato



Con il metodo A dall'etile (4-idrossifenil)carbammato è stata ottenuta una miscela non caratterizzabile di prodotti.

Sintesi di 6-idrossichinazolina da etile (4-etossicarbonilossifenil)carbammato

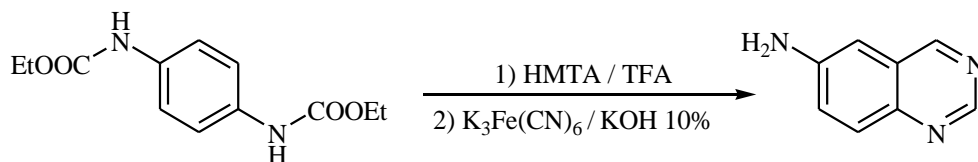


Con il metodo A dall'etile (4-etossicarbonilossifenil)carbammato è stata ottenuta la **6-idrossichinazolina** (35 mg, resa 24%), con p.f. 89 °C. Solvente di estrazione: EtOAc.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.28 (s, 1 H, 4-H); 9.18 (s, 1 H, 2-H); 8.14 (d, J = 2.5, 1 H, 5-H); 7.99 (d, J = 9.1, 1 H, 8-H); 7.61 (dd, J = 9.1, J = 2.5, 1 H, 7-H).

Con il metodo B è stata ottenuta la **6-idrossichinazolina** (resa 86%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Sintesi di 6-amminochinazolina

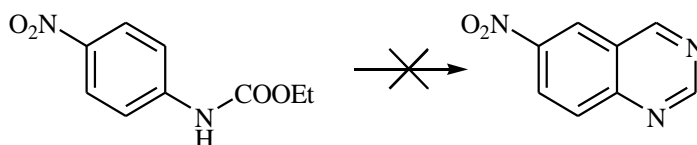


Con il metodo A dall'etile (4-etossicarbonilamminofenil)carbammato è stata ottenuta la **6-amminochinazolina** (78 mg, resa 54%), con p.f. 200 °C. Solvente di estrazione: toluene.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.20 (s, 1 H, 4-H); 9.13 (s, 1 H, 2-H); 7.90 (d, J = 9.1, 1 H, 8-H); 7.35 (dd, J = 9.1, J = 2.6, 1 H, 7-H); 6.95 (d, J = 2.6, 1 H, 5-H).

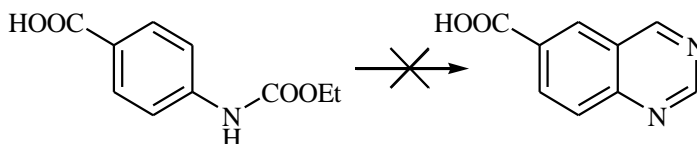
Con il metodo B è stata ottenuta la **6-amminochinazolina** (130 mg, resa 90%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Tentativo di sintesi di 6-nitrochinazolina



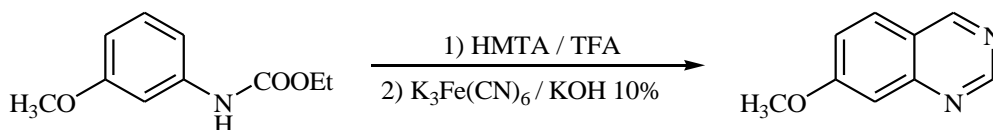
Con il metodo A dall'etile (4-nitrofenil)carbammato non è stato ottenuto nessun prodotto diverso da quello di partenza.

Tentativo di sintesi di 6-carbossichinazolina



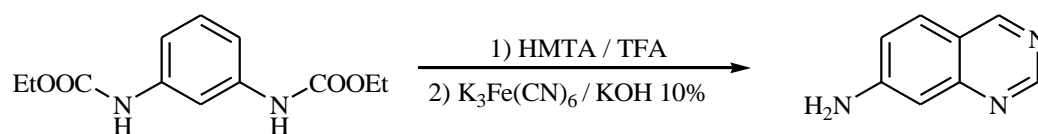
Con il metodo A dall'etile (4-carbossifenil)carbammato non è stato ottenuto nessun prodotto diverso da quello di partenza.

Sintesi di 7-metossichinazolina



Con il metodo A dall'etile (3-metossifenil)carbammato è stata ottenuta la **7-metossichinazolina** (35 mg, resa 22%), con p.f. 35 °C. solvente di estrazione: CE. $^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4): 9.30 (s, 1 H, 4-H); 9.10 (s, 1 H, 2-H); 7.97 (d, $J = 9.0$, 1 H, 5-H); 7.53 (dd, $J = 9.0$, $J = 2.5$, 1 H, 6-H); 7.31 (d, $J = 2.5$, 1 H, 8-H); 4.01 (s, 3 H, OCH₃).

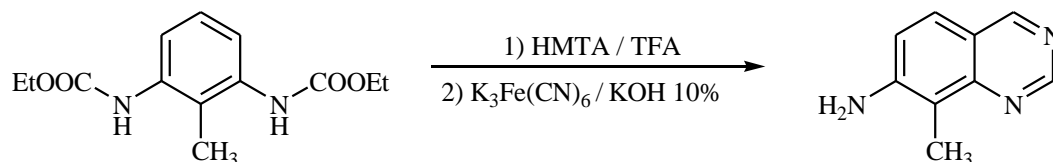
Con il metodo B è stata ottenuta la **7-metossichinazolina** (resa 79%), con p.f. e $^1\text{H-NMR}$ uguali al composto precedentemente preparato.

Sintesi di 7-amminochinazolina

Con il metodo A dall'etile (3-etossicarbonilamminofenil)carbammato è stata ottenuta la **7-amminochinazolina** (resa 45%), con p.f. 140 °C. Solvente di estrazione: toluene.

¹H-NMR (MeOD-*d*₄): 9.01 (s, 1 H, 4-H); 8.84 (s, 1 H, 2-H); 7.79 (d, J = 8.9, 1 H, 5-H); 7.16 (dd, J = 8.9, J = 2.0, 1 H, 6-H); 6.90 (d, J = 2.0, 1 H, 8-H).

Con il metodo B è stata ottenuta la **7-amminochinazolina** (resa 91%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

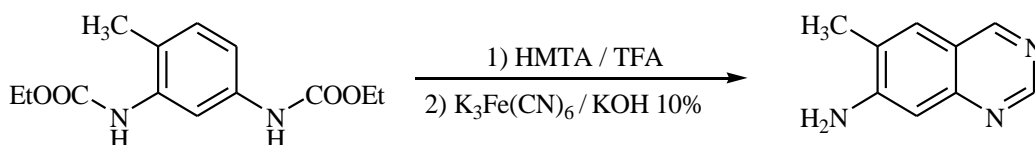
Sintesi di 7-ammino-8-metilchinazolina

Con il metodo A dall'etile (3-etossicarbonilammino-2-metilfenil)carbammato è stata ottenuta la **7-ammino-8-metilchinazolina** (60 mg, resa 38%), con p.f. 163 °C. Solvente di estrazione: toluene.

¹H-NMR (MeOD-*d*₄): 8.96 (s, 1 H, 4-H); 8.90 (s, 1 H, 2-H); 7.65 (d, J = 8.8, 1 H, 5-H o 6-H); 7.16 (d, J = 8.8, 1 H, 5-H o 6-H); 2.43 (s, 3 H, CH₃).

Con il metodo B è stata ottenuta la **7-ammino-8-metilchinazolina** (resa 83%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Sintesi di 7-ammino-6-metilchinazolina

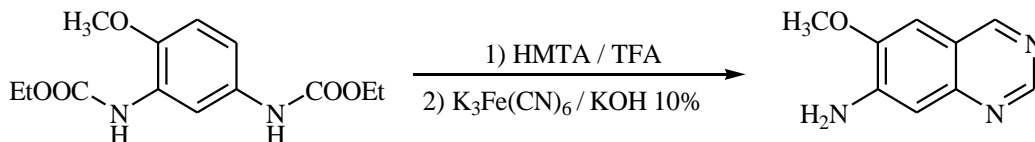


Con il metodo A dall'etile (3-etossicarbonilammino-4-metilfenil)carbammato è stata ottenuta la **7-ammino-6-metilchinazolina** (resa 44%), con p.f. 175 °C. Solvente di estrazione: toluene.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.01 (s, 1 H, 4-H); 8.91 (s, 1 H, 2-H); 7.64 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.38 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 2.30 (s, 3 H, CH₃).

Con il metodo B è stata ottenuta la **7-ammino-6-metilchinazolina** (resa 80%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Sintesi di 7-ammino-6-metossichinazolina

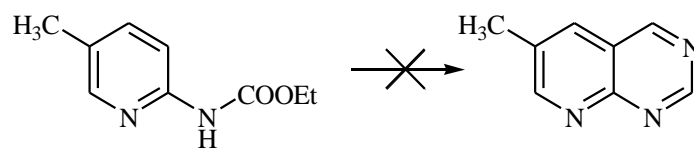


Con il metodo A dall'etile (3-etossicarbonilammino-4-metossifenil)carbammato è stata ottenuta la **7-ammino-6-metossichinazolina** (77 mg, resa 44%), con p.f. 175 °C. Solvente di estrazione: EtOAc.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 9.01 (s, 1 H, 4-H); 9.00 (s, 1 H, 2-H); 7.07 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.00 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.02 (s, 3 H, OCH₃).

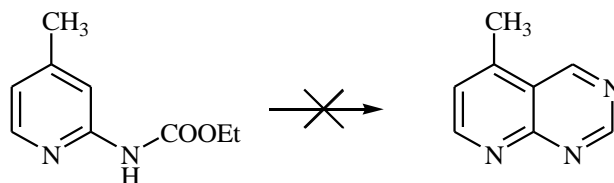
Con il metodo B è stata ottenuta la **7-ammino-6-metossichinazolina** (resa 84%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Tentativo di sintesi di 6-metil-8-aza-chinazolina



Con il metodo A dall'etile (5-metilpiridin-2-il)carbammato non è stato ottenuto nessun prodotto diverso da quello di partenza.

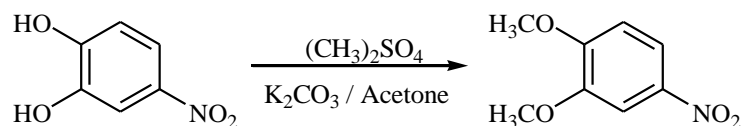
Tentativo di sintesi di 5-metil-8-aza-chinazolina



Con il metodo A dall'etile (4-metilpiridin-2-il)carbammato non è stato ottenuto nessun prodotto diverso da quello di partenza.

6.1.3.4. SINTESI DI PD153035

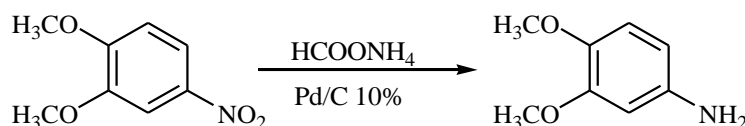
Sintesi di 3,4-dimetossinitrobenzene



Una soluzione di 3,4-diidrossinitrobenzene (3.1 g, 20.0 mmoli) in acetone (350 ml) è stata aggiunta di potassio carbonato (11.1 g, 80.0 mmoli) e dimetil solfato (4.2 ml, 44.0 mmoli). La sospensione è stata posta a riflusso sotto agitazione per 2 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, il residuo solido è stato allontanato per filtrazione e la soluzione limpida è stata concentrata a secchezza, ottenendo il **3,4-dimetossinitrobenzene** (3.5 g, resa 96%), con p.f. 95 °C.

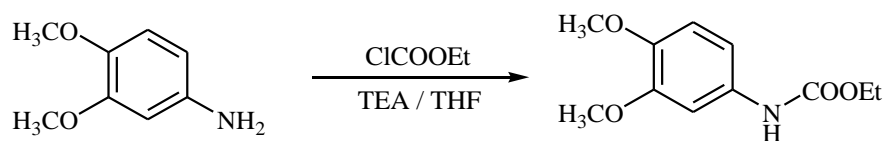
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.92 (dd, J = 9.0, J = 2.8, 1 H, 6-H); 7.74 (d, J = 2.8, 1 H, 2-H); 7.18 (d, J = 9.0, 1 H, 5-H); 3.90 (s, 3 H, OCH₃); 3.88 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di 3,4-dimetossianilina



Ad una soluzione di 3,4-dimetossinitrobenzene (2.8 g, 15.5 mmoli) in EtOH assoluto (200 ml) sono stati aggiunti nell'ordine Pd/C 10% (50 mg) e ammonio formiato (4.4 g, 69.8 mmoli). La sospensione è stata posta a riflusso sotto agitazione per 3 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, il catalizzatore è stato allontanato per filtrazione e la soluzione limpida è stata concentrata a secchezza, ottenendo la **3,4-dimetossianilina** (2.4 g, resa quantitativa), con p.f. 65 °C.

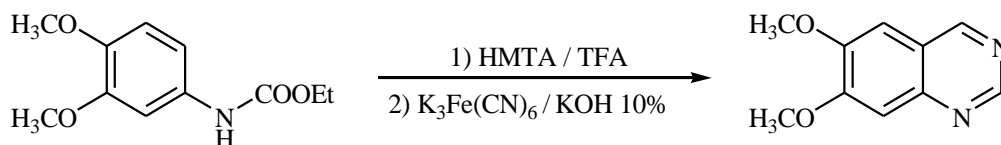
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 6.63 (d, J = 8.5, 1 H, 5-H); 6.25 (d, J = 2.5, 1 H, 2-H); 6.05 (dd, J = 8.5, J = 2.5, 1 H, 6-H); 3.66 (s, 3 H, OCH₃); 3.59 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di etile (3,4-dimetossifenil)carbammato

Ad una soluzione di 3,4-dimetossianilina (2.2 g, 14.4 mmoli) in THF anidro (150 ml) e TEA (4.0 ml, 28.9 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (2.8 ml, 28.9 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'etile (3,4-dimetossifenil)carbammato (3.2 g, resa quantitativa) con p.f. 45 °C.

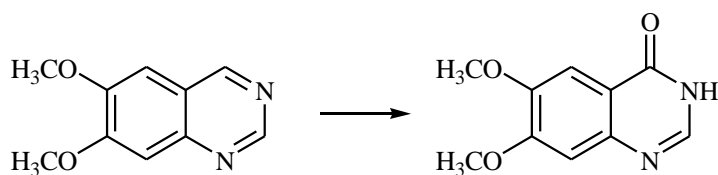
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.39 (s all, 1 H, NH); 7.16 (d, J = 1.7, 1 H, 2-H); 6.93 (dd, J = 9.2, J = 1.7, 1 H, 6-H); 6.85 (d, J = 9.2, 1 H, 5-H); 4.09 (q, J = 7.1, 2 H, COOCH₂CH₃); 3.70 (s, 3 H, OCH₃); 3.69 (s, 3 H, OCH₃); 1.23 (t, J = 7.1, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di 6,7-dimetossichinazolina



Una soluzione di etile (3,4-dimetossifenil)carbammato (3.2 g, 14.4 mmoli) e HMTA (2.0 g, 14.4 mmoli) in TFA (44 ml) è stata irradiata con microonde a 80W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1/1 (450 ml). Alla miscela (pH ≥10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (46.0 g, 139.7 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (450 ml) ed estratta a fondo con EtOAc (3 x 250 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **6,7-dimetossichinazolina** (2.2 g, resa 81%) con p.f. 114°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.29 (s, 1 H, 4-H); 9.07 (s, 1 H, 2-H); 7.48 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.35 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 3.98 (s, 3 H, OCH₃); 3.94 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di 6,7-dimetossi-4(3H)-chinazolinona*Metodo A*

Ad una soluzione di 6,7-dimetossichinazolinone (1.4 g, 7.2 mmoli) in HCl 1M (20 ml) è stata aggiunta H₂O₂ 30% (2.2 ml, 21.6 mmoli). La soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2 giorni (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con H₂O, ottenendo il **6,7-dimetossi-4(3H)-chinazolinone** (0.3 g, resa 19%) con p.f. 295°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.09 (s, 1 H, 2-H); 7.45 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.13 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 3.91 (s, 3 H, OCH₃); 3.87 (s, 3 H, OCH₃).

Metodo B

Ad una soluzione di 6,7-dimetossichinazolinone (0.5 g, 2.7 mmoli) in H₂SO₄ 4M (5 ml) è stata aggiunta H₂O₂ 30% (0.8 ml, 8.0 mmoli). La soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2 giorni (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata alcalinizzata (pH = 10) con KOH e poi riacidificata (pH = 4) con AcOH. Il precipitato formatosi è stato filtrato e cristallizzato da EtOH/CE. Poiché non si è ottenuto il prodotto desiderato, la reazione è stata abbandonata.

Metodo C

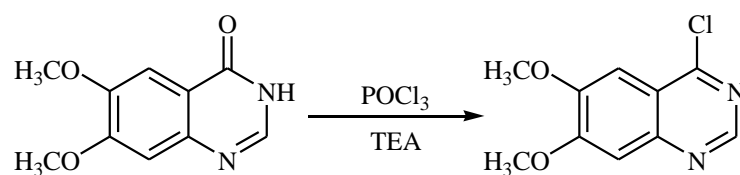
Ad una soluzione di 6,7-dimetossichinazolinone (0.2 g, 1.0 mmoli) in AcOH (1 ml) è stata aggiunto NaClO₂ (0.7 g, 8.0 mmoli) preventivamente disciolto in H₂O (5 ml). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente senza la formazione di alcun prodotto diverso da quello di partenza, quindi la reazione è stata abbandonata.

Metodo D

Ad una soluzione di 6,7-dimetossichinazolina (0.5 g, 2.6 mmoli) in AcOH (5 ml) è stato aggiunto H₂SO₄ (1 ml). Alla miscela di reazione è stata lentamente aggiunta una soluzione di CrO₃ (1.6 g, 15.6 mmoli) in H₂O (3 ml) e la soluzione ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La soluzione, posta in bagno di ghiaccio, è stata cautamente neutralizzata con NH₄OH concentrato con formazione di un abbondante precipitato, che è stato filtrato e lavato con H₂O, ottenendo il **6,7-dimetossi-4(3H)-chinazolinone** (0.2 g, resa 35%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

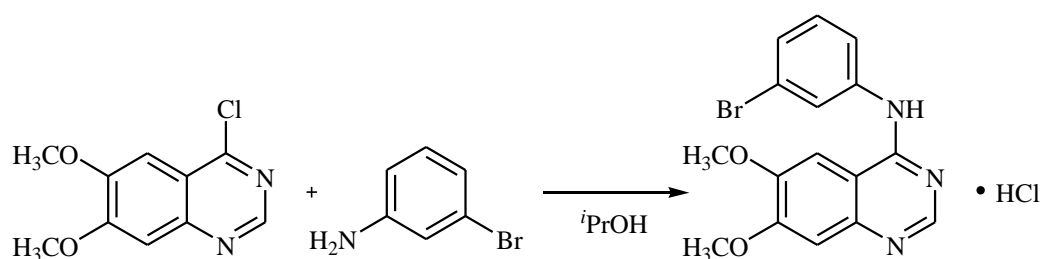
Metodo E

Ad una soluzione di 6,7-dimetossichinazolina (0.5 g, 2.6 mmoli) in AcOH (1 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di CAN (5.7 g, 10.4 mmoli) in H₂O (12 ml). Al termine dell'aggiunta (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con AcOH, portando all'ottenimento del **6,7-dimetossi-4(3H)-chinazolinone** (0.4 g, resa 80%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Sintesi di 4-cloro-6,7-dimetossichinazolina

Ad una sospensione di 6,7-dimetossi-4(3H)-chinazolinone (0.4 g, 2.1 mmoli) in POCl₃ (4.0 ml, 42.9 mmoli) è stata aggiunta TEA (1 ml). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 3 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido ottenuto è stato ripreso con EtOAc (50 ml) e lavato con una soluzione satura di NaHCO₃ (50 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-cloro-6,7-dimetossichinazolina** (0.3 g, resa 70%) con p.f. 186°C. ¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.88 (s, 1 H, 2-H); 7.40 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.35 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.08 (s, 6 H, 2 x OCH₃).

Sintesi di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato



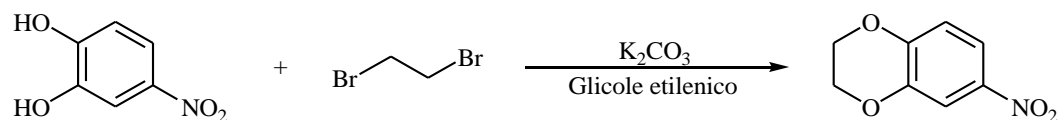
Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-dimetossichinazolina (0.2 g, 1.1 mmoli) in isopropanolo (10 ml) è stata aggiunta *m*-bromoanilina (120 μ l, 1.1 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore *m*-bromoanilina (120 μ l, 1.1 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata filtrata, ottenendo la **6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato** (0.4 g, resa 81 %) con p.f. 266°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.04 (s all, 1 H, NH); 8.87 (s, 1 H, 2-H); 8.16 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.01 (s, 1 H, 2'-H); 7.78 – 7.72 (m, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.53 – 7.42 (m, 2 H, 5'-H e 4'-H o 6'-H); 7.29 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.01 (s, 6 H, 2 x OCH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₆H₁₅BrN₃O₂:

360.0342 (calcolato)	360.0279 (trovato)	(M ⁺ + 1)
362.0327 (calcolato)	362.0333 (trovato)	(M ⁺ + 3)

6.1.3.5. SINTESI DI NUOVI DERIVATI 4-ANILINOCHINAZOLINICI

Sintesi di 3,4-etilendiossinitrobenzene*Metodo A*

Ad una sospensione di 4-nitrocatecolo (0.2 g, 1.0 mmoli) in glicole etilenico (2 ml), sono stati aggiunti 1,2-dibromoetano (0.2 ml, 2.0 mmoli) e potassio carbonato (0.3 g, 2.1 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 150 W a una temperatura di 150 °C. La reazione è stata abbandonata perché non è stato possibile mantenere un adeguato controllo della temperatura durante l'irraggiamento.

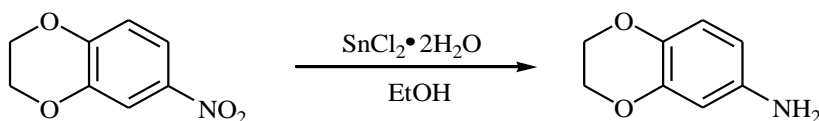
Metodo B

Ad una sospensione di 4-nitrocatecolo (3.0 g, 19.3 mmoli) in glicole etilenico (15 ml), sono stati aggiunti 1,2-dibromoetano (6.7 ml, 77.4 mmoli) e potassio carbonato (5.6 g, 40.6 mmoli). La miscela di reazione è stata riscaldata a 120 °C per 4 ore in atmosfera di elio (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata diluita con 100 ml di H₂O, con formazione di un abbondante precipitato, che è stato filtrato e cristallizzato da EtOH, ottenendo il **3,4-etilendiossinitrobenzene** (2.9 g, resa 82%), con p.f. 120 °C.

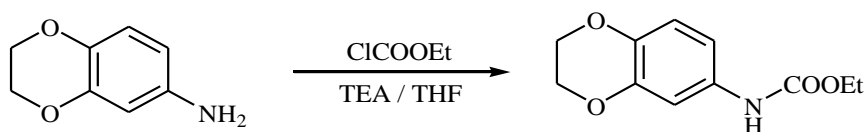
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.78 (dd, J= 8.9, J= 2.7, 1 H, 6-H); 7.73 (d, J= 2.7, 1 H, 2-H); 7.10 (d, J= 8.9, 1 H, 5-H); 4.41 – 4.31 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

Sintesi di 3,4-etilendiossianilina



Ad una soluzione di 3,4-etilendiossinitrobenzene (2.9 g, 15.9 mmoli) in EtOH (130 ml) è stato aggiunto $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17.9 g, 79.5 mmoli). La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso sotto agitazione per 2 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato ripreso con una soluzione satura di NaHCO_3 (300 ml). La soluzione ottenuta è stata estratta a fondo con CHCl_3 e la fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza, ottenendo la **3,4-etilendiossianilina** (2.1 g, resa 70%), di consistenza oleosa.

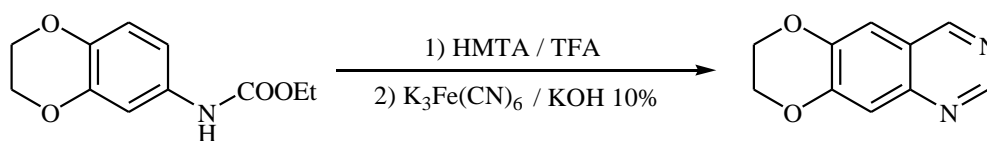
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 10.07 (s all, 2 H, NH_2); 6.95 (d, $J=8.6$, 1 H, 5-H); 6.89 (d, $J=2.4$, 1 H, 2-H); 6.82 (dd, $J=8.6$, $J=2.4$, 1 H, 6-H); 4.27 – 4.25 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

Sintesi di etile (3,4-etilendiossifenil)carbammato

Ad una soluzione di 3,4-etilendiossianilina (1.9 g, 12.5 mmoli) in THF anidro (150 ml) e TEA (3.5 ml, 25.0 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (2.4 ml, 25.0 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con EtOAc e filtrato a caldo. Il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'**etile (3,4-etilendiossifenil)carbammato** (2.2 g, resa 77%) con p.f. 117 °C.

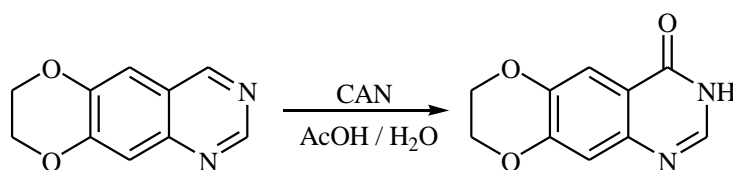
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 9.38 (s all, 1 H, NH); 7.03 (d, $J=2.1$, 1 H, 2-H); 6.85 (dd, $J=8.7$, $J=2.1$, 1 H, 6-H); 6.74 (d, $J=8.7$, 1 H, 5-H); 4.22 – 4.14 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4.08 (q, $J=7.1$, 2 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 1.21 (t, $J=7.1$, 3 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).

Sintesi di 6,7-etilendiossichinazolina



Una soluzione di etile (3,4-etilendiossifenil)carbammato (5.0 g, 22.4 mmoli) e urotropina (3.1 g, 22.4 mmoli) in TFA (70 ml) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1:1 (800 ml). Alla miscela (pH ≥10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (59.0 g, 179.2 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (800 ml) ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **6,7-etilendiossichinazolina** (3.6 g, resa 86%) con p.f. 109 °C.

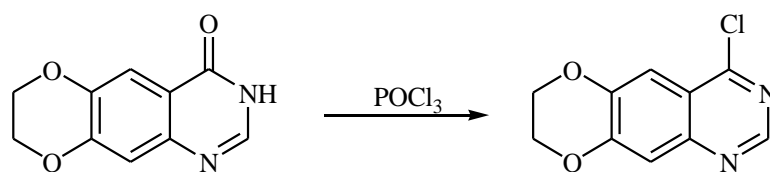
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.30 (s, 1 H, 4-H); 9.03 (s, 1 H, 2-H); 7.55 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.36 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.47 – 4.38 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

Sintesi di 6,7-etilendiossi-4(3H)-chinazolinone

Ad una soluzione di 6,7-etilendiossichinazolina (1.7 g, 9.1 mmoli) in AcOH (4 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di CAN (20.0 g, 36.4 mmoli) in H₂O (48 ml). Al termine dell'aggiunta (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con AcOH, portando all'ottenimento del **6,7-etilendiossi-4(3H)-chinazolinone** (1.1 g, resa 65%), con p.f. 282 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 12.01 (s all, 1 H, NH); 7.92 (s, 1 H, 2-H); 7.45 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.08 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.39 – 4.30 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

Sintesi di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina



Metodo A

Ad una sospensione di 6,7-etilendiossi-4(3*H*)-chinazolinone (1.1 g, 5.2 mmoli) in POCl₃ (2.8 ml, 30.0 mmoli) è stato aggiunto PCl₅ (1.9 g, 9.1 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la soluzione è stata versata in 200 ml di H₂O e ghiaccio, neutralizzata con NaHCO₃ ed estratta a fondo con CHCl₃. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza. Nel residuo solido non è stato rilevato alcun prodotto diverso da quello di partenza, quindi la reazione è stata abbandonata.

