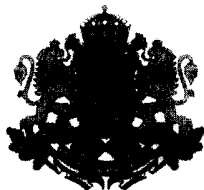


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 100370A

(51) C07D471/10

C07D498/10

C07D497/10

A61K31/435

C07D453/02

C07D513/10

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 100370 (22) Заявено на 19.02.1996 (24) Начало на действие на патента от:				(71) Заявител(и): STATE OF ISRAEL, REPRESENTED BY THE PRIME MINISTER'S OFFICE, ISRAEL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL RESEARCH, . , NESS-ZIONA, NESS-ZIONA (IL) ;	
Приоритетни данни				(72) Изобретател(и): FISHER, ABRAHAM ., HOLON (IL) ; KARTON, YISHAL ., NESS-ZIONA (IL) ; MARCIANO, DANIELE ., RAMAT- HASHARON (IL) ; BARAK, DOV ., REHOVOT (IL) ; MESHULAM, HAIM ., BAT YAM (IL) ;	
(31) 94855	(32) 20.07.1993	(33)	US	(74) Представител по индустриална собственост: Фани Владимирова Божинова, 1000 София, п.к. 728	
(41) Публикувана заявка в бюлетин № 11 29.11.1996 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници:				(86) № на PCT заявка: PCT/ GB94/0 / 1543, 15.07.1994 (87) № и дата на PCT публикация: 95/033 / 03, 02.02.1995	
(62) Разделена заявка от рег. №					

**(54) АЗАСПИРОСЪЕДИНЕНИЯ И СЪСТАВ С АКТИВНОСТ НА МУСКАРИНОВ
АГОНИСТ, ДЕЙСТВАЩИ ВЪРХУ ХОЛИНЕРГИЧНАТА СИСТЕМА**

(57) Изобретението се отнася до спирозъединения, които действат активно върху централната и периферната нервна система и имат например активност на мускаринов агонист. Те са с формули в които пръстенът а з аедно със спировъглеродния атом образува мостов или немостов пръстен, съдържащ един или два азотни атома в пръстена, а всеки от другите символи във формулата е определен. Изобретението се отнася още до техни фармацевтично приемливи соли, кватернерни съединения, които структурно произлизат от съединения с третичен азотен атом, енантиомери и рацемати.

19 претенции, 0

BG 100370A

АЗАСПИРОСЪЕДИНЕНИЯ С АКТИВНОСТ НА МУСКАРИНОВ АГОНИСТ, ДЕЙСТВАЩИ ВЪРХУ ХОЛИНЕРГИЧНАТА СИСТЕМА

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до спиропетчленни пръстени съединения, при които пръстенът, който е спиросвързан към петчления пръстен, е наситен мостов или немостов пръстен съдържащ един или два азотни атома, до фармацевтични състави съдържащи спиросъединенията и до метод за лечение на заболявания на централната и периферна нервна система като се използват спиросъединения или фармацевтични състави.

Предшестващо състояние на техниката

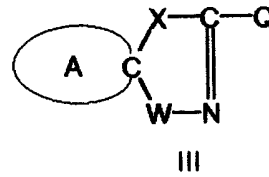
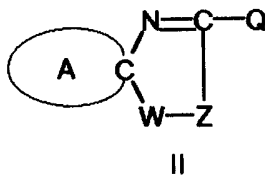
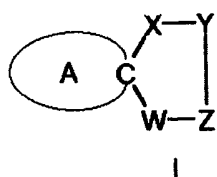
Нови спирохинуклидини, в които оксатиолановите пръстени са спиросвързани с хинуклидиновите пръстени, са описани например в заявка EP № 0205247 A2, публикувана на 17.12.86 и в САЩ патенти № 4 855 290 (издаден на 08.08.89), № 4 981 858 (издаден на 01.01.91), № 4 900 830 (издаден на 13.02.90) и № 4 876 260 (издаден на 24.10.89). Някои спирооксазолини са описани в САЩ патент № 5 053 412 , а някои спирооксазолини и някои спиротиазолини са описани в САЩ заявка за патент сер. № 07/685 397. Всички изброени по-горе САЩ патенти и САЩ заявка за патент сер.№ 07/685 397, както и други патенти и литературни цитати отбелязани в настоящата заявка са включени за справка. Новите съединения от горесцитираните патенти притежават

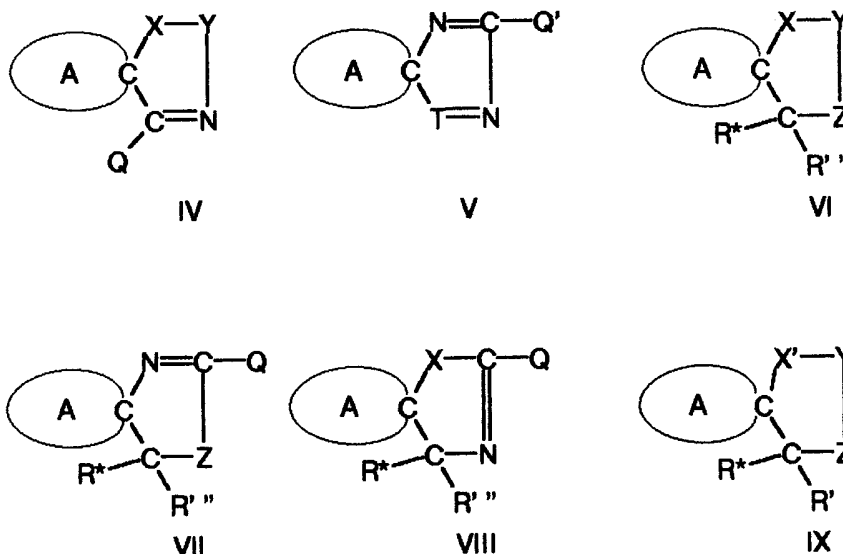
активност върху централната нервна система. Биологичната активност на 2-метилспиро(1,3-оксатиолан-5,3')хинуклидин, който съществува като *цис* и *транс* изомер в зависимост от това къде е локализирана 2-метилната група, на същата страна на оксатиолановия пръстен както азотния атом (*цис*) на хинуклидиновия пръстен или на обратната страна на азотния атом (*транс*) на хинуклидиновия пръстен е по същество обширно изследвано и е намерено, въз основа на предклинични опити, че *цис* съединението (код № AF102B) е особено надеждно за контрол на сенилна деменция от типа Алцхаймер (SDAT). Интересно е също така, всеки от *цис* и *транс* изомерите може да бъде оптически разделен, а биологичната активност на оптичните изомери също е изследвана в редица случаи.

Главен обект на настоящото изобретение е създаването нови спиросъединения. Други обекти на изобретението и по-специално тези, които се отнасят до създаването на полезни фармацевтични състави и методи за лечение на заболявания, ще станат очевидни от описанието, което следва.

Техническа същност на изобретението

Настоящото изобретение се отнася, в един аспект, до нови съединения с формули I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII и IX

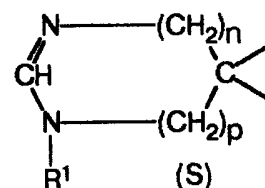
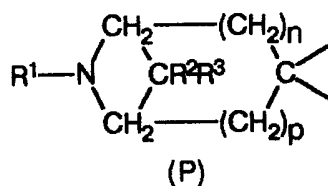
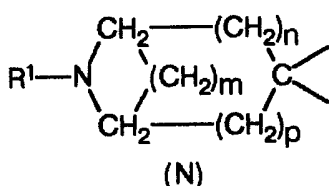
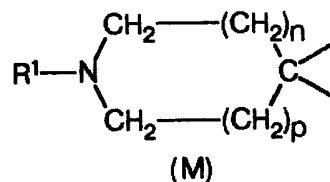
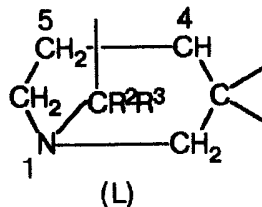
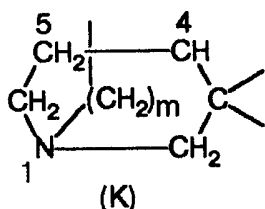




и техни фармацевтичноприемливи соли, енантиомери и рацемати, в които пръстенът А заедно със спировъглеродния атом образува мостов или немостов пръстен съдържащ един или два азотни атома в пръстена, X означава $>O$, $>S$ или $>NR^*$, Т означава $-C(Q)=$ или $-N=$, Y означава $>C=O$, $>C=S$, $>C=NR^*$, $>C=CRR'$, $>CRR'$, $>CHOR''$, $>O$, $>S$ или $>NR^*$, Z означава $>O$, $>S$, $>C=O$, $>C=S$, $C=NR^*$, $>C=CRR'$, $>CRR'$, $>CHOR''$ или $>NR^*$, W означава $>O$, $>S$, $>C=O$, $>C=S$, $C=NR^*$, $>C=CRR'$, $>CHOR''$ или $>NR^*$, Q и Q' независимо един от друг означават OR, SR, NRR' и R, X' и Z' независимо един от друг означават $>C=O$, $>C=S$ и $>C=CRR'$ и R, R', R'', R*, R* и R'' независимо един от друг означават H, C₁₋₆-алкил, C₁₋₆-алкокси, C₂₋₆-хидроксиалкил, C₂₋₆-алкенил, C₂₋₆-алкинил, фенил и C₁₋₆-алкил заместен с един, два или три фенила, като R' и R* могат също така независимо един от друг да означават C₁₋₆-алканоил, при условие, че нарисуваният петчленен пръстен съдържа най-малко един въглероден атом в пръстена освен спировъглеродния атом, така че два съседни атома от пръстена да не са едновременно кислородни атоми и че (ia) във формула I, -W-Z-Y-X- не е

-C(=O)-NH-C(=O)-N(алкил)-, -C(=O)-NH-C(=O)-NH-,
-O-C(=O)-CRR'-O- или -OC(=O)-CRR'-S-, (Ib) във формула I, когато
пръстенът A е пиперидинов пръстен, който може да бъде N-
заместен, тогава -W-Z-Y-X- не е -NR*-CRR'-CRR'-O-,
-NR*-C(=O)-CRR'-O-, -NR*-CRR'-CRR'-S- или -NR*-C(=O)-CRR'-S-,
(Ic) във формула I, когато -W-Z-Y-X- е -C(=O)-NH-C(=O)-O-, тогава
пръстенът A не е хинуклидинов пръстен, (ii) във формула I, когато
-W-Z-Y-X- е -NH-C(=O)-N(Ph)-NH-, -NH-N(Ph)-C(=O)-NH-,
-NR*-NR*-C(=O)-NR*- или -NR*-NR*-C(=S)-NR*-, тогава пръстенът
A не е N-метилпиперидинов пръстен и когато -W-Z-Y-X- е
-NR*-NR*-C(=S)-NR*-, тогава пръстенът A също не е незаместен
пиперидинов пръстен, (iiia) във формула III, пръстенът A може да не
е заместен с два фенилни радикала, (iiib) във формула III, когато Q
е NRR' и W е C=O, тогава X не е O, (iv) във формула VI, когато Y е
CRR' и X = Z = O или S или единият от X или Z е O, а другият е S,
тогава най-малко един от R* и R'' не е H, (v) във формула VI,
когато Y е CRR', X е O или S и пръстен A е пиперидинов пръстен,
който може да бъде N-заместен, тогава Z е NR* освен N-CHO, (vi)
във формула VI, когато X е O, Y е NR* и Z е C=O или C=S, тогава
пръстен A е или мостов пръстен или най-малко единият от R* и R''
не е H, (vii) във формула VI, когато -X-Y-Z- е -O-C(=O)-NH-,
-O-C(=S)-NH-, -O-NR*-C(=O)- или -O-NR*-C(=S)- и R* е H или алкил,
тогава пръстен A не е пиперидинов пръстен, (viii) във формула VII,
когато Z е O, тогава Q е или SR или NRR' или най-малко единият R*
и R'' не е H, (ix) във формула VIII, когато X е O или S, тогава Q е
или SR или най-малко единият от R* и R'' не е H и (x) във формула
IX, когато -X'-Y-Z'- е -C(=O)-NR*-C(=O)- и R* е H или алкил, тогава
пръстен A не е пиперидинов пръстен.

В предпочитано изпълнение, пръстенът А може да се избере от групата със структури К, L, M, N, P и S, а именно:



като всяка една структура е незаместена или заместена с 1 до 3 заместителя като C_{1-6} -алкил и хидроксил, а във формули К и L, мостът е свързан с единия си край в позиция 1, а с другия в позиция 4 или 5 (т.е. частта CH_2-CH означава CH_2-CH или $CH-CH_2$), m е 1, 2 или 3 и p и r независимо един от друг означават 0, 1, 2 или 3, при условие, че $n+p = 1-3$, R^1 означава водород, C_{1-6} -алкил, C_{2-6} -алкенил, C_{2-6} -алкинил, C_{3-7} -циклоалкил, C_{1-6} -алкил заместен с 1-6 халогенни атоми, хидрокси- C_{1-6} -алкил, C_{1-6} -алкокси, C_{1-6} -алкилтио, C_{1-6} -алкокси- C_{1-6} -алкил, карбокси- C_{1-6} -алкил, (C_{1-6} -алкокси)карбонил- C_{1-6} -алкил, amino- C_{1-6} -алкил, моно-(C_{1-6} -алкил)амино- C_{1-6} -алкил, ди-(C_{1-6} -алкил)амино- C_{1-6} -алкил, 2-оксо-пирролидин-1-ил-метил, арил, диарилметил, C_{1-6} -алкил заместен с една или две арилни групи, C_{1-6} -алканоил и арилкарбонил, арил означава незаместен фенил или фенил заместен с 1-3 заместителя като халоген, C_{1-6} -алкил, C_{1-6} -алкокси и CF_3 , R^2 и R^3 независимо един от друг означават C_{1-4} -алкил.

Изобретението освен това се отнася до съединения с формули I-IX, техни соли, кватернерни съединения, енантиомери и рацемати както са дефинирани по-горе, където в допълнение или алтернативно във всяка част CRR', R и R' заедно с въглеродния атом, с който са свързани могат да образуват наситен карбоциклен пръстен като 3-6 членен пръстен, а в структурите (K), (L), (M), (N), (P) и (S) всеки H атом свързан с въглероден атом от пръстена може да бъде заместен с R', който (освен като H) има дефинираните по-горе значения.

Примерни съединения съгласно изобретението са:

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(1'-етилхидантоин), пиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-метилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-пропаргилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2',5'-бис(метилтио)-4'H-имидазол), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-4'-тиохидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(4'-метилтио-3'-имидазолин-2'-тион), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-дитиохидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-2',4'-дитиохидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(4'-етилтио-3'-имидазолин-2'-тион), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-тион), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тиохидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тио-4'-β-хидроксиетилиминохидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(оксазолидин-2'-тион), N-метилнортропан-3-спиро-5'-(3'-метилхидантоин), N-метилнортропан-3-спиро-5'-(3'-етилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилоксазолидин-2'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(3'-етилоксазолидин-2'-он), 2-N-метилспиро-(1,3-сукцинимид

4,3')хинуклидин, 2-N-етилспиро-(1,3-сукцинимид 4,3')хинуклидин, 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(оксазолидин-2',4'-дион), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилоксазолидин-2',4'-дион), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метил-2'-тиазолин), N-метилнортропан-3-спиро-5'-хидантоин, 1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-метил-2'-имидазолин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-оксазолин-4'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-[2'-метил-4'H(5'H)-имидазол-5'(4')-он], 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-метокси-4'H-имидазол, 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-амино-4'H-имидазол), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-аминометил-4'H-имидазол), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-[2',5'-бис(аминометил)-4'H-имидазол], 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тион-3'-етилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тион-3'-трет-бутилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-трет-бутилхидантоин), 1-пропаргилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-[3'-(4-пиролидино-2-бутинил)хидантоин], 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-[3'-(2-бутинил)хидантоин], пиперидин-4-спиро-5'-(3'-пропаргил-хидантоин), 2-метил-1,4-тиазолидин-3-он-спиро-[5,3']хинуклидин, 1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-метилтио-2'-имидазолин-5'(4')-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-имидазолин-5'-он).

Настоящото изобретение освен това се отнася до фармацевтичен състав за използване при лечение на заболявания на централната и периферна нервна система у бозайници, съдържащ ефективно количество, за използване при лечение на тези заболявания, на съединение с формула I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII или IX както са дефинирани по-горе, включително техни

фармацевтичнопоносими соли, енантиомери и рацемати, заедно с най-малко един фармацевтичнопоносим разредител, носител или спомагателно средство. Такъв състав е за предпочитане във форма подходяща за орално, ректално, парентерално или подкожно прилагане (в този случай съставът да съдържа допълнително мастна киселина с ниско молекулно тегло), или за прилагане чрез инсуфлация или назално разпръскване и могат да бъдат в единична дозирана форма. Най-малко едно съединение съгласно изобретението както са дефинирани по-горе може да се съдържа в единичната доза в количество в границата напр. около 0,5 до около 100 mg, за предпочитане около 5 до около 100 mg и повече за предпочитане около 10 до около 50 mg.

Съгласно особено изпълнение на изобретението, фармацевтичният състав, както е описан в предишния параграф, може да съдържа допълнително най-малко едно друго фармакологичноактивно съединение избрано от физостигмин, тетраhydroаминоакридин, холин, лецитин, пирацетам, анирацетам, прамирацетам, оксирацетам, 4-аминопиридин, 3,4-диаминопиридин, соматостатин, пирензепин, N-метилатропин, N-бутилскополамин, скополамин, слонидин, кванфамицин, пропантелин, метантелин, гликопиролат, тропензилий, нортриптилин, амитриптилин, имипрамин, минаприн, сековерин, AFDX-116, никотин, алапроклат, зимелидин, депренил и неврорастежен фактор.

Заболявания на централната или периферна нервна система у бозайници могат да се лекуват чрез метод, който се състои в прилагане на ефективно количество за използване при лечение на тези заболявания, на най-малко едно съединение с формула I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII или IX както са дефинирани по-горе, включително техни фармацевтичнопоносими соли,

енантиомери и рацемати. Такива съединения могат, разбира се, да се използват за тази цел във форма на фармацевтичен състав съгласно изобретението, както е дефиниран по-горе.

Изобретението се отнася също, в специално изпълнение, до съединения с някоя от формули I, както са дефинирани тук, с молекулни дименсии посочени по-долу, където r е изходна точка, дефинирана с позицията на аниона съответстващ на катионната форма на азотния атом свързан не с двойна връзка, означен като N^* , на пръстен A (или A') в такова съединение в неговата най-стабилна конформация, X^* означава пръстенен хетероатом в нарисувания 5-членен пръстен притежаващ една от формулите I до IX или X до XIII, такъв пръстенен хетероатом в позиция съседна на спировъглеродния атом, Z^* означава следващия, но един пръстенен атом след X^* в нарисувания 5-членен пръстен и Q^* означава краен C или N атом на страничната верига свързана с пръстенния атом между атомите X^* и Z^* в 5-членния пръстен нарисуван по-долу, водородните атоми в страничната верига са игнорирани в този случай. Такива молекулни дименсии имат по същество следните стойности: двустранен ъгъл $r-X^*-Q^*-Z^* =$ от -54° до -170° и молекулярно разстояние $r-N^* = 3,0$ ангстрьома (разстоянието до линията на координатната мрежа), $r-X^* =$ от 5,7 до 6,75 ангстрьома, $r-Q^* =$ от 7,9 до 8,90 ангстрьома, $x-Q^* =$ от 2,4 до 2,8 ангстрьома. Такива съединения с така дефинирани молекулни дименсии се характеризират с активност на мускаринов агонист. Тази дефиниция основаваща се на молекулни дименсии е подкрепена с биологични тестове, виж по-специално таблица 1 по-долу.

В друго изпълнение, изобретението се отнася до

фармацевтичен състав съдържащ най-малко едно съединение с някоя от формули I до IX както са дефинирани тук и освен това неврорастежен фактор (NGF), като съединението (та) съгласно изобретението са в количество, което подпомага растежната активност на нервите на NGF. Повечето от настоящите съединения, освен някои нови съединения притежаващи активност спрямо централната или периферна нервна система, не подпомагат *per se* растежната активност на нервите в отсъствие на NGF, позволявайки по-добър контрол, когато е желателно терапевтично подпомагане растежа на нервите. Все пак, някои от най-активните съединения съгласно изобретението подпомагат растежната активност на нервите независимо от NGF. Освен това, съединенията съгласно изобретението, които обикновено имат активност като активност на мускаринов агонист, активност за секретирание предшественик на амилоидния протеин (APP) и активност за намаляване β -амилоидите и активност за увеличаване частта на дефосфорилираните τ протеини. Тестовите, проведени за изясняване на биологичната активност на съединенията съгласно изобретението са описани подробно по-долу.

Изобретението освен това се отнася до съединения с формула (I) както са дефинирани по-горе, включително техни фармацевтичнопоносими соли, кватернерни съединения, които са структурно получени от съединенията с третичен азотен атом, енантиомери и рацемати, за използване за производство на лекарствено средство с биологична активност като (a) активност на мускаринов агонист, (b) нервотрофноподобна или синергична активност с NGF, (c) активност на секретирание прекурсор на амилоиден протеин (APP) и активност на намаляване на

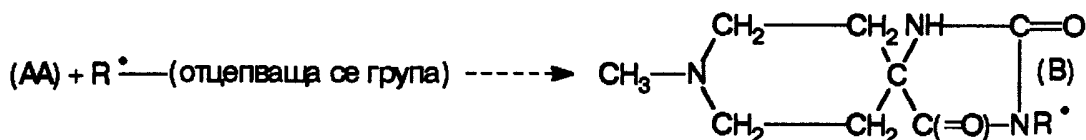
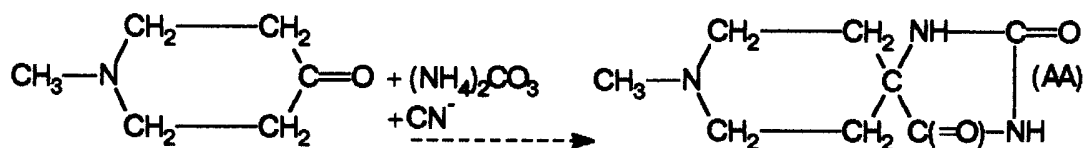
β-амилоиди, (d) активност на увеличаване частта на дефосфорилирани τ протеини и (e) NGF-подобна активност, в която формула -W-Z-Y-X- е -NR^{*}-CRR'-CRR'-O-, -O-C(=O)-CRR'-O-, -O-C(=O)-CRR'S-, -NR^{*}-C(=O)-CRR'-O-, -NR^{*}-CRR'CRR'-S(=O)_q-, или -NR^{*}-C(=O)-CRR'-S(=O)_q-, q е 0, 1 или 2 и R, R' и R^{*} имат горните значения. Примери за такива съединения са: 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-оксазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-диметил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-4-метил-1,4-тиазолидин-3'-он), пиперидин-4-спиро-5'-(3'-метил-1',4'-оксатиолан-2'-он), пиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-3'-оксо-1',4'-тиазолидин-1'-оксид), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-метил-1',4'-оксатиолан-2'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(5'-метил-1',4'-оксазолидин), 1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(4'-етил-1',3'-оксазолидин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-1',4'-оксатиолан-2'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(5'-метил-1',3'-диоксолан-4'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-тион) и енантиомерите (+)- и (-)-1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) и (+)- и (-)-1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он).

Съединенията съгласно изобретението могат да се използват за лечение на болести у бозайници, податливи на лечение с ефективно количество (в контекста на горните активности а-е) от съединението(та) и могат да се използват във

форма на фармацевтични състави съдържащи ефективно количество от съединението(та), както в същност са описани по-горе.

Методите използвани за получаване на съединенията съгласно настоящото изобретение са по същество известните на химиците органици методи за формиране на петчленни пръстени, заместване в ядрото, смяна степента на наситеност/ненаситеност, взаимно превръщане на соли и основи, образуване на кватернерна сол и т.н.. Така някои примерни методи за получаване на дадени съединения съгласно изобретението са описани, но и други методи също могат да се прилагат за тяхното получаване, както е очевидно за специалистите.

Когато желаният 5-членен пръстен е хидантоин, например, този пръстен може да се формира чрез взаимодействие на съответен наситен N-хетероциклен кетон (напр. 1-метилпиперидин-4-он) с $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ и CN^- и 3'-N-атомът след това може да се замени по познат начин. Взаимодействието може да се илюстрира така:

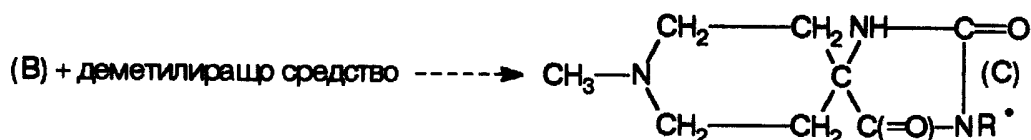


напр. AF160 $\text{R}^* = \text{Et}$, AF178 $\text{R}^* = \text{Me}$, AF185 $\text{R}^* = \text{пропаргил}$, AF167 $\text{R}^* = \text{Me}$, аналог* и AF168 $\text{R}^* = \text{Et}$, аналог* (* в който N-метилпиперидиновата част съдържа 2,6-етиленов мост, напр.

N-метилнортропанов аналог).

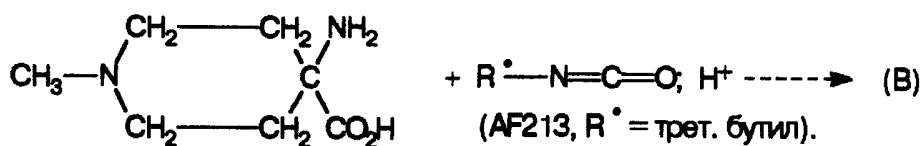
Отцепващата се група в "R* - отцепваща се група" може да бъде напр. бромид, хлорид или р-толуенсулфонат и R* е вече дефиниран, с изключение на H, алкокси и алканоил. Заместителната реакция може да се извърши при по същество известни условия, напр. чрез взаимодействие на 3'-незаместен хидантоин в присъствие на основи като KOH и при използване на разтворител като етанол. Съответното 1',3'-дизаместено съединение може да се получи при горната реакция чрез използване на излишък от реагента "R* - отцепваща се група", или чрез взаимодействие на съединение (B) с "R* - отцепваща се група".

1-Метилната група на съединението със структурната формула (B) може да се отстрани чрез взаимодействие с деметилиращо средство като $\text{CH}_3\text{CH}(\text{Cl})\text{OCOC}\text{Cl}$:



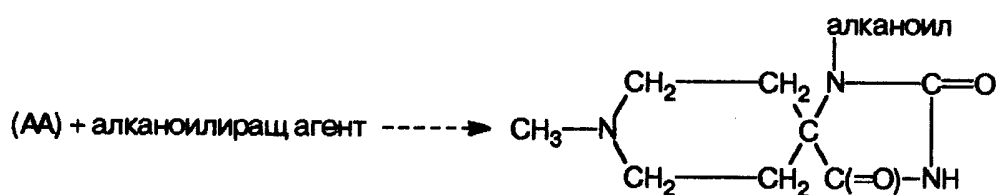
т.е. AF160(дез) $\text{R}^* = \text{Et}$, AF179 $\text{R}^* = \text{Me}$.

Съединението със структура (B) може да се получи също така и както следва:



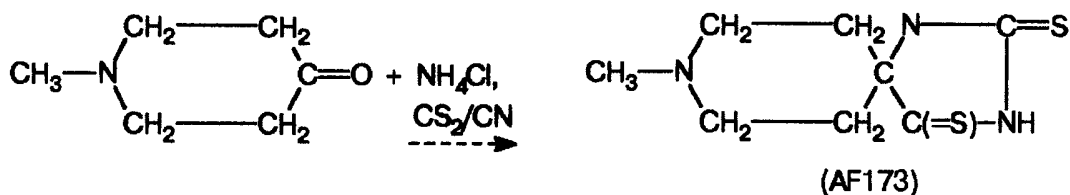
Заместването на $R^*-N=C=S$ съгласно аналогична реакция води до получаване на (В)-3-тион, напр. AF181 ($R=Et$), AF184 ($R=трет.бутил$).

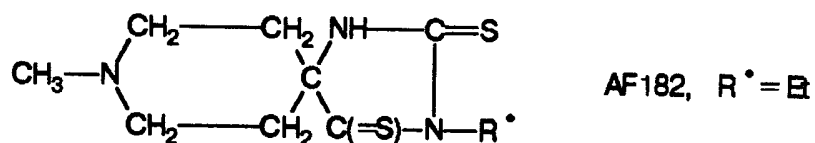
Взаимодействието на съединение (АА) с алканоилхалид или алканоиланхидрид при условия на стандартно алканоилиране води до заместване в 1'-позиция:



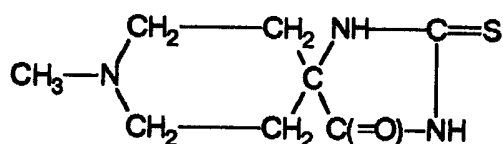
AF164, алканоил = ацетил

Когато желаният петчленен пръстен е дитиохидантоин, тези съединения могат да се получат напр. чрез формиране на този пръстен чрез взаимодействие на съответния наситен N-хетероциклен кетон с CN^- , NH_4Cl и CS_2 . Когато хидантоинът е заместен (напр. чрез алкилиране) при N-атомите, тиохидантоинът дава N- и/или S-заместени продукти. Примерите (които следват) илюстрират условията на реакцията, които водят до различни продукти или смеси от продукти, които могат да се разделят. Тези реакции могат да се илюстрират както следва, където N-хетероцикленият кетон е примерно 1-метилпиперидин-4-он:



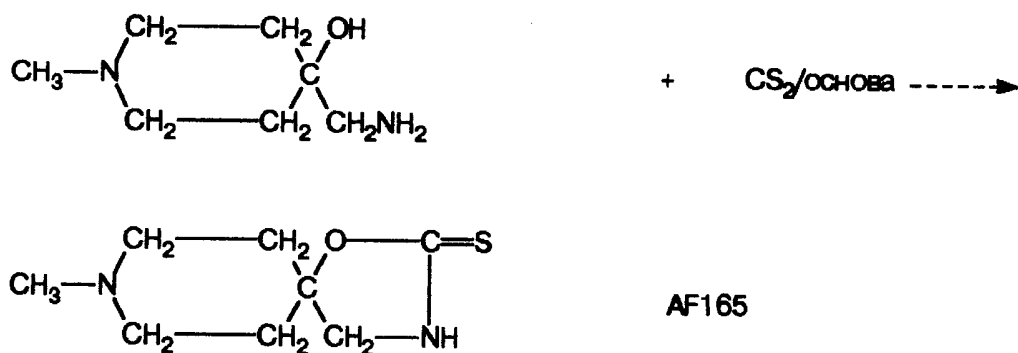


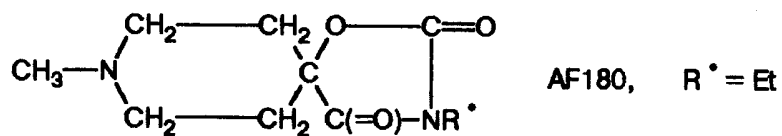
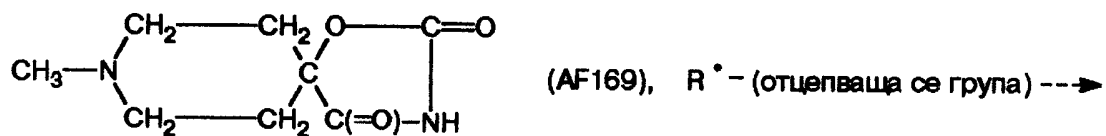
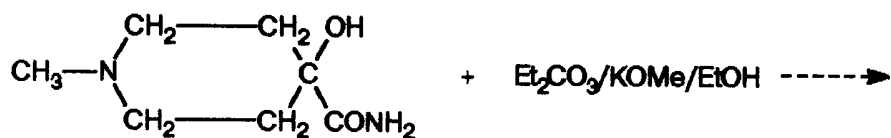
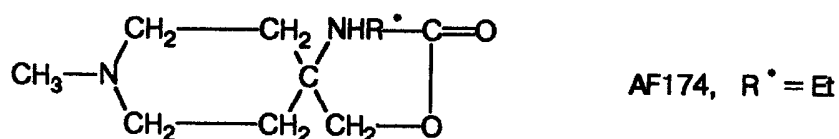
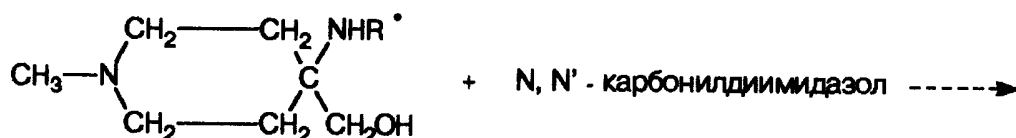
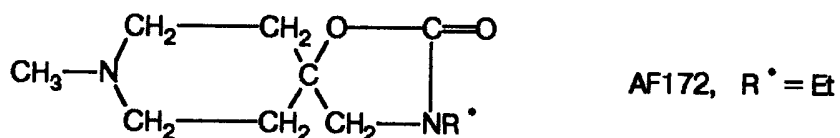
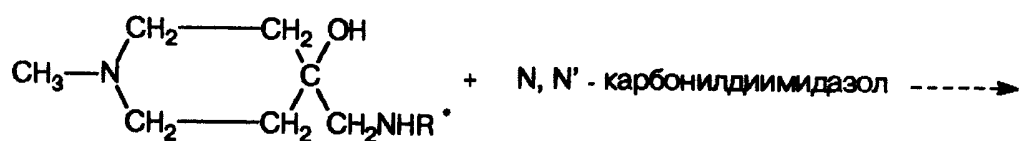
Подобно, взаимодействието на съединение (D) с 20% HCl дава съединение със следната структура (виж напр. пример 12):



Това съединение също се образува чрез хидролиза на аналога съдържащ $=\text{NR}^*$ вместо $\text{O}=\text{}$, като $=\text{NR}^*$ аналогът може да се получи чрез взаимодействие на съединение AF173 с R^*NH_2 (виж напр. пример 13, където $\text{R}^* = \beta$ -хидроксиетил).

Съединенията съгласно изобретението, които са оксо- или тионозаместени оксазолидини могат да се получат например както следва:





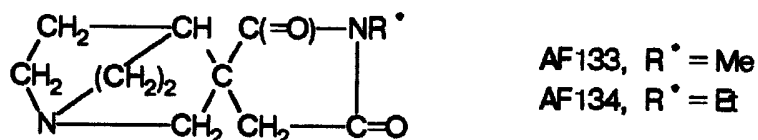
Отцепващата се група в "R*-отцепваща се група" може да бъде такава каквато е описана по-горе за хидантоините, каквото е

значението на R^* . Заместителната реакция може да се проведе при по същество известни условия.

