



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 310075

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 D 471/10, 498/10, 453/02, 497/10,
A 61 K 31/435

Patentstyret

| | | | |
|-------------------|------------|--------------------------------------|----------------------------|
| (21) Søknadsnr | 19960225 | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | 1994.07.15. PCT/GB94/01543 |
| (22) Inng. dag | 1996.01.18 | (85) Videreføringsdag | 1996.01.18 |
| (24) Løpedag | 1994.07.15 | (30) Prioritet | 1993.07.20. US. 94855 |
| (41) Alm. tilgj. | 1996.03.12 | | |
| (45) Meddelt dato | 2001.05.14 | | |

(71) Patenthaver State of Israel, represented by the Prime Minister's Office, Israel Institute for Biological Research, P.O. Box 19, Ness-Ziona 70450, IL

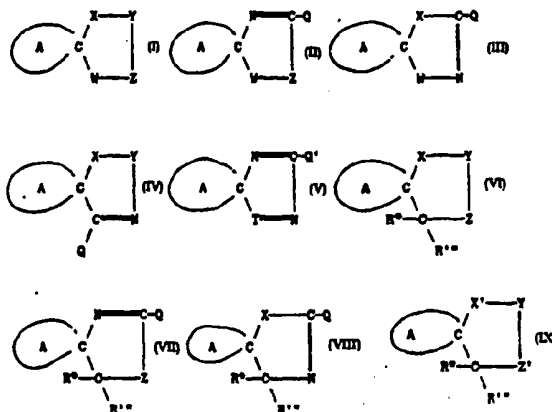
(72) Oppfinner Abraham Fisher, Holon, IL
Yishai Karton, Ness-Ziona, IL
Daniele Marciano, Ramat-Hasharon, IL
Dov Barak, Rehovot, IL
Haim Meshulam, Bat Yam, IL

(74) Fullmektig Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **AZA spiroforbindelser som virker på det cholinergiske system med muscarinisk agonistaktivitet, anvendelse av samme for fremstilling av medikament, farmasøytisk sammensetning omfattende samme samt kjemisk forbindelse til bruk som medikament**

(56) Anførte publikasjoner EP A 452101, EP A 314444, EP A 311313, EP A 205247, JP A 63/208590, JP A 02/164882, JP A 02/247183
J. Med. Chem. 30, 969 (1987)
J. Med. Chem. 31, 486 (1988)
J. Med. Chem. 35, 1541 (1992)

(57) Sammendrag Spiroforbindelser med aktivitet i sentral og perifert nervesystem, for eksempel muscarinisk agonist aktivitet, med formlene (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII og IX) og deres farmasøytiske akseptable salter, kvaternære forbindelser som er strukturelt avledet fra nevnte forbindelser med et tertiært nitrogenatom, enantiomerer og racemater, hvor ring A sammen med spiro-karbonatomet utgjør en brodannet eller ikke brodannet ring inneholdende en eller to ringnitrogenatomer, og verdien til hver av de andre symbolene i formlene er definert.



Foreliggende oppfinnelse vedrører spiro fem-leddede ringforbindelser hvor ringen som er spiro-koblet til den fem-leddede ringen som angitt heri er en mettet brodannet eller ikke brodannet ring inneholdende en eller to nitrogenatomer; farmasøytisk sammensetning som inneholder spiro-forbindelsene og en kjemisk forbindelse til bruk som terapeutikum samt anvendelse av spiro-forbindelser for fremstilling av medikament.

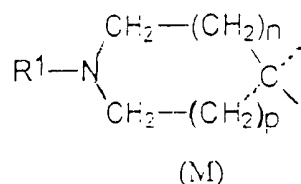
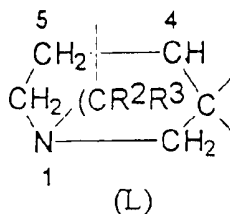
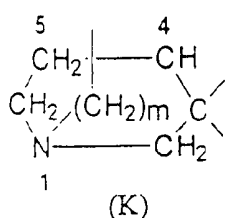
Nye spiro-quinuclidin forbindelser, hvor oksatiolanringene ble koblet ved spirometoden med quinuclidinringer, ble beskrevet for eksempel i europeisk patentsøknad nr. 0205247 A2, publisert desember 17, 1986, og i US-PS 4.855.290 (utstedt august 8, 1989), 4.981.858 (utstedt januar 1, 1991), 4.900.830 (utstedt februar 13, 1990) og 4.876.260 (utstedt oktober 24, 1989). Likeledes er noen spiro-oksazoliner blir beskrevet i US-PS 5.053.412 (utstedt oktober 5.053.412), mens noen spiro-oksazoliner og noen spiro-tiazoliner er blitt beskrevet i US-patent søknad serienr. 07/685.397. Det er å bemerke at hele innholdet av ovennevnte patenter og av U.S.S.N. 07/685.397, samt andre patenter og andre litteraturartikler som er nevnt i foreliggende oppfinnelse er innkorporert heri som referanse. De nye forbindelsene ifølge ovennevnte patenter har sentralnervesystem aktivitet. Den biologiske aktiviteten til 2-metylspiro(1,3-oksatiolan-5.3')quinuclidin, som eksisterer som geometriske cis- og trans-isomerer avhenger av om 2-metyl gruppen er beliggende på samme side av oksatiolanringen som quinuclidinring nitrogenatom (cis) eller på den andre siden av quinuclidinringnitrogenomet (trans), ble spesielt omfattende undersøkt, og det ble oppdaget på grunnlag av pre-kliniske tester at cis-forbindelsen (code no. AF102B) var spesielt lovende for kontrollering av senil demens av Alzheimers type (SDAT). Det er også av interesse at hver av cis- og trans-isomerene kan bli optisk oppløst, og den biologiske aktiviteten til optiske isomerer ble også undersøkt i et antall tilfeller.

En spesiell hensikt ifølge oppfinnelsen er å tilveiebringe nye spiro-forbindelser. Andre hensikter ifølge oppfinnelsen omfatter spesielt de som vedrører forutsetning for nyttige farmasøytiske sammensetninger og fremgangsmåte for behandling av sykdom og vil fremgå av beskrivelsen.

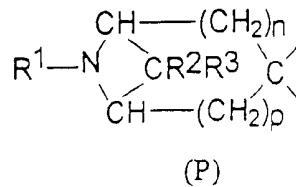
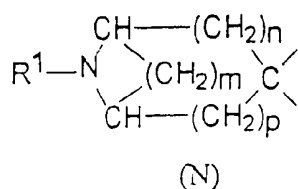
Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer spiro-forbindelse, kjennetegnet ved at den innbefatter farmasøytiske akseptable salter derav, enantiomerer og racemater derav og kvaternære forbindelser avledet derifra når nevnte forbindelse har et tertiært nitrogenatom, hvori nevnte spiro-forbindelse inneholder en 5-leddet del hvori en spiro-grense eksisterer ved et karbonatom derav og samtidig ved et karbonatom til et mettet ringsystem inneholdende et nitrogenatom, hvori nevnte 5-leddede del blir valgt fra

gruppen bestående av 3-etylhydantoin, 1-acetylhydantoin, 3-metylhydantoin, 3-propargylhydantoin, 2,4-ditiohydantoin, 2-tiohydantoin, oksazolidin-2-tion, 3-etyloksazolidin-2-one, oksazolidin-2,4-dion, 3-etyloksazolidin-2,4-dion, 2-metyl-1,4-oksazolidin-3-one, 2-metyl-1,4-tiazolidin-3-one, 2,4-dimetyl-1,4-tiazolidin-3-one, 2-etyl-1,4-tiazolidin-3-one, 2-etyl-1,4-tiazolidin-3-one, 2-metyl-3-okso-1,4-tiazolidin-1-oxid, 5-metyl-1,3-oksazolidin-4-one, N-metylsuksinimid, N-etylsuksinimid, 3-t-butylhydantoin, 3-(4-pyrrolidino-2-butynyl)-hydantoin, 3-(2-butynyl)-hydantoin, 2,5-bis(metyltio)-4H-imidazol, 3-etyl-4-tiohydantoin, 3-etyl-2,4-tiohydantoin, 4-etyltio-3-imidazolin-2-tion, 1-etyl-2-etyltio-2-imidazolin-5-tion, 2-tio-4 β -hydroksyetyliminohydantoin, 2,5-bis(aminometyl)-4H-imidazol, 2-metyl-2-tiazolin, 2-metyl-2-imidazolin, 2-metyl-2-oksazolin-4-one, 2-metyl-4H(5H)-imidazol-5(4)-one, 2-metyltio-5-metoksy-4H-imidazol, 2-metyltio-5-amino-4H-imidazol, 2-metyltio-5-aminometyl-4H-imidazol, 2-tion-3-etylhydantoin, 2-tion-3-etylhydantoin, 2-tion-3-t-butylhydantoin, 2-metyltio-2-imidazolin-5(4)-one, 1-etyl-2-etyltio-2-imidazolin-5-one og 1-etyl-2-imidazolin-5-one; og hvori nevnte mettede ringsystem inneholdende et nitrogenatom blir valgt fra gruppen bestående av delene K, L, M, N og P:

20



25



hvor i hver slik del er usubstituert eller substituert med 1-3 substituenten valgt fra C₁₋₆ alkyl og hydroksyl; hvori broen i strukturene K og L er koblet i en ende til posisjon 1 og i den andre enden til posisjon 4 eller 5; hvori m er 1, 2 eller 3, og n og p er hver uavhengig 0, 1, 2 eller 3, forutsatt at n + p = 1-3; hvori R¹ er hydrogen, C₁₋₆-alkyl, C₂₋₆-alkenyl, C₂₋₆-alkynyl, C₃₋₇-cykloalkyl, C₁₋₆ alkyl substituert med 1-6 halogenatomer, hydroksy-C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-alkoksy, C₁₋₆-alkyltio, C₁₋₆-alkyl, karboksy-C₁₋₆-alkyl, (C₁₋₆-alkoksy)karbonyl-C₁₋₆-alkyl, amino-C₁₋₆-alkyl, mono-(C₁₋₆-alkyl)amino-C₁₋₆-alkyl, di-C₁₋₆-alkyl, 2-okso-pyrrolidin-1-yl-metyl, aryl, diarylmetylol, C₁₋₆-alkyl substituert med 1 eller 2 arylgrupper, C₁₋₆-alkanoyl eller arylkarbonyl; hvori aryl er fenyl eller fenyl substituert med 1-3 substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen, C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-alkoksy og CF₃; og hvori R² og R³ er uavhengig C₁₋₄ alkyl; i det når nevnte mettede ringsystem er M, er n 1, p er 1 og R¹ er hydrogen eller metyl, i det nevnte 5-leddede del ikke er 3-etylhydantoin, 1-acetylhydantoin, 3-metylhydantoin, 3-propargylhydantoin, 2,4-ditiohydantoin, 2-tiohydantoin, oksazolidin-2-tion, 3-etyloksazolidin-2-one, 3-etyl-4-tiohydantoin, 4-metyltioimidazolin-2-tion, 3-etyl-2,4-ditiohydantoin, 4-etyltio-3-imidazolidin-2-tion, 1-etyl-2-etyltio-2-imidazolin-5-tion, 2-tio-4β-hydroksyetyliminohydantoin, 2-metyl-2-tiazolin, 2-metyl-2-imidazolin, 2-metyl-2-oksazolin-4-one.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av spiro-forbindelsen ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for behandling av sykdommer assosiert med cholinergisk hypofunksjon valgt fra gruppen bestående av senil demens av Alzheimers type, Alzheimers sykdom, Lewy Body demens, multiinfarkt demens (MID), slag ischemi, MID kombinert med MID (slag/ischemi/hodeskade), kombinert MID og Alzheimers sykdom, human hodeskade, alders-assosiert hukommelsessvikt, akutt konfusjonsforstyrrelser, halusinatoriske-paranoide tilstander, emosjonelle og "attention" forstyrrelser, manier, tardiv dyskinesi, blandet Alzheimers og Parkinsons sykdom, afasi, postencephalitisk amnesisk syndrom, alkoholfjerningssymptomer, Huntingtons chorea, Picks sykdom, Friedrichs ataksi, Gilles de la Tourette sykdom og Downs syndrom, til et pattedyr som trenger slik behandling.

Foreliggende oppfinnelse omfatter i tillegg en farmasøytisk sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter minst en spiro-forbindelse ifølge oppfinnelsen, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav og et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel, en bærer eller en adjuvant.

Oppfinnelsen angår også en kjemisk forbindelse til bruk som terapeutikum, kjennetegnet ved at den består av en forbindelse ifølge oppfinnelsen.

Eksempler på forbindelser ifølge oppfinnelsen er: 1-metyl-piperidin-4-spiro-5'-(3'-etylhydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(1'-acetylhydantoin); piperidin-4-spiro-5'-(3'-etylhydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-metylhydantoin); piperidin-4-spiro-5'-(3'-metylhydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-propargylhydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2',5'-bis(metyltio)-4'H-imidazol): 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-4'-tiohydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(4'-metyltio-3'-imidazolin-2'-tion); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-2',4'-dithiohydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(4'-etyltio-3'-imidazolin-2'-tion); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-etyltio-2'-imidazolin-5'-tion); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tiohydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tio-4'-β-hydroksyetyliminohydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(oksazolin-2'-tion); N-metylnortropan-3-spiro-5'-(3'-metylhydantoin); N-metylnortropan-3-spiro-5'-(3'-etylhydantoin); 1-metyl-piperidin-4-spiro-5'-(3'-etyloksolidin-2'-one); 1-metyl-piperidin-4-spiro-4'-(3'-etyloksazolidon-2'-one); 2-N-metyl-spiro-(1,3-succinimid 4,3')quinuclidin; 2-N-etylspiro-(1,3-succinimid 4,3')quinuclidin; 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(oksazolidin-2',4'-dion); 1-metyl-piperidin-4-spiro-5'-(3'-etyloksazolidin-2',4'-dion); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyl-2'-tiazolin); N-metylnortropan-3-spiro-5'-hydantoin; 1-metyl-piperidin-4-spiro-4'(5')-(2'metyl-2'-imidazolin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2'-oksazolin-4'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'(5')-[2'-metyl-4'H(5'H)-imidazol-5'(4')-one]; 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyltio-5'-metoksy-4'H-imidazol); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyltio-5'-amino-4'H-imidazol); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyltio-5'-aminometyl-4'H-imidazol); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-[2',5'-bis(aminometyl)-4'H-imidazol]; & 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tion-3'-etylhydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tion-3'-t-butylhydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-t-butylhydantoin); 1-propargylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etylhydantoin); 1-metyl-piperidin-4-spiro-5'-[3'-(4-pyrrolidino-2-butynyl)hydantoin]; 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-[3'-(2-butynyl)-hydantoin]; piperidin-4-spiro-5'-(3'-propargylhydantoin); 2-metyl-1,4-tioazolidin-3-one-spiro[5.3']-quinuclidin; 1-metylpiperidin-4-spiro-4'(5')-(2'-metyltio-2'-imidazolin-5'(4')-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-etyltio-2'-imidazolin-5'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-imidazolin-5'-one).

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en farmasøytisk sammensetning for anvendelse ved behandling av sykdommer i sentral og perifert nervesystem i pattedyr, som omfatter en mengde som er effektiv for anvendelse ved behandling av nevnte

sykdommer, av minst en forbindelse ifølge oppfinnelsen, inkludert deres farmasøytiske akseptable salter, enantiomerer og racemater, sammen med minst et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel, bærer eller adjuvant. En slik sammensetning er fortrinnsvis i en form egnet for oral, rektal, parenteral eller transdermal administrering (i dette tilfellet kan sammensetningen omfatte i tillegg en fettsyre med lav molekylvekt), eller for administrering ved innblåsning eller nasalspray, og kan være i enhetsdoseringsform. Den minst ene forbindelsen ifølge oppfinnelsen, som definert ovenfor, kan være tilstede i enhetsdosering i en mengde i området på for eksempel omtrent 0,5 til omtrent 100 mg, fortrinnsvis omtrent 5 til omtrent 100 mg, mere foretrukket omtrent 10 til omtrent 50 mg.

Ifølge en spesiell utførelsesform ifølge oppfinnelsen kan den farmasøytiske sammensetningen beskrevet i foregående avsnitt omfatte i tillegg minst en ytterligere farmakologisk aktiv forbindelse valgt fra fysostigmin, tetrahydroaminoakridin, cholin, lecithin, pireacetam, aniracetam, pramiracetam, oksiracetam, 4-aminopyridin, 3,4-diaminopyridin, somatostatin, pirenzepin, N-metylatropin, N-butylscopolamin, scopolamin, clonidin, quanfamicin, propanthelin, metanthelin, glykopyrrolat, tropenzilium, nortriptylin, amitriptylin, imipramin, minaprin, sekoverin, AFDX-116, nikotin, alaprocleat, simelidin, deprenyl og nervevekstfaktor.

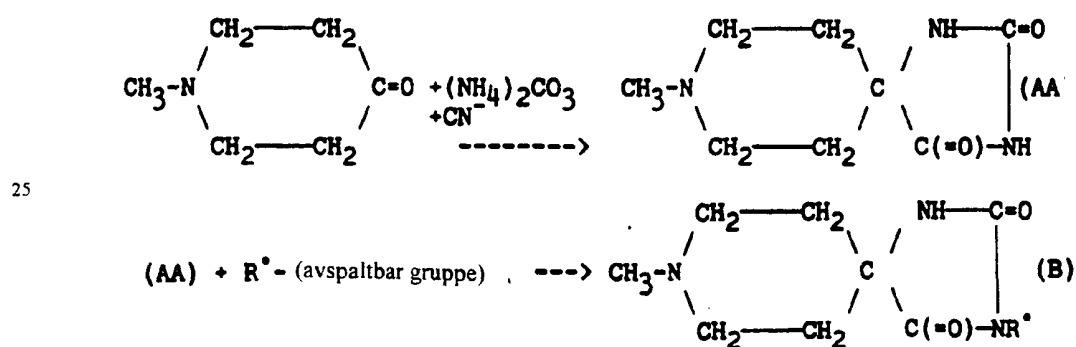
Sykdommer i sentral eller perifer nervesystem i pattedyr kan bli behandlet ved en metode som omfatter administrering dertil av en mengde effektiv for anvendelse ved behandling av nevnte sykdommer, av minst en forbindelse ifølge oppfinnelsen, inkludert deres farmasøytiske akseptable salter, enantiomerer, tautomerer og racemater. Slike forbindelser kan selvfølgelig bli anvendt for dette formålet i form av en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen, som definert ovenfor.

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en farmasøytisk sammensetning som omfatter minst en forbindelse ifølge oppfinnelsen, og i tillegg nervevekstfaktor (NGF), forbindelsen (ene) ifølge oppfinnelsen er tilstede i en mengde som fremmer nervevekstaktiviteten til NGF. De fleste forbindelsene, til forskjell fra visse kjente forbindelser som har sentral eller perifer nervesystemaktivitet, fremmer ikke i seg selv nervevekstaktiviteten i fravær av NGF, muliggjør følgelig bedre kontroll når det er ønskelig med fremming av nervevekst i terapi. Noen av de mest aktive forbindelsene fremmer nervevekstaktivitet uavhengig av NGF. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen som vanligvis har aktivitet valgt fra muscarinisk agonistaktivitet, amyloid forløperprotein (APP) utskillende aktivitet og β -amyloid reduserende aktivitet, og aktivitet som øker

proporsjonen av defosforylerte τ proteiner. Tester utført for å bekrefte den biologiske aktiviteten til foreliggende forbindelser er angitt nedenfor.

- Slike forbindelser ifølge oppfinnelsen kan følgelig bli anvendt for behandling av sykdommer i pattedyr, diagnostisert å være mottagelig for behandling med en effektiv mengde (i sammenheng med ovennevnte aktiviteter a-e) av forbindelsen (ene), og kan bli anvendt i form av farmasøytiske sammensetninger omfattende en effektiv mengde av slike forbindelser, men er ellers som beskrevet ovenfor.
- 10 Fremgangsmåter anvendt for fremstilling av foreliggende forbindelser er generelt de som er kjente for organiske kjemikere for dannelse av 5-leddede ringer, ring-substitusjon, forandring av grad av ringmetning/ikke metning, innbyrdes omdannelse av salter og baser, kvaternær saltdannelse osv. I det det er gitt eksempler på fremgangsmåte for fremstilling av visse forbindelser ifølge oppfinnelsen kan også andre fremgangsmåter bli anvendt for fremstilling derav.

- Når ønsket 5-leddet ring er et hydantoin kan denne ringen for eksempel bli dannet ved omsetning av tilsvarende mettet N-heterocyklisk keton (for eksempel 1-metylpiperidin-4-one) med $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + \text{CN}^-$, og 3'-N atomet kan deretter bli substituert på kjent måte.
- 20 Disse reaksjonene kan følgelig bli illustrert slik:



- 30 for eksempel, AF160, $\text{R}^0=\text{Et}$; AF178, $\text{R}^0=\text{Me}$; AF185, $\text{R}^0=\text{propargyl}$; AF167, $\text{R}^0=\text{Me}$, analog*; og AF168, $\text{R}^0=\text{Et}$, analog* (* hvor N-metylpiperidindelen inneholder en 2,6-etylenbro, dvs. N-metylnortropan analog).

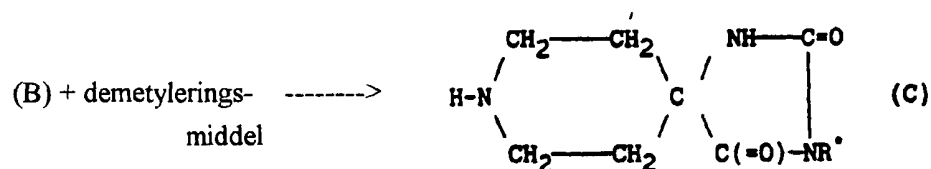
- Avspaltbar gruppe i " R^0 -(avspaltbar gruppe)" kan for eksempel være bromid, klorid eller p-toluensulfonat og R^0 er som definert heri, unntatt H, alkoksy og alkanoyl. Denne substitusjonsreaksjonen kan bli utført under vesentlig kjente betingelser, for eksempel ved omsetning av 3'-usubstituert hydantoin i nærvær av en alkali så som KOH og
- 35

anvendelse av et oppløsningsmiddel så som etanol. Tilsvarende 1',3'-disubstituert forbindelse kan bli oppnådd i ovennevnte reaksjon ved anvendelse av overskudd "R^O- (avspaltbar gruppe)" reagens, eller ved omsetning av forbindelse (B) med "R^O- (avspaltbar gruppe)".

5

1-metylgruppen i struktur (B) kan bli fjernet ved omsetning med et demetyleringsmiddel så som CH₃CH(C1)OCOCl:

10

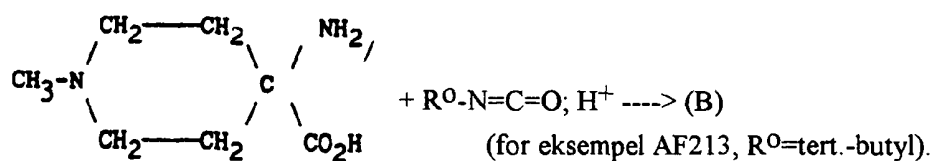


15

for eksempel AF160(Des), R^O=Et; AF179, R^O=Me.

20 Struktur (B) kan også bli dannet for eksempel som følger:

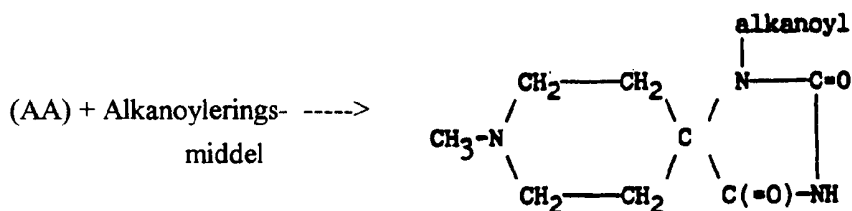
25



30 Substituering av R^O-N=C=S i den analoge reaksjonen tilveiebringer (B)-3-tion, for eksempel AF181 (R=Et), AF184 (R=tert.-butyl).

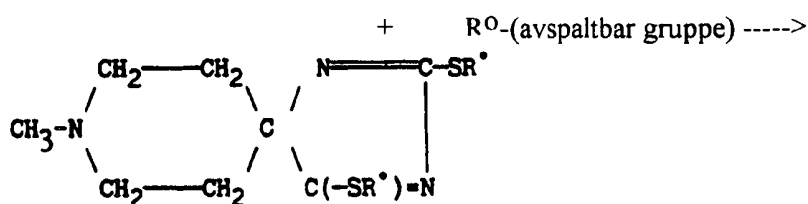
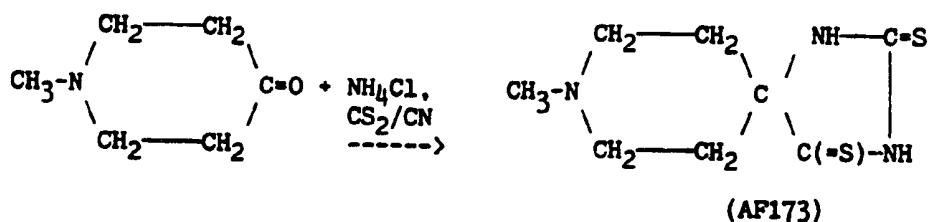
Omsetning av forbindelse (AA) med et alkanoylhalid eller et alkanoisik anhydrid under standardalkanoyleringsbetingelser tilveiebringer substitusjon i 1'-posisjonen, følgelig:

35



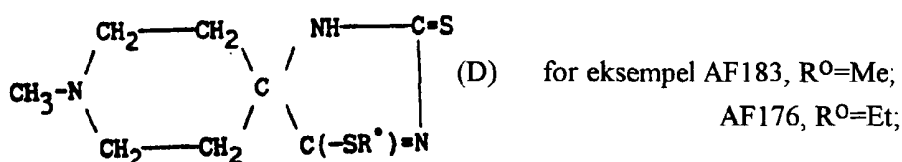
10 for eksempel AF 164, alkanoyl-acetyl

15 Når ønsket fem-leddet ring er et dithiohydantoin, kan slike forbindelser for eksempel bli dannet ved dannelse av denne ringen ved omsetning av tilsvarende mettet N-heterocyklisk keton med CN^- , NH_4Cl og CS_2 . Når hydantoinene substituerer (for eksempel ved alkylering) på N-atomene gir tiohydantoinene N- og/eller S-substituerte produkter. Eksemplene (nedenfor) illustrerer reaksjonsbetingelsene som for de forskjellige produktene, eller blandinger av produkter som kan bli separert. Disse reaksjonene kan bli illustrert som følger, hvor N-heterocyklisk keton eksemplvis er

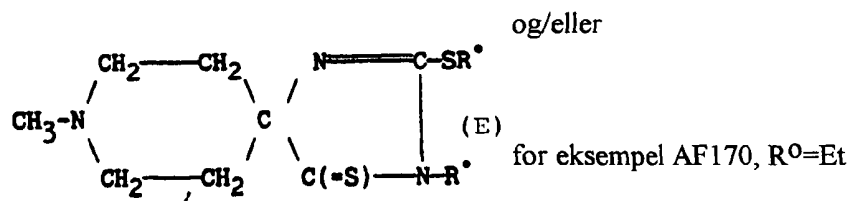


30 for eksempel AF177, $\text{R}^{\text{O}}=\text{Me}$

35 og/eller



5

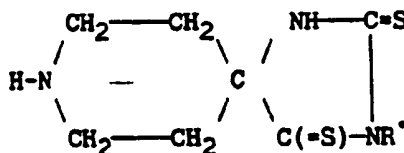


10

Avspaltbar gruppe og verdien til R⁰ i "R⁰-(avspaltbar gruppe)" kan være som beskrevet ovenfor for hydantoiner. Substitusjonsreaksjonene kan bli utført under vesentlig kjente betingelser.

- 15 Dithiohydantoiner kan generelt også bli oppnådd ved omsetning av tilsvarende hydantoiner med P₂S₅, for eksempel følgende:

- 20 (B) + fosfor ---->
(AF160) pentasulfid

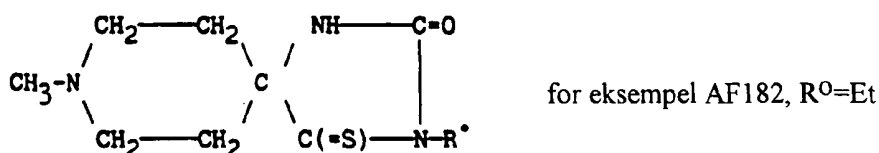


for eksempel AF163, R⁰=Et

25

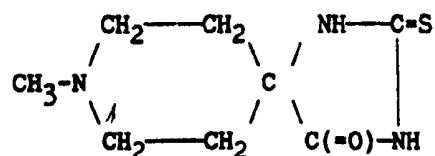
Når forbindelse (E) ble omsatt med 20% HCl blir S-R⁰ hydrolysert for å tilveiebringe følgende forbindelse:

30



35

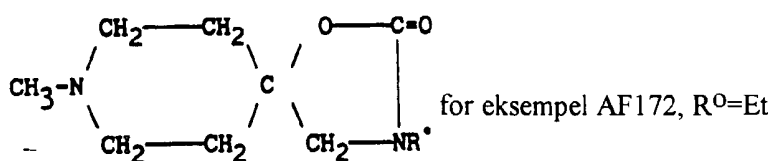
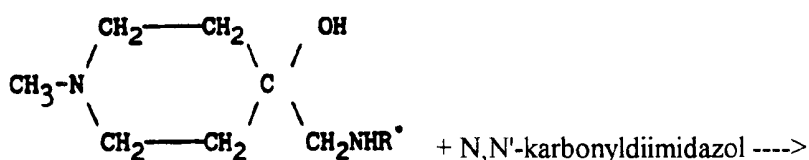
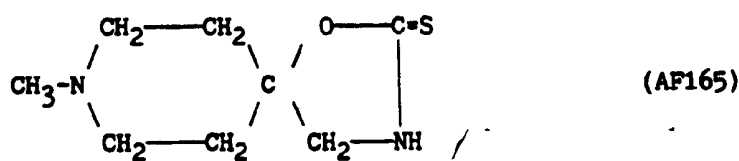
Lignende omsetning av forbindelse (D) med 20% HCl tilveiebringer en forbindelse med følgende struktur (se for eksempel eksempel 12):

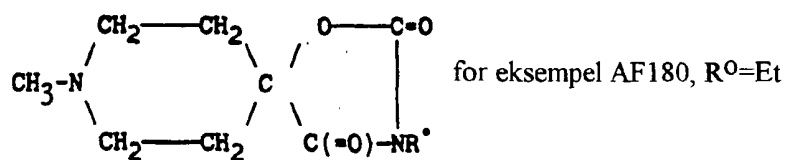
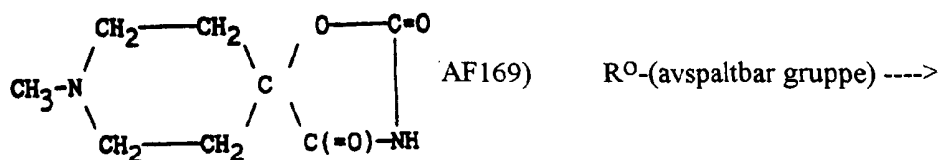
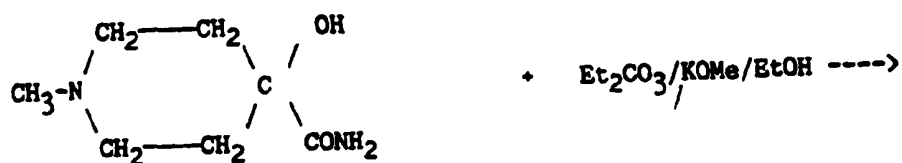
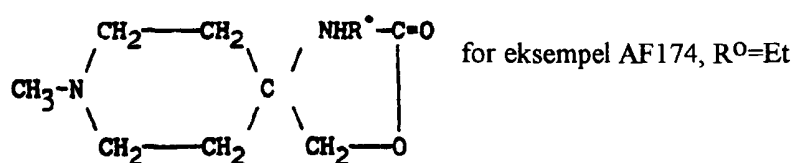
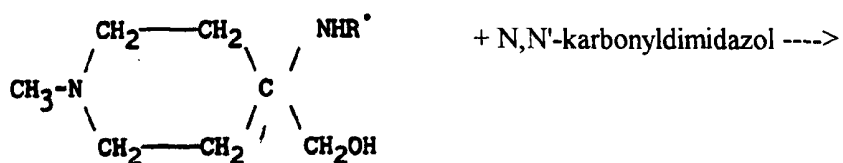


Denne forbindelsen blir også dannet ved hydrolysering av analogen inneholdende $=NR^O$ i stedenfor $O=$; $=NR^O$ analogen kan bli fremstilt ved omsetning av forbindelse AF173 med R^ONH_2 (se for eksempel eksempel 13, hvor $R^O = \beta$ -hydroksyetyl).

10

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen som er okso- eller tiono-substituerte oksazolidiner kan for eksempel bli fremstilt som følger:

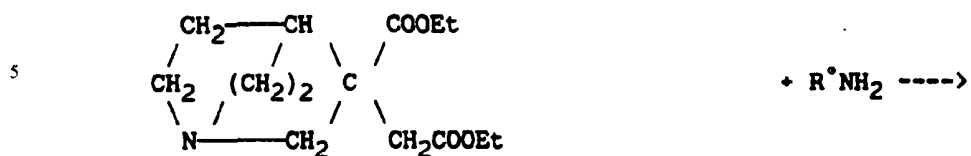




Avspaltbar gruppe i "R⁰-(avspaltbar gruppe)" kan være som beskrevet ovenfor for hydantoiner, som verdien til R⁰. Substitusjonsreaksjonen kan bli utført under vesentlig kjente betingelser.

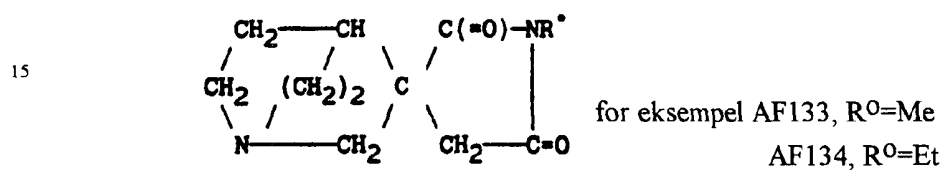
35

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen hvor fem-leddet ring er et succinimid kan for eksempel bli fremstilt som følger:



3-karboksy-3-karboetyoksymetylquinuclidin

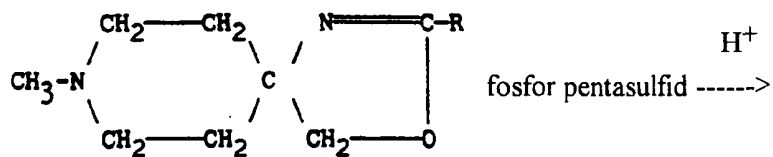
10



20

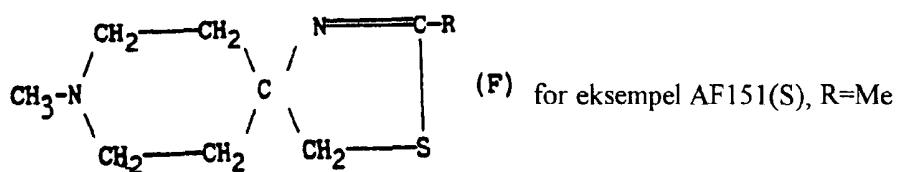
Tiazoliner ifølge oppfinnelsen kan bli fremstilt for eksempel slik:

25

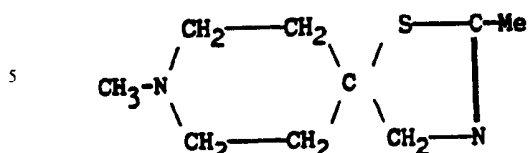


30

35



Det kan nevnes at forbindelsen:

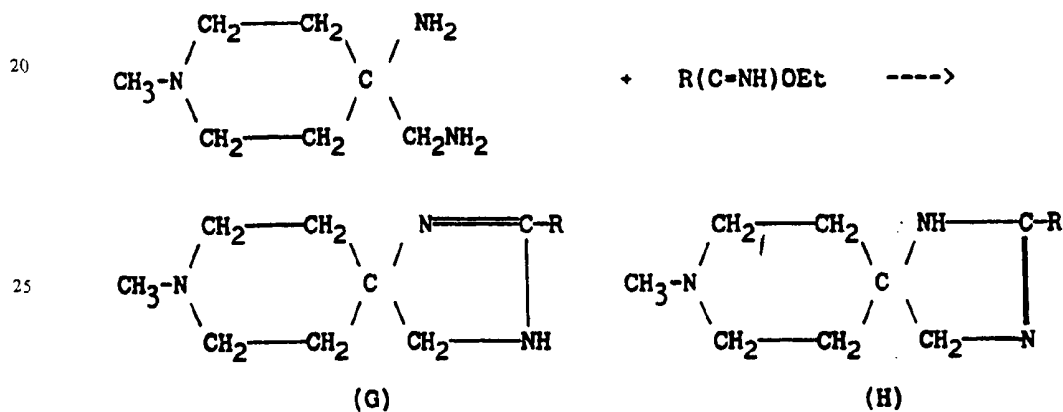


betegnet AF150(S) er blitt beskrevet
i vår U.S.S.N. 07/685.397, mens for-

bindelsene med formel (F) ikke ble spesifikt eksemplifisert i denne US-patentsøknaden.

