

金刚烷胺衍生物的合成和生物活性

李艳萍, 李卓荣*, 曹 珏, 陶玉杰

(中国医学科学院·中国协和医科大学 医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 为了寻找新的神经元保护剂, 合成了 7 个新的 1 位氮取代的金刚烷胺类衍生物, 其结构均经核磁共振氢谱 ($^1\text{H NMR}$)、MS-FAB 和高分辨质谱 (HRMS) 确证; 以四甲基偶氮唑盐 (MTT) 微量比色法和乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率测定法初步考察了所合成化合物体外对谷氨酸损伤神经细胞的保护作用, 研究显示, $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸能够引起神经元细胞发生明显的损伤性变化, 细胞死亡率升高, MTT 值明显降低, LDH 漏出率增加; 加入一定浓度的化合物能够显著提高谷氨酸损伤的人神经母细胞瘤株 SY5Y 的 MTT 代谢率, 降低细胞死亡率, 而且进一步研究显示化合物 **3d** 和 **4c** 能显著降低 LDH 漏出率, 对谷氨酸损伤的神经细胞体外模型显示了保护作用。

关键词: 金刚烷胺; 美金刚胺; 衍生物; 谷氨酸

中图分类号: R916.2 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)04 - 0392 - 04

Synthesis and neuroprotective activity in cell culture of am inoadamantane analogues

LI Yan-ping, LI Zhuo-rong*, CAO Jue, TAO Yu-jie

(Institute of Medicinal and Biotechnology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Seven novel derivatives of am inoadamantane with 1-am inosubstituted group were synthesized from amantadine or memantine individually in order to find new neuroprotective agent. Six of them are amides of two precursors, one is a 1-am ino derivative of memantine substituted with 2-hydroxy propyl. Their chemical structures were confirmed by $^1\text{H NMR}$ and HRMS. The neuroprotective activity *in vitro* was evaluated primarily with $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glutamate damaged SY5Y cell by measurement of MTT metabolic rate and LDH leakage rate. Glutamate reduced MTT metabolic rate, but increased LDH leakage rate significantly. The addition of new derivatives elevated the MTT value with their certain concentration, reduced cell death rate. Especially as for **3d** and **4c**, they fully normalized LDH leakage rate with concentration of $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ during LDH measurement. These data indicated that **3d** and **4c** have significant protective effect on nerve cell against glutamate injury, deserved to be further tested and maybe helpful for treatment of neurodegenerative disease.

Key words: amantadine; memantine; derivative; glutamate

随着世界人口老龄化, 针对衰老和老年人认知功能障碍的研究已经成为当今神经科学领域的重要内容。老年人认知功能障碍以阿尔茨海默氏病^[1,2] (Alzheimer's disease, AD) 最为多见。AD 是一种常见的中枢神经系统进行性变性疾病, 其主要症状呈

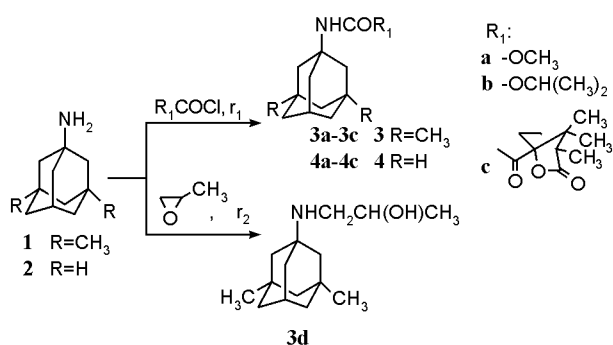
慢性, 进行性加重态势, 尚无有效的治疗方法, 一般在 7~8 年后多数患者的生活变得严重受限甚至不能自理, 给家庭和社会带来沉重负担, 已经成为影响世界各国发展的一个重要因素。AD 带给社会的经济负担将不容忽视, 尤其是对于老年人口绝对值较大的中国, AD 引发的社会问题更是亟待解决。美金刚胺 (1-am ino-3, 5-dimethyladamantane, memantine) 是作为 N-甲基-D-天冬氨酸盐 (N-methyl-D-aspartate,

收稿日期: 2006-07-14.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 63027185,
E-mail: l-z-r@263.net