Metodo B

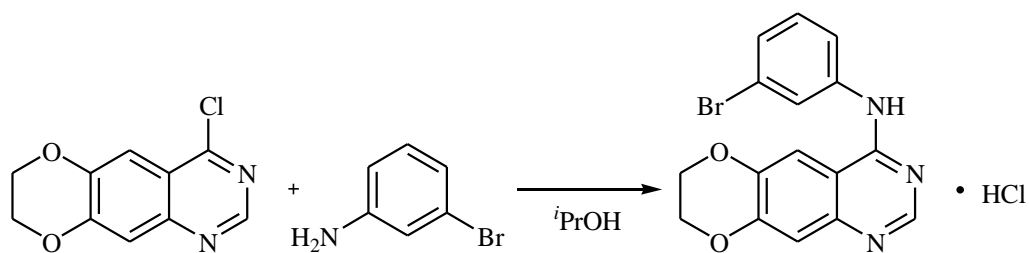
Una sospensione di 6,7-etilendiossi-4(3*H*)-chinazolinone (0.2 g, 1.0 mmoli) in POCl₃ (1.4 ml, 10.6 mmoli) è stata irradiata con microonde a 50W, raggiungendo la temperatura di 65°C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 5 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunto ulteriore POCl₃ (0.5 ml, 5.4 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 5 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione satura di NaHCO₃ ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina** (0.2 g, resa 70%) con p.f. 216 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): 8.86 (s, 1 H, 2-H); 7.66 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.50 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.47 – 4.39 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

Metodo C

Ad una sospensione di 6,7-etilendiossi-4(3*H*)-chinazolinone (0.8 g, 3.8 mmoli) in POCl₃ (8.0 ml, 85.8 mmoli) è stata aggiunta TEA (3 ml). La miscela è stata posta a riflusso per 3 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido ottenuto è stato ripreso con EtOAc e lavato con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina** (0.7 g, resa 87%), con p.f. e ¹H-NMR uguali al composto precedentemente preparato.

Sintesi di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato

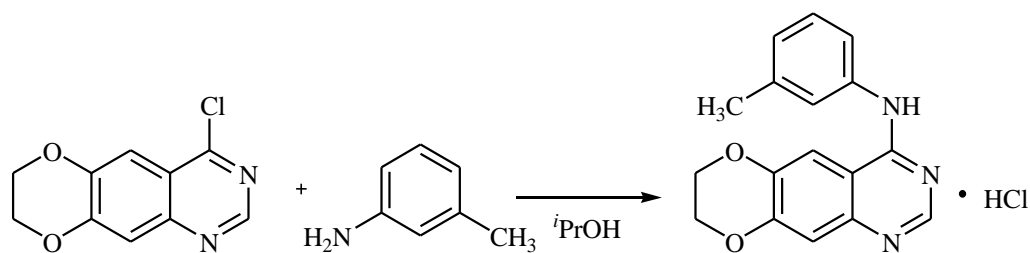


Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta *m*-bromoanilina (50 μ l, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore *m*-bromoanilina (50 μ l, 0.5 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato** (0.2 g, resa 80%) con p.f. > 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.16 (s all, 1 H, NH); 8.87 (s, 1 H, 2-H); 8.40 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.10 (t, J= 1.6, 1 H, 2'-H); 7.76 (dt, J= 7.8, J= 1.6, 1 H, 4'-H, o 6'-H); 7.50 (dt, J= 7.8, J= 1.6, 1 H, 4'-H, o 6'-H); 7.44 (t, J= 7.8, 1 H, 5'-H); 7.37 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.56 – 4.41 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₆H₁₃BrN₃O₂

358.0186 (calcolato)	358.0296 (trovato)	(M ⁺ + 1)
360.0167 (calcolato)	360.0303 (trovato)	(M ⁺ + 3)

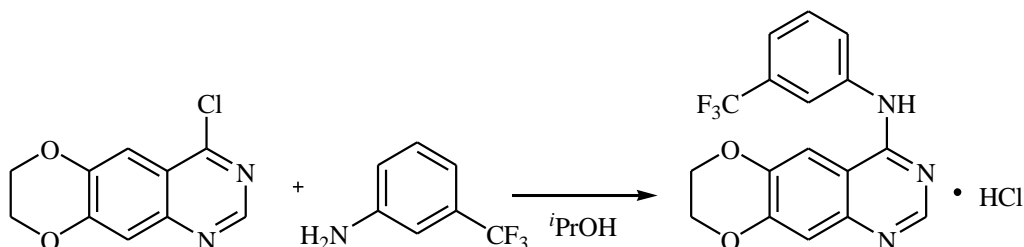
Sintesi di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato

Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolin-4-il (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta *m*-toluidina (50 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-etilendiossi-chinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato** (0.1 g, resa 78%) con p.f. > di 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.90 (s all, 1 H, NH); 8.81 (s, 1 H, 2-H); 8.31 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.52 – 7.47 (m, 2 H, 2'-H e 4'H o 6'-H); 7.37 (t, J= 7.5, 1 H, 5'-H); 7.31 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.15 (d, J= 7.5, 1 H, 4'-H o 6'-H); 4.54 – 4.43 (m, 4 H, OCH₂CH₂O); 2.36 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₇H₁₆N₃O₂ (M⁺ + 1)
294.1237 (calcolato) 294.1278 (trovato)

Sintesi di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato



Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolin-4-yl (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta *m*-trifluorometilanilina (100 µl, 0.9 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore *m*-trifluorometilanilina (50 µl, 0.5 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato** (0.1 g, resa 72%) con p.f. > di 300 °C.

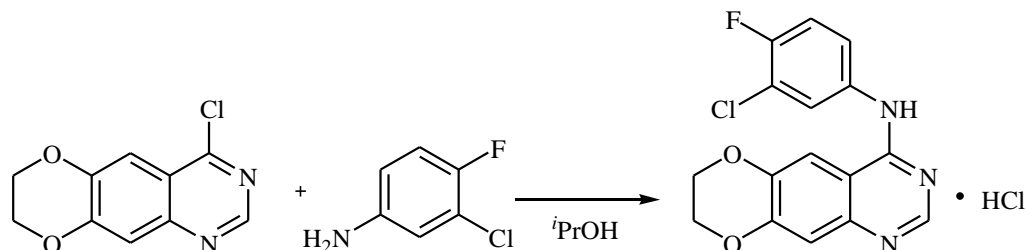
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.23 (s all, 1 H, NH); 8.90 (s, 1 H, 2H); 8.40 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.18 (s, 1 H, 2'-H); 8.10 (d, J= 8.2, 1 H, 4'-H o 6'H); 7.73 (t, J= 8.2, 1 H, 5'-H); 7.66 (d, J= 8.2, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.36 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.55 – 4.43 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₇H₁₃F₃N₃O₂ (M⁺ + 1)

348.0954 (calcolato)

348.0950 (trovato)

Sintesi di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato



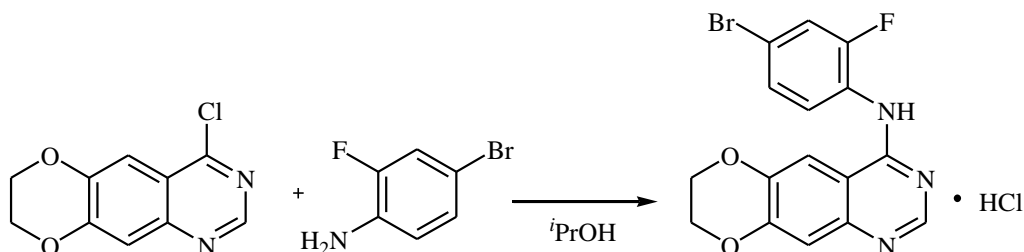
Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-cloro-4-fluoroanilina (66 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato** (0.1 g, resa 85%) con p.f. > di 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.10 (s all, 1 H, NH); 8.85 (s, 1 H, 2-H); 8.33 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.06 (dd, J = 6.8, J = 2.6, 1 H, 6'-H); 7.78 – 7.70 (m, 1 H, 2'-H o 5'-H); 7.59 – 7.51 (m, 1 H, 2'-H o 5'-H); 7.35 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.54 – 4.43 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₆H₁₂ClFN₃O₂

332.0587 (calcolato)	332.0572 (trovato)	(M ⁺ + 1)
334.0727 (calcolato)	334.0805 (trovato)	(M ⁺ + 3)

Sintesi di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato



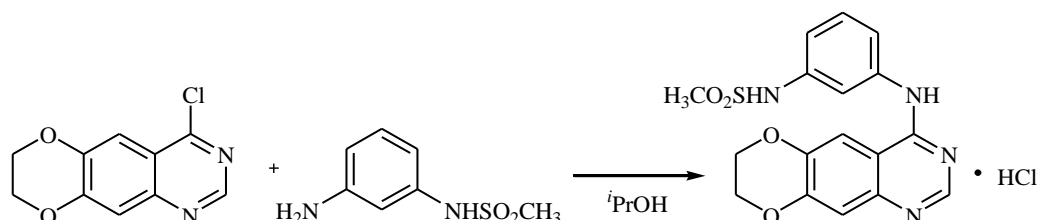
Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 4-bromo-2-fluoroanilina (86 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore 4-bromo-2-fluoroanilina (86 mg, 0.5 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato** (0.2 g, resa 87%) con p.f. > di 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.16 (s all, 1 H, NH); 8.76 (s, 1 H, 2-H); 8.24 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.79 (dd, J = 9.7, J = 1.4, 1 H, 5'-H); 7.59 – 7.48 (m, 2 H, 3'-H e 6'-H); 7.34 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.54 – 4.43 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₆H₁₂BrFN₃O₂

376.0091 (calcolato)	376.0092 (trovato)	(M ⁺ + 1)
378.0073 (calcolato)	378.0038 (trovato)	(M ⁺ + 3)

Sintesi di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonamidofenil)ammina cloridrato



Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-metansolfonammidoanilina (84 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore 3-metansolfonammidoanilina (42 mg, 0.3 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonamidofenil)-ammina cloridrato** (0.2 g, resa 82%) con p.f. > di 300 °C.

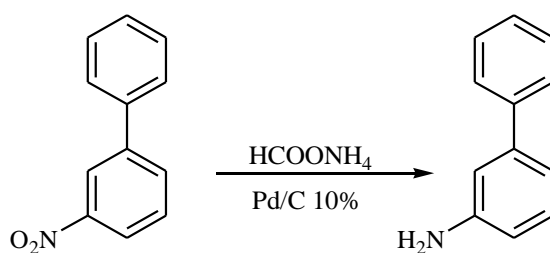
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.93 (s all, 1 H, NH); 9.98 (s all, 1 H, NH); 8.79 (s, 1 H, 2-H); 8.31 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.59 (s, 1 H, 2'-H); 7.50 (d, J = 7.7, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.41 (t, J = 7.7, 1 H, 5'-H); 7.32 (d, J = 7.7, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.10 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.55 – 4.41 (m, 4 H, OCH₂CH₂O); 3.06 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₇H₁₇N₄O₄S (M⁺ + 1)

373.0965 (calcolato)

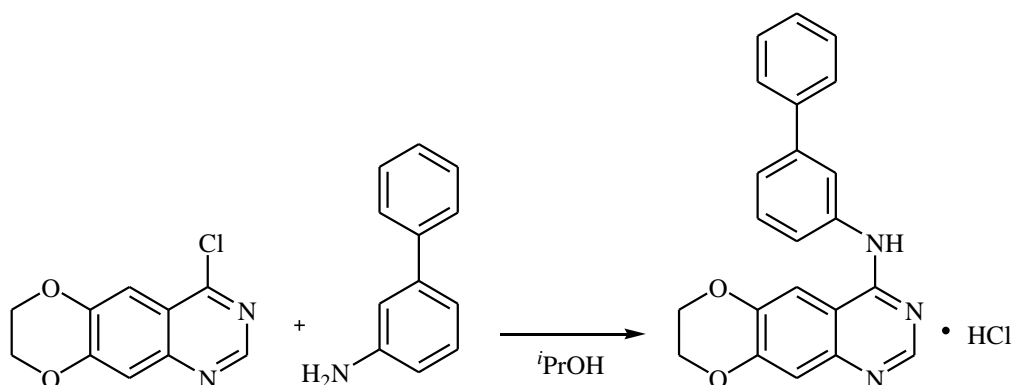
373.0969 (trovato)

Sintesi di 3-fenilammina



Ad una soluzione di 3-fenilnitrobenzene (1.0 g, 5.0 mmoli) in EtOH assoluto (200 ml) sono stati aggiunti nell'ordine Pd/C 10% (50 mg) e ammonio formiato (1.4 g, 22.5 mmoli). La sospensione è stata posta a riflusso sotto agitazione per 40 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, il catalizzatore è stato allontanato per filtrazione e la soluzione limpida è stata concentrata a secchezza, ottenendo la **3-fenilammina** (1.6 g, resa 95 %), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.55 (dd, J = 7.2, J = 1.7, 2 H, 2'-H e 6'-H); 7.42 (t, J = 7.2, 2 H, 3'-H e 5'-H); 7.32 (tt, J = 7.2, J = 1.7, 1 H, 4'-H); 7.10 (t, J = 7.9, 1 H, 5-H); 6.86 (t, J = 1.9, 1 H, 2-H); 6.78 (dt, J = 7.9, J = 1.9, 1 H, 4-H); 6.58 (dt, J = 7.9, J = 1.9, 1 H, 6-H); 5.21 (s all, 2 H, NH₂).

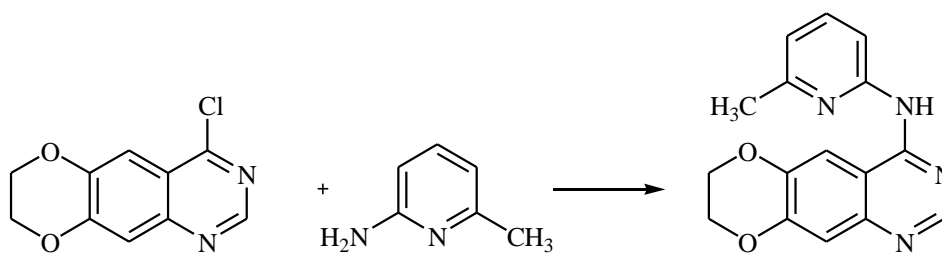
Sintesi di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina cloridrato

Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-fenilanilina (76 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina cloridrato** (0.2 g, resa 88%) con p.f. > di 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.01 (s, 1 H, NH); 8.82 (s, 1 H, 2-H); 8.34 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.03 (s, 1 H, H_{arom}); 7.78 – 7.66 (m, 3 H, H_{arom}); 7.64 – 7.47 (m, 4 H, H_{arom}); 7.44 – 7.37 (m, 1 H, H_{arom}); 7.31 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.55 – 4.41 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₂H₁₈N₃O₂ (M⁺ + 1)
356.1394 (calcolato) 356.1385 (trovato)

Sintesi di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina



Metodo A

Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 2-ammino-6-picolina (50 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore 2-ammino-6-picolina (50 mg, 0.5 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1) senza la formazione di alcun prodotto, quindi la reazione è stata abbandonata.

Metodo B

Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 2-ammino-6-picolina (0.1 g, 0.9 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso senza ottenere alcun prodotto diverso da quello di partenza (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1), quindi la reazione è stata abbandonata.

Metodo C

Ad una sospensione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) e 2-ammino-6-picolina (0.1 g, 0.7 mmoli) in DMF anidra (5 ml) sono stati aggiunti Pd(OAc)₂ (1.0 mg, 0.01 mmoli), BINAP (13.0 mg, 0.02 mmoli) e Cs₂CO₃ (0.3 g, 0.75 mmoli). La sospensione è stata irradiata con microonde a 100W, raggiungendo la temperatura di 150°C in 2 minuti. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata ripresa con EtOH (20 ml) e il precipitato formatosi è stato allontanato per filtrazione. La soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato ripreso con H₂O (100 ml); il residuo indisciolto è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la **(6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina** (20 mg, resa 15%) con p.f. 218 °C.

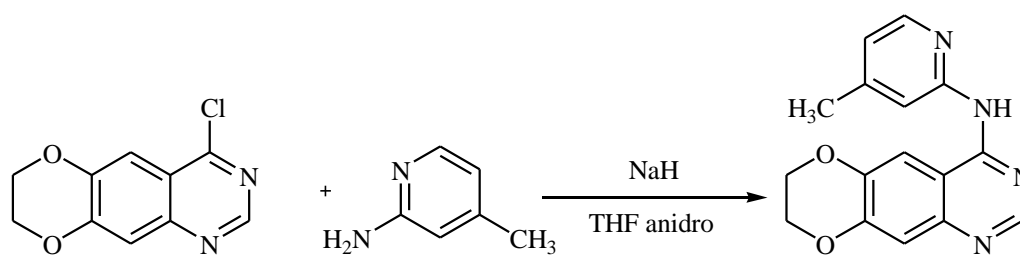
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.05 (s all, 1 H, NH); 8.50 (s, 1 H, 2-H); 8.25 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.20 (d, J= 7.6, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.71 (t, J=7.6, 1 H, 5'-H); 7.20 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.98 (d, J= 7.6, 1 H, 4'-H o 6'-H); 4.42 – 4.37 (m, 4 H, OCH₂CH₂O); 2.47 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₆H₁₅N₄O₂ (M⁺ + 1)
295.1190 (calcolato) 295.1169 (trovato)

Metodo D

Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in THF anidro (4 ml) sono stati aggiunti 2-ammino-6-picolina (0.1 g, 0.5 mmoli) e NaH (30 mg, 1.4 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti e poi è stata posta a riflusso per un'ora e 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata versata in 5 ml di H₂O e il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la **(6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina** (0.1 g, resa 65%), con p.f., ¹H-NMR, e HRMS uguali al composto precedentemente preparato.

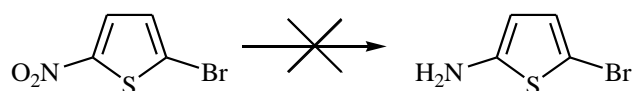
Sintesi di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina



Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-etilendiossichinazolin-4-il (0.1 g, 0.5 mmoli) in THF anidro (4 ml) sono stati aggiunti 2-ammino-4-picolina (0.1 g, 0.5 mmoli) e NaH (30 mg, 1.4 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti e poi è stata posta a riflusso per un'ora (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata versata in 5 ml di H₂O e il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina (0.1 g, resa 75%), con p.f. 120 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.03 (s all, 1 H, NH); 8.53 (s, 1 H, 2-H); 8.26 – 8.23 (m, 2 H, 6'-H e 4'-H o 3'-H); 8.23 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.19 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.90 (d, 1 H, J= 5.4, 4'-H o 3'-H); 4.43 – 4.35 (m, 4 H, OCH₂CH₂O); 2.40 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₆H₁₅N₄O₂ (M⁺ + 1)
 295.1190 (calcolato) 295.1170 (trovato)

Tentativo di sintesi di 2-ammino-5-bromotiofene*Metodo A*

Ad una soluzione di 5-bromo-2-nitrotiofene (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (10 ml) sono stati aggiunti nell'ordine Pd/C 10% (40 mg) e ammonio formiato (0.1 g, 2.3 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1) senza formazione di alcun prodotto diverso da quello di partenza, quindi la reazione è stata abbandonata.

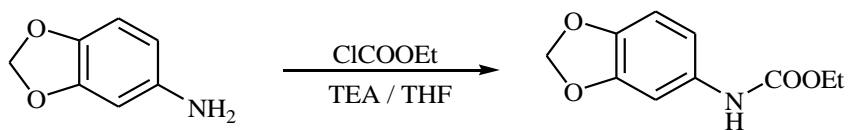
Metodo B

Ad una sospensione di Pd/C 10% (40 mg) in isopropanolo (20 ml) saturata con H₂ gassoso è stata aggiunta una soluzione di 5-bromo-2-nitrotiofene (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (10 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione sotto leggera pressione di H₂ senza ottenere il prodotto desiderato (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1), quindi la reazione è stata abbandonata.

Metodo C

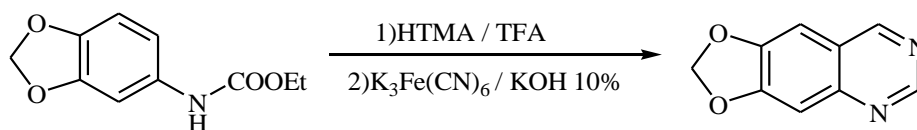
Ad una soluzione di 5-bromo-2-nitrotiofene (0.1 g, 0.5 mmoli) in EtOH assoluto (10 ml) è stato aggiunto SnCl₂·2H₂O (0.5 g, 2.3 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la soluzione è stata concentrata a secchezza, il residuo solido è stato ripreso con isopropanolo e il precipitato formatosi è stato allontanato per filtrazione. La soluzione limpida è stata concentrata a secchezza, ottenendo una miscela complessa di prodotti, quindi la reazione è stata abbandonata.

Sintesi di etile (3,4-metilendioossifenil)carbammato



Ad una soluzione di 3,4-metilendioossianilina (5.0 g, 36.5 mmoli) in THF anidro (440 ml) e TEA (10.2 ml, 72.9 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (6.9 ml, 72.9 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'**etile (3,4-metilendioossifenil)carbammato** (resa quantitativa) di consistenza oleosa.

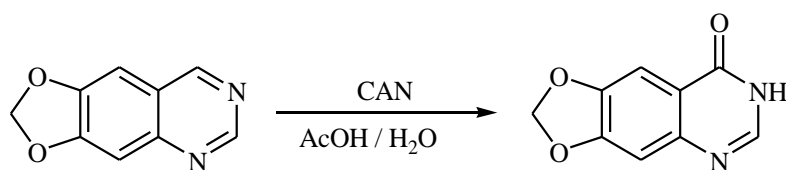
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.47 (s all, 1 H, NH); 7.11 (s, 1 H, 2-H); 6.87 – 6.78 (m, 2 H, 5-H e 6-H); 5.95 (s, 2 H, OCH₂O); 4.09 (q, J= 7.1, 2 H, COOCH₂CH₃); 1.22 (t, J= 7.1, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di 6,7-metilendirossichinazolina

Una soluzione di etile (3,4-metilendirossifenil)carbammato (7.2 g, 34.0 mmoli) e urotropina (4.2 g, 34.0 mmoli) in TFA (90 ml) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1/1 (1200 ml). Alla miscela (pH ≥10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (89.5 g, 272.0 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (1200 ml) ed estratta a fondo con EtOAc (3 x 700 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza ottenendo la **6,7-metilendirossichinazolina** (5.0 g, resa 83%) con p.f. 158 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): 9.12 (s, 1 H, 4-H); 9.10 (s, 1 H, 2-H); 7.29 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.12 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.17 (s, 2 H, OCH₂O).

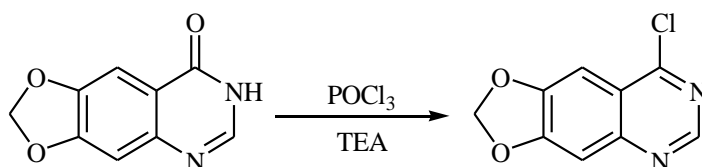
Sintesi di 6,7-metilendiossi-4(3H)-chinazolinone



Ad una soluzione di 6,7-metilendiossichinazolina (0.5 g, 2.9 mmoli) in AcOH (1 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di CAN (6.4 g, 11.6 mmoli) in H₂O (13 ml). Al termine dell'aggiunta (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con AcOH, portando all'ottenimento del **6,7-metilendiossi-4(3H)-chinazolinone** (0.4 g, resa 68%), con p.f. > 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.97 (s, 1 H, 2-H); 7.41 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.12 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.20 (s, 2 H, OCH₂O).

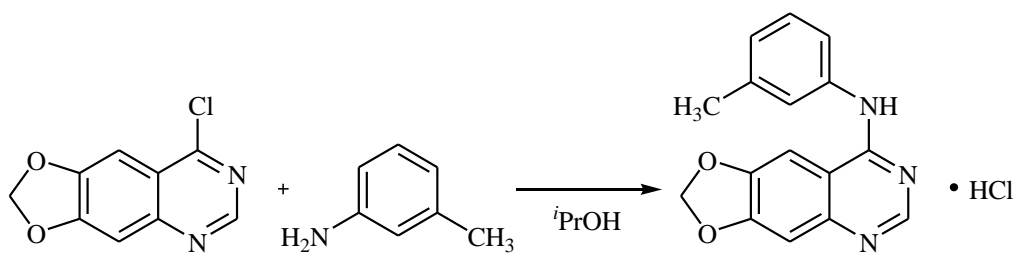
Sintesi di 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina



Ad una sospensione di 6,7-metilendiossi-4(3H)-chinazolinone (0.8 g, 4.3 mmoli) in POCl₃ (9.0 ml, 96.5 mmoli) è stata aggiunta TEA (3 ml). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 3 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato ripreso con EtOAc (100 ml) e lavato con una soluzione satura di NaHCO₃ (100 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina** (0.6 g, resa 72%) con p.f. 168 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): 8.85 (s, 1 H, 2-H); 7.49 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.32 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.21 (s, 2 H, OCH₂O).

Sintesi di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato

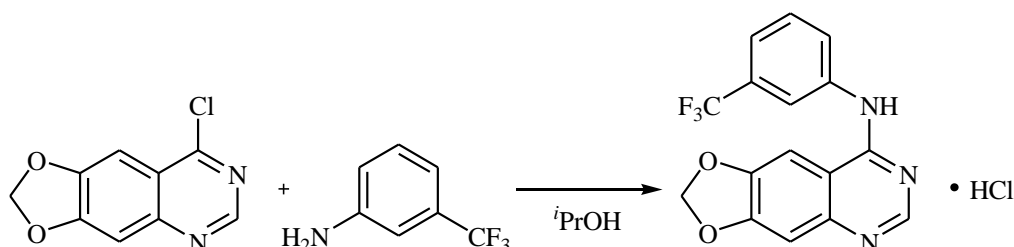


Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina (0.10 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta *m*-toluidina (50 μ l, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore *m*-toluidina (50 μ l, 0.5 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata, ottenendo la **(6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato** (0.1 g, resa 72%) con p.f. > di 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.58 (s all, 1 H, NH); 8.75 (s, 1 H, 2-H); 8.14 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.52 – 7.45 (m, 2 H, 2'-H e 4'-H o 6'-H); 7.35 (t, J= 8.0, 1 H, 5'-H); 7.29 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.10 (d, J= 8.0, 1 H, 4'-H o 6'-H); 6.36 (s, 2 H, OCH₂O); 2.36 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₆H₁₄N₃O₂ (M⁺ + 1)
 280.1081 (calcolato) 280.1076 (trovato)

Sintesi di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato



Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolin-4-il (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta *m*-trifluorometilanilina (60 μ l, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore *m*-trifluorometilanilina (60 μ l, 0.5 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata filtrata, ottenendo la **(6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato** (0.2 g, resa 82%) con p.f. > di 300 °C.