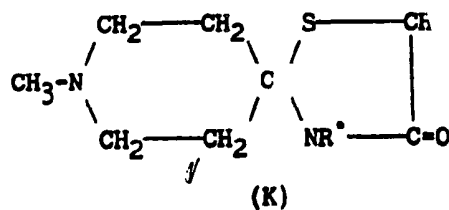
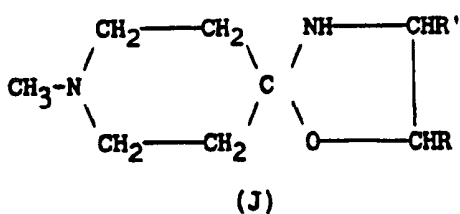
Det er nå overraskende blitt oppdaget at forbindelsene med formel (F) som
10 eksemplifisert ved forbindelse AF151(S) overraskende er mye mere lovende ut fra et
farmakologisk aktivitetstandpunkt enn klassen av forbindelser eksemplifisert ved
AF150(S).

15 Imidazolinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan for eksempel bli fremstilt ifølge
følgende skjema:



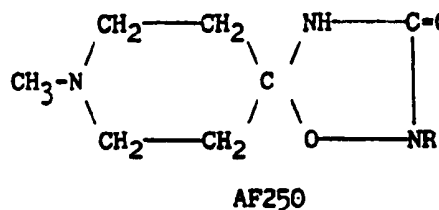
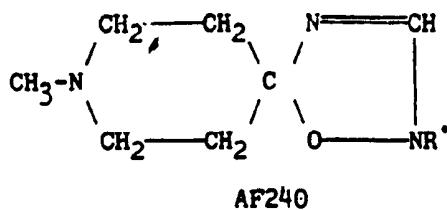
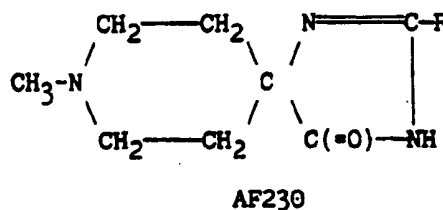
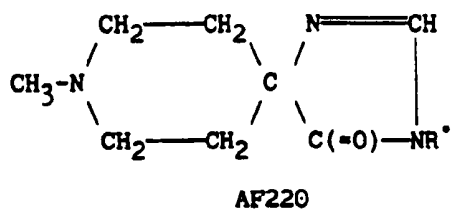
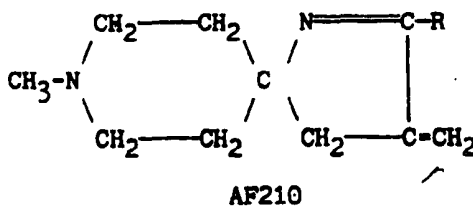
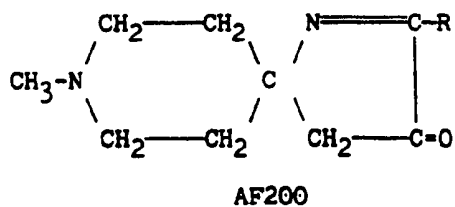
I dette tilfellet kan produktet, for eksempel AF190, R=Me eksistere som en tautomerisk
blanding av strukturene (G) og (H).

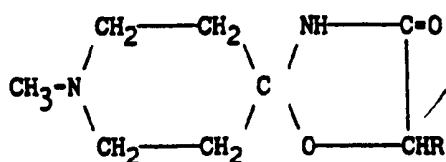
Oksazolidiner og tiazolidiner ifølge oppfinnelsen så som strukturene (J) (så som AF264, R=Me, R'=H; AF268. R=H, R'=Et) og (K) (så som AF261, R=Me, R⁰=H; AF267, R=Et, R⁰=H; AF266, R=R⁰=Me) kan for eksempel bli fremstilt som beskrevet nedenfor.



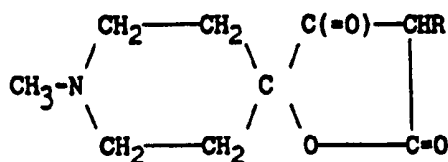
Forbindelsene (J) og (K) blir fremstilt når N-metylpiperidon blir omsatt med HOCHRCHR'NH₂, eller med (HSCHRCO₂H + R⁰NH₂).

- 15 Følgende forbindelser hvor R og R⁰ er som definert heri, men som hver fortrinnsvis er for eksempel Me eller Et utgjør også foretrukne forbindelser ifølge oppfinnelsen.

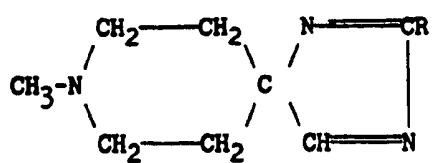




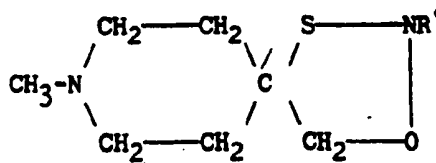
AF260



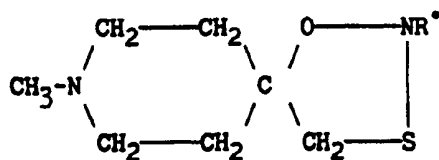
AF270



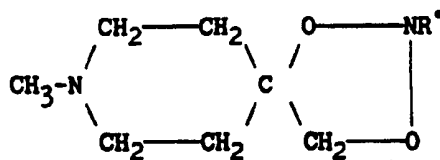
AF280



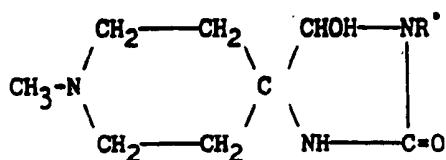
AF290



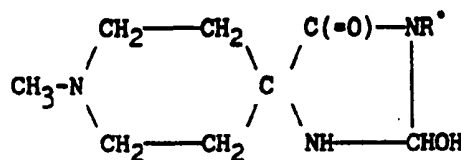
AF300



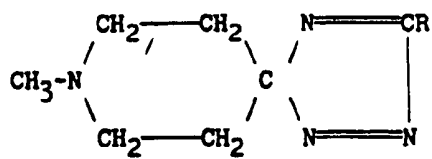
AF310



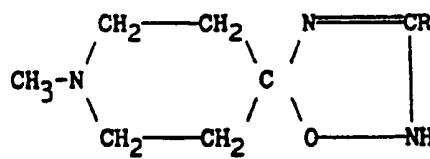
AF320



AF330



AF390



AF370

30 Det er å bemerke at illustrerende forbindelser ifølge oppfinnelsen har vist piperidin, nortropin og quinuclidinringer, men en hvilken som helst nitrogenheterocyklisk ring som definert heri er egnet for spirofigurasjon og angitte spiro fem-leddet ring kan bli erstattet dermed. En lignende anmerkning gjelder for utførelseseksemplene som illustrerer oppfinnelsen.

35

Spiro-forbindelsene ifølge oppfinnelsen er generelt potensielt nyttige for behandling av presenil og senil demens, senil demens av Alzheimers type (SDAT), atypisk Alzheimers

sykdom (Perry et al, *Advances i Neurology*, eds. R.J. Wurtman et al., 51:41, 1990), kombinert multiinfarkt demens og Alzheimers sykdom, alders-assosiert hukommelsesforstyrrelser (AAMI), akutt fusjonsforstyrrelser, emosjonelle og oppmerksomhetsforstyrrelser, mani, tardiv-dyskinesi, hyperkinesi, blandede Alzheimers og Parkinsons sykdom, afasi, hallusinatoriske paranoide tilstander, post encefalitisk amnesisk syndrom, alkoholfjerningssymptomer, Huntingtons chorea, Pick's sykdom, Friedrick's ataxi, Gilles de la Tourette sykdom og Down syndrom, på grunn av at alle disse sykdomstilstandene er forstyrrelser hvor en sentral cholinergisk hypofunksjon er blitt implisert i det minste til en viss grad. Foreliggende forbindelser er videre potensielt nyttige for behandling av progressiv supranukleær palsy og det er også potensielle analgesiske midler og kan følgelig være nyttige for behandling av alvorlige smertetilstander så som revmatisme, artritt og terminal sykdom.

Som angitt ovenfor kan spiro-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse bli anvendt i kombinasjon med minst en ytterligere farmakologisk aktiv forbindelse, for eksempel, acetylcholinesterase inhibitorer så som fysostigmin eller tetrahydroaminoakridin; i kombinasjon med acetylcholinforløpere så som cholin eller lecitin; i tillegg til "nootropiske" medikamenter så som piracetam, aniracetam, oksiracetam eller pramiracetam; i tillegg til forbindelser som reagerer med CA_{2+} kanaler så som 4-aminopyridin eller 3,4-diaminopyridin; eller i tillegg til peptider som kan ha modulerende virkninger på acetylcholin frigjøringen, så som somatostatin; i kombinasjon med et perifert antimuscarinisk middel (så som piperizin, N-metylatropin, N-butylscopolamin, propanthelin, metanthelin, glykopyrrolat eller tropenzilium) for å motvirke perifere negative virkninger som kan være ventet ved høye doser, så som spyttavsondring, diarrè, gastrisk sekresjon eller oppkast, eller kombinasjon med transdermal skopolamin så som Scopoderm(R) for å motvirke kvalme og/eller oppkast; i kombinasjon med antidepressive midler så som nortriptylin, amitriptylin, imipramin, minaprin for å lindre både kognitive forstyrrelser og depressive symptomer assosiert med SDAT, AAMI, blandet med SDAT/Parkinsons sykdom (PD); i kombinasjon med M2-antimuscariniske medikamenter så som secoverin, AFDX-116 (cf. Hammer et al. 1986 *Life Sci.* 38:1653) for å motvirke perifere negative bivirkninger som kan ventes ved høye doser av forbindelsene, for å motvirke inhibitoriske virkninger av slike agonister ved sentralinhibitoriske presynaptiske og postsynaptiske reseptorer av M2 type og for å potensierte frigjøring av acetylcholin via inhibisjon av inhibitoriske autoreseptorer av M2 type ved intakte terminaler; i kombinasjon med nikotiniske antagonistere så som nikotin for stimulere både nikotiniske og muscariniske resptorer i hjernen; i kombinasjon med en adrenergisk agonist (klodin eller quanfamicin) for å lindre både kognitive og andre forstyrrelser assosiert med en

blandet cholinergisk-noradrenergisk svikt i SDAT; i kombinasjon med inhibitorer av neuronal serotonin gjenopptak så som alaproklat, zimelidin for å lindre både kognitive og andre emosjonelle funksjoner i SDAT; i kombinasjon med monoamin oksydase-B inhibitorer som deprenyl for å lindre både kognitive og andre motorforstyrrelser assosiert med blandede tilstander så som SDAT/PD; i kombinasjon med nerve vekstfaktor (NGF, 5 som blir administrert enten ved en nasalspray eller intracerebroventrikulært).

Spiro-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse, med eller uten ovennevnte ytterligere aktive forbindelser, kan for eksempel bli administrert ved injeksjon i et egnet 10 fortynningsmiddel eller en bærer, per os, rektalt i form av suppositorier, innblåsing eller nasalspray, ved infusjon eller transdermalt i en egnet bærer med eller uten fysostigmin eller tetrahydroaminoacridin.

Foreliggende spiro-forbindelser kan også være potensielt nyttige for behandling av 15 forstyrrelser som krever applikasjon av et lenge-virkende cholinergisk middel med svak lokal aktivitet. Et slikt middel er nødvendig i forstyrrelser så som glaukoma, i det forbindelsene ikke blir ødelagt av enzymet som deaktiverer acetylcholin, dvs. acetyl- og butyryl-cholin esterase, og kan også bli anvendt for behandling av perifere cholinergiske forstyrrelser så som myasthenia gravis, urinblære feilfunksjoner, Adis sykdom og Eaton- 20 Lambert sykdom. Disse forbindelsene kan også bli anvendt i forstyrrelser hvor cholinergisk underaktivitet blir indusert av medikamentene.

Hvor foreliggende spiro-forbindelser er anticholinergiske midler (som kan bli bestemt av fagfolk) kan de potensielt bli anvendt for behandling av forstyrrelser på grunn av en 25 cholinergisk hyperfunksjon, enten om dette blir spontant eller medikament-indusert. Foreliggende forbindelse kan bli anvendt for behandling av forskjellige sykdommer så som PS, pseudo-PD, blandet AD/PD, primær dystonias, spasmodisk torticollis, cranial dystonia, depresjon, bevegelsesykdom, akathisia (etter neuroleptisk fjerning), sentral hypertensjon, human hodeskade, blandet tardiv dyskinesia og PD, manisk depresjon, som 30 hjelpemidler i kirurgi i stedet for atropin, scopolamin osv. Ved kvelning på grunn av overskudd acetylcholin som inhibisjon av acetylcholin esterase. Disse kan også bli anvendt i oftalmologi når enten forlenget eller kort-tids mydriasis er nødvendig.

Foreliggende spiro-forbindelser kan også bli anvendt for behandling av sykdom 35 kjennetegnet ved overskudd av perifer-lignende aktivitet så som astma, kronisk obstruktiv lungesykdom, peptisk sår sykdom. For disse perfiere forstyrrelsene er det spesielt anbefalt å anvende kvaternære salter ifølge foreliggende forbindelser.

Kvaternære ammoniumsalter blir anvendt i terapi i dag. Eksempler på slike cholinergiske agonister er acetylcholin klorid, betanechol klorid og karebaxol (se for eksempel Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Seventh Edition, Macmillan Publishing Co., 1985, side 104). Kvaternære anticholinesterasemidler er for eksempel neostigminbromid, ambenoniumklorid, pyridostigmin bromid, edrofonium klorid, demecarium bromid og ehotifat iodid; pralidoksimklorid blir anvendt som en cholinesterease reaktivator (se Goodman & Gilman, loc cit, sidene 122-123).

Kvaternære derivater av belladonna alkaloider, for eksempel methscopolaminbromid og homatropinbromid og syntetiske kvaternære forbindelser, for eksempel metanthelinbromid og propanthelinbromid blir anvendt for behandling av mave-tarm forstyrrelser (se Goodman & Gilman, loc cit, sidene 139-140).

I "Medicinal Chemistry" av Alfred Burger, Second Edition, Interscience Publishers, 1960, s. 497, er det nevnt en antagelse om at kvaternære ammoniumioner, uansett kjemisk struktur, produserer curareform paralysis (og senere korroborasjon av denne antagelsen. Denne egenskapen til de kvaternære forbindelsene blir anvendt i anestesi, for eksempel som en adjuvant i kirurgisk anestesi for å oppnå avslapning av skjelettmuskelen (se Goodman & Gilman, loc cit), i kapittel 11 under tittelen "Neuromuscular Blocking Agents", sidene 222-235).

Denne neuromuskulære blokkeringsaktiviteten til kvaternære forbindelser, som diskutert ovenfor, har ikke forhindret utvikling og klinisk applikasjon av kvaternære forbindelser i terapeutiske midler de senere årene. Fagfolk bør være oppmerksom på at mange faktorer innvirker på valget av en hvilken som helst forbindelse (inkludert en kvaternær forbindelse) for anvendelse i klinisk terapi, for eksempel effektiviteten for antatt formål, trygghet, mulige bivirkninger og terapeutisk indeks. Fagfolk vil vite hvordan uttrykket "farmasøytiske akseptable kvaternære forbindelser" som blir strukturelt avledet fra forbindelsene ifølge oppfinnelsen med et tertiært nitrogenatom skal forstås i det dette uttrykket blir anvendt i foreliggende beskrivelse og krav, i lys av relevant kunnskap tilgjengelig innenfor fagområdet.

Oppfinnelsen vil nå bli illustrert med følgende ikke-begrensede eksempler.

Eksempel 1: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etylhydantoin) AF160

a) 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin

En blanding av oppløsninger av 1-metylpiperidin-4-one (36.44 g, 0.322 mol) i etanol (150 ml), ammoniumkarbonat (93.0 g, 0.968 mol) i vann (400 ml) og kaliumcyanid (25.8 g, 0.396 mol) i vann (82 ml) ble oppvarmet ved 60°C i 2.5 timer, og deretter latt stå ved romtemperatur over natt. Presipitert 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin ble filtrert ut og vasket med små mengder kaldt vann, etanol og eter for å tilveiebringe et krystallinsk pulver (27.0 g). Konsentrasjonen av filtratet og vaskingene ga en annen avling (20.0 g). Produktet ble krystallisert fra metanol, smp. 265-276 (dek.).

10 IR (KBr) 3170 (NH); 1700 (C=O) cm^{-1} .

Massespektrum m/e 183(M^+ , 38%); 71 (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) 1.8 (2H); 2.06 (seksstett, 2H); 2.49 (s, - CH_3); 2.58 (t, 2H); 3.14 (t, 1H); 3.20 (t, 1H) ppm.

15 b) 4-amino-1-metylpiperidin-4-karboksylysyre

1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin (9.75 g, 0.0533 mol) og bariumhydroksidoktahydrat (28.8g, 0.0913 mol) i vann (150 ml) ble oppvarmet ved 160°C i en bombe i 3 timer. Innholdet av fire slike batcher ble kombinert og presipitert bariumkarbonat ble filtrert ut. Filtratet ble nøytralisert med fast CO_2 og presipitatet fjernet ved filtrering. Konsentrering av filtratet ga 4-amino-1-metyl-piperidin-4-karboksylysyre (32.0 g, 95%), smp. 275-280°C (dek.).

20 IR (KBr) 3300, 1655, 1580 cm^{-1} .

Massespektrum m/e 158 (M^+ , 90%); 141 (98%, M-OH), 113 (12%, M- CO_2H); 96 (100%); 71 (52%).

25 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}+\text{D}_2\text{O}$) 1.2 (m, 2H); 1.48 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 1.7 (m, 2H); 1.9 (m, 2H); 2.0 (m, 2H) ppm.

c) 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etylhydantoin), AF160

Til en blanding av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin (5 g, 27 mmol) og kaliumhydroksid (2.08 g, 37 mmol) i 100 ml ble absolutt etanoletylbromid (15 g, 137 mmol) tilsatt. Blandingen ble oppvarmet ved 80°C og prøvene ble tatt i 0,5 timer intervaller og undersøkt ved GLC i forhold til indre standard (difenylmetan). Basisiteten ble registrert ved titrering (HCl 1N) etterfulgt av tilsetning av kaliumhydroksid (totalt 2.1 g). Etter oppnåelse av maksimalt utbytte (2.5 t) ble oppløsningen avdampet, vann (50 ml) ble tilsatt og den vandige oppløsningen ble ekstrahert fra kloroform og kromatografert på silikagel kolonne ved anvendelse av kloroform/metanol/vandig ammoniak (80:20:1)

som et elueringssystem. Produktet ble løst opp i eter og presipitert som et saltsyresalt ved tilsetning av HCl i isopropanol smp. 278-280°C.

Massespektrum m/e 211(M⁺, 45%); 71 (100%).

¹H-NMR (fri base, CDCl₃) 1.2(t, J=6Hz, 3H); 1.6-1.7(m, 2H); 1.9-1.95(m, 2H); 2.1-2.2(m, 2H); 2.34(s, 3H); 2.85-2.95(m, 2H); 3.5(q, J=6Hz, 2H);

¹H-NMR (HCl salt, D₂O) 1.1(t, J=6Hz, 3H); 1.95-2.05(m, 2H); 2.2-2.3(m, 2H); 2.85(s, 3H); 3.0-3.2(m, 2H); 3.4-3.5(m, 2H); 3.5(q, J=6Hz, 2H) ppm.

¹³C-NMR (fri base, CDCl₃) 14.0; 33.0; 33.1; 46.0; 52.8; 59.9; 157.0; 177.0 ppm.

UV (fri base, H₂O) lambda_{max} 208nm (ε 3500).

10

Eksempel 2: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(1'-acetylhydantoin)AF164

a) AF164A. En blanding av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin (3.25 g) i eddiksyreanhydrid (50 ml) ble oppvarmet under tilbakeløp i 3 timer. Overskudd reagens ble fjernet ved redusert trykk og ga et fast stoff ble dispergert i eter og filtrert for å tilveiebringe et hvitt fast stoff (3.75 g) krystallisert fra metanol-diklormetan smp. 250-254°C (dek.) AF164A.

¹H-NMR (D₂O) 1.89(m, 2H); 2.44(s, CH₃CO-); 2.86(s, CH₃N-); 2.98(m, 2H); 3.41 (m, 2H); 3.67 (m, 2H) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, dioksan som indre standard) 26.6 (C₃ & C₅); 26.9 (CH₃CO-);

43.8(CH₃N-); 51.4(C₂ & C₆); 62.0 (C₄); 67.3 (dioksan); 166.0 (C₂); 173.8 (CH₃CO-); 189.2 (C₄) ppm.

MS m/e 225 (M⁺); 210; 166; 155; 123; 95; 71 (100%); 70.

b) AF164B. Del av AF164A (1.10 g) ble gjort basisk med mettet vandig Na₂CO₃ oppløsning og ekstrahert med en blanding av metanol-diklormetan, ekstraktet ble avdampet og resten ekstrahert på nytt med samme oppløsningsmiddelblanding, ekstraktet ble filtrert og filtratet avdampet, og resten (1.0 g) ble triturerert med aceton for å tilveiebringe et hvitt fast stoff AF164B, smp. 225-230°C (dek.) (krystallisert fra CH₂Cl₂-CH₃OH-CH₃CN).

¹H-NMR (D₂O) 1.53(m, 2H); 2.21(s, CH₃CO-); 2.39(s, CH₃N-); 2.65-2.80 (m, 6H) ppm.

¹³C-NMR (D₂O), med dioksan som indre standard) 26.9 (CH₃CO-); 28.3 (C₃ & C₅); 45.0 (CH₃N-); 50.9 (C₂ & C₆); 64.9 (C₄); 67.3 (dioksan); 168.8 (C₂); 173.6 (CH₃CO-); 193.9 (C₄) ppm.

MS m/e 225 (M⁺); 183 (M⁺ - CH₂=C=O); 166; 154; 123; 95; 71 (100%).

35

c) AF164 (HCl salt). Et HCl salt av AF164 ble dannet ved behandling av en oppløsning av AF164A eller AF164B i metanol med HCl oppløst i isopropanol helt til pH var sur

(pH 1-2). Saltet, AF164 (HCl salt), presipiterte etter kort tid som et hvitt fast stoff smp. 301-2°C (dek.).

¹H-NMR (D₂O) 2.17 (m, 2H); 2.50 (s, CH₃CO-); 2.93 (s, CH₃N-); 3.10 (m, 2H); 3.48-3.71 (m, 4H) ppm.

5 ¹³C-NMR (D₂O, dioksan som indre standard) 26.7 (C₃ & C₅); 26.9 (CH₃CO-); 43.9 (CH₃N-); 51.1 (C₂ & C₆); 61.8 (C₄); 67.3 (dioksan); 154.8 (C₂'); 173.4 (CH₃CO-); 176.0 (C₄') ppm.

Hydrolyse av AF164.

10 AF164A og AF164B ble hydrolysert ved tilbakeløp i 0.2N vandig NaOH (1-2 t.) for å tilveiebringe 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin, identifisert ved sammenligning av TLC og ¹H-NMR til en autentisk prøve.

Eksempel 3: piperidin-4-spiro-5'-(3'-etylhydantoin) AF160(Des)

15 Til en oppløsning av tørket AF160 (2.0 g, 9.5 mmol) i dikloretan (25 ml, tørket over molekylsikter) α-kloretylklorformat (1.0ml, 9.3mmol) ble tilsatt ved romtemperatur og blandingen ble oppvarmet til 60°C i 1 time. Diklormetan ble fjernet i vakuum, det faste stoffet som ble oppnådd ble løst opp i 20 ml metanol og oppløsningen ble oppvarmet i ytterligere 30 min. ved 60°C. Deretter ble metanol fjernet i vakuum og det oljeholdige

20 faste stoffet som ble løst opp i vandig natriumkarbonat og vasket med eter. Det vandige laget ble ekstrahert med kloroform og ekstraktet avdampet for å tilveiebringe en råolje som ble ytterligere rensed ved kolonnekromatografi på en silikagelkolonne. Eluering med kloroform: metanol: vandig ammoniakk (4:1:0.1) ga AF160 (Des) (1.12 g., 60% utbytte) som et hvitt pulver

25 smp. 225-227°C.

MS m/e 197 (M⁺ base topp); 57

¹H-NMR (CDCl₃) 1.17 (t, J=6Hz, 3H); 1.65-1.7 (m, 2H); 1.85-2.0(m,2H); 2.75-2.85(m,2H); 3.05-3.15(m,2H); 3.5(q,J=6Hz, 2H) ppm.

30 Eksempel 4: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-metylhydantoin)AF178.

Til en blanding av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin (5.0 g, 27.3 mmol) og natriumhydroksid (2.0 g, 50 mmol) i 120 ml metanol, ble metyltosylat (11.2 g, 60 mmol) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt over natt ved romtemperatur, metanol ble fjernet ved avdampning og den oljeholdige resten ble oppløst i vandig kaliumkarbonat og

35 ekstrahert med kloroform. Det organiske ekstraktet ble avdampet og råproduktet som ble oppnådd ble ytterligere rensed ved kolonnekromatografi på silika og eluering med

kloroform/metanol/aq. ammoniakk (9:1:0.1) tilveietragte 1.2 g (22%) av et hvitt fast stoff smp. 229-231°C.

MS m/e 197 (M^+ , 30%); 71 (100%).

1H -NMR (fri base, $CDCl_3$) 1.6-1.7(m, 2H); 2.1-2.3(m, 4H); 2.34 (s, 3H); 2.85-
5 2.95(m, 2H); 3.02(s, 3H) ppm.

Eksempel 5: Piperidin-4-spiro-5'-(3-metylhydantoin) AF179

Det hvite pulveraktige produktet som ble oppnådd på samme måte som i eksempel 3 ble løst opp i isopropanol og surgjort ved anvendelse av saltsyre for å tilveiebringe et hvitt
10 presipitat.

smp. ovenfor 320°C (dek.).

MS m/e 183(M^+ , base topp): 57.

1H -NMR(HCl salt, D_2O); 2.0(m, 2H); 2.2(m, 2H); 2.96(s, 3H); 3.3(m, 2H); 3.6 (m, 2H).

15 Eksempel 6: Fremstilling av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-propargylhydantoin) (AF185).

En suspensjon av KH (11 g, 0.1 mol; 35% w/w dispersjon i mineralolje) og 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin (tørket over P_2O_5 , 25 g, 0.13 mol) ble omrørt ved romtemperatur i tørket DMF (500 ml). Propargylklorid (15 g, 0.2 mol) ble tilsatt og
20 reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 50°C i 20 minutter. Blandingen ble avkjølt og surgjort til pH ca 3 (med vandlig saltsyre) og DMF ble fjernet ved ekstrahering med en blanding av petroleumeter-eter 1:1 og deretter med eter. Den vandige fasen ble gjort basisk med natriumkarbonat til pH ca 10 og ekstrahert to ganger med kloroform.

Kloroformekstraktene ble kombinert, tørket og avdampet for å tilveiebringe en rå olje
25 (27 g) som ble kromatografert på en silikagel kolonne. Eluering med kloroform/metanol/ammoniakk (80:19:1) ga 3.0 g ren AF185 og flere fraksjoner (totalt 10 g) inneholdende mindre urenheter. Den frie basen ble presipitert som HCl salt; 3.2 g hvitt ikke hygroskopisk salt ble oppnådd ved krystallisering fra metanol.

1H -NMR (D_2O , HCl salt) δ 2.0-2.35 (m, 4H); 2.64(t, 1H, J=3.5Hz); 2.91(s, CH_3N^-);
30 3.1-3.2(m, 2H); 3.5-3.7(m, 2H); 4.27(bs, 2H)ppm.

1H -NMR (D_2O overskudd natriumkarbonat) δ 1.65-1.75(m, 2H); 1.9-2.05(m, 2H); 2.25(s, CH_3N^-); 2.2-2.3(m, 4H); 2.8-2.9(m, 4H); 4.25(s, 2H)ppm. 1H -NMR ($CDCl_3$, fri base) δ 1.85-1.95(m, 4H); 2.2(m, 2H); 2.23(t, 1H, J=3.5Hz); 2.4(s, CH_3N^-); 2.9-2.95(m, 2H); 4.3(d, 2H, J=3.5Hz); 6.4(bs, 1H)ppm.

35 MS m/e 221(M^+ , basetopp); 206(M-15); 149.

Eksempel 7: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2',5'-bis(metyltio)-4'H-imidazol) AF177.

Til en oppløsning av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoin) (1.00 g, 4.65 mmol; se eksempel 11) i metanol (15 ml), NaOH (0.30 g, 7.50 mmol) og deretter ble gradvis en metyliodid (1.00 g, 7.04 mmol) oppløsning i metanol (3.0 ml) tilsatt, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1.5 timer. NaBr presipiterte og ble filtrert og vasket med metanol. Filtratet og vaskingene ble kombinert og oppløsningsmiddelet fjernet. Resten ble gjort basisk med vandig K₂CO₃ og ekstrahert med eter. Det organiske ekstraktet ble tørket (Na₂SO₄) og oppløsningsmiddelet fjernet som ga en rest som ble kromatografert på en silikagel kolonne. Eluering med en 78:18:3:1

oppløsningsmiddelblanding av eter/kloroform/metanol/ammoniakk (aq.) ga AF177, s.p. 101-102°C (465 mg) etter krystallisering fra heksan.

¹H-NMR (CDCl₃) 1.33 (m, 2H); 1.98 (m, 2H); 2.39 (s, CH₃N-); 2.56(s, CH₃S-); 2.59 (s, CH₃S-); 2.48-2.64 (m, 2H); 2.82 (m, 2H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃) 14.1 (CH₃S-); 14.2 (CH₃S-); 34.9 (C₃ & C₅); 46.1 (CH₃N-); 52.2 (C₂ & C₆); 83.0 (C₄); 171.6 (C₂); 203.5 (C₅)ppm.

MS m/e 244 (M⁺+1); 185; 149; 93; 75

IR (KBr) 2920; 279; 1535; 1477; 1465; 1452; 1378; 1316; 1286; 1210; 1108; 1054; 1000; 965; 942; 900; 776; 696 cm⁻¹.

UV (EtOH) lambda_{max} 257 nm (ε 16100).

Eksempel 8: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-4'-tiohydantoin) AF182.

En prøve av 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-etyltio-2'-imidazolin-5'-tion) AF179 (100 mg; se eksempel 12) ble løst opp i 20% HCl (1 ml) og oppløsningen ble tilbakestrømmet i 1.5 time. Reaksjonsblandingen ble gjort basisk med kons. oppløsning

NaOH til pH14 og deretter ekstrahert med diklormetan. Det organiske ekstraktet ble tørket (Na₂SO₄) og oppløsningsmiddelet avdampet for tilveiebringning av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-4'-tiohydantoin) som et hvitt fast stoff (74 mg) krystallisert fra petroleum eter diklormetan smp. 176-178°C.

¹H-NMR (CDCl₃) 1.25 (t, J=7.2Hz, CH₃CH₂-); 1.54 (m, 2H); 2.10 (m,2H); 2.36 (s, CH₃N-); 2.41 (m, 2H); 2.96 (m, 2H); 3.94 (q, J=7.2Hz; -CH₂CH₃); 7.23 (NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃) 11.8 (CH₃CH₂-); 36.9 (C₃ & C₅); 37.4 (-CH₂CH₃); 46.1 (CH₃N-); 51.2 (C₂ & C₆); 68.1 (C₄); 157.1 (C₂'); 208.1 (C₄.) ppm.

MS m/e 227 (M⁺); 211 (M⁺-O); 194 (M⁺-SH); 170 (M⁺-C₃H₇N); 71; 70 (100%).

UV (EtOH) lambda_{max}. 280 nm (ε 13600), 229 nm (ε 4400).

Eksempel 9: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(4'-metyltio-3'-imidazolin-2'-tion) AF183

Ved gjentagelse av eksempel 7, men med anvendelse av ekvivalente mengder metyliodid, natriumhydroksid og dithiohydantoin, ble det i tillegg til bis-(metyltio) derivat AF177, 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(4'-metyltio-3'-imidazolin-2'-tion) AF183, smp. 218-220°C

(dek.) (fra CH₂Cl₂-aceton).

¹H-NMR (CDCl₃) 1.74 (m, 2H); 2.07 (m, 2H); 2.37 (m, 2H); 2.39 (s, CH₃N-); 2.69 (sm CH₃S-); 2.95 (m, 2H); 10.3 (brs. -NH-) ppm.

MS m/e 229 (M⁺); 182 (M⁺-CH₃S); 123; 122; 70.

UV (EtOH) lambda_{max}. 312 nm (ε 12000), 280 nm (ε 15300).

Eksempel 10: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-2' 4'-dithiohydantoin) AF163.

Pulver av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etylhydantoin) (0.570 g) og fosforpentasulfid (0.570 g), ble intimt blandet og tilbakestrømmet i tetralin (15 ml) i 2 timer. Etter at reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur ble et brunt hardt presipitat dannet.

Tetralin ble fjernet under redusert trykk og presipitatet ble disintegrert og vasket med petroleumeter. Det ble gjort basisk med en konsentrert vandig NaOH oppløsning og ekstrahert med diklormetan. Ekstraktet ble tørket (Na₂SO₄) og avdampet for å tilveiebringe en rest (0.250 g) som ble kromatografert på en silika gelkolonne (Merck) (60.15 g). Eluering med en 77:18:4:1 blanding av kloroform/eter/metanol/ammoniakk (aq.) ga ren AF163 (50 mg), krystallisert fra CH₂Cl₂-eter, smp. 223-225°C (dek.). ¹H-NMR (CDCl₃) 1.27(t, J=7.2Hz, CH₃CH₂-); 1.55-1.67(m, 2H); 2.03-2.19 (m, 2H); 2.26-2.46(m, 2H); 2.36(s, CH₃N-); 2.89-3.04(m, 2H); 4.27(q, J=7.2Hz, -CH₂CH₃); 8.25(brs. -NH-) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-d₆) 11.16 (CH₃CH₂-); 36.9(C₃ & C₅); 39.9(-CH₂CH₃);

45.9(CH₃N); 49.9(C₂ & C₆); 72.9(C₄); 179.8(C_{2'}); 207.8(C₄). ppm.

MS m/e 243(M⁺), 186(M⁺-C₃H₇N); 149; 71; 70(100%); 57.

IE (KBr) 3177(NH); 2930; 2778; 1513; 1434; 1357; 1231; 1116; 1090; 1070; 1040; 961; 801; 780; 626; 546; 457 cm⁻¹.

UV (EtOH) lambda_{max}. 302 nm (ε 34200), 226 nm. (ε 7700). Fremstilling av tartratsaltet av AF163.

Til en oppløsning av AF163 fri base (0.735 g, 3.025 mmol) i metylenklorid (15 ml)-metanol (5 ml). blir en oppløsning av L(+) tartarsyre (0.214g, 1.427 mmol) i metanol (2.0 ml) ble tilsatt. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 0,5 timer. Deretter ble oppløsningsmidlene avdampet og resten ble suspendert i eter-metylenklorid, filtrert og vasket med samme oppløsningsmiddelblanding for å tilveiebringe et gult fast stoff AF163(tartrat) smp. 221-225°C (dek.; 0.923 g, 96% utbytte).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) 1.27 (t, $J=7.2\text{Hz}$, CH_3CH_2-); 2.08 (m, 2H); 2.49 (m, 2H); 3.01 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$); 3.31 (m, 2H); 3.76 (m, 2H); 4.26 (q, $J=7.2\text{Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4.37 (s, $-\text{CHOH}$) ppm.

