



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Marta López Querol

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS.

TESIS DOCTORAL

Dirigida por los Dres. Francesc X. Sureda y Jordi Mallol Mirón

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus
2010

Imagen de la portada exterior: células
granulares de cerebelo de rata *in vitro*.

| DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL | |
|---|--|
| Títol de la tesi doctoral Evaluación de la actividad antagonista glutamatérgica y neuroprotectora de nuevos compuestos policíclicos. | |
| Doctorand/a Marta López Querol | |
| Director(s)/es Francesc X. Sureda Batlle Jordi Mallol Mirón | Tutor/a (si s'escau) |
| Programa de doctorat Neurotoxicología y Psicofarmacología | |
| Departament Ciències Mèdiques Bàsiques | Grup de recerca Farmacobiologia Cel·lular |

| INFORME DEL DIRECTOR DE TESI | | |
|--|----|----|
| El(s) (co)directors sotasignats emeten el següent informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit | SI | NO |
| La tesi consisteix en un treball original de recerca | X | |
| El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi | X | |
| Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats | X | |
| La metodologia està descrita | X | |
| Hi consta el procediment | X | |
| Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos | X | |
| Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats | X | |
| La bibliografia està ben reflectida | X | |
| D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques: Duque MD, Camps P, Torres E, Valverde E, Sureda FX, López-Querol M, Camins A, Prathalingam SR, Kelly JM, Vázquez S. New oxapolycyclic cage amines with NMDA receptor antagonist and trypanocidal activities. Bioorg Med Chem. 2010; 18(1):46-57. Duque MD, Camps P, Profire L, Montaner S, Vázquez S, Sureda FX, Mallol J, López-Querol M, Naesens L, De Clercq E, Prathalingam SR, Kelly JM. Synthesis and pharmacological evaluation of (2-oxaadamant-1-yl)amines. Bioorg Med Chem. 2009; 17(8):3198-206. Camps P, Duque MD, Vázquez S, Naesens L, De Clercq E, Sureda FX, López-Querol M, Camins A, Pallàs M, Prathalingam SR, Kelly JM, Romero V, Ivorra D, Cortés D. Synthesis and pharmacological evaluation of several ring-contracted amantadine analogs. Bioorg Med Chem. 2008; 16(23):9925-36. Kolocouris A, Spearpoint P, Martin SR, Hay AJ, López-Querol M, Sureda FX, Padalko E, Neyts J, De Clercq E. Comparisons of the influenza virus A M2 channel binding affinities, anti-influenza virus potencies and NMDA antagonistic activities of 2-alkyl-2-aminoadamantanes and analogues. Bioorg Med Chem Lett. 2008; 18(23):6156-60 | | |
| Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi: | | |

I en conclusió, s'emet l'informe favorable per tal que es pugui portar a terme tràmit de lectura i posterior defensa pública.

Reus, 23 de setembre de 2010

Francesc X. Sureda
Director de la tesi

Jordi Mallol Mirón
Codirector

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol



FEM CONSTAR que aquest treball, titulat “Evaluación de la actividad antagonista glutamatérgica y neuroprotectora de nuevos compuestos policíclicos”, que presenta na Marta López Querol per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d’aquesta universitat.

Reus, a 27 de setembre de 2010

Els directors de la tesi doctoral

Dr. Jordi Mallol Mirón

Dr. Francesc X. Sureda Batlle

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

Publicaciones derivadas de esta tesis.

Artículos:

- Duque MD, Camps P, Profire L, Montaner S, Vázquez S, Sureda FX, Mallol J, López-Querol M, Naesens L, De Clercq E, Prathalingam S, Kelly J. *Synthesis and pharmacological evaluation of (2-oxadamant-1-yl) amines*. Bioorg.Med.Chem. 2009; 17(8):3198-3206.
- Duque MD, Camps P, Torres E, Valverde E, Sureda FX, López-Querol M, Camins A, Prathalingam S, Kelly J, Vázquez S. *New oxapolycyclic cage amines with NMDA receptor antagonist and trypanocidal activities*. Bioorg.Med.Chem. 2009.
- Camps P, Duque M, Vázquez S, Naesens L, De Clercq E, Sureda FX, López-Querol M, Camins A, Pallàs M, Prathalingam S, Kelly J, Romero V, Ivorra D, Cortés D. *Synthesis and pharmacological evaluation of several ring-contracted amantadine analogs*. Bioorg. Med. Chem. 2008; 16:9925-9936.
- Kolocouris A, Spearpint P, Martin S, Hay A, López-Querol M, Sureda F, Padalko E, Neyts J, De Clercq E. *Comparisons of the influenza virus A M2 channel binding affinities, anti-influenza virus potencies and NMDA antagonistic activities of 2-alkyl-2-aminoadamantanes and analogues*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008; 18:6156-6160.

Contribuciones a Congresos:

Autores: Sureda, F.X.; Duque, M.D.; López-Querol, M.; Camins, A.; Pallàs, M.; Camps, P.; Vázquez, S.

Título: Novel noradamantane amines with antagonist activity on glutamate receptors.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: VI Simposio de Neurobiología Experimental.

Lugar de celebración: Barcelona (España).

Año: 2006.

Autores: Duque, M.D.; Camps, P.; Vázquez, S.; López-Querol, M.; Mallol, J.; Sureda, F.X.

Título: New benzopolycyclic amines with NMDA receptor antagonist activity.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXII Reunión Bienal de Química Orgánica.

Lugar de celebración: Tarragona (España). *Año:* 2008.

Autores: Duque, M.D.; Camps, P.; Vázquez, S.; López-Querol, M.; Sureda, F.X.

Título: Synthesis of oxa-analogues of amantadine and memantine: pharmacological evaluation as NMDA receptor antagonists.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXII Reunión Bienal de Química Orgánica.

Lugar de celebración: Tarragona (España). *Año:* 2008.

Autores: López-Querol M, Duque MD, Camps P, Vázquez S, Camins A, Sureda FX.

Título: Nuevos compuestos con actividad antagonista sobre receptores NMDA. Estudios de neuroprotección *in vitro*.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XIII Congreso Sociedad española de neurociencia.

Lugar de celebración: Tarragona (España). *Año:* 2009.

Autores: López-Querol M, Kolocouris A, Pallàs M, Sureda FX.

Título: Evaluación de los efectos neurotoxicológicos de nuevos antivíricos con estructura de tipo adamantano.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XIII Congreso Sociedad española de neurociencia.

Lugar de celebración: Tarragona (España). *Año:* 2009.

Autores: López-Querol M, Sureda FX.

Título: NMDA antagonist activity and neuroprotection of new polycyclic compounds related to memantine and amantadine.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 7th FENS forum of european neuroscience.

Lugar de celebración: Amsterdam (The Netherlands). Año: 2010.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| AHP | Hiperpolarización posterior. |
| AMPA | α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato. |
| APOE | Apolipoproteína E. |
| APOJ | Apolipoproteína J. |
| APP | Proteína precursora de amiloide. |
| CA | Área <i>cornu ammonis</i> del hipocampo. |
| CREB | Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico. |
| CTD | Dominio intracelular. |
| DIV | Días <i>in vitro</i> . |
| EA | Enfermedad de Alzheimer. |
| EAAT | Transportador de aminoácidos excitadores (glutamato). |
| EH | Enfermedad de Huntington. |
| ELA | Esclerosis lateral amiotrófica. |
| EM | Esclerosis Múltiple. |
| EP | Enfermedad de Parkinson. |
| GDP | Guanosina-5'-difosfato. |
| GluA | Subunidades del receptor AMPA de glutamato. |
| GluK | Subunidades del receptor kainato de glutamato. |

| | |
|------------------------------|--|
| GTP | Guanosina-5'-trifosfato. |
| DIBAPS | Institut d'investigacions biomèdiques August Pi i Sunyer. |
| iGluR | Receptor ionotrópico de glutamato. |
| IL1β | Interleucina-1 beta. |
| iMAO | inhibidor de la monoamino oxidasa. |
| IT 15 | Gen asociado a la enfermedad de Huntington, conocido también como HTT. |
| LBD | Dominio de unión al ligando. |
| LTD | Depresión a largo plazo. |
| LTP | Potenciación a largo plazo. |
| MAO | Monoamino oxidasa. |
| mGluR | Receptor metabotrópico de glutamato. |
| MMCA | Bomba de calcio de la membrana mitocondrial. |
| MNCX | Intercambiador de Na ⁺ /Ca ²⁺ mitocondrial. |
| NCX | Intercambiador de Na ⁺ /Ca ²⁺ . |
| NMDA | N-metil-D-aspartato. |
| NO | Óxido nítrico. |
| NR | Subunidades del receptor NMDA de glutamato. |
| NTD | Dominio extracelular. |
| OECD | Organización para la cooperación y el desarrollo económico. |
| PCD | Muerte celular programada. |

| | |
|----------------------------------|---|
| PMCA | Bomba de calcio de la membrana plasmática. |
| PS | Presenilina. |
| QSAR | Quantitative structure activity-relationship. |
| rAMPA | Receptores glutamatérgicos tipo no-NMDA. |
| RE | Retículo endoplasmático. |
| rNMDA | Receptor glutamatérgico tipo NMDA. |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno. |
| RyR | Receptores de rianodina. |
| SAR | Structure activity-relationships. |
| SERCA | ATPasa de calcio del retículo sarco-endoplasmático. |
| SIDA | Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. |
| SNC | Sistema nervioso central. |
| SNS | Sistema nervioso simpático. |
| SOD | Superóxido dismutasa. |
| t_{1/2} | Tiempo de semivida. |
| TNFα | Factor de necrosis tumoral alfa. |
| VDCC | Canales de calcio dependientes de voltaje. |
| VGLUT | Transportador vesicular de glutamato. |
| $\Delta\Psi_m$ | Potencial de membrana mitocondrial. |

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

Resumen:

Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica (EA, EP, EH o ELA), entre otras, se caracterizan por la pérdida de poblaciones específicas de neuronas. Este proceso es multifactorial, y en él intervienen diferentes cascadas mediadoras de la muerte neuronal. La excitotoxicidad participa en este proceso, y se debe a una disfunción en la neurotransmisión glutamatérgica que produce una acumulación de glutamato en el espacio sináptico. Eso conlleva a una activación prolongada de los receptores glutamatérgicos que permite una entrada masiva de calcio al interior de la neurona, que finalmente causará la muerte celular. Este influjo de calcio está mediado principalmente por receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA que se caracterizan por una elevada permeabilidad a iones calcio y una cinética de activación lenta. Por eso, los antagonistas sobre receptores NMDA son una estrategia interesante para hacer frente a este tipo de trastornos de incidencia social y económica creciente en los últimos años. La memantina es el único antagonista de receptores NMDA aprobado para el tratamiento de la EA. En la actualidad existe un gran interés en la búsqueda de nuevos compuestos que mejoren las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de la memantina.

En este trabajo se han caracterizado tanto la actividad antagonista sobre receptores NMDA de diversos compuestos de nueva síntesis, como su capacidad neuroprotectora en cultivos de neuronas granulares de cerebelo de rata. Para el estudio funcional de la actividad antagonista sobre receptores NMDA, se ha determinado la concentración de calcio intracelular con la ayuda de una sonda fluorescente selectiva de Ca^{2+} (Fura-2). La actividad de los compuestos se ha evaluado frente a glutamato o NMDA, mediante la construcción de curvas concentración-respuesta inhibitorias que permitieron la definición de su potencia como antagonistas de los receptores NMDA. Asimismo, se ha evaluado la capacidad de algunos de estos compuestos

para evitar la muerte neuronal inducida por glutamato en cultivos de células granulares de cerebelo.

Debido a la similitud estructural de algunos de los compuestos evaluados con rasagilina, selegilina u otros inhibidores de la enzima monoaminooxidasa, se ha evaluado también este tipo de actividad farmacológica en una selección de los mismos.

Finalmente, se han llevado a cabo estudios de toxicidad aguda en algunos compuestos adamantánicos con la finalidad de establecer su perfil de seguridad para un posterior uso como antivíricos.

Todo ello ha permitido definir de manera más precisa el perfil de actividad de 127 compuestos investigacionales y establecer la posibilidad para un futuro desarrollo que permita la comercialización de nuevos fármacos neuroprotectores que puedan ser de ayuda en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, que requieren urgentemente de nuevas herramientas para su abordaje terapéutico.

Además, se concluye que los cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata son un excelente sustrato biológico para el screening de nuevos fármacos con actividad antagonista glutamatérgica.

AGRAÏMENTS.

M'agradaria agrair en primer lloc als directors d'aquesta tesi, el Dr. Jordi Mallol i, de manera especial, al Dr. Francesc X. Sureda per tota la dedicació, tots els ensenyaments donats al llarg d'aquests anys i pel recolzament tant dins com fora del laboratori. Per haver confiat en mi i haver-me donat l'oportunitat de treballar en un camp tant interessant com és la neurociència.

Voldria agrair també al Dr. Santiago Vázquez i el seu equip de la Unitat de Química Farmacèutica de la Universitat de Barcelona, el Dr. Antonios Kolocouris de la Unitat de Química Farmacèutica de la Universitat d'Atenes i a la Dra. Carmen Escolano i el seu equip de la Unitat de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona, per tots els compostos evaluats en la present Tesi Doctoral.

A la resta de la Unitat de Farmacologia, la Dra. Nogués i la Dra. Giralt, pels consells i experiència transmesos, a la Marta Romeu, la Vanesa i l'Anabel, per l'ajuda rebuda dins i fora del laboratori. La Dra. Ortín i la Dra. Vidal, per la seva ajuda en les classes d'infermeria. Al Dani, per les xerrades i consells.

A la Esperanza, per tota l'ajuda i les hores i experiències compartides des del primer moment, gràcies.

A la Sílvia, la Laura i la Mònica, per les hores de laboratori i de despatx, i el dia a dia compartit. I les últimes incorporacions, na Núria i el Nacho, amb qui juntament amb el Jordi hem gaudit de divertides i intenses xerrades.

A la Meri, la Tania, la Ingrid, la Diana, el Jose Gregorio, el Luís, la Roser, la Lolita, la Gemma, la Bea i la Is, pels cursos, els congressos, els sopars, les celebracions, els dinars diaris,...sense vosaltres això hauria sigut molt avorrit.

A la coordinadora del màster en salut mental, la Dra. Maria Teresa Colomina, per tota l'ajuda i orientacions lliurades en tots els àmbits.

Al Dr. Santafè, per encomanar passió i dinamitzar-nos amb els seminaris dels divendres, juntament amb la resta de la unitat d'histologia. I a la Marta Tomás, per les xerrades i companyonia.

Al personal de l'estabulari, l'Amparo, el Juan i l'Esperanza, per tota l'ajuda i ensenyaments en el tracte amb els animals, i per la feina feta tant en l'organització com en el manteniment dels animals en el dia a dia.

A la Montse Pallàs i la Imma, per tota l'ajuda en aquest món de la burocràcia universitària que tant bé coneixen i tant ens pot perdre als altres.

A la unitat de Lípids per facilitar-me l'accés al seu laboratori pels estudis d'inhibició de la MAO.

Als meus pares, sense vosaltres això no hauria sigut possible, gràcies als dos. Al meu germà, l'Oriol, i a l'Stéph, que sempre hi son quan els necessites, per tots al ànims i el suport incondicional.

Als amics, que heu aguantat mesos de *monotema*, i al Victor, per la paciència i els ànims, ja hi hem arribat p!.

ÍNDICE

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| 1. Introducción. | 3 |
| 1.1 Enfermedades neurodegenerativas. | 5 |
| 1.2 Neurotransmisión glutamatérgica. | 8 |
| 1.3 Receptores glutamatérgicos. | 12 |
| 1.3.1 Receptores metabotrópicos. | 13 |
| 1.3.2 Receptores ionotrópicos no-NMDA. | 14 |
| 1.3.3 Receptores ionotrópicos tipo NMDA. | 18 |
| 1.3.3.1 Estructura y subunidades de rNMDA. | 18 |
| 1.3.3.2 Función fisiológica de los rNMDA. | 24 |
| 1.4 Excitotoxicidad. | 27 |
| 1.4.1 Papel de los iones calcio en la excitotoxicidad. | 30 |
| 1.4.2 Papel de la mitocondria y retículo endoplasmático. | 32 |
| 1.4.3 Sistemas de regulación de los niveles de calcio citosólico. | 33 |
| 1.4.4 Muerte celular. | 33 |
| 1.5 Memantina como fármaco neuroprotector. | 38 |
| 1.5.1 Mecanismo de acción de la memantina. | 40 |
| 1.5.2 Otras características farmacológicas de la memantina. | 43 |
| 1.6 Compuestos evaluados en esta memoria. | 43 |
| 1.6.1 Compuestos del Dr. Vázquez y su equipo. | 44 |
| 1.6.2 Estructuras facilitadas por el Dr. Kolocouris (compuestos AK). | 47 |
| 1.6.3 Alcaloides derivados de la rincofilina. | 47 |
| 1.7 Desarrollo de nuevos fármacos. | 49 |
| 1.8 Actividad inhibidora de la MAO. | 52 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1.9 | Uso de modelos <i>in vitro</i> en el desarrollo de fármacos en neurociencias. | 55 |
| 1.10 | Modelos <i>in vitro</i> utilizados en el presente estudio. | 58 |
| 1.10.1 | Cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata. | 59 |
| 1.10.2 | Cultivos primarios de células hipocampales de ratón. | 61 |
| 1.10.3 | Cultivos primarios de células corticales de rata. | 62 |
| 1.10.4 | Línea celular SH-SY5Y. | 63 |
| 1.10.5 | Línea celular STHdh ^{Q7} y STHdh ^{Q111} . | 64 |
| 1.11 | Pruebas toxicológicas in vivo. | 65 |
| 2. | Hipótesis y objetivos. | 69 |
| 3. | Materiales y métodos. | 75 |
| 3.1 | Cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata. | 75 |
| 3.2 | Cultivos primarios de células hipocampales de embriones de 18 días (E18) de ratón. | 80 |
| 3.3 | Cultivos primarios de células corticales de embriones de 18 días (E18) de rata. | 83 |
| 3.4 | Mantenimiento y subcultivo de la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano. | 85 |
| 3.5 | Mantenimiento y subcultivo de la línea celular STHdh ^{Q7} (<i>wild-type</i>) y STHdh ^{Q111} (<i>mutada</i>). | 88 |
| 3.6 | Determinación del incremento de [Ca ²⁺] intracelular inducido por glutamato o NMDA. | 90 |
| 3.7 | Valoración de la neuroprotección de los distintos compuestos por cuantificación de viabilidad mediante el ensayo de MTT. | 94 |

| | |
|---|------------|
| 3.8 Determinación de la capacidad inhibidora de la MAO de compuestos de nueva síntesis. | 97 |
| 3.8.1 Preparación cruda mitocondrial de cerebro de ratón. | 98 |
| 3.8.2 Determinación de la proteína presente en la muestra. | 98 |
| 3.8.3 Determinación de la actividad inhibidora sobre la MAO. | 99 |
| 3.9 Valoración in vivo de la toxicidad de una selección de compuestos con actividad antivírica. | 101 |
| 4. Resultados y discusión. | 107 |
| 4.1 Experimentos realizados en cultivos de células granulares de cerebelo de rata. | 114 |
| 4.1.1 Caracterización farmacológica. | 115 |
| 4.1.2 Valoración de compuestos derivados de memantina y amantadina como inhibidores del incremento de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (inducido por glutamato y NMDA), y como neuroprotectores. | 119 |
| 4.1.2.1 Bisnoradamantos. | 119 |
| 4.1.2.1.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA. | 119 |
| 4.1.2.1.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad. | 123 |
| 4.1.2.2 Noradamantanos. | 128 |
| 4.1.2.2.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA. | 128 |
| 4.1.2.2.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad. | 131 |
| 4.1.2.3 Oxadamantanos. | 135 |
| 4.1.2.3.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA. | 135 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.2.3.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad. | 138 |
| 4.1.2.4 Benzohomooxadamantanos. | 143 |
| 4.1.2.4.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA. | 143 |
| 4.1.2.4.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad. | 147 |
| 4.1.2.5 Pentaciclos. | 151 |
| 4.1.2.5.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA. | 151 |
| 4.1.2.5.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad. | 155 |
| 4.1.2.6 Benzohomonoradamantanos. Compuestos ETC. | 158 |
| 4.1.2.6.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA. | 158 |
| 4.1.2.6.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad. | 161 |
| 4.1.2.7 Adamantanos. Compuestos RFP. | 163 |
| 4.1.2.7.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA. | 163 |
| 4.1.2.7.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad. | 165 |
| 4.1.2.8 Adamantanos. Compuestos AK. | 167 |
| 4.1.2.8.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA. | 167 |
| 4.1.2.9 Compuestos PF. | 173 |
| 4.1.2.9.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA. | 173 |
| 4.1.2.10 Discusión general de la evaluación de los compuestos. | 175 |
| 4.1.2.11 Estudios de la capacidad inhibidora de la MAO. | 182 |

| | |
|---|------------|
| 4.2 Experimentos realizados en cultivos de células hipocampales de ratón. | 184 |
| 4.3 Experimentos realizados en cultivos de células corticales de rata. | 188 |
| 4.4 Experimentos realizados con la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano. | 191 |
| 4.5 Experimentos realizados con la línea celular STHdh de células estriatales. | 193 |
| 4.6 Estudios de la toxicidad aguda de ciertos compuestos AK in vivo. | 195 |
| 5. Conclusiones. | 207 |
| 6. Bibliografía. | 213 |
| Anexos. | 235 |
| I. Estructura de todos los compuestos usados en este trabajo. | 235 |
| II. Descripción de los ítems de la Batería de Observación Funcional (FOB, del inglés) y sus valoraciones. | 247 |
| III. Modelo para la toma de datos en los experimentos <i>In Vivo</i> . | 253 |
| IV. Artículos derivados de esta Tesis. | 255 |
| Artículo 1 | 255 |
| Artículo 2 | 267 |
| Artículo 3 | 273 |
| Artículo 4 | 283 |

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

INTRODUCCIÓN

El aumento de la esperanza de vida al que hemos asistido en los países desarrollados durante las últimas décadas, ha producido un incremento destacable de la incidencia de trastornos relacionados con la edad como las enfermedades neurodegenerativas.

Una característica destacable de estas enfermedades es que se trata de trastornos crónicos y que los tratamientos existentes tan sólo ejercen un efecto paliativo y limitado, retrasando la aparición de la sintomatología como el declive cognitivo en casos de demencia (Donoso y Delgado, 2009; Daviglius y cols., 2010).

Actualmente en Europa se estima que hay unos 5 millones de personas afectadas de la principal forma de demencia, la enfermedad de Alzheimer (EA). Los datos epidemiológicos españoles disponibles estiman que entre 5-15% de la población mayor de 65 años sufren este trastorno. Debe considerarse que en 2005 la población española mayor de 65 años era de unas 7.3 millones de personas, pero para 2050 se prevé que sea de unos 16 millones (García y cols., 2001; Conduras y cols., 2010).

Actualmente la EA ya está considerada la tercera enfermedad destacada en términos de costes económicos y sociales en los países desarrollados, y de cuidados sanitarios tanto para los pacientes como para sus familias y cuidadores (Casado, 2000; Donoso y cols., 2001; Conduras y cols., 2010).

Este tipo de enfermedades son el resultado de múltiples factores entre los que se pueden destacar los medioambientales, los endógenos o los relacionados con la edad o la genética, si bien su mecanismo molecular no está descrito completamente (Jellinger, 2009).

El envejecimiento también es un proceso multifacético que se caracteriza por la presencia de diferentes déficits funcionales y estructurales (Smaili y cols., 2009).

4 | URV Introducción

Determinados procesos pueden ser comunes en estados patológicos y en procesos fisiológicos como el envejecimiento. En las enfermedades neurodegenerativas las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} contribuyen a la muerte celular. Asimismo, en el envejecimiento, la regulación de calcio se ve alterada (Foster, 2007; Smaili y cols., 2009), produciéndose en ambos casos la activación de cascadas intracelulares que ocasionarán la muerte neuronal, facilitando o potenciando la aparición de este tipo de dolencias. De hecho, existe un fino equilibrio entre dos procesos conflictivos, los mecanismos que permiten la entrada de Ca^{2+} fisiológica y aquellos que limitan el exceso de calcio intracelular para evitar los procesos neurodegenerativos. El desequilibrio entre ambos determina la viabilidad de la célula (Foster, 2007).

La neurodegeneración consiste en una desaparición progresiva de neuronas que está presente en distintas enfermedades como isquemia cerebral, EA, enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH) o Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), entre otras (Rowland y Merrit. Merritt's neurology. 2005).

Esta pérdida o muerte de neuronas puede ser iniciada por señales extrínsecas (ej. ambiente hostil) e intrínsecas (ej. mutaciones génicas). Pero a nivel molecular se cree que existen posibles desencadenantes como la excitotoxicidad y el incremento de calcio intracelular asociado, las alteraciones del metabolismo energético, el estrés oxidativo, o la acumulación de agregados proteicos. A finales del siglo pasado también se conoció la aparición de tumefacción y la activación glial durante la lesión excitotóxica (Dusart y cols., 1991; Marty y cols., 1991).

Esta activación astrocítica y microglial, libera varias especies químicas altamente reactivas como los radicales libres, la interleucina-1 beta ($\text{IL1}\beta$), el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) y el óxido nítrico (NO), que pueden contribuir al proceso de degeneración neuronal (Guimarães y cols., 2009; Love, 1999; Takahashi y cols., 2003).

Las enfermedades neurodegenerativas tradicionalmente se han definido como entidades clínico-patológicas, ahora clasificadas en

función de su mecanismo genético conocido y/o los principales componentes de sus depósitos proteicos (Jellinger, 2009).

Todas estas enfermedades tienen varios factores desencadenantes comunes en casi todas ellas, como los factores genéticos, que se han ido asociando a las distintas enfermedades neurodegenerativas durante los últimos años (Young, 2009).

1.1 Enfermedades neurodegenerativas.

Los trastornos neurodegenerativos agudos tienen una elevada incidencia en países desarrollados y constituyen la tercera causa más frecuente de muerte en Europa y Estados Unidos, por detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Guimarães y cols., 2009).

En la EA, la demencia más frecuente en países desarrollados (Guttmacher y Collins, 2003; Molinuevo y cols., 2005), se produce una pérdida difusa de neuronas siendo más evidente esta pérdida en las estructuras límbicas como el hipocampo y la amígdala, en cuerpos celulares y dendritas de neuronas glutamatérgicas en las capas III y IV de la neocorteza (Hynd y cols., 2004) y núcleos seleccionados del tronco del encéfalo.

La EP, que entre las afecciones neurodegenerativas del sistema nervioso central es la segunda en frecuencia, se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la población compacta de la sustancia nigra (Guttmacher y Collins, 2003), una población que se proyecta hacia las neuronas del núcleo caudado y el putamen.

La EH se caracteriza por la presencia de una atrofia profunda pero selectiva del núcleo caudado y el putamen, con cierta degeneración asociada de las cortezas frontal y temporal. Otra enfermedad neurodegenerativa con menor incidencia, pero no menos grave es la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) que se caracteriza por la degeneración lenta pero inexorable de las neuronas motoras alfa del

6 | URV Introducción

asta ventral de la médula espinal y el tronco del encéfalo (neuronas motoras inferiores), y finalmente las neuronas de la corteza motora (neuronas motoras superiores). En la tabla 1.1 se relacionan algunas de las características epidemiológicas, anatomopatológicas y genéticas de estos trastornos.

| Enfermedad | Prevalencia | Agregados | Genes |
|--------------------------------|-------------|--|--------------------------------------|
| De Parkinson | 1 millón | Cuerpos de Lewy | α -sinucleína, Parkin y UCHL1 |
| De Alzheimer | 4 millones | Placas seniles y ovillos neurofibrilares | PS1, PS2, ApoE y APP |
| De Huntington | 30000 | Inclusiones de huntingtina | IT IS |
| Esclerosis lateral amiotrófica | 20000 | Cuerpos de Bunina | SOD |

Tabla 1.1 Listado parcial de enfermedades neurodegenerativas, los genes con los que se han relacionado y su prevalencia en Estados Unidos (Shastry, 2003).

Actualmente se sabe que múltiples genes están asociados con EA, EP, EH o ELA. Por ejemplo en la EH se identificó en 1993 la mutación genética que subyacía en la enfermedad. Se trata de la expansión de un triplete de repetición (CAG) en el gen de la huntingtina, localizado en el cromosoma 4, en el primer exón que codifica para la proteína. Cuando el triplete que codifica para una glutamina (Q) se repite sobre unas 35 veces da lugar a la enfermedad y además, la longitud del tramo de poliglutaminas es inversamente proporcional a la edad de aparición de los síntomas; a más repeticiones más temprano aparece la enfermedad (Zuchner y Brundin, 2008; Young, 2009).

Ciertas formas de la EA se han relacionado con el gen para la proteína precursora de amiloide (APP) en el cromosoma 21, con el gen para presenilina 1 (PS1) en el cromosoma 14 o el de presenilina 2 (PS2), en el cromosoma 1. No obstante, estas mutaciones solo explican menos del 1% de los casos de EA. La gran mayoría de casos (principalmente para la

forma de inicio tardío) presentan un cuadro genético más complejo, viéndose implicado de forma importante el gen que codifica para apolipoproteína E (APOE) en el cromosoma 19. Más recientemente se han propuesto dos locus más, posiblemente asociados a una forma tardía de la enfermedad, uno en CLU también conocido como APOJ que codifica para la lipoproteína J, en el cromosoma 8 y el otro en CR1 que codifica para el receptor del complemento (3b/4b), en el cromosoma 1 (Lambert, 2009).

En el caso de EP o de ELA, también se han relacionado con diferentes genes, el de la proteína α -sinucleína y el de la proteína superóxido dismutasa, SOD, respectivamente (Young, 2009).

Aparte de los factores genéticos, también se han propuesto como posibles causas la acumulación de agregados de proteínas. Por ejemplo, en la EA se encuentran estos agregados intra- y extracelularmente, mientras que en EH, EP o ELA se caracterizan por agregados intraneuronales. Otros de los factores que se ven alterados en este tipo de enfermedades y con un papel central en ellas son la excitotoxicidad, el aumento de los niveles de estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, entre otros.

Uno de los más destacados y estudiados es la excitotoxicidad; la excitotoxicidad inducida por glutamato contribuye a gran número de trastornos cerebrales como isquemia, epilepsia, traumatismos craneoencefálicos, demencia asociada al SIDA y en enfermedades neurodegenerativas como EA (Hynd y cols., 2004), EP (Caudle y Zhang, 2009), EH (Estrada Sánchez y cols., 2007), ELA y posiblemente Esclerosis Múltiple (EM) (Young, 2009; Walton y Dodd, 2007; Dingledine y cols. 1999; Kalia y cols., 2008; Lau y Tymianski 2010). Para una mejor comprensión del proceso excitotóxico, a continuación se describen las principales características de la neurotransmisión mediada por glutamato.

1.2 Neurotransmisión glutamatérgica

El glutamato es el principal aminoácido neurotransmisor excitador del cerebro y se encuentra presente en el 70% de todas las sinapsis excitadoras.

Las neuronas glutamatérgicas comprenden alrededor del 80% de la población total de neuronas de la corteza cerebral (Guimarães y cols., 2009). Así, las neuronas glutamatérgicas forman el principal sistema excitador en el cerebro y tiene un papel fundamental en diversas funciones neurofisiológicas. El glutamato interviene en el aprendizaje, la memoria y la función cognitiva. También es un neurotransmisor clave en la percepción primaria. El efecto excitador del glutamato se ejerce a través de la activación de distintos receptores de membrana (Fig. 1.1) (Tanović y Alfaro, 2006; Molinuevo y cols., 2005).

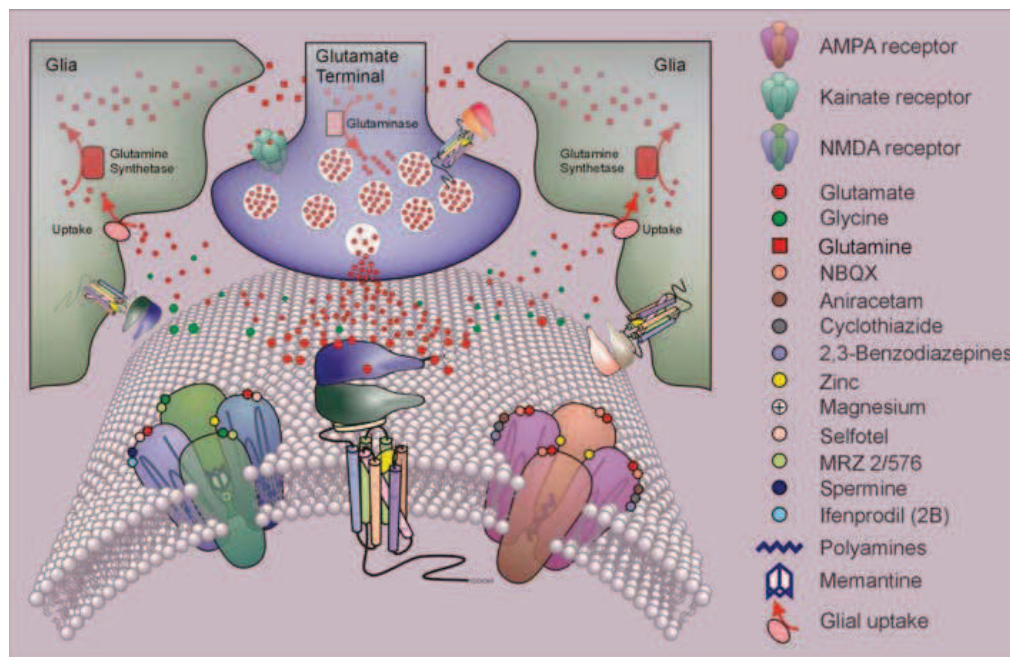


Fig. 1.1. En esta figura se muestra un terminal sináptico glutamatérgico con algunos de sus receptores y el ciclo de liberación y recaptación del glutamato. Extraído de <http://www.chrisparsons.de/Chris/glutamate.htm>

Para su normal funcionamiento fisiológico, la correcta homeostasis del glutamato es esencial y su disfunción o falta de control puede tener

consecuencias patológicas. La fuente principal de glutamato es la glutamina, que es transformada a glutamato por acción de la glutaminasa y se acumula en forma de vesículas en el terminal presináptico con la acción de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs).

El glutamato se libera de sus reservas en las vesículas sinápticas para actuar sobre sus receptores de membrana y con posterioridad es recaptado fundamentalmente por transportadores específicos (EAATs) presentes en la astroglia circundante (Salinska y cols., 2005) que lo metabolizan a glutamina, que es liberada al espacio extracelular y es recaptada por las neuronas que la convierten de nuevo en glutamato. La homeostasis de la neurotransmisión glutamatérgica depende de la actividad coordinada de estos diferentes componentes, y un fallo en alguno de ellos puede llevar al daño excitotóxico neuronal (Estrada Sánchez y cols., 2008).

Se han identificado molecularmente y caracterizado funcionalmente tres isoformas de transportadores de glutamato (vesículas presinápticas) VGLUT: VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3. VGLUT1 y VGLUT2 se expresan selectivamente en los terminales presinápticos, mientras VGLUT3 se expresa en el soma y las dendritas de neuronas glutamatérgicas y no glutamatérgicas, como también en astrocitos. Aproximadamente el 80% de la recaptación de glutamato vesicular se lleva a cabo por VGLUT1 en el sistema nervioso central adulto (Benarroch, 2010).

Esta recaptación de glutamato está dirigida por un gradiente electroquímico dependiente de protones a través de la membrana vesicular creado por una ATPasa de tipo vacuolar (Benarroch, 2010).

VGLUT1 y VGLUT2 son marcadores específicos de neuronas glutamatérgicas y los cambios en su expresión pueden indicar/reflejar la integridad de los terminales sinápticos en enfermedades neurodegenerativas (Benarroch, 2010).

10 | URV Introducción

Pasando del interior celular al espacio sináptico, la concentración extracelular de glutamato en la sinapsis está estrictamente controlada. La concentración intracelular de glutamato es alrededor de 10mM, mientras la concentración extracelular se mantiene en 1μM. El mantenimiento de las concentraciones de glutamato extracelular se lleva a cabo por transportadores de glutamato (EAAT) de alta afinidad dependientes de Na⁺ localizados en la membrana plasmática de neuronas y células gliales (Estrada Sánchez y cols., 2008; Shimamoto, 2008).

Se han descrito cinco subtipos de transportadores de glutamato. Inicialmente se identificaron los genes codificantes para los tres principales subtipos de transportadores de glutamato en ratones y conejos, y se nombraron GLAST, GLT-1 y EAAC1 (Walton y Dodd, 2007). Posteriormente se identificaron dos subtipos más en humano y se uniformó su nomenclatura a transportadores de aminoácidos excitadores 1-5 (EAAT1-5).

EAAT1 (GLAST) Y EAAT2 (GLT-1), dos transportadores gliales, son responsables de reclutar la mayor parte de glutamato y son críticos para el mantenimiento de la homeostasis de glutamato en el cerebro (Fig.1.2).

El glutamato se libera continuamente en condiciones basales por un mecanismo no vesicular. Las células gliales liberan glutamato mientras simultáneamente lo recaptan a través de los EAATs. La inhibición de los EAATs causa un incremento de la concentración de glutamato extracelular que puede resultar en una activación excesiva de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Los EAATs son responsables no solo de eliminar el neurotransmisor sino también de modular la transmisión sináptica (Shimamoto, 2008).

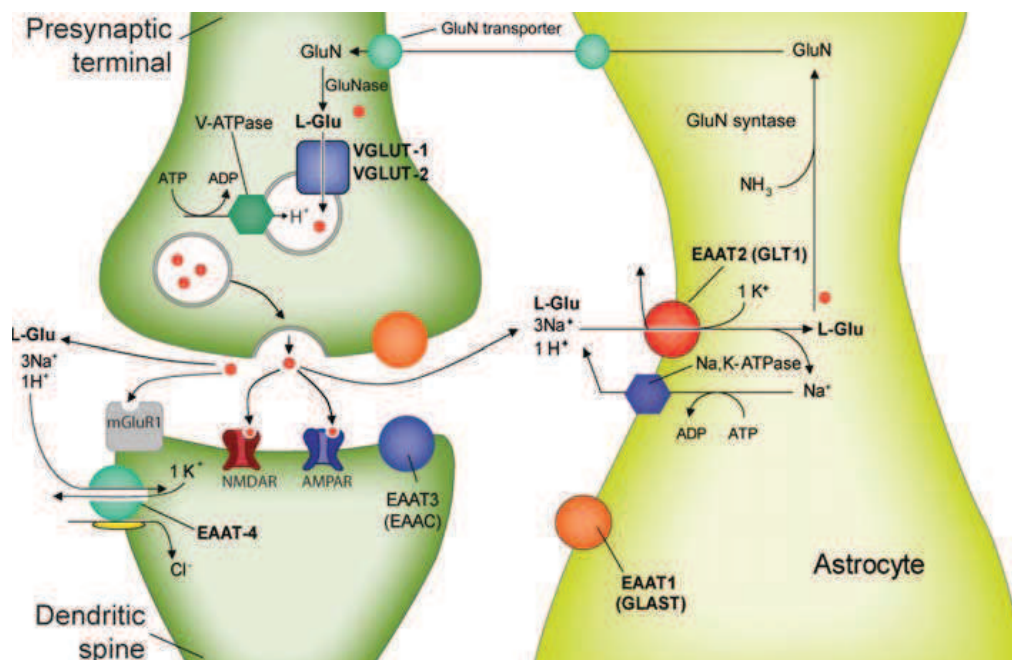


Fig. 1.2. Esquema del mecanismo de homeostasis del glutamato y sus transportadores (Wang y cols. 2010).

Un EAAT funcional consiste en tres subunidades idénticas que están acopladas funcionalmente a una ATPasa de Na^+ , K^+ como parte del mismo complejo macromolecular. Los EAATs operan a través de un mecanismo de acceso alternativo, la traslocación de una molécula de glutamato está acoplada con el co-transporte hacia el interior celular de 3 iones de Na^+ y un ion H^+ , mientras extrae un ión K^+ (Benarroch, 2010; Estrada Sánchez y cols., 2008; Shimamoto y cols., 2008; Walton y Dodd, 2007).

En condiciones patológicas se pueden producir fallos en la actividad de estas proteínas. Errores en la actividad de estos transportadores o la inversión de los mismos puede ser provocada por déficit energético o por desequilibrio en el gradiente de Na^+ .

Por todo esto, los EAATs y VGLUTs son esenciales para el mantenimiento y modulación de la transmisión sináptica excitadora y determina la evolución de la activación de los receptores glutamatérgicos (Benarroch, 2010; Shimamoto, 2008).

La estimulación sostenida de estos receptores glutamatergicos conlleva la despolarización neuronal continuada y la aparición de flujos iónicos que iniciarán los mecanismos del daño neuronal (Salinska y cols., 2005).

1.3 Receptores glutamatergicos.

Los receptores glutamatergicos se dividen en dos grandes familias (Fig. 1.3), los receptores asociados a proteínas G o metabotrópicos, **mGluRs**, y los canales iónicos activados por ligandos o receptores ionotrópicos, **iGluRs**.

Por lo que se refiere a los receptores metabotrópicos se conocen ocho subtipos y han sido clasificados en tres grupos distintos: mGluRs grupo I (mGluR1 y mGluR5) que estimulan la hidrólisis de fosfatidilinositoles y la liberación de calcio intracelular, mGluRs grupo II (mGluR2 y mGluR3) y mGluRs grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8), que inhiben la formación de AMPc (Villmann y Becker, 2007; Salinska y cols., 2005).

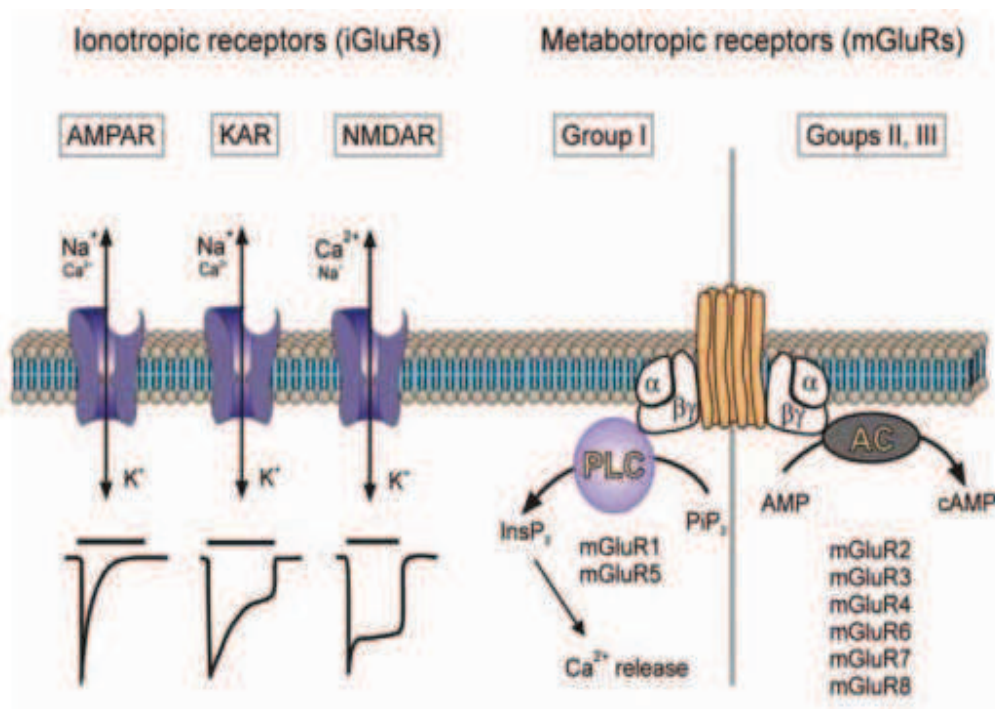


Fig. 1.3. Los receptores de glutamato. (VerKhratsky y Kirchhoff, 2007).

El grupo de los receptores ionotrópicos comprende tres principales tipos farmacológicos que incluyen los receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato) y Kainato (ácido kaínico), también llamados receptores no-NMDA; y los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), denominados así por los agonistas que los activan específicamente (Villmann y Becker, 2007; Huggins y Grant, 2004).

1.3.1. Receptores metabotrópicos.

Los **receptores metabotrópicos** de glutamato pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Proteínas unidas a membrana que se activan por ligandos extracelulares como péptidos, neurotransmisores o luz, y transducen señales intracelulares a través de dichas proteínas lo que permite la modulación de la función de diversas moléculas efectoras como enzimas, canales iónicos o factores de transcripción (Niswender y Conn, 2010).

Estructuralmente, los receptores metabotrópicos contienen un dominio transmembrana con 7 hélices transmembrana, un dominio amino terminal más largo que otros receptores metabotrópicos y un dominio C-terminal intracelular (Fig. 1.4). Este gran dominio N-terminal contiene

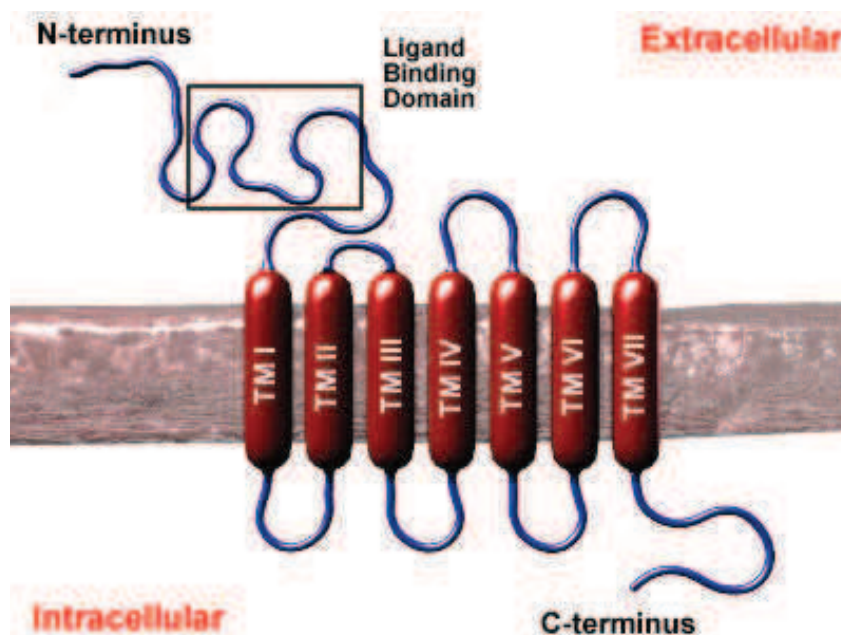


Fig. 1.4. Estructura básica de los receptores metabotrópicos de glutamato.

14 | URV Introducción

el lugar de unión a glutamato.

Parece que estos receptores trabajan principalmente en forma de dímeros y cuando el agonista se une al receptor, produce el cambio conformacional que activa las proteínas G intracelulares (Brock y cols., 2007; Niswender y Conn, 2010).

El *splicing* alternativo da lugar a diversos subtipos de receptores mGlu, en muchos casos con variaciones en el dominio C-terminal. Por ejemplo, se conocen cinco isoformas del subtipo mGluR7 (mGluR7a-e), tres isoformas de mGlu8 (mGlu8a-c) o cuatro isoformas para mGlu1 (mGlu1a-d). Estos receptores están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central. Los receptores del grupo I se distribuyen por todo el cerebro principalmente en el cerebelo, tálamo e hipocampo. Los receptores del grupo II se reparten ampliamente por el córtex cerebral y particularmente en el cerebelo. Finalmente los receptores del grupo III se encuentran más restringidos a nivel espacial; mGlu4 se encuentra principalmente en las células granulares del cerebelo, mGlu7, más disperso, se ha encontrado en la región CA1 y el giro dentado del hipocampo, el bulbo olfatorio, cuerda espinal y tálamo; por último, mGlu8 todavía tiene una distribución más restringida encontrándose en el córtex, cerebelo y bulbo olfatorio (Ferraguti y Shigemoto, 2006; Niswender y Conn, 2010).

1.3.2 Receptores ionotrópicos no-NMDA.

Como se ha comentado, los receptores llamados no-NMDA comprenden los receptores AMPA y los receptores kainato.

Los **receptores AMPA** median la neurotransmisión excitadora rápida en la mayoría de sinapsis en el sistema nervioso central. Están compuestos por cuatro subunidades llamadas GluA1-4 que tienen un tamaño similar y una homología de secuencia entre ellas de un 70% (Ozawa y cols., 1998).

Cada subunidad existe en dos formas distintas, la forma Flip y la forma Flop, generadas por *splicing* alternativo de una región de 115 pb que precede a la hélice transmembrana M4 (Fig. 1.5).

Parece que en los cerebros embrionarios se expresa predominantemente la forma Flip, mientras que la forma Flop tiene una baja expresión antes de los 8 días postnatales y va aumentando gradualmente (Monyer y cols., 1991; Ozawa y cols., 1998).

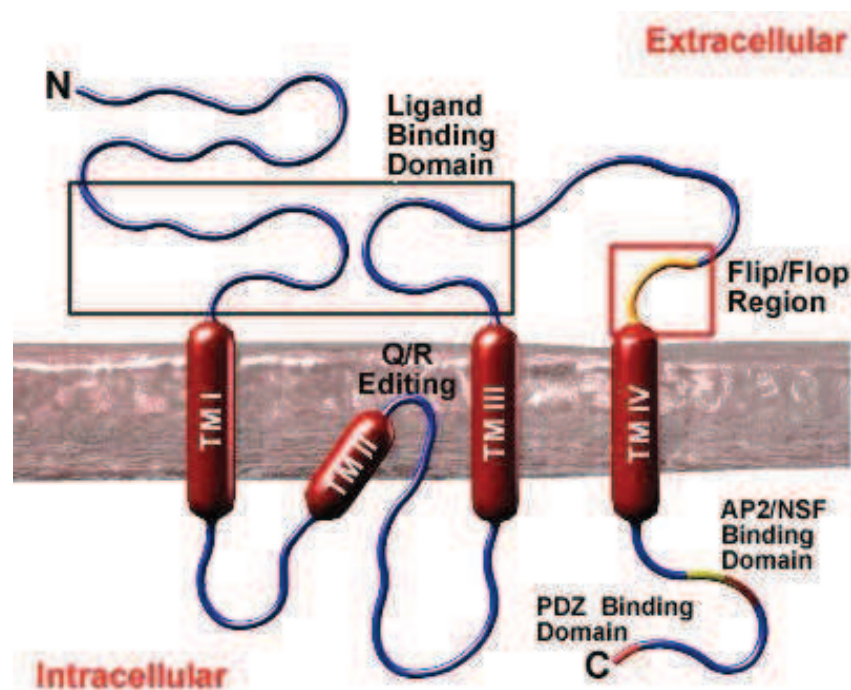


Fig. 1.5. Estructura básica de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA.

Los receptores AMPA nativos son impermeables a calcio y esta función está controlada por modificaciones post-transcripcionales de la subunidad GluA2. Se produce el cambio de un solo aminoácido en la región de M2 de glutamina (Q) por arginina (R), dando lugar a subunidades GluA2(Q) permeables a iones calcio y subunidades GluA2(R) que no lo son. Esta zona es conocida como lugar de editaje Q/R y la mayoría de receptores AMPA expresados en el sistema

16 | URV Introducción

nervioso central contienen la subunidad GluA(R) (Fig. 1.5) (Ozawa y cols., 1998; Dingledine y cols., 1999).

Los tipos de subunidades que forma cada receptor determinan sus propiedades biofísicas y sensibilidad farmacológica; y se expresan ampliamente por el sistema nervioso central. GluA1, GluA2 y GluA3 se encuentran de manera abundante en la capa de células piramidales y el giro dentado. GluA4 tiene una expresión bastante menor, pero con una presencia relativamente más alta en CA1 y giro dentado que en CA3 y CA4. En el córtex la expresión de GluA1, GluA3 y GluA4 varía en función de la capa, mientras que GluA2 se encuentra uniformemente distribuido por las diferentes capas. En el cerebelo, GluA1 y GluA3 se expresan preferentemente en células de Purkinje, GluA4 lo hace principalmente en células granulares, mientras que GluA2 se expresa abundantemente tanto en células de Purkinje como en células granulares (Ozawa y cols., 1998).

Los canales asociados a los receptores AMPA se consideran permeables sólo a iones Na^+ y iones K^+ y casi impermeable a iones Ca^{2+} en neuronas del SNC (Iino y cols., 1990; Ozawa y cols., 1998).

Los **receptores kainato** comparten gran parte de su estructura con los otros receptores ionotrópicos. También se trata de proteínas multiméricas formadas por diversas subunidades ensambladas. Se conocen cinco subunidades distintas actualmente llamadas GluK1, GluK2, GluK3 (conocidas anteriormente como GluR5-7), GluK4 y GluK5 (conocidas como KA1 y KA2). Cada subunidad contiene un dominio N-terminal, un dominio transmembrana con un giro entre las hélices M3 y M4 que forma el canal del receptor, y un dominio C-terminal (Fig. 1.6). Las variantes de splicing y los lugares de modificaciones post-transcripcionales presentes en los receptores kainato incrementan la heterogeneidad farmacológica de estos receptores (Fig. 1.7). (Jane D y cols., 2008; Ozawa S y cols., 1998; Dingledine R y cols., 1999).

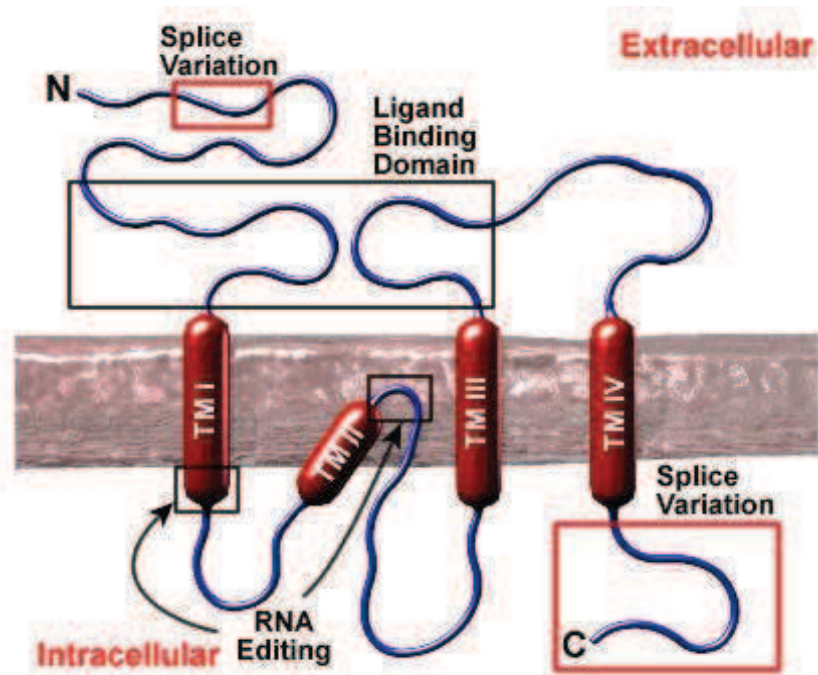


Fig. 1.6. Estructura básica de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo kainato.

Para que estos receptores sean funcionales parece que deben contener alguna de las subunidades GluK1 y GluK2. Las subunidades GluK3, GluK4 y GluK5 por sí solas no dan lugar a receptores con plena funcionalidad (Ozawa y cols., 1998).

Los receptores kainato son relativamente abundantes en todo el SNC, pero en áreas como la región CA3 del hipocampo y la capa granular del cerebelo su expresión es mayor (Ozawa y cols., 1998).

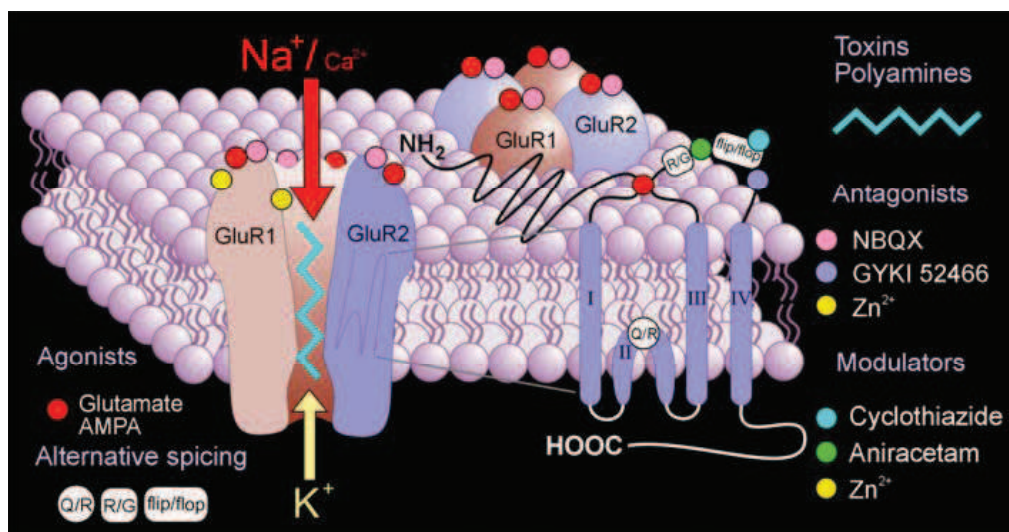


Fig. 1.7. Lugares de unión y posibles moduladores de los receptores no NMDA.

1.3.3 Receptores ionotrópicos tipo NMDA.

Los receptores NMDA (rNMDA), están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, y en función de su composición pueden presentar diferentes propiedades fisiológicas y farmacológicas (Doraiswamy, 2003).

En general, muestran una cinética de activación lenta y una permeabilidad a iones calcio (Ca^{2+}) muy elevada. Además, sufren una característica particular como es el bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje. La dependencia de voltaje significa que tras la despolarización neuronal, este bloqueo desaparece. En reposo, los iones Mg^{2+} bloquean el canal iónico del rNMDA. Bajo condiciones despolarizantes y en presencia de glutamato (agonista) y glicina (coagonista), los iones Mg^{2+} salen del canal permitiendo el influjo de Ca^{2+} . Esta característica hace que el rNMDA sea ideal para mediar determinados procesos fisiológicos como la plasticidad neuronal. Pero bajo ciertas condiciones, como tras una despolarización prolongada, la falta de bloqueo por magnesio puede mantenerse durante un intervalo de tiempo excesivo permitiendo un influjo masivo de iones Ca^{2+} (Doraiswamy, 2003).

1.3.3.1 Estructura y subunidades del rNMDA.

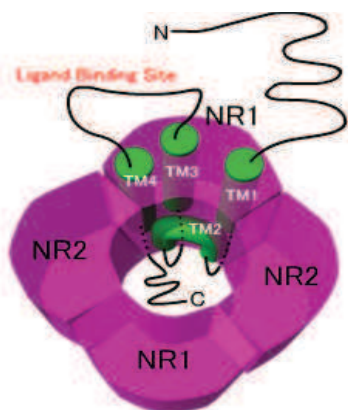


Fig. 1.8. Estructura del canal del receptor NMDA.

Los miembros de la familia de los receptores de NMDA comparten una estructura proteica común. Su estructura es de dímero de dimeros (Fig. 1.8.), formado por cuatro subunidades ensambladas que constituyen un canal a través de la membrana. Esta estructura multimérica está compuesta por tres tipos distintos de subunidades: NR1, NR2 y NR3, y la combinación de las distintas subunidades es la que determina las propiedades de cada

receptor, de forma similar a lo que sucede en los otros receptores ionotrópicos de glutamato (Huggins y Grant, 2004; Villmann y Becker, 2007).

Cada subunidad del receptor está organizada en 4 dominios funcionales. En la figura 1.9.A se muestra la secuencia lineal de una subunidad de rNMDA, mientras en la figura 1.9.B se puede observar un modelo de distribución de los dominios de una subunidad del rNMDA en membrana

Cada subunidad de rNMDA consta de un *dominio extracelular* situado en el terminal amino (NTD, del inglés N-terminal domain) que contiene péptidos señales que aseguran su localización extracelular, como otros canales iónicos activados por ligando; un *dominio de unión al ligando* (LBD, del inglés ligand-binding domain) formado por el lóbulo S1 situado entre el NTD y M1, y el otro lóbulo S2, que en la secuencia se encuentra entre M3 y M4. En la intersección de ambos lóbulos en el lado extracelular, se encuentra el dominio de unión a los agonistas, glutamato si el subtipo es NR2 y glicina en el NR1 (Fig. 1.9.C).

El *dominio transmembrana* está formado por las α -hélices M1, M3 y M4, y una región que no sobresale al lado exterior (M2). M2 y M3 forman el filtro selectivo del poro. Finalmente el *dominio intracelular* situado en el terminal carboxilo (CTD, del inglés C-terminal domain) media las interacciones sinápticas proteína-proteína y es determinante en la movilización y la renovación de los receptores (Villmann y Becker, 2007).

La homología que presenta el NTD de estas subunidades con el dominio de unión de los receptores metabotrópicos glutamatérgicos, sugiere que éste puede formar una estructura de unión al ligando diferente del dominio de unión al agonista que forman los segmentos S1-S2, como se puede ver en la figura 1.9. (Hollmann y cols., 1989; Keinaren y cols., 1990; Roche y cols., 1994; Taverna y cols., 1994; Paoletti y Neyton, 2007; Kristiansen y cols., 2007; Wollmouth y Sobolevsky, 2004; Spedding y cols., 2003).

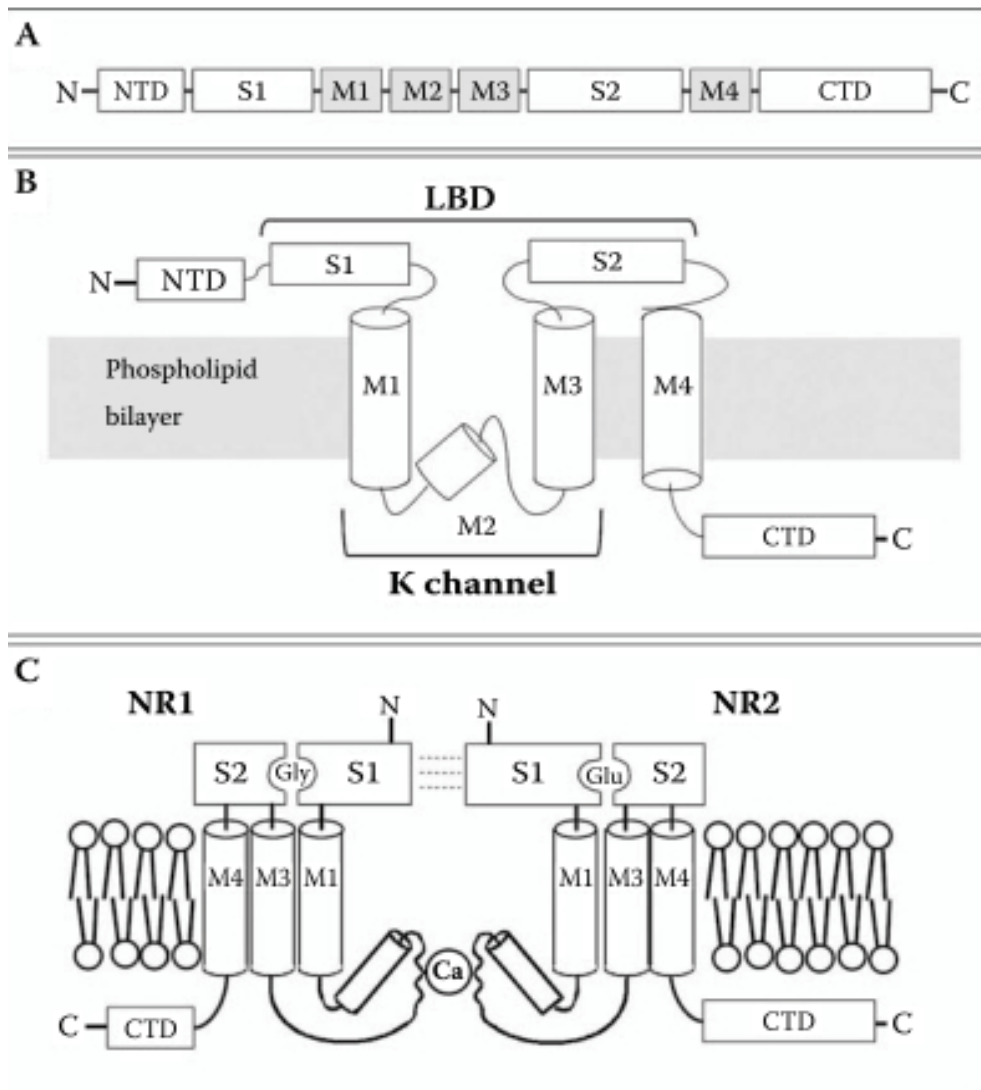


Fig. 1.9. Estructura de los dominios del rNMDA. **A** Secuencia lineal de los aminoácidos de las subunidades de los rNMDA: cuatro dominios hidrofóbicos (M1-M4), dos dominios de unión al ligando (S1 y S2), y los dominios amino y carboxi terminales (NTD y CTD). **B:** Modelo de distribución en membrana de una subunidad del rNMDA. **C:** Modelo de distribución en membrana de dos subunidades, NR1 que une glicina en el lugar de unión al ligando y NR2 que une glutamato (Blanke y VanDongen, 2009).

En la figura 1.10 se detallan algunos de los lugares de unión de distintas moléculas agonistas, antagonistas y moduladores sobre estos receptores.

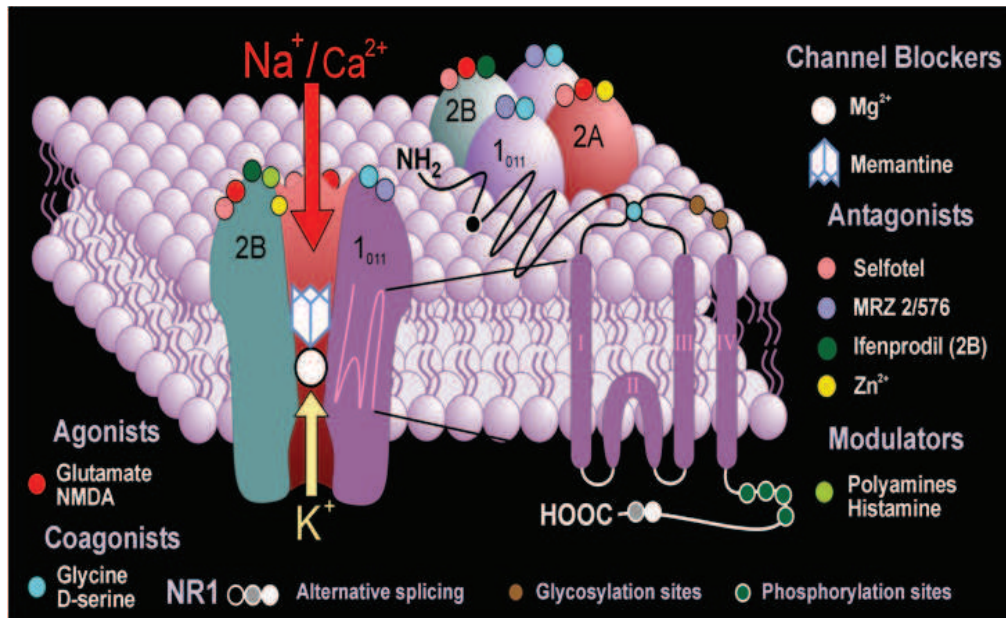


Fig. 1.10. Distintos lugares de unión que presenta el receptor NMDA y vista del bucle transmembrana. (Parsons y cols., 2007).

Además de los cuatro dominios bien definidos y los lugares de unión identificados, se han identificado otros hipotéticos lugares de unión en los que determinados ligandos extracelulares podrían modular la actividad del rNMDA (Fig. 1.11).

También en la región N-terminal se pueden unir diversos posibles moduladores alostéricos (Zn²⁺, H⁺, poliaminas como espermina y espermidina (site 1, Fig. 1.11).

El espacio entre lóbulos del dominio de unión al agonista podría ser otro lugar de unión de moduladores alostéricos (site 3, Fig. 11), como lo es en el caso de los receptores AMPA donde se unen moduladores alostéricos positivos como ciclotiazida y aniracetam.

Otra región que puede ser modulada es la que conecta el dominio de unión al agonista a la región transmembrana. También en los rAMPA esta región forma un lugar de unión para antagonistas no competitivos selectivos de los rAMPA (site 4, Fig. 1.11) (Paoletti y Neyton, 2007; Furukawa y cols., 2005; Jin y cols., 2005; Balannik y cols., 2005).

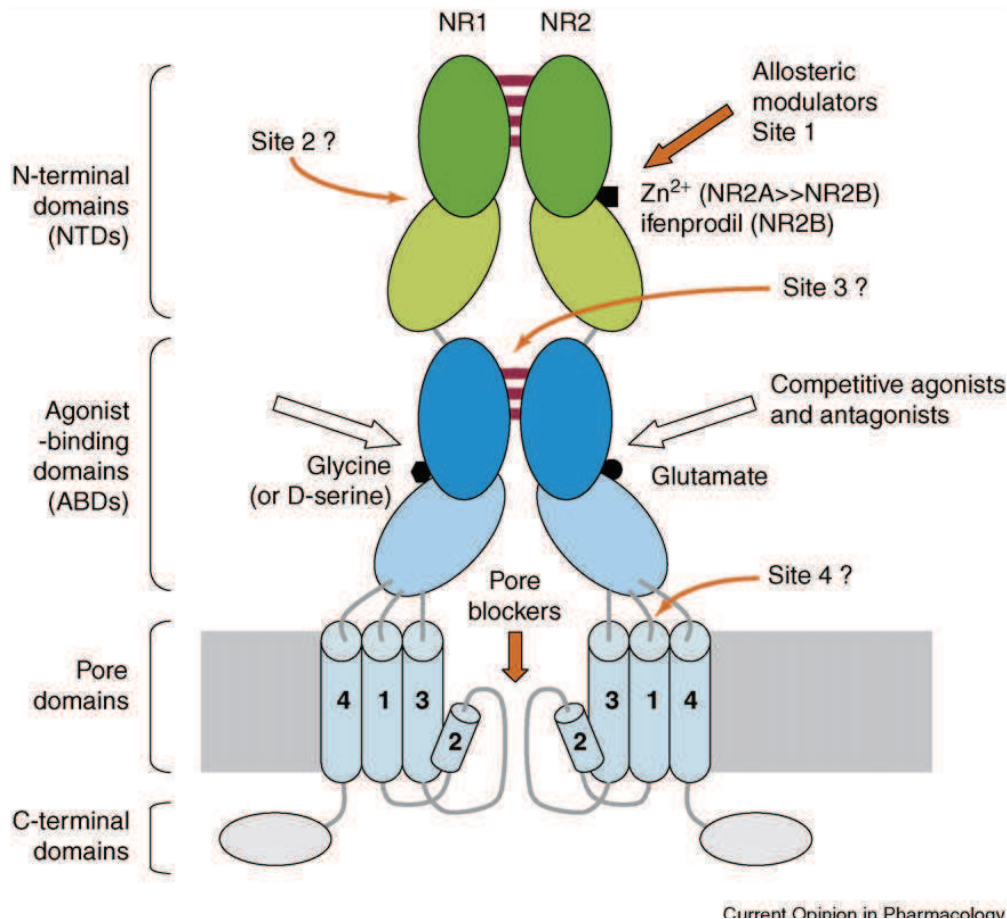


Fig. 1.11. Lugares de unión hipotéticos para los moduladores de los rNMDA (Paoletti y Neyton, 2007).

Se considera que los rNMDA contienen dos subunidades NR1 obligatorias, que unen glicina, y dos subunidades reguladoras que pueden ser NR2A → D o NR3A → B, que unen glutamato. La subunidad inhibitoria NR3, que también une glicina, puede sustituir en ciertos casos una o dos de las subunidades NR2, dando lugar a un receptor activado por glicina (Huggins y Grant, 2004; Villmann y Becker, 2007; Kashiwagi y cols., 2002).

Los genes que codifican para estas subunidades fueron identificados hace tan solo un par de décadas, y consisten en GR1N1 para NR1, GR1N2A, GR1N2B, GR1N2C y GR1N2D para NR2 y GR1N3A y GR1N3B para NR3 (Kalia, 2008). De todas formas a través del “*splicing alternativo*” pueden generarse variaciones de las diferentes subunidades, de manera que se aumenta la variabilidad funcional de estos receptores.

Con la ayuda de diferentes técnicas como la utilización de radioligandos o la hibridación *in situ*, se ha podido observar la distribución de los receptores NMDA en el sistema nervioso central. Se ha observado que estos receptores están distribuidos ampliamente por el sistema nervioso central, pero los niveles más altos se han encontrado en la región CA1 del hipocampo. En roedores adultos la subunidad NR1 se encuentra presente en todo el cerebro. Los diferentes transcritos de la subunidad NR2 (A-D) presentan distribuciones diferentes entre ellas. NR2A está distribuido de manera amplia por el cerebro, pero tiene mayor presencia en el córtex cerebral, hipocampo y cerebelo. La subunidad tipo NR2B tiene una distribución más restringida y principalmente se encuentra en el córtex cerebral, hipocampo, séptum, caudado-putamen y bulbo olfatorio. NR2C se expresa principalmente en la capa de células granulares del cerebelo y NR2D se ha localizado en el tálamo y el bulbo olfatorio (Monyer y cols., 1994; Ozawa y cols., 1998).