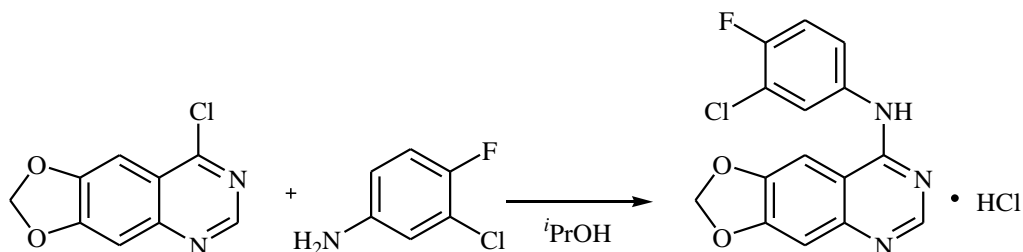
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.76 (s all, 1 H, NH); 8.83 (s, 1 H, 2-H); 8.20 – 8.17 (m, 2 H, 2'-H e 5-H o 8-H); 8.09 (d, J= 7.9, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.71 (t, J= 7.9, 1 H, 5'-H); 7.61 (d, J= 7.9, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.33 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.38 (s, 2 H, OCH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₆H₁₁F₃N₃O₂ (M⁺ + 1)

334.0796 (calcolato)

334.0778 (trovato)

Sintesi di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato



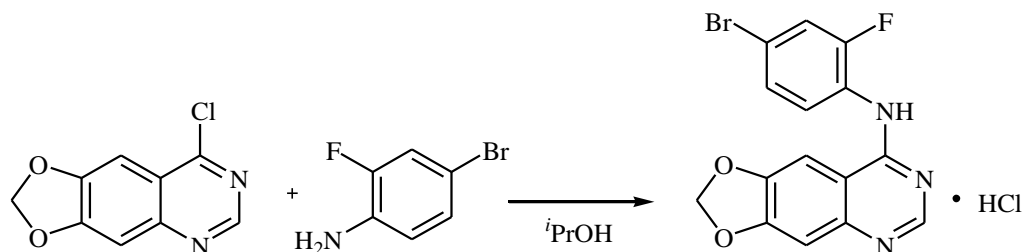
Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-cloro-4-fluoroanilina (70 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore 3-cloro-4-fluoroanilina (70 mg, 0.5 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato** (0.1 g, resa 86%) con p.f. > di 300°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.72 (s all, 1 H, NH); 8.81 (s, 1 H, 2-H); 8.16 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.05 (dd, J = 6.8, J = 2.6, 1 H, 6'-H); 7.75 – 7.68 (m, 1 H, 2'-H o 5'-H); 7.57 – 7.50 (m, 1 H, 2'-H o 5'-H); 7.32 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.37 (s, 2 H, OCH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₅H₁₀ClFN₃O₂

318.0440 (calcolato)	318.0519 (trovato)	(M ⁺ + 1)
320.0415 (calcolato)	320.0413 (trovato)	(M ⁺ + 3)

Sintesi di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato



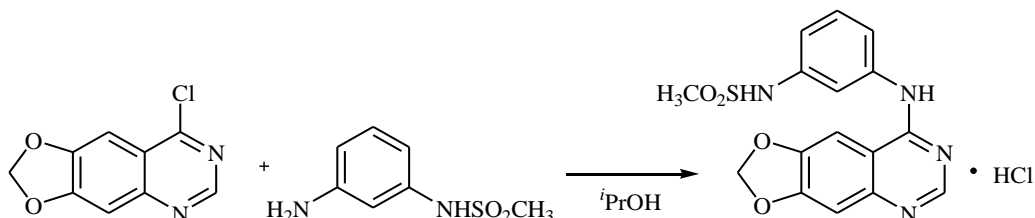
Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 4-bromo-2-fluoroanilina (91 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 100 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 20 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore 4-bromo-2-fluoroanilina (50 mg, 0.3 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 20 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato** (0.2 g, resa 84%) con p.f. > di 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.59 (s all, 1 H, NH); 8.67 (s, 1 H, 2-H); 8.02 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.75 (dd, J = 9.9, J = 2.0, 1 H, 5'-H); 7.57 – 7.48 (m, 2 H, 3'-H e 6'-H); 7.30 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.36 (s, 2 H, OCH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₅H₁₀BrFN₃O₂

361.9935 (calcolato)	361.9917 (trovato)	(M ⁺ + 1)
363.9916 (calcolato)	363.9909 (trovato)	(M ⁺ + 3)

Sintesi di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonamidofenil)-ammina cloridrato

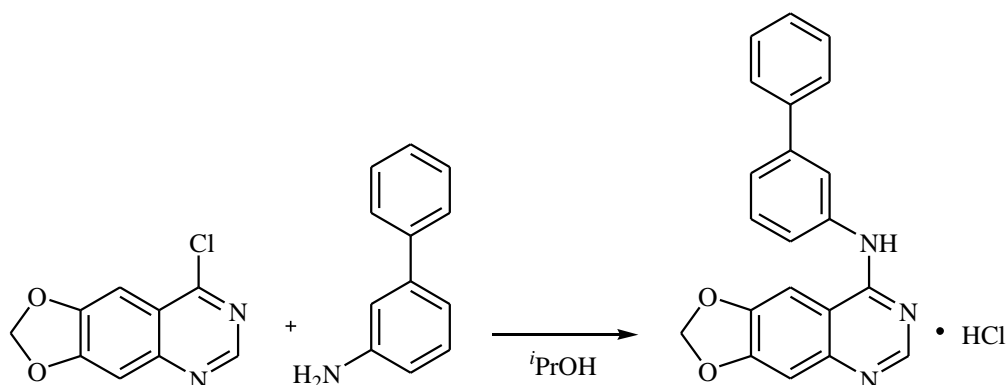


Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-metansolfonammidoanilina (89 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95/5). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore 3-metansolfonammidoanilina (45 mg, 0.3 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95/5). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonamidofenil)-ammina cloridrato** (0.2 g, resa 91%) con p.f. > di 300 °C.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 10.74 (s all, 1 H, NH); 9.96 (s all, 1 H, NH); 8.77 (s, 1 H, 2-H); 8.19 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.57 (s, 1 H, 2'-H); 7.48 (d, $J = 8.2$, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.41 (t, $J = 8.2$, 1 H, 5'-H); 7.32 (d, $J = 8.2$, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.09 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.37 (s, 2 H, OCH_2O); 3.06 (s, 3 H, CH_3).

HRMS (ESI-TOF) per $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M}^+ + 1$)
 359.0809 (calcolato) 359.0784 (trovato)

Sintesi di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina cloridrato

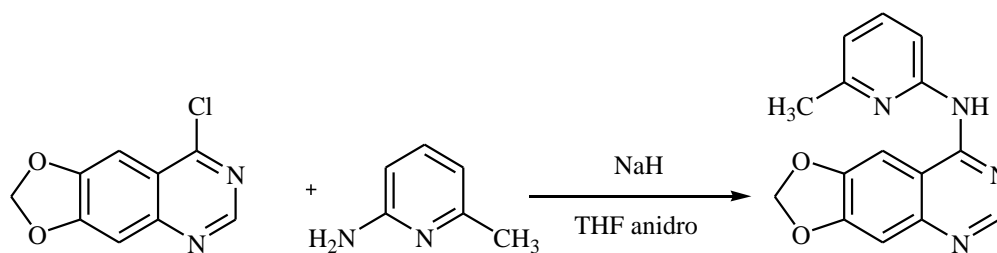


Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-fenilanilina (81 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina cloridrato** (0.2 g, resa 85%) con p.f. > di 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.66 (s, 1 H, NH); 8.77 (s, 1 H, 2-H); 8.18 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.03 (s, 1 H, H_{arom}); 7.78 – 7.67 (m, 3 H, H_{arom}); 7.60 – 7.47 (m, 4 H, H_{arom}); 7.45 – 7.37 (m, 1 H, H_{arom}); 7.30 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.37 (s, 2 H, OCH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₁H₁₆N₃O₂ (M⁺ + 1)
342.1237 (calcolato) 342.1260 (trovato)

Sintesi di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina



Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in THF anidro (4 ml) sono stati aggiunti 2-ammino-6-picolina (60 mg, 0.6 mmoli) e NaH (60 mg, 2.5 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti e poi è stata posta a riflusso per un'ora e 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata versata in 5 ml di H₂O e il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la **(6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina** (0.1 g, resa 75%) con p.f. 213 °C.

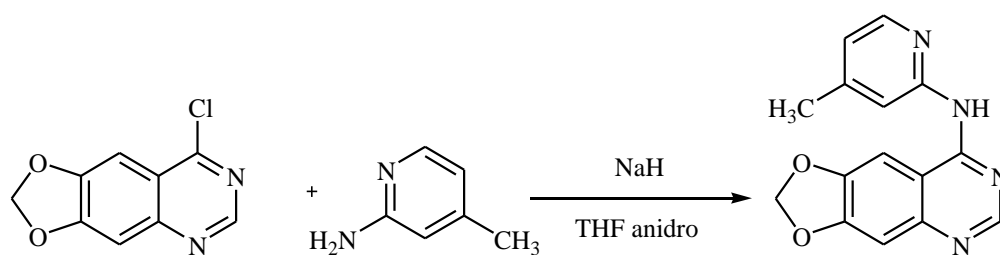
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.93 (s all, 1 H, NH); 8.53 (s, 1 H, 2-H); 8.21 – 8.13 (m, 2 H, 5-H o 8-H e 4'-H o 6'-H); 7.70 (t, J= 7.6, 1 H, 5'-H); 7.20 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.97 (d, J= 7.6, 1 H, 4'-H o 6'-H); 6.23 (s, 2 H, OCH₂O); 2.48 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₅H₁₂N₄O₂ (M⁺ + 1)

281.1033 (calcolato)

281.1002 (trovato)

Sintesi di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina

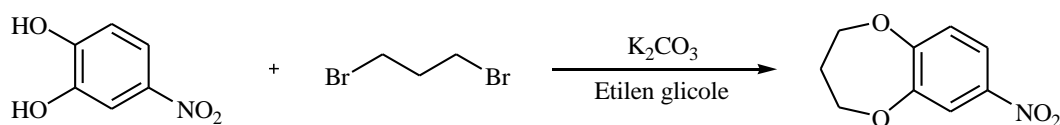


Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-metilendiossichinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in THF anidro (4 ml) sono stati aggiunti 2-ammino-4-picolina (60 mg, 0.6 mmoli) e NaH (30 mg, 1.4 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti e poi è stata posta a riflusso per un'ora e 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata versata in H₂O (10 ml) ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato cristallizzato da ⁱPrOH, ottenendo la **(6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina** (0.1 g, resa 68%) con p.f. 116 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.44 (s all, 1 H, NH); 8.82 (s, 1 H, 2-H); 8.38 (d, J= 5.1, 1 H, 6'-H); 8.29 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.88 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.37 (s, 1 H, 3'-H); 7.26 (d, J= 5.1, 1 H, 5'-H); 6.36 (s, 2H, OCH₂O); 2.47 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₅H₁₂N₄O₂ (M⁺ + 1)
281.1033 (calcolato) 281.1054 (trovato)

Sintesi di 3,4-(1',3'-propilendiossi)nitrobenzene



Metodo A

Ad una sospensione di 4-nitrocatecolo (5.0 g, 32.2 mmoli) in glicole etilenico (32 ml), sono stati aggiunti 1,3-dibromopropano (16.4 ml, 161.2 mmoli) e potassio carbonato (13.8 g, 100.0 mmoli). La miscela di reazione è stata riscaldata a 120 °C per 22 ore in atmosfera di azoto (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata diluita con 200 ml di H₂O, con formazione di un abbondante precipitato, che è stato filtrato e cristallizzato da EtOH, ottenendo il **3,4-(1',3'-propilendiossi)nitrobenzene** (3.3 g, resa 52%), con p.f. 107 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.84 (dd, J=8.9; J=2.8, 1 H, 6-H); 7.77 (d, J=2.8, 1 H, 2-H); 7.16 (d, J=8.9, 1 H, 5-H); 4.33 (t, J=5.8, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.27 (t, J=5.8, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.19 (quint, J=5.8, 2 H, 2'-CH₂).

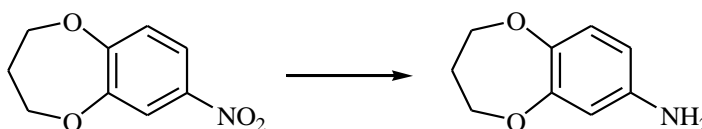
Metodo B

Ad una sospensione di 4-nitrocatecolo (5.0 g, 32.2 mmoli) in glicole etilenico (32 ml), sono stati aggiunti 1,3-dibromopropano (26.2 ml, 257.9 mmoli) e potassio carbonato (13.8 g, 100.0 mmoli). La miscela di reazione è stata riscaldata a 120 °C per 24 ore in atmosfera di azoto (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela è stata ripresa con 200 ml di H₂O ed estratta a fondo con EtOAc (250 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄. La soluzione limpida è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: CHCl₃), ottenendo il **3,4-(1',3'-propilendiossi)nitrobenzene** (3.3 g, resa 52%) con ¹H-NMR e p.f. uguali al composto precedentemente ottenuto.

Metodo C

Ad una sospensione di 4-nitrocatecolo (5.0 g, 32.2 mmoli) in glicole etilenico (32 ml), sono stati aggiunti 1,3-dibromopropano (13.1 ml, 129.0 mmoli) e potassio carbonato (9.4 g, 67.7 mmoli). La miscela di reazione è stata riscaldata a 120 °C per 2 giorni in atmosfera di azoto (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1).

Il residuo sublimato durante la reazione è stato purificato mediante cristallizzazione in etanolo, ottenendo il **3,4-(1',3'-propilendiossi)nitrobenzene** (3.8 g, resa 60%) con ¹H-NMR e p.f. uguali al composto precedentemente ottenuto.

Sintesi di 3,4-(1',3'-propilendiossi)anilina*Metodo A*

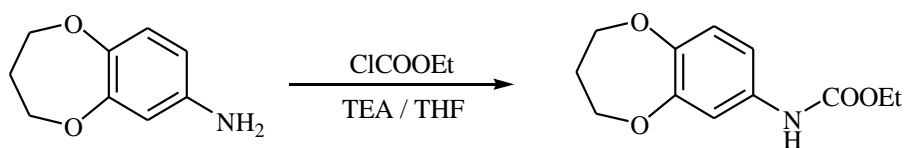
Ad una soluzione di 3,4-propilendiossi-nitrobenzene (2.7 g, 13.9 mmoli) in etanolo assoluto (500 ml) è stato aggiunto Pd/C 10% (40 mg). La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente in atmosfera di H₂ per 17 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Il catalizzatore è stato quindi allontanato per filtrazione e la soluzione limpida è stata concentrata a secchezza, ottenendo la **3,4-(1',3'-propilendiossi)anilina** (2.3 g, resa quantitativa), con p.f. 68 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 6.64 (d, J=8.4, 1 H, 5-H); 6.18 (d, J=2.6, 1 H, 2-H); 6.13 (dd, J=8.4, J=2.7, 1 H, 6-H) ; 4.77 (s all, 2 H, NH₂); 3.99 (t, J=5.3, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 3.90 (t, J=5.3, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 1.98 (quint, J=5.3, 2 H, 2'-CH₂).

Metodo B

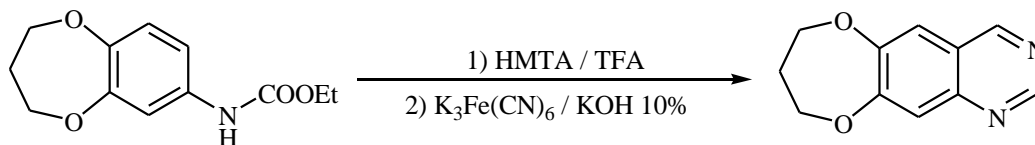
Ad una soluzione di 3,4-propilendiossi-nitrobenzene (0.5 g, 2.6 mmoli) in etanolo assoluto (70 ml) è stato aggiunto $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.9 g, 12.8 mmoli). La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso sotto agitazione per 17 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato ripreso con una soluzione satura di NaHCO_3 (250 ml) e la soluzione ottenuta è stata estratta a fondo con EtOAc (3 x 100 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza, ottenendo la **3,4-(1',3'-propilendiossi)anilina** (0.5 g, resa quantitativa), con $^1\text{H-NMR}$ e p.f. uguali al composto precedentemente preparato.

Sintesi di etile [3,4-(1',3'-propilendiossi)fenil]carbammato



Ad una soluzione di 3,4-propilendiossianilina (2.3 g, 13.9 mmoli) in THF anidro (150 ml) e TEA (3.9 ml, 27.8 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (2.7 ml, 27.8 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza ottenendo l'**etile [3,4-(1',3'-propilendiossi)fenil]carbammato** (3.3 g, resa quantitativa), di consistenza oleosa.

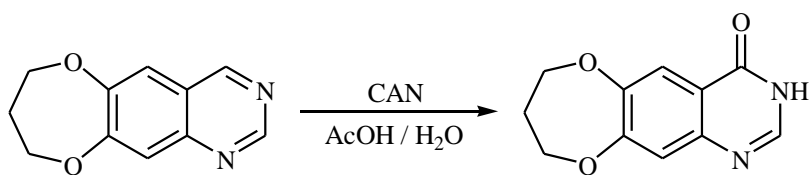
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 9.48 (s all., 1 H, NH); 7.12 (d, $J=2.4$, 1 H, 6-H); 7.00 (dd, $J=8.7$, $J=2.4$, 1 H, 5-H) ; 6.86 (d, $J=8.7$, 1 H, 2-H); 4.13 - 4.01 (m, 6 H, 1'- CH_2 , 3'- CH_2 e $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 2.05 (quint, $J=5.3$, 2 H, 2'- CH_2); 1.22 (t, $J=7.1$, 3 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).

Sintesi di 6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina

Una soluzione di etile [3,4-(1',3'-propilendiossi)fenil]carbamato (3.3 g, 13.9 mmoli) e urotropina (1.9 g, 13.9 mmoli) in TFA (42 ml) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1:1 (420 ml). Alla miscela (pH ≥10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (41.2 g, 125.1 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 20 ore (TLC: EtOAc). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (450 ml) ed estratta a fondo con EtOAc (800 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina** (2.5 g, resa 89%) di consistenza oleosa.

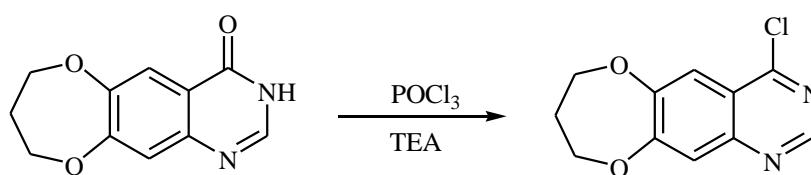
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.37 (s, 1 H, 4-H); 9.11 (s, 1 H, 2-H); 7.68 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.46 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.37 (t, J=5.7, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.31 (t, J=5.7, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.23 (quint, J=5.7, 2 H, 2'-CH₂).

Sintesi di 6,7-(1',3'-propilendiossi)-4(3H)-chinazolinone



Ad una soluzione di 6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina (2.5 g, 12.3 mmoli) in AcOH (5 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di CAN (27.0 g, 49.2 mmoli) in H₂O (60 ml). Al termine dell'aggiunta (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con AcOH, portando all'ottenimento del **6,7-(1',3'-propilendiossi)-4(3H)-chinazolinone** (2.0 g, resa 73%), con p.f. 180 °C.

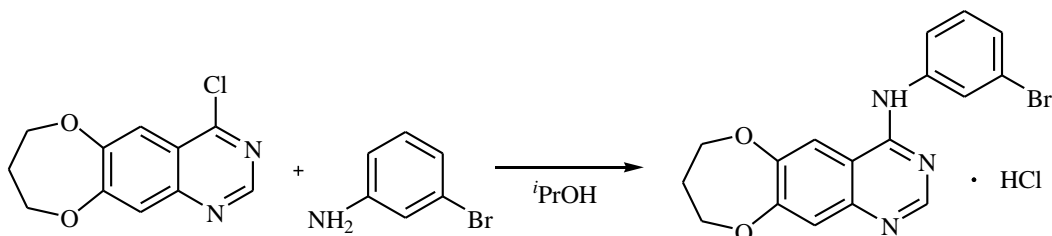
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.97 (s, 1 H, 2-H); 7.56 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.16 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.28 (t, J=5.6, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.22 (t, J=5.6, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.17 (quint, J=5.6, 2 H, 2'-CH₂).

Sintesi di 4-cloro-6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina

Ad una sospensione di 6,7-(1',3'-propilendiossi)-4(3H)-chinazolinone (0.8 g, 3.7 mmoli) in POCl₃ (7 ml) è stata aggiunta TEA (1.9 ml). La miscela è stata posta a riflusso per 3 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato ripreso con EtOAc (100 ml) e lavato prima con una soluzione satura di NaHCO₃ (100 ml) e poi con H₂O (100 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-cloro-6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina** (0.8 g, resa 93%), con p.f. 194 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.92 (s, 1 H, 2-H); 7.68 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.56 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.42 (t, J=5.8, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.36 (t, J=5.8, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.26 (quint, J=5.8, 2 H, 2'-CH₂).

Sintesi di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-bromofenil)ammina cloridrato



Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina (0.1 g, 0.4 mmoli) in isopropanolo (3 ml) è stata aggiunta *m*-bromoanilina (46 µl, 0.4 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **[6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-bromofenil)ammina cloridrato** (0.1 g, resa 70%), con p.f. 240 °C.

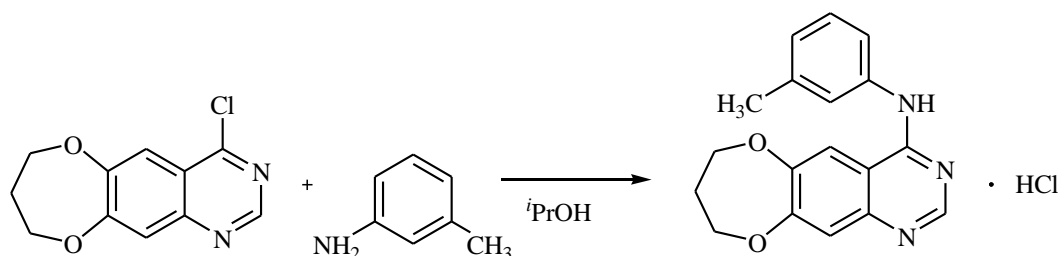
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.93 (s all, 1 H, NH); 8.87 (s, 1 H, 2-H); 8.40 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.08 (t, J=1.6, 1 H, 2'-H) ; 7.76 (dt, J=7.8, J=1.6, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.49 (dt, J=7.8, J=1.6, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.44 (t, J=7.8, 1 H, 5'-H); 7.39 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.44 (t, J=5.7, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.36 (t, J=5.7, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.27 (quint, J=5.7, 2 H, 2'-CH₂).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₇H₁₅BrN₃O₂

372.0348 (calcolato) 372.0227 (trovato) (M⁺ + 1)

374.0327 (calcolato) 374.0219 (trovato) (M⁺ + 3)

Sintesi di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-metilfenil)ammina cloridrato

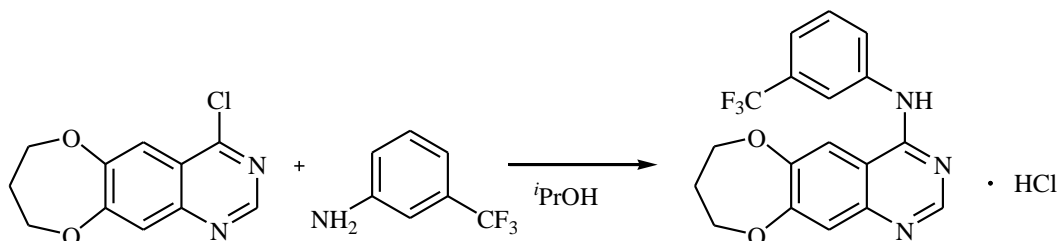


Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina (0.1 g, 0.4 mmoli) in isopropanolo (3 ml) è stata aggiunta *m*-toluidina (45 μ l, 0.4 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore *m*-toluidina (45 μ l, 0.4 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **[6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-metilfenil)ammina cloridrato** (40 mg, resa 28%), con p.f. 213 °C.

¹H-NMR (CD₃OD-*d*₆): 8.40 (s, 1 H, 2-H); 8.01 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.55 (s, 1 H, 2'-H); 7.52 (d, J=7.7, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.34 – 7.27 (m, 2 H, 5'-H e 5-H o 8-H); 7.05 (d, J= 7.7, 1-H, 4'-H o 6'-H) ; 4.41 (t, J=5.8, 2-H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.36 (t, J=5.8, 2-H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.41 (s, 3 H, CH₃); 2.32 (quint, J=5.8, 2 H, 2'-CH₂).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₈H₁₈N₃O₂ (M⁺ + 1)
308.1399 (calcolato) 308.1222 (trovato)

Sintesi di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-trifluorometilfenil)-ammina cloridrato



Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina (0.1 g, 0.4 mmoli) in isopropanolo (3 ml) è stata aggiunta *m*-trifluorometilanilina (52 μ l, 0.4 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, per altre due volte è stata aggiunta ulteriore *m*-trifluorometilanilina (52 μ l, 0.4 mmoli) sottoponendo ogni volta la miscela di reazione ad un ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata e il precipitato è stato lavato con etere di petrolio ottenendo la **[6,7-(1',3'propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato** (40 mg, resa 22%), con p.f. 248 °C.

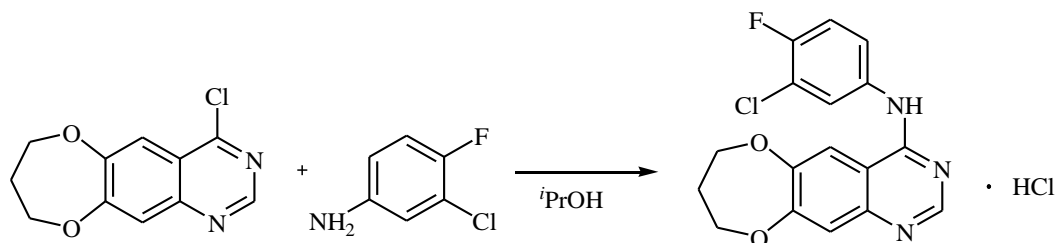
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.55 (s all, 1 H, NH); 8.77 (s, 1 H, 2-H); 8.34 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.26 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.15 (d, J = 8.2, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.70 (t, J= 8.2, 1 H, 5'-H); 7.57 (d, J = 8.2, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.35 (s, 1 H, 2'-H); 4.41 (t, J=5.6, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.35 (t, J=5.6, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.27 (quint, J=5.6, 2 H, 2'-CH₂).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₈H₁₅F₃N₃O₂ (M⁺+1)

362.1116 (calcolato)

362.0950 (trovato)

Sintesi di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-cloro-4'-fluorofenil)-ammina cloridrato



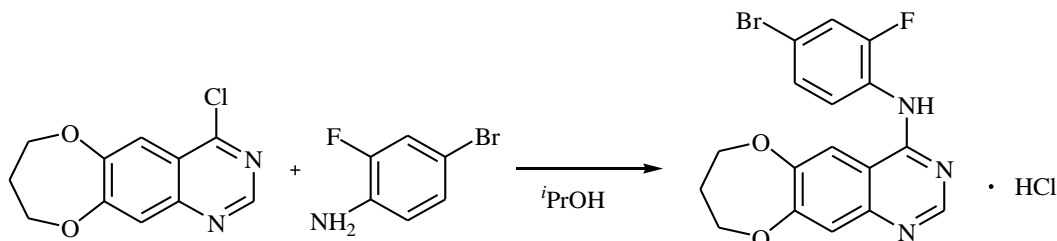
Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina (0.1 g, 0.4 mmoli) in isopropanolo (1 ml) è stata aggiunta 3-cloro-4-fluoroanilina (61 mg, 0.4 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80°C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **[6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato** (70 mg, resa 43%), con p.f. 254 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.66 (s, 1 H, 2-H); 8.10 (dd, J=2.7, J=6.9, 6'-H); 7.69 – 7.63 (m, 1 H, 2'-H); 7.62 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.54 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.32 (t, J = 6.9, 1 H, 5'-H); 4.55 (t, J=5.7, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.50 (t, J=5.7, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.46 (quint, J=5.7, 2'-CH₂).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₇H₁₄ClFN₃O₂

346.0759 (calcolato)	346.0722 (trovato)	(M ⁺ + 1)
348.0729 (calcolato)	348.0733 (trovato)	(M ⁺ + 3)

Sintesi di [6,7-(1',3'-propilendioossi)chinazolin-4-il]-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato



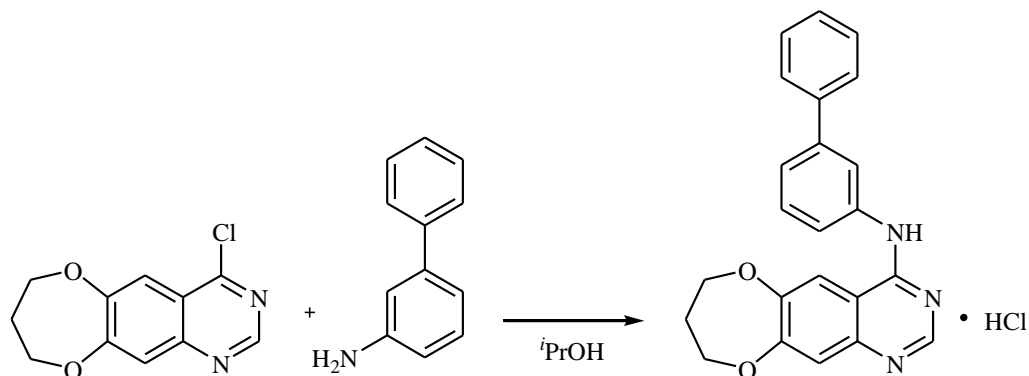
Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-(1',3'-propilendioossi)chinazolina (0.1 g, 0.4 mmoli) in isopropanolo (3 ml) è stata aggiunta 4-bromo-2-fluoroanilina (0.1 g, 0.4 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore 4-bromo-2-fluoroanilina (0.1 g, 0.4 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata concentrata a secchezza e mediante colonna cromatografica con eluente CHCl₃ si è ottenuta la **[6,7-(1',3'-propilendioossi)chinazolin-4-il]-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato** (17 mg, resa 12%), con p.f. 203 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.23 (s all, 1 H, NH); 8.51 (s, 1 H, 2-H); 8.17 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.70 (d, J=10.0, 1 H, 6'-H) ; 7.53-7.46 (m, 2 H, 3'H e 5'H); 7.33 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.36 (t, J=5.8, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.31 (t, J=5.8, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.23 (quint, J=5.4, 2 H, 2'-CH₂).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₇H₁₄BrFN₃O₂

390.0253 (calcolato)	390.0246 (trovato)	(M ⁺ + 1)
390.0233 (calcolato)	390.0235 (trovato)	(M ⁺ + 3)

Sintesi di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(*m*-bifenil)ammina cloridrato

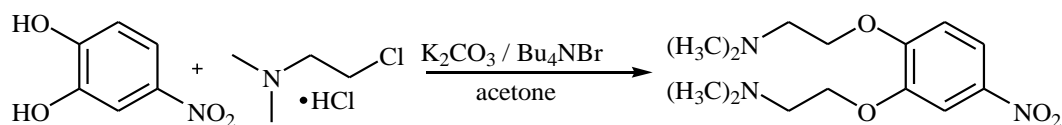


Ad una soluzione di 4-cloro-6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolina (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-fenilanilina (71 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **[6,7-(1',3'-metilendiossi)chinazolin-4-il]-(*m*-bifenil)ammina cloridrato** (0.2 g, resa 89%) con p.f. > di 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.73 (s, 1 H, NH); 8.78 (s, 1 H, 2-H); 8.39 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.06 (s, 1 H, H_{arom}); 7.82 – 7.66 (m, 3 H, H_{arom}); 7.59 – 7.46 (m, 4 H, H_{arom}); 7.45 – 7.37 m, 1 H, H_{arom}); 7.35 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.42 (t, J=5.9, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 4.35 (t, J=5.9, 2 H, 1'-CH₂ o 3'-CH₂); 2.27 (quint, J=5.4, 2'-CH₂).

