

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1996-182
(22) Přihlášeno: 15.07.1994
(30) Právo přednosti: 20.07.1993 US 1993/94855
(40) Zveřejněno: 17.07.1996
(Věstník č. 7/1996)
(47) Uděleno: 14.10.2005
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 14.12.2005
(Věstník č. 12/2005)
(86) PCT číslo: PCT/GB1994/001543
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1995/003303

(11) Číslo dokumentu:

295 929

(13) Druh dokumentu:

B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 D 471/10
C 07 D 498/10
C 07 D 453/02
C 07 D 497/10
C 07 D 513/10
A 61 K 31/435
A 61 P 25/02

(56) Relevantní dokumenty:
EP 0205247.

(73) Majitel patentu:

STATE OF ISRAEL represented by THE PRIME
MINISTER'S OFFICE, ISRAEL INSTITUTE FOR
BIOLOGICAL RESEARCH, Ness-Ziona, IL

(72) Původce:

Fisher Abraham, Holon, IL
Karion Yishai, Ness-Ziona, IL
Marciano Daniele, Ramat-Hasharon, IL
Barak Dov, Rehovot, IL
Meshulam Haim, Bat Yam, IL

(74) Zástupce:

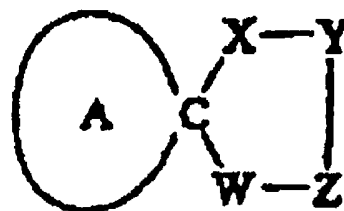
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha 4,
14021

(54) Název vynálezu:

**Léčivo obsahující azaspirosloučeninu pro léčení
onemocnění centrálního nebo periferního
nervového systému, enantiomer
azaspirosloučeniny a farmaceutický přípravek
ho obsahující**

(57) Anotace:

Použití azaspirosloučeniny obecného vzorce I a jejích
farmaceuticky přijatelných solí pro výrobu léčiva pro léčení
onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému
u savce. Kvartérní sloučeniny s terciárním atomem dusíku,
které jsou strukturně odvozeny od této sloučeniny, jejích
enantiomery a jejich racemáty, farmaceutický prostředek,
který je obsahuje, a jejich použití. Tyto sloučeniny mají
aktivitu na centrální a periferní nervový systém, například
aktivitu typu muskarinového agonisty.



CZ 295929 B6

Léčivo obsahující azaspirosloučeninu pro léčení onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému, enantiomer azaspirosloučeniny a farmaceutický přípravek ho obsahující

5

Oblast techniky

Tento vynález se týká použití azaspirosloučeniny obecného vzorce I a jejích farmaceuticky přijatelných solí pro výrobu léčiva pro léčení onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému u savce. Dále se týká kvartérních sloučenin s terciárním atomem dusíku, které jsou strukturně odvozeny od těchto sloučenin, jejich enantiomerů a jejich racemátů, farmaceutického prostředku, který je obsahuje, a jejich použití. Tyto sloučeniny mají aktivitu na centrální a periferní nervový systém, například aktivitu typu muskarinového agonisty.

Vynález se týká azaspirocyclických sloučenin s pětičlenným kruhem, jejichž kruh, který je spojen spirovazbou s pětičlenným kruhem, je nasycený kruh s jedním nebo dvěma atomy dusíku a s můstkem nebo bez můstku.

Dosavadní stav techniky

Předložená přihláška je částečným pokračováním US patentové přihlášky 08/094 855, podané 20. července 1993.

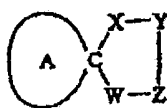
Nové spirochinuklidinové sloučeniny, v nichž je oxathiolanový kruh spiro–způsobem napojen na chinuklidinové kruhy, byly popsány v evropské patentové přihlášce EP 0205247 A2, publikované 17. prosince 1986, a v USA patentech US 4 855 290 (vydaný 8. srpna 1989), US 4 981 858 (vydaná 1. ledna 1991), US 4 900 830 (vydaný 13. února 1990) a US 4 876 260 (vydaný 24. října 1989). Podobně byly některé spiro–oxazolinové sloučeniny popsány v USA patentu US 5 053 412 (vydaném v říjnu), některé spiro–oxazolinové a některé spirothiazolinové jsou popsány v US patentové přihlášce 07/685 397. Tomu je třeba rozumět tak, že všechny obsahy shora uvedených patentů a USA patentové přihlášky 07/685 397 stejně jako jakýchkoliv jiných patentů a článků literatury uvedených v předložené patentové přihlášce jsou zde zahrnuty jako odkaz. Nové sloučeniny shora uvedených patentů mají aktivitu na centrální nervový systém. Zvláště intenzivně byla zkoumána biologická aktivita 3–methylspiro(1,3–oxathiolan–5,3')chinuklidinu, který existuje jako geometrické cis– a trans–izomery podle toho, jestli je 2–methylová skupina umístěna na stejné straně oxathiolanového kruhu jako atom dusíku chinuklidinového kruhu (cis) nebo na druhé straně jako atom dusíku chinuklidinového kruhu (trans). Na základě preklinických testů bylo zjištěno, že cis–sloučenina (kód č. AF102B) je zvláště slibnou pro kontrolu senilní demence Alzheimerova typu (SDAT). Je také zajímavé, že cis– a trans–izomery mohou být opticky rozštěpeny. V mnoha případech byla zkoumána také biologická aktivita těchto optických izomerů.

Základním předmětem tohoto vynálezu je získat nové spiro–sloučeniny. Další předměty tohoto vynálezu, a zvláště ty, které souvisejí se získáním užitečných farmaceutických přípravků, budou zřejmé z následujícího popisu.

45

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití azaspirosloučeniny obecného vzorce I



(I),

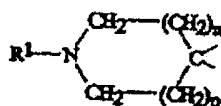
v němž X znamená skupinu $>S$, Y znamená skupinu $>CRR'$, Z znamená skupinu $>C=O$ a W znamená skupinu $>NR^0$,

5 v nichž R znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami,

10 R' znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami,

15 R^0 znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo
20 třemi fenylovými skupinami a alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, a

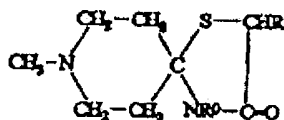
A znamená kruh obecného vzorce M



(M),

25 který není substituován nebo je substituován 1 až 3 substituenty vybranými ze skupiny sestávající z alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a hydroxylové skupiny, přičemž jak n tak p znamená číslo 1, 2 nebo 3 s tím, že součet n+p znamená číslo 1 až 3, a R^1 znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, cykloalkylové skupiny se 3 až 7 atomy uhlíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované 1 až 6
30 atomy halogenu, hydroxyalkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkylythioskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy(s 1 až 6 atomy uhlíku)alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, karboxy-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, alkoxy(s 1 až 6 atomy uhlíku)karbonyl-alkylové(s 1 až 6 atomy uhlíku) skupiny, aminoalkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, mono(alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku))aminoalkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny,
35 di(alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku))amino-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, 2-oxopyrrolidin-1-yl-methylové skupiny, arylové skupiny, diarylmethylolové skupiny, alkyl-(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny substituované jednou nebo dvěma arylovými skupinami, alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a arylkarbonylové skupiny, kde arylová skupina znamená nesubstituovanou fenylovou skupinu nebo fenylovou skupinu substituovanou 1 až
40 3 substituenty vybranými ze skupiny sestávající z atomu halogenu, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a skupiny CF_3 , včetně jejich farmaceuticky přijatelných solí, kvartérních sloučenin, které jsou strukturně odvozeny od těchto sloučenin na terciárním atomu dusíku, jejich enantiomerů a jejich racemátů,
45 pro výrobu léčiva pro léčení onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému u savce.

Ve zvláštním provedení se tento vynález týká použití azaspirosloučeniny obecného vzorce I, v němž azaspirosloučenina obecného vzorce I znamená sloučeninu obecného vzorce K



(K),

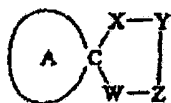
v němž R znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami, a

R^o znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami a alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku,

včetně jejích farmaceuticky přijatelných solí, kvartérních sloučenin, které jsou strukturně odvozeny od těchto sloučenin na terciárním atomu dusíku, jejích enantiomerů a jejích racemátů,

pro výrobu léčiva pro léčení onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému u savce.

Předložený vynález se týká také enantiomeru azaspirosloučeniny obecného vzorce I



(I),

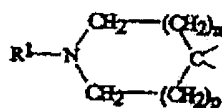
v němž X znamená skupinu >S, Y znamená skupinu >CRR', Z znamená skupinu >C=O a W znamená skupinu >NR^o,

v nichž R znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami,

R' znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami,

R^o znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami a alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, a

A znamená kruh obecného vzorce M



(M),

v němž jak n tak p znamená číslo 1, 2 nebo 3 s tím, že součet n+p znamená číslo 1 až 3 a

- 5 R¹ znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, cykloalkylové skupiny se 3 až 7 atomy uhlíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované 1 až 6 atomy halogenu, hydroxyalkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkylthioskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy(s 1 až 6 atomy uhlíku)alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, karboxy-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, alkoxy(s 1 až 6 atomy uhlíku)karbonyl-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, amino-alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, mono(alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku))aminoalkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, di(alkyl)(s 1 až 6 atomy uhlíku))amino-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, 2-oxopyrrolidin-1-yl-methylové skupiny, arylové skupiny, diarylmethylové skupiny, alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny substituované jednou nebo dvěma arylovými skupinami, alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a arylkarbonylové skupiny, kde arylová skupina znamená nesubstituovanou fenylovou skupinu nebo fenylovou skupinu substituovanou 1 až 3 substituenty vybranými ze skupiny sestávající z atomu halogenu, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a skupiny CF₃,
- 20 včetně jeho farmaceuticky přijatelných solí a jeho kvartérních sloučenin, které jsou strukturně odvozeny od těchto sloučenin na terciárním atomu dusíku.

Předložený vynález poskytuje farmaceutický prostředek pro použití pro léčení onemocnění centrálního a periferního nervového systému u savců, přičemž pro léčení uvedeného onemocnění obsahuje efektivní množství sloučeniny shora uvedeného obecného vzorce I včetně jejích farmaceuticky přijatelných solí, enantiomerů a racemátů, společně s alespoň jedním farmaceuticky přijatelným ředidlem, nosičem nebo adjuvancem. Tyto prostředky jsou s výhodou ve formě vhodné pro orální, rektální, parenterální nebo transdermální podávání (v tomto případě může prostředek dále obsahovat mastnou kyselinu s nízkou molekulovou hmotností) nebo pro podávání insuflací nebo jako nosní sprej a mohou být v jednotkové dávkové formě. Alespoň jedna shora uvedená sloučenina podle vynálezu může být přítomna v jednotkové dávce v množství od např. 0,5 do 100 mg, s výhodou od 5 do 100 mg, výhodněji od 10 mg do 50 mg.

Podle příslušného provedení tohoto vynálezu farmaceutický prostředek popsáný v předchozím odstavci může obsahovat také alespoň jednu další farmakologicky aktivní sloučeninu, která je vybrána ze skupiny sestávající z fysostigminu, tetrahydroaminoakridinu, cholinu, lecithinu, piracetamu, aniracetamu, pramiracetamu, oxiracetamu, 4-aminopyridinu, 3,4-diaminopyridinu, somatostatinu, pirenzepinu, N-methylatropinu, N-butylskopolaminu, skopolaminu, klonidinu, quanfamicenu, propanthelinu, methanthelinu, glykopyrolátu, tropenzilia, nortryptilinu, amitriptylinu, imipraminu, minaprinu, sekoferinu, AFDX-116, nikotinu, alaproklatu, zimelidinu, deprenylu a nervového růstového faktoru.

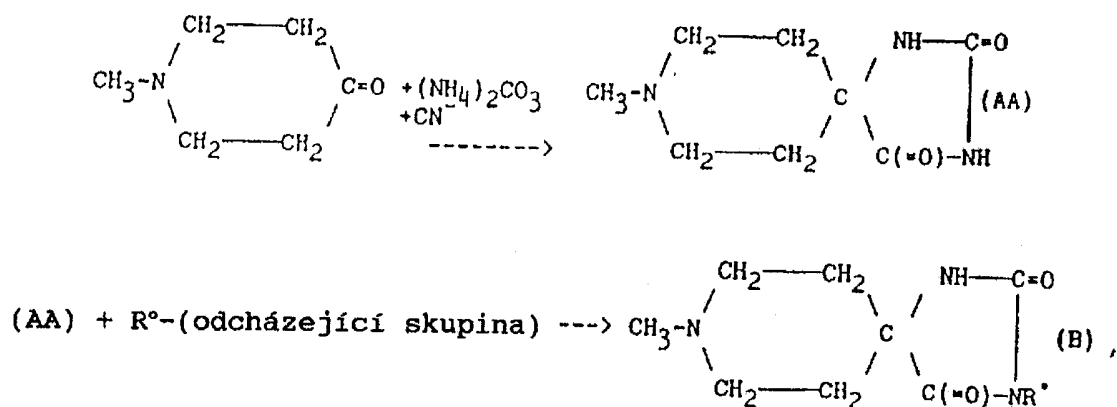
Onemocnění centrálního a periferního nervového systému savců může být léčeno způsobem, který pro léčení uvedeného onemocnění zahrnuje podávání efektivního množství sloučeniny shora uvedeného obecného vzorce I včetně jejích farmaceuticky přijatelných solí, enantiomerů, tautomerů a racemátů. Tyto sloučeniny se pro tento účel mohou používat ve formě shora uvedeného farmaceutického prostředku podle vynálezu.

V jiném provedení tento vynález poskytuje farmaceutický prostředek, který obsahuje alespoň jednu sloučeninu shora uvedeného obecného vzorce I a dále nervový růstový faktor (NGF). Sloučeniny podle vynálezu jsou přítomny v množství, které podporuje nervovou růstovou aktivitu

NGF. Většina z předložených sloučenin na rozdíl od některých známých sloučenin s aktivitou na centrální a periferní nervový systém sama o sobě nepodporuje nervovou růstovou aktivitu v nepřítomnosti NGF, což umožňuje lepší kontrolu, jestliže je při léčení vyžadována podpora nervového růstu. Některé z nejúčinnějších předložených sloučenin však podporují nervovou růstovou aktivitu nezávisle na NGF. Navíc, sloučeniny podle vynálezu obvykle mají aktivitu, která je vybrána z aktivity muskarinového agonisty, aktivity sekretující amyloidní prekurzorový protein (APP), aktivity snižující β -amyloidy a aktivity zvyšující podíl defosforylovaných τ -proteinů. Testy, které byly provedeny pro zjištění biologické aktivity předložených sloučenin, jsou podrobně uvedeny níže.

Způsoby použité pro přípravu předložených sloučenin jsou v podstatě ty, které jsou známy organickým chemikům jako způsoby tvorby pětičlenných kruhů, substituce kruhů, měnění stupně nasycení/nenasycení kruhu, přeměny solí a bází, tvorba kvartérních solí atd. I když zde budou popsány příklady způsobů přípravy některých sloučenin podle tohoto vynálezu, lze pro jejich přípravu použít také jiné způsoby, jak je zřejmé odborníkům z oblasti techniky.

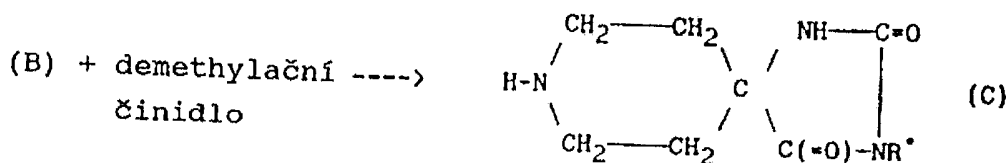
Jestliže žádaný pětičlenný kruh znamená například hydantoin, potom se může tento kruh vytvořit reakcí odpovídajícího nasyceného N-heterocyklického ketonu (např. 1-methylpiperidin-4-onu) s $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + \text{CN}^-$ a 3'-atom dusíku se pak může známým způsobem substituovat. Tyto reakce lze ilustrovat takto:



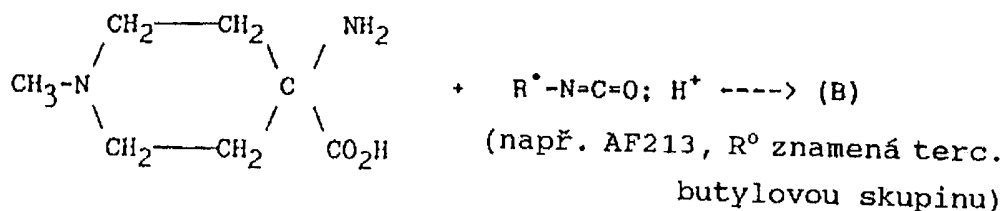
např. AF160, R° znamená ethylovou skupinu, AF178, R° znamená methylovou skupinu, AF185, R° znamená propargylovou skupinu, AF167, R° znamená methylovou skupinu, analog* a AF168, R° znamená ethylovou skupinu, analog* (*: v němž N-methylpiperidinová skupina obsahuje 2,6-ethylenový můstek, tj. N-methylnortropanový analog).

Odcházející skupina v „ R° -(odcházející skupina)“ může znamenat např. bromid, chlorid nebo p-toluensulfonát a R° znamená jak shora uvedeno s výjimkou atomu vodíku, alkoxy skupiny a alkanoylové skupiny. Tato substituční reakce se může provádět v podstatě za známých podmínek, např. reakcí 3'-nesubstituovaného hydantoinu v přítomnosti alkálií, jako je KOH, a použitím rozpouštědla, jako je ethanol. Odpovídající 1',3'-disubstituovaná sloučenina se může ve shora uvedené reakci získat použitím nadbytku činidla „ R° -(odcházející skupina)“ nebo zreagováním sloučeniny obecného vzorce B s činidlem „ R° -(odcházející skupina)“.

1-Methylovou skupinu v obecném vzorci B lze odstranit reakcí s demethylačním činidlem, jako je $\text{CH}_3\text{CH}(\text{Cl})\text{OCOCI}$:

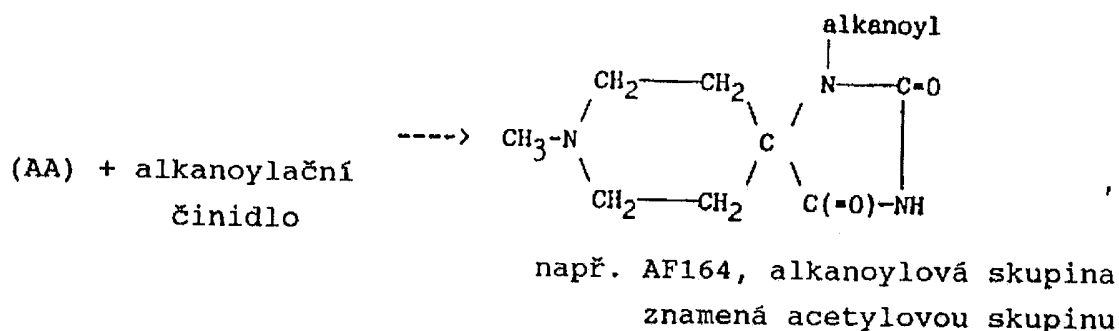


- např. AF160(des), R° znamená ethylovou skupinu, AF179, R° znamená methylovou skupinu.
5 Sloučeniny obecného vzorce B se mohou vyrábět také například následovně:

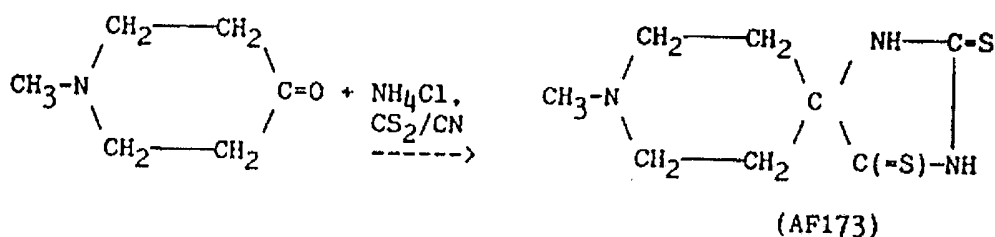


Substituováním $\text{R}^\circ\text{-N}=\text{C}=\text{S}$ v analogické reakci se získá (B)-3-thion, např. AF181 (R znamená ethylovou skupinu), AF184 (R znamená terc.butylovou skupinu).

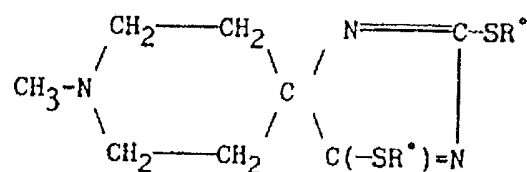
- 10 Reakcí sloučeniny obecného vzorce AA s alkanoylhalogenidem nebo anhydridem alkanové kyseliny za standardních alkanoylačních podmínek dochází k substituci v poloze 1', tedy:



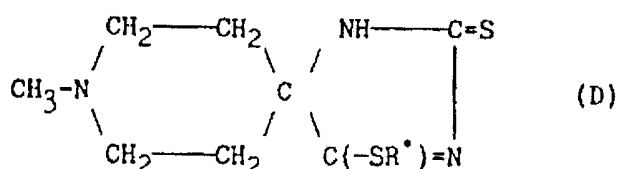
- 15 Jestliže žádaný pětičlenný kruh znamená dithiohydantoin, pak se tato sloučenina připravuje např. vytvořením tohoto kruhu reakcí odpovídajícího nasyceného N-heterocyklického ketonu s CN^- , NH_4Cl a CS_2 . Jestliže se hydantoiny substituují (např. alkylací) na atomech dusíku, thiohydantoiny poskytují N- a/nebo S-substituované produkty. Níže uvedené příklady ilustrují reakční podmínky, které poskytují různé produkty nebo směsi produktů, které se mohou rozdělit. Tyto reakce lze ilustrovat následujícím schématem, v němž N-heterocyklický keton znamená například 1-methylpiperidin-4-on:



+ R^o-(odcházející skupina) →

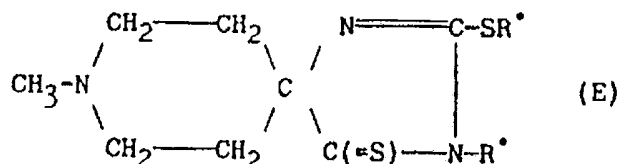


např. AF177, R^o znamená methylovou skupinu a/nebo



5 např. AF183, R^o znamená methylovou skupinu,

AF176, R^o znamená ethylovou skupinu a/nebo

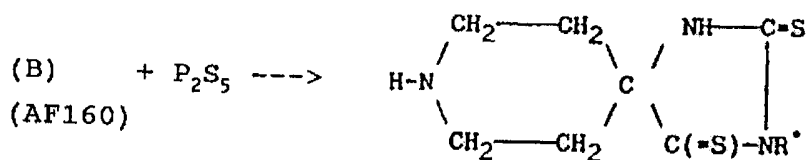


např. AF170, R^o znamená ethylovou skupinu.

10

Odcházející skupina a skupina R_o v „R^o-(odcházející skupina)“ znamená stejně jako shora uvedeno u hydantoinů. Substituční reakce se mohou provádět v podstatě za známých podmínek.

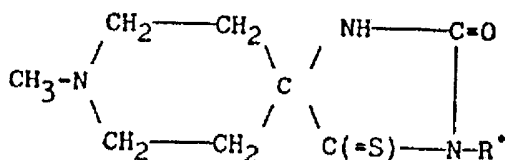
Dithiohydantoiny lze obecně získávat reakcí odpovídajících hydantoinů s P₂S₅, např.:



15

např. AF163, R^o znamená ethylovou skupinu.

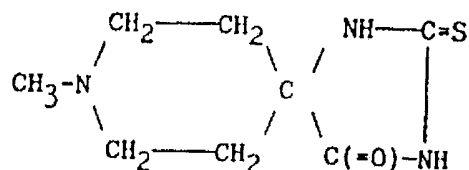
Jestliže se sloučenina obecného vzorce E nechá zreagovat s 20% (hmotn.) HCl, hydrolyzuje se vazba S-R^o za vzniku následující sloučeniny:



20

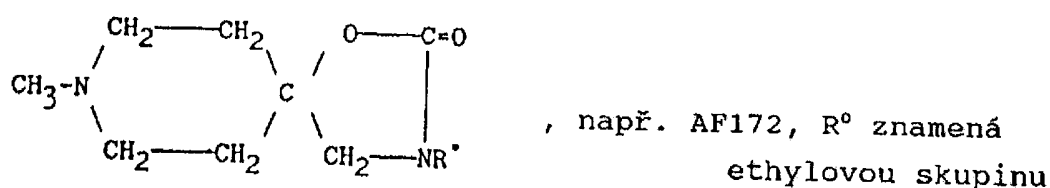
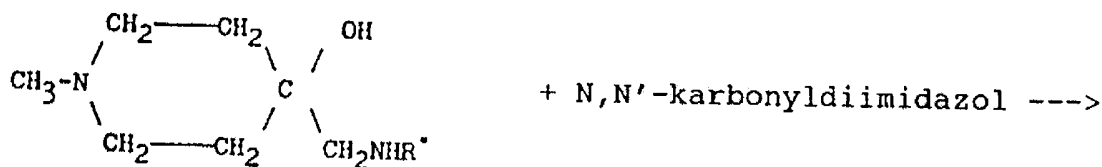
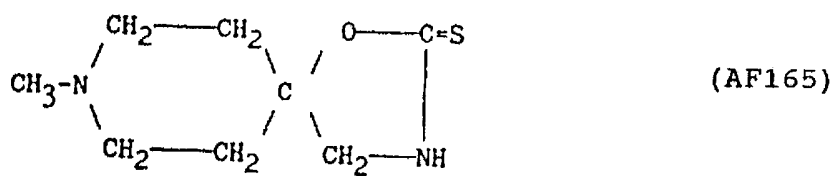
např. AF182, R^o znamená ethylovou skupinu.

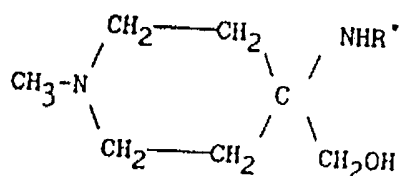
Podobná reakce sloučeniny obecného vzorce D s 20% (hmotn.) HCl poskytuje sloučeninu následujícího obecného vzorce (viz např. příklad 12):



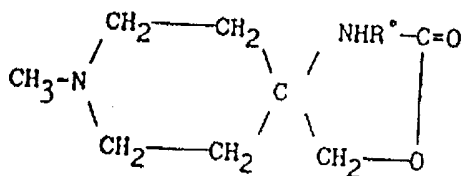
- 5 Tato sloučenina se tvoří také hydrolyzováním analogu obsahujícího skupinu $=NR^o$ místo skupiny $O=$. Analog se skupinou $=NR^o$ se připraví reakcí sloučeniny AF173 s R^oNH_2 (viz např. příklad 13, kde R^o znamená β -hydroxyethylovou skupinu).

Sloučeniny podle vynálezu, které znamenají oxo- nebo thiono-substituované oxazolidiny, se mohou připravovat např. následujícím postupem:

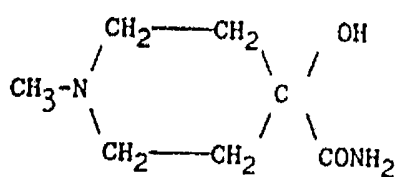
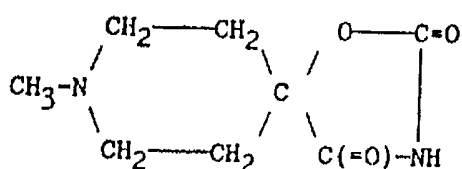




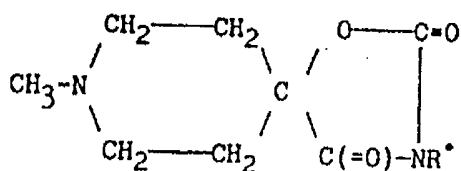
+ N,N'-karbonyldiimidazol --->



, např. AF174, R° znamená ethylovou skupinu

+ Et₂CO₃/KOME/EtOH --->

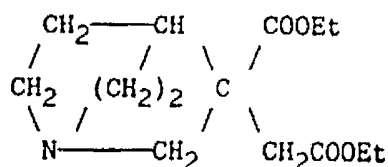
(AF169) R°-(odcházející skupina) --->



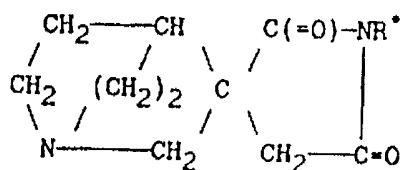
, např. AF180, R° znamená ethylovou skupinu.

Odcházející skupina i skupina R° v „R°-(odcházející skupina)“ znamenají jak shora uvedeno u hydantoinů. Substituční reakce se provádí v podstatě za známých podmínek.

- 5 Sloučeniny podle vynálezu, v nichž pětičlenný kruh znamená sukcinimid, se připravují například následujícím způsobem:

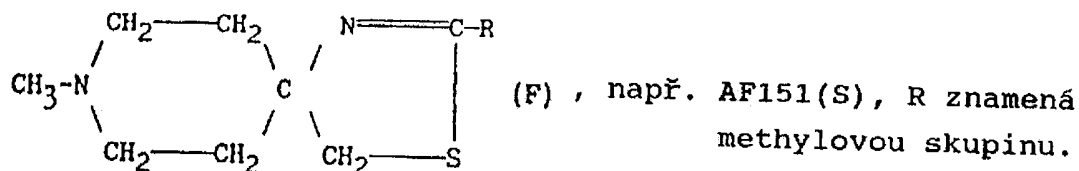
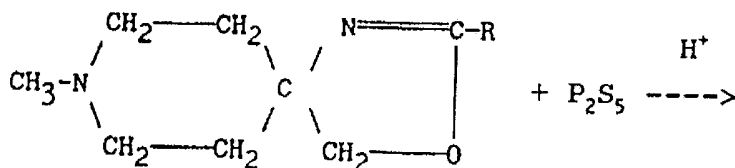
+ R°NH₂ --->

(3-karboethoxy-3-karboethoxymethylchinuklidin)

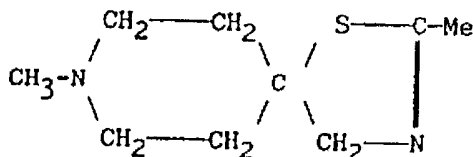


, např. AF133, R° znamená
methylovou skupinu,
AF134, R° znamená
ethylovou skupinu.

Thiazoliny podle vynálezu se vyrábějí například takto:

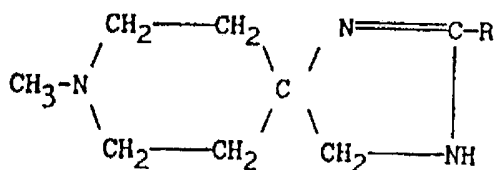
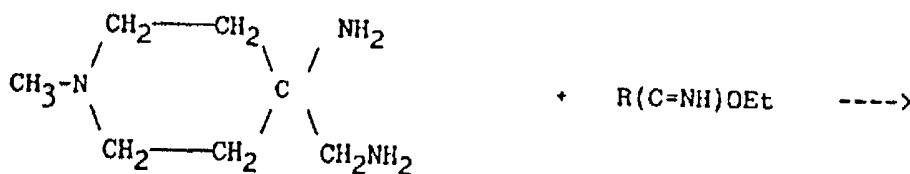


5 Lze se zde zmínit o tom, že sloučenina vzorce

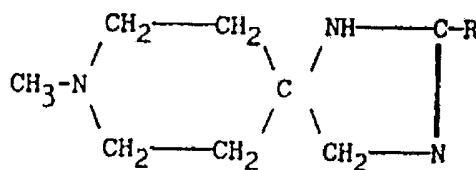


10 která je označována AF150(S), byla připravena v naší US patentové přihlášce 07/685 397, přičemž sloučeniny obecného vzorce F nebyly specificky v této US patentové přihlášce uvedeny. Nyní však bylo překvapivě zjištěno, že sloučeniny obecného vzorce F, jejichž příkladem je sloučenina AF151(S), jsou překvapivě mnohem slibnější z hlediska jejich farmakologické aktivity než skupina sloučenin, jejichž příkladem je AF150(S).

Imidazoliny podle předloženého vynálezu se připravují například podle následujícího schématu:



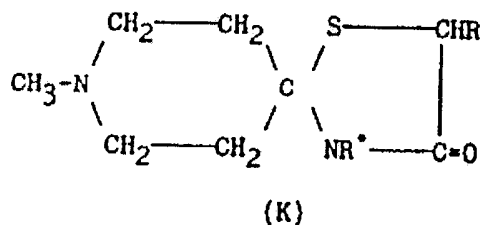
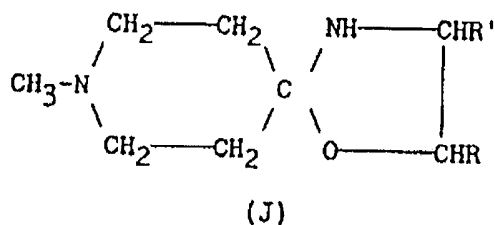
(G)



(H)

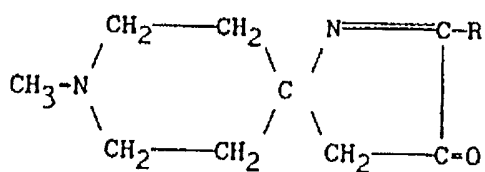
V tomto případě může produkt, např. AF190, R znamená methylovou skupinu, existovat jako směs tautomerů obecných vzorců G a H.

- 5 Oxazolidiny a thiazolidiny podle vynálezu, jako jsou sloučeniny obecného vzorce J (jako je AF264, R znamená methylovou skupinu, R' znamená atom vodíku, AF268, R znamená atom vodíku, R' znamená ethylovou skupinu) a K (jako je AF261, R znamená methylovou skupinu, R° znamená atom vodíku, AF267, R znamená ethylovou skupinu, R° znamená atom vodíku, AF266, R i R° znamená methylovou skupinu) se vyrábějí například podle níže popsaného postupu.

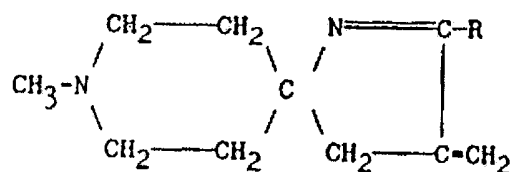


- 10 Ilustrativně lze uvést, že sloučeniny obecného vzorce J a K se připraví tak, že se N-methylpiperidon nechá zreagovat s $\text{HOCHRCHR}'\text{NH}_2$ nebo s $(\text{HSCHR}\text{CO}_2\text{H} + \text{R}^\circ\text{NH}_2)$.