Además las subunidades parecen variar su expresión a lo largo del desarrollo. Sobre todo es la subunidad NR2 la que presenta mayor variación. NR2B y NR2D se expresan en el estadio prenatal, mientras las subunidades NR2A y NR2C se expresan tras el nacimiento. Durante la primera semana postnatal la expresión de NR2A va aumentando e intercambiándose por la expresión de la subunidad NR2B. Por otro lado, la expresión de la subunidad NR3A disminuye drásticamente después de la segunda semana postnatal, mientras la expresión de NR3B persiste en la edad adulta. NR3B se expresa principalmente en motoneuronas y en cambio NR3A lo hace de manera más amplia (Sheng y cols., 1994; Nishi y cols., 2001; Villmann y Becker, 2007).

1.3.3.2 Función fisiológica de los rNMDA.

Como se ha comentado en el apartado 1.3.3, los rNMDA tienen ciertas características que los hacen idóneos para participar en los mecanismos que subyacen en la plasticidad sináptica y así desarrollar un papel relevante en procesos de aprendizaje y memoria.

Es ampliamente aceptado que la memoria depende de cambios en la eficiencia sináptica que permiten la potenciación de asociaciones de neuronas. Ramón y Cajal S, hipotetizó originalmente que el almacenamiento de información recaía en cambios en la fuerza de las conexiones entre neuronas activas (Ramón y Cajal, 1913). Hebb y posteriormente Bliss y Lomo en 1973 confirmaron esta hipótesis con la primera descripción de la potenciación a largo plazo (LTP), en la que trenes de estimulaciones de alta frecuencia causaban un reforzamiento de la eficiencia en la transmisión sináptica en células granulares del giro dentado (Lynch, 2004).

Posteriormente se identificó el papel de los rNMDA en este proceso. Inicialmente se observó que un antagonista de los rNMDA como el ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico inhibía la LTP en CA1, lo que combinado con el conocimiento de las características de estos receptores (Tabla 1.2) permitió establecer que la mayoría de sinapsis que llevan a cabo la LTP lo hacen de manera dependiente de rNMDA

Participación en la LTP y memoria/aprendizaje.

Los antagonistas NMDA inhiben la LTP y el aprendizaje espacial (Collingridge y cols., 1983; Morris y cols., 1990).

Disfunción de NR2B lleva a una LTP atenuada (Kutsuwada y cols., 1996).

La disfunción de NR2A lleva a una LTP atenuada y empeora el aprendizaje espacial (Kiyama y cols., 1998).

La sobreexpresión de NR2B potencia la LTP y el aprendizaje espacial (Tang y cols., 1999).

Tabla 1.2 Listado parcial de publicaciones referentes del papel de los rNMDA en el proceso de LTP.

aunque su activación no es suficiente para la inducción de la LTP. Lo que sí es suficiente y necesario para la inducción de la LTP en el hipocampo, es un incremento de la concentración de calcio postsináptico (Ascher y Nowak, 1986; Bliss y Collingridge, 1993).

La fuerza sináptica puede también ser alterada en cualquier dirección si un solo estímulo sináptico se acopla con una despolarización post-sináptica, dando lugar a una LTP heterosináptica que se ha propuesto como modelo para la memoria asociativa (Bear y Malenka, 1994).

El modelo fisiológico (Fig. 1.12) relaciona la alteración del umbral de la plasticidad sináptica a un cambio en la fuente de Ca^{2+} . Un aumento moderado de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y de las reservas intracelulares favorece la inducción de la depresión a largo plazo (LTD). Además, el aumento de Ca^{2+} potencia la hiperpolarización posterior (AHP), la hiperpolarización inhibe la activación de los receptores NMDA comportando un incremento del umbral de la potenciación a largo plazo (LTP). Un cambio en el equilibrio de LTD/LTP conlleva una disminución de la transmisión sináptica (Foster, 2007).

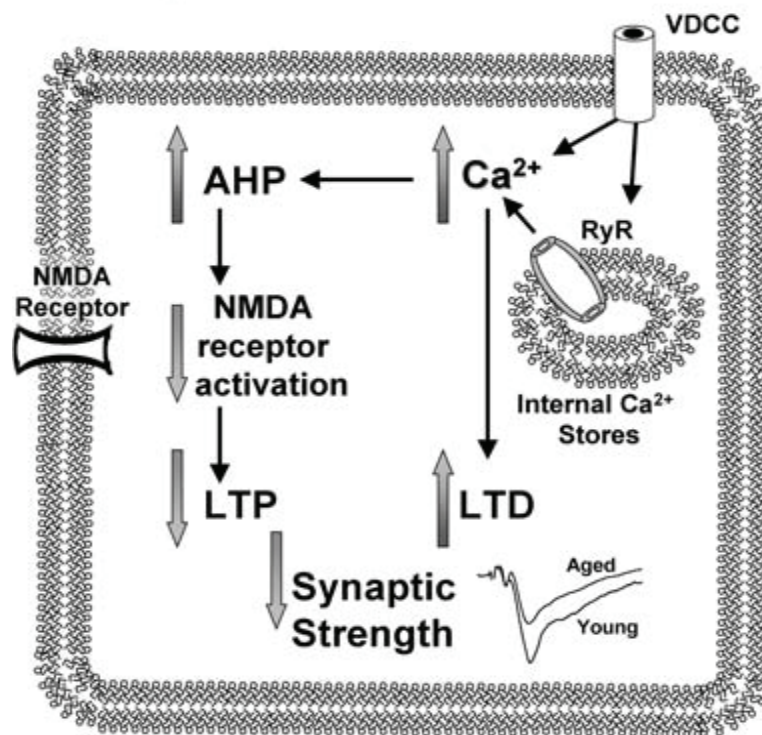


Fig. 1.12. Modelo para los diferentes efectos producidos en función de la fuente de iones calcio (Foster, 2007).

Introducción

Una vez aceptada ampliamente la participación de los rNMDA en estos dos fenómenos, se ha observado que la localización de estos receptores también parece afectar a su actividad y efectos (Wenzel y cols., 1997; Sans y cols., 2000). Se han identificado rNMDA sinápticos, perisinápticos y extrasinápticos que presentan respuestas diferentes entre ellos. Por ejemplo, el influjo de iones calcio dependiente de una intensa activación de rNMDA sinápticos es bien tolerada por las células, mientras que una activación equivalente de rNMDA extrasinápticos solos o con la activación simultánea de los sinápticos es peor tolerada por las células y puede desencadenar la muerte neuronal (Lynch y Guttman, 2002; Al-Hallaq y cols., 2008; Soriano y cols., 2006).

También se ha observado que en función de la localización de los receptores activados, pueden variar las vías de señalización intracelular. La activación de rNMDA sinápticos parece inducir la expresión de genes dependiente de CREB (del inglés, cAMP-responsive element-binding protein) como el gen de BDNF, mientras que la activación de rNMDA extrasinápticos parece inhibirla. Algo parecido ocurre con la activación de la vía de ERK y Ras; los rNMDA sinápticos parecen activar la vía de Ras y ERK mientras los rNMDA extrasinápticos parecen favorecer la inactivación de la misma. Por otro lado, sólo la activación de rNMDA sinápticos es capaz de activar sostenidamente la vía de PI3K/AKT (Hardingham y cols., 2002; Sala y cols., 2000; Hardingham y Bading, 2002; Ivanov y cols., 2006; Papadia y cols., 2008; Hardingham, 2009; Vanhoutte y Bading, 2003).

En general se observa una mayor densidad de rNMDA sinápticos que extrasinápticos y además la composición de estos receptores parece ser diferente según la localización del rNMDA. Las subunidades del tipo NR2A principalmente están localizadas en la membrana postsináptica mientras las NR2B parecen ser esencialmente extrasinápticas. (Tovar y Westbrook, 1999; Liu y cols., 2004; Chen y cols., 2008; Groc y cols. 2009).

NR2A y NR2B son las subunidades más estudiadas ya que están ampliamente distribuidas por el cerebro, principalmente en el córtex postnatal, y se cree que juegan un papel importante en la plasticidad

sináptica. Estas dos subunidades difieren en la cinética del canal, localización sináptica y en las proteínas de unión, factores que pueden influir en la inducción de plasticidad sináptica (Yashiro y Philpot, 2008).

Por ejemplo, los canales di-heteroméricos NR1/NR2A muestran mayor rapidez en el aumento y decaimiento de las corrientes que los canales di-heteroméricos NR1/NR2B. Los canales tri-heteroméricos muestran un curso de tiempo de decaimiento intermedio entre los dos tipos de canales di-heteroméricos. (Yashiro y Philpot, 2008).

1.4 Excitotoxicidad.

El término *excitotoxicidad* fue usado por primera vez por John Olney para identificar el fenómeno de la sobreexcitación de los receptores glutamatérgicos (Olney y Ho, 1970), aunque realmente ya se conocía este fenómeno. Fue observado por primera vez en 1957 por Lucas y Newhouse al administrar glutamato sódico que destruyó neuronas de la capa interna de la retina (Lucas y Newhouse, 1957).

Esta estimulación excesiva se puede deber a la acumulación de glutamato en el espacio sináptico, ya sea por una liberación masiva del neurotransmisor o por alguna disfunción en la recaptación del mismo (Salinska y cols., 2005). En resumen, la excitotoxicidad fue el término utilizado originalmente para referirse a la capacidad del glutamato de mediar en la muerte neuronal (Guimarães, 2009).

En la figura 1.13 se presenta un esquema de cómo el glutamato media la muerte celular y a través de qué mecanismos lo lleva a cabo. La activación de los diversos receptores glutamatérgicos produce un conjunto de alteraciones primarias relacionadas entre ellas como la movilización de diferentes iones, estrés del retículo endoplasmático, disfunción mitocondrial y inestabilidad de lisosomas. Todas estas alteraciones primarias producen alteraciones secundarias más generales como la formación de radicales libres y daño oxidativo del óxido nítrico, la activación de proteínas quinasas, liberación de

proteasas y alteración de factores de transcripción (Wang y cols., 2010). Todas estas alteraciones llevan a la neurona a la muerte celular activándose mecanismos de apoptosis, autofagia o necrosis, que son características de las enfermedades neurodegenerativas.

En el fenómeno de excitotoxicidad se pueden distinguir dos procesos dañinos que se diferencian en su curso temporal y las características iónicas. El daño primario, consecuencia temprana del episodio patológico inicial, consiste en una inflamación del cuerpo celular y las dendritas a través de la apertura de canales catiónicos de membrana, causando despolarización. La expansión del volumen celular va precedida de una disfunción de la bomba Na^+/K^+ con un influjo de iones Na^+ , y un influjo pasivo de iones Cl^- y agua (Guimarães y cols., 2009; Hynd y cols., 2004; Arundine y cols., 2003).

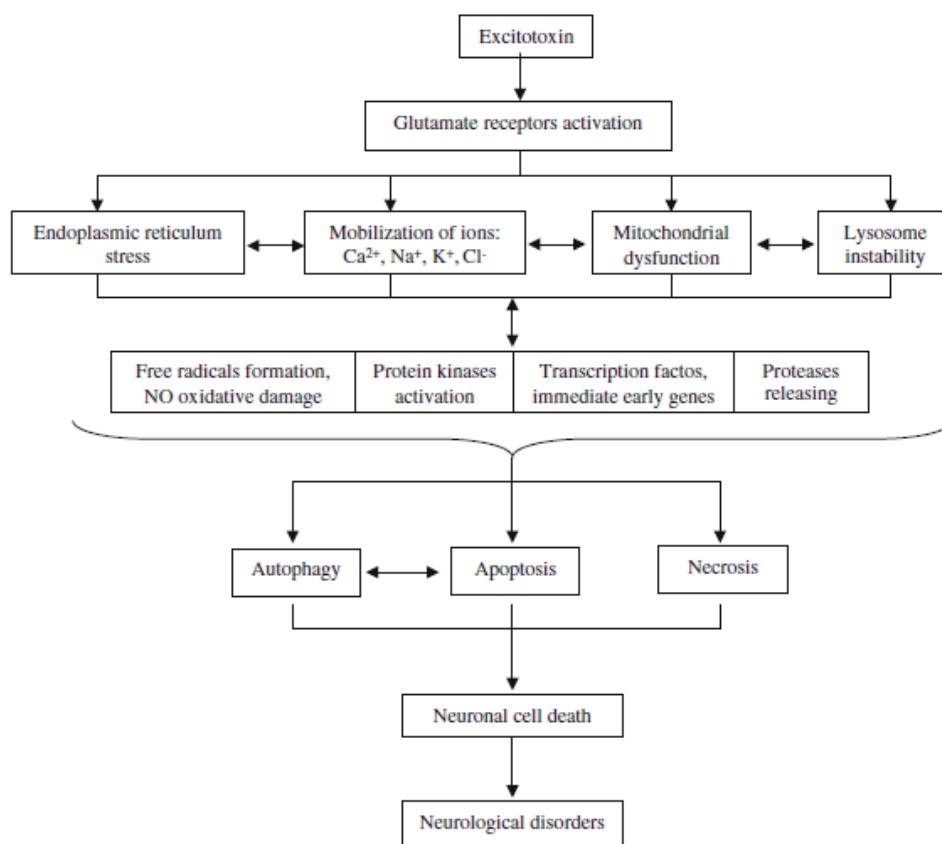


Fig. 1.13. Esquema del mecanismo de excitotoxicidad en enfermedades neurodegenerativas (Wang y Qin, 2010).

La degeneración neuronal secundaria, que evoluciona más lentamente, está marcada por una entrada de calcio que puede desencadenar un aumento de su concentración intracelular, también a través de reservas intracelulares, lo que puede superar la capacidad de sus mecanismos reguladores. Además puede causar la activación de varios enzimas como proteasas, lipasas, fosfatasa y endonucleasas que acabarán afectando directamente a la estructura celular provocando la degeneración neuronal tardía (Guimarães y cols., 2009; Hynd y cols., 2004; Arundine y cols., 2003).

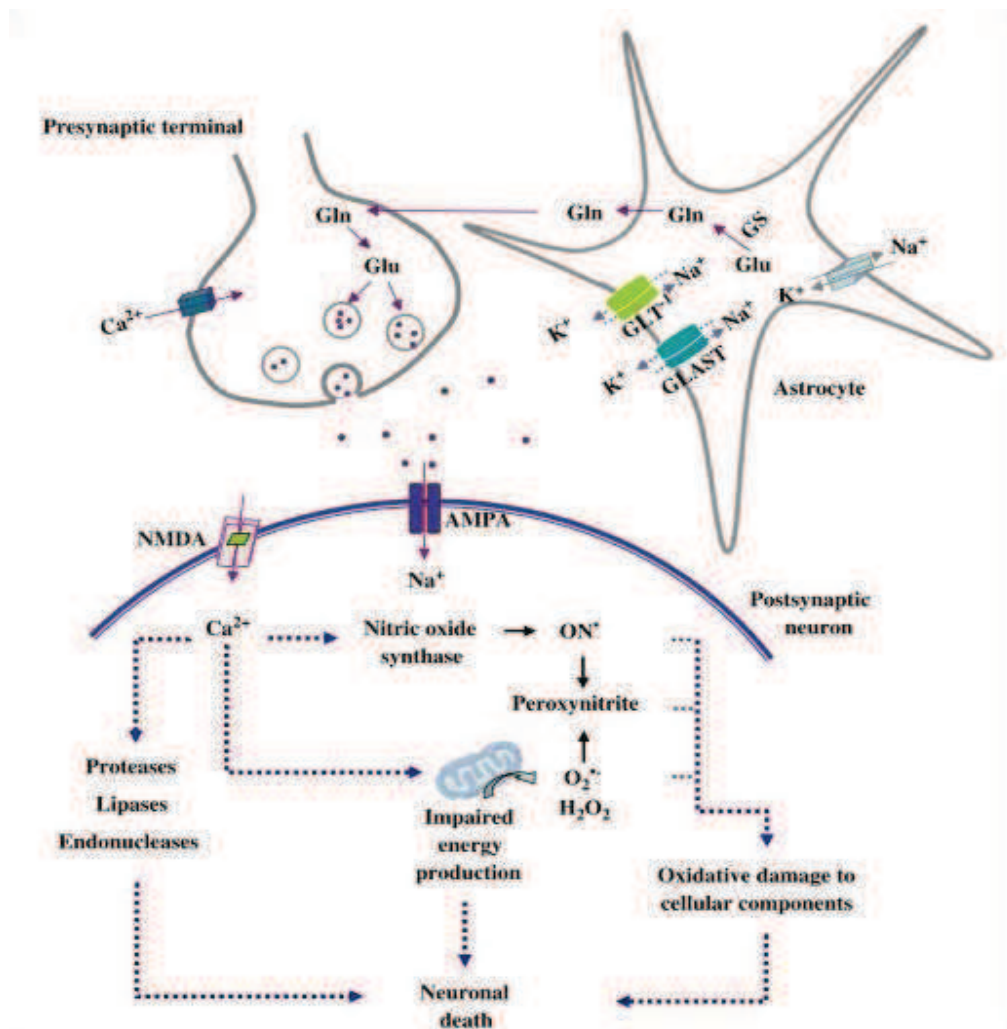


Fig. 1.14. Esquema de la neurotransmisión glutamatergica y la cascada excitotóxica que provoca la muerte celular (Estrada y cols., 2007).

1.4.1 Papel de los iones calcio en la Excitotoxicidad.

Como ya se ha comentado, la excitotoxicidad se inicia con la acumulación de glutamato en las hendiduras sinápticas. El glutamato es liberado de las neuronas y otras células cerebrales. Esto induce la entrada de calcio en las neuronas a través, principalmente, de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA y en menor grado tipo AMPA (Choi y cols., 2005; Foster y cols., 2007).

Como se observa en la figura 1.15, los iones Ca^{2+} también entran a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC) y otros tipos de canales de membrana permeables a Ca^{2+} , y además, se libera calcio de las reservas intracelulares a través, en parte, de la activación de receptores metabotrópicos de glutamato (Choi y cols., 2005; Foster y cols., 2007).

Existe un gradiente de concentraciones a través de la membrana celular, con una concentración intracelular de iones calcio libres que es alrededor de 100-200nM, separados tan solo por una bicapa lipídica de concentraciones entre 1-2mM en el exterior. Una fina regulación de los canales permite el paso de pequeñas cantidades de calcio a través de la membrana, causando incrementos localizados de los niveles de calcio intracelular y la activación de las moléculas apropiadas (Choi y cols., 2005; Foster y cols., 2007).

Sin calcio, simplemente la vida no sería posible; actúa como importante mensajero intracelular que gobierna funciones celulares, como la diferenciación y el crecimiento, la excitabilidad de la membrana, la exocitosis y la actividad sináptica (Arundine, 2003).

La concentración intracelular de calcio está regulada por un sistema dependiente de energía (ATPasa de calcio del retículo endoplasmático y de la membrana citoplasmática). El influjo masivo de calcio característico del proceso excitotóxico lleva a una sobrecarga de calcio intramitocondrial, puesto que esta organela es una de los principales reservorios de calcio intracelular. Ello altera su actividad e impide la producción de ATP. Como consecuencia, se ven afectados la carga de

calcio dependiente de ATP y los mecanismos de expulsión, lo que a su vez, provoca un incremento sostenido del calcio intracelular (Estrada Sánchez y cols., 2008).

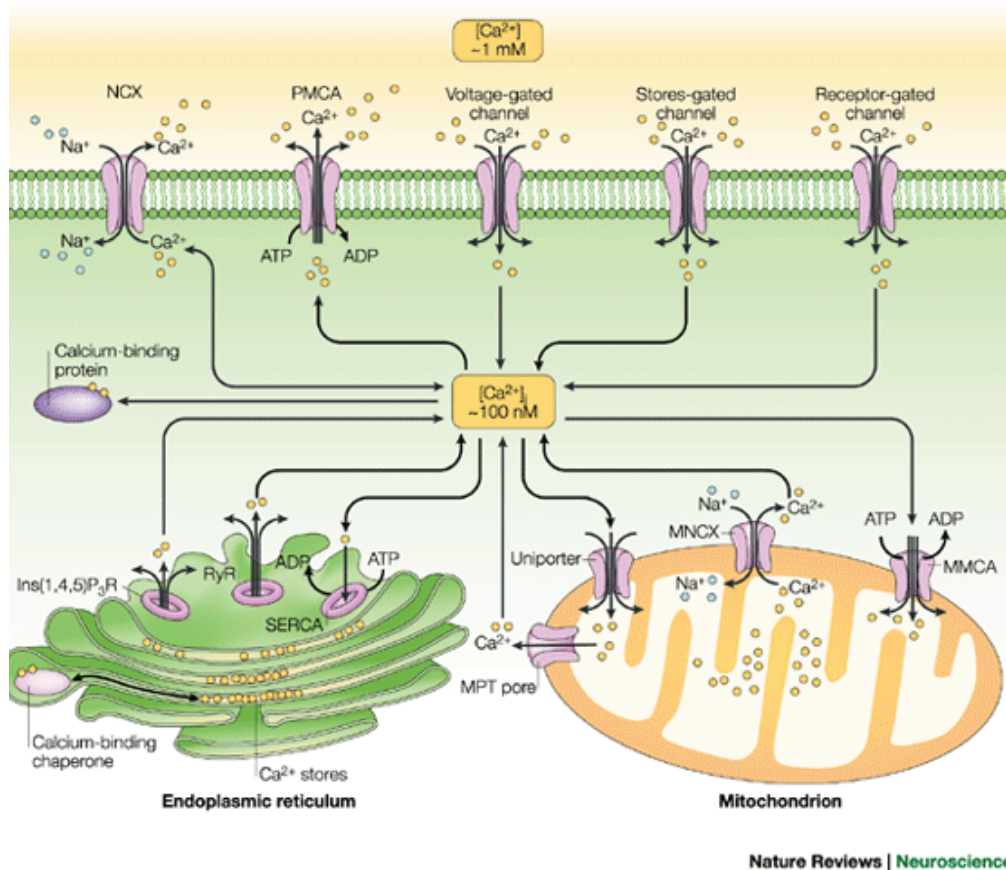


Fig. 1.15. Esquema de los sistemas responsables de la homeostasis del calcio intracelular (Syntichaki y Tavernarakis, 2003).

Como se ha comentado, bajo condiciones de excitotoxicidad y como se observa en la figura 1.15, a los iones calcio que entran del exterior celular a través de diferentes canales, se le suma el Ca²⁺ que puede ser liberado de las reservas intracelulares mediante la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR, fenómeno que se inhibe bajo concentraciones muy elevadas de calcio) seguida de la activación de los receptores de rianodina (RyR) e inositol-1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P₃R) que también liberan calcio de las reservas del retículo endoplasmático (Syntichaki y Tavernarakis, 2003; Krantic y cols., 2005; Desagher y Martinou, 2000).

Es decir, que dependiendo de la magnitud y la duración del incremento del Ca^{2+} intracelular se ven modificadas diferentes cascadas de señalización y procesos biológicos (Foster, 2007).

1.4.2 Papel de la mitocondria.

Hay un interés especial en conocer la relación entre los iones Ca^{2+} y la señalización de muerte celular, en los procesos neurodegenerativos (Smaili y cols., 2009).

La mitocondria es una importante reserva de calcio que está estrechamente relacionada y comunicada con el retículo endoplasmático (RE). La captación y liberación de calcio desde estos orgánulos modula la señal de calcio intracelular. En condiciones fisiológicas, el calcio captado por la mitocondria contribuye a la activación de la deshidrogenasa mitocondrial de Ca^{2+} y la producción de ATP (Smaili y cols., 2009).

No obstante, el incremento del calcio intracelular lleva a una sobrecarga de calcio en la mitocondria a través de la bomba de calcio de la membrana mitocondrial (MMCA) y otros canales específicos (Fig. 1.15). Esta sobrecarga de calcio desencadena una segunda liberación de calcio desde los almacenes mitocondriales, a través del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (MNCX) y de la formación del poro mitocondrial temporal (del inglés Permeability Transition Pore, PTP, o Mitochondrial Permeability Transition, MPT pore), dando lugar a una despolarización mitocondrial transitoria y un disminución en la producción de ATP. La mitocondria libera proteínas activadoras de caspasas, como el citocromo C que a su vez también provoca la liberación de calcio de las reservas mitocondriales (Syntichaki y Tavernarakis, 2003; Krantic y cols., 2005; Desagher y Martinou, 2000; Boehning y cols., 2003).

1.4.3 Sistemas de regulación de los niveles de calcio citosólico

Para regular estos procesos, las neuronas poseen un mecanismo de homeostasis especializado para asegurar un control riguroso de los niveles de calcio citosólico (Arundine M 2003) y la familia de los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) representan la primera defensa celular contra la sobrecarga de Ca^{2+} , bombeando iones Na^+ hacia el citoplasma y iones Ca^{2+} fuera de la célula (Fig. 1.16.) (Choi, 2005).

Así, la familia de proteínas NCX cargan con la responsabilidad de mantener concentraciones intracelulares de Ca^{2+} bajas y junto a la bomba de calcio de la membrana plasmática (PMCA) y la ATPasa de calcio del retículo sarco-endoplasmático (SERCA) tienen la función de restaurar los niveles de calcio intracelular. Bajo condiciones normales, estas proteínas transportan iones Na^+ disminuyendo sus gradientes de concentración en las células y transportando grandes cantidades de iones Ca^{2+} hacia fuera (Choi, 2005; Syntichaki y Tavernarakis, 2003).

Bajo condiciones patológicas los mecanismos de regulación se encuentran saturados y las concentraciones de calcio incrementan debido al influjo de calcio desde las distintas fuentes descritas y en circunstancias extremas, también a través del intercambiador de sodio/calcio NCX que puede actuar como vía de entrada de calcio (en modo inverso) especialmente durante fuertes despolarizaciones y con incrementos importantes de sodio intracelular (Syntichaki y Tavernarakis, 2003).

1.4.4 Muerte celular

La naturaleza, el transcurso y las causas moleculares de la muerte celular en enfermedades neurodegenerativas y su relación con los procesos básicos todavía es materia de discusión.

En base a los distintos criterios morfológicos y características bioquímicas se proponen tres principales mecanismos: apoptosis, una forma específica de muerte celular programada dirigida genéticamente;

necrosis, un tipo de muerte pasiva de la célula; y degeneración autofágica (Bredesen y cols., 2006; Bredesen, 2008; Gorman, 2008; Jellinger, 2006, 2007a; Okouchi y cols., 2007; Jellinger, 2009).

La apoptosis es un proceso de eliminación natural involucrado en numerosos eventos fisiológicos sobre todo durante la etapa del desarrollo. Pero la apoptosis también ocurre durante ciertos estados patológicos como daño isquémico, enfermedades neurodegenerativas, infecciones o toxicidad química, y puede ser desencadenada por la activación de receptores de muerte de la membrana plasmática o por estrés celular (Smali y cols., 2009).

En la figura 1.16 se muestra un esquema de las principales vías apoptóticas, entre las que se destacan la intrínseca y la extrínseca. La vía extrínseca está desencadenada por la unión de las denominadas moléculas de muerte a sus receptores, mientras que la vía intrínseca es activada por diversos acontecimientos celulares en los que la mitocondria posee un papel central.

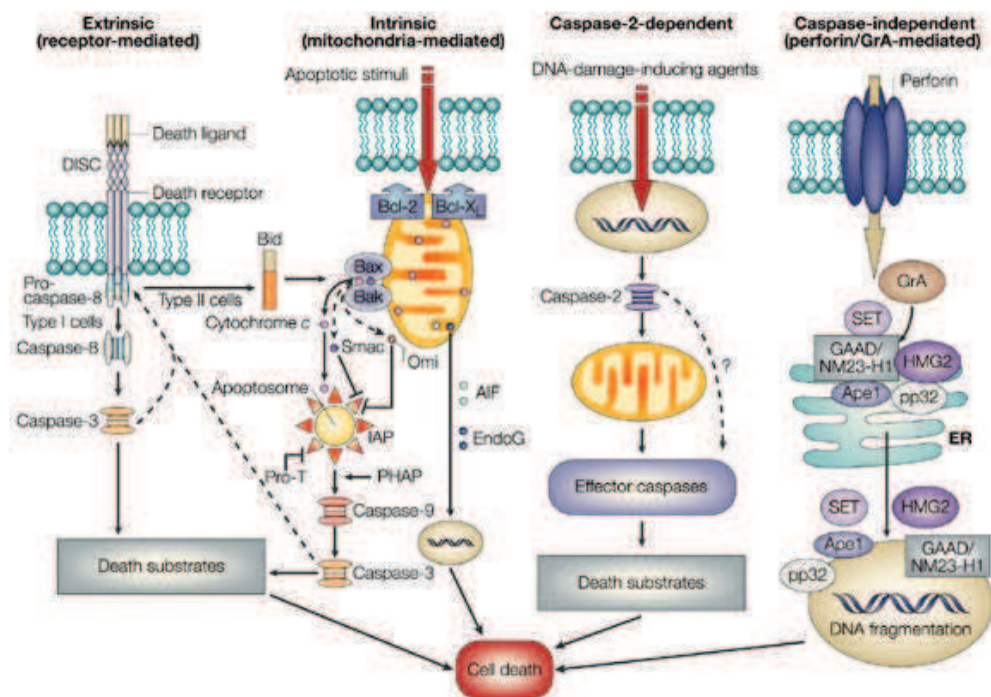


Fig. 1.16. Las diferentes vías de la apoptosis, entre las que destacan la vía extrínseca e intrínseca (Orrenius y cols., 2003).

La vía extrínseca es un mecanismo dependiente de receptor en el que la activación de los receptores de muerte lleva a la formación del complejo de señalización de inducción de muerte por activación de la caspasa-8 seguida de una cascada de caspasas que ejecutará la muerte celular. La caspasa-8 puede activar a Bid (del inglés, BH3 Interacting domain death agonist) y con ello, provocar la activación de la vía intrínseca (Fig. 1.16) (Orrenius y cols., 2003).

La vía intrínseca se activa por la presencia de diferentes estímulos apoptóticos que causan la traslocación de Bax a la mitocondria (Orrenius y cols., 2003) e involucra la familia de proteínas Bcl-2. Las proteínas de esta familia pueden promover la supervivencia celular (Bcl-2 y Bcl-x_L) o la muerte celular (Bax y Bid) (Smaili y cols., 2009).

La inserción de Bax en la mitocondria causa la liberación de citocromo C del espacio intermembrana mitocondrial y la pérdida del potencial de

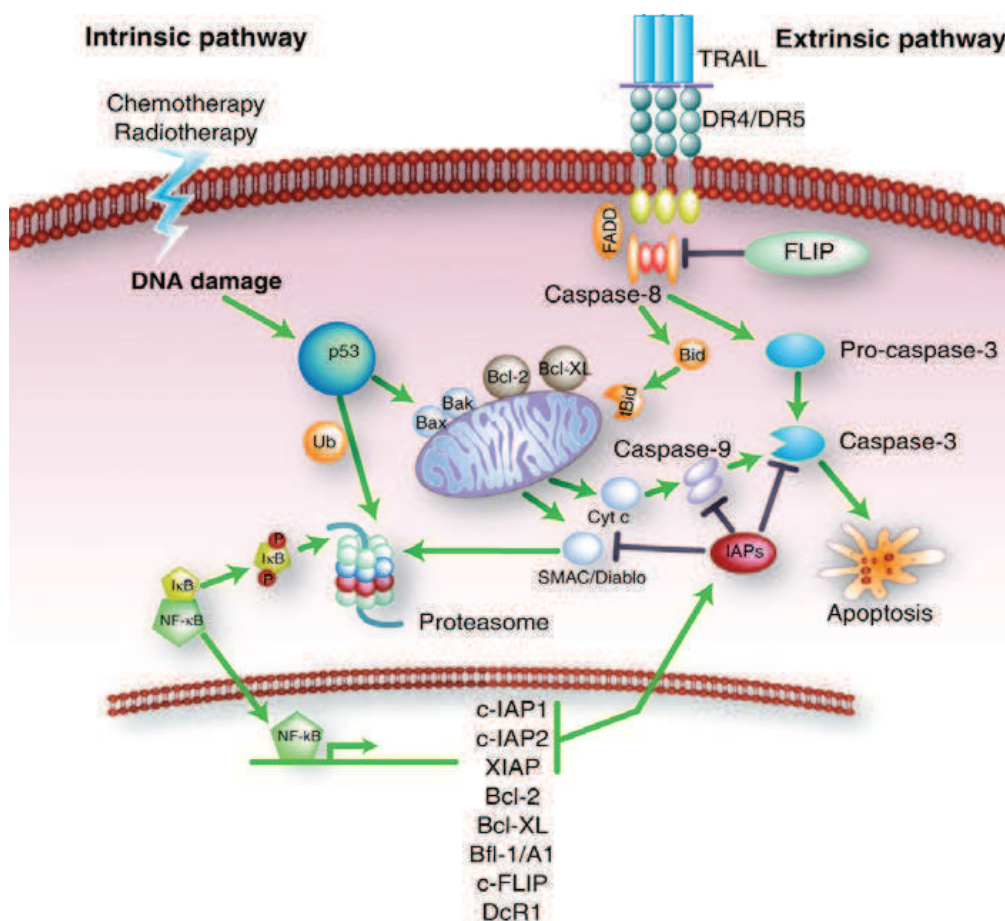


Fig. 1.17. Liberación de citocromo c y actuación de las proteínas de la familia de Bcl-2 y Caspasas, en el proceso de apoptosis (vía intrínseca y vía extrínseca) (De Vries y cols., 2006).

membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). El citocromo C activará finalmente la caspasa-3 provocando la proteólisis de la célula, mientras que la disminución de $\Delta\Psi_m$ conlleva una disminución de la producción de ATP y está asociada con la permeabilización de la membrana mitocondrial, contribuyendo a la liberación de Ca^{2+}_m que constituye el 68% del contenido celular de $(\text{Ca}^{2+})_i$ (Fig. 1.17) (Orrenius y cols., 2003).

Necrosis y apoptosis parecen coexistir en diferentes trastornos neurodegenerativos, como las EA, EH y EP, la ELA, las ataxias espinocerebelosas y las encefalopatías espongiiformes transmisibles, que también han sido asociados a procesos de necrosis, además de la apoptosis inicialmente propuesta (Bossy-Wetzel y cols., 2004; Mattson, 2000; Taylor y cols., 2002).

Cuando los niveles de ATP son bajos, las células padecen necrosis en lugar de apoptosis, pero muchas características pueden suceder simultáneamente. Este fenómeno se describe como necrapoptosis, que puede ocurrir especialmente cuando las células empiezan sufriendo apoptosis y derivan a una muerte celular necrótica (Smali y cols., 2009).

Los mecanismos de necrosis se ponen en marcha cuando la célula se expone a variaciones extremas de las condiciones fisiológicas (hipoxia, hipotermia), que pueden resultar en daños a la membrana plasmática. El proceso empieza con fallos celulares en el mantenimiento de la homeostasis, que ocasionan un influjo de agua e iones extracelulares. Distintos orgánulos intracelulares incrementan su volumen, principalmente la mitocondria, y la propia célula hasta su ruptura (lisis celular). Todos los componentes citoplasmáticos (incluyendo enzimas lisosomales) se liberan al fluido extracelular. Por eso normalmente el proceso de necrosis se asocia a un daño tisular extenso y por tanto una respuesta inflamatoria intensa.

El último mecanismo de muerte celular propuesto es la autofagia. El término autofagia (que significa “comerse a sí mismo”) fue usado por primera vez por Christina de Duve hace unos 40 años. Pero ha sido en la última década cuando ha habido mayor investigación sobre este fenómeno. Estudios recientes han demostrado la implicación de la vía

de autofagia en numerosos procesos biológicos como la adaptación inducida por estrés, el desarrollo celular, la diferenciación y la supervivencia. Además, disfunciones en esta vía parecen promover enfermedades como el cáncer, enfermedades cardíacas, infecciones, enfermedades hepáticas y diversas enfermedades neurodegenerativas. La autofagia es una vía evolutivamente conservada que media la degradación celular a través de la acción de los lisosomas, ver figura 1.19. (Lee, 2009; Glick y cols., 2010).

Se conocen tres tipos de autofagia conocidas como macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. En la macroautofagia, la carga citoplasmática se entrega al lisosoma a través de una vesícula de doble membrana intermediaria llamada autofagosoma, éste se funde con el lisosoma formando un autolisosoma. Contrariamente, en la microautofagia los componentes citoplasmáticos son directamente recogidos por el lisosoma a través de la invaginación de la membrana lisosomal. En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas diana son transportadas a través de la membrana lisosomal, formando complejos con chaperonas (como Hsc-

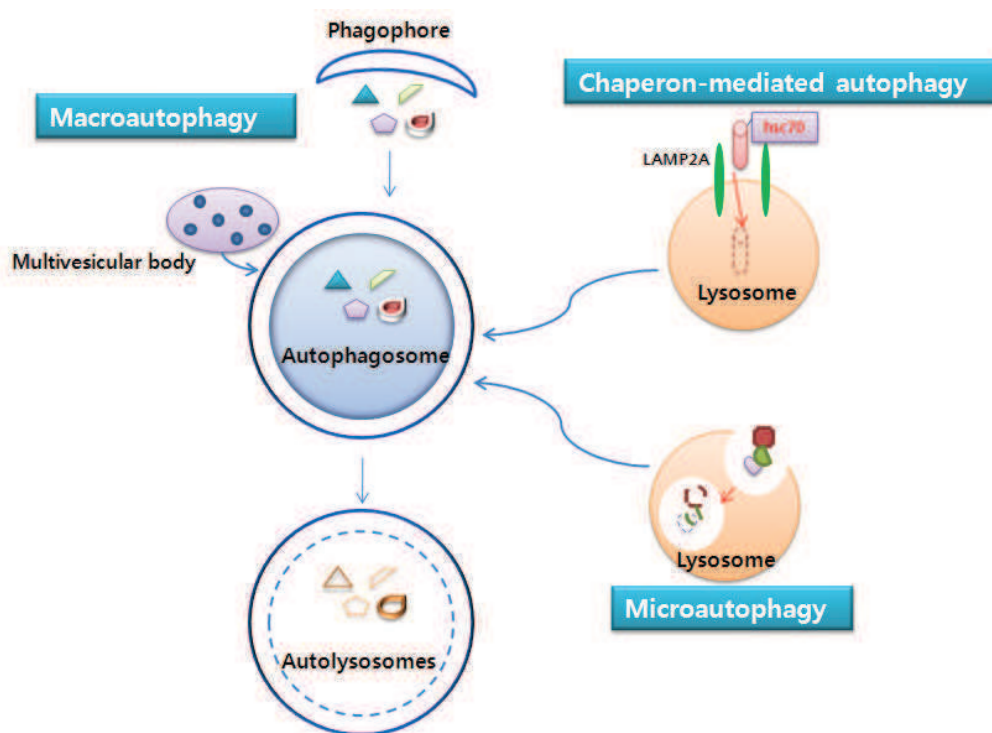


Fig. 1.19. Modelo esquemático de autofagia, mostrándose los tres tipos conocidos. Aunque la autofagia es una vía de degradación lisosomal conservada, puede diferir en las maneras de ofrecer la cara citosólica al lisosoma. (Lee JA, 2009).

70) que son reconocidas por receptores de membrana lisosomal asociados a la proteína de membrana 2A, llegando a su desnaturalización y degradación (García-Arencibia y cols., 2010; Glick y cols., 2010).

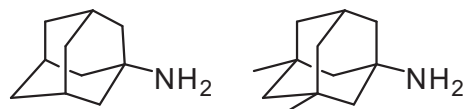
1.5 Memantina como fármaco neuroprotector.

La memantina es un derivado estructural directo de la amantadina. La amantadina fue el primer miembro de la familia de moléculas llamadas aminoadamantanos que tuvieron aplicación clínica. En los años 60 se comercializó por primera vez para el tratamiento de infecciones respiratorias debidas al virus de influenza A, pero de manera casual se observaron sus efectos beneficiosos sobre síntomas extrapiramidales en pacientes de enfermedad de Parkinson (Kalia y cols., 2008; Blanpied y cols., 2005).

Inicialmente se asumió que sus efectos antiparkinsonianos se basaban en su actividad dopaminérgica. Pero más tarde algunos estudios mostraron que el mecanismo de acción predominante para ese efecto de la amantadina eran sus propiedades antagonistas sobre los receptores NMDA, actuando como un bloqueador de la apertura del canal (Kalia y cols., 2008).

La memantina (Fig. 1.20), con fórmula molecular $C_{12}H_{21}N$, tiene una estructura química de 1-amino-3,5-dimetiladamantano. Fue registrada en Alemania para una gran variedad de indicaciones en trastornos del sistema nervioso central en 1978 (Molinuevo y cols., 2005). En 1983, el mismo grupo que llevó a cabo su síntesis publicó un trabajo que aglutinaba las evidencias experimentales que explicaban las observaciones clínicas, postulando directa e indirectamente la actividad dopaminomimética y efectos sobre el sistema serotoninérgico y noradrenérgico de la memantina. Desde ese instante, se destinaron grandes esfuerzos para determinar su mecanismo de acción, pero no fue hasta 10 años después cuando se descubrió su mecanismo de acción como antagonista no competitivo de los receptores NMDA.

Hasta el día de hoy, diversa investigación preclínica ha revelado que el mecanismo de acción terapéuticamente más acertado de la memantina es la vía del antagonismo de los receptores NMDA (Parsons y cols., 1999; Molinuevo y cols., 2005).

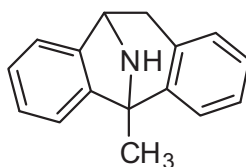


Amantadina

Memantina

Fig. 1.20. Estructuras de Amantadina y 1-amino-3,5-dimetil-adamantano (memantina).

Se han estudiado gran cantidad de antagonistas de los rNMDA, pero no todos con el mismo éxito clínico. Un ejemplo claro de ello es el MK-801 (Fig. 1.21), antagonista muy potente de los rNMDA cuyo desarrollo clínico fue abandonado debido a la aparición de efectos adversos sobre el SNC (trastornos cognitivos y de tipo psicodisléptico, entre otros).



MK-801

Fig. 1.21. Estructuras de MK-801.

Conociendo la actividad principal de este tipo de compuestos, colaboramos con el grupo del Dr. Santiago Vázquez de la universidad de Barcelona y con el Dr. Antonios Kolocouris y su equipo de la universidad de Atenas en Grecia, que nos proporcionaron compuestos estructuralmente similares a memantina y amantadina, y por tanto con capacidad potencial de antagonizar los receptores NMDA.

1.5.1 Mecanismo de acción de la memantina.

El antagonismo que ejerce la memantina es de tipo no competitivo y de baja-moderada afinidad. Como se puede ver en el modelo teórico de la figura 1.22, se postula que se une al sitio de unión del interior del canal protegiendo a las neuronas de la excitotoxicidad inducida por glutamato (Tanović y Alfaro, 2006; Molinuevo y cols., 2005).

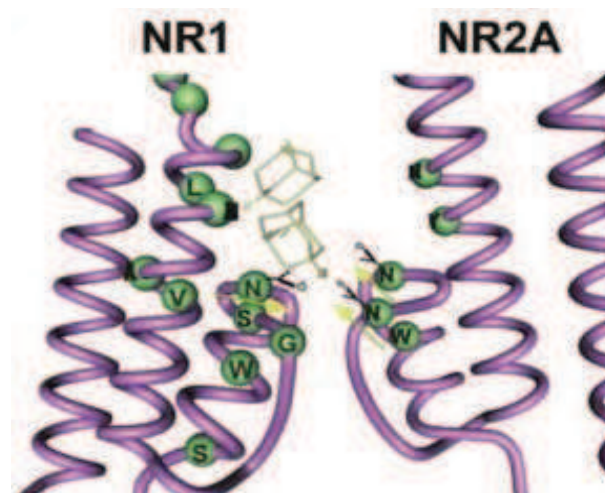


Fig. 1.22. Modelo teórico de la interacción entre las subunidades del rNMDA y memantina.

Además de la memantina otros compuestos parecen capaces de bloquear al receptor NMDA, pero presentan diferencias importantes con la memantina.

Los antagonistas no competitivos de alta afinidad, como el (+)MK-801 bloquean continuamente el receptor, evitando también la transmisión sináptica normal. Este es el motivo principal por el que tienen muchos e importantes efectos adversos. En cambio, la memantina al tener una baja-moderada afinidad, realiza un bloqueo on/off del canal con una rápida cinética de disociación y una elevada dependencia de voltaje. Como se ha comentado, se une al lugar de unión del Mg^{2+} (en el interior del canal) y lo abandona rápidamente. El lugar específico de acción de la memantina se sitúa cerca del lugar de unión externo donde se produce el bloqueo por Mg^{2+} , en la región de filtrado selectivo del canal asociado a los receptores NMDA, formado por residuos de

asparagina en los denominados “N-site” de la subunidad NR1 y los “N-site” y “N+1-site” de la subunidad NR2 (Chen y Lipton, 2005; Parsons y cols., 2007).

Una de las posibles explicaciones de la rápida cinética de los antagonistas no competitivos de baja o moderada afinidad, parece estar basada en la “ley de masas”. Los antagonistas de alta afinidad necesitan una presencia muy baja para hacer efecto. Según esta ley, al haber menos moléculas, el tiempo requerido para actuar es mayor. Ocurre lo contrario con los antagonistas no competitivos de baja afinidad, que al tener un mayor número de moléculas presentes, ocupan con más facilidad el receptor (Fig. 1.23) (Parsons y cols., 2007).

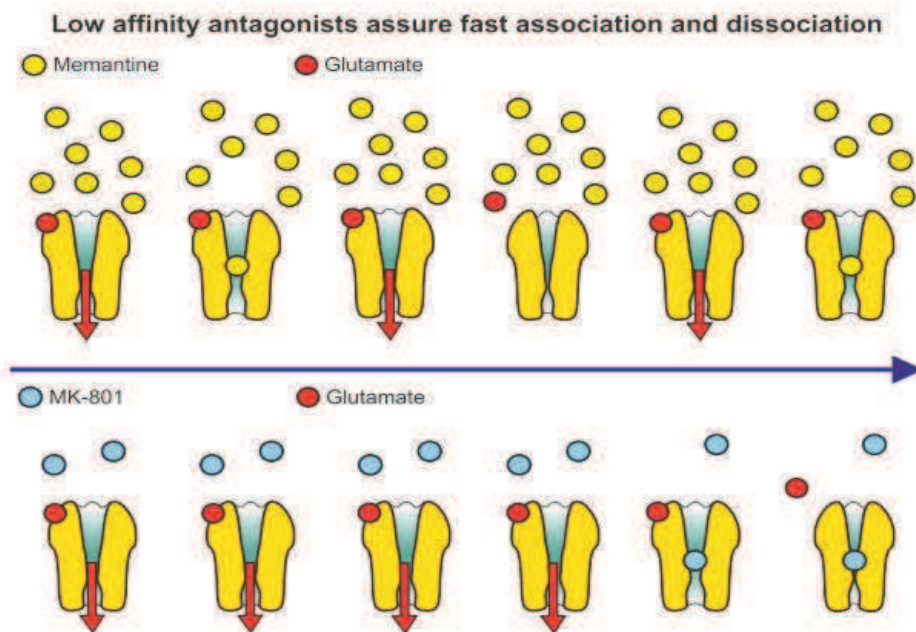


Fig. 1.23. Diferencias entre el bloqueo producido por la memantina y por el MK-801 sobre receptores NMDA (Parsons y cols., 2007).

El esquema de la figura 1.24 muestra su comportamiento dependiente de voltaje y las diferencias entre la activación fisiológica o patológica de estos receptores. Bajo condiciones de reposo (en la figura 1.24, -70mV) los tres compuestos (magnesio, mk-801 y memantina) bloquean el

receptor. El magnesio y la memantina, en condiciones fisiológicas son capaces de liberar el receptor bajo fuertes despolarizaciones sinápticas (-20mV), debido a su pronunciada dependencia de voltaje y su rápida cinética de desbloqueo, mientras que el MK-801 sigue bloqueando el canal. La memantina no abandona el canal tan fácilmente como el magnesio frente a despolarizaciones moderadas pero prolongadas como las que se producen durante la excitotoxicidad (Parsons y cols., 2007).

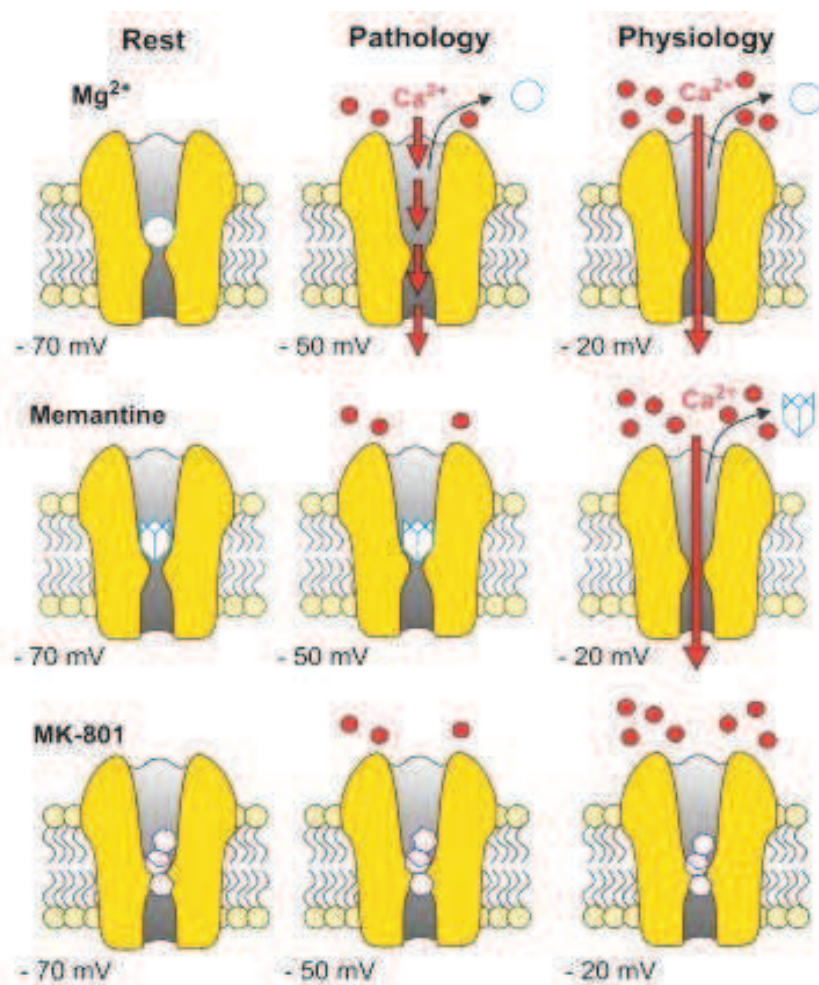


Fig. 1.24. Bloqueo de la memantina, MK-801 o Mg²⁺ sobre los rNMDA en diferentes situaciones (Parsons y cols., 2007).

1.5.2 Otras características farmacológicas de la memantina.

La memantina se absorbe completamente por el tracto gastrointestinal, con una biodisponibilidad absoluta de aproximadamente el 100% y su pico de concentración en plasma llega a las 3-8 horas después de su ingesta oral. No se ha observado ninguna influencia de alimentos en su absorción. La memantina atraviesa la barrera hematoencefálica y los niveles en el fluido cerebroespinal son de un 20 a 50% menores que en plasma. La memantina se encuentra unida a las proteínas plasmáticas aprox. en un 45% y se elimina del plasma con un *tiempo de vida media* ($T_{1/2}$) de 60 a 100 horas. El proceso de eliminación se realiza principalmente por los riñones, y solo un pequeño porcentaje se procesa por el hígado acabando como bilis o heces (Ficha técnica de memantina, Ebixa - Clorhidrato de Memantina - 2008).

En general la memantina es bien tolerada, y los ensayos clínicos realizados por el laboratorio fabricante han demostrado que la mayoría de los efectos adversos que provoca son de escasa gravedad. Los síntomas más frecuentes aparecidos en grupos tratados con memantina fueron alucinaciones, mareos, agitaciones, cefaleas y fatiga; otros síntomas más infrecuentes fueron ansiedad, vómitos, infección del tracto urinario y aumento de la sudoración (Parsons y cols., 1999; Kalia y cols., 2008).

Si bien, en general, se considera un fármaco bien tolerado, es preciso continuar en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad similar, pero con mejoras tanto desde el punto de vista farmacocinético como farmacodinámico.

1.6 Compuestos evaluados en esta memoria.

Todos los compuestos utilizados provienen de tres grupos de investigación, quienes nos los han facilitado. El mayor número de compuestos, los LD, han sido sintetizados y diseñados por el Dr. Santiago Vázquez y su equipo en la Unidad de Química Farmacéutica de

la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, como derivados de memantina y/o amantadina. Se clasifican en 7 grupos distintos en función de su estructura química aminas bisnoradamantánicas, aminas noradamantánicas, aminas oxadamantánicas, aminas benzohomooxadamantánicas, aminas pentacíclicas, compuestos ETC (con estructura de aminas benzohomonoradamantánicas) y compuestos RFP (aminas adamantánicas). También se han evaluado los compuestos AK (adamantanos y adamantanoles), facilitados por el Dr. Kolocouris y su equipo del departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Atenas. Finalmente, un último grupo de compuestos ha sido suministrado por el grupo de la Dra. Carmen Escolano de la Unidad de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

1.6.1 Compuestos del Dr. Vázquez y su equipo

A continuación se muestran los esquemas de las estructuras básicas de cada grupo de compuestos, mostrándose los radicales del núcleo principal.

BISNORADAMANTANOS (16 compuestos) Los compuestos de este grupo tienen unas estructuras con un núcleo central 2 átomos de carbono menor que los compuestos de referencia y con un puente 1 átomo más corto reduciendo su volumen. En todos ellos se mantienen los dos radicales metilo presentes en memantina.

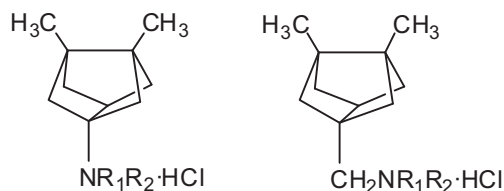


Fig. 1.25. Estructuras básicas del grupo de las aminas bisnoradamantánicas.

NORADAMANTANOS (18 compuestos) Los distintos noradamantanos disminuyen el volumen del núcleo central en 1 átomo de carbono, y en este caso derivan de amantadina, con un solo sustituyente.

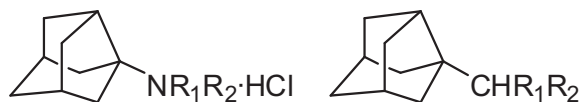


Fig. 1.26. Estructuras básicas del grupo de las aminas noradamantánicas.

OXADAMANTANOS (19 compuestos) Los compuestos de este grupo mantienen la estructura central de los compuestos de referencia sustituyendo un átomo de carbono del núcleo central por un átomo de oxígeno, aumentando de manera significativa el volumen del núcleo central.

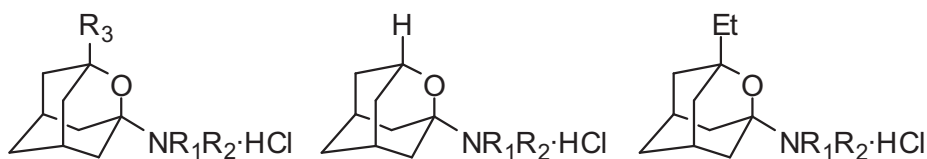


Fig. 1.27. Estructuras básicas del grupo de las aminas oxadamantánicas.

BENZOHOMOOXADAMANTANOS (19 compuestos) Los distintos derivados benzohomoxadamantanos, igual que el grupo anterior también incorporan un átomo de oxígeno en uno de sus ciclos, pero las estructuras son mayores, con 14 átomos de carbono en el núcleo central, siendo así el grupo con los compuestos más voluminosos.

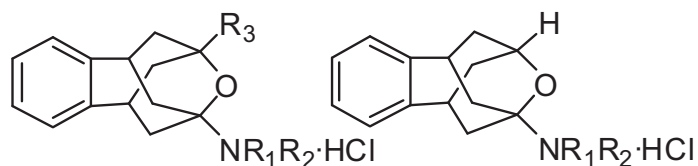


Fig. 1.28. Estructuras básicas del grupo de las aminas benzohomoxadamantánicas.

PENTACICLOS (18 compuestos) Estos compuestos presentan estructuras ligeramente distintas a los compuestos de referencia con un núcleo central de 12 átomos de carbono con dos estructuras que sobresalen lateralmente.

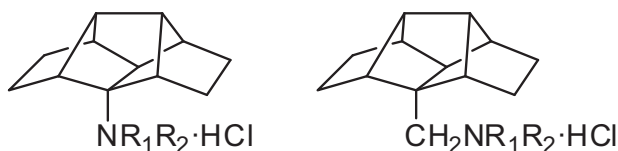


Fig. 1.29. Estructuras básicas del grupo de las aminas pentacíclicas.

Compuestos ETC - Benzohomonoradamantanos (9 compuestos) Los compuestos ETC presentan una estructura de aminas benzohomonoradamantánicas, mantienen la estructura de los benzohomoxadamantanos pero con todos los átomos del núcleo central como átomos de carbono.

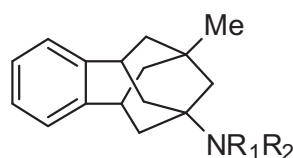


Fig. 1.30. Estructura básica del grupo de las aminas benzohomonoradamantánicas.

Compuestos RFP (10 compuestos) Estos compuestos vuelven a tener un núcleo central de 10 átomos de carbono como los compuestos de referencia pero en este caso presentan una diferente ubicación en los radicales metilo/etilo del núcleo central respecto a memantina.

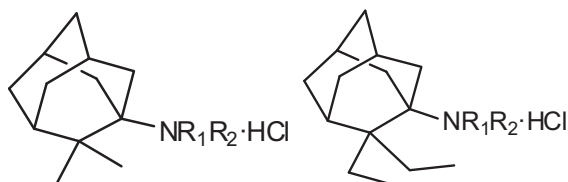


Fig. 1.31. Estructuras básicas del grupo de las aminas adamantánicas.

1.6.2 Estructuras facilitadas por el Dr. Kolocouris (11 compuestos AK)

Los compuestos AK tienen una estructura central muy parecida a la de amantadina, con gran variedad de sustituyentes. Esto es debido a que estos compuestos han sido sintetizados con el objetivo de obtener actividad antivírica (como amantadina).

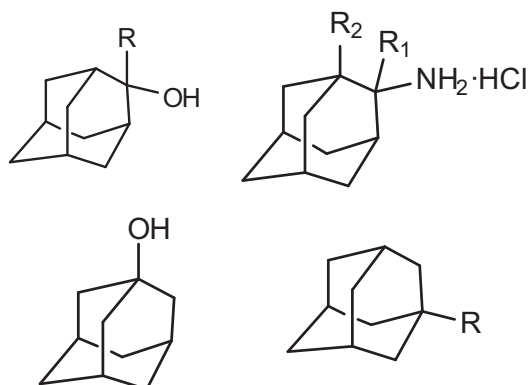


Fig. 1.32. Estructuras básicas de los compuestos AK.

1.6.3 Alcaloides derivados de la rincofilina.

Los compuestos proporcionados por el grupo de la Dra. Escolano, de la Unidad de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia (Universidad de Barcelona), están relacionados con la rincofilina, un alcaloide aislado de *Uncaria rhynchophylla*. La rincofilina ha demostrado actuar como antagonista no competitivo en receptores de NMDA expresados en oocitos de *Xenopus* (Kang y cols., 2002) y posee efectos neuroprotectores en el modelo de muerte neuronal inducida por glutamato en cultivos de neuronas granulares de cerebelo (Shimada y cols., 1999). Por ello, se decidió evaluar la actividad de una pequeña serie de compuestos sintetizados con estructura espiroindólica, e indolo y benzoquinolizidínica.

Las estructuras básicas de estos compuestos se han mostrado en la figura 1.33 en comparación con la estructura de la rincofilina.

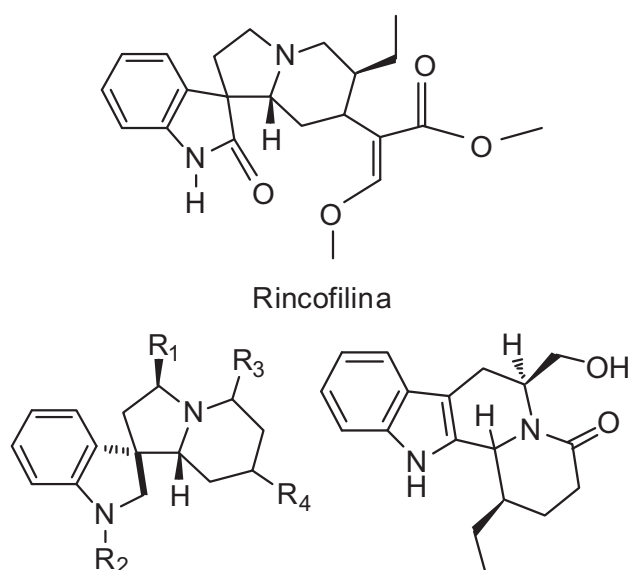


Fig. 1.33. Estructura de rincofilina y las estructuras básicas de los compuestos PF.

En la presente memoria, cuando se haga referencia a estos compuestos se usará o bien la nomenclatura facilitada por el grupo que ha suministrado dichos compuestos (en el caso de los compuestos facilitados por el Dr. Santiago Vázquez y su equipo, los nombraremos LDs, ETCs, EVs y RPFs) o una nomenclatura en función del grupo colaborador del que provienen (el caso de los compuestos facilitados por el Dr. Kolocouris, AKs y los facilitados por la Dra. Carmen Escolano, PFs).

Como se verá más adelante, uno de los objetivos principales de este trabajo es valorar la actividad como antagonistas de los receptores NMDA de los compuestos presentados en este apartado, así como evaluar su acción neuroprotectora.

Una de las técnicas más utilizadas en el proceso de investigación de nuevos compuestos es el estudio de la estructura de los compuestos en cuestión, su adaptación a su lugar de unión y el establecimiento de relaciones estructura-actividad.

En nuestro caso, y debido a la falta de un modelo tridimensional del receptor NMDA, se ha optado por un enfoque basado en

modificaciones de la estructura de memantina y otras relacionadas que no permitan determinar qué estructuras pueden definirse como farmacóforos para un futuro desarrollo de candidatos.

1.7 Desarrollo de nuevos fármacos.

La historia del medicamento se remonta a los orígenes de la sociedad humana. Desde los primeros tiempos el hombre ha acudido a la naturaleza para obtener sustancias que, o bien le ayudaran a paliar el dolor, los síntomas de sus enfermedades o bien le facilitarían la obtención del alimento (veneno para la caza), o en sus relaciones sociales y religiosas (estimulantes y alucinógenos).

En los últimos años ha habido grandes avances en el desarrollo de fármacos, que cada vez son más seguros, específicos y efectivos en el tratamiento de enfermedades.

El descubrimiento de un fármaco comprende todas las fases necesarias para que podamos asegurar que el compuesto tiene un perfil deseable de actividad. Comprende desde la síntesis, el aislamiento de la fuente natural, o la obtención biotecnológica y toda fase preclínica, incluida la toxicología, hasta la confirmación de que el compuesto es aceptable tanto en eficacia como en seguridad para su ensayo en seres humanos (Escalona y cols., 2008).

Todo este proceso se puede dividir en tres grandes fases que se muestran en la figura 1.34. El *descubrimiento*, que abarca desde un

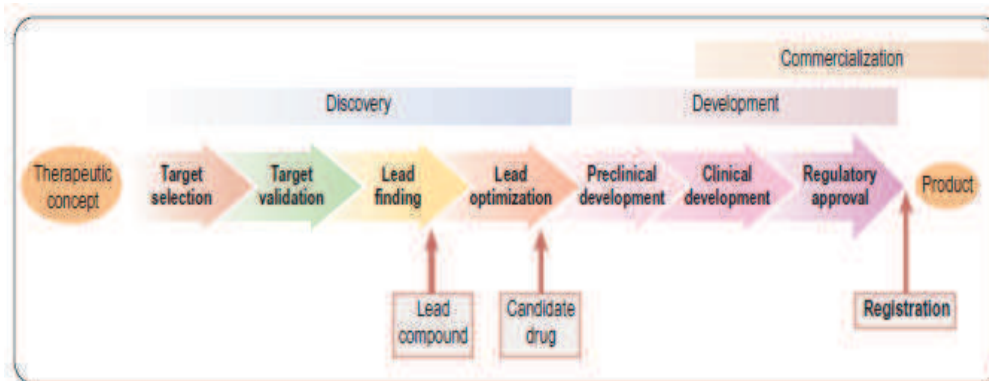


Fig. 1.34. Las tres fases principales en la creación de un nuevo fármaco: Descubrimiento, desarrollo y comercialización. (Rang HP, 2005).

concepto terapéutico hasta la obtención de una molécula, el *desarrollo* de ensayos preclínicos y clínicos con esta molécula hasta su registro y la *comercialización* del producto para aplicaciones terapéuticas (Rang, 2005).

Uno de los problemas mayores que se presenta en los procesos de desarrollo de nuevos medicamentos es el tiempo y los costes que conllevan. Por cada millón de moléculas que se inician en esta larga cadena para la obtención de nuevos fármacos, sólo tres recuperan la inversión inicial. Por este motivo, el diseño racional de fármacos constituye una herramienta casi indispensable en el desarrollo actual de nuevos medicamentos (Escalona y cols., 2008).

Tradicionalmente, el descubrimiento de fármacos ha sido un ejercicio de ensayo-error basado en el *screening* de compuestos en ensayos biológicos donde existían serias limitaciones en la diversidad química que podía ser explorada, y el resultado dependía enormemente de la elección de los compuestos ensayados (Pouplana y cols., 2009).

La entrada de la computación en el campo del diseño de fármacos ha supuesto una revolución en el enfoque y en las posibilidades dando paso a la química computacional. Han aparecido nuevas técnicas y métodos que permiten relacionar la estructura química con la actividad biológica como los métodos de modelación molecular o SAR (Structure Activity-Relationships), los Métodos QSAR (Quantitative Structure Activity-Relationships) y sus nuevas modalidades (por redes de neuronas y tridimensional) (Escalona y cols., 2008).

En el enfoque tradicional, basado en el ligando, se han utilizado las técnicas conocidas como “Variaciones estructurales”, y también es la que utilizamos en esta tesis. Este proceso se inicia con la búsqueda y elección de un compuesto *cabeza de serie*.

En la fase de descubrimiento se pueden tomar diferentes enfoques para el desarrollo de nuevos medicamentos, dependiendo de si se conoce la estructura del receptor, si se tiene información sobre el sitio de unión, o si hay algún ligando de referencia.

Una vez encontrada y definida la cabeza de serie es necesaria la exploración de la serie a través de la modulación de la estructura base con el fin de encontrar un producto mejor (Fig. 1.35). Algunos de los objetivos a conseguir en esta fase pueden ser: mejorar la potencia del líder, eliminar efectos secundarios no deseados, potenciar acciones secundarias deseadas, separar actividades en compuestos multiacción (normalmente para potenciar alguna de las acciones farmacológicas sobre las demás), combinar actividades en un mismo compuesto/entidad, modificar la biodisponibilidad del líder, etc. (Escalona y cols., 2008).

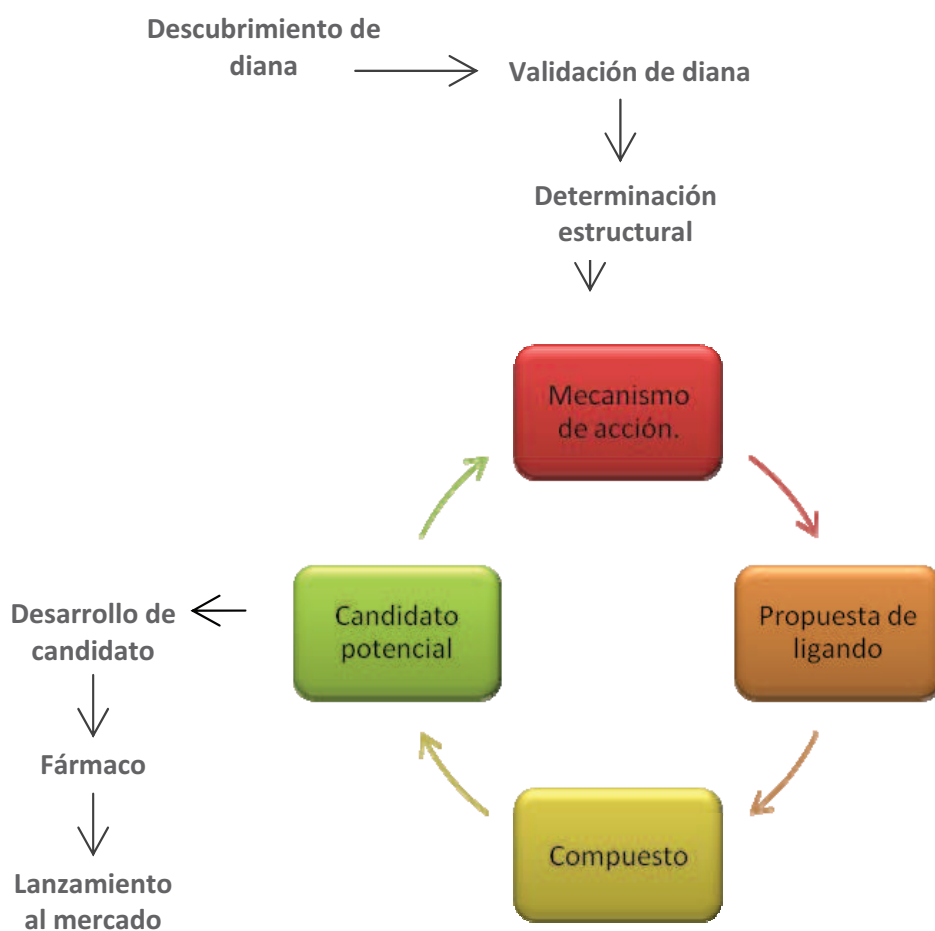


Fig. 1.35 Representación esquemática de las etapas involucradas en el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Modificado de Pouplana y cols., 2009).

Una vez obtenidos los compuestos candidatos se iniciaría la fase de desarrollo farmacológico con los ensayos preclínicos y clínicos necesarios hasta su aprobación para ser registrado (Pouplana y cols., 2009).

Basándonos en esta metodología de estudio, algunos de nuestros compuestos, aparte de compartir su estructura básica con amantadina y memantina, que presentan actividad antagonista sobre los receptores NMDA, también compartían cierta similitud estructural con compuestos con actividad inhibidora de la mono amino oxidasa (MAO).

El objetivo planteado fue determinar la posible sinergia en neuroprotección con moléculas que presentan condiciones estructurales para ejecutar diferentes mecanismos de acción.

De hecho, en los últimos años, la estrategia de combinar diferentes mecanismos de acción ha generado un gran interés por los laboratorios de investigación y desarrollo de nuevos fármacos.

Así, se seleccionaron un grupo de los compuestos para la valoración de la capacidad inhibidora de la MAO. La selección se llevó a cabo en función a la similitud estructural con compuestos de conocida actividad i-MAO.

1.8 Actividad Inhibidora de la MAO.

La monoamino oxidasa (MAO) es la enzima responsable de la regulación en el sistema nervioso central de ciertos neurotransmisores como dopamina, noradrenalina y serotonina a través de su desaminación oxidativa. La MAO es una flavoproteína presente en la membrana mitocondrial de neuronas y glía, que puede existir en dos isoformas, MAO-A y MAO-B.

El uso terapéutico de los inhibidores de la MAO en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas tiene su origen en la acción antiparkinsoniana de los inhibidores selectivos de la monoamino

oxidasa B (MAO-B). La **selegilina** y la **rasagilina** (Fig. 1.36) son dos compuestos clínicamente probados para la enfermedad de Parkinson, inhibidores selectivos de la MAO-B que incrementan la presencia de dopamina en la sinapsis.

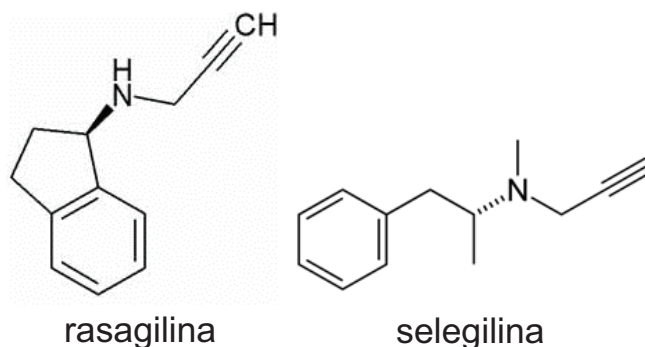


Fig. 1.36. Estructura de la rasagilina y selegilina.

Por otro lado, durante el proceso de desaminación oxidativa de la dopamina y otras aminas biogénicas, se genera peróxido de hidrogeno y en último término radicales libres de oxígeno (ROS), y los inhibidores de la MAO parecen desviar el catabolismo de la dopamina por vías alternativas que no generan ROS, dándoles ciertas propiedades neuroprotectoras, como ha demostrado la rasagilina en una serie de experimentos *in vitro* y en experimentos con pacientes de Alzheimer (Youdim y cols., 2005; Chen y Swope, 2007).

Como se puede observar en la figura 1.36, tanto selegilina como rasagilina tienen en su estructura una unidad propargilamino y los estudios de estructura actividad han mostrado que esta parte de la estructura está relacionada con la actividad inhibidora de la MAO (Duque y cols., 2009).