NMDA)受体拮抗剂用于 AD治疗的代表药物,已于 2001 被 FDA批准上市,用于重度 AD及血管性痴呆的治疗。而且也有研究^[3]表明,NMDA受体的拮抗剂还对神经组织的肿瘤生长有抑制作用,如神经细胞瘤和神经胶质瘤。而经典的抗病毒药物金刚烷胺^[4](1-amino-adamantane, amantadine)与前者的结构差别仅在于 3,5 位上没有甲基取代,并且也具有与 memantine近似的 NMDA 受体拮抗作用,同时它还具有增强多巴胺能神经传导和抗谷氨酸的活性。但是实验证明它在脑内的浓度远低于 memantine^[5],而且复杂不清的作用机制也使其没能成为 AD治疗药物。

金刚烷胺类化合物结构简单、稳定性好,本研究分别以美金刚胺(1)和金刚烷胺(2)为先导物,设计合成了 3 种共 6 个在二者 1 位氨基上的酰化衍生物,参考 Gm icro 等^[6,7]对金刚烷胺进行多胺基取代的研究报道,探索性地设计合成了 1 个美金刚胺 1 位氨基上的醇羟基取代产物(合成路线见图式 1),旨在通过对 1 位氨基的改造初步探讨不同的衍生化对活性的影响。



r_1 : $N(Et)_3$, CH_2Cl_2 , $0^\circ C$, 4 h; r_2 : THF, rt, overnight

Scheme 1 Synthetic route of the compounds **3a - 3d**, **4a - 4c**

所选择的合成方法简单易行,收率稳定。在合成化合物 **3d**的过程中,虽然环氧丙烷与 **1**的摩尔比远远高于 1:1,却只得到单取代衍生物。且主要得到胺基进攻环氧乙烷位阻较小的 3 位碳生成的产物 **3d**。环氧丙烷及 **1**均为液体且可互溶,因此反应也可采用密闭条件下不加反应溶剂四氢呋喃而直接进行。由于所采用的环氧丙烷是消旋体,得到的产物也无光学活性。

本文合成得到的 7 个目标化合物均未见文献报道,其结构经 1H NMR 和 HRMS 确证。理化数据和波谱数据见表 1。

谷氨酸是中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质,在 AD 及脑缺血、缺氧性损伤等许多神经系统疾病中均表现为内源性兴奋性毒素作用,它通过与 NMDA, AMPA 等受体结合,影响神经元的应答反应,对神经元产生明显的损伤作用。文献报道^[8] $500 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的谷氨酸对 SY5Y 细胞的损伤模型是比较适用于体外评价药物对神经细胞的保护作用。本文通过 MTT 法和测定细胞 LDH 漏出率^[9]对所合成的化合物进行了体外受谷氨酸损伤的 SY5Y 人神经母细胞瘤株保护活性的初步筛选(图 1, 2),同时用 2 个先导物作为对照。实验结果表明:(1) $500 \mu mol \cdot L^{-1}$ 谷氨酸能够降低神经细胞的 MTT 代谢率,增加 LDH 的漏出,增加细胞死亡率,并且所产生的损伤作用具有统计显著性;(2) 细胞受到谷氨酸损伤的同时给予不同浓度的化合物后,各化合物均能在某一或某些给药浓度条件下使吸收度值明显高于谷氨酸组,两者相比有显著性差异,而与对照组相比无显著差异;细胞死亡率得到明显降低。(3) 化合物 **3c** 和 **4c** 在 $5 \sim 60 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的给药范围内均能显著地增加 MTT 试验中光吸收度的作用。(4) 试验样品浓度为 $20 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的 **3c**, **4c** 和 **3d** 在以 2 个先导物作为对照的 LDH 漏出率试验显示,与谷