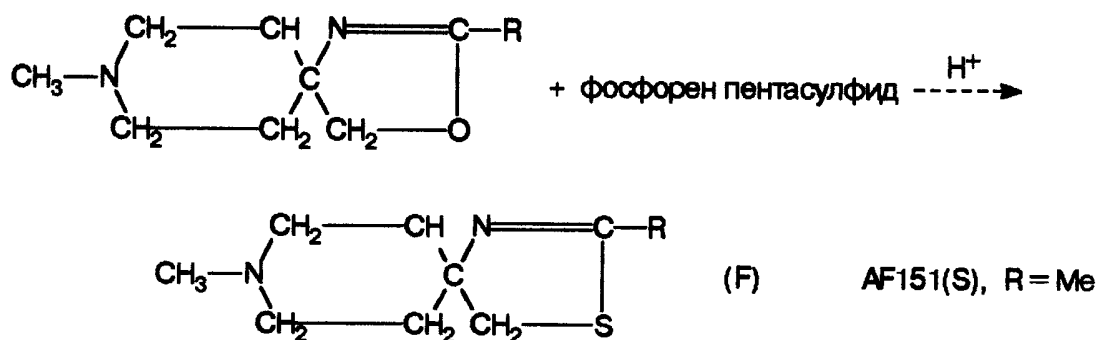
Съединенията, съгласно изобретението, в които петчленният пръстен е сукцинимид, могат да се получат, например, както следва:



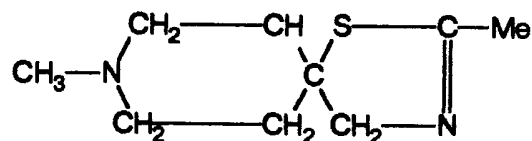
3-карбоетокси-3-карбоетоксиметилхинуклидин



Тиазолини съгласно изобретението могат да се получат например така:

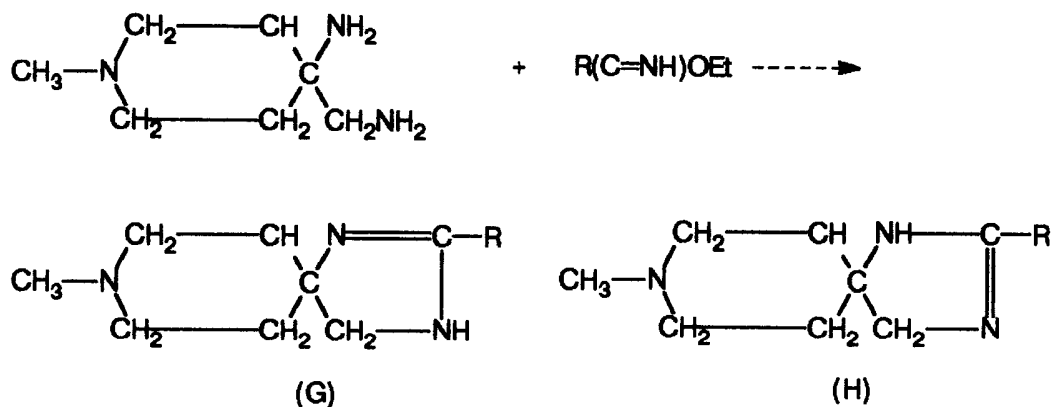


Трябва да се отбележи и това, че съединението:



означено AF150(S) е описано в наше искане за патент на САЩ сер.№ 07/685397, където съединенията с формула (F) не са конкретно описани като примери в тази САЩ патентна заявка. Обаче, сега е намерено изненадващо, че съединенията с формула (F) в сравнение със съединението AF150(S) изненадващо показват по-голяма надеждност от гледна точка на фармакологична активност, отколкото класа съединения дадени за пример чрез AF150(S).

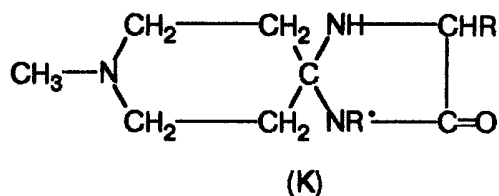
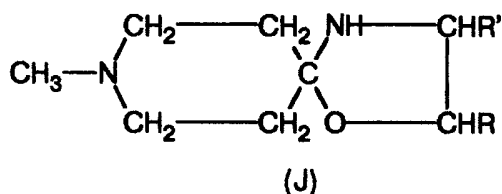
Имидазолини съгласно настоящото изобретение могат да се получат, например, съгласно следната схема:



В този случай, продуктът, напр. AF190 R=Me, може да съществува като тавтомерна смес със структури (G) и (H).

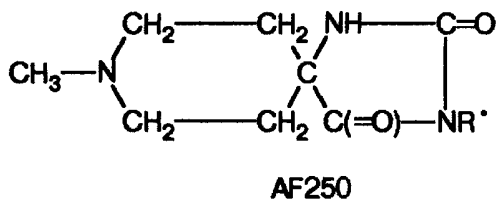
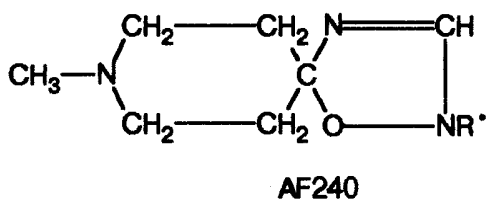
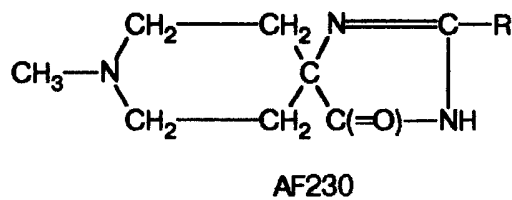
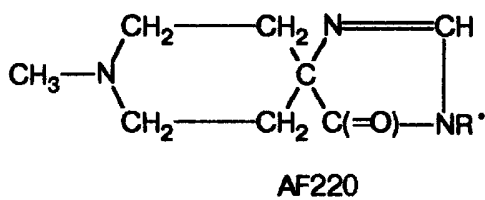
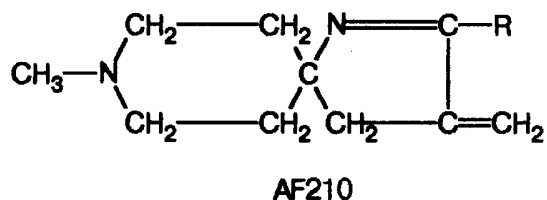
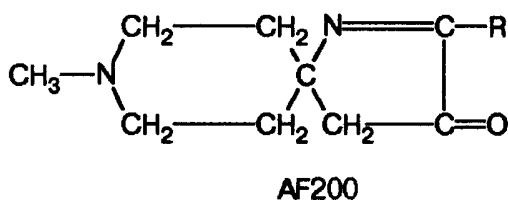
Оксазолидини и тиазолидини съгласно изобретението като скруктури (J) (като AF264 R=Me R'=H, AF268 R=H R'=Et) и (K) (като AF261 R=Me R' =H, AF267 R=Et R' =H, AF266 R= R' =Me)

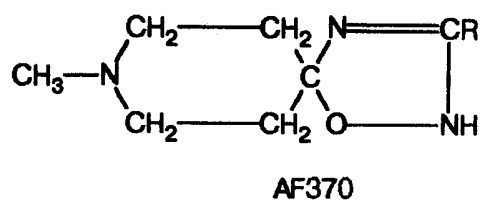
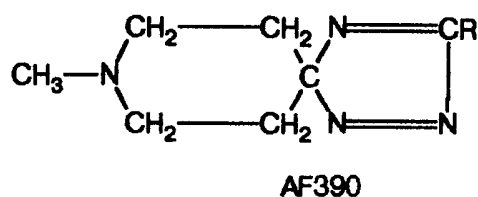
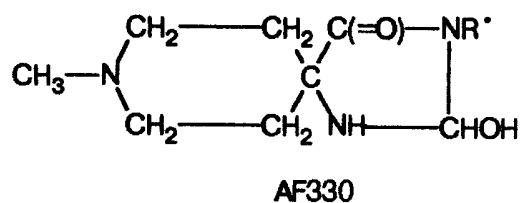
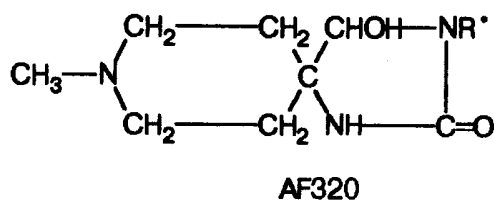
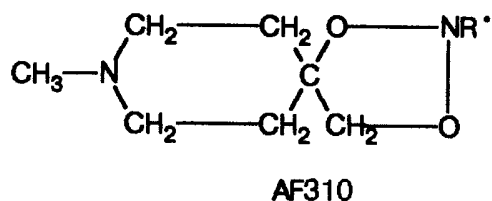
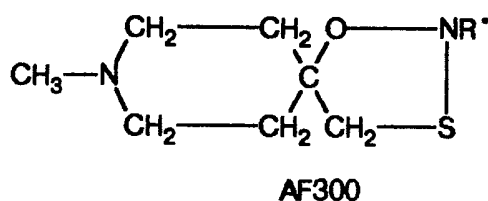
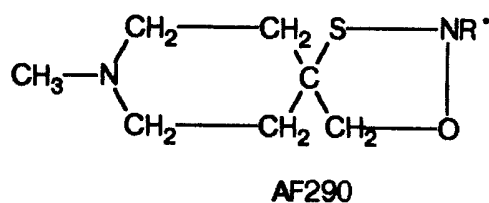
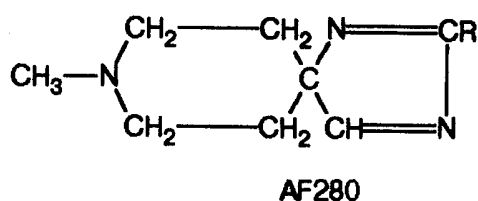
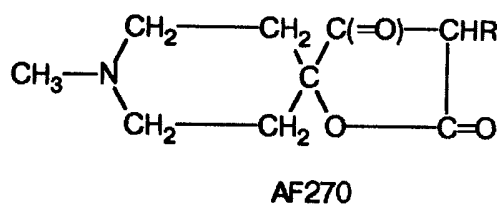
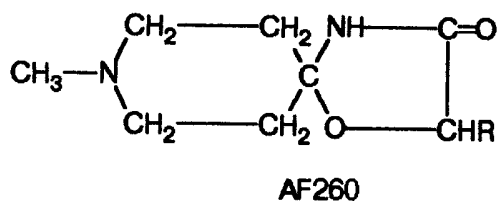
могат да се получат напр. както е описано по-долу.



За илюстрация, съединения (J) и (K) се получават, когато N-метилпиперидон взаимодейства с $\text{HOCHRCHR}'\text{NH}_2$ или с $\text{HSCHRCO}_2\text{H} + \text{R}'\text{NH}_2$, респективно.

Следните съединения, където R и R' имат дадените тук значения, но за предпочитане всяко едно от тях е напр. Me или Et, също представляват предпочитани съединения съгласно настоящото изобретение.





Ясно е, че когато в горното описание, съединенията за илюстрация съгласно изобретението показват пиперидинов, нортропинов и хинуклидинов пръстен, всеки азотен хетероциклен пръстен както е дефиниран тук като подходящ за спиро-конфигурация с нарисувания спиропетчленен пръстен, могат да

бъдат заместени. Подобна забележка се прави за конкретните примери, които по-скоро са за илюстрация и не са ограничаващи.

Спиросъединенията съгласно изобретението са най-общо потенциално полезни за лечение на предсенилна и сенилна деменция, сенилна деменция от Алцхаймеров тип (SDAT), нетипична Алцхаймерова болест (Perry et al, *Advances in Neurology*, eds. R.J.Wurtman et al., 51:41, (1990), комбинирана мултиинфарктна деменция и Алцхаймерова болест, свързани с възрастта увреждания на паметта (AAMI), остри психически разстройства, увреждания на емоциите и вниманието, мания, бавноразвиваща се дискинезия, хиперкинезия, смесена Алцхаймерова и Паркинсонова болест, афазия, халюцинационно-параноидни състояния, синдром на амнезия след енцефалит, симптоми на алкохолно пристрастяване, хорея на Huntington, болест на Pick, атаксия на Friedrich, болест на Gille de la Tourette и синдром на Даун, тъй като всички тези състояния са смущения, при които поне в известна степен се свързват с централната холинергична функция. Освен това съединенията съгласно настоящото изобретение са потенциално полезни за лечение на прогресивен супрануклеарен паралич. Те също са потенциални аналгетични средства и затова могат да бъдат полезни за лечение на тежки болкови състояния като ревматизъм, артрит и заболявания на крайниците.

Както е посочено накратко по-горе, спиросъединенията съгласно настоящото изобретение могат да се използват в комбинация с поне едно друго фармакологичноактивно съединение, например инхибитори на ацетилхолинестеразата като физостигмин или тетрахидроаминоакридин, в комбинация с ацетилхолинови прекурсори като холин или лецитин, в допълнение към "ноотропни" лекарствени средства като пирацетам, анирацетам, оксирацетам

или прамирацетам, в допълнение към съединения, които взаимодействат с Ca_2^+ каналите като 4-аминопиридин или 3,4-диаминопиридин, или в допълнение към пептиди, които могат да притежават модулаторни ефекти върху освобождаването на ацетилхолин като соматостатин, в комбинация с периферно антимускариново средство (като пиренцепин, N-метилатропин, N-бутилскополамин, пропантелин, метантелин, гликопиролат или тропенцилий) да противодействат на периферни неблагоприятни действия, които могат да се очакват при високи дози като слюноотделяне, диария, стомашна секреция или повръщане, или в комбинация с трансдермален скополамин като Scopoderm_® за противодействие при гадене и/или повръщане, в комбинация с антидепресанти като нортриптилин, аминотриптилин, имипрамин, минаприн, за да облекчат както когнитивните увреждания, така и депресивните симптоми свързани понякога с SDAT, AAMI, смесена SDAT/Паркинсонова болест (PD), в комбинация с M2-антимускаринови лекарствени средства като сековерин, AFDX-116 (виж Hammer et al, 1986 Life Sci., 38:1653) с оглед да се противодейства на периферни нежелани странични ефекти, които могат да се очакват при високи дози от съединенията, да се противодейства на инхибиращото действие на такива агонисти върху централни инхибиторни пресинаптични и постсинаптични рецептори от M2 тип и да се потенцира освобождаването на ацетилхолин чрез потискане на инхибиторните авторецептори от M2 тип в интактни окончания, в комбинация с никотинови агонисти като никотин, с оглед да се стимулират и никотиновите и мускариновите рецептори в мозъка, в съчетание с адренергични агонисти (клонидин или кванфамицин), с оглед да се облекчат както когнитивните така и други увреждания свързани със смесена

холинергична-норадренергична недостатъчност при SDAT, в комбинация с инхибитори на повторно невронално поемане на серотонин като алапроклат, зимелидин, с цел да се облекчат както когнитивните така и други емоционални функции при SDAT, в съчетание с инхибитори на моноаминооксидаза-B като депренил, с цел да се облекчат когнитивни и други моторни увреждания свързани със смесени състояния като SDAT/PD, в комбинация с неврорастежен фактор (NGF, който се прилага било чрез назален спрей, било интрацеребровентрикуларно).

Спиросъединенията съгласно настоящото изобретение, със или без гореизложените допълнителни активни вещества могат да се прилагат например по инжекционен път с подходящ разредител или носител, орално, ректално под формата на супозитории, по инхалационен път или посредством назален спрей, чрез инфузия или трансдермално в подходящ носител със или без физиостигмин или тетрахидроаминоакридин.

Настоящите спиросъединения могат също да се използват потенциално за лечение на смущения изискващи приложението на дълготрайни холинергични средства с меко локално действие.

Такива средства са необходими при заболявания като глаукома, тъй като съединението не се разрушава от ензима, който дезактивира ацетилхолина, напр, ацетилхолинестеразата и бутирилхолинестеразата и могат да се използват също така за лечение на периферни холинергични заболявания като миастения гравис, дисфункция на пикочния мехур, болестта на Адисън и болестта на Eaton-Lambert. Тези съединения могат също да се използват при смущения, при които от лекарства е причинена понижена холинергична активност.

Тъй като спиросъединенията съгласно настоящото

изобретение са антихолинергични средства (което лесно може да се определи от специалист), те могат да се използват за лечение на заболявания дължащи се на холинергична хиперфункция, когато тя е спонтанна или причинена от лекарства. Нещо повече, съединенията от настоящото изобретение могат да се използват при лечение на различни болести като PD, псевдо-PD, смесена AD/PD, първична дистония, спастично изкривяване на врата, краниална дистония, депресия, двигателна болест, акатизия (след пристрастяване към невролептици), централна хипертензия, увреждане на главата у хора, смесена забавена дискинезия и PD, маниакална депресия, като допълнително средство в хирургията вместо атропин, скополамин и др., при интоксикации дължащи се на излишък от ацетилхолин подобно на инхибиране на ацетилхолинестеразата. Те могат да се използват също в офталмологията, когато се изисква продължителна или краткотрайна мидриаза.

Спиросъединенията съгласно настоящото изобретение могат да се използват още за лечение на болести характеризиращи се с излишък на перифероподобна активност като астма, хронично обструктивно белодробно заболяване, пептична язвена болест. За тези периферни неразположения специално се препоръчват кватернерните соли на съединенията от настоящото изобретение.

Кватернерните амониеви соли са широко използвани понастоящем в терапията. Примери за такива холинергични агонисти са ацетилхолинхлорид, бетанехолхлорид и карбахол (виж напр. Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of the Therapeutics", Seventh Edition, Macmillan Publishing Co., 1985, p. 104). Кватернерни антихолинестеразни средства са например неостигминбромид, абменониев хлорид, пиридостигминбромид,

едрофониев хлорид, демекариев бромид и ехотифатйодид, пралидоксимхлорид се използва като реактиватор на холинестераза (виж Goodman & Gilman, loc cit, p. 122-123).

Кватернерните производни на алкалоидите на беладоната, например метскополаминбромид и хоматропинпетилбромид и синтетичните кватернерни съединения, например метантелинбромид и пропантелинбромид, се използват за лечение на стомашночревни заболявания (виж Goodman, loc cit., p 139-140).

В "Medicinal Chemistry", Alfred Burger, Second Edition, Interscience Publishers, 1960, p. 497, се споменава предположението, че кватернерните амониеви соли, без оглед на тяхната химична структура, предизвикват курареподобна парализа, а по-късно това предположение е потвърдено. Това свойство на кватернерните амониеви съединения се използва за анестезия, например като добавка на хирургическа анестезия, за да се получи разхлабване на скелетната мускулатура (виж Goodman & Gilman, loc cit., Chapter 11, под заглавие "Neuromuscular Blocking Agents", p. 222-235).

Тази блокираща невромускулна активност на кватернерни съединения, както е дискутирано по-горе, не пречи на развитието и клиничното прилагане на кватернерни съединения в терапията през следващите години. Специалистите знаят, че много фактори повлияват избора на едно съединение (включително кватернерно съединение) за прилагането му в клиничната терапия, например ефективността му за набелязаната цел, безопасност, възможните странични ефекти и терапевтичният му индекс. Специалистите следователно добре разбират как да интерпретират израза "фармацевтичнопоносими кватернерни съединения", които произлизат структурно от съединенията съгласно изобретението,

притежаващи третичен азотен атом, както този израз се използва в настоящото описание и претенциите, в светлината на съответните знания в областта.

Изобретението се илюстрира със следните неограничаващи примери:

ПРИМЕР 1

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин) AF160

а) 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин

Смес от разтвори на 1-метилпиперидин-4-он (36,44 g, 0,322 mol) в етанол (150 ml), амониев карбонат (93,0 g, 0,968 mol) във вода (400 ml) и калиев цианид (25,8 g, 0,396 mol) във вода (82 ml) се нагрява при 60°C в продължение на 2,5 часа и след това се оставя при стайна температура една нощ. Утаеният 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин се филтрира и промива с малко количество студена вода, етанол и етер като се получава кристален прах (27,0 g). След концентриране на филтрата и промиване се получава второ количество (20,0 g). Продуктът кристализира из метанол, т.на топене 265-276°C (разлагане).

ИЧ (KBr) 3170 (NH), 1700 (C=O) cm^{-1} .

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

^1H -ЯМР (D_2O) 1,8 (2H), 2,06 (секстет, 2H), 2,49 (s, $-\text{CH}_3$), 2,58 (t, 2H), 3,14 (t, 1H), 3,20 (t, 1H) ppm.

б) 4-амино-1-метилпиперидин-4-карбоксилна киселина

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин (9,75 g, 0,0533 mol) и бариев хидроксид октахидрат (28,8 g, 0,0913 mol) във вода (150 ml) се нагрява при 160°C в автоклав в продължение на 3 часа. Съдържанието на четири такива партии се обединява и утаеният бариев карбонат се филтрира. Филтратът се неутрализира с твърд

CO₂ и утайката се отделя чрез филтриране. След концентриране на филтратата се получава 4-амино-1-метилпиперидин-4-карбоксилна киселина (32,0 g, 95%), т.на топене 275-280°C (разлагане).

ИЧ (KBr) 3300, 1655, 1580 cm⁻¹.

Масспектър m/e 158 (M⁺, 90%), 141 (98%, M-OH), 113 (12%, M-CO₂H), 96 (100%), 71 (52%).

¹H-ЯМР (C₅D₅N+D₂O) 1,2 (m, 2H), 1,48 (s, CH₃N-), 1,7 (m, 2H), 1,9 (m, 2H), 2,0 (m, 2H) ppm.

с) 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин), AF160

Към смес от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин (5 g, 27 mmol) и калиев хидроксид (2,08 g, 37 mmol) в 100 ml абсолютен етанол се прибавя етилбромид (15 g, 137 mmol). Сместа се нагрява при 80°C и се вземат проби на интервал от 0,5 час и се проверяват чрез газовотечна хроматография спрямо вътрешен стандарт (дифенилметан). Основността се определя чрез титруване (HCl 1N) последвано от прибавяне на калиев хидроксид (общо 2,1 g). След получаване на максимален добив (2,5 часа), разтворът се изпарява, прибавя се вода (50 ml) и водният разтвор се екстрахира с хлороформ и се хроматографира на колона върху силикагел като се използва хлороформ/метанол/воден амоняк (80:20:1) като елюираща система. Продуктът се разтваря в етер и се утаява като хлороводородна сол чрез прибавяне на HCl в изопропанол, т. на топене 278-280°C.

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

¹H-ЯМР (свободна основа, CDC₃) 1,2 (t, J=6Hz, 3H), 1,6-1,7 (m, 2H), 1,9-1,95 (m, 2H), 2,1-2,2 (m, 2H), 2,34 (s, 3H), 2,85-2,95 (m, 2H), 3,5 (q, J=6Hz, 2H),

¹H-ЯМР (HCl сол, D₂O), 1,1 (t, J=6Hz, 3H), 1,95-2,05 (m,

2H), 2,2-2,3 (m, 2H), 2,85 (s, 3H), 3,0-3,2 (m, 2H), 3,4-3,5 (m, 2H), 3,5 (q, J=6Hz, 2H) ppm.

^{13}C -ЯМР (свободна основа, CDCl_3), 14,0, 33,1, 46,0, 52,8, 59,9 157,0, 177,0 ppm.

УВ (свободна основа, H_2O) λ_{max} 208 nm (ϵ 3500).

ПРИМЕР 2

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(1'-ацетилхидантоин), AF164

а) AF164A. Смес от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-

хидантоин (3,25 g) в оцетен анхидрид (50 ml) се нагрива под обратен хладник в продължение на 3 часа. Излишният реагент се отстранява при намалено налягане до отделяне на твърд продукт, който се диспергира в етер и се филтрира като се получава бяло твърдо вещество (3,75 g) при кристализация из метанол-дихлорметан, т.на топене 250-254°C (разлагане AF164A.

^1H -ЯМР (D_2O), 1,89 (m, 2H), 2,44 (s, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2,86 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,98 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 3,76 (m, 2H) ppm.

^{13}C -ЯМР (D_2O , диоксан като вътрешен стандарт), 26,6 (C_3 & C_5), 26,9 ($\text{CH}_3\text{CO-}$), 43,8 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 51,4 (C_2 & C_6), 62,0 (C_4), 67,3 (диоксан), 166,0 (C_2), 173,8 ($\text{CH}_3\text{CO-}$), 189,2 (C_4) ppm.

Масспектър m/e 225 (M^+), 210, 166, 155, 123, 95, 71 (100%), 70.

б) AF164B. Част от AF164A (1,10 g) се алкализира с наситен воден разтвор на натриев карбонат и се екстрахира със смес от метанол-дихлорметан, екстрактът се изпарява и остатъкът се екстрахира отново със същата смес от разтворители, екстрактът се филтрира и филтратът се изпарява, а остатъкът (1,0 g) се обработва с ацетон като се получава бял твърд продукт AF164B, т.на топене 225-230°C (разлагане) (кристализиран из CH_2Cl_2 - CH_3OH -

CH₃CN).

¹H-ЯМР (D₂O), 1,53 (m, 2H), 2,21 (s, CH₃CO-), 2,39 (s, CH₃N-), 2,65-2,80 (m, 6H) ppm.

¹³C-ЯМР (D₂O, с диоксан като вътрешен стандарт), 26,9 (CH₃CO-), 28,3 (C₃ & C₆), 45,0 (CH₃N-), 50,9 (C₂ & C₅), 64,9 (C₄), 67,3 (диоксан), 168,8 (C₂'), 173,6 (CH₃CO-), 193,9 (C₄') ppm.

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

с) AF164 (HCl сол). Хлороводородна сол на AF164 се получава чрез взаимодействие на разтвор на AF164A или AF164B в метанол с HCl, разтворен в изопропанол докато рН стане кисело (рН 1-2). Солта, AF164 (HCl сол), се утаява след кратко време като бяло твърдо вещество, т.на топене 301-2°C (разлагане).

¹H-ЯМР (D₂O), 2,17 (m, 2H), 2,50 (s, CH₃CO-), 2,93 (s, CH₃N-), 3,10 (m, 2H), 3,48-3,71 (m, 4H) ppm.

¹³C-ЯМР (D₂O, диоксан като вътрешен стандарт), 26,7 (C₃ & C₆), 26,9 (CH₃CO-), 43,9 (CH₃N-), 51,1 (C₂ & C₅), 61,8 (C₄), 67,3 (диоксан), 154,8 (C₂'), 173,4 (CH₃CO-), 176,0 (C₄') ppm.

Хидролиза на AF164

AF164A и AF164B се хидролизират при нагряване под обратен хладник в 0,2N водна NaOH (1-2 часа) като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин, идентифициран при сравнение на неговите ТСХ и ¹H-ЯМР с тези на автентична проба.

ПРИМЕР 3

Пиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин) AF160(дез)

Към разтвор на сух AF160 (2,0 g, 9,5 mmol) в дихлоретан (25 ml, сушен с молекулно сито) се прибавя α-хлороетил хлороформиат (1,0 ml, 9,3 mmol) при стайна температура и сместа

се нагрява до 60°C в продължение на 1 час. Дихлоретанът се отстранява под вакуум, полученият твърд продукт се разтваря в 20 ml метанол и разтворът се нагрява в продължение на още 30 минути при 60°C. След това метанолът се отстранява под вакуум и полученият маслообразен твърд продукт се разтваря във воден разтвор на натриев карбонат и се промива с етер. Водният слой се екстрахира с хлороформ и екстрактът се изпарява като се получава сурово масло, което след това се пречиства посредством колонна хроматография върху колона със силикагел. След елуиране с хлороформ: метанол: воден амоняк (4:1:0,1) се получава AF160 (Дез) (1,12 g, 60% добив) като бял прах с т.на топене 225-227°C.

Масспектър m/e 197 (M^+ основен пик), 57.

^1H -ЯМР (CDCl_3), 1,17 (t, $J=6\text{Hz}$, 3H), 1,65-1,7 (m, 2H), 1,85-2,0 (m, 2H), 2,75-2,85 (m, 2H), 3,05-3,15 (m, 2H), 3,5 (q, $J=6\text{Hz}$, 2H) ppm.

ПРИМЕР 4

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-метилхидантоин) AF178

Към смес от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин (5,0 g, 27,3 mmol) и натриев хидроксид (2,0 g, 50 mmol) в 120 ml метанол, се прибавя метилтозилат (11,2 g, 60 mmol). Реакционната смес се разбърква една нощ при стайна температура, метанолът се отстранява чрез изпаряване и маслообразният остатък се разтваря във воден разтвор на натриев карбонат и се екстрахира с хлороформ. Органичният екстракт се изпарява и полученият суров продукт по-нататък се пречиства посредством колонна хроматография върху силикагел и се елюира с хлороформ/метанол/воден амоняк (9:1:0,1) като се получава 1,2 g (22%) бяло твърдо вещество с т.на топене 229-231°C.

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

^1H ЯМР (свободна основа, $CDCl_3$), 1,6-1,7 (m, 2H), 2,1-2,3 (m, 4H), 2,34 (s, 3H), 2,85-2,95 (m, 2H), 3,02 (s, 3H) ppm.

ПРИМЕР 5

Пиперидин-4-спиро-5'-(3-метилхидантоин) AF179

Бялото прахообразно вещество, което се получава по същия начин както в пример 3 се разтваря в изопропанол и се подкислява като се използва солна киселина, при което се получава бяла утайка с т.на топене $320^\circ C$ (разлагане).

Масспектър m/e 183 (M^+ , основен пик), 57.

^1H -ЯМР (HCl сол, D_2O), 2,0 (m, 2H), 2,2 (m, 2H), 2,96 (s, 3H), 3,3 (m, 2H), 3,6 (m, 2H).

ПРИМЕР 6

Синтез на 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-пропаргилхидантоин) (AF185).

Суспензия от КН (11 g, 0,1 mol, 35 тегловни % дисперсия в минерално масло) и 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин (сушен върху P_2O_5 , 25 g, 0,13 mol) се разбъркват при стайна температура в сух диметилформаид (500 ml). Прибавя се пропаргилхлорид (15 g, 0,2 mol) и реакционната смес се нагрява до $50^\circ C$ в продължение на двадесет минути. Сместа се охлажда и се подкислява до pH-3 (с водна солна киселина) и диметилформамидът се отстранява чрез екстракция със смес от петролев етер-етер 1:1 и след това с етер. Водната фаза се алкализира с натриев карбонат до pH-10 и се екстрахира 2 пъти с хлороформ. Хлороформените екстракти се обединяват, сушат и изпаряват като се получава суров продукт като масло (27 g), което се хроматографира на силикагелна колона. След елуиране с

хлороформ/метанол/амоняк (80:19:1) се получава 3,0 g чист AF185 и няколко фракции (общо 10 g) съдържащи незначителни онечиствания. Свободната основа се утаява като HCl сол, 3,2 g бяла нехигроскопична сол се получава чрез кристализация из метанол.

^1H -ЯМР (D_2O , HCl сол) δ 2,0-2,35 (m, 4H), 2,64 (t, 1H, $J=3,5\text{Hz}$), 2,91 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 3,1-3,2 (m, 2H), 3,5-3,7 (m, 2H), 4,27 (bs, 2H) ppm.

^1H -ЯМР (D_2O излишък натриев карбонат) δ 1,65-1,75 (m, 2H), 1,9-2,05 (m, 2H), 2,25 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,2-2,3 (m, 4H), 2,8-2,9 (m, 4H), 4,25 (s, 2H) ppm.

^1H -ЯМР (CDCl_3 , свободна основа) δ 1,85-1,95 (m, 4H), 2,2 (m, 2H), 2,23 (t, 1H, $J=3,5\text{ Hz}$), 2,4(s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,9-2,95 (m, 2H), 4,3 (d, 2H, $J=3,5\text{ Hz}$), 6,4 (bs, 1H) ppm.

Масспектър m/e 221 (M^+ , основен пик), 206 (M-15), 149.

ПРИМЕР 7

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2',5'-бис(метилтио)-4'Н-имидазол) AF177

Към разтвор на 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-дитиохидантоин) 1,00 g, 4,65 mmol, виж пример 11) в метанол (15 ml), се прибавя NaOH (0,30 g, 7,50 mmol) и след това постепенно разтвор на метилйодид (1,00 g, 7,04 mmol) в метанол (3,0 ml) и сместа се разбърква при стайна температура в продължение на 1,5 часа. Утаява се NaBr и се филтрира и се промива с метанол. Филтратът и промивките се обединяват и разтворителят се отстранява, остатъкът се алкализира с воден разтвор на калиев карбонат и се екстрахира с етер. Органичният екстракт се суши (Na_2SO_4) и разтворителят се отстранява като остава остатък, който

се хроматографира на силикагелна колона. След елюиране с 78:18:3:1 смес от разтворителите етер/хлороформ/метанол/амоняк (воден) се получава AF177, т.на топене 101-102°C (465 mg), след кристализиране из хексан.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,33 (m, 2H), 1,98 (m, 2H), 2,39 (s, CH_3N -), 2,56 (s, CH_3S -), 2,59 (s, CH_3S -), 2,48-2,64 (m, 2H), 2,82 (m, 2H) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) 14,1 (CH_3S -), 14,2 (CH_3S -), 34,9 (C_3 & C_5), 46,1 (CH_3N -), 52,2 (C_2 & C_6), 83,0 (C_4), 171,6 (C_2), 203,5 (C_5) ppm.

Масспектър m/e 244 (M^++1), 185, 149, 93, 75

ИЧ (KBr) 2920, 2797, 1535, 1477, 1465, 1452, 1378, 1316, 1286, 1210, 1108, 1054, 1000, 965, 942, 900, 776, 696 cm^{-1} .

УВ (EtOH) λ_{max} 257 nm (ϵ 16100).

ПРИМЕР 8

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-4'-тиохидантоин)
AF182

Проба 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-тион) AF170 (100 mg, виж пример 12) се разтваря в 20% HCl (1 ml) и разтворът се нагрява под обратен хладник в продължение на 1,5 часа. Реакционната смес се алкализира с конц. разтвор на NaOH до pH 14 и след това се екстрахира с дихлорметан. Органичният екстракт се суши (Na_2SO_4) и разтворителят се изпарява като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-4'-тиохидантоин) като бало твърдо вещество (74 mg) кристализация из петролев етер - дихлорметан, т.на топене 176-178°C.

^1H -ЯМР (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 -ЯМР (CDCl_3) 11,8 (CH_3CH_2 -), 36,9 (C_3 & C_5), 37,4 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 46,1 (CH_3N -), 51,2 (C_2 & C_6), 68,1 (C_4), 157,1 (C_2), 208,1 (C_4) ppm.

Масспектър m/e 227 (M^+), 211 (M^+-O), 194 (M^+-SH), 170 ($\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$), 71, 70 (100%).

УВ (EtOH) λ_{max} 280 nm (ϵ 4400).

ПРИМЕР 9

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(4'-метилтио-3'-имидазолин-2'-тион) AF183

Повтаря се пример 7, като се използват еквивалентни количества метилйодид, натриев хидроксид и дитиохидантоин като се получава освен бис-(метилтио)производно AF177 и 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(4'-метилтио-3'-имидазолин-2'-тион) AF183, т.на топене 218-220°C (разлагане) (из CH_2Cl_2 -ацетон).

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,74 (m, 2H), 2,07 (m, 2H), 2,37 (m, 2H), 2,39 (s, CH_3N -), 2,69 (s, CH_3S -), 2,95 (m, 2H), 10,3 (brs, $-\text{NH}-$) ppm.

Масспектър m/e 229 (M^+), 182 (M^+-CH_3), 123, 122, 70.

УВ (EtOH) λ_{max} 312 nm (ϵ 15300).