Por otro lado, Vernalis PLC, bajo licencia de Chiesi Farmaceutici SpA, está realizando estudios con otro fármaco que presenta actividad inhibidora de la MAO, inhibiendo tanto MAO-A como MAO-B (Mattia y Coluzzi, 2007), pero que además ha mostrado actividad antagonista de receptores NMDA, el **indantadol**. Este compuesto tiene unas

características estructurales particulares (Fig. 1.37), con un núcleo indano y una cadena aminoacetamida.

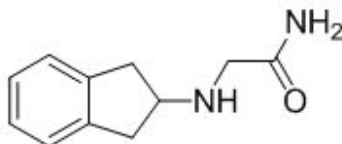


Fig. 1.37. Estructura del compuesto indantadol.

El **N20C** (Fig. 1.38) es otro compuesto con propiedades neuroprotectoras, derivado de glicina, pero que no se une al sitio de unión de glicina. Parece ser un antagonista no competitivo de los receptores NMDA y también presenta un grupo aminoacetamido en su estructura (Planells-Cases y cols., 2002).

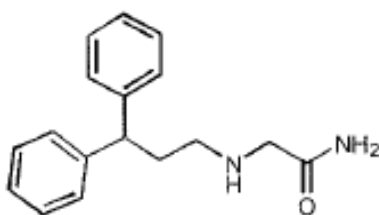


Fig. 1.38. Estructura del compuesto N20C (Planells-Cases R y cols., 2002).

Teniendo en cuenta toda esta información se decidió caracterizar con más profundidad los compuestos sintetizados que tuvieran cierta similitud estructural con los compuestos citados anteriormente (indantadol, N20C, rasagilina y selegilina). Así, se seleccionaron aquellos compuestos de nueva síntesis que tuvieran en su estructura un grupo propargilamino o un grupo aminoacetamido, principalmente compuestos del grupo de los benzohomoxadamantanos, para evaluar su capacidad inhibidora de la MAO.

1.9 Uso de modelos *in vitro* en el desarrollo de fármacos en neurociencias.

Debido a la complejidad de los organismos vivos y en concreto del sistema nervioso, y nuestra falta de conocimiento de todos los procesos bioquímicos implicados en la neurotoxicidad es difícil encontrar un sistema *in vitro* que pueda reemplazar un sistema *in vivo* que pueda ser utilizado en el desarrollo de nuevos fármacos.

Los sistemas *in vitro* han sido útiles en un contexto más aislado y han sido ampliamente usados para definir mecanismos de toxicidad, identificar células diana de la neurotoxicidad y dibujar los cambios celulares inducidos por neurotóxicos (Harry y cols., 1998).

Como se ha comentado en el apartado 1.7, el desarrollo de nuevos compuestos se puede dividir en tres grandes fases (descubrimiento, desarrollo y comercialización).

Previamente a los ensayos, el compuesto candidato debe cumplir un conjunto de criterios químicos, farmacológicos, farmacocinéticos y toxicológicos.

Algunos de estos criterios como la potencia sobre la diana o la biodisponibilidad oral, son requerimientos absolutos, mientras otros como la solubilidad en agua o la falta de genotoxicidad *in vitro* son altamente deseables pero no indispensables (Rang HP 2005).

Como se describe en la tabla 1.3, ciertos criterios necesitan de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Este tipo de ensayos se rigen en gran parte por el principio de las 3 erres, postulado por Russel y Burch, dos biólogos ingleses, en los años 60 en su libro *The Principles of Humane Experimental Technique*. Las 3 erres (Reemplazo, Reducción y Refinado del método) están enfocadas a mejorar y minimizar el uso de animales de experimentación, ya sea en ensayos *in vitro* con el uso de cultivos primarios o en ensayos *in vivo*.

| Químico | Farmacológico | Farmacocinético | Toxicológico |
|----------------------------------|--|---|--|
| Estructura patentable. | Potencia sobre la diana definida. | Permeabilidad celular <i>n vitro.</i> | Test de genotoxicidad <i>in vitro</i> negativo. |
| Soluble en agua. | Selectividad para dianas específicas respecto a otras dianas relacionadas. | Biodisponibilidad oral adecuada. | Test toxicológicos preliminares <i>in vivo</i> . |
| Estabilidad química. | Actividad farmacodinámica <i>in vivo e in vitro.</i> | Para fármacos del SNC: cruzar la barrera hemato-encefálica. | |
| Síntesis factible a gran escala. | Ausencia de efectos adversos en pruebas de seguridad farmacológica. | Vida media en plasma apropiada. | |

Tabla 1.3 Criterios de selección de compuestos candidatos destinados al uso oral (Rang HP 2005, Drug Discovery, Sec 2).

En general, los fármacos son diseñados para actuar a través de un mecanismo específico sobre un receptor. Por eso se puede desarrollar un sistema *in vitro* específico para ese objetivo. El uso de técnicas *in vitro* para identificar un compuesto eficaz y con posibilidades de desarrollo, refinar la acción del fármaco y detectar posibles problemas es extenso (Harry y cols., 1998).

Aunque se reconozca que los sistemas *in vitro* solo ofrecen respuestas parciales a preguntas más complejas son una técnica ampliamente usada y presentan claras ventajas frente a las técnicas *in vivo*. Algunas de estas ventajas son la posibilidad de exponer las células directamente a compuestos, manipular las condiciones ambientales para aumentar, bloquear o modular la respuesta celular, o evaluar la respuesta celular intrínseca a compuestos. Pero también pueden presentar limitaciones en función de las propiedades químicas de los compuestos usados (solubilidad, volatilidad, pH, posible unión con componentes del medio

de cultivo), la falta de un metabolismo más completo o de mecanismos de regulación (Rees, 1980; Schrier, 1982; Balls y Clothier, 1983; Grisham y Smith, 1984; Conning, 1986; Harry y cols., 1998).

Los sistemas *in vitro* más usados en neurofarmacología son los cultivos de órganos (ganglios o órganos sensoriales como el ojo), cultivos organotípicos (principalmente hipocampales, aunque también de cerebelo, córtex o locus coeruleus) que presentan la ventaja de mantener la organización tridimensional, cultivos primarios (células en suspensión o re agregados, cultivos primarios disociados, cultivos neuronales primarios, cultivos primarios gliales) o líneas celulares continuas (líneas celulares de gliomas, líneas celulares de neuroblastoma, células de feocromocitoma). El sistema *in vitro* más usado en neurociencias se basa en los cultivos primarios disociados ya sean de neuronas, células gliales o mixtos (Harry y cols., 1998).

También son muy usadas las líneas celulares. Las líneas celulares continuas normalmente derivan de tejido tumoral (neuroblastomas, gliomas o feocromocitomas). En cultivo estas células tienen un tiempo de vida de aproximadamente 50 divisiones. Las líneas inmortalizadas se generan a partir de estas líneas celulares de tiempo de vida limitado y sus características más interesantes son la homogeneidad, la facilidad con que se obtienen un gran número de células y su condición de inmortalidad (Saneto y cols., 1986; Shahar y cols., 1989).

La homogeneidad de estas líneas celulares puede hacerlas apropiadas para el estudio de la selectividad de neurotóxicos en experimentos de toxicología, pero también puede ser una limitación en cuanto pierden las interacciones típicas de circuitos neuronales.

Una de sus limitaciones es el bajo número de líneas disponibles con fenotipos bien caracterizados *in vivo*. El hecho que deriven de tejido neoplásico puede sugerir un origen que haga a las células anormales y se intente evitar su uso. Pero se ha de tener en cuenta que cualquier célula adquiere características anormales estando en cultivo. Una de las mayores limitaciones de estas células es la dificultad de inhibir la división celular para obtener una población estable de células

diferenciadas. Esta situación es contraria a las condiciones *in vivo*, donde las células en el último estadio de la diferenciación normalmente no se dividen.

Igualmente, las células de cultivos primarios de animales fetales o de temprana edad no presentan las mismas características de las neuronas diferenciadas adultas y necesitan una maduración en cultivo. En células de neuroblastoma y líneas celulares relacionadas, factores tróficos de crecimiento alteran el estado de diferenciación morfológica y la expresión génica. Algunos de estos factores son el NGF (del inglés, nerve growth factor) y el ácido retinoico (Benda y cols., 1968; Harry y cols., 1998).

No está claro si el proceso de diferenciación *in vitro* es equiparable al ocurrido *in vivo*. Además, las líneas celulares parecen ser menos sensibles a tóxicos que los cultivos primarios (Harry y cols., 1998). Aún así, las líneas celulares pueden ser una alternativa a la utilización de cultivos primarios, que exigen el sacrificio de animales de experimentación.

1.10 Modelos *in vitro* utilizados en el presente estudio.

Uno de los mecanismos mejor caracterizados en neurotoxicidad es la liberación excesiva del neurotransmisor excitador glutamato. La identificación y comprensión del proceso excitotóxico ha sido posible gracias al uso de diversos sistemas *in vitro*, como rodajas hipocampales, cultivos primarios de células hipocampales, corticales y granulares de cerebelo, oocitos de *Xenopus* y diversas líneas celulares derivadas de neuroblastoma (Harry y cols., 1998).

Para realizar las distintas evaluaciones de los compuestos nos planteamos hacer un pequeño estudio comparativo de los modelos usados en este tipo de experimentos relacionados con la excitotoxicidad y la neuroprotección. Como hemos visto, la excitotoxicidad inducida por glutamato es un fenómeno ampliamente

distribuido entre los distintos tipos celulares del cerebro, dada la gran ubiquidad del glutamato y sus sinapsis excitadoras.

Anteriormente se ha mostrado la distribución de los receptores glutamatérgicos, concretamente los ionotrópicos tipo NMDA, en el sistema nervioso central y es una información que se ha considerado a la hora de escoger los diferentes modelos evaluados. Otro factor tenido en cuenta ha sido la distinta afectación celular neurodegenerativa observada en las diferentes enfermedades de esta índole.

De los distintos cultivos neuronales, primarios o líneas celulares, usados en el campo de la neurociencia, se han seleccionado los que presentaban mayor uso en el estudio del fenómeno de excitotoxicidad en las distintas enfermedades neurodegenerativas y que clásicamente se han utilizado para el estudio de la neurotransmisión glutamatérgica.

Por esto se seleccionaron cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata de 7-8 días de edad, cultivos primarios de células hipocámpales de embrión de ratón de 18 días de gestación, cultivos primarios de células corticales de embriones de rata de 18 días de gestación, la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano y la línea celular STHdh^{Q7} y STHdh^{Q111} que son células estriatales que presentan una mutación en la proteína huntingtina (mhtt), usadas principalmente para el estudio de la enfermedad de Huntington.

Debido a las diferencias temporales en el desarrollo de diferentes áreas cerebrales, los cultivos de cada zona específica se realizan con animales de diferentes edades (Harry y cols., 1998).

1.10.1 Cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata.

El cerebelo (Fig. 1.39) se sitúa en la parte posterior del cerebro y es en esencia un componente motor del encéfalo. Tiene una corteza muy amplia que está muy plegada con una extensión de tres cuartos de la corteza cerebral.

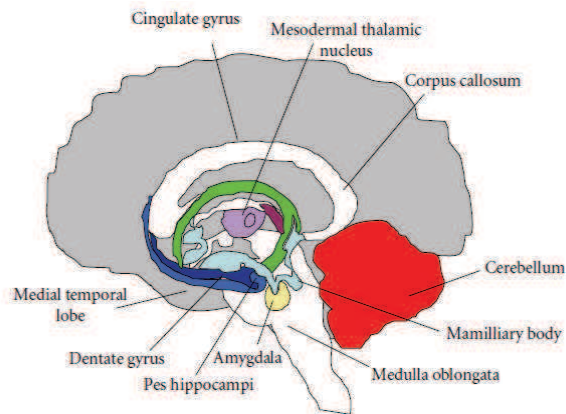


Fig. 1.39. Representación del encéfalo en la que se destacan algunas zonas como el cerebelo (en rojo).

Se considera que existen 3 capas en la corteza cerebelosa (Fig. 1.40), cada una con composición celular distinta. Desde la superficie, la primera capa está constituida por células de Purkinje, la sigue la capa molecular (con interneuronas pero sobre todo una zona sináptica) y la capa de células granulares.

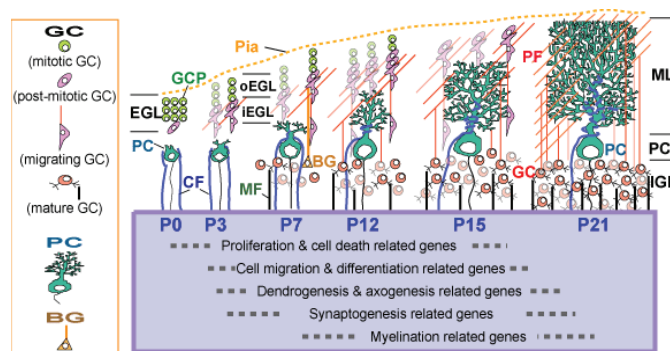


Fig. 1.40. Esquema del desarrollo de neuronas granulares de cerebelo en el que se puede observar la formación de las tres capas (Extraído de www.brain.riken.jp)

Como se ha comentado en el apartado 1.3, el cerebelo es una zona con abundante presencia de rNMDA, principalmente formados por subunidades tipo NR1, que se expresa en la mayor parte del cerebro, subunidades NR2A y subunidades NR2C, prácticamente exclusiva de esta zona.

Por otro lado, este tipo de cultivo celular primario es ampliamente conocido y usado en el campo de la neurociencia, como estudios relacionados con la excitotoxicidad o la apoptosis. Estos cultivos preparados según Nicoletti y cols. (1986), contienen un alto porcentaje de células granulares (95% aprox.) y constituyen un modelo de estudio robusto y gran estabilidad (Verdaguer y cols., 2002).

1.10.2 Cultivos primarios de células hipocámpales de ratón.

El **hipocampo** forma parte del sistema límbico del cerebro (Fig. 1.41) y tiene 3 áreas o sectores llamados CA1, CA2 y CA3. También se conocen tres láminas en la corteza del hipocampo. La lámina molecular (situada en el centro de la formación hipocámpica), la lámina de células piramidales (grandes neuronas que son de las primeras en verse afectadas en diversas alteraciones de memoria e intelectuales como la EA) y la lámina polimórfica que contiene axones, dendritas e interneuronas.

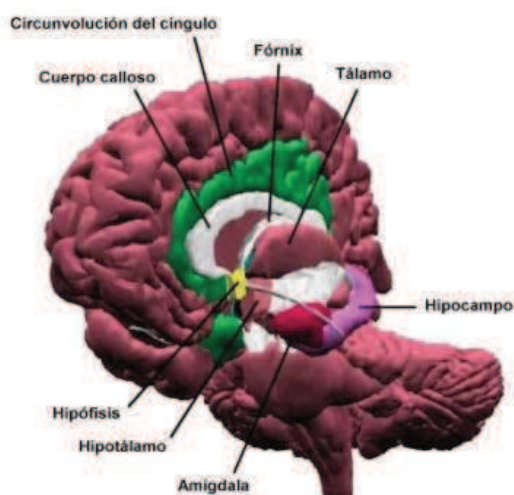


Fig. 1.41. Esquema de parte del sistema límbico donde se indica el hipocampo.

Ésta es la zona más rica en expresión de rNMDA, principalmente la región CA1 del hipocampo, como se ha mencionado anteriormente

(Monyer y cols. 1994; Ozawa y cols., 1998). En general el hipocampo es rico en subunidades tipo NR1, NR2A y NR2B.

Estos cultivos se han realizado a partir de un protocolo cedido por la Dra. Crespo-Biel de la unidad de Farmacología y Farmacognosia de la facultad de farmacia de la UB.

1.10.3 Cultivos primarios de células corticales de rata.

Cada hemisferio cerebral tiene un manto de sustancia gris, **la corteza cerebral**, con una estructura característica que consiste en cuerpos celulares neuronales y axones dispuestos en láminas, como se observa en la figura 1.42.

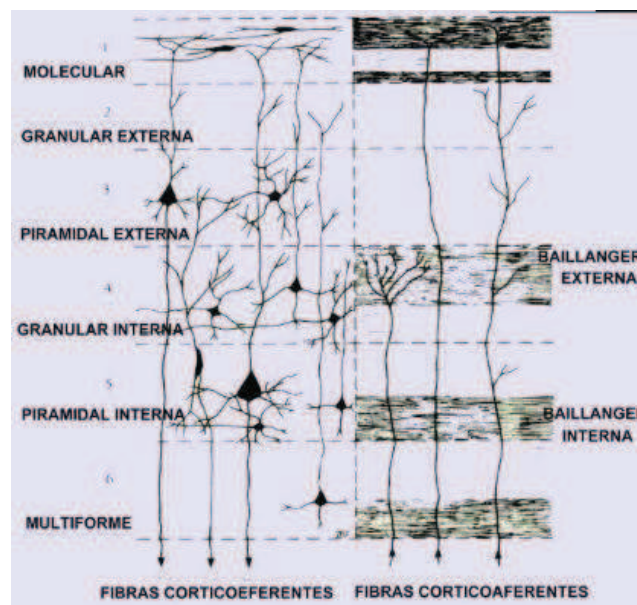


Fig. 1.42. Esquema de las diferentes láminas en que se divide la corteza cerebral y su composición celular.

Las células principales se conocen como células piramidales y las piramidales gigantes se conocen como células de Betz y se presentan sólo en el área motora primaria del lóbulo frontal. Cerca de dos tercios

de las neuronas corticales son células piramidales. Los axones de las neuronas piramidales son excitatorios en su sinapsis y se considera que usan glutamato como neurotransmisor.

Las diferentes láminas (omitiendo diferencias regionales) de la corteza a partir del exterior son 1 la lámina molecular (con predominio de ramas terminales de dendritas y axones), 2 la lámina granular externa (con muchas células piramidales pequeñas e interneuronas), 3 la lámina piramidal externa (con neuronas piramidales típicas), 4 la lámina granular interna (principalmente con células estrelladas y algunas interneuronas o células piramidales), 5 la lámina piramidal interna (con células piramidales grandes mezcladas con interneuronas y finalmente 7 la lámina multiforme (con células fusiformes típicas de esta lámina y algunas células piramidales e interneuronas).

En cuanto a la presencia de rNMDA, el córtex también es una de las zonas más ricas, expresando principalmente subunidades de tipo NR1 y NR2, concretamente las isoformas A y B (ver apartado 1.3).

El cultivo de estos tipos celulares se ha realizado siguiendo el protocolo descrito por Petegnief y cols., 2001, para obtener un cultivo principalmente neuronal con la inhibición del crecimiento de las células no neuronales.

Los cultivos presentados hasta ahora son cultivos primarios en los que se realiza la disección y obtención del tejido neuronal deseado, para su posterior cultivo.

Se ha querido trabajar también con líneas celulares tumorales para poder comparar y clarificar las ventajas o inconvenientes en comparación con los cultivos primarios, como posibles modelos *in vitro* para realizar experimentos de excitotoxicidad o neuroprotección.

1.10.4 Línea celular SH-SY5Y.

La línea celular **SH-SY5Y** proviene de neuroblastoma humano, un tumor de la infancia que deriva de células precursoras o inmaduras del sistema nervioso simpático (SNS). En concreto, es un subclon de la línea celular SK-N-SH (Edsjö y cols., 2007).

Como se ha comentado con anterioridad, la mayoría de líneas celulares necesitan de ciertos inductores de diferenciación celular que alteren el estado morfológico y la expresión génica.

Para la diferenciación celular de la línea celular SH-SY5Y se han descrito algunos inductores como ciertos forbolésteres biológicamente activos (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato o TPA (Pahlman y cols., 1981; Edsjö y cols., 2007), factores de crecimiento como el NGF (Vuillaume y cols., 2001), pero principalmente ácido retinoico (del inglés, RA) (Enzinas y cols., 2000; Rastinejad, 2001; Singh y Kaur, 2007; Kullikov y cols., 2007; Cheung y cols., 2009).

Las líneas celulares de neuroblastoma se diferencian a células que son bioquímicamente, ultraestructuralmente y electrofisiológicamente similares a neuronas (Abemayor y Sidell, 1989; Edsjö y cols., 2007).

Además se ha descrito la presencia de receptores NMDA funcionales en esta línea celular (Nair y cols., 1996; Sun y Murali, 1998).

1.10.5 Línea celular STHdh^{Q7} y STHdh^{Q111}.

Las líneas celulares **STHdh^{Q7}** y **STHdh^{Q111}** son células estriatales, es decir del cuerpo estriado.

El cuerpo estriado es una voluminosa región de sustancia gris cerca de la base de cada hemisferio cerebral y consiste en el núcleo caudado y el núcleo lentiforme que se divide en el putamen y el globo pálido.

La terminología de esta zona es variada y también se usa la nomenclatura de estriado para indicar el putamen y núcleo caudado.

Las células principales del núcleo caudado y el putamen son neuronas de tamaño medio con dendritas espinosas.

Uno de los modelos usados para estudiar la EH son las células precursoras de neuronas estriatales inmortalizadas de un modelo de ratón Knock-in (KI-**STHdh**^{Q111}) (Trettel y cols., 2000; Lim y cols., 2008). Las células estriatales **STHdh**^{Q111} derivan de embriones Hdh^{Q111/Q111}.

Las células de esta línea inmortalizada normalmente crecen a 33^o C, pero cuando se mantienen a 39^o C pierden la proteína SV40 tsA58 y la proliferación cesa (Trettel y cols., 2000).

En este trabajo se han utilizado células STHdh^{Q7} (con un tramo de 7 glutaminas) y STHdh^{Q111} (con 111 glutaminas). Como se ha comentado anteriormente, la enfermedad de Huntington se manifiesta con mutaciones que presenten tramos poly Q superiores a 35 glutaminas. Este fenotipo molecular temprano (STHdh^{Q111}) parece mostrar excitotoxicidad a través del influjo de iones calcio, provocado por una disminución de la síntesis de ATP mitocondrial y potenciado por la activación de receptores NMDA (Gines y cols., 2003; Fan y Raymond, 2007; Paoletti y cols., 2008).

Esta variación en el comportamiento de las células wild-type (STHdh^{Q7}) y las mutadas (STHdh^{Q111}), nos pareció interesante para el estudio del antagonismo de los receptores NMDA.

Con este objetivo nos pusimos en contacto con la Dra. Silvia Ginés del IDIBAPS de Barcelona, que nos proporcionó amablemente las dos cepas celulares.

1.11 Pruebas toxicológicas *in Vivo*.

La valoración del riesgo de toxicidad sistémica aguda después de una exposición oral se basa en la aparición de signos de efectos adversos en los 14 días posteriores a la administración de una única dosis dada a un animal.

El clásico test de la dosis letal 50 (del inglés, LD50) (TG401), fue retirado de la guía de la Organización para la cooperación económica y el desarrollo (del inglés, OECD) en 2002 y sustituida por tres métodos alternativos. Estos son el procedimiento de dosis fija (TG 420), el método clásico de toxicidad aguda (TG423) y el procedimiento “up and down” (TG425). De este modo se consigue reducir y refinar la metodología para la estimación de la toxicidad sistémica aguda (Test Guidelines for acute oral toxicity testing, OCDE 2007; Forsby A y cols., 2009).

Debido a la falta de información existente sobre la toxicidad y características ADME de los compuestos a valorar, en este trabajo se optó por una modificación del método TG425 (2008) de la OECD.

Los compuestos AK, del Dr. Kolocouris y su equipo de la universidad de Atenas, tienen una estructura similar a amantadina y fueron sintetizados con el objetivo de obtener compuestos que presentaran actividad anti influenza A (igual que amantadina).

Como se ha ido comentando a lo largo de este trabajo, amantadina también presenta actividad antagonista de los receptores NMDA. Con el objetivo de descartar posibles efectos a nivel de SNC se evaluaron los compuestos AK con mayor actividad antivírica.

El procedimiento de “up and down” consiste en la administración oral de una dosis del compuesto a valorar a un animal (roedor). Si el animal muere, al siguiente animal se le administra una dosis menor. Si el animal sobrevive, al siguiente animal se le administra una dosis mayor. Este test es el más fácil para compuestos que pueden producir la muerte en un par de días (Test Guidelines for acute oral toxicity testing, OECD 2007).

Además de realizar el procedimiento TG425 modificado, se decidió realizar una batería de observación funcional (del inglés, FOB) a los animales que sobrevivieran para poder valorar mejor la afectación a nivel de SNC.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

En la actualidad, no se dispone todavía de suficientes herramientas farmacológicas que permitan abordar con eficacia el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica entre otras.

Además, estos trastornos están relacionados con la edad por lo que el envejecimiento de la población constituye un motivo de preocupación adicional a la falta de opciones terapéuticas para estas enfermedades. Ello repercute, sin duda, en un elevado coste sanitario, económico y social.

Habida cuenta que una de las estrategias más utilizadas en química farmacéutica es la síntesis de nuevos compuestos con características similares a otros fármacos ya comercializados, se plantea la siguiente **hipótesis de trabajo:**

- 1. Los compuestos que poseen un núcleo lipofílico con características estructurales y fisicoquímicas similares a la memantina pueden antagonizar la activación del receptor NMDA de manera parecida a este fármaco neuroprotector, y quizá, mostrar un espectro farmacológico más amplio, incluso sobre otros receptores, que permita una mejora en la eficacia de futuros compuestos neuroprotectores.**
- 2. Además, compuestos que contienen un grupo propargilamino y/o un grupo aminoacetamido pueden mostrar actividad inhibidora de la monoamino oxidasa MAO, lo que podría complementar su acción terapéutica.**
- 3. Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo son la técnica in vitro más usada para estudios de excitotoxicidad y neuroprotección. Cultivos primarios de**

otras zonas cerebrales afectadas en enfermedades neurodegenerativas y con presencia de rNMDA pueden ser también buenos modelos para experimentos relacionados con la excitotoxicidad y la neuroprotección.

Con la finalidad de verificar esta hipótesis, se han planteado los siguientes **objetivos**:

- 1.- Verificar la validez de la determinación intracelular de calcio con sondas fluorescentes en un cultivo neuronal como herramienta de *screening* farmacológico de nuevos compuestos.**
- 2.- Valorar la capacidad antagonista de los nuevos compuestos, cedidos por el Dr. Santiago Vázquez y su equipo de la Universidad de Barcelona, clasificados según su estructura en diferentes grupos como bisnoradamantanos, noradamantanos, oxadamantanos, benzohomooxadamantanos, pentaciclos, benzohomonoradamantanos y otros adamantanos, sobre los receptores glutamatérgicos a través de la definición de su potencia para evitar la entrada de calcio inducida por glutamato o por el agonista selectivo N-metil-D-aspartato en un sistema de cultivo neuronal.**
- 3.- Valorar la capacidad antagonista de un grupo de adamantanos y adamantanoles cedidos por el Dr. Antonios Kolocouris de la Universidad de Atenas, sobre los receptores glutamatérgicos a través de la definición de su potencia para evitar la entrada de calcio a través de receptores glutamatérgicos en un sistema de cultivo neuronal.**
- 4.- Valorar la capacidad antagonista de un grupo de compuestos cedidos por la Dra. Carmen Escolano de la Universidad de Barcelona, con similitudes estructurales a rincofilina sobre los receptores glutamatérgicos.**

5.- Evaluar la capacidad neuroprotectora de algunos de los compuestos más potentes en un modelo de excitotoxicidad *in vitro*, en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo.

6.- Evaluar la capacidad inhibidora sobre la enzima monoamino oxidasa (MAO) de una selección de los compuestos evaluados con estructura benzohomooxadamantano.

7.- Valorar el uso de diferentes sistemas *in vitro* para el estudio de la excitotoxicidad, la neuroprotección y el desarrollo de nuevos fármacos de acción sobre la neurotransmisión glutamatérgica, ya sean cultivos primarios o diferentes tipos de líneas celulares.

8.-Evaluar la presencia de efectos adversos presentados por ciertos compuestos a través de la valoración de su toxicidad sistémica aguda en roedores.

MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los experimentos de movilización de calcio y de neuroprotección se han utilizado cultivos neuronales de diferente procedencia (primarios o líneas celulares) que se han hecho crecer en diferentes soportes en función del experimento requerido/realizado (placas de 24 o 96 pozos)

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS. El día anterior al emplacaje de las células se procede a la polilisinización de las placas. Las placas de 24 pozos llevan un vidrio redondo de 22µm y 10mm de diámetro al fondo de cada pozo que se polilisinizará conjuntamente. Se prepara una solución de poli-L-lisina a la concentración de 0.1mg/ml (1X). En placas de 24 pozos se incuban 0.5ml por pozo de poli-L-lisina 1X, en placas de 96 pozos 200µl. Tras 45min de incubación, se retira la solución mediante aspirado con bomba de vacío y se dejan secar las placas en condiciones de esterilidad. Para los estudios de movilización de calcio, se disponen sendos portaobjetos circulares estériles en cada pozo previamente a la polilisinización. Para los cultivos de neuronas hipocámpales se realizan dos o tres lavados con agua Milli-Q después de la polilisinización.

3.1 Cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata.

REACTIVOS.

- Hidrobromuro de Poli-L-lisina (SIGMA; P6282-5MG).
- NaCl (PROLABO; 27810-295).
- KCl (PANREAC; Cod. 141494).
- KH₂PO₄ (PANREAC; Cod. 121509).
- D-Glucosa (PANREAC; Cod. 141341).
- NaHCO₃ (PROBUS; 2030).
- Rojo fenol (SIGMA; P3532).

Materiales y métodos

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA; M1880).
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PANREAC; Cod. 141215).
- Medio BME; Basal Medium Eagle sin glutamina (Cat. No. 41010-026) de GIBCO®.
- FBS; Fetal Bovine Serum Certified (Cat. No. 16000-044) de GIBCO® (Invitrogen). Inactivado por calor, 30min a 56°C
- BSA; Albumina de Serum Bovino, indicado para cultivo celular (SIGMA; A9418).
- Tripsina de páncreas bovino, ≥ 7.500 BAEE unidades/mg sólido (SIGMA; T9201).
- SBTI; Inhibidor de Tripsina de soja, tipo I-S (SIGMA; T9003).
- DNAsa I de páncreas bovino, tipo IV, liofilizado, $\geq 80\%$ de proteína, ≥ 2000 Kunitades/mg proteína (SIGMA; D5025).
- Sal de sulfato de Gentamicina, para cultivo celular (SIGMA; G1264).
- L-Glutamina, para cultivo celular (SIGMA; G6392).
- Hidrocloruro de citosín- β -D-arabinofuranosido (SIGMA; C6645).

SOLUCIONES.

Poli L lisina 10X (5mg/50ml): dentro del mismo frasco de 5mg de poli-L-lisina se añaden 50ml de agua Milli-Q estéril. Esta solución 10X se almacena en tubos de 15ml a -20°C. A partir de ésta, se prepara extemporáneamente la cantidad necesaria para cada cultivo.

Krebs buffer 10X: se conserva en tubos de 50ml a 4°C (composición: NaCl 3.53g, KCl 180mg, KH_2PO_4 83mg, Glucosa 1.285g, NaHCO_3 1.07g, Rojo fenol 5mg y H_2O Milli-Q q.s.p. 50ml).

MgSO₄ stock al 3.82%: 382g de MgSO_4 en 10ml de agua Milli-Q. Conservar en tubos de 15ml a 4°C.

CaCl₂ stock al 0.18%: 18mg de CaCl_2 en 10ml de agua Milli-Q. Conservar en tubos de 15ml a 4°C.

Soluciones que se preparan justo antes de la realización de los cultivos (para aprox. 10 crías de rata).

Solución A: 150mg BSA, 5ml Krebs stock 10X, 0.4ml MgSO₄ stock. Añadir H₂O esterilizada hasta 50ml.

Solución B: 3.12mg Tripsina. Añadir solución A hasta 12.5ml.

Solución C: 3.9mg SBTI, 1.2mg DNAsa, 0.075ml MgSO₄ stock. Añadir solución A hasta 7.5ml.

Solución D: 10.5ml de solución A más 2ml de solución C.

Solución E: 6.25ml de solución A, 0.05ml MgSO₄ stock y 0.05ml CaCl₂ stock.

Solución GGK (para 120ml de medio completo): 6mg de gentamicina, 34.8mg de glutamina y 198mg de KCl en 5ml de BME. Se filtra con filtro estéril de 0.22µm.

Todas las soluciones se filtran a través de un filtro (0.22 µm) y se pasan a tubos de 15ml.

Se prepara el medio completo que consiste en la solución GGK a la que se añade un 10% del volumen final de medio completo deseado y se ajusta el volumen final con BME.

ANIMALES. Estos cultivos se realizan a partir de crías de rata Sprague-Dawley®(Fig. 3.1) de 7 días de vida. El número de animales a sacrificar dependerá de la cantidad de placas que se quieran obtener.



Fig. 3.1 Cepa de rata Sprague-Dawley®, albina.

Los animales fueron acomodados en jaulas de Makrolon en el estabulario de la facultad de Medicina y ciencias de la salud de Reus,

Materiales y métodos

bajo condiciones estándar de temperatura (22 ± 2 °C), humedad relativa (50 ± 10 %) y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas diarias (luz 8:00-20:00). En todo momento los animales recibieron agua del grifo y pienso *ad libitum* (dieta estándar Panlab, A04 para roedores, Barcelona).

En todo momento se siguieron las normas aprobadas por la Generalitat de Catalunya para la manipulación de animales de experimentación. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de animales de experimentación de la Universitat Rovira i Virgili.

DISECCIÓN. Para realizar la disección se prepara el material necesario y las soluciones estériles. Antes de empezar se limpia la zona de trabajo dentro de la campana de flujo con etanol al 70% y se cubre con un papel mojado también con etanol, colocando encima dos placas de 35mm de diámetro con solución A y una placa de 100mm.

Se seccionan las cabezas de los animales y con la ayuda de pinzas y tijeras pequeñas se extraen los cerebelos y se depositan dentro de las placas de 35mm con solución A. Seguidamente se quitan las meninges y una vez limpios se disponen los cerebelos en la placa de 100mm. Se seccionan en dos direcciones ortogonales con una cuchilla estéril y se pasan a un tubo de centrifugación que contiene el resto de solución A. Se centrifugan durante 2min a 1000rpm.

Se decanta el sobrenadante (SN) y se resuspende el pellet con la solución B. La suspensión se transfiere a un frasco de 50ml y se incuba 15' al baño a 37 °C en agitación suave.

Se recogen los fragmentos del frasco del baño con una pipeta Pasteur corta (para no disgregar demasiado), y se traspasan al tubo que contiene la solución D, para su posterior centrifugación durante 3' a 1000rpm.

Tras la misma, se decanta el SN y se resuspende el pellet con 2-3ml de la solución C. La disgregación de las células se produce por pipeteo (25-

30 veces) con ayuda de una pipeta Pasteur larga. Se añade el resto de la solución C y se pipetea unas 15 veces más. Se deja sedimentar la suspensión durante 10'.

Transcurridos 10' se recoge el SN y se transfiere al tubo que contiene la solución E. La suspensión restante se vuelve a pipetear unas 10 veces más y se deja sedimentar 10'.

Posteriormente, se recoge el SN libre de partículas macroscópicas y se centrifuga durante 7' a 1000rpm. Seguidamente se descarta el SN y se resuspende el pellet con 5 o 10ml de medio completo.

Una alícuota de 50µl de la suspensión final se destina al recuento de células mediante cámara de Neubauer.

Según el rendimiento obtenido se realizarán los cálculos necesarios para emplacar las placas que se deseen a una densidad de $1,2 \cdot 10^6$ cel/ml.

Los volúmenes a emplacar en cada pozo dependen del tipo de placa de cultivo. Para placas de 96 pozos el volumen ideal es de 200µl y para las de 24 pozos es de 500µl. Tras el emplacado, las células se mantienen en el incubador a 37 °C.

Entre las 16 y 18 horas posteriores al emplacado se añade hidrocloreuro de citosín arabinósido (10µM)(Fig. 3.2), conocido también como Ara-C o citarabina. Este compuesto es transformado por las células a la forma trifosfato araCTP, que es un inhibidor de la polimerasa del DNA celular (Saura, J; 2007). De esta forma, se inhibe la proliferación de los astrocitos presentes en el cultivo (5-7% del total de células). Las neuronas se consideran maduras a partir del séptimo día *in vitro* (DIV) y son viables hasta los 12-13 DIV.

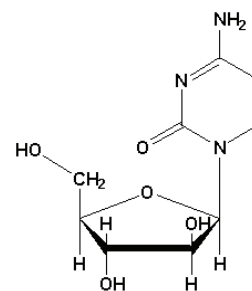


Fig. 3.2 Estructura química del citosín arabinósido o Ara-C.

Materiales y métodos

3.2 Cultivos primarios de células hipocampales de embriones de 18 días (E18) de ratón.

REACTIVOS.

- Hidrobromuro de Poli-L-lisina (SIGMA; P6282-5MG).
- D-Glucosa (PANREAC; Cod. 141341).
- Tampón fosfato PBS. Para preparar un litro se necesita 8g de NaCl (PROLABO; Cod. 27810-295), 2g de Na₂HPO₄ (PANREAC; Cod 131679), 0.2g de KCl (PANREAC; Cod. 141494), 0.15g de KH₂PO₄*3H₂O (PANREAC; Cod. 121509) y H₂O destilada.
- DNAsa I de páncreas bovino, tipo IV, liofilizado, ≥80% de proteína, ≥2000 Kunitades/mg proteína (SIGMA; D5025).
- Tripsina de páncreas bovino, ≥7.500 BAEE unidades/mg sólido (SIGMA; T9201).
- Suero bovino fetal (FBS), Fetal Bovine Serum (Cat. No. 16000-044) de GIBCO® (Invitrogen).
- Medio DMEM; Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose, con 4500mg/L glucosa y bicarbonato sódico, sin L-glutamina y piruvato sódico, líquido, filtrado y estéril (SIGMA; D5671).
- Medio Neurobasal™ (1X) líquido (Cat. No. 21103-049)(Invitrogen).
- Complemento B27 libre de suero (50X), líquido (Cat. No. 17504-044)(Invitrogen): es un suplemento para el crecimiento y viabilidad a largo plazo de neuronas hipocampales. Se usa combinado con medio basal tipo Neurobasal™ Medium.
- Complemento B27 menos AntiOxidantes (AO) (50X), líquido (Cat. No. 10889-038)(Invitrogen): es el complemento B27 sin antioxidantes que podrían interferir en estudios de estrés oxidativo.
- Penicilina-Estreptomicina, líquida (Cat. No. 15140-122)(Invitrogen): Contiene 10,000 unidades de penicilina (base) y 10,000 µg de estreptomicina (base)/ml.
- L-Glutamina, para cultivo celular (SIGMA; G6392).

SOLUCIONES.

PBS 0,6% GLUCOSA: 1,2g de D-glucosa en 200ml de PBS (preparado previamente), ajustar el pH a 7,4 y filtrar para esterilización.

TRIPSINA 2mg/ml: 14mg de tripsina en 7ml de PBS, se filtra para esterilización.

ANIMALES. Estos cultivos se realizan con fetos de ratones hembras gestantes de 18 días, de la cepa CD1 (Fig. 3.3). El número de individuos a utilizar dependerá de la cantidad de placas que se quieran obtener.



Fig. 3.3. Cepa CD1 de ratón, albina.

Los animales se acomodaron bajo las mismas condiciones que el caso anterior y se siguieron las mismas normas para la manipulación de animales de experimentación.

DISECCIÓN. Antes de empezar se limpia la zona de trabajo con etanol al 70%. El material tiene que estar autoclavado previamente y las soluciones necesarias y las muestras obtenidas se mantendrán siempre en hielo.

Tras anestesia, se sacrifica el ratón hembra gestante por dislocación cervical. A continuación se realiza una incisión abdominal por donde se podrán extraer los embriones del útero, que se colocan en una placa de Petri con PBS al 0.6% de glucosa a 4°C. Posteriormente, se extraen los embriones (12-15) de su bolsa amniótica y se decapitan. Se sujeta la cabeza con la ayuda de unas pinzas y se abre incidiendo una tijera por el agujero medular. Se extrae el cerebro entero que posteriormente se separa en sus dos hemisferios para facilitar el acceso a la zona límbica (Fig. 3.4). Es muy importante limpiar bien las meninges para evitar una elevada presencia de glía en el cultivo. Una vez extraídos, con una lupa

Materiales y métodos

binocular Cambridge Instruments de 10.5-45 aumentos, se identifica y se extrae la zona hipocampal. Las muestras extraídas se depositan en una placa de Petri pequeña con PBS al 0.6% de glucosa.

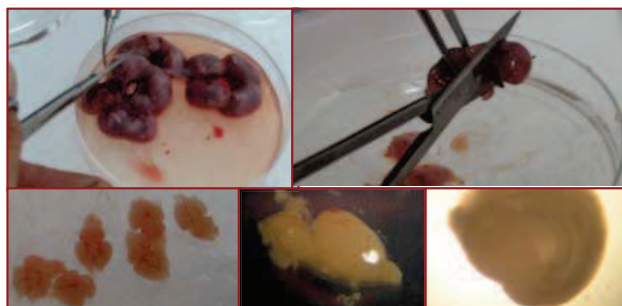


Fig. 3.4. Proceso de disección en los cultivos primarios hipocampales.

Una vez obtenidos todos los hipocampos, se aspira el PBS de la placa pequeña con una micropipeta y se añaden 2ml de medio de cultivo completo, que contiene (para 100ml):

| | |
|---------------------------|--------------|
| Penicilina/Estreptomicina | 1ml |
| Complemento B27 | 2ml |
| Medio Neurobasal™ | q.s.p. 100ml |

Seguidamente se recoge el contenido de la placa y se transfiere a un frasco de 50ml estéril que contiene la solución de tripsina. Se incuba a 37°C en agitación suave durante unos 15'. Transcurrido este tiempo, se traspasa el contenido del frasco a un tubo de 15ml y se añade medio de cultivo para hacer uno o dos lavados, centrifugando durante 3' a 1000rpm. Si es necesario, en el último lavado se puede añadir 1-1.5mg de DNAsa. A continuación de los lavados, se añaden unos 5ml de medio de cultivo y se disgrega mecánicamente con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio estéril. Una vez disgregado completamente el tejido se realiza el recuento de las células a partir de una dilución 1:10, en una cámara de Neubauer. Una vez se conoce el rendimiento, se realiza la

dilución necesaria para obtener una densidad en placa de 300000cel/ml.

Los volúmenes que se usarán son los mismos que los presentados para el cultivo de células granulares de cerebelo, 0.2ml por pozo de placa de 96 y 0.5ml por pozo de placa de 24. Ya sembradas las células, se mantienen a 37 °C en un incubador. Cuatro días después de la siembra se realizará un cambio de medio de cultivo que se repetirá cada cuatro DIV, aspirando lentamente el medio presente en el pozo con la ayuda de una bomba de vacío y añadiendo el mismo volumen de medio de cultivo nuevo. En este medio de cultivo nuevo se sustituirá el complemento B27 por otra formulación del complemento B27 sin antioxidantes (AO), para no interferir con el curso de los cultivos.

3.3 Cultivos primarios de células corticales de embriones de 18 días (E18) de rata.

REACTIVOS.

- Hidrobromuro de Poli-L-lisina (SIGMA; P6282-5MG).
- Tripsina 0.05%(1X) con 0.53mM EDTA 4Na, líquido (Cat. No. 25300-104) de Invitrogen.
- Suero bovino fetal (FBS), Fetal Bovine Serum (Cat. No. 16000-044) de GIBCO® (Invitrogen).
- Medio MEM, Minimum Essential Medium Eagle, con sales Earle, L-glutamina y bicarbonato sódico, líquido, filtrado y estéril (SIGMA; M4655).
- DNAsa I de páncreas bovino, tipo IV, liofilizado, ≥80% de proteína, ≥2000 unidades/mg proteína (SIGMA; D5025).
- Sal de sulfato de Gentamicina, para cultivo celular (SIGMA; G1264).
- Hidrocloruro de citosín-β-D-arabinofuranosido (SIGMA; C6645).
- Complemento B27 libre de suero (50X), líquido (Cat. No. 17504-044) de Invitrogen.

SOLUCIONES.

Medio MEM/Suero: medio MEM+10%FBS.

Gentamicina 0.1mg/ml en medio MEM.

DNAsa 100U/ml en medio MEM.

ANIMALES. En este tipo de cultivo se han usado embriones de rata de 18 días. La cepa de rata utilizada es la Sprague-Dawley.

Se han acomodado los animales del mismo modo que para los dos cultivos presentados anteriormente, bajo las mismas condiciones y siguiendo las mismas normas para la manipulación de animales de experimentación.

DISECCIÓN. Igual que en los cultivos primarios anteriores, antes de empezar se limpiará la zona de trabajo con etanol al 70%. También el material tiene que estar en condiciones de esterilidad y mantener constantemente las muestras en hielo.

Tras anestesia, se sacrifica a la rata gestante por dislocación cervical y se procede a la extracción de los embriones de sus sacos amnióticos y se decapitan. Con la ayuda de pinzas y tijeras se extraen los cerebros limpiándolos bien para eliminar en la medida de lo posible las meninges. Una vez limpios se separa el córtex y se disponen en una placa con medio MEM frío. Cuando se han extraído todos los córtex, se traspasa el contenido de la placa a un tubo de 15ml para centrifugar durante 2min a 800rpm. Seguidamente se decanta el SN y se añaden unos 6ml de tripsina-EDTA para cada 12-15 córtex, se incuba a 37 °C y en agitación durante unos 15min. Transcurrido el tiempo, se añaden 89µl de DNAsa (100U/ml) y 4ml de medio MEM/Suero. Seguidamente se trituran los córtex con la ayuda de una pipeta de plástico de 10ml y una vez disociados se centrifugan durante 5min a 800rpm para eliminar la tripsina. Después de descartar el SN, se añaden 2ml de medio MEM templado+20µl de DNAsa+1ml MEM/suero y se disgrega el pellet con

una pipeta Pasteur estéril. Una vez disgregado, se añaden 3ml de medio MEM y 3ml de medio MEM/suero, obteniéndose un volumen final aproximado de 11ml. En este momento se deja sedimentar unos 5min y transcurrido el tiempo se traspasa el SN a un nuevo tubo y se añaden 4-5ml de medio MEM. Si es necesario se vuelve a disgregar y posteriormente se centrifuga durante 4min a 800rpm. Finalmente se resuspende el pellet con 10ml de medio MEM/suero y posteriormente se transfiere a un frasco con 50ml del mismo medio. De esta suspensión final se toman 2 alícuotas para realizar el recuento con cámara de Neubauer. La densidad final se ajusta a 700000 cel/ml.

4DIV: Al cuarto día in Vitro se añaden 6 μ M de citosin arabinósido (Ara-C) en el medio de cultivo de los pozos.

7DIV: se retiran 300 μ l de cada pozo y se añaden 200 μ l de medio MEM/B27 con 3 μ M de Ara-C. Este medio nuevo se prepara con un 2% de B27.

Al décimo DIV: se retiran 200 μ l por pozo y se añaden otros 200 μ l por pozo de medio nuevo, exactamente igual que el usado en el cambio anterior.

3.4 Mantenimiento y subcultivo de la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano.

Como se ha comentado en la Introducción, la línea celular SH-SY5Y proviene de neuroblastoma humano, obtenida originalmente a partir de una biopsia de médula ósea.

REACTIVOS.

- Medio MEM, Minimum Essential Medium Eagle, con sales Earle, L-glutamina y bicarbonato sódico, líquido, filtrado y estéril (SIGMA; M4655).

Materiales y métodos

- Medio F12 Nutrient Mixture (Ham), líquido (Cat. No. 21765-029) de GIBCO® (Invitrogen).
- Penicilina-Estreptomicina, líquida (Cat. No. 15140-122)(Invitrogen): Contiene 10,000 unidades de penicilina (base) y 10,000 µg de estreptomicina (base)/ml.
- Tripsina 0.05%(1X) con 0.53mM EDTA 4Na, líquido (Cat. No. 25300-104) de Invitrogen.
- Suero bovino fetal (FBS), Fetal Bovine Serum (Cat. No. 16000-044) de GIBCO® (Invitrogen).
- Aminoácidos no esenciales, MEM non Essential Amino Acids (100X), líquido (Cat. No. 11140-035) de GIBCO® (Invitrogen).
- NaCl (PROLABO; 27810-295).
- KCl (PANREAC; Cod. 141494).
- KH₂PO₄ (PANREAC; Cod. 121509).
- D-Glucosa (PANREAC; Cod. 141341).
- Na₂HPO₄ (PANREAC; Cod 131679).
- Rojo fenol (SIGMA; P3532).
- Acido Retinoico (FLUKA; 95152).
- Dimetil sulfóxido (DMSO), pureza ≥99.5% (SIGMA; 41644) o ≥ 99.0% (SIGMA; 41650).

SOLUCIONES.

Solución de Hank BSS (Hank's Balanced Salt Solution): para preparar 200ml se necesitaran 80mg de KCl, 12mg de KH₂PO₄, 70mg de NaHCO₃, 1600mg de NaCl, 9.6mg de Na₂HPO₄, 100mg de D-glucosa y 2mg de rojo fenol.

El *Medio completo* (200ml) de crecimiento se compone de medio F12 (88ml), medio MEM (88ml), Penicilina/Estreptomicina (2ml), MEM non essential amino acids (2ml) y FBS (20ml).

PUESTA EN MARCHA Y MANTENIMIENTO.

DESCONGELACIÓN. Las células se conservan congeladas en nitrógeno líquido, en criotubos. Se descongela el contenido de un criotubo y se traspasa a un tubo de 15ml que contiene 10ml de medio completo. Se centrifuga durante 5min. a 1000rpm. Se decanta el SN y se resuspende el pellet en 10ml de medio completo. Se transfiere a un frasco de 50ml para dejar crecer en el incubador a 37°C.

PASAJE. Cuando las células del frasco se encuentran a un 85-90% de confluencia se realiza un nuevo pasaje. Para ello se aspira el medio del frasco y se añaden 9ml de solución de Hank BSS y 1ml de Tripsina-EDTA. Se incuba durante 5-10 minutos a 37°C para que la tripsina facilite la separación de las células de la superficie del frasco. Transcurrido el tiempo necesario se traspasa el contenido del frasco a un tubo de 15ml para centrifugarlo durante 3 minutos a 1000rpm. Seguidamente se decanta el sobrenadante y el pellet se resuspende en un volumen pequeño conocido de medio completo. La mitad de este volumen se traspasa a un frasco nuevo con 10ml de medio completo, para mantener el cultivo. La otra mitad se lleva al volumen necesario para llenar la placa de 24 pozos preparada con anterioridad.

DIFERENCIACIÓN CELULAR. Las células se siembran a la densidad deseada y se añade, por cada 5ml de medio de cultivo completo, 2.5µl de ácido retinoico 20mM en DMSO, para obtener una concentración en pozo de 10µM de ác. retinoico. Las células se pueden utilizar a partir del quinto día de diferenciación.

CONGELACIÓN. Para conservar las células, una vez tripsinizadas, lavadas y resuspendidas en medio completo se mezclan con FBS y DMSO (1400µl de medio completo con células, 400µl de FBS y 200µl de DMSO) en un criotubo. Se dejan 3h a -20°C, 48h a -80°C y finalmente se conservan en nitrógeno líquido.

3.5 Mantenimiento y subcultivo de la línea celular STHdh^{Q7} (wild-type) y STHdh^{Q111} (mutada).

La línea celular STHdh de origen tumoral puede contener una mutación que afecta a la proteína huntingtina. Como se ha comentado en el apartado de introducción se ha trabajado con células que no presentan esta alteración o salvajes/nativas (STHdh^{Q7}) y células STHdh^{Q111} que presentan una mutación que codifica para una proteína huntingtina con una cola poli-Q de 111 glutaminas. En los dos casos estas células han sido cedidas amablemente por la Dra. Silvia Ginés del departamento de biología celular de la facultad de Medicina de la UB.

REACTIVOS.

- Hidrobromuro de Poli-L-lisina (SIGMA; P6282-5MG).
- Medio DMEM; Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose, con 4500mg/L glucosa y bicarbonato sódico, sin L-glutamina y piruvato sódico, líquido, filtrado y estéril (SIGMA; D5671).
- Suero bovino fetal (FBS), Fetal Bovine Serum (Cat. No. 16000-044) de GIBCO®(Invitrogen).
- Penicilina-Estreptomicina, líquida (Cat. No. 15140-122)(Invitrogen): Contiene 10,000 unidades de penicilina (base) y 10,000 µg de estreptomicina (base)/ml.
- L-Glutamina, para cultivo celular (SIGMA; G6392).
- Piruvato sódico, para cultivos celulares (SIGMA; P5280).
- Geneticina, sal de disulfato de G418, para cultivo celular (SIGMA; A1720).
- Tripsina 0.05%(1X) con 0.53mM EDTA 4Na, líquido (Cat. No. 25300-104) de Invitrogen.

SOLUCIONES.

El *medio de crecimiento* se compone de medio DMEM, 40% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina, 2mM de L-Glutamina y 1mM de piruvato sódico.

El *medio para emplacado* se compone de medio DMEM, 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato sódico y 400µg/ml de geneticina.

PUESTA EN MARCHA Y MANTENIMIENTO.

DESCONGELACIÓN. Las células se conservan congeladas en nitrógeno líquido, en criotubos. Se descongela el contenido de un criotubo y se traspasa rápidamente a un frasco de 50ml que contiene 20ml de medio de crecimiento. Como particularidad, se dejan crecer en el incubador a 33°C

PASAJE. Cuando las células del frasco se encuentran a un 85-90% de confluencia se realiza un nuevo pasaje. Para ello se aspira el medio del frasco con la ayuda de una pipeta Pasteur corta y una bomba de vacío. A continuación se añaden 8ml de medio DMEM y 2ml de Tripsina-EDTA. Se deja durante 5-10 minutos a 33°C dentro del incubador para que la tripsina facilite la separación de las células de la superficie del frasco. Transcurrido el tiempo necesario se traspasa el contenido del frasco a un tubo de 15ml para centrifugarlo durante 5 minutos a 1000rpm. Seguidamente se decanta el SN y el pellet se resuspende en 2-3ml de medio de crecimiento. La mitad de este volumen se traspasa a un frasco nuevo con 10-15ml de medio de crecimiento, para mantener el cultivo. La otra mitad se lleva al volumen necesario con medio para emplacado, para llenar la placa de 24 pozos preparada con anterioridad.

CONGELACIÓN. Para conservar las células, una vez tripsinizadas, lavadas y resuspendidas, se mezclan con 40% de FBS y 20% de DMSO (1400µl de medio completo con células, 400µl de FBS y 200µl de DMSO) en un

Materiales y métodos

criotubo. Se dejan 3h a -20°C , 48h a -80°C y finalmente se conservan en nitrógeno líquido.

3.6 Determinación del incremento de $[\text{Ca}]^{2+}$ intracelular inducido por glutamato o *N*-metil-D-aspartato (NMDA).

REACTIVOS.

- Fura-2 AM; solución stock en DMSO anhidro (F-1221, Molecular Probes, Invitrogen).
- BSA; Albumina de Serum Bovino, indicado para cultivo celular (SIGMA; A9418).
- D-Glucosa (PANREAC; Cod. 141341).
- NaHCO_3 (PROBUS; 2030).
- NaCl (PROLABO; 27810-295).
- KCl (PANREAC; Cod. 141494).
- HEPES (del inglés, (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (SIGMA; H3375).
- Glicina (SIGMA; G8898).
- Sal monosódica de glutamato (SIGMA; G1626).
- *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (SIGMA; M3262).

PROTOCOLO.

El método más usado para medir la $[\text{Ca}]^{2+}$ intracelular se basa en la utilización de indicadores de fluorescencia de Ca^{2+} y por ello la introducción de Fura-2 ha supuesto uno de los mayores avances en el campo de la investigación sobre la movilización de Ca^{2+} (Gulaboski y cols., 2008).

El Fura-2 (Fig. 3.5) es un indicador de Ca^{2+} fluorescente y radiométrico, que forma un complejo estable con los iones calcio. Se comercializa en su forma éster (Fura-2 AM) y como sal potásica. La forma éster es permeable a la membrana citoplasmática y puede ser fácilmente

introducido/cargado dentro de las células. Una vez en el interior celular, el Fura-2 AM será desesterificado por esterasas intracelulares de forma que se evita su eflujo. De esta forma, el Fura-2 puede formar un complejo con los iones Ca^{2+} presentes en el citoplasma (Gulaboski y cols., 2008).

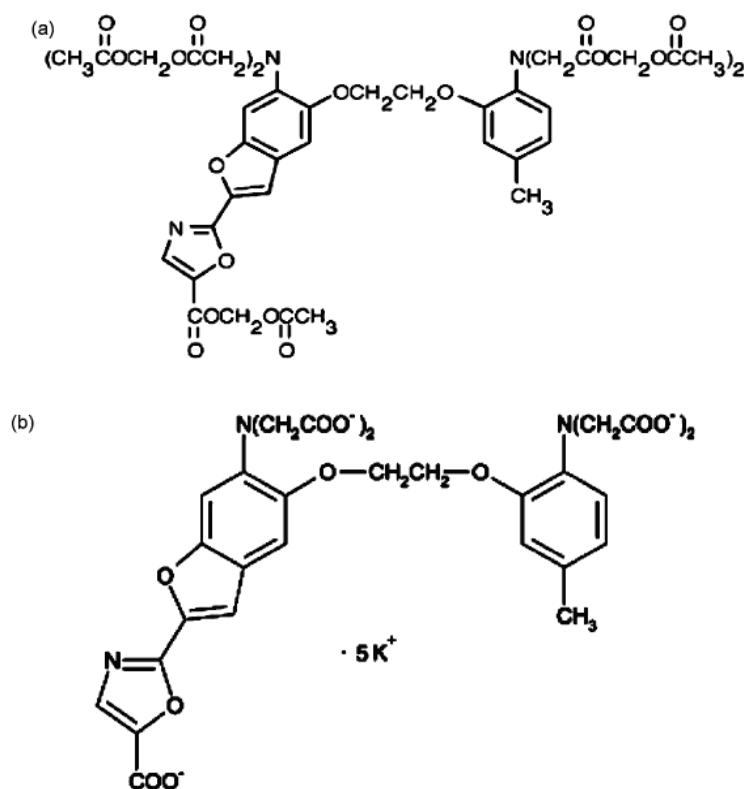


Fig. 3.5. Estructura de Fura-2 AM (a) y estructura de la sal de potasio de Fura-2 (b) (Gulaboski y cols., 2008).

La *Fluorescencia* es un proceso atómico en el que la emisión de radiación electromagnética resulta de la absorción de radiación que proviene de una fuente extramolecular. El estado de excitación de la molécula generalmente tiene una vida media de unos 10^{-8} segundos. La radiación fluorescente tiene una longitud de onda más larga que la radiación absorbida. Cada especie molecular fluorescente tiene una o más longitudes de onda óptimas para la excitación que coincide con la absorción máxima. En este caso, la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de calcio libre.

Materiales y métodos

El Fura-2 es un fluorocromo de doble excitación (Fig. 3.6), es necesario alternar la longitud del haz de excitación y leer un haz de emisión. Con estos valores se calcula el cociente de fluorescencias $R = F_{340}/F_{380}$ que es proporcional a la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$). La incorporación de Fura-2 en los cultivos celulares permite la monitorización de la $[Ca^{2+}]_i$ en tiempo real.

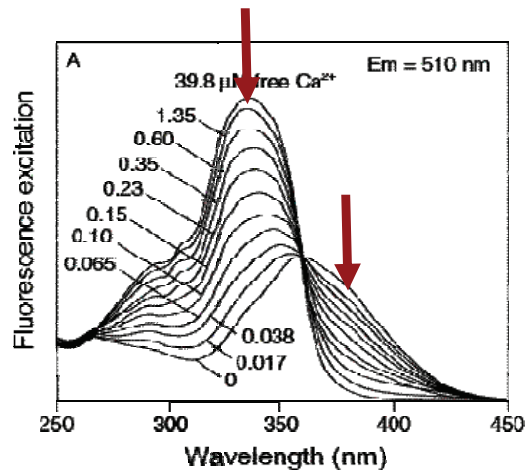


Fig. 3.6. Espectro de excitación del Fura-2.

A uno de los pozos de una placa de 24 que contiene un portaobjetos de cristal de 10mm de diámetro previamente polilisinizado para facilitar la adherencia de las células, se incorporan 0.7µl (concentración en el pozo de 6µM) de Fura-2 AM durante 45-60 minutos dentro del incubador a 37°C.

Transcurrido el tiempo suficiente de incubación, se monta el portaobjetos en un soporte específico (ver figura 3.7) que permite la lectura de fluorescencia en una cubeta de fluorescencia estándar.



Fig. 3.7. Soporte de plástico para realizar las lecturas en espectrofluorímetro.

SOLUCIONES.

Tampón de Locke Hepes 10X: para preparar 100ml, se pesan 9g de NaCl, 417.5mg de KCl, 302.5mg de NaHCO₃ y 2.385g de HEPES. Disolver en H₂O milli-Q y ajustar el pH = 7,35. Una vez ajustado el pH, filtrar con filtro Nylon de 0,2µm y conservar a 4°C.

Tampón de Locke Hepes 1X: para preparar 200ml, se pesan 220mg de D-Glucosa y 200mg de BSA. Se añaden 20ml de Locke Hepes 10X y 20ml de la solución de calcio. Disolver primero la BSA y la glucosa en H₂O milli-Q, añadir la solución Locke Hepes 10X y la solución de calcio, y llevar el volumen hasta 190ml. Ajustar el pH = 7,4 y conservar a 4°C.

Solución de Calcio 13mM en agua Milli-Q.

Solución de glicina 1mM en Locke HEPES 1X.

Solución de glutamato 10mM en Locke HEPES 1X.

Solución de NMDA 10mM en Locke HEPES 1X.

De cada *compuesto* se preparan 5 diluciones de 40mM, 10mM, 1mM, 100µM y 10µM en Locke HEPES 1X, excepto la solución más concentrada que se disuelve en etanol. Se puede observar la estructura de todos los compuestos en el anexo I.

Las muestras se sumergen en tampón Locke HEPES 1X (1,3ml). Las lecturas se realizan en un espectrofluorímetro (PerkinElmer LS50B), como el mostrado en la figura 3.8, que contiene un accesorio “Fast Filter” que permite la lectura rápida de la fluorescencia a 510nm con excitación alternada entre 340nm y 380nm.



Fig.3.8 Espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B.

Una vez estabilizada la señal, se realizan adiciones sucesivas de glicina y glutamato a los 60 y 120 segundos de iniciar la lectura, aproximadamente. A partir de 360-400 segundos se procede con las adiciones de diluciones de los diferentes compuestos con la finalidad de realizar una curva concentración-respuesta acumulativa (desde 10nM hasta 1000 μ M). Los valores del cociente F_{340}/F_{380} (R) se determinan mediante el software *FLWinLab 2.0* (PerkinElmer) y se ajustan a un modelo de regresión no lineal (curva sigmoidea de pendiente variable) con el programa *GraphPad Prism 4.0, Inc.*, para obtener las IC_{50} y el porcentaje máximo de inhibición de cada compuesto (Fig. 3.9A).

Se realizan triplicados para cada compuesto, a partir de los cuales se realizan las medias para obtener los valores de IC_{50} y de porcentaje máximo de inhibición (Fig. 3.9B).

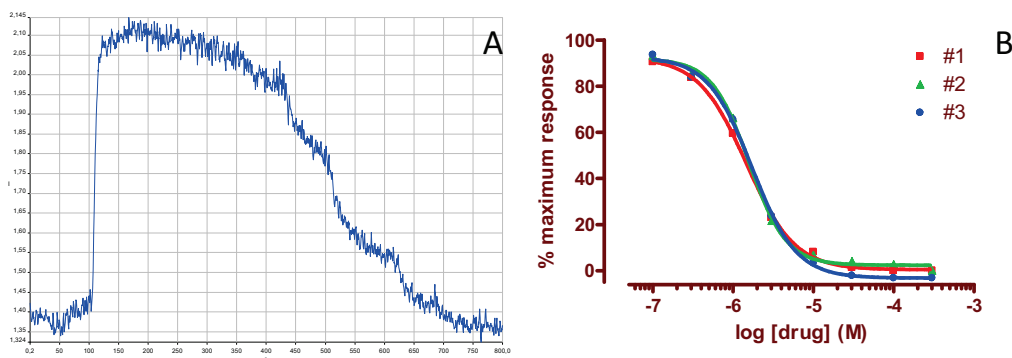


Fig.3.9 Gráficas obtenidas en los experimentos de inhibición del incremento de la concentración de calcio intracelular.

3.7 Valoración de la neuroprotección de los distintos compuestos por cuantificación de viabilidad mediante el ensayo de MTT.

Estos experimentos también se han realizado con células granulares de cerebelo. En este caso se han sembrado en placas de 96 pozos.

REACTIVOS.

- Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-dipreniltetrazolio, MTT (SIGMA; M2128).
- SDS (SIGMA; L3771).
- Dimetil sulfóxido, DMSO (SIGMA; D4540).
- Acido acético glacial (UN-2789).
- Glicina (SIGMA; G8898).
- Sal monosódica de glutamato (SIGMA; G1626).
- N-metil-D-aspartato (NMDA) (SIGMA; M3262).
- (+)MK-801 (SIGMA; M107).
- Hidrocloruro de 1,3-dimetil-5-amino-adamantano, memantina (Cas.N. 41100-52-1).

SOLUCIONES.

Solución de Calcio 13mM en agua Milli-Q.

Solución Locke Hepes 10X: para preparar 100ml, se pesan 9g de NaCl, 417.5mg de KCl, 302.5mg de NaHCO₃ y 2.385g de HEPES. Disolver en H₂O Milli-Q y ajustar el pH = 7,35. Una vez ajustado el pH, filtrar con filtro Nylon de 0,2µm y conservar a 4°C.

Solución Locke Hepes 1X sin glucosa ni BSA: Para preparar 200ml se necesitan 20ml de Locke Hepes 10X, 20ml de Calcio Stock y completar con agua Milli-Q.

Solución stock de MTT: 2,5mg de MTT/ml de PBS.

Solución de Decoloración: 2,5g SDS/25ml de DMSO. Se añade a esta solución 0,143ml de ácido acético glacial.

Solución GG (glicina+glutamato): se prepara una solución stock con las concentraciones necesarias de glicina (200µM) y de glutamato (4mM) para obtener una concentración final en pozo de 10µM de glicina y 200µM de glutamato.

Materiales y métodos

Solución MK-801: Se prepara esta solución a una concentración de 200 μ M Locke HEPES 1X sin glucosa. La concentración deseada en pozo es de 10 μ M.

Solución stock de memantina: se prepara una solución concentrada de 200 μ M en Locke HEPES 1X sin glucosa.

Solución de glicina 1mM en Locke HEPES 1X sin glucosa.

Solución de glutamato 10mM en Locke HEPES 1X sin glucosa.

Solución de NMDA 10mM en Locke HEPES 1X sin glucosa.

Para los distintos compuestos a valorar se prepararan dos soluciones a 1mM y 200 μ M en Locke HEPES 1X sin glucosa, de las que también se realizaran diluciones 1:20 para obtener las concentraciones en pozo de 10 μ M y 50 μ M.

PROTOCOLO.

Inducción de la excitotoxicidad y neuroprotección.

Se retira el medio de cultivo de los pozos y se conserva en una placa de 100mm en el incubador. A medida que se retira el medio se añade el tampón Locke HEPES 1X sin glucosa para evitar el secado de las células. A continuación se incorporan los neuroprotectores que actuarán como controles positivos y los compuestos a valorar. Finalmente, se añade la solución GG que contiene el agonista y el co-agonista necesarios para la apertura masiva de los canales y la consecuente neurotoxicidad.

Se incuba durante una hora en el incubador y transcurrido este periodo se aspira el tampón y se vuelve a añadir el medio de cultivo original. Tras 24 horas en el incubador, se realiza la evaluación de la capacidad neuroprotectora de los compuestos en base a la determinación de la viabilidad.

Determinación de la viabilidad.

A las 24 horas de la exposición a los fármacos, se realiza el ensayo de determinación de viabilidad con el método de MTT. El MTT es un colorante que se incorpora a las células y es reducido a formazán en la mitocondria. Este proceso solo tiene lugar en células viables. El formazán forma unos cristales de color azul oscuro que se podrán cuantificar por absorbancia.

Se añaden 4µl de la solución concentrada de MTT y se dejar reposar una hora en el incubador. Posteriormente, se aspira el medio y se añaden 200µl de la solución decoloradora por pozo, se mezcla bien con ayuda de la pipeta para que se disuelvan los cristales de formazán y tras 10-15' se lee la absorbancia en el espectrofotómetro (Bioteck) a 595nm. Posteriormente estos valores se transforman en porcentajes de viabilidad. Para el tratamiento estadístico de los valores obtenidos se ha utilizado el programa *GraphPad Prism 4.0.* y SPSS 15.0 para Windows. Para comparar los valores vs. el control (Glutamato solo) se ha aplicado una *prueba T para muestras apareadas* en caso de muestras paramétricas o un test de Wilcoxon para muestras no paramétricas.

3.8 Determinación de la capacidad inhibidora de la MAO de compuestos de nueva síntesis.

REACTIVOS

- K₂HPO₄ (PANREAC; S0021).
- Sacarosa (MERCK; S0027).
- BSA (SIGMA; A9418).
- Reactivo Bradford (SIGMA; B6916).
- MAO-GloTM Assay (Cat. N. V1401; PROMEGA).
- Hidrocloruro de deprenyl (Selegilina) (SIGMA; M003).

Materiales y métodos

3.8.1 Preparación cruda mitocondrial de cerebro de ratón.

SOLUCIONES.

Solución de K_2HPO_4 1M : se pesan 8.7g (PM=174.18 g/mol) y se ajusta el volumen final de 50ml.

Solución de Sacarosa 250mM para preparar unos 100ml, se pesan 8.56g; y ajustar pH a 7.4 con la solución de K_2HPO_4 1M.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.

Para obtener la muestra se decapita un ratón adulto (3-4 meses), se extrae el cerebro y posteriormente se disecciona el **córtex** sobre superficie fría. A continuación se homogeniza el córtex con 10 partes (p/v) de la solución de sacarosa 250mM preparada anteriormente. Una vez obtenido el homogenado, se centrifuga a 1500g durante 20' a 4°C. Se descarta el pellet, se recoge el SN y se vuelve a centrifugar a 18000g durante 20'. Después de esta centrifugación se descarta el SN y se resuspende el pellet en la mitad de volumen inicial. Se repite la centrifugación con las mismas condiciones anteriores (18000g, 20'). En este caso, se elimina el SN y se resuspende el pellet en 5ml de la solución de sacarosa 250mM.

3.8.2 Determinación de la proteína presente en la muestra.

Para la valoración de la concentración proteica se ha utilizado el método de Bradford según protocolo para microplacas del fabricante (SIGMA) Las lecturas se han realizado en un espectrofotómetro de placa BioTek a 595nm.

3.8.3 Determinación de la actividad inhibidora sobre la MAO.

Se han seleccionado algunos compuestos con un grupo propargilamino en su estructura por similitud con las estructuras de selegilina y rasagilina, dos conocidos inhibidores de la MAO. Además, un compuesto posee un grupo aminoacetamido en su estructura, lo que guarda similitud con indantadol, que también es i-MAO. En concreto se trata de los compuestos LD 126, LD 127, LD 128, LD 131 y LD 132.

Para realizar los distintos experimentos se ha utilizado el kit MAO-Glo™ Assay de Promega. Este kit ofrece un método luminiscente para determinar la actividad monoamino oxidasa de muestras nativas o recombinantes y medir el efecto de los compuestos a valorar sobre la actividad MAO.

Se incubaba el extracto crudo mitocondrial con un sustrato de la MAO luminogénico (un derivado de luciferina). La enzima MAO presente en la preparación biológica convierte este derivado de luciferina en metilesterluciferina. Después de la reacción de la MAO (1h), se añade simultáneamente a todas las muestras el reactivo de detección de luciferina reconstituido para parar la reacción de la MAO, convirtiendo el derivado metilester a luciferina y produciendo fotones. La cantidad de radiación luminiscente producida es directamente proporcional a la actividad MAO. La señal luminiscente tiene una vida media superior a 5

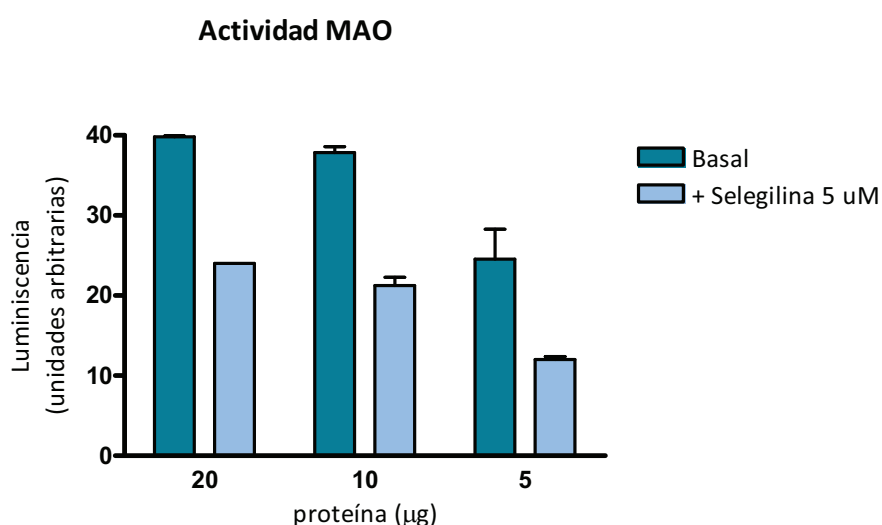


Fig 3.10. Determinación del efecto de la cantidad de proteína sobre la señal luminiscente

Materiales y métodos

horas. La presencia de compuestos con actividad inhibitoria sobre la MAO deberá producir una disminución en la radiación luminiscente.