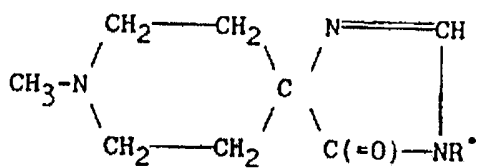
Následující sloučeniny, v nichž R a R^o znamenají jak uvedeno, ale vždy znamenají výhodnou skupinu, např. metylovou nebo ethylovou, znamenají také výhodné sloučeniny podle předložného vynálezu.



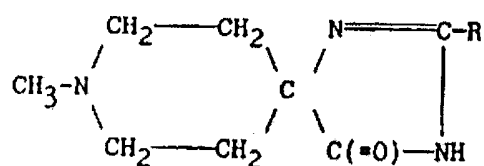
AF200



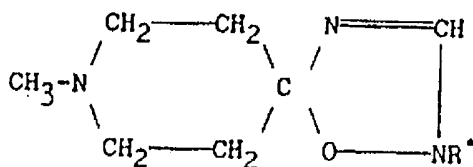
AF210



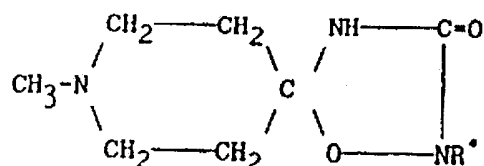
AF220



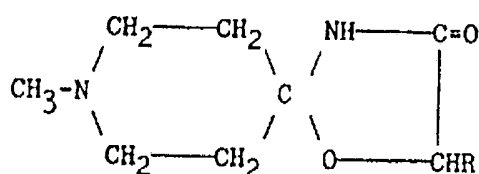
AF230



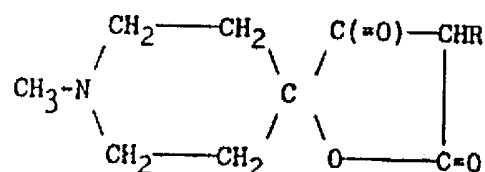
AF240



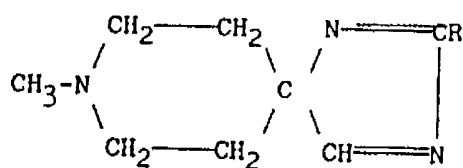
AF250



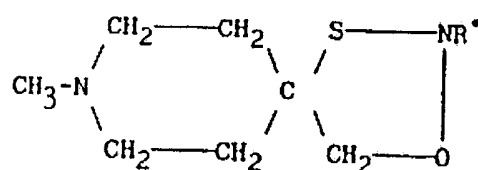
AF260



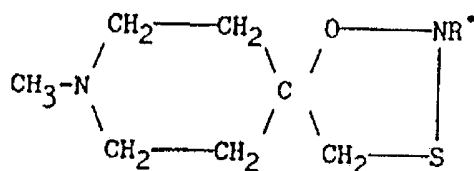
AF270



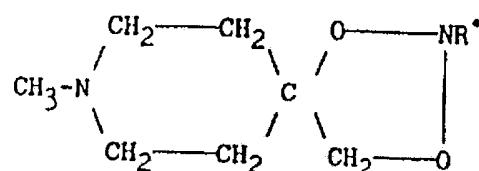
AF280



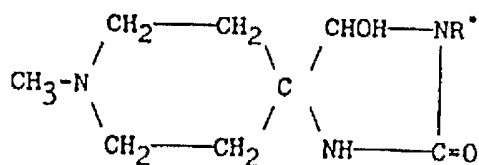
AF290



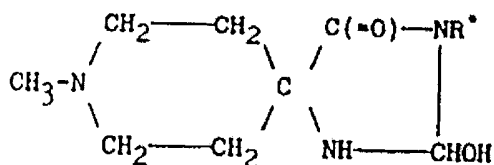
AF300



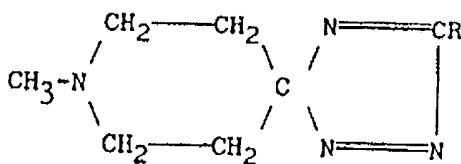
AF310



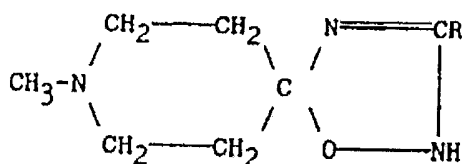
AF320



AF330



AF390



AF370

Tomu je třeba rozumět tak, že zatímco v předcházejícím popisu ilustrativní sloučeniny podle vynálezu znamenají piperidinové, nortropinové a chinuklidinové kruhy, jakýkoliv heterocyklický kruh s atomem dusíku, jak zde uvedeno, který je vhodný pro spiro-konfiguraci, může být substituován uvedeným spiro-pětičlenným kruhem. Podobná poznámka se týká také praktických příkladů, které jsou pouze ilustrativní a nikoliv omezující.

Spirosloučeniny podle vynálezu jsou obecně potenciálně užitečné pro léčení presenilní a senilní demence, senilní demence Alzheimerova typu (SDAT), atypické Alzheimerovy choroby (Perry a spol.: *Advances in Neurology*, R. J. Wurtman a spol. (red.), 51 41 (1990).), kombinace multiinfaktní demence a Alzheimerovy choroby, s věkem souvisejícího zhoršování paměti (AAMI), akutní poruchy zmatenosti, poruchy emocí a pozornosti, mánie, tardivní diskineze, hyperkinézy, smíšené Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, afazie, halucinačně-paranoidních stavů, postencefalytického amnestického syndromu, příznaků abstinence na alkohol, Huntingtonovy chorey, Pickovy choroby, Friedrickovy ataxie, Gilles de al Tourettovy choroby a Downova syndromu, protože všechny tyto chorobné stavy jsou poruchami, při nichž dochází alespoň v jistém rozsahu k centrální cholinergní hypofunkci. Předložené sloučeniny jsou navíc potenciálně užitečné pro léčení progresivní supranukleární paralýzy, jsou také potenciálními analgetickými činidly a mohou být tedy užitečné při léčení silně bolestivých stavů, jako je revmatismus, artritida a terminální nemoci.

Jak bylo shora stručně uvedeno, spiro-sloučeniny podle předloženého vynálezu se mohou používat v kombinaci s alespoň jednou další farmakologicky aktivní sloučeninou, například inhibitory acetylcholinesterázy, jako je physostigmin nebo tetrahydroaminoakridin, v kombinaci s prekurzory acetylcholinu, jako je cholin nebo lecithin, vedle „nootropních“ léčivých prostředků, jako je piracetam, aniracetam, oxiracetam nebo pramiracetam, dále ve sloučeninách, které interagují s Ca^{2+} kanálky, jako je 4-aminopyridin nebo 3,4-diaminopyridin, vedle peptidů, které mají modulační účinky na uvolňování acetylcholinu, jako je somastatin, v kombinaci s periferním antimuskarinovým činidlem (jako je pirenzepin, N-methylatropin, N-butylskopolamin, propanthelin, methanthelin, glykopyrrolát nebo tropenzilium) působících proti periferním nepříznivým účinkům, které by bylo možné očekávat při vysokých dávkách, jako je slinění, diareta, žaludeční sekrece nebo zvracení, v kombinaci s transdermálním skopolaminem, jako je Scopoderm®, působící proti nauzei anebo zvracení, v kombinaci s antidepresivními činidly, jako je nortryptilin, amitryptilin, imipramin, minapramin, aby se ulevilo jak narušenému poznávání tak příznakům deprese souvisejících někdy s SDAT, AAMI, kombinací SDAT/Parkinsonova choroba (PD), v kombinaci s M2-antimuskarinovými léčivými činidly, jako je secoverin, AFDX-116 (viz Hammer a spol.: *Life Sci.* 38, 1653 (1986).), působících proti periferním nepříznivým vedlejším účinkům, které by mohly být očekávány při vysokých dávkách těchto sloučenin, působících proti inhibičním účinkům takových agonistů centrálních inhibičních presynaptických a postsynaptických receptorů typu M2 a k zesílení uvolnění acetylcholinu via inhibici inhibičních autoreceptorů typu M2 v neporušených terminálech, v kombinaci s nikotinovými agonisty, jako je nikotin, pro

- stimulaci jak nikotinových tak muskarinových receptorů v mozku, v kombinaci s adrenergními agonisty (klonidin nebo guanfacin) pro ulehčení jak poznávacích tak jiných poškození souvisejících se smíšenou cholinergní–noradrenergí deficiencí u SDAT, v kombinaci s inhibitory zvýšení neuronálního serotoninu, jako je alaproklat, zimelidin, pro ulehčení jak kognitivních tak jiných emočních funkcí u SDAT, a v kombinaci s inhibitory monoamin–oxidázy B, jako deprenyl, pro ulehčení jak kognitivních tak jiných motorických poškození souvisejících se smíšenými stavy, jako je SDAT/PD, v kombinaci s nervovým růstovým faktorem (NGF, který se podává buď jako nazální sprej nebo intracerebroventrikulárně).
- 10 Spirosloučeniny podle předloženého vynálezu, s nebo bez shora uvedených dalších aktivních sloučenin, se mohou podávat například injekcí ve vhodném ředidle nebo nosiči, per os, rektálně ve formě čípků, isuflací nebo nazálním sprejem, infuzí nebo transdermálně ve vhodném ředidle s nebo bez physostigminu nebo tetrahydroaminoakridinu.
- 15 Předložené spirosloučeniny mohou mít také potenciální použití při léčení poruch vyžadujících aplikaci dlouhodobého cholinergního činidla s mírnou lokální aktivitou. Takové činidlo je potřebné při poruchách, jako je glaukom, protože tato sloučenina není ničena enzymem, který deaktivuje acetylcholin, tj. acetyl– a butyryl–cholinesterázou, a může se používat také pro léčení periferních cholinergních poruch, jako je myastenie gravis, dysfunkce močového měchýře, Adiho choroba a Eaton–Lambertova choroba. Tyto sloučeniny se mohou používat také při poruchách, kdy je snižena cholinergní reaktivita indukována léčivými činidly.
- 20 Když předložené spiro–sloučeniny znamenají anticholinergní činidla (která mohou být snadno stanovena odborníkem v oblasti techniky), mohou se potenciálně používat pro léčení poruch zapříčiněných cholinergní hyperfunkcí, ať již jde o spontánní nebo indukovanou léčivým činidlem. Předložené sloučeniny mají potenciální použití také při léčení různých onemocnění, jako je PD, pseudo–PD, smíšená AD/PD, primární dystonie, spastická tortikolis, kraniální dystonie, deprese, choroba pohybu, akatise (po neuroleptické poruše), centrální hypertenze, poranění hlavy u člověka, smíšená tardivní diskineze a PD, maniakální deprese, jako přídatek v chirurgii místo atropinu, skopolaminu atd., při intoxikaci způsobené inhibicí acetylcholinesterázy, která se podobá nadbytku acetylcholinu. Mohou se používat také v oftalmologii, jestliže je požadována buď prodloužená nebo krátkodobá mydriáza.
- 30 Předložené spiro–sloučeniny se mohou potenciálně používat také při léčení choroby vyznačující se nadbytkem periferně–podobné aktivity, jako je astma, chronické obstruktivní pulmonární onemocnění a peptická vředová choroba. U těchto periferních poruch se zvláště doporučuje používání kvartérních solí předložených sloučenin.
- 35 Kvartérní amoniové soli jsou v současné době široce používány v léčení. Příklady takových cholinergních agonistů jsou acetylcholinchlorid, bethanecholchlorid a karchol (viz např. Goodman & Gilman: „The Pharmacological Basis of Therapeutics“, 7. vydání, Macmillan Publishing Co., str. 104, 1985). Kvartérními cholinesterázovými činidly jsou např. neostigminbromid, ambenoniumchlorid, pyridostigminbromid, edrophoniumchlorid, demekariumbromid a echothipatjodid, pralidoximchlorid se používá jako cholinesterázový reaktivátor (viz
- 45 Goodman & Gilman, shora uvedená citace, str. 122 až 123).
- Kvartérní deriváty beladonových alkaloidů, např. methskopolaminbromidu a methylbromidu homatropinu, a syntetické kvartérní sloučeniny, např. methanthelinbromid a propanthelinbromid, se používají při léčení gastrointestinálních poruch (viz Goodman & Gilman, shora uvedená citace, str. 139 až 140).
- 50 V „Medicinal Chemistry“ Alfreda Burgera, druhé vydání, Interscience Publishers, str. 497, 1960, je uvedena předpověď, že kvartérní amoniové soli, bez ohledu na jejich chemickou strukturu, způsobují paralýzu typu kurareformy, a pozdější potvrzení této předpovědi. Tato vlastnost kvartérních sloučenin je využívána v anestézi, např. jako pomocné činidlo při chirurgické anestézi pro
- 55

uvolnění kosterního svalstva (viz Goodman & Gilman, shora uvedená citace, kapitola 11 pod názvem „Neuromuscular Blocking Agents“, str. 222 až 235).

5 Tato shora uvedená neuromuskulární blokuující aktivita kvartérních sloučenin v následujících letech nezabránila vývoji a klinické aplikaci kvartérních sloučenin při léčbě. Odborník v oblasti techniky by si měl být vědom toho, že výběr jakékoliv sloučeniny (včetně kvartérní sloučeniny) pro použití při klinické léčbě ovlivňuje mnoho faktorů, např. účinnost pro zamýšlené použití, bezpečnost, možné vedlejší účinky a terapeutický index. Odborník by tedy měl dobře pochopit jak interpretovat výraz „farmaceuticky přijatelné kvartérní sloučeniny“, které jsou strukturně
10 odvozeny od vynalezených sloučenin s terciárním atomem dusíku, jelikož tento výraz je používán v tomto spisu a v nárocích ve světle příslušných znalostí dostupných v oblasti techniky.

Tento vynález bude nyní ilustrován následujícími neomezujícími příklady.

15

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

20

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethylhydantoin) AF160

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

25 Směs roztoků 1-methylpiperidin-4-onu (36,44 g, 0,322 mol) v ethanolu (150 ml), uhličitanu amonného (93,0 g, 0,968 mol) ve vodě (400 ml) a kyanidu draselného (25,8 g, 0,396 mol) ve vodě (82 ml) se zahřívá 2,5 h na 60 °C. Potom se nechá stát za teploty místnosti přes noc. Vysrážený 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin se odfiltruje a promyje se malým množstvím studené vody, ethanolu a etheru. Získá se tak krystalický prášek (27,0 g). Zahuštěním filtrátu a promývacích roztoků se získá druhý podíl (20,0 g). Produkt se překrystaluje z methanolu, t.t. 265 až 276 °C (rozkl.). IČ spektrum (KBr): 3170 (NH), 1700 (C=O) cm⁻¹. Hmotnostní spektrum (m/e): 183 (M⁺, 38 %), 71 (100 %). ¹H NMR spektrum (D₂O): 1,8 (2H), 2,06 (sextet, 2H), 2,49 (s, -CH₃), 2,58 (t, 2H), 3,14 (t, 1H), 3,20 (t, 1H) ppm.

35 b) 4-Amino-1-methylpiperidin-4-karboxylová kyselina

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin (9,75 g, 0,0533 mol) a oktahydrát hydroxidu barnatého (28,8 g, 0,0913 mol) ve vodě (150 ml) se zahřívá 3 h na 160 °C v tlakové nádobě. Obsah čtyř těchto dávek se spojí a vysrážený uhličitán barnatý se odfiltruje. Filtrát se zneutralizuje pevným oxidem uhličitým. Sraženina se odfiltruje. Zahuštěním filtrátu se získá 4-amino-1-methylpiperidin-4-karboxylová kyselina (32,0 g, 95 % hmotn.), t.t. 275 až 280 °C (rozkl.). IČ spektrum (KBr): 3300, 1655, 1580 cm⁻¹. Hmotnostní spektrum (m/z): 158 (M⁺, 90 %), 141 (98 %, M-OH), 113 (12 %, M-COOH), 96 (100 %), 71 (52 %). ¹H-NMR spektrum (C₅D₅N+D₂O): 1,2 (m, 2H), 1,48 (s, CH₃N-), 1,7 (m, 2H), 1,9 (m, 2H), 2,0 (m, 2H) ppm.

45

c) 1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethylhydantoin), AF160

Ke směsi 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoinu (5 g, 27 mmol) a KOH (2,08 g, 37 mmol) ve 100 ml absolutního ethanolu se přidá ethylbromid (15 g, 137 mmol). Směs se zahřívá na 80 °C.
50 V půlhodinových intervalech se odebírají vzorky a kontrolují se GLC vzhledem k vnitřnímu standardu (difenylmethan). Bazicita se sleduje titrací (1N HCl), následuje přidání KOH (celkem 2,1 g). Po získání maximálního výtěžku (2,5 h) se roztok odpaří, přidá se voda (50 ml), vodný roztok se extrahuje chloroformem a chromatografuje se na koloně silikagelu, eluce směsí chloroform-methanol-vodný amoniak (80:20:1). Produkt se rozpustí v etheru a vysráží se jako hydro-

chlorid přidáním HCl v izopropanolu, t.t. 278 až 280 °C. Hmotnostní spektrum (m/e): 211 (M^+ , 45 %), 71 (100 %). ^1H -NMR spektrum (volná báze, $CDCl_3$): 1,2 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 1,6 až 1,7 (m, 2H), 1,9 až 1,95 (m, 2H), 2,1 až 2,2 (m, 2H), 2,34 (s, 3H), 2,85 až 2,95 (m, 2H), 3,5 (q, $J = 6$ Hz, 2H) ppm. ^1H NMR spektrum (hydrochlorid, D_2O): 1,1 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 1,95 až 2,05 (m, 2H), 2,2 až 2,3 (m, 2H), 2,85 (s, 3H), 3,0 až 3,2 (m, 2H), 3,4 až 3,5 (m, 2H), 3,5 (q, $J = 6$ Hz, 2H) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (volná báze, $CDCl_3$): 14,0, 33,0, 33,1, 46,0, 52,8, 59,9, 157,0, 177,0 ppm. UF spektrum (volná báze, voda): Λ_{max} 208 nm (ϵ 3500).

10 Příklad 2

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(1'-acetylhydantoin) AF164

a) AF164A

15

Směs 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoinu (3,25 g) v anhydridu kyseliny octové (50 ml) se zahřívá 3 h pod zpětným chladičem. Nadbytek reakčního činidla se odstraní za sníženého tlaku. Zůstane pevná látka, která se disperguje v etheru. Odfiltrováním se získá bílá pevná látka AF164A (3,75 g), která krystaluje ze směsi methanol-dichlormethan, t.t. 250 až 254 °C (rozkl.). ^1H -NMR spektrum (D_2O): 1,89 (m, 2H), 2,44 (s, CH_3CO-), 2,86 (s, CH_3N-), 2,98 (s, 2H), 3,41 (m, 2H), 3,67 (m, 2H) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (D_2O , dioxan jako vnitřní standard): 26,6 (C_3 a C_5), 26,9 (CH_3CO-), 43,8 (CH_3N-), 51,4 (C_2 a C_6), 62,0 (C_4), 67,3 (dioxan), 166,0 (C_2), 173,8 (CH_3CO-), 189,2 (C_4), ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 225 (M^+), 210, 166, 155, 123, 95, 71 (100 %), 70.

25

b) AF164B

Část AF164A (1,10 g) se zalkalizuje nasyceným vodným roztokem uhličitanu sodného a extrahuje se směsí methanolu s dichlormethanem. Extrakt se odpaří a odparek se opět extrahuje stejnou směsí rozpouštědel. Extrakt se zfiltruje a filtrát se odpaří. Odparek (1,0 g) se rozetře s acetonem. Získá se tak bílá pevná látka AF164B, t.t. 225 až 230 °C (rozkl.) (krystaluje ze směsi dichlormethan-methanol-acetonitril). ^1H -NMR spektrum (D_2O): 1,53 (m, 2H), 2,21 (s, CH_3CO-), 2,39 (s, CH_3N-), 2,65 až 2,80 (m, 6H) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (D_2O , dioxan jako vnitřní standard): 26,9 (CH_3CO-), 28,3 (C_3 a C_5), 45,0 (CH_3N-), 50,9 (C_2 a C_6), 64,9 (C_4), 67,3 (dioxan), 168,8 (C_2), 173,6 (CH_3CO-), 193,9 (C_4) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 183 ($M^+ - CH_2=C=O$), 166, 154, 123, 95, 71 (100 %).

35

c) AF164 (hydrochlorid)

Hydrochlorid AF164 se připraví tak, že se na roztok AF164A nebo AF164B v methanolu nechá působit HCl rozpuštěná v izopropanolu do kyselého pH (1 až 2). Po krátkém čase se vysráží sůl, hydrochlorid AF164, jako bílá pevná látka, t.t. 301 až 302 °C (rozkl.). ^1H -NMR spektrum (D_2O): 2,17 (m, 2H), 2,50 (s, CH_3CO-), 2,93 (s, CH_3N-), 3,10 (m, 2H), 3,48 až 3,71 (m, 4H) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (D_2O , dioxan jako vnitřní standard): 26,7 (C_3 a C_5), 26,9 (CH_3CO-), 43,9 (CH_3N-), 51,1 (C_2 a C_6), 61,8 (C_4), 67,3 (dioxan), 154,8 (C_2), 173,4 (CH_3CO-), 176,0 (C_4) ppm.

45

Hydrolyza AF164

AF164A a AF164B se hydrolyzují pod zpětným chladičem v 0,2N vodném NaOH (1 až 2 h). Získá se tak 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin, který byl identifikován srovnáním jeho TLC a ^1H -NMR spektra s autentickým vzorkem.

50

Příklad 3

Piperidin-4-spiro-5'-(3'-ethylhydantoin) AF160 (Des)

- 5 K roztoku vysušeného AF160 (2,0 g, 9,5 mmol) v dichlorethanu (25 ml, sušený nad molekulovým sítem) se za teploty místnosti přidá α -chloroethyl-chlorformiát (1,0 ml, 9,3 mmol). Směs se zahřívá 1 h na 60 °C. Dichlormethan se odstraní ve vakuu. Získaná pevná látka se rozpustí v 20 ml methanolu a tento roztok se zahřívá dalších 30 minut na 60 °C. Methanol se pak ve vakuu odstraní. Získaná olejovitá pevná látka se rozpustí ve vodném uhličitane sodném a promyje se etherem. Vodná vrstva se extrahuje chloroformem. Extrakt se odpaří. Získá se tak surový olej,
- 10 který se dále přečistí chromatografií na koloně silikagelu. Eluce směsí chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 4:1:0,1 poskytne AF160(Des) (1,12 g, výtěžek 60 % hmotn.) jako bílá prášek, t.t. 225 až 227 °C, hmotnostní spektrum (m/e): 197 (M^+ , základní maximum), 57. ^1H -NMR spektrum ($CDCl_3$): 1,17 (t, J = 6 Hz, 3H), 1,65 až 1,7 (m, 2H), 1,85 až 2,0 (m, 2H), 2,75 až 2,85 (m, 2H), 3,05 až 3,15 (m, 2H), 3,5 (q, J = 6 Hz, 2H) ppm.
- 15

Příklad 4

20 1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-methylhydantoin) AF178

- Ke směsi 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoinu (5,0 g, 27,3 mmol) a NaOH (2,0 g, 50 mmol) ve 120 ml methanolu se přidá methyltosylát (11,2 g, 60 mmol). Reakční směs se míchá za teploty místnosti přes noc. Methanol se odstraní odpařením. Olejovitý odparek se rozpustí ve vodném uhličitane draselném a extrahuje se chloroformem. Organický extrakt se odpaří. Takto získaný surový produkt se dále vyčistí chromatografií na koloně silikagelu, eluce směsí chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 9:1:0,1. Získá se 1,2 g (22 % hmotn.) bílé pevné látky, t.t. 229 až 231 °C. Hmotnostní spektrum (m/e): 197 (M^+ , 30 %), 71 (100 %). ^1H -NMR spektrum (volná báze, $CDCl_3$): 1,6 až 1,7 (m, 2H), 2,1 až 2,3 (m, 3H), 2,34 (s, 4H), 2,85 až 2,95 (m, 2H), 3,02 (s, 3H) ppm.
- 25
- 30

Příklad 5

35 Piperidin-4-spiro-5'-(3-methylhydantoin) AF179

- Bílý práškovitý produkt, který se získá stejným způsobem jako v příkladu 3, se rozpustí v izopropanolu a okyslí se kyselinou chlorovodíkovou. Získá se bílá sraženina, t.t. nad 320 °C (rozkl.). Hmotnostní spektrum (m/e): 183 (M^+ , základní maximum), 57. ^1H -NMR spektrum (jako hydrochlorid, $CDCl_3$): 2,0 (m, 2H), 2,2 (m, 2H), 2,96 (m, 3H), 3,3 (m, 2H), 3,6 (m, 2H) ppm.
- 40

Příklad 6

45 Syntéza 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-propargylhydantoinu), (AF185)

- Suspenze KH (11 g, 0,1 mol, 35% (hmotn.) disperze v minerálním oleji) a 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoinu (vysušený nad P_2O_5 , 25 g, 0,13 mol) se míchá za teploty místnosti v suchém DMF (500 ml). Přidá se propargylchlorid (15 g, 0,2 mol) a reakční směs se 20 minut zahřívá na 50 °C. Směs se pak ochladí a okyslí se na pH 3 (vodnou kyselinou chlorovodíkovou). DMF se odstraní extrakcí směsí petroletheru s etherem v poměru 1:1 a etherem. Vodná fáze se zalkalizuje uhličitane sodným na pH 10 a extrahuje se dvakrát chloroformem. Chloroformové extrakty se spojí, vysuší a odpaří. Získá se tak surový olej (27 g), který se chromatografuje na koloně silikagelu. Elucí směsí chloroformu s methanolem a amoniakem v poměru 80:19:1 se získá 3,0 g čis-
- 50

tého AF185 a několik frakcí (celkem 10 g) obsahujících minoritní nečistoty. Volná báze se vysráží jako hydrochlorid. Krystalizací z methanolu se získá 3,2 g bílé nehydropskopické soli. ^1H -NMR spektrum (D_2O , hydrochlorid, δ): 1,65 až 1,75 (m, 2H), 1,9 až 2,05 (m, 2H), 2,25 (s, CH_3N^-), 2,2 až 2,3 (m, 4H), 2,8 až 2,9 (m, 4H), 4,25 (s, 2H) ppm. ^1H -NMR spektrum (CDCl_3 , volná báze, δ): 1,85 až 1,95 (m, 4H), 2,2 (m, 2H), 2,23 (t, 1H, $J = 3,5$ Hz), 2,4 (s, CH_3N^-), 2,9 až 2,95 (m, 2H), 4,3 (d, 2H, $J = 3,5$ Hz), 6,4 (široký s, 1H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 221 (M^+ , základní maximum), 206 ($\text{M}-15$), 149.

10 Příklad 7

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(2',5'-bis(methylthio)-4'H-imidazol) AF177

K roztoku 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoinu) (1,00 g, 4,65 mmol, viz příklad 11) v methanolu (15 ml) se přidá NaOH (0,30 g, 7,50 mmol) a potom postupně roztok methyljodidu (1,00 g, 7,04 mmol) v methanolu (3,0 ml). Směs se míchá za teploty místnosti 1,5 h. NaBr se vysráží, zfiltruje a promyje se methanolem. Filtrát a promývací podíly se spojí a rozpouštědlo se odstraní. Odparek se zalkalizuje vodným uhličitánem draselným a extrahuje se etherem. Organický extrakt se vysuší (síranem sodným) a rozpouštědlo se odstraní. Zůstane zbytek, který se chromatografuje na koloně silikagelu. Elucí směsí rozpouštědel ether:chloroform:methanol:amoniak (vodný) v poměru 78:18:3:1 se po krystalizaci z hexanu získá AF177, t.t. 101 až 102 °C (465 mg). ^1H -NMR spektrum (CDCl_3): 1,33 (m, 2H), 1,98 (m, 2H), 2,39 (s, CH_3N^-), 2,56 (s, CH_3S^-), 2,59 (s, CH_3S^-), 2,48 až 2,64 (m, 2H), 2,82 (m, 2H) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (CDCl_3): 14,1 (CH_3S^-), 14,2 (CH_3S^-), 34,9 (C_3 a C_5), 46,1 (CH_3N^-), 52,2 (C_2 a C_6), 83,0 (C_4), 171,6 (C_2), 203,5 (C_5) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 244 ($\text{M}^+ + 1$), 185, 149, 93, 75. IČ spektrum (KBr): 2920, 2797, 1535, 1477, 1465, 1452, 1378, 1316, 1286, 1210, 1108, 1054, 1000, 965, 942, 900, 776 a 696 cm^{-1} . UV spektrum (ethanol): λ_{max} 257 nm (ϵ 16100).

30

Příklad 8

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyl-4'-thiohydantoin) AF182

Vzorek 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-ethyl-2'-ethylthio-2'-imidazolin-5'-thionu) AF170 (100 mg, viz příklad 12) se rozpustí ve 20% (hmotn.) HCl (1 ml) a roztok se vaří 1,5 h pod zpětným chladičem. Reakční směs se zalkalizuje konc. roztokem NaOH na pH 14. Potom se extrahuje dichlormethanem. Organický extrakt se vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se oddestiluje. Získá se tak 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyl-4'-thiohydantoin) jako bílá pevná látka (74 mg), která krystaluje ze směsi petroletheru s dichlormethanem, t.t. 176 až 178 °C. ^1H -NMR spektrum (CDCl_3): 1,25 (t, $J = 7,2$ Hz, CH_3CH_2^-), 1,54 (m, 2H), 2,10 (m, 2H), 2,36 (s, CH_3N^-), 2,41 (m, 2H), 2,96 (m, 2H), 3,94, (q, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 7,23 (NH) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (CDCl_3): 11,8 (CH_3CH_2^-), 36,9 (C_3 & C_5), 37,4 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 46,1 (CH_2N^-), 51,2 (C_2 & C_6), 68,1 (C_4), 157,1 (C_2), 208,1 (C_4) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 227 (M^+), 211 ($\text{M}^+ - \text{O}$), 194 ($\text{M}^+ - \text{SH}$), 170 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7\text{N}$), 71,70 (100 %). UV spektrum (ethanol): λ_{max} 280 nm (ϵ 13600), 229 nm (ϵ 4400).

50

Příklad 9

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(4'-methylthio-3'-imidazolin-2'-thion) AF183

Jestliže se zopakuje příklad 7, ale použijí se ekvivalentní množství methyljodidu, hydroxidu sodného a dithiohydantoinu, získá se vedle bis(methylthio)derivátu AF177 také 1-methylpiperidin-

4-spiro-5'-(4'-methylthio-3'-imidazolin-2'-thion)AF183, t.t. 218 až 220 °C (rozkl.) (ze směsi dichlormethan-aceton). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃): 1,74 (m, 2H), 2,07 (m, 2H), 2,37 (m, 2H), 2,39 (s, CH₃N-), 2,69 (s, CH₃S-), 2,95 (m, 2H), 10,3 (široký singlet, -NH-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 229 (M⁺), 182 (M-CH₃S), 123, 122, 70. UV spektrum (ethanol): λ_{max} 312 nm (ε 12000), 280 nm (ε 15300).

Příklad 10

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyl-2',4'-dithiohydantoin) AF163

Smíchá se prášek 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethylhydantoinu) (0,570 g) a P₂S₅ (0,570 g). Směs se vaří 2 h pod zpětným chladičem v tetralinu (15 ml). Reakční směs se nechá ochladit na teplotu místnosti. Vytvoří se hnědá tvrdá sraženina. Tetralin se za sníženého tlaku odstraní a sraženina se rozdrobí a promyje petroletherem. Zalkalizuje se koncentrovaným vodným roztokem NaOH a extrahuje se dichlormethanem. Extrakt se vysuší nad síranem sodným a rozpouštědlo se odpaří. Získá se odparek (0,250 g), který se chromatografuje na koloně silikagelu (Merck) (60,15 g). Eluce směsí chloroform:ether:methanol:vodný amoniak v poměru 77:18:4:1 poskytne čistý AF163 (50 mg), který krystaluje ze směsi dichlormethanu s etherem, t.t. 223 až 225 °C (rozkl.). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃): 1,27 (t, J = 7,2 Hz, CH₃CH₂-), 1,55 až 1,67 (m, 2H), 2,03 až 2,19 (m, 2H), 2,26 až 2,46 (m, 2H), 2,36 (s, CH₃N-), 2,89 až 3,04 (m, 2H), 4,27 (q, J = 7,2 Hz, -CH₂CH₃), 8,25 (široký s, -NH-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (DMSO-d₆): 11,6 (CH₃CH₂-), 36,9 (C₃ & C₅), 39,9 (-CH₂CH₃), 45,9 (CH₂N), 49,9 (C₂ & C₆), 72,9 (C₄), 179,8 (C₂), 207,8 (C₄) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 243 (M⁺), 186 (M⁺-C₃H₇N), 149, 71, 70 (100 %), 57. IČ spektrum (KBr): 3177 (NH), 2930, 2778, 1513, 1434, 1357, 1231, 1116, 1090, 1070, 1040, 961, 801, 780, 626, 546, 457 cm⁻¹. UV spektrum (ethanol): λ_{max} 302 nm (ε 34200), 226 nm (ε 7700).

Syntéza vínanu AF163

K roztoku volné báze AF163 (0,735 g, 3,025 mmol) ve směsi methylenchlorid (15 ml) - methanol (5 ml) se přidá roztok L(+)-vinné kyseliny (0,214 g, 1,427 mmol) v methanolu (2,0 ml). Tato směs se míchá 0,5 h za teploty místnosti. Rozpouštědlo se pak odpaří a odparek se suspenduje ve směsi etheru s methylenchloridem, zfiltruje a promyje stejnou směsí rozpouštědel. Získá se tak žlutá pevná látka AF163 (vínan), t.t. 221 až 225 °C (rozkl., 0,923 g, 96% (hmotn.) výtěžek). ¹H-NMR spektrum (D₂O): 1,27 (t, J = 7,2 Hz, CH₃CH₂-), 2,08 (m, 2H), 2,49 (m, 2H), 3,01 (s, CH₃N-), 3,31 (m, 2H), 3,76 (m, 2H), 4,26 (q, J = 7,2 Hz, -CH₂CH₃), 8,37 (s, CHOH) ppm.