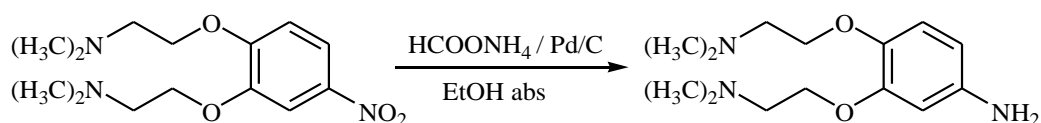
HRMS (ESI-TOF) per C₂₃H₂₀N₃O₂ (M⁺ + 1)
 370.1550 (calcolato) 370.1521 (trovato)

Sintesi di 3,4-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)nitrobenzene



Ad una soluzione di 4-nitrocatecolo (4.0 g, 26.0 mmoli) in acetone (520 ml) sono stati aggiunti Bu_4NBr (1.7 g, 5.2 mmoli), K_2CO_3 (172.5 g, 1248.0 mmoli) e *N,N*-dimetilamminoetilcloruro cloridrato (22.3 g, 155.0 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 16 ore (TLC: $CHCl_3/MeOH$ 8/2). Dopo raffreddamento la sospensione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato ripreso con H_2O ed estratto a fondo con $CHCl_3$. La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con EtOAc e la soluzione è stata ridotta di volume fino a precipitazione delle impurezze che sono state allontanate per filtrazione. La soluzione limpida è stata concentrata a secchezza, ottenendo il **3,4-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)nitrobenzene** (4.5 g, resa 56%) di consistenza oleosa.

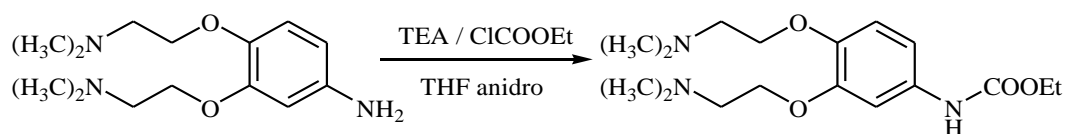
1H -NMR ($CDCl_3$): 7.87 (dd, $J= 8.9, J= 2.6$, 1 H, 6-H); 7.74 (d, $J=2.6$, 1 H, 2-H); 6.89 (d, $J= 8.9$, 1 H, 5-H); 4.21 – 4.10 (m, 4 H, 2 x OCH_2CH_2N); 2.83 -2.74 (m, 4 H, 2 x OCH_2CH_2N); 2.36 – 2.34 (m, 12 H, 2 x $N(CH_3)_2$).

Sintesi di 3,4-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)anilina

Ad una soluzione di 3,4-*bis*(2'-N,N-dimetilamminoetossi)nitrobenzene (2.5 g, 8.2 mmoli) in EtOH assoluto (220 ml) sono stati aggiunti Pd/C 10% (40 mg) e ammonio formiato (2.6 g, 41.2 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 8/2). Il catalizzatore è stato allontanato per filtrazione e la soluzione limpida è stata concentrata a secchezza, ottenendo la **3,4-*bis*(2'-N,N-dimetilamminoetossi)anilina** (resa quantitativa) di consistenza oleosa.

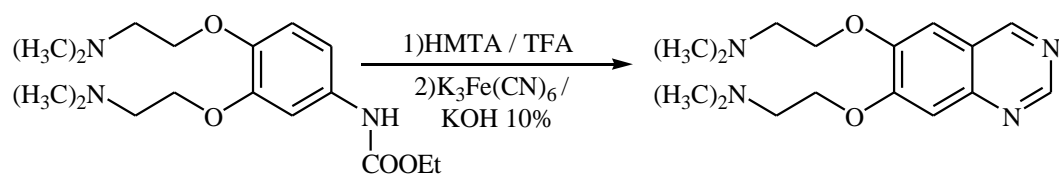
¹H-NMR (CDCl₃): 6.75 (d, J= 8.5, 1 H, 5-H); 6.34 (d, J= 2.6, 1 H, 2-H); 6.24 (dd, J= 8.5, J= 2.6, 1 H, 6-H); 4.28 (t, J= 5.0, 2 H, OCH₂CH₂N); 4.21 (t, J= 5.0, 2 H, OCH₂CH₂N); 3.31 – 3.21 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂N); 2.79 – 2.78 (m, 6 H, N(CH₃)₂); 2.73 – 2.71 (m, 6 H, N(CH₃)₂).

Sintesi di etile [3,4-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)fenil]carbammato



Ad una soluzione di 3,4-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)anilina (3.5 g, 13.0 mmoli) in THF anidro (240 ml) e TEA (7.2 ml, 52.0 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (2.5 ml, 26.0 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per un'ora (TLC: CHCl₃/MeOH 8/2). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con EtOAc e filtrato a caldo. Il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'etile [3,4-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)fenil]carbammato (3.0 g resa 67%) di consistenza oleosa.

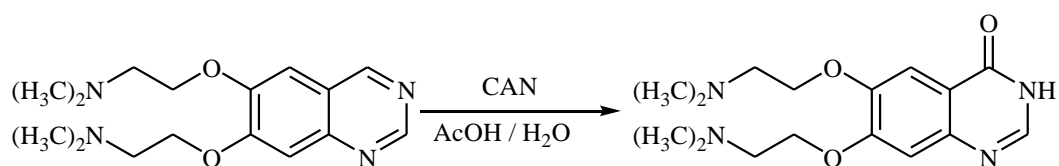
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.34 (s all, 1 H, NH); 7.16 (s, 1 H, 2-H); 6.95 – 6.82 (m, 2 H, 6-H e 5-H); 4.10 (q, J= 7.1, 2 H, COOCH₂CH₃); 4.04 – 3.90 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂N); 2.64 – 2.53 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂N); 2.23 – 2.18 (m, 12 H, 2 x N(CH₃)₂); 1.22 (t, J= 7.1, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di 6,7-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)chinazolina

Una soluzione di etile [3,4-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)fenil]carbammato (2.8 g, 8.1 mmoli) e urotropina (1.2 g, 8.1 mmoli) in TFA (25 ml) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 8/2). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1:1 (270 ml). Alla miscela (pH ≥10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (21.3 g, 64.8 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 8/2). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O ed estratta a fondo con CHCl₃. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **6,7-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)chinazolina** (1.6 g, resa 65%) di consistenza oleosa.

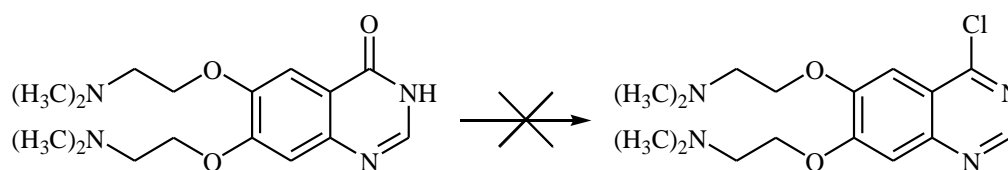
¹H-NMR (CDCl₃): 9.13 (s, 2 H, 2-H e 4-H) ; 7.23 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.09 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.31 – 4.18 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂N); 2.90 - 2.80 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂N); 2.41 – 2.31 (m, 12 H, 2 x N(CH₃)₂).

Sintesi di 6,7-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)-4(3H)-chinazolinone



Ad una soluzione di 6,7-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)chinazolina (1.6 g, 5.3 mmoli) in AcOH (2 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di CAN (11.6 g, 21.2 mmoli) in H₂O (24 ml). La soluzione è stata neutralizzata con NH₄OH concentrato fino a pH 7 e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato estratto con Soxhlet per 40 ore utilizzando come solvente EtOAc. La soluzione organica è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna, eluendo con MeOH, isolando il **6,7-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)-4(3H)-chinazolinone** (1.2 g, resa 76%) di consistenza oleosa.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.98 (s, 1 H, 2-H); 7.44 (s, 1 H, 5-H o 8- H); 7.13 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.23 – 4.09 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂N); 2.71 – 2.62 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂N); 2.27 – 2.22 (m, 12 H, 2 x N(CH₃)₂).

Tentativo di sintesi di 4-cloro-6,7-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)chinazolina**Metodo A**

Ad una sospensione di 6,7-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)-4(3H)-chinazolinone (0.1 g, 0.3 mmoli) in POCl₃ (1.0 ml, 1.1 mmoli) è stata aggiunta TEA (0.5 ml). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 10 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 8/2). Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido ottenuto è stato ripreso con EtOAc e lavato con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza senza ottenere il prodotto desiderato, quindi la reazione è stata abbandonata.

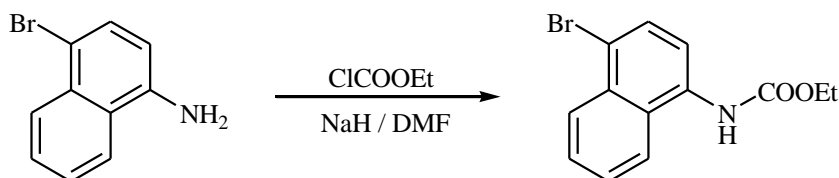
Metodo B

Ad una soluzione di 6,7-bis(2'-N,N-dimetilamminoetossi)-4(3H)-chinazolinone (0.1 g, 0.3 mmoli) in DCE (0.5 ml) sono stati aggiunti trifetilfosfina (0.2 g, 0.8 mmoli) e CCl₄ (0.2 ml, 1.6 mmoli). La miscela di reazione è irradiata con microonde a 50 W, raggiungendo la temperatura di 100 °C in 10 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 8 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 8/2). Dopo raffreddamento, sono stati aggiunti ulteriori trifetilfosfina (0.2 g, 0.8 mmoli) e CCl₄ (1.0 ml, 10.4 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 8 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 8/2). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con CHCl₃ e concentrata a secchezza senza ottenere il prodotto desiderato, quindi la reazione è stata abbandonata.

Metodo C

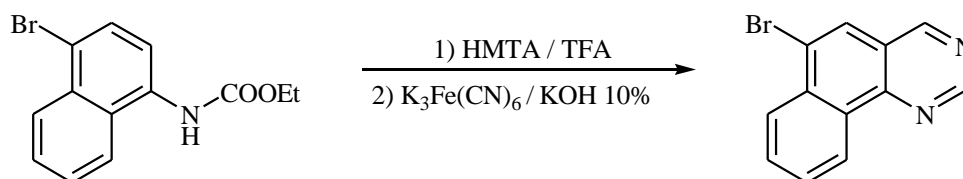
Ad una soluzione di 6,7-bis(2'-*N,N*-dimetilamminoetossi)-4(3*H*)-chinazolinone (0.1 g, 0.2 mmoli) in CHCl₃ (0.5 ml) sono stati aggiunti trifenilfosfina (0.1 g, 0.4 mmoli) e CCl₄ (0.2 ml, 1.6 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso (TLC: CHCl₃/MeOH 8/2), ma non è stato rilevato alcun prodotto diverso da quello di partenza, quindi la reazione è stata abbandonata.

Sintesi di etile (4-bromonaftalen-1-il)carbammato



Ad una soluzione di 4-bromo-1-naftilammina (5.0 g, 22.5 mmoli) in DMF anidra (10 ml) sono stati aggiunti lentamente e sotto agitazione rispettivamente NaH (0.6 g, 24.8 mmoli) ed una soluzione di etile cloroformiato (3.2 ml, 33.8 mmoli) in DMF anidra (5 ml). La soluzione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata cautamente versata in una soluzione acquosa saturata con NH₄Cl (500 ml), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con abbondante H₂O, ottenendo l' **etile (4-bromonaftalen-1-il)carbammato** (6.6 g, resa quantitativa), con p.f. 143 °C.

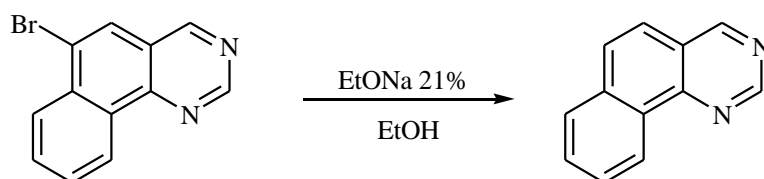
¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 8.28 (dd, J = 4.2, J = 2.1, 1 H, 5-H o 8-H); 7.88 (dd, J = 4.2, J = 2.1, 1 H, 5-H o 8-H); 7.77 (s, 2 H, 2-H e 3-H); 7.65 – 7.55 (m, 2 H, 6-H e 7-H); 6.90 (s all, 1 H, NH); 4.28 (q, J = 7.1, 2 H, COOCH₂CH₃); 1.35 (t, J = 7.1, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di 6-bromobenzo[h]chinazolina

Una soluzione di etile (4-bromonaftalen-1-il) carbammato (2.9 g, 10.0 mmoli) e urotropina (7.7 g, 55.0 mmoli) in TFA (60 ml) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1:1 (600 ml). Alla miscela (pH ≥10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (25.0 g, 75.9 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (600 ml) ed estratta a fondo con Toluene (3 x 400 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **6-bromobenzo[h]chinazolina** (1.7 g, resa 65%), con p.f. 115 °C.

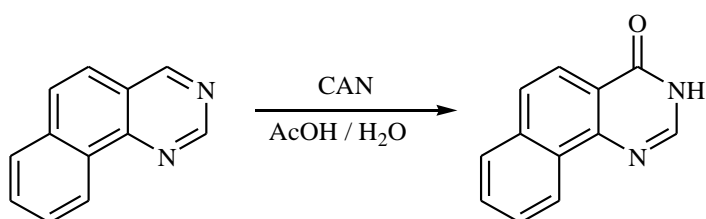
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.58 (s, 1 H, 4-H); 9.52 (s, 1 H, 2-H); 9.26 (d, J = 7.7, 1 H, 7-H o 10-H); 8.50 (s, 1 H, 5-H); 8.36 (d, J = 7.7, 1 H, 7-H o 10-H); 8.07 (t, J = 7.7, 1 H, 8-H o 9-H); 7.97 (t, J = 7.7, 1 H, 8-H o 9-H).

Sintesi di benzo[h]chinazolina



Una soluzione di 6-bromobenzo[h]chinazolina (1.3 g, 5.0 mmoli) in EtONa 21% in EtOH (20 ml) è stata irradiata con microonde a 100 W, raggiungendo la temperatura di 105 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata cautamente versata in una soluzione acquosa saturata con NH₄Cl (200 ml) ed estratta a fondo con CHCl₃ (3 x 80 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **benzo[h]chinazolina** (0.9 g, resa quantitativa) con p.f. 120 °C.

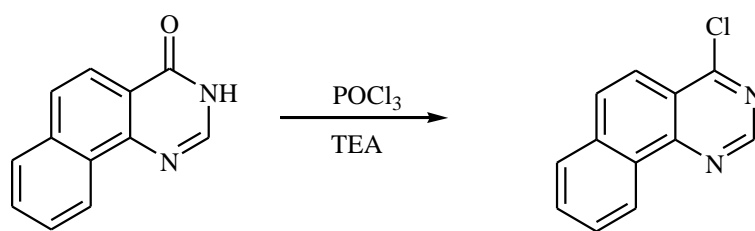
¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.42 (s, 1 H, 4-H); 9.28 (s, 1 H, 2-H); 9.21 – 9.18 (m, 1 H, 7-H o 10-H); 7.90 – 7.87 (m, 1 H, 7-H o 10-H); 7.82 (d, J = 8.9, 1 H, 5-H o 6-H); 7.77 – 7.73 (m, 2 H, 8-H e 9-H); 7.64 (d, J = 8.9, 1 H, 5-H o 6-H).

Sintesi di benzo[h]chinazolin-4(3H)-one

Ad una soluzione di benzo[h]chinazolina (0.4 g, 2.0 mmoli) in AcOH (1 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di CAN (4.4 g, 8.0 mmoli) in H₂O (12 ml). Al termine dell'aggiunta (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con AcOH, portando all'ottenimento del **benzo[h]chinazolin-4(3H)-one** (0.4 g, resa quantitativa), con p.f. >300 °C.

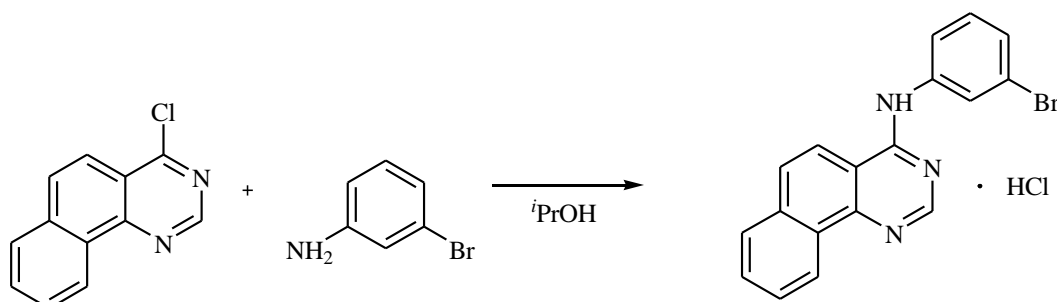
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.92 (dd, J = 7.2, J = 1.6, 1 H, 7-H o 10-H); 8.37 (s, 1 H, 2-H); 8.09 – 8.04 (m, 2 H, 5-H o 6-H e 7-H o 10-H); 7.96 (d, J = 8.8, 1 H, 5-H o 6-H); 7.82 – 7.71 (m, 2 H, 8-H e 9-H).

Sintesi di 4-clorobenzo[*h*]chinazolina



Ad una sospensione di benzo[*h*]chinazolin-4(3*H*)-one (0.8 g, 3.9 mmoli) in POCl₃ (10 ml) è stata aggiunta TEA (2 ml). La miscela è stata posta a riflusso per 3 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido ottenuto è stato ripreso con EtOAc (100 ml) e lavato prima con una soluzione satura di NaHCO₃ (100 ml) e poi con H₂O (100 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-clorobenzo[*h*]chinazolina** (0.5 g, resa 63%), con p.f. 115 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 9.22 (d, *J* = 7.6, 1 H, 7-H o 10-H); 9.16 (s, 1 H, 2-H); 8.04 (d, *J* = 9.1, 1 H, 5-H o 6-H); 7.97 – 7.90 (m, 2 H, 5-H o 6-H e 7-H o 10-H); 7.87 – 7.75 (m, 2 H, 8-H e 9-H).

Sintesi di (benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato

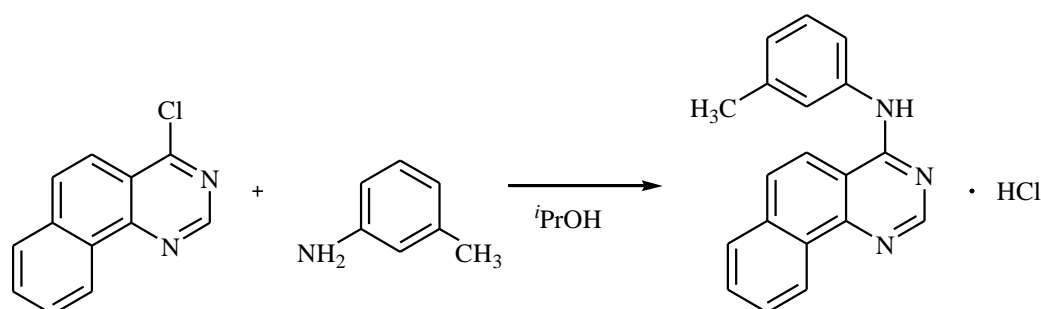
Ad una soluzione di 4-clorobenzo[h]chinazolina (0.1 g, 0.3 mmoli) in isopropanolo (3 ml) è stata aggiunta *m*-bromoanilina (36 μ l, 0.3 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 95/5). Dopo raffreddamento, è stata aggiunta ulteriore *m*-bromoanilina (36 μ l, 0.3 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 95/5). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato** (0.1 g, resa 63%), con p.f.: > 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.24 (s all, 1 H, NH); 9.08 (d, J = 7.7, 1 H, 7-H o 10-H); 8.95 (s, 1 H, 2-H); 8.50 (d, J = 9.0, 1 H, 5-H o 6-H); 8.23 (s, 1 H, 2'-H); 8.16 – 8.10 (m, 2 H, 5-H o 6-H e 4'-H o 6'-H); 7.92 – 7.79 (m, 3 H, 8-H, 9-H e 7-H o 10-H); 7.44 – 7.34 (m, 2 H, 5'-H e 4'-H o 6'-H).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₈H₁₃BrN₃

350.0287 (calcolato)	350.0436 (trovato)	(M ⁺ + 1)
352.0269 (calcolato)	352.0396 (trovato)	(M ⁺ + 3)

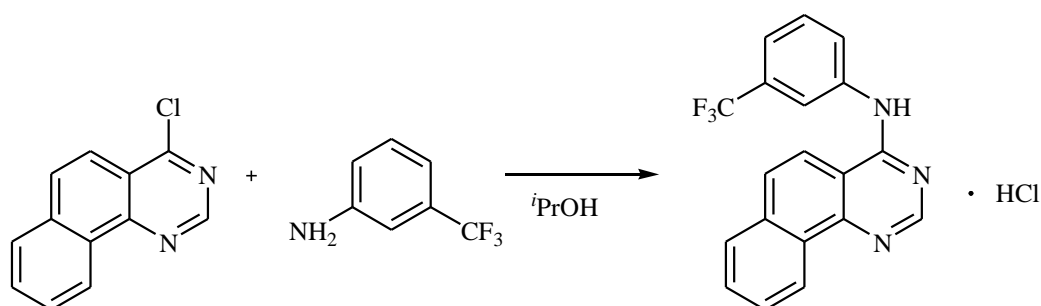
Sintesi di (benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato



Ad una soluzione di 4-cloro-benzo[h]chinazolina (0.1 g, 0.3 mmoli) in isopropanolo (3 ml) è stata aggiunta *m*-toluidina (35 μ l, 0.3 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 95/5). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato** (80 mg, resa 75%), con p.f. >300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.80 (s all, 1 H, NH); 9.08 (d, J = 8.3, 1 H, 7-H o 10-H); 8.94 (s, 1 H, 2-H); 8.60 (d, J = 9.2, 1 H, 5-H o 6-H); 8.24 – 8.15 (m, 2 H, 5-H o 6-H e 7-H o 10-H); 7.96 – 7.84 (m, 2 H, 8-H e 9-H); 7.62 – 7.56 (m, 2 H, 2'-H e 4'-H o 6'-H); 7.37 (t, J = 7.9, 1 H, 5'-H); 7.10 (d, J = 7.9, 1 H, 4'-H o 6'-H); 2.38 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C ₁₉ H ₁₆ N ₃	(M ⁺ + 1)
286.1339 (calcolato)	286.1282 (trovato)

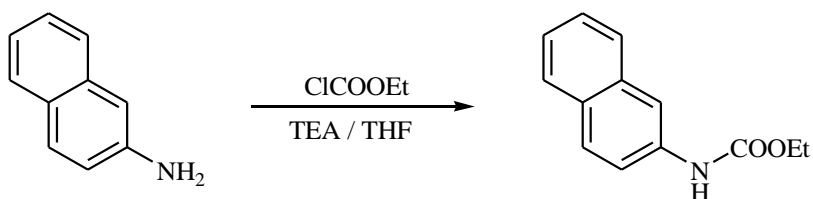
Sintesi di (benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato

Ad una soluzione di 4-cloro-benzo[h]chinazolina (0.1 g, 0.3 mmoli) in isopropanolo (3 ml) è stata aggiunta *m*-trifluorometilanilina (41 μ l, 0.3 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 95/5). Dopo raffreddamento, per altre due volte è stata aggiunta ulteriore *m*-trifluorometilanilina (41 μ l, 0.3 mmoli) sottoponendo ogni volta la miscela di reazione ad un ciclo di irraggiamento per 15 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 95/5). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata e il precipitato è stato lavato con etere di petrolio ottenendo la **(benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato** (70 mg, resa 56%), con p.f. > 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.29 (s all, 1 H, NH); 9.10 (d, J = 8.3, 1 H, 7-H o 10-H); 8.95 (s, 1 H, 2-H); 8.51 (d, J = 9.2, 1 H, 5-H o 6-H); 8.34 (s, 1 H, 2'-H); 8.25 (d, J = 8.3, 1 H, 7-H o 10-H); 8.16 – 8.10 (m, 2 H, 5-H o 6-H e 4'-H o 6'-H); 7.91 – 7.79 (m, 2 H, 8-H e 9-H); 7.68 (t, J = 7.9, 1 H, 5'-H); 7.52(d, J = 7.9, 1 H, 4'-H o 6'-H).

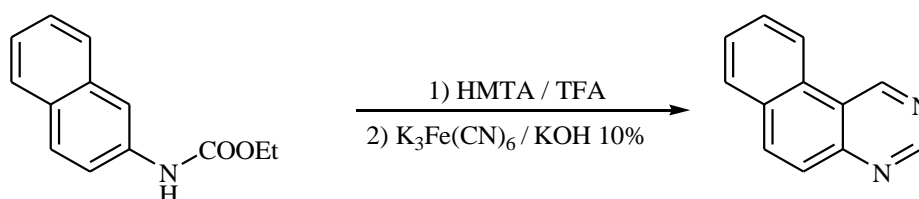
HRMS (ESI-TOF) per C₁₉H₁₃F₃N₃ (M⁺ + 1)
340.1056 (calcolato) 340.1025 (trovato)

Sintesi di etile (naftalen-2-il)carbammato



Ad una soluzione di 2-naftilammina (3.0 g, 20.9 mmoli) in THF anidro (300 ml) e TEA (5.9 ml, 42.1 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (4.1 ml, 42.1 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a riflusso per 30 minuti (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con EtOAc e filtrato a caldo. Il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'**etile (naftalen-2-il)carbammato** (4.3 g resa 95%), con p.f. 74 °C.

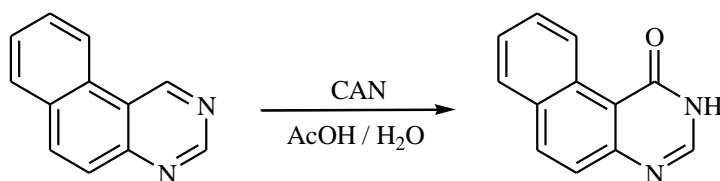
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 9.80 (s all, 1 H, NH); 8.06 (d, $J = 1.9$, 1 H, 1-H); 7.84 – 7.75 (m, 3 H, 4-H, 5-H e 8-H); 7.53 (dd, $J = 8.9$, $J = 1.9$, 1 H, 3-H); 7.45 (td, $J = 6.9$, $J = 1.2$, 1 H, 6-H o 7-H); 7.36 (td, $J = 6.9$, $J = 1.2$, 1 H, 6-H o 7-H); 4.17 (q, $J = 7.1$, 2 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 1.27 (t, $J = 7.1$, 3 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).

Sintesi di benzo[f]chinazolina

Una soluzione di etile (naftalen-2-il)carbammato (2.2 g, 10.0 mmoli) e urotropina (1.4 g, 10.0 mmoli) in TFA (30 ml) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1:1 (300 ml). Alla miscela (pH ≥ 10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (25.0 g, 75.9 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (300 ml) ed estratta a fondo con toluene (3 x 150 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **benzo[f]chinazolina** (1.8 g, resa 98%), con p.f. 107 °C.