Para determinar tanto la cantidad de proteína mínima necesaria para realizar el experimento, como la cantidad idónea de inhibidor de la MAO, selegilina que se utilizó como control positivo, se llevaron a cabo pruebas preliminares a los experimento de evaluación de la actividad i-MAO de los compuestos en estudio. Inicialmente se realizó un estudio concentración-respuesta de la actividad MAO con distintas concentraciones de proteína, lo que permitió determinar la cantidad de proteína necesaria para los futuros ensayos (Fig. 3.10).

Se escogió la concentración máxima probada para tener una buena respuesta contando con la posible inhibición de los compuestos. El siguiente experimento se realizó con la concentración de proteína ya conocida y con diferentes concentraciones de selegilina (control positivo del experimento), con el fin de validar el método.

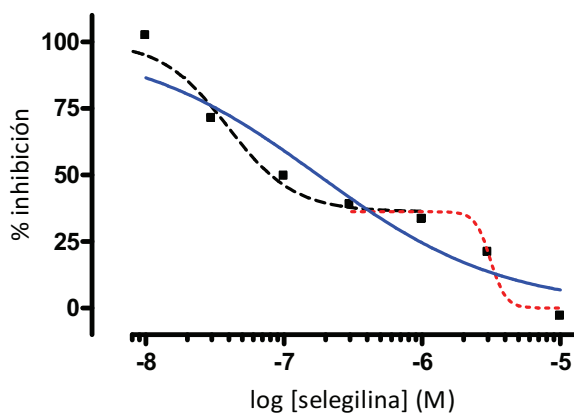


Fig. 3.11 Determinación de la selectividad de la selegilina.

Se pudo observar que la inhibición de la actividad MAO seguía una doble sigmoidea (Fig. 3.11), la primera parte correspondiente a la inhibición de MAO-B, a bajas concentraciones de selegilina y la parte final correspondiente a la inhibición completa de la MAO (tanto MAO-B como MAO-A), a concentraciones mayores, en las que la selegilina pierde su selectividad. En la evaluación de los compuestos era de interés la inhibición de la actividad MAO en general, por este motivo se

escogió una concentración de selegilina que asegurara nuestro objetivo, es decir, determinación tanto de actividad sobre MAO-B como sobre MAO-A.

Finalmente, se llevó a cabo la valoración de la capacidad inhibidora de la MAO de los compuestos escogidos. Se utilizó las concentraciones de 10 μ M y 50 μ M para cada compuesto a evaluar, y dos concentraciones para el control positivo, 1 μ M y 10 μ M.

La determinación de la actividad inhibidora sobre la MAO para cada compuesto se ha realizado con 25 μ l de crudo mitocondrial a los que se añaden 12.5 μ l de sustrato de la MAO luminogénico y 12.5 μ l del compuesto. Todos los puntos se realizan por duplicado y se deja incubar a temperatura ambiente.

Después de 1h se añaden 50 μ l de reactivo de detección de luciferina y se deja 20' a temperatura ambiente para generar y estabilizar la señal luminiscente. A continuación se procede a la lectura de los RLU con un luminómetro.

3.9 Valoración in Vivo de la toxicidad de una selección de compuestos con actividad antivírica.

Se ha evaluado una pequeña selección de los compuestos cedidos por el Dr. Antonios Kolocouris. De todos los cedidos inicialmente, se escogieron tres para realizar su valoración toxicológica in vivo. Estos compuestos fueron AK2, AK3 y AK10, que se valoraron juntamente con amantadina como compuesto de referencia.

En esta parte de la experimentación se ha realizado una administración única intraperitonealmente del compuesto a evaluar y posteriormente cuando ha sido posible, se ha realizado una valoración funcional a través de una Batería de Observación Funcional (FOB).

REACTIVOS.

- Hidrocloruro de amantadina (SIGMA; A1260).
- Compuestos AK2, AK3 y AK10.

La farmacocinética de estos compuestos es desconocida, pero se conoce que memantina y amantadina penetran fácilmente al SNC, por ello, era de esperar que estos compuestos, que derivan estructuralmente de amantadina, serían también capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica.

Las dosis evaluadas han sido de 30, 100 y 300 mg/kg por vía i.p. Cada dosis se ha evaluado con un mínimo de tres animales (Tabla 3.1). Los supervivientes se han valorado a tres tiempos distintos (a los 30 minutos de la administración, a la hora y a las 2h).

| DOSIS (mg/kg) | Amantadina | AK-2 | AK-3 | AK-10 |
|---------------|------------|--------|--------|--------|
| 30 | macho | macho | hembra | macho |
| | hembra | hembra | macho | hembra |
| 100 | macho | hembra | macho | macho |
| | macho | macho | macho | macho |
| | macho | hembra | hembra | hembra |
| | hembra | macho | macho | macho |
| 300 | macho | macho | macho | hembra |
| | macho | macho | macho | macho |
| | hembra | hembra | hembra | macho |

Tabla 3.1. Diseño experimental in vivo.

Para llevar a cabo las valoraciones se escogieron animales ratón de la cepa CD1, tanto hembras como machos, todos adultos jóvenes, de unos 2 meses de edad. Los experimentos se realizaron con los animales en ayunas y por la mañana.

Con ellos se realizó una Batería de Observación Funcional (FOB, del inglés, Functional Observatory Battery) que consta de 4 partes distintas;

Jaula (1 minuto de observación en la jaula dónde está estabulado el animal), En Mano (30 segundos en la mano del observador), Campo Abierto (10 minutos de observación en un campo abierto) y Respuesta a las manipulaciones.

El protocolo de la FOB aplicado es una adaptación del diseñado originalmente por Moser (2000) con el fin de detectar efectos neurotóxicos o comportamentales debidos a la exposición química aguda en ratas jóvenes (Moser, 2000). Esta evaluación permite obtener un índice del estado general, muy útil para evaluar si los animales presentan signos de toxicidad debidos a un tratamiento o exposición a algún compuesto. Consiste en 31 puntos para evaluar la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central, efectos neuromusculares y autónomos, así como la reactividad sensorial y motora (Sills y cols., 2000; Fuentes y cols., 2007). Las variables que forman parte de la FOB y el modelo para la toma de datos se describen en los anexos II y III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la realización de este trabajo se han utilizado distintos sustratos biológicos con el objetivo de valorarlos como posibles modelos para la evaluación de fármacos neuroprotectores.

La mayoría de los experimentos se han llevado a cabo en cultivos de células granulares de cerebelo de rata puesto que es un modelo ampliamente usado para el estudio de la neurodegeneración, como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis.

El receptor NMDA contiene gran número de lugares de unión para distintas moléculas. Por lo que se refiere a los antagonistas de estos receptores podemos diferenciar entre los antagonistas no competitivos (fenciclidina, ketamina, MK-801, memantina, dextrometrofano o amantadina, entre otros) (Fig. 4.1) que se unen próximos al lugar de unión del Mg^{2+} , situado en el interior del canal; y los antagonistas competitivos (selfotel y midafotel, entre otros) (Fig. 4.2) que se unen reversiblemente en el lugar de unión del NMDA y compiten con el glutamato para unirse a ese lugar (Lyden y Gunnar-Wahlgren, 2000).

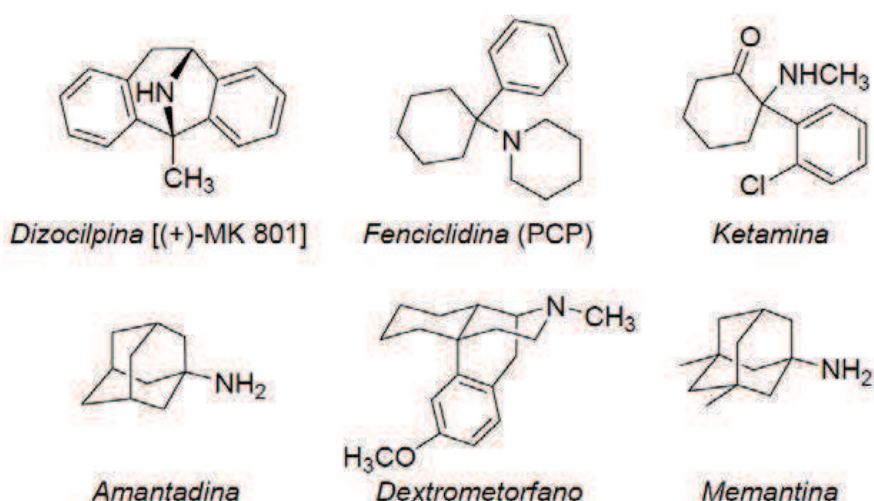


Fig. 4.1 Antagonistas no competitivos del receptor glutamatérgico NMDA. Dizocilpina, fenciclidina, ketamina, amantadina, dextrometrofano, memantina.

Resultados y discusión

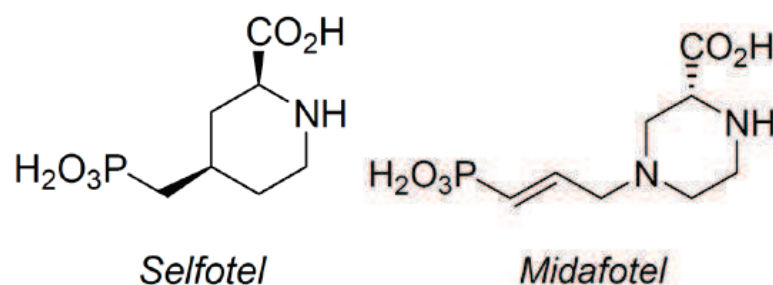


Fig. 4.2 Antagonistas competitivos del receptor glutamatérgico NMDA. Selfotel, midafotel.

Gran parte de la investigación sobre este receptor se ha centrado en los últimos años en bloquear la excitotoxicidad o controlar la excesiva actividad de estos receptores (Gilling y cols., 2009; Klimaviciusa y cols., 2008; Hao y cols., 2008), que se han implicado en enfermedades neurodegenerativas (Greenamyre, 1986; Henneberry y cols., 1989; Cotman y Monaghan, 1989) algunas de ellas con una prevalencia creciente en los últimos años (Perkins y cols., 1997; Coduras y cols., 2009; de Pedro-Cuesta y cols., 2009). Pero los fármacos con mayor potencia para inhibir el proceso excitotóxico también han presentado efectos adversos inaceptables en fases más avanzadas de su desarrollo, fundamentalmente debido a la inhibición de la actividad glutamatérgica fisiológica (Manahan-Vaughan y cols., 2008).

Los bloqueantes que actúan en el lugar de unión del Mg²⁺ en el interior del canal actúan regulando el flujo o la entrada de iones calcio. Cuando el antagonista se une con demasiada afinidad al receptor durante periodos de baja activación del mismo aparecen efectos clínicamente inaceptables. Una de las principales razones de este problema puede ser el excesivo tiempo de demora para abandonar el interior del canal (su lenta “salida”) debido a su elevada afinidad por el lugar de unión. De este modo, fármacos como MK-801 se fijan en el canal bloqueando en exceso la neurotransmisión glutamatérgica (Lipton, 2004).

Por otro lado, antagonistas no competitivos pero con un tiempo de demora en el interior del canal menor (con una “salida” más rápida) presentan mejor tolerancia clínica. Este es el caso de la memantina, con

una afinidad baja-moderada. Estos compuestos son relativamente inefectivos en el bloqueo con unos niveles bajos de actividad de receptores, asociada a una función neurofisiológica normal. Pero son excepcionalmente efectivos a concentraciones elevadas. Memantina es capaz de bloquear la muerte celular por excitotoxicidad pero lo más importante es que ejerce este efecto con una buena tolerabilidad clínica (Lipton, 2004).

Así, ¿qué es lo que hace diferentes dos antagonistas que actúan sobre el mismo lugar de unión? Como se ha comentado en el apartado de introducción, la afinidad, la cinética de bloqueo/desbloqueo y la dependencia de voltaje son factores cruciales para determinar la tolerabilidad del fármaco. El magnesio, bloqueante endógeno, presenta una fuerte dependencia de voltaje y una afinidad muy baja, asociada con una rápida cinética de bloqueo. Contrariamente, el MK-801 muestra una elevada afinidad asociada a una cinética de bloqueo muy lenta y una dependencia de voltaje débil. La memantina tiene una potencia moderada asociada a una dependencia de voltaje y una cinética de bloqueo entre el magnesio y el MK-801. (Danysz y Parsons, 2003).

En función de estas características, los antagonistas no competitivos de los receptores NMDA se dividen en dos grupos, los que presentan elevada afinidad como MK-801, fenciclidina o ketamina y los de baja-moderada afinidad, como memantina.

Según los modelos actuales de estructura del receptor NMDA, el lugar de interacción de los derivados de memantina evaluados en este trabajo debería ser en el poro del canal, el mismo lugar de unión del Mg^{2+} y memantina (Fig. 4.3) (Parsons y cols., 2007; Chen y Lipton, 2005).

Resultados y discusión

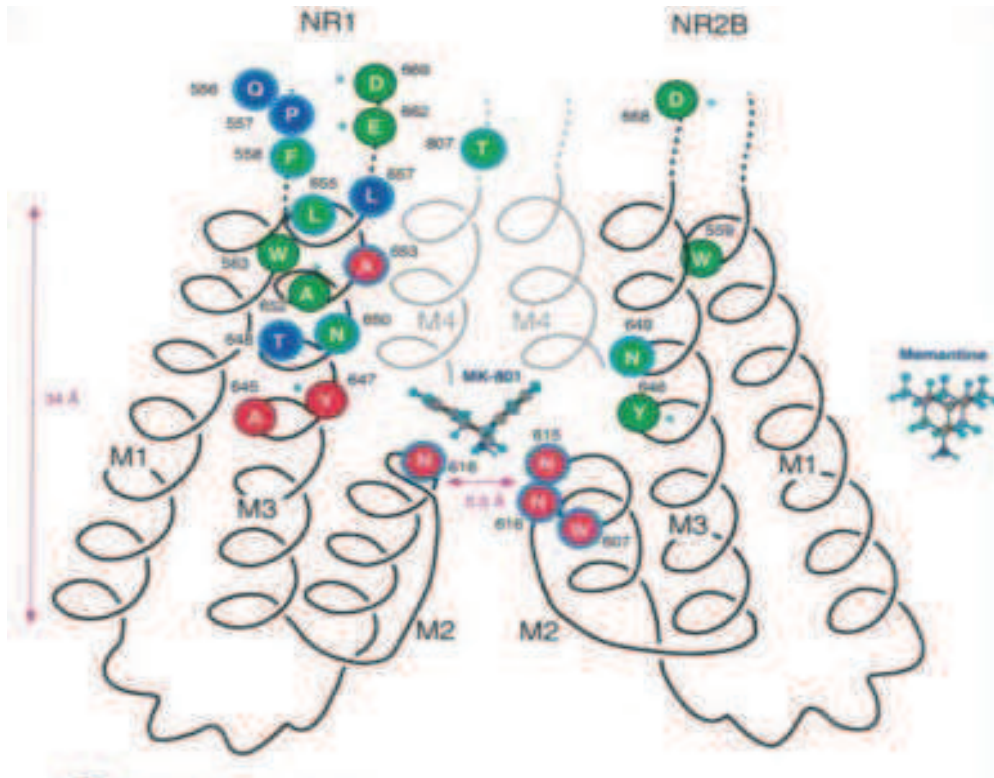


Fig. 4.3 Representación de la situación de distintos residuos que afectan al bloqueo del receptor NMDA, en la región vestibular y del poro. ● Indica los residuos que interactúan con MK-801 y memantina, ● indica residuos que pueden interactuar con MK-801, ● indica residuo accesible e ● indica residuo con la accesibilidad no determinada (Kashiwagi y cols., 2001).

En este lugar de unión del centro del canal, toman partido el segmento M2 y la parte de M3 que da al canal, encargados también del filtro del canal. El segmento M2 empieza con una α -hélice en su parte C-terminal y forma un bucle que se interna en la cavidad del canal. La estrechez en esta construcción forma parte del filtro selectivo posicionado cerca de la punta del giro. El segmento transmembrana M3 también forma parte del filtro, delimitando la estrechez del poro (Kashiwagi y cols., 2001; Yuan y cols., 2005; Sobolevsky y cols., 2007; Jones y cols., 2002). En la figura 4.3 se presenta la cavidad del canal con MK-801 en su interior y resaltados en distintos colores se muestran diferentes aminoácidos con una función crítica en estas interacciones.

El motivo DRPEER en el M3 de NR1 es el encargado de la permeabilidad del ión calcio. El motivo SYTANLAAF, también en M3, se encuentra conservado en gran parte de los receptores glutamatérgicos y estudios

de sustitución de cisteínas en esta región muestran una accesibilidad que depende del estado de activación del receptor. La alteración de la accesibilidad a residuos, a menudo indica un cambio conformacional. Esto sugiere que este motivo se mueve en respuesta a la activación del receptor. Por eso se ha propuesto que M3 puede funcionar como elemento transductor, acoplado la unión del ligando con la apertura del canal y posibilitando este proceso de apertura. (Ferrer-Montiel y cols., 1998; Karlin y Akabas, 1998; Wollmuth y Sobolevsky, 2004; Magazanik y cols., 2003; Morris y cols., 2005).

Los tres aminoácidos críticos de esta región están situados en los lugares N616 de la subunidad NR1 y los N616 y N615 de la subunidad NR2B. Son tres asparraginas (Fig. 4.4), aminoácido neutro y polar que tiene como grupo reactivo un grupo amida (R1CONR2R3) (Chen y Lipton, 2005; Sakurada y cols., 1992; Kashiwagi y cols., 2001).

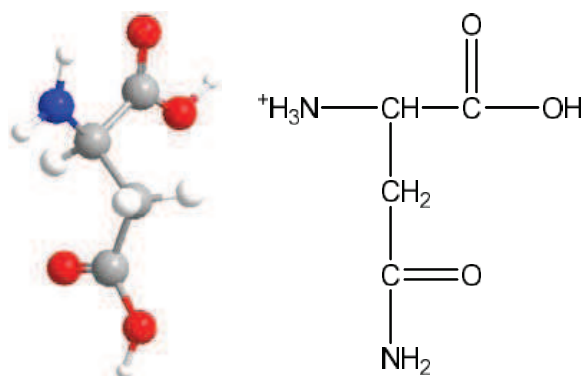


Fig. 4.4 Representación de la molécula de asparagina. En azul, el átomo de nitrógeno y en rojo, los átomos de oxígeno.

Los átomos de oxígeno de las asparraginas del filtro quedan en el lado interior del canal, favoreciendo así la unión de su oxígeno con el hidrógeno del grupo amino de los fármacos bloqueantes (Ferrer-Montiel y cols., 1998; Wollmuth y Sobolevsky, 2004; Magazanik y cols., 2003; Morris y cols., 2005; Zheng y cols., 1999).

Resultados y discusión

Los compuestos de referencia usados en este trabajo son memantina y amantadina. Estos compuestos derivan del hidrocarburo policíclico adamantano (Fig. 4.5) cuya síntesis fue descrita por Von Schleyer en 1957 (Schleyer, 1957).

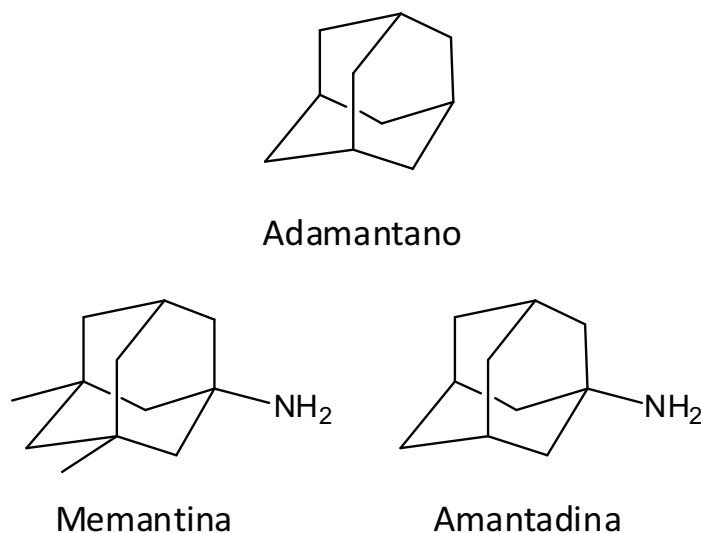


Fig. 4.5 Estructura del hidrocarburo policíclico **adamantano** y sus dos aminas derivadas amantadina y memantina.

Como ya se ha expuesto en la introducción de esta Tesis, el 1-aminoadamantano o amantadina es un antivírico aprobado por la FDA desde 1976 para el tratamiento de la gripe causada por el virus influenza-A y posteriormente se le conocieron propiedades anti parkinsonianas. Memantina es un dimetil derivado de amantadina sin actividad antivírica que presenta actividad como antagonista no competitivo del receptor NMDA. (Davies y cols., 1964; Tilley y Kramer, 1981; Danysz y cols., 1997; Witt y cols., 2004; Rammes y cols., 2008).

Según nuestros resultados, amantadina presenta también actividad antagonista sobre receptores NMDA destacable, aunque con una potencia 46 veces menor que memantina con NMDA como agonista y unas 6 veces menor con glutamato como agonista. En la representación de su estructura tridimensional (Fig. 4.6) se muestra los núcleos con el átomo de nitrógeno en la misma posición.

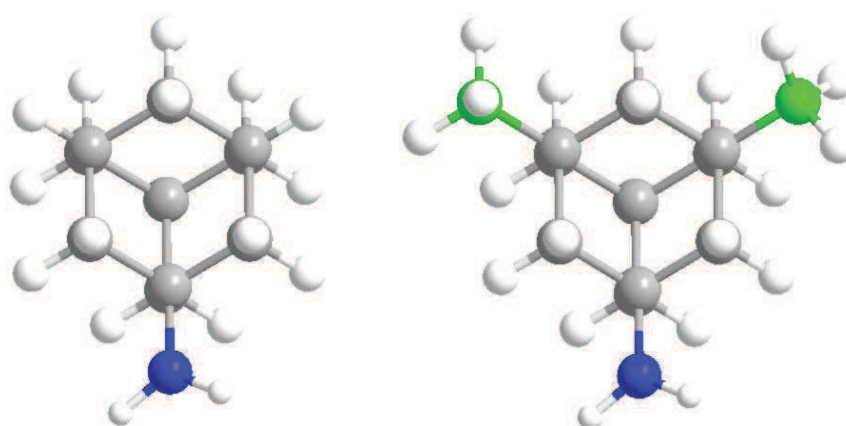


Fig. 4.6 Representación de la molécula de amantadina (izq.) y de memantina (dcha.) en 3D. Se representa en azul el átomo de nitrógeno y en verde los átomos de carbono de los radicales metilo de memantina.

A la vista de estos datos, pareció razonable que aminas bisnoradamantánicas, noradamantánicas, oxadamantánicas benzohomonoradamantánicas y estructuras relacionadas y derivadas de memantina y amantadina pudieran actuar como análogos de estos dos compuestos de referencia presentando actividad antagonista sobre los rNMDA.

Según lo expuesto en la introducción la modulación de la actividad de estos receptores pueda ser determinante en el avance del tratamiento de cualquier trastorno del SNC en el que se haya implicado la excitotoxicidad.

Aún así, la memantina no es capaz de revertir el proceso neurodegenerativo si bien proporciona una mejora cognitiva en los pacientes y ralentiza la evolución de la enfermedad neurodegenerativa, dos factores importantes en este tipo de trastornos. No obstante, su eficacia clínica es limitada, por lo que urge hallar nuevas moléculas que amplíen su margen de utilización en todas las fases de evolución de las enfermedades neurodegenerativas, pero con unas características farmacocinéticas y de tolerabilidad que aseguren un desarrollo clínico ventajoso. En este sentido, en los últimos años se han descrito numerosas estructuras policíclicas con actividad como antagonistas sobre los rNMDA como neramexano, NGP-1, CR3394 o nitromemantina

(Lois y cols., 2006; Gilling y cols., 2007; Nakamura y Lipton, 2009; Hao y cols., 2008).

4.1 Experimentos realizados en cultivos de células granulares de cerebelo de rata.

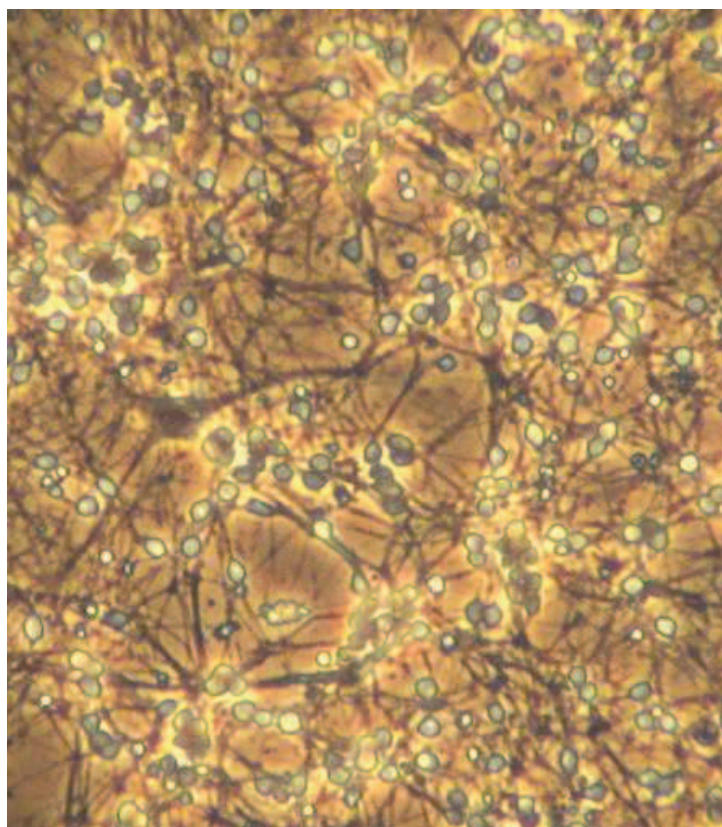


Fig. 4.7 Imágenes de células granulares de cerebelo de rata en placa de 24 pozos.

Como se ha comentado en el apartado de materiales y métodos, los cultivos de células granulares de cerebelo (Fig. 4.1), se han realizado a partir de crías de rata de siete días de edad, y sembradas sobre portaobjetos circulares en placas de 24 pozos para los estudios de monitorización de calcio y en placas de 96 pozos para los estudios de neuroprotección.

4.1.1 Caracterización farmacológica.

Antes de realizar la valoración de los compuestos de nueva síntesis, se ha establecido la validez de los cultivos de células granulares usados en los experimentos posteriores. Para identificar las concentraciones de agonistas necesarias para producir el incremento de calcio intracelular deseado, se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) acumulativas de glutamato y de NMDA (Figuras 4.8 y 4.9). A partir de estos estudios se obtuvieron las concentraciones eficaces 50 (EC_{50}) para los dos agonistas de los receptores NMDA (Tabla 4.1). La EC_{50} corresponde a la concentración necesaria para que dicho compuesto efectúe el 50% de su efecto máximo. Este valor se obtiene a partir de la regresión no lineal de los datos experimentales, tal y como se especifica en el apartado 3.3 de la sección de material y métodos.

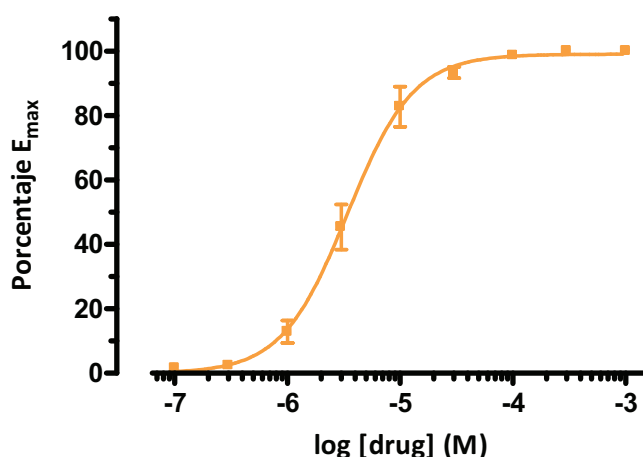


Fig. 4.8 Representación gráfica de la curva concentración-respuesta de glutamato (n=4).

Así, cuanto menor sea la EC_{50} más potente será el compuesto. Esto también se traduce en la representación, cuanto más a la izquierda se sitúa la curva sigmoidea, más potente es el compuesto.

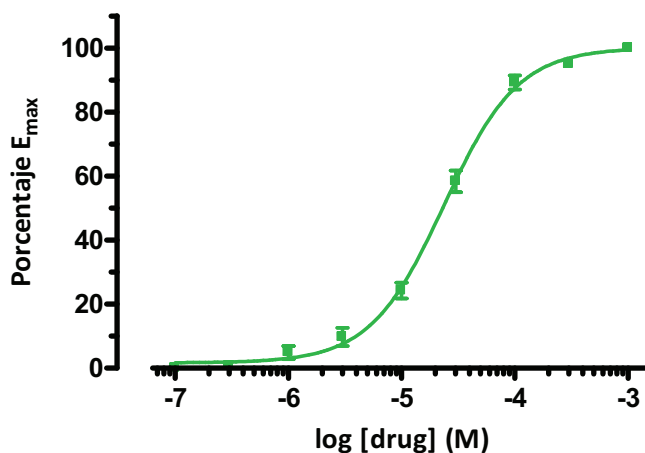


Fig. 4.9 Representación gráfica de la curva concentración-respuesta de NMDA (n=3).

| AGONISTA | Media EC ₅₀ (μM) | SD | n |
|-----------|--------------------------------|------|---|
| GLUTAMATO | 3,73 | 1,75 | 4 |
| NMDA | 23,84 | 4,07 | 3 |

Tabla 4.1 Valores de las EC₅₀ de los agonistas utilizados.

Se ha determinado la capacidad de los compuestos de referencia, memantina y amantadina, para actuar como antagonistas sobre los receptores NMDA, a través de la inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato y NMDA. En este caso se han obtenido sus valores de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀). La IC₅₀ es la concentración de antagonista necesaria para inhibir la respuesta del agonista en un 50%.

La memantina tiene una IC₅₀ menor (Tabla 4.2), lo que nos indica que es más potente como antagonista frente a glutamato que la amantadina.

| COMPUESTO | Media IC ₅₀ (μM) | SD | n |
|------------|--------------------------------|-------|---|
| Memantina | 55,37 | 12,11 | 3 |
| Amantadina | 337,13 | 98,74 | 3 |

Tabla 4.2 Valores de las IC₅₀ de los antagonistas de referencia usando glutamato como agonista (100μM) en presencia de glicina (10μM).

En la figura 4.10 se puede observar que los antagonistas evaluados no consiguen un 100% de inhibición. En este caso el agonista usado es el glutamato, responsable de la movilización de calcio a través también de otros receptores glutamatérgicos (como los receptores kainato y metabotrópicos tipo I).

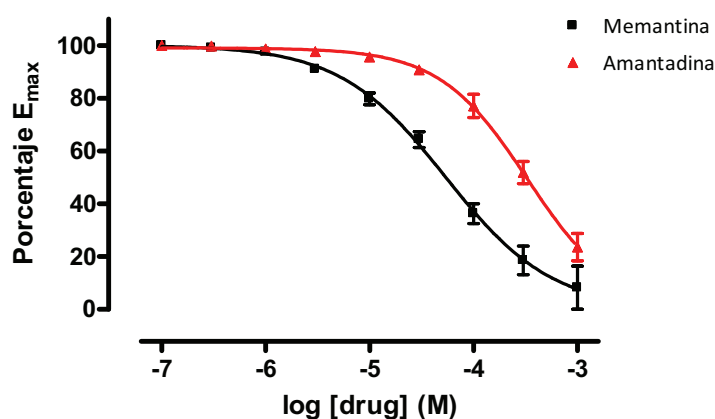


Fig. 4.10 Representación gráfica del efecto de memantina y amantadina sobre el incremento de la [Ca²⁺] intracelular, inducido por 100μM de glutamato en presencia de glicina (10μM). Memantina (n=3), Amantadina (n=3).

En el caso de la figura 4.11, dónde se ha usado NMDA como agonista, como es de esperar se obtiene un 100% de inhibición del incremento de la concentración de calcio intracelular.

Resultados y discusión

Se observa en la figura 4.11 que frente a NMDA, los dos antagonistas han presentado una menor IC_{50} que respecto a glutamato. Ello puede explicarse por la menor potencia que posee NMDA respecto a glutamato en nuestro modelo experimental.

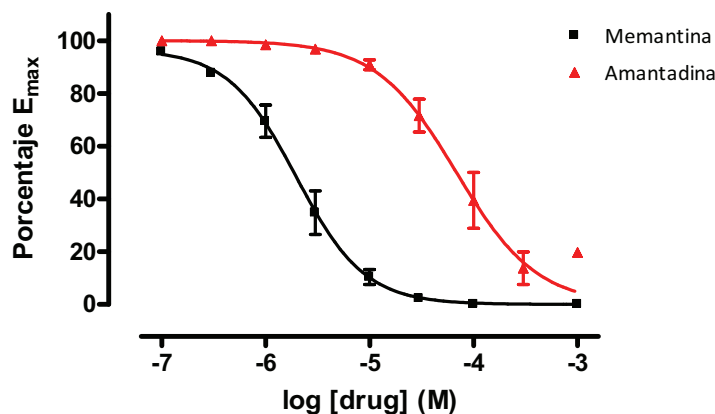


Fig. 4.11 Representación gráfica del efecto de memantina y amantadina sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]$ intracelular, inducido por $100\mu M$ de NMDA en presencia de glicina ($10\mu M$). Memantina ($n=3$), Amantadina ($n=3$).

En la tabla 4.3 se presentan los valores de IC_{50} de los dos antagonistas, frente a NMDA ($100\mu M$) en presencia de glicina ($10\mu M$).

| COMPUESTO | Media IC_{50} (μM) | SD | n |
|------------|--------------------------------|-------|---|
| Memantina | 1,57 | 0,16 | 3 |
| Amantadina | 74,64 | 40,86 | 3 |

Tabla 4.3 Valores de las IC_{50} de los antagonistas de referencia, con NMDA como agonista.

A continuación se presentan los resultados que se han obtenido con todos los compuestos evaluados en esta memoria. Igual que en la introducción, se presentan agrupados en función del grupo de investigación que los ha proporcionado. En concreto, estos son los

compuestos cedidos por el grupo del Dr. Santiago Vázquez (bisoradamantanos, noradamantanos, oxadamantanos, benzohomooxadamantanos, pentaciclos, Benzohomonoramantanos ETC y adamantanos RFP), los compuestos cedidos por el Dr. Kolocouris (AK) y por la Dra. Escolano (PF).

4.1.2 Valoración de compuestos derivados de memantina y amantadina como inhibidores del incremento de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (inducido por glutamato y NMDA), y como neuroprotectores.

Para valorar los distintos grupos de compuestos derivados de memantina y amantadina, y otros, se han realizado curvas de inhibición para cada uno de ellos (por triplicado y en distintos cultivos), y se han obtenido las IC_{50} , mostradas en las tablas correspondientes. Los ajustes no lineales de los valores de inhibición se representan agrupados en cada uno de los distintos grupos estructurales, y gráficamente sólo para los compuestos más destacables.

Además, se presentan en cada gráfica los ajustes correspondientes a los dos compuestos de referencia, memantina y amantadina, siempre representados en negro y rojo, respectivamente.

4.1.2.1 Bisoradamantanos.

4.1.2.1.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA.

Se puede observar en las gráficas (Fig. 4.12 y 4.13) y en la tabla siguientes, que hay ciertos compuestos bisoradamantanos con valores IC_{50} entre los valores de memantina y amantadina.

Resultados y discusión

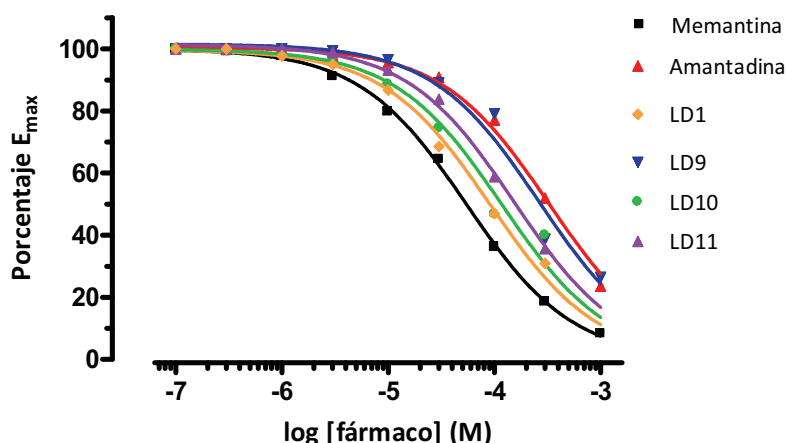


Fig. 4.12 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo Bisnoradamantanos (Parte 1).

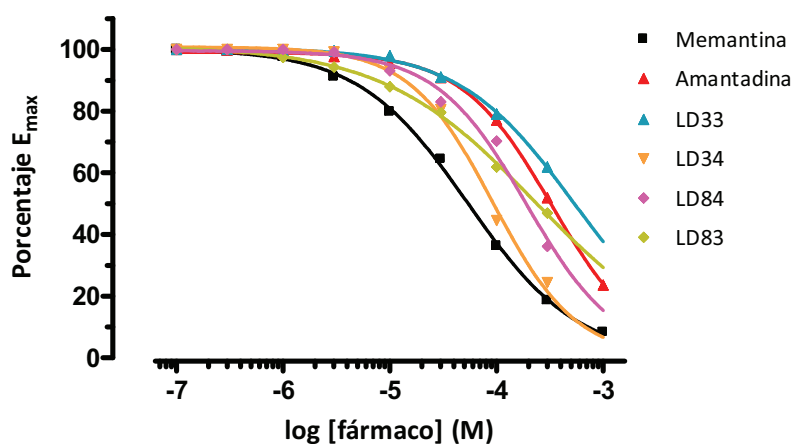


Fig. 4.13 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo Bisnoradamantanos (Parte 2).

En la primera gráfica (Fig. 4.12) se pueden observar los resultados obtenidos con los compuestos LD1, LD9, LD10 y LD11, siendo LD1 el más cercano a memantina, es decir, el compuesto de mayor potencia.

Y en la segunda gráfica (Fig. 4.13), se muestran los resultados de los compuestos LD33, LD34, LD83 y LD84, mostrándose LD34 como el compuesto más potente. De todo el grupo de bisnoradamantanos (Tabla 4.4), los compuestos más potentes han sido LD1 y LD34.

| BISNORADAMANTANOS | Media IC ₅₀ (μM) | SD | N |
|-------------------|--------------------------------|---------------|----------|
| LD 1 | 94,45 | 50,79 | 3 |
| LD 9 | 220,4 | 201,5 | 3 |
| LD 10 | 142,98 | 106,66 | 3 |
| LD 11 | 346,56 | 281,20 | 4 |
| LD 12 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 13 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 14 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 15 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 27 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 30 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 31 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 32 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 33 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 34 | 104,09 | 53,15 | 3 |
| LD 83 | 239,40 | 82,61 | 3 |
| LD 84 | 200,53 | 26,07 | 3 |

Tabla 4.4 Valores de las IC₅₀ de los compuestos del grupo bisnoradamantanos, con glutamato como agonista.

Utilizando NMDA como agonista y tal y como sucede en general con otros compuestos, los compuestos del grupo de Bisnoradamantanos han mejorado su actividad antagonista. No obstante, cabe destacar el importante incremento de potencia de memantina en comparación con el resto de compuestos.

En la primera gráfica de este grupo (Fig. 4.14), se presentan los efectos de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos LD1, LD9, LD10 y LD15, que han presentado todos ellos valores similares a los de amantadina.

Resultados y discusión

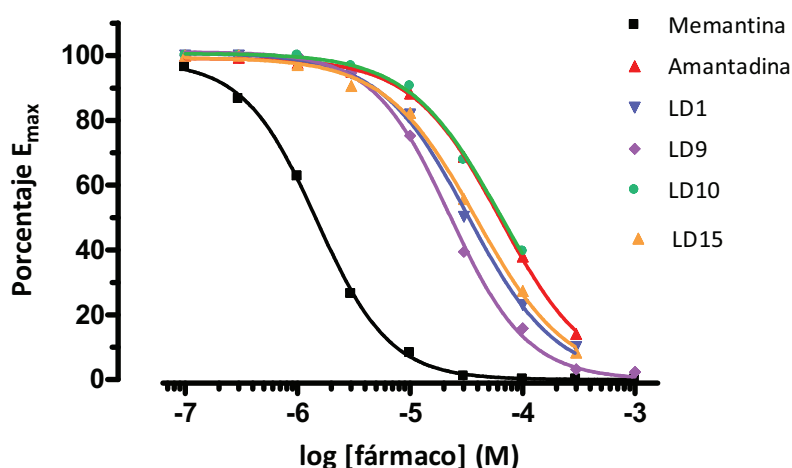


Fig. 4.14 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo Bisnoradamantanos (Parte 1).

Los compuestos LD30, LD34 y LD84 (Fig. 4.15), muestran valores de inhibición entre amantadina y memantina. LD34 es el compuesto que ha presentado mejores resultados.

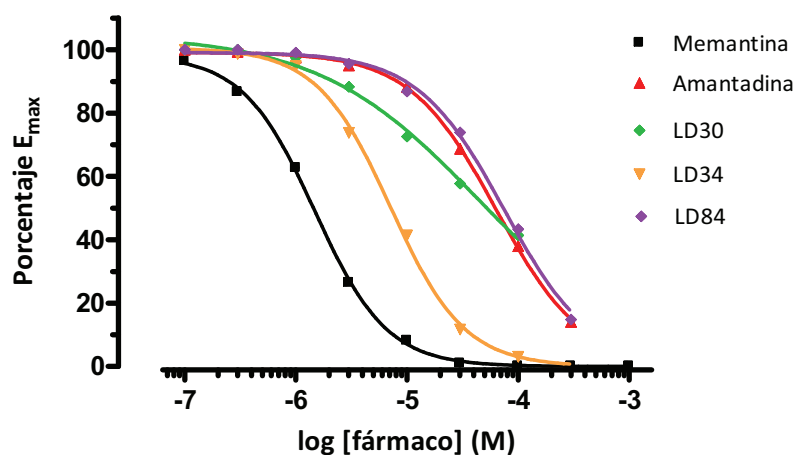


Fig. 4.15 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo Bisnoradamantanos (Parte 2).

En la tabla 4.5, se presentan los valores de IC_{50} de los distintos compuestos, que en general mejoran sus valores comparándolos con los obtenidos con glutamato como agonista. A diferencia de los resultados obtenidos con glutamato, en este caso el compuesto LD34 es

el que se ha mostrado más potente, con un valor de IC₅₀ que se aproxima al de memantina.

| BISNORADAMANTANOS | Media IC ₅₀ (μM) | SD | N |
|-------------------|--------------------------------|-------------|----------|
| LD 1 | 37,0 | 16,7 | 3 |
| LD 9 | 23,0 | 3,9 | 3 |
| LD 10 | 70,1 | 16,1 | 3 |
| LD 11 | 153,1 | 36,5 | 4 |
| LD 12 | 367,9 | 81,2 | 3 |
| LD 13 | ≥500 | - | 3 |
| LD 14 | 127,9 | 77,2 | 4 |
| LD 15 | 34,7 | 4,4 | 3 |
| LD 27 | 320,9 | 163,2 | 3 |
| LD 30 | 47,1 | 29,5 | 4 |
| LD 31 | 159,8 | 41,6 | 3 |
| LD 32 | 272,0 | 160,0 | 3 |
| LD 33 | 256,1 | 206,6 | 3 |
| LD 34 | 7,1 | 0,6 | 3 |
| LD 83 | 288,2 | 232,2 | 4 |
| LD 84 | 79,6 | 26,3 | 3 |

Tabla 4.5 Valores de las IC₅₀ de los compuestos del grupo bisnoradamantanos, con NMDA como agonista.

4.1.2.1.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad.

Los experimentos se han llevado a cabo con cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata de 7-8 días de edad.

Las condiciones de excitotoxicidad a las que han sido expuestas las células corresponden a la exposición a una concentración de 10μM de glicina y de 200μM de glutamato. En todas las placas se ha evaluado la capacidad neuroprotectora de dos concentraciones diferentes (10μM y 50μM) de los compuestos valorados y se ha comparado frente al efecto neuroprotector de MK-801 y memantina (10μM).

Resultados y discusión

Las determinaciones de viabilidad, como se ha comentado en el apartado de materiales y métodos, se han llevado a cabo utilizando el método de MTT.

Los resultados se muestran en porcentajes de viabilidad, teniendo como valor de referencia (100%) el valor obtenido en los pozos en ausencia de fármacos. En todas las gráficas se muestran las medias de los valores obtenidos ($n=3$, \pm SEM) con la exposición a glicina y glutamato, y los valores en presencia de MK-801 y memantina, como controles positivos y los resultados obtenidos con los compuestos evaluados de cada grupo a las dos concentraciones probadas.

Las diferencias estadísticamente significativas se expresan en relación a los resultados presentados por las condiciones de excitotoxicidad, es decir en presencia de glicina y glutamato.

Para realizar los experimentos con el grupo de los bisnoradamantanos se escogieron los tres compuestos con IC_{50} menores, los compuestos LD1, LD10 y LD34. De todos ellos, LD34 es el que ha presentado mejores resultados. A una concentración de $50\mu M$ ha presentado efectos neuroprotectores similares a la memantina, pero a una concentración cinco veces mayor.

En la figura 4.16 se muestran los resultados de viabilidad obtenidos con LD34 y los compuestos de referencia memantina y MK-801. Únicamente éste último ha presentado diferencias significativas frente a las células expuestas sólo a las condiciones de excitotoxicidad.

Los resultados obtenidos en la valoración de los compuestos con estructura bisnoradamantano como inhibidores del incremento de la concentración de calcio intracelular inducido por NMDA y glutamato, indican que la mayoría de compuestos de este grupo ha presentado cierta actividad antagonista, eso sí, todos ellos con potencias inferiores a la de memantina. Las estructuras de este grupo de compuestos disminuyen en 2 átomos de carbono su núcleo policíclico central respecto a memantina, manteniendo sus dos radicales metilo.

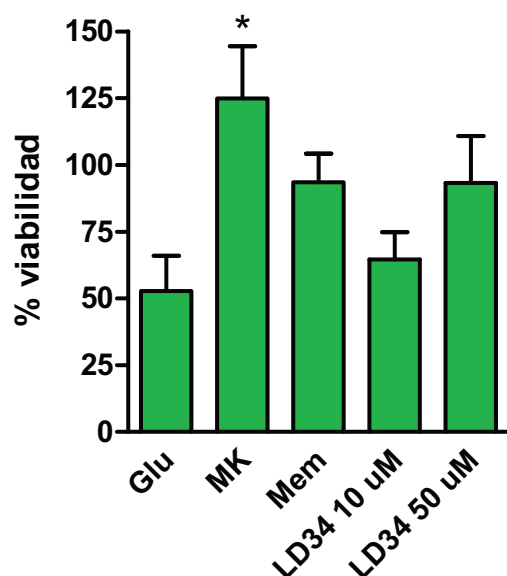


Fig. 4.16 Representación del porcentaje de viabilidad del compuesto LD34 del grupo con estructura bisnoradamantano. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

Los compuestos de este grupo que han presentado las potencias más elevadas son LD34, LD9, LD15, LD1, LD30 y LD10 (Fig. 4.17). De todos ellos el compuesto más potente ha sido el derivado de guanidina, LD34, con una potencia unas 4 veces menor que memantina y unas 10 veces mayor que amantadina.

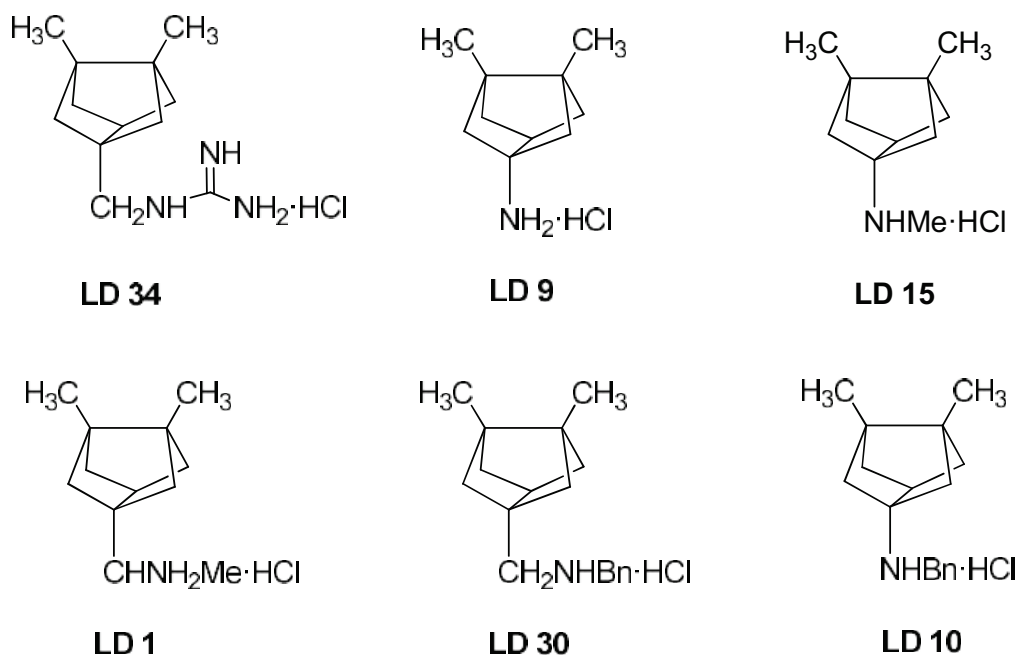


Fig. 4.17 Estructura de las aminas bisnoradamantánicas que han presentado mejores resultados.

Resultados y discusión

Si nos fijamos en las estructuras de los compuestos de la figura 4.18 se puede concluir que la alquilación de aminas equivalentes no favorece su actividad antagonista sobre los receptores NMDA. Asimismo, las bisnoradamantil-aminas presentan mayor actividad en general que sus equivalentes bisnoradamantil-metilaminas. Tenemos como ejemplos las parejas de compuestos amina/metilamina como LD9 (23.0 μ M)/LD14 (127.9 μ M) o LD11 (153.1 μ M)/LD27 (320.9 μ M) o LD15 (37.4 μ M)/LD32 (272.0 μ M) (Fig. 4.18).

Esta tendencia se invierte cuando se trata de aminas con un radical fenilo y en este caso las metilaminas (LD30 y LD31) son más potentes que sus respectivas aminas (LD10 y LD12).

Otro efecto del radical fenilo en las aminas es que en el caso de las aminas directas presentan menor potencia que los compuestos equivalentes con un metilo como sustituyente. Pero cuando se habla de metilaminas, los compuestos con un radical fenilo son más potentes que los que presentan un metilo en su lugar. En el caso de LD32/LD30, la metil-amina con un fenilo como sustituyente (LD30) presenta una potencia unas 5 veces mayor.

También se pone de manifiesto cómo afecta la sustitución de la amina a la capacidad antagonista sobre el receptor NMDA. Comparando en este caso los compuestos LD9/LD15/LD11 (Fig. 4.18), y sus valores de IC_{50} (23.0, 34.7 y 153.1 μ M respectivamente). En esta serie se puede ver como la sustitución de la amina disminuye la potencia antagonística sobre los receptores NMDA. El efecto también se observa en la serie de compuestos LD14/LD32/LD27 (valores de IC_{50} =127.9, 272.0 y 320.9 μ M respectivamente).

Resultados y discusión

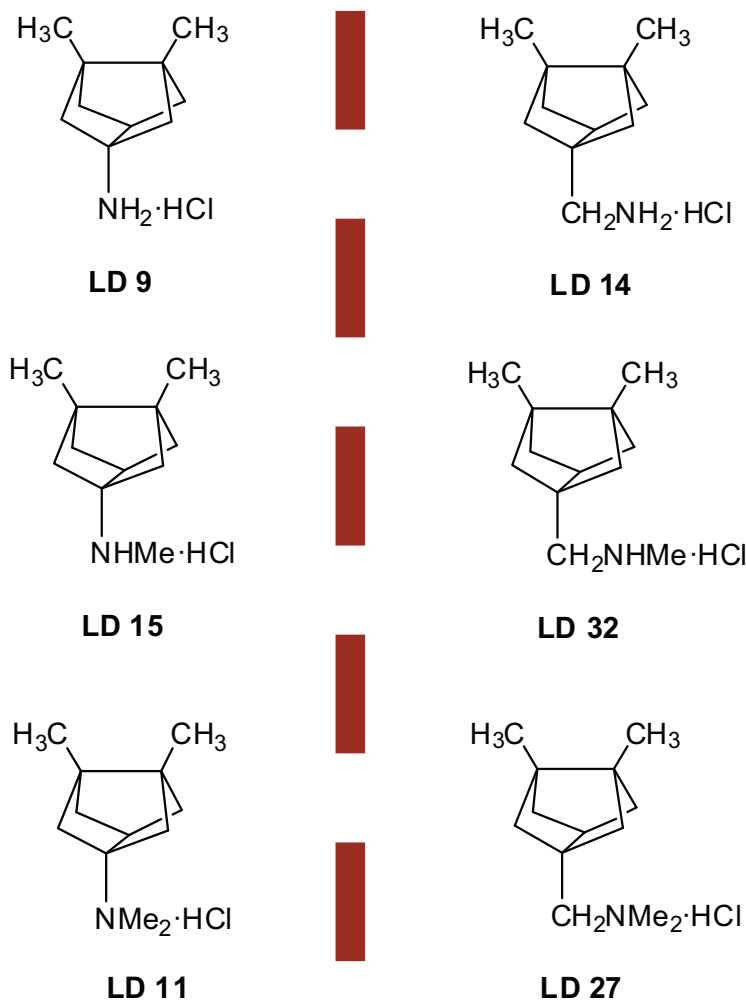


Fig. 4.18 Comparación de estructuras de tipo bisnoradamantil aminas (columna izq.) respecto a sus equivalentes bisnoradamantil metilaminas (derecha).

En general, la disminución de tamaño que supone la pérdida de dos carbonos en el núcleo central, no supone un incremento en la potencia de estos compuestos respecto a memantina.

Los tres compuestos escogidos para la valoración de la viabilidad fueron los compuestos que presentaron valores de IC₅₀ menores usando glutamato como agonista, dado que también se usa para generar las condiciones excitotóxicas utilizadas en los experimentos de viabilidad. Estos compuestos han sido LD1, LD34 y LD10. De estos tres compuestos sólo LD34 a una concentración de 50µM presenta una neuroprotección cercana a la presentada por memantina.

Resultados y discusión

Este resultado se corresponde con los valores de IC_{50} obtenidos como antagonistas de rNMDA. El hecho de que LD1 sea más potente en los experimentos con glutamato como agonista pero no presente tanta neuroprotección en condiciones de excitotoxicidad podría corroborar que este tipo de fenómeno está principalmente mediado por rNMDA, como ya es conocido. El que ha presentado mayor neuroprotección también había presentado el valor de IC^{50} más bajo con NMDA como agonista.

4.1.2.2 Noradamantanos.

4.1.2.2.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA.

En este grupo, la mayoría de los compuestos han presentado una actividad antagonista sobre los receptores NMDA poco destacable. En las gráficas siguientes (Fig. 4.19 y 4.20) se muestra el comportamiento de los mejores compuestos del grupo, LD94, LD43, LD44, LD45 y LD51. LD51, el compuesto más potente, muestra valores similares a amantadina.

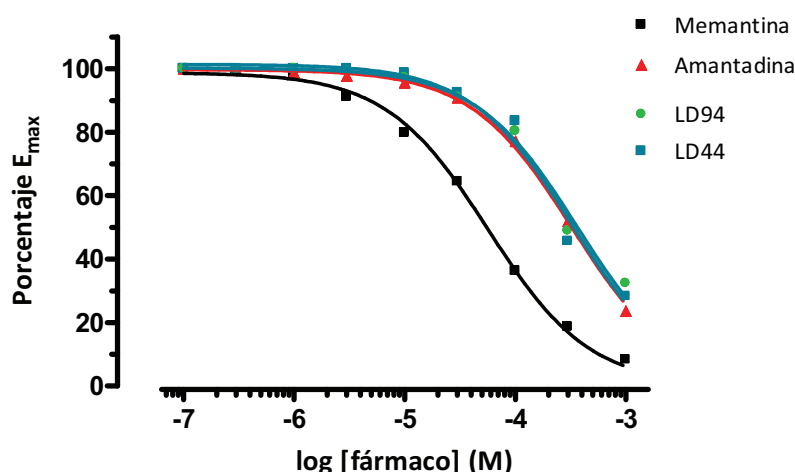


Fig. 4.19 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo noradamantanos (Parte 1).

Resultados y discusión

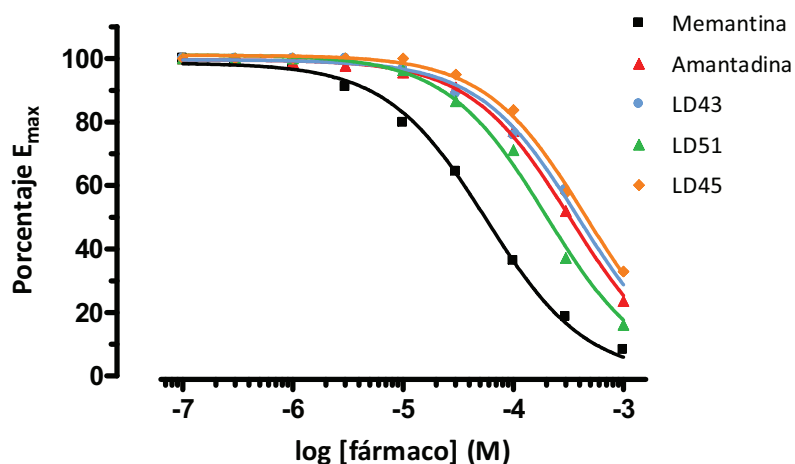


Fig. 4.20 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo noradamantanos (Parte 2).

En la tabla 4.6 se muestra el valor de las IC_{50} de todos los noradamantanos.

| NORADAMANTANOS | MEAN IC_{50} (μM) | SD | N |
|----------------|-------------------------------|--------------|----------|
| LD 24 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 25 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 29 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 35 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 36 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 37 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 38 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 39 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 40 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 41 | ≤ 500 | - | 5 |
| LD 42 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 43 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 44 | 388,9 | 227,2 | 3 |
| LD 45 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 46 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 50 | ≤ 500 | - | 5 |
| LD 51 | 205,1 | 49,3 | 4 |
| LD 94 | 362,3 | 31,4 | 4 |

Tabla 4.6 Valores de las IC_{50} de los compuestos más destacables del grupo noradamantanos, con glutamato como agonista.

Resultados y discusión

Como en el grupo anterior, los mismos compuestos usando NMDA como agonista, mejoran sus valores de IC_{50} . En la figura 4.21 se muestran los efectos de inhibición de los compuestos LD36, LD37 y LD94, todos con un comportamiento similar a amantadina.

En la segunda gráfica de este grupo (Fig. 4.22) se representan los efectos de inhibición de los compuestos LD43, LD44, LD45, LD50 y LD51. En este caso, el compuesto LD45 es el que ha presentado mejores valores de inhibición.

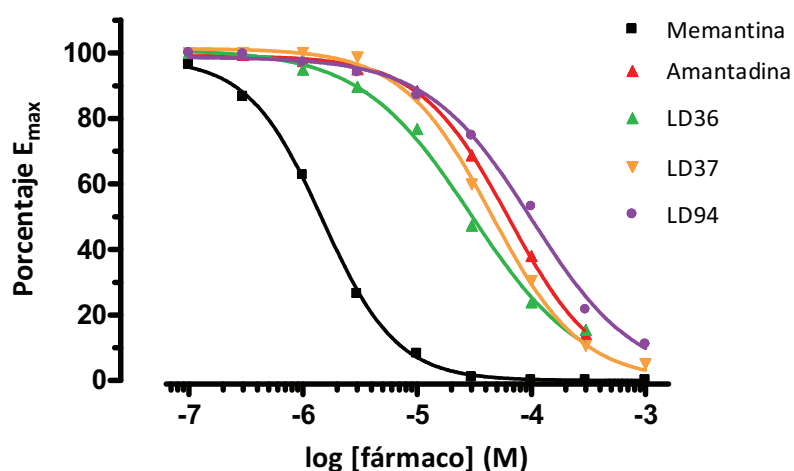


Fig. 4.21 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo Noradamantanos (Parte 1).

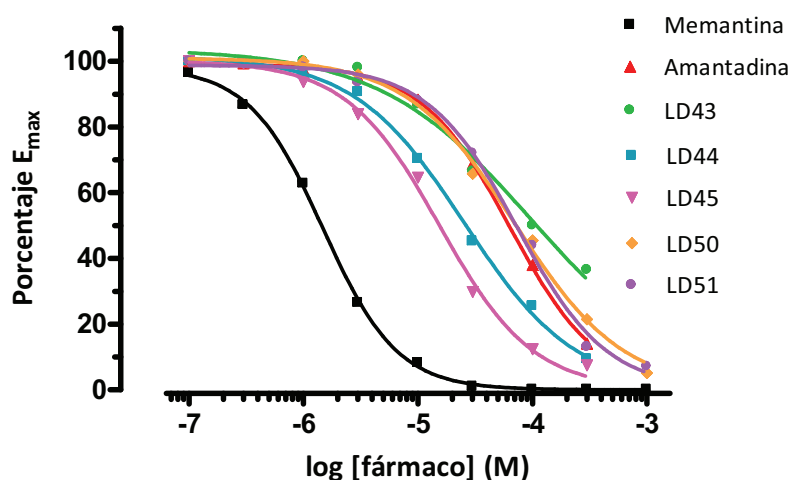


Fig. 4.22 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo Noradamantanos (Parte 2).

En la tabla 4.7 se relacionan los valores de IC₅₀ para este grupo, del que cabe destacar el compuesto LD45 como el más potente del grupo.

| NORADAMANTANOS | Media IC ₅₀ (μM) | SD | N |
|----------------|--------------------------------|-------------|----------|
| LD 24 | 177,5 | 9,4 | 3 |
| LD 25 | 121,9 | 55,4 | 3 |
| LD 29 | 219,0 | 14,4 | 3 |
| LD 35 | 220,0 | 170,0 | 3 |
| LD 36 | 31,1 | 9,2 | 3 |
| LD 37 | 45,2 | 6,8 | 3 |
| LD 38 | 124,8 | 41,4 | 3 |
| LD 39 | 168,4 | 39,2 | 3 |
| LD 40 | 404,4 | 41,0 | 3 |
| LD 41 | ≥500 | - | 3 |
| LD 42 | 105,4 | 37,2 | 3 |
| LD 43 | 90,6 | 46,6 | 3 |
| LD 44 | 24,9 | 13,3 | 3 |
| LD 45 | 16,7 | 7,3 | 4 |
| LD 46 | 498,3 | 220,3 | 4 |
| LD 50 | 71,2 | 11,1 | 3 |
| LD 51 | 73,6 | 21,2 | 3 |
| LD 94 | 111,4 | 40,2 | 4 |

Tabla 4.7 Valores de las IC₅₀ de los compuestos del grupo noradamantanos, con NMDA como agonista.

4.1.2.2.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad.

Del grupo de los noradamantanos, se han podido valorar los compuestos LD36, LD37 y LD39. Los dos primeros se encuentran entre los mejores compuestos del grupo y de ellos, el compuesto LD36 es el único que ha presentado una capacidad neuroprotectora similar a la

Resultados y discusión

presentada por memantina, incluso ligeramente mejor, si bien ésta se obtuvo a la máxima concentración probada (50 μ M).

En la figura 4.23 se pueden observar los porcentajes de viabilidad que han presentado el compuesto LD36, memantina y MK-801. MK-801 y el compuesto LD36 a la concentración de 50 μ M han presentado diferencias significativas.

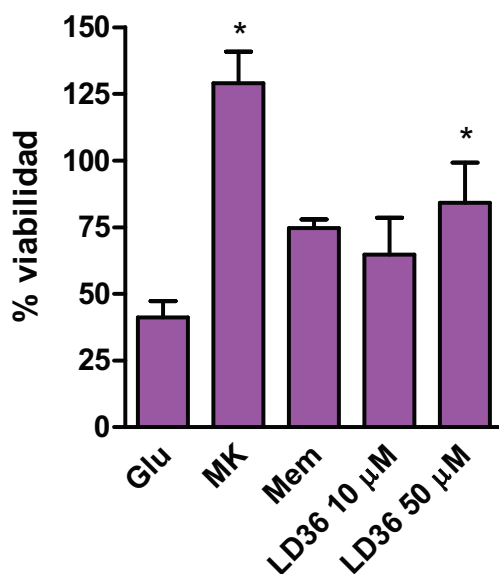


Fig. 4.23 Representación del porcentaje de viabilidad del compuesto LD36 del grupo con estructura noradamantano. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

La mayoría de los compuestos del grupo noradamantano han mostrado actividad antagonista moderada con NMDA como agonista. Y los mejores, con valores de IC_{50} cercanos a amantadina e incluso claramente mejores, como LD45, LD44, LD36 y LD37 (Fig. 4.24).

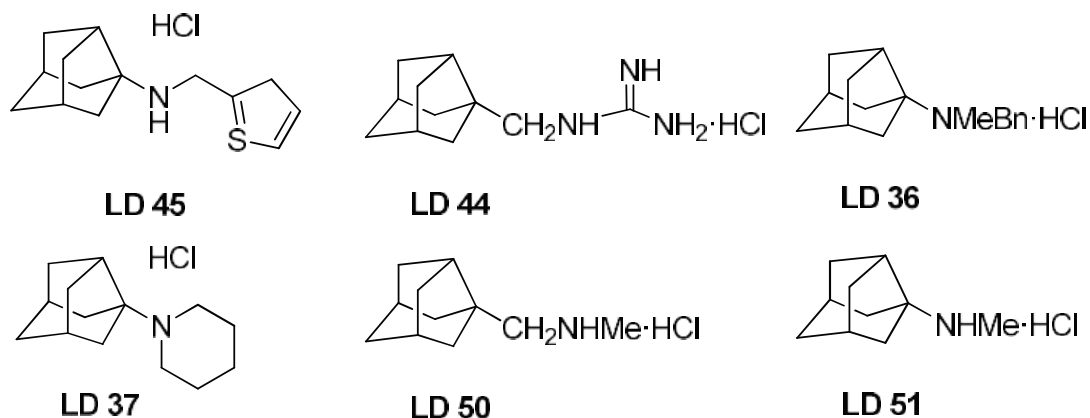


Fig. 4.24 Estructuras de los mejores compuestos del grupo de los noradamantanos.

Estructuralmente los compuestos de este grupo difieren de los adamantanos en que han sufrido una contracción del núcleo central de 1 átomo de C, presentando un átomo más que los bisnoradamantanos. Si se comparan los noradamantanos con sus aminas bisnoradamantánicas equivalentes evaluadas, la gran mayoría de los compuestos con estructura noradamantano han presentado menor potencia como antagonistas de los receptores NMDA. Parece ser más favorable para la interacción del compuesto con el canal del receptor una reducción mayor del núcleo policíclico central.

En este grupo de compuestos, también parece que las noradamantilaminas obtienen mejores resultados que las equivalentes noradamantilmetilaminas, y se obtienen valores de IC_{50} menores en la mayoría de las aminas LD25, LD51, LD24, y LD36 (121.9, 73.6, 177.5 y 31.1 μ M respectivamente) frente a los valores de las metilaminas

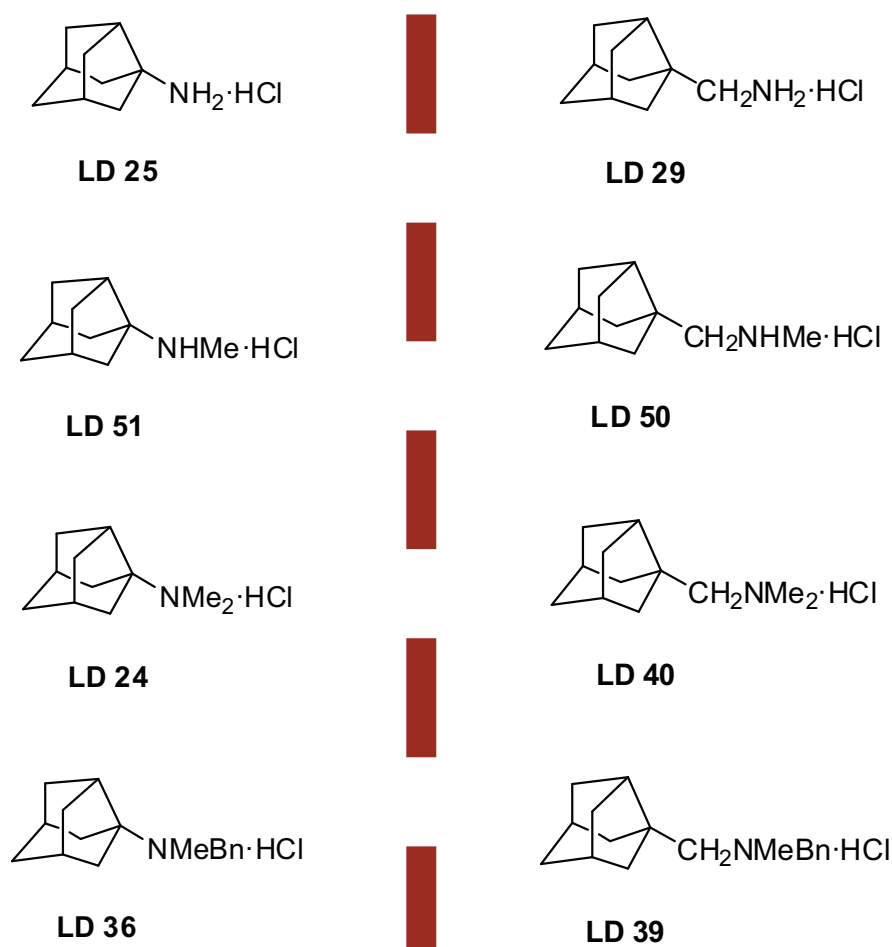


Fig. 4.25 Estructuras de tipo noradamantil amina (columna izq.) respecto a sus equivalentes noradamantil metilamina (derecha).

Resultados y discusión

correspondientes LD29, LD50, LD40 y LD39 (219.0, 71.2, 404.4 y 168.4 μ M respectivamente)(Fig. 4.25).

En el caso de LD51 y LD50 presentan valores muy similares entre ellos, pero la metilamina de esta pareja presenta una potencia ligeramente mayor que LD51. Estos dos compuestos tampoco siguen la tendencia general cuando consideramos la alquilación de la amina. En el grupo de compuestos anterior, la mayor alquilación parecía disminuir la potencia de los compuestos de la serie. En este grupo tenemos dos series de compuestos de aminas primarias/secundarias/terciarias que corresponden a LD25/LD51/LD24 o LD29/LD50/LD40 que parecen seguir la misma tendencia, pero en los dos grupos, la amina y metilamina secundaria (LD51 y LD50) pasan a tener la mayor potencia de sus series.

El hecho de tener un radical fenilo en la amina no parece afectar igual a las aminas secundarias que a las terciarias. LD36 y LD39, amina y metilamina terciarias con un radical fenilo muestran valores de IC₅₀ menores que los compuestos equivalentes con un metilo de sustituyente en la amina, mientras que LD35 y LD38, amina y metilamina secundarias con un radical fenilo presentan potencias menores que sus compuestos equivalentes.

Otro dato destacable es que el segundo compuesto más potente es un derivado de guanidina igual que el mejor compuesto del grupo anterior con estructura de bisnoradamantano.

La valoración de la viabilidad no se pudo realizar con todos los mejores compuestos del grupo por limitaciones en la cantidad de compuesto disponible, pero sí con algunos compuestos interesantes como LD36, LD37 y LD39 (Fig. 4.26). LD36 con una potencia unas 20 veces menor que memantina como antagonista sobre rNMDA, ha mostrado un porcentaje de supervivencia a la concentración mayor probada ligeramente superior al de memantina. Una explicación posible sería un efecto neuroprotector no mediado por el propio receptor NMDA, si bien establecer más concretamente esta posibilidad requeriría más estudios.

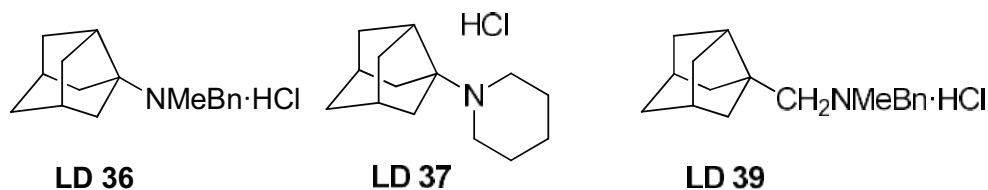


Fig. 4.26 Estructura de compuestos del grupo utilizados en la valoración de la capacidad neuroprotectora.

4.1.2.3 Oxadamantanos.

4.1.2.3.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA.