Příklad 11

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoin) AF173

Roztok 1-methyl-4-piperidonu (29,35 g, 0,260 mol), KCN (26,57 g, 0,408 mol), NH₄Cl (21,00 g, 0,393 mol) a CS₂ (26 ml) se zahřívá 8 h pod zpětným chladičem na 50 až 55 °C ve směsi ethanolu (200 ml) s vodou (50 ml). Reakční směs se nechá stát za teploty místnosti přes noc. Získaná sraženina se odfiltruje a promyje vodou a ethanolem. Získá se tak žlutá pevná látka (26,3 g, výtěžek: 47,0 % hmotn.), t.t. 250 až 253 °C (rozkl.), po krystalizaci z methanolu má t.t. 252 až 254 °C (rozkl.). ¹H-NMR spektrum (DMDO-d₆): 1,43 až 1,56 (m, 2H), 1,89 až 2,05 (m, 2H), 2,21 (s, CH₃N-), 2,26 až 2,40 (m, 2H), 2,64 až 2,79 (m, 2H), 11,14 (široký singlet, -NH-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (DMSO-d₆): 36,2 (C₃ & C₅), 45,5 (CH₃N-), 49,9 (C₂ & C₆), 74,8 (C₄), 181,5 (C₂), 212,0 (C₄) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 215 (M⁺), 183 (M⁺-S), 182 (M⁺-SH), 181, 158 (M⁺-C₃H₇N), 123, 102, 77, 71, 70 (100 %). IČ spektrum (KBr): 3130 (NH),

1484, 1449, 1350, 1295, 1231, 1198, 1176, 1145, 1083, 1062, 957, 721, 545, 504 cm^{-1} . UV spektrum (0,01N HCl): λ_{max} 298 nm (ϵ 32000), 220 nm (ϵ 8000).

5 Příklad 12

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyl-2',4'-thiohydantoin) AF163, 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(4'-ethylthio-3'-imidazolin-2'-thion) AF176 a 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-ethyl-2'-ethylthio-2'-imidazolin-5'-thion) AF170

10

K suspenzi 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoinu) AF173 (3,30 g, 15,3 mmol) v suchém DMF (30 ml) se přidá NaH (0,760 g, 60% (hmotn.) v minerálním oleji, 19,0 mmol). Směs se míchá 1,5 h při 50 °C. Ke shora uvedené směsi se postupně přidává roztok ethylbromidu (1,85 g, 17,0 mmol) v DMF (6 ml). Směs se míchá 4 h při 75 až 80 °C. Po stání přes noc za teploty místnosti se vytvoří sraženina (NaBr), která se odfiltruje a promyje etherem. Filtrát a promývací podíly se spojí a odpaří. Získá se olej, z něhož se oddělí pevná látka (1,5 g) nerozpustná v dichlormethanu, o které bylo zjištěno, že jde o výchozí materiál (identické NMR spektrum a TLC). Odparek se zchromatografuje na koloně silikagelu. Eluce směsí rozpouštědel ether:chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 68:27:4:1 se získá nejdříve 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyl-2',4'-thiohydantoin) AF163 (0,95 g), identický s produktem získaným shora reakcí AF160 s P_2S_5 . Pokračováním eluce se získá 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(4'-ethylthio-3'-imidazolin-2'-thion) AF176 (0,15 g), který krystalizuje ze směsi hexanu s dichlormethanem, t.t. 212 až 215 °C (rozkl.). ^1H -NMR spektrum (CDCl_3): 1,42 (t, $J = 7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 1,73 (m, 2H), 2,06 (m, 2H), 2,31 (m, 2H), 2,38 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 2,95 (m, 2H), 3,33 (q, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 10,0 (široký signál, $-\text{NH}-$) ppm. ^{13}C -NMR spektrum ($\text{DMSO}-d_6$): 14,2 (CH_3CH_2-), 25,6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 35,0 (C_3 & C_5), 45,8 ($\text{CH}_3\text{N}-$), 50,5 (C_2 & C_6), 74,3 (C_4), 192,1 (C_2), 198,1 (C_4) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 243 (M^+), 182 (M^+-EtS , 100 %), 156 (M^+-EtSCN), 123, 124, 96, 71, 70, 57. IČ spektrum (KBr): 3135 (NH), 2930, 2788, 1476, 1463, 1446, 1281, 1257, 1232, 1158, 1141, 1121, 1096, 958, 711, 674 a 535 cm^{-1} . UV spektrum (ethanol): λ_{max} 314 nm (ϵ 5400) inf., 282 nm (ϵ 6700).

Opakováním shora uvedené reakce s 1,5 molárním nadbytkem EtBr k AF173 se vedle shora uvedených monoethylderivátů získá diethylderivát 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-ethyl-2'-ethylthio-2'-imidazolin-5'-thionu) AF170, t.t. 66 až 67 °C (krystalováno z hexanu). ^1H -NMR spektrum (CDCl_3): 1,24 (t, $J = 7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 1,24 (m, 2H), 1,44 (t, $J = 7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 2,27 (m, 2H), 2,39 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 2,52 (m, 2H), 2,81 (m, 2H), 3,24 (q, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,93 (q, $J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (CDCl_3): 12,2 (CH_3CH_2-), 13,02 (CH_3CH_2-), 25,7 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 36,8 (C_3 & C_5), 39,0 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 46,1 ($\text{CH}_3\text{N}-$), 51,5 (C_2 & C_6), 82,2 (C_4), 158,5 (C_2), 216,7 (C_5) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 271 (M^+), 242 (M^+-Et), 214 ($\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$), 185, 162, 75, 71, 70 (100 %), 57. IČ spektrum (KBr): 1574 ($\text{C}=\text{N}$), 1446, 1372, 1354, 1212, 1071, 1060, 936 cm^{-1} . UV spektrum (ethanol) λ_{max} 296 nm (ϵ 22000), 252 nm (ϵ 17700).

45 Kyselá hydrolyza AF176

K AF176 (48 mg) se přidá vodná HCl (1 ml, 20% (hmotn.)). Okamžitě je cítit vůně merkaptanu. Získaný roztok se míchá za teploty místnosti 1 h, potom se odpaří za sníženého tlaku při 50 °C. Získá se bílá pevná látka, hydrochlorid 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thiohydantoinu). ^1H -NMR spektrum (D_2O): 2,10 až 2,43 (m, 4H), 2,94 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 3,20 (m, 1H), 3,47 až 3,78 (m, 3H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 199 (M^+), 181, 171, (M^+-CO), 156 (M^+-HNCO), 142 ($\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$), 111, 96, 71, 70, 57. UV spektrum (voda): λ_{max} 264 nm (ϵ 20400), 224 nm (ϵ 8600).

Příklad 13

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thiohydantoin) AF195

- 5 a) Roztok 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoinu) (AF173) (10,0 g) v ethanol-aminu (40 ml) s vodou (75 ml) se vaří pod zpětným chladičem 1,75 h. Rozpouštědlo a nadbytek reakčního činidla se za sníženého tlaku odstraní. Opakovaná krystalizace odparku ze směsi acetonitrilu s dichlormethanem, acetonu a ethanolu s acetonitrilem poskytla čistý 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thio-4'-(8 β -hydroxyethyliminohydantoin), t.t. 230 až 231 °C (rozkl.). ¹H-NMR spektrum (D₂O): 11,74 (m, 2H), 1,94 (m, 2H), 2,26 (s, CH₃N-), 2,17 až 2,34 (m, 2H), 2,92 (s, 2H), 3,54 (t, J = 5,4 Hz, -CH₂OH), 3,74 (t, J = 5,4 Hz, =NCH₂-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (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. Hmotnostní spektrum (m/e): 242 (M⁺), 224 (M⁺-H₂O), 199, 185, 172 (M⁺-70), 154 (M⁺-70-H₂O), 71,70. UV spektrum (0,01N HCl) $\lambda_{\max}$ 227 nm (ε 22200), 242 nm (ε 10200).

- 10 Iminohydantoinový derivát (1,40 g) se rozpustí ve vodné HCl (5,0 ml, 1:1) a roztok se zahřívá 1 h pod zpětným chladičem. Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku. Odparek se překrystaluje z methanolu. Získá se hydrochlorid 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thiohydantoinu) (0,756 g) identického s produktem, který se získá hydrolyzou AF176 (viz příklad 12).

- 25 b) Roztok 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dithiohydantoinu) (AF173) (10,0 g, 0,0465 mol) a butylaminu (17,0 g, 0,233 mol) v ethanolu (80 ml) se zahřívá 1,5 h pod zpětným chladičem. Z ochlazené reakční směsi vypadne krystalická pevná látka, která se odfiltruje, promyje malým množstvím ethanolu, etheru a petroletheru. Získá se tak 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thio-4'-ethyliminohydantoin) (AF189) (11,1 g, 0,437 mol) ve výtěžku 94 % hmotn. Tento produkt se překrystaluje ze směsi dichlormethanu s methanolem. Získají se jehličky s t.t. 236 až 239 °C (rozkl.). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃ + CD₃OD): 0,94 (t, J = 7,2 Hz, 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 = 7,2 Hz, -CH₂-N=) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 254 (M⁺), 197 (M⁺-C₄H₉), 184 (M⁺-70), 149, 128, 71, 70, 57 (C₄H₉⁺).

- 35 Iminohydantoinový derivát AF189 (10,45 g) se rozpustí ve vodné HCl (15,0 ml, 16% (hmotn.)) a roztok se zahřívá 1 h pod zpětným chladičem. Reakční směs se oddestilovává tak dlouho až zůstane jenom malé množství kapaliny. Přidá se ethanol (50 ml) a ochlazením vypadlá pevná látka se odfiltruje a promyje malým množstvím ethanolu a etheru. Získá se hydrochlorid 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thiohydantoinu) (AF195) (8,42 g, výtěžek 87 % hmotn.), t.t. vyšší než 295 °C (rozkl.), identický se shora získaným produktem.

40

Příklad 14

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(oxazolidin-2'-thion) AF165

- 45 K bezvodému DMSO (10 ml), který obsahuje malé množství prášku KOH, se za míchání přidá 4-aminomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidin (0,595 g, 4,13 mmol) a CS₂ (0,340 g, 4,47 mmol). Reakční směs se zahřívá 2 h na 50 °C. Ve vakuu se odstraní rozpouštědlo a odparek se několikrát překrystaluje z methanolu, acetonu a dichlormethanu. Získá se tak krystalická pevná látka s t.t. 190 až 195 °C (211 mg). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃): 1,80 až 1,98 (m, 2H), 2,03 až 2,16 (m, 2H), 2,32 (s, CH₃N-), 2,44 až 2,72 (m, 4H), 3,51 (s, -CH₂N-C=S) ppm. ¹³C-NMR spektrum (DMSO-d₆): 35,1 (C₃Cl₅), 45,7 (CH₃N-), 51,5 (C₂Cl C₆), 53,1 (-CH₂NH-), 86,4 (C₄), 187,2 (-C=S) ppm.

50

Příklad 15

N-Methylnortropan-3-spiro-5'-(3'-methylhydantoin) AF167 a N-methylnortropan-3-spiro-5'-(3'-ethylhydantoin) AF168

5

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

Směs tropinonu (45 g, 0,32 mol) v ethanolu (160 ml), uhličitanu amonného (93 g, 0,96 mol) ve vodě (400 ml) a KCN (25,8 g, 0,40 mol) ve vodě (84 ml) se zahřívá na 60 °C 2 hodiny. Potom se nechá stát za teploty místnosti 16 h. N-Methylnortropan-3-spiro-5'-hydantoin (61,33 g, 0,29 mol, výtěžek: 92 % hmotn.) se oddělí a nechá se sušit v exsikátoru, t.t. 330 °C. Hmotnostní spektrum m/e 209 (M⁺). ¹H-NMR spektrum (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 (široký s, NH), 4,1 (široký s, 2H, H1=H5) ppm. ¹H-NMR spektrum (DCl, D₂O): 2,3 (m, 4H, H6=H7(α) a H2=H4(β)), 2,5 (m, 2H, H2=H4(α)), 2,7 (m, 2H, H6=H7(β)), 2,9 (s, 3H), 4,15 (široký s, 2H, H1=H5) ppm. ¹³C-NMR spektrum (DCl, 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.

15

b) AF167 a AF168

20

N-Methylnortropan-3-spiro-5'-hydantoin (1 ekvivalent) a KOH (1 ekvivalent) se míchají několik minut ve vodě za teploty místnosti. K vodnému roztoku se přikape methyljodid nebo ethylbromid (2 ekvivalenty) v methanolu nebo ethanolu. Reakční směs se extrahuje chloroformem a před odpařením se vysuší nad síranem hořečnatým. Získají se produkty AF167 a AF168 ve výtěžku 10 % hmotn.

25

AF167: ¹H-NMR spektrum (D₂O): 1,65 (m, 2H, H6=H7(α)), 1,8 (m, 2H, H2=H4(β)), 2,2 (m, 2H, H2=H4(α)), 2,4 (m, 2H, H6=H7(β)), 2,55 (s, 3H), 2,85 ((s, 3H), 3,25 (široký s, 2H, H1=H5) ppm. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃): 1,55 (m, 2H, H6=H7(α)), 1,75 (m, 2H, H2=H4(β)), 2,2 (m, 2H, H2=H4(α)), 2,4 (s, 3H), 2,45 (m, 2H, H6=H7(β)), 3,0 (s, CH₃), 3,3 (široký s, 2H, H1=H5), 6,3 (široký s, NH) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 223 (M⁺).

30

AF168: ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, CD₃OD): 1,1 (t, 3H), 1,6 (m, 2H, H6=H7(α)), 1,75 (m, 2H, H2=H4(β)), 2,2 (m, 2H, H2=H4(α)), 2,35 (s, 3H), 2,4 (m, 2H, H6=H7(β)), 3,3 (široký s, 2H, H1=H5), 3,55 (q, 2H) ppm. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃): 1,2 (t, 3H), 1,6 (m, 2H, H6=H7(α)), 1,75 (m, 2H, H2=H4(β)), 2,2 (m, 2H, H2=H4(α)), 2,4 (s, 3H), 2,45 (m, 2H, H6=H7(β)), 3,3 (široký s, 2H, H1=H5), 3,55 (q, 2H), 6,3 (široký s, NH) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 13 (CH₃CH₂), 25 (C6=C7), 35 (C2=C4), 40 (N-CH₃), 40,5 (N-CH₂), 59 (C3=C5'), 60 (C1=C5), 159 (C2'), 180 (C4') ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 237 (M⁺).

40

Příklad 16

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyloxazolidin-2'-on) AF172

45

a) 4-Acetamidomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidin

4-Aminomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidin (2,95 g, 0,02 mol), uhličitan draselný (6,5 g, 0,047 mol) a anhydrid kyseliny octové (8,5 g, 0,08 mol) v methanolu se míchají 2 h za teploty místnosti. Pro zneutralizování se přidá NaOH a roztok se extrahuje chloroformem. Po odpaření se získá žlutý olej, který byl identifikován jako 4-acetamidomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidin (3,4 g, 0,018 mol, výtěžek: 91 % hmotn.).

50

b) 4-Ethylaminomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidin

4-Acetamidomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidin (3,4 g, 0,018 mol) v suchém THF se zahřívá pod zpětným chladičem v přítomnosti hydridohlinitanu lithného (4 g). Po třech dnech se směs vlije do lázně ledu s vodou a zfiltruje se celitem. Rozpouštědlo se odpaří a po přidání vody se roztok extrahuje chloroformem. Extrakt se vysuší síranem hořečnatým a odpaří. Výtěžek 1,03 g (33 % hmotn.) surového materiálu. Takto získaný produkt, 4-ethylaminomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidin, se použije bez dalšího čištění.

c) 1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyloxazolidin-2-on) AF172

4-Ethylaminomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidin (16,8 g, 0,1 mol) a N,N'-karbonyldiimidazol (32 g, 0,2 mol) se smíchají pod dusíkem ve 400 ml chloroformu. Odpařením se získá 50 g surového materiálu, který se řádně promyje hexanem. Odpařením se získá produkt, 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyloxazolidin-2-on) AF172, jako žlutavý olej (16,8 g, 0,085 mol, výtěžek: 85 % hmotn.). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,15 (t, 3H), 1,8 (m, 2H), 1,95 (m, 2H), 2,3 (m, 3H), 2,55 (m, 2H), 3,28 (s, 2H), 3,32 (q, 2H) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃): 13 (CH₃CH₂), 22 (CH₃CH₂), 37 (CH₃CH₂N), 39 (EtNCH₂), 52 (NCH₂CH₂), 55 (C-O), 157,5 (C=O) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 198 (M⁺).

Příklad 17

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(3'-ethyloxazolidin-2-on) AF174

a) 4-Acetamido-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin

4-Amino-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin (2,95 g, 0,02 mol), uhličitán draselný (6,5 g, 0,047 mol) a anhydrid kyseliny octové (8,5 g, 0,08 mol) v methanolu se míchají 2 h za teploty místnosti. Pro zneutralizování se přidá NaOH a roztok se extrahuje chloroformem. Po odpaření se krystalizací z horkého acetonu získá bílá pevná látka, 4-acetamido-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin (1,67 g, 0,009 mol, výtěžek: 45 % hmotn.).

b) 4-Ethylamino-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin

4-Acetamido-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin (1,6 g, 8,6 mmol) v suchém THF se zahřívá pod zpětným chladičem v přítomnosti hydridohlinitanu lithného (3 g). Po 4 h se směs vlije do lázně ledu s vodou a zfiltruje se celitem. Rozpouštědlo se odpaří a po odpaření většiny vody se roztok extrahuje chloroformem. Extrakt se vysuší síranem hořečnatým a odpaří. Výtěžek 1,13 g (77 % hmotn.) zcela čistého materiálu. Takto získaný produkt, 4-ethylamino-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin, se použije bez dalšího čištění.

c) 1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(3'-ethyloxazolidin-2-on) AF174

4-Ethylamino-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin (172 mg, 1 mmol) a N,N'-karbonyldiimidazol (486 mg, 3 mmol) se 3 dny míchají pod dusíkem v chloroformu. Odpařením se získá surový materiál, který se řádně promyje hexanem. Odpařením se získá produkt, 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(3'-ethyloxazolidin-2-on) AF174, jako bílá pevná látka (140 mg, 0,71 mol, výtěžek: 71 % hmotn.). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,10 (t, 3H), 1,6 (m, 2H), 1,95 (m, 4H), 2,25 (m, 3H), 2,85 (m, 2H), 3,2 (q, 2H), 4,1 (s, 2H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 198 (M⁺).

Příklad 18

2-N-Methylspiro-(1,3-sukcinimid-4,3')chinuklidin AF133

5 a) Ethylester (3-chinuklidyliden)kyanoctové kyseliny

Směs 3-chinuklidinonu (30 g, 0,24 mol), ethylesteru kyanooctové kyseliny (40 g, 0,35 mol), octanu amonného (3,8 g), kyseliny octové (11 g) a benzenu (120 ml) se zahřívá pod zpětným chladičem. Voda se odstraňuje azeotropickou destilací (celkem 4 ml vody). Benzenový roztok se ochladí, přidá se uhlíčitán draselný (30 g) ve 120 ml vody a směs se extrahuje toluenem (3 x 500 ml). Toluénové extrakty se spojí, vysuší a produkt se vysráží jako hydrochlorid. Výtěžek 63 g (95 % hmotn.) surového produktu. Při TLC na silikagelu (Merck, položka 5735), eluce amoniak (25% hmotn.) ve vodě se 2 % obj. methanolu, má R_f 0,67. Tento produkt se dále přečistí krystalizací v ethanolu nebo izopropanolu. $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3 , TMS, volná báze): 1,29 (m, 3H, CH_3), 4,2 (m, 2H, CH_2), 1,7 až 1,9 a 2,8 až 3,2 (m, chinuklidinový skelet) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrum (CDCl_3 , TMS, δ): 14 (CH_3), 62 (CH_2O), 189 (C=O), 162 (C=N), 115 (C-CN), 100 (C=C), 33,7 (C-H) ppm.

20 b) 3-Karboethoxy-3-karboethoxymethylchinuklidin

Ethylester (3-chinuklidyliden)kyanoctové kyseliny (64 g, 0,24 mol) a KCN (17 g, 0,26 mol) rozpuštěný ve 25 ml vody se rozpustí ve 125 ml ethanolu. Tato směs se zahřívá pod zpětným chladičem 20 minut, ochladí, dekantuje od KCl a zbývající KCl se promyje dvěma 50ml dávkami ethanolu. Spojený alkoholový roztok se odpaří. Olejovitý odparek se rozpustí ve 250 ml koncentrované HCl a směs se zahřívá pod zpětným chladičem 24 h. Roztok se odpaří, odparek se několikrát promyje acetonem a vysuší. Pevná látka se zahřívá 20 h pod zpětným chladičem v ethanolu nasyceném HCl. Ethanol se pak odstraní, odparek se pečlivě zalkalizuje uhlíčitánem sodným a extrahuje se chloroformem. Chloroformový roztok se vysuší, odpaří a surový diester se dále vyčistí chromatografií na koloně, eluce 2 % methanolu v chloroformu. Hmotnostní spektrum (m/e) 2,69 (M^+), základní maximum 196 (M-C-OEt). $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3 , TMS, δ): 1,2 (dt, 6H, CH_3), 4,2 až 4,3 (dt, 4H, CH_2O), 1,3 až 1,6 a 2,6 až 3,1 (m, chinuklidinový skelet).

c) 2-N-Methylspiro-(1,3-sukcinimid-4,3')chinuklidin (AF133)

3-Karboethoxy-3-karboethoxymethylchinuklidin (3,35 g, 12 mmol) se rozpustí ve 4,5 g methylaminu a směs se 90 h zahřívá pod tlakem na 190 °C. Reakční směs se ochladí, odpaří a pevný odparek se přečistí chromatografií na koloně silikagelu, eluce 2 % methanolu v chloroformu obsahujícím 0,2 amoniaku. Získá se AF133 jako bílá pevná látka, t.t. 94 až 96 °C (1,2 g, 5,7 mmol). Hmotnostní spektrum: M^+ 209. $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3 , TMS, δ): 3,4 (d, 1H, H_2), 2,96 (s, 3H, CH_3), 2,5 (d, 1H, H_2), 1,5 až 1,9 (m, chinuklidinový skelet).

Příklad 19

45 2-N-Ethylspiro-(1,3-sukcinimid-4,3')chinuklidin AF134

Surový 3-karboethoxy-3-karboethoxymethylchinuklidin (20 g) se rozpustí v 70% vodném ethylaminu a směs se 7 h zahřívá pod tlakem na 140 °C. Průběh reakce se sleduje plynovou chromatografií. Surový produkt se extrahuje chloroformem, vysuší a odpaří. Olejovitý odparek se přečistí chromatografií na koloně silikagelu, eluce směsí chloroform:petrolether:ethanol:vodný amoniak v poměru 17:13:3:0,4. Volná báze se vysráží jako hydrochlorid. Výtěžek 6,6 g bílé pevné látky, t.t. 270 až 272 °C. TLC (hydroxid amonný (25 % hmotn. ve vodě):methanol; 2 % obj.) na silikagelu (Merck položka 5735) R_f 0,47. Hmotnostní spektrum: M^+ 222. $^1\text{H-NMR}$

spektrum (CDCl_3 , TMS, δ , volná báze): 1,5 (t, 3H, CH_3), 2,5 (q, 2H, N-CH_2), 1,6 až 3,3 (m, chinuklidinový skelet).

5 Příklad 20

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(oxazolidin-2',4'-dion) AF169 a 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyloxazolidin-2',4'-dion) AF180

10 a) 4-Hydroxy-4-kyano-1-methylpiperidin

K čerstvě predestilovanému 1-methylpiperidin-4-onu (81,72 g, 0,72 mol) ve vodě (200 ml) se přidá kolem 100 ml 37% (hmotn.) HCl do pH 3. Reakční směs se ochladí v ledové lázni, příslušnou rychlostí se přidává KCN (49 g, 0,75 mol) ve vodě (200 ml) tak, aby se vnitřní teplota udržovala kolem 10 °C. Reakční směs se po přidání míchá další 2 h, potom se zfiltruje. Po promytí vodou a vysušení se získá 4-hydroxy-4-kyano-1-methylpiperidin ve výtěžku 67 % (hmotn.) jako bílý prášek (67 g, 0,48 mol, t.t. 135 °C). $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3 , δ): 1,9 (m, 2H), 2,2 (m, 2H), 2,4 (s, 3H), 2,45 (m, 2H), 2,75 (m, 2H), 2 až 3,5 (široký m, 1H, OH) ppm.

20 b) 4-Hydroxy-4-karbamoyl-1-methylpiperidin

4-Hydroxy-4-kyano-1-methylpiperidin (36,4 g, 0,26 mol) se postupně přidává ke kyselině sírové (80 ml) za vnějšího chlazení. Směs se udržuje na teplotě místnosti 41 h, potom se přidá rozdrcený led (30 g). Výsledný roztok se zneutralizuje uhličitánem barnatým (376 g) na pH 8 až 9 a po přidání vody se výsledný síran barnatý oddělí a promyje methanolem. Filtrát se za sníženého tlaku zahustí. Produkt, 4-hydroxy-4-karbamoyl-1-methylpiperidin (28,16 g, 0,18 mol, výtěžek: 69 % hmotn.) se překrystaluje z ethanolu jako bílá pevná látka, t.t. 180 °C. $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CD_3OD , δ): 1,51 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,4 (m, 2H), 2,7 (m, 2H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 158 (M^+).

30

c) 1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(oxazolidin-2',4'-dion) AF169

K roztoku methoxidu sodného (9,8 g, 0,14 mol) v suchém ethanolu (60 ml) se přidá roztok 4-hydroxy-4-karboxamid-1-methylpiperidinu (27,5 g, 0,17 mol) a diethyluhličitánu (26,23 g, 0,22 mol) v ethanolu (300 ml). Výsledná směs se zahřívá 60 h na 80 °C pod zpětným chladičem. Reakční směs se odpaří, odparek se vytřepe studenou vodou (70 ml) a zneutralizuje se 2N HCl na pH 7. Tento roztok se zahustí na poloviční objem a bílá sraženina se odfiltruje. Rozmícháním s ethanolem se získá 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(oxazolidin-2',4'-dion) AF169 (22 g, 0,12 mol) ve výtěžku 70 % hmotn. jako bílá pevná látka, t.t. 285 °C (rozkl.). $^1\text{H-NMR}$ spektrum (D_2O , pH 7): 2,07 (m, 2H), 2,27 (m, 2H), 2,95 (s, 3H), 3,3 (m, 2H), 3,6 (m, 2H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e, pH sloučeniny je 7): 185 až 184 ($\text{M}^+ + 1$ a M^+).

40

d) 1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyloxazolidin-2',4'-dion) AF180

K roztoku 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(oxazolidin-2',4'-dionu) (2,8 g, 0,015 mol) v suchém DMF (100 ml) se pomalu přidává KH (65% (hmotn.) v oleji) dokud se v reakci nezastaví ohřívání (použilo se 4,9 g). Bílá suspenze se zahřívá pod zpětným chladičem jednu hodinu, potom se ochladí a přikape se ethylbromid (4,6 g, 0,042 mol). Reakce se spontánně zahřeje. Po ochlazení reakční směsi na teplotu místnosti se směs zahřívá 2 h pod zpětným chladičem. Po ochlazení se oddělí bílá pevná látka, která se promyje ethanolem. Po odpaření rozpouštědel se surový produkt zchromatografuje na koloně silikagelu, eluce chloroformem a methanolem. Frakce, které obsahují produkt, se odpaří. Produkt se izoluje a identifikuje ve formě volné báze. Pro praktické zacházení se převede na hydrochlorid působením roztoku obsahujícího HCl, ether a ethanol. Z tohoto roztoku se vysráží hydrochlorid 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyloxazolidin-

50

2',4'-dionu) (0,746 g, 0,003 mol, výtěžek 21 % hmotn.), t.t. 305 °C (rozkl.). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ, volná báze): 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 spektrum (CDCl₃, δ, volná báze): 13 (CH₃CH₂), 32 (CH₂CH₃), 35 (CH₂-CH₂-C), 46 (N-CH₃), 50 (CH₂-N-CH₃), 85 (C spiro), 155 (OC=O), 175 (C-C=O) ppm. Hmotnostní spektrum (volná báze, m/e): 212 (M⁺).

Příklad 21

10 1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-methyl-2'-thiazolin)AF151(S)

a) Směs 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-methyl-2'-oxazolinu) AF151 (1,85 g, 11,01 mmol), P₂S₅ (1,83 g, 8,23 mmol) a monohydrátu p-toluensulfonové kyseliny (4,20 g, 22,08 mmol) v xylenu (70 ml) se magneticky míchá a zahřívá 3 h pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo se azeotropicky oddestiluje. Zbytek se zalkalizuje koncentrovaným vodným roztokem NaOH, potom se extrahuje dichlormethanem, organický extrakt se vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se odstraní. Získá se tak hnědý olej (2,10 g), který se chromatografuje na koloně silikagelu (Kieselgel S, 0,032 až 0,063 mm, Riedel DeHaen, 70 g). Eluce směsí chloroformu s methanolem v poměru 97 : 3, která obsahuje 10M amoniak. Získají se frakce, které obsahují čistý AF151(S) (0,90 g).

b) Směs prášků 4-acetamido-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidinu (8,00 g, 0,043 mmol) a P₂S₅ (6,10 g, 0,0275 mol) se suspenduje v xylenu (120 ml). Tato směs se magneticky míchá 6 h za zahřívání pod zpětným chladičem. Reakční směs se nechá stát za teploty místnosti přes noc. Získaná sraženina se odfiltruje a promyje se petroletherem (40 až 60 °C). Získá se tak šedý prášek (13,0 g). Získaný prášek se ochladí a zalkalizuje se koncentrovaným vodným roztokem NaOH, potom se několikrát extrahuje dichlormethanem. Spojené extrakty se vysuší síranem sodným a odpaří. Odparek se extrahuje hexanem a hexan se odstraní. Získá se červený olej (3,53 g), který se predestiluje. Získá se tak bezbarvý olej, t.t. 60 až 68 °C (53,3 Pa) (2,40 g), který se zchromatografuje na sloupci silikagelu 60 (Merck, 100 g). Elucí směsí chloroform:ether:methanol:amoniak v poměru 70:25:4:1 se získá čistý AF151(S) (1,71 g). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃): 1,65 až 1,78 (m, 2H), 1,90 až 2,04 (m, 2H), 2,19 (m, CH₃C=N-), 2,32 (s, CH₃N-), 2,30 až 2,43 (m, 2H), 2,60 až 2,75 (m, 2H), 3,11 (s, CH₂S-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃): 19,9 (CH₃C=N-), 35,8 (C₃ a C₅), 43,1 (-CH₂S-), 45,6 (CH₃N-), 52,1 (C₂ a C₆), 78,5 (C₄), 161,0 (S-C=N-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 184 (M⁺, 100 %), 110 (26 %), 109 (56 %), 72 (93 %), 71 (24 %).

Příklad 22

40 1-Methylpiperidin-4-spiro-4'(5')-(2'-methyl-2'-imidazolin) AF190

a) 4-Amino-4-kyano-1-methylpiperidin

45 1-Methylpiperidin-4-on (33,0 g, 0,292 mmol), KCN (19,5 g, 0,299 mol) a chlorid amonný (16,5 g, 0,308 mol) se suspendují v methanolu (225 ml) a vodě (150 ml). Směs se míchá 12 dnů za teploty místnosti. Získaná sraženina se odfiltruje a filtrát se odpaří za sníženého tlaku. Pro odstranění vody, která může ve zbytku zůstat, se přidá ethanol a směs se azeotropicky destiluje. Ke zbytku se opět přidá ethanol, zbytek se v něm částečně rozpustí a zůstane anorganická pevná látka, která se zfiltruje a promyje se ethanolem. Filtrát a promývací vody se spojí a rozpouštědlo se odstraní. Zůstane viskózní olej (35,5 g), který má dvě skvrny na TLC ve směsí chloroform:methanol:amoniak (vodný) v poměru 17:2:1 na silikagelu. Krystalizací z etheru se získá pevná látka, která se dále krystaluje ze stejného rozpouštědla. Získá se tak 4-kyano-4-hydroxy-1-methylpiperidin jako krystaly s t.t. 130 až 135 °C. Matečné louhy po zahuštění poskytnou

druhý podíl krystalické pevné látky, kterou je většinou 4-amino-4-kyano-1-methylpiperidin. $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3): 1,72 až 1,88 (m, 2H), 2,01 (m, 2H), 2,25 až 2,37 (m, 2H), 2,32 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,74 až 2,83 (m, 2H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 139 (M^+), 112 ($\text{M}^+ - \text{HCN}$), 71, 70.

5

4-Amino-4-kyano-1-methylpiperidinacetylací anhydridem kyseliny octové v pyridinu poskytl 4-acetamido-4-kyano-1-methylpiperidin, který krystalizací ze směsi petroletheru s dichlormethanem poskytuje t.t. 143 až 144 °C. $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3): 1,78 až 1,96 (m, 2H), 2,04 (s, $\text{CH}_3\text{CON-}$), 2,32 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,35 až 2,50 (m, 4H), 2,66 až 2,84 (m, 2H), 6,22 (s, $-\text{NHCO-}$) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 181 (M^+), 122 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CONH}_2$). IČ spektrum (CHCl_3): 3438, 3303, 2940, 2804, 2242, ($\text{C}=\text{N}$), 1670 (amid) cm^{-1} .

10

Kyselá hydrolyza 4-amino-4-kyano-1-methylpiperidinu kyselinou sírovou poskytla 4-amino-4-karbamoyl-1-methylpiperidin, který byl krystalován ze směsi ethylacetátu s dichlormethanem, t.t. 145 až 147 °C. $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3): 1,44 (m, 2H), 1,68 (široký signál, $-\text{NH}_2-$), 2,12 až 2,34 (m, 4H), 2,30 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,70 až 2,82 (m, 2H), 5,47 (široký signál, $-\text{NH-}$), 7,39 (široký signál, $-\text{NH-}$) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 158 ($\text{M}^+ + 1$), 157 (M^+), 140 ($\text{M}^+ - \text{NH}_3$, 100 %), 113 ($\text{M}^+ - \text{CONH}_2$), 96, 71.

15

20 b) 4-Amino-4-aminomethyl-1-methylpiperidin

Roztok 4-amino-4-kyano-1-methylpiperidinu (3,60 g) v suchém dimethoxyethanu se přidává k mechanicky míchané suspenzi LiAlH_4 (3,0 g) v suchém dimethoxyethanu v atmosféře dusíku takovou rychlostí, aby teplota nepřestoupila 50 °C. Na konci přidávání se směs zahřívá 6 h pod zpětným chladičem. Nadbytek LiAlH_4 se rozloží přidáním 4M NaOH (10 ml), vody (3 ml), nasyceného NaOH roztoku (120 ml) a vody (5 ml) k ochlazení (0 °C) míchané reakční směsi. Organické rozpouštědlo se oddělí a vodná fáze se několikrát extrahuje horkým THF. Organické rozpouštědlo, které bylo odděleno a THF extrakty se spojí, vysuší se síranem sodným a rozpouštědla se odstraní. Získá se tak titulózní sloučenina jako viskózní olej (3,17 g), který byl dále přečištěn destilací, t.v. 60 až 62 °C (107 Pa). $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3): 1,43 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 2,15 (široký signál, $-\text{NH}_2-$), 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. Acetylací získaného diaminu se získá diacetamid jako pevná látka, t.t. 175 až 176 °C (z acetonitrilu). $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3): 1,74 (m, 2H), 1,96 až 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 až 2,61 (m, 2H), 3,50 (d, $J = 5,7 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{NH-}$), 5,62 (s, $-\text{NHCO-}$), 7,18 (t, $-\text{CH}_2\text{NHCO-}$) ppm. Hmotnostní spektrum (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.