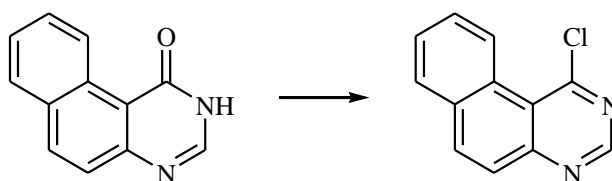
¹H-NMR (CDCl₃-d): 10.12 (s, 1 H, 1-H); 9.44 (s, 1 H, 3-H); 8.75 (dd, J = 7.8, J = 1.5, 1 H, 10-H); 8.21 (d, J = 8.9, 1 H, 5-H o 6-H); 8.00 (dd, J = 7.8, J = 1.5, 1 H, 7-H); 7.92 (d, J = 8.9, 1 H, 5-H o 6-H); 7.81 (td, J = 7.8, J = 1.5, 1 H, 8-H o 9-H); 7.74 (td, J = 7.8, J = 1.5, 1 H, 8-H o 9-H).

Sintesi di benzo[f]chinazolin-1(2H)-one



Ad una soluzione di benzo[f]chinazolina (0.4 g, 2.0 mmoli) in AcOH (1 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di CAN (4.4 g, 8.0 mmoli) in H₂O (12 ml). Al termine dell'aggiunta (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con la minima quantità di AcOH, portando all'ottenimento del **benzo[f]chinazolin-1(2H)-one** (0.4 g, 96 %), con p.f. 260 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 12.63 (s all, 1 H, NH); 9.86 (d, J = 8.2, 1 H, 7-H o 10-H); 8.30 (d, J = 8.2, 1 H, 7-H o 10-H); 8.28 (s, 1 H, 2-H); 8.07 (d, J = 8.4, 1 H, 5-H o 6-H); 8.05 (d, J = 8.4, 1 H, 5-H o 6-H); 7.85 (t, J = 8.2, 1 H, 8-H o 10-H); 7.60 (t, J = 8.2, 1 H, 8-H o 10-H).

Sintesi di 1-clorobenzo[f]chinazolina*Metodo A*

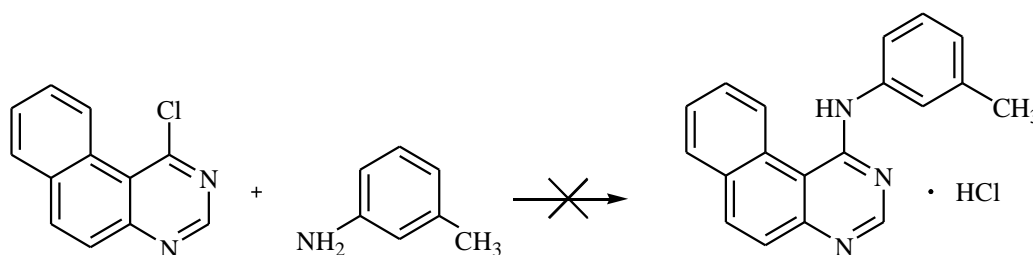
Ad una sospensione di benzo[f]chinazolin-1(2H)-one (0.5 g, 2.6 mmoli) in POCl_3 (15 ml) è stata aggiunta TEA (3 ml). La miscela è stata posta a riflusso per 48 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8/2). Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido ottenuto è stato ripreso con toluene (100 ml) e lavato prima con una soluzione satura di NaHCO_3 (100 ml) e poi con H_2O (100 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza. Poichè il residuo solido è risultato costituito dal solo prodotto di partenza, il metodo è stato abbandonato.

Metodo B

Una sospensione di benzo[f]chinazolin-1(2H)-one (1.3 g, 6.4 mmoli), trifenilfosfina (6.9 g, 26.2 mmoli) e CCl_4 (6.2 ml, 64.1 mmoli) in CH_2Cl_2 (22 ml) è stata posta a riflusso sotto agitazione per 3 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8/2). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: CHCl_3), ottenendo così la **1-clorobenzo[f]chinazolina** (0.7 g, resa 48%), con p.f. non determinato.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -d): 9.75 (d, $J = 8.4$, 1 H, 7-H o 10-H); 9.11 (s, 1 H, 3-H); 8.23 (d, $J = 9.0$, 1 H, 5-H o 6-H); 8.02 (d, $J = 8.4$, 1 H, 7-H o 10-H); 7.93 (d, $J = 9.0$, 1 H, 5-H o 6-H); 7.87 – 7.75 (m, 2 H, 8-H e 9-H).

Tentativo di sintesi di (benzo[f]chinazolin-1-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato

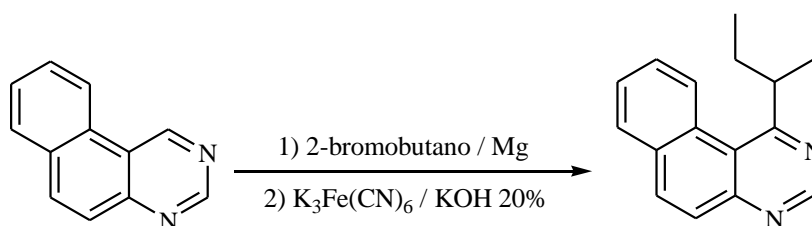


Metodo A

Ad una soluzione di 1-clorobenzo[f]chinazolina (0.1 g, 0.3 mmoli) in isopropanolo (3 ml) è stata aggiunta *m*-bromoanilina (36 μ l, 0.3 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 95/5). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo però il **benzo[f]chinazolin-1(2H)-one**, motivo per cui il metodo è stato abbandonato.

Metodo B

Ad una sospensione di 1-clorobenzo[f]chinazolina (0.2 g, 1.0 mmoli) e *m*-bromoanilina (200 μ l, 1.7 mmoli) in DMF anidra (5 ml) sono stati aggiunti Pd(OAc)₂ (1.0 mg, 0.01 mmoli), BINAP (25.0 mg, 0.02 mmoli) e Cs₂CO₃ (0.5 g, 1.0 mmoli). La sospensione è stata irradiata con microonde a 100 W, raggiungendo la temperatura di 150 °C in 2 minuti. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata ripresa con H₂O (50 ml) ed estratta a fondo con EtOAc (3 x 20 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza. Poichè il residuo solido è risultato costituito dal solo **benzo[f]chinazolin-1(2H)-one**, il metodo è stato abbandonato.

Sintesi di 2-(benzo[f]chinazolin-1-il)-butano

Ad una sospensione di Mg metallico (0.8 g, 33.3 mmoli) e I₂ (50 mg) in Et₂O anidro (5 ml) è stata lentamente aggiunta una soluzione di 2-bromobutano (1.8 ml, 16.7 mmoli) in Et₂O anidro (4 ml). La sospensione è stata cautamente riscaldata fino a comparsa di effervescenza spontanea, ad indicare l'innesco della reazione. Al termine della formazione del sale di Grignard, la sospensione ottenuta è stata filtrata per eliminare l'eccesso di Mg non reagito e la soluzione limpida è stata cautamente aggiunta ad una soluzione di benzo[f]chinazolina (1.0 g, 5.6 mmoli) in Et₂O anidro (15 ml). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 10 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la soluzione è stata cautamente diluita con tampone ammoniacale (0.3 g NH₄Cl in 6 ml NH₄OH concentrato) e lasciata in agitazione a temperatura ambiente. La sospensione è stata diluita con H₂O (50 ml) ed estratta a fondo con EtOAc (3 x 30 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con KOH acquosa 20% (20 ml) e la soluzione, aggiunta di K₃Fe(CN)₆ (5.5 g, 16.7 mmoli), è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per un'ora (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). La sospensione è stata diluita con H₂O (50 ml) ed estratta a fondo con EtOAc (3 x 30 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: EtOAc), portando all'isolamento del **2-(benzo[f]chinazolin-1-il)-butano** (0.5 g, resa 35%), con p.f. 85 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.26 (s, 1 H, 3-H); 8.59 (d, J = 8.0, 1 H, 7-H o 10-H); 8.33 (d, J = 8.9, 1 H, 5-H o 6-H); 8.17 (d, J = 8.0, 1 H, 7-H o 10-H); 7.90 – 7.76 (m, 3 H, 8-H, 9-H e 5-H o 6-H); 4.05 – 3.92 (m, 1 H, CHCH₃); 2.06 – 1.67 (m, 2 H, CH₂CH₃); 1.54 (d, J = 6.6, 3 H, CHCH₃); 0.69 (t, J = 7.3, 3 H, CH₂CH₃).

6.2. GENERAZIONE DI MODELLI CN-QSAR

6.2.1. MATERIALI E STRUMENTI

Le strutture dei TKI (1630 derivati) e le loro attività inibitorie (IC_{50} o pIC_{50}) sono state estratte dalla letteratura scientifica. Sono stati considerati solo i dati di attività derivanti da saggi su enzimi isolati, misurati come inibizione della fosforilazione di un peptide sintetico poli-tirosinico (non sono cioè stati considerati saggi relativi all'inibizione dell'autofosforilazione dei recettori). I valori di pIC_{50} sono stati convertiti nei corrispondenti valori di IC_{50} , e sono stati considerati sia TKI ad azione reversibile che irreversibile. Tutte le strutture 2D dei TKI sono state convertite nel corrispondente codice SMILES mediante il software *CHEMDRAW ULTRA* ver. 8.0 (Chembridgesoft).

Il set di TK include 5 RTK (EGFR, FGFR, KDR, PDGFR e VEGFR-1) e 5 TK non recettoriali (c-abl, c-src, lck, v-abl e v-src). Poichè alcuni TKI sono stati saggiati nei confronti di diverse TK, il totale dei casi presi in considerazione è stato di 2536.

I descrittori molecolari associati ai composti sono stati calcolati con l'approccio TOPS-MODE del software *MODESLAB* ver. 1.0.

I modelli QSAR sono stati ottenuti mediante il software *STATISTICA* ver. 6.0 (Statsoft) per il calcolo statistico.

Le CN sono state generate, elaborate e visualizzate graficamente mediante i software *EXCEL* ver. 2007 (Microsoft), *CENTIBIN* ver. 1.4.3 (Research Group Network Analysis, Germany) e *PAJEK* ver. 1.15.

6.2.2. COSTRUZIONE DEI MODELLI QSAR

6.2.2.1. CALCOLO DEI DESCRITTORI MOLECOLARI

Ad ogni m coppia TK – TKI (Drug Enzyme Pair, DEP; $m = 2536$) è stata assegnata una variabile di classificazione (C), che può assumere solo i valori $C = 1$ (TKI attivo) o $C = 0$ (TKI inattivo), a seconda che l'IC₅₀ del TKI sia minore o maggiore di un determinato cut-off di attività. Poichè sono stati considerati 7 cut-off di attività (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 e 5.0 μM), sono stati generati 7 modelli QSAR di classificazione. Mediante l'approccio TOPS-MODE del software *MODESLAB*, per ogni i composto ($i = 1630$) è stato calcolato un set di descrittori molecolari ($\mu_{k,i}^{\text{descrittore}}$) al passo k ($k = 0 \div 5$). Tale approccio è basato sul calcolo di momenti spettrali derivanti da una matrice di adiacenza, utilizzando diversi *bond weights* (Tabella 8) e diversi algoritmi matematici all'aumentare del passo k di calcolo.

Simbolo del descrittore	<i>Bond weight</i> utilizzato
$\lambda\mu$	Distanza
$^d\mu$	Momento dipolare
$^h\mu$	Idrofobicità
$^r\mu$	Refrattività molare
$^{\text{ps}}\mu$	Superficie polare
$^{\text{p}}\mu$	Polarizzabilità
$^{\text{vdw}}\mu$	Volume di Van der Waals
$^{\text{gm}}\mu$	Carica di Gasteiger-Marsilii
$^{\text{m}}\mu$	Massa atomica

Tabella 8. Simboli e descrizioni dei descrittori molecolari calcolati.

Ad ogni TK è stato associato un set di descrittori molecolari ($\langle \text{descrittore } \mu_{k,TK} \rangle_{\text{cut-off}}$), calcolato come valore medio dei momenti spettrali solo dei TKI saggiati nei confronti di quella TK e attivi al cut-off considerato.

Inoltre, a ciascun m caso è stato associato un ulteriore set di descrittori cut-off dipendente ($\Delta(\text{descrittore } \mu_{k,m})_{\text{cut-off}}$), calcolato come differenza fra il corrispondente descrittore del composto i e il momento spettrale associato alla TK.

6.2.2.2. GENERAZIONE DEI MODELLI DI CLASSIFICAZIONE QSAR

I 7 modelli QSAR sono stati sviluppati attraverso l'impiego del modulo LDA (Linear Discriminant Analysis) del software *STATISTICA*. Per ogni cut-off di attività è stata generata un'equazione lineare del tipo:

$$\text{Score}_{\text{cut-off}} = a \cdot \mu_k^a + b \cdot \mu_k^b + \dots + h \cdot \mu_k^h + z$$

in cui μ_k^x indica un generico momento spettrale al passo di calcolo k . In ogni equazione, almeno uno dei momenti spettrali è riferito alla TK, cioè almeno uno dei termini dell'equazione è del tipo:

$$\langle \text{descrittore } \mu_{k,TK} \rangle_{\text{cut-off}} \quad \text{oppure} \quad \Delta(\text{descrittore } \mu_{k,m})_{\text{cut-off}}$$

Per la generazione di ciascun modello ci si è avvalsi dell'algoritmo matematico *forward stepwise*, con un numero massimo di passaggi pari a 8.

Il 75% dei casi è stato assegnato, in maniera stocastica, al *training set*, mentre il rimanente 25% è stato utilizzato per la *cross-validazione* del modello. La determinazione della bontà dei modelli è stata valutata mediante la misura di Specificità, Sensibilità e Accuratezza del *training set* e del *cross validation set*, e mediante la misura dell'Accuratezza totale. La rilevanza statistica dei modelli di classificazione è stata determinata calcolando il livello di errore p mediante test F.

Per ciascun caso m , dagli Score dei modelli QSAR è stata infine calcolata la Probabilità di Attività (Pact = 0 ÷ 1).

I 7 modelli generati e le relative matrici di classificazione sono riportati di seguito.

$$\text{Score}_{0.05\mu\text{M}} = -0.78 \cdot {}^d\mu_5 - 1.00 \cdot {}^h\mu_2 - 0.47 \cdot {}^{\text{ps}}\mu_4 + 1.07 \cdot {}^p\mu_2 + 2.34 \cdot {}^m\mu_2 \\ - 1.39 \cdot {}^m\mu_3 - 0.51 \cdot \langle {}^d\mu_4 \rangle_{0.05} - 0.43 \cdot \langle {}^h\mu_3 \rangle_{0.05} - 1.31$$

Matrice di classificazione (training)				Matrice di classificazione (cross validation)					
Parametro	%		Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	Parametro	%	Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	
Specificità	72.96	Inattivi (Osservati)	1001	371	Specificità	71.10	Inattivi (Osservati)	337	137
Sensibilità	76.60	Attivi (Osservati)	124	406	Sensibilità	78.75	Attivi (Osservati)	34	126
Accuratezza	73.97	Totale	1125	777	Accuratezza	73.03	Totale	371	263

$$N = 1630 \quad F = 79.90 \quad p < 0.001 \\ \text{Accuratezza totale} = 73.74 \%$$

$$\text{Score}_{0.1\mu\text{M}} = -2.37 \cdot {}^d\mu_5 - 0.72 \cdot {}^h\mu_1 + 1.08 \cdot {}^p\mu_1 + 0.39 \cdot \langle {}^m\mu_1 \rangle_{0.1} + 1.96 \cdot \Delta({}^d\mu_5)_{0.1} \\ - 1.96 \cdot \Delta({}^{\text{ps}}\mu_4)_{0.1} + 1.46 \cdot \Delta({}^m\mu_2)_{0.1} - 0.87 \cdot \Delta({}^m\mu_3)_{0.1} - 0.83$$

Matrice di classificazione (training)				Matrice di classificazione (cross validation)					
Parametro	%		Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	Parametro	%	Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	
Specificità	68.49	Inattivi (Osservati)	852	392	Specificità	66.91	Inattivi (Osservati)	277	137
Sensibilità	78.57	Attivi (Osservati)	141	517	Sensibilità	80.45	Attivi (Osservati)	43	177
Accuratezza	71.98	Totale	993	909	Accuratezza	71.61	Totale	320	314

$$N = 1630 \quad F = 75.13 \quad p < 0.001 \\ \text{Accuratezza totale} = 71.88 \%$$

$$\text{Score}_{0.2\mu M} = -0.56 \cdot {}^d\mu_5 - 0.67 \cdot {}^h\mu_1 + 0.84 \cdot {}^p\mu_1 + 0.83 \cdot {}^m\mu_2 - 0.41 \cdot {}^m\mu_4 \\ - 0.43 \cdot \Delta({}^r\mu_1)_{0.2} - 1.50 \cdot \Delta({}^{PS}\mu_4)_{0.2} + 1.03 \cdot \Delta({}^{PS}\mu_5)_{0.2} - 0.55$$

Matrice di classificazione (training)				Matrice di classificazione (cross validation)					
Parametro	%		Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	Parametro	%	Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	
Specificità	68.66	Inattivi (Osservati)	791	361	Specificità	68.38	Inattivi (Osservati)	253	117
Sensibilità	77.60	Attivi (Osservati)	168	582	Sensibilità	78.41	Attivi (Osservati)	57	207
Accuratezza	72.19	Totale	959	943	Accuratezza	72.56	Totale	310	324

$$N = 1630 \quad F = 74.80 \quad p < 0.001 \\ \text{Accuratezza totale} = 72.28 \%$$

$$\text{Score}_{0.5\mu M} = -0.82 \cdot {}^d\mu_2 + 0.02 \cdot {}^d\mu_5 - 0.74 \cdot {}^h\mu_1 + 0.74 \cdot {}^p\mu_1 + 1.08 \cdot {}^m\mu_1 \\ - 1.50 \cdot \Delta({}^{PS}\mu_3)_{0.5} + 0.13 \cdot \Delta({}^m\mu_2)_{0.5} - 0.05$$

Matrice di classificazione (training)				Matrice di classificazione (cross validation)					
Parametro	%		Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	Parametro	%	Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	
Specificità	67.52	Inattivi (Osservati)	657	316	Specificità	69.58	Inattivi (Osservati)	215	94
Sensibilità	74.17	Attivi (Osservati)	240	689	Sensibilità	77.54	Attivi (Osservati)	73	252
Accuratezza	70.77	Totale	897	1005	Accuratezza	73.66	Totale	288	346

$$N = 1630 \quad F = 79.96 \quad p < 0.001 \\ \text{Accuratezza totale} = 71.49 \%$$

$$\text{Score}_{1.0\mu M} = -2.87 \cdot {}^d\mu_4 + 2.13 \cdot {}^d\mu_5 - 1.06 \cdot {}^h\mu_1 + 0.69 \cdot {}^p\mu_1 + 0.93 \cdot {}^m\mu_1 \\ + 0.30 \cdot \Delta({}^h\mu_3)_{1.0} - 0.44 \cdot \Delta({}^{PS}\mu_2)_{1.0} + 0.31 \cdot \Delta({}^m\mu_1)_{1.0} + 0.43$$

Matrice di classificazione (training)				Matrice di classificazione (cross validation)					
Parametro	%		Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	Parametro	%	Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	
Specificità	68.49	Inattivi (Osservati)	550	253	Specificità	69.62	Inattivi (Osservati)	181	79
Sensibilità	74.07	Attivi (Osservati)	285	814	Sensibilità	77.01	Attivi (Osservati)	86	288
Accuratezza	71.71	Totale	835	1067	Accuratezza	73.97	Totale	267	367

$$N = 1630 \quad F = 75.47 \quad p < 0.001 \\ \text{Accuratezza totale} = 72.28 \%$$

$$\text{Score}_{2.0\mu\text{M}} = -0.88 \cdot {}^h\mu_1 + 0.22 \cdot {}^h\mu_4 - 0.44 \cdot {}^{\text{ps}}\mu_3 + 0.67 \cdot {}^p\mu_1 + 0.30 \cdot \langle {}^{\text{gm}}\mu_5 \rangle_{2.0} \\ - 0.72 \cdot \Delta({}^d\mu_5)_{2.0} + 0.98 \cdot \Delta({}^m\mu_1)_{2.0} + 0.74$$

Matrice di classificazione (training)					Matrice di classificazione (cross validation)				
Parametro	%		Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	Parametro	%		Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)
Specificità	66.91	Inattivi (Osservati)	467	231	Specificità	66.23	Inattivi (Osservati)	153	78
Sensibilità	75.08	Attivi (Osservati)	300	904	Sensibilità	77.67	Attivi (Osservati)	90	313
Accuratezza	72.08	Totale	767	1135	Accuratezza	73.50	Totale	243	391

$$N = 1630 \quad F = 85.72 \quad p < 0.001 \\ \text{Accuratezza totale} = 72.44 \%$$

$$\text{Score}_{5.0\mu\text{M}} = -0.31 \cdot {}^d\mu_5 - 0.88 \cdot {}^h\mu_1 + 0.53 \cdot {}^h\mu_4 + 0.49 \cdot {}^p\mu_1 + 0.97 \cdot {}^m\mu_1 \\ - 0.50 \cdot \Delta({}^d\mu_3)_{5.0} - 0.44 \cdot \Delta({}^r\mu_4)_{5.0} - 0.28 \cdot \Delta({}^{\text{ps}}\mu_2)_{5.0} + 1.26$$

Matrice di classificazione (training)					Matrice di classificazione (cross validation)				
Parametro	%		Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)	Parametro	%		Inattivi (Predetti)	Attivi (Predetti)
Specificità	64.55	Inattivi (Osservati)	335	184	Specificità	62.92	Inattivi (Osservati)	112	66
Sensibilità	73.68	Attivi (Osservati)	364	1019	Sensibilità	77.19	Attivi (Osservati)	104	352
Accuratezza	71.19	Totale	699	1203	Accuratezza	73.19	Totale	216	418

$$N = 1630 \quad F = 55.40 \quad p < 0.001 \\ \text{Accuratezza totale} = 71.69 \%$$

6.2.3. COSTRUZIONE DELLE RETI COMPLESSE

6.2.3.1. COSTRUZIONE DELLA RETE COMPLESSA REALE (OBSERVED COMPLEX NETWORK, OCN)

I valori di IC_{50} relativi ad ogni singolo caso m sono stati utilizzati per la costruzione della matrice di connessione per la generazione della OCN, attraverso l'impiego del software *EXCEL*. Sia nelle colonne che nelle righe della matrice sono stati riportati: tutti gli m casi, l'attività corretta (Corrected Activity, CA; $CA = IC_{50} / IC_{50max}$), il codice SMILES e la TK. Ciascun elemento della matrice è costituito da una coppia di DEP (Pair of Drug-Enzyme Pair, PDEP). Poichè due nodi possono essere connessi solo se presentano la stessa TK o lo stessi TKI e solo se presentano un ΔCA maggiore o uguale a un certo valore di soglia (Observed Treshold Value, OTV; $OTV = 0 \div 1$), la linea di comando utilizzata in *EXCEL* è stata:

$$f = \text{if} (m_{colonna} = m_{riga}, \text{"nd"}, \text{if} (\text{and} (\text{enzyme}_{colonna} \langle \rangle \text{enzyme}_{riga}, \text{smile}_{colonna} \langle \rangle \text{smile}_{riga}), \text{"nd"}, \text{if} ((CA_{colonna} - CA_{riga}) > OTV, 1, 0)))$$

A seconda del valore di output i PDEP possono essere suddivisi in:

- ✓ PDEP connessi (ordered PDEP, oPDEP), se PDEP = 1;
- ✓ PDEP non connessi (not-cordered PDEP, noPDEP), se PDEP = 0;
- ✓ PDEP non correlati (unrelated PDEP, uPDEP), se PDEP = "nd".

Per ciascun PDEP sono stati calcolati il numero medio di connessioni in entrata (Observed in node degree, OZ_{in}) e il numero medio di connessioni in uscita (Observed out node degree, OZ_{out}), essendo rispettivamente la media degli oPDEP in ciascuna riga e in ciascuna colonna, in funzione del valore di OTV.

6.2.3.2. COSTRUZIONE DELLE RETI COMPLESSE PREDETTE (PREDICTED COMPLEX NETWORKs, PCN_{cut-off})

Per ciascun valore di cut-off è stata costruita una PCN_{cut-off}.

I valori di Pinact ($Pinact = 1 - Pact$) relativi ad ogni singolo caso m ad ogni singolo cut-off sono stati utilizzati per la costruzione della matrice di connessione per la generazione di ciascuna PCN_{cut-off}, attraverso l'impiego del software *EXCEL*. Sia nelle colonne che nelle righe della matrice sono stati riportati: tutti gli m casi, la Pinact, il codice SMILES e la TK. Ciascun elemento della matrice è costituito da una coppia di DEP (Pair of Drug-Enzyme Pair, PDEP). Poichè due nodi possono essere connessi solo se presentano la stessa TK o lo stessi TKI e solo se presentano un $\Delta Pinact$ maggiore o uguale a un certo valore di soglia (Predicted Treshold Value, PTV; $PTV = 0 \div 1$), la linea di comando utilizzata in *EXCEL* è stata:

$$f = \text{if} (m_{\text{colonna}} = m_{\text{riga}}, \text{"nd"}, \text{if} (\text{and} (\text{enzyme}_{\text{colonna}} \diamond \text{enzyme}_{\text{riga}}, \text{smile}_{\text{colonna}} \diamond \text{smile}_{\text{riga}}), \text{"nd"}, \text{if} ((Pinact_{\text{colonna}} - Pinact_{\text{riga}}) > PTV, 1, 0)))$$

A seconda del valore di output i PDEP possono essere suddivisi in:

- ✓ PDEP connessi (ordered PDEP, oPDEP), se PDEP = 1;
- ✓ PDEP non connessi (not-ordered PDEP, noPDEP), se PDEP = 0;
- ✓ PDEP non correlati (unrelated PDEP, uPDEP), se PDEP = "nd".

Per ciascun PDEP è stato calcolato il numero medio di connessioni in entrata (Predicted in node degree, PZ_{in}) e il numero medio di connessioni in uscita (Predicted out node degree, PZ_{out}), essendo rispettivamente la media degli oPDEP in ciascuna riga e in ciascuna colonna, in funzione del valore di PTV.

6.2.3.3. COMPARAZIONE DI OCN E PCN_{cut-off}

Le 7 PCN_{cut-off} sono state comparate alla OCN utilizzando 7 matrici di corrispondenza (una per ogni valore di cut-off), generate mediante il software *EXCEL*.

Sia nelle colonne che nelle righe della matrice sono stati riportati: tutti gli m casi, la CA, la Pinact, il codice SMILES e la TK. Nel foglio di calcolo sono stati inseriti anche OTV e PTV come valori modificabili in maniera indipendente. La linea di comando utilizzata in *EXCEL* per il calcolo della matrice è stata:

$$f = \text{if}(m_{\text{colonna}} = m_{\text{riga}}, \text{"nd"}, \text{if}(\text{and}(\text{enzyme}_{\text{colonna}} \langle \rangle \text{enzyme}_{\text{riga}}, \text{smile}_{\text{colonna}} \langle \rangle \text{smile}_{\text{riga}}), \text{"nd"}, \text{if}(\text{and}((\text{CA}_{\text{colonna}} - \text{CA}_{\text{riga}}) > \text{OTV}, (\text{Pinact}_{\text{cut-off-colonna}} - \text{Pinact}_{\text{cut-off-riga}}) > \text{PTV}), 2, \text{if}((\text{CA}_{\text{colonna}} - \text{CA}_{\text{riga}}) > \text{OTV}, 1, \text{if}((\text{Pinact}_{\text{cut-off-colonna}} - \text{Pinact}_{\text{cut-off-riga}}) > \text{PTV}, -1, 0))))))$$

Gli elementi della matrice di corrispondenza possono quindi assumere i valori:

- ✓ $f = 2$, se sia la OCN che la PCN_{cut-off} rivelano un oPDEP;
- ✓ $f = 1$, se solo la OCN rivela un oPDEP;
- ✓ $f = -1$, se solo la PCN_{cut-off} rivela un oPDEP;
- ✓ $f = 0$, se sia la OCN che la PCN_{cut-off} rivelano un noPDEP;
- ✓ $f = \text{"nd"}$, se riferito a un uPDEP.