ПРИМЕР 10

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-2',4'-дитиохидантоин) AF163

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин) (0,570 g) и фосфоренпентасулфид (0,570 g) в прахообразно състояние се смесват грижливо и се нагреват под обратен хладник с тетралин (15 ml) в продължение на 2 часа. След охлаждане на реакционната смес до стайна температура се образува твърда кафява утайка, тетралинът се отстранява под намалено налягане и утайката се

раздробява и промива с петролев етер. Алкализира се с концентриран воден разтвор на натриев хидроксид и се екстрахира с дихлорметан. Екстрактът се суши (Na_2SO_4) и изпарява като се получава остатък (0,250 g), който се хроматографира върху колона от силикагел (Merck) (60,15 g). Елуира се със с мес 77:18:4:1 от хлороформ/етер/метанол/воден амоняк като се получава чист AF163 (50 mg), кристализира се из CH_2Cl_2 -етер, т.на топене 223-225°C (разлагане).

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,27 (t, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 1,55-1,67 (m, 2H), 2,03-2,19 (m, 2H), 2,26-2,46 (m, 2H), 2,36 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 2,89-3,04 (m, 2H), 4,27 (q, $J=7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 8,25 (brs, $-\text{NH}-$) ppm.

^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) 11,6 (CH_3CH_2-), 36,9 (C_3 & C_5), 39,9 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 45,9 (CH_3N), 49,9 (C_2 & C_6), 72,9 (C_4), 179,8 (C_2), 207,8 (C_4) ppm.

Масспектър m/e 243 (M^+), 186 ($\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$), 149, 71, 70 (100%), 57.

ИЧ (KBr) 3177 (NH), 2930, 2778, 1513, 1434, 1357, 1231, 1116, 1090, 1070, 1040, 961, 801, 780, 626, 546, 457 cm^{-1} .

УВ (EtOH) λ_{max} 302 nm (ϵ 34200), 226 nm, (ϵ 7700).

Синтез на тартаратна сол на AF163

Към разтвор на AF163 свободна основа (0,735 g, 3,025 mmol) в метиленхлорид (15 ml) - метанол (5 ml) се добавя разтвор на L(+)-винена киселина (0,214 g, 1,427 mmol) в метанол (2,0 ml). Сместа се разбърква при стайна температура в продължение на 0,5 час, след това разтворителят се изпарява и остатъкът се суспендира в етер-метиленхлорид, филтрира и промива със същата смес от разтворители като се получава жълто твърдо вещество AF163 (тартарат), т.на топене 221-225°C (разлагане, 0,923 g, 96%

добив).

^1H -ЯМР (D_2O) 1,27 (t, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 2,08 (m, 2H), 2,49 (m, 2H), 3,01 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 3,31 (m, 2H), 3,76 (m, 2H), 4,26 (q, $J=7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,37 (s, $-\text{CHOH}$) ppm.

ПРИМЕР 11

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-дитиохидантоин)

AF173

Разтвор на 1-метил-4-пиперидон (29,35 g, 0,260 mol), KCN (26,57 g, 0,408 mol), NH_4Cl (21,00 g, 0,393 mol) и CS_2 (26 ml) в етанол (200 ml) - вода (50 ml) се нагрява под обратен хладник (50-55°C) в продължение на 8 часа. Реакционната смес се оставя при стайна температура една нощ и получената утайка се филтрира и промива с вода и след това с етанол като се получава жълто твърдо вещество (26,3 g, 47,0 % добив), т.на топене 250-253°C (разлагане), кристализация из метанол, т.на топене 252-254°C (разлагане).

^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) 1,43-1,56 (m, 2H), 1,89-2,05 (m, 2H), 2,21 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 2,26-2,40 (m, 2H), 2,64-2,79 (m, 2H), 11,14 (brs, -NH-) ppm.

^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) 36,2 (C_3 & C_5), 45,5 ($\text{CH}_3\text{N}-$), 49,9 (C_2 & C_6), 74,8 (C_4), 181,5 (C_2), 212,0 (C_4).

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

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

УВ (0,01N HCl) λ_{max} 298 nm (ϵ 32000), 220 nm (ϵ 8000).

ПРИМЕР 12

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-2',4'-дитио-

хидантоин) AF163,

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(4'-етилтио-3'-имидазолин-2'-тион) AF176,

1-метилпиперидин-4-спиро-4'(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-тион) AF170.

Към суспензия от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-дитиохидантоин) AF173 (3,30 g, 15,3 mmol) в сух диметилформамид (30 ml) се добавя NaN (0,760 g, 60% в минерално масло, 19,0 mmol) и сместа се разбърква при 50°C в продължение на 1,5 часа. Към горната смес постепенно се прибавя разтвор на EtBr (1,85 g, 17,0 mmol) в диметилформамид (6 ml) и се разбърква при 75-80°C в продължение на 4 часа. След престояване при стайна температура една нощ, образуваната утайка (NaBr) се филтрира и промива с етер. Филтратът и промивките се обединяват и изпаряват като се получава масло, от което се отделя неразтворимо в дихлорметан твърдо вещество (1,5 g), което се оказва изходен продукт (идентични ЯМР и ТСХ). Остатъкът се хроматографира върху колона от силикагел. Елюира се със смес от разтворители етер/хлороформ/метанол/воден амоняк 68:27:4:1 като първо се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-2',4'-дитиохидантоин) AF163 (0,95 g), идентичен на продукта получен по-горе при взаимодействие на AF160 с P₂S₅. Елюирането продължава като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(4'-етилтио-3'-имидазолин-2'-тион) AF176 (0,15 g). Кристализира се из хексан-CH₂Cl₂, т. на топене 212-215°C (разлагане).

¹H-ЯМР (CDCl₃) 1,42 (t, J=7,2 Hz, CH₃CH₂-), 1,73 (m, 2H), 2,06 (m, 2H), 2,31 (m, 2H), 2,38 (s, CH₃N-), 2,95 (m, 2H), 3,33 (q, J=7,2 Hz, -CH₂CH₃), 10,0 (br, -NH-) ppm.

^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) 14,2 ($\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2-}$), 25,6 ($-\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$), 35,0 ($\text{C}_3\&\text{C}_5$), 45,8 ($\text{CH}_3\text{N}-$), 50,5 ($\text{C}_2\&\text{C}_6$), 74,3 (C_4), 192,1 (C_2), 198 (C_4) ppm.

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

ИЧ (KBr) 3135 (NH), 2930, 2788, 1476, 1463, 1446, 1281, 1257, 1232, 1158, 1141, 1121, 1096, 958, 711, 674, 535 cm^{-1} .

УВ (EtOH) λ_{max} 314 nm (ϵ 5400), 282 nm (ϵ 6700).

При повторение на горната реакция с 1,5 моларен излишък EtBr върху AF173 се получава допълнително количество от горните моноетилни производни. Диетилното производно 1-метил-пиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-тион) AF170 има т.на топене 66-67°C (кристализация из хексан).

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,24 (t, $J=7,2$ Hz, $\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2-}$), 1,24 (m, 2H), 1,44 (t, $J=7,2$ Hz, $\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2-}$), 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, $-\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$), 3,93 (q, $J=7,2$ Hz, $-\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) 12,2 ($\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2-}$), 13,9 ($\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2-}$), 25,7 ($-\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$), 36,8 ($\text{C}_3\&\text{C}_5$), 39,0 ($-\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$), 46,1 ($\text{CH}_3\text{N}-$), 51,5 ($\text{C}_2\&\text{C}_6$), 82,2 (C_4), 158,5 (C_2), 216,7 (C_5) ppm.

Масспектър 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.

ИЧ (KBr) 1574, ($\text{C}=\text{N}$), 1446, 1372, 1354, 1212, 1071, 1060, 936 cm^{-1} .

УВ (EtOH) λ_{max} (ϵ) 296 (22000), 252 (17700) nm.

Киселинна хидролиза на AF176

Към AF176 (48 mg) се добавя водна HCl (1 ml 20%).

Веднага се забелязва миризма на меркаптан. Полученият разтвор

се разбърква при стайна температура в продължение на 1 час, след това се изпарява при 50°C при намалено налягане, като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тиохидантоин) HCl сол (X) като бяло твърдо вещество.

^1H -ЯМР (D_2O) 2,10-2,43 (m, 4H), 2,94 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 3,20 (m, 1H), 3,47-3,78 (m, 3H) ppm.

Масспектър m/e 199 (M^+), 181, 171 ($\text{M}^+ - \text{CO}$), 156 ($\text{M}^+ - \text{HNCO}$), 142 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7\text{N}$), 111, 96, 71, 70, 57.

УВ (H_2O) λ_{max} 264 nm (ϵ 20400), 224 nm (ϵ 8600).

ПРИМЕР 13

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тиохидантоин) AF195

а) Разтвор на 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-дитиохидантоин)(AF173) (10,0 g) в етаноламин (40 ml) - вода (75 ml) се нагрява под обратен хладник в продължение на 1,75 часа. Разтворителят и излишният реагент се отстраняват под намалено налягане. Повторна кристализация на остатъка из ацетонитрил-дихлорометан, ацетон и етанол-ацетонитрил дава чист 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тио-4'-(8 β -хидроксиетилимино-хидантоин)), т.на топене 230-231°C (разлагане).

^1H -ЯМР (D_2O) 11,74 (m, 2H), 1,94 (m, 2H), 2,26 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,17-2,34 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 3,54 (t, $J=5,4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 3,74 (t, $J=5,4$ Hz, $=\text{NCH}_2-$) ppm.

^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) 33,7 ($\text{C}_3\&\text{C}_5$), 45,4 ($-\text{CH}_2-$), 45,9 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 50,6 ($\text{C}_2\&\text{C}_6$), 59,2 ($-\text{CH}_2-$), 66,3 (C_4), 182,5 ($-\text{C}=\text{S}$), 195,0 ($-\text{C}=\text{N-}$) ppm.

Масспектър m/e 242 (M^+), 224 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 199, 185, 172 ($\text{M}^+ - 70$), 154 ($\text{M}^+ - 70 - \text{H}_2\text{O}$), 71, 70.

УВ (0,01N HCl) λ_{max} 227 nm (ϵ 22200), 242 nm (ϵ 10200).

Иминохидантоиновото производно (1,40 g) се разтваря във водна HCl (5,0 ml, 1:1) и се нагрява под обратен хладник в продължение на 1 час. Реакционната смес се изпарява под намалено налягане и остатъкът се кристализира из метанол като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тиохидантоин) хидрохлорид (0,756 g), идентичен на продукта получен при хидролиза на AF 176 (виж пример 12).

b) Разтвор на 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-дитиохидантоин) (AF173) (10,0 g, 0,0465 mol) и норм.-бутиламин (17,0 g, 0,233 mol) в етанол (80 ml) се нагрява под обратен хладник в продължение на 1,5 часа. Кристалното твърдо вещество, което се отделя от охладената реакционна смес се филтрира, промива с малко количество етанол, с етер и петролев етер като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тио-4'-етилиминохидантоин) (AF189) (11,1 g, 0,0437 mol) 94% добив. Продуктът кристализира из дихлорометан-метанол като игли, т.на топене 236-239°C (разлагане).

^1H -ЯМР ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) 0,94 (t, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 1,38 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,69 (m, 2H), 1,89 (m, 2H), 2,40 (m, 2H), 2,41 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 2,91 (m, 2H), 3,47 (t, $J=7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{N}=$) ppm.

Масспектър m/e 254 (M^+), 197 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9$), 184 ($\text{M}^+ - 70$), 149, 128, 71, 70, 57 (C_4H_9^+).

Иминохидантоиновото производно AF189 (10,45 g) се разтваря във водна солна киселина (15,0 ml, 16%) и се нагрява под обратен хладник в продължение на 1 час. Реакционната смес се дестилира докато остане малко количество течност. След добавяне на етанол (50 ml) към остатъка и охлаждане се получава твърд продукт, който се филтрира и промива с малко количество етанол и

с етер като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тиохидантоин) хидрохлорид (AF195) (8,42 g, 87% добив), т.на топене $> 295^{\circ}\text{C}$ (разлагане), идентичен на продукта получен по-горе.

ПРИМЕР 14

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(оксазолидин-2'-тион) AF165

Към безводен DMSO (10 ml) съдържащ малко количество KOH на прах, се прибавя 4-аминометил-4-хидрокси-1-метилпиперидин (0,595 g, 4,13 mmol) при разбъркване, след това въглеродендисулфид (0,340 g, 4,47 mmol). Реакционната смес се нагрява при 50°C в продължение на 2 часа. Разтворителят се отстранява под вакуум и остатъкът кристализира няколко пъти из метанол, ацетон и CH_2Cl_2 като се получава кристално твърдо вещество с т. на топене $190-195^{\circ}\text{C}$ (211 mg).

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,80-1,98 (m, 2H), 2,03-2,16 (m, 2H), 2,32 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,44-2,72 (m, 4H), 3,51 (s, $-\text{CH}_2\text{N-C=S}$) ppm.

^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6) 35,1 (C_3Cl_5), 45,7 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 51,5 (C_2ClC_6), 53,1 ($-\text{CH}_2\text{NH-}$), 86,4 (C_4), 187,2 ($-\text{C=S}$) ppm.

ПРИМЕР 15

N-метилнортропан-3-спиро-5'-(3'-метилхидантоин) AF167

N-метилнортропан-3-спиро-5'-(3'-етилхидантоин) AF168

а) N-метилнортропан-3-спиро-5'-хидантоин

Смес от тропинон (45 g, 0,32 mol) в етанол (160 ml), амониев карбонат (93 g, 0,96 mol) във вода (400 ml) и KNC (25,8 g, 0,40 mol) във вода (84 ml) се нагрява при 60°C в продължение на 2 часа и след това се държи при стайна температура в продължение на 16 часа. Отделя се N-метилнортропан-3-спиро-5'-хидантоин (61,33 g, 0,29 mol, 92% добив) и се суши в десикатор, т. на топене

330°C.

Масспектър m/e 209 (M^+).

^1H -ЯМР (CD_3COOD) 2,1 (m, 2H, $H_6=H_7(\alpha)$), 2,3 (m, 2H, $H_2=H_4(\beta)$), 2,4 (m, 2H, $H_2=H_4(\alpha)$), 2,7 (m, 2H, $H_6=H_7(\beta)$), 2,9 (s, 3H), 3,0 (bs, NH), 4,1 (bs, 2H, $H_1=H_5$) ppm.

^1H -ЯМР (DCI, D_2O) 2,3 (m, 4H, $H_6=H_7(\alpha)$ и $H_2=H_4(\beta)$), 2,5 (m, 2H, $H_2=H_4(\alpha)$), 2,7 (m, 2H, $H_6=H_7(\beta)$), 2,9 (s, 3H), 4,15 (bs, 2H, $H_1=H_5$) ppm.

^{13}C -ЯМР (DCI, D_2O) 25,5 ($C_6=C_7$, t), 33,5 ($C_2=C_4$, t), 39,7 (CH_3 , q), 59,3 (C_3-C_5' , s), 63,0 ($C_1=C_5$, d), 159,3 (C_2' , s), 180,2 (C_4' , s) ppm.

б) AF167 и AF168

N-метилнортропан-3-спиро-5'-хидантоин (1 экв) и KOH (1 экв.) се смесват във вода при стайна температура в продължение на няколко минути. Към водния разтвор се прибавя на капки метилйодид или етилбромид (2 экв.) в метанол или етанол. Реакционната смес се екстрахира с хлороформ и се суши над магнезиев сулфат преди изпаряване. Продуктите AF167 и AF168 се получават с около 10% добив.

AF167

^1H -ЯМР (D_2O) 1,65 (m, 2H, $H_6=H_7(\alpha)$), 1,8 (m, 2H, $H_2=H_4(\beta)$), 2,2 (m, 2H, $H_2=H_4(\alpha)$), 2,4 (m, 2H, $H_6=H_7(\beta)$), 2,55 (s, 3H), 2,85 (s, 3H), 3,25 (bs, 2H, $H_1=H_5$) ppm.

^1H -ЯМР ($CDCl_3$) 1,55 (m, 2H, $H_6=H_7(\alpha)$), 1,75 (m, 2H, $H_2=H_4(\beta)$), 2,2 (m, 2H, $H_2=H_4(\alpha)$), 2,4 (s, 3H), 2,45 (m, 2H, $H_6=H_7(\beta)$), 3,0 (s, CH_3), 3,3 (bs, 2H, $H_1=H_5$), 6,3 (bs, NH) ppm.

Масспектър m/e 223 (M^+)

AF168

^1H -ЯМР (CDCl_3 , CD_3OD) 1,1 (t, 3H), 1,6 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\alpha)$), 1,75 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\beta)$), 2,2 (m, 2H $\text{H}_2=\text{H}_4(\alpha)$), 2,35 (s, 3H), 2,4 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\beta)$), 3,3 (bs, 2H, $\text{H}_1=\text{H}_5$), 3,55 (q, 2H) ppm.

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,2 (t, 3H), 1,6 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\alpha)$), 1,75 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\beta)$), 2,2 (m, 2H, $\text{H}_2=\text{H}_4(\alpha)$), 2,4 (s, 3H), 2,45 (m, 2H, $\text{H}_6=\text{H}_7(\beta)$), 3,3 (bs, 2H, $\text{H}_1=\text{H}_5$), 3,55 (q, 2H), 6,3 (bs, NH) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) 13 (CH_2CH_2), 25 ($\text{C}_6=\text{C}_7$), 35 ($\text{C}_3=\text{C}_4$), 40 ($\text{N}-\text{CH}_3$), 40,5 ($\text{N}-\text{CH}_2$), 59 ($\text{C}_3-\text{C}_5'$), 60 ($\text{C}_1=\text{C}_5$), 159 (C_2'), 180 (C_4') ppm.

Масспектър m/e 237 (M^+).

ПРИМЕР 16

1-метилпиперидин-4-спира-5'-(3'-этилоксазолидин-2'-он)

AF172

а) 4-ацетамидометил-4-гидрокси-1-метилпиперидин

4-аминометил-4-гидрокси-1-метилпиперидин (2,95 g, 0,02 mol), калиев карбонат (6,5 g, 0,047 mol) и оцетен анхидрид (8,5 g, 0,08 mol) в метанол се смесват при стайна температура в продължение на два часа. За неутрализация се прибавя натриев хидроксид и разтворът се екстрахира с хлороформ. След изпаряване се получава жълто масло, което се идентифицира като 4-ацетамидометил-4-гидрокси-1-метилпиперидин (3,4 g, 0,018 mol, 91% добив).

б) 4-етиламинометил-4-гидрокси-1-метилпиперидин

4-ацетамидометил-4-гидрокси-1-метилпиперидин (3,4 g, 0,018 mol) в сух тетраhydroфуран се нагрява под обратен хладник в присъствие на литиевоалуминиев хидрид (4 g). След 3 дни сместа се излива в лед-вода и се филтрира през Celite. Разтворителят се

изпарява и след добавяне на вода разтворът се екстрахира с хлороформ и екстрактът се суши с магнезиев сулфат и изпарява като се получава 1,03 g (33% добив) суров продукт. Така полученият продукт, 4-етиламинометил-4-хидрокси-1-метилпиперидин, се използва без по-нататъшно пречистване.

с) 1-метилпиперидин-4-спира-5'-(3'-етилоксазолидин-2-он)

AF172

4-етиламинометил-4-хидрокси-1-метилпиперидин (16,8 g, 0,1 mol) и N,N'-карбонилдиимидазол (32 g, 0,2 mol) се смесват в 400 ml хлороформ под азот. След изпаряване се получава 50 g суров продукт, който се промива пълно с хексан, който след това се изпарява като се получава продуктът 1-метилпиперидин-4-спира-5'-(3'-етилоксазолидин-2-он) AF172 като жълтеникаво масло (16,8 g, 0,085 mol, 85% добив).

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,15 (t, 3H), 1,8 (m, 2H), 1,95 (m, 2H), 2,3 (s, 3H), 2,55 (m, 2H), 3,28 (s, 2H), 3,32 (q, 2H) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) 13 (CH_3CH_2), 22 (CH_3CH_2), 37 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$), 39 (CH_2NEt), 52 (NCH_2CH_2), 55 (C-O), 157,5 (C=O) ppm.

Масспектър m/e 198 (M^+).

ПРИМЕР 17

1-метилпиперидин-4-спира-4'-(3'-етилоксазолидин-2-он)

AF174

а) 4-ацетамидо-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин

4-амино-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин (2,95 g, 0,02 mol), калиев карбонат (6,5 g, 0,047 mol) и оцетен анхидрид (8,5 g, 0,08 mol) в метанол се смесват при стайна температура в продължение на два часа. За неутрализация се прибавя натриев хидроксид и разтворът се екстрахира с хлороформ. След изпаряване полученото бяло твърдо вещество кристализира из

горещ ацетон като се получава 4-ацетамидо-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин (1,67 g, 0,009 mol, 45% добив).

b) 4-етиламино-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин

4-ацетамидо-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин (1,6 g, 8,6 mmol) в сух тетраhydroфуран се нагрява под обратен хладник в присъствие на литиевоалуминиев хидрид (3 g). След 4 часа сместа се излива в лед-вода и се филтрира през Celite. Разтворителят се изпарява и след изпаряване на по-голямата част от водата, разтворът се екстрахира с хлороформ, суши се с магнезиев сулфат и се изпарява като се получава 1,13 g (77% добив) достатъчно чист продукт. Продуктът, 4-етиламино-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин, така получен, се използва без по-нататъшно пречистване.

c) 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(3'-етилоксазолидин-2-он) AF 174

4-етиламино-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин (172 mg, 1 mmol) и N,N'-карбонилдиимидазол (486 mg, 3 mmol) се смесват в хлороформ под азот за период от 3 часа. След изпаряване се получава суров продукт, който се промива пълно с хексан, който след това се изпарява като се получава продуктът, 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(3'-етилоксазолидин-2-он) AF174, като бял твърд продукт (140 mg, 0,71 mmol, 71% добив).

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,10 (t, 3H), 1,6 (m, 2H), 1,95 (m, 4H), 2,25 (s, 3H), 2,85 (m, 2H), 3,2 (q, 2H), 4,1 (s, 2H) ppm.

Масспектър m/e 198 (M^+).

ПРИМЕР 18

2-N-метилспиро-(1,3-сукцинимид-4,3')хинуклидин AF133

a) етил (3-хинуклидилиден)цианоацетат

Смес от 3-хинуклидинон (30 g, 0,24 mol), етил цианоацетат (40 g, 0,35 mol), амониев ацетат (3,8 g), оцетна киселина (11 g) и 120 ml бензен се нагрява под обратен хладник и водата се отстранява чрез ацеотропна дестилация (общо 4 ml вода). Бензеновият разтвор се охлажда, прибавя се калиев карбонат (30 g) в 120 ml вода и сместа се екстрахира с толуен (3x500 ml). Толуеновите екстракти се обединяват, сушат и продуктът се утаява като хлороводородна сол с добив 63 g (95% добив) на суров продукт.

ТСХ, амониев хидроксид (25% във вода) 2 обемни % в метанол върху силикагел арт.5735 (Merck) R, 0,67.

Продуктът по-нататък може да се пречисти чрез кристализация из етанол или изопропанол.

^1H ЯМР δ (CDCl_3 -TMS) свободна основа: 1,29 (t, 3H, CH_3), 4,2 (q, 2H, CH_2), 1,7-1,9, 2,8-3,2 (m, хинуклидинов скелет).

^{13}C -ЯМР δ (CDCl_3 -TMS): 14 (CH_3), 62 (CH_2O), 189 ($\text{C}=\text{O}$), 162 ($\text{C}=\text{N}$), 115 ($\text{C}-\text{CN}$), 100 ($\text{C}=\text{C}$), 33,7 ($\text{C}-\text{H}$).

б) карбоетокси-3-карбоетоксиметилхинуклидин

Етил (3-хинуклидилиден)цианоацетат (64 g, 0,24 mol) и калиев цианид (17 g, 0,26 mol) разтворен в 25 ml вода се разтварят в 125 ml етанол. Сместа се нагрява под обратен хладник в продължение на двадесет минути, охлажда се, декантира се от калиевия хлорид, който калиев хлорид се промива два пъти с по 50 ml порции етанол. Обединените алкохолни разтвори се изпаряват и маслообразният остатък се разтваря в 250 ml концентрирана солна киселина и се нагрява под обратен хладник в продължение на 24 часа. Разтворът след това се изпарява и остатъкът се промива няколко пъти с ацетон и се суши. Сухият твърд продукт се нагрява

под обратен хладник в етанол наситен с хлороводород газ в продължение на 20 часа. След това етанолът се изпарява и остатъкът се алкализира внимателно, като се използва натриев карбонат и се екстрахира в хлороформ. Хлороформният разтвор се суши, изпарява и суровият диестер по-нататък се пречиства посредством колонна хроматография като се използва 2% метанол в хлороформ като елюираща система.

Масспектър m/e (M^+), основен пик m/e 196 ($M-C-OEt$).

^1H -ЯМР δ ($CDCl_3$ -TMS) 1,2 (dt, 6H, CH_3), 4,2-4,3 (dt, 4H, CH_2O), 1,3-1,6, 2,6-3,1 (m, хинуклидинов скелет).

с) 2-N-метилспиро-(1,3-сукцинимид-4,3')хинуклидин (AF133)

3-карбоетокси-3-карбоетоксиметилхинуклидин (3,35 g, 12 mmol) се разтваря в 4,5 g метиламин и се нагрява под налягане при 190°C (90 часа). Реакционната смес се охлажда, изпарява и твърдият остатък се пречиства посредством колонна хроматография върху силикагел като се използва 2% метанол в хлороформм съдържащ 0,2 амоняк като елюираща система. AF133 се получава като бяло твърдо вещество, т.на топене 94-96°C, 1,2 g (5,7 mmol).

Масспектър M^+ 209.

^1H -ЯМР δ ($CDCl_3$ -TMS): 3,4 (d, 1H)(H_2), 2,96 (s, 3H)(CH_3), 2,5 (d, 1H)(H_2), 1,5-1,9 (m, хинуклидинов скелет).

ПРИМЕР 19

2-N-етилспиро-(1,3-сукцинимид-4,3')хинуклидин AF134

Суров 3-карбоетокси-3-карбоетоксиметилхинуклидин (20 g) се разтваря в 70-ен воден разтвор на етиламин и се нагрява при 140°C под налягане в продължение на 7 часа. Реакцията се

контролира с газова хроматография. Суровият продукт се екстрахира с хлороформ, който след това се суши и изпарява. Маслообразният остатък се пречиства чрез колонна хроматография върху силикагел като се използва хлорофор/петролев етер/етанол/воден амониак 17/13/3/0,4. Свободната основа се утаява като хлороводородна сол с добив 6,6 g бяло твърдо вещество, т.на топене 270-272°C. ТСХ, амониев хидроксид (25% във вода) 2 обемни % в метанол върху силикагел арт.5735 Merck R, 0,47.

Масспектър M^+ 222.

^1H -ЯМР δ (CDCl_3 -TMS) свободна основа : 1,5 (t, 3H, CH_3), 3,5 (q, 2H, N- CH_2), 1,6-3,3 (m, хинуклидинов скелет).

ПРИМЕР 20

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(оксазолидин-2',4'-дион)

AF169 и

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилоксазолидин-2',4'-дион) AF180

а) 4-хидрокси-4-циано-1-метилпиперидин

Към прясно дестилиран 1-метилпиперидин-4-он (81,72 g, 0,72 mol) във вода (200 ml) се прибавя около 100 ml HCl 37% до pH 3. Реакционната смес се охлажда на ледена баня и се прибавя калиев цианид (49 g, 0,75 mol) във вода (200 ml) с такава скорост, че да се поддържа вътрешна температура около 10°C. Реакционната смес се разбърква още два часа след добавянето и след това се филтрира. След промиване с вода и сушене, продуктът, 4-хидрокси-4-циано-1-метилпиперидин, се получава с 67% добив като бял прах (67 g, 0,48 mol, т.т. 135°C).

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,9 (m, 2H), 2,2 (m, 2H), 2,4 (s, 3H), 2,45 (m, 2H), 2,75 (m, 2H), 2-3,5 (bm, 1H, OH) ppm.

б) 4-хидрокси-4-карбамоил-1-метилпиперидин

Съединението 4-хидрокси-4-циано-1-метилпиперидин (36,4 g, 0,26 mol) се прибавя постепенно към сярна киселина (80 ml), при външно охлаждане. Сместа се държи при стайна температура в продължение на 41 часа, след което се прибавя към раздробен лед (30 g). Полученият разтвор се неутрализира с бариев карбонат (376 g) до pH 8-9 и след добавяне на вода полученият бариев сулфат се отделя и промива с метанол. Филтратът се концентрира под намалено налягане. Продуктът, 4-хидрокси-4-карбамоил-1-метилпиперидин (28,16 g, 0,18 mol, 69% добив) кристализира из етанол като бяло твърдо вещество (т.т. 180°C).

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,51 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,4 (m, 2H), 2,7 (m, 2H) ppm.

Масспектър m/e 158 (M^+).

с) 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(оксазолидин-2',4'-дион)

AF169

Към разтвор на калиев метоксид (9,8 g, 0,14 mol) в сух етанол (60 ml) се прибавя разтвор на 4-хидрокси-4-карбоксамид-N-метилпиперидин (27,5 g, 0,17 mol) и диетилкарбонат (26,23 g, 0,22 mol) в етанол (300 ml). Получената смес се нагрява под обратен хладник при 80°C в продължение на 60 часа. Реакционната смес се изпарява, остатъкът се разклаща със студена вода (70 ml) и се неутрализира с HCl (2N) до pH 7. Разтворът се концентрира до половината обем и бялата утайка се филтрира. Обработването с етанол дава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(оксазолидин-2',4'-дион) AF169 (22 g, 0,12 mol) с 70% добив като бяло твърдо вещество (т.т. 285°C (разлагане)).

^1H -ЯМР (D_2O , pH 7) 2,07 (m, 2H), 2,27 (m, 2H), 2,95 (s, 3H),

3,30 (m, 2H), 3,60 (m, 2H) ppm.

Масспектър (pH на съединението е 7) m/e 185 и 184 ($M^+ + 1$ и M^+).

d) 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилоксазолидин-2',4'-дион) AF180

Към разтвор на 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(оксазолидин-2',4'-дион) (2,8 g, 0,015 mol) в сух диметилформаид (100 ml) и бавно се прибавя калиев хидрид (65% в масло) докато реакционната смес престане да се затопля (4,9 g са необходими). Бялата суспензия се нагрива под обратен хладник в продължение на един час и се охлажда. На капки се прибавя етилбромид (4,6 g, 0,042 mol). Реакционната смес се затопля спонтанно. След охлаждане на сместа до стайна температура, тя се нагрива под обратен хладник в продължение на два часа. След охлаждане се отделя бяло твърдо вещество, което се промива с етанол. След изпаряване на разтворителя суровият продукт се хроматографира върху силикагелна колона като се използва хлороформ и метанол като елюент. Фракциите съдържащи продукта се изпаряват. Продуктът се изолира и идентифицира във форма на свободна основа. За практически цели тя се превръща в хлороводородна сол с разтвор на HCl/етер/етанол, от който се утаява като 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилоксазолидин-2',4'-дион) хидрохлорид (0,746 g, 0,003 mol, 21% добив) (т.т. 305°C (разлагане)).

^1H -ЯМР (CDCl_3 , свободна основа) δ 1,2 (t, 3H), 1,75 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 2,3 (s, 3H), 2,32 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 3,55 (q, 2H) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3 , свободна основа) δ 13 (CH_2CH_2), 32

(CH_2CH_3), 35 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}$), 46 (N-CH_3), 50 ($\text{CH}_2\text{-N-CH}_3$), 85 (C спиро), 155 (OC=O), 175 (C-C=O) ppm.

Масспектър (свободна основа) m/e 212 (M^+).

ПРИМЕР 21

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-тиазолин) AF151(S)

а) Смес от 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метил-2'-оксазолин), AF151 (1,85 g, 11,01 mmol), фосфорен пентасулфид (1,83 g, 8,23 mmol) и p-толуенсулфонова киселина монохидрат (4,20 g, 22,08 mmol) в ксилен (70 ml) се разбърква с магнитна бъркалка и се нагрява под обратен хладник в продължение на 3 часа. Разтворителят се дестилира ацеотропно и полученият остатък се алкализирa с концентриран воден разтвор на NaOH, след това се екстрахира с дихлорметан. Органичният екстракт се суши (Na_2SO_4) и разтворителят се отстранява като се получава кафяво масло (2,10 g), което се хроматографира върху силикагелна колона (Kieselgel S, 0,032-0,063 mm, Riedel DeHaen, 70 g). След елюиране със смес от разтворители хлороформ (97%) - метанол (3%), който съдържа 10M амоняк, се получават фракции, които съдържат чист AF151(S) (0,90 g).

б) Интимна смес от прахообразни 4-ацетамидо-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин (8,00 g, 0,043 mol) и фосфорен пентасулфид (6,10 g, 0,0275 mol) се суспендира в ксилен (120 ml), разбърква се с магнитна бъркалка и се нагрява под обратен хладник в продължение на 6 часа. Реакционната смес се оставя да стои при стайна температура една нощ и получената утайка се филтрира и промива с петролев етер (40-60°C) като се получава сив прах (13,0 g). Полученият прах се охлажда и се алкализирa с воден концентриран разтвор на NaOH, след това се екстрахира с

дихлорметан няколко пъти. Обединените екстракти се сушат (Na_2SO_4) и изпаряват. Остатъкът се екстрахира с хексан и след отстраняване на хексана се получава червено масло (3,53 g), което се дестилира като се получава безцветно масло, т. на врене 60-68°C (0,4 mm), (2,4 g), което се хроматографира на колона със силикагел 60 (Merck, 100 g). След елюиране със смес от разтворители $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}:\text{NaOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (70:25:4:1) се получава чист AF151(S) (1,71 g).

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,65-1,78 (m, 2H), 1,90-2,04 (m, 2H), 2,19 (s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}-$), 2,32 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 2,30-2,43 (m, 2H), 2,60-2,75 (m, 2H), 3,11 (s, $\text{CH}_2\text{-S}-$) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) 19,9 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{N}-$), 35,8 ($\text{C}_3\&\text{C}_5$), 43,1 ($\text{CH}_2\text{S}-$), 45,6 ($\text{CH}_3\text{N}-$), 52,1 ($\text{C}_2\&\text{C}_6$), 78,5 (C_4), 161,0 ($\text{S-C}=\text{N}-$) ppm.

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

ПРИМЕР 22

1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-метил-2'-имидазолин) AF190

а) 4-амино-4-циано-1-метилпиперидин

1-метилпиперидин-4-он (33,0 g, 0,292 mol), калиев цианид (19,5 g, 0,299 mol) и амониев хлорид (16,5 g, 0,308 mol) се суспендират в метанол (225 ml) и вода (150 ml) и сместа се разбърква при стайна температура в продължение на 12 дни. Получената утайка се филтрира и филтратът се изпарява под намалено налягане. За да се отстрани водата, която може да остане в остатъка, се прибавя етанол и тя се дестилира ацеотропно. Към остатъка отново се прибавя етанол, който се разтваря частично като се получава неорганично твърдо вещество,

което се филтрира и промива с етанол. Филтратът и промивките се обединяват и разтворителят се отстранява като остава вискозно масло (35,5 g), което показва две петна на ТСХ (хлороформ: метанол:воден амониев хидроксид 17:2:1 - силикагел). След кристализация из етер се получава твърд продукт, който след това кристализира из същия разтворител като се получава 4-циано-4-хидрокси-1-метилпиперидин под форма на кристали с т. на топене 130-133°C. След концентриране на матерната луга се утаява второ количество кристално твърдо вещество, което главно е 4-амино-4-циано-1-метилпиперидин.

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,72-1,88 (m, 2H), 2,01 (m, 2H), 1,25-2,37 (m, 2H), 2,32 (s, CH_3N -), 2,74-2,83 (m, 2H) ppm.