30

35

40 Hydrogenací 4-amino-4-kyano-1-methylpiperidinu vodíkem (340 kPa) RaNi jako katalyzátorem v horkém (60 °C) anhydridu kyseliny octové obsahujícím octan sodný se také získá diacetamid.

c) 1-Methylpiperidin-4-spiro-4'(5')-(2'-methyl-2'-imidazolin) AF190

45 K roztoku 4-amino-4-aminomethyl-1-methylpiperidinu (0,248 g, 1,734 mmol) v dichlormethanu (5 ml) se přidá hydrochlorid ethylacetimidátu (0,282 g, 2,282 mmol) a směs se míchá 3 h za teploty místnosti. Rozpouštědlo se za sníženého tlaku odstraní, zbytek se zalkalizuje koncentrovaným vodným roztokem uhličitanu sodného a extrahuje se dichlormethanem. Extrakt se vysuší uhličitánem sodným a rozpouštědlo se odstraní. Získá se bezbarvý olej (191 mg), který se chromatografuje na koloně silikagelu, eluce směsí methanolu s chloroformem a 1% (hmotn.) vodným amoniakem se zvyšujícím se obsahem methanolu od 10 do 99 % hmotn. Získá se tak produkt AF190 jako olej, který ochlazením ztuhne. $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3): 1,57 až 1,84 (m, 4H), 1,93 (s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{N-}$), 2,17 až 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. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrum (CDCl_3): 15,2 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{N-}$), 37,3 (C_3 & C_5), 46,1 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 52,5 (C_2 & C_6), 59,7 (C_4), 63,7 ($-\text{CH}_2\text{N-}$), 162,1 ($-\text{C}=\text{N-}$) ppm. Hmotnostní spektrum

50

55

(m/e): 167 (M^+), 152 ($M^+ - CH_3$), 138, 109 (100 %), 97, 96, 72, 71, 70. IČ spektrum (čistý): 3260, 2933, 2852, 2800, 1620 ($-C=N-$) cm^{-1} .

5 Příklad 23

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'(5')-[2'-methyl-4'H(5'H)-imidazol-5'(4')-on] AF230

4-acetamido-4-kyano-1-methylpiperidin (1,03 g) se rozpustí v koncentrované kyselině sírové (4,0 ml) a nechá se stát za teploty místnosti 4 dny. Reakční směs se přidá k ochlazené vodě (10 ml). Potom se přidává uhličitán barnatý, dokud není pozorována žádná reakce. Vysrážený síran barnatý se odfiltruje a promyje se vodou a ethanolem. pH spojeného filtrátu a promývacích roztoků se koncentrovaným roztokem hydroxidu sodného upraví na 13. Rozpouštědlo se za sníženého tlaku odstraní. Odparek se extrahuje ethanolem. Extrakt se odpaří a odparek se extrahuje dichlormethanem. Odpařením extraktu se získá olej (0,75 g), který se chromatografuje na koloně silikagelu 60 (Merck 0,040 až 0,063 mm, 32 g). Eluce směsí methanolu (s 15 hmotn. % amoniaku) s chloroformem v poměru 1:9 se získá čistý AF230 (0,185 g), který krystaluje ze směsi dichlormethanu s etherem, t.t. 231 až 234 °C. ^1H -NMR spektrum ($CDCl_3$, 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 (široký signál, $-NH-$) ppm. ^1H -NMR spektrum (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. Hmotnostní spektrum (m/e): 181 (M^+), 111 ($M^+ - 70$), 104, 94, 77, 71 (100 %), 70. UV spektrum (ethanol): λ_{max} 224 nm (ϵ 4650), 248 nm (ϵ 2450). IČ spektrum (KBr): 3140, 2795, 2540, 1665, 1540 cm^{-1} .

Cyklizace 4-acetamido-4-kyano-1-methylpiperidinu se může provádět v alkalickém prostředí. Zahříváním této sloučeniny v 1N ethanolicke KOH nebo ve vodném 1N NaOH se tedy také získá AF230. V druhém případě se získá také 4-acetamido-4-karbamoyl-1-methylpiperidin, t.t. 207 až 208 °C (rozkl.) po krystalizaci ze směsi dichlormethan-methanol. ^1H -NMR spektrum ($CDCl_3$, δ): 2,05 (CH_3CO-), 2,08 až 2,30 (m, 6H), 2,28 (CH_3N-), 2,63 (m, CH_2-), 5,40 (široký s, $-NH-$), 5,56 (široký s, $-NH-$), 7,04 (široký s, $-NH-$) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 199 (M^+), 181 ($M^+ - H_2O$), 155 ($M^+ - CONH_2$), 140 ($M^+ - CH_2CONH_2$), 122, 112, 111, 96, 71 (100 %), 70.

AF230 může existovat jako směs tautomerů, jak je uvedeno v titulu.

Příklad 24

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-2'-oxazolin-4'-on) AF238

a) 4-Acetamidokarbonyl-4-acetoxy-1-methylpiperidin

Ke směsi 4-kyano-4-hydroxy-1-methylpiperidin (2,55 g, 18 mmol) a anhydridu kyseliny octové (11 ml, 108 mmol) v tříhrdlé baňce se přikape 5,1 g (2 ekvivalenty) 60% (hmotn.) roztoku kyseliny chloristé. Dojde k exotermní reakci, ale teplota po 20 minutách klesne. Roztok se míchá 2 h a nechá se stát přes noc za teploty místnosti. Bílá sraženina se odfiltruje a promyje se etherem a petroletherem. Získá se chloristan 4-acetamidokarbonyl-4-acetoxy-1-methylpiperidinu v téměř kvantitativním výtěžku. ^1H -NMR spektrum (D_2O , chloristan, δ): 2,2 až 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 spektrum ($CDCl_3$, volná báze, δ): 2,05 až 2,27 (m, 4H), 2,13 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,67 až 2,75 (m, 4H), 8,42 (široký s, 1H, NH) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 242 (M^+), 182, 167, 139, 123 (100 %), 114, 96, 82, 70, 60. UV spektrum (voda): λ_{max} 206 nm (ϵ 20400). IČ spektrum (KBr): 3380, 3020, 1740, 1670(sh), 1550, 1400, 1380, 1250 cm^{-1} .

b) 1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-2'-oxazolin-4'-on) AF238

Chloristan 4-acetamidokarbonyl-4-acetoxy-1-methylpiperidinu (70 mg, 0,25 mmol) v xylenu se zahřeje na 172 °C (teplota lázně se silikonovým olejem), přičemž bílá suspendovaná pevná látka zežloutne. Během reakce byla zřetelná silná vůně kyseliny octové. TLF ukazuje celkovou přeměnu na 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-2'-oxazolin-4'-on), AF238, který byl charakterizován jako chloristan. ¹H-NMR spektrum (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. Hmotnostní spektrum (m/e): 182 (M⁺), 140, 123, 112, 104, 96, 77, 70 (100 %).

Příklad 25

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(1'-methyl-3'-ethylhydantoin) AF161

Ke směsi AF160 (100 mg, 0,47 mmol) a KH (100 mg, 35% (hmotn.) v minerálním oleji) v 5 ml DMF se přidá methylester p-toluensulfonové kyseliny (0,4 g, 1 mmol). Roztok se míchá 10 minut za teploty místnosti, okyselí se kyselinou šťavelovou v etheru, sraženina se rozpustí ve vodě, zalkalizuje, extrahuje petroletherem a extrakty se zahustí a chromatografují na silikagelu směsí chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 90:10:1. Čisté frakce se spojí a odpaří. Odparek se rozpustí v etheru a vysráží se jako hydrochlorid (85 mg, výtěžek: 72 % hmotn.). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, volná báze, δ): 1,2 (t, J = 6 Hz, 3H), 1,6 až 1,65 (m, 2H), 2,0 až 2,1 (m, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,75 až 2,85 (m, 4H), 2,86 (s, 3H), 3,55 (q, J = 6 Hz, 2H) ppm. ¹H-NMR spektrum (D₂O, hydrochlorid, δ): 1,2 (t, J = 6 Hz, 3H), 2,1 až 2,15 (m, 2H), 2,3 až 2,4 (m, 2H), 2,95 (s, 3H), 3,0 (s, 3H), 3,5 (q, J = 6 Hz, 2H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 225 (M⁺, 18 %), 71 (100 %).

Příklad 26

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(1',3'-diethylhydantoin) AF162

Ke směsi 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoinu (110 mg, 0,6 mmol) a KH (0,2 g, 35% (hmotn.) v minerálním oleji) ve 3 ml DMF se přidá ethylbromid (0,5 g, 4,6 mmol). Roztok se míchá 30 minut za teploty místnosti, zředí se etherem a okyselí se nadbytkem kyseliny šťavelové. Sraženina se rozpustí ve vodě, zalkalizuje, několikrát se extrahuje chloroformem a extrakty se spojí a zahustí a chromatografují na silikagelu gradientem chloroformu a směsí chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 90:10:1. Získá se čistý AF162 (60 mg, výtěžek: 42 % hmotn.). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, volná báze, δ): 1,2 (t, J = 6 Hz, 3H), 1,65 až 1,7 (m, 2H), 1,96 až 2,15 (m, 2H), 2,4 (s, 3H), 2,5 až 2,6 (m, 4H), 3,3 (q, J = 6 Hz, 2H) ppm. ¹H-NMR spektrum (D₂O, hydrochlorid, δ): 1,15 (t, J = 6 Hz, 3H), 2,05 až 2,15 (m, 2H), 2,25 až 2,35 (m, 2H), 2,9 (s, 3H), 3,3 (q, J = 6 Hz, 3H) ppm. ¹³C-NMR spektrum (hydrochlorid, D₂O, δ): 14,0, 28,6, 35,0, 44,0, 52,7, 59,2, 157,0, 177,0 ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 239 (M⁺, 75 %), 71 (100 %).

Příklad 27

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-methylthio-5'-methoxy-4'H-imidazol) AF191

Směs 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(2',5'-dimethylthio-4'H-imidazolu) AF177 (0,700 g, 2,881 mmol) a methoxidu sodného (0,360 g, 6,667 mmol) se zahřívá pod zpětným chladičem v methanolu (15 ml) 3,5 h. Bylo pozorováno uvolňování plynu. Rozpouštědlo se z reakční směsi odpaří. Odparek se extrahuje dichlormethanem. Organický extrakt se odpaří. Získá se pevný

odparek (0,631 g), který se extrahuje horkým petroletherem. Rozpouštědlo se odpaří. Zbytek (0,263 g) krystalizací z petroletheru poskytne čistý AF191, t.t. 84 až 85 °C. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃): 1,40 (m, 2H), 1,97 (m, 2H), 2,36 (s, CH₃N-), 2,52 (s, CH₃S-), 2,53 (m, 2H), 2,70 až 2,80 (m, 2H), 4,10 (s, CH₃O-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃): 13,6 (CH₃S), 32,3 (C₃), 46,2 (CH₃N-), 51,9 (C₂), 57,9 (CH₃O-), 74,2 (C₄), 171,6 (-N=C-SCH₃), 196,0 (-N=C-OCH₃) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 228 (M⁺ + 1).

Příklad 28

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-methylthio-5'-amino-4'H-imidazol) AF192

Roztok AF177 (0,411 g) v reakčním činidle připraveném rozpuštěním amoniaku v methanolu (15 % hmotn.) se míchá 3 dny za teploty místnosti. Reakční směs se odpaří a ke zbytku se přidá čerstvý podíl 15 ml reakčního činidla. Reakce se zopakuje ještě dvakrát. Nakonec se reakční směs odpaří za sníženého tlaku. Pevný zbytek se promyje acetone. Získá se tak AF192 jako bílá pevná látka (0,266 g), t.t. vyšší než 240 °C (rozkl.) (z ethanolu). ¹H-NMR spektrum (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. Hmotnostní spektrum (m/e): 212 (M⁺), 142 (M⁺ - 70), 70).

Příklad 29

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-methylthio-5'-aminomethyl-4'H-imidazol) AF193 a 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(2',5'-bis(aminomethyl)-4'H-imidazol) AF194

Roztok AF177 (0,338 g) ve vodném methylaminu (5,0 ml, 35 %) se zahřívá 2 h pod zpětným chladičem na teplotu 80 °C. Voda a nadbytek reakčního činidla se odstraní odpařením za sníženého tlaku. Odparek se chromatografuje na koloně silikagelu (Merck 60, 0,040 až 0,06 mm). Eluce směsí chloroformu s methanolem a vodným amoniakem v poměru 80:20:1. Získá se tak AF193 jako bílá pevná látka (0,061 g). Krystalizace z acetonitrilu poskytne t.t. 193 až 194 °C. ¹H-NMR spektrum (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. Hmotnostní spektrum (m/e): 226 (M⁺), 179 (M⁺ - CH₃S), 170 (M⁺ - CH₃NHCN), 169, 156 (M⁺ - 70).

Elucí směsí chloroformu s methanolem a vodným amoniakem v poměru 50:50:1 se získá AF194 jako bílá pevná látka (0,130 g). Krystalizace z acetonitrilu poskytne t.t. 113 až 114 °C. ¹H-NMR spektrum (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. Hmotnostní spektrum (m/e): 209 (M⁺), 152, 139 (M⁺ - 70).

Jestliže se zopakuje shora uvedená reakce, ale použijí-li se dva mol methylaminu na každý mol AF177, jako hlavní produkt se získá AF193 s pouze stopami AF194.

Příklad 30

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-methyl-2'-oxazolin) AF150

a) Hydrochlorid 1-methyl-4-nitromethylpiperidin-4-olu

Výchozí materiál se připraví mírně modifikovaným způsobem podle A. D. Caleho, patent US 4 746 655 z roku 1988. Směs N-methylpiperidinu (142 g, 1,28 mol) a nitromethanu (78,1 g, 1,28 mol) se přidá k dobře míchanému roztoku ethoxidu sodného (1,28 g, 20% (hmotn.)) v ethanolu. Směs se přitom udržuje na vnitřní teplotě 5 až 8 °C. Vysráží se bílá pevná látka.

V míchání se pokračuje 20 minut a dalších 40 minut za teploty místnosti. Výsledný roztok se okyselí 500 ml 7,2N HCl v izopropylalkoholu. Hydrochlorid a anorganické soli se extrahují methanolem (3 x 200 ml) a rozpouštědlo se odpaří ve vakuu. Získá se tak titulní sloučenina, t.t. 180 až 182 °C (nehydroskopická). Hmotnostní spektrum (m/z): 174 (M^+ volná báze, 100 %), 157 (M-OH, 20 %), 127 (M-H-NO₂, 25 %), 113 (M-NO₂-CH₃, 40 %).

b) Hydrochlorid 4-aminomethyl-1-methylpiperidin-4-olu

K roztoku 1-methyl-4-nitromethylpiperidin-4-olu (133,5 g) v methanolu (1500 ml) se po částech přidá palladium na uhlí (10% (hmotn.), 4 g). Sloučenina se hydrogenuje v hydrogenačním přístroji podle Paara při tlaku 374 kPa 48 h za teploty místnosti. Roztok se pečlivě zfiltruje, nechá se zreagovat s aktivním uhlím a rozpouštědlo se odstraní. Zbytek se rozetře s ethanolem (200 ml). Získá se tak titulní sloučenina, t.t. 177 až 179 °C. Hmotnostní spektrum (m/z): 144 (M^+ volná báze, 15 %), 127 (M-OH, 25 %), 114 (M-CH₂NH₂, 100 %).

c) 1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-methyl-2'-oxazolin) AF150

Roztok KOH (1,43 g, 86% (hmotn.)) v methanolu (50 ml) se přidá k roztoku hydrochloridu 4-aminomethyl-1-methylpiperidin-4-olu (3,61 g, 0,02 mol) v absolutním methanolu (50 ml). Po 10 minutách míchání se přidá roztok hydrochloridu ethylacetimidátu (2,7 g) ve 20 ml absolutního methanolu a v míchání se pokračuje 30 minut za teploty místnosti. Rozpouštědlo se odstraní. Zbýlá pevná látka se rozpustí v roztoku 2,8 g uhličitanu sodného v 50 ml vody. Potom se zahustí do sucha ve vakuu. Bílá pevná látka se extrahuje 2 x 50 ml chloroformu, zpracuje se s aktivním uhlím, vysuší se síranem sodným a rozpouštědlo se odstraní. Získá se tak titulní produkt (62,5 % hmotn.), t.t. 45 °C (sublimuje při 40 °C/6,7 Pa). Na TLC na silikagelu poskytuje jedinou skvrnu, která se eluuje 2 % (hmotn.) amoniaku v methanolu při R_f 0,4. Hmotnostní spektrum (m/z): 168 (M^+ volné báze, 100 % při 7,5 eV). ¹H-NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃, δ): 3,56 (q, J = 1,5 Hz, 2H), 2,53 (m, 4H), 2,34 (s, 3H), 1,96 (3H, t, J = 1,5 Hz), 1,82 (m, 4H) ppm.

Jestliže se KOH v tomto příkladu nahradí ekvivalentním množstvím NaOH nebo triethylaminu, získají se podobné výsledky.

d) Dibenzoyl-D-vínan AF150

Za míchání se přidá horký roztok dibenzoyl-D-vinné kyseliny (5,4 g, 15 mmol) v 500 ml toluenu k AF150 (5,5 g, 32 mmol) rozpuštěnému ve 200 ml suchého toluenu. Sraženina se nechá usadit a supernatant se dekantuje. Zbývající pevná látka se promyje 3 x 100 ml suchého toluenu a vysuší se za sníženého tlaku. Získá se tak 8,4 g (výtěžek 80 % hmotn.) bílé, mírně hydroskopické pevné látky. TLC na oxidu hlinitém, eluce chloroformem (Merck, položka č. 5581): R_f = 0,4. Hmotnostní spektrum (m/e): 168 (M^+). ¹H-NMR spektrum (300 MHz, D₂O obsahující 1,5 mg uhličitanu sodného na 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 až 8,2 (m, 10H, aromatické protony).

Příklad 31

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-ethyl-2'-oxazolin)(2'-ethylanalog sloučeniny AF150)

Tato sloučenina se připraví podobně jako sloučenina v příkladu 30 až na to, že se použije ekvivalentní množství hydrochloridu ethylpropionimidátu místo hydrochloridu ethylacetimidátu. Takto získaný produkt je kapalina s t.v. 53 °C/4 Pa. Výtěžek 60,5 % hmotn. ¹H-NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃, δ): 3,52 (2H, t, J = 1,5 Hz), 2,47 (4H, m), 2,30 (3H, s), 2,26 [2H, kvartet (J = 7 Hz), triplet (J = 1,5 Hz)], 1,86 (2H, m), 1,72 (2H, m), 1,18 (3H, t).

Příklad 32

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-2'-oxazolin) AF151

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

Směs roztoků 1-methylpiperidin-4-onu (36,44 g, 0,322 mol) v ethanolu (150 ml), uhličitanu amonného (93,0 g, 0,968 mol) ve vodě (400 ml) a KCN (25,8 g, 0,396 mol) ve vodě (82 ml) se zahřívá 2,5 h na 60 °C. Potom se nechá stát za teploty místnosti přes noc. Přitom se oddělí 10 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin, který se odfiltruje a promyje malým množstvím studené vody, ethanolem a etherem. Získá se tak krystalický prášek (27,0 g). Zahuštěním filtrátu a promývacích vod se získá druhý podíl (20,0 g). Produkt se překrystaluje z methanolu, t.t. 265 až 276 °C (rozkł.). IČ spektrum (KBr): 3170 (NH), 1700 (C=O) cm⁻¹. Hmotnostní spektrum (m/z): 183 (M⁺, 38 %), 71 (100 %). ¹H-NMR spektrum (300 MHz, D₂O, δ): 1,8 (2H), 2,06 (sextet, 2H), 15 2,49 (s, -CH₃), 2,58 (t, 2H), 3,14 (t, 1H), 3,20 (t, 1H).

b) 4-Amino-1-methylpiperidin-4-karboxylová kyselina

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-hydantoin (9,75 g, 0,0533 mol) a oktahydrát hydroxidu barnatého 20 (28,8 g, 0,00913 mol) ve vodě (150 ml) se 3 h zahřívají na 160 °C v autoklávu. Obsahy čtyř těchto dávek se spojí a vysrážený uhličitan barnatý se odfiltruje. Filtrát se zneutralizuje pevným oxidem uhličitým a sraženina se odstraní odfiltrováním. Filtrát se zahustí na malý objem. Získá se tak 4-amino-1-methylpiperidin-4-karboxylová kyselina (32,0 g, výtěžek 95 % hmotn.), t.t. 275 až 280 °C (rozkł.). IČ spektrum (KBr): 3300, 1655, 1580 cm⁻¹. Hmotnostní spektrum 25 (m/z): 158 (M⁺, 90 %), 141 (98 %, M-OH), 113 (12 %, M-COOH), 96 (100 %), 71 (52 %). ¹H-NMR spektrum (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-hydroxymethyl-1-methylpiperidin

30 K roztoku práškovatého LiAlH₄ (15,62 g, 0,412 mol) v suchém tetrahydrofuranu (THF) (600 ml), který se 15 minut zahřívá pod zpětným chladičem, se po částech pod dusíkem přidá 4-amino-1-methylpiperidin-4-karboxylová kyselina (31,0 g, 0,196 mol) ve formě suchého prášku. Celá směs se přitom intenzivně míchá. Po přidání se reakční směs zahřívá 4 h pod zpětným 35 chladičem, ochladí se na 0 °C pod dusíkem za intenzivního míchání, pečlivě se zpracuje přidáním vody (20 ml), 15% (hmotn.) vodného NaOH (20 ml) a opět vody (10 ml). Reakční směs se zfiltruje a sraženina se extrahuje vroucím THF (3 x 150 ml). THF filtrát a extrakty se spojí a rozpouštědlo se při 3,3 kPa oddestiluje. Získá se tak žlutý viskózní olej (28,0 g, výtěžek 98,9 % hmotn.). IČ spektrum (čistá látka): 3320 (NH), 3200 (široký signál, OH), 1587 (NH₂), 1468, 40 1448 cm⁻¹. Hmotnostní spektrum (m/z): 144 (M⁺, 15 %), 127 (M-OH), 113 (M-COOH), 96 (100 %), 70 (41 %). ¹H-NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃, δ): 1,41 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 2,24 (s, CH₃N), 2,29 (m, 2H), 2,48 (m, 2H), 2,50 (široký signál, -NH₂), 3,29 (s, -CH₂OH).

d) 1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-2'-oxazolin) AF151

45 Směs 4-amino-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidinu (1,80 g), kyseliny octové (20 ml) a xylenu (20 ml) se 28 h azeotropicky destiluje. Zbývající kyselina octová a xylen se odstraní za sníženého tlaku (3,33 kPa). Zbývající viskózní olej se zalkalizuje na pH 11 vodným roztokem uhličitanu draselného. Extrakcí chloroformem a odpařením extraktu se získá malé množství zbývajících 50 hnědého oleje (0,27 g). Vodný roztok, který zůstal po extrakci chloroformem, se odpařením zbaví vody, zbylá pevná látka se extrahuje chloroformem a extrakt se vysuší síranem sodným. Odpařením se získá velmi hyroskopická pevná látka (3,0 g). TLC ukazuje, že poslední látka je hlavně jednou skvrnou, která je polárnější než výchozí aminoalkohol. Část hyroskopické pevné látky, která taje při 150 až 160 °C, se zahřeje ve vakuu a téměř okamžitě začne destilovat jako bezbarvý

olej při 45 °C/200 Pa. Tento olej v mrazničce vytvoří krystalické jehličky, které tají za teploty místnosti. Destilátem je octan titulní sloučeniny. IČ spektrum (čistá látka): 1664 (–C=N), 1565 a 1398 (–COO[–]), 1256 (C–O) cm^{–1}. Hmotnostní spektrum (m/z): 168 (M⁺ volné báze), 109, 70. ¹H–NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃, δ): 1,77 (m, 2H), 1,96 (m, 2H), 1,98 (s, CH₃–), 2,0 (s, CH₃–), 2,49 (s, CH₃–N–), 2,91 (m, 4H), 3,95 (s, CH₂O–), 9,30 (široký s, –COOH). ¹³C–NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃, δ): 14,0 (CH₃COO–), 22,9 (CH₃C=N–), 35,6 (C₃ a C₅), 44,4 (CH₃N⁺), 51,1 (C₂ a C₆), 67,0 (C₄), 77,4 (C₅), 164,3 (C=N), 176,7 (–COO–). ¹H–NMR spektrum volné báze (300 MHz, CDCl₃, δ): 1,64 (m, 2H), 1,84 (m, 2H), 1,98 (s, CH₃–), 2,26 (m, 2H), 2,30 (s, CH₃–), 2,69 (m, 2H), 3,94 (s, –CH₂–).

Příklad 33

1–Methylpiperidin–4–spiro–5'–(2'–ethyl–2'–oxazolin) (2'–ethylanalog sloučeniny AF151)

Směs 4–amino–4–hydroxymethyl–1–methylpiperidinu (3,0 g) s kyselinou propionovou (50 ml) a xylenem (90 ml) se azeotropicky destiluje 5 h. Odparek (7 ml) se zalkalizuje vodným uhlíčitěm draselným na pH 11 až 12. Extrakcí chloroformem a odpařením extraktu se získají nepolární sloučeniny (0,80 g). Vodný roztok, který zůstane po extrakci chloroformem, se odpařením zbaví vody, výsledná pevná látka se extrahuje chloroformem a extrakt se vysuší síranem sodným. Odpařením se získá hydroskopická pevná látka (3,6 g). TLC ukazuje, že poslední sloučenina je hlavně jedinou skvrnou, která je polárnější než výchozí aminoalkohol (silikagel, směs methanolu s chloroformem a vodným amoniakem v poměru 40:58:2). Část hydroskopické pevné látky (1,5 g) se zahřeje ve vakuu a téměř okamžitě začne destilovat jako viskózní bezbarvý olej při 50 °C/13 Pa. Destilátem je propionát titulní sloučeniny. Hmotnostní spektrum (m/z): 182 (M⁺ volné báze, 14 %), 167 (5 %), 154 (71 %), 125 (9 %), 109 (100 %), 96 (45 %), 81 (30 %), 74 (57 %), 70 (89 %), 57 (64 %). ¹H–NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃, δ): 1,12 (t, J = 7,5 Hz, CHCH₂–), 1,17 (t, J = 7,6 Hz, CH₃CH₂–), 1,75 (m, 2H), 2,00 (m, 2H), 2,99 (q, J = 7,5, CH₃CH₂–), 2,30 (q, J = 7,6, CH₃CH₂–), 2,56 (s, CH₃–N–), 3,02 (m, 2 –CH₂–), 3,95 (s, –CH₂O–), 7,52 (široký signál, –COOH).

K míchanému roztoku shora uvedené propionátové soli (700 mg) v chloroformu se přidává nasycený vodný roztok uhlíčitanu draselného dokud se nezastaví uvolňování oxidu uhlíčitěho. Směs se pak míchá 0,5 h a fáze se oddělí. Vodná fáze se extrahuje chloroformem, spojené oddělené chloroformové fáze a extrakty se vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se oddestiluje. Získá se tak titulní sloučenina (volná báze) jako bezbarvý olej (550 mg), který má na TLC jedinou skvrnu. ¹H–NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃, δ): 1,17 (t, J = 7,6 Hz, CH₃CH₂–), 1,61 (m, –CH₂–), 1,86 (m, –CH₂–), 2,18 (m, –CH₂–), 2,29 (q, J = 7,6, CH₃CH₂–), 2,30 (s, CH₃N–), 2,71 (m, –CH₂–), 3,94 (s, –CH₂O–). Hmotnostní spektrum (m/z): 182 (M⁺, 25 %), 167 (9 %), 154 (78 %), 125 (17 %), 109 (100 %), 96 (65 %), 81 (54 %), 70 (96 %), 57 (77 %).

Jiná cesta vedoucí ke sloučeninám, jako jsou AF150 a AF151, spočívá v cyklodehydrataci příslušných amidů. Pro shora uvedené reakce se mohou použít dehydratační činidla, jako je P₂O₅, kyselina sírová, BF₃–etherát, chlorid vápenatý a molekulová síta. Analogickými reakcemi s P₂S₅ lze získat odpovídající thiazoliny místo oxazolinů.

Příklad 34

1–Methylpiperidin–4–spiro–5'–(2'–methyl–2'–thiazolin)AF150(S)

a) 4–Acetamidomethyl–4–hydroxy–1–methylpiperidin

4-Aminomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidin (0,83 g, 5,7 mol) se rozpustí v 10 ml chloroformu. Přidá se anhydrid kyseliny octové (0,58 g, 5,7 mmol). Reakční směs se spontánně ohřeje na 40 až 50 °C. Po 30 minutách se rozpouštědlo odpaří a surový odparek se chromatografuje na koloně silikagelu (Merck 7734), eluce směsí 2% (hmotn.) vodného amoniaku s methanolem v poměru 33:67. Hmotnostní spektrum (m/z): 186 (M^+). ^1H -NMR spektrum (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1,60 (m, 4H, H3 a H4), 2,01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 2,29 (s, 3H, CH_3N), 2,38 (m, 2H, H1), 2,55 (m, 2H, H2), 2,98 (m, 1H, NH), 3,26 (d, 2H, H5) ppm. ^1H -NMR spektrum (300 MHz, D_2O , δ): 1,42 (m, 4H, H3 a H4), 1,81 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 2,08 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 2,27 (m, 2H, H1), 2,46 (m, 2H, H2), 3,03 (s, 2H, H) ppm. Nečistoty poskytují maximum při 3,44 ppm.

b) 1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-2'-thiazolin) AF150(S)

Směs 4-acetamidomethyl-4-hydroxy-1-methylpiperidinu (6,5 g, 35 mmol) s P_2S_5 (10 g, 22 mol) se zahřívá 30 minut na 220 °C. Potom se ochladí a rozpustí se ve 30 ml koncentrované vodné HCl. Tento roztok se smíchá se 100 ml studeného koncentrovaného vodného NaOH, extrahuje se 2 x 100 ml chloroformu a spojené extrakty se vysuší a odpaří. Získá se tak 5 g černého olejovitého odparku, který se přechistí destilací při 75 °C/133 Pa. Výtěžek byl 1,8 g jasné kapaliny. Hmotnostní spektrum (m/z): 184 (M^+). ^1H -NMR spektrum (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1,8 až 2,0 (m, 4H), 2,17 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 2,2 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 3,9 (q, 2H, $\text{CH}_2\text{-thiazolinový kruh}$).

Příklad 35

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thion-3'-ethylhydantoin) AF181

K roztoku 4-amino-1-methylpiperidin-4-karboxylové kyseliny (91,78 g, 0,0113 mol) a NaOH (0,47 g, 0,0118 mol) ve vodě (3,0 ml) se přidá ethyl-izothiokyanát (1,00 g, 0,0111 mol). Směs se zahřívá 6,5 h pod zpětným chladičem. Reakční směs se okyselí koncentrovanou HCl na pH 1 a v zahřívání pod zpětným chladičem se pokračuje po dobu 1,5 h. Stáním za teploty místnosti z reakční směsi vypadává pevná látka (0,61 g), která překrystalováním z methanolu poskytne krystaly (83 mg) s t.t. vyšší než 260 °C. ^1H -NMR spektrum této pevné látky ukazuje, že jde o hydrochlorid sloučeniny AF181. ^1H -NMR spektrum (D_2O , δ): 1,16 (t, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}$), 2,0 až 2,4 (m, 4H), 2,94 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 3,20 (m, 1H), 3,4 až 3,74 (m, 3H), 3,80 (q, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}$) ppm.

Matečné louhy po izolaci a krystalizaci shora uvedené soli byly spojeny, zalkalizovány koncentrovaným vodným roztokem NaOH na pH 13 a extrahovány dichlormethanem. Extrakt se vysuší uhličitánem sodným a odpaří. Získá se tak nažloutlá pevná látka, která se chromatografuje na koloně silikagelu (Merck 60, 0,04 až 0,06 mm). Elucí směsí chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 96:3:1 se získá nejdříve 1,3-diethyl-2-thiomocovina (0,287 g), t.t. 76 až 78 °C (krystaly z etheru) a potom 8-methyl-3-ethyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]dekan-4-en-2-thion (AF181) (135 mg) jako volná báze. Překrystalováním ze směsi etheru s dichlormethanem se získají jehličky s t.t. 180 °C. ^1H -NMR spektrum (CDCl_3 , δ): 1,24 (t, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}$), 1,69 (m, 2H), 2,05 až 2,30 (m, 4H), 2,35 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,90 (m, 2H), 3,87 (q, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}$) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 227 (M^+), 71, 70.

Příklad 36

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thion-3'-terc.butylhydantoin) AF184

Směs 4-amino-1-methylpiperidin-4-karboxylové kyseliny (1,80 g, 0,0114 mol) a terc.butyl-izothiokyanatanu (1,00 g, 0,0087 mol) ve vodě (3,0 ml) se zahřívá 5 h na 80 °C. Jakmile je reakce podle TLC ukončena, přidá se ethanol (4,0 ml) a reakční směs se zahřívá další 1 h pod

zpětným chladičem. Koncentrovanou HCl se okyselí na pH 1 a v zahřívání pod zpětným chladičem se pokračuje další 1 h. Stáním přes noc za teploty místnosti vypadne sraženina, která se odfiltruje. Získá se tak výchozí aminokyselina (0,60 g). Matečné louhy se odpaří. Odparek se zalkalizuje koncentrovaným vodným roztokem NaOH a extrahuje se dichlormethanem. Organický extrakt se vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se odstraní. Získá se krystalická pevná látka (0,101 g) jako jehličky (ze směsi ether–dichlormethan), t.t. 200 až 201 °C. ¹H–NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,63 (m, 2H), 1,81 [s, (CH₃)₃C–], 2,00 až 2,21 (m, 4H), 2,33 (s, CH₃N–), 2,87 (m, 2H), 7,82 (široký s, –NH–) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 255 (M⁺), 199 (M⁺ – C₄H₈), 96, 71, 70, 57.

Příklad 37

1–Methylpiperidin–4–spiro–5'–(3'–terc.butylhydantoin) AF213

Titulní sloučenina se syntetizuje podobným způsobem jako sloučenina AF181. Produkt byl získán jako hydrochlorid 1–methylpiperidin–4–spiro–5'–(3'–terc.butylhydantoinu), t.t. 300 až 303 °C (rozkl.) po krystalizaci z methanolu. ¹H–NMR spektrum (D₂O, δ): 1,55 [s, (CH₃)₃C–], 2,01 (m, 2H), 2,22 (m, 2H), 2,92 (s, CH₃N–), 2,97 až 3,5 (m, 2H), 3,62 (m, 2H) ppm.