Per ciascuna matrice di corrispondenza e per ciascuna coppia di OTV e PTV utilizzati è stato calcolato il seguente set di parametri:

- $\text{oPDEP}_{\text{cut-off}}^{\text{OTV,PTV}}$: percentuale di elementi della matrice di corrispondenza con $f = 2$ rispetto al numero totale di oPDEP nella OCN (Sensibilità)
- $\text{noPDEP}_{\text{cut-off}}^{\text{OTV,PTV}}$: percentuale di elementi della matrice di corrispondenza con $f = 0$ rispetto al numero totale di oPDEP nella OCN (Specificità);
- $\text{PDEP}_{\text{cut-off}}^{\text{OTV,PTV}}$: percentuale di elementi della matrice di corrispondenza con $f = 2$ o $f = 0$ rispetto al numero totale di casi (2536) (Accuratezza);

$OZ_{in\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero medio di connessioni in entrata per l'OCN;
$OZ_{out\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero medio di connessioni in uscita per l'OCN;
$OZ_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero medio di connessioni per l'OCN;
$PZ_{in\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero medio di connessioni in entrata per la PCN;
$PZ_{out\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero medio di connessioni in uscita per la PCN;
$PZ_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero medio di connessioni per la PCN;
$OD_{in\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero di nodi senza connessioni in entrata per l'OCN;
$OD_{out\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero di nodi senza connessioni in uscita per l'OCN;
$OD_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero di nodi disconnessi per l'OCN;
$PD_{in\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero di nodi senza connessioni in entrata per la PCN;
$PD_{out\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero di nodi senza connessioni in uscita per la PCN;
$PD_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV}$:	numero di nodi disconnessi per la PCN;

La sovrapposibilità di ciascuna PCN_{cut-off} con la OCN è stata valutata utilizzando il modulo LDA del software *STATISTICA*. Come variabili indipendenti sono state considerate Sensibilità, Specificità, Accuratezza, $OZ_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV}$, $PZ_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV}$, $OD_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV}$ e $PD_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV}$; come variabile dipendente è stata creata la variabile Suitability (S), mediante il software *EXCEL*. La riga di comando utilizzata per la creazione di S è stata:

$$S = \text{if (or (oPDEP}_{cut-off}^{OTV,PTV} < 65, \text{noPDEP}_{cut-off}^{OTV,PTV} < 65, \text{noPDEP}_{cut-off}^{OTV,PTV} < 65, \\ OZ_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV} > 300, Pz_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV} > 300, \%OD_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV} > 15, \%PD_{tot\ cut-off}^{OTV,PTV} > \\ 15), 0, 1)$$

I 7 output dei modelli statistici, gli OTV e i PTV a ciascun cut-off sono stati utilizzati per la generazione di 7 superfici 3D, i cui massimi corrispondono alle miglior sovrapposizioni fra ciascuna PCN_{cut-off} e la OCN. Il massimo valore di S in assoluto è stato quindi associato al miglior set di OTV, PTV e cut-off necessari per definire la PCN_{cut-off} che meglio approssima la OCN. Le matrici di connessione della OCN e della miglior PCN_{cut-off} generate coi relativi valori di

OTV e PTV selezionati sono state quindi importate nel software *CENTIBIN* come files .mat, allo scopo di calcolare i seguenti parametri topologici: numero di connessioni dirette e indirette, diametro della rete, indice di Wiener e distanza media. Le CN sono state infine visualizzate importando i files generati con *CENTIBIN* nel software *PAJEK*.

6.2.3.4. COSTRUZIONE DI RETI COMPLESSE ALEATORIE (RANDOM COMPLEX NETWORKs, RCN)

Mediante l'algoritmo di Erdos-Renyi del software *CENTIBIN* sono state generate due RCN. Variando i parametri dell'algoritmo fino ad ottenere un numero di connessioni indirette pari rispettivamente a quello della OCN e a quello della PCN scelta, sono state generate una Observed RCN (ORCN) e una Predicted RCN (PRCN). Di tali RCN sono stati calcolati i parametri topologici (numero di connessioni dirette e indirette, diametro della rete, indice di Wiener e distanza media), che sono stati confrontati con quelli della OCN e della PCN. Le CN sono state infine visualizzate importando i files generati con *CENTIBIN* nel software *PAJEK*.

7. APPENDICI

7.1. SPETTRI $^1\text{H-NMR}$ DI DERIVATI 4-ANILINO-CHINAZOLINICI

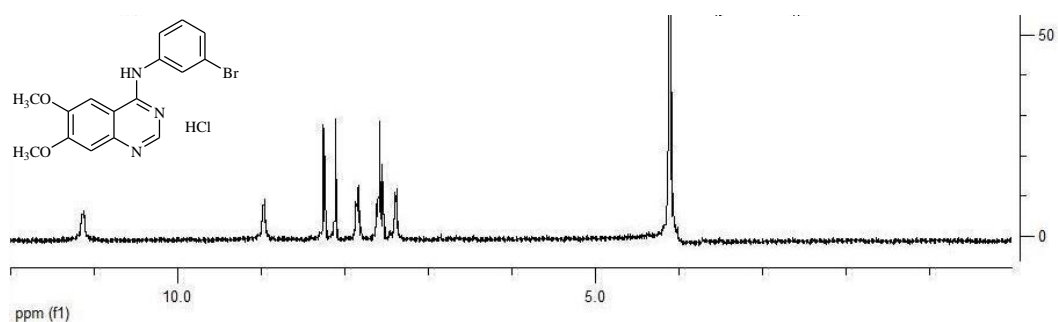


Figura 30. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.

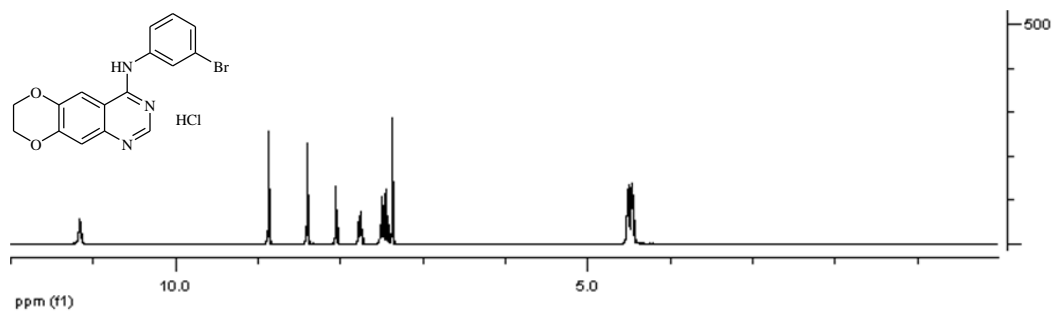


Figura 31 Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.

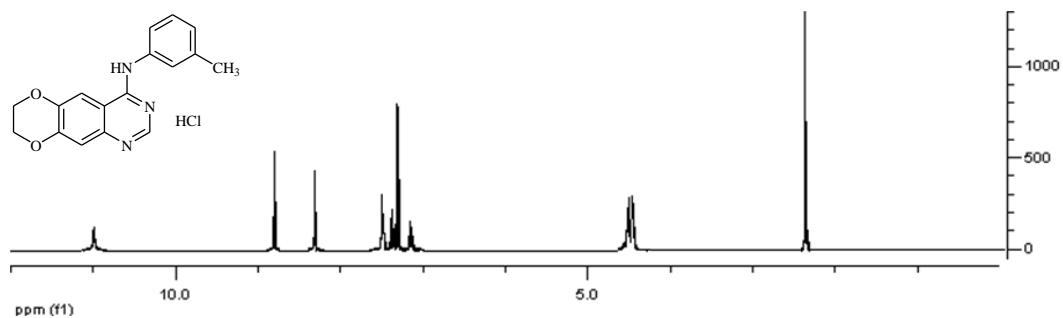


Figura 32. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato.

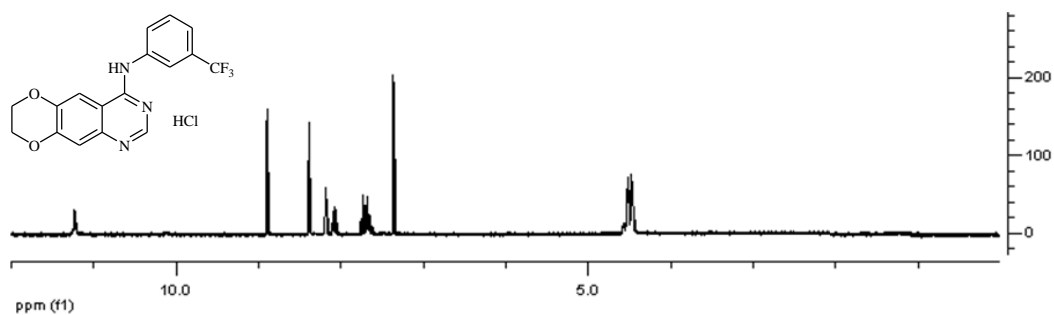


Figura 33. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato.

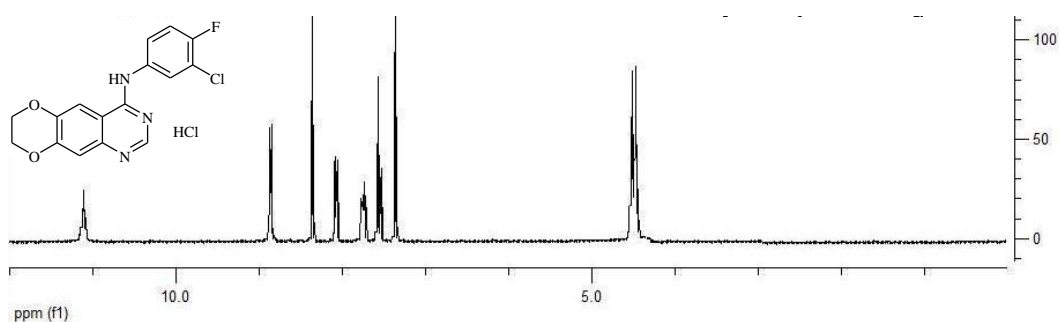


Figura 34. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato.

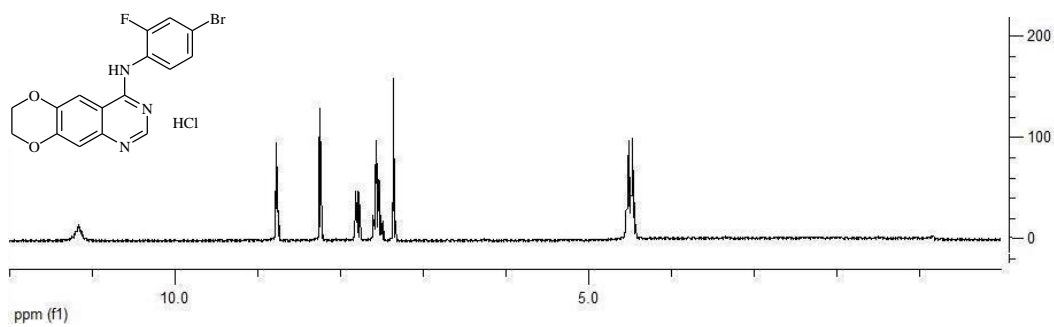


Figura 35. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato.

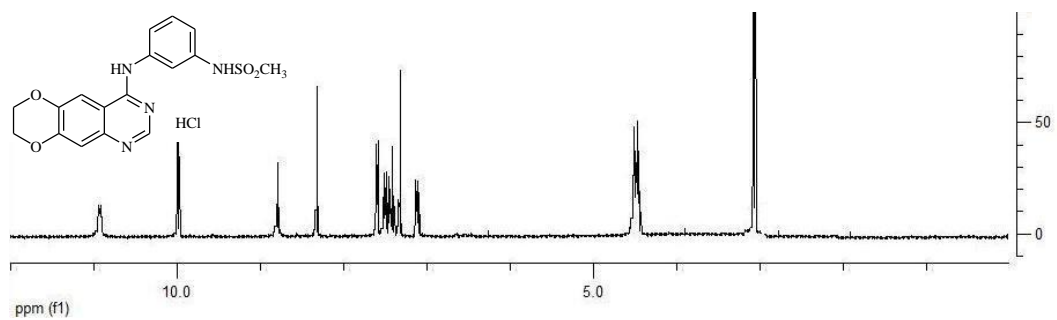


Figura 36. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonamidofenil)ammina cloridrato.

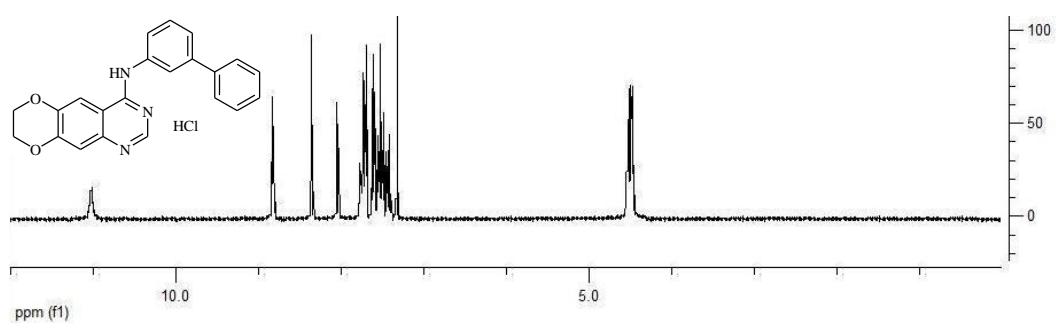


Figura 37. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina cloridrato.

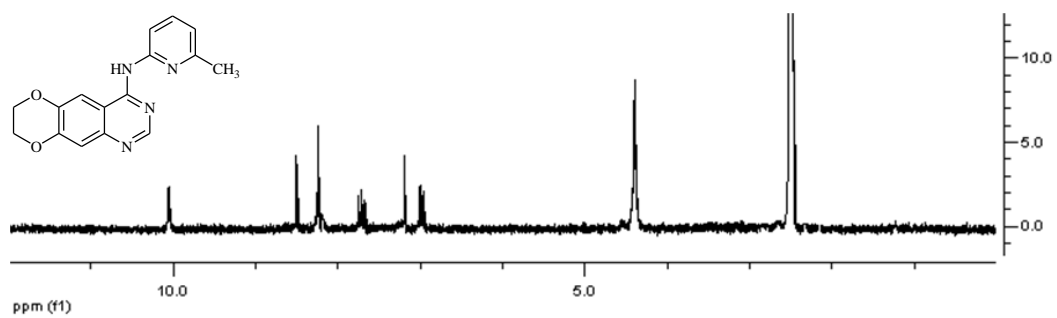


Figura 38. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina.

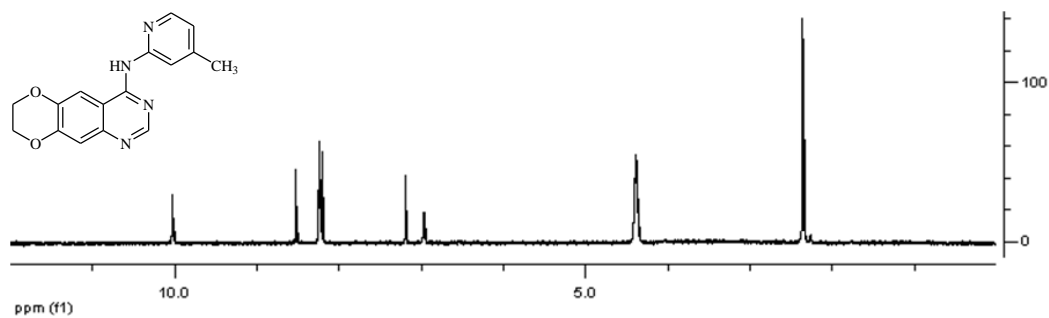


Figura 39. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-etilendioossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina.

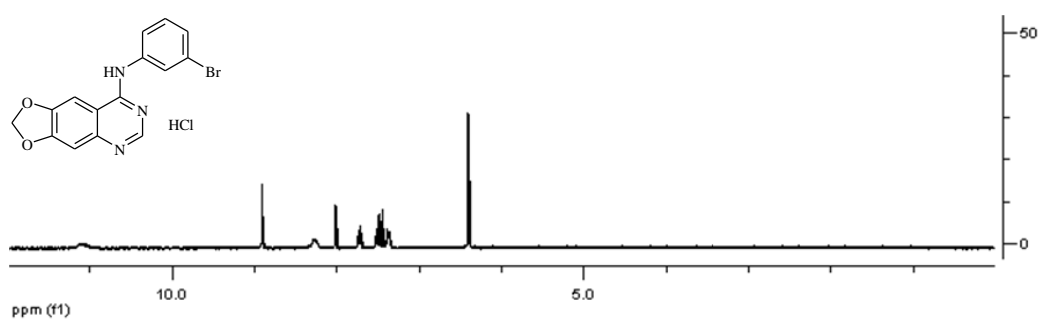


Figura 40. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-metilendioossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.

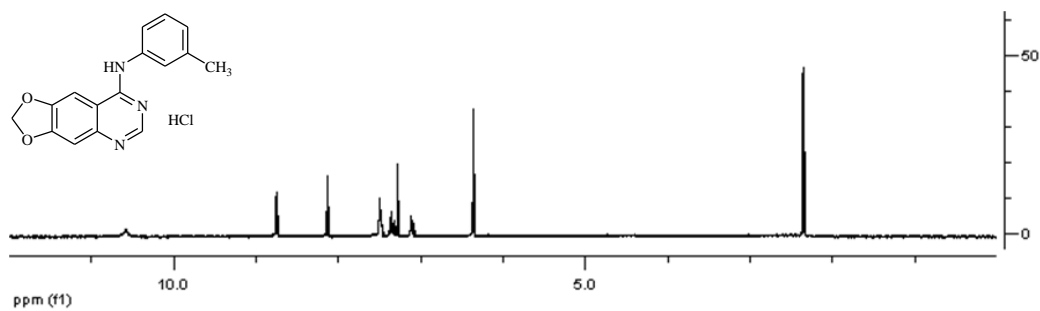


Figura 41. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-metilendioossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato.

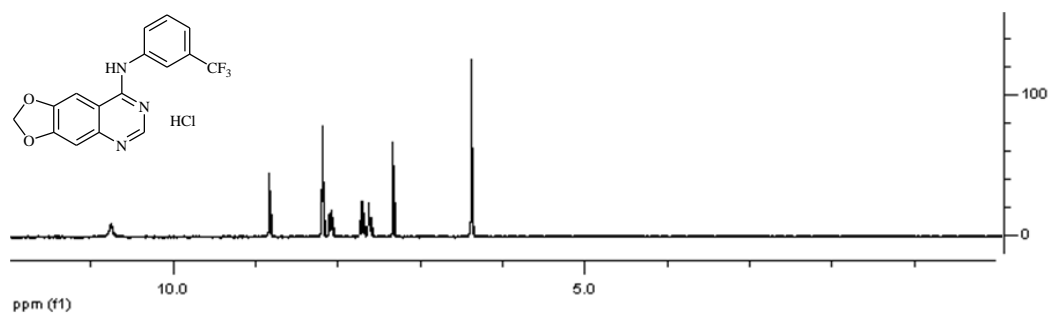


Figura 42. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato.

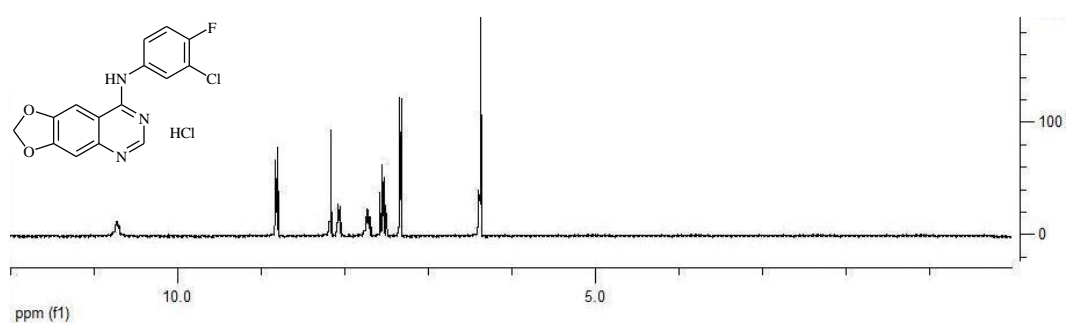


Figura 43. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato.

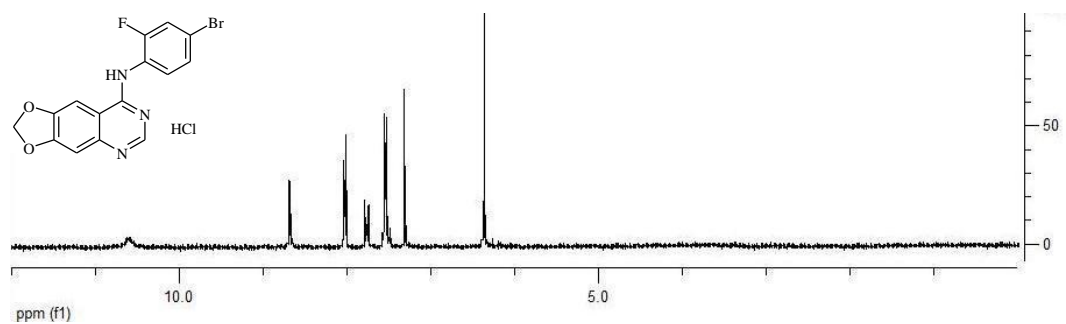


Figura 44. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato.

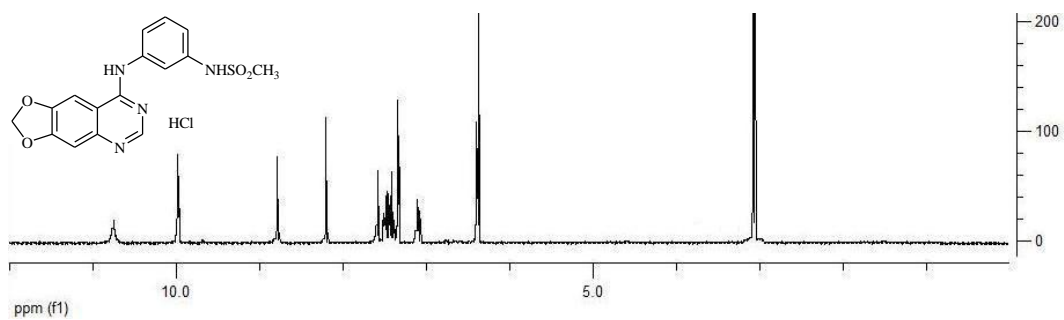


Figura 45. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metansolfonamidofenil)-ammina cloridrato.

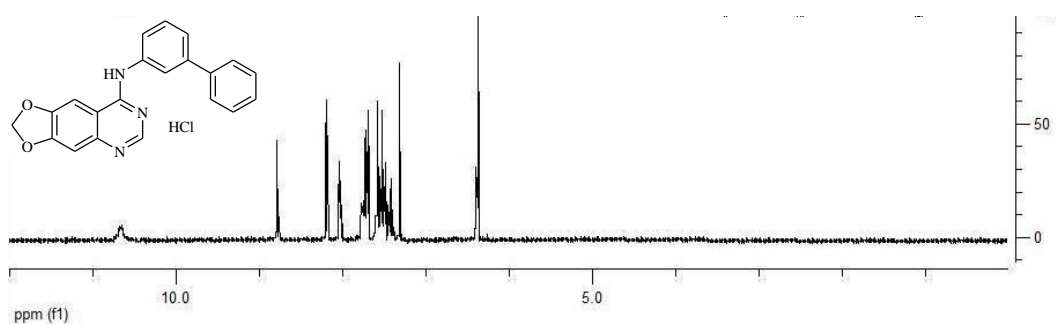


Figura 46. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(m-bifenil)ammina cloridrato.

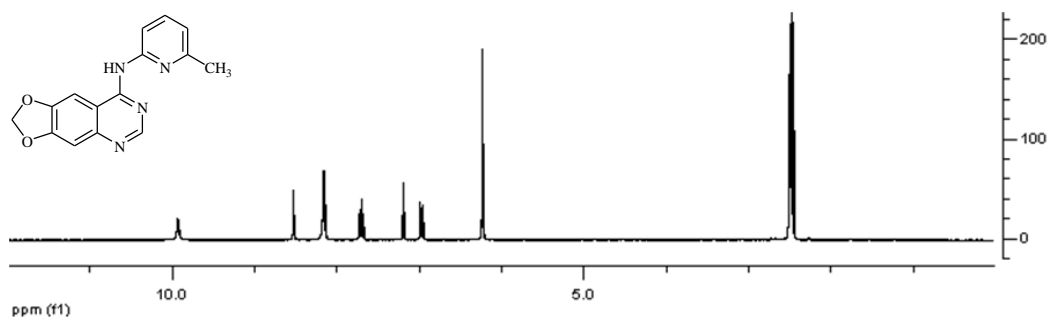


Figura 47. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(6'-metil-2'-piridil)ammina.

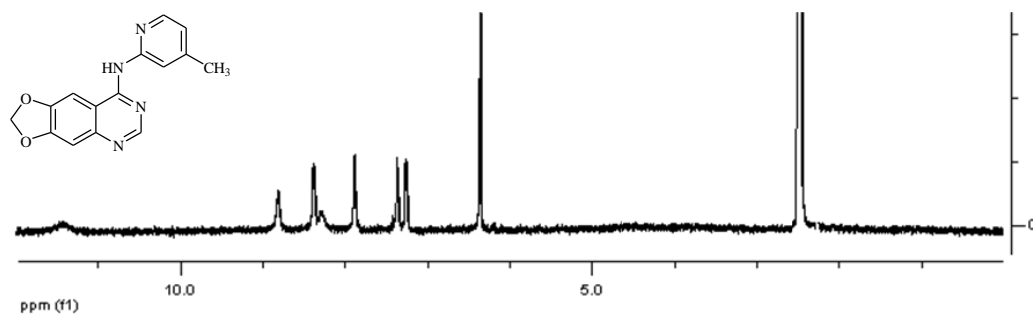


Figura 48. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(4'-metil-2'-piridil)ammina.

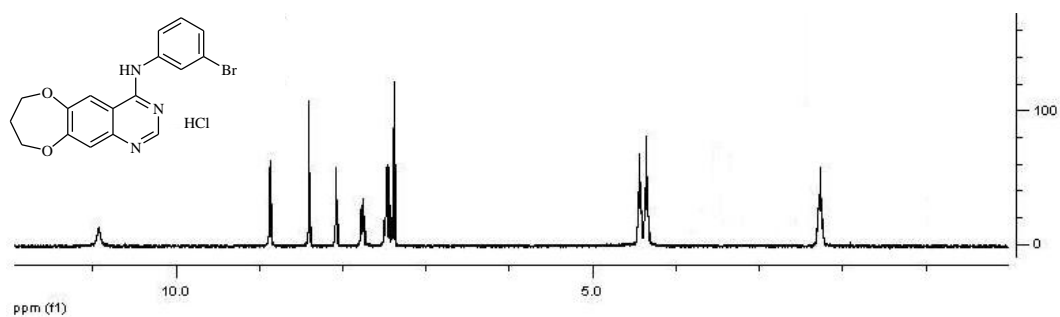


Figura 49. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendioossi)chinazolin-4-il]-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.

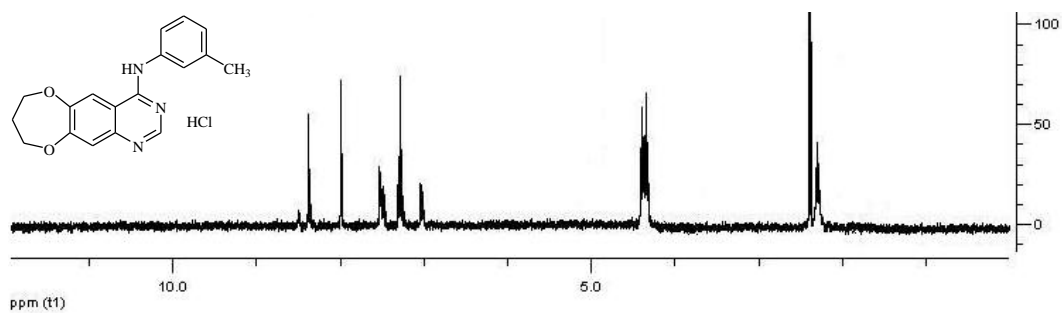


Figura 50. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendioossi)chinazolin-4-il]-(3'-metilfenil)ammina cloridrato.

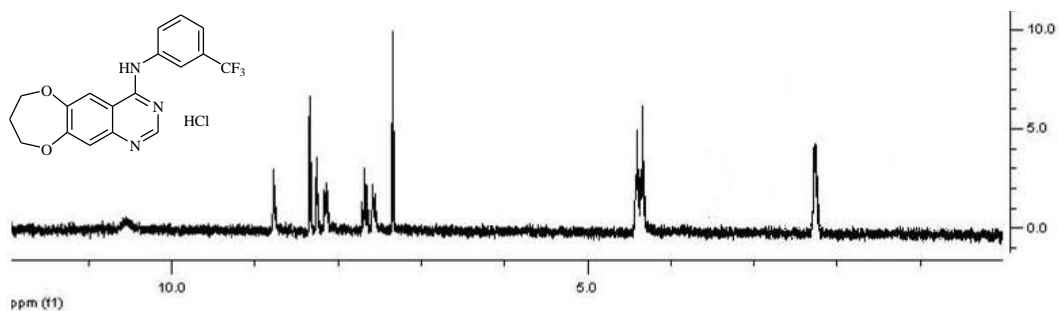


Figura 51. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato.