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

При ацетилиране на 4-амино-4-циано-1-метилпиперидин с оцетен анхидрид и пиридин се получава 4-ацетамидо-4-циано-1-метилпиперидин, който кристализира из петролев етер - дихлорметанр т. на топене 143-144°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,78-1,96 (m, 2H), 2,04 (s, CH_3CON -), 2,32 (s, CH_3N), 2,35-2,50 (m, 4H), 2,66-2,84 (m, 2H), 6,22 (s, $-\text{NHCO}$ -) ppm.

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

ИЧ (CHCl_3) 3438, 3303, 2940, 2804, 2242 ($\text{C}=\text{N}$), 1670 (амид) cm^{-1} .

След киселинна хидролиза (H_2SO_4) на 4-амино-4-циано-1-метилпиперидин се получава 4-амино-4-карбамоил-1-метилпиперидин, който кристализира из етилацетат-дихлорметан, т. на топене 145-147°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,44 (m, 2H), 1,68 (br, $-\text{NH}_2$), 2,12-2,34 (m,

4H), 2,30 (s, CH₃N-), 2,70-2,82 (m, 2H), 5,47 (br, -NH-), 7,39 (br, -NH-) ppm.

Масспектър m/e 158 (M⁺+1), 157 (M⁺), 140 (M⁺-NH₃, 100%), 113 (M⁺ -CONH₂), 96, 71.

b) 4-амино-4-аминометил-1-метилпиперидин

Разтвор на 4-амино-4-циано-1-метилпиперидин (3,60 g) в сух диметоксиетан се прибавя към механично разбърквана суспензия на LiAlH₄ (3,0 g) в сух диметоксиетан под азотна атмосфера с такава скорост, че температурата да не се вдига над 50°C. В края на прибавянето сместа се нагрява под обратен хладник в продължение на 6 часа. Излишният LiAlH₄ се разрушава чрез прибавяне към студената (0°C) реакционна смес, под азот, на 4M NaOH (10 ml), вода (3 ml), наситен разтвор на натриев хидроксид (10 ml) и вода (5 ml). Органичният разтворител се отделя и водната фаза се екстрахира няколко пъти с тетраhydroфуран. Органичният разтворител, който е отделен и тетраhydroфурановите екстракти се обединяват, сушат (Na₂SO₄) и разтворителите се отделят като се получава съединението съгласно заглавието като вискозно масло (3,17 g), което се пречиства чрез дестилация, т. на врене 60-62°C (0,8 mm).

¹H-ЯМР (CDCl₃) 1,43 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 2,15 (br, -NH₂), 2,30 (s, CH₃N-), 2,30 (m, 2H), 2,56 (s, -CH₂NH), 2,56 (m, 2H) ppm.

Ацетилирането на получения диамин дава диацетамид като твърдо вещество с т. на топене 175-176°C (из ацетонитрил).

¹H-ЯМР (CDCl₃) 1,74 (m, 2H), 1,96-2,10 (m, 2H), 1,99 (s, CH₃CON-), 2,02 (CH₃CON-), 2,21 (m, 2H), 2,28 (s, CH₃N-), 2,51-2,61 (m, 2H), 3,50 (d, J=5,7 Hz, -CH₂NH-), 5,62 (s, -NHCO-), 7,18 (t, -CH₂NHCO-) ppm.

Масспектър m/e 227 (M^+), 184 ($M^+ - CH_3CO$), 169 ($M^+ - CH_3CONH$), 168 ($M^+ - CH_3CONH_2$), 167, 155, 112, 109 (100%), 96, 71, 70.

Диацетаммидът се получава също чрез хидрогениране на 4-амино-4-циано-1-метилпиперидин с водород (50 psi) с Raney-Ni като катализатор в горещ (60°C) оцетен анхидрид съдържащ натриев ацетат.

с) 1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-ицидазолин) AF190

Към разтвор на b) 4-амино-4-аминометил-1-метилпиперидин (0,248 g, 1,734 mmol) в дихлорметан (5 ml), се прибавя етилацетамид хидрохлорид (0,282 g, 2,282 mmol) и сместа се разбърква при стайна температура в продължение на 3 часа. Разтворителят се отстранява под намалено налягане и остатъкът се алкализира с концентриран воден разтвор на Na_2CO_3 , след това се екстрахира с дихлорметан. Екстрактът се суши (Na_2CO_3) и разтворителят се отстранява като се получава безцветно масло (191 mg), което се хроматографира на колона от силикагел. Елюира се със смес от разтворители метанол:хлороформ:1% воден амониев хидроксид, като увеличаването на съдържанието на метанол от 10% до 99% дава чист продукт AF190 като масло, което се втвърдява в хладилник.

^1H -ЯМР ($CDCl_3$) 1,57-1,84 (m, 4H), 1,93 (s, $CH_3C=N-$), 2,17-2,33 (m, 2H), 2,29 (s, CH_3N-), 2,56 (m, 2H), 3,37 (s, $-CH_2-N-$) ppm.

^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$) 15,2 ($CH_3C=N-$), 37,3 (C_3 & C_5), 46,1 (CH_3N-), 52,5 (C_2 & C_6), 59,7 (C_4), 63,7 ($-CH_2N-$), 162,1 ($-C=N-$) ppm.

Масспектър m/e 167 (M^+), 152 ($M - CH_3$), 138, 109 (100%), 97, 96, 72, 71, 70.

ИЧ (чиста) 3260, 2933, 2852, 2800, 1620 ($-C=N-$) cm^{-1} .

ПРИМЕР 23

1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-[2'-метил-4'H(5'H)-
имидазол-5'(4')-он] AF230

4-ацетамидо-4-циано-1-метилпиперидин (1,03 g) се разтваря в концентрирана сярна киселинаа (4,0 ml) и се оставя при стайна температура в продължение на 4 дни. Реакционната смес се прибавя към студена вода (10 ml) и след това се прибавя бариев карбонат докато не се осъществява повече взаимодействие. Утаеният бариев сулфат се филтрира и се промива с вода и етанол. Стойността на pH на обединените филтрат и промивки се наглася на 13 с концентриран разтвор на NaOH и разтворителите се отстраняват под намалено налягане. Остатъкът се екстрахира с етанол, екстрактът се изпарява, остатъкът се екстрахира с дихлорметан и екстрактът се изпарява като се получава масло (0,75 g), което се хроматографира на колона от силикагел 60 (Merck 0,040-0,063 mm, 32 g). След елюиране с 1:9 метанол (съдържащ 15 тегловни % NH_3) - хлороформ се получава чист AF230 (0,185 g), след кристализиране из дихлорметан-етер т.на топене е 231-234°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,49 (m, 2H), 1,97 (m, 2H), 2,20 (s, CH_3 -), 2,34 (s, CH_3 -), 2,48 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 9,83 (br., -NH-) ppm.

^1H -ЯМР (D_2O) δ 1,55 (m, 2H), 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.

Масспектър m/e 181 (M^+), 111 ($\text{M}^+ - 70$), 104, 94, 77, 71 (100%), 70.

УВ (EtOH) λ_{max} 224 nm (ϵ 4650), 248 nm (ϵ 2450).

ИЧ (KBr) 3140, 2795, 2540, 1665 1540 cm^{-1} .

Циклизацията на 4-ацетамидо-4-циано-1-метилпиперидин

може също да се осъществи в алкална среда. Така, нагряване на това съединение под обратен хладник в 1N етанолна KOH или водна 1N NaOH също води до AF230. В последния случай се получава и 4-ацетамидо-4-карбамоил-1-метилпиперидин, т. на топене 207-208°C (разлагане), кристализация из дихлорметан-метанол.

^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ 2,05 ($\text{CH}_3\text{CO-}$), 2,08-2,30 (m, 6H), 2,28 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 2,63 (m, $\text{CH}_2\text{-}$), 5,40 (br.s, -NH-), 5,56 (br.s, -NH-), 7,04 (br.s -NH-) ppm.

Масспектър m/e 199 (M^+), 181 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 155 ($\text{M}^+ - \text{CONH}_2$), 140 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CONH}_2$), 122, 112, 11, 96, 71 (100%), 70.

AF230 може да съществува във форма на тавтомери, както е посочено в заглавието.

ПРИМЕР 24

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-оксазолин-4'-он) AF238

4-ацетамидокарбонил-4-ацетокси-1-метилпиперидин

Към смес от 4-циано-4-хидрокси-1-метилпиперидин (2,55 g, 18 mmol) и оцетен анхидрид (11 ml, 108 mmol) в тригърла колба се прибавя на капки 5,1 g (2 екв.) 60%-ен разтвор на перхлорна киселина (HClO_4). Реакцията е екзотермична, но температурата пада след 20 минути. Разтворът се разбърква в продължение на 2 часа и се оставя да стои един час при стайна температура. Бялата утайка се филтрира и се промива с етер и петролев етер. Перхлоратът на 4-ацетамидокарбонил-4-ацетокси-1-метилпиперидин се получава в почти количествен добив.

^1H -ЯМР [перхлорат] (D_2O) δ 2,2-2,4 (m, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,5 (m, 2H), 2,95 (s, 3H), 3,32 (m, 2H), 3,58 (m, H) ppm.

^1H -ЯМР [свободна основа] (CDCl_3) δ 2,05-2,27 (m, 4H), 2,13

(s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,67-2,75 (m, 4H), 8,4 (br.s, 1H, NH) ppm.

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

УВ (H₂O) $\lambda_{\max}$ 206 nm (ϵ 20400).

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

b) 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-оксазолин-4'-он), AF238

Перхлоратна сол на 4-ацетамидокарбонил-4-ацетокси-1-метилпиперидин (70 mg, 0,25 mmol) в ксилен се нагрява при 172°C (температура на баня от силиконово масло), при което белият суспендиран твърд продукт става жълт. В процеса на реакцията се усеща силна миризма на оцетна киселина. ТСХ показва пълно превръщане в 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-оксазолин-4'-он), AF238, който кристализира като перхлоратна сол.

¹H-ЯМР (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.

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

ПРИМЕР 25

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(1'-метил-3'-етилхидантоин)
AF161

Към смес от AF160 (100 mg, 0,47 mmol) и КН (100 mg, 35 тегловни % в минерално масло) в 5 ml диметилформамид, се прибавя метил p-толуенсулфонат (0,4 g, 1 mmol), разтворът се разбърква 10 минути при стайна температура и се подкислява с оксалова киселина в етер. Утайката се разтваря във вода, алкализира се и се екстрахира с петролев етер, а екстрактите се

концентрират и хроматографираат върху силикагел като се използва 90:10:1 хлороформ/метанол/воден амоняк. Чистите фракции се обединяват и изпаряват, а остатъкът се разтваря в етер и се утаява като HCl сол (85 mg, добив 72%).

^1H -ЯМР (свободна основа, CDCl_3) δ 1,2 (t, $J=6\text{Hz}$, 3H), 1,6-1,65 (m, 2H), 2,0-2,1 (m, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,75-2,85 (m, 4H), 2,86 (s, 3H), 3,55 (q, $J=6\text{Hz}$, 2H) ppm.

^1H -ЯМР (HCl сол, D_2O) δ 1,2 (t, $J=6\text{Hz}$, 3H), 2,1-2,15 (m, 2H), 2,3-2,4 (m, 2H), 2,95 (s, 3H), 3,0 (s, 3H), 3,5 (q, $J=6\text{Hz}$, 2H).

Масспектър m/e 225 (M^+ 18%), 71 (100%).

ПРИМЕР 26

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(1',3'-диетилхидантоин
AF162

Към смес от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин (110 mg, 0,6 mmol) и КН (0,2 g, 35 тегловни % в минерално масло) в 3 ml диметилформаид, се прибавя етилбромид (0,5 g, 4,6 mmol), разтворът се разбърква 30 минути при стайна температура, разрежда се с етер и се подкислява с излишък от оксалова киселина. Утайката се разтваря във вода, алкализира се и се екстрахира няколко пъти с хлороформ и екстрактите се обединяват, концентрират и хроматографираат върху силикагел като се използва градиент на хлороформ 90:10:1 хлороформ/метанол/воден амоняк, като се получава чист AF162 (60 mg, добив 42%).

^1H -ЯМР (свободна основа, CDCl_3) δ 1,2 (t, $J=6\text{Hz}$, 6H), 1,65-1,7 (m, 2H), 1,96-2,15 (m, 2H), 2,4 (s, 3H), 2,5-2,6 (m, 4H), 3,3 (q, $J=6\text{Hz}$, 2H) ppm.

^1H -ЯМР (HCl сол, D_2O) δ 1,15 (t, $J=6\text{Hz}$, 6H), 2,05-2,15 (m, 2H), 2,25-2,35 (m, 2H), 2,9 (s, 3H), 3,3 (q, $J=6\text{Hz}$, 3H) ppm.

^{13}C -ЯМР (HCl сол, D_2O) δ 14,0, 28,6, 35,0, 44,0, 52,7, 59,2, 157,0, 177,0 ppm.

Масспектър m/e 239 (M^+ 75%), 71 (100%).

ПРИМЕР 27

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-метокси-4'-Н-имидазол) AF191

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2',5'-диметилтио-4'-Н-имидазол) AF177 (0,700 g, 2,881 mmol) и натриев метоксид (0,360 g, 6,667 mmol) се нагряват под обратен хладник в метанол (15 ml) в продължение на 3,5 часа. Наблюдава се отделяне на газ. Разтворителят се отстранява от реакционната смес и остатъкът се екстрахира с дихлорметан. Органичният екстракт се изпарява като се получава твърд остатък (0,613 g), който се екстрахира с горещ петролев етер. Разтворителят се изпарява от екстракта като остава остатък (0,236 g), който кристализира из петролев етер като се получава чист AF191, т. на топене 84-85°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,40 (m, 2H), 1,97 (m, 2H), 2,36 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,52 (s, $\text{CH}_3\text{S-}$), 2,53 (m, 2H), 2,70-2,80 (m, 2H), 4,10 (s, $\text{CH}_3\text{O-}$) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) 13,6 ($\text{CH}_3\text{S-}$), 32,3 (C_3), 46,2 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 51,9 (C_2), 57,9 ($\text{CH}_3\text{O-}$), 74,2 (C_4), 171,6 ($-\text{N}=\underline{\text{C}}-\text{SCH}_3$), 196,0 ($-\text{N}=\text{C}-\text{OCH}_3$) ppm.

Масспектър m/e 228 (M^++1).

ПРИМЕР 28

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-амино-4'-Н-имидазол) AF192

Разтвор на AF177 (0,411 g) и реагент (15 ml) получен чрез разтваряне на амоняк в метанол (15 тегловни %) се разбърква 3 дни при стайна температура. Реакционната смес се изпарява и към

остатъка се прибавя пресен реагент 15 ml порция и реакцията се повтаря повече от 2 пъти. Накрая реакционната смес се изпарява под намалено налягане и твърдият остатък се промива с ацетон като се получава AF192 като бяло твърдо вещество (0,266 g), т. на топене $>240^{\circ}\text{C}$ (разлагане) (из етанол).

^1H -ЯМР (D_2O) 1,48 (m, 2H), 1,89 (m, 2H), 2,29 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,46 (m, 2H), 2,48 (s, $\text{CH}_3\text{S-}$), 2,86 (m, 2H) ppm.

Масспектър m/e 212 (M^+), 142 (M^+-70), 70.

ПРИМЕР 29

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-аминометил-4'-Н-имидазол) AF193 и

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2',5'-бис(аминометил)-4'-Н-имидазол) AF194

Разтвор на AF177 (0,338 g) във воден разтвор на метиламин (5,0 ml, 35%) се нагрява при 80°C в продължение на 2 часа. Водата и излешният реагент се отстраняват чрез изпаряване под намалено налягане и остатъкът се хроматографира на колона от силикагел (Merck 60, 0,040-0,06 mm). След елюиране с 80:20:1 смес от разтворители хлороформ/метанол/воден амоняк се получава AF193 като бяло твърдо вещество (0,061 g). След кристализиране из ацетонитрил т. на топене е $193-194^{\circ}\text{C}$.

^1H -ЯМР (CDCl_3) 1,44 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 2,38 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,52 (s, $\text{CH}_3\text{S-}$), 2,66 (m, 2H), 2,81 (m, 2H), 3,06 (s, $\text{CH}_3\text{NH-}$), 6,47 (-NH-) ppm.

Масспектър m/e 226 (M^+), 179 ($\text{M}^+-\text{CH}_3\text{NHCN}$), 169, 156 (M^+-70).

Елюирането с 50:50:1 смес от разтворители хлороформ/метанол/воден амоняк води до получаване на AF194

като бяло твърдо вещество (0,130 g). След кристализация из ацетонитрил т. на топене е 113-114°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3 + CD_2OD) 1,44 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 2,37 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,57 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,95 (s, $\text{CH}_3\text{NH-}$), 2,96 (m, $\text{CH}_3\text{NH-}$) ppm.

Масспектър m/e 209 (M^+), 152, 139 (M^+-70).

При повторение на горната реакция, но като се използват два мола метиламин за всеки мол AF177, главният продукт, който се получава е AF193, само със следи от AF194.

ПРИМЕР 30

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метил-2'-оксазолин)

AF150

а) 1-метил-4-нитрометилпиперидин-4-ол хидрохлорид

Този изходен продукт се получава като се използва лека модификация на метода на A.D.Cale (САЩ 4 746 655, 1988). Смес от N-метилпиперидинон (142 g, 1,28 mol) и нитрометан (78,1 g, 1,28 mol) се прибавя към добре разбъркван разтвор на натриев етоксид (1,28 mol), 20% в етанол, при подържане на вътрешната температура при 5-8°C. Утаява се бяло твърдо вещество, разбъркването продължава 20 минути и след това още 40 минути при стайна температура. Полученият разтвор се подкислява с 500 ml 7,2N HCl в изопропилов алкохол. Хидрохлоридът и неорганичните соли се екстрахират с CH_3OH (3x200 ml) и разтворителят се отстранява под вакуум като се получава съединението съгласно заглавието, т. на топене 180-182°C (нехигроскопично).

m/z 174 (M^+ свободна основа, 100%), 157 (M-OH , 20%), 127 (M-H-NO_2 , 25%), 113 ($\text{M-NO}_2\text{-CH}_3$, 40%).

б) 4-аминометил-1-метилпиперидин-4-ол хидрохлорид

Паладий върху въглен (10%, 4g) се прибавя на порции към разтвор на 1-метил-4-нитрометилпиперидин-4-ол (133,5 g) в метанол (1500 ml). Съединението се хидрогенира в апарат на Parr при налягане 55 psi при стайна температура в продължение на 48 часа. Разтворът се филтрира предпазливо, обработва се с активен въглен, разтворителят се отстранява и остатъкът се обработва с етанол (200 ml) като се получава съединението съгласно заглавието, т.на топене 177-179°C.

m/z 144 (M^+ свободна основа, 15%), 127 ($M-OH$, 25%), 114 ($M-CH_2NH_2$, 100%).

с) 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метил-2'-оксазолин)

AF150

Разтвор наа KOH (1,43 g, 86%) в метанол (50 ml) се прибавя към разтвор на 4-аминометил-1-метилпиперидин-4-ол хидрохлорид (3,61 g, 0,02 mol) в абсолютен метанол (50 ml). След разбъркване в продължение на 10 минути се прибавя разтвор на етилацетимидат хидрохлорид (2,7 g) в 20 ml абсолютен метанол и разбъркването продължава 30 минути при стайна температура. Разтворителят се отстранява и остатъкът твърд продукт се разтваря в разтвор на 2,8 g Na_2CO_3 в 50 ml вода, концентрира се до сухо под вакуум. Бялото твърдо вещество се екстрахира с 2 x 50 ml хлороформ, обработва се с активен въглен, суши се (Na_2SO_4) и разтворителят се отстранява като се получава продуктът съгласно заглавието (62,5% добив), т. на топене 45°C (сублимира при 40°C/0,05 mm Hg), който дава едно петно върху ТСХ силикагел елюиране с 2% NH_3 в метанол, $R_f = 0,4$.

m/z 168 (M^+ свободна основа, 100% при 7,5 ev).

^1H -ЯМР (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,56 (2H, q, $J = 1,5$ Hz), 2,53

(4H, m), 2,34 (3H, s), 1,96 (3H, t, $J=1,5$ Hz), 1,82 (4H, m).

При заместване на KOH използвана в този пример с еквивалентно количество NaOH или Et_3N се получават подобни резултати.

d) AF150-добензоил-D-тартарат

Горещ разтвор на добензоил-D-винена киселина (5,4 g, 15 mmol) в 500 ml толуен се прибавя при разбъркване към AF150 (5,5 g, 32 mmol) разтворен в 200 ml сух толуен. Утайката се оставя да се утаи и течността над нея се декантира. Останалият твърд продукт се промива с 3 x 100 ml сух толуен и се суши под намалено налягане като се получава 8,4 g (80% добив) бял леко хигроскопичен твърд продукт.

ТСХ хлороформ/алуминиев оксид (Merck арт.5581) $R_f=0,4$.
 m/z 168 (M^+).

^1H -ЯМР (300 MHz, D_2O съдържаща 1,5 mg Na_2CO_3 /0,5 ml D_2O) δ 1,95 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 2,35 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 3,5 (s, 4H, CH_2), 5,7 (s, 2H), 7,5-8,2 (m, 10H, водороди от ароматното ядро).

ПРИМЕР 31

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-етил-2'-оксазолин)
(2'-етилов аналог на AF150)

Това съединение се получава подобно на съединението от пример 30, но като се използва еквивалентно количество етил пропионимидат хидрохлорид вместо етилацетимидат хидрохлорид. Продуктът се получава като течност, т. на кипене $53^\circ\text{C}/0,03$ mm Hg, с 60,5% добив.

^1H -ЯМР (300 MHz, CDCl_3) : δ 3,52 (2H, t, $J=1,5$ Hz), 2,47 (4H, m), 2,30 (3H, s), 2,26 [2H,квартет ($J=7$ Hz), триплет ($J=1,5$ Hz)], 1,86 (2H, m), 1,72 (2H, m), 1,18 (3H, t).

ПРИМЕР 32

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-оксазолин)

AF151

а) 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин

Смес от разтвори на 1-метилпиперидин-4-он (36,44 g, 0,322 mol) в етанол (150 ml), амониев карбонат (93,0 g, 0,968 mol) във вода (400 ml) и калиев цианид (25,8 g, 0,396 mol) във вода (82 ml) се нагряват при 60°C в продължение на 2,5 часа и след това се оставя при стайна температура една нощ, след което се отделя 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин. Той се филтрира и промива с малко количество студена вода, етанол и етер като се получава кристален продукт (27,0 g). След концентриране на филтратата и промиване се получава второ количество (20,0 g). Продуктът се кристализира из метанол, т. на топене 265-276°C (разлагане).

ИЧ (KBr) 3170 (NH), 1700 (C=O) cm^{-1} .

m/z 183 (M^+ , 38%), 71 (100%).

^1H -ЯМР (300 MHz, D_2O): δ 1,8 (2H), 2,06 (секстет, 2H), 2,49 (s, CH_3), 2,58 (t, 2H), 3,14 (t, 1H), 3,20 (t, 1H).

б) 4-амино-1-метилпиперидин-4-карбоксилна киселина

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-хидантоин (9,75 g, 0,0533 mol) и бариев хидроксид октахидрат (28,8 g, 0,00913 mol) във вода (150 ml) се нагрява при 160°C в автоклав в продължение на три часа. Съдържанието на четири такива опити се обединява и утаеният бариев карбонат се филтрира. Филтратът се неутрализира с твърд въглероден диоксид и утайката се отстранява чрез филтриране. Филтратът се концентрира до малък обем като се получава 4-амино-1-метилпиперидин-4-карбоксилна киселина (32,0 g, 95% добив), т. на топене 275-280°C (разлагане).

ИЧ (KBr) 3300, 1655, 1580 cm^{-1} .

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

^1H -ЯМР (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}+\text{D}_2\text{O}$): δ 1,2 (m, 2H), 1,48 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 1,7 (m, 2H), 1,9 (m, 2H), 2,0 (m, 2H).

с) 4-амино-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин

Литиевоалуминиев хидрид на прах (15,62 g, 0,412 mol) в сух тетраhydroфуран (600 ml) се нагрява под обратен хладник в продължение на 15 минути, след което на части под азот се прибавя 4-амино-1-метилпиперидин-4-карбоксилна киселина (31,0 g, 0,196 mol) във вид на сух прах, при енергично разбъркване. След като завърши прибавянето реакционната смес се нагрява под обратен хладник в продължение на 4 часа, охлажда се до 0°C под азот при енергично разбъркване, обработва се с внимателно бавно прибавяна на вода (20 ml), 15% водна NaOH (20 ml) и отново вода (10 ml). Реакционната смес се филтрира и утайката се екстрахира с врящ тетраhydroфуран (3 x 150 ml). Тетраhydroфурановият филтрат и екстрактите се обединяват и разтворителят се отстранява при 25 mm Hg като се получава жълто вискозно масло (28,0 g, 98,9% добив).

ИЧ (чисто) 3320 (NH), 3200 (br, OH), 1587 (NH_2), 1468, 1448 cm^{-1} .

m/z 144 (M^+ , 15%), 127 (M-OH), 113 (M- CO_2H), 96 (100%), 70 (41%).

^1H -ЯМР (300 MHz, CDCl_3): δ 1,41 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 2,24 (s, $\text{CH}_3\text{-N}$), 2,29 (m, 2H), 2,48 (m, 2H), 2,50 (br., $-\text{NH}_2$), 3,29 (s, $-\text{CH}_2\text{OH}$).

d) 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-оксазолин)

AF151

Смес от 4-амино-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин (1,80 g) с оцетна киселина (20 ml) и ксилен (20 ml) се дестилира ацеотропно в продължение на 28 часа. Останалата оцетна киселина и ксиленът се отстраняват при намалено налягане (25 mm Hg) като се получава вискозно масло, което се алкализира до pH 11 с воден разтвор на K_2CO_3 . След екстрахиране с хлороформ и изпаряване на екстракта се получава малко количество кафяво масло (0,27 g). Водният разтвор останал след екстракцията с хлороформ се изпарява, за да се отстрани водата, останалият твърд продукт се екстрахира с хлороформ и екстрактът се суши (Na_2SO_4) и изпарява като се получава остатък много хигроскопично твърдо вещество (3,0 g). ТСХ показва, че това вещество дава главно едно петно, което е много по-полярно отколкото изходния аминокалхол. Част от това хигроскопично твърдо вещество, което се топи при 150-160°C се нагрива под вакуум и почти веднага започва да дестилира като безцветно масло при 45°C/0,15 mm Hg. Това масло, при съхраняване във фризер, образува кристали във форма на игли, топящи се при стайна температура. Дестилатът е сол с оцетната киселина на продукта съгласно заглавието.

ИЧ (чисто) 1664 ($-C=N$), 1565 & 1398 (CO_2^{--}), 1256 ($C-O$) cm^{-1} .

m/z 168 (M^+ на свободната основа), 109, 70.

^1H НЯМР (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1,77 (m, 2H), 1,96 (m, 2H), 1,98 (s, CH_3-), 2,0 (s, CH_3-), 2,49 (s, CH_3-N-), 2,91 (m, 4H), 3,95 (s, $-CH_2O-$), 9,30 (br., s, $-CO_2H$).

^{13}C НЯМР (300 MHz, $CDCl_3$): δ 14,0 (CH_3CO_2-), 22,9 ($CH_3C=N-$), 35,6 (C_3 и C_5), 44,4 (CH_3N^+), 51,1 (C_2 и C_6), 67,0 (C_4), 77,4 (C_5),

164,3 (C=N), 176,7 (-CO₂-).

¹H-ЯМР на свободната основа (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).

ПРИМЕР 33

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-2'-оксазолин)
(2'-етилов аналог на AF151)

Смес от 4-амино-4-хидроксиметил-1-метилпиперидин (3,0 g) и пропионова киселина (50 ml) и ксилен (90 ml) се дестилира ацеотропно в продължение на 5 часа. Остатъкът (7 ml) се алкализирa до pH 11-12 с воден разтвор на K₂CO₃. След екстрахиране с хлороформ и изпаряване на екстракта се получава смес от неполярни съединения (0,80 g). Водният разтвор останал след екстракцията с хлороформ се изпарява, за да се отстрани водата, полученият твърд продукт се екстрахира с хлороформ и екстрактът се суши (Na₂SO₄) и изпарява, като се получава остатък хигроскопично твърдо вещество (3,6 g). ТСХ показва, че това вещество дава главно едно петно, което е по-полярно от изходния аминокалхол (силикагел 40:58:2 метанол-хлороформ-воден амоняк). Част от това хигроскопично твърдо вещество (1,5 g) се нагрива под вакуум и почти незабавно започва да дестилира като вискозно безцветно масло при 50°C/0,1 mm Hg. Дестилатът е сол с пропионовата киселина на съединението съгласно заглавието.

m/z 182 (M⁺ на свободната основа, 14%), 167 (15%), 154 (71%), 125 (9%), 109 (100%), 96 (45%), 81 (30%), 74 (57%), 70 (89%), 57 (64%).

¹H-ЯМР (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), 2,29 (q, J=7,5,

CH_3CH_2-), 2,30 (q, $J=7,6$, CH_3CH_2-), 2,56 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 3,02 (m, 2 $-\text{CH}_2-$) 3,95 (s, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 7,52 (br., $-\text{CO}_2\text{H}$).

Към разбъркван разтвор на горната пропионова сол (700 mg) в CHCl_3 , се прибавя наситен воден разтвор на K_2CO_3 , докато престане отделянето на CO_2 . Сместа след това се разбърква 0,5 час и фазите се разделят. Водната фаза се екстрахира с CHCl_3 , екстрактът се обединява с отделената CHCl_3 фаза и се суши (Na_2SO_4) и разтворителят се изпарява като се получава съединението съгласно заглавието (свободна основа) като остатък безцветно масло (550 mg), което показва едно петно на ТСХ.

^1H -ЯМР (300 MHz, CDCl_3): δ 1,17 (t, $J=7,6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 1,61 (m, $-\text{CH}_2-$), 1,86 (m, $-\text{CH}_2-$), 2,18 (m, $-\text{CH}_2$), 2,29 (q, $J=7,6$, CH_3CH_2-), 2,30 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 2,71 (m, $-\text{CH}_2-$), 3,94 (s, $-\text{CH}_2\text{O}-$).

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

Алтернативен начин за получаване на съединения като AF150 и AF151 се основава на циклодехидратирането на подходящите амиди. Дехидратиращи средства са P_2O_5 , сярна киселина, BF_3 -етерат, CaCl_2 и молекулни сита. Съответните тиазолини вместо оксазолини могат да се получат по аналогичен начин като се използва P_2O_5 .

ПРИМЕР 34

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-тиазолин)

AF150(S)

а) 4-ацетамидометил-4-хидрокси-1-метилпиперидин

4-аминометил-4-хидрокси-1-метилпиперидин (0,83 g, 5,7 mmol) се разтваря в 10 ml CHCl_3 и се прибавя оцетен анхидрид (0,58 g, 5,7 mmol). Реакционната смес се затопля спонтанно до 40-

50°C. След 30 минути разтворителят се изпарява и суровият остатък се хроматографира върху силикагелна колона (Merck 7734), като се използва елюент 33:67 2% воден амоняк-метанол.

m/z 186 (M^+).

^1H -ЯМР (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1,60 (m, 4H, H3 и H4), 2,01 (s, 3H, CH_3 -C), 2,29 (s, 3H, CH_3 -N), 2,38 (m, 2H, H1), 2,55 (m, 2H, H2), 2,98 (m, 1H, NH), 3,26 (d, 2H, H5) ppm.

^1H -ЯМР (300 MHz, D_2O): δ 1,42 (m, 4H, H3 и H4), 1,81 (s, 3H, CH_3 -C), 2,08 (s, 3H, CH_3 -N), 2,27 (m, 2H, H1), 2,46 (m, 2H, H2), 3,03 (s, 2H, H) ppm.

Онечистването дава пик при 3,44 ppm.

б) 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-тиазолин)

AF150(S)

Смес от 4-ацетамидометил-4-хидрокси-1-метилпиперидин (6,5 g, 35 mmol) и пентасулфид (10 g, 22 mol) се нагряват при 220°C в продължение на 30 минути, охлажда се и се разтваря в 30 ml концентрирана водна солна киселина. Разтворът се смесва с 100 ml студен концентриран воден NaOH, екстрахира се с 2 x 100 ml $CHCl_3$ и обединените екстракти се сушат и изпаряват като се получава 5 g черен маслен остатък, който се пречиства чрез дестилация при 75°C/1 mm Hg като се получава 1,8 g бистра течност.

m/z 184 (M^+).

^1H -ЯМР (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1,8-2,0 (m, 4H), 2,17 (t, 3H, CH_3 -C), 2,2 (s, 3H, CH_3 -N), 3,9 (q, 2H, CH_2 -тиазолинов пръстен).

ПРИМЕР 35

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тион-3'-етилхидантоин)

AF181

Към разтвор на 4-амино-1-метилпиперидин-4-карбоксилна киселина (1,78 g, 0,0113 mol) и натриев хидроксид (0,47 g, 0,0118 mol) във вода (3,0 ml), се прибавя етилизотиоцианат (1,00 g, 0,0111 mol) и сместа се нагрява под обратен хладник в продължение на 6,5 часа. Реакционната смес се подкислява до pH 1 с концентрирана солна киселина и нагряването под обратен хладник продължава още 1,5 часа. При стоене при стайна температура из реакционната смес се утаява твърд продукт (0,61 g), който се кристализира из метанол като се получават кристали (83 mg), т. на топене $>260^{\circ}\text{C}$. ^1H -ЯМР спектърът на този твърд продукт показва, че той е хлороводородна сол на AF181.

^1H -ЯМР (D_2O): δ 1,16 (t, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 2,0-2,4 (m, 4H), 2,94 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 3,20 (m, 1H), 3,4-3,74 (m, 3H), 3,80 (q, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2-) ppm.

Матерните луги останали след изолиране и кристализиране на горната сол се обединяват, алкализират се до pH 13 с концентриран воден разтвор на натриев хидроксид, след това се екстрахират с дихлорметан. Екстрактът се суши (Na_2CO_3) и изпарява като се получава жълтеникаво твърдо вещество, което се хроматографира върху силикагелна колона (Merck 60 0,04-0,06 mm). След елюиране с хлороформ/метанол/воден амониев хидроксид 96:3:1 първо се получава 1,3-диетил-2-тиокарбамид (0,287 g), т. на топене $76-78^{\circ}\text{C}$ (кристали из етер) и след това 8-метил-3-етил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-4-он-2-тион (AF181) (135 mg) като свободна основа. Тя кристализира из етер-дихлорметан като се получават игли, т. на топене 180°C .

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,24 (t, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 1,69 (m, 2H), 2,05-2,30 (m, 4H), 2,35 (s, $\text{CH}_3\text{N}-$), 2,90 (m, 2H), 3,87 (q, $J=7,2$ Hz,

CH_3CH_2 -) ppm.

Масспектър m/e 227 (M^+), 71, 70.