En el grupo de los oxadamantanos hay algunos compuestos destacables con valores cercanos e incluso inferiores a los de memantina. En la grafica (Fig. 4.27) se representan los resultados obtenidos con los compuestos LD52 y LD53, más similares a amantadina y LD55 más cercano a memantina.

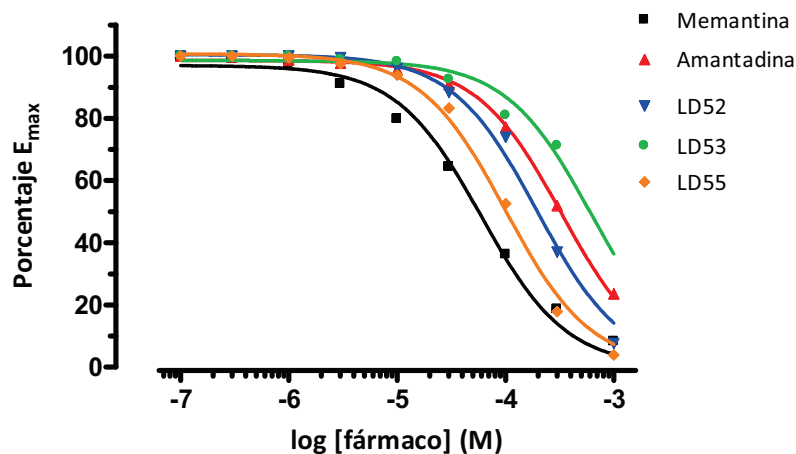


Fig. 4.27 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo Oxadamantanos (Parte 1).

También se muestran los efectos (Fig. 4.28) de los compuestos LD56, LD58 y LD68 y LD133. LD58 presenta valores muy parecidos a amantadina, LD56 y LD133, muy similares entre ellos, presentan valores entre memantina y amantadina. Finalmente hay que destacar el

Resultados y discusión

compuesto LD68 que tiene una IC_{50} menor incluso que la memantina, siendo el mejor de su grupo, como se expresa en la tabla 4.8.

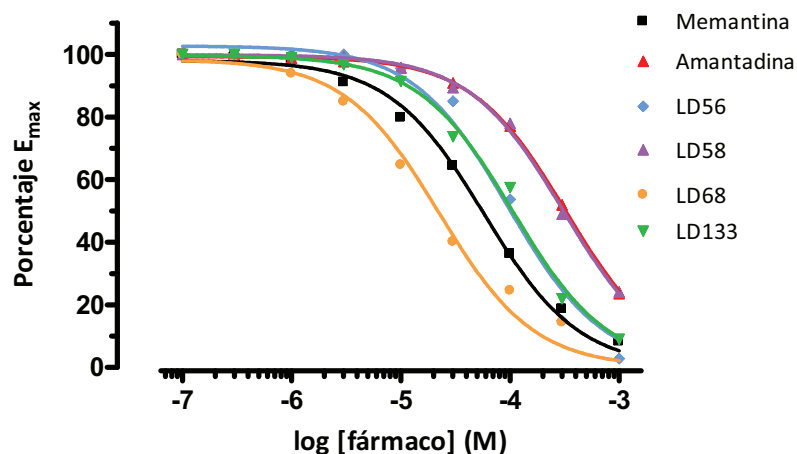


Fig. 4.28 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo Oxadamantanos (Parte 2).

| OXADAMANTANOS | Media IC_{50} (μM) | SD | N |
|---------------|--------------------------------|--------------|----------|
| LD 3 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 4 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 5 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 6 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 16 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 17 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 18 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 52 | 223,3 | 104,1 | 4 |
| LD 53 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 54 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 55 | 105,6 | 20,7 | 4 |
| LD 56 | 107,8 | 28,9 | 3 |
| LD 57 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 58 | 350,3 | 217,2 | 4 |
| LD 59 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 60 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 61 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 68 | 14,5 | 1,4 | 3 |
| LD 133 | 117,2 | 27,7 | 3 |

Tabla 4.8 Valores de las IC_{50} de los compuestos más destacables del grupo oxadamantano, con glutamato como agonista.

Resultados y discusión

Por lo que se refiere a los experimentos con NMDA como agonista, del grupo de los oxadamantanos destacan en la gráfica (Fig. 4.29) los compuestos LD52, LD57 y LD133. Aun así, solo se obtienen valores de IC similares a amantadina.

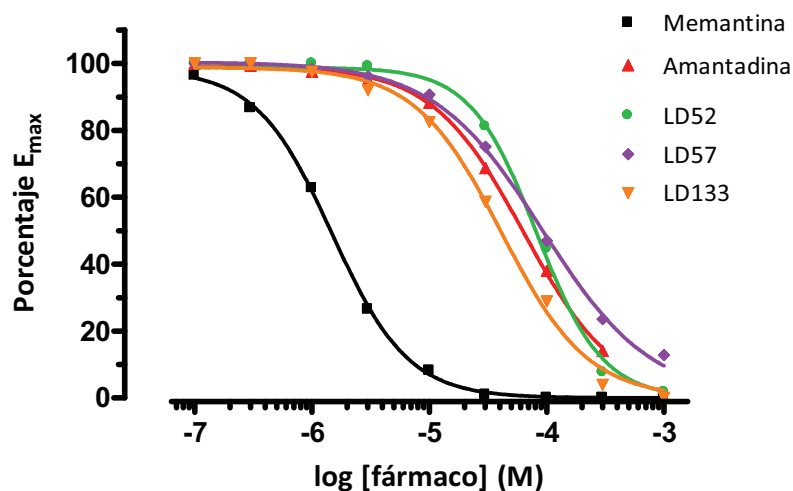


Fig.4.29 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo oxadamantanos (Parte 1).

En la segunda gráfica de este grupo (Fig. 4.30) se presentan los efectos de los compuestos LD55, LD56 y LD68, todos ellos con comportamiento similar a amantadina. El LD68 es el único que se aproxima a memantina.

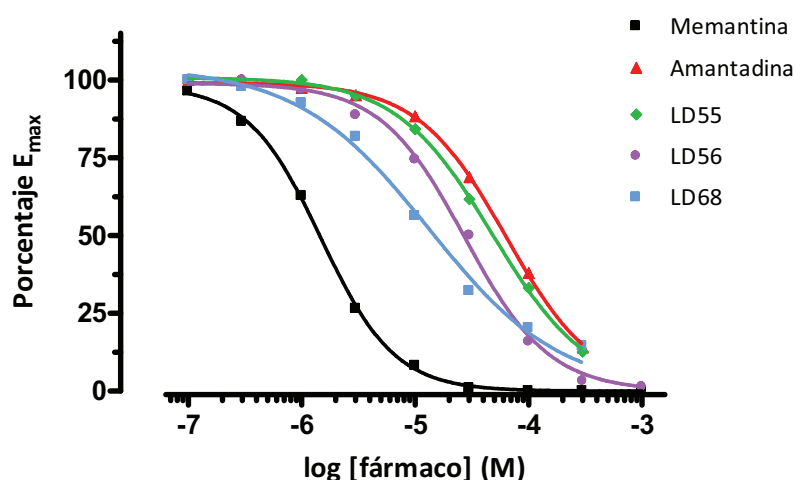


Fig. 4.30 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo oxadamantanos (Parte 2).

Resultados y discusión

En la tabla 4.9 se puede observar que de los compuestos destacados el que ha presentado mayor potencia ha sido el compuesto LD68.

| OXADAMANTANOS | Media IC ₅₀ (μ M) | SD | N |
|---------------|--------------------------------------|-------------|----------|
| LD 3 | ≥ 500 | - | 5 |
| LD 4 | 468,7 | 210,0 | 4 |
| LD 5 | 253,0 | 42,6 | 3 |
| LD 6 | ≥ 500 | - | 5 |
| LD 16 | 357,0 | 46,4 | 4 |
| LD 17 | ≥ 500 | - | 3 |
| LD 18 | 458,6 | 90,3 | 3 |
| LD 52 | 83,0 | 9,8 | 3 |
| LD 53 | ≥ 500 | - | 3 |
| LD 54 | 198,1 | 58,7 | 3 |
| LD 55 | 55,1 | 23,8 | 4 |
| LD 56 | 31,8 | 18,9 | 4 |
| LD 57 | 94,0 | 22,0 | 3 |
| LD 58 | 226,5 | 64,9 | 3 |
| LD 59 | ≥ 500 | - | 3 |
| LD 60 | ≥ 500 | - | 4 |
| LD 61 | ≥ 500 | - | 3 |
| LD 68 | 14,1 | 6,3 | 5 |
| LD 133 | 45,9 | 21,2 | 3 |

Tabla 4.9 Valores de las IC₅₀ de los compuestos oxadamantanos, con NMDA como agonista.

4.1.2.3.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad.

En el grupo de los oxadamantanos, no ha sido posible realizar experimentos con LD55, LD56 y LD133, que ofrecieron algunos de los mejores valores de IC₅₀ del grupo frente a NMDA, debido a la escasa cantidad de producto sintetizado. Se escogieron los compuestos LD52 y LD68, este último el más potente del grupo. Con el compuesto LD52 no se han obtenido resultados muy relevantes a ninguna de las concentraciones evaluadas. El compuesto LD68 ha presentado

Resultados y discusión

porcentajes de inhibición más próximos al de memantina pero sin alcanzarlo. En la figura 4.19 se muestran estos porcentajes de inhibición y se puede ver que solo ha presentado diferencias significativas el MK-801.

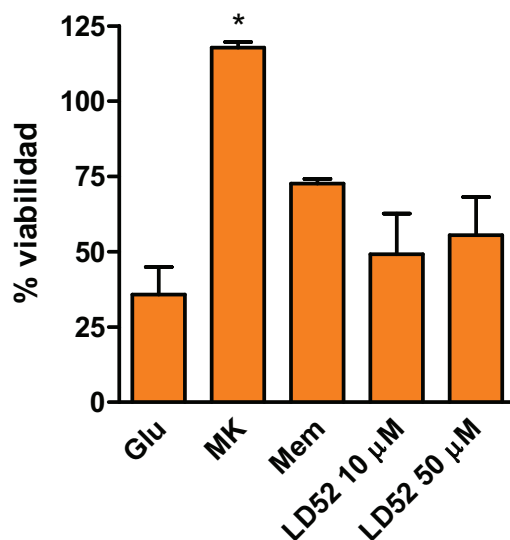


Fig. 4.31 Representación del porcentaje de viabilidad del compuesto LD52 del grupo con estructura oxadamantano. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

El grupo de los oxadamantanos se caracteriza estructuralmente por tener un carbono del ciclo sustituido por un átomo de oxígeno. Esto aumenta el volumen del cuerpo central de la molécula.

En este grupo más de la mitad de los compuestos han presentado actividad apreciable como antagonista de los receptores NMDA. En general, la potencia de estos compuestos frente a glutamato se correlacionan bien con los resultados obtenidos utilizando NMDA como agonista. En el caso del uso de NMDA como agonista, los mejores compuestos son los representados en la figura 4.32, LD68, LD56, LD133, LD55 y LD52.

También se puede afirmar que contrariamente a lo que ha ocurrido en los grupos anteriores, aquí la alquilación parece favorecer la actividad antagonista de los compuestos. Un ejemplo de ello son las aminas

Resultados y discusión

LD52, LD56 y LD55 (primaria, secundaria y terciaria, respectivamente). Las aminas secundarias o terciarias del grupo con un etilo en el C-3 del núcleo, son más potentes que las aminas primarias correspondientes.

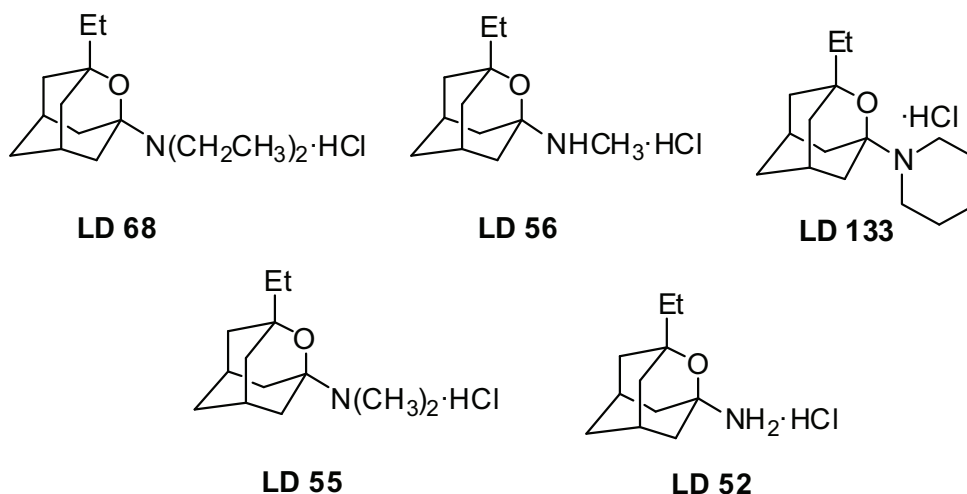


Fig. 4.32 Estructura de los mejores compuestos del grupo de los oxadamantanos.

Si se observan los valores de IC_{50} y las estructuras de los compuestos del grupo de la figura 4.33 resaltan dos hechos. Por un lado los compuestos que no tienen sustituido el C-3 del núcleo han presentado muy poca o ninguna actividad como antagonistas. Esto comprende el compuesto LD4 y sus derivados LD3, LD5, LD18, LD6, LD16 y LD17. Por otro lado, los compuestos LD59, LD60 y LD61 que presentan un metilo en el C-3 del núcleo tampoco han mostrado actividad apreciable.

Si nos fijamos ahora en los compuestos más activos (Fig. 4.32), todos ellos presentan un etilo en C-3 del núcleo 2-oxa-adamantánico. Parece ser que la alquilación de esta posición del núcleo es importante para la actividad antagonista en los compuestos de este grupo que como característica diferencial contiene un átomo de oxígeno en el núcleo de su estructura.

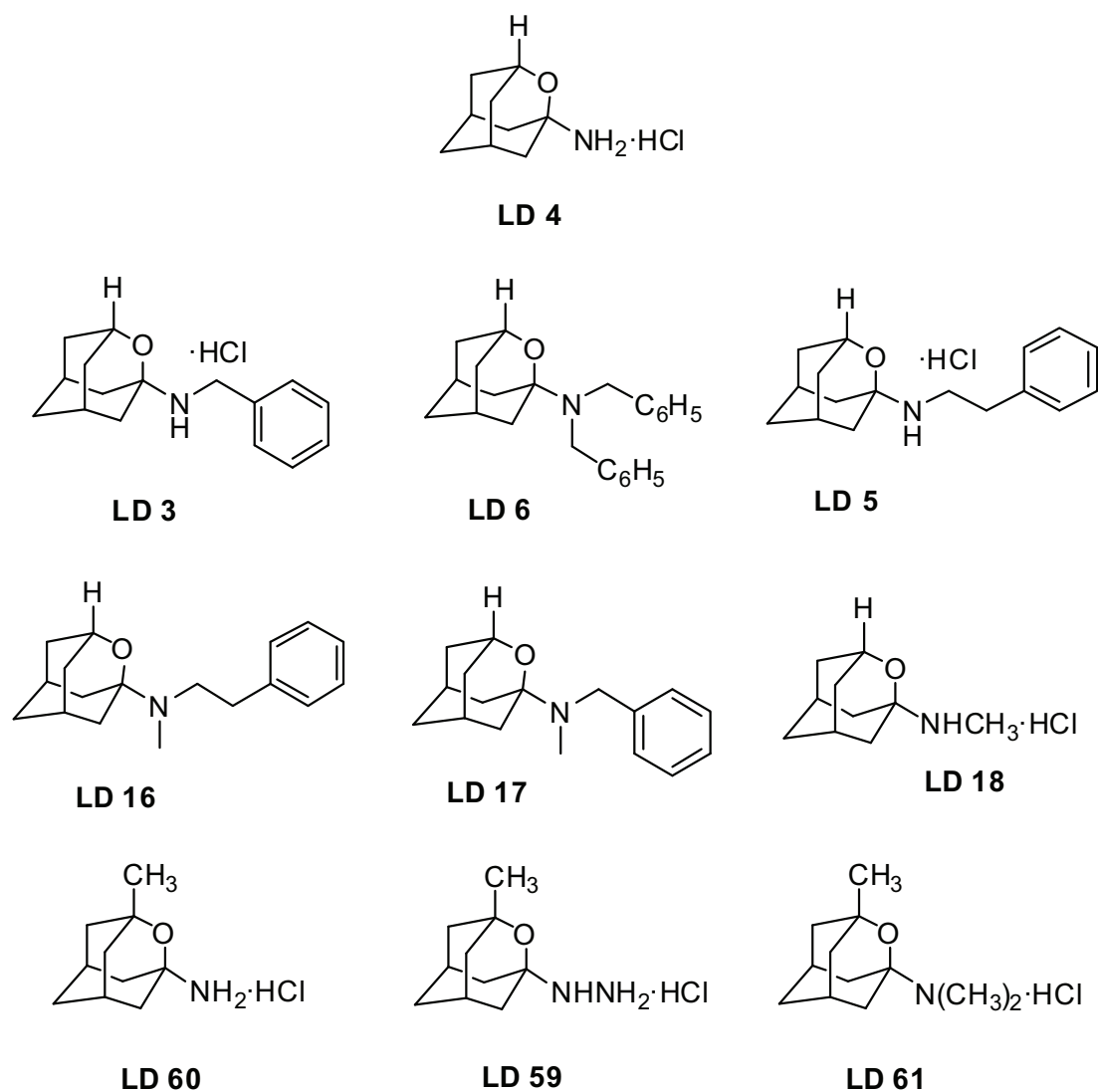


Fig. 4.33 Estructuras de diferentes aminas del grupo de los compuestos con estructura oxadamantano.

Otra serie interesante es la de la amina primaria con distintos sustituyentes en la posición C-3 del núcleo LD52, LD57 y LD58 (Fig. 4.34). Este último compuesto con un radical fenilo es el que presenta menor potencia. Los otros dos compuestos presentan potencias mayores y similares entres sí.

Si comparamos los resultados de este grupo con los bisnoradamantanos y noradamantanos, el aumento de volumen del núcleo no mejora su capacidad antagonista sobre el receptor, a excepción de los compuestos LD52, LD55 y LD56, todos ellos con un radical etilo en el C-3

Resultados y discusión

del núcleo, que presentan valores inferiores de IC_{50} que sus equivalentes noradamantanos y similares a sus equivalentes bisnoradamantanos.

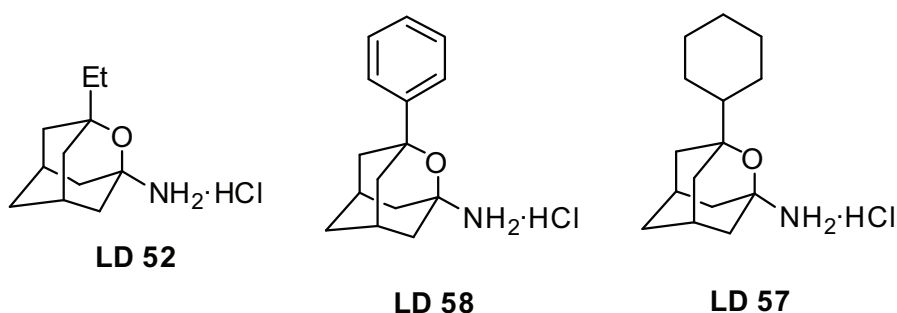


Fig. 4.34 Estructura de una serie de aminas primarias con distintos sustituyentes en el ciclo central del grupo de los compuestos oxadamantanos.

De LD68, LD55 y LD56, LD68 es el que tiene el grupo amino más voluminoso de los tres y el que tiene mejor valor de IC_{50} . El compuesto LD68 tiene un valor de IC_{50} muy similar con los dos agonistas usados. Cuando se utiliza NMDA el valor obtenido es unas 8 o 10 veces mayor que memantina, mientras que cuando se utiliza glutamato como agonista, el valor obtenido por LD68 es unas cinco veces menor que el de memantina. LD133 supone una variación de LD68 más rígida estructuralmente que no aporta mejoras respecto al mejor compuesto del grupo.

Se ha realizado la valoración de la viabilidad de los compuestos LD52 y LD68. LD52 presenta una IC_{50} ligeramente menor que amantadina y unas 4 veces mayor que amantadina con glutamato como agonista. Con el mismo agonista, LD68 ha obtenido un valor de IC_{50} unas 23 veces menor que amantadina y unas 4 veces menor también que memantina. Estos resultados no se han reflejado en los experimentos de viabilidad ya que LD68 ha presentado porcentajes de viabilidad inferiores a memantina, a las dos concentraciones evaluadas. Cabe destacar que ha presentado mayor neuroprotección a la menor concentración probada ($10\mu M$).

4.1.2.4 Benzohomooxadamanos.

4.1.2.4.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA.

El grupo de benzohomooxadamanos es el que ha proporcionado mayor número de compuestos a destacar, con valores de IC_{50} menores que la amantadina, entre la amantadina y la memantina, o incluso menores que la memantina.

En la figura 4.35 se representan los efectos de los compuestos LD7, LD20, LD23 y LD67 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato. LD7 presenta

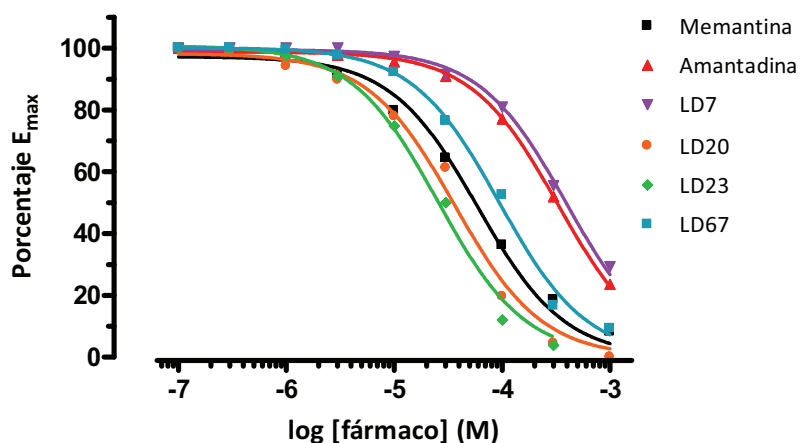


Fig. 4.35 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo Benzohomooxadamanos (Parte 1).

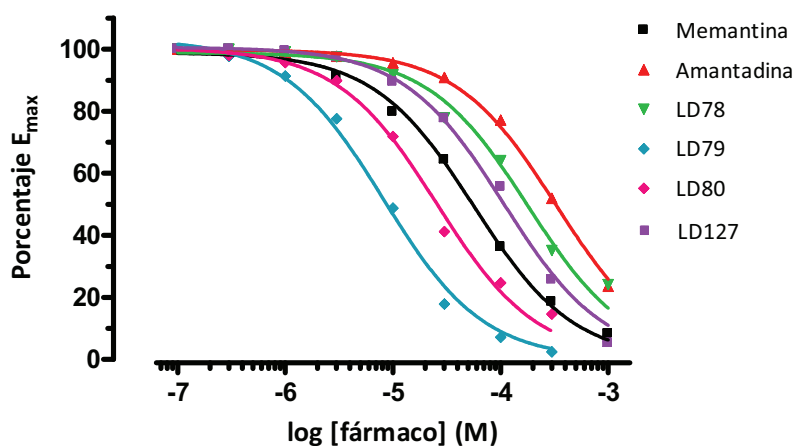


Fig. 4.36 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo Benzohomooxadamanos (Parte 2).

Resultados y discusión

valores cercanos a amantadina, LD67 presenta valores inferiores a amantadina y muy cercanos a memantina, pero LD20 y LD23 han mostrado valores inferiores a memantina.

En la figura 4.36 se presentan los efectos de los compuestos LD78, LD79, LD80 y LD127, todos ellos con valores inferiores a amantadina. LD78 y LD127 presentan valores entre amantadina y memantina, y los compuestos LD79 y LD80 han mostrado valores inferiores a memantina en ambos casos.

Entre estos benzohomooxadamantanos, el LD20, LD23, LD79 y LD80 pertenecen al grupo de compuestos con IC_{50} menores que la memantina. Y de entre ellos el compuesto con mayor potencia es el LD79 con un valor de IC_{50} de $9,29\mu M$, como se muestra en la tabla 4.10

| BENZOHOMO- OXADAMANTANOS | Media IC_{50} (μM) | SD | N |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------|----------|
| LD 7 | 407,7 | 190,4 | 3 |
| LD 8 | ≤ 500 | | 3 |
| LD 19 | ≤ 500 | | 4 |
| LD 20 | 39,5 | 2,6 | 3 |
| LD 21 | ≤ 500 | | 3 |
| LD 22 | ≤ 500 | | 3 |
| LD 23 | 28,2 | 7,8 | 3 |
| LD 67 | 96,2 | 23,0 | 3 |
| LD 78 | 167,6 | 72,0 | 4 |
| LD 79 | 9,3 | | 4 |
| LD 80 | 22,0 | 5,4 | 3 |
| LD 97 | ≤ 500 | | 3 |
| LD 98 | ≤ 500 | | 3 |
| LD 117 | ≤ 500 | | 3 |
| LD 126 | ≤ 500 | | 3 |
| LD 127 | 114,9 | 29,3 | 3 |
| LD 128 | ≤ 500 | | 3 |
| LD 131 | ≤ 500 | | 4 |
| LD 132 | ≤ 500 | | 3 |

Tabla 4.10 Valores de las IC_{50} de los compuestos del grupo benzohomooxadamantanos, con glutamato como agonista.

Resultados y discusión

El grupo de los benzohomooxadamanos también es, en los experimentos con NMDA como agonista, el que ha presentado una mayor cantidad de compuestos interesantes. En la Fig. 4.37 se representan los compuestos LD7, LD20, LD23 y LD67, todos ellos entre amantadina y memantina.

En la Fig. 4.38 se han representado el efecto de inhibición de los compuestos LD78, LD79, LD80 y LD127, que igual que en la gráfica anterior presentan un comportamiento entre memantina y amantadina.

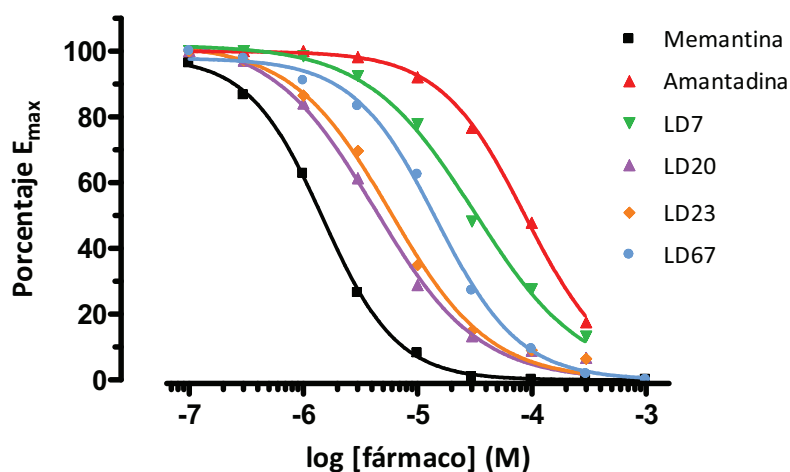


Fig. 4.37 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo de los benzohomooxadamanos (Parte 1).

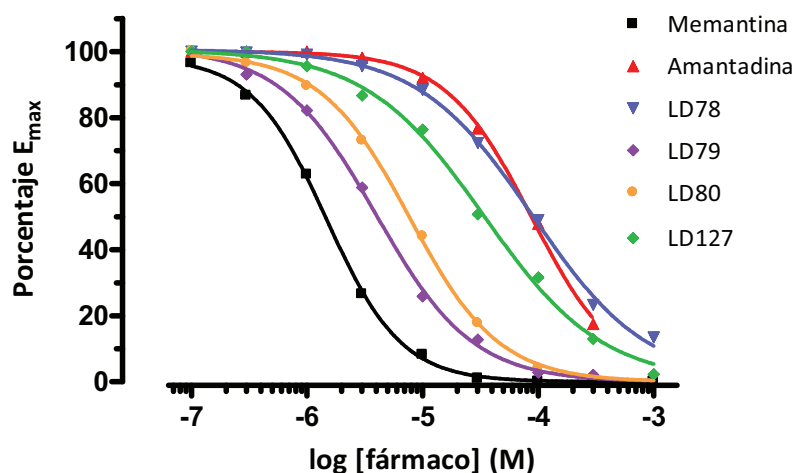


Fig. 4.38 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo de los benzohomooxadamanos (Parte 2).

Resultados y discusión

En la tabla 4.11 se presentan los valores de las IC_{50} de todos los compuestos del grupo de los benzohomooxadamantanos, en la que se muestran valores de los compuestos destacados en las gráficas anteriores. El compuesto LD20 es el que ha presentado mayor potencia, con un valor muy cercano al de memantina.

| BENZOHOMOOXA- ADAMANTANOS | Media IC_{50} (μM) | SD | N |
|--------------------------------------|---|-------------|----------|
| LD 7 | 35,0 | 13,6 | 4 |
| LD 8 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 19 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 20 | 3,8 | 0,4 | 3 |
| LD 21 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 22 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 23 | 6,0 | 2,3 | 3 |
| LD 67 | 14,2 | 1,9 | 3 |
| LD 78 | 97,6 | 44,5 | 3 |
| LD 79 | 4,0 | 0,7 | 3 |
| LD 80 | 7,7 | 1,7 | 3 |
| LD 97 | 226,1 | 20,4 | 3 |
| LD 98 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 117 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 126 | 371,3 | 298,3 | 3 |
| LD 127 | 33,8 | 3,3 | 4 |
| LD 128 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 131 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 132 | ≤ 500 | - | 3 |

Tabla 4.11 Valores de las IC_{50} del grupo de compuestos benzohomooxadamantanos con NMDA como agonista.

4.1.2.4.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad.

Con los benzohomonoradamantanos, se han podido probar cinco de los mejores compuestos, con las IC_{50} menores, LD20, LD23, LD67, LD79 y LD80. Además se han evaluado también los compuestos LD128 y LD131, que al poseer unas características estructurales particulares, se juzgó interesante evaluar su actividad.

Si bien la actividad antagonista frente al rNMDA de estos dos compuestos es despreciable, curiosamente presentan cierta actividad neuroprotectora. LD128 ha presentado diferencias estadísticamente significativas a la concentración mayor probada, con unos porcentajes de inhibición ligeramente superiores a los de memantina. MK-801 también ha presentado diferencias significativas. En la figura 4.39 se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos por LD128 y los compuestos memantina y MK-801.

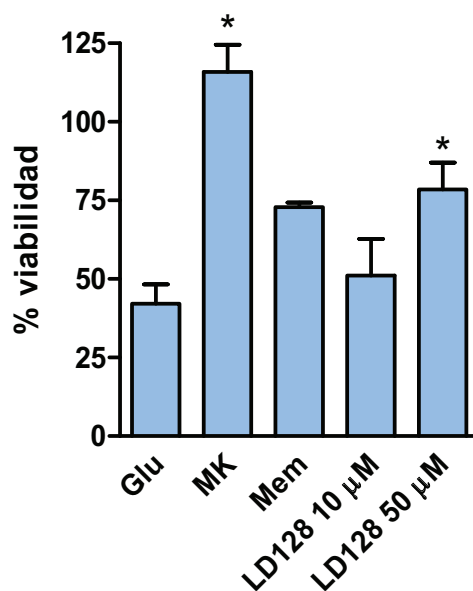


Fig. 4.39 Representación del porcentaje de viabilidad del compuesto LD128 del grupo con estructura benzohomonoradamantano. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

Resultados y discusión

Sin embargo, LD20 y LD80, que presentaron valores bajos de IC₅₀ frente a rNMDA (LD20 es el compuesto más potente), no destacan por su actividad neuroprotectora. Han mostrado resultados parecidos, presentando en todos los casos valores de viabilidad por debajo de los valores presentados por memantina.

Finalmente, los compuestos LD23, LD67 y LD79 son los que han presentado porcentajes de viabilidad más elevados. Como se puede ver en las figuras 4.40, 4.26 y 4.27; a la concentración de 50µM los tres compuestos han mostrado valores de viabilidad muy similares al obtenido con memantina, y LD23 y LD67 han presentado diferencias significativas

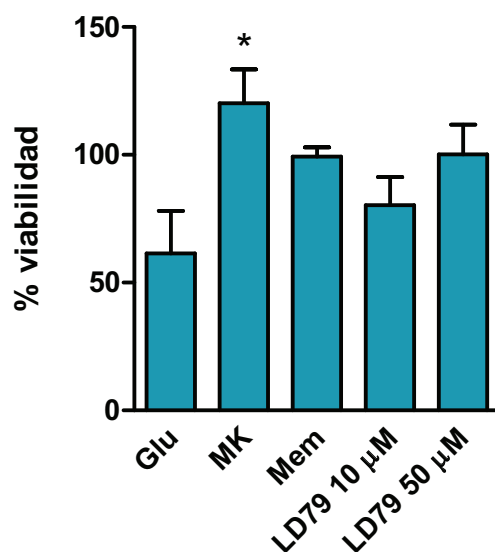


Fig. 4.40 Representación del porcentaje de viabilidad del compuesto LD79 del grupo con estructura benzohomonoradamantano. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

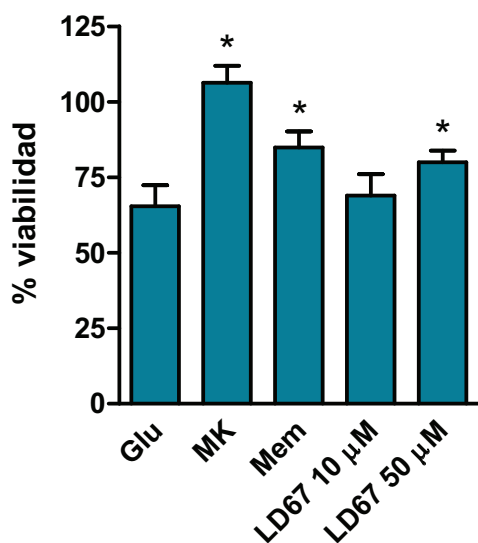


Fig. 4.41 Representación del porcentaje de viabilidad del compuesto LD67 del grupo con estructura benzohomonoradamantano. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

A la concentración menor, en los tres casos se han obtenido resultados inferiores a los de memantina, pero LD23 ha presentado diferencias significativas de nuevo.

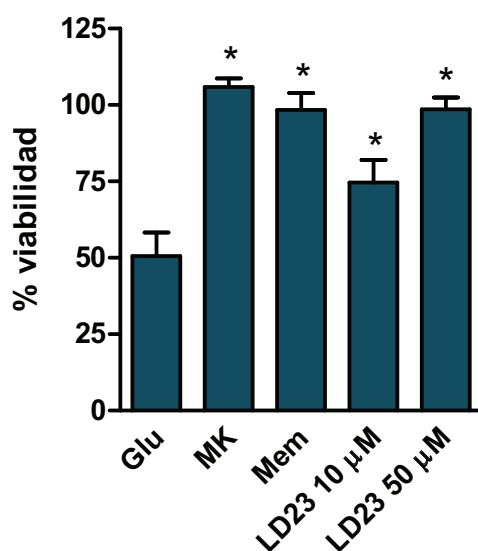


Fig. 4.42 Representación del porcentaje de viabilidad del compuesto LD23 del grupo con estructura benzohomonoradamantano. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

Resultados y discusión

El grupo de los benzohomooxadamantanos es el grupo con los compuestos más voluminosos. Tienen un átomo de oxígeno sustituyendo a un átomo de carbono en el núcleo central que además tienen 4 átomos de carbono más que los compuestos de referencia. Este es uno de los grupos que ha proporcionado mejores compuestos y gran parte del grupo ha presentado capacidad de antagonizar rNMDA de manera significativa.

Los compuestos que han presentado mayores potencias son LD20, LD79, LD23, LD80 y LD67, entre los que destaca LD20, con valores de IC_{50} de unas 2 veces los de memantina.

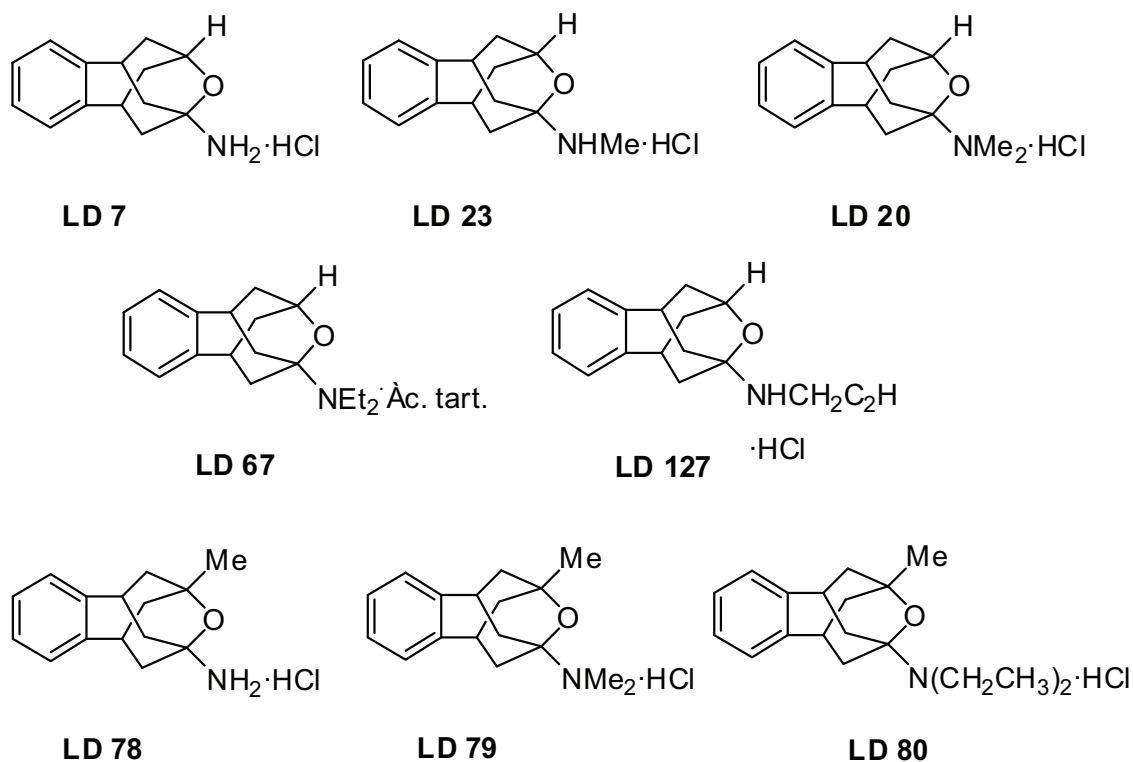


Fig. 4.43 Estructura de diversos compuestos del grupo de los benzohomooxadamantanos, entre ellos los más potentes.

Estructuralmente en estos compuestos parece que la alquilación de la amina hace aumentar la potencia en comparación con las aminas menos alquiladas. Un ejemplo es el caso de LD7/LD23/LD20 o LD78/LD79/LD80 (Fig. 4.43). Igual que el grupo de los oxadamantanos y

contrariamente a los policíclicos hidrocarbonados en los que la alquilación disminuía la potencia de los compuestos. Es destacable también que los dos mejores compuestos son dos aminas dimetiladas (LD20 y LD79).

La mayoría de compuestos que presentan un radical fenilo en la amina han mostrado poca o ninguna actividad, presentando en todos los casos potencias menores que los respectivos compuestos sin este sustituyente.

En este grupo la presencia de un sustituyente en el C contiguo al oxígeno del núcleo no parece favorecer la potencia del compuesto, como se puede ver en la serie LD7/LD78/LD97 (H-/Me-/Et-). No obstante, la presencia de metilos/etilos en la amina sí parece incrementar la potencia de estos compuestos.

En este caso, la valoración de la viabilidad se ha realizado con los mejores compuestos del grupo. Se ha evaluado la capacidad neuroprotectora de LD20, LD23, LD67, LD79 y LD80; además de los compuestos LD128 y LD131 con estructura benzohomoxadamantanos con una IC_{50} mayor que amantadina. LD128 y 131 han presentado cierta actividad neuroprotectora aun sin presentar valores de IC_{50} destacables. LD128 a la mayor concentración probada ha presentado diferencias estadísticamente significativas. Esto podría indicar un efecto neuroprotector por vías alternativas al antagonismo de los rNMDA. De los compuestos que han presentado valores de IC_{50} destacados, los compuestos LD79 y LD23, son los que han presentado mayor neuroprotección. A la concentración de 50 μ M obtienen porcentajes de viabilidad similares a los de memantina a una concentración 5 veces menor.

4.1.2.5 Pentaciclos.

4.1.2.5.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA.

Resultados y discusión

Gran parte de los compuestos de este grupo han presentado valores de inhibición próximos a amantadina o entre amantadina y memantina, e incluso ciertos compuestos presentan mayor potencia que memantina.

En la figura 4.44 se presentan los porcentajes de inhibición de los compuestos LD70, LD71, LD73, LD74 y LD75, entre los que destaca LD71, LD73 y LD75 como compuestos más potentes que el compuesto de referencia memantina.

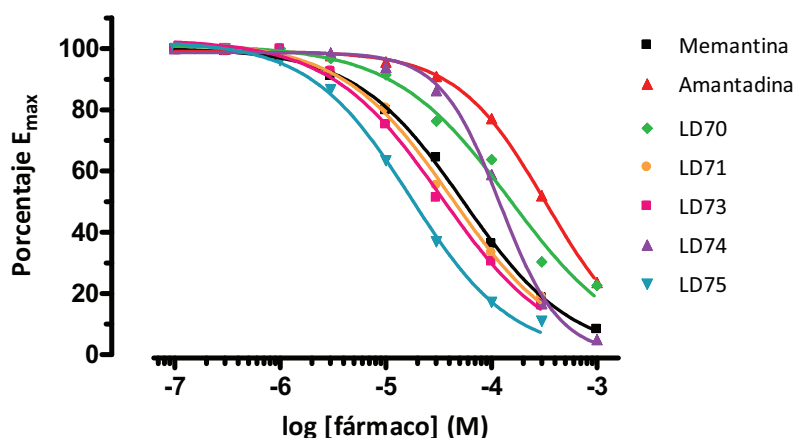


Fig. 4.44 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo Pentaciclos (Parte 1).

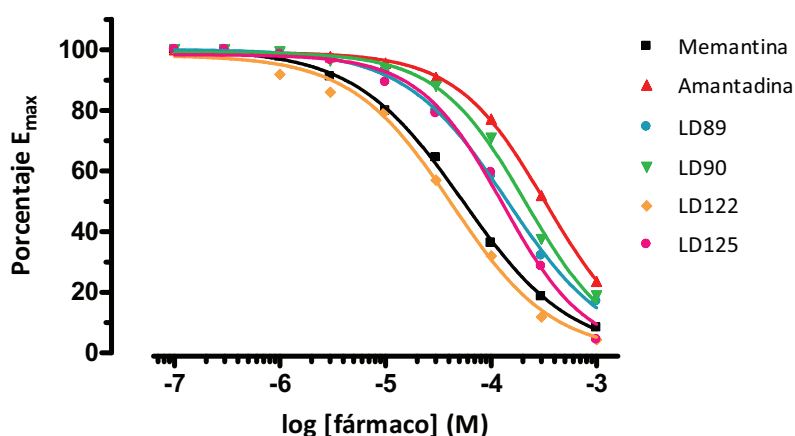


Fig. 4.45 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos del grupo Pentaciclos (Parte 2).

Resultados y discusión

Los efectos de inhibición presentados por los compuestos LD89, LD 90, LD122 y LD125, se muestran en la figura 4.45. Entre ellos destaca el compuesto LD122 con valores inferiores a memantina.

En la tabla 4.12 se muestran los valores las IC₅₀ de los compuestos del grupo. Los más destacables, con IC₅₀ menores, son LD71, LD73, LD75 y LD122, siendo el compuesto LD75 el más potente de este grupo.

| PENTACICLOS | Media IC₅₀ (µM) | SD | N |
|--------------------|---------------------------------------|--------------|----------|
| LD 47 | 402,1 | 70,1 | 3 |
| LD 49 | 433,4 | 199,8 | 4 |
| LD 70 | 183,5 | 125,7 | 5 |
| LD 71 | 44,5 | 14,9 | 3 |
| LD 73 | 31,7 | 11,3 | 3 |
| LD 74 | 121,8 | 15,6 | 3 |
| LD 75 | 16,7 | 2,9 | 3 |
| LD 86 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 87 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 88 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 89 | 155,2 | 57,2 | 4 |
| LD 90 | 208,7 | 79,8 | 3 |
| LD 93 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 118 | ≤ 500 | - | 4 |
| LD 119 | ≤ 500 | - | 3 |
| LD 121 | 417,7 | 99,2 | 3 |
| LD 122 | 44,2 | 13,9 | 3 |
| LD 125 | 133,2 | 57,0 | 3 |

Tabla 4.12 Valores de las IC₅₀ de los compuestos del grupo pentaciclos, con glutamato como agonista.

En este grupo se destacan varios compuestos en las gráficas, con los que se han obtenido valores entre memantina y amantadina. En la Fig. 4.46 se muestran los efectos de inhibición de los compuestos LD47, LD49, LD70, LD71 y LD73. Mientras en la Fig. 4.47 se presentan los

Resultados y discusión

efectos de los compuestos LD 75, LD86, LD89, LD121, LD122 y LD125, todos ellos con comportamiento similar a amantadina, si bien destacan LD49 y LD73 en la gráfica del grupo I, y LD75 en la gráfica del grupo II con valores de IC_{50} más cercanos a memantina.

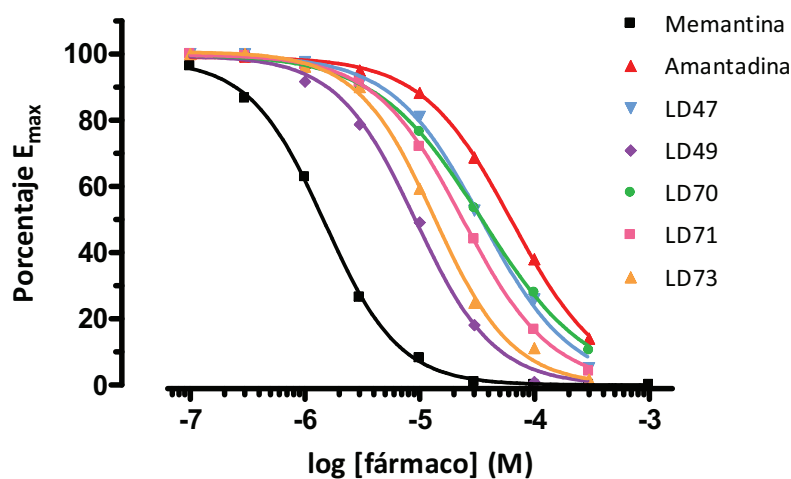


Fig. 4.46 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo de los pentaciclos (Parte 1).

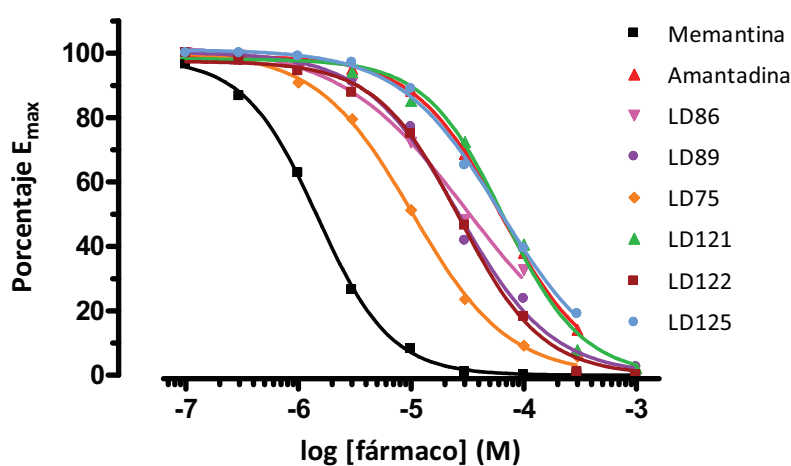


Fig. 4.47 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos del grupo de los pentaciclos (Parte 2).

En la tabla 4.13 se muestran los valores de las IC₅₀ de todos los compuestos del grupo. El compuesto LD75 es el que ha presentado un valor menor.

| PENTACICLOS | Media IC ₅₀ (μM) | SD | N |
|-------------|--------------------------------|------|---|
| LD 47 | 39,2 | 19,2 | 4 |
| LD 49 | 10,3 | 2,4 | 3 |
| LD 70 | 38,7 | 22,6 | 4 |
| LD 71 | 26,5 | 13,0 | 3 |
| LD 73 | 14,2 | 3,3 | 3 |
| LD 74 | ≥500 | - | 3 |
| LD 75 | 9,8 | 4,2 | 4 |
| LD 86 | 51,7 | 39,4 | 4 |
| LD 87 | 77,9 | 14,9 | 3 |
| LD 88 | 114,8 | 45,0 | 3 |
| LD 89 | 27,1 | 4,3 | 3 |
| LD 90 | 106,1 | 12,3 | 3 |
| LD 93 | 173,8 | 90,6 | 4 |
| LD 118 | 96,1 | 50,6 | 3 |
| LD 119 | ≥500 | - | 3 |
| LD 121 | 67,2 | 20,6 | 4 |
| LD 122 | 29,2 | 13,0 | 3 |
| LD 125 | 68,5 | 14,8 | 4 |

Tabla 4.13 Valores de las IC₅₀ del grupo de los compuestos con estructura pentaciclo, con NMDA como agonista.

4.1.2.5.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad.

En el grupo de los compuestos con estructura pentaciclo, se han podido evaluar algunos de los mejores compuestos LD75, LD49, LD73 y LD122.

Resultados y discusión

Los cuatro compuestos a la menor concentración probada han mostrado porcentajes de viabilidad inferiores al de memantina y ninguno de ellos ha presentado diferencias significativas a esta concentración, como se muestra en las figuras 4.48 y 4.49.

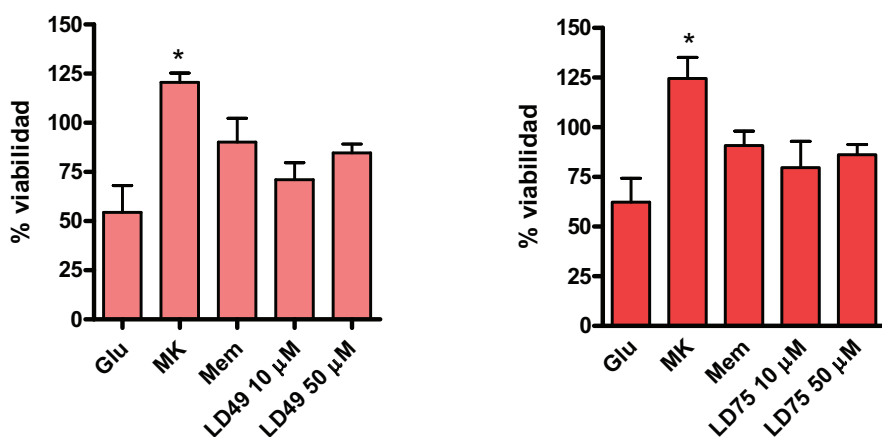


Fig. 4.48 Representación del porcentaje de viabilidad de los compuestos LD49 y LD75 del grupo con estructura pentaciclo. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

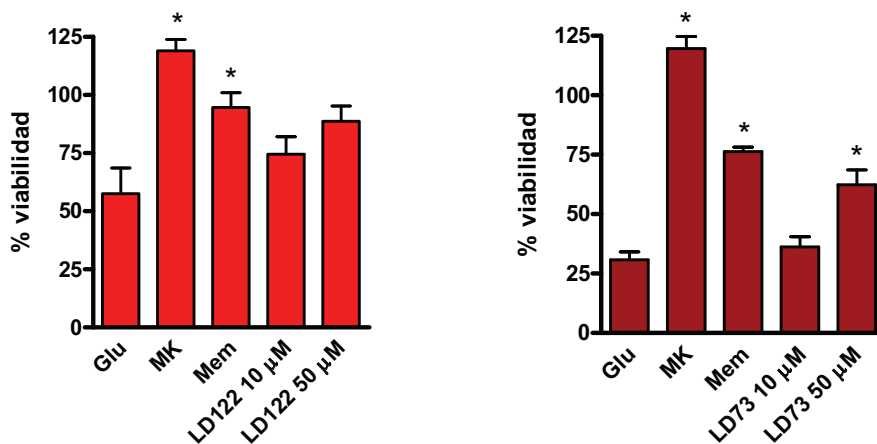


Fig. 4.49 Representación del porcentaje de viabilidad de los compuestos LD122 y LD73 del grupo con estructura pentaciclo. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

A la concentración de 50 μM los cuatro compuestos han presentado unos efectos neuroprotectores muy similares al de memantina, eso sí, a una concentración 5 veces superior. Solo el compuesto LD73 ha

presentado diferencias estadísticamente significativas a esta concentración.

La gran mayoría de los compuestos del grupo han presentado actividad antagonista de los receptores NMDA destacable. Los mejores valores de IC_{50} con NMDA como agonista los han presentado los compuestos LD75, LD49, LD73, LD71, LD89 y LD122 (Fig. 4.50). Gran parte de ellos también ha obtenido los mejores valores de IC_{50} pero usando glutamato como agonista.

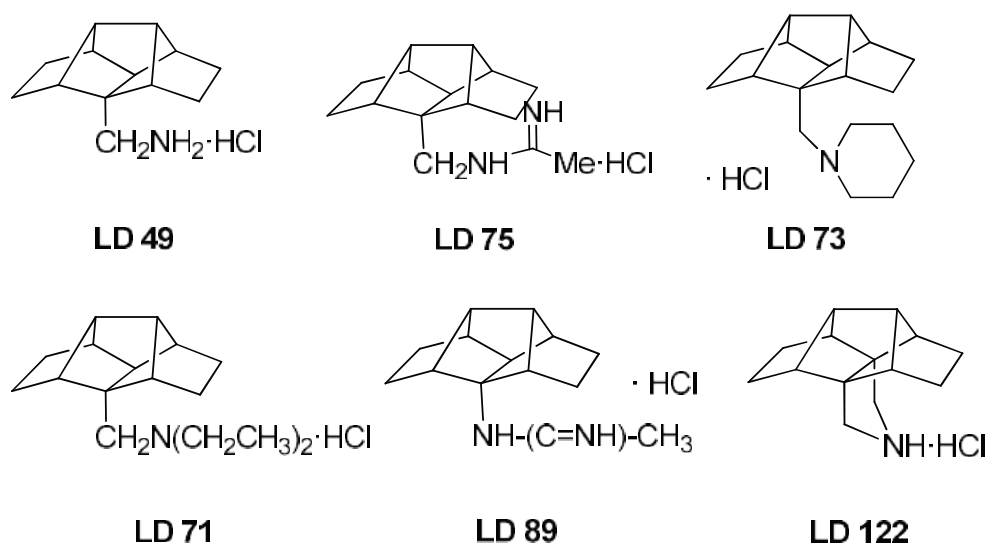


Fig. 4.50 Estructura de los mejores compuestos del grupo con estructura tipo pentaciclo.

Estructuralmente, el mejor compuesto del grupo (LD75) con una IC_{50} unas 6 veces mayor que memantina, presenta similitudes con compuestos muy destacados de los grupos bisnoradamantanos (LD34) y noradamantanos (LD44) con una estructura derivada de guanidina.

Por otro lado, el efecto que ejerce la alquilación de la amina sobre estos compuestos se puede observar en la serie de compuestos LD47 (amina primaria), LD87 (amina secundaria), LD90 (amina terciaria), LD88 (amina terciaria) (Fig. 4.51). A medida que aumenta la alquilación, la potencia de los compuestos parece disminuir. De manera similar sucede con la

Resultados y discusión

serie LD49, LD74, LD70, LD71; las aminas más sustituidas presentan potencias menores.

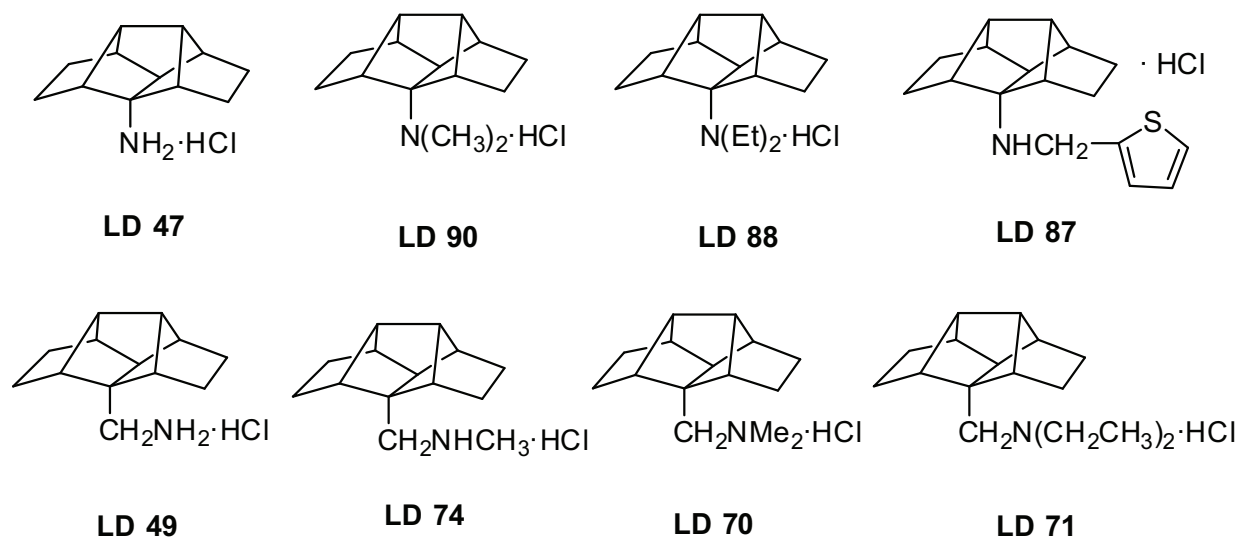


Fig. 4.51 Estructura de algunas aminas de interés del grupo de los compuestos pentaciclos.

En el grupo de los compuestos pentaciclos, las metilaminas parecen presentar mayor potencia que las correspondientes aminas, como se confirma comparando los valores que han presentado las siguientes parejas de aminas/metilaminas LD47/LD49, LD90/LD70, LD88/LD71 y LD89/LD75 (Fig. 19).

Finalmente se ha podido evaluar la viabilidad de algunos de los mejores compuestos del grupo (LD73, LD75, LD122 y LD49). Los cuatro compuestos a la concentración mayor probada han presentado porcentajes de viabilidad similares a memantina a una concentración 5 veces menor (10 μ M). Destaca LD73 que ha presentado diferencias estadísticamente significativas.

4.1.2.6 Benzohomonoradamantanos. Compuestos ETC.

4.1.2.6.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA.

Resultados y discusión

En la figura 4.52 se muestran las curvas de inhibición observadas para los compuestos ETC0, ETC2 y ETC6, juntamente con el compuesto EV1, relacionado estructuralmente. El ETC0 ha sido el compuesto más potente y los otros se han comportado de manera similar a memantina.

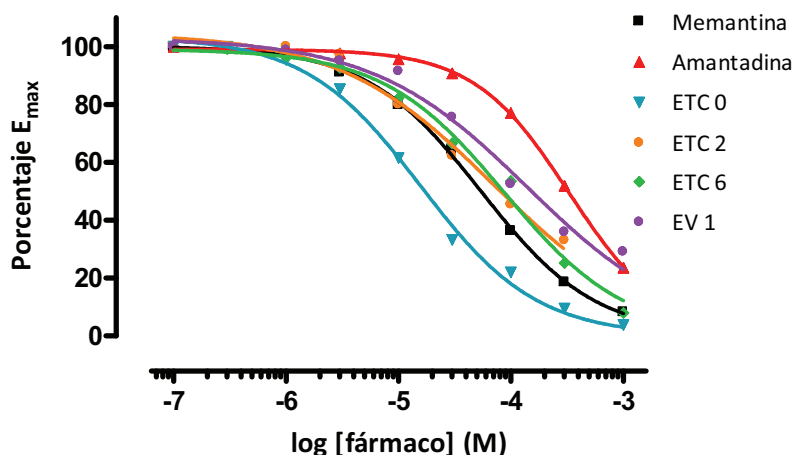


Fig. 4.52 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos ETC.

En la tabla 4.14 se presentan los valores de IC_{50} de los distintos compuestos y en concreto, el compuesto ETC0 muestra valores menores incluso a memantina.

| COMPUESTOS ETC | Media IC_{50} (μM) | SD | N |
|----------------|--------------------------------|-------------|----------|
| ETC 0 | 22,0 | 6,8 | 3 |
| ETC 1 | ≥ 500 | - | 3 |
| ETC 2 | 87,5 | 48,7 | 3 |
| ETC 3 | ≥ 500 | - | 3 |
| ETC 4 | ≥ 500 | - | 3 |
| ETC 5 | ≥ 500 | - | 3 |
| ETC 6 | 103,2 | 53,0 | 3 |
| ETC 7 | 455,8 | 373,4 | 3 |
| ETC 8 | ≥ 500 | - | 3 |
| EV 1 | 168,9 | 93,0 | 3 |

Tabla 4.14 Valores de las IC_{50} de los compuestos ETC y EV1, con glutamato como agonista.

Resultados y discusión

En la Fig. 4.53 se muestran las representaciones de los resultados obtenidos con los compuestos más destacados del grupo, ETC0, ETC2, ETC5, ETC6 y EV1. Todos ellos han presentado valores entre memantina y amantadina.

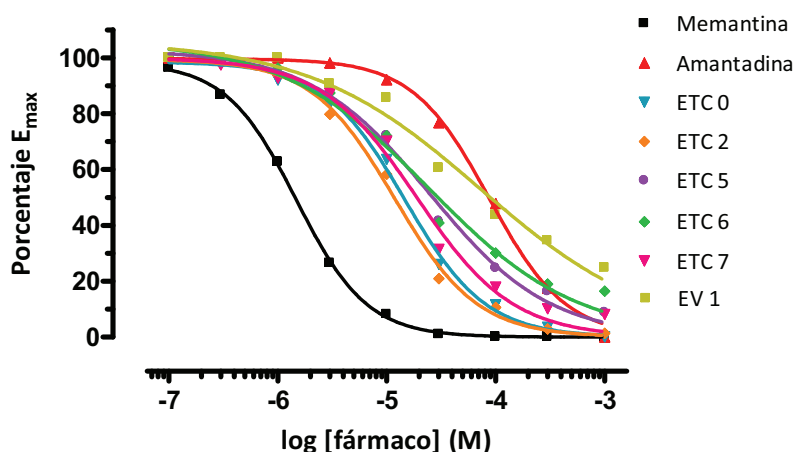


Fig. 4.53 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos ETC y EV1.

En la tabla 4.15 se muestran los valores de las IC_{50} de los distintos compuestos del grupo, de entre los que destaca el compuesto más potente, el ETC2, con un valor de IC_{50} usando NMDA como agonista de $11,8\mu M$.

| COMPUESTOS ETC | Media IC_{50} (μM) | SD | N |
|----------------|--------------------------------|-------------|----------|
| ETC 0 | 13,6 | 6,8 | 4 |
| ETC 1 | 489,0 | 506,0 | 3 |
| ETC 2 | 11,8 | 5,4 | 3 |
| ETC 3 | ≥ 500 | - | 3 |
| ETC 4 | ≥ 500 | - | 3 |
| ETC 5 | 27,5 | 22,9 | 3 |
| ETC 6 | 28,0 | 15,1 | 3 |
| ETC 7 | 19,4 | 5,7 | 3 |
| ETC 8 | 101,4 | 35,5 | 3 |
| EV 1 | 29,5 | 1,4 | 4 |

Tabla 4.15 Valores de las IC_{50} del grupo de compuestos ETC y EV1 con NMDA como agonista.

Se observa en la gráfica (Fig. 4.53) que el compuesto EV1 presenta una inhibición que no alcanza al 100%.

4.1.2.6.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad.

En el grupo de los compuestos benzohomonoradamantanos se ha podido evaluar uno de los mejores compuestos del grupo, ETCO. En los experimentos realizados se han obtenido resultados muy parecidos con las dos concentraciones probadas, y ambas similares a los presentados por memantina (Fig. 4.54), pero sin presentar diferencias estadísticamente significativas.

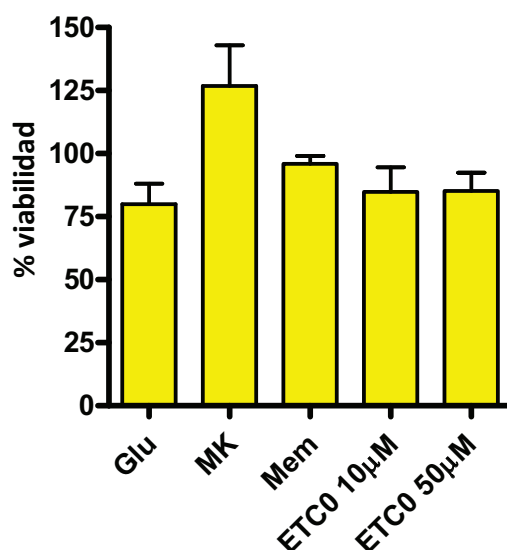


Fig. 4.54 Representación del porcentaje de viabilidad del compuesto ETCO. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

Estos compuestos comparten estructura con los benzohomooxadamantanos sin el átomo de oxígeno en el núcleo central, benzohomonoradamantanos (Fig. 4.55).

Resultados y discusión

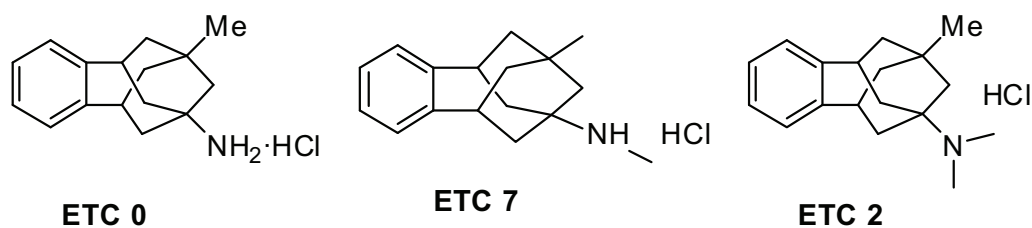


Fig. 4.55 Estructuras de los compuestos más relevantes del grupo benzohomonoradamantano. Tres aminas de la misma serie donde ETC0 es la amina primaria, ETC7 es la amina secundaria y ETC2 es la amina terciaria.

Estas estructuras son muy voluminosas, con 5 átomos más en su núcleo policíclico que los compuestos de referencia, pero los compuestos del grupo que han presentado mejores resultados han sido los que tienen en su estructura unas cadenas laterales más pequeñas, ETC0 y ETC2.

Parece haber la misma tendencia frente a la alquilación que en los bisnoradamantanos, noradamantanos y pentaciclos, es decir que a más alquilación menor potencia presentan los compuestos. Pero en el caso de la amina terciaria (ETC2, Fig. 4.54) presenta un valor de IC_{50} menor incluso que la amina primaria. Parece ser que en este caso la presencia de dos radicales poco voluminosos en la amina favorece su interacción con el canal, ya que otras aminas terciarias pero con sustituyentes más voluminosos (ETC3, ETC4 y ETC8) prácticamente no presentan actividad.

Se ha evaluado la capacidad neuroprotectora del mejor compuesto en los experimentos realizados con glutamato como movilizador de calcio. Este compuesto es ETC0 y ha presentado unos porcentajes de viabilidad muy próximos a los presentados por memantina.

4.1.2.7 Adamantanos. Compuestos RFP.

4.1.2.7.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA.

Los compuestos de este grupo se han comportado mayoritariamente como compuestos más potentes que amantadina y en gran parte sus valores de inhibición se han situado entre amantadina y memantina.

En la grafica siguiente (Fig. 4.56) se muestran los efectos de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato que han presentado los compuestos RFP con mayor actividad antagonista. Los compuestos RFP3, RFP6 y RFP11 son los más destacables, con valores similares a memantina.

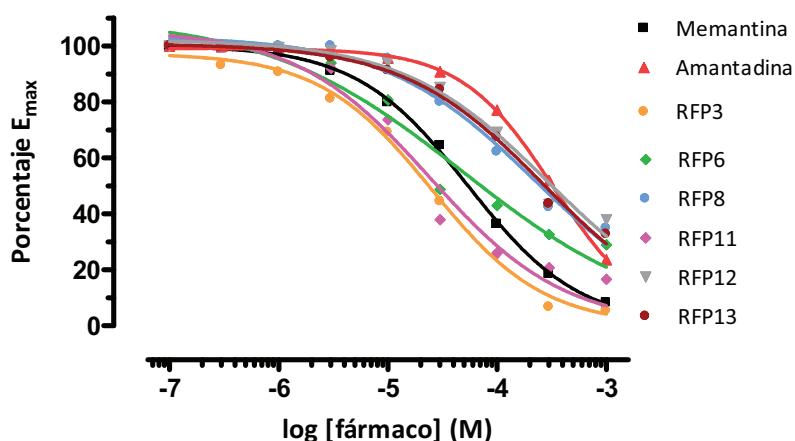


Fig. 4.56 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos RFP.

En la tabla 4.16 se muestran los valores de IC_{50} . Obsérvese que el compuesto con menor IC_{50} es el compuesto RFP11, con una IC_{50} de $18.8\mu M$.

Resultados y discusión

| COMPUESTOS RFP | Media IC ₅₀ (μM) | SD | N |
|----------------|--------------------------------|-------------|----------|
| RFP 2 | 223,3 | 361,1 | 3 |
| RFP 3 | 32,6 | 21,9 | 3 |
| RFP 4 | 210,0 | 147,3 | 3 |
| RFP 5 | ≥500 | - | 3 |
| RFP 6 | 25,3 | 20,2 | 3 |
| RFP 7 | ≥500 | - | 3 |
| RFP 8 | 75,7 | 41,4 | 3 |
| RFP 11 | 22,5 | 10,9 | 4 |
| RFP 12 | 107,2 | 31,6 | 3 |
| RFP 13 | 151,7 | 60,4 | 3 |

Tabla 4.16 Valores de las IC₅₀ de los compuestos RFP, con glutamato como agonista.

En la Fig. 4.57 se representan los compuestos RFP2 y RFP6, y se puede observar que presentan una capacidad de inhibir el incremento de la concentración de calcio superior a la de amantadina. No obstante, ninguno de los compuestos es capaz de inhibir el 100% de la movilización de calcio ocasionada por el agonista NMDA.

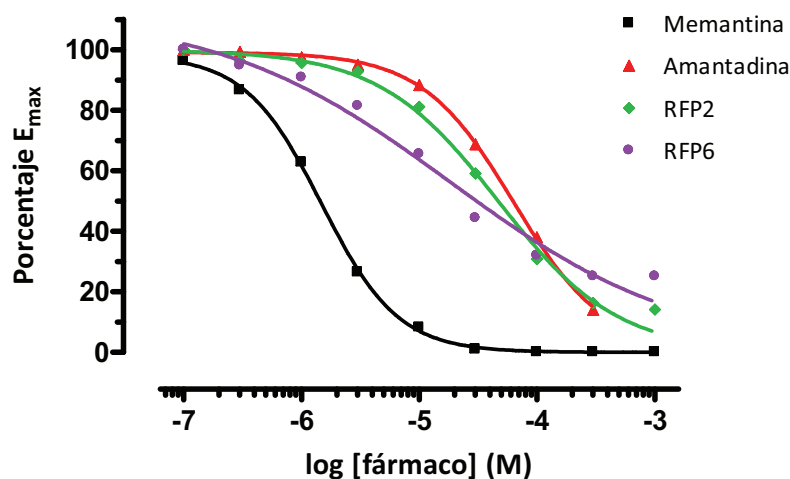


Fig. 4.57 Representación del porcentaje de inhibición de la [Ca²⁺]_i inducida por NMDA de los compuestos RFP.

| COMPUESTOS RFP | Media IC ₅₀ (μM) | SD | N |
|----------------|--------------------------------|-------------|----------|
| RFP 2 | 35,0 | 17,4 | 3 |
| RFP 3 | 90,2 | 7,0 | 3 |
| RFP 4 | 98,6 | 100,0 | 3 |
| RFP 5 | 119,3 | 77,2 | 3 |
| RFP 6 | 11,4 | 9,3 | 3 |
| RFP 7 | ≥500 | - | 3 |
| RFP 8 | ≥500 | - | 3 |
| RFP 11 | 105,2 | 99,5 | 3 |
| RFP 12 | 63,6 | 65,9 | 3 |
| RFP 13 | 68,8 | 44,4 | 3 |

Tabla 4.17 Valores de las IC₅₀ del grupo de compuestos RFP con NMDA como agonista.

4.1.2.7.2 Neuroprotección frente a la excitotoxicidad.

El último grupo de compuestos derivados de memantina y/o amantadina valorados es el de los compuestos RFP. De este grupo se han probado algunos de los compuestos con IC₅₀ menores, como RFP6, RFP2, RFP12, RFP13, RFP3, RFP11 y RFP5.