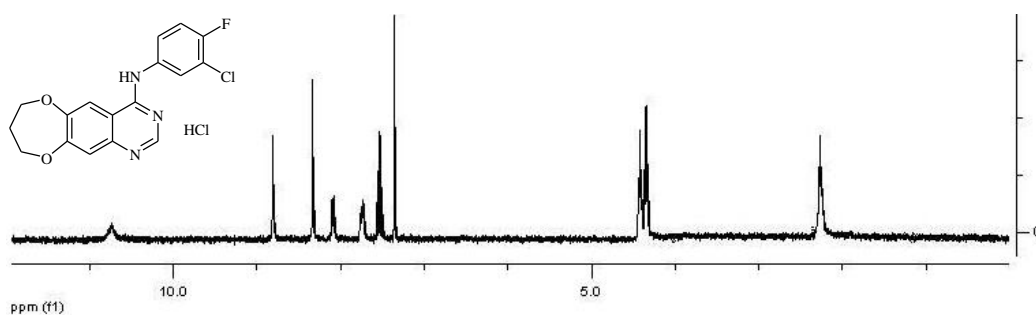


Figura 52. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(3'-cloro-4'-fluorofenil)ammina cloridrato.

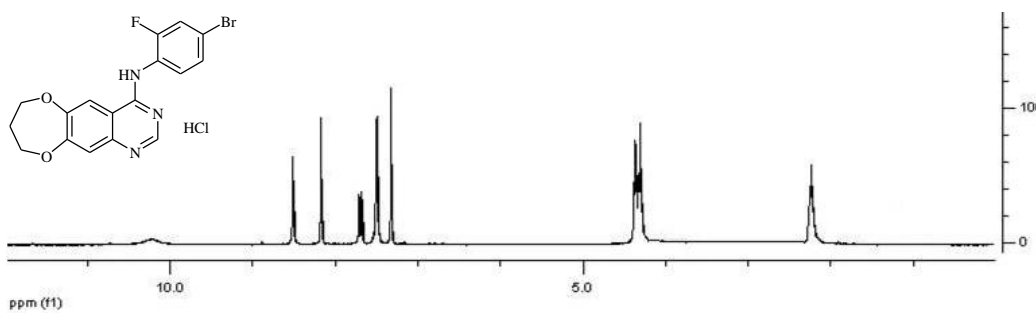


Figura 53. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato.

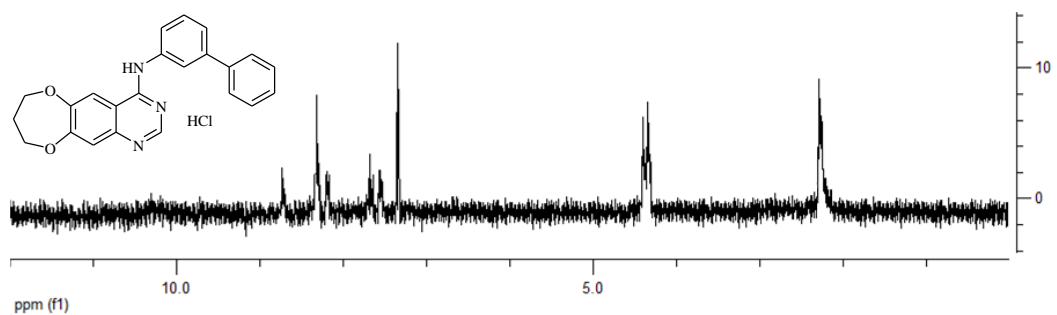


Figura 54. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di [6,7-(1',3'-propilendiossi)chinazolin-4-il]-(m-bifenil)ammina cloridrato.

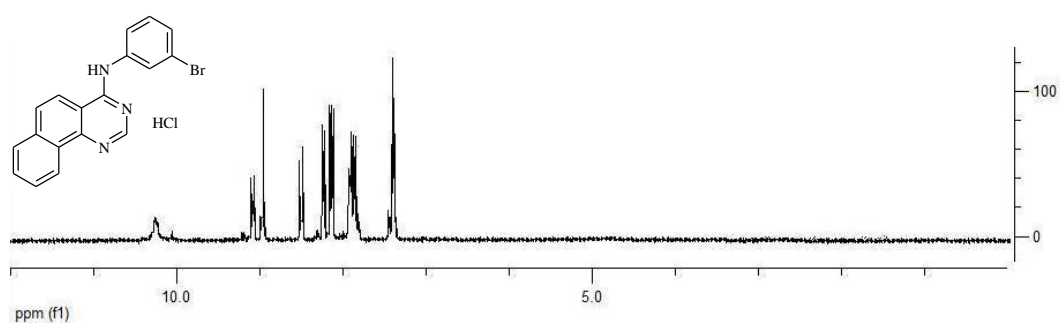


Figura 55. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato.

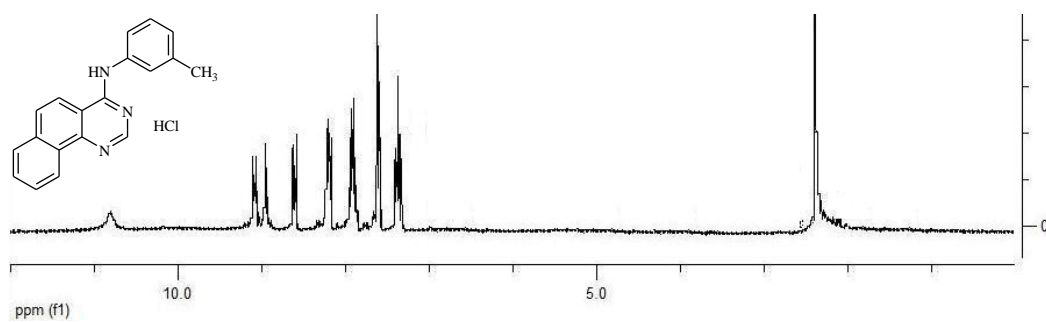


Figura 56. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di (benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato.

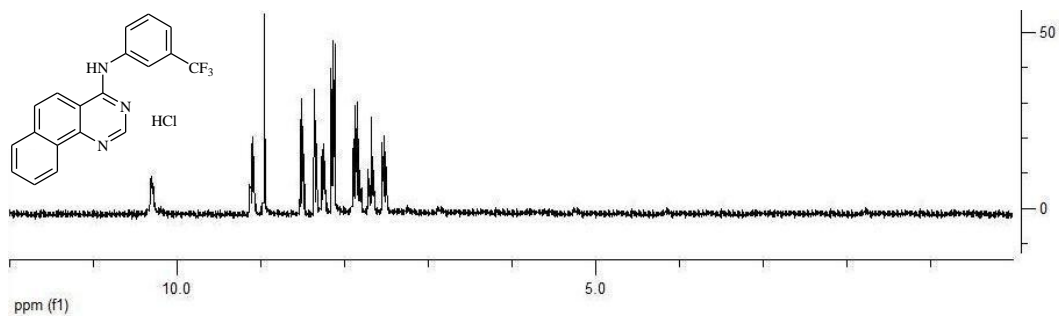


Figura 57. Spettro ¹H-NMR di (benzo[h]chinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato.

7.2. SINTESI ORGANICA ASSISTITA DA MICROONDE⁴⁴

L'uso delle microonde (MicroWaves, MW) per condurre sintesi organiche è iniziato a metà degli anni '80. Le prime sperimentazioni furono effettuate con forni a microonde domestici, che si dimostrarono inadeguati a sostenere le condizioni di reazione. I continui miglioramenti apportati hanno quindi permesso la realizzazione degli attuali reattori per uso scientifico. Attualmente si ritiene che tutte le reazioni chimiche condotte con l'ausilio del calore possano essere accelerate dall'utilizzo delle MW.

Le microonde sono onde elettromagnetiche localizzate tra la radiazione IR e le onde radio, tra i 0.3 e i 300 GHz (lunghezza d'onda = 1 mm – 1 m) (Figura 58). Per evitare interferenze con i sistemi di telecomunicazione ed i radar, la frequenza degli apparati a microonde domestici ed industriali è regolata a 2450 MHz (lunghezza d'onda = 12.2 cm).

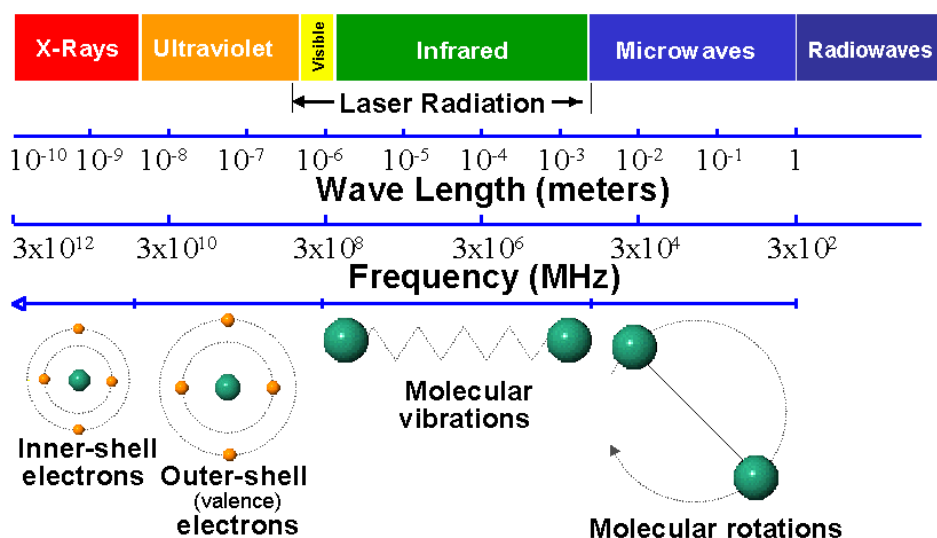


Figura 58. Spettro elettromagnetico.

Ad ogni forma di energia è associata una risposta molecolare: le microonde inducono solo movimenti di rotazione circolare delle molecole, mantenendo intatti i legami interatomici e la loro lunghezza. Infatti l'energia per rompere un legame covalente è stimata tra le 80 e le 120 Kcal/mol, mentre l'energia del fotone delle MW è di 0.037 Kcal/mol, evidentemente non sufficiente per indurre la rottura di un legame chimico.

La tecnica MW si è dimostrata utilissima nei casi in cui il riscaldamento tradizionale abbia bassa efficienza per effetto di trasmissione inefficiente del calore. Infatti la sintesi convenzionale avviene attraverso il trasferimento lento e graduale di calore da una sorgente esterna alla miscela di reazione attraverso il contenitore. Nel caso delle MW il transfer di energia è rapido e senza inerzia, ha potere di penetrazione dell'ordine della lunghezza d'onda usata (quindi 10 cm) e interessa il prodotto ed il solvente ma non il recipiente (Figura 59).

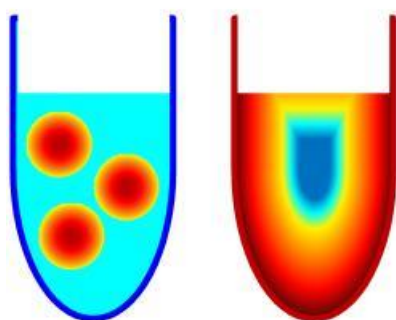


Figura 59. Confronto fra il riscaldamento in-situ dovuto alle microonde (a sinistra) e il metodo di riscaldamento classico (a destra).

Il riscaldamento che si ottiene è quindi rapido e localizzato e non dipende dalla conducibilità termica del contenitore in quanto trasparente alle microonde.

7.2.1. MODALITA' DI AZIONE DELLE MICROONDE

Come tutte le onde elettromagnetiche, le MW sono caratterizzate da un campo elettrico (E) e da un campo magnetico (H) perpendicolari (Figura 60), ma solo quello elettrico è coinvolto nel trasferimento di energia.

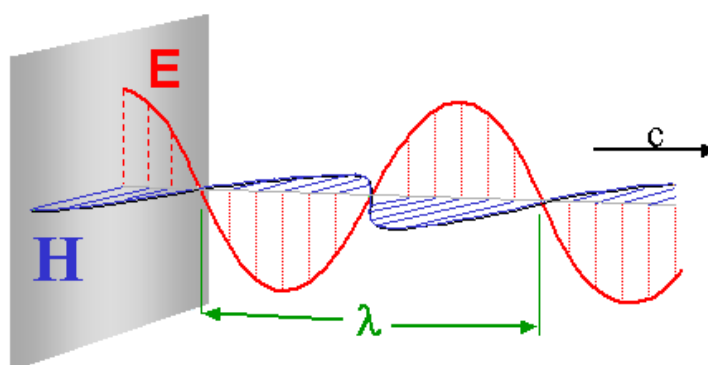


Figura 60. Schematizzazione di un'onda elettromagnetica.

Le microonde provocano particolari oscillazioni in molecole che possiedono momento dipolare non nullo; i movimenti generati a seguito dell'assorbimento determinano un riscaldamento elevato e istantaneo delle molecole attraverso due meccanismi: la **rotazione dipolare** e la **conduzione ionica**. Nel primo caso, molecole dipolari sottoposte ad una radiazione elettromagnetica tendono ad allinearsi con il campo elettrico assumendo movimenti oscillatori. Tali movimenti dipendono dalla viscosità del mezzo e dalla frequenza del campo applicato: se le frequenze sono troppo elevate, le molecole non hanno tempo sufficiente per rispondere alla variazione del campo elettrico e, non riuscendo a ruotare, non si ha trasferimento di energia né riscaldamento; se le frequenze sono troppo basse, le molecole ruotano perfettamente in fase con il campo elettrico, sviluppando troppa poca energia e quindi non producendo calore. Tuttavia, se la frequenza applicata è dell'ordine delle MW, le molecole riescono a ruotare ad una velocità tale per cui permane costantemente una differenza di fase (δ) tra l'orientazione del campo

elettrico e quella del dipolo. Ciò genera una perdita di energia da parte del dipolo attraverso frizionamento e collisioni, che si traduce in riscaldamento.

Nel fenomeno di conduzione ionica, particelle cariche in soluzione si muovono sotto l'influenza del campo elettrico con aumento delle collisioni tra le molecole, con conversione dell'energia cinetica in riscaldamento. Liquidi contenenti ioni, pertanto, assorbiranno le MW maggiormente di liquidi deionizzati.

Se è vero che esiste una correlazione diretta tra costante dielettrica (ϵ') di una molecola e la sua capacità di assorbire le microonde, non altrettanto si può dire riguardo alla velocità con cui una molecola aumenta di temperatura. Ad esempio, nonostante l'acqua possenga una costante dielettrica circa 4 volte superiore a quella dell'etanolo, quest'ultimo si riscalda ad una velocità doppia. La capacità di convertire l'assorbimento in calore è quindi il parametro fondamentale che caratterizza i solventi nella sintesi assistita da microonde, e viene espresso da un parametro chiamato dielectric loss (ϵ''), legato sia alla costante dielettrica che alla differenza di fase fra campo elettrico applicato e dipolo molecolare dall'equazione: $\tan\delta = \epsilon'' / \epsilon'$ (Tabella 9).

Solvente	ϵ'	$\tan\delta$	ϵ''
Acqua	80.4	0.123	9.889
CH₃CN	37.5	0.062	2.325
CH₃OH	24.3	0.941	22.866
CHCl₃	4.8	0.091	0.437
Toluene	2.4	0.04	0.096

Tabella 9. Confronto fra i valori di costante dielettrica e di dielectric loss per alcuni dei principali solventi utilizzati nella sintesi organica.

Sulla base del valore di dielectric loss, i solventi vengono classificati in:

- ✓ **solventi ad alto assorbimento:** hanno ϵ'' elevato. DMSO, alcoli, nitrobenzene, acido formico, glicoli;
- ✓ **solventi a medio assorbimento.** Acqua, DMF, chetoni, AcOH, TFA;
- ✓ **solventi a basso assorbimento:** hanno ϵ'' basso. CHCl_3 , eteri, piridina, TEA, toluene.

È inoltre interessante ricordare che per alcuni solventi le proprietà dielettriche sono fortemente influenzate dalla temperatura (Figura 61), causando una progressiva diminuzione dell'entità del dipolo molecolare.

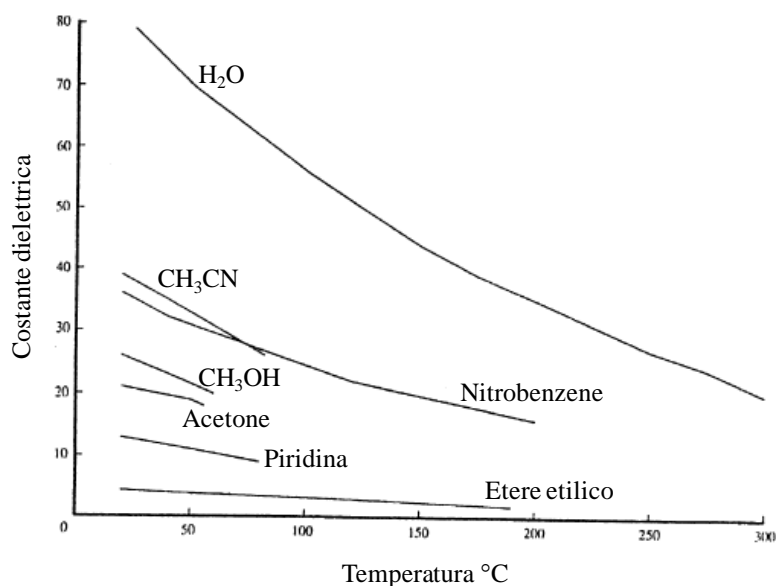


Figura 61. Variazione del valore della costante dielettrica in funzione della temperatura per alcuni dei principali solventi utilizzati nella sintesi organica.

Attualmente sempre più pubblicazioni scientifiche riguardano, ad esempio, la possibilità di utilizzare l'acqua a temperature comprese fra 150 e 250°C (Near Critical Water) se non addirittura maggiori di 300°C (Critical Water) come solvente per reazioni assistite da microonde. A queste temperature e sotto pressione l'acqua ha una ϵ' paragonabile a quella di solventi organici quali acetone, metanolo e nitrobenzene, e può quindi venir considerata come un solvente pseudo-organico.

L'effetto in generale delle microonde sulla sintesi organica è quello di aumentare velocità e resa di reazione, in quanto l'energia trasferita è molto maggiore rispetto alla quota necessaria per raggiungere l'energia d'attivazione. Mentre nel metodo di riscaldamento convenzionale la temperatura a cui si esegue la reazione non può essere superiore a quella complessiva del sistema (temperatura di bulk, T_B), l'utilizzo dell' MW consente alle molecole, in grado di assorbire, il raggiungimento di temperature molto più elevate (temperatura istantanea, T_i). Sulla base di queste considerazioni, se nell'equazione di Arrhenius, che descrive la dipendenza della cinetica di reazione dalla temperatura, si sostituisce il termine T_B con T_i si intuisce immediatamente la ragione per cui le MW inducono una notevole riduzione dei tempi di reazione (Figura 62).

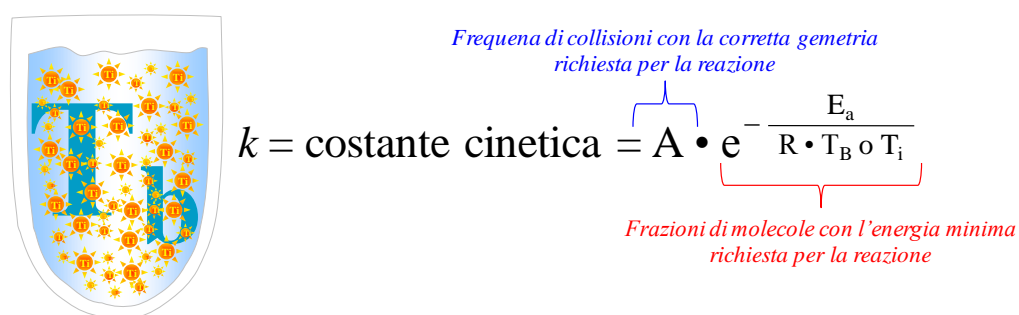


Figura 62. Effetto del riscaldamento MW sulla costante cinetica di reazione. $T_i \gg T_B$.

Il miglior raggiungimento dell'energia di attivazione necessaria è uno dei motivi per cui spesso, oltre alla riduzione dei tempi di reazione, si ha anche una notevole riduzione della quantità di catalizzatori necessari.

L'irraggiamento con microonde, garantendo inoltre un più rapido raggiungimento delle condizioni di temperatura ottimali, è in grado di aiutare ad ottenere miscele di reazione meno complesse: è stato infatti dimostrato che la maggior parte dei prodotti secondari delle reazioni si formano nella fase di riscaldamento.

7.2.2. TIPOLOGIE DI REATTORI A MICROONDE

Esistono due tipi di reattori a microonde: **multimodali** e **monomodali**. Nel primo caso rientrano, ad esempio, i forni a microonde domestici o strumenti industriali dotati di una cavità ampia con una conseguente dispersione di energia e una distribuzione energetica non uniforme. Nei sistemi monomodali invece si ha la focalizzazione delle onde elettromagnetiche sul campione, con un conseguente notevole aumento di densità e uniformità di energia. Il reattore che è stato utilizzato in questo lavoro di tesi di dottorato è di tipo monomodale self-tuning (Figura 63), in cui si ha un'automatica regolazione della potenza delle microonde in base alle condizioni operative impostate.

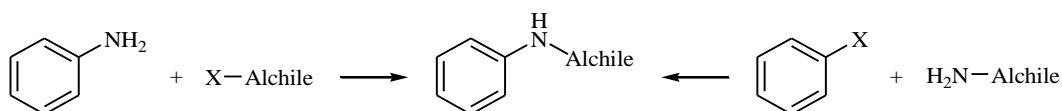


Figura 63. A sinistra: reattore monomodale self-tuning. A destra: sistema toroidale utilizzato per focalizzare le MW direttamente nel campione, presente al centro dello strumento.

Nel sistema utilizzato è presente, inoltre, un flusso di gas di raffreddamento attivabile secondo le esigenze operative ed un controllo a feedback della temperatura che permette di massimizzare l'input delle microonde (Enhanced Microwave Synthesis, EMS). In questo modo è possibile fornire energia senza aumentare proporzionalmente la temperatura di bulk, migliorando la cinetica di reazione e riducendo i fenomeni di termodegradazione.

7.3. APPLICAZIONI DELLA SINTESI ASSISTITA DA MICROONDE: N-ALCHILAZIONE DI ANILINE

La sintesi di *N*-alchilaniline gioca un ruolo fondamentale nella chimica organica, data l'elevata importanza di questi derivati come intermedi di sintesi e prodotti dotati di attività biologica⁴⁵. Composti di questo tipo possono essere ottenuti per diretta *N*-alchilazione di aniline⁴⁶ o per Sostituzione Nucleofila Aromatica (SNAr) su alobenzeni⁴⁷ (Schema 20).

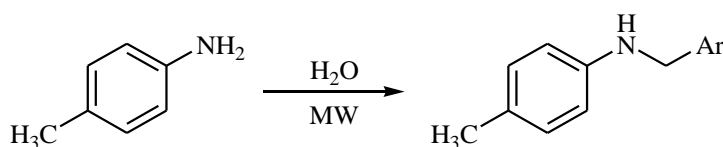


Schema 20. Strategie per l'ottenimento di N-alchilaniline.

Nonostante il notevole sviluppo di efficienti catalizzatori per poter eseguire reazioni di SNAr anche su nuclei aromatici ricchi di elettroni, la via di elezione per la sintesi di questi derivati rimane in molti casi la diretta alchilazione della funzione amminica. Recentemente, anche grazie all'ausilio delle microonde, molti autori si sono concentrati sulla possibilità di sostituire i solventi organici comunemente utilizzati con l'acqua, utilizzando deboli condizioni di basicità per ridurre la quantità di catalizzatori⁴⁸⁻⁵⁰. Tutti i metodi presentati, tuttavia, non consentono la risoluzione del principale problema della diretta funzionalizzazione di una funzione amminica: la polialchilazione.

In questo capitolo viene presentato un nuovo metodo per la mono *N*-alchilazione selettiva di aniline mediante l'utilizzo di acqua come solvente, in condizioni Near Critical, senza l'ausilio di catalizzatori o di ambienti debolmente alcalini.

Per lo studio di questa nuova metodica sintetica, è stata inizialmente presa a modello la reazione fra la 4-metilnilina e il benzilcloruro in presenza di sola acqua, esplorando diversi tempi e temperature di reazione. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 10.



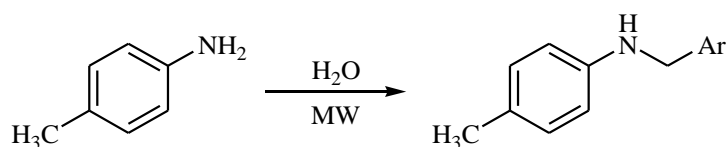
Tempo min	Temperatura °C	Rapporto Anilina : Alogenuro	Resa %
10	110	1 : 1	0
10	130	1 : 1	5
10	150	1 : 1	60
20	150	1 : 1	75
30	150	1 : 1	75
20	150	1 : 2	82

Tabella 10. Ottimizzazione della reazione fra 4-metilanilina e benzilcloruro. Condizioni di reazione: 4-metilanilina (3 mmoli) e benzilcloruro (secondo rapporto indicato) sono stati sospesi in acqua (1 ml) ed irradiati con MW nelle condizioni indicate.

Irraggiando la miscela di reazione per 20 minuti a 150 °C si ottiene una soddisfacente conversione del prodotto di partenza nel derivato desiderato. È interessante, inoltre, notare come anche utilizzando un eccesso di alogenuro non si ottenga mai polialchilazione: dalla miscela di reazione sono isolabili solamente il prodotto di arrivo e il prodotto di partenza immutato. Tale osservazione assume ancora maggiore importanza se consideriamo che, nelle strategie riportate in letteratura, si ha sempre la formazione di una discreta quantità di prodotti di polialchilazione, anche operando con rapporti equimolari fra i prodotti di partenza.

Non è tuttavia stato possibile portare la reazione a completezza né allungando i tempi di reazione, né aumentando il rapporto con l'alogenuro.

Per verificare se la presenza di basi o di catalizzatori potesse influenzare il decorso della reazione, sono stati sperimentati diversi ambienti di reazione, sempre irraggiando le miscele per 20 minuti a 150 °C (Tabella 11).



Base	Catalizzatore	Resa %
KOH	-	40
TEA	-	35
K ₂ CO ₃	-	45
NaHCO ₃	-	48
-	KI	40
-	CuI	0

Tabella 11. Effetto di basi e catalizzatori sul decorso della reazione.

Condizioni di reazione: 4-metilanilina (3 mmoli), benzilcloruro (6 mmoli) e base (6 mmoli) o catalizzatore (10 mmoli%) sono stati sospesi in acqua (1 ml) ed irradiati per 20 minuti a 150°C.

In tutte le condizioni testate le rese sono risultate sensibilmente inferiori a quelle ottenute precedentemente, dimostrando che la presenza di basi o catalizzatori nelle condizioni utilizzate porta a un peggioramento del decorso della reazione.

L'applicabilità del metodo sintetico è stata quindi valutata sottoponendo la 4-metilanilina ad alchilazione con diversi alogenuri alifatici. In ogni caso, 3 mmoli di 4-metilanilina sono stati fatti reagire con 6 mmoli di alogenuro, in presenza di 1 ml di acqua ed irraggiando per 20 minuti a 150°C. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 12.

Alogenuro	Prodotto	Resa %
		85
		88
		73
		66
		90
		85
		20
		20

Tabella 12. Alchilazione di 4-metilanilina con alogenuri alchilici.

Tutte le reazioni testate con monoalogenuri alchilici hanno portato ad alte rese di prodotto desiderato e non è stata rilevata presenza di prodotti di polialchilazione; d'altro canto, con l'uso di α,ω -dibromoalcani, cioè di alogenuri alchilici bifunzionali, non è stato ottenuto il derivato desiderato. In particolare, nel caso dell'1,4-dibromobutano è stata ottenuta una ciclocondensazione derivante da iniziale alchilazione della funzione amminica e successiva ciclizzazione intramolecolare; nel caso dell'1,2-dibromoetano, invece, non si è assistito alla sintesi del sistema aziridinico ma all'ottenimento di due derivati diversi, la *N,N'*-di-(4-metilfenil)etilendiammina (derivante dalla funzionalizzazione di entrambi i siti reattivi del dibromoetano con due molecole di anilina) e la *N,N'*-di-(4-metilfenil)piperazina (derivante probabilmente dalla reazione del prodotto precedente con una seconda molecola di alogenuro).