ПРИМЕР 36

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тион-3'-трет-бутил-хидантоин) AF184

Смес от 4-амино-1-метилпиперидин-4-карбоксилна киселина (1,80 g, 0,0114 mol) и трет.бутилизоотиоцианат (1,00 g, 0,0087 mol) във вода (3,0 ml) се нагрява при 80°C в продължение на 5 часа. Тъй като реакцията според ТСХ не е завършила, се прибавя етанол (4,0 ml) и реакционната смес се нагрява под обратен хладник в продължение още на 1 час. Подкислява се до pH 1 с концентрирана солна киселина и нагряването под обратен хладник продължава още 1 час. След стоене една нощ при стайна температура се отделя утайка, тя се филтрира като се получава изходната аминокиселина (0,60 g). Матерната луга се изпарява и остатъкът се алкализира с концентриран воден разтвор на натриев хидроксид, след това се екстрахира с дихлорметан. Органичният екстракт се суши (Na_2SO_4) и разтворителят се отстранява като се получава кристален твърд продукт (0,101 g), игли из етер-дихлорметан, т. на топене 200-201°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3): δ 1,63 (m, 2H), 1,81 [s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -], 2,00-2,21 (m, 4H), 2,33 (s, CH_3N -), 2,87 (m, 2H), 7,82 (bs, -NH-) ppm.

Масспектър m/e 255 (M^+), 199 ($M^+ - \text{C}_4\text{H}_8$), 96, 71, 70, 57.

ПРИМЕР 37

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-трет-бутилхидантоин) AF213

Съединението съгласно заглавието се синтезира по подобен начин както AF181. Продуктът се получава като

хлороводородна сол на 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-трет-бутилхидантоин) AF213 и се кристализира из метанол, т. на топене 300-303°C (разлагане).

^1H -ЯМР (D_2O): δ 1,55 [s, $(\text{CH}_3)_3\text{C-}$], 2,01 (m, 2H), 2,22 (m, 2H), 2,92 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,97-3,5 (m, 2H), 3,62 (m, 2H) ppm.

Получената свободна основа кристализира из етер-дихлорметан и има т. на топене 221-223°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3): δ 1,57 (m, 2H), 1,60 [s, $(\text{CH}_3)_3\text{C-}$], 2,01-2,18 (m, 4H), 2,31 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,88 (m, 2H), 4,77 (bs, -NH-) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3): δ 28,6 [$(\text{CH}_3)_3\text{C-}$], 33,5 ($\text{C6\&C10}$), 46,2 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 51,0 ($\text{C7\&C9}$), 57,5 и 58,1 [$\text{C5\&}(\text{CH}_3)_3\text{C-}$], 158,4 (C2), 177,4 (C4) ppm.

Масспектър m/e 239 (M^+), 237, 224 (M^+-CH_3), 194, 181, 155, 110, 104, 71, 56, 43.

ПРИМЕР 38

1-пропаргилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин)
AF196

Смес от пиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин) (AF160)(Дез) (40,9 mg, 0,21 mmol) и пропаргилбромид (24,7 mg, 0,21 mmol), 80 тегловни % в толуен) се разбърква в метанол (1,0 ml) при 25°C в продължение на 24 часа. Метанолът се отстранява с поток от азот и получената маса се алкализира с помощта на воден разтвор на натриев карбонат и се екстрахира с хлороформ. Хлороформните екстракти се изпаряват и остатъкът се пречиства с препаративна хроматография на силикагелна плоча (хлороформ/метанол/воден амоняк 90/10/1) и се утаява с излишък от оксалова киселина като се получава кристално твърдо вещество (29 mg).

^1H -ЯМР (D_2O , сол с оксалова киселина): δ 1,12 (t, 3H,

$J=6\text{Hz}$, CH_3CH_2-), 2,1-2,35 (m, 6H), 3,12 (t, 1H, $J=3,5\text{ Hz}$), 3,5 (q, $J=6\text{Hz}$, CH_3CH_2-), 3,7-3,85 (m, 2H), 4,12 (d, $J=3,5\text{ Hz}$) ppm.

Масспектър m/e 235 (M^+), 196 ($M^+-\text{C}_3\text{H}_5$), 95, 80, 67, 56.

ПРИМЕР 39

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-[3'-(4-пиролидино-2-бутил)хидантоин] AF197

Смес от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-пропаргилхидантоин) (AF185) (204 mg, 0,92 mmol), пиrolидин (88 mg, 1,23 mmol), параформалдехид (52 mg, 1,7 mmol) и меден хлорид (4,2 mg) се разбърква в диоксан (10 ml) в продължение на 70 часа при стайна температура. Диоксанът се отстранява посредством поток от азот, получената маса се алкализира с воден разтвор на калиев карбонат и се екстрахира с хлороформ. Хлороформените екстракти се изпаряват и 50 тегловни % от остатъка се пречиства на препаративна силикагелна плоча (хлороформ/метанол/воден амоняк 150/20/100/6), кристализира се двукратно из етер като се получава кристално твърдо вещество (25 mg).

^1H -ЯМР (CDCl_3 , свободна основа): δ 1,12 (m), 2,1-2,2 (m), 2,35 (s, 3H), 2,6 (m), 2,9-2,95 (m), 3,4 (t, 2H, $J=3,5\text{ Hz}$), 4,15 (t, 2H, $J=3,5\text{ Hz}$), 5,9 (br s, 1H) ppm.

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

ПРИМЕР 40

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-оксазолидин-3'-он) AF260

Смес от 1-метил-4-пиперидон (5,0 g, 44,2 mmol), етил-(s)-лактат (5,75 g, 48,8 mmol), амониев карбонат (6,38 g) и р-толуенсулфонова киселина (2,1 g) в толуен (100 ml) се затваря под налягане в съд от неръждаема стомана и се нагрява при 107°C с

разбъркване в продължение на 24 часа. Толуенът се отстранява от реакционната смес чрез дестилация и остатъкът се хроматографира на силикагелна колона (Merck 60). След елюиране със смес от разтворители хлороформ/метанол/амоняк 92:7:1 се получава фракция (1,01 g), която по-нататък се разделя чрез хроматографиране на силикагелна колона. След елюиране със смес от разтворители хлороформ/етер/метанол/амониев хидроксид 54:37:7:2 се получава суров продукт (0,441 g), който кристализира из етер-петролев етер и след това из толуен като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-оксазолидин-3'-он) (AF260) като игли (85 mg), т. на топене 148-150°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,42 (d, $J=6,6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH-}$), 1,85 (m, 4H), 2,31 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,52 (m, 4H), 4,40 (q, $J=6,6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH-}$), 7,64 (br.s, -NH-), 2,52 (m, 4H), 4,40 (q, $J=6,6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH-}$), 7,64 (bs, -NH-) ppm.

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

ПРИМЕР 41

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF261 и

ПРИМЕР 42

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-диметил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF266

а) Смес от 1-метил-4-пиперидон (5,65 g, 0,050 mol), тиомлечна киселина (6,37 g, 0,060 mol) и амониев карбонат (7,20 g) в бензен (150 ml) се нагрява под обратен хладник в продължение на 16 часа когато сублимира твърд продукт (амониев карбонат), който кондензира извън реакционната колба. Отвреме навреме този твърд продукт се прибавя отново в реакционната колба заедно с

допълнителна порция нов амониев карбонат (общо 6,2 g). Накрая, бензенът се отстранява чрез дестилация и остатъкът се промива с етер като се получава разтворим в етер продукт (0,76 g) и неразтворим такъв (12,9 g), който се разтваря в малко количество метанол и се алкализирa с разтвор на амоняк в метанол. Изпарява се и се хроматографира на силикагелна колона (Merck 60). След елюиране със смес от разтворители хлорофор/метанол/амоняк 89:10:1 се получава фракция (0,61 g), която е идентифицирана като 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-диметил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF266. Това е нискотопимо хигроскопично твърдо вещество.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,53 (d, $J=7\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$), 1,69 (m, 2H), 2,16-2,44 (m, 4H), 2,32 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,87 (m, 2H), 2,90 (s, $\text{CH}_3\text{NCO-}$), 3,79 (q, $J=7\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) δ 19,7 ($\text{CH}_3\text{CH-}$), 27,2 ($\text{CH}_3\text{NCO-}$), 36,0 и 37,3 ($\text{C6\&C10}$), 39,7 (C2), 45,3 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 51,8 и 52,2 (C7&C9), 68,5 (C5), 172,8 (C3) ppm.

Хлороводородната сол на AF266 се получава чрез обработване на разтвора на свободната основа в етер с разтвор на солна киселина в изопропилов алкохол като се получава хигроскопично твърдо вещество, което кристализира из изопропилов алкохол, т. на топене 238-240°C (разлагане).

^1H -ЯМР (D_2O , HCl сол) δ 1,48 (d, $J=7,2\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$), 2,05 (m, 2H), 2,57 (m, 2H), 2,89 и 2,91 (2s, CH_3N^+ - и $\text{CH}_3\text{NCO-}$), 3,31 (m, 2H), 3,61 (m, 2H), 4,04 (q, $J=7,2\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$) ppm.

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

Като се продължи елюирането на колоната със смес от разтворители хлороформ/метанол/амоняк 85:14:1 се получава

главна фракция (3,50 g), която кристализира из етер-дихлорметан като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-12'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF261 като игли (1,83 g), т. на топене 133-134°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,53 (d, $J=7\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$), 1,9-2,20 (m, 4H), 2,20-2,42 (m, 2H), 2,30 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,68 (m, 2H), 3,85 (q, $J=7\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$), 6,90 (bs, $-\text{NH-}$) ppm.

^{13}H -ЯМР (CDCl_3) δ 19,9 ($\text{CH}_3\text{CH-}$), 41,0 и 41,3 ($\text{C6\&C10}$), 41,3 (C2), 45,7 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 52,5 и 52,8 ($\text{C7\&C9}$), 63,6 (C5), 176,3 (C3) ppm.

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

Хлороводородната сол на AF261 се получава чрез взаимодействие на разтвор на свободната основа в етер с разтвор на солна киселина в изопропилов алкохол, т. на топене 285-287°C.

^1H -ЯМР (HCl сол в D_2O) δ 1,50 (d, $J=7,1\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$), 2,17-2,44 (m, 4H), 2,89 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 3,24 (m, 2H), 3,59 (m, 2H), 4,10 (q, $J=7,1\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH-}$) ppm.

b) Смес от 1-метил-4-пиперидон (5,65 g, 0,050 mol), тиомлечна киселина (6,37 g, 0,060 mol) и амониев карбонат (7,20 g) в бензен (100 ml) се затваря в съд от неръждаема стомана под налягане и се нагрява една нощ при 95°C при магнитно разбъркване. Разтворителят се отстранява от реакционната смес и остатъкът се разтваря в малко количество метанол и се пропуска през суха колона от силикагел (Merck 60, 200 g). След елюиране със смес от разтворители хлороформ/метанол/воден амоняк 94:5:1 се получава първо AF260 (0,71 g) и след това AF261 (3,02 g).

c) Смес от 1-метил-4-пиперидон (2,50 g, 22,1 mmol), тиомлечна киселина (2,81 g, 26,5 mmol) и метиламин (0,90 g,

29,0 mmol) в толуен (60 ml) се затваря в съд от неръждаема стомана под налягане и се нагрява при 96°C с разбъркване в продължение на 24 часа. Реакционната смес е вискозно масло, от което се отделя утайка и толуенов разтвор. Разтворът се отделя и разтворителят се отстранява чрез дестилация. Остатъкът (1,68 g) се дестилира при намалено налягане като се получава чист 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-диметил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF266, т. на врене 100°C (0,35 mm Hg), като твърд продукт (1,02 g), 43-45°C.

ПРИМЕР 43

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF267 и

ПРИМЕР 44

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-4-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF272.

Съединението от заглавието AF267 се получава както е описано за AF261 като се използва 2-меркаптомаслена киселина вместо 2-меркаптопропионова киселина (тиомлечна киселина). То кристализира из ацетон с т. на топене 140-141°C.

¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 1,02 (t, J=7,2 Hz, CH₃CH₂-), 1,75 и 2,06 (m, CH₃CH₂-), 1,98 (m, 4H), 2,30 (s, CH₃N-), 2,32 (m, 2H), 2,67 (m, 2H), 3,81 (dd, -CHS-), 6,35 (bs, -NH-) ppm.

¹³H-ЯМР (CDCl₃) δ 11,4 (CH₃CH₂-), 27,1 (CH₃CH₂-), 41,5 (C6&C10), 45,8 (CH₃N-), 49,0 (C2), 52,7 и 52,9 (C7&C9), 63,7 (C5), 175,5 (C3) ppm.

Масспектър m/e 214 (M⁺), 181, 140, 71, 57.

Хроводородната сол на AF267 има т. на кипене 267-269°C (разлагане).

Като страничен продукт се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-4'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF272 като вискозно масло.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,00 (t, $J=7,4$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 1,67 (m, 2H), 1,58-1,78 (m) и 2,13 (m) (CH_3CH_2-), 2,20-2,42 (m, 4H), 2,32 (s, CH_3N), 2,89 (s, $\text{CH}_3\text{NCO}-$), 2,90 (m, 2H), 3,76 (dd, $J_1=3,6$ Hz, $J_2=9,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}-$) ppm.

Масспектър m/e 228 (M^+), 195, 170, 138, 125, 96, 71, 70, 57.

ПРИМЕР 45

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(1'-сулфокси-4'-аза-2'-метил-3'-он) AF262

Смес от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) (AF261) (48,4 mg, 0,24 mmol) в 2,0 ml оцетна киселина и 0,5 ml воден разтвор на водороден пероксид (32%) се разбърква при 25°C в продължение на двадесет минути.

Реакционната смес се подкислява чрез прибавяне на излишък от солна киселина и се разрежда с 20 ml петролев етер/етер 4/1.

Утайката се разтваря във воден разтвор на натриев карбонат и разтворът се екстрахира с хлороформ. Хлороформеният екстракт се суши, изпарява и получената маса се хроматографира върху препаративна силикагелна плоча (хлороформ/метанол/воден амоняк 80/20/1) като се получава 3,3 mg масло, което се утаява из етер с помощта на оксалова киселина като се получава един изомер (>90% чистота) като кристален твърд продукт.

^1H -ЯМР (CDCl_3 , свободна основа) δ 1,52 (d, 3H, $J=6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 1,85-2,7 (m, 8H), 2,36 (s, 3H, $\text{CH}_3-\text{N}-$), 3,55 (q, $J=6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 7,0 (bs, 1H) ppm.

Масспектър m/e 216 (M^+), 199, 167, 149, 125, 111.

ПРИМЕР 46

Пиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он)

AF263

Смес от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) (AF261) (250 mg 125 mmol) и α -хлороетилхороформиат (0,15 ml, 1,4 mmol) се нагрива в 5 ml дихлоретан при 60°C в продължение на деветдесет минути. Дихлоретанът се отстранява с поток от азот и масленият остатък се разтваря в метанол и се нагрива при 60°C в продължение на един час. Метанолът се изпарява, остатъкът се разтваря във воден разтвор на натриев карбонат, екстрахира се с хлороформ и се разделя на препаративна силикагелна плоча (хлороформ/метанол/воден амоняк 80/20/1) като се получава 20 mg свободна основа, която се утаява като кристална оксалатна сол.

^1H -ЯМР (D_2O , сол с оксалова киселина) δ 1,51 (d, 3H, $\text{J}=6\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 2,2-2,35 (m, 4H), 3,1-3,6 (m, 4H), 4,1 (q, $\text{J}=6\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}-$) ppm

Масспектър m/e 186 (M^+), 153, 126, 57.

ПРИМЕР 47

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-метил-1',4'-оксатиолан-2'-он) AF265

Разтвор на 1-метилпиперидин (11,3 g, 0,1 mol), тиомлечна киселина (15 ml) и p-толуенсулфонова киселина в ацетонитрил се нагрива под обратен хладник в продължение на 24 часа като се следи с ТСХ (силикагел-20% метанол в хлороформ). След това разтворът се изпарява, остатъкът се разтваря в хлороформ и се промива с разтвор на натриев бикарбонат и след това с вода. Органичната фаза се суши върху натриев сулфат и се

изпарява. Продуктът се пречиства върху силикагелна колона (Merck 60). След елюиране със смес от разтворители хлороформ/метанол/амоняк се получава 10,27 g масло, което кристализира при стоене при стайна температура. Идентифицира се като 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-метил-1',4'-оксатиолан-2'-он) (AF265), т. на топене 92°C.

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

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) δ 18 (q, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 39 (t, C6&C10), 40 (d, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 45,5 (q, $\text{CH}_3\text{-N}-$), 51,8 и 52 (два отделни триплета, C7&C9), 87 (s, C5), 175 (C=O) ppm.

Масспектър m/e 201 (M^+).

Съединението AF265 (свободна основа) се разтваря в ацетон и се прибавя оксалова киселина (един мол за два мола свободна основа). След няколко секунди се утаява бяло твърдо вещество. То се филтрира, промива с ацетон, хлороформ и етар и се суши в ексикатор. Идентифицира се като оксалатна сол на AF265. Стабилността на тази сол още се изследва. Част от нея се разлага във вода, вероятно чрез хидролиза на лактона и сигналите принадлежащи на продукта получен чрез отваряне на пръстена могат да се видят от ^{13}C -ЯМР спектъра, който се регистрира в D_2O в продължение на най-малко 3 часа акумулиращо сканиране. В ^1H -ЯМР спектъра измерен незабавно след разтваряне, се вижда само спиросъединението. Намерено е, че разтвор на AF265 във вода показва след една седмица около една трета отваряне на пръстена. Т. на топене 120°C.

^1H -ЯМР (D_2O) δ 1,55 (d, 3H), 2,3-2,6 (m, 4H), 2,9 (s, 3H),

3,2-3,4 (m, 2H), 3,4-3,7 (m, 2H), 4,4 (q, 1H) ppm.

^{13}C -ЯМР (D_2O) δ 17,5 (CH_3CH), 36 и 36,5 (C6 и C10), 41,5 (CH_3CH), 43 (CH_3N), 51 (C7 и C9), 84 (C5), 167 (CO на оксаловата киселина), 177 ($\text{C}=\text{O}$) ppm.

ПРИМЕР 48

Пиперидин-4-спиро-5'-(3'-метил-1',4'-оксатиолан-2'-он)

AF269

Исходният продукт 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-метил-1',4'-оксатиолан-2'-он) (AF265) (80 mg) се разтваря в бензен и разтворът се изпарява до сухо с гаранция, че няма никаква влага. Под азотна атмосфера се прибавя дихлорметан (около 4 ml) сушен на молекулно сито и след това 1-хлоретилхлороформиат (56 mg). Реакционната смес се нагрява до 100°C в продължение на около един час и след това се изпарява. Прибавя се хлороформ и белият твърд продукт се филтрира, промива с хлороформ и въглероден тетрахлорид, след това се суши. Продуктът се идентифицира като хлороводородна сол на пиперидин-4-спиро-5'-(3'-метил-1',4'-оксатиолан (AF269).

^1H -ЯМР (D_2O) δ 1,55 (d, CH_3CH), 2,25-2,55 (m, 4H), 3,3-3,42 (m, 4H), 4,4 (q, CH_3CH) ppm.

Масспектър m/e 187 (M^+).

ПРИМЕР 49

1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(5'-метил-1',3'-оксазолидин)

AF264

Смес от 1-метил-4-пиперидон (11,30 g, 0,10 mol) и DL-1-амино-2-пропанол (9,75 g, 0,13 mol) се нагрява под обратен хладник в продължение на 1,5 часа. Реакционната смес се дестилира под намалено налягане. След отстраняване на фракция,

която дестилира при 30-110°C (18 mm Hg) и съдържа вода, излишък от аминокиселина и продукта, чистият продукт 1-метилпиперидин-4-спиро-2-(5'-метил-1',3'-оксазолидин) (AF264) се дестилира при 110-115°C (18 mm Hg, 10,70 g).

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,22 (d, $J=6\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CHO-}$), 1,75 (m, 4H), 2,30 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,49 (m, 4H), 2,70 (dd) и 3,27 (dd, $J_1=6,6\text{ Hz}$, $J_2=12\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{NH-}$), 4,04 (m, $J_1=6,6\text{ Hz}$, $J_2=6\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CHO-}$) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) δ 20,3 ($\text{CH}_3\text{CHO-}$), 35,3 и 36,7 ($\text{C6\&C10}$), 45,5 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 51,7 ($-\text{CH}_2\text{NH-}$), 52,8 ($\text{C7\&C9}$), 71,8 ($\text{CH}_3\text{CHO-}$), 93,3 (C5) ppm.

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

ПРИМЕР 50

1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(4'-етил-1',3'-оксазолидин)

AF268

Смес от 1-метил-4-пиперидон (5,65 g, 0,05 mol) и DL-2-амино-1-бутанол (6,24 g, 0,07 mol) се нагрява под налягане. След отстраняване на фракция, която дестилира при 30-128°C (19 mm Hg, 5,65 g) и съдържаща главно продукта и по-малки количества вода и реагенти, чистият продукт 1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(4'-етил-1',3'-оксазолидин) AF268 дестилира при 129-130°C (19 mm Hg, 4,5 g).

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 0,97 (t, $J=7,5\text{ Hz}$, CH_3CH_2-), 1,45 и 1,69 (m, CH_3CH_2-), 1,70-1,89 (m, 4H), 2,30 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,32-2,62 (m, 4H), 3,25 и 3,96 (m, $-\text{CH}_2\text{O-}$), 3,29 (m, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_3$) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) δ 10,7 (CH_3CH_2-), 26,1 (CH_3CH_2-), 34,9 и 36,3 ($\text{C6\&C10}$), 45,3 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 52,5 и 52,7 ($\text{C7\&C9}$), 58,5 (C3), 69,5 (C2), 93,1 (C5) ppm.

ПРИМЕР 51

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-1',4'-оксазолидин)

AF271

Разтвор на 1-метилпиперидон (1,921 g, 0,017 mol), 2-меркаптомаслена киселина (2 g, 0,0167 mol) и p-толуенсулфонова киселина (300 mg) в ацетонитрил се нагрява под обратен хладник в продължение на 36 часа. След това разтворът се изпарява, остатъкът се разтваря в метанол и продуктът се разделя на силикагелна колона с хлороформ/метанол/амоняк (97:2,5:0,5) като елюент. Следващо пречистване се извършва на силикагелна колона с хлороформ/метанол (95:5) като елюент.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,0 (t, CH_3CH_2), 1,6 (m, 3H), 2,1 (m, 1H, CH_3CH_2), 2,25-2,4 (m, 4H), 2,3 (s, 3H), 2,8-2,95 (m, 2H), 3,75 (dd, CH_2CH) ppm.

Мсспектър m/e 215 (M^+).

ПРИМЕР 52

Синтез на пиперидин-4-спиро-5'-(3'-пропаргилхидантоин)
(AF186)

Съединение AF185 се деметилира съгласно процедурата разработена за AF160(Дез) (виж пример 3) и след това се пречиства чрез хроматография върху силикагелна колона (хлороформ/метанол/амоняк 80:19:1). Свободната основа се утаява като бяла нехигроскопична хлороводородна сол.

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

Масспектър m/e 207 (M^+ , основен пик), 179, 151, 113.

ПРИМЕР 53

Синтез на 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-[3'-(2-бутил)хидантоин (AF199)

Съединение AF199 се синтезира съгласно процедурата описана при AF185 (виж пример 50) и след това се пречиства чрез хроматография върху силикагелна колона хлороформ/метанол/амоняк 80:19:1). Свободната основа се утаява като бяла нехигроскопична хлороводородна сол.

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

Масспектър m/e 235 (M^+), 165, 154, 71 (основен пик)

ПРИМЕР 54

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF261 и неговите оптични изомери (+)AF261 и (-)AF261

Съединение AF261 като свободна основа (3,23 g, 16 mmol) и ди-*p*-толуил-D-винена киселина (5,8 g, 15 mmol) се поставят в 250 ml колба, прибавя се изоамилов алкохол 28 g и толуен 130 g и сместа се нагрява под обратен хладник в продължение на 5 минути. Бистрият разтвор се изпарява частично под обратен хладник посредством поток от азот докато започне леко помътняване и се оставя да стои една нощ. Получената утайка се филтрира и прекристализира из алкохол-толуен няколко пъти докато се получи енантиомерна чистота над 98% (чрез газова хроматограафия и ЯМР). Твърдият продукт се алкализира и утаява като хлороводородна сол като се получават 207 mg бял нехигроскопичен твърд продукт $[\alpha]_D^{25} = -54,8^\circ$ (хлороводородна сол в метанол).

Матерната луга се изпарява, алкализира и обработва с ди-*p*-толуил-L-винена киселина и кристализира четирикратно докато се

получи енантиомерна чистота над 98% (чрез газова хроматография и ЯМР). Твърдият продукт се алкализира и утаява като хлороводородна сол, при което се получават 207 mg бял нехигроскопичен твърд продукт $[\alpha]_D^{25} = +55,7^\circ$ (хлороводородна сол в метанол).

Определянето на чистотата се извършва чрез ЯМР като се използва (R)-(-)-2,2,2-трифлуоро-1-(9-антрил)етанол като разтворител. 7,5 mg от него спрямо 2,5 mg от всеки енантиомер в C6D6 показва наличие на един изомер. ЯМР спектърът на хлороводородната сол е идентичен с този на ($\pm$) AF261.

Чистотата на всеки енантиомер се определя чрез газова хроматография като се използва капилярна колона Chrompack XE-60-S-Val-S- α -PEA, WCOT разтопен силикагел 50 m, вътрешен диаметър 0,26 mm, външен диаметър 0,35 mm, поток 0,9 ml N₂, температура на нагревателната камера 175°C, време на задържане 64 min и 65 min.

ЯМР спектърът на хлороводородната сол е идентичен на този на ($\pm$)AF269.

ПРИМЕР 55

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-1',4'-тиазолидин-3'-он) AF267 и неговите оптични изомери (+)AF267 и (-)AF267

Съединение AF267 като свободна основа и ди-р-толуоил-D-винена киселина се обработват съгласно процедурата описана за AF261 (виж пример 53), докато се достигне енантиомерна чистота 90% (чрез газова хроматография). Твърдият продукт се алкализира и се утаява като хлороводородна сол, при което се получава 207 mg бял нехигроскопичен твърд продукт, $[\alpha]_D^{25} = -67,0^\circ$ (като хлороводородна сол в метанол, >90% оптична чистота). Матерната

луга се изпарява, алкализира и обработва с ди-р-толуоил-L-винена киселина по същия начин. След четири прекристализации, полученият продукт (>90% чистота) се алкализира и утаява като хлороводородна сол $[\alpha]_D^{25} = +70,8^\circ$ (хлороводородна сол в метанол, >95% оптична чистота).

Чистотата на всеки енантиомер се определя чрез газова хроматография като се използва капилярна колона Chrompack ХЕ-60-S-Val-S- α -PEA, WCOT разтопен силикагел 50 m, вътрешен диаметър 0,26 mm, външен диаметър 0,35 mm, поток 0,9 ml N₂, температура на нагревателната камера 175°C, време на задържане 83 min и 88 min.

ЯМР спектърът на хлороводородната сол се идентифицира като (+) AF267.

ПРИМЕР 56

Синтез на 1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(5'-метил-1',3'-диоксолан-4'-он) AF274

Млечна киселина (8 ml) се суши азеотропно с бензен. Към сухата и още гореща млечна киселина се прибавя още сух бензен и след това р-толуенсулфонова киселина (300 mg) и 1-метилпиперидон (5,00 g, 0,027 mol). Сместа се нагрява под обратен хладник докато се отдели допълнителната вода. След това разтворът се изпарява и остатъкът се разтваря в хлороформ и се промива с наситен разтвор на натриев бикарбонат (25 ml). Водната фаза се промива с хлороформ (25 ml) и обединените органични фази се промиват отовоно с вода (2x10 ml). Органината фаза се суши върху смес от натриев сулфат с въглен, филтрира се и се изпарява като се получава 8,7 g маслообразен суров продукт. След комбинирана обработка с хексан, етер и петролев етер (40-60),

полученото масло се разтваря в ацетон и след това към него се прибавя оксалова киселина (1 екв.). След малко се утаява бяло твърдо вещество, което се идентифицира като оксалатна сол на 1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(5'-метил-1',3'-диоксолан-4'-он) AF274.

^1H -ЯМР (оксалатна сол, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ 1,5 (d, 3H, $J=7\text{Hz}$), 2,15 (m, 4H), 2,63 (s, 3H), 2,9 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 4,55 (q, 1H, $J=7\text{Hz}$) ppm.

^1H -ЯМР (свободнаа основа, CDCl_3) δ 1,5 (d, 3H, $J=7\text{Hz}$), 1,95 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 2,5 (m, 2H), 2,6 (m, 2H), 4,5 (q, 1H, $J=7\text{Hz}$) ppm.

Масспектър m/e 185 (M^+).

ПРИМЕР 57

2-метил-1,4-тиазолидин-3-он-спиро[5,3']-хинуклидин

AF273

Смес от 3-хинуклидинон (2,50 g, 20,0 mmol), тиомлечна киселина (2,55 g, 24,0 mmol) и амониев карбонаат (2,9 g) в толуен (100 ml) се затваря в съд от неръждаема стомана под налягане и се нагрява при 108°C при разбъркване в продължение на 28 часа. От реакционната смес се отделя масло, което се отстранява и толуеновият разтвор, който остава се изпарява като се получава остатък (2,5 g). Той кристализира из ацетон като се получава кристално твърдо вещество (0,460 g), което главно е съединение от една енантиомерна двойка AF273. То кристализира отново из ацетонитрил и след това из дихлорметан като се получава чиста енантиомерна двойка ($\pm$) AF273A (0,210 g), т. на топене $201-202^\circ\text{C}$.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,53 (d, $J=7,2\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 1,65 (m, 2H), 1,92 (m, 2H), 2,03 (m, 1H), 2,83 (m, 4H), 3,1 8 и 3,32 (dd, $J=15\text{Hz}$, $-\text{NCH}_2\text{CNH}-$), 3,89 (q, $J=7,2\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 8,58 (bs, $-\text{NH}$) ppm.

Масспектър m/e 212 (M^+), 155, 142 (M^+-70), 123, 96, 71, 70 (100 %), 58.

Матерната луга от първата кристализация, която е обогатена на другата енантиомерна двойка, се хроматографира на колона от силикагел (Merck 60). След елюиране със смес от хлороформ/метанол/воден амоняк 96:3:1 дава първо втората чиста енантиомерна двойка ($\pm$) AF273B (0,106 g), т. на топене 181-182°C (из ацетонитрил).

^1H -ЯМР ($CDCl_3$) δ 1,52 (d, $J=7Hz$, CH_3CH-), 1,64 (m, 2H), 1,93 (m, 2H), 2,03 (s, 1H), 2,70-2,98 (m, 4H), 3,19 (s, $-NCH_2CNH-$), 3,85 (q, $J=7Hz$, CH_3CH-), 8,60 (bs, $-NH-$) ppm.

Масспектър същият както за AF273A.

След това, получава се смес от всички изомери и накрая другата чиста енантиомерна двойка ($\pm$) AF273A.

ПРИМЕР 58

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-тион) (AF274)

Суснезия от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) (AF261) (1,00 g, 5,00 mmol) и реагент на Lawesson (1,40 g, 3,46 mmol) в сух толуен (25 ml) се разбърква и нагрява до 100°C в продължение на 3 часа. Разтворителят се отстранява от реакционната смес и остатъкът се разделя на суха силикагелна колона (Merck 60, 0,040-0,050). След елюиране с ъс смес от разтворители хлороформ, метанол, амониев хидроксид в обемно съотношение 96:3:1 се получава чист 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-тион) (AF275) (0,81 g), игли из ацетон, т. на топене 171-172°C (разлагане).

^1H -ЯМР ($CDCl_3$) 1,69 (d, $J=7Hz$, CH_3CH-), 2,00 (m, 2H),

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

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

ПРИМЕР 59

1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-метилтио-2'-имидазолин-5'(4')-он) (AF187)

(а) 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тиохидантоин) (AF195) хлороводородна сол (1,00 g, 4,25 mmol) се прибавя към разбъркван разтвор на натриев хидроксид (0,36 g, 9,00 mmol) в метанол (30 ml). Образува се утайка (NaCl). При стайна температура към горната смес се прибавя метилйодид (0,664 g, 4,68 mmol) и разбъркването продължава 1,3 часа. Реакционната смес се изпарява при намалено налягане и остатъкът се екстрахира с горещ дихлорметан. Отстраняването на дихлорметана дава остатък (0,58 g), който се разделя на колона от силикагел (Merck 60, 0,040-0,065). След елюиране със смес от разтворители хлороформ, метанол, амониев хидроксид в обемно съотношение 89:10:1 се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-метилтио-2'-имидазолин-5'(4')-он) (AF187) (0,23 g), т. на топене 176-177°C (из ацетон).

¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 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 (bs, -NH-) ppm.

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

Масспектър m/e 213 (M⁺), 198 (M⁺-CH₃), 143 (M⁺-70), 71.

УВ (EtOH) λ_{max} 236 nm (ε 7800), 255 рамо, (ε 4300).

(b) Разтвор на 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-аминометил-4'H-имидазол (AF193) (30 mg) във водна солна

киселина (0,5 ml, 16%) се оставя при стайна температура в продължение на три дни. Разтворителят се отстранява при намалено налягане и остатъкът се алкализира с концентриран воден разтвор на натриев хидроксид, след това се екстрахира с дихлорметан-метанол. Екстрактът се суши (Na_2SO_4) и разтворителят се отстранява като се получава остатък, който се разделя чрез тънкослойна хроматографска плоча (кизелгел Merck 60 F_{254}), развита с хлороформ, метанол, воден амоняк в обемно съотношение 79:20:1 като се получава AF187 (8 mg), идентичен с автентична проба.

ПРИМЕР 60

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-он) (AF188)

Към суспензия от 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тиохидантоин) хидрохлорид (AF195) (4,04 g, 0,0172 mol) и калиев хидроксид (3,85 g, 0,0686 mol) в етанол (100 ml), се прибавя етилбромид (5,60 g, 0,0514 mol) и сместа се нагрива под обратен хладник при разбъркване. След нагриване под обратен хладник в продължение на 2 часа главният продукт е все още моноетилно производно, поради което към реакционната смес се прибавя още калиев хидроксид (0,95 g, 0,0169 mol) и етилбромид (2,00 g, 0,0184 mol) и нагриването под обратен хладник продължава още 3 часа. Разтворителят се изпарява под намалено налягане, прибавя се вода (20 ml) към остатъка и той се екстрахира с етер. Екстрактът се суши (Na_2SO_4) и разтворителят се изпарява като се получава остатък (0,973 g), който кристализира из петролев етер като се получава чист 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-он) (AF188) (0,513 g), т. на топене 95-96°C. След отстраняване на разтворителя матерната луга се хроматографира

на суха силикагелна колона (20 g, Merck 60, 0,040-0,065 mm) и след елюиране със смес от разтворители хлороформ, метанол, воден амоняк 84:5:1 се получава допълнително количество чист AF188 (0,310 g).

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,19 (t, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N-}$), 1,40 (t, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S-}$), 1,43 (m, 2H), 1,99 (m, 2H), 2,36 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,51 (m, 2H), 2,77 (m, 2H), 3,18 (q, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S-}$), 3,49 (q, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N-}$) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) δ 14,1 ($2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}$), 24,4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S-}$), 33,0 (C_6), 35,1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N-}$), 46,2 ($\text{CH}_3\text{N-}$), 51,0 (C_7), 68,6 (C_6), 158,8 ($-\text{N}=\text{C-}$), 183,9 ($-\text{C}=\text{O-}$) ppm.

Масспектър m/e 255 (M^+), 226 (M^+-Et), 185 (M^+-70), 71, 70.