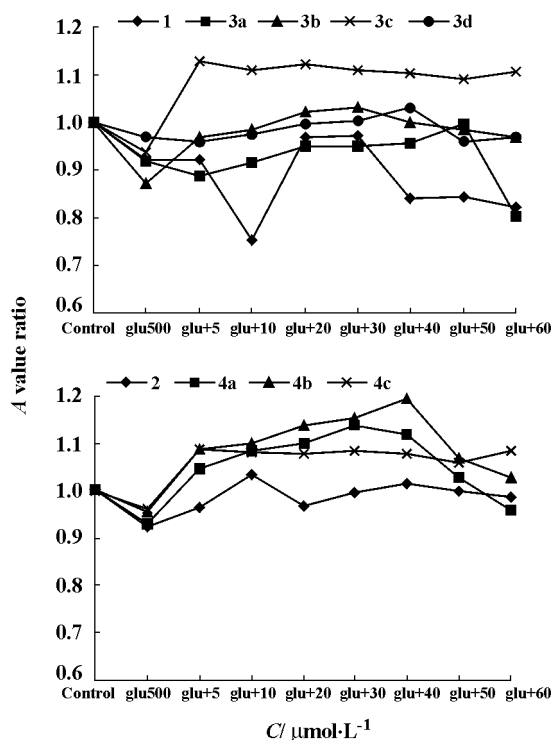


Figure 1 Influence of compounds with different concentrations on the viability of SY5Y in MTT assay. A value ratio vs control groups

Table 1 Structures, physical properties and experimental data of title compounds

| Compd. | M. F. | MS-FAB (<i>m/z</i>) | HRMS Calcd. (Found) | ¹ H NMR (CDCl ₃) δ | Appearance | mp/°C |
|-----------|---|---------------------------|------------------------------|--|---------------|-----------|
| 3a | C ₁₄ H ₂₃ NO ₂ | 237[M] ⁺ | 237.172 879 (237.171 329) | 0.82(s, 6H), 1.07(s, 2H), 1.2 - 1.5(q, <i>J</i> = 12 Hz, 6.2 Hz, 4H), 1.6(s, 4H), 1.75(d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 2H), 2.1(t, 1H, <i>J</i> = 3.3), 3.6(s, 3H), 4.58(br, 1H) | White solid | 45 - 46 |
| 3b | C ₁₆ H ₂₇ NO ₂ | 265[M] ⁺ | 265.204 179 (265.202 003) | 0.9(s, 6H), 1.1(s, 2H), 1.2(d, 6H, <i>J</i> = 6.3), 1.22 - 1.4(q, 4H, <i>J</i> = 12 Hz, 6.3 Hz), 1.6(s, 4H), 1.85(d, 2H, <i>J</i> = 3), 2.15(t, 1H, <i>J</i> = 3), 4.5(Br, 1H), 4.78 - 4.85(m, 1H) | Colorless oil | |
| 3c | C ₂₂ H ₃₃ NO ₃ | 359[M] ⁺ | 359.246 044 (359.243 881) | 0.82(s, 6H), 0.9(s, 3H), 1.1(s, 6H), 1.18(d, 2H, <i>J</i> = 4.5 Hz), 1.2 - 1.4(q, 4H, <i>J</i> = 12 Hz, 6.3 Hz), 1.58 - 1.7(m, 2H, <i>J</i> = 4.2 Hz), 1.63(s, 4H), 1.8(d, 2H, <i>J</i> = 3 Hz), 1.83 - 1.95(m, 2H, <i>J</i> = 4.5 Hz), 2.18(t, 1H, <i>J</i> = 3 Hz), 6.2(br, 1H) | White powder | 118 - 120 |
| 3d | C ₁₅ H ₂₇ NO | 238[M + 1] ⁺ | 238.217 090 (238.217 731) | 0.8(s, 6H), 1.0(d, 3H, <i>J</i> = 6.4 Hz), 1.05(d, 2H, <i>J</i> = 6.4 Hz), 1.08 - 1.2(m, 4H, <i>J</i> = 11.2 Hz), 1.22(s, 4H), 1.4(d, 2H, <i>J</i> = 3.2), 2.05(t, 1H, <i>J</i> = 3.2 Hz), 2.36(d, 2H, <i>J</i> = 6 Hz), 3.3(br, 1H), 3.5(q, 1H, <i>J</i> = 6 Hz), 4.3(br, 1H) | Yellow oil | |
| 4a | C ₁₂ H ₁₉ NO ₂ | 209[M] ⁺ | 209.141 579 (209.140 270) | 1.53(t, 6H, <i>J</i> = 3 Hz), 1.9(d, 6H, <i>J</i> = 2.4 Hz), 2.1(s, 3H), 3.6(s, 3H), 4.5(br, 1H) | White powder | 112 - 115 |
| 4b | C ₁₄ H ₂₃ NO ₂ | 237[M] ⁺ | 237.172 879 (237.171 448) | 1.2(d, 6H, <i>J</i> = 5.1 Hz), 1.6(t, 6H, <i>J</i> = 3 Hz), 1.9(d, 6H, <i>J</i> = 2.4 Hz), 2.09(s, 3H), 4.4(br, 1H), 4.83(s, 1H) | White powder | 115 - 117 |
| 4c | C ₂₀ H ₂₉ NO ₂ | 331[M] ⁺ | 331.214 744 (331.214 882) | 0.9(s, 3H), 1.1(s, 6H), 1.56 - 1.7(m, 2H, <i>J</i> = 4.8 Hz), 1.7(s, 6H), 1.85 - 1.94(m, 2H, <i>J</i> = 4.5 Hz, 9.0 Hz), 2.0(s, 6H), 2.1(m, 3H), 6.1(s, 1H) | White powder | 180 - 181 |