5 Eksempel 11: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoin)AF173.

En oppløsning av 1-metyl-4-piperidon (29.35 g, 0.260 mol), KCN (26.57 g, 0.408 mol), NH_4Cl (21.00 g, 0.393 mol) og CS_2 (26 ml) i etanol (200 ml)-vann (50 ml) ble oppvarmet under tilbakeløp ($50-55^\circ\text{C}$) i 8 timer. Reaksjonsblandingen ble latt stå ved romtemperatur over natt og presipitatet som ble oppnådd ble filtrert og vasket med vann og deretter med etanol for å tilveiebringe et gult fast stoff (26.3 g, 47.0% utbytte) smp.

250-253°C (dek.), krystallisert fra metanol smp. 252-254°C (dek.).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) 1.43-1.56 (m, 2H); 1.89-2.05 (m, 2H); 2.21 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$); 2.26-2.40 (m, 2H); 2.64-2.79 (m, 2H); 11.14 (br. s., $-\text{NH}-$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6) 36.2 ($\text{C}_3\&\text{C}_5$); 45.5 ($\text{CH}_3\text{N}-$); 49.9 ($\text{C}_2\&\text{C}_6$); 74.8 (C_4);

15 181.5 (C_2); 212.0 (C_4') ppm.

MS m/e 215 (M^+); 183 (M^+-S); 182 (M^+-SH); 181; 158 ($\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$); 123; 102; 77; 71; 70 (100%).

IR (KBr) 3130 (NH); 1484; 1449; 1350; 1295; 1231; 1198; 1176; 1145; 1083; 1062; 957; 721; 545; 504 cm^{-1} .

20 UV (0.01N HCl) λ_{max} . 298 nm (ϵ 32000), 220 nm. (ϵ 8000).

Eksempel 12: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-2',4'-dithiohydantoin) AF163; 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(4'-etyltio-3'-imidazolin-2'-tion) AF176; 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-etyltio-2'-imidazolin-5'-tion) AF170.

25

Til en suspensjon av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoin) AF173 (3.30 g; 15.3 mmol) i tørr DMF (30 ml) ble NaH (0.760 g, 60% i mineralolje; 19.0 mmol) tilsatt og blandingen ble omrørt ved 50°C i 1.5 timer. En oppløsning av EtBr (1.85 g; 17.0 mmol) i DMF (6 ml) ble gradvis tilsatt til ovennevnte blanding og den ble omrørt ved $75-80^\circ\text{C}$ i 4 timer. Etter henstand ved romtemperatur over natt ble det dannede presipitatet (NaBr) filtrert og vasket med eter. Filtratet og vaskingene ble kombinert og avdampet for å tilveiebringe en olje hvorfra et diklormetan uoppløselig fast stoff (1.5 g) ble separert, og ble funnet å være utgangsmateriale (identisk NMR og TLC). Resten ble kromatografert på en silika gelkolonne. Eluering med en oppløsningsmiddelblanding bestående av: eter/kloroform/metanol/ammoniakk (aq.) 68:27:4:1 ga først 1-

30 80°C i 4 timer. Etter henstand ved romtemperatur over natt ble det dannede presipitatet (NaBr) filtrert og vasket med eter. Filtratet og vaskingene ble kombinert og avdampet for å tilveiebringe en olje hvorfra et diklormetan uoppløselig fast stoff (1.5 g) ble separert, og ble funnet å være utgangsmateriale (identisk NMR og TLC). Resten ble kromatografert på en silika gelkolonne. Eluering med en oppløsningsmiddelblanding bestående av: eter/kloroform/metanol/ammoniakk (aq.) 68:27:4:1 ga først 1-

35 metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-2',4'-dithiohydantoin) AF163 (0.95 g), identisk med produktet oppnådd før fra omsetning av AF160 med P_2S_5 . Elueringen ble fortsatt for

tilveiebringning av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(4'-etyltio-3'-imidazolin-2'-tion) AF176 (0.15 g).

Krystallisert fra heksan-CH₂Cl₂ smp. 212-215°C (d.k.).

¹H-NMR (CDCl₃) 1.42 (t, J=7.2Hz, CH₃CH₂-); 1.73 (m, 2H); 2.06 (m, 2H); 2.31 (m, 2H); 2.38 (s, CH₃N-); 2.95 (m, 2H); 3.33 (q, J=7.2Hz, -CH₂CH₃); 10.0 (br. -NH-) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-d₆) 14.2 (CH₃CH₂-); 25.6 (-CH₂CH₃); 35.0 (C₃&C₅); 45.8 (CH₃N-); 50.5 (C₂&C₆); 74.3 (C₄); 192.1 (C₂), 198.1 (C₄) ppm.

MS m/e 243 (M⁺); 182 (M⁺-EtS, 100%); 156 (M⁺-EtSCN); 123; 124; 96; 71; 70; 57.

IR (KBr) 3135 (NH); 2930; 2788; 1476; 1463; 1446; 1281; 1257; 1232; 1158; 1141; 1121; 1096; 958; 711; 674; 535 cm⁻¹.

UV (EtOH) lambda_{max} 314 nm. (ε 5400) inf., 282 nm, (ε 6700).

Ved gjentagelse av ovennevnte reaksjon med 1,5 molart overskudd EtBr over AF173 ga i tillegg til ovennevnte monoetylderivater, dietylderivat 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-etyltio-2'-imidazolin-5'-tion) AF170 smp. 66-67°C (krystallisert fra heksan).

¹H-NMR (CDCl₃) 1.24 (t, J=7.2Hz, CH₃CH₂-); 1.24 (m, 2H); 1.44 (t, J=7.2Hz, CH₃CH₂-); 2.27 (m, 2H); 2.39 (s, CH₃N-); 2.52 (m, 2H); 2.81 (m, 2H); 3.24 (q, J=7.2Hz, -CH₂CH₃); 3.93 (q, J=7.2Hz, -CH₂CH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃) 12.2 (CH₃CH₂-); 13.9 (CH₃CH₂-); 25.7 (-CH₂CH₃); 36.8 (C₃&C₅); 39.0 (-CH₂CH₃); 46.1 (CH₃N-); 51.5 (C₂&C₆); 82.2 (C₄); 158.5 (C₂); 216.7 (C₅) ppm.

MS m/e 271 (M⁺); 242 (M⁺-Et); 214 (M⁺-C₃H₇N); 185; 162; 75; 71; 70 (100%); 57.

IR (KBr) 1574 (C=N); 1446; 1372; 1354; 1212; 1071; 1060; 936 cm⁻¹.

UV (EtOH) max. (ε) 296(22000); 252(17700) nm.

Sur hydrolyse av AF176.

Til AF176 (48 mg) ble det tilsatt aq. HCl (1 ml, 20%). En øyeblikkelig lukt av en merkaptan ble observert. Den oppnådde oppløsningen ble omrørt ved romtemperatur i 1 time og deretter avdampet ved 50°C under redusert trykk og ga som et hvitt fast stoff 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tiohydantoin) HCl salt (X).

¹H-NMR (D₂O) 2.10-2.43 (m, 4H); 2.94 (s, CH₃N-); 3.20 (m, 1H); 3.47-3.78 (m, 3H) ppm.

MS m/e 199 (M⁺); 181; 171 (M⁺-CO); 156 (M⁺-HNCO); 142 (M⁺-C₃H₇N); 111; 96; 71; 70; 57.

UV (H₂O) lambda_{max} 264 nm. (ε 20400), 224 nm. (ε 8600).

Eksempel 13: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tiohydantoin) AF195.

- (a) En oppløsning av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoin) (AF173) (10.0 g) i etanolamin (40 ml)-vann (75 ml) ble tilbakestrømmet i 1,75 timer. Oppløsningsmiddelet og overskudd av reagens ble fjernet under redusert trykk. Gjentatt krystallisering av resten fra acetonitril-diklormetan; aceton, og etanol-acetonitril ga ren 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tio-4'-(8β-hydroksyetyliminohydantion) smp. 230-231°C (dek.).
- ¹H-NMR (D₂O) 11.74 (m, 2H); 1.94 (m, 2H); 2.26 (s, CH₃N-); 2.17-2.34 (m, 2H); 2.92 (m, 2H); 3.54 (t, J=5.4Hz, -CH₂OH); 3.74 (t, J=5.4Hz, =NCH₂-) ppm.
- ¹³C-NMR (DMSO-d₆) 33.7 (C₃&C₅); 45.4 (-CH₂-); 45.9 (CH₃N-); 50.6 (C₂ & C₆); 59.2 (-CH₂-); 66.3 (C₄); 182.5 (-C=S); 195.0 (-C=N) ppm.
- MS m/e 242 (M⁺); 224 (M⁺-H₂O); 199; 185; 172 (M⁺-70); 154 (M⁺-70-H₂O); 71; 70. UV (0.01N HCl) lambda_{max} (ε 22200); 242 nm (ε 10200).

- Iminohydantoinderivat (1.40 g) ble løst opp i vandig HCl (5.0 ml, 1:1) og tilbakestrømmet i 1 time. Reaksjonsblandingen ble avdampet under redusert trykk og resten krystallisert fra metanol for tilveiebringning av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tiohydantoin) saltsyresalt (0.756 g), identisk med produktet oppnådd fra hydrolyse av AF176 (se eksempel 12).

- (b) En oppløsning av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-fitiohydantoin) (AF173) (10.0 g, 0.0465 mol) og n-butylamin (17.0 g, 0.233 mol) i etanol (80 ml) ble oppvarmet under tilbakeløp i 1,5 timer. Krystallinsk fast stoff som ble separert fra den avkjølte reaksjonsblandingen ble filtrert, vasket med liten mengde etanol, med eter og petroleumeter, for å tilveiebringe 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tio-4'-etyliminohydantion) (AF189) (11.1 g, 0.0437 mol) 95% utbytte. Produktet ble krystallisert fra diklormetanmetanol for tilveiebringning av nåler smp. 236-239°C (dek).
- ¹H-NMR (CDCl₃+CD₃OD) 0.94 (t, J=7.2Hz, CH₃CH₂-); 1.38 (m, 2h); 1.60 (m, 2H); 1.69 (m, 2H); 1.89 (m, 2H); 2.40 (m, 2H); 2.41 (s, CH₃N-); 2.91 (m, 2H); 3.47 (t, J=7.2Hz, -CH₂-N=) ppm.
- MS m/e 254(M⁺); 197(M⁺-C₄H₉); 184(M⁺-70); 149; 128; 71; 70; 57(C₄H₉⁺).

- Iminohydantionderivatet AF189 (10.45 g) ble løst opp i vandig saltsyre (15.0 ml, 16%) og tilbakestrømmet i 1 time. Reaksjonsblandingen ble destillert helt til det bare vare igjen en liten mengde væske. Tilsetning av etanol (50 ml) til resten og avkjøling ga et fast stoff som ble filtrert og vasket med en liten mengde etanol og med eter for å tilveiebringe 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tiohydantoin) saltsyresalt (AF195) (8.42 gm 87% utbytte) smp. >295°C (dek.), identisk med produktet som ble oppnådd før.

Eksempel 14: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(oksazolidin-2'-tion) AF165

Til vannfri DMSO (10 ml) inneholdende en liten mengde KOH pulver ble 4-aminometyl-4-hydroksey-1-metylpiperidin (0.595 g, 4.13 mmol) tilsatt med omrøring, etterfulgt av karbondisulfid (0.340 g, 4.47 mmol). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved 50°C i 5 timer. Oppløsningsmiddelet ble fjernet i vakuum og resten ble krystallisert flere ganger fra metanol, aceton og CH₂Cl₂ for å tilveiebringe et krystallinsk fast stoff smp. 190-195°C (211 mg).

¹H-NMR (CDCl₃) 1.80-1.98 (m, 2H); 2.03-2.16 (m, 2H); 2.32 (s, CH₃N-); 2.44-2.72 (m, 4H); 3.51 (s-CH₂N-C=S) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-d₆) 35.1 (C₃Cl₅); 45.7 (CH₃N-); 5.15 (C₂Cl C₆); 53.1 (-CH₂NH-); 86.4 (C₄); 187.2 (-C=S) ppm.

Eksempel 15: N-metylnortropan-3-spiro-5'-(3'-metylhydantoin) AF167, og N-

15 metylnortropan-3-spiro-5'-(3'-etylhydantoin), AF168.

a) N-metylnortropan-3-spiro-5'-hydantoin

En blanding av tropinon (45 g, 0.32 mol) i etanol (160 ml), ammoniumkarbonat (93 g, 0.96 mol) i vann (400 ml), og KCN (25.8 g, 0.40 mol) i vann (84 ml) ble oppvarmet ved 60°C i 2 timer, og deretter oppbevart ved romtemperatur i 16 timer. N-metylnortropan-20 3-spiro-5'-hydantoin (61.33 g, 0.29 mol, 92% utbytte) ble separert og ble tørket i en dessikator. smp. 330°C.

Massespektrum m/e 209 (M⁺)

¹H-NMR (CD₃COOD) 2.1 (m, 2H, H₆=H₇(α)), 2.3 (m, 2H, H₂=H₄(β)), 2.4 (m, 2H, H₂-H₄(α)), 2.7 (m, 2H, H₆=H₇(β)), 2.9 (s, 3H), 3.0 (bs, NH) 4.1 (bsm 2H, H₁=H₅) ppm.

25 ¹H-NMR (DCI, D₂O) 2.3 (m, 4H, H₆=H₇(α) og H₂=H₄(β)), 2.5 (m, 2H, H₂=H₄(α)), 2.7 (m, 2H, H₆=H₇(β)), 2.9 (s, 3H), 4.15 (bs, 2H, H₁=H₅) ppm.

¹³C-NMR (DCI, D₂O) 25.5 (C₆=C₇, t), 33.5 (C₂=C₄, t), 39.7 (CH₃, q), 59.3 (C₃-C₅, s), 63.0 (C₁=C₅, d), 159.3 (C₂',s), 180.2 (C₄',s) ppm.

b) AF167 og AF168

N-metylnortropan-3-spiro-5'-hydantoin (1 ekv.) og KOH (1 ekv.) ble blandet i vann ved romtemperatur i noen minutter. Metyliodid eller etylbromid (2 ekv.) i metanol eller etanol ble dråpevis tilsatt til den vandige oppløsningen. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med kloroform og tørket over magnesiumsulfat før avdampning. Produktene

35 AF167 og AF168 ble oppnådd i omtrent 10% utbytte.

AF167

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) 1.65 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\alpha)$), 1.8 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\beta)$), 2.2 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\alpha)$), 2.4 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\beta)$), 2.55 (s, 3H), 2.85 (s, 3H), 3.25 (bs, 2H, $\text{H}_1=\text{H}_5$)ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1.55 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\alpha)$), 1.75 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\beta)$), 2.2 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\alpha)$), 2.4 (s, 3H), 2.45 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\beta)$), 3.0 (s, CH_3), 3.3 (bs, 2H, $\text{H}_1=\text{H}_5$), 6.3 (bsm NH) ppm.

Massespektrum m/e 223 (M^+)

AF168

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , CD_3OD) 1.1(t, 3H), 1.6(m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\alpha)$), 1.75 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\beta)$), 2.2(m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\alpha)$), 2.35(s,3H), 2.4 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\beta)$), 3.3(bs,2H, $\text{H}_1=\text{H}_5$), 3.55(q,2H)ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1.2 (t, 3H), 1.6 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\alpha)$), 1.75 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\beta)$), 2.2 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\alpha)$), 2.4 (s,3H), 2.45 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\beta)$), 3.3(bs,2H, $\text{H}_1=\text{H}_5$), 3.55 (q,2H), 6.3 (bs,NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ) 13(CH_3CH_2), 25($\text{C}_6=\text{C}_7$), 35($\text{C}_2=\text{C}_4$), 40(N-CH_3), 40.5(N-CH_2), 59($\text{C}_3-\text{C}_5'$), 60($\text{C}_1=\text{C}_5$), 159(C_2'), 180(C_4')ppm.

Massespektrum m/e 237 (M^+)

Eksempel 16: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyloksazolidin-2'-one) AF172

a) 4-acetamidometyl-4-hydroksy-1-metylpiperidin

4-aminometyl-4-hydroksy-1-metylpiperidin (2.95 g, 0.02 mol), kaliumkarbonat (6.5 g, 0.047 mol) og eddiksyreanhydrid (8.5g, 0.08 mol) i metanol ble blandet ved romtemperatur i 2 timer. Natriumhydroksid ble tilsatt for nøytralisering og oppløsningen ble ekstrahert med kloroform. Etter avdampning ble det oppnådd en gul olje som ble identifisert som 4-acetamidometyl-4-hydroksy-1-metylpiperidin (3.4 g, 0.018 mol, 91% utbytte).

b) 4-etylaminometyl-4-hydroksy-1-metylpiperidin

4-acetamidometyl-4-hydroksy-1-metylpiperidin (3.4 g, 0.018 mol) i tørr THF ble tilbakestrømmet i nærvær av litiumaluminiumhydrid (4 g). Etter 3 dager ble blandingen helt inn i et is-vannbad og filtrert gjennom celit. Oppløsningsmiddelet ble avdampet og etter tilsetning av vann ble oppløsningen ekstrahert med kloroform, og ekstraktet ble tørket med magnesiumsulfat og avdampet for tilveiebringning av 1.03 g (33% utbytte) råmateriale. Produktet oppnådd på denne måten 4-etylaminometyl-4-hydroksy-1-metylpiperidin, ble anvendt uten ytterligere rensning.

c) 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etylolsazolidin-2-one) AF172 4-etylaminometyl-4-hydroksy-1-metylpiperidin (16.8 g, 0.1 mol) og N,N'-karbonyldiimidazol (32 g, 0.2 mol) ble blandet med 400 cm³ kloroform under nitrogen. Avdampning ga 50 g råmateriale som ble grundig vasket med heksan som etter avdampning ga produktet, 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyloksazolidin-2-one) AF172, som en gul olje (16.8 g, 0.085 mol, 85% utbytte).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.15 (t, 3H), 1.8(m,2H), 1.95(m,2H), 2.3(s,3H), 2.55(m,2H), 3.28(s,2H), 3.32(q,2H)ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃) 13(CH₃CH₂), 22(CH₃CH₂), 37(CH₃CH₂N), 39(CH₂NEt),

52(NCH₂CH₂), 55(C-O), 157.5 (C=O) ppm.

Massespektrum m/e 198 (M⁺)

Eksempel 17: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(3'-etyloksazolidin-2-one) AF174

a) 4-acetamido-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin

4-amino-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin (2.95 g, 0.02 mol), kaliumkarbonat (6.5 g, 0.047 mol) og eddiksyreanhydrid (8.5 g, 0.08 mol) i metanol ble blandet ved romtemperatur i 2 timer. Natriumhydroksid ble tilsatt for nøytralisering og oppløsningen ekstrahert med kloroform. Etter avdampning ble det oppnådde hvite faste stoffet krystallisert med varm aceton for tilveiebringning av 4-acetamido-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin (1.67 g, 0.009 mol, 45% utbytte).

b) 4-etylamino-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin

4-acetamido-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin (1.6 g, 8.6 mmol) i tørr THF ble tilbakestrømmet i nærvær av litium aluminiumhydrid (3g). Etter 4 timer ble blandingen helt inn i is-vannbad og filtrert gjennom celit. Oppløsningsmiddelet ble avdampet og etter avdampning av det meste av vannet ble oppløsningen ekstrahert med kloroform, tørket med magnesiumsulfat og avdampet for tilveiebringning av 1.13 g (77% utbytte) av ganske rent materiale. Produktet 4-etylamino-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin, oppnådd på denne måten ble anvendt uten ytterligere rensning.

c) 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(3-ætyloksazolidin-2-one) AF174

4-etylamino-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin (172 mg, 1 mmol) og N,N'-karbonyldiimidazol (486 mg, 3 mmol) ble blandet i kloroform under nitrogen i løpet av 3 timer. Etter avdampning ble det oppnådd et råmateriale som ble grundig vasket med heksan, som etter avdampning tilveiebragte produktet, 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(3'-etyloksazolidin-2-one) AF174 som et hvitt fast stoff (140 mg, 0.71 mmol, 71% utbytte).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.10 (t, 3H), 1.6(m,2H), 1.95(m,4H), 2.25(s,3H), 2.85 (m,2H), 3.2 (q,2H), 4.1(s,2H)ppm.

Massespektrum m/e 198 (M^+)

5 Eksempel 18: 2-N-metylspiro-(1,3-succinimid-4,3')quinuclidin AF133

a) etyl(3-quinuclidyliden)cianoacetat

En blanding av 3-quinuclidonon (30 g, 0.24 mol), etylvyanoacetat (40 g, 0.35 mol), ammoniumacetat (3.8 g), eddiksyre (11 g) og 120 ml benzen, ble oppvarmet under tilbakeløp og vann ble fjernet ved azeotropisk destillasjon (totalt 4 ml vann).

10 Benzenopløsningen ble avkjølt, kaliumkarbonat (30 g) i 120 ml vann ble tilsatt og blandingen ble ekstrahert med toluen (3 x 500 ml). Tolueneekstraktene ble kombinert, tørket og produktet ble presipitert som et saltsyresalt for tilveiebringning av 63 g (95% utbytte) av råproduktet. TLC ammoniumhydroksid (25% i vann) 2% v/v i metanol på silika Art 5735 (Merck) R_f 0.67.

15 Produktet kan bli ytterligere rensed ved krystallisering i etanol eller isopropanol.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -TMS) fri base: 1.29(t,3H,CH₃); 4.2(q,2H,CH₂); 1.7-1.9, 2.8-3.2 (m, quinuclidinskjelett).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 -TMS): 14(CH₃); 62(CH₂O); 189(C=O); 162 (C=N); 115 (C-CN); 100 (C=C); 33.7 (C-H). b) 3-karboksyetoksy-3-karboetoksymetylquinuclidin.

20

Etyl (3-quinuclidyliden)-cyanoacetat (64 g, 0.24 mol) og kaliumcyanid (17 g, 0.26 mol) oppløst i 25 ml vann ble oppløst i 125 ml etanol. Blandingen ble tilbakestrømmet i 20 minutter, avkjølt, dekantert fra kaliumklorid og gjenværende kaliumklorid ble vasket med to 50 ml porsjoner etanol. Den kombinerte alkoholopløsningen ble avdampet og den oljeholdige resten ble løst opp i 250 ml konsentrert saltsyre og tilbakestrømmet i 24 timer. Oppløsningen ble deretter avdampet og resten ble vasket flere ganger med aceton og tørket. Det tørkede faste stoffet ble tilbakestrømmet i etanol mettet med hydrogenklorid i 20 timer. Deretter ble etanol fjernet og resten ble gjort basisk ved anvendelse av natriumkarbonat og ekstrahert inn i kloroform. Kloroformopløsningen ble tørket, avdampet og rå diester ble ytterligere rensed ved kolonnekromatografi ved anvendelse av 2% metanol i kloroform som et elueringsystem.

25

MS m/e 2.69 (M^+); basetopp m/e 196 (M-C-OEt).

$^1\text{H-NMR}$ δ (CDCl_3 -TMS) 1.2 (dt, 6H, CH₃); 4.2-4.3 (dt, 4H, CH₂O); 1.3-1.6, 2.6-3.1 (m, quinuclidin skjelett).

35

c) 2-N-metyl spiro-(1,3-succinimid 4,3') quinuclidin (AF133)

3-karboksy-3-karboetoksymetylquinuclidin (3.35 g, 12 mmol) ble oppløst i 4.5 g metylamin og ble oppvarmet under trykk ved 190°C (90 timer). Reaksjonsblandingen ble avkjølt, avdampet og den faste resten ble rensset ved kolonnekromatografi på silika ved
5 anvendelse av 2% metanol i kloroform inneholdende 0,2 ammoniakk som et elueringssystem. AF133 ble oppnådd som et hvitt fast stoff, smp. 94-96°C 1.2 g (5.7 mmol).

MS M⁺ 209.

¹H-NMR δ(CDCl₃-TMS). 3.4 (d, 1H)(H₂); 2.96 (s, 3H)(CH₃); 2.5 (d, 1H)(H₂); 1.5-
10 1.9 (m, quinuclidin skjelett).

Eksempel 19: 2-N-etyl-spiro-(1,3-succinimid 4,3') quinuclidin AF134

Rå 3-karboetoksy-3-karboetoksymetylquinuclidin (20 g) ble løst opp i 70% vandig etylamin og oppvarmet ved 140°C under trykk i 7 timer. Reaksjonen ble registrert ved
15 G.C. Råproduktet ble ekstrahert med kloroform som deretter ble tørket og avdampet. Den oljeholdige resten ble rensset ved kolonnekromatografi på silika ved anvendelse av kloroform/petroleumeter/etanol/vandig ammoniakk 17/13/3/0.4. Den frie basen ble presipitert som et saltsyresalt, for å tilveiebringe 6.6 g hvitt fast stoff, smp. 270-272°C
TLC ammoniumhydroksid (25% i vann) 2% v/v i metanol på silika art 5735 Merck R_f
20 0.47.

MS M⁺ 222

¹H-NMR δ(CDCl₃-TMS) fri base: 1.5 (t, 3H, CH₃); 3.5 (q, 2H, N-CH₂); 1.6-3.3 (m, quinuclidinskjelett).

Eksempel 20: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(oksazolidin-2',4'-dion) AF169 og 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-oksazolidin-2',4'-dion) AF180.

a) 4-hydroksy-4-cyano-1-metylpiperidin

Til frisk destillert 1-metylpiperidin-4-one (81.72 g, 0.72 mol) i vann (200 cm³), ble det
30 tilsatt omtrent 100 cm³ HCl 37% til pH 3. Reaksjonsblandingen ble avkjølt i et isbad og kaliumcyanid (49 g, 0.75 mol) i vann (200 cm³) ble tilsatt ved en vandig rate for å opprettholde en indre temperatur på omtrent 10°C. Reaksjonen ble omrørt i 2 ytterligere timer etter tilsetningen og deretter filtrert. Etter vasking med vann og tørking ble produktet 4-hydroksy-4-cyano-1-metylpiperidin oppnådd i 67% utbytte som et hvitt
35 pulver (67 g, 0.48 mol, smp. 135°C).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.9 (m, 2H), 2.2 (m, 2H), 2.4 (s, 3H), 2.45 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 2-3,5 (bm, 1H, OH) ppm.

b) 4-hydroksy-4-karbamoyl-1-metylpiiperidin

Forbindelsen 4-hydroksy-4-cyano-1-metylpiiperidin (36.4 g, 0.26 mol) ble gradvis tilsatt til svovelsyre (80 ml) under ytre avkjøling. Blandingen ble opprettholdt ved romtemperatur i 41 timer og deretter tilsatt til pulveris (30 g). Den resulterende oppløsningen ble nøytralisert med bariumkarbonat (376 g) til pH 8-9 og etter tilsetning av vann ble resulterende bariumsulfat separert og vasket med metanol. Filtratet ble konsentrert under redusert trykk. Produktet 4-hydroksy-4-karbamoyl-1-metylpiiperidin (28.16g, 0.18 mol, 69% utbytte), krystalliserte fra etanol som et hvitt fast stoff (smp. 180°C).

¹H-NMR (CD₃OD) δ 1.51 (m, 2H), 2.15 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.4 (m, 2H), 2.7 (m, 2H) ppm.

Massespektrum m/e 158 (M⁺).

c) 1-metylpiiperidin-4-spiro-5'-(oksazolidin-2',4'-dion) AF169

Til en oppløsning av kaliummetoksid (9.8 g, 0.14 mol) i tørr etanol (60 ml) ble det tilsatt en oppløsning av 4-hydroksy-4-karboksamid-N-metylpiiperidin (27.5 g, 0.17 mol) og dietylkarbonat (26.23 g, 0.22 mol) i etanol (300 ml). Den resulterende blandingen ble tilbakestrømmet ved 80°C i 60 timer. Reaksjonsblandingen ble avdampet, resten ble ristet med kladt vann (70 ml) og nøytralisert med HCl (2N) til pH 7. Oppløsningen ble konsentrert til halvt volum og det hvite presipitatet ble filtrert. Triturering med etanol ga 1-metylpiiperidin-4-spiro-5'-(oksazolidin-2',4'-dion) AF169 (22 g, 0.12 mol) i 70% utbytte som et hvitt fast stoff. Smp. 285°C (dek.).

¹H-NMR (D₂O, pH 7) 2.07 (m, 2H), 2.27 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 3.30 (m, 2H), 3.60 (m, 2H) ppm.

Massespektrum (pH til forbindelsen er 7) m/e 185 og 184 (M⁺ +1 og M⁺).

d) 1-metylpiiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyloksazolidin-2',4'-dion) AF180.

Til en oppløsning av 1-metylpiiperidin-4-spiro-5'-(oksazolidin-2',4'-dion) (2.8 g, 0.015 mol) i tørr DMF (100cm³), ble kaliumhydrid (65% i olje) sakte tilsatt helt til reaksjonen stoppet og ble oppvarmet (4.9 g ble anvendt). Den hvite suspensjonen ble tilbakestrømmet i 1 time og avkjølt. Etylbromid (4.6 g, 0.042 mol) ble dråpevis tilsatt. Reaksjonen ble spontant oppvarmet. Etter at blandingen var blitt avkjølt til romtemperatur ble den tilbakestrømmet i 2 timer. Etter avkjøling ble et hvitt fast stoff separert og vasket med etanol. Etter avdampning av oppløsningsmidlene ble råproduktet på en silika gelkolonne ved anvendelse av kloroform og metanol som elueringsmiddel. Fraksjoner inneholdende produktet ble avdampet. Produktet ble isolert og identifisert i fri baseform. For praktisk håndtering ble den omdannet til saltsyresalt med en HCl/eter

etanoloppløsning hvorfra det presipiterte som 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyloksazolidin-2',4'-dion), hydrogenkloridsalt (0.746 g, 0.003 mol, 21% utbytte) (smp. 305°C (dek.)).

¹H-NMR (CDCl₃, fri base) δ 1.2 (t, 3H), 1.75 (m, 2H), 2.15 (m, 2H), 2.3 (s, 3H), 2.32 (m, 2H), 2.80 (m, 2H), 3.55 (q, 2H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, fri base) δ 13 (CH₃CH₂), 32 (CH₂CH₃), 35 (CH₂CH₂-C), 46 (N-CH₃), 50 (CH₂-N-CH₃), 85 (C spiro), 155 (OC=C), 175 (C-C=O) ppm.

Massespektrum (fri base) m/e 212 (M⁺).

10 Eksempel 21: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyl-2'-tioazolin) AF151(S)

a) En blanding av 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyl-2'-oksazolin), AF151 (1.85 g, 11.01 mmol); fosforpentasulfid (1.83 g, 8.23 mmol) og p-toluensulfonsyremonohydrat (4.20 g, 22.08 mmol) i xylene (70 ml), ble magnetisk omrørt og tilbakestrømmet i 3 timer. Oppløsningsmiddelet ble azeotropisk destillert og resten ble gjort basisk med konsentrert vandig oppløsning av NaOH og deretter ekstrahert med diklormetan. Det organiske ekstraktet ble tørket (Na₂SO₄) og oppløsningsmiddelet ble fjernet for å tilveiebringe en brun olje (2.10 g) som ble kromatografert på silikagelkolonne (Kieselgel S, 0.032-0.063 mm., Riedel DeHaen, 70 g). Eluering med en oppløsningsmiddelblanding av kloroform (97%)-metanol (3%) som inneholdt 10M ammoniak ga fraksjoner som inneholdt ren AF151(S) (0.90 g).

b) En intim blanding av pulvere av 4-acetamido-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin (8.00 g, 0.043 mol) og fosforpentasulfid (6.10 g, 0.0275 mol) ble suspendert i xylene (120 ml), magnetisk omrørt og tilbakestrømmet i 6 timer. Reaksjonsblandingen ble latt stå ved romtemperatur over natt og presipitatet som ble oppnådd ble filtrert og vasket med petroleumeter (40-60°C) for å tilveiebringe grått pulver (13.0 g). Den oppnådde pulveret ble avkjølt og gjort basisk med en vandig konsentrert oppløsning av NaOH, deretter ekstrahert med diklormetan flere ganger. Kombinerte ekstrakter ble tørket (Na₂SO₄) og avdampet. Resten som var igjen ble ekstrahert med heksan og heksan ble fjernet for å tilveiebringe en rød olje (3.53 g) som ble destillert for å tilveiebringe farveløs olje k.p. 60-68°C (0.4 mm), (2.40 g), som ble kromatografert på en silika gelkolonne 60 (Merck 100 g). Eluering med en oppløsningsmiddelblanding av CHCl₃:Et₂O:MeOH:NH₄OH (70:25:4:1) ga ren AF151(S) (1.71 g).

¹H-NMR (CDCl₃) 1.65-1.78(m, 2H); 1.90-2.04(m, 2H); 2.19(s, CH₃C=N-);

2.32(s, CH₃N-); 2.30-2.43(m, 2H); 2.60-2.75(m, 2H); 3.11(s, CH₂S-) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃) 19.9 (CH₃C=N-); 35.8(C₃&C₅); 43.1 (-CH₂S-); 45.6(CH₃N-); 52.1(C₂&C₆); 78.5(C₄); 161.0(S-C=N) ppm.

MS m/e 184(M^+ , 100%); 110(26%); 109(56%); 72(93%); 71(24%).

Eksempel 22: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'(5)-(2'-metyl-2'-imidazolin) AF190

a) 4-amino-4-cyano-1-metylpiperidin

5 1-metylpiperidin-4-one (33.0 g, 0.292 mol), kaliumcyanid (19.5 g, 0.299 mol) og ammoniumklorid (16.5 g, 0.308 mol) ble suspendert i metanol (225 ml) og vann (150 ml) og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 12 dager. Det oppnådde presipitatet ble filtrert og filtratet ble avdampet under redusert trykk. For å fjerne vann som kan ha vært en i resten ble etanol tilsatt og deretter destillert azeotropisk. Etanol ble på ny tilsatt til

10 resten, som delvis ble oppløst og ga et uorganisk fast stoff som ble filtrert og vasket med etanol. Filtratet og vaskingene ble kombinert og oppløsningsmiddelet ble fjernet for å tilveiebringe en viskøs olje (35.5 g) som viste to flekker på TLC (kloroform:metanol.ammoniumhydroksid (aq.) 17:2:1 - silika gel). Det ble krystallisert fra eter for å tilveiebringe et fast stoff som ble ytterligere krystallisert fra samme

15 oppløsningsmiddel for å tilveiebringe 4-cyano-4-hydroksey-1-metylpiperidin som krystaller, smp. 130-133°C. Morvæsken når konsentrert deponerte en annen avling av et krystallinsk fast stoff som for det meste var 4-amino-4-cyano-1-metylpiperidin. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1.72-1.88 (m, 2H); 2.01 (m, 2H); 2.25-2.37 (m, 2H); 2.32 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2.74-2.83 (m, 2H) ppm.

20 MS m/e 139 (M^+); 112($M^+ - \text{HCN}$); 71; 70.

4-amino-4-cyano-1-metylpiperidin ga ved acetylering med eddiksyreanhydrid og pyridin 4-acetamido-4-cyano-1-metylpiperidin som ble krystallisert fra petroleumeterdiklormetan smp. 143-144°C.

25 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1.78-1.96 (m, 2H); 2.04 (s, $\text{CH}_3\text{CON-}$); 2.32 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2.35-2.50 (m, 4H); 2.66-2.84 (m, 2G); 6.22 (s, $-\text{NHCO-}$) ppm.

MS m/e 181 (M^+); 122 ($M^+ - \text{CH}_3\text{CONH}_2$)

IR(CHCl_3) 3438, 3303, 2940, 2804; 2242 (C=N); 1670 (amid) cm^{-1} .

Sur hydrolyse (H_2SO_4) av 4-amino-4-cyano-1-metylpiperidin ga 4-amino-4-karbamoyl-1-metylpiperidin som ble krystallisert fra etylacetat-diklormetan smp. 145-147°C.

30 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1.44 (m, 2H); 1.68 (br- NH_2); 2.12-2.34 (m, 4H); 2.30 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2.70-2.82 (m, 2H); 5.47 (br $-\text{NH-}$); 7.39 (br, $-\text{NH-}$) ppm.