ПРИМЕР 61

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-имидазолин-5'-он) (AF220)

Ранейникел (0,30 g) се прибавя към разтвор на 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-он) (AF188) (0,214 g) в етанол (10 ml) и сместа се нагрява под обратен хладник в продължение на 4 часа. Тъй като реакцията не е завършила, се прибавя още ранейникел (0,30 g) и нагряването под обратен хладник продължава още 4 часа. Реакционната смес се филтрира и катализаторът се промива с метанол и дихлорметан. Филтратът и промивките се обединяват и изпаряват като се получава 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-имидазолин-5'-он) (AF220) (0,160 g) като масло.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,27 (t, $J=7,3$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}$), 1,46 (m, 2H), 2,03 (m, 2H), 2,36 (s, $\text{CH}_3\text{N-}$), 2,48 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 3,53 (q, $J=7,3$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}$), 7,72 (s, $-\text{CH}=\text{N-}$) ppm.

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) 13,9 (CH_3CH_2-), 32,2 (C_6), 35,3 (CH_3CH_2-), 45,7 ($\text{CH}_3\text{N}-$), 50,5 (C_7), 68,2 (C_5), 151,6 ($-\text{N}=\text{CH}-$), 183,9 ($-\text{C}=\text{O}$) ppm.

При опит за пречистване на продукта чрез хроматография на суха силикагелна колона (20 g, Merck 60, 0,040-0,065 mm) и елюиране със смес от разтворители хлороформ, метанол, воден амоняк в обемно съотношение 25:17:3:1 се получава като главен продукт хидролизен продукт с отворен пръстен: 1-метилпиперидин-4-формиламино-4-N-етилкарбоксаамид (AF221), който кристализира из етер-дихлорметан, т. на топене 108-109°C.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 1,13 (t, $J=7,2$ Hz, CH_3CH_2-), 2,04-2,32 (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 (bs, $\text{EtNHCO}-$), 8,18 (s, $\text{HCON}-$) ppm.

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

В хидролизния продукт AF221 може да се затвори пръстенът до AF220 чрез нагряването му при 150°C под вакуум.

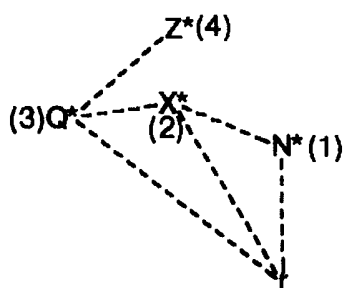
Съединенията съгласно настоящото изобретение притежават фармакологична активност и поради това са полезни като фармацевтични средства, например за лечение. По-специално, спиросъединенията съгласно настоящото изобретение притежават активност по отношение на централната и периферната (или и на двете) нервна система. Една обща характерна активност е върху холинергичната система, където съединенията са лиганди (например агонисти или антагонисти) на мускариновите рецептори.

Агонистичният или антагонистичният профил на съединенията е оценен при редица тестове, включително определяне на молекулата с помощта на компютър, биологични тестове ин витро и ин vivo.

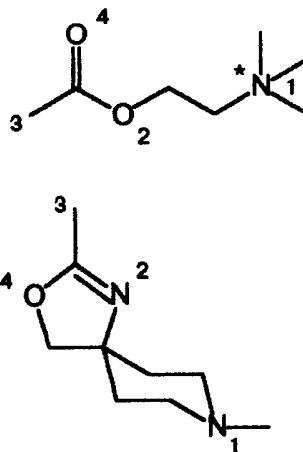
Определяне на молекулата с помощта на компютър

За активност на мускаринов агонист се конструира фармакофорен модел, основаващ се на изпитването на редица агонисти. Моделът включва определение на тези части от структурата на агониста, които са важни за активността, тяхната взаимна пространствена ориентация и до известна степен на максималния обем допустим за лигандата, за да бъде агонист.

Най-общо



Примери



В горната формула точката r е отрицателен товар
взаимодействащ си с катионната глава на агониста. Нейната
позиция е определена в модела спрямо азота. Важните разстояния
(D) са както следва: $D(r-N^*) = 3,0$, $D(r-X^*) = 6,50$, $D(r-Q^*) = 8,70$,
 $D(X^*-Q^*) = 2,45$. Оптималният двустранен ъгъл $r-X^*-Q^*-Z^* = -85$.
Отклонението от параметрите на този оптимален модел в известни
границы не премахва активността (таблица 1).

Някои важни предимства на този модел са изредени по-
долу:

1. Моделът позволява да се прави разлика между пълни и
частични мускаринови агонисти. Разликата се основава на
корелацията между разстоянието $r-X^*$ и агонистичната ефективност.

2. Природата на атома в позиция 4, съответстваща на
карбонилния кислород в ацетилхолина може значително да варира
както и двустранният ъгъл $r-X^*-Q^*-Z^*$ в класа мускаринови агонисти.

3. Когато разстоянието $r-Q^*$ стане много голямо за
агонистична активност, се получават слабосвързващи антагонисти.

От този модел може да се приготви предсказан
предпочитан специфичен рецепторен субтип на мускариновия
агонист, на базата на стабилна структура на агониста, природата
на Z^* и параметрите на модела.

Фармакофорният модел може да се използва при
изследване на нови съединения за потенциална мускаринова
активност по следния начин: а) новата структура се оптимизира, за
да се определят нискоенергитичните конформери, б) тези
конформери се изследват за подходящо подреждане на
фармакофорните елементи. Алтернативно, новата структура може

да се вкара във фармакофорната конформация като се използва един от възможните подходящи пътища. Получената конформация след това се сравнява с ниско енергитичната конформация на същата структура. Прилагането на тези процедури предизвиква надежден отговор във всички изследвани случаи (Таблица 1). Макар че няма начин да се предскаже дали мускариновата активност се проявява само от съединенията съобразно модела, тези които пасват, са активни като агонисти.

Ограничаването на обема на катионната глава за мускариновите агонисти се подсказва от съкратените експерименти за съответните структури (както е посочено в таблица 1) в молекулния модел на трансмембрания домен на m1 мускаринов рецептор. Съединения по-големи от хинуклидинови производни не могат да се приспособят към макромолекулярната свързваща част.

Съединенията изброени в таблица 1 са разделени на четири групи. Първата група включва няколко добре известни мускаринови агонисти. Техните структури са охарактеризирани посредством оптимални фармакофорни параметри. Втората група включва агонисти, които проявяват субоптимален фармакофорен характер и поради това са главно частични агонисти. Структурите на съединенията в третата група се отклоняват от фармакофорния характер на мускаринова активност, дефинирани в предишните групи. Поради това тези съединения са или антагонисти или са лишени от мускаринова активност. В четвъртата група са изредени някои потенциални мускаринови агонисти въз основа на техните фармакофорни параметри.

ТАБЛИЦА 1

Фармакофорни параметри за мускаринови агонисти

Агонист	Селективност	r-X* (A)	r-Q* (A)	X*-Q* (A)	r-X*-Q*-Z*
(Група 1)					
ACh	M2>M1	6,40	8,44	2,40	-86
Диоксолан	M2>M1	6,51	8,71	2,42	-85
Мускарин	M2>M1	6,50	8,53	2,44	-75
Петилфурм♦	M1>M2	6,40	8,54	2,43	-59
Оксатолан	M1>M2	6,55	8,90	2,43	-25
(Група 2)					
AF102B	M1>M2	5,93	8,24	2,45	-173
AF150	M1>M2	5,78	7,91	2,45	-118
AF151	M1>M2	5,82	8,20	2,45	-170
AF150(S)	M1>M2	5,72	8,35	2,81	-84
AF151(S)	M1>M2	5,88	8,15	2,38	-177
AF160	M1>M2	5,80	8,26	2,72	-96
AF160 (Des)	M1>M2	5,78	8,26	2,70	-95
(Група 3)					
AF133		5,98	8,33	2,96	34
AF134		6,00	8,58	2,62	9
AF168		6,69	9,10	2,72	-44
AF172		5,71	9,64	4,00	-101
(Група 4)					
AF170		6,07	8,62	3,01	-60
AF181		5,92	8,35	2,75	-88
AF184		5,93	8,44	2,65	-87
AF185		5,96	8,21	3,13	-105
AF196		5,92	8,40	2,73	-87

ТАБЛИЦА 1 (продължение)

AF202		5,78	8,10	2,42	-170
AF210		5,89	8,20	2,43	-170
AF215		5,94	7,93	2,44	-108
AF216		5,72	8,32	2,84	-96
AF260		5,75	8,02	2,45	-132
AF261		5,91	7,80	2,37	-107
AF264		5,77	8,07	2,46	-128
AF265		5,82	7,72	2,38	-94
AF267		5,91	7,84	3,25	-105
AF270		5,79	8,27	2,73	-93

Биологично изпитване

Тест № 1. Препарат от изолиран илеум на морско свинче

Съединенията съгласно настоящото изобретение се изпитват за тяхната агонистична и антагонистична активност в препарат от изолиран илеум на морско свинче (методът е използван както е описан от Fiisher et al., J.Pharm.Exp.Therap. 257, 392-403 (1991). В таблица 2 са сумирани получените резултати с някои от съединенията.

ТАБЛИЦА 2

Ефект върху препарат от изолиран илеум на морско свинче

Съединение	EC ₅₀ (μM)	Забележки
AF102B*	3,5	частичен агонист
AF134♥		антагонист при 6μM
AF151(S)	7,3	пълнен агонист
AF160	3,2	пълнен агонист
AF160 (Дез)		частичен агонист при 0,1mM максимална концентрация на 80% карбахол
AF177		слаб антагонист при 0,25 mM
AF178	100	частичен агонист (80% ACh)
AF179	100	частичен агонист (80% ACh)
AF180	100	частичен агонист (80% ACh)
AF182		антагонист при 0,1 mM, пълнен антагонист при 0,2 mM

* *цис*-2-метилспиро(1,3-оксатиолан-5,3')хинуклидин

(US № 4 855 290), слаб антагонист за ACh-индуцирани
контракции

♥Държи се като мускаринов антагонист в препарат от изолиран
илеум на морско свинче, неочаквано инхибира AF102B-индуцирани
контракции по-добре отколкото блокира ACh-индуцираните
контракции. Така, ако контракциите индуцирани посредством
AF102B в този препарат си посредничат главно през M3
рецепторите, AF134 се явява селективен M3 антагонист в този
препарат.

Тест № 2. Свързване с мускариновите рецептори в мозъка
Компетентност с [³H]QNB, [³H]NMS и [³H]OXO-M в мембрани приготвени от кората на главния мозък и малкия мозък на плъх .

Използват се мембранни препарати от кора на главен мозък и малък мозък на плъх, като се използват лигандите [³H]NMS, [³H]пиперазин и [³H]оксотреморин-М, за оценка на новите съединения (Таблицы 3 и 4).

ТАБЛИЦА 3

Компетентност на изпитваните съединения с [³H]PZ, [³H]QNB или [³H]NMS (кора на главен мозък на плъх) и [³H]QNB или [³H]NMS (малък мозък), съответно.

Кора на главен мозък

Съединение	[³ H]PZ		[³ H]QNB		[³ H]NMS	
	K _H μM(%)	K _L μM	K _H μM(%)	K _L μM	K _H μM(%)	K _L μM
Карбахол	0,06 (38)	18,6	6,8 (18)	980	0,1 (41)	11
Оксотреморин				2,4		
McN-A-343				7,9		
AF102B		1		7,1		1,1 1,5
AF133		2,7				
AF134		0,13				
AF151(S)	0,75(11)	20	24 (44)	459		
AF160	1,4 (34)	19		58	0,45(31)	
AF160(Дез)	1,3 (36)	9		40		12
AF178	17 (58)	90				7
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

ТАБЛИЦА 3 (продължение)

Кора на главен мозък

Съединение	$[^3\text{H}]\text{PZ}$		$[^3\text{H}]\text{NMS}$	
	$K_{\text{H}} \mu\text{M}(\%)$	$K_{\text{L}} \mu\text{M}$	$K_{\text{H}} \mu\text{M}(\%)$	$K_{\text{L}} \mu\text{M}$
AF181		3,6		
AF184		0,64		
AF196		>1000		
AF197		48		
AF213		5,7		
AF264		294		
AF260	0,2 (36)	16	0,014(12)	32
AF261	0,03(26)	25	8,6(33)	100
AF261A		18		20
AF261B	0,13(34)	6,7	0,032(31)	4,2
AF263	0,33(14)	10	0,19(23)	13
AF265	0,93(12)	49	0,18(27)	39
AF267*		2,8*		5,88
AF267A				10,9
AF267B				4,3

* След третиране с Cu^{2+} сравнителният тест с $[^3\text{H}]\text{PZ}$ показва двусайтово свързани сайтове за AF267 ($K_{\text{H}} = 22 \text{ nM}$ (18%), $K_{\text{L}} = 2,5 \mu\text{M}$). Това наблюдение показва, че AF267 се свързва към мускариновите рецептори в кората от главен мозък на плъх като агонист (Fisher et al., J.Pharmacol.Exptl.Therap., 257, 392-403 (1991)).

ТАБЛИЦА 3 (продължение)

Малък мозък

Съединение	[³ H]QNB		[³ H]NMS	
	K _H μM(%)	K _L μM	K _H μM(%)	K _L μM
Карбахол Оксотреморин McN-A-343	1,5 μM (%)	52 0,8 24,4	0,02 (56)	6
AF102B		18,1		1,4 0,4
AF133		5,1		
AF134		3,8		
AF151(S)		45		
AF160		61	0,56(46)	19
AF160(Дез)	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

Изчислените съотношения K_i^{PZ}/K_i^{NMS} или K_i^{PZ}/K_i^{QNB} (Таблица 3) са обикновено използвани указания за M1 селективност на мускариновите лиганди, като по-ниските съотношения са указание за по-добра M1 селективност. Освен това съотношенията K_i^{PZ}/K_i^{QNB} на мембранен препарат от кора на главен мозък спрямо малък мозък на плъх също са показател за M1 селективност на мускариновите лиганди, като по-ниските съотношения от 1 са показател за M1 селективност (Fisher et al., J. Pharmacol.Exptl.Therap., 257, 392-403 (1991)). Като се използват тези анализи, може да се открие, че някои от съединенията съгласно настоящото изобретение показват относително високо предпочитание към M1 мускаринови рецептори. Такива са AF133, AF134, AF160, AF160 (Дез), AF177, AF178, AF181-AF185, AF261, AF265, AF267.

AF185 например показва трикратно по-висок афинитет за компетентност с $[^3H]PZ$ в сравнение с компетентността на свързващите сайтове на $[^3H]NMS$ ($K_i = 1,4 \pm 0,15 \mu M$ спрямо $5 \pm 1 \mu M$, съответно, таблица 3). Това е в пълна противоположност с AF102B (US патент), който показва почти подобни афинитети за компетентност на двете лиганди ($K_i = 1,43 \pm 0,2 \mu M$ спрямо $1,86 \pm 0,43 \mu M$, съответно, таблица 3). Тъй като $[^3H]PZ$ е специфичен маркер на M1AChR в мембрани от кора на главен мозък на плъх, новите данни съгласно изобретението показват, че AF185 е повече M1 селективна лиганда в сравнение с AF102B.

$[^3H]NMS$ кривите на свързване на някои от новите съединения в мембрани от кора на главен мозък, показват взаимодействие с два сайта: около една четвърт от свързващите сайтове показват висок афинитет спрямо тези съединения. Това може да означава висока агонистична ефикасност на този препарат. Такива

съединения са AF260, AF261, AF263 и AF265.

Неочаквано някои от новите съединения показват криви на двусайтова компетентност с [^3H]PZ в кора на главен мозък на плъх (таблица 3). Такива са AF160, AF160 (Дез), AF260, AF261, AF265. Кривите на двусайтовата компетентност на тези съединения с [^3H]PZ се превръщат в прости криви маса-действие в присъствие на стабилен GTP аналог, GppNHp (не е показан). Подобни наблюдения върху GppNHp чувствителност се наблюдават за компетентност с [^3H]NMS (не е показано). Това показва, че настоящите съединения се държат като ефикасни агонисти за M1 рецептори в кора на главен мозък на плъх. Това е противоположно на сравнителните тестове с AF102B, което типично дава криви маса-действие. Тези наблюдения показват някои различия между разпознаването на M1 рецептори от главен мозък на плъх от AF102B и настоящите нови съединения.

AF267 показва криви на едносайтова компетентност и с двата [^3H]NMS и [^3H]PZ в мембрани от кора на главен мозък на плъх. Изследването на фосфоинозитидната (PI) хидролиза и освобождаване на арахидонова киселина подробно описано по-долу показва, че това съединение е частичен агонист. Образците на свързване маса-действие следователно са подобни на данните за M1 селективния агонист AF102B на мускариновите рецептори в настоящия препарат. По-рано е показано, че третирането на мембрани от кора на главен мозък на плъх с 0,1 mM CuSO_4 може да покаже скрити агонистични свързващи свойства на AF102B (Fisher et al., JPET 257, 392-403, 1991, публикуваните данни показват компетентност на AF102B с [^3H]QNB, но подобни наблюдения се получават като се използва [^3H]NMS и [^3H]PZ. Също така такова третиране може да увеличи частта на високо афинитетните сайтове за някои агонисти, които вече показват високо афинитетни сайтове без третиране с Cu^{2+} (напр.

AF160). Затова са изследвани свързващите свойства на AF267 след третиране с Cu^{2+} . Такова третиране последвано от анализ за компетентност с $[^3\text{H}]\text{PZ}$ показва 18% високо афинитетни сайтове за AF267 ($K_{\text{H}} = 22\text{nM}$, т.е. около 100 кратно по-висок афинитет в сравнение с $K_{\text{L}} = 2,5\text{ }\mu\text{M}$) без чувствителна промяна в ниско афинитетните сайтове. Това наблюдение показва, че AF267 може да се свързва с мускаринови рецептори в кора на главен мозък на плъх подобно на AF102B. Способността на третирането с Cu^{2+} да показва високо афинитетни сайтове за някои частични агонисти може да се свърже със стабилизирането на взаимодействието рецептор/G-протеин чрез координационни комплекси на метални йони с критичните сулфхидрили на тези макромолекули (Gurwitz et al., BBRC, 1984, 120, 271-277). В контролни мембрани това взаимодействие очевидно не се улеснява в присъствие на частични агонисти, които по този начин не показват високо афинитетен сайт в анализ за компетентност с белязани антагонисти.

Способността на съединенията да изместват свързването $[^3\text{H}]\text{оксотреморин-М}$ $\{[^3\text{H}]\text{OXO-M}\}$ осигурява измерване на афинитета за високо афинитетното агонистично състояние на рецептора. Съотношението на K_{i} стойностите за изместването на $[^3\text{H}]\text{NMS}$ или $[^3\text{H}]\text{GNB}$ и $[^3\text{H}]\text{OXO-M}$ се използва в литературата за предсказване на ефикасността. Съотношенията по-големи от 100 са свързани с пълни агонисти, антагонистите дават съотношения близо до единица и междинни стойности показват частичните агонисти (Orlek et al., J.Med.Chem., 34, 2726, 1991).

Новите съединения са изследвани в анализи за компетентност с белязания неселективен мускаринов агонист $[^3\text{H}]\text{OXO-M}$, като се използват мембрани от кора на главен мозък на плъх, силният агонистичен характер на AF179 и AF160 се отразява на

техните относително големи K_i^{NMS}/K_i^{OXO-M} стойности (таблица 4).

ТАБЛИЦА 4

Компетентност с $[^3H]OXO-M$ на сродни AF160 и указаните мускаринови агонисти в препарати от кора на главен мозък на плъх

Съединение		Ki (μM)	Ki ^{NMS} /Ki ^{OXO-M}	
А. Криви маса - действие ^a				
CCh				
Пилокарпин		0,06±0,005 (3)	380	
AF102B		0,1		
AF160		0,6±0,2 (3)	2,1	
AF177		1,8±0,2 (3)	9,4	
AF179		11	1,4	
AF182		1,3±0,3	31	
AF183		14	1	
		>100	-1	
K _H (μM)		%H	KL(μM)	Ki ^{NMS} /K _L i ^{OXO-M}
В.Криви на двусайтова компетентност ^b				
AF160(Дез)	Експ.1 0,05	36	2,2	
	Експ.2 0,03	58	1,8	
	Експ.3 0,02	42	2,1	
	средно			
	(1-3) 0,033	45±6	2,0±0,1	3,5
	±0,007(3)			
AF185	Експ.1 0,04	53	49	0,18
	Експ.2 0,01	18	3	3

Забележка: Експериментите на свързване са осъществени като се използват промити в Трис/ Mn^{2+} буфер в продължение на 0,5 час при 25°C мембрани от кора на главен мозък на плъх; Ki^{NMS} данните са средни стойности от таблица 3. Данните са от 1-4 експеримента.

^a данните са за лекарствени средства показващи криви на компетентност маса-действие с $[^3H]OXO-M$.

^b данните са за лекарствени средства показващи криви на двусайтова компетентност с $[^3H]OXO-M$; с AF160(Дез) и AF185, в някои експерименти се наблюдават криви маса-действие.

Неочаквано, AF160(Дез) и AF185 са единствените изпитани съединения, чиито криви на компетентност (като се използват $[^3H]OXO-M$ и мембрани от кора на главен мозък на плъх) не показват едносайтови криви маса-действие (таблица 4). Крайно силната компетентност на тези съединения със субфракция на рецептори белязани с $[^3H]OXO-M$ в мембрани от кора на главен мозък на плъх може да означава, че тези съединения са високо селективен субтип. Така, изчислените съотношения на Ki^{NMS}/K^{OXO-M} (таблица 4) може да означават, че AF160(Дез) е мощен агонист за подгрупа мускаринови рецептори в кора на главен мозък на плъх, в сравнение с друга сродна на AF160 група и самия AF102B. Обаче, това не се наблюдава: криви на компетентност на двата AF160 (Дез) и AF185 с $[^3H]NMS$ дава твърдо прости криви маса-действие. Фактически, само AF160, който показва двусайтова крива на компетентност с $[^3H]NMS$, все пак е компетентен с $[^3H]OXO-M$ с проста крива маса-действие. Поради това обяснението за хетерогенността на рецепторния субтип, която се открива изключително при свързване с $[^3H]OXO-M$, но не при анализа на свързването с $[^3H]NMS$, не е приемливо. Алтернативни обяснения могат да бъдат възможните взаимодействия с алостерични сайтове на мускариновите рецептори, които не се откриват от състоянието на

рецептора, който свързва антагонисти като [^3H]NMS, но се откриват чрез използване на агонист [^3H]ОХО-М. Друго възможно обяснение за плитките криви на компетентност от анализите на свързване с [^3H]ОХО-М е това, че системата не е достигнала равновесие. При анализите за компетентност на AF160 (Дез) или AF185, равновесие не се постига на 30-та минута, тъй като данните за свързването са различни при 30-та минута в сравнение с 60-та минута при 25°C. Когато тестовите завършват в 30-та минута се наблюдават плитки криви на компетентност с [^3H]ОХО-М на AF160(Дез) или AF185. Подходящо обяснение е, че AF160(Дез) и AF185 имат относително слаби кинетики (както малка скорост на асоциация така и малка скорост на дисоциация), в сравнение с AF102B. Това води до твърде слабо приближаване до равновесие при анализ за компетентност, като несъмнено се откриват двусайтови изотерми на свързване при условия на неравновесие. Основателно е да се приеме, че и скоростта на асоциация и скоростта на дисоциация са относително малки: ако само скоростите на асоциация на AF160 (Дез) и AF185 са малки в сравнение с AF102B, те ще показват много по-ниски афинитети отколкото AF102B. От друга страна, ако техните скорости на дисоциация са по-малки, техните афинитети биха били много по-високи отколкото този на AF102B.

Малкият мозък на плъх е относително хомогенен по отношение на експресираните субтипове mAChR (главно M2). AF102B показва подобни възможности на компетентност на свързване с [^3H]ОХО-М както в кора на главен мозък така и в малък мозък на плъх. Обратно, AF160(Дез) и AF185 показват по-високи възможности в мембрани на кора на главен мозък отколкото в мембрани на малък мозък, а това се отразява като криви на двусайтова компетентност само в мембрани на кора на главен мозък (виж също таблица 4 за

кора на главен мозък). Отново това означава различни кинетики за тези съединения в кора на главен мозък спрямо малък мозък, съответно.

Тест № 3. Носене на вторични активности в мозъчни срезове и клетъчни култури

В процедурите за измерване на ефикасността на изпитваните съединения като агонисти на M1 мускариновите рецептори, се приготвя мозъчен срез от кора на главен мозък на плъх (200 μ M куб). За анализ на превръщането на фосфоинозитидите (PI), тези мозъчни срезове се натоварват с [^{3} H]инозитол (4 μ Ci/ml) чрез инкубирането им в разтвор на сол на Krebs съдържащ белязаната лиганда за 1 час при 37°C при окисление. След промиване се прибавя 50 μ l аликвотни части към всяка епруветка съдържаща 10 mM LiCl в пресен разтвор на Krebs със или без изпитваното съединение. След инкубация в продължение на 20 минути при 37°C реакцията завършва и белязаните продукти се разделят на AG-1-X8 колони както е описано от Berridge (Biochem.J., 258, 849-858, 1983). Частични агонисти според изпитваното съединение, проявяват по-малко от 80% активиране на PI хидролиза, в сравнение с CCh (пълнен агонист). Така например, AF160 причинява значително повишаване на IP₃ (1,6 пъти). В сравнение с CCh, AF160 е частичен агонист с ефикасност 50% от сравнителното съединение. AF160 (Дез) също е активно съединение, макар и в по-малка степен отколкото AF160. AF102B като друг M1 агонист е по-малко активен от AF160, докато AF178 не е активен при този анализ.

Клетъчни култури обогатени в една субпопулация на мускаринови рецептори се използва, за да се определи носенето на втора активност от изпитваните съединения. За изследванията на

превръщането на PI се използва методът на Berridge (Biochem. J., 258, 849-858, 1983), за изследване мобилизацията на арахидонова киселина клетките се маркират в продължение на 16 часа с 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ белязана с тритий арахидонова киселина в органична растежна среда. Преди анализа клетките се промиват общо шест пъти с несъдържащ серум DME с добавка на HEPES (20 mM) и говежди серумен албумин (1 mg/ml). След промиване, се прибавя 0,5 ml от същата среда с последващо прибавяне на изпитваните лиганди. Анализите завършват при преместване на средата в епруветки на Eppendorf и центрофугиране в продължение на 10 min при 6000 g. Изчислява се радиоактивността в течността над утайката и се представя като dpm белязана с тритий арахидонова киселина освободена от всяка ямка. Циклично AMP натрупване в интактни клетки се оценява съгласно метода на Pinkas-Kramarski et al., Neurosci.Lett., 108, 335-340, 1990, при което аденилилциклазната активност в изолирани мембрани се определя съгласно Jonson and Salomon (Methods in Enzymology Vol. 195, R.A. Jonson and Corbin, eds.Academic Press, pp 3-21, 1991).

Съединенията с формули I-IX с максимална степен на PI превръщане и/или мобилизация на арахидонова киселина (но не значително активиране на аденилилциклазата) повече от 25% са предпочитани. Някои примери за такава активност могат да се намерят при AF160, AF160(Дез), AF178, AF179, AF180, AF185, AF260, AF261, AF263, AF265, AF266, AF267. Тези съединения са способни да активират M1 мускариновите рецептори.

За разлика от ацетилхолин, CCh, оксотреморин-M и други класически пълни агонисти, съединенията съгласно настоящото изобретение причиняват селективно активиране на отчетлив сигнал посредством M1 (или M3) мускариновите рецептори. В частност, селективното активиране от мускариновите агонисти на PI хидролиза

без (или с минимално) активиране на сАМР натрупване е главната активност на новите съединения. Това наблюдение може да означава индукция на свързване на М1 мускариновия рецептор към определени G-протеини чрез тези селективни мускаринови лиганди. Така освен активност на М1 рецептори, съединенията съгласно изобретението са също така селективни на ниво отчетлив носител на вторична активност. Тази концепция за селективно активиране на само отделни G-протеини посредством същия мускаринов рецептор като се използват селективни мускаринови лиганди е описано от изобретателите на настоящото изобретение като концепция за лиганда - селективен сигнал като се използват CHO клетки трансфектирани с m1AChR от плъх (Fisher et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett., 2, 839-844, 1992) и в невронен тип клетъчна линия, напр. PC12M1 клетъчна линия (Soc. Neurosci. Abs. Nov., 1993). Възможната надеждност на този сигнален път за развитие на холинергичната заместваща терапия за Алцхаймерова болест (AD) е видна предвид на откриването на повишени Gs нива в AD пациенти и мозъци на възрастни (Harrison et al., Mol. Brain Res., 10, 71, 1991, Young et al., Dev. Brain Res., 61, 243, 1991). Тези съединения съгласно настоящото изобретение могат да бъдат важни за лечение на Алцхаймерова болест.

Някои от съединенията са пълни агонисти, докато други са частични агонисти в сравнение с CCh по стимулиране на PI хидролизата в клетъчни култури трансфектирани с m1AChR. Частични агонисти са AF160, AF160 (Дез), AF178, AF180, AF181, AF265, AF267. AF260, AF261, AF263 и AF266 проявяват пълна агонистична активност в тези тестове. Кривите концентрация-отговор за AF260 и AF261 показват, че максимална активност се получава при 10 μ M и 100 μ M, съответно. AF265 и AF267 се държат като частични агонисти, с

максимална активност от 75% и 66% спрямо 1 mM CCh, съответно. AF181 притежава слаба частична агонистична активност при този тест. Така при концентрация от 1 mM той частично активира PI хидролизата, но намалява индуцирана от CCh хидролиза на PI както се очаква за частичен агонист. AF213 и AF184 показват антагонистична активност като блокират сигнала за PI хидролиза на CCh. От енантиомерите на AF267 по-активният е AF267B, (-)-енантиомерът, това съединение активира PI хидролизата в клетки трансфектирани с m1 рецептори дори при 10 μ M (40% от CCh) и при 100 μ M (80% от CCh).

Изследвана е способността на новите съединения да индуцират десенситилизацията на сигнала за PI хидролиза с CCh медиатор. AF261 индуцира по-малък десенситилизиращ отговор в сравнение с CCh: след 24 часа експозиране на 100 μ M AF261, отговорът за стимулиране на PI хидролиза с 1 mM CCh се намалява с 45% в сравнение с намалението с 60% след предварително инкубиране с 1 mM CCh. AF267, съединение, което притежава частична антагонистична активност за индуциране на PI хидролиза, е по-малко способно да индуцира десенситилизация. Така, след инкубация една нощ с 1 mM AF267, първоначалният PI отговор с медиатор CCh се намалява просто с 29%.

Новите съединения са изследвани и за тяхната способност да индуцират PI хидролиза в клетки транзитивно трансфектирани с човешки m1AChR, m3AChR или m5AChR, в паралелни експерименти както е описано от Pittel и Wess (Mol. Pharmacol., 45, 61-64, 1994). AF267 показва най-висока селективност спрямо m1AChR субтип, като е около 100 пъти по-силнодействащо за m1AChR в сравнение с m3AChR-трансфектирани клетки (ED_{50} стойностите са 1,5 и 150 μ M,

съответно). Това е особено очевидно, когато се сравнява сигнал индуциран с 10 μ M AF267, който е вече максимален в m1AChR-трансфектирани клетки, но е само 15% от максималния CCh сигнал в m3AChR-трансфектирани клетки. AF265 е малко по-силнодействащо и по-ефикасно в m1AChR отколкото в m3AChR трансфектирани клетки и много по-малко активно в m5AChR. Подобни резултати се получават с AF267 и особено за неговия по-активен енантиомер, (-)-енантиомера, в клетъчна култура инжекционно трансфектирана с m1AChR и m3AChR, съответно.

Освобождаването на арахидонова киселина (AA) е друг биохимичен ход, който се активира от агонисти на m1AChR. Тъй като този биохимичен ход може да бъде свързването на m1AChR посредством G протеин различен от този при PI хидролиза, новите съединения се изпитват по този тест, като се използва клетъчна култура инжекционно трансфектирана с m1AChR от плъх. AF263, AF265, AF266 и AF267 (при 1mM) показват частична агонистична активност в този тест. От енантиомерите на AF267, активният енантиомер е AF267B, (-)-енантиомерът, който е пълен агонист при AA освобождаването при 0,1 и 1 mM. AF260 и AF261 показват пълна агонистична активност в сравнение с 1 mM CCh в съгласие с наблюденията за PI хидролизата в същата клетъчна линия. Наблюдава се тенденция тези агонисти да индуцират по-силно AA освобождаване, в сравнение с 1mM CCh. Това може да означава, че сигнал с медиатор CCh вече претърпява десенсибилизация през време на теста (20 минути при 37°C). Правдоподобно е, че тази десенсибилизация е по-малка при изследваните съединения. Алтернативно, някои изпитвани съединения могат да бъдат по-ефикасни от CCh като M1 агонисти, напр. "супер агонисти". В този

случай не е ясно защо това свойство не се наблюдава в теста за PI хидролиза с използване на AF260 и AF261.

Предварително инкубиране на клетъчни култури трансфектирани с m1AChR с 1 mM CCh в продължение на 3 часа последвано от изчерпателно промиване на лигандата (6 x 1 ml) намалява значително освобождаването на AA. Основното отделяне на AA се засяга минимално, което показва, че няма остатъчно количество CCh след промиването. При сравнение, в същия експеримент предварителното инкубиране с 1mM AF265 или AF102B намалява отговора за освобождаване на AA до 1mM CCh само до около половината на първоначалния отговор. За по-дълги инкубационни периоди се предпочитат концентрации от активното съединение 100 μ M като концентрации на 1 mM нямат физиологичен смисъл за дълъг период на третиране. След предварително инкубиране с 100 μ M CCh в продължение на 24 часа AA отговорът е вече напълно загубен. При сравнение на способността на новите съединения да десенсибилизират с медиатор CCh сигнала за AA освобождаване. Неочаквано, предварителното инкубиране с 100 μ M AF265 в продължение на 24 часа не води до някакво намаляване на AA отговора. Това заслужава особено отбелязване, като се има предвид, че това съединение е частичен агонист в този тест. Обратно, стимулиране с AF260, AF261 и AF263 (всички при 100 μ M в продължение на 24 часа) значително намаляват сигнала за AA освобождаване с медиатор CCh. Подобни предварителни инкубации с AF102B или AF267 водят до относително малка намеса в последващия сигнал на AA освобождаване с медиатор CCh, отново отбелязвайки сходството между тези две съединения.

Тест № 4: Невротрофоподобен ефект в клетъчни култури

Активирането на M1 рецептори посредством агонисти може да води до синергитични ефекти с неврорастежния фактор (NGF) в някои клетъчни култури обогатени с m1 рецептори, напр. PC12 (феохромоцитомни клетки от плъх) трансфектирани с m1AChR от плъх (PC12M1 клетки), (Pincas-Kramarski et al., J.Neurochem., 59, 2158-2166, 1992).