Los resultados más destacables se han obtenido con los compuestos RFP6 y RFP11, representados en la figura 4.46. RFP6 ha mostrado porcentajes de viabilidad muy similares a las dos concentraciones probadas e inferiores al de memantina, mientras que RFP11 presenta una viabilidad a la concentración menor bastante inferior a la memantina. A la concentración mayor, RFP11 presenta un porcentaje de viabilidad muy similar al de memantina, pero sin presentar diferencias estadísticamente significativas (Fig. 4.58).

Resultados y discusión

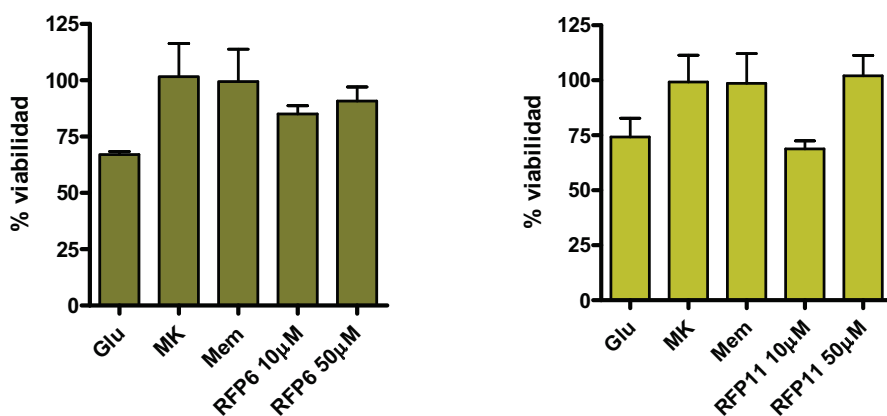


Fig. 4.58 Representación del porcentaje de viabilidad de los compuestos RFP6 y RFP11. Significación estadística con Glu $p < 0.05$ representada por *.

Estos compuestos presentan una estructura con un núcleo menos voluminoso que los compuestos del grupo anterior ya que al ser adamantanos contienen 10 átomos de carbono en su estructura central (4.59).

De todos los compuestos del grupo ha sido RFP6, una amina terciaria cíclica, el compuesto que ha presentado mayor potencia en los experimentos con NMDA como agonista, seguido de RFP2, la amina primaria equivalente. En cambio el compuesto RFP11, que había rendido un valor de IC_{50} excelente, no presentó mejores valores de IC_{50} frente a NMDA.

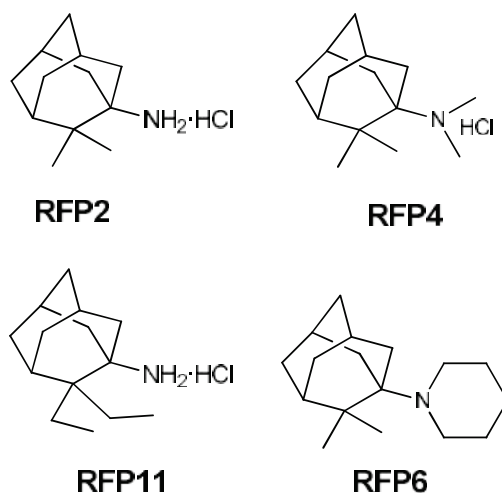


Fig. 4.59 Estructuras de los compuestos del grupo RFP.

Además, si nos fijamos en los compuestos de la serie RFP11/RFP13/RFP12 que corresponden a una amina primaria/secundaria/terciaria respectivamente, se puede observar como la alquilación parece aumentar la potencia de los compuestos.

Para la valoración de la capacidad neuroprotectora se seleccionaron los compuestos RFP2, RFP3, RFP5, RFP6, RFP11, RFP12 y RFP13, que ante uno u otro agonista habían presentado los mejores valores de IC_{50} .

Los que han obtenido mejor capacidad neuroprotectora son RFP11 y RFP6, los compuestos que han presentado valores de IC_{50} menores con glutamato y NMDA como agonista (RFP11 y RFP6, respectivamente).

La amina primaria tiene dos radicales etilos en el ciclo central y parece que estas características favorecen la neuroprotección pero a concentraciones elevadas ($50\mu M$). En el caso de RFP6, una amina terciaria cíclica con dos radicales metilos en el ciclo, parece mejorar la neuroprotección independientemente de la concentración acercándose a los porcentajes de viabilidad alcanzados por memantina.

4.1.2.8 Adamantanos. Compuestos AK.

4.1.2.8.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA.

Con los compuestos cedidos por el Dr. Kolocouris se han realizado valoraciones de la capacidad de inhibición de la concentración intracelular de calcio usando también glutamato o NMDA como agonistas.

Estos compuestos son una selección de compuestos con actividad antivírica destacables (evaluados por el Dr. De Clerq y su equipo). En este caso se ha evaluado su efecto como antagonista de los receptores NMDA con la finalidad de descartar que tuvieran actividad a nivel de sistema nervioso central, hecho que aumentaría sus efectos no deseados y su toxicidad.

Resultados y discusión

La mayoría de los 11 compuestos evaluados en este grupo ha presentado una capacidad antagonista baja, con unos efectos similares a los de amantadina. En la primera gráfica, el compuesto con menor actividad antagonista es el compuesto AK4, seguido de AK3 y AK1 con valores muy similares. La representación gráfica de los efectos de todos los compuestos del grupo se muestran en las figuras 4.60 y 4.61.

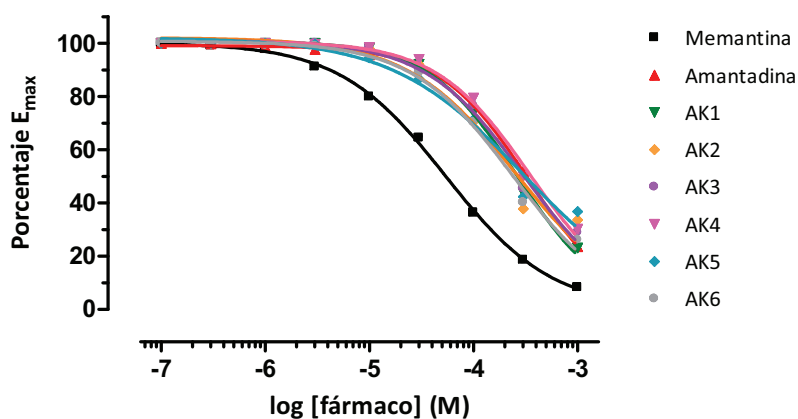


Fig. 4.60 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos AK (parte 1).

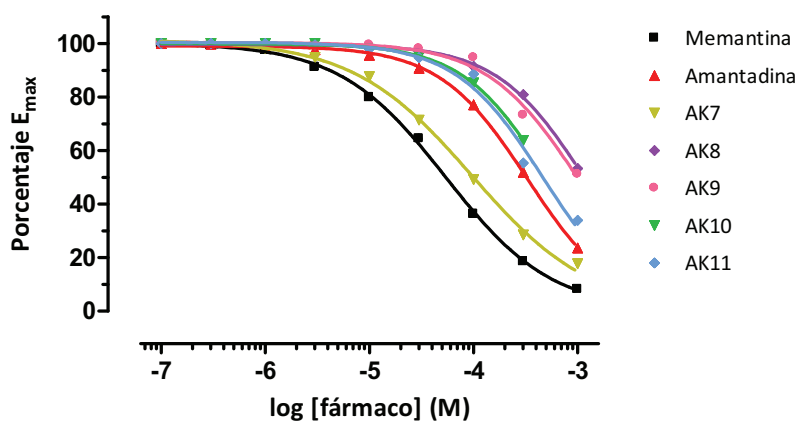


Fig. 4.61 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato de los compuestos AK (parte 2).

Tan sólo el compuesto AK7 ha presentado actividad antagonista a niveles preocupantes para un posible futuro desarrollo. En la tabla 4.18

Resultados y discusión

se presentan los diferentes valores de las IC_{50} de los compuestos AK, destacando los tres compuestos con IC_{50} mayores.

Estos tres compuestos presentan un perfil de selectividad mayor que el resto del grupo, en no interactuar con la neurotransmisión glutamatérgica.

| Compuestos AK | Media IC_{50} (μ M) | SD | N |
|---------------|----------------------------|-------|---|
| AK1 | 305,8 | 166,3 | 3 |
| AK2 | 257,8 | 25,6 | 3 |
| AK3 | 314,0 | 104,0 | 3 |
| AK4 | 350,6 | 85,4 | 3 |
| AK5 | 299,9 | 55,8 | 3 |
| AK6 | 239,3 | 57,7 | 3 |
| AK7 | 96,2 | 13,9 | 3 |
| AK8 | ≥ 500 | - | 3 |
| AK9 | ≥ 500 | - | 3 |
| AK10 | ≥ 500 | - | 3 |
| AK11 | 460,0 | - | 3 |
| Memantina | 55,4 | 12,1 | 3 |
| Amantadina | 337,1 | 98,7 | 3 |

Tabla 4.18 Valores de las IC_{50} de los compuestos AK y los compuestos de referencia, con glutamato como agonista.

Como se ha comentado con anterioridad, igualmente se ha valorado la capacidad inhibitoria del incremento de la concentración de calcio intracelular de estos compuestos usando NMDA como agonista.

En la figura 4.62 se muestran los efectos de los compuestos AK1, AK2, AK3, AK4, AK5 y AK6. Mientras que en la figura 4.63 se representan los efectos inhibitorios de los compuestos AK7, AK8, AK9, AK10 y AK11, todos ellos junto a los compuestos de referencia memantina y amantadina.

Resultados y discusión

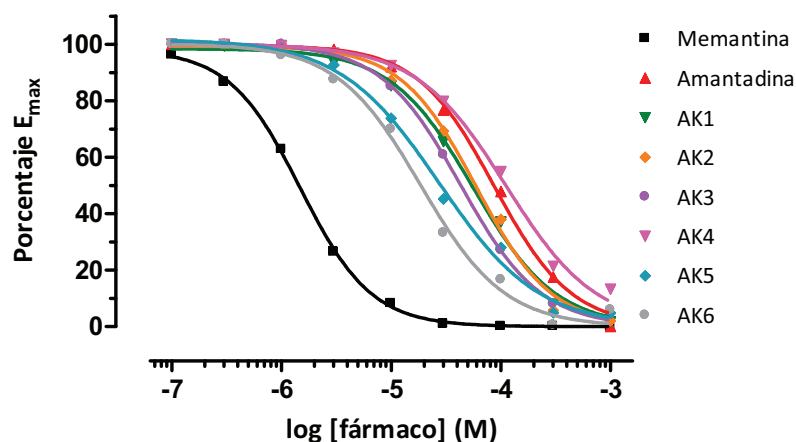


Fig. 4.62 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos AK (parte 1).

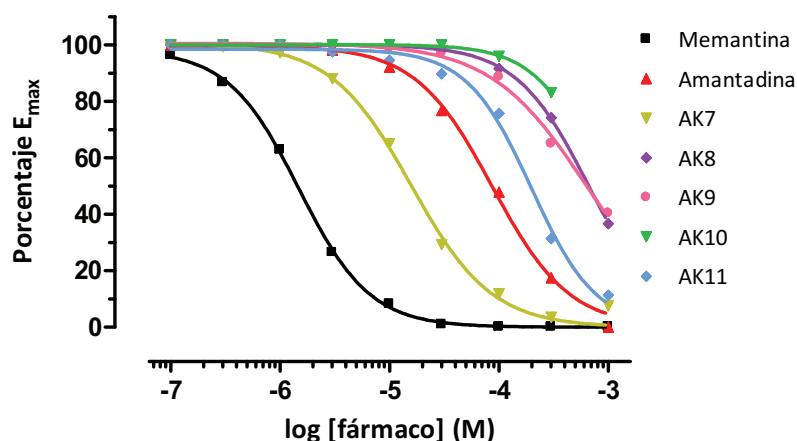


Fig. 4.63 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos AK (parte 2).

El compuesto con menor capacidad inhibidora de la primera gráfica del grupo es AK4, que presenta valores de IC_{50} mayores que amantadina. Los compuestos AK1, AK2 y AK3 ya han presentado valores inferiores a amantadina.

Del segundo grupo de compuestos representados vuelven a destacar los compuestos AK10, AK8 y AK9 como los menos potentes del grupo y tan solo AK7 presenta valores de IC_{50} notablemente menores que amantadina.

En la tabla 4.19 se detallan todos los valores de las IC₅₀ de los compuestos AK.

| Compuestos AK | Media IC ₅₀ (μM) | SD | N |
|---------------|-----------------------------|------|---|
| AK1 | 64,4 | 34,0 | 4 |
| AK2 | 61,2 | 19,3 | 3 |
| AK3 | 50,6 | 10,9 | 3 |
| AK4 | 123,1 | 77,0 | 3 |
| AK5 | 29,6 | 17,6 | 3 |
| AK6 | 19,0 | 7,4 | 3 |
| AK7 | 13,8 | 5,1 | 3 |
| AK8 | ≥500 | - | 3 |
| AK9 | ≥500 | - | 3 |
| AK10 | ≥500 | - | 3 |
| AK11 | 219,4 | 99,5 | 3 |
| Memantina | 1,6 | 0,2 | 3 |
| Amantadina | 74,6 | 40,9 | 3 |

Tabla 4.19 Valores de las IC₅₀ de los compuestos AK y los compuestos de referencia, con NMDA como agonista.

Los compuestos con estructura adamantano como amantadina presentan cierta actividad antagonista aunque destaca más por su actividad antivírica.

El cambio de posición del radical amino presente en amantadina, no parece favorecer a la potencia de los compuestos, como se observa comparando amantadina con AK11. Pero si se añade un sustituyente en el mismo carbono (AK1 y AK2), los valores de las IC₅₀ disminuyen por debajo del valor de amantadina.

Por otro lado, la presencia de un radical pirrolidina (AK3) en el núcleo adamantano parece dar mayor potencia como antagonista sobre los rNMDA que la presencia de un radical amino (amantadina) (Fig. 4.64).

Resultados y discusión

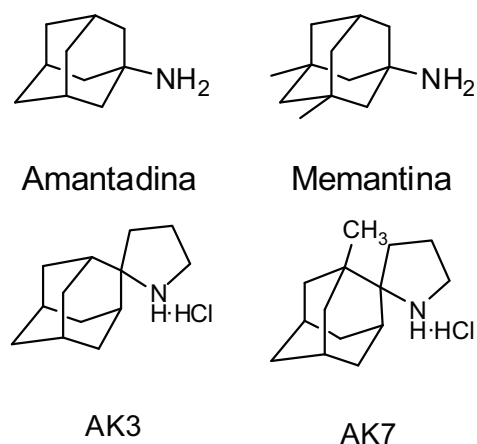


Fig. 4.64 Estructuras de los compuestos del grupo RFP.

El aumento de este radical (AK6) no favorece a la actividad antagonista, pero la adición de un radical metilo en el carbono contiguo sí aumenta la potencia dando lugar al compuesto más potente de este grupo, AK7 con una IC_{50} unas ocho veces menor que amantadina y unas diez veces mayor que memantina (en el caso de los experimentos con NMDA como agonista).

Se observa cómo se repite el efecto que ejerce el metilo añadido a memantina (respecto amantadina) en los compuestos AK3 y AK7, pero con menor intensidad. En el caso de amantadina y memantina, la adición de dos metilos aumenta la potencia del compuesto unas 6 veces con glutamato como agonista y unas 47 veces con NMDA. En cambio, la adición de un solo metilo aumenta la potencia del compuesto de manera más regular con los dos agonistas usados, unas 3 veces con glutamato y 4 con NMDA. Una diferencia interesante es que amantadina y memantina son aminas primarias, mientras los otros dos compuestos son aminas secundarias con bastantes impedimentos estéricos.

Un hecho interesante y destacable es que la presencia de un radical alcohol no favorece en absoluto la capacidad antagonista de estos compuestos como se puede comprobar con AK8, AK9 y AK10, que son los que han presentado los valores de IC_{50} mayores con los dos agonistas usados.

Estos compuestos han sido desarrollados como antivíricos y por tanto la falta de actividad sobre el sistema glutamatérgico les permite poseer un mejor perfil farmacológico ya que carecerán de los efectos adversos típicos de este tipo de compuestos (amnesia, trastornos cognitivos, alucinaciones).

4.1.2.9 Compuestos PF.

4.1.2.9.1 Valoración de la capacidad antagonista sobre los receptores NMDA.

La Dra. Escolano nos facilitó un grupo de compuestos estructuralmente relacionados con rincofilina. Como se ha comentado en la introducción de este trabajo, este compuesto es un alcaloide aislado de *Uncaria rhynchophylla* que ha presentado actividad como antagonista de los receptores NMDA. Por ello se ha evaluado esta actividad potencial de los compuestos PF con experimentos que permitan evaluar la actividad antagonista sobre receptores glutamatérgicos.

En la figura 4.65 se presentan todos los valores de inhibición de los compuestos PF y se puede observar que en ningún caso han presentado capacidad inhibidora. Todos los compuestos han presentado valores de IC_{50} superiores a $500\mu M$.

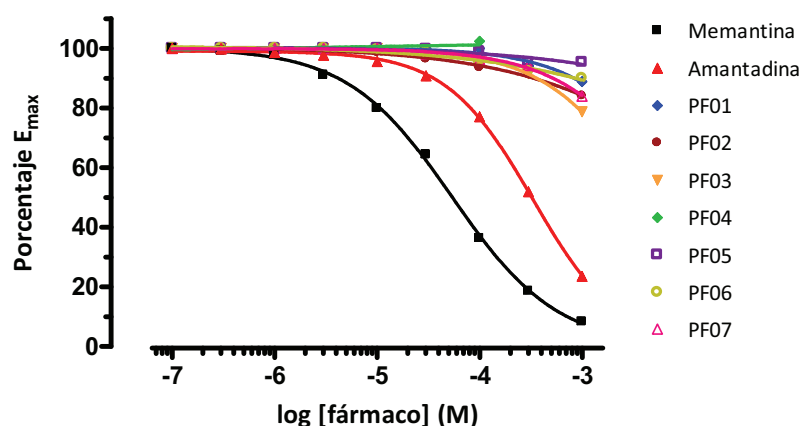


Fig. 4.65 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por Glutamato de los compuestos PF.

Resultados y discusión

Se repitieron los experimentos usando NMDA como agonista y los resultados obtenidos han sido muy similares a los anteriores, no mostrando actividad destacable ninguno de los compuestos del grupo.

Estos resultados se pueden ver gráficamente en la figura 4.66 en la que se muestran las representaciones de todos los compuestos del grupo con un comportamiento muy alejado de los compuestos de referencia. Los valores de las IC_{50} de los compuestos, también en este caso, han mostrado unos valores muy elevados.

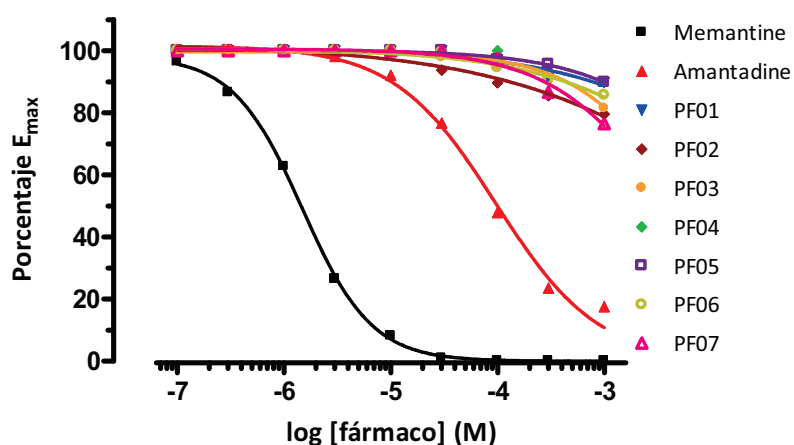


Fig. 4.66 Representación del porcentaje de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA de los compuestos PF.

Los compuestos cedidos por la Dra. Escolano, como se ha comentado en la introducción de este trabajo, son derivados o están relacionados con la rincofilina (rhynchophylline)(Fig. 4.67), que ha mostrado su antagonismo sobre receptores NMDA en oocitos de *Xenopus* y su capacidad neuroprotectora en CGC (Kang y cols., 2002; Shimada y cols., 1999).

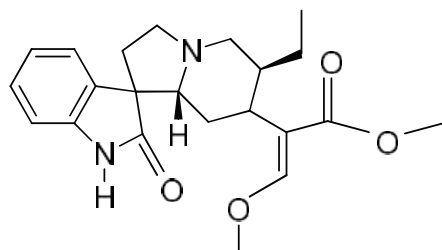


Fig. 4.67 Estructura de rincofilina.

Ninguno de los compuestos evaluados ha presentado actividad antagonista de los receptores NMDA destacables. En la figura 4.68 se pueden observar las estructuras de algunos de estos compuestos.

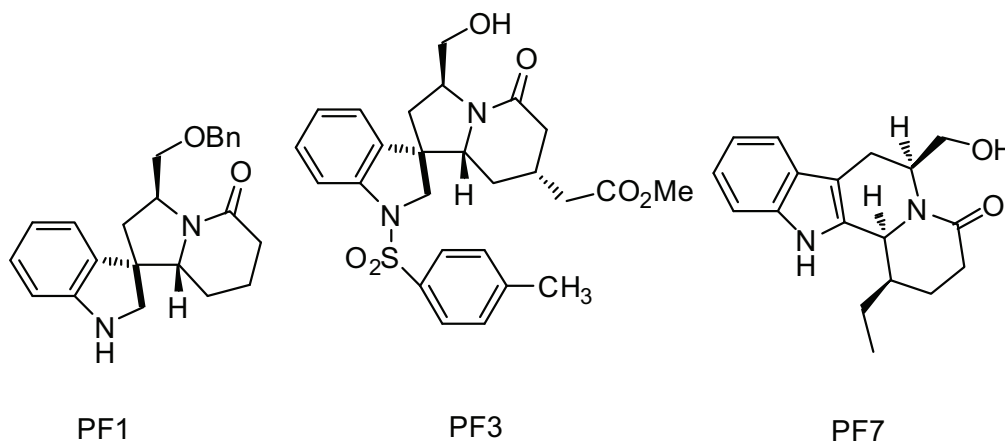


Fig. 4.68 Estructuras bases de los compuestos derivados de rincofilina.

4.1.2.10 Discusión general de la evaluación de los compuestos.

Cuando se ha usado glutamato como agonista para las evaluaciones de la capacidad antagonista, algunos de los compuestos han presentado resultados prometedores, mejorando incluso los presentados por los dos compuestos de referencia amantadina y memantina. En la gráfica

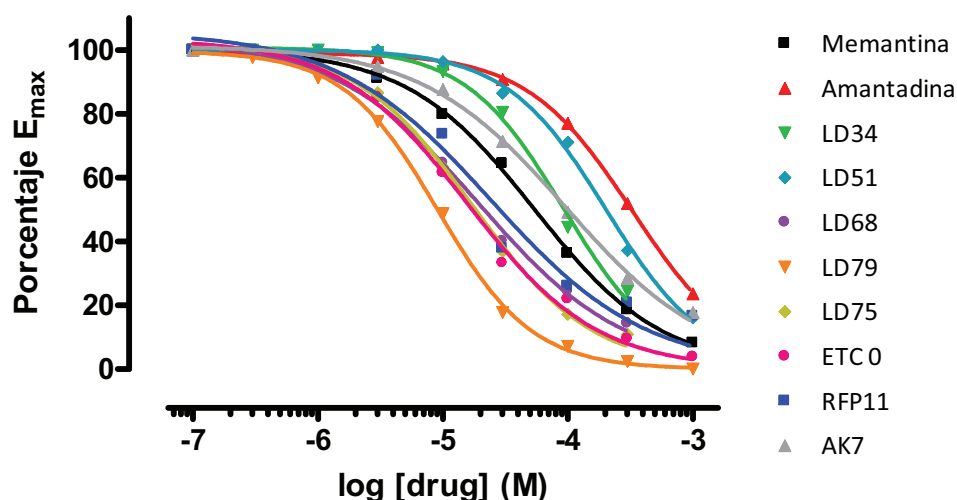


Fig. 4.69 Representaciones gráficas de los porcentajes de inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato del mejor compuesto de cada grupo (bisoradamantano LD34, noradamantano LD51, oxadamantano LD68, benzohomonoramantano LD79, pentaciclo LD75, ETC0, RFP11 y AK7).

Resultados y discusión

de la figura 4.69 se muestran el mejor compuesto de cada grupo usando glutamato como agonista.

Los compuestos que han superado los valores presentados por amantadina y por memantina son LD68, LD75, LD79, ETC0 y RFP11.

En la figura siguiente se muestra las estructuras de los tres mejores compuestos con glutamato como agonista, con el grupo amino en la misma posición.

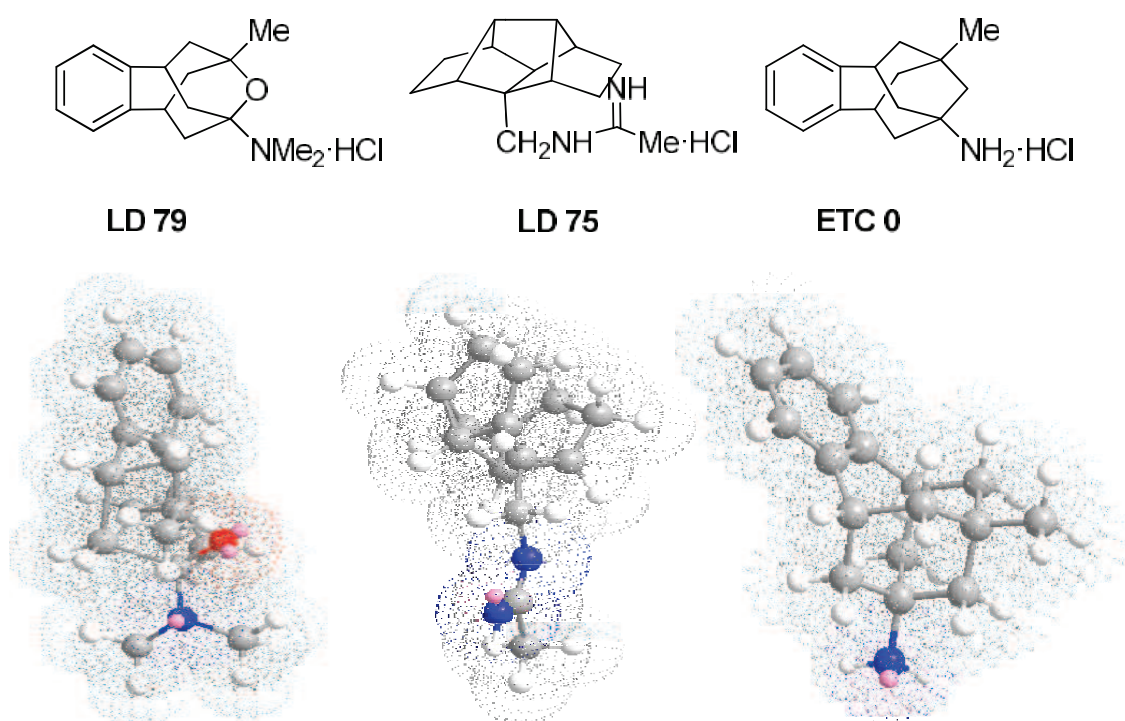


Fig. 4.70 Estructuras de los tres mejores compuestos de todos los evaluados como antagonistas de los receptores NMDA, usando glutamato como agonista. En la parte superior de la figura se muestran las estructuras 2D y en la parte inferior de la figura la correspondiente estructura en un modelo 3D.

En los estudios posteriores con NMDA como agonista no se han corroborado los buenos resultados obtenidos con glutamato. Observando los resultados obtenidos en todas las evaluaciones realizadas con NMDA como agonista, se puede concluir que ningún

compuesto ha presentado mejor capacidad antagonista sobre los receptores NMDA que el compuesto de referencia memantina.

Comparando las estructuras de los mejores compuestos, se observa que los mejores compuestos con NMDA pertenecen al grupo benzohomooxadamantanos con una estructura alargada y voluminosa, y a los grupos bisnoradamantanos y pentaciclos con estructuras en general más reducidas. Pero los mejores compuestos de estos dos últimos grupos, LD34 y LD75 contienen cadenas laterales bastante voluminosas y nucleófilas (Fig. 4.71).

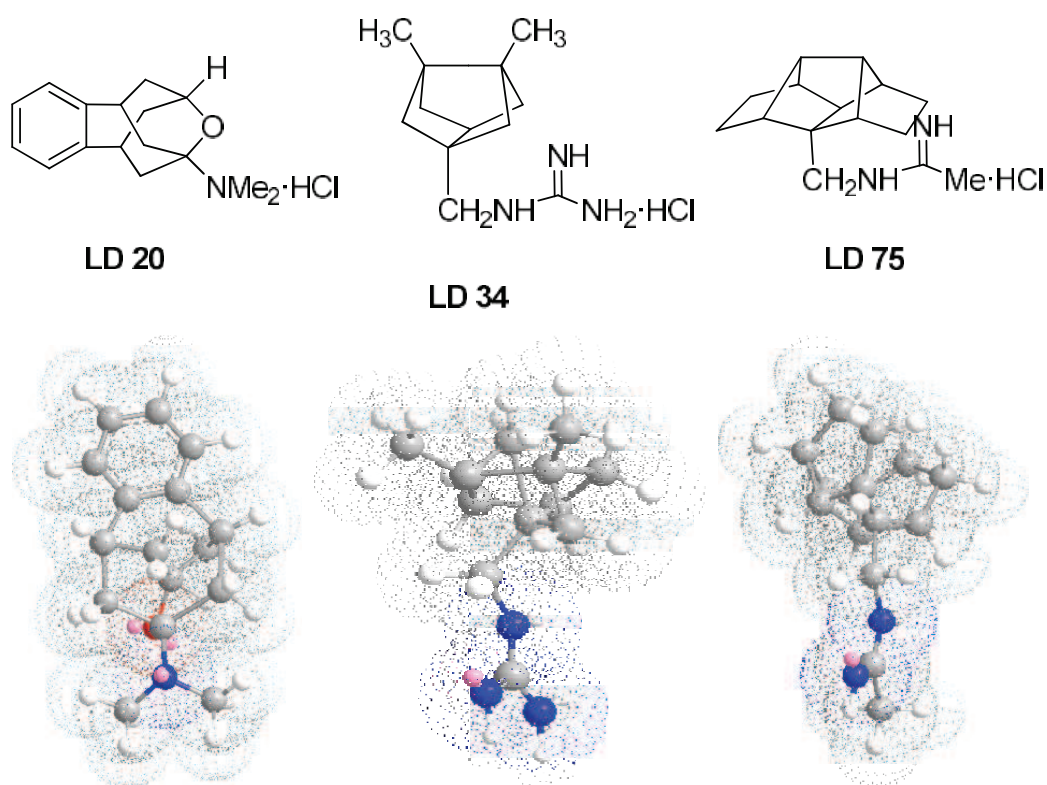


Fig. 4.71 Estructuras de los tres mejores compuestos de todos los evaluados como antagonistas de los receptores NMDA, usando NMDA como agonista. En la parte superior de la figura se muestran las estructuras 2D y en la parte inferior de la figura la correspondiente estructura en un modelo 3D.

En general, se ha podido observar que los compuestos varían su potencia en función del agonista usado para la movilización de calcio. Aunque la mayoría de compuestos ha disminuido el valor de su IC₅₀ al

Resultados y discusión

cambiar de agonista (de glutamato a NMDA), ninguno de los compuestos prometedores lo ha hecho de manera tan espectacular como lo hace la memantina, que presenta un valor de IC_{50} unas 35 veces mayor con glutamato que con NMDA. En cambio la amantadina sólo lo hace unas 4.5 veces.

También es de esperar que los compuestos aumenten su porcentaje de inhibición de la concentración de calcio intracelular cuando se pasa de usar glutamato a usar NMDA como agonista, puesto que el glutamato activa mayor cantidad y tipos de receptores que pueden hacer aumentar la $[Ca^{2+}]_i$. Por este motivo, cuando se induce el aumento de calcio intracelular con NMDA, el porcentaje de inhibición cuando el compuesto es activo debería que ser máximo.

En el grupo de los bisnoradamantanos se observa que en general hay un aumento de potencia de unas dos veces, destacando algunos compuestos que aumentan de manera más significativa su potencia como LD9 y LD34 (9.6 y 14.7 veces, respectivamente), y LD15, que incluso pasa de ser inactivo con glutamato como agonista a presentar una potencia 2 veces mayor que amantadina con NMDA como agonista.

La mayoría de compuestos del grupo noradamantanos pasan de no presentar actividad destacable con glutamato a ser activos con NMDA como agonistas. Y en este grupo hay que destacar el compuesto LD45, el mejor compuesto con NMDA, que aumenta unas 30 veces su potencia.

En el grupo de los oxadamantanos este efecto es menos pronunciado, y se observa que los compuestos que presentan actividad destacable con NMDA también la presentan con glutamato como agonista. Es el caso del mejor compuesto del grupo, LD68, que presenta valores muy similares para los dos agonistas usados.

De manera similar se comportan los compuestos del grupo de las benzohomooxadamantil aminas como LD79 que tan sólo duplica su potencia aún y presentando valores muy destacables en los dos casos.

LD20 es el que presenta un cambio mayor, aumentando unas 10 veces su potencia.

En el grupo de las aminas pentacíclicas los compuestos en general aumentan su potencia al usar NMDA como agonista en lugar de glutamato, dos, cinco o diez veces dependiendo del compuesto. Pero el compuesto LD49 presenta un aumento de potencia incluso mayor que el de memantina, llegando a unas 40 veces. Por otro lado, el compuesto LD74 parece presentar el efecto contrario ya que con NMDA como agonista muestra una potencia como mínimo 5 veces menor que con glutamato como agonista.

Los compuestos ETC, con estructura benzohomonoradamantano, presentan también un comportamiento similar destacando los compuestos ETC5 y ETC7 que aumentan su potencia con NMDA como agonista unas 18 y 23 veces respectivamente.

Los compuestos RFP siguen el mismo comportamiento general, aumentando moderadamente la potencia con NMDA como agonista. Pero contrariamente, los compuestos RFP3, RFP8 y RFP11 disminuyen su potencia en tres, siete y cinco veces respectivamente cuando se usa NMDA para movilizar el calcio.

Resultados previos de nuestro laboratorio con antagonistas potentes y selectivos (como MK-801 o memantina) confirman que la mayoría del calcio que ingresa en las células mediado por glutamato lo hace a través del rNMDA, por lo que en principio no estaría justificado el gran cambio de potencia que presenta memantina. No obstante es posible que la actividad del glutamato sobre otros receptores afecte de algún modo al bloqueo que ejerce la memantina sobre los rNMDA de manera que su potencia sea bastante menor cuando se activan todos los tipos de receptores glutamatérgicos que cuando sólo se activan los rNMDA. Ello podría indicar que el bloqueo por memantina es fácilmente desplazable frente a estímulos despolarizantes como los que se producirían tras la entrada de iones Na^+ a través de receptores AMPA o kainato.

Resultados y discusión

Como se ha comentado en la introducción, algunos autores (Parsons y cols., 2007) proponen que una de las características que favorece más el buen efecto y tolerabilidad de la memantina es su rápida cinética de disociación, más que su afinidad o otros parámetros.

Aunque se trata de una afirmación hipotética y su comprobación se halla fuera de los objetivos de la presente tesis, quizá sería de interés utilizar el cociente de IC_{50} obtenidas con glutamato o con NMDA (IC_{50} glu/ IC_{50} NMDA) Como parámetro indicador de qué fármacos pueden ser candidatos a un futuro desarrollo, puesto que de algún modo, mimetizarían las acciones de la memantina sobre el rNMDA.

Ciertos compuestos evaluados han mostrado un aumento de potencia muy significativo con NMDA como agonista comparado con los valores de IC_{50} con glutamato como agonista. Estos compuestos aumentan su potencia entre 23 y 42 veces, un aumento muy importante y no compartido por la mayoría de los compuestos. En la figura 4.72 se muestran las estructuras de estos cuatro compuestos memantina, LD45, LD49 y ETC0.

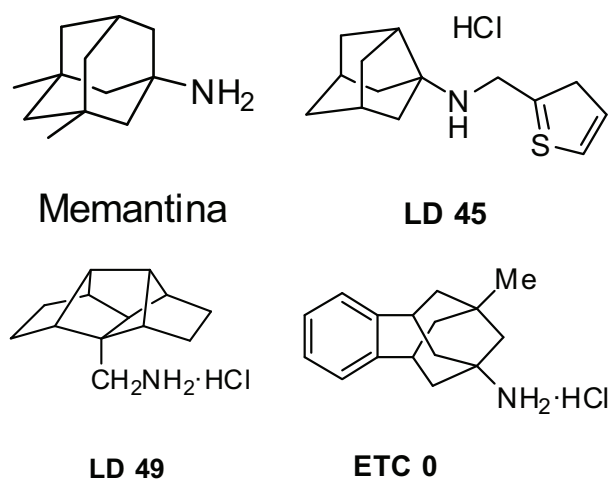


Fig. 4.72 Representación de las estructuras de los compuestos

La figura 4.73 muestra las estructuras 3D de estos compuestos en dos tipos de representaciones. Las dos imágenes de la derecha de cada compuesto nos muestran la posible ocupación espacial en su conformación más estable.

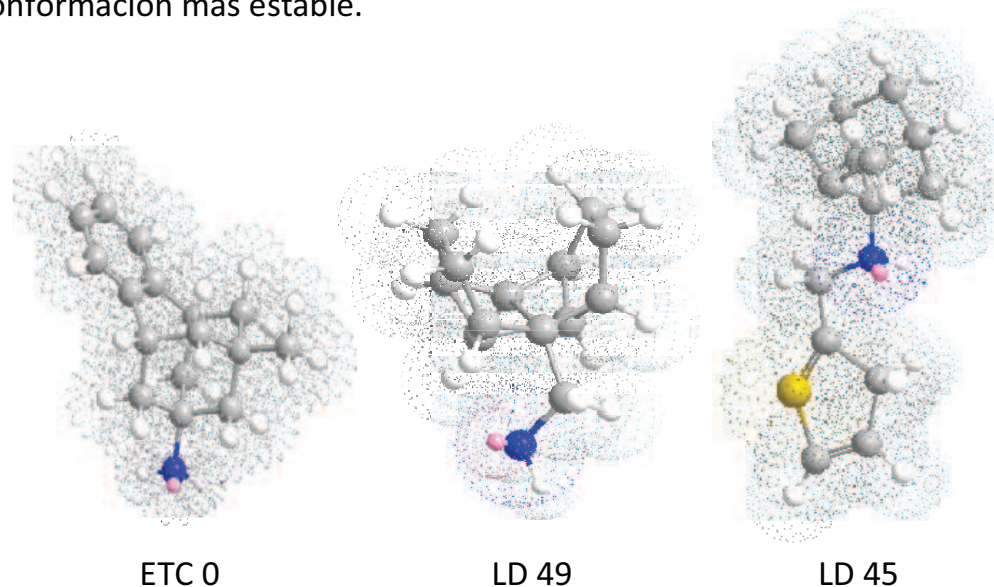


Fig. 4.73 Representación de un modelo en 3D de las estructuras de los compuestos que presentan un mayor aumento de la potencia como antagonistas de rNMDA con NMDA como agonista.

De este modo, un compuesto como LD49, que es mucho más potente con NMDA como agonista que con glutamato (unas 42 veces mayor, incluso más que memantina que aumenta unas 35 veces su potencia) podría ser un buen candidato para su posterior desarrollo.

No deja de ser remarcable, que resultados obtenidos en nuestro laboratorio han presentado una relación $IC_{50} \text{ glu}/IC_{50} \text{ NMDA}$ para el MK-801 de 3.5, con un comportamiento muy distinto al de memantina.

Contrariamente, algunos compuestos como LD74, RFP3, RFP8 y RFP11 han presentado valores de IC_{50} menores con glutamato como agonista que con NMDA. Como se ha planteado al inicio de este apartado, es de esperar que los compuestos derivados de memantina y amantadina evaluados actúen como antagonistas de los receptores NMDA y se unan en el lugar de unión para el Mg^{2+} en el interior del canal, pero puede que ciertos derivados presenten variaciones en el mecanismo de acción

Resultados y discusión

e incluso en su selectividad sobre los receptores glutamatérgicos, cabiendo la posibilidad que antagonicen otro subtipo de receptor.

4.1.2.11 Estudios de la capacidad inhibidora de la MAO.

Como se ha comentado con anterioridad en el apartado de materiales y métodos, a los compuestos que presentaban determinadas similitudes estructurales con inhibidores de la MAO, como selegilina, rasagilina e indantadol, se les ha realizado la evaluación de la capacidad de inhibición de la actividad de esta enzima en una preparación cruda mitocondrial de cerebro de ratón.

Todos los compuestos seleccionados (LD126, LD127, LD128, LD131 Y LD132) han sido evaluados a una concentración de 10 μ M junto con selegilina como control positivo a unas concentraciones de 1 μ M y 10 μ M.

Se puede observar en la figura 4.74 que en ninguno de los casos se ha obtenido una capacidad inhibidora cercana a la mostrada por selegilina, por lo que cabe descartar la actividad de estos compuestos como inhibidores frente a MAO-A o MAO-B.

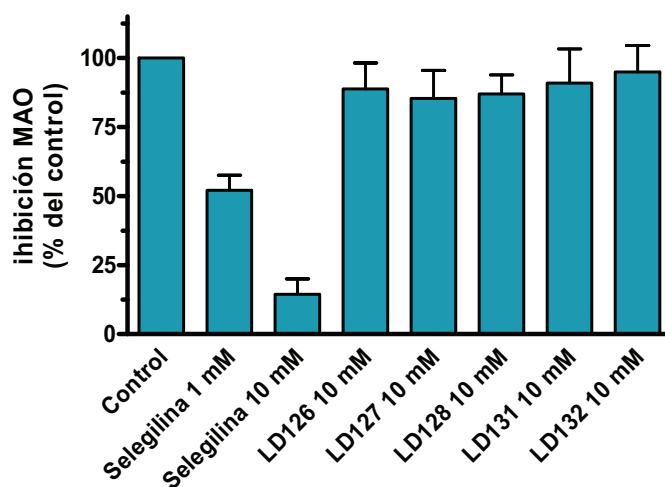


Fig. 4.74 Representación del porcentaje de inhibición de la actividad MAO de los compuestos seleccionados (LD 126, LD 127, LD 128, LD 131 y LD 132) y el compuesto de referencia, Selegilina.

Como se ha comentado con anterioridad, los compuestos escogidos para la evaluación de la actividad MAO tienen ciertas características estructurales comunes entre ellos y con ciertos compuestos con capacidad neuroprotectora. Estas características estructurales son un grupo propargilamina y/o un grupo aminoacetamida, como se muestra en los compuestos de referencia selegilina y rasagilina, e indantadol y N20C, respectivamente. En la figura 4.75 podemos ver las estructuras de estos cuatro compuestos.

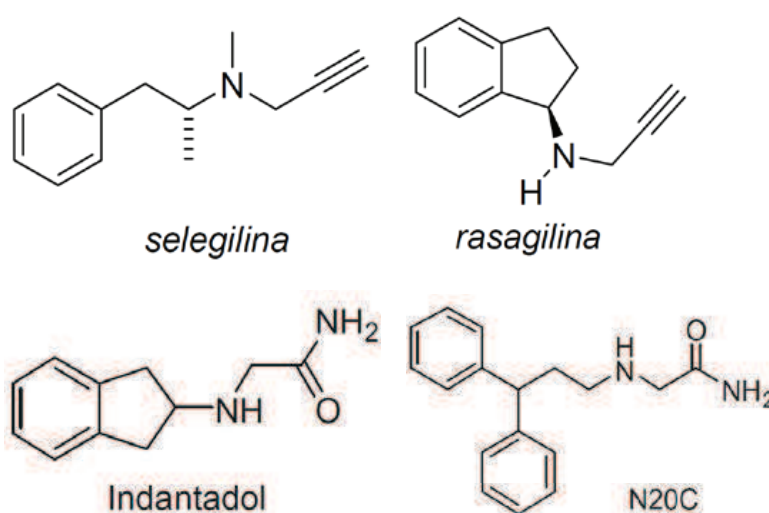


Fig. 4.75 Representación de las estructuras de compuestos con actividad inhibitora sobre la MAO.

Además, tanto rasagilina como indantadol contienen en su estructura un grupo indano. En la figura 4.76 se muestran las estructuras de los compuestos evaluados en esta parte experimental.

Los resultados obtenidos en la evaluación nos muestran que tener alguno o los dos grupos estructurales que contienen los compuestos de referencia, no es suficiente para que el compuesto tenga actividad inhibitora de la MAO. En ninguno de los casos evaluados se ha observado actividad inhibitora de la MAO. Así, parece que es necesario algún otro requerimiento estructural para que el compuesto sea activo.

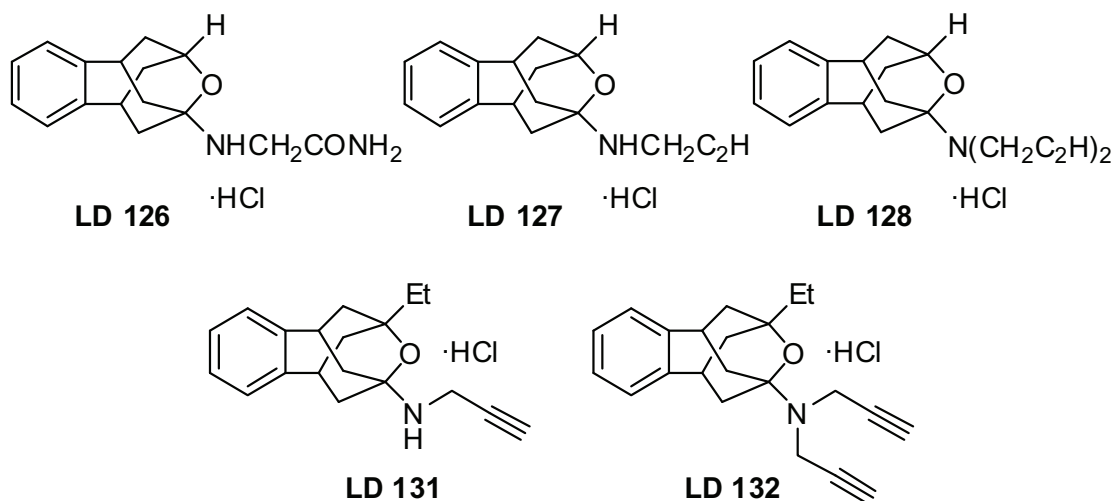


Fig. 4.76 Representación de las Estructuras de los compuestos evaluados como inhibidores de la MAO.

4.2 Experimentos realizados en cultivos de células hipocampales de ratón.

Con la finalidad de determinar la idoneidad de este tipo de cultivos primarios para el screening farmacológico de antagonistas de rNMDA, se han llevado a cabo estudios de caracterización farmacológica con glutamato y NMDA en el modelo experimental de movilización de calcio con Fura-2.

Los cultivos de células hipocampales se han sembrado en placas de 24 pozos, y se consideran adecuadas para los experimentos después de unos 10-12 días *in vitro*. En la figura 4.77 se muestra una imagen representativa de las neuronas en cultivo.

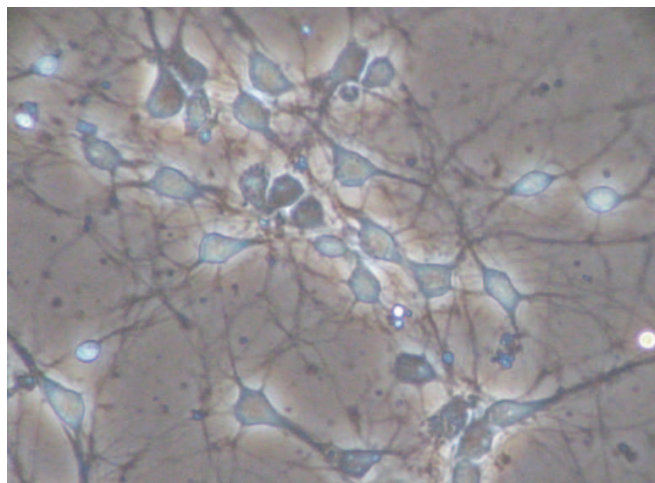


Fig. 4.77 Imágenes de células hipocampales de embriones de ratón de 18 días de gestación en placa de 24 pozos.

Para su caracterización farmacológica, se han realizado curvas dosis-respuesta acumulativas de los dos agonistas de referencia glutamato (Fig. 4.78) y NMDA (Fig. 4.79), siempre en presencia de glicina (10 μ M).

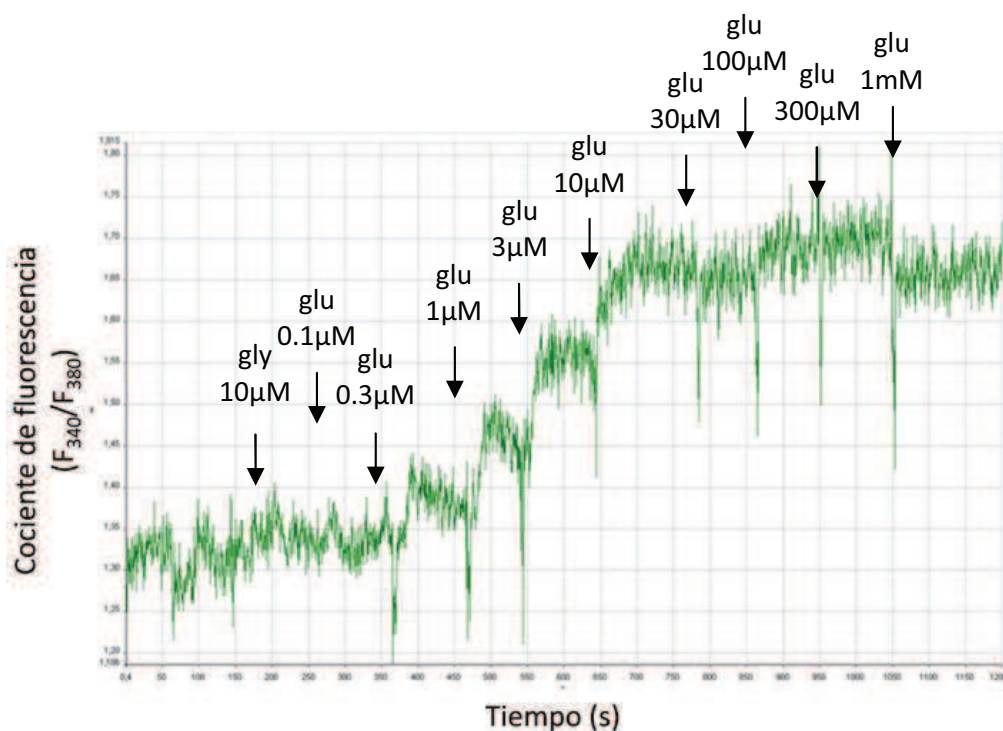


Fig. 4.78. Gráfica en la que se representa el incremento de la [Ca²⁺]_i inducido por concentraciones acumulativas de glutamato en presencia de glicina.

Resultados y discusión

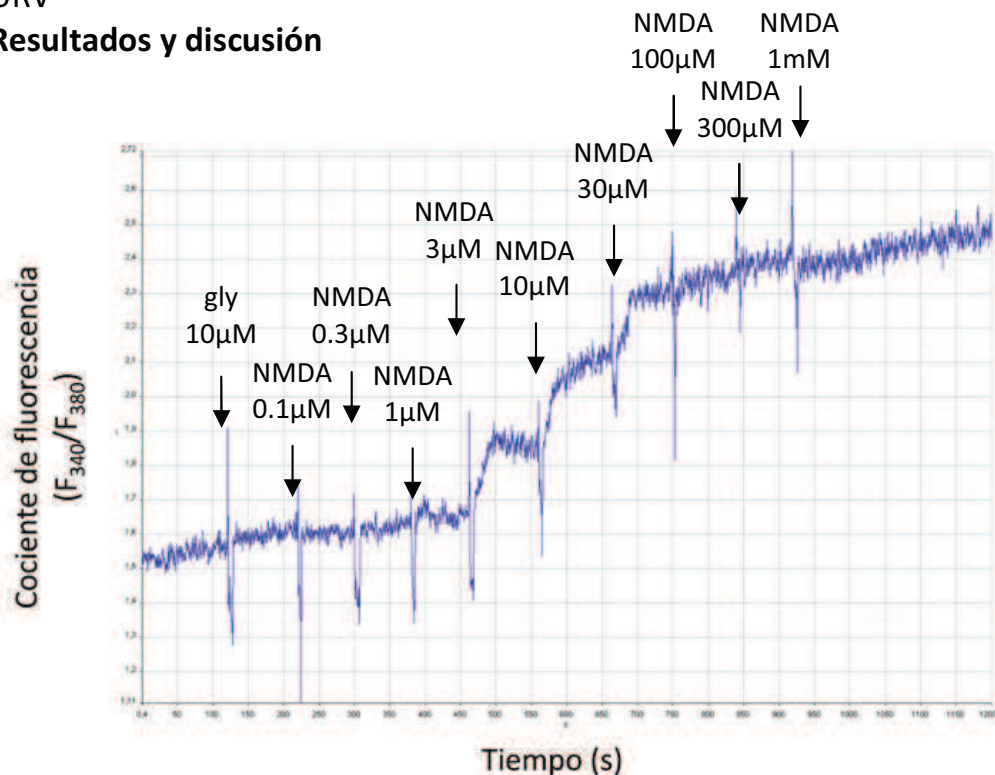


Fig. 4.79 Gráfica en la que se representa el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por concentraciones acumulativas de NMDA en presencia de glicina.

Para evaluar la presencia de receptores que incrementarían la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de receptores no NMDA, se evaluó el efecto de glutamato (100 μM) tras la adición de una concentración de 100 μM de NMDA. Como puede observarse en la figura 4.80, se obtiene un importante

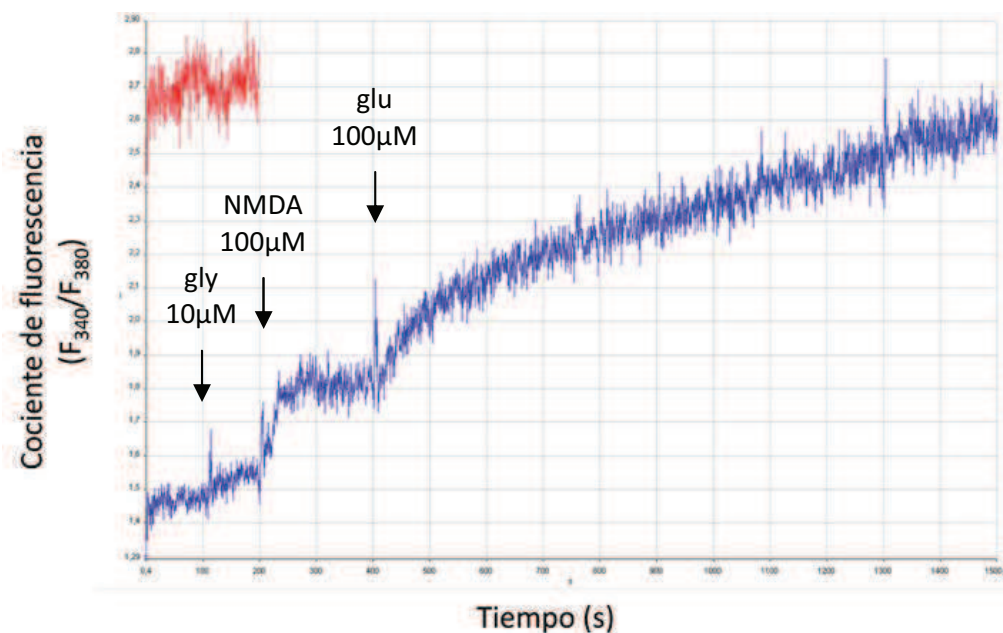


Fig. 4.80 Gráfica en la que se representa el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido inicialmente por NMDA y posteriormente por glutamato, en presencia de glicina.

incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, lo que indica la presencia de una importante población de receptores glutamatérgicos no-NMDA.

Para determinar la participación de cada tipo de receptor glutamatérgico en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por glutamato en presencia de glicina, se evaluó el efecto de dos antagonistas glutamatérgicos. Después de la inducción del incremento del calcio intracelular por glutamato ($100\mu\text{M}$) y glicina ($10\mu\text{M}$), se adicionó MK-801, antagonista de los rNMDA, y/o MCPG, antagonista de los receptores metabotrópicos de glutamato.

En la figura 4.81 se puede observar el efecto sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de dos adiciones de MK-801 ($100\mu\text{M}$ y $150\mu\text{M}$, mientras en la figura 4.82 se puede observar el efecto de la adición de $100\mu\text{M}$ de MK-801 seguida de otra adición de MCPG ($500\mu\text{M}$).

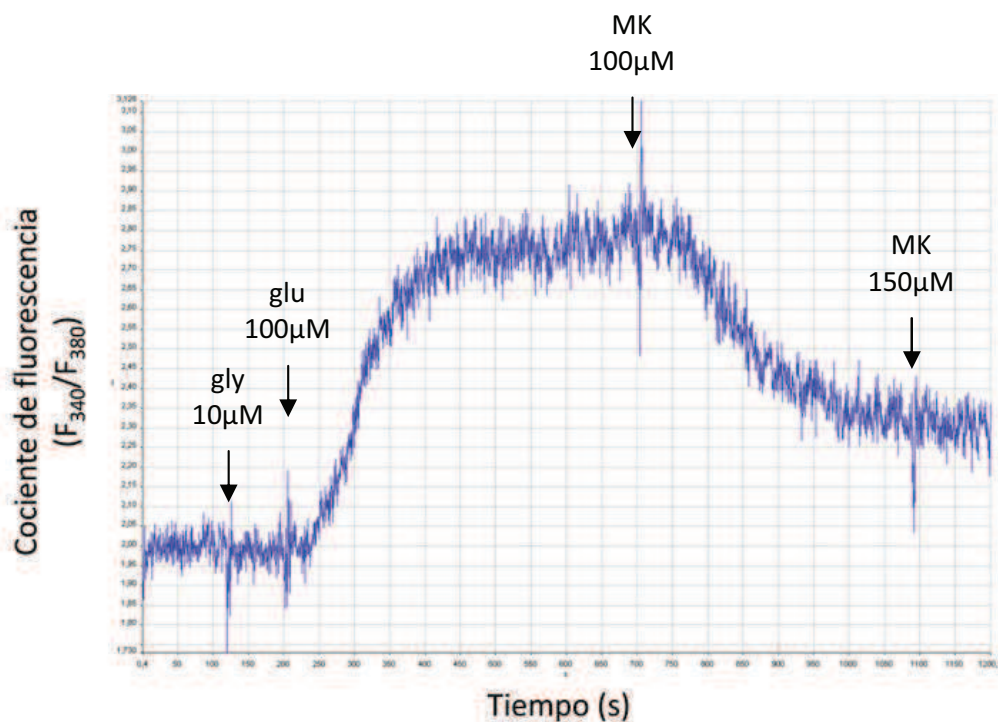


Fig. 4.81 Gráfica en la que se representa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por glutamato y el efecto de la adición de MK-801, en presencia de glicina.

Resultados y discusión

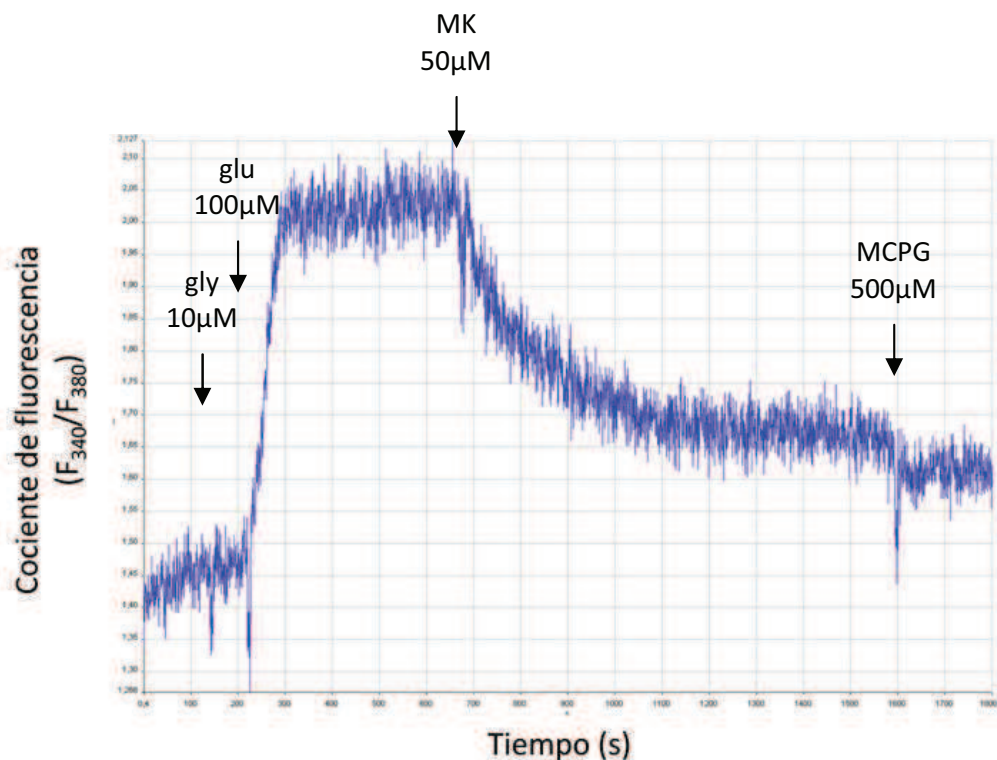


Fig. 4.82 Gráfica en la que se representa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por glutamato y el efecto de la adición de MK-801 y MCPG, en presencia de glicina.

Puesto que el MCPG no inhibió totalmente la entrada de calcio inducida por glutamato tras la adición de MK-801, se considera que la contribución de receptores ionotrópicos no-NMDA en este sustrato biológico sería entre el 15-20% de la señal total.

Globalmente, si bien este tipo de cultivos podrían ser útiles para la terminación de actividad sobre diferentes subtipos glutamatérgicos, la mayor complejidad en su preparación y mantenimiento dificultan su utilización en este tipo de experimentos.

4.3 Experimentos realizados en cultivos de células corticales de rata.

Los cultivos de células corticales también se han sembrado en placas de 24 pozos. En la figura 4.83 se muestra una imagen representativa de estas células en cultivos.

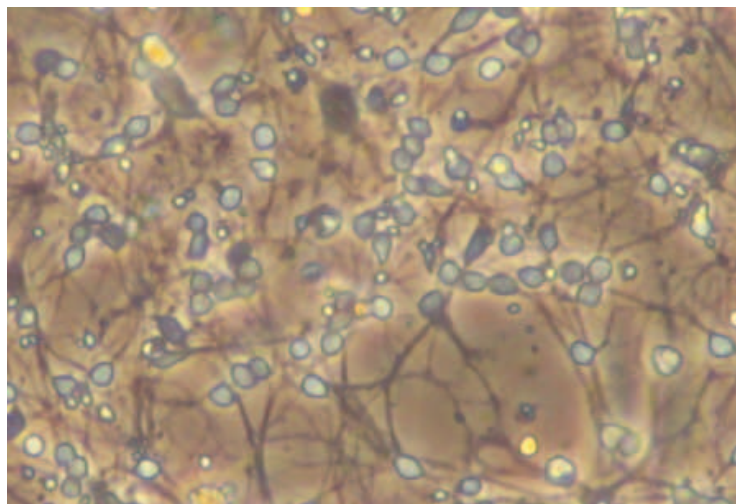


Fig. 4.83 Imágenes de células corticales de embriones de rata de 18 días de gestación, en placa de 24 pozos.

Con la finalidad también de caracterizar farmacológicamente este tipo de cultivo primario se han llevado a cabo diferentes experimentos.

Se ha realizado una curva acumulativa dosis-respuesta de glutamato con la adición de concentraciones crecientes de este agonista, como se muestra en la figura 4.84.

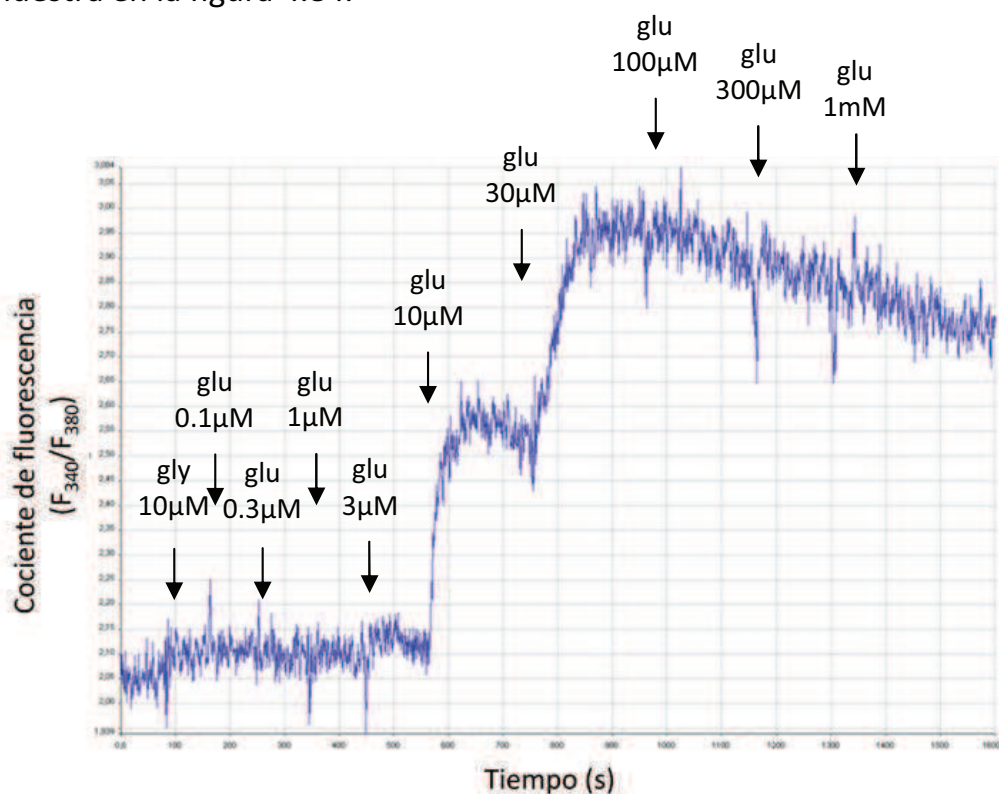


Fig. 4.84 Gráfica en la que se representa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por concentraciones crecientes de glutamato, en presencia de glicina.

Resultados y discusión

Para determinar la contribución de los diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos se ha evaluado el efecto del agonista glutamato después de una adición de NMDA, en presencia de glicina. En la figura 4.85 se puede observar la inducción del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inicialmente por NMDA y a continuación por glutamato.

También se ha evaluado el efecto de diferentes antagonistas glutamatérgicos como memantina y MK-801 (antagonistas de rNMDA), MCPG (antagonista de receptores metabotrópicos) y CNQX (antagonista de rAMPA/Kainato). En la figura 4.86 se pueden observar los efectos de la adición de estos antagonistas después de la inducción del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ por glutamato.

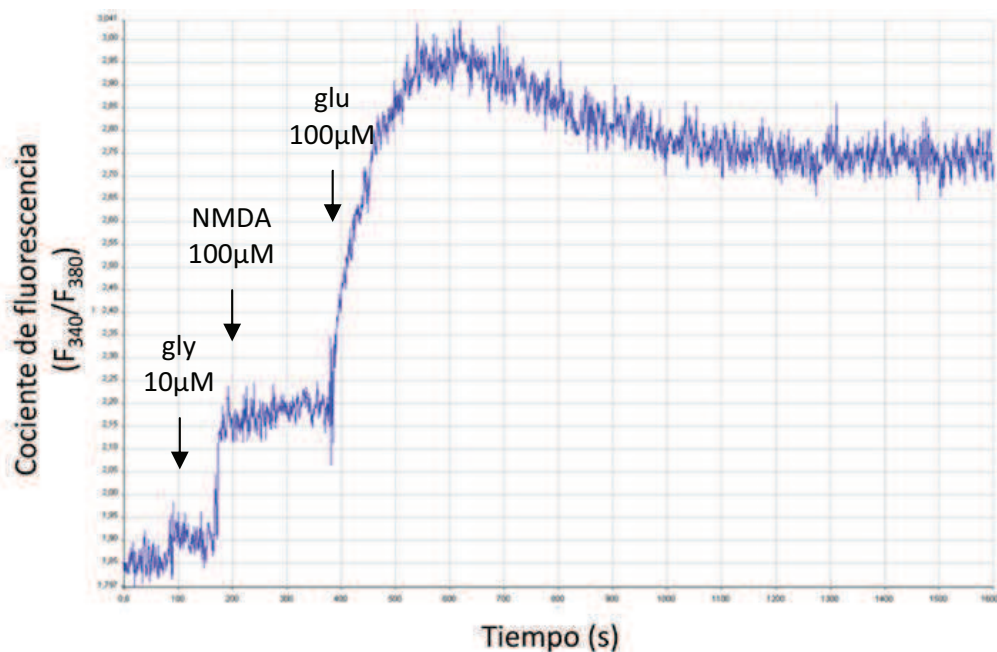


Fig. 4.85 Gráfica en la que se representa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido inicialmente por NMDA y posteriormente por glutamato, en presencia de glicina.

Curiosamente, parte del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por glutamato no es sensible al bloqueo con antagonistas glutamatérgicos específicos. Es posible que la despolarización neuronal permita la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, si bien este último aspecto no se ha investigado con más profundidad. Al igual a lo constatado con los cultivos de neuronas hipocámpales, los cultivos de

neuronas corticales no parecen ser tan idóneos como los de neuronas granulares de cerebelo para el *screening* de antagonistas glutamatérgicos.

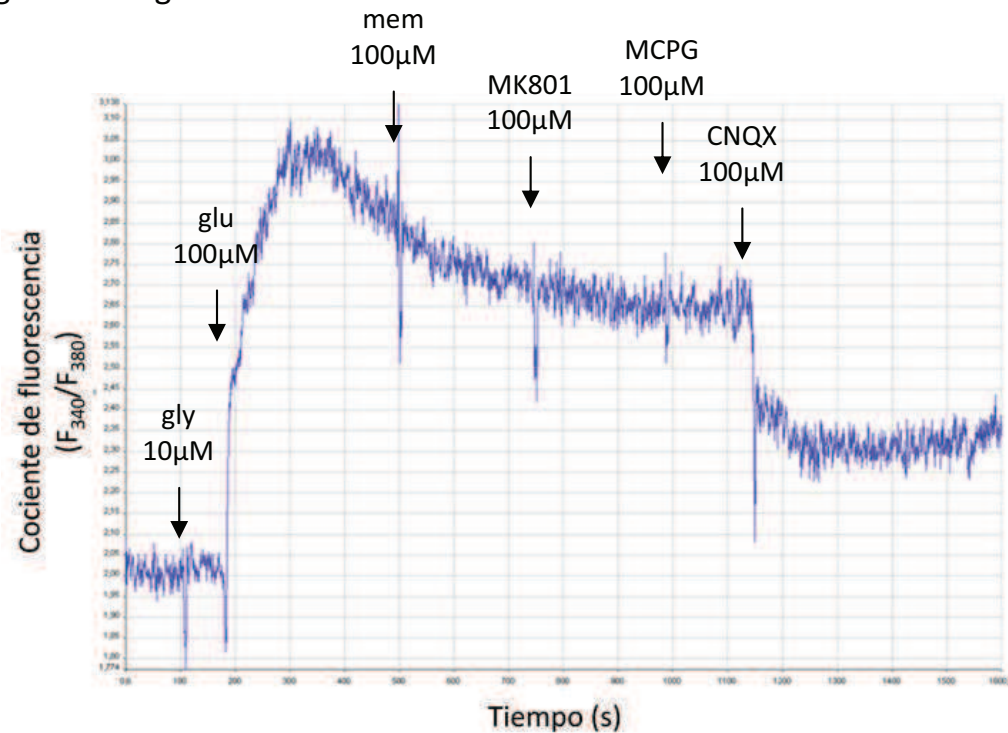


Fig. 4.86 Gráfica en la que se representa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por glutamato y el efecto de la adición de diferentes agonistas glutamatérgicos, en presencia de glicina.

4.4 Experimentos realizados con la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano.

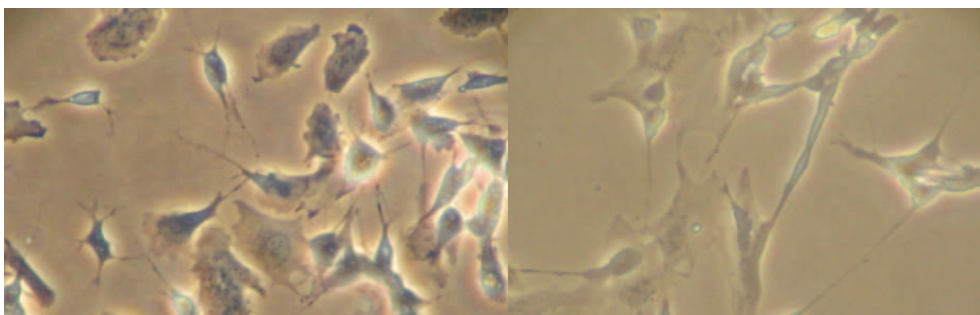


Fig. 4.87 Células de la línea SH-SY5Y de neuroblastoma humano en el segundo DIV, sin diferenciar (izq.) y después del estímulo de diferenciación (dcha.) (ácido retinoico 10µM).