MS m/e 158 ($M^+ + 1$); 157 (M^+); 140 ($M^+ - \text{NH}_3$), 100%; 113 ($M^+ - \text{CONH}_2$), 96; 71.

b) 4-amino-4-aminometyl-1-metylpiperidin

En oppløsning av 4-amino-4-cyano-1-metylpiperidin (3.60 g) i tørr dimetoksyetan ble tilsatt til mekanisk omrørt suspensjon av LiAlH_4 (3.0 g) i tørr dimetoksyetan under nitrogenatmosfære, i en slik rate at temperaturen ikke gikk over 50°C . Etter endt tilsetning ble blandingen oppvarmet under tilbakeløp i 6 timer. Overskudd LiAlH_4 ble ødelagt ved tilsetning til kald (0°C) omrørt reaksjonsblanding, under nitrogen, 4M NaOH (10 ml), vann (3 ml), mettet NaOH oppløsning (10 ml) og vann (5 ml). Det organiske oppløsningsmiddelet ble separert og den vandige fasen ble ekstrahert flere ganger med varm THF. Det organiske oppløsningsmiddelet som ble separert og THF ekstraktene ble kombinert, tørket (Na_2SO_4) og oppløsningsmidlene ble fjernet for å tilveiebringe tittelforbindelsen som en viskøs olje (3.17 g) som ble rensset ved destillasjon k.p. $60\text{-}62^\circ\text{C}$ (0.8 mm).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1.43 (m, 2H); 1.58 (m, 2H); 2.15 (br, $-\text{NH}_2$); 2.30 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2.30 (m, 2H); 2.56 (s, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$); 2.56 (m, 2H) ppm.

Acetylering av diamin som ble oppnådd ga diacetamid som et fast stoff smp. $175\text{-}176^\circ\text{C}$ (fra acetonitril).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1.74 (m, 2H); 1.96-2.10 (m, 2H); 1.99 (s, $\text{CH}_3\text{CON-}$); 2.02 ($\text{CH}_3\text{CON-}$); 2.21 (m, 2H); 2.28 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2.51-2.61 (m, 2H); 3.50 (d, $J=5.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NH-}$); 5.62 (s, $-\text{NHCO-}$); 7.18 (t, $\text{CH}_2\text{NHCO-}$) ppm.

MS m/e 227 (M^+); 184 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CO}$); 169 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CONH}$); 168 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CONH}_2$); 167; 155; 112; 109 (100%); 96; 71; 70.

Diacetamidet ble også oppnådd ved hydrogenering av 4-amino-4-cyano-1-metylpiperidin med hydrogen (50 psi) med Raney-Ni som katalysator i varm (60°C) eddiksyreanhydrid inneholdende natriumacetat.

c) 1-metylpiperidin-4-spiro-4'(5)-(2'-metyl-2'-imidazolin) AF190.

Til en oppløsning av b) 4-amino-4-aminometyl-1-metylpiperidin (0.248 g, 1.734 mmol) i diklormetan (5 ml), ble det tilsatt etylacetamidhydroklorid (0.282 g, 2.282 mmol) og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 3 timer. Oppløsningsmiddelet ble fjernet under redusert trykk og resten ble gjort basisk med konsentrert vandig Na_2CO_3 oppløsning og deretter ekstrahert med diklormetan. Ekstraktet ble tørket (Na_2CO_3) og oppløsningsmiddelet ble fjernet for å tilveiebringe en farveløs olje (191 mg), som ble kromatografert på en silika gelkolonne. Eluering med en oppløsningsmiddelblanding av metanol: kloroform: 1% ammoniumhydroksid (aq.) med metanolinnholdet ble økt fra 10% til 99% ga rent produkt AF190 som en olje som stivnet ved avkjøling. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1.57-1.84 (m, 4H); 1.93 (s, $\text{CH}_3\text{C=N-}$); 2.17-2.33 (m, 2H); 2.29 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2.56 (m, 2H); 3.37 (s, $-\text{CH}_2\text{-N-}$) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3) 15.2 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{N}$ -); 37.3 (C_3 & C_5); 46.1 (CH_3N -); 52.5 (C_2 & C_6); 59.7 (C_4); 63.7 ($-\text{CH}_2\text{N}$ -); 162.1 ($-\text{C}=\text{N}$ -) ppm.

MS m/e 167 (M^+); 152 ($\text{M}-\text{CH}_3$); 138; 109(100%); 97; 96; 72; 71; 70.

IR (neat) 3260; 2933; 2852; 2800; 1620 ($-\text{C}=\text{N}$ -) cm^{-1} .

5

Eksempel 23: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'(5')-[2'-metyl-4'H(5'H)-imidazol-5'(4')-one] AF230.

4-acetamido-4-cyano-1-metylpiperidin (1.03 g) ble oppløst i konsentrert svovelsyre (4.0 ml) og latt stå ved romtemperatur i 4 dager. Reaksjonsblandingen ble tilsatt til kaldt vann (10 ml) og deretter ble bariumkarbonat tilsatt helt til det ikke fremkom noen reaksjon. Presipitert bariumsulfat ble filtrert ut og vasket med vann og etanol. pH til det kombinerte filtratet og vaskingenen ble justert til 13 med konsentrert NaOH oppløsning, og oppløsningsmidlene ble fjernet under redusert trykk. Resten ble ekstrahert med etanol, ekstraktet ble avdampet og resten ble ekstrahert med diklormetan. Ekstraktet ble avdampet for å tilveiebringe en olje (0.75 g), som ble kromatografert på en silika gelkolonne 60 (Merck 0.040-0.963 mm, 32 g). Eluering med 1:9 metanol (inneholdende 15% w/w NH_3)-kloroform ga ren AF230 (0.185 g), krystallisert fra diklormetaneter smp. 231-234°C.

^1H -NMR (CDCl_3) δ 1.49 (m,2H), 1.97(m,2H), 2.20(s, CH_3 -), 2.34(s, CH_3 -), 2.48(m,2H), 2.80(m,2H), 9.83(br,-NH-) ppm.

^1H -NMR(D_2O) δ 1.55 (m, 2H), 1.88(m,2H), 2.22 (s, CH_3 -), 2.29(s, CH_3 -), 2.33(m,2H), 2.90(m,2H) ppm.

MS m/e 181 (M^+): 111 (M^+-70); 104; 94; 77; 71(100%); 70.

UV (EtOH) $\text{Lambda}_{\text{max}}$ 224 nm. (ϵ 4650), 248 nm, (ϵ 2450). IR (KBr) 3140; 2795; 2540; 1665; 1540 cm^{-1} .

Cyklisering av 4-acetamid-4-cyano-1-metylpiperidin kunne også bli oppnådd i basisk medium. Tilbakestrømning av denne forbindelsen i 1N etanolisk KHO eller i vandig 1N NaOH ga også AF230. I det sistnevnte tilfellet ble det også oppnådd 4-acetamido-4-karbamoyl-1-metylpiperidin, smp. 207-208°C (dek.) krystallisert fra diklormetan-metanol.

^1H -NMR (CDCl_3) δ 2.05(CH_3CO -), 2.08-2.30 (m, 6H), 2.28 (CH_3N -), 2.63 (m, CH_2 -), 5.40(brs, -NH-), 5.56 (brs, -NH-), 7.04 (brs, -NH-) ppm.

MS m/e 199 (M^+); 181 ($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$); 155 (M^+-CONH_2); 140 ($\text{M}^+-\text{CH}_2\text{CONH}_2$); 122; 112; 111; 96; 71(199%); 70.

35

AF230 kan eksistere i form av tautomerer, som angitt av tittelen.

Eksempel 24: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2'-oksazolin-4'-one), AF238.

(a) 4-acetamidokarbonyl-4-acetoksy-1-metylpiperidin

Til en blanding av 4-cyano-4-hydroksey-1-metylpiperidin (2.55 g, 18 mmol) og eddiksyreanhydrid (11 ml, 108 mmol) i en tre-halset flasket ble 5.1 g (2 ekvivalenter) av en en 60% oppløsning av perklorsyre (HClO₄) dråpevis tilsatt. En eksoterm reaksjon oppsto, men temperaturen falt etter 20 minutter. Oppløsningen ble omrørt i 2 timer og ble latt stå over natt ved romtemperatur. Det hvite presipitatet ble filtrert ut og vasket med eter og petroleumeter. Perklorsyresaltet av 4-acetamidokarbonyl-4-acetoksy-1-metylpiperidin ble oppnådd i nesten kvantitativt utbytte. ¹H-NMR (perklorsyre) (D₂O) δ 2.2-2.4(m,2H), 2.26(s,3H), 2.27 (s,3H), 2.5(m,2H), 2.95(s,3H), 3.32(m,2H), 3.58(m,H) ppm.

¹H-NMR [fri base] (CDCl₃) δ 2.05-2.27(m,4H), 2.13(s,3H), 2.28(s,3H), 2.67-2.75(m,4H), 8.4(bs,1H,NH) ppm.

MS m/e 242 (M⁺); 182, 167, 139, 123(100%), 114, 96, 82, 70, 60.

UV (H₂O) lambda_{max} 206 nm. (ε 20400).

IR (KBr) 3380, 3020, 1740, 1670(sh), 1550, 1400, 1380, 1250 cm⁻¹.

(b) 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2'-oksazolin-4'-one), AF238.

20

Perklorsaltet av 4-acetamidokarbonyl-4-acetoksy-metylpiperidin (70 mg, 0.25 mmol) i xylene ble oppvarmet ved 172°C (silikonoljebad temperatur), i det det hvite suspenderte faste stoffet ble gult. En sterkt lukt av eddiksyre fremkom i løpet av reaksjonen. TLC viser total omdanning til 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2'-oksazolin-4'-one),

25 AF238, som blir karakterisert som perklorsyresaltet

¹H-NMR (D₂O) δ 2.2(m,3H), 2.25(m,2H), 2.45(m,2H), 2.8(s,3H), 3.25(m,2H), 3.5(m,2H) ppm.

MS m/e 182 (M⁺); 140, 123, 112, 104, 96, 77, 70(100%).

30 Eksempel 25: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(1'-metyl-3'-etylhydantoin), AF161.

Til en blanding av AF160 (100 mg, 0.47 mmol) og KH (100 mg, 35% w/w i mineralolje) i 5 ml DMF, ble det tilsatt metyl p-toluensulfonat (0.4 g, 1 mmol), oppløsningen ble omrørt i 10 minutter ved romtemperatur og surgjort med oksalsyre i eter. Presipitatet ble oppløst i vann, gjort basisk og ekstrahert med petroleumeter, og ekstraktene ble konsentrert og kromatografert på silika ved anvendelse av 90:10:1 kloroform/metanol/vandig ammoniak. De rene fraksjonene ble kombinert og avdampet, og resten ble oppløst i eter og presipitert som et HCl salt (85 mg, utbytte 72%).

35

$^1\text{H-NMR}$ (fri base, CDCl_3) δ 1.2 (t, $J=6\text{Hz}$, 3H), 1.6-1.65 (m, 2H), 2.0-2.1(m,2H), 2.39(s,3H), 2.75-2.85(m,4H), 2.86(s,3H), 3.55(q, $J=6\text{Hz}$,2H) ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (HCl salt, D_2O) δ 1.2 (t, $J=6\text{Hz}$,3H), 2.1-2.15(m,2H), 2.3-2.4(m,2H), 2.95(s,3H), 3.0(s,3H), 3.5(q, $J=6\text{Hz}$,2H) ppm.

5 MS m/e 225 (M^+ 18%); 71(100%).

Eksempel 26: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(1',3'-dietylhydantoin) AF162.

Til en blanding av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin (110 mg, 0.6 mmol) og KH (0.2 gm 35% i mineralolje w/w) i 3 ml DMF ble det tilsatt etylbromid (0.5 g, 4.6 mmol), oppløsningen ble omrørt i 30 minutter ved romtemperatur, fortynnet med eter og surgjort med overskudd oksalsyre. Presipitatet ble oppløst i vann, gjort basisk og ekstrahert flere ganger med kloroform, og ekstraktene ble kombinert, konsentrert og kromatografert på silikagel ved anvendelse av en gradient av kloroform og 90:10:1

15 kloroform/metanol/vandig ammoniakk, for å tilveiebringe ren AF162 (60 mg, utbytte 42%).

$^1\text{H-NMR}$ (fri base, CDCl_3) δ 1.2(t, $J=6\text{Hz}$,6H), 1.65-1.7(m,2H), 1.96-2.15(m,2H), 2.4(s,3H), 2.5-2.6(m,4H), 3.3(q, $J=6\text{Hz}$,2H), ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (HCl salt, D_2O) δ 1.15 (t, $J=6\text{Hz}$,6H), 2.05-2.15(m,2H), 2.25-2.35(m,2H), 2.9(s,3H), 3.3(q, $J=6\text{Hz}$,3H) ppm.

20 $^{13}\text{C-NMR}$ (HCl salt, D_2O) δ 14.0; 28.6; 35.0; 44.0; 52.7; 59.2; 157.0; 177.0 ppm.

MS m/e 239 (M^+ 75%); 71(100%).

Eksempel 27: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyltio-5'-metoksy-4'H-imidazol) AF191

1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2',5'-dimetyltio-4'H-imidazol) AF177 (0.700 g, 2.881 mmol) og natriummetoksid (0.360 g, 6.667 mmol) ble oppvarmet under tilbakeløp i metanol (15 ml) i 3.5 timer. Gassutvikling ble observert. Oppløsningsmiddelet ble fjernet fra reaksjonsblandingen og resten ble ekstrahert med diklormetan. Det organiske ekstraktet ble avdampet for å tilveiebringe en fast rest (0.613 g) som ble ekstrahert med varm petroleumeter. En oppløsning ble avdampet fra ekstraktet for å fjerne et residie (0.263 g) som ga ren AF191 ved krystallisering fra petroleumeter, smp. 84-85°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1.40(m,2H); 1.97 (m,2H); 2.36 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2.52(s, $\text{CH}_3\text{S-}$); 2.53(m,2H); 2.70-2.80(m,2H); 4.10(s, $\text{CH}_3\text{O-}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 13.6 ($\text{CH}_3\text{S-}$); 32.3(C_3); 46.2($\text{CH}_3\text{N-}$); 51.9(C_2); 57.9($\text{CH}_3\text{O-}$); 74.2(C_4); 171.6($-\text{N}=\text{C}-\text{SCH}_3$); 196.0($-\text{N}=\text{C}-\text{OCH}_3$) ppm.

35 MS m/e 228 M^+ + 1).

Eksempel 28: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyltio-5'-amino-4'H-imidazol) AF192

En oppløsning av AF177 (0.411 g) et reagens (15 ml) dannet ved oppløsning av ammoniakk i metanol (15% w/w) ble omrørt i 3 dager ved romtemperatur.

Reaksjonsblandingen ble avdampet og en frisk 15 ml porsjon reagens ble tilsatt til resten,

5 og reaksjonen ble gjentatt 2 x ganger. Til slutt ble reaksjonsblandingen avdampet under redusert trykk, og den faste resten ble vasket med acetone for å tilveiebringe AF192, et hvitt fast stoff (0.266 g), smp. >240°C (dek.) (fra etanol).

¹H-NMR(D₂O) 1.48(m,2H); 1.89(m,2H); 2.29(s,CH₃N-); 2.46(m,2H); 2.48(s,CH₃S-); 2.86(m,2H) ppm.

10 MS m/e 212M⁺; 142 (M⁺ - 70); 70.

Eksempel 29: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyltio-5'-aminometyl-4'H-imidazol)

AF193 og 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2',5'-bis(aminometyl)-4'H-imidazol) AF194

En oppløsning av AF177 (0.338 g) i vandig metylamin (5.0 ml; 35%) ble oppvarmet til

15 80°C i 2 timer. Vannet og reagens i overskudd ble fjernet ved avdampning under redusert trykk og resten ble kromatografert på en silikagel kolonne (Merck 60, 0.040-0.06 mm).

Eluering med en 80:20:1 oppløsningsmiddelblanding av kloroform/metanol/aq.

ammoniakk ga AF193 som et hvitt fast stoff (0,061 g). Krystallisering fra acetonitril ga smp. 193-194°C.

20 ¹H-NMR (CDCl₃) 1.44(m,2H); 1.85(m,2H); 2.38 (s, CH₃N-); 2.52 (s, CH₃S-); 2.66(m,2H); 2.81(m,2H); 3.06(s, CH₃NH-); 6.47(-NH-) ppm.

MS m/e 226 M⁺; 179(M⁺-CH₃S); 170 (M⁺-CH₃NHCN); 169; 156(M⁺-70).

Eluering med en 50:50:1 oppløsningsmiddelblanding av kloroform/metanol/aq.

25 ammoniakk ga AF194 som et hvitt fast stoff (0.130 g). Krystallisering fra acetonitril ga smp. 113-114°C.

¹H-NMR(CDCl₃ + CD₃OD) 1.44(m,2H); 1.81 (m,2H); 2.37 (s, CH₃N-); 2.57(m,2H); 2.80(m,2H); 2.95(s,CH₃NH-); 2.96(m,CH₃NH-) ppm.

MS m/e 209 M⁺; 152; 139 (M⁺-70).

30

Ved gjentakelse av ovennevnte reaksjon, men ved anvendelse av to mol metylamin for hvert mol AF177 var oppnådd hovedprodukt AF193 med bare spor av AF194.

Eksempel 30: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyl-2'-oksazolin) AF150

(a) 1-metyl-4-nitrometylpiperidin-4-ol hydroklorid

Dette utgangsmaterialet ble dannet ved anvendelse av en liten modifikasjon av metoden til A.D. Cale (US-PS 4.746.655, 1988). En blanding av N-metylpiperidinon (142 g, 1.28 mol) og nitrometan (78.1 g, 1.28 mol) ble tilsatt til en godt omrørt oppløsning av natriumetoksid (1.28 mol), 20% i etanol, ved å opprettholde den indre temperaturen på 5-8°C. Et hvitt fast stoff ble presipitert, røringen fortsatte i 20 minutter og ytterligere 40 minutter ved romtemperatur. Den resulterende oppløsningen ble gjort sur med 500 ml 7.2 N HCl i isopropylalkohol. Hydrokloridet og uorganiske salter ble ekstrahert med CH₃OH (2x200 ml) og oppløsningsmiddelet fjernet i vakuum for å tilveiebringe tittelforbindelsen, smp. 180-182°C (ikkehygroskopisk).

m/z: 174 (M⁺ fri base, 100%), 157 (M-OH, 20%), 127 (M-H-NO₂), 25%, 113 (M-NO₂-CH₃, 40%).

(b) 4-aminometyl-1-metylpiperidin-4-ol hydroklorid

Palladium på trekull (10%, 4 g) ble porsjonsvis tilsatt til en oppløsning av 1-metyl-4-nitrometylpiperidin-4-ol (133.5 g) i metanol (1500 ml). Forbindelsen ble hydrogenert i en Paar ved et trykk på 55 psi ved romtemperatur i 48 timer. Oppløsningen ble forsiktig filtrert, behandlet med aktivt trekull, oppløsningsmiddelet fjernet og resten ble tritureret med etanol (200 ml) for å tilveiebringe tittelforbindelsen, smp. 177-179°C.

m/z: 144(M⁺ fri base, 15%), 127 (M-OH, 25%), 114 (M-CH₂NH₂, 100%).

(c) 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyl-2'-oksazolin) AF150

En oppløsning av KOH (1,43 g, 86%) i metanol (50 ml) ble tilsatt til en oppløsning av 4-aminometyl-1-metylpiperidin-4-ol hydroklorid (3.61 g, 0.02 mol) i absolutt metanol (50 ml). Etter omrøring i 10 minutter ble en oppløsning av etylacetimidathydroklorid (2.7 g) i 20 ml absoluttmetanol tilsatt, og omrøringen ble fortsatt i 30 minutter ved romtemperatur. Oppløsningsmiddelet ble fjernet, og gjenværende fast stoff ble løst opp i en oppløsning av 2.8 g Na₂CO₃ i 50 ml vann, som ble konsentrert til tørrhet i vakuum.

Det hvite faste stoffet ble ekstrahert med 2 x 50 ml kloroform, behandlet med aktivt trekull, tørket (Na₂SO₄) og oppløsningsmiddelet fjernet for tilveiebringe tittelproduktet (62.5% utbytte), smp. 45°C (sublimerte ved 40°C/0.05 mm Hg), for tilveiebringning av en enkelt flekk på silika TLC eluert med 2% NH₃ i CH₃OH, R_f=0.4.

m/z: 168 (M⁺ fri base, 100% ved 7.5 ev.).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.56 (2H, q, J=1.5 Hz), 2.53 (4H, m), 2.34 (3H, s), 1.96 (3H, t, 1.5Hz), 1.82 (4H, m).

Erstatning av KOH anvendt i dette eksempelet med ekvivalent mengde NaOH eller Et₃N ga lignende resultater.

(d) AF150-dibenzoyl-D-tartrat

5 En varm oppløsning av dibenzoyl-D-tartratsyre (5.4 g, 15 mmol) i 500 ml toluen ble tilsatt med omrøring til AF150 (5.5 g, 32 mmol) oppløst i 200 ml tørr toluen. Presipitatet ble satt og supernantvæsken ble dekantert av. Gjenværende fast stoff ble vasket med 3 x 100 ml tørr toluen og tørket under redusert trykk for å tilveiebringe 8.4 g (80% utbytte) av hvitt delvis hygroskopisk fast stoff.

10 TLC kloroform/aluminium (Merck Art 5581) R_f=0.4.

m/z: 168 (M⁺)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O inneholdende 1.5 mg. Na₂CO₃/0.5 ml. D₂O): δ 1.95 (s, 6H, CH₃-C), 2.35 (s, 6H, CH₃-N), 3.5 (s, 4H, CH₂), 5.7 (s, 2H), 7.5-8.2 (m, 10H, aromatiske hydrogenener).

15

Eksempel 31: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-etyl-2'-oksazolin) (2'-etylanalog av AF150). Denne forbindelsen ble fremstilt som forbindelsen i eksempel 31 ved anvendelse av ekvivalent mengde etylpropionimidathydroklorid, i stedet for etylacetimidathydroklorid. Produktet ble oppnådd som en væske, kp. 53°/0.03 mm Hg, i 60.5% utbytte.

20 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.52 (2H, t, J=1.5 Hz), 2.47 (4H, m), 2.30 (3H, s), 2.26 [2H, kvartett (J=7 Hz), tripletter (J=1.5Hz)], 1.86 (2H, m), 1.72 (2H, m), 1.18 (3H, t).

Eksempel 32: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2'-oksazolin) AF151

(a) 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin

25 En blanding av oppløsninger av 1-metylpiperidin-4-one (36.44 g, 0.322 mol) i etanol (150 ml), ammoniumkarbonat (93.0 g, 0.968 mol) i vann (400 ml) og kaliumcyanid (25.8 g, 0.396 mol) i vann (82 ml), ble oppvarmet ved 60°C i 2,5 timer og deretter latt stå i romtemperatur over natt, i det 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin separerte. Det ble filtrert av og vasket med små mengder kaldt vann, etanol og eter, for å tilveiebringe et

30 krystallinsk pulver (27.0 g). Konsentrering av filtratet og vaskingene ga en annen avling (20.0 g). Produktet ble krystallisert fra metanol: smp. 265-276°C (dek.).

IR (KBr) 3170 (NH); 1700 (C=O) cm⁻¹

m/z 183(M⁺, 38%); 71 (100%)

35 ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ 1.8 (2H), 2.06 (sekkstett, 2H), 2.49 (s, -CH₃), 2.58 (t, 2H), 3.14 (t, 1H), 3.20 (t, 1H).

(b) 4-amino-1-metylpiperidin-4-karboksylsyre

1-metylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin (9.75 g, 0.0533 mol) og bariumhydroksidoktahydrat (28.8 g, 0.00913 mol) i vann (150 ml) ble oppvarmet ved 160°C i en autoklav i tre timer. Inneholdet av fire slike batcher ble kombinert og presipitert bariumkarbonat ble filtrert ut. Filtratet ble nøytralisert med fast karbondioksid og presipitatet ble fjernet ved filtrering. Filtratet ble konsentrert til et lite volum for å tilveiebringe 4-amino-1-metylpiperidin-4-karboksylsyre (32.0 g, 95% utbytte), smp. 275-280°C (dek.).

IR (KBr) 3300, 1655, 1580 cm^{-1}

m/z 158(M^+ , 90%); 141 (98% m M-OH); 113 (12%, M-CO₂H); 96 (100%); 71(52%)

¹H-NMR (300 MHz, C₅D₅N + D₂O): δ 1,2 (m, 2H), 1.48 (s, CH₃N-), 1.7 (m, 2H), 1.9 (m, 2H), 2.0 (m, 2H).

(c) 4-amino-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin

Litiumaluminium hydridpulver (15.62 g, 0.412 mol) i tørr tetrahydrofuran (THF) (600 ml) ble oppvarmet under tilbakesløp i 15 minutter hvorefter 4-amino-1-metylpiperidin-4-karboksylsyre (31.0 g, 0.196 mol) i form av tørt pulver ble porsjonsvis tilsatt under nitrogen, med effektiv omrøring. Etter at tilsetningen var fullført ble reaksjonsblandingen oppvarmet under tilbakesløp i 4 timer, avkjølt til 0°C under nitrogen med effektiv omrøring, opparbeidet ved forsiktig sakte tilsetning av vann (20 ml), 15% vandig NaOH (20 ml) og på nytt vann (10 ml). Reaksjonsblandingen ble filtrert og presipitatet ble ekstrahert med kokende THF (3 x 150 ml). THF filtratet og ekstraktene ble kombinert og oppløsningsmiddelet fjernet ved 25 mm for å tilveiebringe en gul viskøs olje (28.0 g, 98.9% utbytte).

IR (neat) 3320 (NH), 3200 (br. OH), 1587 (NH₂), 1468, 1448 cm^{-1}

m/x 144(M^+ , 15%); 127 (M-OH); 113 (M-CO₂H); 96 (100%), 70 (41%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.41 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 2.24 (s, CH₃-N), 2.29 (m, 2H), 2.48 (m, 2H), 2.50 (br. -NH₂), 3.29 (s, -CH₂OH).

(d) 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2'-oksazolin) AF151

En blanding av 4-amino-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin (1.80 g) med eddiksyre (20 ml) og xylen (20 ml) ble azeotropisk destillert i 28 timer. Gjenværende eddiksyre og xylen ble fjernet ved redusert trykk (25 mm Hg) for å tilveiebringe en residual viskøs olje som ble gjort basisk til pH 11 med en vandig oppløsning av K₂CO₃. Ekstrahering med kloroform og avdampning av ekstraktet ga en liten mengde gjenværende brun olje (0.27 g). Den vandige oppløsningen som var igjen etter kloroformekstrahering ble avdampet for å fjerne vann, gjenværende fast stoff ble ekstrahert med kloroform og ekstraktet ble

tørket (Na_2SO_4) og avdampet, for å tilveiebringe som rest et meget hygroskopisk fast stoff (3.0 g). TLC viste at sistnevnte ga hovedsakelig en flekk, som var mere polar enn utgangsamino-alkohol. En del av det hygroskopiske faste stoffet som smeltet ved 150-160°C ble oppvarmet under vakuum, og begynte nesten øyeblikkelig å destillere som en farveløs olje ved 45°C/0.15 mm Hg. Denne oljen, ved oppbevaring i fryser, dannet krystallinske nåler som smeltet ved romtemperatur. Destillatet var eddiksyresaltet av tittelforbindelsen.

IR (neat) 1664 (-C=N); 1565 & 1398 (-CO_2^-); 1236 (C-O) cm^{-1}

m/z 168(M^+ fri base); 109; 70.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.77 (m, 2H), 1.96 (m, 2H), 1.98 (s, CH_3^-), 2.0 (s, CH_3^-), 2.49 (s, $\text{CH}_3\text{-N-}$), 2.91 (m, 4H), 3.95 (s, $\text{-CH}_2\text{O-}$), 9.30 (br, s, $\text{-CO}_2\text{H}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 14.0 (CH_3CO_2^-), 22.9 ($\text{CH}_3\text{C=N-}$), 35.6 (C_3 og C_5), 44.4 (CH_3N^*), 51.1 (C_2 og C_6), 67.0 (C_4), 77.4 (C_5'), 164.3 (C=N), 176.7 (-CO_2^-).

$^1\text{H-NMR}$ fri base (300 MHz, CDCl_3): δ 1.64 (m, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.98 (s, CH_3^-), 2.26 (m, 2H), 2.30 (s, CH_3^-), 2.69 (m, 2H), 3.94 (s, -CH_2^-).

Eksempel 33: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-etyl-2'-oksazolin) (2'-etylanalog av AF151)

En blanding av 4-amino-4-hydroksymetyl-1-metylpiperidin (3.0 g) med propionsyre (50 ml) og xylene (90 ml) ble azeotropisk destillert i 5 timer. Resten (7 ml) ble gjort basisk til pH 11-12 med en vandig oppløsning K_2CO_3 . Ekstrahering med kloroform og avdampning av ekstraktet ga en blanding av ikke-polare forbindelser (0,8 g). Den vandige oppløsningen som var igjen etter kloroformekstrahering ble avdampet for å fjerne vann, gjenværende fast stoff ble ekstrahert med kloroform og ekstraktet ble tørket (Na_2SO_4) og avdampet, for å tilveiebringe som rest et hygroskopisk fast stoff (3.6 g).

TLC viste at sistnevnte ga hovedsakelig en flekk som var mer polar enn utgangsaminoalkohol (silikagel, oppløsningsmiddel 40:58:2 metanol-kloroform-vandig ammoniakk). En porsjon av det hygroskopiske faste stoffet (1.5 g) ble oppvarmet under vakuum, og begynte nesten øyeblikkelig å destillere som en viskøs farveløs olje ved 50°C/0.1 mm Hg. Destillatet er propionsyresaltet av tittelforbindelsen.

m/z 182(M^+ fri base, 14%); 167 (5%), 154 (71%), 125 (9%), 109 (100%), 96 (45%), 81 (30%), 74 (57%), 70 (89%), 57 (64%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.12 (t, $J=7.5$ Hz, CDCH_2^-), 1.17 (t, $H=7.6$ Hz, CH_3CH_2^-), 1.75 (m, 2H), 2.00 (m, 2H), 2.29 (q, $J=7.5$, CH_3CH_2^-), 2.30 (q, $J=7.6$, CH_3CH_2^-), 2.56 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 3.02 (m, 2- CH_2^-), 3.95 (s, $\text{-CH}_2\text{O-}$), 7.52 (br, $\text{-CO}_2\text{H}$).

Til en omrørt oppløsning av ovennevnte propionsyresalt (700 mg) i CHCl_3 , ble en mettet vandig oppløsning K_2CO_3 tilsatt helt til utvikling av CO_2 var opphørt.

Blandingen ble deretter omrørt i 0,5 timer og fasene ble separert. Den vandige fasen ble ekstrahert med CHCl_3 , kombinert separert CHCl_3 fase og ekstraktene ble tørket

5 (Na_2SO_4) og oppløsningsmiddelet ble avdampet for å tilveiebringe tittelforbindelsen (fri base) som en residual farveløs olje (550 mg), som viste en enkelt flekk på TLC.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.17 (t, $J=7.6$ Hz, CH_3CH_2-), 1.61 (m, $-\text{CH}_2-$), 1.86 (m, $-\text{CH}_2-$), 2.18 (m, $-\text{CH}_2-$), 2.29 (q, $J=7.6$, CH_3CH_2-), 2.30 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2.71 (m, $-\text{CH}_2-$), 3.94 (s, $-\text{CH}_2\text{O-}$).

10 m/z 182(M^+ 25%), 167 (9%), 154 (78%), 125 (17%), 109 (100%), 96 (65%), 81 (54%), 70 (96%), 57 (77%).

En alternativ vei til forbindelsene så som AF150 og AF151 avhenger av

cyklodehydrering av hensiktsmessige amider. Dehydreringsmidlene så som P_2O_5 ,

15 svovelsyre, BF_3 -eterat, CaCl_2 og molekylær sikter, kan bli anvendt for ovennevnte reaksjoner. Tilsvarende tiazoliner i stedet for oksazoliner kan bli oppnådd ved analoge reaksjoner ved anvendelse av P_2S_5 .

Eksempel 34: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2'-tiazolin) AF150(S).

20 (a) 4-acetamidometyl-4-hydroksey-1-metylpiperidin

4-aminometyl-4-hydroksey-1-metylpiperidin (0.83 g, 5.7 mmol) ble løst opp i 10 ml CHCl_3 , og eddiksyreanhydrid (0.58 g, 5.7 mmol) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble varmet spontant til 40-50°C. Etter 30 minutter ble oppløsningsmiddelet avdampet og den rå resten ble kromatografert på en silika gelkolonne (Merck 7734), ved anvendelse som

25 elueringsmiddel 33:67 2% aq. ammoniakk-metanol.

m/z 186 (M^+)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.60 (multiplett, 4H, H3 og H4), 2.01 (singlett, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 2.29 (singlett, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 2.38 (multiplett, 2H, H1), 2.55 (multiplett, 2H, H2), 2.98 (multiplett, 1H, NH), 3.26 (dublett, 2H, H5) ppm.

30 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ 1.42 (multiplett, 4H, H3 og H4), 1.81 (singlett, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 2.08 (singlett, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 2.27 (multiplett, 2H, H1), 2.46 (multiplett, 2H), 3.03 (singlett, 2H, H) ppm.

Urenheten gir en topp på 3.44 ppm.

(b) 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2'-tiazolin) AF150(S)

En blanding av 4-acetamidometyl-4-hydroksey-1-metylpiperidin (6.5 g, 35 mmol) med fosforpentasulfid (10 g, 22 mol) ble oppvarmet ved 220°C i 30 minutter, avkjølt og oppløst i 30 ml. konsentrert aq. HCl. Oppløsningen ble blandet med 100 ml kald

5 konsentrert aq. NaOH, ekstrahert med 2 x 100 ml. CHCl₃, og kombinerte ekstrakter ble tørket og avdampet for å tilveiebringe 5 g av en svart oljeholdig rest, som ble rensert ved destillering ved 75°C/1mm Hg for å tilveiebringe 1.8 g klar væske.

m/z: 184 (M⁺)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.8-2.0 (m, 4H), 2.17 (t, 3H, CH₃-C), 2.2 (s, 3H, CH₃-N), 3.9 (q, 2H, CH₂-tiazolin ring).

Eksempel 35: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tion-3'-etylhydantoin) AF181

Til en oppløsning av 4-amino-1-metylpiperidin-4-karboxylsyre (1.78 g, 0.0113 mol) og natriumhydroksid (0.47 g, 0.0118 mol) i vann (3.0 ml), ble etylisotiocyanat (1.00 g, 0.011 mol) tilsatt og blandingen ble oppvarmet under tilbakesløp i 6.5 timer.

Reaksjonsblandingen ble surgjort til pH 1 med konsentrert saltsyre og tilbakestrømmingen fortsatte i ytterligere 1,5 timer. Ved henstand ved romtemperatur deponerte reaksjonsblandingen et fast stoff (0,61g) som ble krystallisert fra metanol for å tilveiebringe krystaller (83 mg) smp. >260°C. ¹H-NMR spekteret til dette faste stoffet viste at det er saltsyresaltet av AF181.

¹H-NMR (D₂O) δ 1.16(t, J=7.2Hz, CH₃CH₂-); 2.0-2.4 (m,4H); 2.94 (s, CH₃N-); 3.20 (m, 1H); 3.4-3.74 (m, 3H); 3.80 (q, J=7.2Hz, CH₃CH₂-) ppm.

Morvæsken som var igjen etter isolering og krystallisering av ovennevnte salt ble

25 kombinert, gjort basisk til pH 13 med konsentrert vandig natriumhydroksid oppløsning og deretter ekstrahert med diklormetan. Ekstraktet ble tørket (Na₂CH₃) og avdampet for å tilveiebringe et gult fast stoff som ble kromatografert på en silikagel kolonne (Merck 60 0.04-0.06 mm). Eluering med kloroform/metanol/ammoniumhydroksid (aq.)

96:3:1 ga først 1,3-dietyl-2-tiourea (0.287 g) smp. 76-78°C (krystaller fra eter) og

30 deretter 8-metyl-3-etyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]dekan-4-one-2-tion (AF181) (135 mg) som fri base. Det ble krystallisert fra eter-diklormetan for å tilveiebringe nåler smp. 180°C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.24 (t, J=7.2Hz, CH₃CH₂-); 1.69(m,2H); 2.05-2.30 (m,4H); 2.35 (s, CH₃N-); 2.90(m,2H); 3.87 (q,J=7.2Hz, CH₃CH₂-) ppm.

MS m/e 227(M⁺); 71; 70.