HRMS ion source was EI except that compound **3d** tested with FAB

氨酸组相比,化合物 **4c**和 **3d**组均显著减少了神经细胞 LDH 漏出;而且化合物 **3d**和 **4c**的作用与对照药美金刚胺相当,具有显著性差异,对谷氨酸损伤神经细胞体外模型显示了保护作用。

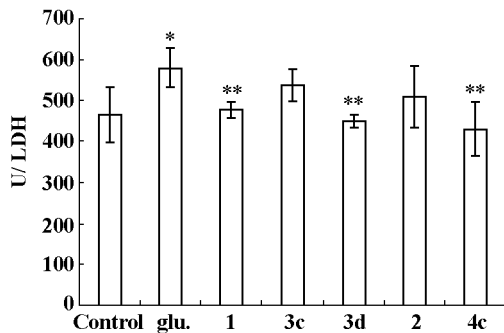


Figure 2 Leakage LDH activity. * *P* < 0.05 vs control group; ** *P* < 0.01 vs glutamate group

实验部分

熔点用 X₆ 型熔点仪测定,温度计未校正;质谱用 Autospec Ultima-Tof 型质谱仪测定;核磁共振氢

谱用 Varian Mercury-300 MHz 核磁共振仪测定(内标: TMS);酶标仪型号为 Diagnostic Pasteur LP400。

美金刚胺为本室合成,金刚烷胺及樟脑酰氯从百灵威公司购入,甲氧酰氯、异丙氧酰氯及其余试剂均为北京化学试剂公司产品,未经注明均为化学纯。

细胞试验所采用的 SY5Y 细胞株由瑞典卡罗琳斯卡研究所提供。MEM 培养基为 Gibco BRL, 41500-034 产品;谷氨酸 (*L*-glutamic acid)及 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)为 Sigma 产品;乳酸脱氢酶 (LDH)测定试剂盒为北京化工厂产品;HEPES 从 DNN Company 购得,胎牛血清从 Sigma 购得。

1 化合物 3a 的制备

将三乙胺 (0.24 mL, 1.7 mmol) 加入 **1** (300 mg, 1.67 mmol) 的 THF 溶液中,搅拌 10 min 后,冰水浴及 N₂ 保护下,向混合液中滴加氯甲酸甲酯 (1.67 mmol),室温搅拌 3 h。过滤反应液,THF 冲洗不溶物,合并滤液,蒸除溶剂,残留物用硅胶柱分离纯化,洗脱剂 (环己烷-乙酸乙酯 25:1) 冲洗,收集洗脱液