Resultados y discusión

Como se puede ver en las figuras 4.87, identificar la diferenciación a nivel morfológico no ha sido demasiado evidente. Además, los experimentos para caracterizar farmacológicamente esta línea celular no han resultado exitosos.

En la figura 4.88 se puede observar la falta de efecto tras la adición de glutamato 100 μ M en presencia de glicina (10 μ M).

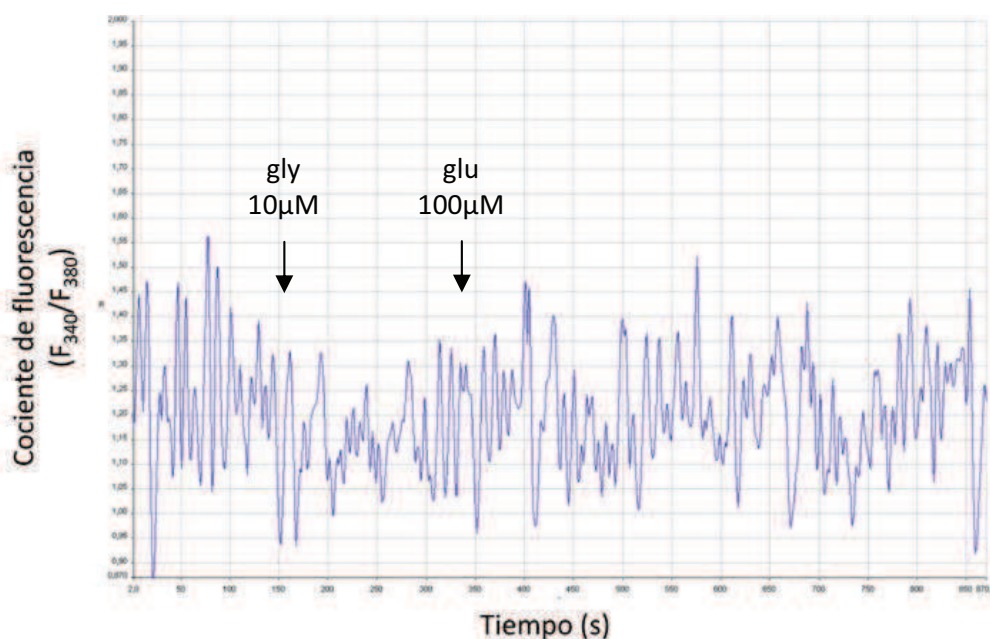


Fig. 4.88 Gráfica en la que se representa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por glutamato, en presencia de glicina.

Estas células han presentado más dificultades de las esperadas y los resultados han sido menos exitosos. No se ha conseguido una respuesta estable y satisfactoria ante la exposición a NMDA o glutamato en presencia de glicina.

Si bien el ácido retinoico es la sustancia más utilizada en la bibliografía para la diferenciación de las células de esta línea, es posible que puedan obtenerse mejores resultados con NGF u otros agentes. Así mismo, la dilucidación de este aspecto se escapa de los objetivos planteados.

4.5 Experimentos realizados con la línea celular STHdh de células estriatales.

Este tipo celular (Fig. 4.89) poseen una característica particular en su manipulación y mantenimiento que puede influir en factores como la fluidez de las membranas, puesto que deben mantenerse a una temperatura de cultivo de 33°C.

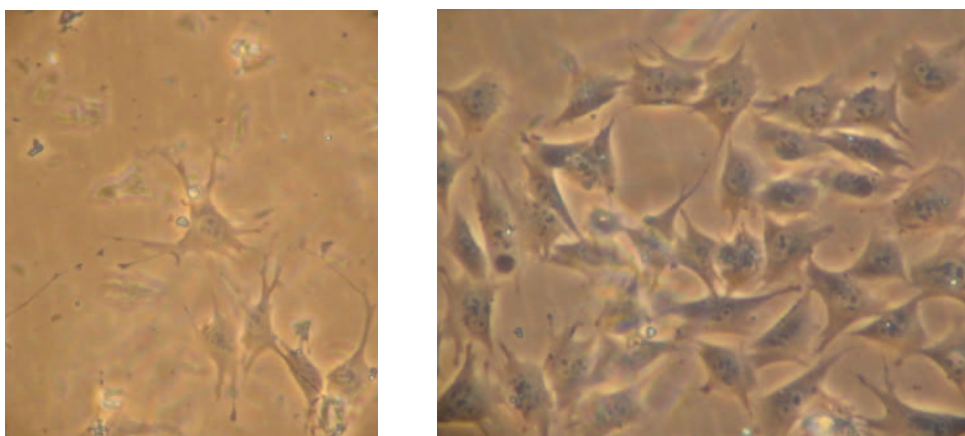


Fig. 4.89 Células de la línea STHdh en los primeros DIV en frasco de cultivo.

Las células de esta línea han presentado problemas en la captación de fura-2 dificultando la realización de los diferentes experimentos para su caracterización farmacológica.

Aún así, en condiciones específicas (4h de incubación a 33°C), pero no de una manera sistemática, se ha producido una buena carga del fluorocromo y se ha realizado algún experimento.

En la figura 4.90 se puede observar la falta de efecto después de la adición de agonistas como NMDA y glutamato. Solo se observa incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ después de adicionar ionomicina (40 μ M), un ionóforo de calcio que facilita la entrada de Ca^{2+} al crear un entorno lipídico que permite el paso del ion por la membrana citoplasmática.

Con estas células se han presentado problemas ya en la carga de fura-2. Posiblemente, el hecho que estos cultivos se mantengan a una

Resultados y discusión

temperatura de 33C puede tener alguna influencia en la fluidez de la membrana, dificultando la entrada del fluorocromo al interior celular.

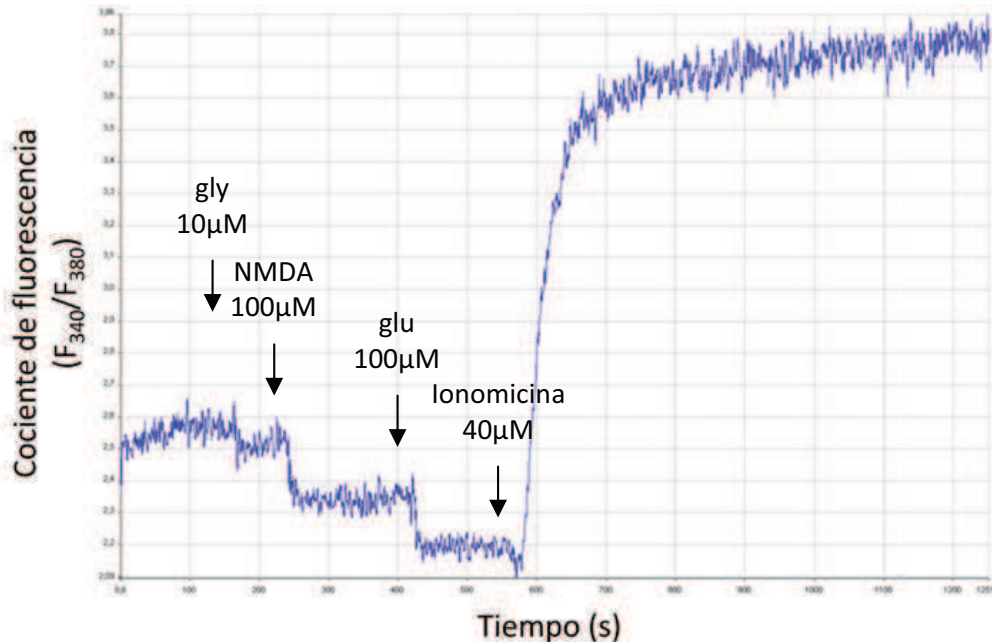


Fig. 4.90 Gráfica en la que se representa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido primero por NMDA y después por glutamato, en presencia de glicina. Seguido de la adición de ionomicina.

En general las líneas celulares han presentado peor fiabilidad por su falta de estabilidad y repetitividad en estos experimentos que los cultivos primarios.

Éstos han presentado mejores resultados con una mayor robustez y estabilidad de respuesta en los experimentos de movilización de calcio intracelular. Los tres tipos de cultivos responden a los agonistas de referencia usados con una respuesta estable. No obstante, los que han mostrado mejores características y una elevada repetitividad en la respuesta, son los cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata. Por ello, se propone su uso como sustrato biológico de referencia para la determinación de la actividad antagonista sobre los rNMDA.

4.6 Estudios de la toxicidad aguda de ciertos compuestos AK *In Vivo*.

Como se ha comentado en el apartado de materiales y métodos, para este estudio de toxicidad aguda *in vivo* se han escogido tres compuestos del grupo de compuestos del Dr. Kolocouris: AK2, AK3 y AK10, aparte del compuesto de referencia amantadina.

Esta prueba se ha realizado con animales machos y hembras después de una administración aguda intraperitoneal de tres dosis distintas (30mg/kg, 100mg/kg y 300mg/kg) de cada compuesto (Amantadina, AK2, AK3 y AK10). Cada dosis se ha evaluado con un mínimo de tres animales y a tres tiempos distintos cada animal (a los 30 minutos de la administración, a la hora y a las 2h).

Cuando en la dosis anterior se ha observado un 100% de mortalidad, no se ha realizado la prueba.

Supervivencia en las pruebas de toxicidad aguda de los compuestos AK seleccionados, a las distintas dosis.

| DOSIS (mg/kg) | Amantadina | AK-2 | AK-3 | AK-10 |
|---------------|------------|--------|--------|--------|
| 30 | Macho | Macho | Hembra | Macho |
| | Hembra | Hembra | Macho | Hembra |
| | Hembra | Hembra | Macho | Macho |
| | Macho | | | Macho |
| 100 | Macho | Macho | Macho | Macho |
| | Macho | Hembra | Macho | Hembra |
| | Hembra | Macho | Hembra | Macho |
| | | | Macho | Macho |
| 300 | Macho | | Macho | Hembra |
| | Macho | | Macho | Macho |
| | Hembra | | Hembra | Macho |

Tabla 4.20 Tabla de supervivencia de los animales a las distintas dosis. En verde se muestran los animales que han sobrevivido a la dosis aguda y en rojo los animales que han muerto después de la administración aguda de la dosis correspondiente del fármaco.

Resultados y discusión

Se puede ver en la tabla 4.20 como el compuesto AK10 es el que ha presentado mejor toxicidad, mejorando los resultados de amantadina. AK2 y AK3 en cambio, han mostrado una toxicidad mayor, en los dos casos, que amantadina. AK2 presenta una mortalidad del 100% a la dosis de 100 mg/kg, mientras que AK3 a la misma dosis presenta una mortalidad del 50%.

Posteriormente y si el animal sobrevivió, se llevó a cabo la batería de observación funcional (FOB) para cada uno de ellos, como acercamiento inicial al estudio neurotoxicológico

En general, el efecto máximo del compuesto administrado se observa a los 30 minutos de la administración por vía intra-peritoneal. Esto indica una rápida absorción y distribución del compuesto. En los casos en los que se produjo la muerte del animal, también lo hicieron a los pocos minutos de la administración de los fármacos.

Como se comentó en el apartado anterior, este estudio permite evaluar la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central, efectos neuromusculares y autónomos, y la reactividad sensorial y motora (Sills y cols., 2000; Fuentes y cols., 2007). En este caso nos centraremos en los estados de actividad y excitabilidad del sistema nervioso central, y para ello seleccionamos los ítems correspondientes. El resto de parámetros evaluados (como la posición inicial, salivación, lagrimeo, piloerección, acicalamiento u otros), no mostraron variaciones relevantes.

Según algunos autores, el grado de alerta o vigilancia y los levantamientos se asocian con la actividad del sistema nervioso central, mientras otros ítems como los movimientos tónicos y clónicos, la respuesta inicial y la reacción en mano se relacionan con la excitabilidad del sistema nervioso central (Sills y cols., 2000; Golub y cols., 2004).

En las gráficas siguientes se pueden ver representados los ítems comentados anteriormente (estado de alerta, levantamientos, movimientos tónicos y clónicos, reacción en mano y respuesta inicial), para cada dosis evaluada.

En el caso de amantadina 30 mg/kg, se observa una disminución de los distintos ítems valorados, y en concreto de los factores relacionados con la actividad del SNC, como son los levantamientos y el estado de alerta (Fig. 4.91).

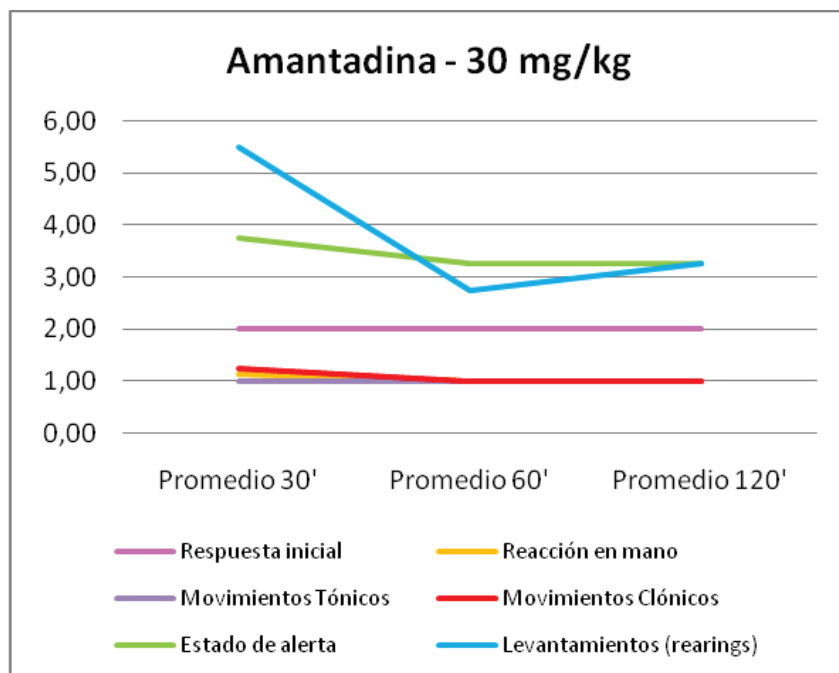


Fig. 4.91 Gráfica con la representación de los ítems relacionados con la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central con una dosis de 30 mg/kg de amantadina.

En la dosis inmediatamente superior de amantadina (100mg/kg), se ven afectados más factores pero sin una tendencia clara a una mayor o menor actividad y excitabilidad del SNC. Por otro lado, se han presentado temblores moderados o estremecimientos (Fig. 4.92).

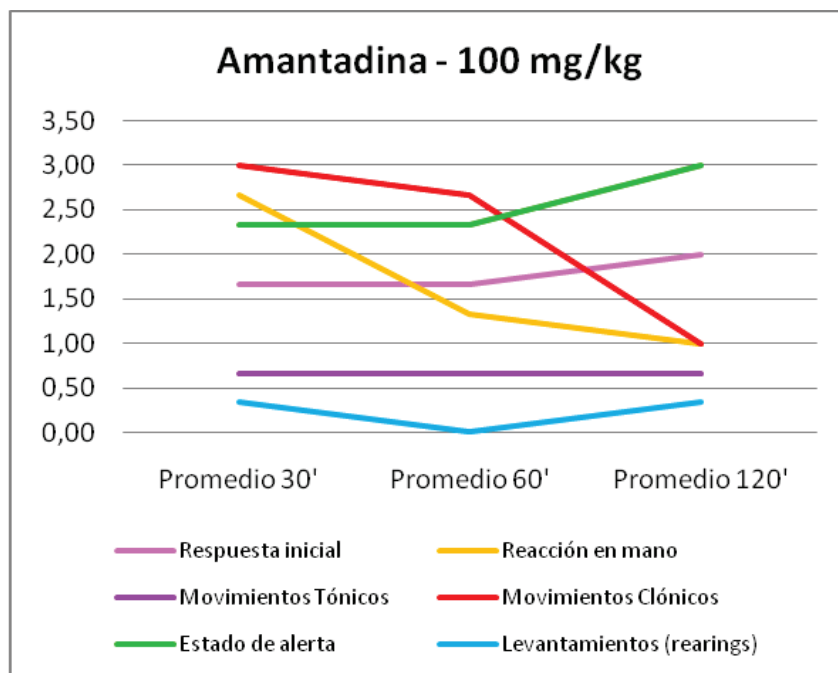


Fig. 4.92 Gráfica con la representación de los ítems relacionados con la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central con una dosis de 100 mg/kg de amantadina.

En el caso del compuesto AK2 solo se pudo evaluar la dosis más baja, obteniéndose una disminución de los factores indicadores de actividad, mientras que los relacionados con la excitabilidad no presentan una tendencia clara (Fig. 4.93).

En algunos casos los animales han presentado alteraciones en el andar como hacerlo de puntillas o arrastrando las patas posteriores, y algunos temblores y arqueamientos corporales leves.

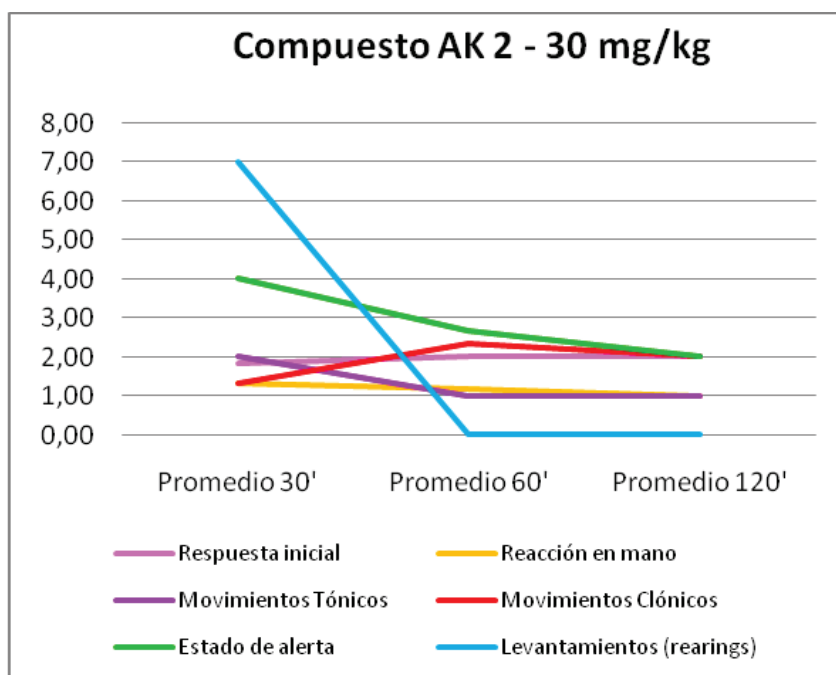


Fig. 4.93 Gráfica con la representación de los ítems relacionados con la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central con una dosis de 30 mg/kg del compuesto AK2.

El compuesto AK3 a la dosis más baja presenta un aumento de los ítems relacionados con la actividad, y una disminución en tres de los cuatro relacionados con la excitabilidad (Fig.4.94). En este caso también se han

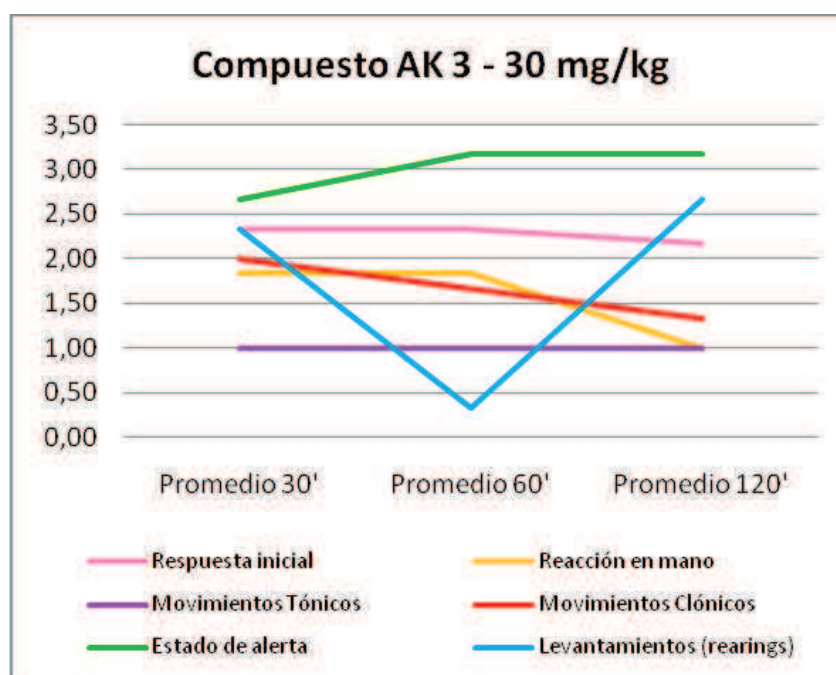


Fig. 4.94 Gráfica con la representación de los ítems relacionados con la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central con una dosis de 30 mg/kg del compuesto AK3.

Resultados y discusión

observado ciertas alteraciones menos pronunciadas, como arrastrar las patas posteriores al andar y en algunos casos temblores suaves.

En la dosis de 100 mg/kg el compuesto AK3 presenta una alteración general de los distintos ítems valorados (Fig. 4.95). Además de los ítems mostrados en la gráfica, se han visto alteraciones más importantes como temblores y convulsiones moderadas, vaivén excesivo al andar, dificultades en la movilidad e incoordinación motora.

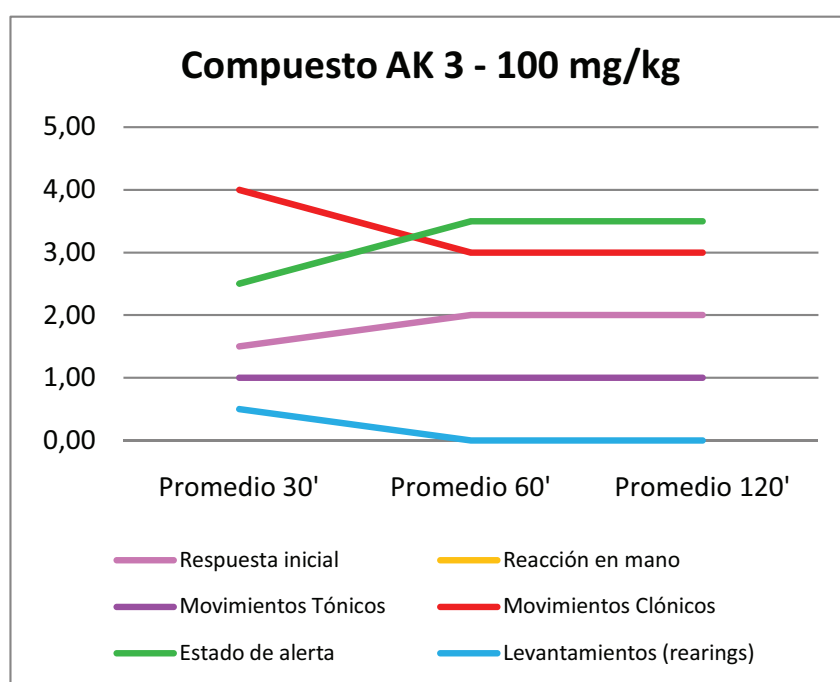


Fig. 4.95 Gráfica con la representación de los ítems relacionados con la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central con una dosis de 100 mg/kg del compuesto AK3.

El último compuesto presentado es el AK10. A la dosis menor presenta una disminución en el estado de alerta y los levantamientos, relacionados con la actividad del SNC. La respuesta inicial, la reacción en mano y los movimientos clónicos, relacionados con la excitabilidad del SNC, muestran un ligero aumento (Fig. 4.96). También han presentado ligeras alteraciones en la movilidad como arrastrar las patas posteriores o andar de puntillas y algunos temblores suaves.

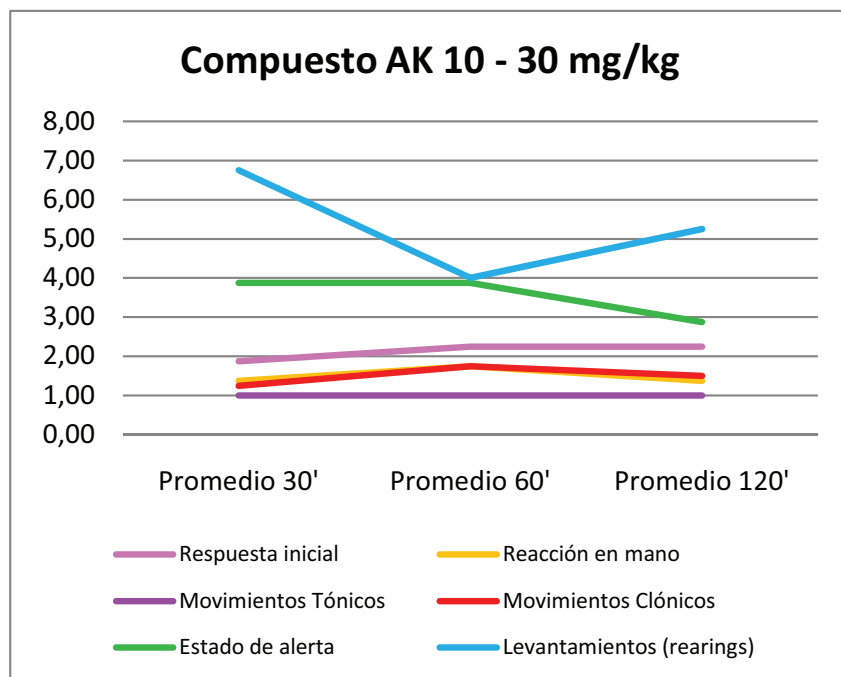


Fig. 4.96 Gráfica con la representación de los ítems relacionados con la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central con una dosis de 30 mg/kg del compuesto AK10.

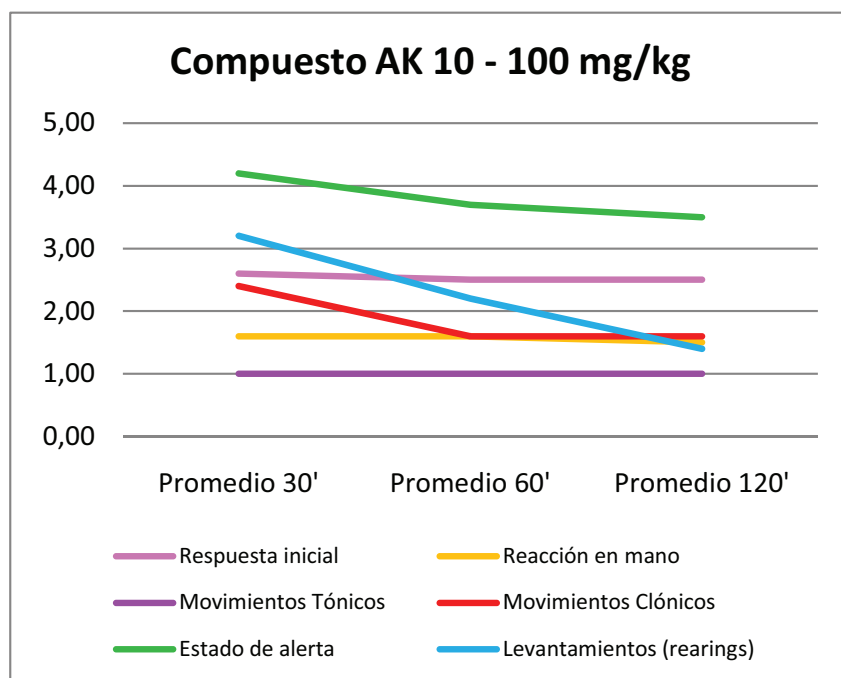


Fig. 4.97 Gráfica con la representación de los ítems relacionados con la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central con una dosis de 100 mg/kg del compuesto AK10.

Resultados y discusión

A la concentración siguiente, los efectos sobre los factores relacionados con la actividad del SNC se mantienen, y se suavizan los relacionados con la excitabilidad (Fig. 4.97). Con esta dosis también se han presentado ligeras alteraciones sobretodo en el andar como hacerlo en posición encorvada, de puntillas o arrastrando las patas traseras y temblores con alguna sacudida.

En el caso de la dosis mayor de este compuesto, continúan disminuidos los ítems relacionados con la actividad (levantamiento y estado de alerta), mientras los relacionados con la excitabilidad se ven alterados irregularmente (Fig. 4.98). También se han visto alterados otros factores como el andar (arqueado o de puntillas), ciertas dificultades en la movilidad y equilibrio en los levantamientos, movimientos repetitivos de cabeza y sacudidas.

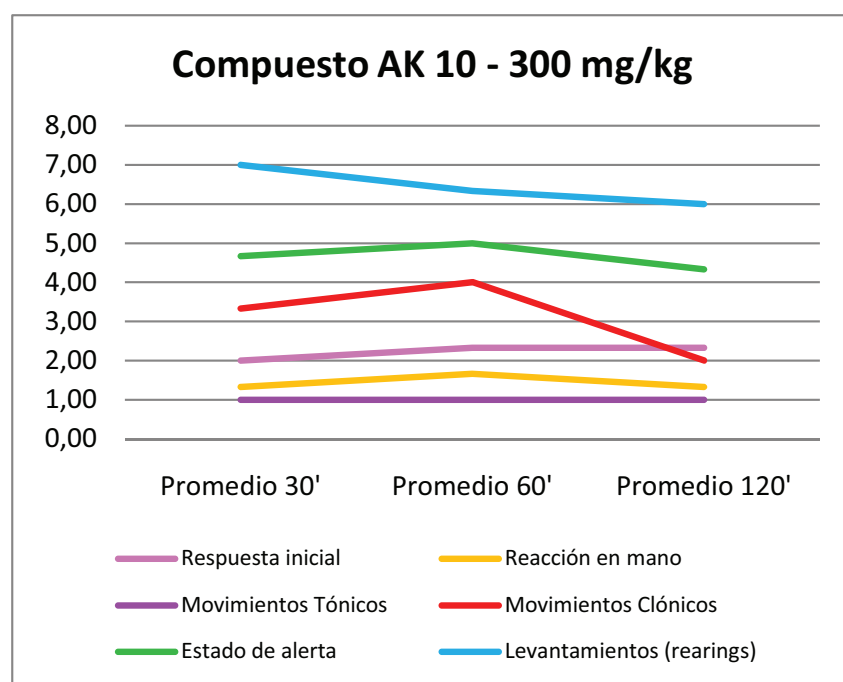


Fig. 4.98 Gráfica con la representación de los ítems relacionados con la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central con una dosis de 300 mg/kg del compuesto AK10.

A modo de resumen, los compuestos AK2 y AK3 han presentado una toxicidad mayor que el compuesto de referencia y los tres presentan

ligeras alteraciones a la menor dosis probada, mientras que a la dosis de 100 mg/kg ya presentan alteraciones más generalizadas a nivel de tono muscular y equilibrio, aparte de los comentados previamente a nivel de actividad y excitabilidad de sistema nervioso central.

El compuesto AK10 es el que ha presentado menor toxicidad, con unos niveles menores de toxicidad aguda. Aún así, a las dosis mayores también se muestran alteraciones a nivel de tono muscular.

Estos tres compuestos se escogieron principalmente por su actividad antivírica (determinada previamente en el laboratorio del Dr. De Clercq, en Bélgica) y por su escasa capacidad como antagonistas sobre los receptores glutamatérgicos por lo que se juzgó adecuado realizar un estudio más detallado de su perfil toxicológico.

En cuanto a las dosis usadas, Kornhuber y colaboradores, usaban 50-100 mg/kg de amantadina en ratas para obtener cambios conductuales (Kornhuber y cols., 1995). Cabe hacer notar que en humanos, la dosis habitual de amantadina es de unos 100-400mg/kg.

La toxicidad parece aumentar desde AK10 < Amantadina < AK2 y AK3. Si observamos los valores de IC_{50} presentados por los mismos compuestos, se observa que siguen el mismo orden que la toxicidad cuando se usa glutamato y NMDA como agonistas en los experimentos de la valoración de la actividad antagonista de los rNMDA.

Como se observa en la tabla, los compuestos AK2 y AK3 son los más potentes usando NMDA/glutamato como agonistas, más potentes incluso que amantadina y son también los que presentan mayor toxicidad.

Tanto AK2 como AK3 presentan mayor toxicidad que amantadina, pero AK2 ha presentado una mortalidad del 100% a la dosis de 100mg/kg, mientras que AK3 ha presentado una mortalidad del 50%. Este comportamiento parece que se refleja en los valores de IC_{50} con glutamato como agonista.

Resultados y discusión

| | AK10 (μM) | Amantadina | AK2 | AK3 |
|-------------------------|------------------------|------------|-------|-------|
| IC ₅₀ (Glu.) | >500 | 337,1 | 257,8 | 314,0 |
| IC ₅₀ (NMDA) | >500 | 74,6 | 61,2 | 50,6 |

Tabla 4.21 Valores de las concentraciones inhibitorias 50 con glutamato o NMDA como agonistas de los compuestos usados en el estudio de toxicidad *in Vivo*.

El compuesto que presenta mayor actividad antagonista de los rNMDA con NMDA como agonista, AK3, es el único que parece mostrar un aumento de la actividad del SNC a dosis más bajas (30mg/kg). Por otro lado, los tres compuestos más activos como antagonistas rNMDA, presentan una alteración general de los distintos ítems valorados, además de alteraciones en el tono muscular, la movilidad o el equilibrio.

Cabe destacar que la toxicidad presentada por el compuesto de referencia, amantadina, ha sido mayor de la esperada, ya que los valores de DL₅₀ referenciados en la bibliografía son de 700mg/kg en ratones y 1275mg/kg en ratas, por vía oral (Vernjer y cols., 1969; The Merck Índex, Ed. 14). Una de las posibles razones por las que se produce una mayor toxicidad puede estar relacionada con la vía de administración puesto que en los experimentos *in vivo* de esta tesis la administración se ha realizado por vía intraperitoneal. Se tomó la decisión de utilizar esta vía de administración dado el desconocimiento de la farmacocinética y la farmacodinamia de los demás compuestos evaluados. No obstante, la cepa utilizada puede también haber influido en este fenómeno.

CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

5. CONCLUSIONES

1. El glutamato y el agonista específico NMDA son capaces de incrementar los niveles de calcio intracelular en cultivos de células granulares de cerebelo de rata de forma dependiente de la concentración. Se han definido sus valores de EC₅₀ a través de un análisis no lineal de los datos.
2. Se ha definido la potencia de una serie de 127 compuestos de nueva síntesis como antagonistas glutamatérgicos, después de haber definido la potencia de memantina y amantadina como antagonistas de referencia del incremento de la [Ca²⁺]_i inducido por glutamato o por el agonista específico NMDA.
3. Se ha determinado el efecto neuroprotector de un grupo seleccionado de los compuestos de estudio en un modelo de neurodegeneración *in vitro*.
4. Ni la reducción de dos átomos de carbono del núcleo central ni la alquilación de la amina que presentan los compuestos de estructura bisnoradamantilamina favorecen la potencia de estos compuestos, respecto a los compuestos de referencia. Tampoco favorece su potencia la reducción de 1 átomo de carbono del núcleo central en los compuestos con estructura noradamantilamina.
5. La presencia de un radical etilo en el C-3 de los compuestos con estructura oxadamantilamina parece ser necesaria para su actividad, pero la sustitución de un átomo de carbono del núcleo central por un átomo de oxígeno no es suficiente para mejorar sustancialmente la potencia en estos compuestos. No obstante, la presencia de un átomo de oxígeno en la estructura benzohomooxadamantano parece ser una característica que favorece el antagonismo sobre el rNMDA, ya que en general sus potencias son mayores que los compuestos con estructura benzohomonordamantano.
6. Se demuestra que estructuras no estrictamente relacionadas con los aminoadamantanos (benzohomooxadamantanos, benzohomonor-

- adamantanos y pentaciclos) son capaces de actuar como antagonistas del rNMDA.
7. La presencia de dos sustituyentes en el carbono contiguo al carbono que soporta la amina en los adamantanos no favorece a la potencia de éstos en comparación a memantina.
 8. La alquilación de las aminas parece favorecer a los compuestos que presentan un átomo de oxígeno en el núcleo central como los oxadamantanos y los benzohomoxadamantanos, mientras que parece desfavorecer al resto de compuestos.
 9. Las aminas parecen presentar mayor potencia que las metilaminas equivalentes en los compuestos con estructuras bisnoradamantano y noradamantano, mientras que en las aminas pentacíclicas ocurre lo contrario.
 10. Por lo que se refiere a la serie de compuestos con estructura adamantano sintetizados por el Dr. Kolocouris (compuestos AK), se descarta que posean una apreciable actividad sobre la neurotransmisión glutamatérgica. Además, la sustitución de la amina por un hidroxilo (-OH) asegura la falta de actividad de estos compuestos a este nivel.
 11. Los compuestos con estructura relacionada con rincofilina cedidos por la Dra. Escolano de la Universidad de Barcelona no han presentado actividad antagonista sobre los receptores NMDA.
 12. Se propone el modelo de estudio cultivo primario de células granulares de cerebelo como sustrato biológico idóneo para el screening de fármacos antagonistas sobre rNMDA. En cambio, las líneas celulares estudiadas no han demostrado, según los resultados obtenidos en la presente tesis, ser un modelo biológico aceptable para el estudio de fármacos antagonistas sobre el rNMDA.
 13. La presencia de grupos aminoacetamido y/o propargilamino no parece ser suficiente para otorgar actividad inhibidora sobre la monoamino oxidasa a estos compuestos.

14. La toxicidad presentada *in vivo* por los compuestos AK se corresponde con sus valores de IC_{50} con NMDA como agonista. Los compuestos con IC_{50} menores han presentado mayor toxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abemayor E, Sidell N. Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environ Health Perspect.* 1989; 80:3-15.
- Al-Hallaq RA, Yasuda RP, Wolfe BB. Enrichment of N-methyl-d-aspartate NR1 splice variants and synaptic proteins in rat postsynaptic densities. *J.Neurochem.* 2001; 77(1):110-119.
- Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2003; 34:325-337.
- Ascher P, Nowak L. A patch-clamp study of excitatory amino acid activated channels. *Adv Exp Med Biol.* 1986; 11(203):507.
- Balannik V, Menniti FS, Paternain AV, Lerma J, Stern-Bach Y. Molecular mechanism of AMPA receptor noncompetitive antagonism. *Neur.* 2005; 48:279-288.
- Balls M, Clothier R. Differentiated cell and organ culture in toxicity testing. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1983; 52(Suppl. 2):115-137.
- Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol.* 1994; 4(3):389-399.
- Benarroch EE. Glutamate transporters. *Neurol.* 2010; 19(74):259-264.
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Sci.* 1968; 161(839):370-371.
- Blanke ML, VanDongen AMJ. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In: VanDongen AMJ, editor. *Biology of the NMDA Receptor* Duke University Medical Center, North Carolina: CRC Press Frontiers in Neuroscience; 2009. p. Ch13.

Bibliografía

- Blanpied TA, Clarke RJ, Johnson JW. Amantadine Inhibits NMDA Receptors by Accelerating Channel Closure during Channel Block. *J. Neurosci.* 2005; 25(13):3312-3322.
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nat.* 1993; 9(31):361.
- Bliss TVP, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 1973; 232(2):331-356.
- Boehning D, Patterson RI, Snyder SH. Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome C and inositol 1,4,5-triphosphate. *Cell cyc.* 2004; 3(3):252-254.
- Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. Cytochrome C binds to inositol (1,4,5) triphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2003; 10:1051-1061.
- Bossy-Wetzell E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med.* 2004; 10(Suppl.):2-9.
- Bredesen DE. Programmed cell death mechanisms in neurological disease. *Curr Mol Med.* 2008; 8(3):173-186.
- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nat.* 2006; 443(7113):796-802.
- Brock C, Oueslati N, Soler S, Boudier L, Rondard P, Pin J. Activation of a Dimeric Metabotropic Glutamate Receptor by Intersubunit Rearrangement. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(45):33000-33008.
- Camps P, Duque M, Vázquez S, Naesens L, De Clercq E, Sureda FX, López-Querol M, Camins A, Pallàs M, Prathalingam S, Kelly J, Romero V, Ivorra D, Cortés D. Synthesis and pharmacological evaluation of several ring-contracted amantadine analogs. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16:9925-9936.

- Casado D. Los efectos del envejecimiento demográfico sobre el gasto sanitario: mitos y realidades. *Gac Sanit* 2000; 15:154-163.
- Caudle WM, Zhang J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in parkinson disease. *Experim. Neurol.* 2009; 220:230-233.
- Chen V, Lipton S. Pharmacological implications of two distinct mechanism of interaction of memantine with NMDA-gated channels. *J. Pharmacol. Experim. Therap.* 2005; 314:961-971.
- Chen JJ, Swope DM, Dashtipour K. Comprehensive review of rasagiline, a second-generation monoamine oxidase inhibitor, for the treatment of Parkinson's Disease. *Clin.Ther.* 2007 9; 29(9):1825-1849.
- Chen M, Lu T, Chen X, Zhou Y, Chen Q, Feng X. Differential Roles of NMDA Receptor Subtypes in Ischemic Neuronal Cell Death and Ischemic Tolerance. *Stroke* 2008; 39(11):3042-3048.
- Cheung Y, Lau WK, Yu M, Lai CS, Yeung S, So K, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicol.* 2009; 30(1):127-135.
- Choi DW. Neurodegeneration: cellular defences destroyed. *Nat.*2005; 433:696-698.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 1983; 334(1):33-46.
- Conduras A, Rabasa I, Frank A, Bermejo-Pareja F, López-Pousa S, López-Arieta JM. Prospective one-year cost of illness study in a cohort of patients with dementia of Alzheimer's disease type in Spain: the ECO study. *J. Alzhe. D.* 2010; 19:601-615.
- Conning DM, Phillips JC. Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. *F. Chem. Toxicol.* 1986; 24(10-11):1145-1148.

- Cotman C, Monaghan D. Multiple Excitatory Amino Acid Receptor Regulation of Intracellular Ca²⁺ Implications for Aging and Alzheimer's Disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1989; 568(1):138-148.
- Danzysz W, Parsons C. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *I. J. Geriat. Psychi.* 2003; 18:23-32.
- Danzysz W, Parsons CG, Kornhuber J, Schmidt WJ, Quack G. Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents — preclinical studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997; 21(4):455-468.
- Davies WL, Grunert RR, Haff RF, McGahen JW, Neumayer EM, Paulshock MI. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Sci.* 1964; 144:862-3.
- Daviglus ML, Bell CC, Berrettini W, Bowen PE, Connolly ES, Cox NJ. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Preventing Alzheimer Disease and Cognitive Decline. *Ann. Intern. Med.* 2010; 153(3):176-181.
- De Pedro-Cuesta J, Virues-Ortega J, Vega S, Seijo-Martinez M, Saz P, Rodriguez F. Prevalence of dementia and major dementia subtypes in Spanish populations: A reanalysis of dementia prevalence surveys, 1990-2008. *BMC Neurol.* 2009; 9(1):55.
- Desagher S, Martinou J. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *T. Cell Biol.* 2000; 10(9):369-377.
- De Vries E, Gietema J, de Jong S. Tumor necrosis factor-Related apoptosis- Inducing ligand pathway and its therapeutic implications. *Clinic. Canc. Res.* 2006; 12:2390.
- Diaello L. Current Issues in Dementia Pharmacotherapy. *Am. J. Manag. Care* 2007; 13(8):198-204.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* 1999; 51(1):7-62.

- Donoso A, Delgado C. Perspectivas en la prevención y tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Med. Chile* 2009; 137(2):289-295.
- Doraiswamy P. Alzheimer's disease and the glutamate NMDA receptor. *Psychopharmacol Bull.* 2003; 37(2):41-49.
- Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 1992; 89(10):4363-4367.
- Duque MD, Camps P, Profire L, Montaner S, Vázquez S, Sureda FX, Mallol J, López-Querol M, Naesens L, De Clercq E, Prathalingam S, Kelly J. Synthesis and pharmacological evaluation of (2-oxadamant-1-yl) amines. *Bioorg.Med.Chem.* 2009; 17(8):3198-3206.
- Duque MD, Camps P, Torres E, Valverde E, Sureda FX, López-Querol M, Camins A, Prathalingam S, Kelly J, Vázquez S. New oxapolycyclic cage amines with NMDA receptor antagonist and trypanocidal activities. *Bioorg.Med.Chem.* 2009.
- Dusart I, Marty S, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS—II. Astrocytes. *Neurosci.* 1991; 45(3):541-549.
- Ebixa. *Ficha técnica de la memantina (clorhidrato de memantina)*. 2008.
- Edsjö A, Holmquist L, Pählman S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Semin.Cancer Biol.* 2007; 17(3):248-256.
- Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 2000; 75(3):991-1003.
- Escalona JC, Carrasco R, Padrón JA editors. *Introducción al diseño racional de fármacos*. Ciudad de la Habana: Editorial Universitaria; 2008.

Bibliografía

- Estrada Sánchez AM, Mejía-Toiber J, Massieu L. Excitotoxic Neuronal Death and the Pathogenesis of Huntington's Disease. *Arch.Med.Res.* 2008; 39(3):265-276.
- Fan MMY, Raymond LA. N-Methyl-d-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog.Neurobiol.* 2007; 81(5-6):272-293.
- Ferraguti F, Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* 2006; 326(2):483-504.
- Ferrer-Montiel AV, Merino JM, Planells-Cases R, Sun W, Montal M. Structural determinants of the blocker binding site in glutamate and NMDA receptor channels. *Neuropharmacol.* 1998; 2(139):147.
- Forsby A, Bal-Price AK, Camins A, Coecke S, Fabre N, Gustafsson H. Neuronal in vitro models for the estimation of acute systemic toxicity. *Toxicol. Vit.* 2009; 23(8):1564-1569.
- Foster TC. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 2007; 6(3):319-325.
- Fuentes S, Vicens P, Colomina MT, Domingo JL. Behavioral effects in adult mice exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Toxicol.* 2007; 242(1-3):123-129.
- Furukawa H, Singh S, Mancusso R, Gouaux E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nat.* 2005; 438(10):1038.
- García FJ, Sánchez MI, Pérez A, Martín E, Marsal C, Rodríguez Ferrer G. Prevalencia de demencia y de sus subtipos principales en sujetos mayores de 65 años: efecto de la educación y ocupación. *Med. Clin (Bar)* 2001; 116:401-407.
- García-Arencibia M, Hochfeld WE, Toh PPC, Rubinsztein DC. Autophagy, a guardian against neurodegeneration. *Semin.Cell Dev.Biol.* 2010.
- Gardoni F, Di Luca M. New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur.J.Pharmacol.* 2006; 545(1):2-10.

- Gilling KE, Jatzke C, Hechenberger M, Parsons CG. Potency, voltage-dependency, agonist concentration-dependency, blocking kinetics and partial untrapping of the uncompetitive N-methyl-d-aspartate (NMDA) channel blocker memantine at human NMDA (GluN1/GluN2A) receptors. *Neuropharmacol.* 2009; 56(5):866-875.
- Gines S, Ivanova E, Seong I, Saura CA, MacDonald ME. Enhanced Akt Signaling Is an Early Pro-survival Response That Reflects N-Methyl-D-aspartate Receptor Activation in Huntington's Disease Knock-in Striatal Cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(50):50514-50522.
- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J.Pathol.* 2010; 221(1):3-12.
- Golub MS, Germann SL, Lloyd KCK. Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav.Brain Res.* 2004; 153(1):159-170.
- Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *J.Cell.Mol.Med.* 2008; 12(6a):2263-2280.
- Greenamyre JT. The Role of Glutamate in Neurotransmission and in Neurologic Disease. *Arch.Neurol.* 1986; 43(10):1058-1063.
- Grisham JW, Smith GJ. Predictive and mechanistic evaluation to toxic responses in mammalian cell culture systems. *Pharmacol Rev.* 1984; 36(Suppl. 2):151S-171S.
- Groc L, Bard L, Choquet D. Surface trafficking of N-methyl-d-aspartate receptors: Physiological and pathological perspectives. *Neurosci.* 2009; 158(1):4-18.
- Guimaraes JS, Freire MAM, Lima RR, Souza-Rodrigues R.D, Costa AMR, dos Santos CD. Mecanismos de degeneración secundaria en el sistema nervioso central durante los trastornos neuronales agudos y el daño en la sustancia blanca. *Rev Neurol.* 2009; 48(6):304-310.

Bibliografía

- Gulaboski R, Pereira CM, Cordeiro MNDS, Silva AF, Hoth M, Bogeski I. Redox properties of the calcium chelator Fura-2 in mimetic biomembranes. *Cell Calc.* 2008; 43(6):615-621.
- Guttmacher AE, Collins FS. Welcome to the Genomic Era. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349(10):996-998.
- Hao J, Mdzinarishvili A, Abbruscato TJ, Klein J, Geldenhuys WJ, Van der Schyf CJ. Neuroprotection in mice by NGP1-01 after transient focal brain ischemia. *Brain Res.* 2008; 1196:113-120.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neurosci.* 2002; 5:405-414.
- Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem. Soc. Trans.* 2009; 37(6):1147-1160.
- Hardingham GE, Bading H. Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochem. Biophys. A.* 2002; 1600(1-2):148-153.
- Harry GJ, Billingsley M, Bruinink A, Campbell IL, Classen W, Dorman DC. In vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environ Health Perspect.* 1998; 106(Suppl. 1):131-158.
- Henneberry RC, Novelli A, Cox JA, Lysko PG. Neurotoxicity at the N-Methyl-D-Aspartate Receptor in Energy-Compromised Neurons An Hypothesis for Cell Death in Aging and Disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1989; 568(1):225-233.
- Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nat.* 1989; 342:643-648.
- Huggins D, Grant G. The function of the amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *J. Mol. Graph. Model.* 2005; 23:381-388.

- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Internat.* 2004; 45:583-595.
- Iino M, Ozawa S, Tsuzuki K. Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* 1990; 424(1):151-165.
- Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska I, Salyha Y, Ben-Ari Y. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 2006; 572(3):789-798.
- Jane DE, Lodge D, Collingridge GL. Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacol.* 2009; 56(1):90-113.
- Jellinger KA. Challenges in neuronal apoptosis. *Curr Alzheimer Res.* 2006; 3(4):377-391.
- Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm.* 2009; 16:1111-1162.
- Jin R, Clark S, Weeks AM, Dudman JT, Gouaux E, Partin KM. Mechanism of Positive Allosteric Modulators Acting on AMPA Receptors. *J.Neurosci.* 2005; 25(39):9027-9036.
- Jones KS, VanDongen HMA, VanDongen AMJ. The NMDA Receptor M3 Segment Is a Conserved Transduction Element Coupling Ligand Binding to Channel Opening. *J.Neurosci.* 2002; 22(6):2044-2053.
- Kalia LV, Kalia SK, Salter MW. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lanc. Neurol.* 2008; 7(8):742-755.
- Kang T, Murakami Y, Matsumoto K, Takayama H, Kitajima M, Aimi N. Rhynchophylline and isorhynchophylline inhibit NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur.J.Pharmacol.* 2002; 455(1):27-34.

- Karlin A, Akabas MH. Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol.* 1998; 293(123):145.
- Kashiwagi K, Masuko T, Nguyen C, Kuno T, Tanaka I, Igarashi K. Channel blockers acting at NMDA receptors: differential effects of mutations in the vestibule and ion channel pore. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61:533-545.
- Keinänen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Verdoorn TA, Sakmann B. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science.* 1990; 249(4968):556-560.
- Kiyama Y, Manabe T, Sakimura K, Kawakami F, Mori H, Mishina M. Increased Thresholds for Long-Term Potentiation and Contextual Learning in Mice Lacking the NMDA-type Glutamate Receptor epsilon 1 Subunit. *J. Neurosci.* 1998; 18(17):6704-6712.
- Klimavičiūsa L, Safiulina D, Kaasik A, Kluša V, Zharkovsky A. The effects of glutamate receptor antagonists on cerebellar granule cell survival and development. *Neurotoxicol.* 2008; 29(1):101-108.
- Kornhuber J, Quack G, Danysz W, Jellinger K, Danielczyk W, Gsell W. Therapeutic brain concentration of the NMDA receptor antagonist amantadine. *Neuropharmacol.* 1995; 34(7):713-721.
- Kolocouris A, Spearpoint P, Martin S, Hay A, López-Querol M, Sureda F, Padalko E, Neyts J, De Clercq E. Comparisons of the influenza virus A M2 channel binding affinities, anti-influenza virus potencies and NMDA antagonistic activities of 2-alkyl-2-aminoadamantanes and analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008; 18:6156-6160.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2005; 28(12):670-676.
- Kristiansen LV, Huerta I, Beneyto M, Meador-Woodruff JH. NMDA receptors and schizophrenia. *Curr. Op. Pharmacol.* 2007; 7(1):48-55.

- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulation in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1998; 60:619-642.
- Kulikov AV, Rzhaninova AA, Goldshtein DV, Boldyrev AA. Expression of NMDA receptors in multipotent stromal cells of human adipose tissue under conditions of retinoic acid-induced differentiation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007; 144(4):626-629.
- Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, Kushiya E. Impairment of Suckling Response, Trigeminal Neuronal Pattern Formation, and Hippocampal LTD in NMDA Receptor $\epsilon 2$ Subunit Mutant Mice. *Neur.* 1996; 16(2):333-344.
- Lambert JC. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 2009; 6.
- Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Eur J Physiol* 2010; 14.
- Lee JA. Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin. *BMB Rep.* 2009; 42(6):324-330.
- Lim D, Fedrizzi L, Tartari M, Zuccato C, Cattaneo E, Brini M. Calcium Homeostasis and Mitochondrial Dysfunction in Striatal Neurons of Huntington Disease. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(9):5780-5789.
- Liu X, Murray KD, Jones EG. Switching of NMDA Receptor 2A and 2B Subunits at Thalamic and Cortical Synapses during Early Postnatal Development. *J. Neurosci.* 2004; 24(40):8885-8895.
- Lois G, Lanza M, Makovec F, Artusi R, Caselli G, Puia G. Functional in vitro characterization of CR 3394: A novel voltage dependent N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist. *Neuropharmacol.* 2006; 50(3):277-285.
- Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 1999; 9(1):119-31.

Bibliografía

- Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol.* 1957; 58(2):193-201.
- Lynch DR, Guttman RP. Excitotoxicity: Perspectives Based on N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 2002; 300(3):717-723.
- Lynch MA. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol.Rev.* 2004; 84(1):87-136.
- Magazanik LG, Tikhonov DB, Bol'shakov KV, Gmiro VE, Buldakova SL, Samoilova MV. Studies of the structure of glutamate receptor ion channels and the mechanisms of their blockade by organic cations. *Neurosci Behav Physiol.* 2003; 33(3):237-246.
- Manahan-Vaughan D, von Haebler D, Winter C, Juckel G, Heinemann U. A single application of MK801 causes symptoms of acute psychosis, deficits in spatial memory, and impairment of synaptic plasticity in rats. *Hipp.* 2008; 18(2):125-134.
- Marty S, Dusart I, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS—I. Microglia/macrophages. *Neurosci.* 1991; 45(3):529-539.
- Mattia C, Coluzzi F. Indantadol, a novel NMDA antagonist and nonselective MAO inhibitor for the potential treatment of neuropathic pain. *IDrugs.* 2007; 10(9):636-644.
- Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; 1(2):120-129.
- Molinuevo J, Lladó A, Rami L. Memantine: Targeting glutamate excitotoxicity in Alzheimer's disease and others dementias. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2005; 20(2):77-85.
- Monyer H, Seeburg PH, Wisden W. Glutamate-operated channels: Developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neur.* 1991; 6(5):799-810.

- Morris BJ, Cochran SM, Pratt JA. PCP: from pharmacology to modelling schizophrenia. *Curr. Op. Pharmacol.* 2005; 5(1):101-106.
- Morris RGM, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE. Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur.J.Neurosci.* 1990; 2(12):1016-1028.
- Moser VC. The functional observational battery in adult and developing rats. *Neurotoxicol.* 2000; 21(6):989-996.
- Nair VD, Niznik HB, Mishra RK. Interaction of NMDA and dopamine D2L receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 1996; 66(6):2390-2393.
- Nakamura T, Lipton SA. Preventing Ca²⁺-mediated nitrosative stress in neurodegenerative diseases: Possible pharmacological strategies. *Cell Calcium* 2010; 47(2):190-197.
- Neyton J, Paoletti P. Relating NMDA Receptor Function to Receptor Subunit Composition: Limitations of the Pharmacological Approach. *J.Neurosci.* 2006; 26(5):1331-1333.
- Nicoletti F, Wroblewski JT, Novelli A, Guidotti A, Costa E. Excitatory amino acid signal transduction in cerebellar cell cultures. *Funct Neurol.* 1986; 1(4):345-349.
- Nishi M, Hinds H, Lu H, Kawata M, Hayashi Y. Motoneuron-Specific Expression of NR3B, a Novel NMDA-Type Glutamate Receptor Subunit That Works in a Dominant-Negative Manner. *J.Neurosci.* 2001; 21(23):185RC.
- Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010; 50(1):295-322.
- OCDE. *Guidelines for acute oral toxicity testing.* 2007.
- Okouchi M, Ekshyyan O, Maracine M, Aw TY. Neuronal Apoptosis in Neurodegeneration. *Antiox. Redox Sig.* 2007; 9(8):1059-1096.

- Olney JW, Ho OL. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nat.* 1970; 227(5258):609-611.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(7):552-565.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog.Neurobiol.* 1998; 54(5):581-618.
- Påhlman S, Odelstad L, Larsson E, Grotte G, Nilsson K. Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int J Cancer.* 1981; 28(5):583-589.
- Paoletti P, Vila I, Rife M, Lizcano JM, Alberch J, Gines S. Dopaminergic and Glutamatergic Signaling Crosstalk in Huntington's Disease Neurodegeneration: The Role of p25/Cyclin-Dependent Kinase 5. *J.Neurosci.* 2008; 28(40):10090-10101.
- Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Op. Pharmacol.* 2007; 7(1):39-47.
- Papadia S, Soriano FX, Léveillé F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH. Synaptic NMDA receptor activity boost intrinsic antioxidant defences. *Nat Neurosci.* 2008; 11(4):476-487.
- Parsons C, Danysz W, Quack G. Memantine es a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist-a review of preclinical data. *Neuropharmacol.* 1999; 38:735-767.
- Parsons C, Stöffler A, Danysz W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system- too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacol.* 2007; 53:699-723.
- Petegnief V, Saura J, de Gregorio-Rocasolano N, Paul SM. Neuronal injury-induced expression and release of apolipoprotein E in mixed neuron/glia co-cultures: nuclear factor κ B inhibitors reduce basal and lesion-induced secretion of apolipoprotein E. *Neurosci.* 2001; 104(1):223-234.

- Planells-Cases R, Montoliu C, Humet M, Fernández AM, García-Martínez C, Valera E. A Novel N-Methyl-d-aspartate Receptor Open Channel Blocker with in Vivo Neuroprotectant Activity. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 2002; 302(1):163-173.
- Pouplana R, Barril X, Luque FJ. Química computacional en diseño de fármacos. *Life sciences lab.* 2009:28-31.
- Rammes G, Danysz W, Parsons CG. Pharmacodynamics of memantine: an update. *Curr Neuropharmacol.* 2008; 6(1):55-78.
- Ramon y Cajal S editor. *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebros.* Paris; 1913.
- Rang HP. The drug discovery process: general principles and some case histories. 2006:43-56.
- Rastinejad F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 2001; 11(1):33-38.
- Rees KR. Cells in culture of toxicity testing: a review. *J. R. Soc. Med.* 1980; 73(4):261-264.
- Roche KW, Raymond LA, Blackstone C, Haganir RL. Transmembrane topology of the glutamate receptor subunit GluR6. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(16):11679-11682.
- Rowland LP, Merritt HH editors. *Merritt's neurology.* 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- Sakurada K, Masu M, Nakanishi S. Alteration of Ca²⁺ permeability and sensitivity to Mg²⁺ and channel blockers by single aminoacid substitution in the NMDA receptor. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(1):410-415.
- Sala C, Rudolph-Correia S, Sheng M. Developmentally Regulated NMDA Receptor-Dependent Dephosphorylation of cAMP Response Element-Binding Protein (CREB) in Hippocampal Neurons. *J.Neurosci.* 2000; 20(10):3529-3536.

Bibliografía

- Salinska E, Danysz W, Tazarewicz J. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Fol. Neuropathol.* 2005; 43(4):322-339.
- Saneto RP, Altman A, Knobler RL, Johnson HM, de Vellis J. Interleukin 2 mediates the inhibition of oligodendrocyte progenitor cell proliferation in vitro. *Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 1986; 83(23):9221-9225.
- Sans N, Petralia RS, Wang Y, Blahos J,II, Hell JW, Wenthold RJ. A Developmental Change in NMDA Receptor-Associated Proteins at Hippocampal Synapses. *J. Neurosci.* 2000; 20(3):1260-1271.
- Schleyer PR. A Simple Preparation of Adamantane. *J. Am. Chem. Soc.* 1957; 79:32-92.
- Schrier BK, Van Putten DN. On the application of molecular cloning to developmental neurobiology. *Int J Neurol.* 1983; 16-17:46-60.
- Shahar A, Ralph J, David Y. Morphological alterations in cultured neuromuscular tissue induced by two anesthetic agents. *Neurochem Res.* 1989; 14(10):1017-1024.
- Shastry BS. Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochem. Int.* 2003; 43(1):1-7.
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nat.* 1994; 368(6467):144-147.
- Shimada Y, Goto H, Itoh T, Sakakibara I, Kubo M, Sasaki H. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats. *J Pharm Pharmacol.* 1999; 51(6):715-722.
- Shimamoto K. Glutamate Transporter Blockers for Elucidation of the Function of Excitatory Neurotransmission Systems. *Chem. Rec.* 2008; 8:182-199.
- Sills RC, Valentine WM, Moser V, Graham DG, Morgan DL. Characterization of Carbon Disulfide Neurotoxicity in C57BL6

- Mice: Behavioral, Morphologic, and Molecular Effects. *Toxicol. Pathol.* 2000; 28(1):142-148.
- Singh J, Kaur G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Res.* 2007; 1154:8-21.
- Smaili S, Hirata H, Ureshino R, Monteforte PT, Morales AP, Muler ML. Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. *A. A. B. Ciênc.* 2009; 81(3):467-475.
- Sobolevsky AI, Prodromou ML, Yelshansky MV, Wollmuth LP. Subunit-specific Contribution of Pore-forming Domains to NMDA Receptor Channel Structure and Gating. *J. Gral. Physiol.* 2007; 129(6):509-525.
- Soriano FX, Papadia S, Hofmann F, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE. Preconditioning Doses of NMDA Promote Neuroprotection by Enhancing Neuronal Excitability. *J. Neurosci.* 2006; 26(17):4509-4518.
- Spedding M, Neau I, Harsing L. Brain plasticity and pathology in psychiatric disease: sites of action for potential therapy. *Curr. Op. Pharmacol.* 2003; 3(1):33-40.
- Stanika RI, Pivovarova NB, Brantner CA, Watts CA, Winters CA, Andrews SB. Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Pnas* 2006; 106(24):9854-9859.
- Sun D, Murali SG. Stimulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in neuronal cells by excitatory neurotransmitter glutamate. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 275(3):C772-779.
- Syntichaki P, Tavernarakis N. the biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4:672-684.
- Takahashi JL, Giuliani F, Power C, Imai Y, Yong VW. Interleukin-1 promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann. Neurol.* 2003; 53(5):588-595.

Bibliografía

- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nat.* 1999; 63(9):6748.
- Tanovié A, Alfaro V. Neuroprotección con memantina (antagonista no competitivo del receptor NMDA-glutamato) frente a la excitotoxicidad asociada al glutamato en la enfermedad de Alzheimer y en la demencia vascular. *Rev. Neurol.* 2006; 42(607):616.
- Taverna FA, Wang LY, MacDonald JF, Hampson DR. A transmembrane model for an ionotropic glutamate receptor predicted on the basis of the location of asparagine-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(19):14159-14164.
- Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease. *Sci.* 2002; 296(5575):1991-1995.
- Tilley JW, Kramer MJ. Aminoadamantane derivatives. *Prog Med Chem.* 1981; 18:1-44.
- Tovar KR, Westbrook GL. The Incorporation of NMDA Receptors with a Distinct Subunit Composition at Nascent Hippocampal Synapses In Vitro. *J. Neurosci.* 1999; 19(10):4180-4188.
- Trettel F, Rigamonti D, Hilditch-Maguire P, Wheeler VC, Sharp AH, Persichetti F. Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdhQ111 striatal cells. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9(19):2799-2809.
- Vanhoutte P, Bading H. Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003; 13(3):366-371.
- Verdaguer E, García-Jordà E, Jiménez A, Stranges A, Sureda FX, Canudas AM. Kainic acid-induced neuronal cell death in cerebellar granule cells is not prevented by caspase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(5):1297-1307.
- Verkhratsky A, Kirchhoff F. Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J. Anat.* 2007; 210(6):651-660.

- Villmann C, Becker M. On the Hypes and falls in neuroprotection targeting the NMDA receptor. *Neuroscient.* 2007; 13(6):594.
- Vuillaume I, Schraen-Maschke S, Formstecher P, Sablonnière B. Real Time RT-PCR Shows Correlation between Retinoid-Induced Apoptosis and NGF-R mRNA Levels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001; 289(3):647-652.
- Walton HS, Dodd PR. Glutamate–glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem.Int.* 2007; 50(7-8):1052-1066.
- Wang Y, Qin Z. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apop. Agin. Brain* 2010.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport.* 1992; 3(12):1138-1140.
- Wenzel A, Benke D, Mohler H, Fritschy J-. N-methyl--aspartate receptors containing the NR2D subunit in the retina are selectively expressed in rod bipolar cells. *Neurosci.* 1997; 78(4):1105-1112.
- Witt A, Macdonald N, Kirkpatrick P. Memantine hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(2):109-110.
- Wollmuth LP, Sobolevsky AI. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci.* 2004; 27(6):321-328.
- Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacol.* 2008; 55(7):1081-1094.
- Youdim MB, Maruyama W, Naoi M. Neuropharmacological, neuroprotective and amyloid precursor processing properties of selective MAO-B inhibitor antiparkinsonian drug, rasagiline. *Drugs T. (Barc)* 2005; 41(6):369-391.
- Young AB. Four Decades of Neurodegenerative Disease Research: How Far We Have Come! *J. Neurosci* 2009; 41(29):12722-12728.

Bibliografía

Zheng X, Zhang L, Wang AP, Araneda RC, Lin Y, Zukin RS. Mutation of structural determinants lining the N-methyl--aspartate receptor channel differentially affects phencyclidine block and spermine potentiation and block. *Neurosci.* 1999; 93(1):125-134.

Zuchner T, Brundin P. Mutant huntingtin can paradoxically protect neurons from death. *Cell Death Differ.* 2008; 15:435-442.

ANEXOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

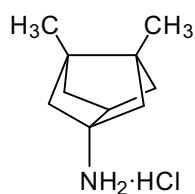
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA GLUTAMATÉRGICA Y NEUROPROTECTORA DE NUEVOS COMPUESTOS POLICÍCLICOS

Marta López Querol

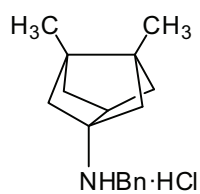
ANEXOS

I. Estructura de todos los compuestos usados en este trabajo.

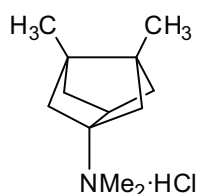
A. Aminas bisnoradamantánicas.



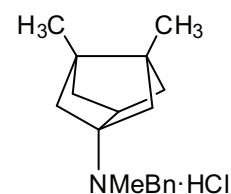
LD 9



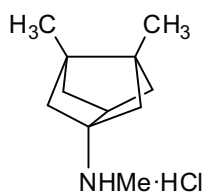
LD 10



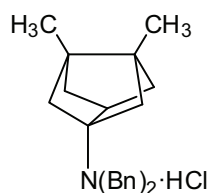
LD 11



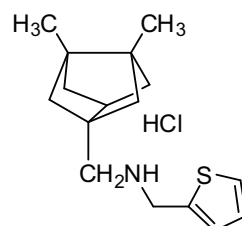
LD 12



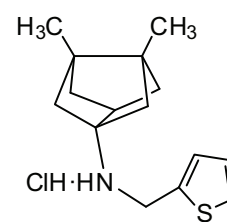
LD 15



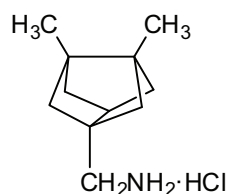
LD 13



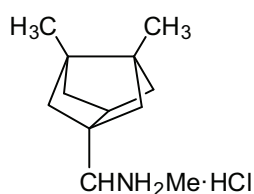
LD 83



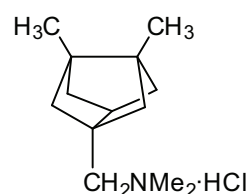
LD 84



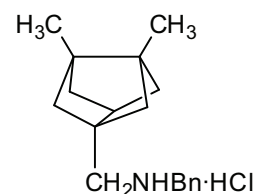
LD 14



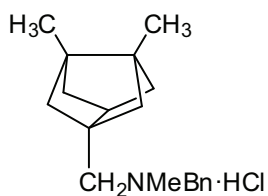
LD 1



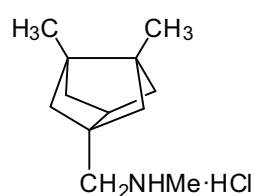
LD 27



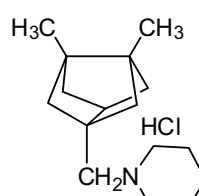
LD 30



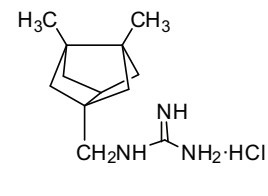
LD 31



LD 32



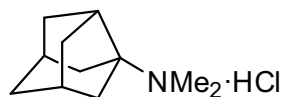
LD 33



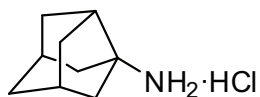
LD 34

\rightleftharpoons
guanidina

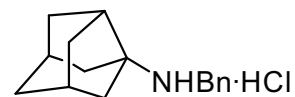
B. Aminas noradamantánicas.



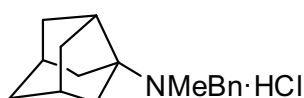
LD 24



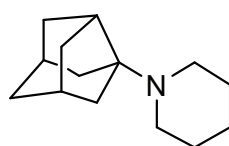
LD 25



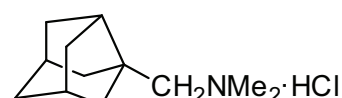
LD 35



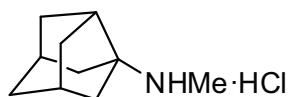
LD 36



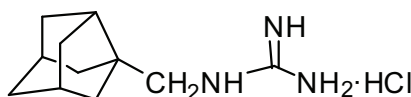
LD 37



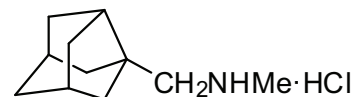
LD 40



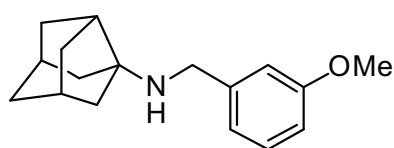
LD 51



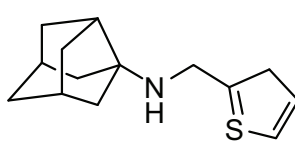
LD 44



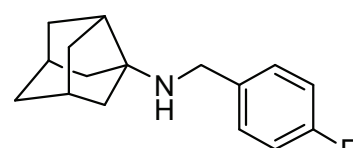
LD 50



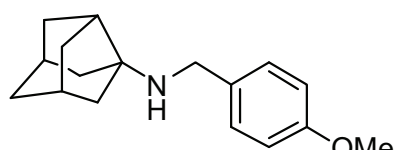
LD 43



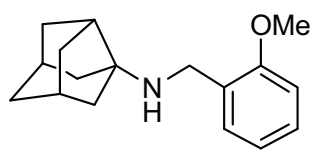
LD 45



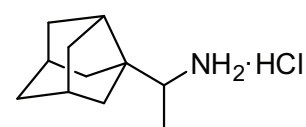
LD 46



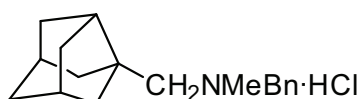
LD 41



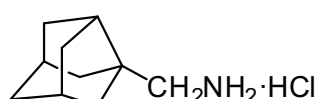
LD 42



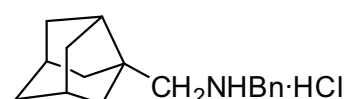
LD 94



LD 39

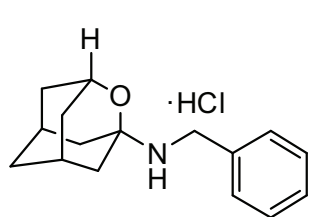


LD 29

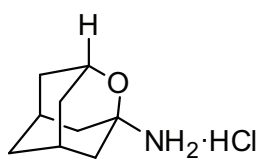


LD 38

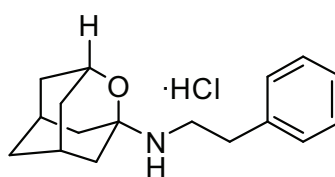
C. Aminas oxadamantánicas.