Volná báze byla krystalována ze směsi etheru s dichlormethanem a měla t.t. 221 až 223 °C. ¹H–NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,57 (m, 2H), 1,60 [s, (CH₃)₃C–], 2,01 až 2,18 (m, 4H), 2,31 (s, CH₃N–), 2,88 (m, 2H), 4,77 (široký s, –NH–) ppm. ¹³C–NMR spektrum (CDCl₃, δ): 28,6 [(CH₃)₃C–], 33,5 (C6 a C10), 46,2 (CH₃N–), 51,0 (C7 a C9), 57,5 a 58,1 [C5 a (CH₃)₃C–], 158,4 (C2), 177,4 (C4) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 239 (M⁺), 237, 224 (M⁺ – CH₃), 194, 181, 155, 110, 104, 71, 56, 43.

Příklad 38

1–Propargylpiperidin–4–spiro–5'–(3'–ethylhydantoin) AF196

Směs piperidin–4–spiro–5'–(3'–ethylhydantoinu) (AF160)DES (40,9 mg, 0,21 mmol) a propargylbromidu (24,7 mg, 0,21 mmol, 80% (hmotn.) v toluenu) se míchá 24 h v methanolu (1,0 ml) při 25 °C. Methanol se odstraní proudem dusíku a výsledná hmota se zalkalizuje vodným uhličitánem sodným. Produkt se extrahuje chloroformem, chloroformové extrakty se odpaří a odparek se vyčistí na preparativních deskách silikagelu, eluce směsí chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 90:10:1. Nadbytečná kyselina šťavelová se vysráží. Získá se 29 mg krystalické pevné látky. ¹H–NMR spektrum (D₂O, sůl kyseliny šťavelové, δ): 1,12 (t, 3H, J = 6 Hz, CH₃CH₂–), 2,1 až 2,35 (m, 6H), 3,12 (t, 1H, J = 3,5 Hz), 3,5 (q, J = 6 Hz, CH₃CH₂–), 3,7 až 3,85 (m, 2H), 4,12 (d, J = 3,5 Hz) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 235 (M⁺), 196 (M⁺ – C₃H₃), 95, 80, 67, 56.

Příklad 39

1–Methylpiperidin–4–spiro–5'–[3'–(4–pyrrolidino–2–butinyl)hydantoin] AF197

Směs 1–methylpiperidin–4–spiro–5'–(3'–propargylhydantoinu) (AF185) (204 mg, 0,92 mmol), pyrrolidinu (88 mg, 1,23 mmol), paraformaldehydu (52 mg, 1,7 mmol) a octanu měďnatého (4,2 mg) se míchá 70 h v dioxanu (10 ml) za teploty místnosti. Proudem dusíku se odstraní nadbytečný dioxan, výsledná hmota se zalkalizuje vodným uhličitánem draselným a extrahuje se chloroformem. Chloroformové extrakty se odpaří a 50 % hmotnosti zbytku se přečistí na preparativních deskách silikagelu, eluce směsí chloroform:methanol:ether:vodný amoniak v poměru

150:20:100:6. Dvojí krystalizací z etheru se získá krystalická pevná látka (25 mg). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, volná báze, δ): 1,12 (m), 2,1 až 2,2 (m), 2,35 (s, 3H), 2,6 (m), 2,9 až 2,95 (m), 3,4 (t, 2H, J = 3,5 Hz), 4,15 (t, 2H, J = 3,5 Hz), 5,9 (široký s, 1H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 304 (M⁺), 234 (M⁺ - C₄H₈N), 71 (C₄H₉N⁺).

5

Příklad 40

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-oxazolidin-3'-on) AF260

10

Směs 1-methyl-4-piperidonu (5,0 g, 44,2 mmol), ethyl-(s)-laktátu (5,75 g, 48,8 mmol), uhličitanu amonného (6,38 g) a p-toluensulfonové kyseliny (2,1 g) v toluenu (100 ml) se zataví do tlakové nádoby z nerezavějící oceli a zahřívá se 24 h na 107 °C za míchání. Z reakční směsi se oddestiluje toluen a zbytek se chromatografuje na koloně silikagelu (Merck 60). Eluce směsí chloroform:methanol:amoniak v poměru 92:7:1 poskytne frakci (1,01 g), která se dále dělí chromatografií na koloně silikagelu. Elucí směsí chloroform:ether:methanol:hydroxid amonný v poměru 54:37:7:2 se získá surový produkt (0,441 g), který se překrystaluje ze směsi etheru s petroletherem a potom z toluenu. Získá se tak 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-oxazolidin-3'-on) (AF260) jako jehličky (85 mg) s t.t. 148 až 150 °C. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,42 (d, J = 6,6 Hz, CH₃CH-), 1,85 (m, 4H), 2,31 (s, CH₃N-), 2,52 (m, 4H), 4,40 (q, J = 6,6 Hz, CH₃CH-), 7,64 (široký s, -NH-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 184 (M⁺), 156, 126, 114, 84, 71, 70, 43 (100 %).

15

20

25

Příklad 41 a 42

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-on) AF261 a 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dimethyl-1',4'-thiazolidin-3'-on) AF266

30

a) Směs 1-methyl-4-piperidonu (5,65 g, 0,050 mol), thiomléčné kyseliny (6,37 g, 0,060 mol) a uhličitanu amonného (7,20 g) v benzenu (150 ml) se zahřívá 16 h pod zpětným chladičem, přičemž pevná látka (uhličitan amonný) sublimuje v reakční nádobě. Čas od času se tato pevná látka opět přidá do reakční baňky společně s další částí nového uhličitanu amonného (celkem 6,2 g). Nakonec se benzen oddestiluje a zbytek se promyje etherem. Získá se v etheru rozpustný materiál (0,76 g) a v etheru nerozpustný materiál (12,9 g), který se rozpustí v malém množství methanolu a zalkalizuje se roztokem amoniaku v methanolu. Odpaří se zchromatografuje se na koloně silikagelu (Merck 60). Elucí směsí chloroform:methanol:amoniak v poměru 89:10:1 se získá frakce (0,61 g), která byla identifikována jako 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dimethyl-1',4'-thiazolidin-3'-on) AF266. Tato sloučenina je nízkotající hydroskopickou látkou. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,53 (d, J = 7 Hz, CH₃CH-), 1,69 (m, 2H), 2,16 až 2,44 (m, 4H), 2,32 (s, CH₃N-), 2,87 (m, 2H), 2,90 (s, CH₃NCO-), 3,79 (q, J = 7 Hz, CH₃CH-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 19,7 (CH₃CH-), 27,2 (CH₃NCO-), 36,0 a 37,3 (C6 a C10), 39,7 (C2), 45,3 (CH₃N-), 51,8 a 52,2 (C7 a C9), 68,5 (C5) a 172,8 (C3) ppm.

35

40

45

Hydrochlorid sloučeniny AF266 se získá tak, že se roztok volné báze v etheru nechá zreagovat s roztokem HCl v izopropylalkoholu. Získá se hydroskopická pevná látka, která krystaluje z izopropanolu, t.t. 238 až 140 °C (rozkl.). ¹H-NMR spektrum (D₂O, hydrochlorid, δ): 1,48 (d, J = 7,2 Hz, CH₃CH-), 2,05 (m, 2H), 2,57 (m, 2H), 2,89 a 2,91 (2s, CH₃N⁺ a CH₃NCO-), 3,31 (m, 2H), 3,61 (m, 2H), 4,04 (q, J = 7,2 Hz, CH₃CH-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 214 (M⁺), 181, 156, 125, 124, 96, 71, 70, 57 (100 %), 43.

50

Pokračováním eluce kolony směsí chloroform:methanol:amoniak v poměru 85:14:1 se získá frakce (3,50 g), která krystaluje ze směsi etheru s dichlormethanem. Získá se tak 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-on) AF261 jako jehličky (1,83 g) s t.t. 133 až

134 °C. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,53 (d, J = 7 Hz, CH₃CH-), 1,9 až 2,20 (m, 4H), 2,20 až 2,42 (m, 2H), 2,30 (s, CH₃N-), 2,68 (m, 2H), 3,85 (q, J = 7 Hz, CH₃CH-), 6,90 (široký s, -NH-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 19,9 (CH₃CH-), 41,0 a 41,3 (C6 a C10), 41,3 (C2), 45,7 (CH₃N-), 52,5 a 52,8 (C7 a C9), 63,6 (C5) a 176,3 (C3) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 200 (M⁺), 167, 140 (M⁺-CH₃CHS-), 91, 71, 70, 69, 57.

Hydrochlorid sloučeniny AF261 se získá tak, že se roztok volné báze v etheru nechá zreagovat s roztokem HCl v izopropylalkoholu. T.t. 285 až 287 °C. ¹H-NMR spektrum (D₂O, hydrochlorid, δ): 1,50 (d, J = 7,2 Hz, CH₃CH-), 2,17 až 2,44 (m, 4H), 2,89 (s, CH₃N-), 3,24 (m, 2H), 3,59 (m, 2H), 4,10 (q, J = 7,1 Hz, CH₃CH-) ppm.

b) Směs 1-methyl-4-piperidonu (5,65 g, 0,050 mol), thiomléčné kyseliny (6,37 g, 0,060 mol) a uhličitany amonného (7,20 g) v benzenu (100 ml) se zataví do tlakové nádoby z nerezavějící oceli a zahřívá se přes noc na 95 °C s magnetickým mícháním. Rozpouštědlo se z reakční směsi odstraní a zbytek se rozpustí v malém množství methanolu. Naplní se na suchou kolonu se silikagelem (Merck 60, 200 g). Eluce směsí chloroformu s methanolem a vodným amoniakem v poměru 94:5:1 poskytne nejdříve AF266 (0,71 g) a potom AF261 (3,02 g).

c) Směs 1-methyl-4-piperidonu (2,50 g, 22,1 mmol), thiomléčné kyseliny (2,81 g, 26,5 mmol) a methylaminu (0,90 g, 29,0 mmol) v toluenu (60 ml) se zataví do tlakové nádoby z nerezavějící oceli a zahřívá se 24 h na 96 °C za míchání. Reakční směs je viskózní olej, z něhož se oddělí sraženina a roztok toluenu. Roztok se oddělí. Rozpouštědlo se oddestiluje. Zbytek (1,68 g) se předestiluje za sníženého tlaku. Získá se tak čistý 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2',4'-dimethyl-1',4'-thiazolidin-3'-on) AF266, t.v. 100 °C (47 Pa), jako pevná látka (1,02 g) má t.t. 43 až 45 °C.

Příklad 43 až 44

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-ethyl-1',4'-thiazolidin-3'-on) AF267 a 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-ethyl-4-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-on) AF272

Titulní sloučenina AF267 se připraví tak, jak je to popsáno při přípravě sloučeniny AF261 s tím, že se místo 2-merkaptopropionové kyseliny (thiomléčné) použije 2-merkaptomáselná kyselina. Po krystalizaci z acetonu má t.t. 140 až 141 °C. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,02 (t, J = 7,2 Hz, CH₃CH₂-), 1,75 a 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 (široký s, -NH-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 11,4 (CH₃CH₂-), 27,1 (CH₃CH₂-), 41,5 (C6 a C10), 45,8 (CH₃N-), 49,0 (C2), 52,7 a 52,9 (C7 a C9), 63,7 (C5) a 175,5 (C3) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 214 (M⁺), 181, 140, 71, 57.

Hydrochlorid sloučeniny AF267 má t.t. 267 až 269 °C (rozkl.). Jako vedlejší produkt byl získán 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-ethyl-4'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-on) AF272 jako viskózní olej. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,00 (d, J = 7,4 Hz, CH₃CH-), 1,67 (m, 2H), 1,58 až 1,78 (m) a 2,13 (m) (CH₃CH₂-), 2,20 až 2,42 (m, 4H), 2,32 (s, CH₃N), 2,89 (s, CH₃NCO-), 2,90 (m, 2H), 3,76 (dd, J₁ = 3,6 Hz, J₂ = 9,0 Hz, CH₃CH₂CH-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 228 (M⁺), 195, 170, 138, 125, 96, 71, 70, 57.

Příklad 45

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(1'-sulfoxy-4'-aza-2'-methyl-3'-on) AF262

Směs 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-onu) (AF261) (48,4 mg, 0,24 mol) ve 2,0 ml kyseliny octové a 0,5 ml peroxidu vodíku (32% (hmotn.)) se míchá 20 minut při 25 °C. Reakční směs se okyselí přidáním nadbytku HCl a zředí se 20 ml směsí petroletheru s etherem v poměru 4:1. Sraženina se rozpustí ve vodném uhličitanu sodném a roztok se extrahuje chloroformem. Chloroformový extrakt se vysuší, odpaří a výsledná hmota se zchromatografuje na preparativní desce silikagelu směsí chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 80:20:1. Získá se 3,3 mg oleje, který vysrážením z etheru kyselinou šťavelovou poskytl jeden izomer (o čistotě vyšší než 90 %) ve formě krystalické pevné látky. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, volná báze, δ): 1,52 (d, 3H, J = 6 Hz, CH₃CH-), 1,85 až 2,7 (m, 8H), 2,36 (s, 3H, CH₃N-), 3,55 (q, J = 6 Hz, CH₃CH-), 7,0 (široký s, 1H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 216 (M⁺), 199, 167, 149, 125, 111.

Příklad 46

15

Piperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-on)AF263

Směs 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-onu) (AF261) (250 mg, 1,25 mmol) a α-chlorethylchlorformiátu (0,15 ml, 1,4 mmol) se zahřívá v 5 ml dichlorethanu 90 minut na 60 °C. Dichlorethan se odstraní proudem dusíku. Olejovitý zbytek se rozpustí v methanolu a zahřívá se 1 h na 60 °C. Methanol se odpaří, odparek se rozpustí ve vodném uhličitanu sodném, extrahuje chloroformem a rozdělí na preparativní desce silikagelu, eluce směsí chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 80:20:1. Získá se tak 20 mg volné báze, která se vysráží jako krystalická sůl s kyselinou šťavelovou. ¹H-NMR spektrum (D₂O, oxalát, δ): 1,51 (d, 3H, J = 6 Hz, CH₃CH-), 2,2 až 2,35 (m, 4H), 3,1 až 3,6 (m, 4H), 4,1 (q, J = 6 Hz, CH₃CH-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 186 (M⁺), 153, 126, 57.

Příklad 47

30

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-methyl-1',4'-oxathiolan-2'-on) AF265

Roztok 1-methylpiperidonu (11,3 g, 0,1 mol), thiomléčné kyseliny (15 ml) a kyseliny p-toluensulfonové v acetonitrilu se vaří 24 h pod zpětným chladičem. Následuje TLC (silikagel, 20% methanol v chloroformu). Potom se rozpouštědlo odpaří, zbytek se rozpustí v chloroformu a promyje se roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou. Organická fáze se vysuší síranem sodným a odpaří. Produkt se vyčistí na koloně silikagelu (Merck 60). Eluce směsí chloroform:methanol:amoniak poskytne 10,27 g oleje, který zkrystaluje stáním za teploty místnosti. Byl identifikován jako 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-methyl-1',4'-oxathiolan-2'-on) (AF265), t.t. 92 °C. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 11,6 (d, 3H), 1,98 až 2,12 (m, 2H), 2,13 až 2,3 (m, 2H), 2,34 až 2,55 (m, 2H), 2,55 až 2,72 (m, 2H), 2,30 (s, 2H), 4,06 (q, 1H) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 18 (CH₃CH, q), 39 (C6 a C10, t), 40 (CH₃CH, d), 45,5 (CH₃-N, q), 51,8 a 52 (C7 a C9, 2t), 87 (C5, s) a 175 (C=O) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 201 (M⁺).

Sloučenina AF265 (volná báze) se rozpustí v acetonu a přidá se kyselina šťavelová (jeden mol na dva mol vodné báze). Během několika vteřin se vysráží bílá pevná látka. Odfiltruje se, promyje acetonem, chloroformem a etherem a vysuší se v exsikátoru. Byla identifikována jako oxalát sloučeniny AF265. Stabilita této soli je stále ještě zkoumána. Částečně se rozkládá ve vodě, možná hydrolyzou laktonu. V ¹³C-NMR spektru je možné vidět signály produktu získaného otevřením kruhu v D₂O po alespoň 3 h násobného skanování. V ¹H-NMR spektru změřeném bezprostředně po rozpuštění je viditelná pouze spirosloučenina. Bylo zjištěno, že roztok AF265 ve vodě po jednom týdnu vykazuje otevření kruhu z jedné třetiny. T.t. 120 °C. ¹H-NMR spektrum (D₂O, δ): 1,55 (d, 3H), 2,3 až 2,6 (m, 4H), 2,9 (s, 3H), 3,2 až 3,4 (m, 2H), 3,4 až 3,7 (m, 2H),

4,4 (q, 1H) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (D_2O , δ): 17,5 (CH_3CH), 36 a 36,5 (C_6 a C_{10}), 41,5 (CH_3CH), 43 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 51 (C_7 a C_9), 84 (C_5) a 167 (C=O kyseliny šťavelové) ppm.

5 Příklad 48

Piperidin-4-spiro-5'-(3'-methyl-1',4'-oxathiolan-2'-on) AF269

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-methyl-1',4'-oxathiolan-2'-on) (AF265) (80 mg) se rozpustí v benzenu a roztok se odpaří do sucha, aby se zajistilo, že roztok neobsahuje žádnou vlhkost. Dichlormethan se odstraní vysušením na molekulovém sítu (asi 4 ml) pod dusíkem. Přidá se 1-chlorethylchlorformiát (56 mg). Reakční směs se zahřívá 1 h na 100 °C, odpaří, přidá se chloroform a bílá pevná látka se odfiltruje, promyje chloroformem a tetrachlormethanem, vysuší a produkt se identifikuje jako hydrochlorid piperidin-4-spiro-5'-(3'-methyl-1',4'-oxathiolan-2'-onu) (AF269), ^1H -NMR spektrum (D_2O , δ): 1,55 (d, CH_3CH), 2,25 až 2,55 (m, 4H), 3,3 až 4,32 (m, 4H), 4,4 (q, CH_3CH) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 187 (M^+).

Příklad 49

20

1-Methylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-methyl-1',3'-oxazolidin) AF264

Směs 1-methyl-4-piperidonu (11,30 g, 0,10 mol) a DL-1-amino-2-propanolu (9,75 g, 0,13 mol) se zahřívá 1,5 g pod zpětným chladičem. Reakční směs se oddestiluje za sníženého tlaku. Po odstranění frakce, která destiluje při 30 až 110 °C (2,40 kPa) a obsahuje vodu, nadbytek aminoalkoholu a produkt, destiluje při 110 až 115 °C (2,4 kPa) čistý produkt, 1-methylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-methyl-1',3'-oxazolidin) (AF264) (10,70 g). ^1H -NMR spektrum (CDCl_3 , δ): 1,22 (d, $J = 6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CHO-}$), 1,75 (m, 4H), 2,30 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,49 (m, 4H), 2,70 (dd) a 3,27 (dd) ($J_1 = 6,6$ Hz, $J_2 = 12$ Hz, $\text{CH}_2\text{NH-}$), 4,04 (m, $J_1 = 6,6$ Hz, $J_2 = 6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CHO-}$) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (CDCl_3 , δ): 20,3 ($\text{CH}_3\text{CHO-}$), 35,3 a 36,7 (C_6 a C_{10}), 45,5 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 5 1,7 ($-\text{CH}_2\text{NH-}$), 52,8 (C_7 a C_9), 71,8 ($\text{CH}_3\text{CHO-}$), 93,3 (C_5) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 170 (M^+), 169 ($\text{M}^+ - 1$), 123, 112, 85, 83 (100 %), 71, 70, 58.

35 Příklad 50

1-Methylpiperidin-4-spiro-2'-(4'-ethyl-1',3'-oxazolidin) AF268

Směs 1-methyl-4-piperidonu (5,65 g, 0,05 mol) a DL-2-amino-1-butanolu (6,24g, 0,07 mol) se zahřívá 3 h pod zpětným chladičem. Reakční směs se oddestiluje za sníženého tlaku. Po odstranění frakce, která destiluje při 30 až 128 °C (2,50 kPa, 5,65 g) a obsahuje hlavně produkt a menší množství vody a reakčních složek, destiluje při 129 až 130 °C (2,5 kPa) čistý produkt (4,5 g), 1-methylpiperidin-4-spiro-2'-(4'-ethyl-1',3'-oxazolidin) (AF268). ^1H -NMR spektrum (CDCl_3 , δ): 0,97 (t, $J = 7,5$ Hz, CH_3CH_2-), 1,45 a 1,69 (m, CH_3CH_2-), 1,70 až 1,89 (m, 4H), 2,30 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,32 až 2,62 (m, 4H), 3,25 a 3,96 (m, $-\text{CH}_2\text{O-}$), 3,29 (m, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_3$) ppm. ^{13}C -NMR spektrum (CDCl_3 , δ): 10,7 (CH_3CH_2-), 26,1 (CH_3CH_2-), 34,9 a 36,3 (C_6 a C_{10}), 45,3 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 52,5 a 52,7 (C_7 a C_9), 58,5 (C_3), 69,5 (C_2) a 93,1 (C_5) ppm.

50 Příklad 51

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(3'-ethyl-1',4'-oxathiolan-2'-on) (AF271)

Roztok 1-methylpiperidonu (1,921 g, 0,017 mol), 2-merkaptomáselné kyseliny 2 g, 0,0167 mol) a kyseliny p-toluensulfonové (300 mg) v acetonitrilu se zahřívá 36 h pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo se pak odpaří, zbytek se rozpustí v methanolu a produkt se chromatografuje na koloně silikagelu, eluce směsí chloroform:methanol:amoniak v poměru 97:2,5:0,5. Produkt byl dále přečištěn na koloně silikagelu, eluce směsí chloroform:methanol (95:5). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,0 (t, CH₃CH₂), 2,6 (m, 3H), 2,1 (m, 1H, CH₃CH₂), 2,25 a 2,4 (m, 4H), 2,3 (s, 3H), 2,8 až 2,95 (m, 2H), 3,75 (dd, CH₂CH) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 215 (M⁺).

10 Příklad 52

Syntéza piperidin-4-spiro-5'-(3'-propargylhydantoinu) (AF186)

Sloučenina AF185 se demethyluje podle postupu vyvinutého pro AF160(Des) (viz příklad 3). Produkt se vyčistí chromatografií na koloně silikagelu, eluce směsí chloroform:methanol:amoniak v poměru 80:19:1. Volná báze se vysráží jako nehydrokopický hydrochlorid. ¹H-NMR spektrum (D₂O, hydrochlorid, δ): 2,0 až 2,15 (m, 2H), 2,2 až 2,35 (m, 2H), 2,68 (t, 1H, J = 3,5 Hz), 2,91 (s, CH₃N-), 3,25 až 3,35 (m, 2H), 3,55 až 3,65 (m, 2H), 4,3 (d, 2H, J = 3,5 Hz) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 207 (M⁺, základní maximum), 179, 151, 113.

20

Příklad 53

Syntéza 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-[3'-(2-butinyl)hydantoinu] (AF199)

Sloučenina AF199 se syntetizuje podle postupu vyvinutého pro AF185 (viz příklad 50). Produkt se vyčistí chromatografií na sloupci silikagelu, eluce směsí chloroform:methanol:amoniak v poměru 80:90:1. Volná báze se vysráží jako nehydrokopický hydrochlorid. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, volná báze): 1,65 až 1,8 (m, 2H), 1,78 (t, 3H, J = 1,7 Hz), 1,9 až 2,25 (m, 4H), 2,33 (s, CH₃N-), 2,8 až 2,95 (m, 2H), 4,22 (q, 2H, J = 1,7 Hz), 6,7 (široký s, 1H) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 235 (M⁺), 165, 154, 71 (základní maximum).

30

Příklad 54

35

1-Methyl-piperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-on) AF261 a jeho optické izomery (+)AF261 a (-)AF261

Sloučenina AF261 jako volná báze (3,23 g, 16 mmol) a di-p-toluoyl-D-vinná kyselina (5,8 g, 15 mmol) se umístí do 250ml baňky, přidá se izoamylalkohol (28 g) a toluen (130 g) a směs se zahřívá 5 minut pod zpětným chladičem. Jasný roztok se částečně odpařuje pod zpětným chladičem proudem dusíku dokud se nevytvoří nepatrné zakalení. Potom se nechá stát přes noc. Výsledná sraženina se odfiltruje a překrystaluje se několikrát ze směsi izoamylalkoholu s toluenem, dokud se nedosáhne enantiomerní čistota nad 98 % (podle GC a NMR). Pevný produkt se zalkalizuje a vysráží se jako hydrochlorid. Výtěžek 207 mg bílé nehydrokopické pevné látky, $[\alpha]^{25}_D = -54,8^\circ$ (hydrochlorid v methanolu).

45

Matečné louhy se odpaří, zalkalizují a nechají se zreagovat s di-p-toluoyl-L-vinnou kyselinou. Čtyřikrát se překrystalují, dokud se nedosáhne enantiomerní čistoty nad 98 % (podle GC a NMR). Pevný produkt se zalkalizuje a vysráží jako hydrochlorid. Výtěžek 207 mg bílé nehydrokopické pevné látky, $[\alpha]^{25}_D = +55,7^\circ$ (hydrochlorid v methanolu).

50

Optická čistota byla stanovena NMR spektroskopií pomocí (R)-(-)-2,2,2-trifluor-1(9-anthryl)-ethanolu jako štěpícího činidla. 7,5 mg tohoto činidla s 2,5 mg každého enantiomeru v hexa-

deuterobenzeny ukazuje na přítomnost jediného enantiomeru. NMR spektrum hydrochloridu bylo identické se spektrem ($\pm$)AF261.

- 5 Čistota každého enantiomeru byla stanovena GC kapilární kolonou Chrompack XE-60-S-Val-S- α -PEA, WCOT tavený oxid křemičitý, 50 m, vnitřní průměr 0,26 mm, vnější průměr 0,35 mm, průtok 0,9 ml dusíku, teplota pece 175 °C, retenční doba 64 a 65 minut. NMR spektrum hydrochloridu bylo identické se spektrem sloučeniny ($\pm$)AF269.

10 Příklad 55

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-ethyl-1',4'-thiazolidin-3-on) AF267 a jeho optické izomery (+)AF267 a (-)AF267

- 15 Sloučenina AF267 jako volná báze a di-p-toluoyl-D-vinná kyselina se nechají reagovat podle postupu popsaného pro AF261 (viz příklad 53), dokud se nezíská enantiomerní čistota nad 90 % (podle GC). Pevný produkt se zalkalizuje a vysráží se jako hydrochlorid. Výtěžek 27 mg bílé nehyroskopické pevné látky, $[\alpha]_D^{25} = 67,0^\circ$ (hydrochlorid v methanolu, optická čistota vyšší než 90 %). Matečné louhy se odpaří, zalkalizují a nechají se zreagovat stejným způsobem
- 20 s di-p-toluoyl-L-vinnou kyselinou. Čtyřikrát se překrystalují, výsledný produkt (90% enantiomerní čistota) se zalkalizuje a vysráží jako hydrochlorid, $[\alpha]_D^{25} = +70,8^\circ$ (hydrochlorid v methanolu, optická čistota >95 %).

- 25 Čistota každého enantiomeru byla stanovena GC s kapilární kolonou Chrompack XE-60-S-Val-S- α -PEA, WCOT tavený oxid křemičitý, 50 m, vnitřní průměr 0,26 mm, vnější průměr 0,35 mm, průtok 0,9 ml dusíku, teplota pece 175 °C, retenční doba 83 a 88 minut. NMR spektra hydrochloridu bylo identické se spektrem (+)AF267.

30 Příklad 56

Syntéza 1-methylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-methyl-1',3'-dioxolan-4'-onu) AF274

- 35 Kyselina mléčná (8 ml) se azeotropicky vysuší s benzenem. K suché a ještě horké kyselině mléčné se přidá další benzen, potom p-toluensulfonová kyselina (300 mg) a 1-methylpiperidon (5,00 g, 0,027 mol). Tato směs se vaří pod zpětným chladičem dokud se již neodděluje žádná další voda. Potom se roztok odpaří, odparek se rozpustí v chloroformu, promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (25 ml), vodná fáze se promyje chloroformem
- 40 (25 ml) a spojené organické fáze se opět promyjí vodou (2 x 10 ml). Organická fáze se vysuší síranem sodným smíchaným s aktivním uhlím, zfiltruje a odpaří. Získá se 8,7 g olejovitého surového produktu. Po rozmíchání tohoto produktu s hexanem, etherem a petroletherem (t.v. 40 až 60 °C) se zbývající olej rozpustí v acetonu a potom se k němu přidá 1 ekvivalent kyseliny šťavelové. Po chvíli se vysráží bílá pevná látka, která byla identifikována jako šťavelan
- 45 1-methylpiperidin-4-spiro-2'-(5'-methyl-1',3'-dioxolan-4'-onu) AF274. ^1H -NMR spektrum (CDCl_3 + $\text{DMSO}-d_6$, δ , oxalát): 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, $J = 7$ Hz, 1H) ppm. ^1H -NMR spektrum (volná báze, CDCl_3 , 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, $J = 7$ Hz) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 185 (M^+).

50

Příklad 57

2-Methyl-1,4-thiazolidin-3-on-spiro[5,3']-chinuklidin AF273

Směs 3-chinuklidinonu (2,50 g, 20,0 mmol), thiomléčné kyseliny (2,55 g, 24,0 mmol) a uhlíkatu amonného (2,9 g) v toluenu (100 ml) se zataví v tlakové nádobě z nerezavějící oceli a zahřívá se 28 h na 108 °C. Olej se z reakční směsi oddělí, odstraní a zbylý toluenový roztok se odpaří. Odparek (2,5 g) se překrystaluje z acetonu. Získá se tak krystalická pevná látka (0,460 g), která z větší části sestává z jednoho enantiomerního páru AF273. Krystalizací z acetonitrilu a potom dichlormethanu se získá jeden čistý enantiomerní pár ($\pm$) AF273A (0,210 g), t.t. 201 až 202 °C. ¹H-NMR spektrum (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 a 3,22 (dd, J = 15 Hz, -NCH₂CNH-), 3,89 (q, J = 7,2 Hz, CH₃CH-), 8,58 (široký s, -NH-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 212 (M⁺), 155, 142 (M⁺ - 70), 123, 96, 71, 70 (100 %). 58.

Matečné louhy z první krystalizace, které jsou obohaceny o jeden enantiomerní pár, se chromatografují na koloně silikagelu (Merck 60). Elucí směsí chloroform:methanol:vodný amoniak v poměru 96:3:1 se získá nejdříve druhý čistý enantiomerní pár ($\pm$) AF273B (0,106 g), t.t. 181 až 182 °C (z acetonitrilu). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,52 (d, J = 7 Hz, CH₃CH-), 1,64 (m, 2H), 1,93 (m, 2H), 2,03 (m, 1H), 2,70 až 2,98 (m, 4H), 3,19 (s, -NCH₂CNH-), 3,85 (q, J = 7 Hz, CH₃CH-), 8,60 (široký s, -NH-) ppm. Hmotnostní spektrum je stejné jako u sloučeniny ($\pm$) AF273A.

Dále byla získána směs všech izomerů a konečně další čistý enantiomerní pár ($\pm$) AF273A.

Příklad 58

1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-thion) (AF275)

Suspenze 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-onu) (AF261) (1,00 g, 5,00 mmol) a Lawessonova činidla (1,40 g, 3,46 mmol) v suchém toluenu (25 ml) se míchá a zahřívá 3 h na 100 °C. Rozpouštědlo se z reakční směsi odstraní. Odparek se dělí na koloně suchého silikagelu (Merck 60, 0,040 až 0,065). Eluce směsí chloroformu s methanolem a hydroxidem amonným v poměru 96:3:1 (obj. díly) poskytla čistý 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-methyl-1',4'-thiazolidin-3'-thion) (AF275) (0,81 g), jehličky z acetonu, t.t. 171 až 172 °C (rozkl.). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,69 (d, J = 7,1 Hz, CH₃CH-), 2,00 (m, 2H), 2,00 až 2,35 (m, 4H), 2,30 (s, CH₃N-), 2,80 (m, 2H), 4,26 (q, J = 7,1 Hz, CH₃CH-), 8,74 (široký s, -NH-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 216 (M⁺), 156, 98, 97, 96 (100 %), 70.

Příklad 59

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'(5')-(2'-methylthio-2'-imidazolin-5'(4')-on) (AF187)

a) 1-Methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thiohydantoin) (AF195) jako hydrochlorid (1,00 g, 4,25 mmol) se přidá k míchanému roztoku hydroxidu sodného (0,36 g, 9,00 mmol) v methanolu (30 ml). Vytvoří se sraženina (NaCl). Ke shora uvedené směsi se za teploty místnosti přidá methyljodid (0,664 g, 4,68 mmol) a směs se míchá 1 h. Reakční směs se za sníženého tlaku odpaří a odparek se extrahuje horkým dichlormethanem. Odstranění dichlormethanu poskytne odparek (0,58 g), který se dělí na sloupci silikagelu (Merck 60, 0,040 až 0,065). Eluce směsí chloroformu s methanolem a hydroxidem amonným v poměru 89:10:1 (obj. díly) poskytne 1-methylpiperidin-4-spiro-4'(5')-(2'-methylthio-2'-imidazolin-5'(4')-on) (AF187) (0,23 g), t.t. 176 až 177 °C (z acetonu). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃): 1,57 (m, 2H), 2,00 (m, 2H), 2,35 (s, CH₃N-), 2,52 (m, 2H), 2,56 (s, CH₃S-), 2,84 (m, 2H), 6,73 (široký s, -NH-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃): 12,6 (CH₃S-), 32,7 (C3), 45,8 (CH₃N-), 50,8 (C₂), 68,4 (C4), 163,8 (-C-SCH₃), 188,1 (-C=O-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 213 (M⁺), 198 (M⁺ - CH₃),

143 (M1 – 70), 71. UV spektrum (ethanol) $\lambda_{\max}$ 236 nm (ϵ 7800), 255 nm (shoulder, ϵ 436700).

- b) Roztok 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(2'-methylthio-5'-aminomethyl-4'H-imidazolu) (AF193) (30 mg) ve vodné HCl (0,5 ml, 16 % hmotn.) se nechá stát 3 dny za teploty místnosti. Rozpouštědlo se za sníženého tlaku odstraní. Zbytek se zalkalizuje koncentrovaným vodným roztokem hydroxidu sodného, potom se extrahuje směsí dichlormethanu s methanolem, extrakt se vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se odstraní. Získá se zbytek, který se rozdělí na desce se silnou vrstvou silikagelu (Merck kieselgel 60 F₂₅₄), eluce chloroformem s methanolem a vodným amoniakem v poměru (obj. díly) 79:20:1. Získá se tak sloučenina AF187 (8 mg) identická s autentickým vzorkem.