Сега е установено, съгласно друг аспект на изобретението, че съединенията с формули I-IX с максимална степен на превръщане на PI по-висока от 25% действат като синергисти на израстването на аксоните продуцирано от NGF. Два класа съединения могат да се открият сред съединенията съгласно изобретението: 1) съединения като AF260, AF261 и AF263, които в отсъствие на NGF индуцират израстването на аксоните подобно на CCh и 2) тези съединения, които в остър контраст на оксотреморина не оказват въздействие на аксоновото израстване или индуцират само минимална морфологична промяна в отсъствие на NGF. Двата класа са важни за лечение на Алцхаймерова болест. Във втория клас не настъпва неконтролируем аксонов растеж. Поради това, предпочитани съединения кандидати за лечение на Алцхаймерова болест, например, трябва да индуцират само невритогенезата при строг контрол на локално синтезирани и освободени растежни фактори, като NGF, получавани от главния мозък неврофактори (BDNF), NT-3 и т.н. Примери за такава уникална активност могат да се намерят сред съединенията като AF160, AF160(Дез), AF185, които са най-малко силни колкото AF102B в синергизъм с NGF индуцираното аксоново израстване. Аксони удължени при комбинирано третиране с NGF и новите съединения съгласно изобретението са стабилни за дълъг период в културата. Оттук, трябва да се приеме, че сигналният път (пътища) използван от

съединенията съгласно изобретението за индуциране на аксоновото израстване не се десенсибилизира бързо. Това напомня много на самия NGF, който индуцира много стабилни и дълготрайни аксонопромотиращи ефекти в PC12 клетки, както и в първични култури на симпатикови неврони. Трябва да се отбележи, обаче, че стари нетретирани култури от изпитвани клетки се разрушават и съдържат много мъртви клетки, които се отделят от повърхността. Интересно е, че феноменът на умъртвяване на клетка е по-малък в култури, които предварително са третирани с комбинация от новите съединения и NGF. Известно е, че NGF спасява PC12 клетки от програмирана клетъчна смърт (напр. Ruckenstein et al., J.Neuroscience 11, 2552-2563, 1991). Следователно, тези наблюдения показват, че е възможно съединенията съгласно настоящото изобретение да посредничат за подобни отговори подпомагащи оживяването. Всички тези свойства осигуряват допълнителна полезност на съединенията във връзка с потенциално третиране на пациенти с Алцхаймерова болест.

Невротрофоподобната активност на тези агонисти съгласно настоящото изобретение в нервните клетки, която също зависи от присъствието на NGF, вероятно показва, че тези съединения упражняват невротрофна активност във връзка с някакъв сигнал(и) чийто посредник са NGF рецепторите. Една от възможностите е, че тези ефекти са индиректни, чрез увеличаване отделянето на прекурсор на амилоидни протеини (APP) с посредник 1mAChR, видно по-долу. Особено, ендогенните APP са необходими за нормален растеж на фибробластните клетки, а екзогенните APP могат да стимулират пролиферацията на тези клетки (Saitoh et al., Cell, 58, 615, 1989, Nattson et al., TINS, 16, 409-414, 1993). Интересно е, че секретираните форми на APP, заедно с другите активности, е

известно да регулират аксоновото израстване и да подпомагат оживяването на невроните (обзор на Mattson et al., TINS, 16, 409-414, 1993). Умиране на нервна клетка при Алцхаймерова болест вероятно включва намаляване на продукцията и/или способността на невротрофините, което на свой ред компрометира оживяването на холинергичните неврони. Ако настъпят също невротрофоподобни събития индуцирани от M1 агонисти в мозъка, това може да има много важно клинично значение и по такъв начин подсказва ново лечение за Алцхаймерова болест.

Тест № 5. Секретиране на прекурсор на амилоидни протеини (APP) в мозъчни срезове и клетъчни култури

Има нарастващо доказателство, че β -амилоидът съдейства за патологичния процес водещ до Алцхаймерова болест. Въз основа на " Хипотеза амилоидна каскада ", AD се получава в резултат на мисметаболизъм на прекурсор на амилоидни протеини (APP) (Mattson et al., TINS 16, 409-414, 1993). Активирането на mAChRs и в частност m1 субтипа, увеличава секретирането на APP ин витро (Nitsch et al., Science, 258, 304, 1992, Buxbaum et al., PNAS US 89, 10075, 1992, Lahiri et al., Biochem.Int., 28, 853, 1992). Така съгласно друг аспект на изобретението, съединенията с формули I-IX, в частност тези, показващи селективна m1 агонистична активност и увеличено освобождаване на APP, могат да бъдат полезни не само за лечение на Алцхаймерова болест, но и за задържане на нейното прогресиране или дори за нейното предотвратяване.

Използваният метод за оценка на секретирането на APP е имуноблотингтехниката на Western (Nitsch et al., PNAS, 90, 5191-5193, 1993). Съгласно теста са използвани 22C11 моноклонален анти APP, който се използва широко за откриване на APP. Това антитяло се насочва към аминокрая на APP и разпознава всички APP изоформи

съобщени до момента. То не може да открива амилоид или С-крайния APP фрагмент образуван след APP секретирането. За оценка на ефекта на новите съединения върху освобождаването на APP, клетъчни линии трансфектирани с m1 рецептори се култивират в 12-ямкови плаки (в някои експерименти в 6-ямкови плаки) както е описано от Pinkas-Kramarski et al. (J.Neurochem., 59, 2158, 1992). Прибавят се лиганди от стерилен 100x щокков разтвор за изпитвания период. Експериментите завършват чрез промиване на плаките двукратно със среда свободна от серум. Клетките се остъргват от плаките в студен фосфат/физиологичен разтвор буфер (pH = 7,4, PBS). След центрофугиране (10 мин 10 000 g) течностите над утайките се премахват и пелетите се суспендират в 0,1 ml студен лизисен буфер съдържащ смес от инхибитори на протеаза (50mM TRIS:HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1 mM PMSF, 5 единици/ml апротинин, 5 µg/ml пепстатин А, 5 µg/ml леупептин). Пелетите след това се разрушават с ултразвук в продължение на 5 секунди при максимална настройка (Branson sonicator, model 130) и се центрофугират отново. Течностите над утайките (екстракти от клетъчни мембрани) се преместват в чисти епруветки. Вземат се проби за определяне на протеин по метода на Lowry.

За APP анализа равни количества протеин (обикновено 100 µg/на ред) се разреждат в буфер съдържащ 0,6% SDS и 1% 2-меркаптоетанол и се прибавя към 10% акриламид/SDS минигел (Hoffer Scientific). Предварително оцветени стандарти за молекулни тегла (Sigma) се прибавят към всеки гел. Гелове се подлагат на ток с постоянна стойност от 25 mAmp/гел при 4°C. Блотингът се извършва при 100 mAmp в продължение на 16-18 часа при 4°C, като

се използва нитроцелулозна мембрана. Следващите етапи се провеждат при стайна температура. Мембраните се блокират за 1 час посредством потапяне в PBS съдържащ 10% нискомаслено мляко. Този етап се последва от промиване 3x5 минути в PBS съдържащ 0,05% Tween-20 и 0,1% BSA (PBST). Анти-APP моноклонално антитяло, клон # 22C11 от Boehringer Manneheim (cat. # 1285-262) се прибавя при разреждане 1:200 (0,25 µg/ml IgG) в PBST буфер в продължение на 2 часа при стайна температура или 18 часа при 4°C. В някои експерименти подобни петна се изследват с контролен миши IgG при подобна концентрация. Този етап се последва от 3x5 минути промиване в PBST. Вторични кози анти-миши IgG антитела свързани с пероксидаза от хрян (от Jackson Immunochemicals, cat. # 115-035-003) се използват при 1:2000 в PBST в продължение на 1 час след което следва промиване както по-горе. Оцветяването на имунопетната се осъществява при стайна температура в продължение на 15-30 минути като се използва пресен разтвор на 4-хлоронафтол (0,2 mg/ml в TBS съдържащ 16% етанол) и H₂O₂ (0,01%). Оцветените петна се фотографират (Kodak TMAX негативен филм) и се сканират в LKB UltroScan KL лазерен скенер при 40 µm вертикален размер на интервала и 2,4 mm хоризонтална ширина на прорежа. Всеки ред се сканира три пъти при лека промяна на позицията, получените данни са главните стойности за оптична плътност.

По този метод се измерва количеството APP останало в клетъчната мембранна фракция след инкубацията (обикновено в продължение на 24 часа) с изпитваните съединения. Най-ниските нива APP останали в мембраните след такава инкубация с агонисти се вземат за индикатор, че повече APP е секретирал от клетките. Този начин на измерване е надежден, когато се разглежда способността на

мускариновите агонисти да намаляват акумулирането на β -амилоид при Алцхаймерова болест, понеже само мембранносвързани APP, за разлика от секретираниите форми на APP, могат да породят β -амилоид. За измерване на APP, който се секретира от клетъчна културална среда ("кондиционирана среда"), кондиционираната среда се концентрира като се използва Amicon микрофилтрационни мембрани (30 kDa отрез). След етапа на концентриране се измерва количеството на протеина в пробите посредством метода на Bradford (Bio-Rad kit # 500-0006) като се използва говежди гамаглобулин като стандарт. Еднакви количества протеин се подлагат на полиакриламидна гелна електрофореза (PAGE). Количеството APP в пробите се анализира посредством имуноблот с 22C11 моноклонално анти-APP антитяло, както е описано по-горе. Молекулните тегла се оценяват от предварително оцветени стандарти (Sigma), които се включват във всеки гел.

Съединенията с формули I-IX с максимална степен на секретирание в клетъчни култури по-високи от 125% (спрямо база взета като 100%) се предпочитат. Такива примери за такава активност могат да се намерят в AF160(Дез), AF179, AF185, AF261, AF263, AF265, AF267.

За да се даде възможност да се обработват по-голям брой проби едновременно, се предпочитат някои изследвания, при които се използва дотблот техника (96 петна могат да се обработват едновременно на отделна мембрана) При тази техника кондиционираната среда от стимулирани PC12M1 клетки се прилага директно към нитроцелулозни мембрани под вакуум (без предварителна концентрация). Мембраните след това се изследват подобно на имуноблотинг протокол. Подробни изследвания на

зависимостта концентрация-отговор и време също се анализират чрез разделяне на секретираниите APP върху PAGE. Резултатите от тези изследвания и тези получени от дотблотинг изследванията са в добро съответствие. Изследването на APP секретирание посредством клетки трансфектирани с m1AChR се провежда с новите съединения и се прилага също дотблотинг техника и 1 час инкубация. Някои от съединенията като AF261, AF263, AF265 и AF267 са пълни агонисти според този тест. Десенсибилизацията на медиатора m1AChR на APP секретирание е по-силна през време на продължителна инкубация с CCh в сравнение с частичните агонисти съгласно изобретението. Това обяснение е особено важно, когато се сраняват данните съгласно изобретението за десенсибилизирането на сигнали за освобождаването на арахидонова киселина (AA) в комбинация със скорошните предположения на Emmerling et al. (BBRC 197, 292-297, 1993), че освобождаването на AA се включва в стимулирането на APP секретирането. Данните съгласно настоящото изобретение показват, че някои от новите съединения могат да бъдат предпочетени сред агонистите с най-висока активност за клинично използване пред по-ниски нива на клетъчносвързан APP за дълги периоди. Съединенията, които показват минимална десенсибилизация при изследването за освобождаване на AA са AF265 и AF267. Измерването на клетъчносвързан APP след инкубация с AF265 или AF267 в продължение на 24 часа (и двата при μM) показва намаляване на APP нивата, което е по-силно с AF267 и подобно на ефекта на CCh, докато AF265 има по-слаб ефект.

Данните за секретирание на APP от инжекционно трансфектирани с m1AChR клетъчни култури ясно показват, че няколко от новите съединения могат да стимулират APP секретирането и могат следователно да съдействат за намаляване натрупването на

амилоид ин виво. Обаче, за да е възможна екстраполацията на данни от тъканна култура в ин виво ситуация, би било за предпочитане да се покаже, че съединенията съгласно изобретението могат също да стимулират APP секреция в мозъка. За тази цел е изследвана APP секреция в срезове от кора на главен мозък на плъх. В типичен експеримент, срезове от кора на главен мозък на плъх се приготвят непосредствено от прясно дисектирана тъкан срязана в две перпендикулярни посоки посредством McIlwain Tissue Chopper (300x300 микрона) и промита три пъти с наситен с кислород буфер на Krebs. Промитите срезове се еквилибрират с този буфер в продължение на 50 минути при 37°C. След етапа на еквилибриране (който е необходим за отстраняване на клетъчните отломки получени при приготвянето на среза) буферът се сменя с буфер на Krebs, съдържащ 50 µg/ml BSA (като носител на протеин) и смес от инхибитори на протеази (0,1 mM PMSF и по 5µg/ml леупептин, пепстатин и апротинин-A). Срезове се разпределят в пластмасови епруветки и се стимулират в продължение на 1 час при 37°C (2 часа в един експеримент) с посочените концентрации на изследваните съединения. В края на инкубационния период буферните проби се събират чрез центрофугиране, анализират се за протеиново съдържание и еднаквите протеинови количества се отделят и обработват за имуноблотинг с 22C11 анти-APP моноклонално антитяло, като се използва PAGE подобно на експериментите с култивирани клетки. Секретираният APP се появява като две протеинови ивици, с видими молекулни тегла от 117 kDa (главна ивица) и 90 kDa (второстепенна ивица). Тези APP ивици кореспондират на секретираният форми APP751 и APP695 (главните Kunitz-съдържащи и Kunitz-несъдържащи форми на APP).

Алтернативно, те могат да съответстват на зряла и незряла (негликозилирани) форми на секретиран APP751. Понастоящем, няма достатъчни данни за разграничаване между тези възможности, защото 22C11 моноклонално антитяло използвано при тези изследвания идентифицира всички форми на секретиран APP. Както CCh така и AF267, например (и двата при 0,1 mM) увеличават APP секретирането в срез от кора на главен мозък от плъх с 2 до 3 пъти в сравнение с контролно APP секретиране. Това е очевидно както за 117 kDa така и от 90 kDa протеинови ивици.

Наблюдението върху секретиране на APP в срезове от кора на главен мозък е уникално. Досега единственото публикувано доказателство за APP секретиране в мозъчна тъкан ин витро е от Nitsch et al. (PNAS, 90, 5191-5193, 1993), който съобщава, че електрическо стимулиране на хипокампусови срезове от плъх увеличават освобождаването на APP. Именно, неговото изследване не включва стимулиране с рецепторен агонист. Наблюденията съгласно настоящото изобретение са изобретателски и нови, тъй като те са първото доказателство за регулиране на APP секретирането в мозъчна тъкан от която и да е рецепторна лиганда и в частност M1 агонист като AF267. Тези съединения, които стимулират APP секретирането в срезове от кора на главен мозък на плъх се предпочитат. Такива съединения могат да се разглеждат като всички тези агонисти съгласно настоящото изобретение способни на стимулиране на вторична активност като PI контрол >25%. Тези уникални наблюдения могат да сочат възможността на някои от съединенията да забавят отлагането на A4-амилоидни пептиди в мозъци на пациенти с Алцхаймерова болест.

Тест № 6. Фосфорилиране на τ протеин в клетъчни култури трансфектирани с m1AChRs и в срезове от кора на главен мозък на плъх

Тау (τ) е невронспецифичен свързан с микротубулите протеин, на който са богати аксоните. Тау се експресира като няколко изоформи, всяка от които е произлязла от алтернативно снаждане на единичен ген (човешкият тау има 6 изоформи, притежаващи 352-441 аминокиселини). Той действа за стабилизирането на микротубулите на невронните аксони. Неговото свързване с микротубулите се регулира чрез фосфорилирането му в определени сайтове (Mandelkow and Mandelkow, TIBS, 18,480-483, 1993). Това свързване на свой ред регулира растежа и стабилността на аксона (Baas et al., J. Cell. Biol., 115, 1333-1344, 1991, Mattson, Brain Res., 582, 107-118, 1992). Една от главните характеристики на Алцхаймеровата болест, освен отлагането на амилоид в плаките, е натрупване на тау или тау производни в неврофибриларни възли (NFTs). Тези възли вероятно отразяват крайния продукт от смъртта на нервните клетки в заболялата мозъчна тъкан. Много изследвания са показали промени във фосфорилирането на тау протеина в проби от мозък взет след смъртта на пациенти с Алцхаймерова болест. Този феномен е най-добре документиран като увеличена имунореактивност с моноклоналното антитяло ALZ-50, за което е показано, че открива хиперфосфорилирани форми на тау в тези мозъчни проби (Vinsent and Davies, PNAS, 87, 4840-4844, 1990, Vinsent and Davies, Brain. Res. 531, 127-135, 1990). Следователно, предполага се, че промени в деликатния баланс между тауспецифичните кинази/фосфатази може би участват в процеса на умирането на нервната клетка при Алцхаймерова болест и следователно коригирането на такъв вероятен

дисбаланс може да бъде с потенциална терапевтична стойност.

В съгласие с горното, изследвано е нивото на фосфорилиране на тау протеини в клетъчни култури инжекционно трансфектирани с m1AChR след стимулиране с CCh или едно от изпитваните съединения. Това е направено като се използва моноклоналното антитяло тау-1, за което е известно, че разпознава само дефосфорилирани, но не и фосфорилирани изоформи на тау (Mandelkow and Mandelkow, TIBS, 18, 480-483, 1993). След инкубирането на клетките или на срезове от кора на главен мозък на плъх с агонистите за различни периоди, клетките или срезове се промиват трикратно с PBS, остъргват се в PBS съдържащ 0,2 mM EDTA и се центрофугират 5 минути при 10 000 x g . Мембранните пелети се анализират за протеиново съдържание и еднаквите протеинови количества се зареждат на PAGE за имуноблотинг с тау-1 антитялото. Измерванията на имунореактивността се извършват подобно на изследванията на APP като се използва видеодензитометрия с изключение на това, че свързаното с пероксидаза второ антитяло се открива като се използва усиlena хемилуминисцентна техника (kit RPN-2109, Amersham, UK).

Именно, както CCh така и изпитваните агонисти увеличават тау-1 имунореактивността и това увеличение се блокира напълно от атропин. Наблюдава се удивително увеличение на тау-имунореактивността с медиатор CCh в клетки култивирани с NGF (50 pg/ml) за 3 дни преди стимулиране с мускаринови лиганди. Подобни експерименти при използване на различни концентрации на CCh или изпитваните агонисти показват, че увеличената тау-1 имунореактивност изисква относително високи концентрации на лиганда (10-100 μM).

Измерено е също тауфосфорилирането в срезове от кора на

главен мозък на плъх след стимулиране с CCh в сравнение със съединенията съгласно настоящото изобретение. Неочаквано, отново изследваните мускаринови агонисти са способни да намаляват тауфосфорилирането.

Така, мускариновите агонисти са способни да намаляват тауфосфорилирането чрез активиране на трансфектираните m1AChR в клетъчни култури и по-важно в мозъчни срезове. Също така, ефектите от тези агонисти изглежда че са продължителни, което е очевидно дори след инкубиране на клетките с 100 μ M лиганди за най-малко три дни. Тези наблюдения могат да означават, че селективни M1 агонисти са способни да намаляват тауфосфорилирането.

Тези наблюдения са нови, тъй като при най-доброто от настоящите познания, досега не е показана никаква зависимост между данните за холинергична недостатъчност при Алцхаймерова болест и натрупването на фосфорилирани изоформи на тау протеини в неврофибриларните възли характерно за заболял мозък. Тези нови наблюдения са важни за забавянето на прогресирането на Алцхаймеровата болест посредством M1 агонисти.

В заключение:

M1 агонистите могат да имат редица ефекти. Така, неочаквано, механизмът на действие на m1 агонисти е по-комплексен отколкото първоначално предвидения. Следните активности са вече свързани с m1 агонистите ин витро (и може би ин виво):

1. Свързване със и активиране на m1 рецептори,
2. Отчетливо активиране на избрани G-протеини (напр. Gg, но не Gs),
3. Невротрофоподобни и синергитични ефекти с NGF,
4. Секретиране на прекурсора на амилоиден протеин (APP) и намаляване на β -амилоиди,

5. Увеличаване частта на дефосфорилирани τ протеини,
6. NGF подобни ефекти.

Всички тези ефекти могат да се свържат в модел, при който активиране на m1AChRs води до каскада от свързани събития. Тези комплексни механизми лежащи в основата на m1 агонистичната активност могат да се свържат в общ сценарий, който обяснява необикновенната APP преработка, NGF подобната недостатъчност и холинергичната недостатъчност при SDAT и AD. Следователно, m1 агонисти подобни на тези от настоящото изобретение могат да бъдат ценни за предпазване от формирането на амилоид чрез селективно и позитивно подпомагане на секретазния начин на преработка и могат също да подпомагат действието на невротрофините при AD, заради техния синергитичен ефект с NGF. Така m1 агонистите могат да бъдат полезни при холинергичната заместителна стратегия и също за забавяне прогресирането на Алцхаймерова болест. Съединенията съгласно изобретението, които са m1 агонисти са (за разлика от пептидите) относително малки молекули, които имат невротрофоподобно действие и подпомагат освобождаването и нормалната преработка на APP и увеличават дефосфорилираните (или намаляват фосфорилираните) тау протеини. Така третирането на клетки с m1 агонист би могло вероятно да отмести преработката на APP от амилоидогенния лизозомален път в нормален секреторен път и следователно холинергичната терапия на AD може да има ефект върху β -амилоидното натрупване по-дълго време (по въпроса също Lahiri et al., Biochem.Int., 28, 853-860, 1992). Освен това, тъй като някои от агонистите съгласно настоящото изобретение показват NGF подобен ефект по контролиран начин и в частност в присъствие на NGF такива съединения могат да бъдат от съществено значение при бъдещо

третиране на AD/SDAT. По този начин може да се контролира израстването на аксоните по-добре. Нещо повече, съединенията съгласно изобретението имат продължителен благоприятен ефект върху израстването на аксоните, в присъствие на NGF. Така може да се обсъжда, че бъдещото възможно лечение като се използват такива растежни фактори като NGF за AD/SDAT пациенти може да изисква по-малка честота на прилагане на самия растежен фактор, когато се прилага заедно с m1 агонист. Именно, прилагането на NGF към мозъка е най-трудната задача, тъй като това съединение не преминава кръвномозъчната бариера. Когато бъде решен този проблем (напр. посредством специална освобождаващи системи) това още ще изисква повторно прилагане на NGF подобни съединения. Агонистите m1 в тази връзка могат да редуцират броя на необходимите повторни прилагания на NGF, тъй като такива агонисти продължават ефекта на NGF (най-малко ин витро). Интересно е, че клинични тестове на NGF (icv) в 2 пациенти с Алцхаймерова болест показва много сериозни противоположни ефекти (сериозна болка, объркване, влошаване на минимални умствени показател), (3rd Springfield Symposium on Alzheimer's Disease, May 11-15, 1994, Springfield, Il., USA). Използването на M1 агонисти като тези съгласно настоящото изобретение, които действат като синергисти с NGF могат да бъдат от голямо значение за редуциране на страничните ефекти свързани с NGF при хора, тъй като могат да се използват по-ниски дози на NGF.

Тест № 7. Фармакологичен и токсикологичен профили

Изследването се провежда чрез наблюдение на животни след венозно или орално (при мишки) или орално (в стомаха за плъхове) прилагане на 3-6 дози от всяка субстанция. Резултатите са сумирани в таблица 5.

В различни интервали от време след прилагането (10, 20, 30, 45, 60, 120, 240 минути и 24 часа) животните се подлагат на подробно наблюдение за промяна в общото поведение, рефлекс и автономни ефекти. Смъртността се документира при 24 часа след прилагането на изпитваните съединения. Телесната температура на плъховете се измерва като се използва Tele-Termometer (Model 46 TUC). Различните фармакологични и поведенчески параметри включват: саливация, зачервяване около носа и устата, хромодакриорея, седативен ефект, атаксия, цианоза, тремори, конвулсии, хипотермия, опистотонос, респираторен дистрес, диарея, гризание, пилоерекция, смъртност, промяна в диаметъра на зениците, ротарод, вокализация. Някои от изпитваните съединения не са токсични до 500 mg/kg (р.о., мишки и плъхове).

ТАБЛИЦА 5

Фармацевтични и токсикологични профили при мишки или плъхове

Съед AF	Доза *	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
133 мишки	50♥														0/5
	100♥														3/5
	200♥														5/5
	400														1/5
134 мишки	10♥														0/5
	25♥														0/5
	50♥														0/5
	100♥						4/5				2/5				3/5
	100														0/5
	200										1/5				0/5
151 (S) плъхове	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
	100	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		0/4	3/4	0/4	0/4	0/4
	200	4/4	4/4	4/4	2/4	1/4	1/4	1/4	0/4		1/4	4/4	0/4	0/4	1/4
	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

ТАБЛИЦА 5 (продължение)

Съед АФ	Доза *	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
160 млшк	8	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	нт		0/4	0/4	нт	нт	0/4
	16	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4			0/4	1/4			0/4
	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
	глю ве	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
		25	0/4	1/4	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	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	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	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	4/4		0/4	4/4	4/4	4/4	0/4
160 Дез глю ове	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
	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
	250	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4		0/4	1/4	0/4	0/4	0/4
	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
	млшк	120	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	4/4	0/4	1/4			0/4
		500	1/4	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	4/4	3/4	0/4	3/4			0/4
163 млшк	25	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	нт	0/4	0/4	0/4	нт	нт	0/4
	50	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4			0/4
	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
	глю ве	50	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	нт	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		100	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		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
177 млшк	31	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	нт	нт	0/4
	62	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4			1/4
	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

Ключ към таблица 5:

* = mg/kg, приложени орално, освен ако е посочено друго

♥ = приложено венозно (iv)

1 = саливация

2 = хромодакриорея (плъхове) или лакримация (мишки)

3 = седативен ефект

4 = атаксия

5 = цианоза

6 = тремор

7 = конвулсии

8 = хипотермия

9 = мидриазис

10 = респираторен дистрес

11 = диарея

12 = гризане

13 = пилоерекция

14 = смъртност

Обсъждане на резултатите

AF160

AF160 е относително мощен мускаринов агонист, по-скоро централен отколкото периферен (напр. хипотермия спрямо саливация) и по-малко токсичен най-малко 5 пъти в сравнение с AF102B. Забележително откритие за това съединение е липсата на тремор у плъховете до най-високата изпитвана доза (500 mg/kg p.o.) и известна степен на тремор при мишки при доза > 125 mg/kg p.o. Подобна насока е открита при метиловите аналози на AF160, именно AF178, където не се наблюдава тремор както при мишки така и при плъхове до 500 mg/kg p.o. Мишките са по-чувствителни към това съединение отколкото плъховете, като периферни и централни

странични ефекти се получават при по-ниски дози.

Намерено е, че при плъхове AF160 е мощен агонист.

Симптоми се появяват при доза по-ниска от 25 mg/kg. ED₅₀ стойности са получени за хипотермия и гризание. Степента и силата на симптомите са съответни на дозата. Хипотермичният ефект е продължителен, по-дълъг от 4 часа.

Четири аспекта са забележителни в AF160:

1. Очевидно съединението е повече CNS активно отколкото PNS активно (напр. хипотермията се появява при по-ниски дози отколкото саливацията).
2. Има CNS селективност, тъй като не всички CNS ефекти се наблюдават (напр. хипотермия спрямо липса на тремор).
3. Времетраенето на наблюдаваните ефекти е голямо.
4. Не се наблюдава смъртност при мишки и плъхове при най-високите дози, 500 mg/kg.

AF160(Дез)

При плъхове, саливация, хипотермия и диарей се наблюдават в едно на четири животни 45 минути след прилагане на 125 mg/kg. След увеличаване дозата на 500 mg/kg броят на животните от групата проявяващи тези симптоми се увеличава и освен това се различават пилоерекция и седативен ефект. Хипотермичният ефект не е зависим от дозата. Никакви централни или автономни ефекти не се получават от това съединение. Съединението е относително неактивно по отношение на холинергични странични ефекти. При съединението AF160(Дез) странични ефекти се окриват при дози >246 mg/kg, р.о. при плъхове.

При мишки се наблюдават лакримация, диарей и мидриаза, след прилагане на 240 mg/kg AF160 (Дез). При по-високи дози и до 1000 mg/kg, се появяват допълнителни симптоми като саливация,

седативен ефект и хипотермия. Степента и силата на повечето от симптомите (освен за лакримацията) са в зависимост от дозата. Не се наблюдава смъртност дори при най-високи дози, 1000 mg/kg. Локално приложение от 1 mg (прагово количество) AF160(Дез) в окото предизвиква мидриаза за 15 минути. Обратно, използваният атропин като сравнително лекарствено средство заради неговия локален мидриатичен ефект, предизвиква мидриаза за 45 минути в количество по-ниско от 40 µg. Този резултат ясно показва, че предизвиканата от AF160(Дез) мидриаза е централна по произход.

AF163

При плъхове, при доза в границите от 50 до 400 mg/kg, единствените ефекти които предизвиква съединението са саливация и зачервяване около носа и устата. Тези ефекти се появяват бързо (10 минути) и траят кратко (20 минути). Докато броят на животните проявяващи саливация е зависим от дозата, зачервяване около носа е намерено само у едно животно при доза от 100 mg/kg. В заключение, наблюдават се само автономни ефекти след прилагане на това съединение при плъхове.

При мишки, освен вокализация наблюдавана при едно животно при най-високата изпитвана доза (400 mg/kg), това съединение е лишено от каквито и да са други явни ефекти. Никакви явни периферни и централни странични ефекти не се откриват с AF163, при мишки дори при най-висока изпитвана доза (400 mg/kg, р.о.). AF163 се смята пролекарство за AF160 по подобен начин както дитиоаналога на RS86 (виж Bolliger et al., Alzheimer's and Parkinson's Disease, Strategies in R&D, eds. Fisher et al., Plenum Press, p. 585, 1986).

AF177

При мишки се наблюдават хипотермия, хипоактивност и

тремор 10 минути след прилагане на 31 mg/kg. След увеличаване на дозата до 62 mg/kg, броят на симптомите се увеличава. Наблюдават се седативен ефект, атаксия, Straub-опашка и изпадане от ротарод 20 минути след прилагане на 4/4 мишки. Наблюдава се смъртност 1/4 мишки 30 минути след прилагане. Когато дозата се увеличи до 125, 250 и 500 mg/kg, се наблюдава саливация, конвулсии и смъртност на 4/4 мишки, но началото и продължителността на симптомите стават прогресивно по-тежки. Изчислените ED_{50} стойности показват, че AF177 притежава главно централни ефекти. AF177 може да се счита като пролекарство за централнодействащ и мощен мускаринов агонист.

AF178

При мишки, намалената моторна активност, саливация, лакримация и диарей се наблюдават до един час след прилагане на 60 mg/kg. Увеличаване на дозата до 500 mg/kg води до допълнителни симптоми като респираторна дистресия, намаляване изпълнението върху ротарод, тремор и мидриаза. Степента и силата на повечето от симптомите са съответни на дозата. Най-общо, увеличаването на дозите удължава активността. Например, диарей, тремор, мидриаза и т.н. продължават приблизително 4 часа. Заслужава да се отбележи, че при 500 mg/kg едно животно проявява палпитация до 20 минути след прилагането, продължаваща 10 минути. Дори макар че при дози 500 mg/kg се получават дълбоки токсикологични симптоми, не се регистрира смъртност. Така оценяването на ED_{50} би била при дози по-високи от 500 mg/kg.

При плъхове, саливация е единственият явен признак след прилагане на 62,5 mg/kg AF178. Увеличаване дозата до 125 mg/kg се появяват повече признаци като хромодакриорея, хипотермия, диарей

и гризание. Степента и силата на тези симптоми се увеличават с дозата. Респираторен дистрес се появява само у едно животно при доза 500 mg/kg, 5 минути след инжектиране. Съединението може да притежава относително широка граница на безопасност.

AF180

При плъхове, саливацията е единственият проявен симптом при 125 mg/kg AF180. Той е очевиден до 20 минути след прилагане и трае 40 минути. По-нататъшно увеличение на дозата до 500 mg/kg увеличава продължителността на саливацията до 230 минути. При това ниво на дозата при три житони се регистрира също хипотермия 15 до 240 минути след инжектиране. Не се наблюдават други централни или автономни ефекти при това ниво на дозата.

При мишки се наблюдават хипотермия и мидриаза 20 минути след прилагането на 125 mg/kg. След увеличаване на дозата до 500 mg/kg, броят на животните за група проявяващи тези симптоми се увеличава, и допълнително саливация, лакримация и седативен ефект стават отчетливи. Освен това продължителността на тези симптоми става по-голяма от 1,5 часа след прилагане на 500 mg/kg. Не се проявяват никакви други централни или автономни ефекти от това съединение.

AF185

При мишки се наблюдава мидриаза след прилагане на 62,5 mg/kg AF185. При по-високи дози и до 500 mg/kg, допълнителни симптоми като саливация и хипотермия се появяват след прилагане на съединението. Не се наблюдава смъртност дори при най-висока ниво на дозата (500 mg/kg).

При плъхове, освен зачервяване около носа и устата, при една мишка при най-високата изпитвана доза (500 mg/kg) това съединение е лишено от други явни ефекти. Може да се направи

заклучение, че AF185 е много безвредно съединение.

AF261

При плъхове единственият проявен симптом е хипотермия (типичен CNS ефект) при 7,5 mg/kg AF261. Той става очевиден за 10 минути след прилагане и трае в продължение на 50 минути. След увеличаване на дозата до 15,6 mg/kg се появяват допълнителни симптоми като саливация, хромациорей, хипоактивност, атаксия и диарея за 10 минути. При по-високи дози и до 250 mg/kg се появяват допълнителни признаци като зачервяване около носа и устата, тремор, конвулсии, опистотонус, гризана и пилоерекция. Тези признаци могат да се открият 5-10 минути след прилагане. Силата и степента на повечето от тези симптоми са свързани с дозата. Смъртност при 4/4 плъха се случва само при най-високата изпитвана доза (250 mg/kg), 45 минути след прилагане.

AF265

При плъхове, единственият проявен симптом е хипотермия (типичен CNS ефект) при 250 mg/kg AF265. Той става очевиден за 10 минути след прилагането и трае в продължение на 110 минути. Не се наблюдават никакви други централни или автономни ефекти след прилагането на това съединение. Така това съединение е забележително само заради неговия CNS ефект.

Тест № 8. Ефекти на AF134 при необучени плъхове.

Ефектите на AF134 върху паметта и способността към обучение се оценява в етап от задача за пасивно избягване при необучени плъхове. Поведенческата парадигма и инструментариумът е както е описано от Fisher et al., *Neurosci.Lett.*, 102, 325, 1989). Четири групи (20 плъха/група) необучени мъжки плъхове порода Sprague-Dawley, 200-300 g, на възраст 3-4 месеца (Charles River Breeding, UK) се третират с една от следните дози AF134: 1, 5, 10,

mg/kg, интраперитонеално (ip) и една група получават физиологичен разтвор (1 ml/kg ip).

При третирания с AF134 плъхове не се откриват значителни разлики между латентностите на задържането на третирани преди шока плъхове, при които съединението се инжектира 30 минути преди шока и на плъхове третирани след шока, при които съединението се инжектира 60 минути след шока.

При друга експериментална парадигма AF134 се сравнява със скополамин (антимускариново съединение) в радиален лабиринт с осем прохода с необучени плъхове (поведенческа парадигма и инструментариум както е описано от Fisher et al., *Neurosci.Lett.*, 102, 325, 1989). Група от 14 необучени плъха се третират със скополамин (0,2 mg/kg i.p.) или физиологичен разтвор (1 ml/kg i.p.) 20 минути преди стартиране на лабиринта. Всички проходи имат примамка. Всеки плъх получава две третирания с три дни интервал между третиранията. (Десет дни тренинг се последват от десет дни тестиране). Същият експеримент със същите плъхове се повтаря с AF134 (5 mg/kg i.p.) срещу физиологичен разтвор (1 ml/kg i.p.). Скополаминът показва, както се очаква, типичен антихолинергичен "амнезичен" ефект при използваната доза. Обаче AF134 не предизвиква никаква промяна в поведението на плъховете.