浓缩后得到目标物 0.37 g, 收率为 86%。

同法分别采用氯甲酸异丙酯或樟脑酰氯为试剂, 制备得到化合物 3b 和 3c, 收率分别为 84% 和 93%。

以金刚烷胺 (2) 为原料, 同法分别合成得到 4a, 4b 和 4c, 收率分别为 91%, 85% 和 90%。

2 化合物 3d 的制备

向 1 (350 mg, 1.95 mmol) 的 THF 溶液中加入 1,2-环氧丙烷 (230 mg, 4.0 mmol), 搅拌均匀后, 室温密闭搅拌, TLC 跟踪反应, 每隔 4 h 加入环氧丙烷 (0.11 g, 1.95 mmol) 至原料消失。减压蒸干反应液, 残余物加入氯仿溶解, 依次用氢氧化钠水、硫酸钠水溶液洗涤, 有机层经硫酸镁干燥后蒸除溶剂, 残留物用硅胶柱分离纯化得到 3d 黄色黏稠油状物 0.31 g, 收率为 67%。

3 谷氨酸损伤神经细胞的保护活性测定

3.1 细胞培养 人神经母细胞瘤株 SY5Y 培养于 MEM 培养基中, 加入 10% 胎牛血清、15 mmol·L⁻¹ HEPES、青霉素 100 u·mL⁻¹、链霉素 100 u·mL⁻¹, 于 5% CO₂, 37 °C 每周换液 2 次, 传代 1 次。

3.2 MTT 法测定神经细胞存活率 将 SY5Y 细胞以每毫升 1 × 10³ 个细胞接种于 96 孔板 (Costar 产品), 3 d 后分为正常对照组、谷氨酸 (50 μmol·L⁻¹) 损伤组和谷氨酸 (500 μmol·L⁻¹) 加浓度分别为 5, 10, 20, 30, 40, 50 和 60 μmol·L⁻¹ 各化合物组, 每组 8 孔。接种后 4 d 每孔加 MTT (5 g·L⁻¹) 20 μL, 37 °C 孵育 4 h, 吸出培养液, 每孔加 DMSO 200 μL, 振荡 10 min, 用酶标仪测定 550 nm 处吸收度, 并用 SPSS 软件作统计分析。

3.3 化合物对 SY5Y 细胞 LDH 漏出率的影响 将 SY5Y 细胞以每毫升 1 × 10³ 个细胞接种于 24 孔板, 3 d 后分组同 MTT 法, 每组 8 孔, 接种后 4 d 留取各组细胞培养液, LDH 测定试剂盒所示方法 (比色

法), 测定 450 nm 处吸收度, 计算乳酸脱氢酶活力, 并用 SPSS 软件作统计分析。

致谢: 体外神经细胞保护活性由首都医科大学宣武医院神经生化室完成; 中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所代测核磁共振氢谱和高分辨质谱。

References

- [1] Chawla PS, Kochar MS. What's new in clinical pharmacology and therapeutics [J]. Wisconsin Med J, 2006, 105: 24 - 29.
- [2] Zhang JT. Pathogenesis and therapeutic strategies of senior dementia [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2000, 35: 635 - 640.
- [3] Abdul M, Hoosein N. N-Methyl-D-aspartate receptor in human prostate cancer [J]. J Membr Biol, 2005, 205: 125 - 128.
- [4] Lees A. Alternatives to levodopa in the initial treatment of early Parkinson's disease [J]. Drugs Aging, 2005, 22: 731 - 740.
- [5] Mayke BH, Bert GDB, Douwe DB, et al. Brain penetration and *in vivo* recovery of NMDA receptor antagonists amantadine and memantine: a quantitative microdialysis study [J]. Pharm Res, 1999, 16: 637 - 642.
- [6] Gmiro VE, Serdyuk SE. Bis-ammonium adamantane derivatives novel modulators of polyamine binding sites [J]. Eksp Klin Farmakol, 2000, 63: 16 - 20.
- [7] Bloschakov KV, Kim KH, Potapjeva NN, et al. Design of antagonist for NMDA and AMPA receptor [J]. Neuropharmacology, 2005, 49: 144 - 166.
- [8] Wang R, Zhang JY, Ai HX, et al. Effect of APP-17 mer peptide on glutamate neurotoxicity [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2000, 16: 313 - 316.
- [9] Jantas-Skotniczna D, Kajta M, Lason W. Memantine attenuates staurosporine-induced activation of caspase-3 and LDH release in mouse primary neuronal cultures [J]. Brain Res, 2006, 1069: 145 - 153.