Eksempel 36: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tion-3'-t-butylhydantoin) AF184

En blanding av 4-amino-1-metylpiperidin-4-karboksylysyre (1.80 g, 0.0114 mol) og t-butylisotiocyanat (1.00 g, 0.0087 mol) i vann (3.0 ml) ble oppvarmet ved 80°C i 5 timer.

I det reaksjonen ifølge TLC ikke var fullført ble etanol (4.0 ml) tilsatt og

- 5 reaksjonsblandingen ble oppvarmet under tilbakeløp i ytterligere 1 time. Det ble surgjort til pH 1 med konsentrert saltsyre og tilbakestrømmingen fortsatt i ytterligere 1 time. Etter henstand over natt ved romtemperatur ble et presipitat separert og det ble filtrert for å tilveiebringe utgangsaminoxyre (0.60 g). Morvæsken ble avdampet og resten gjort basisk med konsentrert vandig natriumhydroksidopløsning, deretter ekstrahert med
- 10 diklormetan. Det organiske ekstraktet ble tørket (Na₂SO₄) og oppløsningsmiddelet fjernet for å tilveiebringe et krystallinsk fast stoff (0,101 g), nåler fra eter-diklormetan, smp. 200-201°C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.63 (m, 2H); 1.81 [s, (CH₃)₃C-]; 2.00-2.21 (m, 4H); 2.33 (s, CH₃N-); 2.87(m,2H); 7.82(bs, -NH-) ppm.

- 15 MS m/e 255(M⁺); 199(M⁺); 199(M⁺-C₄H₈); 96; 71; 07; 57.

Eksempel 37: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-t-butylhydantoin) AF213

Tittelforbindelsen ble syntetisert på lignende måte som AF181. Produktet ble oppnådd som saltsyresaltet av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-t-butylhydantoin) AF213 og ble

20 krystallisert fra metanol, smp. 300-303°C (dek.).

¹H-NMR (D₂O) δ 1.55 [s, (CH₃)₃C-]; 2.01 (m, 2H); 2.22(m, 2H); 2.92 (s, CH₃N-); 2.97-3.5 (m, 2H); 3.62 (m, 2H) ppm.

Den frie basen som ble oppnådd ble krystallisert fra eter-diklormetan og hadde en smp.

25 221-223°C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.57 (m, 2H); 1.60 [s, (CH₃)₃C-]; 2.01-2.18 (m, 4H); 2.31 (s, CH₃N-); 2.88 (m, 2H); 4.77 (bs, -NH-) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 29.6[(CH₃)₃C-]; 33.5(C₆&C₁₀); 46.2 (CH₃N-); 51.0(C₇&C₉); 57.5 og 58.1 [C₅&(CH₃)₃C-]; 158.4(C₂); 177.4 (C₄) ppm.

- 30 MS m/e 239(M⁺); 237; 224(M⁺-CH₃); 194; 181; 155; 110; 104; 71; 56; 43.

Eksempel 38: 1-propargylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etylhydantoin) AF196

En blanding av piperidin-4-spiro-5'-(3'-etylhydantoin) (AF160)DES (40.9 mg, 0.21 mmol) og propargylbromid (24.7 mg, 0.21 mmol, 80% w/w i toluen) ble omrørt i

- 35 metanol (1.0 ml) ved 25°C i 24 timer. Metanol ble fjernet av en nitrogenstrøm, og resulterende masse gjort basisk med vandig natriumkarbonat og ekstrahert med kloroform. Kloroformekstraktene ble avdampet og resten ble rensset på en preparativ

silika-gelplate (kloroform/metanol/vandig ammoniakk 90/10/1) og presipitert av et
overskudd oksalsyre for å tilveiebringe et krystallinsk fast stoff (29 mg).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , oksalsyresalt) δ 1.12 (t, 3H, $J=6\text{Hz}$, CH_3CH_2-); 2.1-2.35 (m, 6H);
3.12(t, 1H, $J=3.5\text{Hz}$); 3.5(q, $J=6\text{Hz}$, CH_3CH_2-); 3,7-3.85(m, 2H); 4.12 (d, $J=3.5\text{Hz}$)
5 ppm.

MS m/e 235(M^+); 196($\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_3$); 95; 80; 67; 56.

Eksempel 39: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-[3'-(4-pyrrolidino-2-butynyl)hydantion] AF197.

En blanding av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-propargylhydantoin) (AF185) (204 mg,
10 0.92 mmol), pyrrolidin (88 mg, 1.23 mmol), paraformaldehyd (52 mg, 1.7 mmol) og
kuproklorid (4.2 mg) ble omrørt i dioksan (10 ml) i 70 timer ved romtemperatur.

Dioksan ble fjernet av en strøm nitrogen, resulterende masse gjort basisk med vandig
kaliumkarbonat og ekstrahert med kloroform. Kloroformekstraktene ble avdampet og 50
vekt-% av resten ble rensert på en preparativ silika-gel plate (kloroform/metanol/eter
15 vandig ammoniakk 150/20/100/6), krystallisert to ganger fra eter for å tilveiebringe et
krystallinsk fast stoff (25 mg).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , fri base) δ 1.12(m); 2.1-2.2(m); 2.35(s,3H); 2.6(m); 2.9-2.95(m);
3.4(t, 2H, $J=3.5\text{Hz}$); 4.15(t,2H, $J=3.5\text{Hz}$); 5.9(bs,1H) ppm.

MS m/e 304(M^+); 234($\text{M}^+-\text{C}_4\text{H}_8\text{N}$); 71($\text{C}_4\text{H}_9\text{N}^+$).

20

Eksempel 40: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-oksazolidin-3'-one) AF260.

En blanding av 1-metyl-4-piperidon (5.0 g, 44.2 mmol), etyl-(s)-laktat (5.75 g, 48.8
mmol) ammoniumkarbonat (6.38 g) og p-toluensulfonsyre (2.1 g) i toluen (100 ml) ble
forseglet i en rustfri ståltrykkbeholder og oppvarmet ved 107°C med omrøring i 24 timer.

25 Toluen ble fjernet fra reaksjonsblandingen ved destillering og resten kromatografert på
en silika gelkolonne (Merck 60). Eluering med en oppløsningsmiddelblanding av
kloroform/metanol/ammoniumklorid 92:7:1 ga en fraksjon (1.01 g) som ble ytterligere
separert ved kromatografi på en silika gelkolonne. Eluering med en
oppløsningsmiddelblanding av kloroform/eter/metanol/ammoniakkhydroksid 54:37:7:2
30 ga et råprodukt (0.441 g), som ble krystallisert fra eter-petroleumeter og deretter fra
toluen for å tilveiebringe 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-oksazolidin-3'-one)
(AF260) som nåler (85 mg) smp. $148-150^\circ\text{C}$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.42(d, $J=6.6\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}-$); 1.85(m,4H); 2.31(s, $\text{CH}_3\text{N}-$); 2.52(m,
4H); 4.40(q, $J=6.6\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}-$); 7.64(bs, $-\text{NH}-$) ppm.

35 MS m/e 184(M^+); 156, 126, 114, 84; 71; 70; 43(100%).

Eksempel 41: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one) AF261; og
eksempel 42: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dimetyl-1',4'-tiazolidin-3'-one) AF266.

a) en blanding av 1-metyl-4-piperidon (5.65 g, 0.050 mol), tioleddiksyre (6.37 g, 0.060 mol) og ammoniumkarbonat (7.20 g) i benzen (150 ml) ble oppvarmet under tilbakeløp i
5 16 timer, i det et fast stoff sublimerste (ammoniumkarbonat) som kondenserte på utsiden av reaksjonsflasken. Fra tid til annen ble dette faste stoffet på ny tilsatt til

reaksjonsflasken sammen med en ytterligere porsjon av nytt ammoniumkarbonat (totalt 6.2 g). Til slutt ble benzen fjernet ved destillering og resten vasket med eter for å tilveiebringe et eteroppløselig materiale (0.76 g) og et uoppløselig materiale (12.9 g),
10 som ble oppløst i en liten mengde metanol og gjort basisk med en oppløsning av ammoniakk i metanol. Det ble avdampet og kromatografert på en silika gelkolonne (Merck 60). Eluering med en oppløsningsmiddelblanding av

kloroform/metanol/ammoniakk 89:10:1 ga en fraksjon (0,61 g) som ble identifisert som 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dimetyl-1',4'-tiazolidin-3'-one) AF266. Det er et
15 hygroskopisk fast stoff med lavt smeltepunkt.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.53(d, $j=7\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$); 1.69(m, 2H); 2.16-2.44(m, 4H); 2.32 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2.87(m, 2H); 2.90(s, $\text{CH}_3\text{NCO-}$); 3.79(q, $j=7\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 19.7($\text{CH}_3\text{CH-}$); 27.2 ($\text{CH}_3\text{NCO-}$); 36.0 og 37.3 (C6\&C10); 39.7(C2); 45.3($\text{CH}_3\text{N-}$); 51.8 og 52.2 (C7\&C9); 68.5 (C5); 172.8(C3) ppm.

20 Saltsyresaltet av AF266 ble oppnådd ved behandling av en oppløsning av fri base i eter med en oppløsning av saltsyre i isopropylalkohol for å tilveiebringe et hygroskopisk fast stoff som ble krystallisert fra isopropylalkohol smp. 238-240°C (dek.).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , HCl salt) δ 1.48(d, $j=7.2\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$); 2.05(m, 2H); 2.57 (m, 2H);
25 2.89 og 2.91 (2s, CH_3N^+ - og $\text{CH}_3\text{NCO-}$); 3.31 (m, 2H); 3.61 (m, 2H); 4.04 (q, $j=7.2\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$) ppm.

MS m/e 214(M^+); 181; 156; 125; 124; 96; 71; 70; 57(100%); 43.

Fortsatt eluering av kolonnen med en oppløsningsmiddelblanding av

30 kloroform/metanol/ammoniakk 85:14:1 ga en fraksjon (3.50 g) som ble krystallisert fra eter-diklormetan for tilveiebringning av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one) AF261 som nåler (1.83 g) smp. 133-134°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.53(d, $j=7\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$); 1.9-2.20(m,4H); 2.20-2.42(m,2H); 2.30(s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2.68 (m,2H); 3.85(q, $j=7\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$); 6.90(bs, -NH-) ppm.

35 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 19.9 ($\text{CH}_3\text{CH-}$); 41.0 og 41.3 (C6\&C10); 41.3 (C2); 45.7($\text{CH}_3\text{N-}$); 52.5 og 52.8 (C7\&C9); 63.6(C5); 176.3(C3) ppm.

MS m/e 200(M^+); 167, 140($\text{M}^+-\text{CH}_3\text{CHS-}$); 91; 71; 70; 69; 57.

Saltsyresaltet av AF261 ble oppnådd ved behandling av en oppløsning av fri base i eter med en oppløsning av saltsyre i isopropylalkohol, smp. 285-187°C.

¹H-NMR (HCl salt, i D₂O) δ 1.50 (d, j=7.1Hz, CH₃CH-); 2.17-2.44 (m, 4H); 2.89 (s, CH₃N-); 3.24 (m, 2H); 3.59 (m, 2H); 4.10 (q, j=7.1Hz, CH₃CH-) ppm.

b) En blanding av 1-metyl-4-piperidon (5.65 g, 0.060 mol), tioeddiksyre (6.37 g, 0.060 mol) og ammoniumkarbonat (7.20 g) i benzen (100 ml) ble forseglet i en rustfri ståltrykkbeholder og oppvarmet over natt ved 95°C med magnetisk omrøring.

Oppløsningsmiddelet ble fjernet fra reaksjonsblandingen og resten oppløst i en liten mengde metanol og applisert på en tørr silika gelkolonne (Merck 60, 200 g). Eluering med en oppløsningsmiddelblanding av kloroform/metanol/ammoniakk (aq.) 94:5:1 ga først AF266 (0.71 g) og deretter AF261 (3.02 g).

c) En blanding av 1-metyl-4-piperidon (2.50 g, 22.1 mmol), tioeddiksyre (2.81 g, 26.5 mmol) og metylamin (0.90 g, 29.0 mmol) i toluen (50 ml) ble forseglet i en rustfri ståltrykkbeholder og oppvarmet ved 96°C med omrøring i 24 timer. Reaksjonsblandingen er en viskøs olje hvorfra det ble separert et presipitat og en toluenoppløsning.

Oppløsningen ble separert og oppløsningsmiddelet fjernet ved destillering. Resten (1.68 g) ble destillert ved redusert trykk for å tilveiebringe ren 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'dimetyl-1',4'-tiazolidin-3'-one)AF266 k.p. 100°C (0.35 mm Hg) som et fast stoff (1.02 g) smp. 43-45°C.

Eksempel 43: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-etyl-1',4'-tiazolidin-3'-one) AF267; og eksempel 44: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-etyl-4-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one) AF272.

Tittelforbindelsen AF267 ble dannet som beskrevet for fremstilling av AF261 ved anvendelse av 2-merkaptosmørsyre i stedet for 2-merkaptopropionsyre (tioeddiksyre). Det ble krystallisert fra aceton smp. 140-141°C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.02 (t, j=7.2Hz, CH₃CH₂-); 1.75 og 2.06 (m, CH₃CH₂-); 1.98 (m, 4H); 2.30 (s, CH₃N-); 2.32 (m, 2H); 2.67 (m, 2H); 3.81 (dd, -CHS-); 6.35 (bs, -NH-) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 11.4(CH₃CH₂-); 27.1(CH₃CH₂-); 41.5(C6&C10); 45.8 (CH₃N-); 49.0 (C2); 52.7 og 52.9 (C7&C9); 63.7(E5); 175.5(c3) ppm.

MS m/e 214(M⁺); 181; 140; 71; 57.

Saltsyresaltet av AF267 hadde smp. 267-269°C (dek.). Som et biprodukt ble 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-etyl-4'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one)AF272 oppnådd som en viskøs olje.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.00(t, j=7.4Hz, CH₃CH-); 1.67 (m, 2H); 1.58-1.78(m) og 2.13(m) (CH₃CH₂-); 2.20-2.42 (m, 4H); 2.32 (s, CH₃N); 2.89 (s, CH₃NCO-); 2.90(m,2H); 3.76 (dd, j₁=3.6Hz, j₂=9.0Hz, CH₃CH₂CH-) ppm.

Ms m/e 228(M⁺); 195; 179; 138; 125; 96; 71; 70; 57.

Eksempel 45: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(1'-sulfoksy-4'-aza-2'-metyl-3'-one) AF262

En blanding av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one) (AF261) (48.4 mg, 0.24 mmol) i 2.0 ml eddiksyre og 0.5 ml vandig hydrogenperoksid (32%) ble omrørt ved 25°C i 20 minutter. Reaksjonsblandingen ble surgjort ved tilsetning av overskuddsaltsyre og fortynnet med 20 ml petroleum-eter/eter 4/1. Presipitatet ble løst opp i vandig natriumkarbonat og oppløsningen ble ekstrahert med kloroform.

Kloroformekstraktet ble tørket, avdampet og resulterende masse kromatografert på en preparativ silika-gelplate (kloroform/metanol/vandig ammoniakk 80/20/1) for å tilveiebringe 3.3 mg olje som ble presipitert fra eter av oksalsyre for å tilveiebringe en isomer (>90% renhet) av et krystallinsk fast stoff.

¹H-NMR (CDCl₃, fri base) δ 1.52 (d, 3H, J=6Hz) CH₃CH-; 1.85-2.7[m,8H]; 2.36(s, 3H)CH₃-N; 3.55(q,J=6Hz)CH₃CH-; 7.0(bs,1H) ppm.

MS m/e 216(M⁺); 199; 167; 149; 125; 111.

Eksempel 46: Piperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one) AF263

En blanding av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2',4'-tiazolidin-3'-one) (AF261) (250 mg, 1.25 mmol) og α-kloretylkloroformat (0.15 ml, 1.4 mmol) ble oppvarmet i 5 ml diklormetan ved 60°C i 90 minutter. Diklormetan ble fjernet under en nitrogenstrøm og den oljeholdige resten ble oppløst i metanol og oppvarmet ved 60°C i 1 time. Metanol ble avdampet, resten oppløst i vandig natriumkarbonat, ekstrahert med kloroform og separert på en preparativ silika-gelplate (kloroform/metanol/vandig ammoniakk 80/20/1) for å tilveiebringe 20 mg fri base som ble presipitert som et krystallinsk oksaltsyresalt.

¹H-NMR (D₂O, oksaltsyresalt) δ 1,51 (d, 3H, J=6 Hz, CH₃CH-); 2,2-2,35 (m, 4H); 3,1-3,6 (m, 4H); 4,1 (q, J=6 Hz, CH₃CH-) ppm.

MS m/e 186 (M⁺); 153; 126; 57.

Eksempel 47: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-metyl-1',4'-oksatiolan-2'-on) AF265

En oppløsning av 1-metylpiperidon (11,3 g, 0,1 mol) tioleddiksyre (15 ml) og p-toluen-sulfonsyre i acetonitril ble tilbakestrømt i 24 timer og etterfulgt av TLC (Silica- 20 % metanol i kloroform). Deretter ble oppløsningen avdampet, oppløst i kloroform og vasket med en oppløsning av natriumbikarbonat og deretter med vann. Den organiske fasen ble tørket på natriumsulfat og avdampet. Produktet ble rensert på en silikagel-kolonne (Merck 60). Eluering med en oppløsningsmiddelblanding av kloroform/metanol/ammoniakk ga 10,27 g av en olje som krystalliserte på henstand ved romtemperatur. Den ble identifisert som 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-metyl-1',4'-oksatiolan-2'-on) (AF265) smp 92°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 11,6 (d, 3H), 1,98-2,12 (m, 2H), 2,13-2,3 (m, 2H), 2,34-2,55 (m, 2H), 2,55-2,72 (m, 2H), 2,30 (s, 2H), 4,06 (q, 1H), ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 18 (CH_3CH , kvartett), 39 ($\text{C}5$ og $\text{C}10$, en triplett), 40 (CH_3CH , dublett), 45,5 ($\text{CH}_3\text{-N}$, kvartett), 51,8 og 52 ($\text{C}7$ og $\text{C}9$, to forskjellige triplerter), 87 ($\text{C}5$, singlett), 175 (C=O) ppm.

MS m/e 201 (M^+)

Forbindelsen AF265 (fri base) ble oppløst i aceton og oksalsyre ble tilsatt (1 mol for 2 mol fri base). Et hvitt fast stoff presipiterte etter noen få sekunder. Det ble filtrert, vasket med aceton, kloroform og eter, og tørket i en dessikator. Det ble identifisert som oksal-syresaltet til AF265. Stabiliteten til dette saltet undersøkes fortsatt. Noe ble dekomponert i vann, muligens ved hydrolyse av lakton og signalene forårsaket av produktet oppnådd ved ringåpning kan sees i $^{13}\text{C-NMR}$ -spekteret som ble registrert i D_2O i minst 3 timer av scan akkumuleringen. I $^1\text{H-NMR}$ spekteret målt øyeblikkelig etter oppløsning var bare spiroforbindelsen synlig. Det ble oppdaget at en oppløsning av AF265 i vann viser etter 1 uke omtrent en tredjedel ringåpning. Smp 120°C.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ 1,55 (d, 3H), 2,3-2,6 (m, 4H), 2,9 (s, 3H), 3,2-3,4 (m, 2H), 3,4-3,7 (m, 2H), 4,4 (q, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) δ 17,5 (CH_3CH), 36 og 36,5 ($\text{C}6$ og $\text{C}10$), 41,5 (CH_3CH), 43 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 51 ($\text{C}7$ og $\text{C}9$), 84 ($\text{C}5$), 167 ($\text{C}0$ av oksalysyren), 1,77 (C=O) ppm.

Eksempel 48: Piperidin-4-spiro-5'-(3'-metyl-1',4'-oksatiolan-2'-on) AF269.

Utgangsmaterialet 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-metyl-1',4'-oksatiolan-2'-on) (AF265) (80 mg) ble oppløst i benzen og oppløsningen avdampet til tørrhet for å forsikre at fuktighet ikke var tilstede. Under en nitrogenatmosfære ble diklormetan tørket på molekylsikt tilsatt (omtrent 4 ml) etterfulgt av 1-kloretylklorformat (56 mg). Reaksjonsblanding ble oppvarmet ved 100°C i omtrent 1 time og deretter avdampet. Kloroform

ble tilsatt og et hvitt fast stoff ble filtrert ut, vasket med kloroform og karbontetraklorid, og deretter tørket. Produktet ble identifisert som hydrokloridsaltet av piperidin-4-spiro-5'-(3'-metyl-1',4'-iksatiolan-2-on (AF269).

¹H-NMR (D₂O) δ 1,55 (d, CH₃CH), 2,25-2,55 (m, 4H), 3,3-3,42 (m, 4H), 4,4 (q, CH₃CH) ppm.

MS m/e 187 (M⁺).

Eksempel 49: 1-metylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-metyl-1',3'-oksazolidin) AF264

En blanding av 1-metyl-4-piperidon (11,30 g, 0,10 mol) og DL-1-amino-2-propanol (9,75 g, 0,13 mol) ble oppvarmet under tilbakestrømning i 1,5 timer. Reaksjonsblandingen ble destillert under redusert trykk. Etter fjerning av en fraksjon som destillerte ved 30-110°C (18 mm Hg) og inneholdt vann overskudd av aminoalkohol og produktet, ble det rene produktet 1-metylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-metyl-1',3'-oksazolidin) (AF264), destillert ved 110-115°C (18 mm Hg, 10,70 g).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1,22 (d, j=6 Hz, CH₃CHO-); 1,75 (m, 4H); 2,30 (s, CH₃N-); 2,49 (m, 4H); 2,70 (dd) og 3,27 (dd) (j₁=6,6 Hz, j₂=12, Hz, -CH₂NH-); 4,04 (m, j₁=6,6 Hz, j₂=6 Hz, CH₃CHO-) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 20,3 (CH₃CHO-); 35,3 og 36,7 (C6 & C10); 45,5 (CH₃N-); 51,7 (-CH₂NH-); 52,8 (C7 & C9); 71,8 (CH₃CHO-); 93,3 (C5) ppm.

MS m/e 170 (M⁺); 169 (M⁺-1); 123; 112; 85; 83 (100 %); 71; 70; 58.

Eksempel 50: 1-metylpiperidin-4-spiro-2'-(4'-etyl-1',3'-oksazolidin) AF268

En blanding av 1-metyl-4-piperidon (5,65 g, 0,05 mol) og DL 2-amino-1-butanol (6,24 g, 0,07 mol) ble oppvarmet under tilbakestrømning i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble destillert ved redusert trykk. Etter fjerning av en fraksjon som destillerte ved 30-128°C (19 mm Hg, 5,65 g) og inneholdt hovedsakelig produktet og mindre mengder vann og reaktanter, ble det rene produktet 1-metylpiperidin-4-spiro-2'-(4'-etyl-1',3'-oksazolidin) (AF268) destillert ved 129-130°C (19 mm Hg, 4,5 g).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 0,97 (t, j=7,5 Hz, CH₃CH₂-); 1,45 og 1,69 (m, CH₃CH₂-); 1,70-1,89 (m, 4H); 2,30 (s, CH₃N-); 2,32-2,62 (m, 4H); 3,25 og 3,96 (m, -CH₂O); 3,29 (m, -CHCH₂CH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 10,7 (CH₃CH₂-); 26,1 (CH₃CH₂-); 34,9 og 36,3 (C6 & C10); 45,3 (CH₃N-); 52,5 og 52,7 (C7 & C9); 58,5 (C3); 69,5 (C2); 93,1 (C5) ppm.

Eksempel 51: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-1',4'-oksatiolan-2'-on) (AF271).

En oppløsning av 1-metylpiperidion (1,921 g, 0,017 mol), 2-merkaptosmøresyre (2 g, 0,0167 mol) og p-toluensulfonsyre (300 mg) i acetonitril ble tilbakestrømmet i 36 timer.

Deretter ble oppløsningen avdampet, oppløst i metanol og produktet separert i en silikagelkolonne med kloroform/metanol/amoniakk (97:2,5:0,5) som elueringsmiddel. Ytterligere rensing ble utført på en silikagelkolonne med kloroform/metanol (95:5) som elueringsmiddel.

5 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,0 (t, CH_3CH_2), 1,6 (m, 3H), 2,1 (m, 1H, CH_3CH_2), 2,25-2,4 (m, 4H), 2,3 (s, 3H), 2,8-2,95 (m, 2H), 3,75 (dd, CH_2CH) ppm.

MS m/e 215 (M^+)

Eksempel 52: Fremstilling av piperidin-4-spiro-5'-(3'-propargylhydantoin) (AF186).

10 Forbindelse AF 185 ble demetylert ifølge prosedyren utviklet av AF160 (Des) (se eksempel 3) og ble ytterligere rensed ved kromatografi på en silikakolonne (kloroform/metanol/ammoniak 80:19:1). Den frie basen ble presipitert som et hvitt ikke-hygroskopisk saltsyresalt.

15 $^1\text{H-NMR}$ (D_2O HCl salt) δ 2,0-2,15 (m, 2H); 2,2-2,35 (m, 2H); 2,68 (t, 1H $J=3,5$ Hz); 2,91 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 3,25-3,35 (m, 2H); 3,55-3,65 (m, 2H), 4,3 (d, 2H, $J=3,5$ Hz) ppm.

MS m/e 207 (M^+ , basetopp); 179; 151; 113.

Eksempel 53: Fremstilling av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-[3'-(2-butynyl)hydantoin] (AF199).

20 Forbindelse AF199 ble fremstilt ifølge fremgangsmåten utviklet for AF185 (se eksempel 50), og ble ytterligere rensed ved kromatografi på en silikakolonne (kloroform/metanol/ammoniak 80:19:1). Den frie basen ble presipitert som et hvitt ikke-hydroskopisk saltsyresalt.

25 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , fri base) δ 1,65-1,8 (m, 2H); 1,78 (t, 3H, $J=1,7$ Hz); 1,9-2,25 (m, 4H); 2,33 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$); 2,8-2,95 (m, 2H); 4,22 (q, 2H, $J=1,7$ Hz); 6,7 (bs, 1H) ppm.

MS m/e 235 (M^+): 165; 154; 71 (basetopp);

Eksempel 54: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-on) AF261, og optiske isomerer derav (+)AF261 og (-)AF261

30 Forbindelse AF261 som en fri base (3,23 g, 16 mmol) og di-p-toluoyl-D-vinsyre (5,8 g, 15 mmol) ble plassert i 250 ml flaske, og isoamylalkohol 28 g og toluen 130 ble tilsatt og blandingen ble tilbakestrømmet i 5 minutter. Den klare oppløsningen ble delvis avdampet under tilbakebøl av en strøm N_2 helt til det ble dannet en viss turbiditet og dette ble latt stå over natt. Det resulterende presipitatet ble filtrert ut og omkrystallisert fra

35 isoamylalkohol-toluen flere ganger helt til enantiomerisk renhet på over 98 % (ved GC og NMR), ble oppnådd. Det faste produktet ble gjort basisk og presipitert som saltsyre-

saltet for å tilveiebringe 207 mg hvitt ikke-hygroskopisk fast stoff $[\alpha]_D^{25} = -54,8^\circ$ (saltsyresalt i metanol).

5 Morvæsken ble avdampet, gjort basisk og behandlet med Di-p-toluoyl-L-vinsyre og krystallisert fire ganger helt til det ble oppnådd enantiomerisk renhet på over 98 % (ved GC og NMR). Det faste produktet ble gjort basisk og presipitert som saltsyresaltet for å tilveiebringe 207 mg hvitt ikke-hygroskopisk fast stoff $[\alpha]_D^{25} = +55,7^\circ$ (saltsyresalt i metanol).

10 Bestemmelse av optisk renhet ble utført ved NMR ved anvendelse av (R)-(-)-2,2,2-trifluor-1-(9-anthryl)etanol som oppløsningsmiddel. 7,5 mg av dette ved vs 2,5 mg av hver enantiomer i C₆D₆ viser tilstedeværelse av en enkelt enantiomer. NMR-spekteret til saltsyresaltet var identisk med det til (±) AF261.

15 Renheten til hver enantiomer ble bestemt ved GC ved anvendelse av en kapillærkolonne Chrompack XE-60-S-Val-S- α -PEA, WCOT kondensert silika (50 m, id 0,26 mm, od 0,35 mm, strømning 0,9 ml N₂, ovnstemperatur 175°C; retensjonstid 64 min og 65 min.

NMR spekteret til saltsyresaltet var identisk med det til (±) AF269.

20

Eksempel 55: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-etyl-1',4'-tiazolidin-3'-on) AF267, og dets optiske isomerer (+) AF267 & (-) AF267.

Forbindelse AF267 som en fri base og di-p-toluoyl-D-vinsyre ble behandlet ifølge prosedyren utviklet for AF261 (se eksempel 53) helt til det ble oppnådd enantiomerisk renhet av ovennevnte 90 % (ved GC). Det faste produktet ble gjort basisk og presipitert som HCl saltet for å tilveiebringe 207 mg hvitt ikke-hygroskopisk fast stoff, $[\alpha]_D^{25} = -67,0^\circ$ (HCl salt i metanol, >90 % optisk renhet). Morvæsken ble avdampet, gjort basisk og behandlet med di-p-toluoyl-L-vinsyre på samme måte. Etter fire rekrystalliseringer ble det resulterende produktet (>90 % ee) gjort basisk og presipitert som HCl saltet, 30 $[\alpha]_D^{25} = +70,8^\circ$ (HCl salt i metanol, >95 % optisk renhet).

Renheten til hver enantiomer ble bestemt ved GC ved anvendelse av en kapillærkolonne Chrompack XE-60-S-Val-S- α -PEA, WCOT kondensert silika 50 m, id 0,26 mm, od 0,35 mm, strømning 0,9 ml N₂, ovnstemperatur 175°C; retensjonstid 83 min og 80 min.

35 NMR spekteret til saltsyresaltet var identisk med det ifølge (+) AF267.

Eksempel 56. Fremstilling av 1-metylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-metyl-1',3'-dioksolan-4'-on) AF274.

Melkesyre (8 ml) ble tørket azeotropisk med benzen. Til tørr og fortsatt varm melkesyre ble mere tørr benzen tilsatt etterfulgt av p-toluensulfonsyre (300 mg) og 1-metylpiperidon (5,00 g, 0,027 mol). Blandingen ble tilbakestrømmet helt til det ikke ble separert ytterligere vann, deretter ble oppløsningen avdampet og resten oppløst i kloroform og vasket med mettet natriumbikarbonatoppløsning (25 ml). Vannfasen ble vasket med kloroform (25 ml) og kombinerte organiske faser ble på ny vasket med vann (2 x 10 cm³). Den organiske fasen ble tørket på natriumsulfat blandet med trekull, filtrert og avdampet for å tilveiebringe 8,7 g av et oljeholdig råprodukt. Etter kombinert triturerings med heksan, eter og petroleum-eter (40-60) ble gjenværende olje oppløst i aceton og deretter ble oksalsyre (1 ekv) tilsatt. Etter en stund presipiterte et hvitt fast stoff som ble identifisert som oksalysyresaltet av 1-metylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-metyl-1',3'-dioksolan-4'-on) AF274.

¹H-NMR (oksalysyresalt, CDCl₃+DMSO-d₆) δ 1,5 (d, 3H, J=7 Hz), 2,15 (m, 4H), 2,63 (s, 3H), 2,9 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 4,55 (q, 1H, J=7 Hz) ppm.

¹H-NMR (fri base, CDCl₃) δ 1,5 (d, 3H, J=7 Hz), 1,95 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 2,5 (m, 2H), 2,6 (m, 2H), 4,5 (q, 1H, J = Hz) ppm.

Massespektrum m/e 185 (M⁺)

20

Eksempel 57: 2-metyl-1,4-tiazolidin-3-on-spiro[5,3']-quinuklidin AF273.

En blanding av 3-quinuklidinon (2,50 g, 20,0 mmol), tioleddiksyre (2,55 g, 24,0 mmol) og ammoniumkarbonat (2,9 g) i toluen (100 ml) ble forseglet i en rustfri ståltrykkbeholder og oppvarmet ved 108°C ved omrøring i 2½ timer. En olje separerte fra reaksjonsblandingen, ble fjernet og toluenoppløsningen var igjen ble avdampet for å tilveiebringe en rest (2,5 g). Den ble krystallisert fra aceton for å tilveiebringe et krystallinsk fast stoff (0,460 g) som for det meste består av et enantiomerpar av AF273. Det ble på ny krystallisert fra acetonitril og deretter fra diklormetan for å tilveiebringe et rent enantiomerpar (±) AF273A (0,210 g). Smp 201-202°C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1,53 (d, j=7,2 Hz, CH₃CH-); 1,65 (m, 2H); 1,92 (m, 2H); 2,03 (m, 1H); 2,83 (m, 4H); 3,18 og 3,32 (dd, j = 15 Hz, -NCH₂CNH-); 3,89 (q, j = 7,2 Hz, CH₃CH-); 8,58 (bs, -NH-) ppm.

MS m/e 212 (M⁺); 1,55; 142 (M⁺-70); 123; 96; 71; 70 (100 %); 58.

35 Morvæskan fra første krystallisering som ble anrikt i et annet enantiomerpar ble kromatografert på en silikagelkolonne (Merck 60). Eluering med en oppløsningsmiddel-

blanding av kloroform/metanol/ammoniakk (aq) 96:3:1 ga først det andre rene enantiomerparet (\pm) AF273B (0,106 g) smp 181-182°C (fra acetonitril).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1,52 (d, $j=7$ Hz, CH₃CH-); 1,64 (m, 2H); 1,93 (m, 2H); 2,03 (s, 1H); 2,70-2,98 (m, 4H); 3,19 (s, -NCH₂CNH-); 3,85 (q, $j=7$ Hz, CH₃CH-); 8,60 (bs, -NH-) ppm.

MS samme som (\pm) AF273A.

Deretter ble en blanding av alle isomerene oppnådd og til slutt det andre rene enantiomerparet (\pm) AF273A.

10

Eksempel 58: 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-tion) (AF275)

En suspensjon av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-on) (AF261) (1,00 g, 5,00 mmol) og Lawesson's Reagent (1,40 g, 3,46 mmol) i tørr toluen (25 ml) ble omrørt og oppvarmet til 100°C i 3 timer. Oppløsningsmidlet ble fjernet fra reaksjons-

blandingen og resten separert på en tørr silikagelkolonne (Merck 60, 0,040-0,065). Eluering med en oppløsningsmiddelblanding av kloroform, metanol, ammoniumhydroksyd 96:3:1 (v/v) ga ren 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-tion) (AF275) (0,81 g), nåler fra aceton smp 171-172°C (dek).

¹H-NMR (CDCl₃) 1,69 (d, $J=7,1$ Hz, CH₃CH-); 2,00 (m, 2H); 2,00-2,35 (m, 4H); 2,30 (s, CH₃N-); 2,80 (m, 2H); 4,26 (q, $J=7,1$ Hz, CH₃CH-); 8,74 (bs, -NH-) ppm.

MS m/e 216 (M⁺); 156; 98; 97; 96 (100 %); 70.

Eksempel 59: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'(5')-(2'-metyltio-2'-imidazolin-5'(4')-on) (AF187)

(a) 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tiohydtantion) (AF195) saltsyresalt (1,00 g, 4,25 mmol) ble tilsatt til en omrørt oppløsning av natriumhydroksyd (0,36 g, 9,00 mmol) i metanol (30 ml). Et presipitat ble dannet (NaCl). Metyliodid (0,664 g, 4,68 mmol) ble tilsatt ved romtemperatur til ovennevnte blanding og omrøringen ble fortsatt i 1,3 timer. Reaksjonsblandingen ble avdampet ved redusert trykk og resten ble ekstrahert med varm

diklormetan. Fjerning av diklormetan ga en rest (0,58 g) som ble separert på en silikagelkolonne (Merck 60, 0,040-0,065). Eluering med en oppløsningsmiddelblanding av kloroform, metanol, ammoniumhydroksyd (89:10:1 (v/v) ga 1-metylpiperidin-4-spiro-4'(5')-(2'-metyltio-2'-imidazolin-4'(4')-on) (AF187) (0,23 g); smp 176-177°C (fra aceton).

¹H-NMR (CDCl₃) 1,57 (m, 2H); 2,00 (m, 2H); 2,35 (s, CH₃N-); 2,52 (m, 2H); 2,56 (s, CH₃S-); 2,84 (m, 3H), 6,73 (bs, -NH-) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃) 12,6 (s, CH₃S-); 32,7 (C₃); 45,8 (CH₃N-); 50,8 (C₂); 68,3 (C₄); 163,8 (-C-SCH₃); 188,1, (-C=O) ppm.