AF134, който притежава антагонистична активност върху M1 (въз основа на изследванията за свързване) и M3 мускариновите рецептори (въз основа на препаратите с илеум от морско свинче) не предизвиква увреждане на познавателния ефект и по такъв начин това съединение може да бъде полезно за лечение на двигателни заболявания, Паркинсонова болест, смесена Паркинсонова и Алцхаймерова болест, маниакална депресия, увреждане на главата на човека и при различни периферни смущения за лечение на остър

ринит, пептична язва и астма.

**Тест № 9. Изследване на поведението с животински модели
AF160 и AF102B - лабиринт с радиални проходи**

Изследва се потенциалният благоприятен ефект на дози от AF160 (3 и 5 mg/kg, p.o.) и AF102B (3 mg/kg p.o.) при дефицит на реверсивната памет у инжектирани с AF64A плъхове (1,5 nmol/2µl/ страна). Този животински модел имитира до известна степен холинергичната хипофункция при SDAT (Fisher et al., J. Pharmacol. Expl. Therap., 257, 392-403, 1991). При това изследване се използват 80 мъжки плъха порода Sprague-Dawley на възраст 4-6 месеца (340-580 g). Интервалът от време между операцията и изпитването на поведението е два до три месеца. Една седмица преди стартиране на теста за поведение плъховете се пренасят в индивидуални клетки и се хранят ограничено докато достигнат приблизително 85% от тяхното тегло при свободно хранене. След това плъховете получават 5-6 парчета Altromin (15 g) дневно, с оглед да се поддържа телесното им тегло в постоянно състояние. Плъховете имат свободен достъп до вода. Пространството се осветява 12 часа дневно (6,00-18,00 часа) и изпитването на поведението се извършва сутринта.

Изпитване на поведението

40 плъха инжектирани с AF64A и 40 плъха с физиологичен разтвор се подразделят произволно на 4 подгрупи и се определят за AF160 3 mg/kg, AF160 5 mg/kg, AF102B 3 mg/kg (10 ml/kg p.o.) и DDW. През време на първите два дни от изпитването на поведението плъховете се тренират съгласно процедурата 8 от 8 снабдени с примамка проходи с оглед да привикнат с лабиринта и усилващите пелети (точност до 45 mg). На този етап плъховете се поставят в централната арена и им се оставя свободен достъп до всичките 8

снабдени с примамка проходи. Всеки сеанс завършва когато всичките 8 пелети са събрани в края на 15-та минута, без значение кой пристига пръв. През време на третия и четвъртия ден пелети се поставят само в края на проходите. Иначе другите процедури са същите както в предварителното трениране. Изпитването се извършва през време на втората седмица на експеримента. През това време веднъж дневно се прилагат AF160, AF102B или DDW (използван за контрола), в продължение на 5 дни 60 минути преди тестването.

Анализ на данните

Регистрират се всички движения в лабиринта, изтеклото време, както и правилните и неправилни отговори. С оглед да се прецени ефектът на AF160 през време на изпитвания период в сравнение с периода на тренировка, който се използва като базово изпълнение, се извършва трикратно ANOVA ($2 \times 4 \times 2$) като се повтарят варианти (блокове от дни за трениране и тестване) и два неповтарящи се варианта (инжектиране на AF64A/физиологичен разтвор и третиране с различни дози от AF160 и AF102B или DDW). Сравнения post-hoc се извършват като се използват контрастите на прости основни ефекти.

Резултати

По отношение на правилния избор от 8 посетени, е намерено значително взаимодействие между групи $\times$ третиране $\times$ седмици [$F(2/48)+3,95$, $P<0,025$]. По-специално, през време на двата периода на трениране и прилагане на съединенията, инжектираните с AF64A плъхове правят значително по-малко правилни избори отколкото плъховете инжектирани с физиологичен разтвор ($P<0,001$). Двете лекарства, AF102B (3 mg/kg) и AF160 (3 mg/kg) подобряват изпълнението на плъховете инжектирани с AF64A през време на втората седмица в сравнение с дните за тренировка ($P<0,01$

респективно). През време на втората седмица двете групи, AF160 (3 mg/kg) и AF102B (3 mg/kg) достигат еднакво ниво на изпълнение, което е значително по-високо от това на инжектираните с AF64A плъхове, третирани с вода ($P < 0,05$). AF160 5mg/kg няма значителен ефект върху този параметър. В сравнение с инжектираните с физиологичен разтвор плъхове изпълнението на плъхове третирани с вода се подобрява (5%) през време на втората седмица в сравнение с първата седмица ($P < 0,01$). По подобен начин подобрене (7,5%) е намерено при плъхове третирани с AF160 (3 mg/kg) ($P < 0,001$). AF102B (3 mg/kg) няма ефект върху този параметър при инжектираните с физиологичен разтвор плъхове.

По отношение на тоталните грешки е установено значително взаимодействие между групи $\times$ третиране $\times$ седмици [$F(3/64) + 3,49$, $P < 0,025$]. Във втората седмица броят на грешките на инжектирани с AF64A плъхове е значително по-голям от тези на инжектирани с физиологичен разтвор плъхове ($P < 0,001$). Броят на грешките на всички четири групи инжектирани с AF64A плъхове се намалява значително във втората седмица в сравнение с първата седмица: AF64A + вода - 20% ($P < 0,01$), AF64A + AF160 - 3 mg/kg - 16% ($P < 0,02$) и AF64A + AF102B - 3 mg/kg - 30% ($P < 0,001$). Макар че всичките четири групи подобряват изпълнението, само това с AF102B - 3 mg/kg е по-високо отколкото изпълнението на групата AF64A+вода. При плъховете инжектирани с физиологичен разтвор, AF160- 3 mg/kg и 5 mg/kg значително подобрява изпълнението във втората седмица в сравнение с първата седмица ($P < 0,01$, $P < 0,001$, съответно). AF102B - 3 mg/kg проявяват влошаване на изпълнението и тази група прави много грешки във втората седмица в сравнение с първата седмица ($P < 0,001$).

Що се отнася до общото време, значително взаимодействие

е намерено между групи х третиране х седмици [$F(2/48)=3,29$, $P<0,05$]. Подобрение във времето е намерено за инжектираните с AF64A подгрупа освен AF64A + AF160 - 5 mg/kg, AF46A + вода - 31% ($P<0,01$) (21%) ($P<0,01$). При инжектираните с физиологичен разтвор плъхове ефектът на подобрение във времето е намерено при физиологичен разтвор + вода - (54%) ($P<0,001$) и физиологичен разтвор + AF160 - 3 mg/kg - (37%) ($P<0,001$). AF102B няма ефект върху инжектирани с физиологичен разтвор плъхове при този параметър, може би заради "ефекта на пода". AF160 - 5 mg/kg не въздейства значително изпълнението на инжектирани с физиологичен разтвор плъхове, макар че може да се наблюдава тенденцията на подобрение.

Заклучения

1. Плъхове инжектирани с AF64A (1,5 nmol/2 μ l/страна) показват значително подобрение в параметрите на правилните избори, броя на грешките и общото време в сравнение с инжектирани с физиологичен разтвор плъхове.

2. AF160 (3 mg/kg) значително подобрява изпълнението на инжектирани с AF64A плъхове (в сравнение с третираните с плацебо) в параметрите на правилните избори и общото време. По-висока доза от 5 mg/kg е ефективна само при параметъра за броя на грешките в сравнение с базата (но не с плацебо).

AF160(Дез) - Задача във воден лабиринт на Morris (MWM)

Обект на това изследване е да се оцени способността на изпитваното съединение AF160(Дез) да промени увреждания в познавателната способност при инжектирани с AF64A плъхове като се използва MWM задача съгласно метода на Fisher et al., Pharmacol. Exptl. Therap., 257, 392-403, 1991. AF160(Дез) се изпитва като се използват две дози: 1 и 3 mg/kg p.o. 38 инжектирани с AF64A (3

nmol/2µl/ страна) и 42 инжектирани с физиологичен разтвор плъхове се разделят произволно на 4 подгрупи и се определят различни дози от AF160(Дез) (1 и 3 mg/kg, p.o.) или DDW 10 ml/kg, p.o.). съединението се прилага един път на ден в продължение на 5 дни, 60 минути преди тестването.

Не се наблюдават устойчиви странични ефекти по време на изпитване на поведението. Получават се следните резултати:

1. Инжектирането на AF64A (3 nmol/2µl/страна) води да значително подобрение в изпълнението, както показват двата параметъра латентен период на избягване и дължина на пътя.

2. AF160(Дез) - 3 mg/kg подобрява изпълнението както на AF64A така и на инжектирани с физиологичен разтвор плъхове върху третия блок за трениране.

Положителните ефекти подсказват използването на различни дози от съединението в бъдеще, за да се изпробва неговите възможни благоприятни ефекти върху обучението и дефицит на памет.

AF185 - избягване на пасивност (PA)

Изследва се ефектът на AF185 при различни дози, върху избягване на пасивност при третирани с AF64A плъхове.

Методи

AF64A се инжектира билатерално (3 nmol/2µl/страна, ivc), за да се получи животинският модел (Fisher et al., J.Pharmacol Exptl. Therap., 257, 392-403, 1991). Четири седмици след операцията, инжектираните с AF64A и физиологичен разтвор групи се подразделят произволно на четири подгрупи от по 10-11 плъха всяка, три подгрупи се третират с различни дози AF185 (1, 5, 10 mg/kg, p.o.), а една подгрупа получава DDW (10 ml/kg). AF185 се прилага незабавно след шока и плъховете се тестват 72 часа по-късно. За

експериментални подробности виж Fisher et al., J.Pharmacol. Exptl.Therap., 257, 392-403, 1991.

Резултати

Измерванията на началната латентност и задържаната латентност се анализират отделно посредством двукратна ANOVA (2x4), инжектиране на AF64A/физиологичен разтвор срещу дози от AF185 или DDW.

Що се отнася до началната латентност не са намерени никакви значителни разлики между началните латентности на които и да са от групите.

Що се отнася до задържане на латентността, намерено е взаимодействие между групите и третирането ($F(3/75)=22,31$, $P<0,001$). Контрастите между простите главни ефекти показват, че задържане на латентността на инжектираните с AF64A плъхове спрямо DDW е значително по-кратка отколкото тази на инжектираните с физиологичен разтвор плъхове третирани с DDW ($P<0,001$). Задържането на латентността на инжектирани с AF64A плъхове третирани с AF185 - 1,5 или 10 mg/kg е значително по-долга от тази на AF64A+DDW ($P<0,001$). Никакви други съществени разлики не са намерени.

Заклучения

1. Инжектирани с AF64A плъхове показват значително подобрене в задържане на латентността в сравнение с инжектираните с физиологичен разтвор плъхове.

2. Инжектираните с AF64A плъхове третирани с AF185 (1,5 и 10 mg/kg) проявяват способност за задържане подобна на контролните животни.

3. AF185 може да бъде потенциално съединение за лечение на разстройства на паметта като тези наблюдавани при Алцхаймерова

болест.

Осигурена е следната корелация на специфични съединения съгласно изобретението, съгласно IUPAC систематичната номенклатура, с техните кодови номера както са използвани в описанието:

2,8-диметил-1-оксо-1-тия-4,8-диазаспиро[4.5]декан-3-он (AF262), 3-етил-8-метил-1-окса-4,8-диазаспиро[4.5]декан (AF268), 2,8-диметил-1-окса-4,8-диазаспиро[4.5]декан (AF264), 3,8-диметил-1,4-диокса-8-аза-спиро[4.5]декан (AF274), 2-етил-4,8-диметил-1-тия-4,8-диазаспиро[4.5]декан-3-он (AF272), 3-метил-1-окса-4-тия-8-азаспиро[4.5]декан-2-он (AF269), 3-етил-8-метил-1-окса-4-тия-8-азаспиро[4.5]декан-2-он (AF271), 2-метил-1-тия-4,8-диазаспиро[4.5]декан-3-он (AF263), 3,8-диметил-1-окса-4-тия-8-азаспиро[4.5]декан-2-он (AF265), 2,8-диметил-1-окса-4,8-диазаспиро[4.5]декан-3-он (AF260), 2,4,8-триметил-1-тия-4,8-диазаспиро[4.5]декан-3-он (AF266), 2-етил-8-метил-1-тия-4,8-диазаспиро[4.5]декан-3-он (AF267), 2,8-диметил-1-тия-4,8-диазаспиро[4.5]декан-3-он (AF261), 2,8-диметил-1-окса-4,8-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-4-он (AF238), 2,8-диметил-1,3,8-триазаспиро[4.5]-дец-1-ен-4-он (AF230), 3-етил-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дец-1-ен-4-он (AF220), 1-етил-8-метил-3-окса-1,8-диазаспиро[4.5]декан-2-он (AF174), 8-метил-1-окса-3,8-диазаспиро[4.5]декан-2-тион (AF165), 3-етил-8-метил-1-окса-3,8-диазаспиро[4.5]декан-2-он (AF172), 8-метил-1-окса-3,8-диазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF169), 3-етил-8-метил-1-окса-3,8-диазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF180), 4-бутилимино-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2-тион (AF189), 8,N,N'-триметил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дека-1,3-диен-2,4-диамин (AF194), метил-(8-метил-2-

метилсульфанил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дека-1,3-диен-4-ил)амин (AF193), 8-метил-2-метилсульфанил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дека-1,3-диен-4-иламин (AF192), 4-метокси-8-метил-2-метилсульфанил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дека-1,3-диен (AF191), 2,8-диметил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дец-1-ен (AF190), 3-этил-2-этилсульфонил-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дец-1-ен-4-тион (AF170), 3-этил-2-этилсульфанил-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дец-1-ен-4-он (AF188), 8-метил-2-метилсульфанил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дец-1-ен-4-он (AF187), 8-метил-2,4-бисметилсульфанил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дека-1,3-диен (AF177), 8-метил-4-метилсульфанил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дец-3-ен-2-тион (AF183), 4-этилсульфанил-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]дек-3-ен-2-тион (AF176), 3-этил-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дитион (AF163), 8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дитион (AF173), 1-ацетил-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF164), 3-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF179), 3,8-диметил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF178), 3-этил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF160 Дез), 3-этил-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF160), 3-этил-8-метил-4-тиоксо-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2-он (AF182), 8-метил-3-(4-пиролидин-1-ил-бут-2-инил)-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF197), 3-проп-2-инил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF186), 3-трет-бутил-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF213), 8-метил-3-проп-2-инил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF185), 3-трет-ббутил-8-метил-2-тиоксо-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-4-он (AF184), 3-этил-8-метил-2-тиоксо-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-4-он (AF181), 3-этил-8-проп-2-инил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF196), 5-(1-метилпиперидин-4-ил)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (AF195), 5-метил-2-(1-метилпиперидин-4-ил)тиазолидин-4-тион (AF275), 3-бут-2-

инил-8-метил-1,3,8-триазаспиро[4.5]декан-2,4-дион (AF199).

Тъй като настоящото изобретение е тук описано частично, с особено указание към експериментираните и други специфични изпълнения, специалистите от областта са наясно, че много варианти и модификации могат да се направят. Изобретението съответно не трябва да се приема като ограничаващо до изпълненията, които са конкретно описани, концепцията, обхватът и същността могат да се разберат като се погледнат претенциите, които следват.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Използване на спиросъединения както са дефинирани по-долу, включително техни фармацевтичнопоносими соли, кватернерни съединения, които структурно произлизат от съединенията с третичен азотен атом, енантиомери и рацемати, за приготвяне на лекарствено средство с активност на мускарина, при условие, че когато съединението притежава (а) активност на мускаринов агонист, то допълнително притежава биологична активност като (b) неутрофоподобна или синергитична активност на неврорастежния фактор (NGF), (c) активност на секретирание прекурсор на амилоидния протеин (APP) и активност намаляваща β -амилоидите, (d) активност увеличаваща частта на дефосфорилираните τ протеини и (e) NGF подобна активност, като спиросъединенията съдържат петчленна част, в която спировръзката е при нейния въглероден атом и едновременно при въглеродния атом на наситената пръстенна система съдържаща един азотен атом, а петчленната част е групата 3-етилхидантоин, 1-ацетилхидантоин, 3-метилхидантоин, 3-пропаргилхидантоин, хидантоин, 2,4-дитиохидантоин, 2-тиохидантоин, оксазолидин-2-тион, 3-етилоксазолидин-2-он, оксазолидин-2,4-дион, 3-етилоксазолидин-2,4-дион, 2-метил-1,4-оксазолидин-3-он, 2-метил-1,4-тиазолидин-3-он, 2,4-диметил-1,4-тиазолидин-3-он, 2-етил-1,4-тиазолидин-3-он, 2-етил-4-метил-1,4-тиазолидин-3-он, 3-метил-1,4-оксатиолан-2-он, 2-етил-1,4-тиазолидин-3-он, 2-метил-3-оксо-1,4-тиазолидин-1-оксид, 5-метил-1,3-оксазолидин, 4-етил-1,3-оксазолидин, 3-етил-1,4-оксатиолан-2-он, 5-метил-1,3-диоксолан-4-он, N-метилсукцинимид, N-етилсукцинимид, 3-трет-бутилхидантоин, 3-(4-пиридино-2-бутинил)-хидантоин, 3-(2-бутинил)хидантоин,

2,5-бис(метилтио)-4Н-имидазол, 3-етил-4-тиохидантоин, 4-метилтиоимидазолин-2-тион, 3-етил-2,4-дитиохидантоин, 4-етилтио-3-имидазолин-2-тион, 1-етил-2-етилтио-2-имидазолин-5-тион, 2-тио-4β-хидроксиетилиминохидантоин, 2,5-бис(аминометил)-4Н-имидазол, 2-метил-2-тиазолин, 2-метил-2-имидазолин, 2-метил-2-оксазолин-4-он, 2-метил-4Н(5Н)-имидазол-5(4)-он, 2-метилтио-5-метокси-4Н-имидазол, 2-метилтио-5-амино-4Н-имидазол, 2-метилтио-5-аминометил-4Н-имидазол, 2-тион-3-етилхидантоин, 2-тион-3-трет-бутилхидантоин, 2-метилтио-2-имидазолин-5(4)-он, 1-етил-2-етилтио-2-имидазолин-5-он или 1-етил-2-имидазолин-5-он, наситената пръстенна система съдържаща един азотен атом е групата пиперидин, 1-метилпиперидин, 1-пропаргилпиперидин, N-метилнортропан или хинуклидин.

2. Използване съгласно претенция 1, характеризиращо се с това, че спиросъединението е 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2',5'-бис(метилтио)-4'Н-имидазол), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-4'-тиохидантоин, 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(4'-метилтиоимидазолин-2'-тион, 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-2',4'-дитиохидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(4'-етилтио-3'-имидазолин-2'-тион), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-тион), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тио-4'β-хидроксиетилиминохидантоин, 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2',5'-бис(аминометил)-4'Н-имидазол), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилоксазолидин-2'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метил-2'-тиазолин), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-метил-2'-имидазолин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-оксазолин-4'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-[2'-метил-4'Н(5'Н)-имидазол-5'(4')-он], 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-метокси-4'Н-

имидазол, 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-амино-4'-Н-имидазол или 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-аминаметил-4'-Н-имидазол.

3. Използване съгласно претенция 1, характеризиращо се с това, че спиросъединението е 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(1'-ацетилхидантоин), пиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-метилхидантоин), пиперидин-4-спиро-5'-(3'-метилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-пропаргилхидантоин), N-метилнортропан-3-спиро-5'-хидантоин, N-метилнортропан-3-спиро-5'-(3'-метилхидантоин), N-метилнортропан-3-спиро-5'-(3'-етилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-дитиохидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тиохидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(оксазолидин-2'-тион), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(3'-етилоксазолидин-2'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(оксазолидин-2',4'-дион), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилоксазолидин-2',4'-дион), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-оксазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2',4'-диметил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-4-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он), пиперидин-4-спиро-5'-(3'-метил-1',4'-оксатиолан-2'-он), пиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-3'-оксо-1',4'-тиазолидин-1'оксид), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-метил-1',4'-оксатиолан-2'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(5'-метил-1',3'-оксазолидин, 1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(4'-етил-1',3'-оксазолидин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-1',4'-оксатиолан-2'-он), 1-

метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-1',4'-тиазолидин-3'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-2'-(5'-метил-1',3'-диоксолан-4'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-тион), 2-N-метилспиро-(1,3-сукцинимид-4,3')хинуклидин или 2-N-етилспиро-(1,3-сукцинимид-4,3')хинуклидин.

4. Използване съгласно претенция 1, характеризиращо се с това, че спиросъединението е 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-[3'(4-пиролидино-2-бутинил)хидантоин], 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-трет-бутилхидантоин), 1-пропаргилхидантоин-4-спиро-5'-(3'-етилхидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-[3'-(2-бутинил)хидантоин], пиперидин-4-спиро-5'-(3'-пропаргилхидантоин) или 2-метил-1,4-тиазолидин-3-он-спиро[5,3']хинуклидин.

5. Използване на един или повече разделени дясно- и лявовъртящи енантиомери като d- и l-1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-1',4'-тиазолидин-3'-он) и d- и l-1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-етил-1',4'-тиазолидин-3'-он), включително техни фармацевтично поносими соли и кватернерни съединения, за приготвяне на лекарствено средство с активност на мускаринов агонист и допълнителна биологична активност като (b) неутрофоподобна или синергитична активност на неврорастежния фактор (NGF), (c) активност на секретирание прекурсор на амилоидния протеин (APP) и активност намаляваща β -амилоидите, (d) активност увеличаваща частта на дефосфорилираните τ протеини и (e) NGF подобна активност.

6. Фармацевтичен състав за използване при лечение на заболявания, при които се прилага лечение със съединения с мускаринова активност, характеризиращ се с това, че съдържа най-малко ефективно количество за лечение на такова заболяване от

най-малко едно от съединенията както са дефинирани в претенции 1 до 5, включително техни фармацевтичнопоносими соли, кватернерни съединения, които структурно произлизат от съединенията с третичен азотен атом, енантиомери и рацемати на такива съединения, с биологична активност както е дефинирана в претенция 1, заедно с най-малко един от следните ingredienti (i) и (ii): (i) най-малко един фармацевтично поносим разредител, носител или добавка, (ii) най-малко още едно фармакологично активно съединение като физостигмин, тетрахидроаминоакридин, холин, лецитин, пирацетам, анирацетам, прамирацетам, оксирацетам, 4-аминопиридин, 3,4-диаминопиридин, соматостатин, пирензепин, N-метилатропин, N-бутилскополамин, скополамин, клонидин, кванфамицин, пропантелин, метантелин, гликопиролат, тропензилин, нортриптилин, амитриптилин, имипрамин, минаприн, сековерин, AFDX-116, никотин, алапроклат, зимелидин, депренил и неврорастежен фактор.

7. Фармацевтичен състав съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че е във форма подходяща за орално, ректално, парентерално или трансдермално приложение или за приложение чрез инсуфлация или назален спрей и в случай на трансдермално приложение съставът може да съдържа като допълнителен компонент мастна киселина с ниско молекулно тегло.

8. Фармацевтичен състав за използване при лечение на заболявания на централната и периферна нервна система у бозайници, характеризиращ се с това, че съдържа мускариноактивно количество от най-малко едно съединение както са дефинирани в някоя от претенции 1 до 5, включително техни фармацевтично поносими соли, кватернерни съединения, които структурно произлизат от съединенията с третичен азотен атом,

енантиомери и рацемати на такива съединения, заедно с най-малко един фармацевтично поносим разредител, носител или добавка и като допълнително фармакологично активно съединение неврорастежен фактор, при условие, че съединението присъства в количество, което подпомага неврорастежната активност на неврорастежния фактор.

9. Фармацевтичен състав съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че е във форма подходяща за орално, ректално, парентерално или трансдермално прилагане или прилагане чрез инсуфлация или назален спрей и в случай на трансдермално прилагане съставът може да съдържа като допълнителен компонент мастна киселина с ниско молекулно тегло.

10. Спиросъединение избрано от:

1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2',5'-бис(метилтио)-4'H-имидазол),
1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-4'-тиохидантоин),
1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(4'-метилтиоимидазолин-2'-тион),
1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етил-2',4'-дитиохидантоин),
1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-тион),
1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-тио-4'β-хидроксиетилимино хидантоин), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2',5'-бис(аминометил)-4'H-имидазол), 1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(3'-етилоксазолидин-2'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метил-2'-тиазолин),
1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-метил-2'-имидазолин),
1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-метил-2'-оксазолин-4'-он),
1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-[2'-метил-4'H(5'H)-имидазол-5'(4')-он], 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-метокси-4'H-имидазол), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-амино-4'H-имидазол) или 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(2'-метилтио-5'-аминометил-4'H-имидазол).

11. Фармацевтичен състав за използване при лечение на заболявания на централната и периферна нервна система у бозайници, които заболявания са потенциално податливи на лечение със съединения с активност на мускарина, характеризиращ се с това, че съдържа ефективно количество за лечение на такива заболявания от най-малко едно съединение както са дефинирани в претенция 10, включително техни фармацевтичнопоносими соли, кватернерни съединения, които структурно произлизат от съединенията с третичен азотен атом, енантиомери и рацемати на такива съединения, заедно с най-малко един от следните ingredienti (i) и (ii): (i) най-малко един фармацевтично поносим разредител, носител или добавка, (ii) най-малко още едно фармакологично активно съединение като физостигмин, тетрахидроаминоакридин, холин, лецитин, пирацетам, анирацетам, прамирацетам, оксирацетам, 4-аминопиридин, 3,4-диаминопиридин, соматостатин, пирензепин, N-метилатропин, N-бутилскополамин, скополамин, клонидин, кванфамицин, пропантелин, метантелин, гликопиролат, тропензилин, нортриптилин, митриптилин, имипрамин, минаприн, сековерин, AFDX-116, никотин, алапроклат, зимелидин, депренил и неврорастежен фактор.

12. Фармацевтичен състав съгласно претенция 11, характеризиращ се с това, че е във форма подходяща за орално, ректално, парентерално или трансдермално прилагане или прилагане чрез инсуфлация или назален спрей и в случай на трансдермално прилагане съставът може да съдържа като допълнителен компонент мастна киселина с ниско молекулно тегло.

13. Фармацевтичен състав за използване при лечение на заболявания на централната и периферна нервна система у бозайници, които заболявания са потенциално податливи на

лечение със съединения с активност на мускарина, характеризиращ се с това, че съдържа ефективно количество за лечение на такива заболявания от най-малко едно съединение както са дефинирани в претенция 10, включително техни фармацевтичнопоносими соли, кватернерни съединения, които структурно произлизат от съединенията с третичен азотен атом, енантиомери и рацемати на такива съединения, заедно с най-малко един фармацевтично поносим разредител, носител или добавка и като допълнително фармакологично активно съединение неврорастежен фактор, при условие, че съединението присъства в количество, което подпомага неврорастежната активност на неврорастежния фактор.

14. Спиросъединение избрано от:

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тион-3'-етилхидантоин),
1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тион-3'-трет-бутилхидантоин),
1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-метилтио-2'-имидазолин-5'(4')-он) или 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-имидазолин-5'-он).

15. Фармацевтичен състав за използване при лечение на заболявания на централната и периферна нервна система у бозайници, които заболявания са потенциално податливи на лечение със съединения с активност на мускарина, характеризиращ се с това, че съдържа ефективно количество за лечение на такива заболявания от най-малко едно съединение както са дефинирани в претенция 14, включително техни фармацевтичнопоносими соли, кватернерни съединения, които структурно произлизат от съединенията с третичен азотен атом, енантиомери и рацемати на такива съединения, заедно с най-малко един един от следните ingredienti (i) и (ii): (i) най-малко един фармацевтично поносим разредител, носител или добавка, (ii) най-малко още едно

фармакологично активно съединение като физостигмин, тетрахидроаминоакридин, холин, лецитин, пирацетам, анирацетам, прамирацетам, оксирацетам, 4-аминопиридин, 3,4-диаминопиридин, соматостатин, пирензепин, N-метилатропин, N-бутилскополамин, скополамин, клонидин, кванфамицин, пропантелин, метантелин, гликопиролат, тропензилин, нортриптилин, митриптилин, имипрамин, минаприн, сековерин, AFDX-116, никотин, алапроклат, зимелидин, депренил и неврорастежен фактор.

16. Фармацевтичен състав съгласно претенция 15, характеризиращ се с това, че е във форма подходяща за орално, ректално, парентерално или трансдермално прилагане или прилагане чрез инсуфлация или назален спрей и в случай на трансдермално прилагане съставът може да съдържа като допълнителен компонент мастна киселина с ниско молекулно тегло.

17. Фармацевтичен състав за използване при лечение на заболявания на централната и периферна нервна система у бозайници, които заболявания са потенциално податливи на лечение със съединения с активност на мускарина, характеризиращ се с това, че съдържа ефективно количество за лечение на такива заболявания от най-малко едно съединение както са дефинирани в претенция 14, включително техни фармацевтичнопоносими соли, кватернерни съединения, които структурно произлизат от съединенията с третичен азотен атом, енантиомери и рацемати на такива съединения, заедно с най-малко един фармацевтично поносим разредител, носител или добавка и като допълнително фармакологично активно съединение неврорастежен фактор, при условие, че съединението присъства в количество, което подпомага неврорастежната активност на неврорастежния фактор.

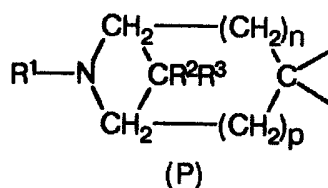
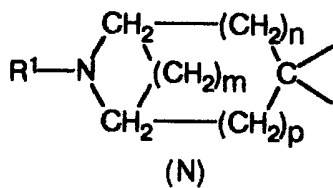
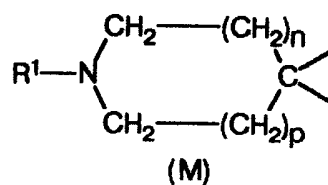
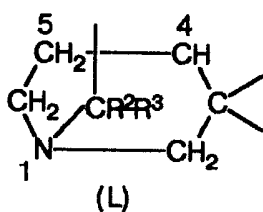
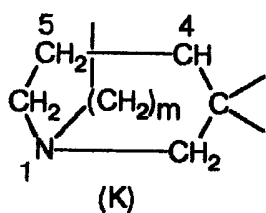
18. Използване съгласно претенция 1, характеризиращо се

с това, че спиросъединението е:

1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тион-3'-етилхидантоин),
1-метилпиперидин-4-спиро-5'-(2'-тион-3'-трет-бутилхидантоин),
1-метилпиперидин-4-спиро-4'(5')-(2'-метилтио-2'-имидазолин-
5'(4')-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-етилтио-2'-
имидазолин-5'-он), 1-метилпиперидин-4-спиро-4'-(1'-етил-2'-
имидазолин-5'-он).

19. Използване на спиросъединения както са дефинирани по-долу, включително техни фармацевтичнопоносими соли, кватернерни съединения, които структурно произлизат от съединенията с третичен азотен атом, енантиомери и рацемати, за приготвяне на лекарствено средство с активност на мускарина, при условие, че когато съединението притежава (а) активност на мускаринов агонист, то допълнително притежава биологична активност като (b) неутрофоподобна или синергитична активност на неврорастежния фактор (NGF), (c) активност на секретирание прекурсор на амилоидния протеин (APP) и активност намаляваща β -амилоидите, (d) активност увеличаваща частта на дефосфорилираните τ протеини и (e) NGF подобна активност, като спиросъединенията съдържат петчленна част, в която спировръзката е при нейния въглероден атом и едновременно при въглеродния атом на наситената пръстенна система съдържаща един азотен атом, а петчленната част е групата 3-етилхидантоин, 1-ацетилхидантоин, 3-метилхидантоин, 3-пропаргилхидантоин, хидантоин, 2,4-дитиохидантоин, 2-тиохидантоин, оксазолидин-2-тион, 3-етилוקсазолидин-2-он, оксазолидин-2,4-дион, 3-етилуксазолидин-2,4-дион, 2-метил-1,4-оксазолидин-3-он, 2-метил-1,4-тиазолидин-3-он, 2,4-диметил-1,4-тиазолидин-3-он, 2-етил-1,4-тиазолидин-3-он, 2-етил-4-метил-1,4-тиазолидин-3-он, 3-метил-1,4-

оксатиолан-2-он, 2-етил-1,4-тиазолидин-3-он, 2-метил-3-оксо-1,4-тиазолидин-1-оксид, 5-метил-1,3-оксазолидин, 4-етил-1,3-оксазолидин, 3-етил-1,4-оксатиолан-2-он, 5-метил-1,3-диоксолан-4-он, N-метилсукцинимид, N-етилсукцинимид, 3-трет-бутилхидантоин, 3-(4-пиролидино-2-бутинил)-хидантоин, 3-(2-бутинил)хидантоин, 2,5-бис(метилтио)-4Н-имидазол, 3-етил-4-тиохидантоин, 4-метилтиоимидазолин-2-тион, 3-етил-2,4-дитиохидантоин, 4-етитио-3-имидазолин-2-тион, 1-етил-2-етилтио-2-имидазолин-5-тион, 2-тио-4β-хидроксиетилиминохидантоин, 2,5-бис(аминометил)-4Н-имидазол, 2-метил-2-тиазолин, 2-метил-2-имидазолин, 2-метил-2-оксазолин-4-он, 2-метил-4Н(5Н)-имидазол-5(4)-он, 2-метилтио-5-метокси-4Н-имидазол, 2-метилтио-5-амино-4Н-имидазол, 2-метилтио-5-аминометил-4Н-имидазол, 2-тион-3-етилхидантоин, 2-тион-3-трет-бутилхидантоин, 2-метилтио-2-имидазолин-5(4)-он, 1-етил-2-етилтио-2-имидазолин-5-он или 1-етил-2-имидазолин-5-он, наситената пръстенна система съдържаща един азотен атом е избрана от групата състоящата се от частите К, L, М, N и Р:



като всяка една формула е незаместена или заместена с 1 до 3 заместителя като C_{1-6} -алкил и хидроксил, а във формули K и L, мостът е свързан с единия си край в позиция 1, а с другия в позиция 4 или 5, m е 1, 2 или 3 и n и r независимо един от друг означават 0, 1, 2 или 3, с ограничението, че $n+r = 1-3$, R^1 означава водород, C_{1-6} -алкил, C_{2-6} -алкенил, C_{2-6} -алкинил, C_{3-7} -циклоалкил, C_{1-6} -алкил заместен с 1-6 халогенни атоми, хидрокси- C_{1-6} -алкил, C_{1-6} -алкокси, C_{1-6} -алкилтио, C_{1-6} -алкокси- C_{1-6} -алкил, карбокси- C_{1-6} -алкил, (C_{1-6} -алкокси)карбонил- C_{1-6} -алкил, amino- C_{1-6} -алкил, моно-(C_{1-6} -алкил)амино- C_{1-6} -алкил, ди-(C_{1-6} -алкил)амино- C_{1-6} -алкил, 2-оксо-пиролидин-1-ил-метил, арил, диарилметилол, C_{1-6} -алкил заместен с една или две арилни групи, C_{1-6} -алканоил и арилкарбонил, арил означава ненаситен фенил или фенил заместен с 1-3 заместителя като халоген, C_{1-6} -алкил, C_{1-6} -алкокси и CF_3 , R^2 и R^3 независимо един от друг означават C_{1-4} -алкил.