Příklad 60

15

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-ethyl-2'-ethylthio-2'-imidazolin-5'-on) (AF188')

- K suspenzi hydrochloridu 1-methylpiperidin-4-spiro-5'-(2'-thiohydantoinu) (AF195) (4,04 g, 0,0172 mol) a KOH (3,85 g, 0,0686 mol) v ethanolu (100 ml) se přidá ethylbromid (5,60 g, 0,0514 mol) a směs se zahřívá pod zpětným chladičem za míchání. Po 2h zahřívání pod zpětným chladičem byl hlavním produktem stále ještě monoethylderivát. K reakční směsi bylo proto přidáno více KOH (0,95 g, 0,0169 mol) a ethylbromidu (2,00 g, 0,0184 mol) a v zahřívání se pokračuje další 3 h. Rozpouštědlo se za sníženého tlaku odpaří. Ke zbytku se přidá voda (20 ml) a produkt se extrahuje etherem. Extrakt se vysuší síranem sodným. Rozpouštědlo se odstraní. Získá se tak zbytek (0,973 g), který překrystalováním z petroletheru poskytne čistý 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-ethyl-2'-ethylthio-2'-imidazolin-5'-on) (AF188) (0,513 g), t.t. 95 až 96 °C. Chromatografií matečných louhů (po odstranění rozpouštědla) na koloně suchého silikagelu (20 g, Merck 60, 0,040 až 0,065 mm) a elucí směsí chloroformu s methanolem a vodným amoniakem v poměru 84:5:1 se získá další podíl čistého AF188 (0,310 g). ¹H-NMR spektrum (CDCl₃): 1,19 (t, J = 7,2 Hz, CH₃CH₂N-), 1,40 (t, J = 7,2 Hz, CH₃CH₂S-), 1,43 (m, 2H), 1,99 (m, 2H), 2,36 (s, CH₃N-), 2,51 (m, 2H), 2,77 (m, 2H), 3,18 (q, J = 7,2 Hz, CH₃CH₂S-), 3,49 (q, J = 7,2 Hz, CH₃CH₂N-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃): 14,1 (2 CH₃CH₂-), 24,4 (CH₃CH₂S-), 33,0 (C₆), 35,1 (CH₃CH₂N-), 46,2 (CH₃N-), 51,0 (C₇), 68,6 (C₅), 158,8 (-N=C-), 183,9 (-C=O-) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 255 (M⁺), 226 (M⁺ - Et), 185 (M⁺ - 70), 71, 70.

35

Příklad 61

1-Methylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-ethyl-2'-imidazolin-5'-on) (AF220)

40

- K roztoku 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-ethyl-2'-ethylthio-2'-imidazolin-5'-onu) (AF188) (0,214 g) v ethanolu (10 ml) se přidá RaNi (0,30 g) a směs se vaří pod zpětným chladičem 4 h. Jelikož reakce nebyla úplná, bylo přidáno dalších 0,30 g RaNi a v zahřívání se pokračuje další 4 h. Reakční směs se zfiltruje a katalyzátor se promyje methanolem a dichlormethanem. Filtrát a promývací roztoky se spojí a odpaří. Získá se tak 1-methylpiperidin-4-spiro-4'-(1'-ethyl-2'-imidazolin-5'-on) (AF220) (0,160 g) jako olej. ¹H-NMR spektrum (CDCl₃, δ): 1,27 (t, J = 7,3 Hz, CH₃CH₂-), 1,46 (m, 2H), 2,03 (m, 2H), 2,36 (s, CH₃N-), 2,48 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 3,53 (q, J = 7,3 Hz, CH₃CH₂-), 7,72 (s, -CH=N-) ppm. ¹³C-NMR spektrum (CDCl₃): 13,9 (CH₃CH₂-), 32,2 (C₆), 35,3 (CH₃CH₂-), 45,7 (CH₃N-), 50,7 (C₇), 68,2 (C₅), 151,6 (-N=CH), 183,9 (-C=O-) ppm.

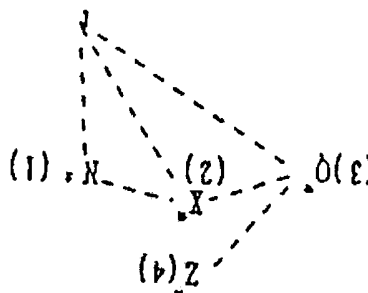
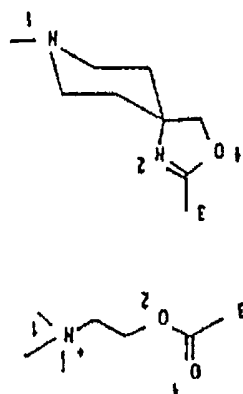
50

Pokus vyčistit tento produkt chromatografií na suchém silikagelu (20 g, Merck, 60, 0,040 až 0,065 mm), eluce směsí chloroformu s etherem, methanolem a vodným amoniakem v poměru (obj. díly) 25:17:3:1 poskytl jako hlavní produkt hydrolyzační produkt s otevřeným kruhem.

- 1-Methylpiperidin-4-formylamino-4-N-ethylkarboxamid (AF221) krystalizací ze směsi ether-dichlormethan má t.t. 108 až 109 °C. $^1\text{H-NMR}$ spektrum (CDCl_3 , δ): 1,13 (t, $J = 7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 2,04 až 2,32 (m, 6H), 2,28 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 2,65 (m, 2H), 3,28 (dq, CH_3CH_2-), 5,73 (s, $\text{HCONH}-$), 6,97 (široký s, $\text{EtNHC}-$), 8,18 (s, $\text{HCON}-$) ppm. Hmotnostní spektrum (m/e): 213 (M^+), 195 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 168 ($\text{M}^+ - \text{EtNH}_2$), 141 ($\text{M}^+ - \text{EtNHCO}$), 98, 97, 96, 71, 70.

Hydrolyzační produkt AF221 lze znovu uzavřít na kruhovou sloučeninu AF220 zahřátím (150 °C) ve vakuu.

- Sloučeniny podle vynálezu mají farmakologickou aktivitu a jsou tedy užitečné jako farmaceutická činidla, např. pro léčení. Spiro-sloučeniny podle předloženého vynálezu mají centrální a periferní (nebo obojí) aktivitu na nervový systém. Jednou obecnou charakteristickou aktivitou je aktivita na cholinergní systém, kde sloučeniny znamenají ligandy (např. agonisty nebo antagonisty) na muskarinových receptorech.
- Agonistický nebo antagonistický profil sloučenin byl vyhodnocován četnými testy včetně počítačového molekulárního vyhodnocení, biologického testování in vitro a biologického testování in vivo.
- Počítačové molekulární hodnocení se provádí následujícím způsobem. Pro muskarinovou agonistickou aktivitu byl zkonstruován farmakoforní model na základě zkoumání četných agonistů. Tento model zahrnuje definici těch částí ve struktuře agonistů, které jsou podstatné pro aktivitu, jejich vzájemnou prostorovou orientaci a do jistého rozsahu maximální objem dovolený pro ligand, který má být agonistou.



Obecné příklady

- Ve shora uvedených vzorcích bod r znamená negativní náboj, který interaguje s kationtovou hlavou agonisty. Jeho poloha vzhledem k atomu dusíku je definována na modelu. Důležitými vzdálenostmi (D) jsou tyto vzdálenosti: $D(r-\text{N}^*) = 3,0$, $D(r-\text{X}^*) = 6,50$, $D(r-\text{Q}^*) = 8,70$, $D(\text{x}^*-\text{Q}^*) = 2,45$. Optimální dihedrální úhel $r-\text{x}^*-\text{Q}^*-\text{x} = -85$. Odchylka od těchto optimálních modelových parametrů v jistých mezích neodstraňuje aktivitu (tabulka 1).

- Některé důležité vlastnosti tohoto modelu jsou uvedeny níže:

1. Tento model umožňuje rozložit mezi plnými a částečnými muskarinovými agonisty. Rozdíl je založen na korelaci mezi vzdáleností $r-\text{X}^*$ a agonistickou účinností.
2. Povaha atomu v poloze 4, odpovídající karbonylovému atomu kyslíku v acetylcholinu, se může ve skupině muskarinových agonistů začne měnit stejně jako dihedrální úhel $r-\text{x}^*-\text{Q}^*-\text{x}$.

3. Jestliže vzdálenost $r-Q^*$ je příliš velká pro agonistickou aktivitu, získávají se slabě se vážající antagonisté.

5 Z tohoto modelu lze na základě strukturní rigidity agonisty, povahy Z^* a modelových parametrů předpovědět subtyp specifčnosti receptoru muskarinového agonisty.

Farmakoforní model se může použít pro testování nových sloučenin na potenciální muskarinovou aktivitu následujícím způsobem: a) nová struktura se optimalizuje tak, že se stanoví konforméry s nízkou energií, b) tyto konforméry jsou zkoumány z hlediska příslušného uspořádání farmakoforních prvků. Nová struktura může být také přinucena zaujmout farmakoforní konformaci použitím jednoho z indukovaných rutinních způsobů. Výsledná konformace se pak srovnává s konformací s nízkou energií stejné struktury. Aplikace těchto postupů poskytly spolehlivou odpověď ve všech zkoumaných případech (tabulka 1). I když neexistuje způsob předpovědi, jestli muskarinovou aktivitu vykazují pouze sloučeniny, které odpovídají tomuto modelu, ty sloučeniny, které tomuto modelu odpovídají, jsou aktivní jako agonisté.

Na omezení objemu kationtové hlavy muskarinových agonistů se usuzuje z pokusů umístit relevantní struktury (jak je naznačeno v tabulce 1) do molekulárního modelu transmembránové domény m1 muskarinového receptoru. Sloučeniny, které jsou větší než chinuklidinové deriváty, nemohou být do makromolekulárního vazebného místa umístěny.

Sloučeniny uvedené v tabulce 1 se dělí do čtyř skupin. Do první skupiny patří několik dobře známých muskarinových agonistů. Jejich struktury jsou charakterizovány optimálními farmakoforními parametry. Do druhé skupiny patří agonisté, kteří vykazují suboptimální farmakoforní sestavy a jsou tedy hlavně částečnými agonisty. Struktury sloučenin ve třetí skupině se odlišují od farmakoforní sestavy pro muskarinovou aktivitu definované předchozími skupinami. Tyto sloučeniny jsou tedy buď antagonisty nebo nemají muskarinovou aktivitu. Skupina čtyři je seznamem potenciálních muskarinových agonistů na základě jejich farmakoforních parametrů.

30

Tabulka 1

Farmakoforní parametry pro muskarinové agonisty

agonista selektivita		r-X*(nm)	R-Q*(nm)	X*-Q*(nm)	R-X*-Q*-Z*
(skupina 1)					
ACh	M2>M1	0,640	0,844	0,240	-86
dioxolan	M2>M1	0,651	0,871	0,242	-85
muskarin	M2>M1	0,650	0,853	0,244	-75
methylyfur	M1>M2	0,640	0,853	0,243	-59 ^a
oxatholan	M1>M2	0,655	0,890	0,243	-25
(skupina 2)					
AF102B	M1>M2	0,593	0,824	0,245	-173
AF150	M1>M2	0,578	0,791	0,245	-118
AF151	M1>M2	0,582	0,820	0,245	-170
AF150(S)	M1>M2	0,572	0,835	0,281	-84
AF151(S)	M1>M2	0,588	0,815	0,238	-177
AF160	M1>M2	0,580	0,826	0,272	-96
AF160(Des)	M1>M2	0,578	0,826	0,270	-95
(skupina 3)					
AF133		0,598	0,833	0,296	34
AF134		0,600	0,858	0,262	9
AF168		0,669	0,910	0,272	-44
AF172		0,571	0,964	0,400	-101

Tabulka 1 (pokračování)

agonista	selektivita $r-X^*(nm)$	$R-Q^*(nm)$	$X^*-Q^*(nm)$	$R-X^*-Q^*-Z^*$
(skupina 4)				
AF170	0,607	0,862	0,301	-60
AF181	0,592	0,835	0,275	-88
AF184	0,593	0,844	0,265	-87
AF185	0,596	0,821	0,313	-105
AF196	0,592	0,840	0,273	-87
AF202	0,578	0,810	0,242	-170
AF210	0,589	0,820	0,243	-170
AF215	0,594	0,793	0,244	-108
AF216	0,572	0,832	0,284	-96
AF260	0,575	0,802	0,245	-132
AF261	0,591	0,780	0,237	-107
AF264	0,577	0,807	0,246	-128
AF265	0,582	0,772	0,238	-94
AF267	0,591	0,784	0,325	-105
AF270	0,579	0,827	0,273	-93

^{a:} methyلفur znamená methyلفurmethid

5 Biologické testování

Test č. 1: Izolované preparáty ilea morčete

- 10 Sloučeniny podle vynálezu byly testovány na jejich agonistickou a antagonistickou aktivitu na izolovaných preparátech ilea morčete (byl použit způsob popsany Fischerem a spol.: J. Pharm. Exp. Therap. 257, 392 (1991).). Tabulka 2 souhrnně uvádí výsledky, které byly získány pro některé sloučeniny.

Tabulka 2

Vliv na preparáty ilea morčete

sloučenina	EC ₅₀ (μM)	poznámky
AF102B ^b	3,5	částečný agonista
AF134 ^c		antagonista při 6μM
AF151S	7,3	plný agonista
AF160	3,2	plný agonista
AF160(Des)		částečný agonista při 0,1mM maximální kontrakci 80 % kar- bacholu
AF177		slabý antagonist
AF178	100	částečný agonista (80 % ACh)
AF179	100	částečný agonista (80 % ACh)
AF180	100	částečný agonista (80 % ACh)
AF182		antagonista při 0,1mM plný antagonist při 0,2mM

5

^b: cis-2-methylspiro(1,3-oxathiolan-5,3')chinuklidin (US patent 4 855 290), slabý antagonist pro ACh-indukovanou kontrakci

10

^c: v preparátu ilea morčete se chová jako muskarionový antagonist; překvapivě lépe inhibuje AF102B indukované kontrakce lépe než blokuje ACh-indukované kontrakce. Jestliže jsou tedy kontrakce indukované AF102B v tomto preparátu zprostředkovány hlavně M3 receptory, AF134 se zdá být na tomto preparátu selektivním M3 antagonistou.

15

Test č. 2: Navázání na muskarinové receptory v mozku, kompetice s [³H]QNB, [³H]NMS a [³H]OXO-M v membránách připravených z krysího kortexu a malého mozku.

Pro vyhodnocování nových sloučenin (tabulka 3 a 4) byly použity membránové preparáty krysí mozkové kůry a kůry malého mozku s použitím ligandů [³H]NMS, [³H]pirenzepinu a [³H]oxotremorinu-M.

Tabulka 3

5 Kompetice testovaných sloučenin s [^3H]PZ, [^3H]QNB nebo [^3H]NMS (kryší kortex) a [^3H]QNB nebo [^3H]NMS (malý mozek)

kortex							
sloučenina	[^3H]PZ		[^3H]QNB		[^3H]NMS		
	K_H	$\mu\text{M}(\%)$	K_L	μM	K_H	$\mu\text{M}(\%)$	K_L
karbachol	0,06(38)	18,6	6,8(18)	980	0,1(41)	11	
oxotremorin				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			12
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
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	

Tabulka 3 (pokračování)

kortex							
sloučenina	$[^3\text{H}]\text{PZ}$		$[^3\text{H}]\text{QNB}$		$[^3\text{H}]\text{NMS}$		
	K_H	K_L	K_H	K_L	K_H	K_L	
	$\mu\text{M}(\%)$	μM	$\mu\text{M}(\%)$	μM	$\mu\text{M}(\%)$	μM	
AF263	0,33 (14)	10			0,19 (23)	13	
AF265	0,93 (12)	49			0,18 (27)	39	
AF267		2,8*				5,88	
AF267A						10,9	
AF267B						4,3	

* Po působení Cu^{++} , test kompetice s $[^3\text{H}]\text{PZ}$ se dvěma vazebnými místy pro AF278 ($K_H = 22 \text{ nM}$ (18 %); $K_L = 2,5 \mu\text{M}$). Toto pozorování ukazuje, že AF267 se váže na muskarinové receptory v krysí mozkové kůře jako agonista (Fischer a spol.: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 257, 392 (1991)).

Tabulka 3 (pokračování)

malý mozek				
sloučenina	[³ H]QNB		[³ H]NMS	
	K _H μM(%)	K _L μM	K _H μM(%)	K _L μM
karbachol	1,5 (54)	52	0,02 (56)	6
oxotremorin		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

Vypočtené poměry K_i^{PZ}/K_i^{NMS} nebo K_i^{PZ}/K_i^{QNB} (tabulka 3) jsou obvykle používanými indikacemi lepší M1 selektivity muskarinových ligandů, nižší poměry znamenají lepší M1 selektivitu. Kromě poměrů K_i^{PZ}/K_i^{QNB} z membránových preparátů krysí mozkové kůry versus malého mozku indikují také M1 selektivitu muskarinových ligandů, nižší poměry než 1 ukazují M1 selektivitu (Fisher a spol.: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 257, 392 (1991)). Použitím těchto analýz bychom mohli detekovat, že některé sloučeniny podle tohoto vynálezu vykazují relativně vysokou prefe-

renci pro M1 muskarinové receptory. Jsou to: AF133, AF134, AF160, AF160 (Des), AF177, AF178, AF181 až AF 185, AF261, AF265, AF267.

Například AF185 vykazuje třikrát vyšší afinitu na kompetici s [³H]PZ než na kompetici s [³H]NMS vazebnými místy ($K_i = 1,4 \pm 0,15 \mu\text{M}$ proti $5 \pm 1 \mu\text{M}$, tabulka 3). To je v příkrém rozporu s AF102B (US patent), která vykazuje téměř podobné afinity pro kompetici s oběma ligandy ($K_i = 1,43 \pm 0,2 \mu\text{M}$ proti $1,86 \pm 0,43 \mu\text{M}$, tabulka 3). Jelikož se o [³H]PZ předpokládá, že specificky označuje M1AChR v membránách krysí mozkové kůry, naše nová data mohou ukazovat na to, že AF185 je při srovnání s AF102B M1-selektivnějším ligandem na M1.

[³H]NMS vazebné křivky některých nových sloučenin v membránách mozkové kůry ukazují interakci se dvěma místy: asi čtvrtina vazebných míst vykazuje vysokou afinitu k těmto sloučeninám. To může znamenat vysokou agonistickou účinnost v tomto preparátu. Mezi tyto sloučeniny patří: AF260, AF261, AF263 a AF265.

Některé nové sloučeniny překvapivě vykazovaly kompetitivní křivky se dvěma místy s [³H]PZ v krysí mozkové kůře (tabulka 3). Patří mezi ně: AF160, AF160(Des), AF260, AF261, AF265. Tyto kompetitivní křivky se dvěma místy uvedených sloučenin s [³H]PZ byly převedeny na jednoduché křivky hromadného působení v přítomnosti stabilního GTP analogu, GppNHP (neuvedeno). Podobná pozorování na GppNHP citlivost byla pozorována pro kompetici s [³H]NMS (neuvedeno). To znamená, že se tyto sloučeniny chovají jako účinní agonisté pro M1 receptory v krysí mozkové kůře. To je v rozporu s AF102B kompetitivními testy, které typicky poskytují křivky hromadného působení. Tato pozorování mohou ukazovat některé rozdíly mezi rozpoznáními M1 receptorů krysího malého mozku AF102B a těmito novými sloučeninami.

AF267 vykazovala kompetitivní křivky s jedním místem jak s [³H]NMS tak [³H]PZ v membránách krysí mozkové kůry. Níže popsané studie hydrolyzy fosfoinositidů (PI) a uvolňování arachidonové kyseliny ukazuje na to, že tato sloučenina je částečným agonistou. Systém vázání hromadného působení byl tedy podobný datům pro M1-selektivního agonistu AF102B na muskarinové receptory v tomto přípravku. Již dříve jsme ukázali, že působení 0,1 mM síranu měďnatého na membrány krysí mozkové kůry mohou prokázat kryptické agonistické vazebné vlastnosti AF102B (Fisher a spol.: JPET 257, 392 (1991); publikovaná data používala kompetici AF102B s [³H]QNB, ale podobná pozorování byla získána s [³H]NMS a [³H]PZ. Takové působení může zvyšovat podíl míst s vysokou afinitou bez působení Cu^{++} (např. AF160). Studovali jsme tedy vazebné vlastnosti AF267 po tom, co na ně bylo působeno Cu^{++} . Toto působení s následujícím testem kompetice s [³H]PZ ukázalo 18 % míst s vysokou aktivitou na AF278 ($K_H = 22 \text{ nM}$, tj. asi stokrát vyšší afinitu při srovnání s $K_L = 2,5 \mu\text{M}$) bez významné změny v místech s nízkou afinitou. Toto pozorování předpokládá, že AF267 se může vázat na muskarinové receptory v krysí mozkové kůře podobně jako AF102B. Schopnost působení Cu^{++} vykazovat místa s vysokou afinitou na některé částečné agonisty může mít vztah se stabilizací interakce receptor/G-protein koordinačními komplexy iontů kovů s kritickými SH-skupinami na těchto makromolekulách (Gurwitz a spol.: BBRC 120, 271 (1984).). U kontrolních membrán tato interakce zřejmě není zvýhodněna v přítomnosti částečných agonistů, které tedy nevykazují místo s vysokou afinitou při kompetitivních testech s označenými antagonisty.

Schopnost sloučenin nahrazovat [³H]oxotremorin-M{[³H]OXO-M} navázání poskytlo míru afinity pro stav receptoru s agonistou s vysokou afinitou. Poměr hodnot K_i pro náhradu [³H]NMS nebo [³H]QNB a [³H]OXO-M se v literatuře používá pro předpovídání účinnosti. Poměry větší než 100 souvisejí s plnými agonisty, antagonisté poskytují poměr blízko jednotce a hodnoty mezi těmito hodnotami ukazují na částečné agonisty (Orlek a spol.: J. Med. Chem. 34, 2726 (1991).).

Nové sloučeniny byly studovány v kompetitivním testu s označeným, neselektivním muskarinovým agonistou, [³H]OXO-M, použitím membrán krysí mozkové kůry. Silný agonistický charakter AF179 a AF160 se odráží v jejich relativně vysokých $K_i^{\text{NMS}}/K_i^{\text{OXO-M}}$ hodnotách (tabulka 4).

Tabulka 4

5 Kompetice s [^3H]OXO-M protějšky AF160 a referenčními muskarinovými agonisty v přípravku krysí mozkové kůry

sloučenina	Ki (μM)	Ki ^{NMS} /Ki ^{OXO-M}
A. Křivky hromadného působení ^a :		
CCh	0,06±0,005 (3)	380
pilocarpin	0,1	
AF102B	0,6±0,2 (3)	2,1
AF160	1,8±0,2 (3)	9,4
AF177	11	1,4
AF179	1,3±0,3	31
AF182	14	1
AF183	>100	-1

sloučenina	Ki (μM)	% H	KL (μM)	Ki ^{NMS} /Ki ^{OXO-M}
B. Kompetitivní křivky se dvěma místy ^b :				
AF160(Des) př. 1	0,05	36	2,2	
př. 2	0,03	58	1,8	
př. 3	0,02	42	2,1	
střed(1-3)	0,033	45	2,0	3,5
	±0,007 (3)	±6	±0,1	
AF185 př. 1	0,04	53	49	0,18
př. 2	0,01	18	3	3

10 Poznámka: Vazebné experimenty byly prováděny s promytými membránami krysí mozkové kůry v TRIS/Mn⁺⁺ pufru 0,5 h při 25 °C; K_i^{NMS} data jsou střední hodnoty z tabulky 3. Data jsou obvykle hodnotami z 1 až 4 pokusů.

^a data jsou pro léčivé sloučeniny vykazující kompetitivní křivky hromadného působení s [^3H]OXO-M

15 ^b data jsou pro léčivé sloučeniny vykazující kompetitivní křivky se dvěma místy s [^3H]OXO-M; s AF160(Des) a AF185 byly v některých pokusech pozorovány křivky hromadného působení

20 AF160(Des) a AF185 byly překvapivě jedinými testovanými léčivými sloučeninami, jejichž kompetitivní křivky (použitím [^3H]OXO-M a membrán krysí mozkové kůry) nevykazují křivky hromadného působení s jedním místem (tabulka 4). Mimořádně silná kompetice těchto léčivých sloučenin s podfrakcí receptorů označených [^3H]OXO-M v membránách krysí mozkové kůry může znamenat, že tyto léčivé látky jsou subtypem s vysokou selektivitou. Vypočtené poměry

- K_i^{NMS}/K_H^{OXO-M} (tabulka 4) mohou znamenat, že AF160(Des) je silným agonistou pro podřadu muskarinových receptorů krysí mozkové kůry při srovnání s jinými protějšky skupiny AF160 a se samotnou AF102B. To však nebylo pozorováno: kompetitivní křivky jak AF160(Des) tak AF185 s [^3H]NMS stále poskytují jednoduché křivky hromadného působení. Ve skutečnosti pouze AF160, která vykazuje při kompetici s [^3H]NMS křivku se dvěma místy, ještě soutěží s [^3H]OXO-M s jednoduchou křivkou hromadného působení. Vysvětlení heterogenity subtypu receptoru, který je výlučně detekován v testu vazby [^3H]OXO-M, ale nikoliv v testu vazby [^3H]NMS, se nezdá atraktivní. Jiná vysvětlení by mohla zahrnovat možné interakce s alosterickými místy na muskarinových receptorech, které nejsou detekovány stavem receptoru, který váže antagonisty, jako je [^3H]NMS, ale je odmaskován použitím agonisty [^3H]OXO-M. Jiným možným vysvětlením mělkých kompetitivních křivek v testech navázání [^3H]OXO-M je to, že tento systém nedosáhl rovnováhy. V kompetitivních testech používajících AF160(Des) nebo AF185 se při 30 minutách nedosáhne rovnováhy, protože vazebná data byla jiná po 30 minutách při srovnání s daty po 60 minutách při 25 °C. Jestliže byly testy ukončeny po 30 minutách, byly pozorovány mělké kompetitivní křivky s [^3H]OXO-M jak pro AF160(Des) tak AF185. Pravděpodobným vysvětlením je to, že AF160(Des) a AF185 mají relativně pomalé kinetiky (jak pomalé asociační rychlosti tak pomalé disociační rychlosti) při srovnání s AF102B. To by mělo za důsledek velmi pomalý přístup k rovnováze při kompetitivních testech, což za nerovnovážných podmínek vede ke zřetelné detekci vazebných izoterm se dvěma místy. Je odůvodněné předpokládat, že rychlosti jak asociace tak disociace jsou relativně pomalé: kdyby byly pomalé pouze asociační rychlosti AF160(Des) a AF185 při srovnání s AF102B, vykazovaly by mnohem nižší afinity než AF102B. Na druhou stranu, kdyby jejich disociační rychlosti byly nižší, jejich afinity by měly být mnohem vyšší než u AF102B.
- Krysí malý mozek je relativně homogenní, pokud jde o exprimované mAChR subtypy (většinou M2). AF102B vykazuje podobné účinky při kompetici navázání [^3H]OXO-M jak v kortexu tak v malém mozku krys. Naproti tomu AF160(Des) a AF185 vykazovaly vyšší účinnosti v membránách kortexu než v membránách malého mozku. To se pak projevuje jako kompetitivní křivky se dvěma místy pouze v membránách kortexu (viz také tabulka 4 pro kortex). Opět to může znamenat různé kinetiky pro tyto dvě sloučeniny v kortexu při srovnání s kinetikami těchto dvou sloučenin v malém mozku.

Test č. 3

- Aktivace druhého messengeru v plátcích mozku a v buněčných kulturách

- Při postupu měření účinnosti testovaných sloučenin jako agonistů na M1 muskarinových receptorech se připraví plátky mozku z krysího kortexu (200 μ M kostky). Pro test přeměny fosfoinositidů (PI) se tyto plátky mozku naplní [^3H]inositolem (4 μ Ci/ml) jejich inkubací 1 h v Krebsově rovnovážném solném roztoku obsahujícím značený ligand při 37 °C pod kyslíkem. Po promytí se do každé zkumavky obsahující 10mM LiCl v čerstvém Krebsově roztoku s nebo bez testované sloučeniny přidají 50 μ l podíly. Po 20min inkubaci při 37 °C se reakce ukončí a označené produkty se rozdělí na AG-1-X8 kolonách, jak popsal Berridge (Biochem. J. 258, 849 (1983)). Částeční agonisté, podle testované sloučeniny, poskytly méně než 80 % aktivace PI hydrolýzy při srovnání s CCh (plný agonista). Tak například AF160 způsobil významné zvýšení IP₃ (1,6krát). Při srovnání s CCh byl AF160 částečným agonistou s účinností 50 % referenční sloučeniny. AF(Des) byl také aktivní, i když v menším rozsahu než AF160, AF102B jako jiný M1 agonista byl méně aktivní než AF160, zatímco AF178 nebyl v tomto testu aktivní.
- Pro vyhodnocení aktivace druhého messengeru testovanými sloučeninami byly použity buněčné kultury obohacené v jedné populaci muskarinových receptorů. Pro studie PI přeměny se použije způsob podle Berridge (Biochem. J. 258, 849 (1983)). Pro mobilizační studie kyselinou arachidonovou se buňky označují 16 h 0,2 μ Ci/ml triciované arachidonové kyseliny v původním růstovém médiu. Před testováním se buňky promyjí celkem šestkrát DME bez séra doplněným HEPES (20mM) a hovězím sérovým albuminem (1 mg/ml). Po promytí se přidá 0,5 ml stejného média a

následuje přidání tetovaných ligandů. Analýzy se ukončí přenesením média do Eppendorfových zkumavek a odstředováním 10 min při 6000 x G. Spočte se radioaktivita v supernatantech a uvádí se jako počet impulzů za minutu uvolněné triciované arachidonové kyseliny na jamku. Akumulace cyklického AMP v neporušených buňkách se vyhodnotí způsobem podle Pinkas-Kramarskiho a spol.: *Neurosci. Lett.* **108**, 335 (1990), zatímco adenylylcyklázová aktivita v izolovaných membránách se stanovuje podle Johnsona a Salomona (*Methods in Enzymology* **195**, R. A. Johnson a J. D. Corbin (red.), Academic Press, str. 3 až 21 (1991)).

Výhodnými jsou sloučeniny obecných vzorců I až IX s maximální rychlostí přeměny PI a/nebo mobilizace arachidonové kyseliny (ale ne významné aktivace adenylylcyklázy) vyšší než 25 %. Některými příklady této aktivity jsou AF160, AF160(Des), AF178, AF179, AF180, AF185, AF260, AF261, AF263, AF265, AF266 a AF267. Tyto sloučeniny jsou schopny aktivovat M1 muskarinové receptory.

Na rozdíl od acetylcholinu, CCh, oxotremorinu-M a dalších klasických plných agonistů, tyto sloučeniny indukují selektivní aktivaci různé signalizace prostřednictvím M1 (nebo M3) muskarinových receptorů. Selektivní aktivace muskarinových agonistů PI hydrolýzy bez (nebo s přítomností minimální) aktivace cAMP akumulace je obecným rysem aktivity nových sloučenin. Tato pozorování mohou zahrnovat indukci kondenzace M1 muskarinového receptoru na vzdálené G-proteiny těmito selektivními muskarinovými ligandy. Vedle aktivace M1 receptorů jsou tyto sloučeniny tedy také selektivní na úrovni rozdílných druhých messengerů. Tento koncept selektivní aktivace pouze rozdílných G-proteinů stejným muskarinovým receptorem použitím selektivních muskarinových ligandů byl nedávno popsán vynálezci pod konceptem ligandově selektivní signalizace používající CHO buňky transfektované krysím m1AChR (Fisher a spol.: *Bioorganic and Medicinal Chem. Lett.* **2**, 839 (1992).) a v buněčné linii neuronového typu, např. buněčné linii PC12M1 (*Soc. Neurosci. Abs. Nov.* 1993). Možný význam této signální cesty pro vývoj cholinergní substituční terapie Alzheimerovy choroby (AD) je zřejmý vzhledem k objevu zvýšených Gs hladin u AD pacientů a starých mozků (Harrison a spol.: *Mol. Brain Res.* **10**, 71 (1991), Young a spol.: *Dev. Brain Res.* **61**, 243 (1991). Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou být tedy důležité pro léčení Alzheimerovy nemoci.

Některé sloučeniny jsou plnými agonisty zatímco jiné jsou částečnými agonisty, jestliže se srovnají s CCh při stimulaci PI hydrolýzy v buněčných kulturách transfektovaných m1AChR. Částečnými agonisty jsou: AF160, AF160(Des), AF178, AF180, AF181, AF265 a AF267. AF260, AF261, AF263 a AF266 mají v tomto testu plně agonistické aktivity. Křivky koncentrační odpovědi pro AF260 a AF261 ukazují, že maximální aktivity se získají při 10 μM a 100 μM koncentraci. AF265 a AF267 se chovají jako částeční agonisté s maximálními aktivitami 75 % a 66 % vzhledem k 1 mM CCh. AF181 má v tomto testu slabou částečnou agonistickou aktivitu. Při 1 mM koncentraci tedy částečně aktivuje PI hydrolýzu, ale zeslabuje CCh-indukovanou PI hydrolýzou, jak je to očekáváno u částečného agonisty. AF213 a AF184 vykazují antagonistickou aktivitu, protože tyto sloučeniny blokují signál CCh PI hydrolýzy z enantiomerů AF267 je aktivnějším AF267B, (–)-enantiomer. Tato sloučenina aktivuje PI hydrolýzu v buňkách transfektovaných m1 receptory, dokonce při 10 μM (40 % CCh) a 100 μM koncentraci (80 % CCh).

Testovali jsme účinnost nových sloučenin na indukování desenzibilizace CCh-zprostředkovaného PI hydrolyzačního signálu. AF261 indukuje menší desenzibilizační odpověď při srovnání s CCh: po 24 h vystavení působení 100 μM nebo 1 mM AF261 byla PI hydrolyzační odpověď na stimulaci 1 mM CCh snížena o 45 % při srovnání se snížením o 60 % po preinkubaci s 1 mM CCh. AF267, sloučenina, která má částečnou agonistickou aktivitu při indukování PI hydrolýzy, měla menší schopnost indukovat desenzibilizaci. Po inkubaci s 1 mM AF267 byla tedy původní CCh zprostředkovaná PI odpověď snížena pouze o 29 %.

Testovali jsme také nové sloučeniny na jejich schopnost indukovat PI hydrolýzu v buňkách přechodně transfektovaných lidskou m1AChR, m3AChR nebo m5AChR v paralelních pokusech, jak popsali Pittel a Wess (*Mol. Pharmacol.* **45**, 61 (1994)). AF267 vykazoval nejvyšší selektivitu na

m1AChR subtyp, kolem 100krát silnější pro m1AChR při srovnání s m3AChR–transfektovanými buňkami (hodnoty ED_{50} byly 1,5 a 150mM). To je zvláště zřejmé, jestliže se srovná signál indukovaný 10μM AF267m, který je již maximální v m1AChR–transfektovaných buňkách, ale pouze 15 % z maximálního CCh signálu v m3AChR–transfektovaných buňkách. AF265 byl poněkud aktivnější a účinnější v m1AChR než v m3AChR transfektovaných buňkách a mnohem méně aktivní v m5AChR. Podobné výsledky byly získány s AF267, zvláště s jeho aktivnějším enantiomerem, (–)-enantiomerem, v buněčné kultuře stabilně transfektované m1AChR a m3AChR.