Quindi, per verificare l'applicabilità del metodo su diversi substrati anilinici è stato preso come agente alchilante standard il cloridrato della 2-cloro-*N,N*-dimetiletilammina. Tale molecola è stata scelta per le sue peculiari caratteristiche (essendo un cloridrato non risulta solubile nei solventi organici comunemente utilizzati per le reazioni di *N*-alchilazione) e per il suo interesse dal punto di vista farmaceutico. Sono molti, infatti, i composti dotati di attività farmacologica che presentano una porzione *N,N*-dialchilamminoalchilamminica⁵¹ (Figura 64).

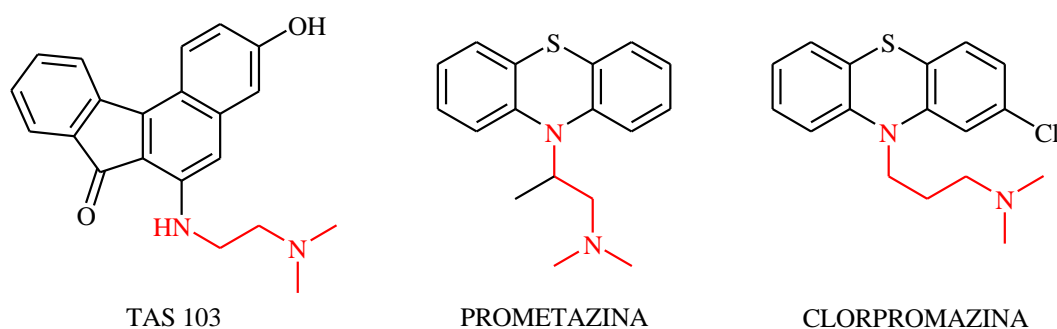
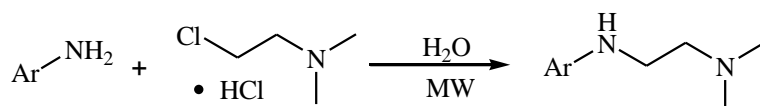


Figura 64. Esempi di farmaci contenenti una porzione *N,N*-dialchilamminoalchilamminica (evidenziata in rosso).

I risultati ottenuti dalla condensazione della 2-cloro-*N,N*-dimetiletilammina cloridrato con diversi substrati amminici aromatici sono riportati in Tabella 13.



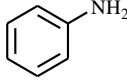
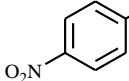
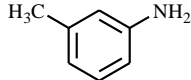
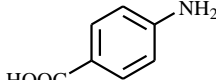
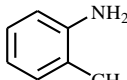
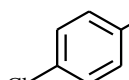
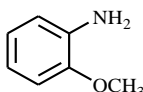
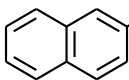
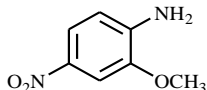
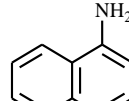
Ammina aromatica	Resa %	Ammina aromatica	Resa %
	89		10
	82		35
	74		67
	72		78
	20		75

Tabella 13. Alchilazione di ammine aromatiche con 2-cloro-*N,N*-dimetiletilammina cloridrato.

Anilina, ammine aromatiche attivate e naftilammine sono state efficientemente alchilate, anche in presenza di sostituenti in orto rispetto all'azoto amminico. In presenza di gruppi elettronattrattori si assiste invece ad una diminuzione della resa di ottenimento del prodotto alchilato, in funzione della capacità disattivante del sostituente ($\text{NO}_2 > \text{COOH} > \text{Cl}$).

Infine, per verificare la selettività della reazione nei confronti della funzione amminica è stata testata la procedura di alchilazione anche su fenilendiammine e amminofenoli (Tabella 14).

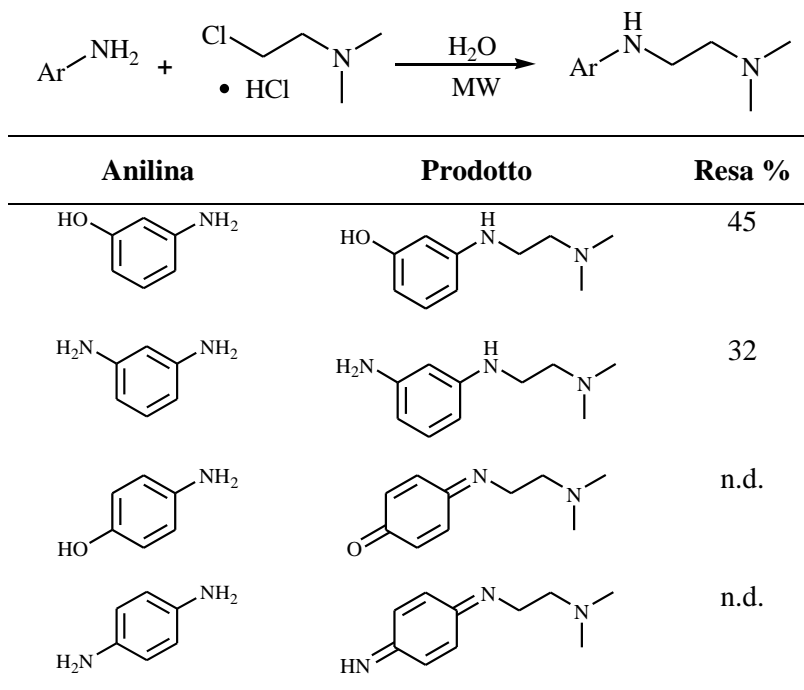


Tabella 14. Alchilazione di fenilendiammine e ammino fenoli con 2-cloro-N,N-dimetiletilammina cloridrato.
n.d. = non determinata.

L'alchilazione del 3-amminofenolo e della 3-fenilendiammina si è dimostrata chemoselettiva, mentre nel caso del 4-amminofenolo e della 4-fenilendiammina oltre alla N-alchilazione si è avuta anche l'ossidazione a corrispondente chinone o chinonimmina (strutture determinate dall'analisi dello spettro HRMS ESI-TOF). Nel complesso, quindi, mediante l'utilizzo di acqua come solvente in condizioni Near Critical è stato possibile mettere a punto una metodica sintetica assistita dalle microonde rapida, pulita ed efficiente per la mono N-alchilazione diretta di aniline senza la necessità di utilizzare ambienti di reazione alcalini o catalizzatori.

7.3.1. METODICA GENERALE DI SINTESI E DATI SPETTROSCOPICI

Una micela di ammina aromatica (3 mmoli) e alogenuro alchilico (6 mmoli) in H₂O (1 ml) è stata irradiata con microonde a 150W, raggiungendo la temperatura di 150°C in 1 minuto. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 20 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata ripresa con H₂O (10 ml), neutralizzata con NaHCO₃ ed estratta a fondo con CHCl₃ (3 x 10 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: CHCl₃).

Tutti i dati spettroscopici relativi ai composti ottenuti sono riportati in Tabella 15.

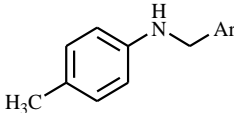
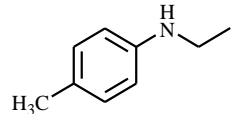
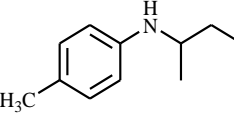
Prodotto	¹ H-NMR	HRMS (M ⁺ + 1)
	CDCl₃-d: 7.49 – 7.36 (m, 5 H, H _{arom}) 7.10 (d, J = 8.4, 2 H, H _{arom}) 6.66 (d, J = 8.4, 2 H, H _{arom}) 4.39 (s, 2 H, CH ₂) 2.36 (s, 3 H, CH ₃)	Teorico: 198.1283 Trovato: 198.1277
	CDCl₃-d: 6.99 (d, J = 8.1, 2 H, H _{arom}) 6.54 (d, J = 8.1, 2 H, H _{arom}) 3.14 (q, J = 7.2, 2 H, CH ₂ CH ₃) 2.24 (s, 3 H, CH ₃) 1.24 (t, J = 7.2, 3 H, CH ₂ CH ₃)	Teorico: 136.1126 Trovato: 136.1202
	CDCl₃-d: 7.03 (d, J = 8.3, 2 H, H _{arom}) 6.79 (d, J = 8.3, 2 H, H _{arom}) 3.41 – 3.30 (m, 1 H, CH) 2.27 (s, 3 H, CH ₃) 1.79 – 1.44 (m, 2 H, CH ₂) 1.21 (d, J = 6.4, 3 H, CH ₃ CH) 0.94 (t, J = 7.0, 3 H, CH ₂ CH ₃)	Teorico: 163.1361 Trovato: 163.1354

Tabella 15. Dati spettroscopici relativi ai derivati alchilati ottenuti.

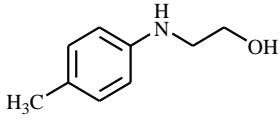
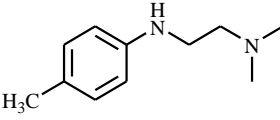
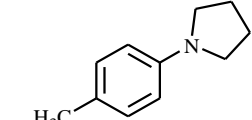
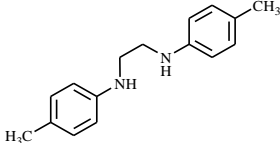
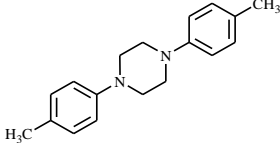
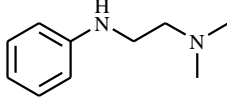
	<p>CDCl₃-d: 7.02 (d, J = 8.1, 2 H, H_{arom}) 6.66 (d, J = 8.1, 2 H, H_{arom}) 3.83 (t, J = 5.0, 2 H, CH₂OH) 3.30 (t, J = 5.0, 2 H, NHCH₂) 2.25 (s, 3 H, CH₃)</p>	<p>Teorico: 152.1075 Trovato: 152.1088</p>
	<p>CDCl₃-d: 6.99 (d, J = 8.3, 2 H, H_{arom}) 6.59 (d, J = 8.3, 2 H, H_{arom}) 3.35 (t, J = 5.8, 2 H, NHCH₂) 2.88 (t, J = 5.8, 2 H, CH₂N) 2.53 (s, 6 H, N(CH₃)₂) 2.23 (s, 3 H, CH₃)</p>	<p>Teorico: 179.1548 Trovato: 179.1566</p>
	<p>CDCl₃-d: 7.03 (d, J = 8.3, 2 H, H_{arom}) 6.50 (d, J = 8.3, 2 H, H_{arom}) 3.30 – 3.15 (m, 4 H, 2'-H e 5'-H) 2.26 (s, 3 H, CH₃) 2.02 – 1.95 (m, 4 H, 3'-H e 4'-H)</p>	<p>Teorico: 162.1283 Trovato: 162.1296</p>
	<p>CDCl₃-d: 7.00 (d, J = 8.2, 4 H, H_{arom}) 6.59 (d, J = 8.2, 4 H, H_{arom}) 3.36 (s, 4 H, 2 x NHCH₂) 2.24 (s, 6 H, 2 x CH₃)</p>	<p>Teorico: 241.1705 Trovato: 241.1700</p>
	<p>CDCl₃-d: 7.10 (d, J = 8.1, 4 H, H_{arom}) 6.91 (d, J = 8.1, 4 H, H_{arom}) 3.28 (s, 8 H, 4 x NCH₂) 2.24 (s, 6 H, 2 x CH₃)</p>	<p>Teorico: 267.1861 Trovato: 267.1888</p>
	<p>CDCl₃-d: 7.19 (t, J = 8.1, 2 H, 3-H e 5-H) 6.71 (t, J = 8.1, 1 H, 4-H) 6.64 (d, J = 8.1, 2 H, 2-H e 6-H) 3.17 (t, J = 6.1, 2 H, NHCH₂) 2.59 (t, J = 6.1, 2 H, CH₂N) 2.28 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 165.1392 Trovato: 165.1374</p>

Tabella 15. Continua.

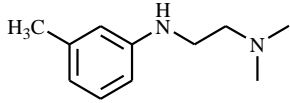
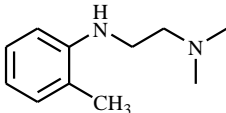
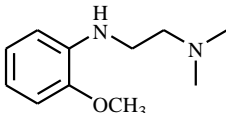
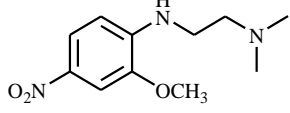
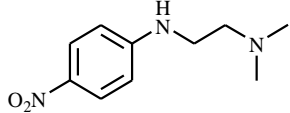
	<p>CDCl₃-d: 7.08 (t, J = 7.5, 1 H, 5-H) 6.54 (d, J = 7.5, 1 H, 4-H) 6.50 – 6.44 (m, 2 H, 2-H e 6-H) 3.17 (t, J = 6.0, 2 H, NHCH₂) 2.59 (t, J = 6.0, 2 H, CH₂N) 2.29 (s, 9 H, N(CH₃)₂ e CH₃)</p>	<p>Teorico: 179.1548 Trovato: 179.1523</p>
	<p>CDCl₃-d: 7.14 (t, J = 8.2, 1 H, 5-H) 7.04 (d, J = 8.2, 1 H, 3-H) 6.72 (t, J = 8.2, 1 H, 4-H) 6.61 (d, J = 8.2, 1 H, 6-H) 3.21 (t, J = 5.9, 2 H, NHCH₂) 2.64 (t, J = 5.9, 2 H, CH₂N) 2.29 (s, 6 H, N(CH₃)₂) 2.18 (s, 3 H, CH₃)</p>	<p>Teorico: 179.1548 Trovato: 179.1572</p>
	<p>CDCl₃-d: 6.87 (td, J = 7.7, J = 1.4, 1 H, 4-H o 5-H) 6.77 (dd, J = 7.7, J = 1.4, 1 H, 3-H o 6-H) 6.67 (td, J = 7.7, J = 1.4, 1 H, 4-H o 5-H) 6.77 (dd, J = 7.7, J = 1.4, 1 H, 3-H o 6-H) 3.85 (s, 3 H, OCH₃) 3.23 (t, J = 6.4, 2 H, NHCH₂) 2.62 (t, J = 6.4, 2 H, CH₂N) 2.31 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 195.1497 Trovato: 195.1486</p>
	<p>CDCl₃-d: 7.91 (dd, J = 8.9, J = 2.3, 1 H, 5-H) 7.62 (d, J = 2.3, 1 H, 3-H) 6.50 (d, J = 8.9, 1 H, 6-H) 3.94 (s, 3 H, OCH₃) 3.49 (t, J = 6.2, 2 H, NHCH₂) 2.86 (t, J = 6.2, 2 H, CH₂N) 2.51 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 240.1348 Trovato: 240.1367</p>
	<p>CDCl₃-d: 8.07 (d, J = 9.2, 2 H, 3-H e 5-H) 6.55 (d, J = 9.2, 2 H, 2-H e 6-H) 3.22 (t, J = 6.0, 2 H, NHCH₂) 2.57 (t, J = 6.0, 2 H, CH₂N) 2.25 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 210.1243 Trovato: 210.1259</p>

Tabella 15. Continua.

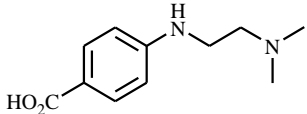
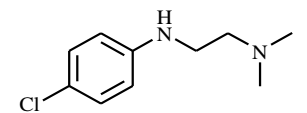
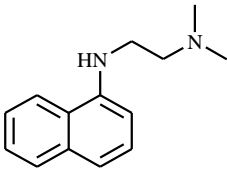
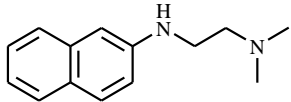
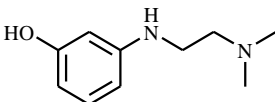
	<p>CDCl₃-d:</p> <p>7.17 (d, J = 7.6, 2 H, 3-H e 5-H) 6.64 (d, J = 7.6, 2 H, 2-H e 6-H) 3.23 (t, J = 5.7, 2 H, NHCH₂) 2.71 (t, J = 5.7, 2 H, CH₂N) 2.38 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 209.1290</p> <p>Trovato: 209.1310</p>
	<p>CDCl₃-d:</p> <p>7.11 (d, J = 8.7, 2 H, 3-H e 5-H) 6.55 (d, J = 8.7, 2 H, 2-H e 6-H) 3.12 (t, J = 5.7, 2 H, NHCH₂) 2.57 (t, J = 5.7, 2 H, CH₂N) 2.27 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 199.1002</p> <p>Trovato: 199.1018</p>
	<p>CDCl₃-d:</p> <p>7.95 – 7.89 (m, 1 H, H_{arom}) 7.82 – 7.76 (m, 1 H, H_{arom}) 7.48 – 7.41 (m, 2 H, H_{arom}) 7.35 (t, J = 7.7, 1 H, 3-H) 7.23 (d, J = 7.7, 1 H, 4-H) 6.58 (d, J = 7.7, 1 H, 2-H) 3.23 (t, J = 6.2, 2 H, NHCH₂) 2.75 (t, J = 6.2, 2 H, CH₂N) 2.34 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 215.1548</p> <p>Trovato: 215.1607</p>
	<p>CDCl₃-d:</p> <p>7.67 (d, J = 8.5, 1 H, 5-H) 7.62 (d, J = 8.5, 2 H, 4-H e 8-H) 7.36 (d, J = 8.5, 1 H, 7-H) 7.19 (t, J = 8.5, 1 H, 6-H) 6.94 (dd, J = 8.5, J = 2.2, 1 H, 3-H) 6.81 (d, J = 2.2, 1 H, 1-H) 3.28 (t, J = 6.1, 2 H, NHCH₂) 2.65 (t, J = 6.1, 2 H, CH₂N) 2.31 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 215.1548</p> <p>Trovato: 215.1555</p>
	<p>DMSO-d₆:</p> <p>6.82 (t, J = 8.1, 1 H, 5-H) 6.04 – 5.91 (m, 3 H, H_{arom}) 3.45 (t, J = 7.2, 2 H, NHCH₂) 3.05 (t, J = 7.2, 2 H, CH₂N) 2.24 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 181.1341</p> <p>Trovato: 181.1400</p>

Tabella 15. Continua.

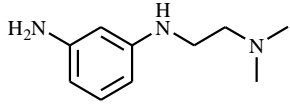
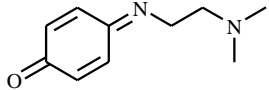
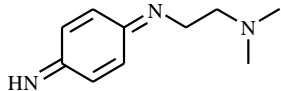
	<p>CDCl₃-d: 6.97 (t, J = 7.7, 1 H, 5-H) 6.12 (dd, J = 7.7, J = 2.8, 2 H, 4-H e 6-H) 5.99 (t, J = 2.8, 1 H, 2-H) 3.14 (t, J = 7.2, 2 H, NHCH₂) 2.57 (t, J = 7.2, 2 H, CH₂N) 2.27 (s, 6 H, N(CH₃)₂)</p>	<p>Teorico: 180.1501 Trovato: 180.1487</p>
	<p>NMR non determinato.</p>	<p>Teorico: 179.1184 Trovato: 179.1200</p>
	<p>NMR non determinato.</p>	<p>Teorico: 178.1344 Trovato: 178.1367</p>

Tabella 15. Continua.

8. PUBBLICAZIONI E PROCEEDINGS

8.1. PUBBLICAZIONI

Marzaro, G.; Chilin, A.; Pastorini, G.; Guiotto, A., "A novel convenient synthesis of benzoquinazolines", *Org. Lett.*, **2006**, 8, 255-256.

Chilin, A.; Marzaro, G.; Zanatta, S.; Barbieri, V.; Pastorini, G.; Manzini, P.; Guiotto, A., "A new access to quinazolines from simple anilines", *Tetrahedron*, **2006**, 62, 12351-12356.

Chilin, A.; Marzaro, G.; Zanatta, S.; Guiotto, A., "A microwave improvement in the Synthesis of the quinazoline scaffold", *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48, 3229-3231.

Chilin, A.; Marzaro, G.; Marzano, C.; Dalla Via L.; Ferlina, M.G.; Pastorini, G.; Guiotto, A., "Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine analogs: The critical role of the acridine moiety in determining their biological activity", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.11.072

8.2. PROCEEDINGS

Zanatta, S.; Marzaro, G.; Pastorini, G.; Chilin, A., “Benzochinazoline: nuovo approccio sintetico”, *5th SAYCS (Sigma Aldrich Young Chemists)*, Riccione, 10-12 Ottobre 2005.

Marzaro, G.; Zanatta, S.; Pastorini, G.; Chilin, A., “Chinazoline benzosostituite: sintesi convenzionale vs. sintesi assistita da microonde”, *6th SAYCS (Sigma Aldrich Young Chemists)*, Riccione, 9-11 Ottobre 2006.

Zanatta, S.; Marzaro, G.; Pastorini, G.; Chilin, A., “Synthesis and structure-activity relationships of coumarinic and quinolinonic compounds as inhibitors of protein kinase CK2”, *6th SAYCS (Sigma Aldrich Young Chemists)*, Riccione, 9-11 Ottobre 2006.

Marzaro, G.; Guiotto, A.; Manzini, P.; Chilin, A., “Quinazoline-based kinase inhibitors: new synthetic approach and biological evaluation”, *5th Joint Meeting on Medicinal Chemistry*, Portorose (Slovenia), 17-21 Giugno 2007.

Marzaro, G.; Urbani, L.; Guiotto, A.; Conconi, M. T.; Chilin, A., “Synthesis and evaluation of erlotinib analogues: exploiting ring closure”, *20th International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC – ISMC)*, Vienna (Austria), 31 Agosto-4 Settembre 2008.

Chilin, A.; Marzaro, G.; Dalla Via, L.; Toninello, A., “New topoisomerase inhibitors as proapoptotic agents”, *20th International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC – ISMC)*, Vienna (Austria), 31 Agosto-4 Settembre 2008.

Marzaro, G.; Urbani, L.; Guiotto, A.; Conconi, M. T.; Pastorini, G.; Chilin, A., “Synthesis and evaluation of tricyclic quinazoline derivatives as EGFR inhibitors”, *19th National Meeting on Medicinal Chemistry*, Verona, 14-18 Settembre 2008.

Marzaro, G.; Dalla Via, L.; Toninello, A.; Manzini, P.; Chilin, A., “New benzoquinazoline derivatives as antitumor agents”, *19th National Meeting on Medicinal Chemistry*, Verona, 14-18 Settembre 2008.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1 Goodman, L. S.; Wintrobe, M. M.; Dameshek, W.; Goodman, M. J.; Gilma, A.; McLennan, M. T., *J. Am. Med. Assoc.* **1946**, *105*, 475-476.
- 2 Medinger, M.; Dreves, J., *Curr. Pharm. Design*, **2005**, *11*, 1139-1149.
- 3 Lehninger, A. L. et al, *Principi di Biochimica*, ed. Zanichelli, Bologna.
- 4 Dowell, J. et al, *Nature reviews-drug discovery* **2005**, Suppl.: S14-S15.
- 5 Schlessinger, J., *Cell*, **2000**, *103*, 211-225.
- 6 Burgess, A. W., *Growth Factors*, **2008**, *26(5)*, 263-274.
- 7 Bianco, R.; Gelardi, T.; Damiano, V.; Ciardello, F.; Tortora G., *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **2007**, *39*, 1416-1431.
- 8 Herbst, R. S., *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **2004**, *59(2)*, Suppl.: 21-26.
- 9 Mazitschek, R.; Giannis, A., *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2004**, *8*, 432-442.
- 10 Abdelrahim, M. et al, *Cancer Res.*, **2007**, *67(7)*, 3286-3294.
- 11 Mendelsohn, J., *J. Clin. Oncol.*, **2002**, *20(18)*, 1s-13s.
- 12 Philip, A. P. et al, *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23(27)*, 6657-6663.
- 13 Anderson, N.G.; Ahmad, T.; Chan, K.; Donson, R.; Bundred, N.J., *Int. J. Cancer*, **2001**, *94(6)*, 774-782.
- 14 Bos, M.; Mendelsohn, J.; Kim, Y. M.; Albanell, J.; Fry, D. W.; Baselga, J., *Clin. Cancer Res.*, **1997**, *3*, 2099-2106.
- 15 Stamos, J.; Sliwkowski, M. X.; Eigenbrot, C., *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277(48)*, 46265-46272.

- 16 Assefa, H.; Kamath, S.; Boulamwini, J. K., *J. Of Computer-Aided Molecular Design*, **2003**, *17*, 475-493.
- 17 Sahtornsumetee, S.; Rich, J. N., *Drugs Today*, **2006**, *42(10)*, 657.
- 18 Hwang, K. C. et al, *PNAS*, **2008**, *105(21)*, 7467-7471.
- 19 Witt, A.; Bergman, J., *Curr. Org. Chem.*, **2003**, *7*, 1-19 and references therein.
- 20 Rewcastle, G. W. et al, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 3482.
- 21 von Niementowsky, S., *J. Prakt. Chem.*, **1895**, *51*, 564.
- 22 Johnstrom, P.; Fredriksson, A.; Thorell, J. O.; Stone-Elander, S., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, **1998**, *XLI*, 623-629.
- 23 Petrelli, A.; Giordano, S., *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 422-32.
- 24 Yildirim, M. A.; Goh, K. I.; Cusick, M. E.; Barabasi, A. L.; Vidal, M., *Nat. Biotechnol.*, **2007**, *25*, 1119-26.
- 25 Biggs, N.; Lloyd, E. and Wilson, R., *Graph Theory*, **1986**, 1736-1936. Oxford University Press.
- 26 Barabasi. A. L., *IEEE Control System Magazine*, **2007**, 33-42.
- 27 Erdos, P.; Renyi, A., *Publicationes Mathematicae*, **1959**, *6*, 290-297, 1959.
- 28 Garcia, I.; Monteanu, C. R.; Fall, Y.; Gomez, G.; Uriarte, U.; Gonzalez-Diaz, H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17(1)*, 165-175.
- 29 Yamanishi, Y.; Araki, M.; Gutteridge, A.; Honda, W.; Kanehisa, M., *Bioinformatics*, **2008**, *24*, i232-40.
- 30 Nacher, J. C.; Schwartz, J. M., *BMC Pharmacology*, **2008**, *8*, 5.
- 31 Marzaro, G.; Chilin, A.; Pastorini, G.; Guiotto, A., *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 255-256.
- 32 Troger, J., *J. Prakt. Chem. / Chem.-Ztg.*, **1887**, *36*, 225-245.
- 33 Bugle, R. C.; Osteryoung, R. A., *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 1719.

- 34 Albert, A.; Armarego, W. L. F.; Spinner, E., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 2689-2696.
- 35 Jung, J. C.; Jung, Y. J.; Park, O. S., *Synth. Comm.*, **2001**, *31*(16), 2507-2511.
- 36 Liu, G.; Yang, S.; Song, B.; Xue, W.; Hu, D.; Jin, L.; Lu, P., *Molecules*, **2006**, *11*, 272-278.
- 37 Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L., *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 1144-1157.
- 38 Schnur, R. C.; Arnold, L. D., *US P. n° 5747498*, **1998**.
- 39 Higashino, T.; Kokubo, H.; Hayashi, E., *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*(3), 950-961.
- 40 Marzaro, G.; Chilin, A.; Guiotto, A.; Uriarte, E.; Gonzalez-Diaz, H., *submitted*.
- 41 Estrada, E.; Vilar, S.; Uriarte, E.; Gutierrez, Y., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2002**, *42*, 1194-203.
- 42 StatSoft.Inc. *STATISTICA (data analysis software system), version 6.0*, www.statsoft.com. Statsoft, Inc., 6.0, **2002**.
- 43 Fawcett, T., *Pattern Recognition Letters*, **2006**, *27*, 861-874.
- 44 (a) Lindstrom, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J., *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 9225-9283; (b) Dallinger, D.; Kappe, O., *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 2563-2591.
- 45 Travis, A. S., in *The chemistry of Anilines*, ed. Z. Rappoport, Wiley & Sons, Chichester, **2007**, 715-782.
- 46 (a) Salvatore, R. N.; Yoon, C. H.; Jung, K. W., *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 7785-7811; (b) Narayanan, S.; Deshpande, K., *Appl. Cat. A*, **2000**, *199*, 1-31; (c) Olsen, C. A.; Franzyk, H.; Jaroszewski, J. W., *Synthesis*, **2005**, 2631-2653.
- 47 Hartwig, J. F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2046-2067.
- 48 Ju, Y.; Varma, R. S., *Green Chem.*, **2004**, *6*, 219-221.

- 49 Singh, C. B.; Kavala, V.; Samal, K.; Patel, B. K., *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 1369-1377.
- 50 Romera, J. L.; Cid, J. M.; Trabanco, A. A., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 8797-8800.
- 51 Foye, W., *Principles of Medicinal Chemistry*, ed. T. L. Lemke and D. A. Williams, Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, VI ed., **2007**.