MS m/e 213 (M^+); 198 (M^+-CH_3); 143 (M^+-70); 71.

UV(EtOH) λ_{maks} 236 nm (ϵ 7800); 255 nm (iskuler, (8ϵ 4300).

(b) En oppløsning av 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-metyltio-5'-aminometyl-4'H-imidazol) AF193 (30 mg) i vandig saltsyre (0,5 ml, 16 %) ble latt stå ved romtemperatur i 3 dager. Oppløsningsmidlet ble fjernet ved redusert trykk og resten gjort basisk med konsentrert vandig natriumhydroksydoppløsning, deretter ekstrahert med diklormetanol. Ekstraktet ble tørket (Na_2SO_4) og oppløsningsmidlet fjernet for å tilveiebringe en rest, som ble separert på en plate med et tykt lag silikagel (Merck kieselgel 60 F254), utviklet med kloroform, metanol, ammoniakk (aq.) 79:20:1 (v/v) for å tilveiebringe AF187 (8 mg), identisk med en autentisk prøve.

Eksempel 60: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-etyltio-2'-imidazolin-5'-on) (AF188). Til en suspensjon av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thiohydantion) saltsyresalt (AF195) (4,04 g, 0,0172 mol) og kaliumhydroksyd (3,85 g, 0,0686 mol) i etanol (100 ml), ble etylbromid tilsatt (5,60 g, 0,0514 mol) og blandingen ble tilbakestrømmet med omrøring. Etter reflux i 2 timer var hovedproduktet fortsatt monoetylderivat derfor ble ytterligere kaliumhydroksyd (0,95 g, 0,0169 mol) og etylbromid (2,00 g, 0,0184 mol) tilsatt til reaksjonsblandingen og tilbakestrømningen ble fortsatt i ytterligere 3 timer. Oppløsningsmidlet ble avdampet under redusert trykk, vann (20 ml) ble tilsatt til resten og ble ekstrahert med eter. Ekstraktet ble tørket (Na_2SO_4) og oppløsningsmidlet fjernet for å tilveiebringe en rest (0,973 g) som ble krystallisert fra petroleumeter for å tilveiebringe ren 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-etyltio-2'-imidazolin-5'-on) (AF188) (0,513 g) smp 95-96°C. Kromatografi av morvæsken, etter fjerning av oppløsningsmidlet, på tørr silikagelkolonne (20 g, Merck 60, 0,040-0,065 mm) og eluering med en oppløsningsmiddelblanding av kloroform, metanol, ammoniakk (aq.) 84:5:1 ga en ytterligere mengde ren AF188 (0,310 g).

1H -NMR ($CDCl_3$) 1,19 (t, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2N-); 1,40 (t, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2S-); 1,43 (m, 2H); 1,99 (m, 2H); 2,36 (s, CH_3N-); 2,51 (m, 2H); 2,77 (m, 2H); 3,18 (q, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2S-); 3,49 (q, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2N-) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$) 14,1 ($2CH_3CH_2-$); 24,4 (CH_3CH_2S-); 33,0 (C_6); 35,1 (CH_3CH_2N-); 46,2 (CH_3N-); 51,0 (C_7); 68,6 (C_5); 158,8 ($-N=C-$); 183,9 ($-C=O$) ppm.
MS m/e 255 (M^+); 226 (M^+-Et); 185 (M^+-70); 71; 70.

Eksempel 61: 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-imidazolin-5'-on) (AF220).

Raney nikkel (0,30 g) ble tilsatt til en oppløsning av 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-etyltio-2'-imidazolin-5'-on) (AF188) (0,214 g) i etanol (10 ml) og blandingen ble tilbakestrømmet i 4 timer. Idet reaksjonen ikke var fullført ble ytterligere Raney nikkel (0,30 g) tilsatt og tilbakestrømningen fortsatt i ytterligere 4 timer. Reaksjonsblandingen ble filtrert og katalysatoren vasket med metanol og diklormetan. Filtratet og vaskingene ble kombinert og avdampet for å tilveiebringe 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-imidazolin-5'-on) (AF220) (0,160 g) som en olje.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1,27 (t, $J=7,3$ Hz, CH_3CH_2 -); 1,46 (m, 2H); 2,03 (m, 2H); 2,36 (s, CH_3N -); 2,48 (m, 2H); 2,82 (m, 2H); 3,53 (q, $J=7,3$ Hz, CH_3CH_2 -); 7,72 (s, $-\text{CH}=\text{N}$ -) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 13,9 (CH_3CH_2 -); 32,2 (C_6); 35,3 (CH_3CH_2 -); 45,7 (CH_3N -); 50,5 (C_7); 68,2 (C_5); 151,6 ($-\text{N}=\text{CH}$ -); 183,9 ($-\text{C}=\text{O}$) ppm.

Et forsøk på å rense produktet ved kromatografi på en tørr silikagelkolonne (20 g, Merck 60 0,040-0,065 mm) eluerende med en oppløsningsmiddelblanding av kloroform, eter, metanol, ammoniakk (aq.) (25:17:3:1) (v/v) ga som hovedprodukt ringåpnet hydrolyseringsprodukt; 1-metylpiperidin-4-formylamino-4-N-etylkarboksamid (AF221) krystallisert fra eter-diklormetan smp 108-109°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 1,13 (t, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2 -); 2,04-2,32 (m, 6H); 2,28 (s, CH_3N -); 2,65 (m, 2H); 3,28 (dq, CH_3CH_2 -); 5,73 (s, HCONH -); 6,97 (bs, EtNHCO -); 8,18 (s, HCON -) ppm.

MS m/e 213 (M^+), 195 ($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$); 168 (M^+-EtNH_2); 141 (M^+-EtNHCO); 98; 97; 96; 71; 70.

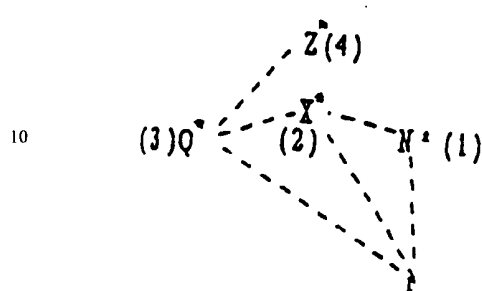
Hydrolyseringsprodukt AF221 kan bli ringlukket til AF220 ved oppvarming derav (150°C) i vakuum.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen utviser farmakologisk aktivitet og er derfor nyttig som farmasøytiske midler, f.eks for terapi. Spiroforbindelsene tilveiebragt ifølge foreliggende oppfinnelse har sentral og perifer (eller begge) aktivitet på nervesystemet. En vanlig karakteristisk aktivitet er på det cholinergiske systemet hvor forbindelsene er ligander (f.eks agonister eller antagonist) på muscariniske reseptorer.

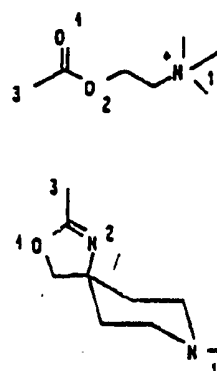
Agonistisk eller antagonistisk profil av forbindelsene ble vurdert i et antall tester inkludert data-assistert molekylær vurdering, molekylær testing in vitro og in vivo.

Data-assistert molekylær vurdering

For muscarinisk agonistisk aktivitet ble en farmakoforisk modell, basert på gransking av mange agonister, konstruert. Modellen innbefatter definisjon av de delene i strukturen av agonistene som er vesentlig for aktivitet, deres gjensidige rommelige orientering og i en viss grad det maksimale volumet tillatt for at en ligand skal være en agonist.



Generell



Eksemper

I ovennevnte formler er punkt r en negativ ladning som reagerer med et kationiske hodet til agonisten. Dets posisjon i forhold til nitrogen er definert i modellen. Viktige avstander (D) er som følger: $D(r-N^*) = 3,0$; $D(r-X^*) = 6,50$; $D(r-Q^*) = 8,70$; $D(x^*-Q^*) = 2,45$. Optimal dihedral vinkel $r-x^*-Q^*-z^* = -85$. Avvik fra disse optimale modellparametrene innenfor visse grenser reduserer ikke aktiviteten (tabell 1).

Visse viktige trekk ved modellen er oppført nedenfor:

1. Modellen muliggjør å skjelne mellom fullstendig og delvis muskariniske agonister. Forskjellen er basert på korrelasjon mellom avstanden $r-X^*$ og agonistisk effektivitet.
2. Naturen til atomet i posisjon 4 som tilsvare karbonyloksygen i acetylcholin kan variere betraktelig samt dihedralvinkelen $r-x^*-Q^*-z^*$ innenfor klassen av muskariniske agonister.
3. Når avstanden $r-Q^*$ blir for stor for agonistisk aktivitet blir svake bindingsantagonister oppnådd.

Utifra denne modellen kan antagelser med hensyn på reseptorsubtypespesifisitet til en muscarinisk agonist bli utført, basert på agonistens strukturelle rigiditet; naturen til Z^* og modellparametrene.

5 Farmakoforisk modell kan bli anvendt for screening av nye forbindelser for potensiell muscarinisk aktivitet på følgende måte a: den nye strukturen blir optimalisert for å bestemme dets lav energi omdannere; b: disse omdannerene (conformers) blir undersøkt for riktig arrangement av farmakoforetiske elementer. Alternativt kan den nye strukturen bli tvunget inn i den farmakoforiske konformasjonen ved anvendelse av en av induced fit
10 rutinene. Resulternede konformasjon blir deretter sammenlignet med lav energi konformasjon til samme struktur. Anvendelse av disse prosedyrene danner et pålitelig svar i alle tilfellene som er blitt undersøkt (tabell 1). Til tross for at det ikke er mulig å avgjøre om muscarinisk aktivitet er manifestert av bare forbindelser som er i samsvar med denne modellen så er de som passer inn aktive som agonister.

15

Begrensning av volumet for kationisk hode for muscariniske agonister er begrenst fra docking eksperimenter av relevante strukturer (som angitt i tabell 1) til en molekylær modell av transmembran domene til m1 muscarinisk reseptor. Forbindelser større enn quinnuklidinderivater kan ikke bli akkommodert av det makromolekylære bindingssetet.

20

Forbindelser oppført i tabell 1 er delt inn i fire grupper. Den første gruppen innbefatter flere kjente muscariniske agonister. Deres strukturer er karakterisert ved optimale farmakoforiske parametre. Den andre gruppen innbefatter agonister som utviser suboptimale farmakoforiske mønstre og er derfor hovedsakelig delagonister. Strukturene til
25 forbindelsene i den tredje gruppen avviker fra det farmkoforetiske mønsteret for muscarinisk aktivitet, definert av tidlige grupper. Disse forbindelsene er derfor enten antagonist eller mangler muscarinisk aktivitet. Grupper 4 oppfører noen av de potensielle muscariniske agonistene basert på deres farmakoforetiske parametre.

Tabell 1: Farmakoforetiske parametre for muscariniske agonister

| Agonist | Selektivitet | r-X* (A) | r-Q* (A) | X*-Q* (A) | r-X*-Q*-Z* |
|-------------|--------------|----------|----------|-----------|------------|
| (Gruppe 1) | | | | | |
| Ach | M2>M1 | 6,40 | 8,44 | 2,40 | -86 |
| Dioksolan | M2>M1 | 6,51 | 8,71 | 2,42 | -85 |
| Muscarin | M2>M1 | 6,50 | 8,53 | 2,44 | -75 |
| Metylfurm* | M1>M2 | 6,40 | 8,54 | 2,43 | -59 |
| Oksatolan | M1>M2 | 6,55 | 8,90 | 2,43 | -25 |
| (Gruppe 2) | | | | | |
| AF102B | M1>M2 | 5,93 | 8,24 | 2,45 | -173 |
| AF150 | M1>M2 | 5,78 | 7,91 | 2,45 | -118 |
| AF151 | M1>M2 | 5,82 | 8,20 | 2,45 | -170 |
| AF150(S) | M1>M2 | 5,72 | 8,35 | 2,81 | -84 |
| AF151(S) | M1>M2 | 5,88 | 8,15 | 2,38 | -177 |
| AF160 | M1>M2 | 5,80 | 8,26 | 2,72 | -96 |
| AF160 (Des) | M1>M2 | 5,78 | 8,26 | 2,70 | -95 |
| (Gruppe 3) | | | | | |
| AF133 | | 5,98 | 8,33 | 2,96 | 34 |
| AF134 | | 6,00 | 8,58 | 2,62 | 9 |
| AF168 | | 6,69 | 9,10 | 2,72 | -44 |
| AF172 | | 5,71 | 9,64 | 4,00 | -101 |
| (Gruppe 4) | | | | | |
| AF170 | | 6,07 | 8,62 | 3,01 | -60 |
| AF181 | | 5,92 | 8,35 | 2,75 | -88 |
| AF184 | | 5,93 | 8,44 | 2,65 | -87 |
| AF185 | | 5,96 | 8,21 | 3,13 | -105 |
| AF196 | | 5,92 | 8,40 | 2,73 | -87 |
| AF202 | | 5,78 | 8,10 | 2,42 | -170 |
| AF210 | | 5,89 | 8,20 | 2,43 | -170 |
| AF215 | | 5,94 | 7,93 | 2,44 | -108 |
| AF216 | | 5,72 | 8,32 | 2,84 | -96 |
| AF260 | | 5,75 | 8,02 | 2,43 | -170 |
| AF261 | | 5,91 | 7,80 | 2,37 | -107 |
| AF264 | | 5,77 | 8,07 | 2,46 | -128 |
| AF265 | | 5,82 | 7,72 | 2,38 | -94 |

| | | | | | |
|-------|--|------|------|------|------|
| AF267 | | 5,91 | 7,84 | 3,25 | -105 |
| AF270 | | 5,79 | 8,27 | 2,73 | -93 |

♦ metylfurmetid

Biologisk testing

5 Test nr 1. Isolert marsvinileumpreparering.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen ble testet for deres agonistiske og antagonistiske aktiviteter i marsvinileumpreparering (metode anvendt som beskrevet av Fisher et al, J. Pharm. Exp. Therap. 257: 392-403 (1991). Tabell 2 oppsummerer resultatene oppnådd med noen av forbindelsene.

10

Tabell 2: Virkning på marsvinileumpreparering

| Forbindelse | EC ₅₀ (µm) | Anmerkninger |
|-------------|-----------------------|--|
| AF102B* | 3,5 | delagonist |
| AF134♥ | | antagonist ved 6 µm |
| AF151(S) | 7,3 | full agonist |
| AF160 | 3,2 | full agonist |
| AF160 (Des) | | delagonist ved 0,1 mm maksimal kontraksjon 80 % karbachol |
| AF177 | | svak antagonist ved 0,25 mm |
| AG178 | 100 | delagonist (80 % av ACh) |
| AF179 | 100 | delagonist (80 % av ACh) |
| AG180 | 100 | delagonist (80 % av ACh) |
| AF182 | | antagonist ved 0,1 mm full antagonist ved 0,2 mm |

* cis-2-metylspiro(1,3-oksatiolan-5,3')quinuklidin

15

(US 4.855.290); svak antagonist for ACh-indusert sammentrekning

♥ Virket som en muscarinisk antagonist i marsvinileumpreparatet. Det var overraskende at det inhiberte AF102B-induserte sammentrekningen bedre enn den blokkerte ACh-induserte sammentrekningen. Dersom sammentrekningen induert av AF102B i dette preparatet hovedsakelig blir formidlet gjennom M3 reseptorene fremkommer AF134 som en selektiv M3 antagonist i dette preparatet.

20

Test nr 2. Binding til muscariniske reseptorer i hjernen; konkurrering med [³H]QNB, [³H]NMS og [³H]OXO-M i membraner dannet fra rottecortex og cerebellum.

Rottecerebralcortex og cerebellarmembranpreparater ved anvendelse av ligandene [³H]NMS, [³H]pirenepin og [³H]oksotremorin-M ble anvendt for vurdering av de nye forbindelsene (tabell 3 og 4).

Tabell 3: Konkurransen av testforbindelser med [³H]PZ, [³H]QNB eller [³H]NMS (rottecortex), og [³H]QNB eller [³H]NMS (cerebellum) respektivt

10

Cortex

| Forbindelse | [³ H]PZ | | [³ H]QNB | | [³ H]NMS | |
|--------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| | K _H μm (%) | K _L μm | K _H μm (%) | K _L μm | K _H μm (%) | K _L μm |
| Carbachol | 0,06 (38) | 18,6 | 6,8 (18) | 980 | 0,1 (41) | 11 |
| Oksotremorin | | | | 2,4 | | |
| McN-A-343 | | | | 7,9 | | |
| AF102B | | 1 | | 7,1 | | 1,1, 1,5 |
| AF133 | | 2,7 | | | | |
| AF134 | | 0,13 | | | | |
| AF151(S) | 0,75 (11) | 20 | 24 (44) | 459 | | |
| AF160 | 1,4 (34) | 19 | | 58 | 0,45 (31) | 12 |
| AF160 (Des) | 1,3 (36) | 9 | | 40 | | 7 |
| AF178 | 17 (58) | 90 | | | | |
| AF180 | | 5,4 | | | | |
| AF177 | 0,06 (10) | 7 | | | 0,1 (14) | 13 |
| AF182 | 0,06 (27) | 8,3 | | | 0,12 (23) | 9,2 |
| AF183 | | | 0,06 (14) | 100 | | 260 |
| AF185 | | | | 4,8 | | 9 |

Tabell 3 (forts)

Cortex

| Forbindelse | [³ H]PZ | | [³ H]NMS | |
|-------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| | K _H μm (%) | K _L μm | K _H μm (%) | K _L μm |
| AF181 | | 3,6 | | |
| AF184 | | 0,64 | | |
| AF196 | | >1000 | | |

| | | | | |
|--------|-----------|------|------------|------|
| AF197 | | 48 | | |
| AF213 | | 5,7 | | |
| AF264 | | 294 | | |
| AF260 | 0,2 (36) | 16 | 0,014 (12) | 32 |
| AF261 | 0,03 (26) | 25 | 8,6 (33) | 100 |
| AF261A | | 18 | | 20 |
| AF261B | 0,13 (34) | 6,7 | 0,032 (31) | 4,2 |
| AF263 | 0,33 (14) | 10 | 0,19 (23) | 13 |
| AF265 | 0,93 (12) | 49 | 0,18 (27) | 39 |
| AF267* | | 2,8* | | 5,88 |
| AF276A | | | | 10,9 |
| AF267B | | | | 4,3 |

* Etter Cu^{2+} behandling eksponerte konkurranseanalysen med $[^3\text{H}]\text{PZ}$ tosete-bindings-
 seter for AF267 ($K_{\text{H}} = 22 \text{ nM}$ (18 %); $K_{\text{L}} = 2,5 \mu\text{M}$). Denne observasjon indikerer at
 AF267 bindes til muscariniske reseptorer i rotte cerebrcortex som en agonist (Fisher et
 al, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 257: 292-403 (1991).

Tabell 3 (forts) Cerebellum

| Forbindelse | $[^3\text{H}]\text{QNB}$ | | $[^3\text{H}]\text{NMS}$ | |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| | $K_{\text{H}} \mu\text{M}$ (%) | $K_{\text{L}} \mu\text{M}$ | $K_{\text{H}} \mu\text{M}$ (%) | $K_{\text{L}} \mu\text{M}$ |
| Carbachol | 1,5 (54) | 52 | 0,02 (56) | 6 |
| Oksotremorin | | 0,8 | | |
| McN-A-343 | | 24,4 | | |
| AF102B | | 18,1 | | 1,4, 0,4 |
| AF133 | | 5,1 | | |
| AF134 | | 3,8 | | |
| AF151(S) | | 45 | | |
| AF160 | | 61 | 0,56 (46) | 19 |
| AF160 (Des) | 5 (36) | 86 | | 2,4 |
| AF178 | | 200 | | |
| AF180 | | 350 | | |
| AF177 | | | | 20 |
| AF182 | | | | 21 |
| AF183 - | | | | 310 |
| AF185 | | | | 7 |

| | | | | |
|--------|--|--|-----------|-----|
| AF181 | | | | 5 |
| AF184 | | | | 2,9 |
| AF197 | | | | 18 |
| AF260 | | | 0,46 (58) | 87 |
| AF261 | | | 0,83 (45) | 23 |
| AF261A | | | | 18 |
| AF261B | | | 0,29 (53) | 24 |
| AF267 | | | | 2,3 |
| AF267A | | | | 6,9 |
| AF267B | | | 0,15 (26) | 3,2 |

De beregnede forholdene til K_i^{PZ}/K_i^{NMS} eller K_i^{PZ}/K_i^{QNB} (tabell 3) er en vanlig anvendt indikasjon for M1 selektivitet til muscariniske ligander idet lavere forhold indikerer bedre M1 selektivitet. I tillegg er forholdene K_i^{PZ}/K_i^{QNB} fra rottecerebralcortex vs cerebellarmembranpreparater også en indikasjon på M1 selektiviteten til muscariniske ligander idet lavere forhold enn 1 indikerer M1 selektivitet (Fisher et al, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 257: 392-403 (1991)). Ved anvendelse av disse analysene var det mulig å detektere at noen av forbindelsene i denne oppfinnelsen viser en relativ høy preferanse for M1 muscariniske reseptorer. Slike er: AF133, AF134, AF160, AF160 (Des), AF177, AF178, AF181-AF185, AF261, AF265, AF267.

AF185 utviser f.eks tre ganger høyere affinitet for konkurrering med [3 H]PZ sammenlignet med konkurransen for [3 H]NMS bindingssteder ($K_i = 1,4 \pm 0,15 \mu\text{M}$ vs $5 \pm 1 \mu\text{M}$ respektivt; tabell 3). Dette er i stor kontrast til AF102B (US patent) som utviser nesten lignende affiniteter for konkurranse med begge ligandene ($K_i = 1,43 \pm 0,2 \mu\text{M}$ vs $1,86 \pm 0,43 \mu\text{M}$, respektivt; tabell 3). På grunn av at [3 H]PZ antas å spesifikt merke M1AChR i rottecerebralcortexmembraner kan nye data indikere at AF185 er en mere M1-selektiv ligand sammenlignet med AF102B.

[3 H]NMS bindingskurvene til noen av de nye forbindelsene i cerebralcortexmembranene indikerer interaksjon med to seter: omtrent en fjerdedel av bindingssetene utviser høy affinitet overfor disse forbindelsene. Dette kan tyde på høy agonistisk effektivitet i disse preparatene. Slike forbindelser er: AF260, AF261, AF263 og AF265.

Det er overraskende at noen av de nye forbindelsene utviser tosetekonkurransekurver med [3 H]PZ i rottecerebralcortex (tabell 3). Disse innbefatter: AF160, AF160(Des), AF260, AF261, AF265. Tosetekonkurransekurvene til disse forbindelsene med [3 H]PZ

ble omdannet til enkelt massevirkningskurver i nærvær av stabil GTP analog, GppNHp (ikke vist). Lignende observasjoner på GppNHp sensitiviteten ble observert for konkurranse med [³H]NMS (ikke vist). Dette indikerer at disse forbindelsene oppfører seg som effektive agonister for M1 reseptorer i rottecerebralcortex. Dette er i kontrast til

5 AF102B ved konkurranseanalyser som vanligvis tilveiebringer "mass-action" kurver. Disse observasjonene kan tyde på visse forskjeller mellom gjenkjenning av rottecerebralcortex M1 reseptorer av AF102B og disse nye forbindelsene.

AF267 utviser enkelt-sete konkurransekurver med både [³H]NMS og [³H]PZ i rottecerebralcortexmembraner. Studier av fosfoinositider (PI) hydrolyse og arachidonsyrefrigjøring beskrevet nedenfor indikerer at denne forbindelsen er en delagonist. Mass-action bindingsmønsteret var derfor likt data for M1 selektiv agonist AF102B og for muscariniske reseptorer i dette preparatet. Vi har tidligere demonstrert at behandling av rottecerebralcortexmembraner med 0,1 mM CuSO₄ kan eksponere kryptiske agonistiske

15 bindingsegenskaper til AF102B (Fisher et al, JPET 257:392-403, 1991; publiserte data anvendte konkurranse mellom AF102B og [³H]QNB, men lignende observasjoner ble oppnådd ved anvendelse av [³H]NMS og [³H]PZ). En slik behandling kan øke proporsjonen av seter med høy affinitet for visse agonister, som allerede utviser høy affinitets seter uten Cu²⁺ behandling (f.eks AF160). Vi har derfor studert bindingsegenskapene til

20 AF267 etter Cu²⁺ behandling. En slik behandling etterfulgt av konkurranseanalyse med [³H]PZ eksponerte 18 % høy affinitets seter for AF267 $K_H = 22$ nM, dvs omtrent 100 ganger høyere affinitet sammenlignet med $K_L = 2,5$ μm) uten signifikant forandring i lav affinitets seter. Denne observasjonen tyder på at AF267 kan bli bundet til muscariniske reseptorer i rottecerebralcortex i likhet med AF102B. Evnen som Cu²⁺ behandling har til

25 å eksponere høy affinitets seter for visse delagonister kan bli relatert til stabilisering av reseptor/G-proteininteraksjon til koordineringskompleksene til metallionene med avgjørende sulfidryler på disse makromolekylene (Gurwitz et al, BBRC 1984, 120:271-277). I kontrollmembranen er denne interaksjonen sannsynligvis ikke favorisert i nærvær av delagonister, som følgelig ikke utviser et høyaffinitets sete i konkurranseanalyser med

30 merkede antagonist.

Evnen som forbindelser har til å forflytte [³H]oksotremorin-M {[³H]OXO-M} bindingen tilveiebrakte et mål på affinitet for høyaffinitetsagonisttilstand til reseptoren. Forholdet til K_i verdiene for forflytning av [³H]NMS eller [³H]QNB og [³H]OXO-M er anvendt i

35 litteraturen for å bestemme effektivitet. Forhold større enn 100 er assosiert med full agonister. Agonister tilveiebringer forhold nær opp til enhet og mellomliggende verdier indikerer delagonister (Orlek et al, J. Med. Chem. 34:2726, 1991).

De nye forbindelsene ble studert i en konkurranseanalyse med merket, ikke-selektiv muscarinisk agonist [^3H]OXO-M, ved anvendelse av rottecerebralcortexmembraner; den potente agonistiske karakteren til AF179 og AF160 er reflektert i deres relativt store $K_i^{\text{NMS}}/K_i^{\text{OXO-M}}$ verdier (tabell 4).

Tabell 4: Konkurranse med [^3H]OXO-M av samme type AF160 og referansemuscariniske agonister i rottecerebralcortexpreparat

| Forbindelse | K_i (μM) | $K_i^{\text{NMS}}/K_i^{\text{OXO-M}}$ | | | |
|---|-------------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|------|
| A. massevirkningskurver ^a : | | | | | |
| CCh | 0,06 \pm 0,005 (3) | 380 | | | |
| Pilocarpine | 0,1 | | | | |
| AF102B | 0,6 \pm 0,2 (3) | 2,1 | | | |
| AF160 | 1,8 \pm 0,2 (3) | 9,4 | | | |
| AF177 | 11 | 1,4 | | | |
| AF179 | 1,3 \pm 0,3 | 31 | | | |
| AF182 | 14 | 1 | | | |
| AF183 | >100 | -1 | | | |
| B: Tosetekonkurransekurver ^b | | | | | |
| | K_H (μM) | % H | KL (μM) | $K_i^{\text{NMS}}/K_i^{\text{OXO-M}}$ | |
| AF160 (Des) | Exp. 1 | 0,05 | 36 | 2,2 | |
| | Exp. 2 | 0,03 | 58 | 1,8 | |
| | Exp. 3 | 0,02 | 42 | 2,1 | |
| | mean(1-3) | 0,033 \pm 0,007 (3) | 45 \pm 5 | 2,0 \pm 0,1 | 3,5 |
| AF185 | Exp. 1 | 0,04 | 53 | 49 | 0,18 |
| | Exp. 2 | 0,01 | 18 | 3 | 3 |

Anmerknning: Bindingseksperimentene ble utført ved anvendelse av vaskede rottecerebralcortexmembraner i Tris/Mn²⁺ buffer i 0,5 timer ved 25°C: K_i^{NMS} data er gjennomsnittlige verdier fra tabell 3. Dataene er generelt fra 1-4 eksperimenter.

^a data er for medikamenter som utviser massevirkningskonkurransekurver med [^3H]OXO-M.

^b data er for medikamenter som utviser tosetekonkurransekurver med [^3H]OXO-M; med AF160(Des) og AF185, massevirkningskurvene ble observert i visse eksperimenter.

Det var overraskende at AF160(Des) og AF185 var de eneste medikamentene som ble testet hvor konkurransekurvene (ved anvendelse av [^3H]OXO-M og rottecerebralcortex-

membraner) ikke utviste enkeltsetemassevirkningskurver (tabell 4). Den ekstremt potente konkurransen til disse medikamentene med en underfraksjon av reseptorer merket med [³H]OXO-M i rottecerebralcortexmembraner kan indikere at disse medikamentene er sterkt subtypeselektive. Beregnede forhold mellom K_i^{NMS}/K_H^{OXO-M} (tabell 4) kan indikere at AF160(Des) er en potent agonist for en undergruppe av rotte-
5 cerebralcortexmuscariniske reseptorer, sammenlignet med andre tilsvarende av AF160 gruppen og med AF102B. Dette ble derimot ikke observert: konkurransekurvene til både AF160(Des) og AF185 med [³H]NMS var enkeltmassevirkningskurver. Bare AF160 som utviste en tosetekurve i konkurranse med [³H]NMS konkurrerte med [³H]OXO-M
10 med en enkel massevirkningskurve. Forklaringen på reseptorsubtypeheterogenisiteten som blir eksklusivt detektert i [³H]OXO-M bindingen, men ikke i [³H]NMS bindingsanalysene, ser ikke ut til å være attraktive. Alternative forklaringer kan innbefatte mulige interaksjoner med allosteriske seter på muscariniske reseptorer, som ikke blir detektert av tilstand til reseptoren som binder antagonister så som [³H]NMS, men er
15 ikke maskert ved anvendelse av agonisten [³H]OXO-M. En annen mulig forklaring for de dårlige konkurransekurvene i [³H]OXO-M bindingsanalysen er at systemet ikke har nådd likevekt. I konkurranseanalyser ved anvendelse av AF160 (Des) eller AF185 ble likevekt ikke nådd innen 30 min, idet bindingsdata var forskjellige ved 30 min sammenlignet med 60 min ved 25°C. Når analysene ble avsluttet ved 30 min flate
20 konkurransekurver med [³H]OXO-M ble observert for både AF160(Des) eller AF185. En lignende forklaring er at AF160(Des) og AF185 har relativt sakte kinetikker (begge sakte assosiasjonsrater og sakte dissosiasjonsrater) sammenlignet med AF102B. Dette vil resultere i en meget sakte tilnærming til likevekt i konkurranseanalysene som tilveiebringer den tilsynelatende deteksjonen av tosetebindende isotermer under ikke-
25 likevektsbetingelser. Det er å anta at begge assosiasjons- og dissosiasjonsratene er relativt sakte: dersom bare assosiasjonsratene til AF160(Des) og AG185 var sakte sammenlignet med AF102B kunne de ha demonstrert mye lavere affiniteter enn AF102B. Dersom derimot deres assisjonsrater var lavere kunne deres affiniteter ha vært mye høyere enn de til AF102B.

30 Rottecerebellum er relativt homogen med hensyn til mAChR subtyper som blir uttrykt (for det meste M2). AF102B utviser lignende potens ved konkurranse med [³H]OXO-M binding i både rottecortex og cerebellum. I kontrast til dette utviste AF160(Des) og AF185 høyere potens i cortex i forhold til cerebellarmembranen og dette ble reflektert
35 som tosetekonkurransekurver bare i cortexmembraner (tabell 4 for cortex). Dette kan indikere forskjellig kinetikker for disse forbindelsene i cortex ved vs cerebellum.

Test nr 3. Andre budbringende aktiveringer i hjernebiter og i cellekulturer.

I en prosedyre for måling av effektiviteten til de testede forbindelsene som agonister på M1 muscariniske reseptorer blir hjernebiter fra rottebortex (200 μm biter) dannet. For fosfoinositider (PI) omdanningsanalyse ble disse hjernebitene belastet med [^3H]inositol (4 $\mu\text{Ci/ml}$) ved inkubering av disse i Krebs balansert saltoppløsning inneholdende den merkede liganden i 1 time ved 37°C under oksygenering. Etter vasking blir 50 μl aliquoter tilsatt til hvert rør inneholdende 10 mM LiCl i frisk Krebs oppløsning med eller uten testforbindelsen. Etter inkubasjon i 20 min ved 37°C blir reaksjonen avsluttet og merkede produkter separert på AG-1-X8 kolonner som beskrevet av Berridge (Biochem. J. 258, 849-858, 1983). Delagonister, ifølge forbindelsen testet, produsert mindre enn 80 % aktivering av PI hydrolyse sammenlignet med CCh (en full agonist). AF160 forårsaket følgelig f.eks en signifikant forhøyning i IP_3 (1,6 ganger). Sammenlignet med CCh var AF160 en delagonist med en effektivitet på 50 % av referanseforbindelsen. AF160(Des) var også aktiv, men i mindre grad enn AF160. AF102B som en annen M1 agonist var mindre aktiv enn AF160, mens AF178 ikke var aktiv i denne analysen.

Cellekulturer anrikt i en subpopulasjon av muscariniske reseptorer blir anvendt for å vurdere andre budbringeraktiveringer av testede forbindelser. For PI omdanningsstudier blir metoden til Berridge (Biochem. J. 258:849-858, 1983) anvendt; for arachidonisk syremobiliseringsstudier blir celler merket i 16 timer med 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ tritiert arachidonsyre i opprinnelig vekstmedium. Før analysen blir cellene vasket totalt 6 ganger med serumfritt DME supplementert med HEPES (20 mM) og bovint serumalbumin (1 mg/ml). Etter vaskeprosedyren ble 0,5 ml av samme medium tilsatt med tilsetning av testede ligander. Analysene blir avsluttet ved overføring av media til Eppendorfrør og sentrifugering i 10 min ved 6000 g. Radioaktiviteten til supernatantene blir opptelt og presentert som DPM tritiert arachidonsyre frigjort per brønn. Syklisk AMP akkumulering i intakte celler blir vurdert ifølge metoden til Pinkas-Kramarski et al, Neurosci. Lett. 108:335-340, 1990, mens adenylylcyklaseaktiviteten i isolerte membraner ble bestemt ifølge Johnson and Salomon (Methods in Enzymology vol 195. R.A. Johnson and J.D. Corbin, eds. Academic Press, pp 3-21, 1991).

Forbindelsene ifølge formlene I-IX med en maksimal rate av PI omdanning og/eller arachidonsyremobilisering (men ingen signifikant aktivering av adenylylcyklase) høyere enn 25 % er foretrukket. Noen eksempler for slik aktivitet kan finnes i AF160, AF160(Des), AF178, AF179, AF180, AF185, AF260, AF261, AF263, AF265, AF266, AF267. Disse forbindelsene har evne til å aktivere M1 muscariniske reseptorer.

Ulikt acetylcholin, CCh, oksotremorin-M og andre klassiske fullagonister inducerer disse forbindelsene selektiv aktivering av bestemt signalisering via M1 (eller M3) muscariniske reseptorer. Den selektive aktiveringen av muscariniske agonister til P1 hydrolyse uten
5 (eller med minimal) aktivering av cAMP akkumulering er det generelle aktivitetsmønsteret til de nye forbindelsene. Disse observasjonene kan innbefatte induksjon av M1 muscariniske reseptor-kobling til bestemte G-proteiner ved disse selektive muscariniske ligandene. I tillegg til aktivering av M1 reseptorene er disse forbindelsene også selektive på nivået til bestemte sekundære budbringere (messengers).
10 Dette konseptet av valgt aktivering av bare bestemte G-proteiner via samme muscariniske reseptor ved avnendelse av selektive muscariniske ligander er nylig blitt beskrevet av oppfinnerne under konseptet med ligand-selektiv signalisering ved anvendelse av CHO celler transfektert med rotte m1AChR (Fisher et al, Biorganic & Medicinal Chem. Lett. 2:839-844, 1992) og i en neuronaltypecellelinje, fleks PC12M1 cellelinje (Soc.
15 Neurosci. Abs. Nov. 1993). Den mulige relevansen til denne signaliserende reaksjonsveien for utvikling av cholinergisk erstatningsterapi for Alzheimers sykdom (AD) er innlysende i lys av funnene på forhøyede Gs nivåer i AD pasienter og aldrende hjerner (Harrison et al, Mol. Brain Res. 10:71, 1991; Young et al, Dev. Brain Res., 61:243, 1991). Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan er følgelig viktige for behandling
20 av Alzheimers sykdom.