Uvolňování kyseliny arachidonové (AA) je jinou biochemickou cestou, která je aktivována agonisty m1AChR. Jelikož tato biochemická cesta může být svázána s m1AChR jiným G proteinem než PI hydrolýza, testovali jsme nové sloučeniny také v tomto testu s použitím buněčných kultur stabilně transfektovaných krysí m1AChR. AF263, AF265, AF266 a AF267 (při 1 mM koncentraci) vykazovaly v tomto testu částečné agonistické aktivity. Z enantiomerů AF267 je aktivním enantiomerem AF267B, (–)-enantiomer, který je úplným agonistou uvolňování AA při 0,1 a 1mM koncentraci. AF260 a AF261 vykazovaly plně agonistické aktivity při srovnání s 1mM CCh v souhlasu s pozorováními PI hydrolýzy u stejné buněčné linie. Pozorovali jsme tendenci těchto agonistů indukovat více uvolnění AA při srovnání s 1mM CCh. To může znamenat, že CCh–zprostředkovaný signál již podléhá desenzibilizaci během doby testování (20 min při 37 °C). Je zřejmé, že tato desenzibilizace je menší u testovaných sloučenin. Jiné testované sloučeniny mohou být také účinnější než CCh jako M1–agonisté, tj. „super–agonisté“. V tomto případě není jasné, proč tato vlastnost nebyla pozorována v testu PI hydrolýzy u AF260 a AF261.

Preinkubace buněčných kultur transfektovaných m1AChR s 1mM CCh 3 h s následujícím intenzivním odmytím ligandu (6 x 1 ml) značně snížila uvolňování AA. Bazální uvolňování AA bylo ovlivněno minimálně, což ukazuje, že po odmytí nebyl přítomen žádný zbytkový CCh. Pro srovnání, ve stejném pokus pre–inkubace s 1mM AF265 nebo AF102B snižovala odpověď uvolňování AA na 1mM CCh pouze na polovinu původní odpovědi. Pro delší inkubační doby je výhodnou koncentrací léčivé sloučeniny 100μM koncentrace, protože 1mM koncentrace nemá při dlouhodobých léčeních žádné fyziologické opodstatnění. Po pre–inkubaci se 100mM CCh po dobu 24 h byla AA odpověď téměř úplně ztracena. Srovnávali jsme schopnost nových sloučenin desenzibilizovat signál CCh–zprostředkovaného AA uvolňování. Pre–inkubace s 100μM AF265 po dobu 24 h překvapiv nevedla k žádnému snížení AA odpovědi. To si zaslouží zvláštní poznámky, přičemž je třeba vzít v úvahu naše zjištění, že tato sloučenina je v tomto testu částečným agonistou. Naproti tomu stimulace působením AF260, AF261 a AF263 (všechny ve 100μM koncentraci po dobu 24 h) značně snižovala CCh–zprostředkovaný signál uvolňování AA. Podobné pre–inkubace s AF102B nebo AF267 vedly k relativně malé interferenci s následným CCh–zprostředkovaným signálem uvolňování AA, což opět ukazuje na podobnost těchto dvou sloučenin.

Test 4

Účinky podobající se neutropním v buněčných kulturách

Aktivace M1 receptorů agonisty může vést k synergickým efektům s nervovým růstovým faktorem (NGF) v některých buněčných kulturách obohacených m1 receptory, např. PC12 (krysí feochromocytomové buňky transfektované krysím m1AChR (PC12M1 buňky) (Pinkas–Kramarski a spol.: J. Neurochem. 59, 2158 až 2166 (1992)).

Nyní bylo objeveno, v souhlasu s jiným aspektem tohoto vynálezu, že sloučeniny obecného vzorce I s maximálním poměrem přeměny PI vyšším než 25 % působí synergicky na výrůstek neuritů produkovaný NGF. Mezi sloučeninami podle vynálezu lze detekovat dvě skupiny sloučenin: 1) sloučeniny jako AF260, AF261 a AF263, které v nepřítomnosti NGF indukují výrůstek neuritů téměř podobně jako CCh a 2) ty sloučeniny, které v příkrém rozporu s oxotremorinem, nepodporují výrůstek neuritů nebo indukují pouze minimální morfológickou změnu v nepřítomnosti NGF. Obě tyto třídy jsou důležité pro léčení AD. Ve druhé skupině by nemělo

- 5 docházet k žádnému nekontrolovanému axonovému výrůstku. Kandidát na výhodou léčivou látku pro léčení AD by tedy například měl indukovat neuritogenezu pouze za přísné kontroly lokálně syntetizovaných a uvolňovaných růstových faktorů, jako je NGF, od mozku odvozený nervový faktor (BDNF), NT-3 atd. Některé příklady takových jedinečných aktivit lze nalézt u sloučenin, jako AF160, AF160(Des) a AF185, které jsou při synergickém působení NGF-indukovaného neuritového výrůstku alespoň tak účinné jako AF102B. Prodloužené neurity, po kombinovaném
- 10 léčení s NGF a těmito novými sloučeninami, byly v kultuře stabilní po dlouhá období. Lze tedy předpokládat, že signální cesta (cesty) používaná těmito sloučeninami pro indukci neuritového výrůstku se rychle nedesenzibilizuje. To velmi připomíná samotný NGF, který indukuje velmi
- 15 stabilní a dlouhotrvající neurity podporující efekty v PC12 buňkách stejně jako v primárních kulturách sympatitických neuronů. Je však třeba poznamenat, že staré nezpracované kultury testovaných buněk se zhoršovaly a obsahovaly mnoho mrtvých buněk, které se oddělovaly z povrchu desky. Je zajímavé, že jev mrtvých buněk byl menší u kultur, na které bylo předem působeno kombinací nových sloučenin a NGF. Je dobře známo, že NGF zachraňuje PC12 buňky před programovanou smrtí buněk (např. Rukenstein a spol.: *J. Neuroscience* **11**, 2552 (1991)). Tato pozorování tedy ukazují, že je možné, že podobné odpovědi podporující přežití jsou zprostředkovány sloučeninami podle předloženého vynálezu. Všechny tyto vlastnosti poskytují další využití těchto sloučenin při potenciálním léčení pacientů s Alzheimerovou chorobou.
- 20 Aktivita podobná neurotropní těchto agonistů podle předloženého vynálezu v neuronových buňkách, která závisí také na přítomnosti NGF, možná znamená, že tyto sloučeniny vykazují neurotropní aktivity v souvislosti s některým signálem (některými signály) zprostředkovaným(i) NGF receptory. Jednou z možností je to, že tyto účinky jsou nepřímé via m1AChR–zprostředkované zvýšené uvolňování amyloidních prekurzorových proteinů (APP), viz výše. Je třeba poznamenat, že endogenní APP jsou nutné pro normální růst fibroblastických buněk a mohou stimulo-
- 25 vat proliferaci těchto buněk (Saitoh a spol.: *Cell* **58**, 615 (1989), Mattson a spol.: *TINS* **16**, 409 (1993)). Je zajímavé, že je známo, že sekretované formy APP, mimo jiné aktivity, regulují výrůstek neuritů a podporují přežití neuronů (souhrnně viz: Mattson a spol.: *TINS* **16**, 409 (1993)). Smrt neuronových buněk u AD pravděpodobně zahrnuje sníženou produkci a/nebo životaschopnost neurotrofinů, což dále vede k přežití cholinergních neuronů. Jestliže k událostem podobajícím se neurotropním událostem indukovanými M1 agonisty dochází také v mozku, může to mít nejdůležitější klinický význam a může to tedy indikovat nové léčení AD.

Test 5

- 35 Sekrece amyloidního prekurzorového proteinu (APP) v plátcích mozku a v buněčných kulturách
- Existuje zvyšující se průkaznost, že β -amyloid přispívá k patologickému procesu vedoucímu k AD. Na základě „Amyloidní kaskádní hypotézy“ je AD důsledkem chybného metabolismu amyloidního prekurzorového proteinu (APP) (Mattson a spol.: *TINS* **16**, 409 (1993)). Aktivace mAChR, a zvláště m1 subtypu, zvyšuje sekreci APP in vitro (Nitsch a spol.: *Science* **258**, 304 (1992), Buxbaum a spol.: *PNAS US* **89**, 10075 (1992), Lahiri a spol.: *Biochem. Int.* **28**, 853 (1992)). Podle dalšího aspektu tohoto vynálezu tedy sloučeniny obecného vzorce I, zvláště ty, které vykazují selektivní m1 agonistickou aktivitu a zvýšené uvolňování APP, mohou být prospěšné nejen při léčení AD, ale i při zpoždování její progrese nebo dokonce při prevenci AD.

- 50 Způsobem vyhodnocování APP sekrece je způsob Westernova imunoblotování (Nitsch a spol.: *PNAS* **90**, 5191 (1993)). Používali jsme 22C11 monoklonální anti-APP, který je široce rozšířen při detekci APP. Tato protilátka je směřována proti amino-koncové oblasti APP a identifikuje všechny až dosud popsané APP izoformy. Nedetekuje amyloidní nebo C-koncové APP fragmenty vytvořené po APP sekreci. Pro vyhodnocení účinků nových sloučenin na APP uvolňování byly buněčné linie transfektované m1 receptory kultivovány na deskách s 12 jamkami (v některých případech na deskách se 6 jamkami) podle Pinkase-Kramarského a spol. (*J. Neurochem.* **59**, 2158 (1992)). Po testované období byly přidávány ligandy ze sterilního stonásobného zásobního roztoku. Pokusy byly ukončeny dvojím promytím desek médiem bez séra. Buňky byly seškra-

- bány z desek v ochlazeném fosforečnanovém/solném pufru (pH 7,4, PBS). Po odstředování (10 min, 10000 x G) se supernatanty odstraní a pelety se suspendují v 0,1 ml studeného lyzačního pufru obsahujícího směs proteázových inhibitorů (50mM Tris:HCl, pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1mM PMSF, 5 jednotek aprotininu na ml, 5 µg pepstatinu A na ml, 5 µg leupeptinu na ml). Pelety se pak podrobí působení ultrazvuku po dobu 5 vteřin při maximálním nastavení (Branson sonicator, model 130) a opět se odstředují. Supernatanty extraktu buněčné membrány se přenesou do čistých zkumavek. Odeberou se vzorky pro stanovení proteinů Lowryho způsobem.
- Pro test APP se stejná množství proteinu (typicky 100 µg na pás) zředí vzorkem pufru obsahujícím 0,6% SDS a 1% 2-merkptoethanol a nanesou se na 10% akrylamidové/SDS minigely (Hoeffer Scientific). Na každý gel se nanesou předem obarvené standardy molekulové hmotnosti (Sigma). Gely se pak vyvíjejí za konstantního proudu 25 mA/gel při 4 °C. Blotování se provádí při 100 mA po dobu 16 až 18 h při 4 °C s použitím nitrocelulózové membrány. Následující stupně se provádějí za teploty místnosti. Membrány se blokují 1 h ponořením do PBS obsahujícího 10 % nízkotučného mléka. Po tomto stupni následuje trojí promytí po dobu 5 minut v PBS obsahujícím 0,05 % Tween-20 a 0,1 % BSA (PBST). Anti-APP monoklonální protilátka (klon č. 22C11 od Boehringer Mannheim (kat. č. 1285-262)) se přidává ve zředění 1:200 (0,25 µg/ml, IgG) v PBST pufru 2 h při teplotě místnosti nebo 18 h při 4 °C. V některých pokusech byly podobné bloty sondovány kontrolním myším IgG v podobné koncentraci. Po tomto stupni následují 3 x 5minutové promývací stupně v PBST. Druhé kozí anti-myší IgG protilátky navázané na křenuvou peroxidázu (od firmy Jackson Immunochemicals, kat. č. 115-035-003) se používají v zředění 1:2000 v PBST po 1 h, následuje promytí jak shora uvedeno. Vybarvení imunoblotů se provádí za teploty místnosti po dobu 15 až 30 minut čerstvým roztokem 4-chlornaftolu (0,2 mg/ml v TBS obsahujícím 16 % ethanolu) a peroxidu vodíku (0,01% (hmotn.)). Vybarvené bloty se fotografují (Kodak TMAX negativní film) a vyhodnocují LBK UltroScan KL laserovým scannerem nastaveným na velikost vertikálního intervalu 40 µm a horizontální šířku štěrby 2,4 mm. Každý pás se vyhodnocuje třikrát v nepatrně rozdílných polohách. Získaná data znamenají střední hodnoty optické hustoty.
- Tímto způsobem se změří množství APP zůstávající ve frakci buněčné membrány po inkubaci (typicky po 24 h) s testovanými sloučeninami. Menší množství APP zůstávající v membránách po takové inkubaci s agonisty se považují za indikaci toho, že buňkami je sekretováno více APP. Tento typ měření je odpovídající jestliže se uvažuje schopnost muskarinových agonistů snižovat akumulaci β-amyloidů u Alzheimerovy choroby, protože pouze membrána související s APP, na rozdíl od sekretovaných forem APP, může poskytovat zvýšení β-amyloidu. Pro měření APP, který je sekretován do média buněčné kultury („upravené médium“) jsme museli toto upravené médium zahustit mikrofiltračními membránami Amicon (s průchodem mol. hmotn. 30 000). Po koncentračním stupni se množství proteinu ve vzorcích změří způsobem podle Bradforda (Bio-Rad souprava č. 500-0006) s hovězím gamaglobulinem jako standardem. Na elektroforézy s polyakrylamidovým gelem (PAGE) se nanesou stejná množství proteinu. Množství APP ve vzorcích se analyzují imunoblotováním s 22C11 monoklonální anti-APP protilátkou, je shora popsáno. Molekulární hmotnosti se vyhodnocují podle předem obarvených standardů (Sigma), které jsou zahrnuty do každého gelu.
- Výhodné jsou sloučeniny obecného vzorce I s maximální rychlostí sekrece APP v buněčných kulturách vyšší než 125 % (vzhledem k základu, který je vzat jako 100 %). Příklady takové aktivity lze nalézt u sloučeniny AF160(Des), AF179, AF185, AF261, AF263, AF265 a AF267.
- Aby bylo možné zpracovávat větší množství vzorků současně, byly provedeny některé studie způsobem tečkového blotování (na jedné membráně se může současně zpracovat 96 teček). Podle tohoto způsobu se upravené médium stimulovaných PC12M1 buněk přímo aplikuje na nitrocelulózové membrány ve vakuu (bez předcházejícího zahuštění). Tyto membrány se pak sondují podobně jako při imunoblotovacím postupu. Oddělením sekretované APP na PAGE byly také

analyzovány podrobné studie závislosti odpovědi na koncentraci a na čase. Výsledky těchto studií a výsledky získané ze studií tečkového blotování jsou v dobrém souhlasu. Studie APP sekrece buňkami transfektovanými m1AChR byly tedy prováděny s novými sloučeninami a také použitím způsobu tečkového blotování a 1h inkubace. Plnými agonisty v tomto testu jsou některé ze sloučenin podle vynálezu, jako je AF261, AF263, AF265 a AF267.

Desenzibilizace m1AChR–zprostředkované APP sekrece je silnější během prodloužených inkubací s CCh při srovnání s částečnými agonisty podle tohoto vynálezu. Toto vysvětlení je zvláště přitažlivé, jestliže se uvažují naše data o desenzibilizaci signálů uvolňování arachidonové kyseliny (AA) v kombinaci s nedávným návrhem Emmerlinga a spol. (BBRC 197, 292 (1993).), že AA se uvolňuje při stimulaci APP sekrece. Naše data by naznačovala, že některé z nových sloučenin mohou být vhodnějšími než vysoce účinní agonisté při klinickém použití pro snížení hladin APP souvisejících s buňkami po dlouhá období. Sloučeninami, které vykazují minimální desenzibilizaci v testu uvolňování AA, jsou AF265 a AF267. Měření APP souvisejícího s buňkami po inkubacích s AF265 nebo AF267 po dobu 24 h (oboje při 100mM koncentraci) ukazuje zvýšené hodnoty APP, které bylo silnější u AF267 a téměř podobné účinky s CCh, zatímco AF265 měl slabší účinnost.

Data APP sekrece buněčnými kulturami stabilně transfektovaných m1AChR jasně ukazují, že některé z nových sloučenin mohou stimulovat sekreci APP a mohou tedy přispívat ke snížené akumulaci amyloidu in vivo. Aby byla možná extrapolace dat tkáňové kultury na situaci in vivo, mělo by být s výhodou ukázáno, že tyto sloučeniny mohou stimulovat také APP sekreci v mozku. Byla tedy studována APP sekrece plátky krysí mozkové kůry. V typickém příkladu se plátky mozkové kůry krys připravené bezprostředně z čerstvě pitvané tkáně nasekají ve dvou kolmých směrech zařízením McIlwain Tissue Chopper (300 x 300 μ m) a promyjí se třikrát Krebsovým pufrém, který je nasycen kyslíkem. Promyté plátky se pak ekvilibrují 50 minut tímto pufrém při 37 °C. Po ekvilibračním stupni (který je potřebný pro odstranění zbytků buněk pocházejících z plátkování) se pufr zamění za Krebsův pufr obsahující 50 μ g/ml BSA (jako nosič proteinů) a směs inhibitorů proteáz (0,1mM PMSF a po 5 μ g/ml leupeptinu, pepstatinu a aprotininu–A). Plátky se umístí do zkumavek z umělé hmoty a stimulují se 1 h při 37 °C (2 h v jednom pokusu) s uvedenými koncentracemi testovaných sloučenin. Na konci inkubační doby se vzorky pufru izolují odstředováním, analyzují se na obsah proteinů, stejná množství proteinů se oddělí a zpracují imunoblotováním s 22C11 anti–APP monoklonální protilátkou pomocí PAGE podobně jako v pokusech s kultivovanými buňkami. Sekretovaný APP se projevuje jako dva proteinové pásy se zdánlivými molekulovými hmotnostmi 117 000 (hlavní pás) a 90 000 (vedlejší pás). Tyto APP pásy mohou odpovídat sekretovaným formám APP751 a APP695 (hlavní Kunitz–obsahující a Kunitz–deficitní formy APP). Mohou odpovídat také maturovaným a nematurovaným (neglykosylovaným) formám sekretovaného APP751. V současné době nejsou dostupná dostatečná data pro rozlišení mezi těmito dvěma možnostmi, protože 22C11 monoklonální protilátka používaná pro tyto studie identifikuje všechny formy sekretovaného APP. Jak CCh tak například AF267 (obě v 0,1mM koncentraci) zvyšují APP sekreci plátky krysí mozkové kůry 2 až 3krát při srovnání s kontrolní APP sekrecí. To bylo prokázáno jak pro proteinový pás o mol. hmotnosti 117, tak pro proteinový pás o mol. hmotnosti 90 000.

Pozorování sekrece APP plátky mozkové kůry jsou jedinečná. Až do dnešní doby jediný publikovaný průkaz sekrece APP mozkovou tkání in vitro je práce Nitsche a spol. (PNAS 90, 5191 (1993).), kteří popisují, že elektrická stimulace krysích hypocampálních plátek zvyšuje uvolňování APP. Je třeba poznamenat, že jejich studie nezahrnuje stimulaci agonisty receptoru. Naše pozorování tedy obsahují vynálezeckou činnost a jsou nová, jelikož poprvé ukazují regulaci APP sekrece v mozkové tkáni receptorovým ligandem, a zvláště M1 agonistou, jako je AF267. Výhodnými jsou ty sloučeniny, které stimulují APP sekreci plátek krysí kůry. Všechny tyto sloučeniny lze považovat za agonisty podle vynálezu schopné stimulovat druhé messengery podobně jako PI>25 % kontroly. Tato jedinečná pozorování mohou ukazovat na účinnost některých sloučenin při zpomalování ukládání A4–amyloidních peptidů v mozcích pacientů s Alzheimerovou chorobou.

Test 6: Fosforylace Tau proteinu v buněčných kulturách transfectovaných m1AChR a v plátcích kryší kůry

- 5 Tau (τ) je neuronově specifický protein související s mikrotubulem, který se hojně vyskytuje v axonech (tj. ve výběžku neuronů). Tau je exprimován jako několik izoform, všechny jsou odvozeny alternativním štěpením jediného genu (lidský tau má 6 izoform, které mají 352 až 441 aminokyselin). Funguje při stabilizaci mikrotubulů neuronových axonů. Jeho navázání na mikrotubuly je regulováno jeho fosforylací v různých místech (Mandelkow a Mandelkow: TIBS 18, 480 (1993)). Tato vazba dále reguluje axonální růst a stabilitu (Bass a spol.: J. Cell. Biol. 115, 1333 (1991), Mattson: Brain Res. 582, 107 (1992)). Jedním z charakteristických znaků Alzheimerovy choroby, vedle ukládání amyloidů v plácích, je akumulace tau nebo tau-derivátů v neurofibrilárních spleteninách (NFT). Tyto spleteniny možná odrážejí konečný produkt smrti neuronových buněk v nemocné mozkové tkáni. Četné studie prokázaly změny fosforylace tau proteinu ve vzorcích mozku po smrti pacientů s AD. Tento jev je nejlépe dokumentován zvýšenou imunoreaktivitou s monoklonální protilátkou ALZ-50, o které bylo ukázáno, že detekuje hyper-fosforylované formy tau v těchto vzorcích mozku (Vincent a Davies: PNAS 87, 4840 (1990), Vincent a Davies: Brain Res. 531, 127 (1990)). Bylo proto navrženo, že v procesu smrti neuronových buněk u AD mohou být zahrnuty změny v jemné rovnováze mezi tau-specifickými kinázami/fosfatázami a tedy, že opravy této možné nerovnováhy mohou mít potenciální terapeutickou hodnotu.

- Byla tedy studována úroveň fosforylace tau proteinů v buněčných kulturách stabilně transfectovaných m1AChR po stimulaci CCh nebo jednou z testovaných sloučenin. To bylo děláno tak, že se použije monoklonální protilátka tau-1, o které bylo ukázáno, že rozpoznává jenom de-fosforylované, ale nikoliv fosforylované, izoformy tau (Mandelkow a Mandelkow: TIBS 18, 480 (1993)). Po inkubacích buněk nebo plátek kryší kůry s agonisty různě dlouhou dobu byly buňky nebo plátky třikrát promyty PBS, seškrabány v PBS obsahujícím 0,2mM EDTA a odstředovány 5 minut při 10000 x G. Membránové pelety byly analyzovány na obsah proteinů a stejná množství proteinů byla nanesena na PAGE pro imunoblotování s tau-1 protilátkou. Měření imunoreaktivity byla prováděna podobně jako při studiích APP (použitím video-denzitometru) s tou výjimkou, že druhá protilátka navázaná na peroxidázu byla detekována způsobem ECL (Enhanced Chemi-Luminescence) (souprava RPN-2109, Amersham, Anglie).

- 35 Je pozoruhodné, že jak CCh tak testování agonisté zvyšovaly tau-1 imunoreaktivitu a že toto zvýšení bylo úplně blokováno atropinem. Zarážející zvýšení CCh-zprostředkované tau-1 imunoreaktivity bylo pozorováno u buněk kultivovaných s NGF (50 ng/ml) po dobu 3 dnů před stimulací muskarinovými ligandy. Podobné pokusy používající rozmanité koncentrace CCh nebo testovaného agonisty ukazovaly, že zvýšená tau-1 imunoreaktivita vyžadovala relativně vysoké koncentrace ligandů (10 až 100 μ M).

- Byla také měřena tau fosforylace v plátcích kryší mozkové kůry po stimulaci CCh při srovnání s předloženými sloučeninami. Překvapivě bylo opět zjištěno, že opět testování muskarinovi agonisté jsou schopni snižovat tau fosforylaci.

- 45 Muskarinovi agonisté jsou tedy schopni snižovat tau fosforylaci aktivováním transfectovaných m1AChR v buněčných kulturách a co je důležitější – v plátcích mozku. Účinky těchto agonistů se zdají být dlouhodobé, jsou zřejmě dokonce po následujících inkubacích buněk se 100 μ M ligandů po alespoň 3 dny. Tato pozorování mohou znamenat, že selektivní M1-agonisté jsou schopni snižovat tau fosforylaci.

Tato pozorování jsou nová, jelikož podle našich nejlepších znalostí nebyl do dnešního dne prokázán žádný vzájemný vztah mezi cholinergním deficitem u Alzheimerovy choroby a akumulací fosforylovaných tau proteinových izoform v neurofibrilárních spleteninách typickou pro

nemocný mozek. Tato nová pozorování mohou být důležitá pro zpomalení progresu Alzheimerovy choroby M1 agonistou.

5 Závěrem lze shrnout: M1 agonisté mají četné účinky. Mechanismus působení m1 agonistů je tedy překvapivě složitější než bylo původně předpokládáno. S m1 agonisty souvisejí následující účinnosti in vitro (a možná in vivo):

1. navázání na a aktivace m1 receptorů,
2. rozdílná aktivace vybraných G-proteinů (např. Gq, ale ne Gs),
3. neurotropním-podobné a synergické účinky s NGF,
- 10 4. sekrece amyloidního prekurzorového proteinu (APP) a snížení β -amyloidů,
5. zvýšení podílu defosforylovaných tau proteinů,
6. účinky podobné NGF.

Všechny tyto účinky mohou být vzájemně spojeny do modelu, v němž aktivace m1AChR vede ke kaskádě vzájemně souvisejících událostí. Tyto komplexní mechanismy, které jsou podkladem m1 agonistické aktivity, mohou být spojeny do obecného scénáře, který vysvětluje abnormální APP zpracování, NGF-podobné deficity a cholinergní deficity u SDAT a AD. Důsledkem je to, že m1 agonisté podobně jako sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou být cennými při prevenci tvorby amyloidů podporováním selektivně a pozitivně cesty opracování sekretázy a mohou tedy podporovat působení neurotropinů u AD, díky jejich synergickému účinku s NGF. m1 agonisté mohou být tedy užiteční v cholinergní substituční strategii a také při zpoždování progresu AD. Předložené sloučeniny, které jsou m1 agonisty, jsou (na rozdíl od peptidů) relativně malé molekuly, které mají účinky podobné neurotrofním účinkům, podporují uvolňování a normální opracování APP a zvyšují defosforylované (nebo snižují fosforylované) tau proteiny. Působení m1 agonisty na buňky by tedy mohlo posunout opracování APP z amyloidogenní lysosomální cesty na normální sekreční cestu a tedy cholinergní léčení AD by již neměla mít dlouhodobější vliv na β -amyloidní ukládání (viz také Lahiri a spol.: *Biochem. Int.* **28**, 853 (1992)). A dále, jelikož někteří agonisté tohoto vynálezu kontrolovaným způsobem vykazují účinky podobné NGF, a zvláště v přítomnosti NGF, tyto sloučeniny mohou mít významnou cenu v budoucím léčení AD/SDAT. Tímto způsobem lze lépe regulovat výrůstek neuritů. Navíc mají naše sloučeniny dlouhotrvající příznivý účinek na výrůstek neuritů v přítomnosti NGF. Lze tedy spekulovat, že budoucí možné léčení používající takové růstové faktory, jako je NGF, by u AD/SDAT pacientů mohlo vyžadovat méně častá podávání samotného růstového faktoru, jestliže se podává současně s m1 agonistou. Je třeba poznamenat, že podávání NGF do mozku je nejobtížnějším úkolem, jelikož tato sloučenina nepřekračuje bariéru krve mozku. Jakmile bude jednou tento problém vyřešen (např. speciálním dodávacím zařízením), bude stále ještě vyžadovat opakované podávání sloučenin podobajících se NGF. m1 agonisté mohou v tomto směru snižovat počet potřebných opakovaných podání NGF, jelikož tyto agonisté prodlužují účinky NGF (alespoň in vitro). Je zajímavé, že klinické pokusy s NGF (icv.) u 2 AD pacientů vykazovaly velmi vážné nepříznivé účinky (silná bolest, zmatenost, zhoršení minimálního skóre) (Třetí Springfieldské sympozium o Alzheimerově nemoci, 11. až 15. května 1994, Springfield, Ill. USA). Použití m1 agonistů, jako jsou agonisté podle předloženého vynálezu, kteří působí synergicky s NGF, může mít velkou cenu při snižování vedlejších účinků souvisejících s NGF u lidí, jelikož by se pak mohly používat nižší dávky NGF.

45 Test č. 7: Farmakologické a toxikologické profily

Tato studie se provádí pozorováním zvířat po iv. nebo orálním (myši) nebo orálním (intragastri-
rické u krys) podání 3 až 6 dávek každé sloučeniny. Výsledky jsou souhrnně uvedeny v tabulce 5.

50 V různých dobách po podání (10, 20, 30, 45, 60, 120 a 240 minut a 24 h) byla zvířata podrobena podrobným pozorováním změn jejich obvyklého chování, reflexů a autonomních účinků. 24 h po podání testovaných sloučenin byla zaznamenána úmrtnost. Tělesná teplota krys byla měřena

- 5 teploměrem Tele-Thermometer (model 46 TUC). Mezi farmakologické parametry a parametry sledující chování patří: slinění, červenání kolem nosu a tlamičky, chromodakryorea, uklidnění, ataxie, cyanóza, třes, konvulze, hypotermie, opistotonus, úzkost při dýchání, diarea, hladovost, vztyčení chlupů, úmrtnost, změny průměru pupily, test na točící se tyčce, hypo- nebo hyper-aktivita a vokalizace. Některé z testovaných sloučenin nejsou toxické až do 500 mg/kg (p.o., myši a krysy).

Tabulka 5

10

Farmakologické a toxologické profily u myši a krysy

sl. dávk- AF ka*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
133 50*														0/5
myš 100*														3/5
200*														5/5
400														1/5
134 10*														0/5
myš 25*														0/5
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
kry-200	4/4	4/4	4/4	2/4	1/4	1/4	1/4	0/4		1/4	4/4	0/4	0/4	1/4
sy 500	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	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	NT	NT	0/4
(S) 16	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4			0/4	1/4			0/4
myš 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

Tabulka 5 (pokračování)

sl. dáv- AF ka*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
kry- sy	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
	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
	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
	100	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	1/4	4/4	4/4	0/4	0/4
	200	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/4	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	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
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
kry-250	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4
sy	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
myš	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	3/4	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	4/4	3/4	0/4	3/4		0/4
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
myš	50	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4		0/4
	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
kry- sy	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
	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
	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
	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

* mg/kg, podáváno orálně, pokud není uvedeno jinak,
 a podáváno intravenózně.

5

Tabulka 5 (pokračování)

sl.	dáv-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
AF	ka*														
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
myš	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
	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
myš	60	1/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	4/4			0/4
	144	3/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	3/4			0/4
	288	4/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		0/4	3/4	2/4			0/4
	500	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4		2/4	0/4	4/4			0/4
kry-	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
sy	125	4/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4		0/4	4/4	4/4	0/4	0/4
	250	3/4	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4		0/4	4/4	3/4	0/4	0/4
	500	4/4	3/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4		1/4	4/4	4/4	0/4	0/4
180	63	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
myš	125	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4		2/4	0/4	0/4			0/4
	250	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4		3/4	0/4	0/4			0/4
	500	4/4	3/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4		4/4	0/4	0/4			0/4
kry-	31	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
sy	62	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	1/4	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	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Tabulka 5 (pokračování)

sl.	dáv-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
AF	ka*														
185	31	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	0/4	3/4	0/4	0/4		0/4
myš	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
	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
kry-	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
sy	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	3,8	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
kry-	7,6	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4	0/4	4/4		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
sy	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
kry-	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
sy	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
myš	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

5 Klíč k tabulce 5:

- 1 znamená slinění,
- 2 znamená chromodakryorea (krysy) nebo slzení (myši),
- 3 znamená uklidnění,
- 4 znamená ataxie,
- 10 5 znamená cyanóza,
- 6 znamená třes,
- 7 znamená konvulze,
- 8 znamená hypotermie,
- 9 znamená mydriáza,
- 15 10 znamená úzkost při dýchání,

- 11 znamená diareu,
- 12 znamená hladovost,
- 13 znamená vztyčení chlupů a
- 14 znamená úmrtnost.

5

V další části tohoto spisu bude uvedena diskuze získaných výsledků.

A160

- 10 AF160 je relativně účinný muskarinový agonista, který je spíše centrální než periferní (např. hypotermie versus slinění), a je alespoň pětikrát méně toxický při srovnání s AF102B. Pozoruhodným zjištěním u této sloučeniny byl chybějící třes u krys až do nejvyšších testovaných dávek (500 mg/kg, p.o.) a trochu třesu u myši v dávkách > 125 mg/kg, p.o. Podobné projevy byly získány u methylanalogu AF160, jmenovitě AF178, kdy nebyly detekovány žádné třesy ani u myši
- 15 ani u krys až do 500 mg/kg, p.o. Myši jsou citlivější na tyto sloučeniny než krysy, jelikož k periferním i centrálním vedlejším účinkům dochází při nižších dávkách.

- U krys bylo zjištěno, že AF160 je silným agonistou. Příznaky byly zřejmé v dávce až do 25 mg/kg. Pro hypotermii a hladovost byly získány hodnoty ED₅₀. Rozsah a nástup příznaků byly
- 20 závislé na dávce. Hypotermní účinek byl dlouhotrvající, delší než 4 h.

U sloučeniny AF160 jsou pozoruhodné 4 aspekty:

1. Tato sloučenina je zřetelně více CNS než PNS aktivní (např. k hypotermii dochází při nižší
- 25 dávce než ke slinění).
2. Tato sloučenina má CNS selektivitu, protože nebyly pozorovány všechny CNS účinky (např. hypotermie, ale chybějící třes).
- 30 3. Trvání pozorovaných účinků je dlouhé.
4. Při nejvyšší dávce (500 mg/kg) nebyla pozorována žádná úmrtnost ani u myši ani u krys.

AF160(Des)

35

- Po podání 125 mg/kg AF160(Des) bylo u jednoho zvířete ze čtyř po 45 minutách po podání pozorováno slinění, hypotermie a diareu. Po zvýšení dávky na 500 mg/kg se zvýšil počet zvířat ve skupině, které měly tyto příznaky, navíc se přidaly další zřetelné příznaky vztyčení chlupů a uklidnění. Hypotermní účinek nebyl závislý na dávce. Tato sloučenina nevyvolávala žádné jiné
- 40 centrální nebo autonomní účinky. Tato sloučenina je relativně neaktivní, pokud jde o cholinergní vedlejší účinky. V případě AF160(Des) byly zjištěny vedlejší účinky v dávkách > 246 mg/kg, p.o. u krys.

- U myši bylo po podání 240 mg/kg AF160(Des) pozorováno slzení, diareu a mydriáza. Ve vyšších
- 45 dávkách až do 1000 mg/kg byly zřejmé další příznaky, jako je slinění, uklidnění a hypotermie. Rozsah a intenzita většiny příznaků (vyjma slzení) byly závislé na dávce. Ani při nejvyšší dávce 1000 mg/kg nebyla pozorována žádná úmrtnost. Místní aplikace 1 mg (prahové množství) AF160(Des) do oka vedla během 15 minut k mydriáze. Naproti tomu atropin, používaný pro svůj známý lokální mydriatický účinek jako referenční léčivá sloučenina, vedl k mydriáze během
- 50 45 minut při dávce pouze 40 µg. Tento výsledek jasně ukazuje, že AF160(Des) indukovaná mydriáza je centrálního původu.

AF163

Jedinými účinky sloučeniny AF163 u krys v rozmezí dávek 50 až 400 mg/kg bylo slinění a červénání kolem nosu a tlamičky. Tyto účinky měly krátký nástup (10 minut) a krátké trvání (20 minut). Zatímco u zvířat, která vykazovala slinění, bylo toto slinění závislé na dávce, červénání kolem nosu bylo zjištěno pouze u jednoho zvířete v dávce 100 mg/kg. Lze tedy shrnout, že po podání této sloučeniny krysám byly pozorovány pouze autonomní účinky.

U myší, kromě vokalizace pozorované u jednoho zvířete při nejvyšší testované dávce (400 mg/kg), neměla tato sloučenina jakékoliv jiné zjevné účinky. U sloučeniny AF163 nebyly detekovány žádné zjevné periferní a centrální vedlejší účinky až do nejvyšší testované dávky (400 mg/kg, p.o.). AF163 může být pro AF160 považována za pro-drogu podobně jako dithioanalog RS86 (viz Bolliger a spol. v „Alzheimer's and Parkinson's Disease; Strategies in R&D“, Fisher a spol. (red.), Plenum Press, str. 585 (1986)).

AF177

U myší byla 10 minut po podání 31 mg/kg pozorována hypotermie, hypoaktivita a třes. Po zvýšení dávky na 62 mg/kg se četné příznaky zvýšily. Uklidnění, ataxie a podání z rotující tyčky byly pozorovány 20 minut po podání u 4/4 myší. 30 minut po podání u 1/4 myší došlo k úmrtí. Jestliže se dávka zvýší na 125, 250 a 500 mg/kg, bylo pozorováno také slinění, křeče a úmrtnost 4/4 myší, ale nástup a trvání příznaků byly progresivně mnohem silnější. Vypočtené hodnoty ED₅₀ ukazují, že AF177 má hlavně centrální účinky. AF177 může být považována za pro-drogu pro centrálně aktivního a potenciálního muskarinového agonistu.

AF178

U myší byla vidět až do 1 h po podání 60 mg/kg snížená motorická aktivita, slinění, slzení a diarea. Zvýšení dávky na 500 mg/kg vedlo k dalším příznakům, jako je úzkost z dýchání, snížený výkon na rotující tyčce, třes a mydriáza. Rozsah a průběh většiny příznaků byly závislé na dávce. Obecně platí, že zvýšení dávky prodlužuje aktivitu. Např. diarea, třes, mydriáza atd. trvaly přibližně 4 h. Je užitečné uvést, že při dávce 500 mg/kg byla u jednoho zvířete během 20 minut po podání pozorována palpitace, která trvala 10 minut. I když dávka 500 mg/kg vyvolávala významné toxikologické příznaky, nebyla zaznamenána žádná úmrtnost. Odhadovaná LD₅₀ by tedy byla vyšší než dávka 500 mg/kg.

U krys bylo jediným zjevným účinkem podání 62,5 mg/kg AF178 slinění. Při zvýšení dávky na 125 mg/kg bylo patrné více změn, jako je chromodacryorea, hypotermie, diarea a hladovost. Rozsah a intenzita těchto příznaků se s dávkou zvyšovaly. Úzkost z dýchání byla zřejmá pouze u jediného zvířete při dávce 500 mg/kg po 5 minutách po injekci. Tato sloučenina má relativně široké hranice bezpečnosti.

AF180

U krys bylo jediným příznakem po podání 125 mg/kg AF180 slinění. Bylo zřetelné 20 minut po podání a trvalo 40 minut. Další zvýšení dávky na 500 mg/kg zvýšilo trvání slinění na 230 minut. Při této dávce byla u tří zvířat 15 až 240 minut po injekci zaznamenána také hypotermie. Při této dávce nebyly pozorovány žádné centrální nebo autonomní účinky.

U myší byla 20 minut po podání 125 mg/kg pozorována hypotermie a mydriáza. Po zvýšení dávky na 500 mg/kg se počet zvířat ve skupině vykazujících tyto příznaky zvýšil a navíc přibýly zřetelné příznaky slinění, slzení a uklidnění. Trvání těchto příznaků bylo delší než 1,5 h po podání 500 mg/kg. Tato sloučenina nevykazovala žádné centrální nebo autonomní účinky.

AF185

U myší byla po podání 62,5 mg/kg AF185 pozorována mydriáza. Po podání vyšších dávek této sloučeniny, až do 500 mg/kg, byly zřetelné další příznaky, jako je slinění a hypotermie. Ani v nejvyšší dávce (500 mg/kg) nebyl pozorována žádná úmrtnost.

U krys, s výjimkou červenání kolem nosu a tlamičky, pozorovaného u jednoho zvířete při nejvyšších testovaných dávkách (500 mg/kg), tato sloučenina neposkytovala žádné jiné zjevné účinky. Lze uzavřít, že AF185 je velmi bezpečnou sloučeninou.

AF261

U krys byla hypotermie (typický CNS účinek) jediným účinkem, ke kterému dochází při dávce 7,5 mg/kg AF261. Byl zřejmý 10 minut po podání a trval 50 minut. Po zvýšení dávky na 15,6 mg/kg byly během 10 minut zřetelné další účinky, jako je slinění, chromacyorea, hypoaktivita, ataxie a diareta. Při vyšších dávkách až do 250 mg/kg byly zřetelné další příznaky, jako je červenání kolem nosu a tlamičky, třes, křeče, opistotonus, hladovost a vztyčení chlupů. Tyto znaky bylo možno detekovat 5 až 10 minut po podání. Intenzita a rozsah většiny těchto příznaků byly závislé na dávce. K úmrtnosti 4/4 myší došlo pouze při nejvyšší testované dávce (250 mg/kg), 45 minut po podání.

AF265

U krys byla jediným příznakem podání 250 mg/kg AF265 hypotermie (typický CNS účinek). Tento účinek byl zřejmý 10 minut po podání a trval 110 minut. Žádné jiné centrální nebo autonomní účinky nebyly po podání této sloučeniny pozorovány. Tato sloučenina je tedy pozoruhodná svým jenom CNS účinkem.

Test č. 8: Účinky AF134 u naivních krys

Vlivy AF134 na paměť a schopnost učení byly vyhodnocovány ve stupni pasivního vyhýbání se úkolu u naivních krys (tj. zvířat, která dosud nebyla podrobena pokusům). Typ chování a provedení jsou popsány Fisherem a spol.: *Neurosci. Lett.* 102, 325 (1989). Čtyři skupiny (20 krys/skupina) naivních krysích samců Sprague–Dawley, 200 až 300 g, ve stáří 3 až 4 měsíce (Charles River Breeding, Anglie) byly léčeny jednou z následujících dávek AF134: 1, 5, 10 mg/kg, intraperitoneálně (i.p.), jedné skupině byl podán solný roztok (1 ml/kg, i.p.).

U krys, jimž byl podán AF134, nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi zachováním latence před–šokovým krys (kterým byla sloučenina podána injekčně 30 minut před šokem), a post–šokových krys (kterým byla sloučenina podána injekčně 60 minut po šoku).

V jiném typu pokusu byla sloučenina AF134 srovnávána se skopolaminem (protimuskarinová sloučenina) v osmiramenném kruhovém bludišti u naivních krys (typ chování a provedení jsou popsány Fisherem a spol.: *Neurosci. Lett.* 102, 325 (1989).). Skupině 14 naivních krys byl podán skopolamin (0,2 mg/kg, i.p.) nebo solný roztok (1 mg/kg, i.p.) 20 minut před proběhnutím bludiště. Všechna ramena bludiště byla opatřena návnadou. Každá krysa dostala obě léčení s intervalem tří dnů mezi léčeními (Deset dnů testování následovalo po 10 dnech trénování). Stejný pokus u stejných krys byl zopakován s AF134 (5 mg/kg, i.p.) a se solným roztokem (1 ml/kg, i.p.). Skopolamin při použité dávce vykazoval, jak bylo očekáváno, typický anticholinergní „amnestický“ účinek. AF134 však nezpůsobil žádnou změnu v chování krys.

AF134, který má antagonistickou aktivitu na M1 (na základě na vazebných studiích) a M3 muskarinové receptory (na základě preparátu ilea křečka), nevede ke zhoršení poznávání a může být tedy užitečný při léčení choroby z pohybu, Parkinsonovy choroby, směsné Parkinsonovy

a Alzheimerovy choroby, maniakální deprese, úrazu hlavy člověka a rozmanitých periferních poruch při léčení akutní rinitidy, vředové choroby a astma.

Test č. 9: Studie chování u zvířecích modelů

5

AF160 a AF102B – bludiště s radiálními raménky

Byl zkoumán potenciální příznivý účinek dávek AF160 (3 a 5 mg/kg, p.o.) a AF102B (3 mg/kg, p.o.) při převracení deficitů paměti krys, jimž byl injekčně podán AF64A (1,5 nmol/2 µl/stranu). Tyto zvířecí modely do jistého rozsahu mimikovaly cholinergní hypofunkci SDAT (Fisher a spol.: J. Pharmacol. Expl. Therap. 257, 392 (1991).). V této studii bylo použito 80 krysích samců Sprague–Dawley ve stáří 4 až 6 měsíců (340 až 580 g). Interval mezi operací a testováním chování byl 2 až 3 měsíce. Jeden týden před počátkem testování chování byly krysy přeneseny do jednotlivých klecí a byly omezeně krmeny dokud nedosáhly přibližně 85 % své hmotnosti při srovnání s neomezeným krmením. Potom dostávaly krysy 5 až 6 kousků Altrominu (15 g) denně, aby si udržovaly stálou tělesnou hmotnost. Krysy měly volný přístup k vodě. Místnost byla osvětlena 12 h denně (6.00 až 18.00) a test chování byl prováděn během dopoledne.

Testování chování: 40 krys, kterým byl injekčně podán AF64A, a 40 krys, kterým byl injekčně podán solný roztok, byly náhodně rozděleny do čtyř podskupin, které byly označeny AF160 3/mg/kg, AF160 5 mg/kg, AF102B 3 mg/kg (10 ml/kg, p.o.) a DDW. Během prvních dvou dnů testování chování byly krysy trénovány podle procedury 8 z 8ramenné návnady, aby se seznámily s bludištěm a s posilujícími peletami (přesně 45 mg). V tomto stadiu byly krysy umístěny do centrální arény a byl jim nechán volný přístup ke všem 8 ramenům s návnadou. Každé sezení bylo ukončeno, když všech osm pelet bylo sebráno nebo po uplynutí 15 minut, podle toho, co nastalo jako první. Během třetího a čtvrtého dne byly pelety umisťovány jenom na konce ramének. Jinak byl ostatní postup stejný jako při předcházejícím tréninku. Testování se provádělo během druhého týdne pokusu. Během této doby byly jednou denně, po dobu 5 dnů, 60 minut před testováním, podávány AF160, AF102B nebo DDW (použito jako kontrola).

Analýza dat: Všechny pohyby v bludišti byly zaznamenávány, byl zaznamenáván uplynutý čas a také správné a nesprávné odpovědi. Pro vyhodnocení účinku AF160 nebo AF102B během testování pro srovnání s obdobím tréninku, který slouží jako základ pro vyhodnocování, byl dělán trojcestný ANOVA (2 x 4 x 2) s opakovanými proměnnými (bloky trénování nebo testovací dny) a dvěma neopakovanými proměnnými (bloky trénování nebo testovací dny) a dvěma neopakovanými proměnnými (injekce AF64A/solný roztok a léčení různými dávkami AF160 a AF102B nebo DDW). Potom byla provedena srovnání na základě hlavních rozdílů v účincích.

Výsledky: Pokud jde o přesné volby z 8 návštěv, byla zjištěna významná souvislost mezi skupinami x léčením x týdny [$F(2/48)=3,95$; $P<0,025$]. Podrobněji – během jak doby trénování tak doby podávání léčivé sloučeniny vykazovaly krysy, kterým byl injekčně podán AF64A, významně méně správné volby než krysy, kterým byl podáván solný roztok ($P<0,001$). Obě léčivé sloučeniny, AF102B (3 mg/kg) a AF160 (3 mg/kg) zlepšovaly výkon krys, kterým byl podán AF64A během druhého týdne, při srovnání s tréninkovými dny ($P<0,001$). Během druhého týdne obě skupiny, AF160 (3 mg/kg) a AF102B (3 mg/kg), dosáhly stejného výkonu, který byl významně vyšší než u krys, kterým byl podán AF64A, ale které byly léčeny vodou ($P<0,01$). AF160 v dávce 5 mg/kg neměl na tento parametr žádný významný vliv. při srovnání s krysami, jimž byl injekčně podán solný roztok, výkon krys léčených vodou se během druhého týdne při srovnání s prvním týdnem ($P<0,01$) zlepšil (5 %). Podobné zlepšení (7,5 %) bylo zjištěno u krys léčených AF160 (3 mg/kg) ($P<0,001$). AF102B (3 mg/kg) neměl na tento parametr u krys, jimž byl injekčně podán solný roztok, žádný vliv.

Pokud jde o celkové chyby, byl nalezen významný vztah mezi skupinami x léčeními x týdny [$F(3/64)=3,49$; $P<0,0025$]. V obou týdnech počet chyb krys, kterým byl injekčně podán AF64A, byl významně vyšší než krys, kterým byl injekčně podán solný roztok ($P<0,001$). Počet chyb ve

všech čtyřech skupinách krys, jimž byl injekčně podán AF64A, se významně snížil ve druhém týdnu při srovnání s prvním týdnem: AF64A + voda –20 % ($P<0,01$), AF64A + AF160–3 mg/kg –16 % ($P<0,001$), AF64A + AF160–5 mg/kg – 15 % ($P<0,01$) a AF64A + AF102B–3 mg/kg – 30 % ($P<0,001$). I když všechny čtyři skupiny zlepšily svůj výkon, pouze skupina AF102B–3 mg/kg měla vyšší výkon než skupina AF64A + voda. U krys, jimž byl injekčně podán solný roztok, AF160–3 a 5 mg/kg významně zlepšily výkon v druhém týdnu při srovnání s prvním týdnem ($P<0,01$, respektive $P<0,001$). AF102B–3 mg/kg vedl ke zhoršení výkonu, tato skupina udělala více chyb druhý týden při srovnání s prvním týdnem ($P<0,001$).

Pokud jde o celkový čas, významná interakce byla zjištěna mez skupinami x léčeními x týdny [$F(2/48)=3,29$; $P<0,05$]. Zlepšení v čase bylo zjištěno u podskupin, kterým byl injekčně podán AF64A s výjimkou AF64A + AF160–5 mg/kg: AF64A + voda – 31 % ($P<0,01$), AF64A + AF160–3 mg/kg – 47 % ($P<0,001$) a AF64A + AF102B–3 mg/kg – 21 % ($P<0,01$). U krys, kterým byl podán solný roztok, bylo zjištěno významné zlepšení v čase při kombinaci sůl + voda – 54 % ($P<0,001$) a sůl + AF160–3 mg/kg – 37 % ($P<0,001$). AF102B neměl žádný vliv na krysy, jimž byl injekčně podán solný roztok při těchto parametrech, možná kvůli „podlahovému efektu“. AF160–5 mg/kg neovlivňoval významným způsobem krysy, jimž byl podán injekčně solný roztok, i když tendence zlepšení byly pozorovány.

Závěry: 1. Krysy, kterým byl injekčně podán AF64A (1,5 nmol/2 μ l/stranu), vykazovaly významné zhoršení v parametrech správných voleb, počtu chyb a celkového času při srovnání s krysy, kterým byl injekčně podán solný roztok.

2. AF160 (3 mg/kg) významně zlepšoval výkon krys, jimž byl injekčně podán AF64A (při srovnání s placebo) v parametrech správných voleb a celkového času. Bylo zjištěno, že vyšší dávka 5 mg/kg byla účinná pouze u parametru počtu chyb při srovnání s kontrolou (ale nikoliv s placebo).

AF160(Des) – MWM úkol (Morris Water Maze)

Předmětem této studie bylo vyhodnotit schopnost testovaného materiálu AF160(Des) převracet zhoršené rozpoznávání u myši, jimž byl injekčně podán AF64A, použitím MWM úkolu podle způsobu popsaného Fisherem a spol.: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 257, 392 (1991). AF160(Des) byl testován ve dvou dávkách: 1 a 3 mg/kg p.o. 38 krys, jimž byl injekčně podán AF64A (3 nmol/2 μ l/stranu), a 42 krysy, jimž byl podán solný roztok, byly náhodně rozděleny do 4 podskupin, kterým byly podány různé dávky AF160 (Des) (1 a 3 mg/kg, p.o.) nebo DDW (10 ml/kg, p.o.). Léčivá látka byla podávána jednou denně po dobu 5 dnů, 60 minut před testováním.

Během testování chování nebyly pozorovány žádné konzistentní vedlejší účinky. Byly získány následující výsledky:

1. Injekce AF64A (3 nmol/2 μ l/stranu) vedly k významnému zhoršení výkonu, jak ukazují jak parametry latence úniku tak délky cesty.

2. AF160(Des) v dávce 3 mg/kg zlepšoval výkon v třetím bloku tréninku jak krys, kterým byl injekčně podán AF64A, tak krys, kterým byl podán injekčně solný roztok.

Pozitivní účinek předpokládá použití různých dávek těchto sloučenin v budoucnu pro testování jejich možných příznivých účinků na nedostatky v učení a paměti.

AF185 – pasivní vyhýbání se (PA)

Tato studie zkoumá vliv AF185 v různých dávkách na zachování pasivního vyhýbání se u krys, kterým byl podán AF64A.

AF64A se podává injekčně bilaterálně (3 nmol/2 μ l/stranu, icv.). Získá se tak modelové zvíře (Fisher a spol.: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 257, 392 (1991)). Čtyři týdny po operaci se skupiny, jimž byl injekčně podán AF64A a solný roztok, náhodně rozdělí do čtyř podskupin po 10 až 11 krysách. Třem skupinám se podají různé dávky AF185 (1, 5, 10 mg/kg, p.o.) a jedné skupině DDW (10 ml/kg). AF185 se podává bezprostředně po šoku a krysy se testují o 72 h později. Pro experimentální detaily viz Fisher a spol.: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 257, 392 (1991).

Počáteční a retenční latence byly analyzovány odděleně dvoucestou ANOVA (2x4); injekce-AF64A/solný roztok versus dávky AF185 nebo DDW.

Pokud jde o počáteční latenci, nebyl nalezen žádný významný rozdíl mezi kteroukoliv z uvedených skupin.

Pokud jde o retenční latenci, byla nalezena interakce mezi skupinami a léčením ($F(3/75)=22,31$; $P<0,001$). Kontrasty jednoduchých hlavních efektů ukázaly, že retenční latence AF64A krysy DDW byla významně kratší než krysy, jimž byl podán solný roztok, léčených DDW ($p<0,001$). Retenční latence AF64A krysy léčených AF185 (1, 5 nebo 10 mg/kg) byla významně delší než pro AF64A + DDW ($p<0,001$). Nebyly zjištěny žádné jiné významné rozdíly.

Závěrem lze říci, že:

1. Krysy, jimž byl injekčně podán AF64A, vykazovaly významné zhoršení retenční latence při srovnání s krysami, jimž byl injekčně podán solný roztok.
2. Krysy, jimž byl injekčně podán AF64A a které byly léčeny AF185 (1, 5 nebo 10 mg/kg), vykazovaly retenční schopnost podobnou kontrolním zvířatům.
3. AF185 může znamenat potenciální sloučeninu pro léčení poruch paměti podobných poruchám pozorovaným u Alzheimerovy choroby.

U příkladů specifických sloučenin podle vynálezu byly provedeny podle systematické nomenklatury IUPAC následující opravy (v závorce jsou uvedena kódová čísla sloučenin tak, jak jsou používána v tomto spisu):

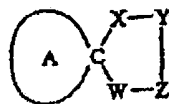
2,8-dimethyl-1-oxo-1-thia-4,8-diaza-spiro[4.5]dekan-3-on (AF262), 3-ethyl-8-methyl-1-oxa-4,8-diaza-spiro[4.5]dekan (AF268), 2,8-dimethyl-1-oxa-4,8-diaza-spiro[4.5]dekan (AF264), 3,8-dimethyl-1,4-dioxan-8-aza-spiro[4.5]dekan (AF274), 2-ethyl-4,8-dimethyl-1-thia-4,8-diaza-spiro[4.5]dekan-3-on (AF272), 3-methyl-1-oxa-4-thia-8-aza-spiro[4.5]dekan-2-on (AF269), 3-ethyl-8-methyl-1-oxa-4-thia-8-aza-spiro[4.5]dekan-2-on (AF271), 2-methyl-1-thia-4,8-diaza-spiro[4.5]dekan-3-on (AF263), 3,8-dimethyl-1-oxa-4-thia-8-aza-spiro[4.5]dekan-2-on (AF265), 2,8-dimethyl-1-oxa-4,8-diaza-spiro[4.5]dekan-3-on (AF260), 2,4,8-trimethyl-1-thia-4,8-diaza-spiro[4.5]dekan-3-on (AF266), 2-ethyl-8-methyl-1-thia-4,8-diaza-spiro[4.5]dekan-3-on (AF267), 2,8-dimethyl-1-thia-4,8-diaza-spiro[4.5]dekan-3-on (AF261), 2,8-dimethyl-1-oxa-3,8-diaza-spiro[4.5]dec-1-en-4-on (AF238), 2,8-dimethyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-2-en-4-on (AF230), 3-ethyl-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-1-en-4-on (AF220), 1-ethyl-8-methyl-3-oxa-1,8-diaza-spiro[4.5]dec-2-on (AF174), 8-methyl-1-oxa-3,8-diaza-spiro[4.5]dekan-2-thion (AF165), 3-ethyl-8-methyl-1-oxa-3,8-diaza-spiro[4.5]dekan-2-on (AF172), 8-methyl-1-oxa-3,8-diaza-spiro[4.5]dekan-2,4-dion (AF169), 3-ethyl-8-methyl-1-oxa-3,8-diaza-spiro[4.5]dekan-2,4-dion (AF180), 4-butylimino-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-2-thion (AF189), 8,N',N'-trimethyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-1,3-dien-2,4-diamin (AF194), methyl-(8-methyl-2-methylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-1,3-dien-4-yl)-amin (AF193), 8-methyl-2-methylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-1,3-dien-4-ylamin (AF192), 4-methoxy-8-methyl-2-methylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-1,3-dien (AF191), 2,8-dimethyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-1-en

(AF190), 3-ethyl-2-ethylsulfanyl-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-1-en-4-thion (AF170), 3-ethyl-2-ethylsulfanyl-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-1-en-4-on (AF188), 8-methyl-2-methylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-1-en-4-on (AF187), 8-methyl-2,4-bis-methylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-1,3-dien (AF177), 8-methyl-4-methylsulfanyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-3-en-2-thion (AF183), 4-ethylsulfanyl-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-3-en-2-thion (AF176), 3-ethyl-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-2,4-dithion (AF163), 8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-2,4-dithion (AF173), 1-acetyl-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-2,4-dion (AF164), 3-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-2,4-dion (AF179), 3,8-dimethyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-2,4-dion (AF178), 3-ethyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-2,4-dion (AF160Des), 3-ethyl-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-2,4-dion (AF160), 3-ethyl-8-methyl-4-thioxo-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-2-on (AF182), 8-methyl-3-(4-pyrrolidin-1-yl-but-2-ynyl)-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-2,4-dion (AF197), 3-prop-2-ynyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-2,4-dion (AF186), 3-terc.butyl-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-2,4-dion (AF213), 8-methyl-3-prop-2-ynyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-2,4-dion (AF185), 3-terc.butyl-8-methyl-2-thioxo-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-4-on (AF184), 3-ethyl-8-methyl-2-thioxo-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-4-on (AF181), 3-ethyl-8-prop-2-ynyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dekan-2,4-dion (AF196), 5-(1-methyl-piperidin-4-yl)-2-thioxo-imidazolidin-4-on (AF195), 5-methyl-2-(1-methylpiperidin-4-yl)-thiazolidin-4-thion (AF275) a 3-but-2-ynyl-8-methyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]deka-2,4-dion (AF199).

I když zde byl tento vynález podrobně popsán se zvláštním odkazem na příklady a jiná specifická provedení, zručný odborník v oblasti techniky si je vědom, že lze udělat mnoho změn a modifikací. Tento vynález není tedy zkonstruován jako omezení těmi provedeními, která zde byla podrobně popsána, ale spíše má být takto porozuměno jeho konceptu, rozsahu a duchu, přičemž je třeba vzít v úvahu následující patentové nároky.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití azaspirosloučeniny obecného vzorce I



(I)

v němž X znamená skupinu >S, Y znamená skupinu >CRR', Z znamená skupinu >C=O a W znamená skupinu >NR^o,

v nichž R znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami,

R' znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami,

5 R^0 znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami a alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, a

A znamená kruh obecného vzorce M

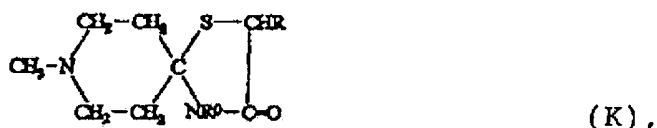


10 který není substituován nebo je substituován 1 až 3 substituenty vybranými ze skupiny sestávající z alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a hydroxylové skupiny, přičemž jak n tak p znamená číslo 1, 2 nebo 3 s tím, že součet n+p znamená číslo 1 až 3, a R^1 znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, cykloalkylové skupiny se 3 až 7 atomy uhlíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované 1 až 6 atomy halogenu, hydroxyalkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkylthioskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy(s 1 až 6 atomy uhlíku)alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, karboxy-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, alkoxy(s 1 až 6 atomy uhlíku)karbonyl-alkylové(s 1 až 6 atomy uhlíku) skupiny, aminoalkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, mono(alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku))aminoalkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, di(alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku))amino-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, 2-oxo-pyrrolidin-1-yl-methylové skupiny, arylové skupiny, diarylmethylové skupiny, alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny substituované jednou nebo dvěma arylovými skupinami, alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a arylkarbonylové skupiny, kde arylová skupina znamená nesubstituovanou fenylovou skupinu nebo fenylovou skupinu substituovanou 1 až 3 substituenty vybranými ze skupiny sestávající z atomu halogenu, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a skupiny CF_3 , včetně jejich farmaceuticky přijatelných solí, kvartérních sloučenin, které jsou strukturně odvozeny od těchto sloučenin na terciárním atomu dusíku, jejich enantiomerů a jejich racemátů,

30 pro výrobu léčiva pro léčení onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému u savce.

35 2. Použití azaspirosloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu léčiva, které má biologickou aktivitu, která je vybrána z a) aktivity typu muskarinového agonisty, b) neurotropně-podobné nebo synergické aktivity s NGF, c) aktivity sekretující amyloidní prekurzorový protein (APP) a snižující aktivitu β -amyloidů, d) aktivity zvyšující podíl defosforylovaných τ proteinů a e) NGF-podobné aktivity.

40 3. Použití azaspirosloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1, v němž azaspirosloučenina obecného vzorce I znamená sloučeninu obecného vzorce K



45 v němž R znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami, a

5 R° znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami a alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku,

včetně jejich farmaceuticky přijatelných solí, kvartérních sloučenin, které jsou strukturně odvozeny od těchto sloučenin na terciárním atomu dusíku, jejich enantiomerů a jejich racemátů.

10 4. Použití podle nároku 3, v němž sloučenina obecného vzorce K znamená AF267, kde R znamená ethylovou skupinu a R° znamená atom vodíku.

5. Použití podle nároku 4, v němž sloučenina obecného vzorce K znamená hydrochloridovou sůl.

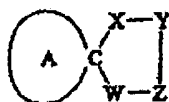
15 6. Použití podle nároku 3, v němž sloučenina obecného vzorce K znamená AF266, kde R znamená methylovou skupinu a R° znamená methylovou skupinu.

20 7. Použití podle nároku 3, v němž sloučenina obecného vzorce K znamená AF272, kde R znamená ethylovou skupinu a R° znamená methylovou skupinu.

8. Použití podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 7, v nichž sloučenina obecného vzorce I je ve formě enantiomeru.

25 9. Použití podle nároku 4, v němž sloučenina obecného vzorce K znamená (–)enantiomer.

10. Enantiomer azaspirosloučeniny obecného vzorce I



(I),

30 v němž X znamená skupinu $>S$, Y znamená skupinu $>CRR'$, Z znamená skupinu $>C=O$ a W znamená skupinu $>NR^{\circ}$,

35 v nichž R znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami,

40 R' znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny a alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami,

45 R° znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, fenylové skupiny, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované jednou, dvěma nebo třemi fenylovými skupinami a alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, a

A znamená kruh obecného vzorce M



v němž jak n tak p znamená číslo 1, 2 nebo 3 s tím, že součet n+p znamená číslo 1 až 3 a

- 5 R¹ znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku, cykloalkylové skupiny se 3 až 7 atomy uhlíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku substituované 1 až 6 atomy halogenu, hydroxyalkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkylthioskupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy(s 1 až 6 atomy uhlíku)alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, karboxy-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, alkoxy(s 1 až 6 atomy uhlíku)karbonyl-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, amino-alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, mono(alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku))aminoalkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, di(alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku))amino-alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny, 2-oxopyrrolidin-1-yl-methylové skupiny, arylové skupiny, diarylmethylové skupiny, alkyl(s 1 až 6 atomy uhlíku)ové skupiny substituované jednou nebo dvěma arylovými skupinami, alkanoylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a aryلكarbonylové skupiny, kde arylová skupina znamená nesubstituovanou fenylovou skupinu nebo fenylovou skupinu substituovanou 1 až 3 substituenty vybranými ze skupiny sestávající z atomu halogenu, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a skupiny CF₃,

20

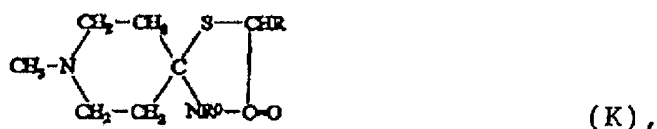
včetně jeho farmaceuticky přijatelných solí a jeho kvartérních sloučenin, které jsou strukturně odvozeny od těchto sloučenin na terciárním atomu dusíku.

25

11. Enantiomer podle nároku 10 pro použití při léčení těla člověka nebo zvířete.

12. Enantiomer podle nároku 10 pro použití při léčení onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému u savce.

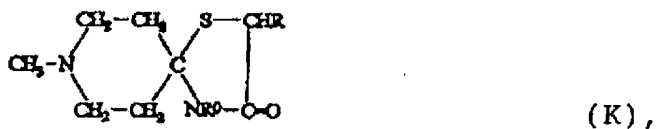
13. (-)Enantiomer podle nároku 12 obecného vzorce K



30

v němž R znamená ethylovou skupinu a R° znamená atom vodíku.

14. Azaspirosloučenina AF267, která znamená sloučeninu obecného vzorce K

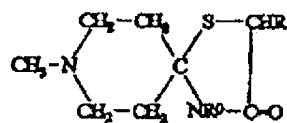


35

v němž R znamená ethylovou skupinu a R° znamená atom vodíku.

15. Azaspirosloučenina podle nároku 14, která znamená hydrochloridovou sůl sloučeniny A267.

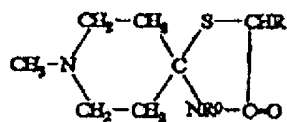
16. Azaspirosloučenina AF266, kterou je sloučenina obecného vzorce K



(K),

v němž R znamená methylovou skupinu a R^o znamená methylovou skupinu.

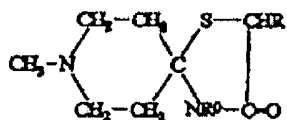
17. Azaspirosloučenina AF272, kterou je sloučenina obecného vzorce K



(K),

v němž R znamená ethylovou skupinu a R^o znamená methylovou skupinu.

18. Azaspirosloučenina AF261, kterou je sloučenina obecného vzorce K



(K),

v němž R znamená methylovou skupinu a R^o znamená atom vodíku.

19. Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje enantiomer podle kteréhokoliv z nároků 10 až 13 nebo sloučeninu podle kteréhokoliv z nároků 14 až 18 společně s farmaceuticky přijatelným ředidlem, nosičem nebo adjuvans.

20. Farmaceutický prostředek podle nároku 19, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje alespoň jednu další farmakologicky aktivní sloučeninu, která je vybrána ze skupiny sestávající z fysostigminu, tetrahydroaminoakridinu, cholinu, lecithinu, piracetamu, aniracetamu, pramiracetamu, oxiracetamu, 4-aminopyridinu, 3,4-diaminopyridinu, somatostatinu, pirenzepinu, N-methylatropinu, N-butylskopolaminu, skopolaminu, klonidinu, quanfamicinu, propanthelinu, methanthelinu, glykopyrolátu, tropenzilia, nortryptilinu, amitriptylinu, imipraminu, minaprinu, sekoverinu, AFDX-116, nikotinu, alaproklatu, zimelidinu, deprenylu a nervového růstového faktoru.

21. Farmaceutický prostředek podle nároku 19 nebo 20, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že je ve formě vhodné pro orální, rektální, parenterální nebo transdermální podávání nebo pro podávání insuflací nebo nazálním sprejem, a v případě transdermálního podávání může prostředek jako další složku obsahovat mastnou kyselinu s nízkou molekulovou hmotností.

22. Farmaceutický prostředek podle nároku 19 pro výrobu léčiva pro léčení onemocnění centrálního a periferního nervového systému u savců, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje takové množství, které je efektivní při léčení uvedených onemocnění, alespoň jedné azaspirosloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 10 až 16 společně s alespoň jedním farmaceuticky přijatelným ředidlem, nosičem nebo pomocným činidlem, a jako další farmakologicky aktivní sloučeninou nervovým růstovým faktorem, s tím, že alespoň jedna azaspirosloučenina je přítomna v takovém množství, které podporuje nervovou růstovou aktivitu nervového růstového faktoru.

Konec dokumentu