Noen av forbindelsene er fullagonister, mens andre er delagonister sammenlignet med CCh i simulerende PI hydrolyse i cellekulturer transfektert med m1AChR. Delagonister er: AF160, AF160(Des), AF178, AF180, AF181, AF265, AF267. AF260, AF261,
25 AF263 og AF266 hadde full agonistisk aktivitet i denne analysen. Konsentrasjons-responskurver for AF260 og AF261 indikerte at maksimale aktiviteter ble oppnådd ved henholdsvis 10 μm og 100 μm . AF265 og AF267 oppførte seg som delagonister, med maksimale aktiviteter på 75 % og 66 % i forhold til 1 mM CCh. AF181 presenterte svak delagonistisk aktivitet i denne analysen. Ved en konsentrasjon på 1 mM aktiverte det
30 delvis PI hydrolysen, men attenuerte CCh-indusert PI hydrolyse, som ventet for en delagonist. AF213 og AF184 viste agonistisk aktivitet idet disse forbindelsene blokkerte PI hydrolysesignalet til CCh. Av enantiomerene til AF267 er den mere aktive AF267B, (-)-enantiomeren; denne forbindelsen aktiverer PI hydrolysen i celler transfektert med M1 reseptorene selv ved 10 μm (40 % CCh) og ved 100 μm (80 % CCh).

35

Vi testet potensen til de nye forbindelsene for å indusere desensitisering av CCh-formidlet PI hydrolysesignalet. AF261 induserte en mindre desensitiseringsrespons

sammenlignet med CCh: etter en 24 timer eksponering overfor 100 μ M eller 1 mM AF261 ble PI hydrolysereseponsen overfor stimulering med 1 mM CCh redusert med 45 % sammenlignet med en reduksjon på 60 % etter pre-inkubasjon med 1 mM CCh. AF267, en forbindelse som presenterte delagonistisk aktivitet for indusering av PI hydrolyse, hadde mindre evne til å inducere desensitisering. Etter en over natt inkubasjon med 1 mM AF267 ble opprinnelig CCh-formidlet PI respons redusert med nesten 29 %, 5

Vi testet også de nye forbindelsene for deres evne til å inducere PI hydrolyse i celler forbigående transfektert med human m1AChR, m3AChR eller m5AChR, i parallelle eksperimentert som beskrevet av Pittel og Wess (Mol. Pharmacol. 45:61-64, 1994). AF267 utviste høyest selektivitet overfor m1AChR subtypen og var omtrent 100 ganger mere potent for m1AChR sammenlignet med m3AChR-transfektete celler (ED₅₀ verdiene var 1,5 og 150 μ M). Dette er spesielt klart når man sammenligner signalet indusert av 10 μ M AF267, som allerede er maksimal i m1AChR transfektete celler, men som bare er 15 % av maksimal CCh signal i m3AChR transfektete celler. AF265 var noe mere potent og mere effektiv i m1AChR enn i m3AChR transfektete celler og mye mindre aktiv i m5AChR. Lignende resultater ble oppnådd med AF267 og spesielt for dets mere aktive enantiomer, (-)-enantiomer, i cellekulturer stabilt transfektet med m1AChR og m3AChR. 10 15 20

Arachidonsyre (AA) frigjøringen er en annen biokjemisk reaksjonsvei som blir aktivert av agonistene til m1AChR. På grunn av at denne biokjemiske reaksjonsveien kan bli koblet til m1AChR via et annet G-protein enn PI hydrolysen testet vi også de nye forbindelsene i denne analysen, ved anvendelse av cellekulturer stabilt transfektet med rotte m1AChR, AF263, AF265, AF266 og AF267 (ved 1 mM) viste delagonistiske aktiviteter i denne analysen. Av enantiomerene A267 er den aktive enantiomeren A267B, (-)-enantiomeren, som er en full agonist på AA frigjøringen ved 0,1 og 1 mM. AF260 og AF261 viste fullstendig agonistisk aktivitet sammenlignet med 1 nM CCh, i samsvar med observasjonene ved PI hydrolysen i samme cellelinje. Vi observerte en tendens ved disse agonistene at de indiserte mere AA frigjøring sammenlignet med 1 mM CCh. Dette kan tyde på at det CCh-formidlede signalet allerede gjennomgår desensitisering i løpet av analyseperioden (20 min ved 37°C). Det er mulig at denne desensitiseringen er mindre med testede forbindelser. Alternativt kan visse testete forbindelser være mere effektive enn CCh som M1-agonister, dvs "super agonister". I det tilfelle er det ikke klart hvorfor denne egenskapen ikke ble observert i PI hydrolyseanalysen ved anvendelse av AF260 og AF261. 25 30 35

Preinkubasjon av cellekulturene transfektert med m1AChR med 1 mM CCh i 3 timer etterfulgt av omfattende utvasking av liganden (6 x 1 ml) reduserte AA frigjøringen betraktelig. Basal AA frigjøring ble minimalt påvirket som indikerer at det ikke var tilstede gjenværende CCh etter utvaskingen. I samme eksperiment derimot reduserte pre-inkubasjon med 1 mM AF265 eller AF102B AA frigjøringsresponsen overfor 1 mM CCh til bare omtrent halvparten av den opprinnelige responsen. For lengre inkubasjonsperioder var det foretrukket medikamentkonsentrasjoner på 100 µM, idet konsentrasjoner på 1 mM ikke er noen fysiologisk relevans for langtidsbehandlinger. Etter preinkubasjon med 100 µM CCh i 24 timer var AA responsen nesten fullstendig borte. Vi sammenlignet evnen som de nye forbindelsene har til å desensitere CCh-formidlet AA frigjøringssignalet. Det var overraskende at preinkubasjon med 100 µM AF265 i 24 timer ikke resulterte i reduksjon i AA responsen. Dette fortjener spesiell oppmerksomhet på grunn av at ifølge funnene er forbindelsen en delagonist i denne analysen. I kontrast til dette førte stimulering med AF260, AF261 og AF263 (alle ved 100 µM i 24 timer) til betraktelig reduksjon av CCh-formidlet AA frigjøringssignal. Lignende preinkubasjoner med AF102B eller AF267 resulterte i relativt liten interferens med påfølgende CCh-formidlet AA frigjøringssignal, som igjen viser til likheter mellom disse to forbindelsene.

Test 4: Neurotrofisk-lignende virkninger i cellekulturer

Aktivering av M1 reseptorer ved agonister kan føre til synergistiske effekter med nervevekstfaktor (NGF) i visse cellekulturer anrikt med M1 reseptorer, f.eks PC12 (rottefeokromocytomceller) transfektert med rotte m1AChR (PC12M1 celler), (Pinkas-Kramarski et al, J. Neurochem. 59:2158-2166, 1992).

Det har nå blitt oppdaget, i henhold til et annet aspekt av oppfinnelsen, at forbindelsene med formlene I-IX med en maksimal rate på PI omdanningen høyere enn 25 % som kan synergere neurittutveksten produsert av NGF. To klasser av forbindelser kan bli detektert blant forbindelsene ifølge oppfinnelsen: 1) forbindelser som AF260, AF261 og AF263 som i fravær av NGF induserer neurittutveksten nesten lik CCh; og 2) de forbindelsene, som i skarp kontrast til oksotremorin, ikke fremmer neurittutveksten eller induserer bare minimal morfologisk forandring i fravær av NGF. Begge klassene er viktig for behandling av AD. I den andre klassen kunne ingen aksonal vekst foregå ukontrollert. En gunstig medikamentkandidat for behandling av f.eks AD vil indusere neuritogenesen bare under streng kontroll av lokalt syntetiserte og frigjorte vekstfaktorer, så som NGF, hjerneavledet nervefaktor (BDNF), NT-3 osv. Noen eksempler for en slik unik aktivitet kan finnes i forbindelser som AF160, AF160(Des), AF185 som er i det minste like

potente som AF102B for synergisering av NGF-indusert neurotutvekst. Neuritter ble utvidet etter en kombinert behandling med NGF og disse nye forbindelsene var stabile i lange perioder i kultur. Det kan følgelig antas at signaliserende reaksjonsveier anvendt av disse forbindelsene for induksjon av neurittutvekst ikke desensitiserer hurtig. Dette er

5 meget reminiscent for NGF som induserer meget stabile og og lengevirkende neurittfremmende effekter i PC12 cellene, samt i primære kulturer av synaptiske neuroner. Det er å bemerke at gamle ubehandlede kulturer til testede celler ble dårligere og inneholdt mange døde celler, som ble løsnet fra plateoverflaten. Det var interessant at celledødfenomenet var mindre i kulturer som ble på forhånd behandlet med en

10 kombinasjon av nye forbindelser og NGF. Det er velkjent at NGF redder PC12 celler fra programert celledød (f.eks Rukenstein et al, J. Neuroscience 11: 2552-2563, 1991). Disse observasjonene viser derfor at det er mulig at lignende overlevelsesfremmede responser blir formidlet av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse. Alle disse egenskapene tilveiebringer ytterligere anvendbarhet for disse forbindelsene i relasjon til

15 potensiell behandling av pasienter med Alzheimers sykdom.

Neurotrofisklignende aktivitet til disse agonistene ifølge foreliggende oppfinnelse i neuralceller, som også er avhengig av tilstedeværelse av NGF, indikerer sannsynligvis at disse forbindelsene utviser neurotrofisk aktivitet i sammenheng med noen signaler

20 formidlet via NGF reseptorene. En av mulighetene er at disse virkningene er indirekte via mAChR-formidlet øket frigjøring av amyloidforløperproteinet (APP), vide infra. Det er å bemerke at endogen APP er nødvendig for normal vekst av fibroblastiske celler, og eksogen APP kan stimulere proliferasjon av disse cellene (Saitoh et al, Cell, 58:615, 1989; Mattson et al, TINS 16:409-414, 1993). De utskilte formene av APP, blant andre

25 aktiviteter, er kjent for å regulere neurittutveksten og å fremme neuronal overlevelse (se oversikten til Mattson et al, TINS 16:409-414, 1993). Neuronal celledød i AD involverer sannsynligvis redusert produksjon og/eller tilgjengelighet av neurotrofiner, som igjen ofrer overlevelse av cholinergiske neuroner. Dersom neurotrofisklignende hendelser induert av M1 agonister også oppstår i hjernen kan dette ha en meget viktig klinisk

30 betydning og kan følgelig indikere en ny behandling for AD.

Test 5: Amyloid forløperprotein (APP) sekresjon i hjernebiter og cellekulturer.

Det er mye som tyder på at β -amyloid er en bidrager til den patologiske prosessen som

35 fører til AD. Basert på "Amyloid cascade hypothesis" resulterer AD fra feilmetabolisme av amyloidforløperproteinet (APP) (Mattson et al, TINS 16-409-414, 1993). Aktivering av mAChRs, og spesielt m1 subtypen, øker sekresjon av APP in vitro (Nitsch et al,

Science 258:304, 1992; Buxbaum et al, PNAS US 89:10075, 1992; Lahiri et al, Biochem. Int. 28:853, 1992). Ifølge et ytterligere aspekt av oppfinnelsen kan forbindelser med formlene I-IX, spesielt de som viser selektiv m1 agonistisk aktivitet og øket frigjøring av APP, være fordelaktig ikke bare for behandling av AD, men ved å forsinke
5 progresjon derav eller forhindring av AD.

Metoden anvendt for vurdering av APP sekresjon er Western immunblottekniikk (Nitshx et al, PNAS 90:5191-5193, 1993). Det er heri anvendt 22C11 monoklonalt anti-APP, som blir meget anvendt for deteksjon av APP. Dette antistoffet er rettet mot den
10 aminoternale region av APP, og identifiserer alle APP isoformene rapportert frem til nå. Den detekterer ikke amyloid eller C-terminale APP fragmenter dannet etter APP sekresjon. For vurdering av virkningene til de nye forbindelsene på APP frigjøring ble cellelinjer transfektert med m1 reseptorer dyrket i 12-brønnskåler (i noen eksperimenter, i 6-brønnskåler) som beskrevet av Pinkas-Kramarski et al. (J. Neurochem. 59:21258,
15 1992). Ligandene ble tilsatt fra sterile 100 x stamopløsninger for testede perioder. Eksperimentene ble avsluttet ved vasking av skålene to ganger i serumfritt medium. Cellene ble skrapet bort fra platene i kald fosfat/saltvannbuffer (pH = 7,4; PBS). Etter sentrifugering (10 min, 10000 g) ble supernatantene fjernet og pelletene ble suspendert i 0,1 ml kald lyseringsbuffer inneholdende proteaseinhibitorcocktail (50 mM TRIS:HCl
20 (pH = 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 mM PMSF, 5 enheter/ml aprotinin, 5 µg/ml pepstatin A, 5 µg/ml leupeptin). Pelletene ble deretter sonikert i 5 sek ved maksimal innstilling (Branson sonicator, model 130) og sentrifugert på ny. Supernatantene (cellemembranekstraktene) ble overført til rene rør. Prøver ble tatt for bestemmelse av protein ifølge Lowry metoden.

25 APP analyse ble like mengder protein (vanligvis 100 µg/kolonne) fortynnet i prøvebuffer inneholdende 0,6 % SDS og 1 % 2-merkaptoetanol, og applisert på 10 % akrylamid/SDS minigeler (Hoeffer Scientific). Forfarvede molekylvektstandarder (Sigma) ble applisert på hver gel. Gelene ble kjørt ved en konstant spenning på 25 mAmp/gel ved 4°C. Blotting
30 ble utført ved 100 mAmp i 16-18 timer ved 4°C ved anvendelse av en nitrocellulosemembran. Følgende trinn ble utført ved romtemperatur. Membranene ble blokkert i 1 time ved nedsenking i PBS inneholdende 10 % melk med lavt fettinnhold. Dette trinnet ble fulgt av vasking 3 x 5 min i PBS inneholdende 0,05 % Tween-20 og 0,1 % BSA (PBST). Anti-APP monoklonalt antistoff, klon nr 22C11 fra Boehringer
35 Manneheim (cat. # 1285-262) ble tilsatt ved en fortynning på 1:200 (0,25 µg/ml IgG) i PBST buffer i 2 timer ved RG eller 18 timer ved 4°C. I noen eksperimenter ble lignende blot probet med kontroll mus IgG ved en lignende konsentrasjon. Dette trinnet ble fulgt

av 3 x 5 min vasketrinn i PBST. Sekundære pepperrøtperoksydasekoblet geiteanti-muse IgG antistoffer (fra Jackson Immunochemicals; cat #115-035-003) ble anvendt ved 1:2000 i PBST i 1 time, etterfulgt av vasking som ovenfor. Farging av immunoblottet ble utført ved romtemperatur i 15-30 min ved anvendelse av en frisk oppløsning av 4-
5 klornaftol (0,2 mg/ml i TBS inneholdende 16 % etanol) og H₂O₂ (0,01 %). Fargede blot ble fotografert (Kodak TMAX negativ film) og scannet i et LKB UltraScan KL laserscannerset ved 40 µm vertikal intervallstørrelse og 2,4 mm horisontal slissvidde. Hver kolonne ble scannet tre ganger ved noe forskjellige posisjoner; data som ble oppnådd var gjennomsnittlig optiske tetthetsverdier.

10

Ifølge denne metoden målte vi mengden av APP som var igjen i cellemembranfraksjonen etter inkubasjon (vanligvis i 24 timer) med testede forbindelser. Mindre APP nivåer som var igjen i membranene etter slik inkubasjon med agonister ble tatt som en indikasjon på at mere APP ble utskilt av cellene. Denne målingstypen er relevant ved betraktning av
15 evnen som muscariniske agonister har til å redusere akkumulasjon av β-amyloid i Alzheimers sykdom, på grunn av at bare membranassosiert APP, til forskjell fra utskilte former av APP, kan gi opphav til β-amyloid. For måling av APP som blir utskilt i cellekulturmediet ("kondisjonert medium") var det nødvendig å konsentrere kondisjoneringsmediet, ved anvendelse av mikrofiltreringsmembraner (30 kDa
20 separering). Etter konsentreringstrinnet ble proteinmengdene i prøvene målt ifølge Bradfordmetoden (Bio-Rad kit # 500-0006) ved anvendelse av bovin gamma-globulin som en standard. Like proteinmengder ble applisert på polyakrylamidgelelektroforese (PAGE). Mengden av APP i prøvene ble analysert ved immunoblotting med 22C11 monoklonalt anti-APP antistoff, som beskrevet ovenfor. Molekylvektene ble vurdert fra
25 forfarvede standarder (Sigma) som ble innbefattet i hver gel.

30

Forbindelsene med formlene I-IX med en maksimal rate når det gjelder APP sekresjon i cellekulturer høyere enn 125 % (over basal tatt som 100 %) er foretrukket. Slike eksempler for en slik aktivitet finnes i AF160(Des), AF179, AF185, AF261, AF263, AF265, AF267.

35

For å muliggjøre prosessering av et stort antall prøver samtidig ble noen studier utført ved anvendelse av en dot-blot teknikk (96 dotter kan bli bearbeidet samtidig på en enkelt membran). I denne teknikken ble kondisjonert medium fra stimulerede PC12M1 celler applisert direkte på nitrocellulosemembraner under vakuum (uten tidligere konsentrering). Membranene ble deretter probet i likhet med immunoblottingsprotokollen. Detaljert konsentrasjonsrespons og tidsavhengighetsstudier ble også analysert ved separering av

utskilt APP på PAGE. Resultatene av disse studiene og de som ble oppnådd fra dot-blot studiene er i samsvar med hverandre. Studiene av APP sekresjon av celler transfektert med m1AChR ble følgelig utført med de nye forbindelsene og også ved anvendelse av dot-blot teknikken og 1 time inkubasjon. Noen av forbindelsene så som AF261, AF263, AF265 og AF267 er fullagonister i denne analysen.

Desensitisering av m1AChR-formidlet APP sekresjon er sterkere i løpet av forlengede inkubasjoner med CCh sammenlignet med delagonistene fra denne oppfinnelsen. Denne forklaringen er spesielt attraktiv når vi betrakter dataene på desensitisering av arachidon-syre (AA) frigjøringsingaler i kombinasjon med det som nylig er blitt foreslått av Emmerling et al (BBRC 197: 292-297, 1993) som omfatter at AA frigjøringen er involvert ved simulering av APP sekresjonen. Våre data indikerer at noen av de nye forbindelsene kan bli favorisert i forhold til de meget effektive agonistene for klinisk anvendelse for å redusere celleassosierte APP nivåer over lange perioder. Forbindelsene som utviste minimal desensitisering i AA frigjøringsanalysen er AF265 og AF267. Målinger av celle-assosiert APP etter inkubasjoner med AF265 eller AF267 i 24 timer (begge ved 100 μm) indikerer reduserte APP nivåer, som var sterkere med AF267 og nesten lik effekten til CCh, mens AF267 hadde en svakere effekt.

Data på APP sekresjon til cellekulturer stabilt transfektert med m1AChR demonstrerer klart at flere av de nye forbindelsene kan stimulere APP sekresjon, og kan derfor bidra til å redusere amyloidakkumuleringen in vivo. For å muliggjøre en ekstrapolasjon av vevkulturdataene til en in vivo situasjon bør det fortrinnsvis bli demonstrert at forbindelsene også kan stimulere APP sekresjon i hjernen. APP sekresjonen til rotte cerebral cortexbiter ble studert. I et typisk eksperiment ble rotte cerebral cortexbiter preparert øyeblikkelig fra frisk-dissekert vev, spaltet i to vinkelrette retninger ved hjelp av en McIlwain Tissue Chopper (300 x 300 micron) og skylt tre ganger med oksygen-mettet Krebs buffer. Vaskede biter ble ekvilibrert med denne bufferen i 15 min ved 37°C. Ved å følge likevektstrinnet (som er nødvendig for fjerning av celledbris som er et resultat fra spaltningsprotokollen), ble bufferen skiftet til Krebs buffer inneholdende 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA (som en proteinbærer) og proteaseinhibitorcocktail (0,1 mM PMSF og 5 $\mu\text{g/ml}$ av leupeptin, pepstratin og aprotinin-A). Bitene ble dispensert til plastrør og stimulert i 1 time ved 37°C (2 timer i et eksperiment) med indikerte konsentrasjoner av testforbindelsene. Ved slutten av inkubasjonsperioden ble bufferprøvene samlet ved sentrifugering, analysert for proteininnhold og like proteinmengder ble separert og prosessert for immunoblotting med 22C11 anti-APP monoklonalt antistoff ved anvendelse av PAGE i likhet med eksperimentene med dyrkede celler. Utskilt APP fremkom som to proteinbånd

med tilsynelatende molekylvekt på 117 kDa (hovedbånd) og 90 kDa (mindre bånd). Disse APP båndene kan tilsvare utskilte former av APP751 og APP695 (hoved Kunitz-inneholdende og Kunitz-manglende former av APP). Alternativt kan de tilsvare modne og umodne (ikke-glykosylerte former av utskilt APP751. For tiden er tilstrekkelig data for å skjelne mellom disse mulighetene ikke tilgjengelig på grunn av at 22C11 monoklonalt antistoff anvendt i disse studiene identifiserer alle formene av utskilt APP. Både CCh eller AF267, f.eks, (begge ved 0,1 mM) økte APP sekresjonen til rotte cerebralcortexbitene 2-3 ganger sammenlignet med kontroll APP sekresjonen. Dette var klart for både 117 kDa og 90 kDa proteinbåndene.

10

Observasjonene på APP sekresjonen til cerebralcortexbitene er unike. Opptil nå er den ene publiserte demonstrasjonen på APP sekresjon fra hjernevev in vitro av Nitsch et al. (PNAS 90:5191-5193, 1993). som rapporterte at elektrisk stimulering av rotte hippocampalbiter økte APP frigjøringen. Deres studier innebærer ikke simulering med en reseptoragonist. Våre observasjoner er følgelig innovative og nye, idet de er den første demonstrasjonen på regulering av APP utskillelse i hjernevev fra en hvilken som helst reseptorligand, og spesielt, en M1 agonist som AF267. De forbindelsene som stimulerer APP sekresjon i rotte cerebralbitene er foretrukket. Slike forbindelser kan bli betraktet som alle agonister i oppfinnelsen med evne til stimulere andre budbringere som PI >25 % kontroll. Disse unike observasjonene kan indikere potensiale til noen av forbindelsene når det gjelder å redusere deponering av A β -amyloidpeptider i hjernen til pasienter med Alzheimers sykdom.

15

20

25

Test 6: Tauproteinfosforylering i cellekulturer transfektert med mAChRs og i rotte cerebralbiter

Tau (τ) er et neuronspesifikt mikrotubulassosiert protein som det er mye av i aksoner. Tau blir uttrykt som flere isoformer som alle kommer fra alternativ spleising av et enkelt gen (humant tau har 6 isoformer, med 352-441 aminosyrer). Det stabiliserer mikrotubulene til neuronalaksoner og dets binding til mikrotubulene blir regulert av dets fosforylering i bestemte seter (Mandelkow and Mandelkow, TIBS 18:480-483, 1993). Denne bindingen regulerer aksonal vekst og stabilitet (Baas et al, J. Cell Biol. 115:1333-1344, 1991; Mattson, Brain Res. 582:107-118, 1992). En av kjennetegnene ved Alzheimers sykdom, i tillegg til amyloiddeponering i plakker, er akkumulering av tau eller tauderivater i neurofibrillære floker (NFT). Disse flokene reflekterer sannsynligvis sluttproduktet fra neuronal celledød i sykt hjernevev. Mange studier har demonstrert forandringer i tauproteinfosforylering i post-mortem hjerneprøver fra AD pasienter.

30

35

Dette fenomenet er best dokumentert som øket immunoreaktivitet med monoklonalt antistoff ALZ-50 som blir vist å detektere hyperfosforylerte former av tau i disse hjerneprøvene (Vincent and Davies, PNAS 87:4840-4844, 1990; Vincent and Davies, Brain Res. 531:127-135, 1990). Det ble følgelig foreslått at endringer i den delikate balansen mellom taupesifikke kinaser/fosfataser kan være involvert i prosessen med neuronal celledød i AD, og en korreksjon av en slik sannsynlig ubalanse kan være av potensiell terapeutisk verdi.

Fosforyleringsnivået til tauproteiner i cellekulturer stabilt transfektert med m1AChR etter stimulering med CCh eller en av testforbindelsene ble følgelig studert. Dette ble utført ved anvendelse av monoklonalt antistoff tau-1 som ble vist å gjenkjenne bare defosforylert, men ikke fosforylert, isoformer av tau (Mandelkow and Mandelkow, TIBS 18:480-483, 1993). Etter inkubasjoner av cellene eller rotteccorticale biter med agonistene i forskjellige perioder ble cellene og/eller bitene vasket tre ganger med PBS, skrapet i PBS inneholdende 0,2 mM EDTA og sentrifugert i 5 min ved 10.000 x g. Membranpelletene ble analysert for proteininnhold, og like proteinmengder ble applisert på PAGE for immuno-blotting med tau-1 antistoff. Målingene av immunoreaktiviteten ble utført i likhet med studiene av APP (ved anvendelse av videodensitometri), med unntakelse av at peroksydase-koblet andre antistoff ble detektert ved anvendelse av Enhanced Chemi-Luminescence (ECL) teknikk (kit RPN-2109; Amersham, UK).

Både CCh eller de testede agonistene økte tau-1 immunoreaktiviteten, og denne økningen ble fullstendig blokkert av atropin. En betydelig økning i CCh-formidlet tau-1 immunoreaktivitet ble observert i celler dyrket med NGF (50 ng/ml) i 3 dager før stimulering med muscariniske ligander. Lignende eksperimenter som anvender varierende konsentrasjoner av CCh eller testet agonist indikerte at den økte tau-1 immunoreaktiviteten krevde relativt høye ligandkonsentrasjoner (10-100 μ m).

Taufosforylering i rotteccerebralcortexbiter etter stimulering med CCh sammenlignet med foreliggende forbindelser kan også bli målt. Det var overraskende at muscariniske agonister som ble testet har evne til å redusere taufosforyleringen.

Muscariniske agonister har evne til å redusere taufosforylering ved å aktivere transfektert m1AChR i cellekulturer og spesielt i hjernebiter. Effektene til disse agonistene ser ut til å være lengevirkende og dette er klart selv etter inkubasjoner av celler med 100 μ m ligander i minst 3 dager. Disse observasjonene kan indikere at selektive M1-agonister har evne til å redusere taufosforyleringen.

Disse observasjonene er nye og det ble ikke demonstrert noe forhold mellom cholinergisk mangel i Alzheimers sykdom og akkumulering av fosforylerte tauproteinisoformer i neurofibrillære floker som er vanlig for skadet hjernvev. Disse nye observasjonene kan ha relevans for å redusere progresjonen av Alzheimers sykdom ved M1 agonistene.

Konklusjon:

M1 agonistene kan ha et antall virkninger. Virkningsmekanismen til m1 agonistene er mer omfattende enn det som opprinnelig har vært antatt. Følgende aktiviteter er allerede vært assosiert med m1 agonistene, in vitro (og kanskje in vivo):

1. Binding med og aktivisering av m1 reseptorer;
2. Bestemt aktivisering av selekterte G-proteiner (f.eks Gq men ikke Gs);
3. Neurotrofisk-lignende og synergistiske virkninger med NGF;
4. Sekresjon av amyloidforløperprotein (APP) og reduksjon av β -amyloider;
5. Økning av andel defosforylerte τ proteiner;
6. NGF-lignende virkninger.

Alle disse virkningene kan bli satt sammen i en modell hvor aktivisering av m1 AChRs fører til en kaskade av beslektede hendelser. Disse komplekse mekanismene som vedrører m1 agonistisk aktivitet kan bli koblet til et generelt scenario som forklarer unormal APP prosessering, NGF-lignende mangler og cholinergiske mangler i SDAT og AD. Følgelig kan agonister som de ifølge foreliggende oppfinnelse være av verdi for å forhindre amyloid dannelse ved å fremme selektivt og positivt sekretaseprosesseringsveien, og kan også fremme virkningen av neurotrofiner i AD, på grunn av deres synergistiske virkning med NGF. m1 agonistene kan følgelig være nyttig i en cholinergisk erstatningsstrategi og også ved forsinkning av AD progresjon. Foreliggende forbindelser som er m1 agonister er (til forskjell fra peptider) relativt små molekyler som har neurotrofisk lignende virkninger og som fremmer frigjøringen og normal prosessering av APP, og øker defosforylerte (eller reduserer fosforylerte) tauproteiner. Behandling av celler med en m1 agonist kan muligens skifte prosessering av APP fra amyloidogen lysosomalreaksjonsvei til normal sekretorisk reaksjonsvei og følgelig cholinergiske terapier av AD kan ha langtidsvirkninger på β -amyloiddeponeringen (se også Lahiri et al, Biochem. Int. 28: 853-860, 1992). På grunn av at noen av agonistene fra denne oppfinnelsen viser NGF-lignende effekter på en kontrollert måte og spesielt i nærvær av NGF kan slike forbindelser være av betydelig verdi for fremtidig behandling av AD/SDAT. På denne måten kan neurittutveksten bli bedre kontrollert. Foreliggende forbindelser har en lengevirkende

fordelaktig virkning på neurittutveksten i nærvær av NGF. Det kan følgelig spekuleres om fremtidig mulig behandling ved anvendelse av slike vekstfaktorer som NGF eller AD/SDAT pasienter kan kreve mindre hyppige administreringer av selve vekstfaktoren, når administrert sammen med en m1 agonist. Administrering av NGF til hjernen er det 5 vanskeligste på grunn av at denne forbindelsen ikke krysser blod-hjerebarrieren. Når dette problemet blir løst (f.eks via spesielle leveringssystemer) vil det fortsatt kreve gjentatt administrering av NGF-lignende forbindelser. m1 agonister i dette henseendet kan redusere antall av nødvendige gjentatte administreringer av NGF på grunn av at slike agonister forlenger virkningene av NGF (i det minste in vitro). Kliniske forsøk av NGF 10 (icv) i 2 AD pasienter viste meget alvorlige negative virkninger (alvorlig smerte, forvirrethet, reduksjon av minimentalregistrering), (3rd Springfield Symposium on Alzheimer's Disease, May 11-15, 1994, Springfield, Il. USA). Anvendelse av m1 agonister som de i foreliggende oppfinnelse som synergiserer med NGF kan være av stor verdi for å redusere bivirkningene som er assosiert med NGF i mennesker, på grunn av 15 at lavere doser NGF kan bli anvendt.

Test nr 7: Farmakologiske og toksikologiske profiler.

Studien ble utført ved å observere dyrene etter iv eller oral (mus) eller oral (intrastrisk 20 for rotter) administrering av 3-6 dosenivåer av hver forbindelse. Resultatene er oppsummert i tabell 5.

Ved forskjellige tidsintervaller post-administrering (10, 20, 30, 45, 60, 120, 240 min og 24 timer) av dyr ble utsatt for detaljerte observasjoner av forandringer i generell adferd, 25 reflekser og autonome effekter. Dødeligheten ble registrert 24 timer etter administrering av testforbindelsene. Kropstemperaturen i rottene ble målt ved anvendelse av Tele-Thermometer (Model 46 TUC). Forskjellige farmakologiske og adferdsmessige parametre innbefatter: spyttsondring, rødhet rundt nese og munn, chromodacryorrhea, beroligelse, ataksi, cyanosis, tremors, konvulsjoner, hypothermia, opisthotonos, 30 respiratorisk distress, diaré, pining, piloreksjon, dødelighet, forandringer i pupilldiameteren, rotarod, hypo- eller hyper-aktivitet og vakalisasjon. Noen av de testede forbindelsene er ikke-toksiske opptil 500 mg/kg (p.o. mus og rotter).

Tabell 5: Farmakologiske og toksikologiske profiler i mus eller rotter

| Forb. | Dose * | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|--------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AF-133 | 50♥ | | | | | | | | | | | | | | 0/5 |
| mus | 100♥ | | | | | | | | | | | | | | 3/5 |
| | 200♥ | | | | | | | | | | | | | | 5/5 |
| | 400 | | | | | | | | | | | | | | 1/5 |
| 134 | 10♥ | | | | | | | | | | | | | | 0/5 |
| | 25♥ | | | | | | | | | | | | | | 0/5 |
| mus | 50♥ | | | | | | | | | | | | | | 0/5 |
| | 100♥ | | | | | | 4/5 | | | | 2/5 | | | | 3/5 |
| | 100 | | | | | | | | | | | | | | 0/5 |
| | 200 | | | | | | | | | | 1/5 | | | | 0/5 |
| 151 | 50 | 4/4 | 4/4 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| (S) | 100 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 200 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 2/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 |
| rotter | 500 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 2/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 2/4 |
| 160 | 8 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | NT | 0/4 | 0/4 | 0/4 | NT | NT | 0/4 |
| | 16 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 1/4 | | | | 0/4 |
| mus | 31 | 2/4 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 1/4 | | | | 0/4 |
| | 63 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | | | | 0/4 |
| | 125 | 3/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | | 0/4 | 2/4 | | | | 0/4 |
| | 250 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | | 0/4 | 3/4 | | | | 0/4 |
| | 500 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | | 0/4 | 3/4 | | | | 0/4 |
| rotter | 10 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 25 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 50 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 100 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 200 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 2/4 | 4/4 | 4/4 | 2/4 | 0/4 |
| | 500 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 |
| 160 | 63 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| (Des) | 125 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 250 | 2/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| rotter | 500 | 3/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 3/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 |
| mus | 120 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| | 240 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 1/4 | | | 0/4 |
| | 500 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 2/4 | | | 0/4 |
| | 1000 | 2/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 3/4 | 0/4 | 3/4 | | | 0/4 |

* mg/kg administrert oralt dersom ikke annet er angitt

♥ administrert intravenøst

Tabell 5: (forts).

| Forb. | Dose | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|--------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AF-163 | 25 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | NT | 0/4 | 0/4 | 0/4 | NT | NT | 0/4 |
| | 50 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| mus | 100 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| | 200 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| | 400 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| rotter | 50 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | NT | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 100 | 2/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 200 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 400 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| 177 | 31 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | NT | NT | 0/4 |
| | 62 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 1/4 |
| mus | 125 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | 2/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 4/4 |
| | 250 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 4/4 |
| | 500 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 4/4 |
| 178 | 30 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | NT | 0/4 | 0/4 | 0/4 | NT | NT | 0/4 |
| | 60 | 1/4 | 2/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| mus | 144 | 3/4 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| | 288 | 4/4 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| | 500 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | | 2/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| rotte | 63 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | NT | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 125 | 4/4 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 3/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 250 | 3/4 | 3/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 3/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 500 | 4/4 | 3/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| 185 | 31,3 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| | 62,5 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| mus | 125 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 2/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| | 250 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| | 500 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | | | 0/4 |
| rotte | 62,5 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 125 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 250 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 500 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| 261 | 3,75 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 7,52 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| rotte | 15,6 | 3/4 | 4/4 | | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | | 0/4 | 3/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 62,5 | 4/4 | 4/4 | | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | | 0/4 | 3/4 | 3/4 | 3/4 | 0/4 |
| | 250 | 4/4 | 4/4 | | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | | 0/4 | 1/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 |
| 265 | 125 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| rotter | 250 | 1/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 2/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| | 500 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| mus | 125 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | | 0/4 | 0/4 |
| | 250 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 2/4 | 2/4 | | 0/4 | | 0/4 | 0/4 |
| | 500 | 2/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | | 0/4 | | 4/4 | 0/4 |

NØKKEL TIL TABELL 5:

| | |
|---|-----------------------------|
| 1 = spyttutsondring | 8 = hypotermia |
| 2 = chromodacryorrhea (rotter) eller lacrimasjon (mus) | 9 = mydriasis |
| 3 = beroligelse | 10 = respiratorisk distress |
| 4 = ataksi | 11 = diare |
| 5 = cynosis | 12 = pining (gnaging) |
| 6 = tremors | 13 = piloereksjon |
| 7 = konvulsjoner | 14 = dødelighet |

Diskusjon av resultatene5 **AF160**

AF160 er en relativ potent muscarinisk agonist som er mere sentral enn perifer (f.eks hypotermia vs spyttutsondring), og mindre toksisk i det minste fem ganger sammenlignet med AF102B. Et betydelig funn i denne forbindelsen var mangel på tremorer i rotter opp til høyest testet dose (500 mg/kg, po) og noen tremorer i mus ved doser >125 mg/kg p.o. En lignende mønster ble detektert i metylanalogen til AF160, dvs AF178, hvor ingen tremorer ble detektert i både mus og rotter opp til 500 mg/kg p.o. Mus er mere sensitive for denne forbindelsen enn rotter, idet perifere og sentrale bivirkninger oppstår ved lavere doser.

15

I rotter ble AF160 funnet å være en potent agonist. Tegn var synlige ved en dose så lav som 25 mg/kg. ED₅₀ verdiene ble oppnådd for hypotermi og "gnawing". Grad og alvorligheten til symptomene var doserelaterte. Den hypotermiske virkningen var lengevirkende, lenger enn 4 timer.

20

Fire aspekter er bemerkelsesverdige i AF160:

1. Forbindelsen er antagelig mere CNS aktiv enn PNS aktiv (f.eks hypotermi oppstår ved lavere dose enn ved spyttutsondring (salivation)).
- 25 2. Det er en CNS selektivitet på grunn av at ikke alle CNS effekter blir observert (f.eks hypotermi vs mangel på tremorer).
3. Varigheten av de observerte effektene er lang
4. Ingen dødelighet i mus og rotter ble observert ved høyeste dosenivå, 500 mg/kg.

AF160(Des)

I rotter ble spyttutsondring, hypotermi og diare observert i 1 av 4 dyr 45 min etter administrering av 125 mg/kg. Etter økning av dosen til 500 mg/kg økte antall dyr pr gruppe som utviser disse symptomene og i tillegg ble piloreksjon og beroligelsen
5 betydelig. Hypotermisk virkning var ikke doserelatert. Ingen andre sentral eller autonome effekter ble produsert av denne forbindelsen. Forbindelsen er relativt inaktiv med hensyn på cholinergiske bivirkninger. I tilfelle AF160(Des) blir bivirkninger utløst ved dosene >246 mg/kg p.o. i rotter.

10

I mus ble lacrimasjon, diare og mydriasis observert etter administrering av 240 mg/kg AF160(Des). Ved høyere doser og opptil 1000 mg/kg var ytterligere symptomer så som spyttutsondring, beroligelse og hypotermi innlysende. Grad og alvorligheten til de fleste symptomene (untatt lacrimasjon) var doserelaterte. Ingen dødelighet ble observert selv
15 ved det høyeste dosenivå, 1000 mg/kg. Topisk aplikasjon av 1 mg (terskelmengde) AF160(Des) inn i øyet produserte mydriasis i løpet av 15 min. I kontrast til dette produserte atropin anvendt som et referansemedikament for dets kjente lokale mydriatiske effekt, mydriasis i løpet av 45 min ved så lavt som 40 µg. Dette resultatet viser klart at AF160(Des) induisert-mydriasis er sentral i opprinnelsen.

20

AF163

I rotter ble de eneste effektene som ble produsert av denne forbindelsen ved et doseområde mellom 50 og 400 mg/kg spyttutsondring og rødhet rundt nese og munn. Disse
25 virkningene hadde kort forløp (10 min) og kort varighet (20 min). I det antall dyr som utviser spyttutsondring var doserelatert, ble rødhet rundt nese bare funnet i et dyr ved et dosenivå på 100 mg/kg. Konklusjonen er at bare autonome virkninger ble observert etter administrering av denne forbindelsen i rotter.

30

I mus, untatt vokalisering observert i et dyr ved den høyeste dosen som ble testet (400 mg/kg) førte denne forbindelsen ikke til andre virkninger. Ingen uvanlige perifere og sentrale bivirkninger ble detektert med AF163, i mus, opptil den høyeste testede dosen (400 mg/kg, p.o.). AF163 kan bli betraktet som et promedikament for AF160 på en
lignende måte som ditioanalogen til RS86 (se BOLLIGER et al, i Alzheimer's and
35 Parkinson's Disease; Strategies in R&D, eds. Fisher et al, Plenum Press. pp 585, 1986).

AF177

I mus ble hypotermi, hypoaktivitet og tremorer observert 10 min etter administrering av 31 mg/kg. Etter økning av dosen til 62 mg/kg økte antall symptomer. Sløvhets, ataksi, Straub-taill og fallning fra rotarod ble observert 20 min etter administrering i 4/4 mus. Dødelighet av 1/4 mus oppsto 30 min etter administrering. Ved økning av dosen til 125, 250 og 500 mg/kg ble spyttutsondring, sammentrekninger og dødelighet av 4/4 mus også observert, men forløpet og varigheten av symptomene ble progresivt mere alvorlig. Beregnede ED₅₀ verdier viser at AF177 har for det meste sentrale virkninger. AF177 kan bli betraktet som et promedikament for en sentralt aktiv og potent muscarinsik agonist.

AF178

I mus ble redusert motoraktivitet, spyttutsondring, lårmasjon og diare sett opptil 1 time etter administrering av 60 mg/kg. Økning av dosen til 500 mg/kg resulterte i ytterligere symptomer så som respiratorisk distress, reduksjon i ytelse på rotarod, tremorer og mydriasis. Grad og alvorligheten til de fleste symptomene var doserelatert. Økning av dosene forlenget aktiviteten. For eksempel varte diare, tremorer, mydriasis osv omtrent i 4 timer. Det er verdt å nevne at ved 500 mg/kg utviste et dyr palpitasjon i løpet av 20 min etter administrering og dette varte i 10 min. Til tross for at en dose på 500 mg/kg produserte betydelige toksikologiske symptomer ble ikke dødelighet registrert. Vurdert LD₅₀ vil følgelig være ved en dose høyere enn 500 mg/kg

I rotter var spyttutsondring det eneste uvanlige tegnet etter administrering av 62,5 mg/kg AF178. Økning av dosen til 125 mg/kg førte til at flere tegn ble synlige så som cromodacryorrea, hypotermi, diare og gnawing. Grad og alvorligheten til disse symptomene ble øket med dose. Respiratorisk distress var bare synlig i et dyr ved en dose på 500 mg/kg, 5 min etter injeksjon. Forbindelsen kan ha relativt bred sikkerhetsmargin.

AF180

I rotter var spyttutsondring det eneste symptomet som ble produsert ved 125 mg/kg AF180. Dette ble synlig i løpet av 20 min etter administrering og varte i 40 min. Ytterligere økning av dosen til 500 mg/kg økte varigheten av spyttutsondringen til 230 min. Ved dette dosenivået ble hypotermi også registrert i 3 dyr 15 til 240 min etter injeksjon. Ingen andre sentral eller autonome virkninger ble observert ved dette dosenivået.

I mus ble hypotermi og mydriasis observert 20 min etter administrering av 125 mg/kg. Etter økning av dosen til 500 mg/kg økte antall pr gruppe som utviser disse symptomene, og spyttutsondring, lacrimasjon og sløvhet tydelig. Varigheten til disse symptomene var videre lengre enn 1,5 time etter administrering av 500 mg/kg. Ingen andre sentrale eller autonome virkninger ble produsert av denne forbindelsen.

AF185

I mus ble mydriasis observert etter administrering av 62,5 mg/kg AF185. Ved høyere doser og opptil 500 mg/kg ble ytterligere symptomer så som spyttutsondring og hypotermi synlig etter administrering av forbindelsen. Ingen dødelighet ble observert selv ved høyest dosenivå (500 mg/kg).

I rotter ble det unntatt rødhet rundt nese og munn observert i et dyr ved høyeste testede dose (500 mg/kg) førte denne forbindelsen ikke til andre negative virkninger. Det kan konkluderes med at AF185 er en meget trygg forbindelse.

AF261

I rotter var hypotermi (en typisk CNS effekt) det eneste symptomet produsert av 7,5 mg/kg AF261. Det ble klart i løpet av 10 min etter administrering og varte i 50 min. Etter økning av dosen til 15,6 mg/kg var ytterligere symptomer så som spyttavsondring, chromacyorrhea, hypoaktivitet, ataksi og diare synlig i løpet av 10 min. Ved høyere doser og opptil 250 mg/kg var ytterligere tegn så som rødhet rundt nese og munn, tremorer, konvulsjoner, opistotoner, gnawing og piloereksjon synlig. Disse tegnene kunne bli detektert 5-10 min etter administrering. Alvorligheten og graden av de fleste av disse symptomene var doserelaterte. Dødelighet på 4/4 rotter oppsto bare ved den høyeste testede dosen (250 mg/kg), 45 min etter administrering.

AF265

I rotter var hypotermi (en typisk CNS effekt) det eneste symptomet som ble produsert av 250 mg/kg AF265. Dette ble klart i løpet av 10 min etter administrering og varte i 110 min. Ingen andre sentrale eller autonome virkninger ble observert etter administrering av denne forbindelsen. Denne forbindelsen er følgelig betydelig på grunn av dets CNS effekt.

Test nr 8: Effekter av AF134 i naive rotter.

- Virkning av AF134 på hukommelsen og læringsevnen ble vurdert i en "step-through" passiv unngåelsesprøve i "naive" rotter. Adferdsparadigmer og instrumentering er som beskrevet i Fisher et al, *Neurosci. Lett.* 102: 325 (1989). Fire grupper (20 rotter/gruppe) av "naive" hann Sprague-Dawley rotter, 200-300 g, 3-4 måneder gamle (Charles River Breeding, UK) ble testet med en av følgende doser AF134: 1, 5, 10 mg/kg, intraperitonealt (ip) og en gruppe mottok saltvann (1 ml/kg, ip).
- I AF134-behandlede rotter ble ingen signifikante forskjeller funnet mellom retensjonslatensen til pre-sjokkbehandlede rotter hvor forbindelsen ble injisert 30 min før sjokket og den til post-sjokkbehandlede rotter (hvor forbindelsen ble injisert 60 min etter sjokket).
- I en annen eksperimentell paradigme ble AF134 sammenlignet med scopolamin (en anti-muscarinisk forbindelse) i en 8-armet radialarm-labyrint i "naive" rotter (adferdsparadigme og instrumentering som beskrevet i Fisher et al, *Neurosci. Lett.* 102:325, 1989). En gruppe på 14 naive rotter ble behandlet med scopolamine (0,2 mg/kg ip) eller saltvann (1 ml/kg, ip) 20 min før labyrinten ble kjørt. Alle armene var med lokkemat. Hver rotte mottok begge behandlingene med intervall på 3 dager mellom behandlingene (10 dagers opptrening ble fulgt av 10 dager med testing). Samme eksperimentet i samme rotter ble gjentatt med AF134 (5 mg/kg, ip) mot saltvann (1 ml/kg, ip). Scopolamin viste som ventet en typisk anticholinergisk "amnesisk" virkning ved anvendt dose. AF134 forårsaket ikke noen forandring i adferden til rottene.
- AF134, som har antagonistisk aktivitet på M1 (basert på bindingsstudier) og M3 muscariniske reseptorer (basert på marsvinilempreparat) produserer ikke forringede kognitive effekter og kan følgelig være nyttig for behandling av bevegelsesyke, Parkinson's sykdom, blandet Parkinson's og Alzheimer's sykdom, manisk depresjon, human hodeskade og i forskjellige perifere forstyrrelser ved behandling av akutt rhinitis, peptiske sår og astma.

Test nr 9: Adferdsstudier i dyremodeller

AF160 og AF102B - Radial armlabyrint.

5 Potensielle nyttevirkninger av dosene til AF160 (3 og 5 mg/kg p.o) og AF102B (3 mg/kg, p.o) for reversering av hukommelsessvikt til AF64A-injiserte rotter (1,5 nmol/2 µl/side), ble undersøkt. Disse dyremodellene etterligner i viss grad den cholinergiske hypofunksjonen til SDAT. (Fisher et al, J. Pharmacol. Expl. Therap. 257:392-403, 1991). 80 hann Sprague-Dawley rotter, 4-6 måneder gamle (340-580 g) ble anvendt i
10 denne studien. Tidsintervallet mellom drifts- og adferdstesting var 2-3 måneder. En uke før adferdstesten ble påbegynt ble rottene overført til individuelle bur og ble ikke gitt mat før de hadde nådd omtrent 85 % av deres vekt ved fri adgang til mat. Deretter mottok rottene 5-6 stykker Altromin (15 g) pr dag for å holde kroppsvekten i likevekt. Rottene hadde fri adgang til vann. Rommet ble opplyst 12 timer pr dag (6:00-18:00) og
15 adferdstesting ble utført i løpet av morgenen.

Adferdstesting

40 AF64A og 40 saltvanninjiserte rotter ble tilfeldig delt inn i 4 subgrupper og ble inn-
20 lemnet i AF160 3 mg/kg, AF160 5 mg/kg, AF102B 3 mg/kg (10 ml/kg, p.o) og DDW. I løpet av de første to dagene av adferdstesting ble rottene opptrent ifølge 8 av 8 "RAM-baiting-procedure", for å gjøre dem familiære med labyrinten og forsterknings-pelletene (presisjon 45 mg). Ved dette stadiet ble rottene plassert i det midtre området og ble gitt fri adgang til alle 8 lokkematarmerne. Hver sesjon ble avsluttet når alle 8 pelletene
25 var blitt samlet eller etter 15 min, hva som enn kom først. I løpet av 3. og 4. dager ble pelletene plassert bare i enden av armene. Ellers var prosedyrene de samme som ved forhåndstreningen. Testing ble utført i løpet av eksperimentets andre uke. I løpet av denne tiden ble AF160, AF102B eller DDW (anvendt som kontroll) administrert en gang pr dag i 5 dager, 60 min før testing.

30

Dataanalyser

Alle bevegelser innenfor labyrinten ble registrert, i tillegg til medgått tid samt korrekte og ukorrekte responser. For å vurdere virkningen av AF160 eller AF102B i løpet av test-
35 perioden sammenlignet med opplæringsperioden som ble anvendt som en grunnlinje ble det anvendt en 3-veis ANOVA (2 x 4 x 2) med en gjentatt variabel (blokker med trening eller dager med testing) og to ikke-gjentatte variabler (injeksjon av

AF64A/saltvann, og behandling med forskjellige dose AF160 og AF102B eller DDW. Post-hoc sammenligninger ble fullført ved anvendelse av "simple main effects" kontraster.

5 Resultater

Når det gjelder korrekt valgt fra 8 visitter ble det funnet en signifikant interaksjon mellom grupper x behandling x uker [$F(2/48)=3,95$; $P<0,025$]. I løpet av både trening og i løpet av administreringsperioden gjorde AF64A-injiserte rotter betydelig mindre korrekte valg enn saltvanninjiserte rotter. ($P<0,001$). Begge medikamentene, AF102B (3 mg/kg) og AF160 (3 mg/kg) forbedret ytelsen til AF64A injiserte rotter i løpet av den andre uken sammenlignet med treningsdagene ($P<0,001$, respektivt). I løpet av den andre uken nådde begge gruppene, AF160 (3 mg/kg) og AF102B (3 mg/kg) det samme ytelsesnivået som var betydelig høyere enn det til AF64A injiserte rotter behandlet med vann ($P<0,05$). AF160 5 mg/kg hadde ingen signifikant virkning på denne parameteren. Sammenlignet med saltvanninjiserte rotter ble ytelsen til rotter behandlet med vann forbedret (5 %) i løpet av den andre uken sammenlignet med den første uken ($P<0,01$). Likeledes ble også en forbedring (7,5 %) oppdaget i rotter behandlet med AF160 (3 mg/kg) ($P<0,001$). AF102B (3 mg/kg) hadde ingen virkning på denne parameteren i saltvanninjiserte rotter.

Med hensyn til totale feil ble en signifikant interaksjon funnet mellom grupper x behandling x uker [$F(3/64)=3,49$; $P<0,025$]. I begge ukene var antall feil i AF64A-injiserte rotter betydelig høyere enn de til saltvanninjiserte rotter ($P<0,001$). Antall feil i alle fire gruppene av AF64A-injiserte rotter ble betydelig redusert i andre uke sammenlignet med første uke: AF64A + vann - 20 % ($P<0,01$), AF64A + AF160 - 3 mg/kg - 16 % ($P<0,001$), AF64A + AF160 - 5 mg/kg - 15 % ($P<0,02$) og AF64A + AF102B - 3 mg/kg - 30 % ($P<0,001$). Til tross for at alle fire gruppene forbedret deres ytelse var bare den til AF102B - 3 mg/kg høyere enn ytelsen til AF64A + vanngruppen. I saltvannsinjiserte rotter forbedret AF160 - 3 og 5 mg/kg betydelig ytelsen i den andre uken sammenlignet med første uken (henholdsvis $P<0,01$, $P<0,001$). AF102B - 3 mg/kg produserte en dårligere ytelse og denne gruppen gjorde flere feil i andre uke sammenlignet med første uke ($P<0,001$).

35 Med hensyn på totaltid ble en betydelig interaksjon funnet mellom grupper x behandling x uker [$F(2/48) = 3,29$; $P<0,05$]. En forbedring i tid ble funnet i AF64A-injiserte subgrupper med unntakelse av AF64A + AF160-5 mg/kg; AF64A + vann - 31 % ($P<0,01$),

AF64A + AF160-3 mg/kg - (47 %) ($P < 0,001$) og AF64A + AF102B 3 mg/kg (21 %) ($P < 0,01$). I saltvanninjiserte rotter ble en signifikant effekt av forbedring i tid funnet i saltvann + vann - (54 %) ($P < 0,001$) og saltvann + AF160 3 mg/kg - (37 %) ($P < 0,001$). AF102B hadde ingen virkning på saltvanninjiserte rotter på dette parameteret, og dette kan kanskje skyldes en "floor effect". AF160 - 5 mg/kg påvirket ikke signifikant ytelsen til saltvannsinjiserte rotter til tross for at en tendens for forbedring kan bli observert.

Konklusjoner

1. Rotter injisert med AF64A (1,5 nmol/2 μ l/side) viste en signifikant forbedring i parametrene korrekte valg, antall feil og totalt tid sammenlignet med saltvanninjiserte rotter.
2. AF160 (3 mg/kg) forringet signifikant ytelsen til AF64A-injiserte rotter (sammenlignet med placebobehandling) i parametrene korrekte valg og total tid. En høyere dose på 5 mg/kg ble funnet effektiv bare i parameteren antall feil sammenlignet med grunnlinjen (men ikke overfor placebo).

AF160(Des) - Morris Water Maze (MWM) forsøk.

20

Hensikten med denne studien var å vurdere evnen som testmaterialet AF160(Des) har til å reversere kognitive forringelser i AF64A injiserte rotter ved anvendelse av MWM forsøket ifølge metoden til Fisher et al, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 257: 392-403, 1991. AF160(Des) ble testet ved anvendelse av to doser: 1 og 3 mg/kg p.o. 38 AF64A (3 nmol/2 μ l/side) og 42 saltvannsinjiserte rotter ble tilfeldig delt inn i fire undergrupper og ble tildelt forskjellige doser av AF160(Des) (1 og 3 mg/kg, p.o.) eller DDW (10 ml/kg, p.o.). Medikamentet ble administrert en gang pr dag i 5 dager, 60 min før testing.

Ingen betydelige bivirkninger ble observert i løpet av adferdstesting. Følgende resultater ble oppnådd:

30

En injeksjon av AF64A (3 nmol/2 μ l/side) resulterte i en signifikant forringelse i ytelse, som indikert av begge parametrene "escape latency" og veilengde.

AF160(Des) - 3 mg/kg forbedret ytelsen til både AF64A og saltvannsinjiserte rotter i den tredje treningsblokken.

35

Den positive effekten foreslår anvendelse av forskjellige doser av denne forbindelsen i fremtiden for å teste dets mulige fordelaktige effekter på læring og hukommelsesmangler.

AF185 - Passiv unngåelse (PA)

5

Denne studien undersøkte virkningen av AF185, i forskjellige doser, på passiv unngåelsesretensjon i AF64A-behandlede rotter.

Fremgangsmåte

10

AF64A ble injisert bilateralt (3 nmol/2 µl/side, icv) for å produsere dyremodellen (Fisher et al, J. Pharmacol, Exptl. Therap. 257:392-403, 1991). Fire uker etter operasjon ble AF64A og saltvannsinjiserte grupper tilfeldig delt inn i fire undergrupper med 10-11 rotter i hver. Tre undergrupper ble tildelt forskjellige doser av AF185 behandling (1, 5, 15 10 mg/kg p.o.) og en undergruppe mottok DDW (10 ml/kg). AF185 ble administrert rett etter sjokk og rottene ble testet 72 timer senere. For eksperimentelle detaljer se Fisher et al, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 257:392-403, 1991.

Resultater

20

Opprinnelige og retensjonslatenser målinger ble analysert separat av en tovei ANOVA (2 x 4); injeksjon-AF64A/saltvann vs doser av AF185 eller DDW.

25

Med hensyn på opprinnelig latens ble ingen signifikante forskjeller funnet i opprinnelige latenser mellom noen av gruppene.

30

Når det gjelder retensjonslatens ble en interaksjon mellom grupper og behandling funnet ($F(3/75)=22,31$; $P<0,001$). Simpel hovedeffektkontraster viste at retensjonslatensen til AF64A rotter med DDW var betydelig kortere enn den til saltvannsrotter behandlet med DDW ($p<0,001$). Retensjonslatensen til AF64A rotter behandlet med AF185 - 1,5 eller 10 mg/kg var betydelig lenger enn den til AF64A + DDW ($p<0,001$). Ingen andre signifikante forskjeller ble funnet.

Konklusjoner

1. AF64A injiserte rotter viste en betydelig forringelse i retensjonslatensen sammenlignet med rotter injisert med saltvann.
2. AF64A injiserte rotter behandlet med AF185 (1,5 og 10 mg/kg) utviste en retensjonsevne som ligner den til kontrolldyrene.
3. AF185 kan være en potensiell forbindelse for behandling av hukommelsesforstyrrelser som de som blir observert i Alzheimer's sykdom.

Følgende korrelasjon er gitt for eksempler på spesifikke forbindelser ifølge oppfinnelsen, ifølge IUPAC systematiske nomenklatur, med kodenommere som anvendt heri: 2,8-dimetyl-1-okso-1-tia-4,8-diaza-spiro[4,5]decan-3-on (AF262); 3-etyl-8-metyl-1-oksa-4,8-diaza-spiro[4,5]decan (AF268); 2,8-dimetyl-1-oksa-4,8-daza-spiro[4,5]decan (AF264); 3,8-dimetyl-1,4-dioksa-8-aza-spiro[4,5]decan-2-on (AF274); 2-etyl-4,8-dimetyl-1-tia-4,8-diaza-spiro[4,5]decan-3-on (AF272); 3-metyl-1-oksa-4-tia-8-aza-spiro[4,5]decan-2-on (AF269); 3-etyl-8-metyl-1-oksa-4-tia-8-aza-spiro[4,5]decan-2-on (AF271); 2-metyl-1-tia-4,8-diaza-spiro[4,5]decan-2-on (AF265); 2,8-dimetyl-1-oksa-4,8-diaza-spiro[4,5]decan-3-on (AF260); 2,4,8-trimetyl-1-tia-4,8-daza-spiro[4,5]decan-3-on (AF266); 2-etyl-8-metyl-1-tia-4,8-daza-spiro[4,5]decan-3-on (AF267); 2,8-dimetyl-1-tia-4,8-diaza-spiro[4,5]decan-3-on (AF261); 2,8-dimetyl-1-oksa-3,8-diaza-spiro[4,5]dec-2-en-4-on (AF238); 2,8-dimetyl-2,3,8-triaza-spiro[4,5]dec-1-en-4-on (AF230); 3-etyl-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]dec-1-en-4-on (AF220); 1-etyl-8-metyl-3-oksa-1,8-diaza-spiro[4,5]decan-2-on (AF174); 8-metyl-1-oksa-3,8-diaza-spiro[4,5]decan-2-tion (AF165); 3-etyl-8-metyl-1-oksa-3,8-diaza-spiro[4,5]decan-2-on (AF172); 8-metyl-1-oksa-3,8-diaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF169); 3-etyl-8-metyl-1-oksa-3,8-diaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF180); 4-butylimino-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2-tion (AF189); 8,N,N'-trimetyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]deca-1,3-dien-2,4-diamin (AF194); metyl-(8-metyl-2-metylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]deca-1,3-dien-4-yl)-amin (AF193); 8-metyl-2-metylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]deca-1,3-dien-4-ylamin (AF192); 4-metoksy-8-metyl-2-metylsulfanyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]deca-1,3-dien (AF191); 2,8-dimetyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]dec-1-en (AF190); 3-etyl-2-etylsulfanyl-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]dec-1-en-4-tion (AF170); 3-etyl-2-etylsulfanyl-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]dec-1-en-4-on (AF188); 8-metyl-2-metylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]dec-1-en-4-on (AF187); 8-metyl-2,4-bis-metylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]deca-1,3-dien (AF177); 8-metyl-4-metylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]dec-3-en-2-

tion (AF183); 4-ethylsulfanyl-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]dec-3-en-2-tion (AF176); 3-ethyl-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dition (AF163); 8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dition (AF173); 1-acetyl-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF164); 3-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF179); 3,8-dimetyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF178); 3-etyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF160 Des); 3-etyl-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF160); 3-etyl-8-metyl-4-tiokso-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2-on (AF182); 8-metyl-3-(4-pyrrolidin-1-yl-but-2-ynyl)-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF197); 3-prop-2-ynyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF186); 3-tert-butyl-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF213); 8-metyl-3-prop-2-ynyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF185); 3-tert-butyl-8-metyl-2-tiokso-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-4-on (AF184); 3-etyl-8-metyl-2-tiokso-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-4-on (AF181); 3-etyl-8-prop-2-ynyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF196); 5-(1-metyl-piperidin-4-yl)-2-tiokso-imidazolidin-4-on (AF195); 5-metyl-2-(1-metyl-piperidin-4-yl)-tiazolidin-4-tion (AF275); 3-but-2-ynyl-8-metyl-1,3,8-triaza-spiro[4,5]decan-2,4-dion (AF199).

20

25

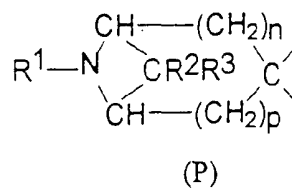
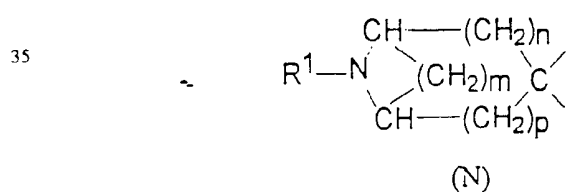
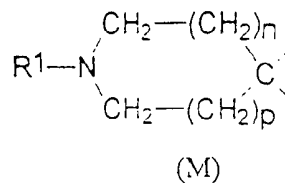
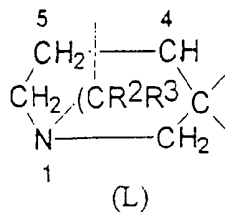
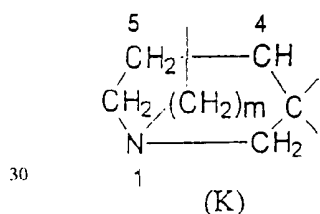
30

35

P a t e n t k r a v

1.

- Spiro-forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter
- 5 farmasøytiske akseptable salter derav, enantiomerer og racemater derav og kvaternære forbindelser avledet derfra når nevnte forbindelse har et tertiært nitrogenatom, hvori nevnte spiro-forbindelse inneholder en 5-leddet del hvori en spiro-grense eksisterer ved et karbonatom derav og samtidig ved et karbonatom til et mettet ringsystem
- 10 inneholdende et nitrogenatom, hvori nevnte 5-leddede del blir valgt fra gruppen bestående av 3-etylhydantoin, 1-acetylhydantoin, 3-metylhydantoin, 3-propargylhydantoin, 2,4-dithiohydantoin, 2-tiohydantoin, oksazolidin-2-tion, 3-etyloksazolidin-2-one, oksazolidin-2,4-dion, 3-etyloksazolidin-2,4-dion, 2-metyl-1,4-oksazolidin-3-one, 2-metyl-1,4-tiazolidin-3-one, 2,4-dimetyl-1,4-tiazolidin-3-one, 2-etyl-1,4-tiazolidin-3-one, 2-etyl-1,4-tiazolidin-3-one, 2-metyl-3-okso-1,4-tiazolidin-1-oksid,
- 15 5-metyl-1,3-oksazolidin-4-one, N-metylsuksinimid, N-etylsuksinimid, 3-t-butylhydantoin, 3-(4-pyrrolidino-2-butynyl)-hydantoin, 3-(2-butynyl)-hydantoin, 2,5-bis(metyltio)-4H-imidazol, 3-etyl-4-tiohydantoin, 3-etyl-2,4-tiohydantoin, 4-etyltio-3-imidazolin-2-tion, 1-etyl-2-etyltio-2-imidazolin-5-tion, 2-tio-4β-hydroksyetyliminohydantoin, 2,5-bis(aminometyl)-4H-imidazol, 2-metyl-2-tiazolin, 2-metyl-2-imidazolin, 2-metyl-2-oksazolin-4-one, 2-metyl-4H(5H)-imidazol-5(4)-one, 2-metyltio-5-metoksy-4H-imidazol, 2-metyltio-5-amino-4H-imidazol, 2-metyltio-5-aminometyl-4H-imidazol, 2-tion-3-etylhydantoin, 2-tion-3-etylhydantoin, 2-tion-3-t-butylhydantoin, 2-metyltio-2-imidazolin-5(4)-one), 1-etyl-2-etyltio-2-imidazolin-5-one og 1-etyl-2-imidazolin-5-one; og hvori nevnte mettede ringsystem inneholdende et nitrogenatom blir valgt fra gruppen
- 25 bestående av delene K, L, M, N og P:



hvor i hver slik del er usubstituert eller substituert med 1-3 substituenten valgt fra C₁₋₆ alkyl og hydroksyl; hvori broen i strukturene K og L er koblet i en ende til posisjon 1 og i den andre enden til posisjon 4 eller 5; hvori m er 1, 2 eller 3, og n og p er hver uavhengig 0, 1, 2 eller 3, forutsatt at n + p = 1-3; hvori R¹ er hydrogen, C₁₋₆-alkyl, C₂₋₆-alkenyl, C₂₋₆-alkynyl, C₃₋₇-cykloalkyl, C₁₋₆ alkyl substituert med 1-6 halogenatomer, hydroksy-C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-alkoksy, C₁₋₆-alkyltio, C₁₋₅-alkyl, karboksy-C₁₋₆-alkyl, (C₁₋₆-alkoksy)karbonyl-C₁₋₆-alkyl, amino-C₁₋₆-alkyl, mono-(C₁₋₆-alkyl)amino-C₁₋₆-alkyl, di-C₁₋₆-alkyl, 2-okso-pyrrolidin-1-yl-metyl, aryl, diarylmetylol, C₁₋₆-alkyl substituert med 1 eller 2 arylgrupper, C₁₋₆-alkanoyl eller arylkarbonyl; hvori aryl er fenyl eller fenyl substituert med 1-3 substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen, C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-alkoksy og CF₃; og hvori R² og R³ er uavhengig C₁₋₄ alkyl; i det når nevnte mettede ringsystem er M, er n 1, p er 1 og R¹ er hydrogen eller metyl, i det nevnte 5-leddede del ikke er 3-etylhydantoin, 1-acetylhydantoin, 3-metylhydantoin, 3-propargylhydantoin, 2,4-ditiohydantoin, 2-tiohydantoin, oksazolidin-2-tion, 3-etyloksazolidin-2-one, 3-etyl-4-tiohydantoin, 4-metyltioimidazolin-2-tion, 3-etyl-2,4-ditiohydantoin, 4-etyltio-3-imidazolidin-2-tion, 1-etyl-2'-etyltio-2-imidazolin-5-tion, 2-tio-4β-hydroksyetylminohydantoin, 2-metyl-2-tiazolin, 2-metyl-2-imidazolin, 2-metyl-2-oksazolin-4-one.

20 2.

Spiro-forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den blir valgt fra gruppen bestående av 1-metylperidin-4-spiro-4'-(2',5'-bis(metyltio)-4'H-imidazol); 1-metylperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-4'-tiohydantoin); 1-metylperidin-4-spiro-5'-(4'-metyltioimidiazolin-2'-tion); 1-metylperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-2',4'-ditiohydantoin); 1-metylperidin-4-spiro-5'-(4'-etyltio-3'-imidazolin-2'-tion); 1-metylperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-etyltio-2'-imidazolin-5'-tion); 1-metylperidin-4-spiro-5'-(2'-tio-4'-β-hydroksyetylminohydantoin); 1-metylperidin-4-spiro-4'-(2',5'-bis(aminometyl)-4'H-imidazol); (1-metylperidin-4-spiro-5'-(3'-etyloksazolidin-2'-one); 1-metylperidin-4'-spiro-1'-(2'-metyl-2'-tiazolin); 1-metylperidin-4-spiro-4'(5')-(2'-metyl-2'-imidazolin); 1-metylperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-2'-oksazolin-4'-one); 1-metylperidin-4-spiro-4'(5')-[2'-metyl-4'H(5'H)-imidazol-5'(4')-one]; 1-metylperidin-4-spiro-1'-(2'-metyltio-5'-metoksy-4'H-imidazol); 1-metylperidin-1-spiro-4'(2'-metyltio-5'-amino-4'H-imidazol); og 1-metylperidin-4-spiro-4'-(2'metyltio-5'aminometyl-4'H-imidazol).

35

3.

Spiro-forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den blir valgt fra gruppen bestående av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(oksazolidin-2'-tion); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(oksazolidin-2',4'dion); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyloksazolidin-2',4'-dion); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-oksazolidin-3'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dimetyl-1',4'-tiazolidin-3'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-etyl-1',4'-tiazolidin-3'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-etyl-4-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one); piperidin-4-spiro-5'-(3'-metyl-1',4'-oksatiolan-2'-one); piperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-3'-okso-1',4'-tiazolidin-1'-oksid); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-metyl-1',4'-oksatiolan-2'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-metyl-1',3'-oksazolidin); 1-metylpiperidin-4-spiro-2'-(4'-etyl-1',3'-oksazolidin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-etyl-1',4'-oksatiolan-2'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-etyl-1',4'-tiazolidin-3'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-metyl-1',3'-dioksolan-4'-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-tion); 2-N-metylspiro-(1,3-suksinimid-4,3')-quinuklidin; og 2-N-etylspiro-(1,3-suksinimid-4,3')-quinuklidin.

4.

Spiro-forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de blir valgt fra gruppen bestående av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-[3'-(4-pyrrolidino-2-butynyl)-hydantoin]; 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-t-butylhydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-[3'-(2-butynyl)-hydantoin]; piperidin-4-spiro-5'-(3'-propargylhydantoin); og 2-metyl-1,4-tiazolidin-3-one-spiro[5,3']-quinuklidin.

5.

Spiro-forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den blir valgt fra gruppen bestående av 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tion-3'-etylhydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-tion-3'-t-butylhydantoin); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(5'-(2'-metyltio-2'-imidazolin-5'(4')-one); 1-metylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-etyl-2'-imidazolin-5'-one).

6.

Spiro-forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den blir valgt fra gruppen bestående av enantiomerisk ren R-1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1,4'-tiazolidin-3'-one), S-1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-metyl-1',4'-tiazolidin-3'-

one); og R-1-metylpiperidin-1-spiro-5'-(2'-etyl-1',4'-tiazolidin-3'-one); og S-1-metylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-etyl-1',4'-tiazolidin-3'-one).

7.

5 Anvendelse av spiro-forbindelsen ifølge krav 1, for fremstilling av et medikament for behandling av sykdommer assosiert med cholinergisk hypofunksjon valgt fra gruppen bestående av senil demens av Alzheimers type, Alzheimers sykdom, Lewy Body dement, multiinfarkt dement (MID), slag ischemi, MID kombinert med MID (slag/ischemi/hodeskade), kombinert MID og Alzheimers sykdom, human hodeskade, 10 alders-assosiert hukommelsessvikt, akutt konfusjonsforstyrrelser, halusinatoriske-paranoide tilstander, emosjonelle og "attention" forstyrrelser, manier, tardiv dyskinesi, blandet Alzheimers og Parkinsons sykdom, afasi, postencephalitisk amnesisk syndrom, alkoholfjerningssymptomer, Huntingtons chorea, Pickers sykdom, Friedrichs ataksi, Gilles de la Tourette sykdom og Downs syndrom, til et pattedyr som trenger slik behandling.

15

8.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter minst en spiro-forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav og et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel, en bærer eller en adjuvant.

20

9.

Kjemisk forbindelse til bruk som terapeutikum, k a r a k t e r i s e r t v e d at den består av forbindelsen ifølge krav 1.