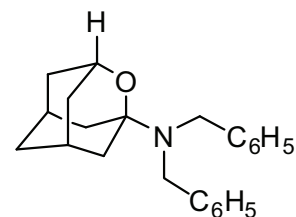
LD 3



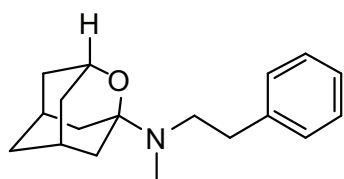
LD 4



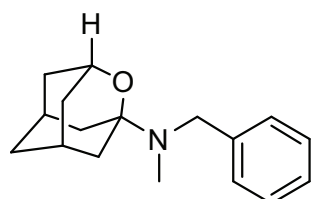
LD 5



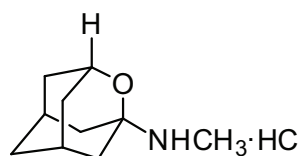
LD 6



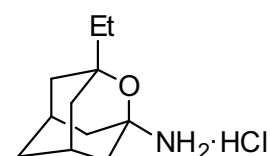
LD 16



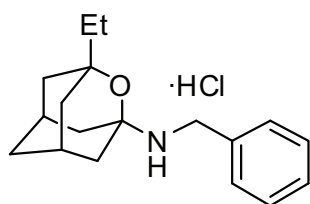
LD 17



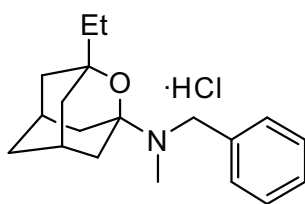
LD 18



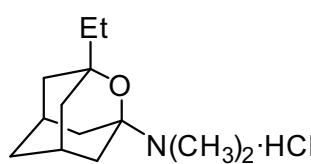
LD 52



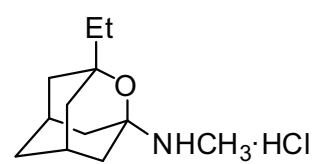
LD 53



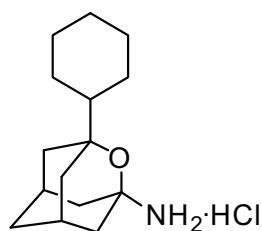
LD 54



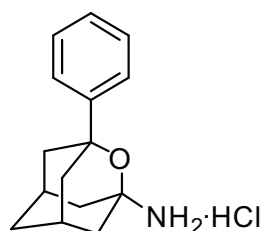
LD 55



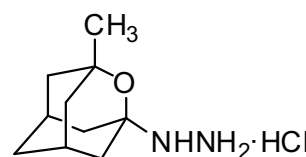
LD 56



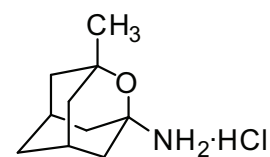
LD 57



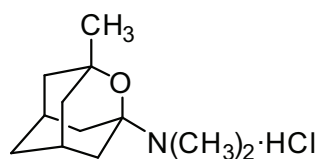
LD 58



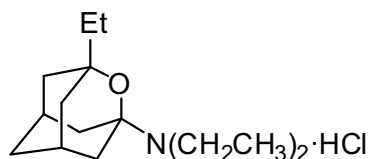
LD 59



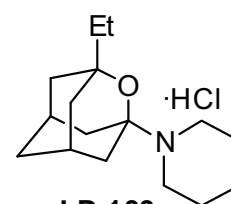
LD 60



LD 61

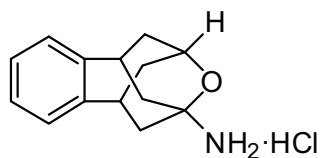


LD 68

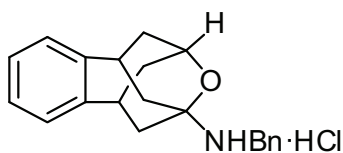


LD 133

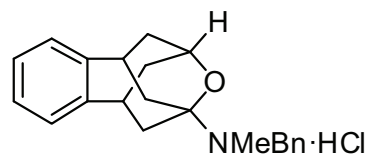
D. Aminas benzohomooxadamantanos.



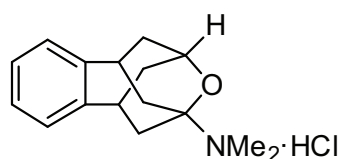
LD 7



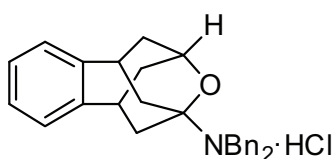
LD 8



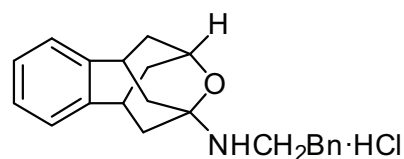
LD 19



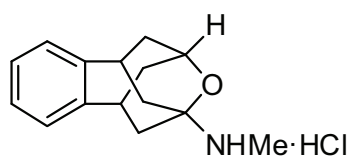
LD 20



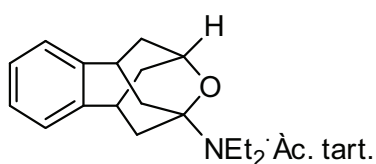
LD 21



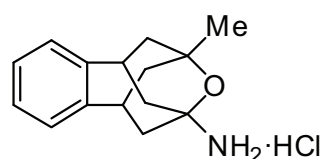
LD 22



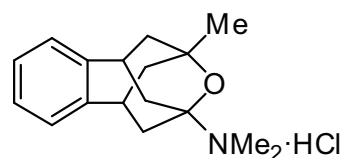
LD 23



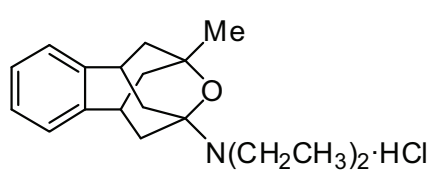
LD 67



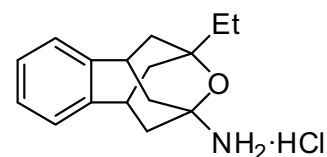
LD 78



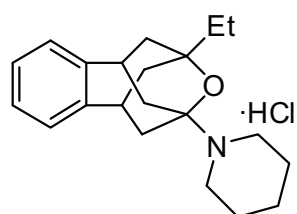
LD 79



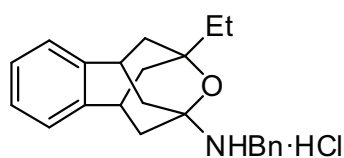
LD 80



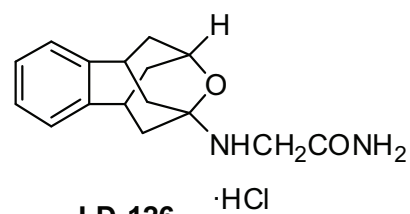
LD 97



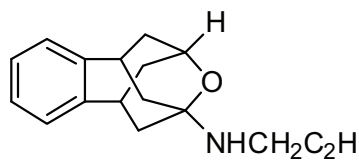
LD 98



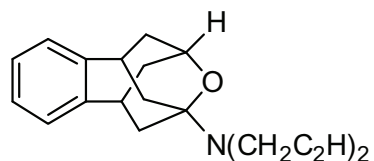
LD 117



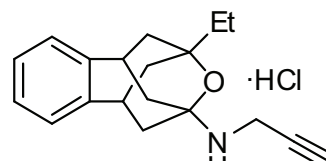
LD 126



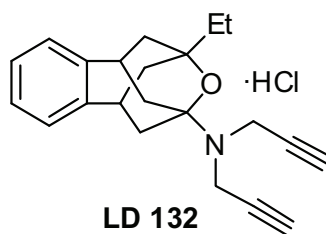
LD 127 ·HCl



LD 128 ·HCl

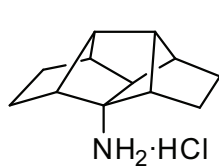


LD 131

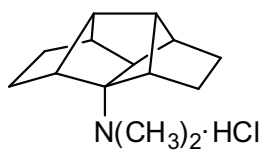


LD 132

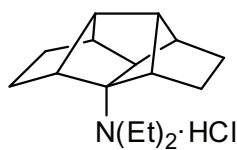
E. Aminas pentacíclicas.



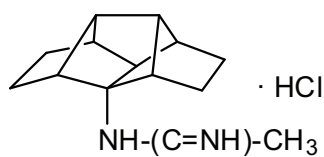
LD 47



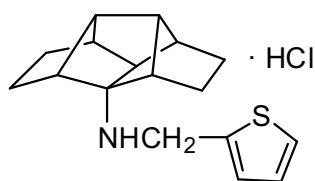
LD 90



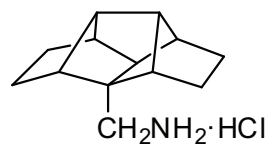
LD 88



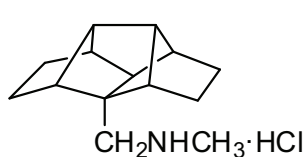
LD 89



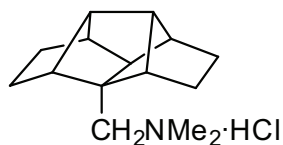
LD 87



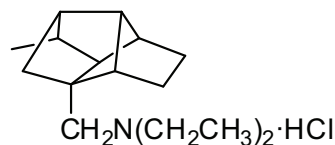
LD 49



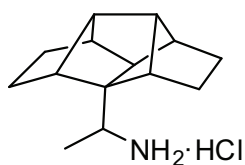
LD 74



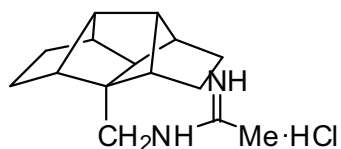
LD 70



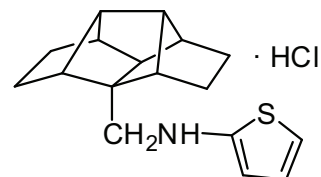
LD 71



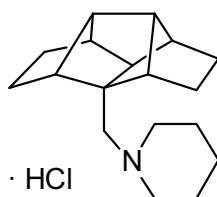
LD 125



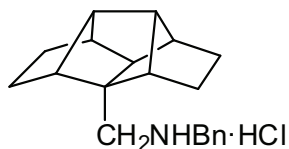
LD 75



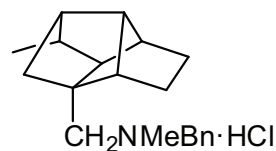
LD 86



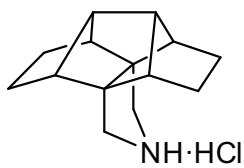
LD 73



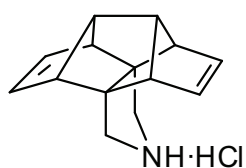
LD 118



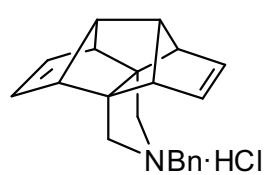
LD 119



LD 122

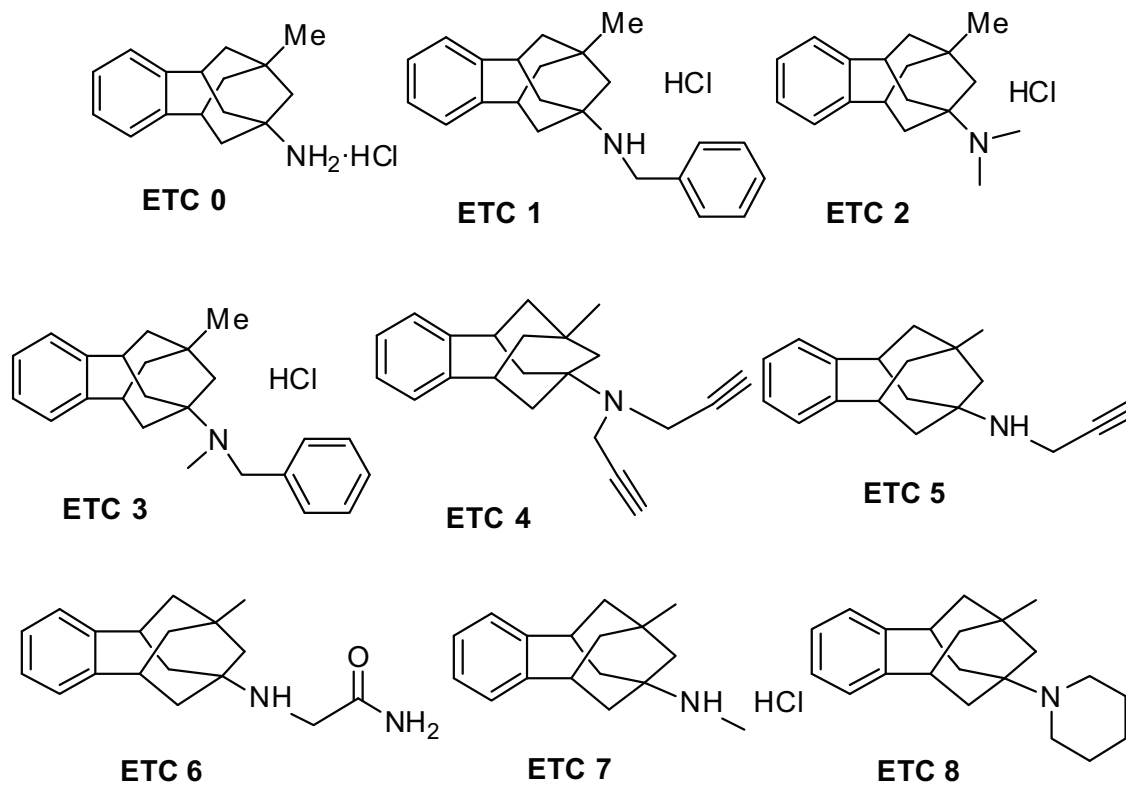


LD 93

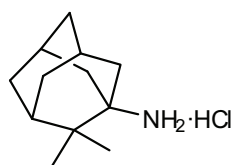


LD 121

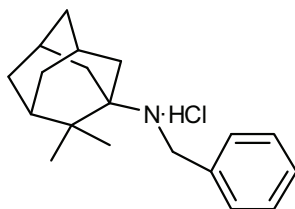
F. Aminas benzohomonoradamantánicas.



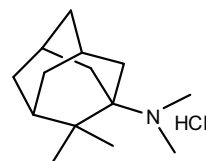
G. Aminas adamantánicas. Compuestos RFP.



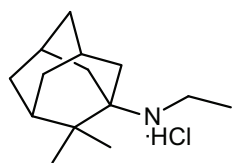
RFP2



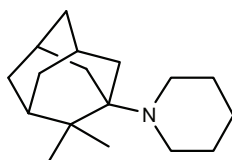
RFP3



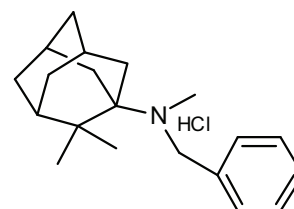
RFP4



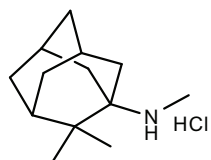
RFP5



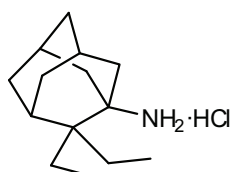
RFP6



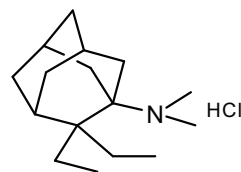
RFP7



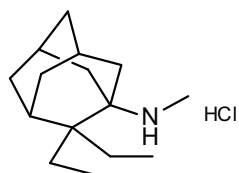
RFP8



RFP11

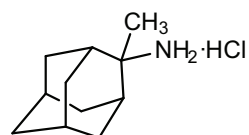


RFP12

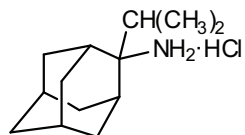


RFP13

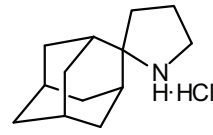
H. Aminas adamantánicas. Compuestos AK.



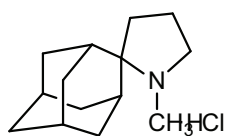
AK1



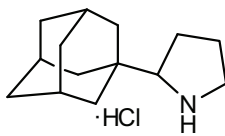
AK2



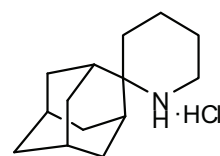
AK3



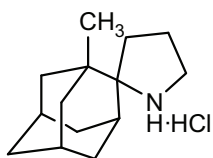
AK4



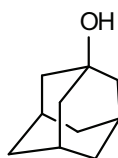
AK5



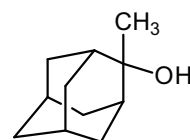
AK6



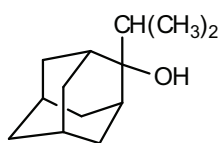
AK7



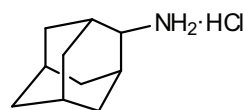
AK8



AK9

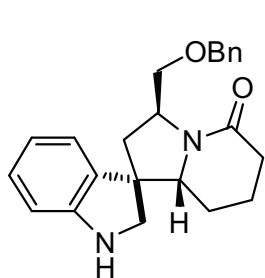


AK10

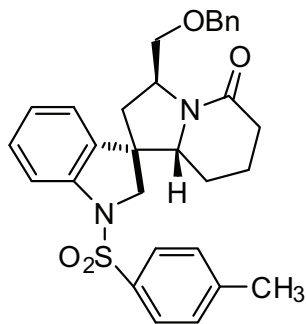


AK11

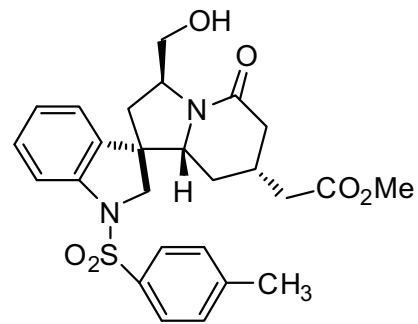
J. Compuestos derivados de rincofilina.



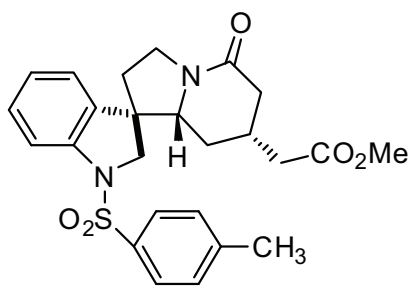
PF1



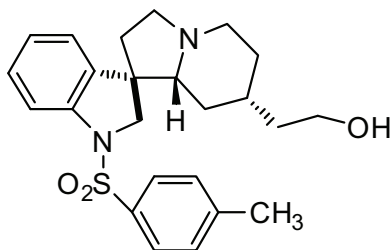
PF2



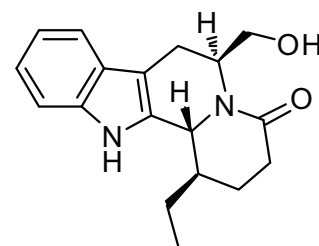
PF3



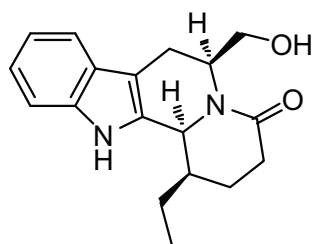
PF4



PF5



PF6



PF7

II. Descripción de los ítems de la Batería de Observación Funcional (FOB, del inglés) y sus valoraciones.

A. Observación del ratón en la jaula (1 minuto).

Durante la observación, mantenerse a uno o dos pasos de la jaula.

| CONDICIÓN | PUNTUACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|----------------------------------|------------|--|
| Posición Inicial | 1 | Normal, sentado o de pie |
| | 2 | Acurrucado, tumbado |
| | 3 | Ligero balanceo |
| | 4 | Balanceo exagerado |
| | 5 | Tumbado en exceso |
| | 6 | Tumbado de lado, patas hacia arriba |
| Excitación, estado de vigilancia | 1 | Muy baja (coma, estupor) |
| | 2 | Baja (inactivo con movimiento leve) |
| | 3 | Ligeramente baja (exploración con momentos de inactividad) |
| | 4 | Normal (alerta, movimientos de exploración) |
| | 5 | Ligeramente alta (tenso, excitado, temblores espontáneos) |
| | 6 | Muy alta (hiper-alerta, muy excitado, movimientos súbitos) |

B. Observación del ratón en la mano (30 segundos).

Destapar la jaula, coger el animal por la cola y ponerlo en la palma de la mano. Observar. En el caso de presentar piloerección, se tiene que pasar la mano por encima para aplanar el pelo, sólo si se mantiene la pilo-erección se puntúa como tal.

| CONDICIÓN | PUNTUACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|--------------------------------------|------------|------------------------------------|
| Respuesta inicial | 1 | Muy fácil, letárgico, no reacciona |
| | 2 | Fácil, normal |
| | 3 | Moderadamente difícil |
| | 4 | Bastante difícil |
| | 5 | Difícil |
| Reacción en mano | 1 | Baja, fácil de manipular |
| | 2 | Moderadamente baja |
| | 3 | Moderadamente alta |
| | 4 | Alta (trepa, intenta morder) |
| Salivación | 1 | Ausente |
| | 2 | Ligera |
| | 3 | Intensa |
| Lagrimo | 1 | Ausente |
| | 2 | Ligera |
| | 3 | Intensa |
| Pilo-erección | 0 | Ausente |
| | + | Presente |
| Sub/sobre- limpieza (grooming) | 0 | Ausente |
| | + | Presente |
| Parpadeo | 1 | Ojos abiertos |
| | 2 | Párpados ligeramente caídos |
| | 3 | Párpados medio cerrados |
| | 4 | Ojos cerrados |

C. Observación en campo abierto (2 minutos).

La observación durará 10 minutos y durante los dos primeros se anotarán los levantamientos, acalamientos y otros comportamientos indicativos de toxicidad.

| CONDICIÓN | PUNTUACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|------------------------------------|------------|---|
| Marcha | 1 | Caminar normal |
| | 2 | Ataxia, Balanceo excesivo |
| | 3 | Arrastrar las patas traseras |
| | 4 | Pisadas muy marcadas |
| | 5 | Incapaz de soportar su propio peso |
| | 6 | De puntillas |
| | 7 | Posición corporal encorvada |
| | 8 | Arrastrar el cuerpo por la superficie |
| Anormalidades en la marcha | 1 | Normal |
| | 2 | Ligeramente anormal |
| | 3 | Moderadamente anormal |
| | 4 | Severamente anormal |
| Movilidad | 1 | Normal |
| | 2 | Ligeramente alterada |
| | 3 | Bastante alterada |
| | 4 | Totalmente alterada |
| Excitación, estado de vigilancia | 1 | Muy poca; coma, estupor |
| | 2 | Poca; algún movimiento de cabeza o cuerpo |
| | 3 | Un poco baja; alguna exploración con momentos inmóviles |
| | 4 | Normal; alerta, movimientos de exploración |
| | 5 | Un poco alta; tenso, excitado |
| | 6 | Muy elevada; hiperalerta, movimientos súbitos |
| Movimientos Clónicos involuntarios | 1 | Normal |
| | 2 | Temblores suaves, escalofríos |
| | 3 | Movimientos repetitivos de boca y mandíbula |
| | 4 | Temblores moderados |
| | 5 | Temblores severos |
| | 6 | Sacudirse |
| | 7 | Sacudirse clónicamente, |

| | | |
|-----------------------|---|---|
| | | espasmódicamente |
| | 8 | Convulsiones espasmódicas |
| Movimientos | 1 | Normal |
| Tónicos involuntarios | 2 | Contracción de los extensores; extremidades posteriores rígidas y estiradas |
| | 3 | "Opistótonos"; arqueo de la espalda con la cabeza hacia atrás |
| | 4 | "Emprostótonos"; arqueo del cuerpo hacia abajo |
| | 5 | Saltos explosivos |
| | 6 | Convulsiones severas clónicas/tónicas que resultan en muerte |
| Posición cola | 1 | Arrastrada por la superficie |
| | 2 | Rígida, sobre la superficie |
| | 3 | Rígida, en el aire |
| Vocalizaciones | 0 | Ausencia |
| | + | Presencia, vocalizaciones espontaneas |
| Defecaciones | 0 | Ausencia |
| | + | Presencia, contarlas |
| Orinas | 0 | Ausencia |
| | + | Presencia, contarlas |

D. Observación de la respuesta a las manipulaciones.

Para esta última parte se necesitará un objeto alargado, un click auditivo y una red para escalar.

| CONDICIÓN | PUNTUACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|------------------------------------|------------|--|
| Respuesta Acercamiento | 1 | No reacciona |
| | 2 | Acercamiento lento, se gira |
| | 3 | Se queda "congelado" |
| | 4 | Respuesta más activa que 2 o 3 |
| | 5 | Respuesta exagerada; saltos, ataques, mordidas |
| Respuesta Contacto | 1 | No reacciona |
| | 2 | Acercamiento lento, se gira |
| | 3 | Se queda "congelado" |
| | 4 | Respuesta más activa que 2 o 3 |
| | 5 | Respuesta exagerada; saltos, ataques, mordidas |
| Respuesta Estímulo Auditivo | 1 | No reacciona |
| | 2 | Acercamiento lento, se gira |
| | 3 | Se queda "congelado" |
| | 4 | Respuesta más activa que 2 o 3 |
| | 5 | Respuesta exagerada; saltos, ataques, mordidas |
| Capacidad Escalada Invertida | 1 | Cae o se mantiene en la base |
| | 2 | Se gira hacia la base, no sube |
| | 3 | Sube hasta arriba |
| Media Vuelta | 1 | Normal; se gira rápidamente |
| | 2 | Se gira, pero más lentamente |
| | 3 | Muy lentamente |

III. Modelo para la toma de datos en los experimentos *In Vivo*.

Batería de observación funcional (del inglés, FOB)

| | |
|------|--|
| OBS. | |
| DIA | |
| SEXO | |
| ANI. | |
| FAR. | |
| DOSI | |

EN JAULA (1 minuto)

| | 30' | 1h | 2h |
|---------------------|-----|----|----|
| Postura inicial 1-6 | | | |
| Excitación 1-6 | | | |
| "Groomings" | | | |
| Comidas/Bebidas | | | |
| Levantamientos | | | |
| "Climbing" | | | |
| Estereotipias | | | |

EN MANO (30 segundos)

| | 30' | 1h | 2h |
|---------------------|-----|----|----|
| Respuesta inicial | | | |
| Reacción en mano | | | |
| Salivación | | | |
| Lacrimación | | | |
| Piloerección | | | |
| "Fur/over grooming" | | | |
| Ojos cerrados | | | |

COMENTARIOS/OBSERVACIONES

OBSERVACIÓN A CAMPO ABIERTO (2 minutos)

| | 30' | 1h | 2h |
|----------------------|-----|----|----|
| Caminar | | | |
| Caminar Anormal | | | |
| Movilidad | | | |
| Excitación | | | |
| Movimientos Tónicos | | | |
| Movimientos Clónicos | | | |
| Levantamientos | | | |
| "Groomings" | | | |
| Vocalizaciones | | | |
| Micciones | | | |
| Defecaciones | | | |
| Posición de cola | | | |
| Estereotipias | | | |

MANIPULACIÓN

| | 30' | 1h | 2h |
|------------------------|-----|----|----|
| Respuesta acercamiento | | | |
| Respuesta contacto | | | |
| Respuesta auditiva | | | |
| Escalada | | | |
| Velocidad de giro | | | |
| Peso | | | |

IV. Artículos derivados de esta Tesis.

Artículo 1

Bioorganic & Medicinal Chemistry 16 (2008) 9925–9936



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



Synthesis and pharmacological evaluation of several ring-contracted amantadine analogs

Pelayo Camps^a, María D. Duque^a, Santiago Vázquez^{a,*}, Lieve Naesens^b, Erik De Clercq^b, Francesc X. Sureda^c, Marta López-Querol^c, Antoni Camins^d, Mercè Pallàs^d, S. Radhika Prathalingam^e, John M. Kelly^e, Vanessa Romero^f, Dolores Ivorra^f, Diego Cortés^f

^aLaboratori de Química Farmacèutica (Unitat Associada al CSIC), Facultat de Farmàcia, and Institute of Biomedicine (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643, Barcelona E-08028, Spain

^bRega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

^cUnitat de Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, c./St. Llorenç 21, Reus E-43201, Spain

^dUnitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institute of Biomedicine (IBUB) and CIBERNED, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643, Barcelona E-08028, Spain

^eLondon School of Hygiene and Tropical Medicine, Department of Infectious and Tropical Diseases, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK

^fDepartamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2008

Revised 6 October 2008

Accepted 12 October 2008

Available online 17 October 2008

Keywords:

Amantadine

NMDA receptor antagonist

Influenza

Memantine

Polycyclic cage compounds

Trypanosomiasis

ABSTRACT

The synthesis of several [3-noradamantyl]amines, [(3-noradamantyl)methyl]amines, (3,7-dimethyl-1-bisnoradamantyl)amines, and [(3,7-dimethyl-1-bisnoradamantyl)methyl]amines is reported. They were evaluated against a wide range of viruses and one of them inhibited the cytopathicity of influenza A virus at a concentration similar to that of amantadine. Several of the new polycyclic amines show an interesting activity as NMDA receptor antagonists. A rimantadine analogue displayed significant trypanocidal activity. Moreover, to further characterize the pharmacology of these compounds, their effects on dopamine uptake were also assessed.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

1-Adamantylamine (amantadine) and (α -methyl-1-adamantyl)methylamine (rimantadine) have prophylactic and therapeutic activity in influenza A virus infections.¹ Related adamantane derivatives also show antiviral activity.² Adamantane derivatives are inexpensive, but resistance against the drugs develops readily and treatment is frequently complicated by central nervous system (CNS) side-effects. In fact, amantadine and its 3,5-dimethyl analogue memantine are NMDA receptor antagonists and are approved for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's disease, respectively.³ Thus, the design of new amantadine-related anti-influenza agents without CNS side-effects is a highly desirable goal. Amantadine, rimantadine, memantine, and related polycyclic amines also possess trypanocidal activity (Fig. 1).⁴

Biological activity has also been found in other polycyclic cage amines. For example, compounds **1–4** have anti-influenza activ-

ity.⁵ **5** is a MAO-B inhibitor,⁶ and **6** is a NMDA receptor antagonist (Fig. 2).⁷

For more than 20 years two of us (P.C. and S.V.) have worked on a project aimed at exploring the structure and the reactivity of noradamantane⁸ and bisnoradamantane derivatives.⁹ Up to now, our work on this topic has been done from a purely synthetic point of view. For example, we have developed several general entries to these skeletons. However, systematic studies directed towards the synthesis of biologically active noradamantane and bisnoradamantane derivatives have not yet been carried out (Fig. 3).¹⁰

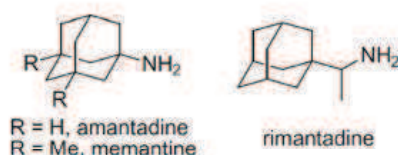


Figure 1. Amantadine, memantine, and rimantadine.

* Corresponding author. Tel.: +34 934024533; fax: +34 934035941.
E-mail address: svazquez@ub.edu (S. Vázquez).

9926

P. Camps et al. / Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 9925–9936

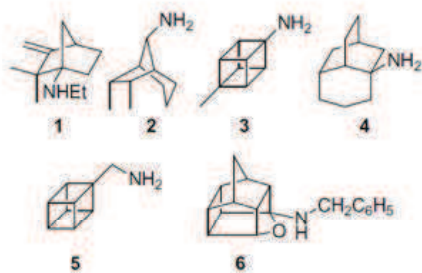


Figure 2. Polycyclic cage amines with biological activity.



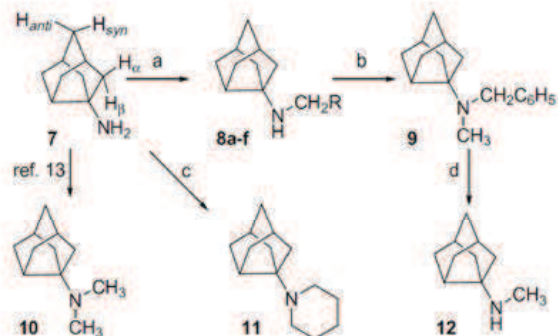
Figure 3. Noradamantane and bisnoradamantane.

It is well known in medicinal chemistry that when drugs contain cyclic systems, it is generally worth synthesizing analogues where the ring is opened, expanded or contracted by one unit, because these analogues show similar activity to the parent compound.¹¹ Tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-ylamine [(3-noradamantyl)amine] and tricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-ylamine [(1-bisnoradamantyl)amine] may be viewed as ring contracted analogs of amantadine, featuring a skeleton with one and two carbon less than the model, respectively. For this reason, in this paper, we describe the preparation of a series of (3-noradamantyl)amines, (1-bisnoradamantyl)amines and related compounds as well as the results of their antiviral, trypanocidal, NMDA receptor antagonist, and dopamine reuptake inhibitory activities.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Starting from the known amine **7**,^{10,12} we have prepared noradamantane amines **8–12** using classical methods in amine chemistry. Thus, reductive alkylation of **7** with several aromatic aldehydes afforded secondary amines **8a–f** in moderate to high yields. Dimethylated derivative **10** was prepared as previously described in the literature.¹³ Monomethyl derivative **12** was synthesized from **8a** by reductive alkylation followed by catalytic debenylation in good overall yield. Finally, piperidine derivative **11** was prepared by



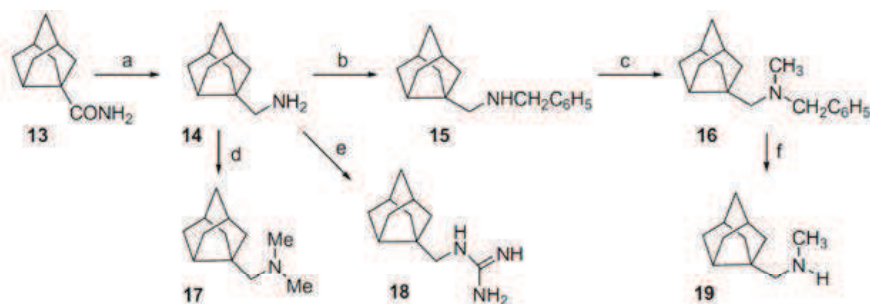
Scheme 1. Reagents and conditions: (a) aldehyde, NaBH₃CN, acetic acid, methanol, 18 h; 92% for **8a**, R = phenyl; 79% for **8b**, R = 4-methoxyphenyl; 44% for **8c**, R = 2-methoxyphenyl; 78% for **8d**, R = 3-methoxyphenyl; 77% for **8e**, R = 4-fluorophenyl; 63% for **8f**, R = 2-thienyl; (b) formaldehyde, NaBH₃CN, acetic acid, acetonitrile, 4 h; 91%; (c) anhyd Et₃N, 1,5-dibromopentane, DMF, 60 °C, 26 h, 48%; (d) H₂ (1 atm), Pd/C, ethanol, 89%.

alkylation of primary amine **7** with 1,5-dibromopentane in 51% yield (Scheme 1).

Starting from the known amide **13**,¹⁴ a series of 3-(noradamantyl)methylamines were synthesized. Thus, reduction of amide **13** with LiAlH₄ followed by acidic work-up led to the hydrochloride of amine **14** in 90% yield. Reductive alkylation of **14** with benzaldehyde and NaCNBH₃ in methanol gave **15** in 77% yield. Reductive methylation of **15** followed by catalytic hydrogenation led to **19** in high yield. Reductive methylation of **14** with formic acid and formaldehyde furnished dimethyl derivative **17** in 68% yield. Finally, reaction of **14** with 1*H*-pyrazol-1-carboxamide led to guanidine **18** in 84% yield (Scheme 2).

On the other hand, starting from the known acid **20**,^{9b} we have prepared amines **21–23**, **25–28**, and **30–36** using classical methods in amine chemistry. Although the synthesis of amine **21** from acid **20** was very low yielding using the classical Schmidt's or Curtius' reactions (14% and 24% yield, respectively), application of the Yamada's modification of the Curtius reaction allowed us to obtain and fully characterize the hydrochloride of amine **21** in 73% yield.

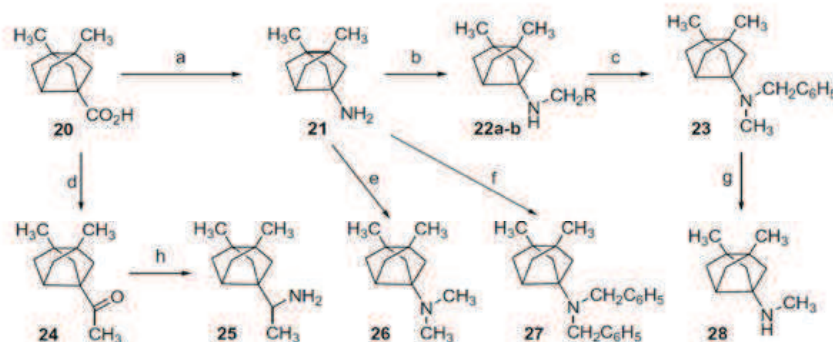
From this amine, reductive alkylation with benzaldehyde led to **22a** in 60% yield. Similarly, reductive alkylation with 2-thiophene-carbaldehyde led to **22b** in 69% yield. Reductive methylation of **22a** followed by catalytic debenylation furnished secondary amine **28** in high yield. Dimethylated derivative **26** was obtained in 83% yield by treating amine **21** with excess of formic acid and formaldehyde. Finally, dibenzylated compound **27** was prepared by double alkylation of **21** with benzyl chloride in 73% yield (Scheme 3).



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) LiAlH₄, THF, reflux, 15 h, 90%; (b) benzaldehyde, NaBH₃CN, acetic acid, methanol, 18 h; 77%; (c) formaldehyde, NaBH₃CN, acetic acid, acetonitrile, 4 h; 96%; (d) formaldehyde, formic acid, diethyl ether, 80 °C, 10 h, 68%; (e) anhyd Et₃N, 1*H*-pyrazol-1-carboxamide hydrochloride, acetonitrile, reflux, 6 h, 70%; (f) H₂ (1 atm), Pd/C, ethanol, 78%.

P. Camps et al. / *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 9925–9936

9927



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) Diphenylphosphorylazide, Et₃N, toluene, reflux, 3 h; then 6 N HCl, reflux, 24 h, 73%; (b) aldehyde; NaBH₃CN, AcOH, MeOH, 18 h; 60% for **22a**, R = phenyl; 69% for **22b**, R = 2-thienyl; (c) 37% aqueous formaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, CH₂CN, 4 h, 88%; (d) MeI, anhyd Et₂O, 0 °C to reflux, 16 h, 19%; (e) 37% aqueous formaldehyde, formic acid, Et₂O, 80 °C, 10 h, 83%; (f) benzyl chloride, NaI, K₂CO₃, CH₂CN, reflux, 24 h, 41%; (g) H₂, Pd/C, EtOH, 89%; (h) NH₂OH, NaOH, EtOH; then, LiAlH₄, Et₂O, reflux, 16 h, 43%.

Moreover, reaction of **20** with methylolithium gave ketone **24** in low yield. Reaction of **24** with hydroxylamine followed by reduction of the obtained oxime with LiAlH₄ gave amine **25**, a compound that can be viewed as a ring contracted analog of the antiviral rimantadine (Scheme 3).

Finally, reduction of the amide **29**, easily available from acid **20**, with LiAlH₄ followed by acidic work-up gave the hydrochloride of amine **30** in 70% overall yield. Following a similar sequence of the previously used with amine **21**, amines **31**, **32**, **33**, and **36** were obtained in high yields. Piperidine derivative **34** was obtained by alkylation of amine **30** with 1,5-dibromopentane in 53% yield. Finally, reaction of **30** with 1*H*-pyrazol-1-carboxamide led to guanidine **35** in 90% yield (Scheme 4).

The structure of all new compounds was confirmed by elemental analysis or accurate mass measurement, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, and mass spectral data.

2.2. Trypanocidal activity

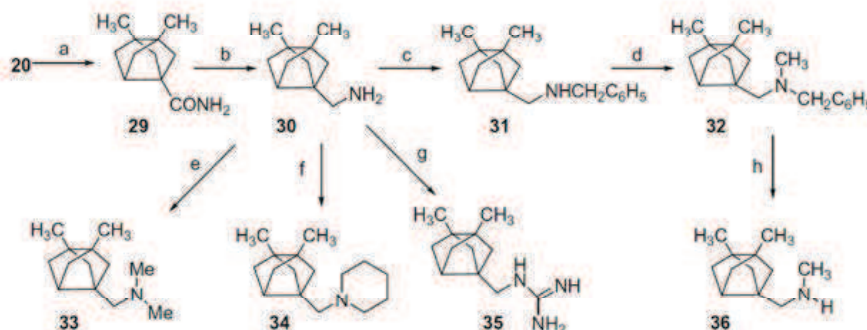
The tsetse fly-transmitted protozoan parasite *Trypanosoma brucei* is the causative agent of Human African Trypanosomiasis (HAT). After a major upsurge of the disease in the late 1990s throughout many parts of sub-Saharan Africa, annual infections have now fallen to 70,000 as a result of major surveillance and treatment programmes.¹⁵ However, over 60 million people remain at risk, and in some areas death rates exceed those from HIV/AIDS and malaria. The drugs currently available to treat HAT require administration under medical supervision and are characterized by limited effi-

cacy, toxicity, and resistance. For example, the arsenical drug melarsoprol, which is used to treat late stage disease, can result in a reactive encephalopathy which kills up to 10% of patients. In the absence of treatment, HAT is invariably fatal and new drugs are therefore urgently required. Recently, it was reported that the anti-influenza virus drug rimantadine was active in vitro against bloodstream form *T. brucei*, and that other aminoadamantane derivatives had enhanced activity.^{4,16} To extend these observations, we have tested several new bisnoradamantanes and related compounds for activity against bloodstream form *T. brucei*.

The noradamantylamines and [(3-noradamantyl)methyl]amines described in this paper and the binoradamantyl derivatives **21**, **22a**, **23**, **27**, **28**, **32**, **34**, and **36** were found to have no significant activity against cultured bloodstream form *T. brucei* at concentrations up to 5 μg mL⁻¹. Compounds **26**, **30**, and **31** showed transient effect on growth at 5 μg mL⁻¹, but cells grew to normal density. Rimantadine analog **25** was the most active of the compounds tested and we established its IC₅₀ (6.02 ± 0.36 μM) and IC₉₀ (9.48 ± 2.64 μM) values. Amine **25** was found to be slightly more active than rimantadine (IC₅₀ = 7.04 ± 0.12 μM; IC₉₀ = 13.97 ± 1.68 μM) and at least 20 times more active than amantadine (IC₅₀ > 130 μM).

2.3. NMDA receptor antagonist activity

NMDA receptor antagonists are highly interesting compounds since these receptors have been involved in several neurodegenerative disorders. In fact, memantine is widely used in therapeutics to slow down the progression of Alzheimer's disease.¹⁷



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) SOCl₂, reflux, 2 h; then NH₂OH, CHCl₃, rt, 15 h, 84%; (b) LiAlH₄, THF, reflux, 15 h, 83%; (c) benzaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, MeOH, rt, 18 h, 68%; (d) 37% aqueous formaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, CH₂CN, reflux, 4 h, 70%; (e) 37% aqueous formaldehyde, formic acid, Et₂O, 80 °C, 10 h, 61%; (f) Et₃N, 1,5-dibromopentane, DMF, 60 °C, 26 h, 53%; (g) Et₃N, 1*H*-pyrazol-1-carboxamide, CH₂CN, reflux, 6 h, 90%; (h) H₂, Pd/C, EtOH, 38 atm, 85%.

9928

P. Camps et al./Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 9925–9936

The activity of the different new polycyclic compounds was assayed on cerebellar granule neurons loaded with the calcium-sensitive probe Fura-2.¹⁸ Addition of glutamate or NMDA (100 μM) in the presence of glycine (10 μM) produced a robust and stable increase in intracellular calcium that was challenged with cumulative additions of the compounds to be tested. Although all the noradamantyl derivatives and several of the bisnoradamantyl compounds were able to inhibit calcium entry through NMDA receptors, none of the compounds was more potent than memantine against glutamate- or NMDA-induced calcium increase in cerebellar granule neurons (Table 1).

In general, the bisnoradamantane derivatives are more potent as NMDA receptor antagonists than the noradamantane amines. For example, amine **21** is 4 times more potent as NMDA receptor antagonist than 3-noradamantylamine, **7**, and the guanidine derivative **35** is 3.5 times more potent than its corresponding noradamantyl analog, **18**.

Bisnoradamantylamines were usually more active than their corresponding (bisnoradamantyl)methylamine analogs as exemplified by the pairs **21/30**, **26/33**, and **28/36**, and alkyl substitution causes a reduction in the potency (e.g., series **21/28/26** or **30/36/33**). The guanidine derivative **35** was the more potent compound, being 10 times more potent than amantadine and 5 times less potent than memantine. Attempts to synthesize a guanidine derivative from **21** were not successful.

2.4. Antiviral activity

None of the synthesized compounds was found to have antiviral activity against the enveloped DNA viruses herpes simplex virus (type 1 or type 2) or vaccinia virus; the enveloped RNA viruses fe-

Table 1
 IC₅₀ (μM) values for selected polycyclic amines as NMDA antagonists.^{a,b}

| Compound | Glutamate (100 μM) | NMDA (100 μM) |
|------------|--------------------|-----------------------|
| 7 | >500 | 92 ± 19 |
| 8c | >500 | 92 ± 30 |
| 8d | >500 | 87 ± 46 |
| 8f | 384 ± 130 | 17 ± 4 |
| 9 | >500 | 36 ± 2 |
| 10 | >500 | 173 ± 4 |
| 11 | >500 | 45 ± 4 |
| 12 | 205 ± 25 | 65 ± 15 |
| 15 | >500 | 138 ± 16 |
| 16 | >500 | 178 ± 25 |
| 18 | 453 ± 113 | 25 ± 8 |
| 19 | >500 | 71 ± 6 |
| 21 | 274 ± 68 | 23 ± 2.2 |
| 22a | 143 ± 62 | 70 ± 9.3 ^c |
| 22b | 204 ± 13 | 80 ± 15 |
| 25 | 94 ± 29 | 37 ± 10 |
| 26 | 185 ± 69 | 153 ± 18 |
| 28 | NE ^d | 35 ± 3 |
| 30 | >500 | 128 ± 39 |
| 31 | NA ^e | 47 ± 15 ^c |
| 32 | NA | 160 ± 24 ^c |
| 35 | 104 ± 31 | 7.1 ± 0.4 |
| Amantadine | 358 ± 130 | 92 ± 29 |
| Memantine | 55 ± 12 | 1.5 ± 0.1 |

^a Functional data were obtained from primary cultures of cerebellar granule neurons using the method described in Section 4 by measuring the intracellular calcium concentration. Cells were challenged with glutamate (2nd column) or NMDA (3rd column) as indicated. Data shown are means ± SEM of at least three separate experiments carried out on three different batches of cultured cells.

^b Compounds **8a**, **8b**, **8e**, **14**, **17**, **23**, **33**, **34**, and **36** were found to have low potency as NMDA receptor antagonists (IC₅₀ > 200 mM), while compound **27** was found not active at the highest concentration tested.

^c Only 60% maximal inhibition due to insolubility in the assay buffer.

^d NE, not evaluated.

^e NA, not active at the highest concentration tested.

Table 2
 Antiviral activity against influenza virus in MDCK cells.

| Compound | Antiviral EC ₅₀ ^a in μM | | | Cytotoxicity (MCC ^b in MDCK) |
|-------------|---|-------------|-----------------|---|
| | A/H1N1 | A/H3N2 | B | |
| 7 | 196 ± 109 | 26.5 ± 22.5 | NA ^c | >575 |
| 14 | 36 ± 11 | 52 ± 16 | NA | >530 |
| Amantadine | 77 ± 21 | 2.7 ± 1.1 | NA | >100 |
| Rimantadine | 29 ± 18 | 0.85 ± 1.1 | NA | >100 |

^a EC₅₀: compound concentration producing 50% antiviral effect, as determined by microscopic scoring of the virus-induced cytopathic effect.

^b MCC, minimum cytotoxic concentration, or compound concentration causing minimal changes in cell morphology.

^c NA, not active at subtoxic concentrations, or at the highest concentration tested.

line coronavirus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus, vesicular stomatitis virus, sindbis virus, or Punta Toro virus; or the non-enveloped RNA viruses Coxsackievirus B4 and Reovirus-1. In the influenza virus assays, only compounds **7** and **14**, two primary amines, displayed reasonable activity against the influenza A/H1N1 and A/H3N2 subtypes, secondary and tertiary amines were not active (Table 2). The antiviral data obtained by microscopy were confirmed by a colorimetric cell viability assay (data not shown). The highest selectivity was noted with compound **7** tested against the A/H3N2 subtype. As anticipated, all compounds proved to be inactive against influenza B virus, which is known to be insensitive to amantadine and rimantadine.

2.5. Dopamine

It is known that amantadine increases extracellular dopamine levels by antagonism of the NMDA receptor,¹⁹ although the exact mechanism has not been fully elucidated. As several of our new amines showed NMDA receptor antagonist activity with IC₅₀ similar or even lower than amantadine, we have determined their effect on [³H]dopamine uptake in rat striatal synaptosomes (Table 3). At the concentration tested (100 μM), several of the compounds were able to inhibit [³H]dopamine uptake in some manner, show-

Table 3
 Effect of compounds on dopamine uptake (at 100 μM).

| Compound | [³ H]Dopamine uptake, % control ± SEM (n = 3) |
|------------|---|
| 7 | 84.9 ± 1.6 |
| 8a | 31.7 ± 6.1 |
| 8b | 63.9 ± 4.2 |
| 8c | 58.3 ± 2.9 |
| 8d | 45.8 ± 0.5 |
| 8e | 81.1 ± 8.5 |
| 8f | 47.7 ± 4.2 |
| 9 | 47.2 ± 3.4 |
| 10 | 71.3 ± 2.6 |
| 11 | 68.5 ± 2.3 |
| 12 | 65.2 ± 4.8 |
| 14 | 50.1 ± 3.5 |
| 15 | 57.9 ± 4.6 |
| 16 | 45.0 ± 2.5 |
| 17 | 62.5 ± 1.2 |
| 18 | 118.7 ± 7.3 |
| 19 | 76.3 ± 3.1 |
| 21 | 54.8 ± 14.3 |
| 25 | 72.2 ± 10.9 |
| 26 | 75.2 ± 6.9 |
| 27 | 74.3 ± 5.3 |
| 28 | 74.6 ± 6.6 |
| 30 | 39.1 ± 2.1 |
| 34 | 39.8 ± 7.4 |
| 36 | 57.3 ± 6.7 |
| Amantadine | 47.4 ± 2.0 |
| Memantine | 53.7 ± 2.6 |

ing similar values of inhibition than amantadine or memantine. However, it seems that no correlation exists with their potency as antagonists at the NMDA receptor. Probably, other mechanisms are being involved in the regulation of dopamine release, like different activities at D_2 receptors or through inhibition at the dopamine transporter.

3. Conclusions

In summary, we have synthesized and fully characterized several (3-noradamantyl)amines, (3-noradamantyl)methylamines, (3-bisnoradamantyl)amines, and (3-bisnoradamantyl)methylamines. Although these compounds were less potent than memantine against NMDA-induced calcium increase in cerebellar granule neurons, several compounds were more potent than amantadine, the bisnoradamantane amines being more potent than the corresponding noradamantane amines. Interestingly, none of those compounds showed antiviral activity, while compound **14**, that displayed reasonable activity against the influenza A/H1N1 and A/H3N2 subtypes, showed no NMDA receptor antagonist activity. Moreover, none of the compounds were significantly more potent, at the tested concentration, than amantadine or memantine as inhibitors of the dopamine uptake.

Amantadine displays both anti-influenza activity and NMDA receptor antagonism. As selectivity is usually highly desirable in drugs, the amines herein reported open the way for the design of new aminopolycyclic compounds with selective anti-influenza or NMDA receptor antagonist activity.

Interestingly, amine **25**, that is 2.5 times more potent than amantadine as NMDA receptor antagonist, also displayed trypanocidal activity, being slightly more active than rimantadine and at least 21 times more active than amantadine.

Guanidine **35** is a polycyclic cage compound with selective NMDA receptor antagonist activity ($IC_{50} = 7.1 \mu\text{M}$) without antiviral and trypanocidal activities.

The synthesis and pharmacological evaluation of more polycyclic cage amines is in progress to reach more potent and selective derivatives.

4. Experimental

4.1. Chemistry

4.1.1. General

Melting points were determined in open capillary tubes. Unless otherwise stated, NMR spectra were recorded in CD_3OD in the following spectrometers: ^1H NMR (500 MHz), ^{13}C NMR (100.6 MHz). Chemical shifts (δ) are reported in ppm related to internal tetramethylsilane (TMS). Assignments given for the NMR spectra are based on DEPT, COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$, and HETCOR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC and HMBC sequences for one bond and long range $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ heterocorrelations, respectively) and NOESY experiments for selected compounds. For the MS and GC/MS analyses the sample was introduced directly or through a gas chromatograph. For GC/MS analyses a 30-m column [5% diphenyl–95% dimethylpolysiloxane, conditions: 10 psi, initial temperature: 35 °C (2 min), then heating at a range of 8 °C/min till 300 °C, then isothermic at 300 °C] was used. The electron impact (70 eV) or chemical ionization (CH_4) techniques were used. Only significant ions are given: those with higher relative ratio. Except for the ions with higher m/z values. Accurate mass measurements were obtained using ESI technic. Absorption values in the IR spectra (KBr) are given as wave-numbers (cm^{-1}). Column chromatography was performed on silica gel 60 Å (35–70 mesh). For the thin-layer chromatography (TLC) aluminum-backed sheets

with silica gel 60 F_{254} were used and spots were visualized with UV light and/or 1% aqueous solutions of KMnO_4 .

4.1.2. *N*-(4-Methoxybenzyl)(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)amine hydrochloride (**8a**·HCl)

To a solution of **7**·HCl (600 mg, 3.46 mmol) in MeOH (10 mL), NaBH_3CN (95%, 445 mg, 6.72 mmol), AcOH (0.3 mL), and benzaldehyde (0.5 mL, 4.92 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. An additional portion of NaBH_3CN (95%, 220 mg, 3.33 mmol) and benzaldehyde (0.25 mL, 2.46 mmol) were added, the mixture was stirred at room temperature overnight and concentrated to dryness. Water (20 mL) was added to the residue, the suspension was basified with 1 N NaOH and was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic extracts were washed with brine (2 × 10 mL), dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated in vacuo. The residue was taken in EtOAc and the amine **8a** was precipitated as its hydrochloride (839 mg, 92% yield) by adding an excess of Et₂O·HCl. The analytical sample of **8a**·HCl was obtained by crystallization from MeOH, mp >300 °C (dec). IR: 2942, 2757, 2656, 2600, 2428, 2363, 2340, 1458, 1425, 1331, 728, 694 cm^{-1} . ^1H NMR 1.64 (dq, $J = 13.2 \text{ Hz}$, $J' = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 9- H_{syn}), 1.73 (dd, $J = 11.0 \text{ Hz}$, $J' = 2.5 \text{ Hz}$, 2H, 6(8)- H_β), 1.75 (overlapped dm, 1H, 9- H_{anti}), 2.04 [m, 2H, 6(8)- H_β], 2.10 [m, 2H, 2(4)- H_β], 2.14 [dd, $J = 10.5 \text{ Hz}$, $J' = 2.0 \text{ Hz}$, 2H, 2(4)- H_α], 2.45 [broad s, 2H, 1(5)-H], 2.48 [tt, $J = 7.0 \text{ Hz}$, $J' = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, 7-H], 4.21 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.44–7.50 [complex signal, 3H, Ar-3(5)-H, and Ar-4-H], 7.55 [m, 2H, Ar-2(6)-H]. ^{13}C NMR 35.0 (CH_2 , C9), 38.8 [CH, C1(5)], 43.66 (CH, C7), 43.73 [CH₂, C6(8)], 46.3 [CH₂, C2(4)], 48.8 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 71.9 (C, C3), 130.3 [CH, Ar-C3(5)], 130.6 (CH, Ar-C4), 130.9 [CH, Ar-C2(4)], 133.2 (C, Ar-C1). MS (EI), m/z (%): 228 [$[\text{M}+\text{H}]^+$, 30], 227 (20), 185 [$[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6]^+$, 83], 184 (52), 91 (C_7H_7^+ , 100). Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}\cdot\text{HCl}$ (263.81): C, 72.85; H, 8.41; N, 5.31; Cl, 13.44. Found: C, 72.90; H, 8.31; N, 5.18; Cl, 13.96.

4.1.3. *N*-(4-Methoxybenzyl)(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)amine hydrochloride (**8b**·HCl)

From **7**·HCl (173 mg, 1.00 mmol), NaBH_3CN (95%, 142 mg, 2.15 mmol), AcOH (0.3 mL), and 4-methoxybenzaldehyde (0.18 mL, 1.48 mmol) in MeOH (7 mL) and following the above procedure, **8b**·HCl was obtained (233 mg, 79% yield). The analytical sample of **8b**·HCl was obtained by crystallization from 2-propanol, mp >300 °C (dec). IR: 2926, 2794, 2751, 2716, 2678, 2592, 2578, 2443, 1613, 1588, 1514, 1460, 1440, 1333, 1306, 1272, 1248, 1178, 1040, 993, 826, 814, 767 cm^{-1} . ^1H NMR 1.63 (dq, $J = 13.1 \text{ Hz}$, $J' = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 9- H_{syn}), 1.72 [dd, $J = 11.5 \text{ Hz}$, $J' = 2.2 \text{ Hz}$, 2H, 6(8)- H_β], 1.74 (overlapped dm, 1H, 9- H_{anti}), 2.00–2.09 [complex signal, 4H, 2(4)- H_β , and 6(8)- H_β], 2.12 [dd, $J = 10.5 \text{ Hz}$, $J' = 2.2 \text{ Hz}$, 2H, 2(4)- H_α], 2.43–2.46 [complex signal, 3H, 1(5)-H, and 7-H], 3.82 (s, 3H, OCH_3), 4.14 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 7.01 [m, 2H, Ar-3(5)-H], 7.45 [m, 2H, Ar-2(6)-H]. ^{13}C NMR (75.4 MHz) 35.0 (CH_2 , C9), 38.8 [CH, C1(5)], 43.7 (CH, C7), 43.7 [CH₂, C6(8)], 46.4 [CH₂, C2(4)], 48.1 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 55.9 (CH_3 , OCH_3), 71.6 (C, C3), 115.6 [CH, Ar-C3(5)], 124.9 (C, Ar-C1), 132.4 [CH, Ar-C2(6)], 162.1 (C, Ar-C4). MS (EI), m/z (%): 257 (M^+ , 38), 214 [$[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$, 48], 121 [$[\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2]^+$, 100]. Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}\cdot 1.05 \text{ HCl}$ (295.7): C, 69.06; H, 8.20; N, 4.74; Cl, 12.59. Found: C, 68.69; H, 8.19; N, 4.70; Cl, 12.73.

4.1.4. *N*-(2-Methoxybenzyl)(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)amine hydrochloride (**8c**·HCl)

From **7**·HCl (173 mg, 1.00 mmol), NaBH_3CN (95%, 142 mg, 2.15 mmol), AcOH (0.3 mL), and 2-methoxybenzaldehyde (0.18 mL, 1.46 mmol) in MeOH (7 mL) and following the procedure described for **8a**, **8c**·HCl was obtained (128 mg, 44% yield). The analytical sample of **8c**·HCl was obtained by crystallization from 2-propanol, mp 262–263 °C. IR: 2956, 2921, 2717, 2678, 2582, 2433,

1605, 1584, 1496, 1466, 1456, 1446, 1435, 1332, 1292, 1253, 1121, 1050, 1031, 771, 752 cm^{-1} . ^1H NMR 1.63 (dq, $J = 13.4$ Hz, $J' = 2.5$ Hz, 1H, 9- H_{syn}), 1.73 [dd, $J = 11.0$ Hz, $J' = 2.5$ Hz, 2H, 6(8)- H_β], 1.76 (overlapped dm, 1H, 9- H_{anti}), 1.99–2.05 [complex signal, 2H, 6(8)- H_β], 2.07 [dm, $J = 10.5$ Hz, 2H, 2(4)- H_β], 2.14 [dd, $J = 10.5$ Hz, $J' = 2.5$ Hz, 2H, 2(4)- H_α], 2.44 [broad s, 2H, 1(5)-H], 2.49 (tt, $J = 6.7$ Hz, $J' = 1.7$ Hz, 1H, 7-H), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 4.19 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.03 (td, $J = 7.7$ Hz, $J' = 1.0$ Hz, 1H, Ar-5-H), 7.11 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar-3-H), 7.42 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J' = 1.7$ Hz, 1H, Ar-6-H), 7.46 (ddd, $J = 8.4$ Hz, $J' = 7.4$ Hz, $J'' = 1.6$ Hz, 1H, Ar-4-H). ^{13}C NMR 35.0 (CH_2 , C9), 38.7 [CH, C1(5)], 43.5 (CH, C7), 43.8 [CH_2 , C6(8)], 44.4 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 46.3 [CH_2 , C2(4)], 56.1 (CH_3 , OCH_3), 71.9 (C, C3), 112.1 (CH, Ar-C3), 121.1 (C, Ar-C1), 122.0 (CH, Ar-C5), 132.6 (CH, Ar-C6), 132.7 (CH, Ar-C4), 159.4 (C, Ar-C2). MS (EI), m/z (%): 257 (M^+ , 35), 214 [$[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$, 57], 121 [$[\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2]^+$, 100], 91 (55). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}\cdot\text{HCl}$ (293.83): C, 69.49; H, 8.23; N, 4.77; Cl, 12.07. Found: C, 69.21; H, 8.29; N, 4.80; Cl, 12.32.

4.1.5. *N*-(3-Methoxybenzyl)(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)amine hydrochloride (8d HCl)

From 7-HCl (173 mg, 1.00 mmol), NaBH_3CN (95%, 142 mg, 2.15 mmol), AcOH (0.3 mL), and 3-methoxybenzaldehyde (0.18 mL, 1.45 mmol) in MeOH (7 mL) and following the procedure described for **8a**, **8d**-HCl was obtained (228 mg, 78% yield). The analytical sample of **8d**-HCl was obtained by crystallization from 2-propanol, mp >257 °C (dec). IR: 3002, 2923, 2873, 2792, 2734, 2708, 2678, 2585, 2446, 1606, 1599, 1588, 1494, 1460, 1437, 1331, 1306, 1272, 1256, 1174, 1035, 851, 794 cm^{-1} . ^1H NMR 1.63 (dq, $J = 13.3$ Hz, $J' = 2.6$ Hz, 1H, 9- H_{syn}), 1.72 (broad d, $J = 11.0$ Hz, 2H, 6(8)- H_β), 1.74 (overlapped dm, 1H, 9- H_{anti}), 2.05 [m, 2H, 6(8)- H_β], 2.09–2.14 [complex signal, 4H, 2(4)- H_α and 2(4)- H_β], 2.44 [broad s, 2H, 1(5)-H], 2.50 (tt, $J = 1.6$ Hz, $J' = 6.7$ Hz, 1H, 7-H), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 4.18 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.00 (ddd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 2.5$ Hz, $J'' = 1.0$ Hz, 1H, Ar-4-H), 7.12 (dt, $J = 7.5$ Hz, $J' = 1.0$ Hz, 1H, Ar-6-H), 7.17 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, Ar-2-H), 7.38 (pseudo t, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-5-H). ^{13}C NMR 35.0 (CH_2 , C9), 38.8 [CH, C1(5)], 43.66 (CH, C7), 43.72 [CH_2 , C6(8)], 46.3 [CH_2 , C2(4)], 48.7 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 55.9 (CH_3 , OCH_3), 71.9 (C, C3), 116.0 (CH, Ar-C4), 116.4 (CH, Ar-C2), 122.8 (CH, Ar-C6), 131.5 (CH, Ar-C5), 134.5 (C, Ar-C1), 161.8 (C, Ar-3). MS (EI), m/z (%): 258 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 31), 257 (M^+ , 25), 215 [$[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6]^+$, 55], 214 [$[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$, 41], 121 [$[\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2]^+$, 100], 91 (17). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}\cdot 1.1\text{HCl}\cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$ (299.28): C, 68.23; H, 8.18; N, 4.68; Cl, 13.03. Found: C, 68.13; H, 8.34; N, 4.69; Cl, 12.91.

4.1.6. *N*-(4-Fluorobenzyl)(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)amine hydrochloride (8e HCl)

From 7-HCl (150 mg, 0.86 mmol), NaBH_3CN (95%, 125 mg, 1.89 mmol), AcOH (0.3 mL), and 4-fluorobenzaldehyde (0.14 mL, 1.31 mmol) in MeOH (8 mL) and following the procedure described for **8a**, **8e**-HCl was obtained (186 mg, 77% yield). The analytical sample of **8e**-HCl was obtained by crystallization from ethyl acetate, mp >300 °C (dec). IR: 2947, 2920, 2797, 2754, 2580, 2446, 1604, 1590, 1514, 1457, 1440, 1429, 1334, 1232, 1163, 1127, 830, 778 cm^{-1} . ^1H NMR 1.64 (dq, $J = 13.2$ Hz, $J' = 2.5$ Hz, 1H, 9- H_{syn}), 1.73 (dd, $J = 11.0$ Hz, $J' = 2.5$ Hz, 2H, 6(8)- H_β), 1.76 (overlapped dm, 1H, 9- H_{anti}), 2.00–2.06 [m, 2H, 6(8)- H_β], 2.08 [dm, $J = 10.5$ Hz, 2H, 2(4)- H_β], 2.13 [dd, $J = 10.2$ Hz, $J' = 1.7$ Hz, 2H, 2(4)- H_α], 2.45 [broad s, 2H, 1(5)-H], 2.47 [overlapped tt, $J = 6.7$ Hz, $J' = 1.7$ Hz, 1H, 7-H], 4.21 (s, 2H, $\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$), 7.22 (tt, $J = 8.7$ Hz, $J' = 2.2$ Hz, 2H, Ar-3(5)-H), 7.58 (m, 2H, Ar-2(6)-H). ^{13}C NMR 35.0 (CH_2 , C9), 38.8 [CH, C1(5)], 43.67 (CH, C7), 43.72 [CH_2 , C6(8)], 46.3 [CH_2 , C2(4)], 48.0 (CH_2 , $\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$), 71.8 (C, C3), 117.1 [CH, d, $^3J_{\text{CF}} = 22.4$ Hz, Ar-C3(5)], 129.3 (C, Ar-C1), 133.3 [CH, d, $^3J_{\text{CF}} = 9.0$ Hz, Ar-C2(6)], 164.8 (C, d, $^1J_{\text{CF}} = 247.7$ Hz, Ar-C4). MS (EI), m/z (%): 245 (M^+ , 32), 203 (16), 202 [$[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$, 100], 109 [$[\text{FC}_6\text{H}_4\text{CH}_2]^+$, 100], 106 (20).

Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NF}\cdot 1.1\text{HCl}\cdot 0.33\text{H}_2\text{O}$ (291.45): C, 65.94; H, 7.53; N, 4.81; Cl, 13.38; F, 6.52. Found: C, 66.01; H, 7.67; N, 4.83; Cl, 13.31; F, 6.34.

4.1.7. *N*-(2-Thenyl)(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)amine hydrochloride (8f HCl)

From 7-HCl (150 mg, 0.86 mmol), NaBH_3CN (95%, 125 mg, 1.89 mmol), AcOH (0.3 mL), and 2-thiophenecarbaldehyde (0.12 mL, 1.37 mmol) in MeOH (8 mL) and following the procedure described for **8a**, **8f**-HCl was obtained (145 mg, 66% yield). The analytical sample of **8f**-HCl was obtained by crystallization from EtOAc, mp 278 °C (dec). IR: 2939 2917, 2790, 2747, 2442, 1589, 1457, 1440, 1429, 1334, 1256, 1194, 1126, 984, 854, 695 cm^{-1} . ^1H NMR 1.64 (dq, $J = 13.0$ Hz, $J' = 2.5$ Hz, 1H, 9- H_{syn}), 1.73 (dd, $J = 11.0$ Hz, $J' = 2.5$ Hz, 2H, 6(8)- H_β), 1.75 (overlapped dm, 1H, 9- H_{anti}), 2.00–2.05 [m, 2H, 6(8)- H_β], 2.07 [dm, $J = 10.0$ Hz, 2H, 2(4)- H_β], 2.12 [dd, $J = 10.0$ Hz, $J' = 2.5$ Hz, 2H, 2(4)- H_α], 2.44 [broad s, 2H, 1(5)-H], 2.46 (overlapped tt, $J = 8.5$ Hz, $J' = 2.0$ Hz, 1H, 7-H), 4.46 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$), 7.12 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J' = 4.0$ Hz, 1H, Ar-4-H), 7.34 (dm, $J = 3.5$ Hz, 1H, Ar-3-H), 7.57 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J' = 1.0$ Hz, 1H, Ar-5-H). ^{13}C NMR 35.0 (CH_2 , C9), 38.8 [CH, C1(5)], 42.6 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$), 43.7 (CH, C7), 43.7 [CH_2 , C6(8)], 46.2 [CH_2 , C2(4)], 71.8 (C, C3), 128.7 (CH, Ar-C4), 129.2 (CH, Ar-C5), 131.5 (CH, Ar-C3), 134.0 (C, Ar-C1). MS (EI), m/z (%): 233 (M^+ , 56), 190 [$[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$, 78], 106 (45), 97 [$[\text{C}_4\text{H}_3\text{SCH}_2]^+$, 100]. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NS}\cdot 1.05\text{HCl}\cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$ (276.17): C, 60.89; H, 7.50; N, 5.07; S, 11.61; Cl, 13.48. Found: C, 60.99; H, 7.59; N, 5.09; S, 11.28; Cl, 13.49.

4.1.8. *N*-Benzyl-*N*-methyl(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)amine hydrochloride (9 HCl)

To a solution of **8a**-HCl (395 mg, 1.5 mmol) in acetonitrile (10 mL), formaldehyde (1.18 mL, 37% wt. in water solution, 15 mmol), and NaBH_3CN (95%, 238 mg, 4.28 mmol) were added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature. AcOH (0.3 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. An additional portion of NaBH_3CN (95%, 283 mg, 4.28 mmol) was added and the mixture was further stirred at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated to dryness, 2 N NaOH (20 mL) was added and the suspension was extracted with CH_2Cl_2 (3 \times 20 mL). The combined organic phases were washed with H_2O (2 \times 20 mL), dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated in vacuo. The residue was taken in EtOAc and the amine **9** was precipitated as its hydrochloride (327 mg, 91% yield) by adding an excess of Et₂O-HCl. The analytical sample of **9**-HCl was obtained by crystallization from 2-propanol, mp 258–259 °C (dec). IR: 3042, 2927, 2872, 2850, 2608, 2553, 2520, 2487, 2472, 2391, 1498, 1458, 1405, 1332, 994, 748, 696 cm^{-1} . ^1H NMR 1.64 (dq, $J = 13.5$ Hz, $J' = 2.6$ Hz, 1H, 9- H_{syn}), 1.78 (dd, $J = 11.5$ Hz, $J' = 3.0$ Hz, 2H, 6(8)- H_β), 1.79 (dm, $J = 13.5$ Hz, 1H, 9- H_{anti}), 2.09–2.29 [complex signal, 6H, 6(8)- H_β , 2(4)- H_α , and 2(4)- H_β], 2.50 [broad s, 2H, 1(5)-H], 2.73 (s, 3H, N- CH_3), 2.75 (tt, $J = 7.0$ Hz, $J' = 2.0$ Hz, 1H, 7-H), 4.09 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H) and 4.60 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H) ($\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$), 7.49–7.53 [complex signal, 3H, Ar-3(5)-H and Ar-4-H], 7.59 [m, 2H, Ar-2(6)H]. ^{13}C NMR 35.2 (CH_2 , C9), 36.5 (CH_3 , NCH₃), 38.8 [CH, C1(5)], 42.8 (CH, C7), 43.8 [CH_2 , C6(8)], 44.4 (broad signal, CH_2) and 45.4 (broad signal, CH_2) (C2 and C4), 58.1 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 79.9 [C, C3], 130.3 (CH, Ar-C3(5)), 131.1 (CH, Ar-C4), 131.3 (C, Ar-C1), 132.4 [C, Ar-C2(6)]. MS (EI), m/z (%): 241 (M^+ , 70), 199 (25), 198 [$[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$, 100], 185 (40), 120 (17), 91 (96). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}\cdot\text{HCl}$ (277.84): C, 73.49; H, 8.71; N, 5.04; Cl, 12.76. Found: C, 73.61; H, 8.74; N, 5.04; Cl, 12.99.

4.1.9. *N*-(Tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)piperidine hydrochloride (11 HCl)

To a solution of 7 HCl (173 mg, 1.00 mmol) in DMF (2.5 mL), anhydrous Et₃N (0.4 mL, 2.9 mmol) was added and the suspension was

stirred at room temperature for 2 h. 1,5-Dibromopentane (0.17 mL, 1.2 mmol) was added and the mixture was heated at 60 °C for 26 h. To the cold mixture, water (15 mL) was added and the solution was washed with EtOAc (3 × 10 mL). The aqueous phase was basified with 2 N NaOH (5 mL) and extracted with ethyl acetate (3 × 10 mL). The combined organic extracts were washed with water (3 × 10 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and excess of Et₂O-HCl was added. The solution was concentrated in vacuo to dryness to give **11**-HCl (117 mg, 48% yield). The analytical sample of **11**-HCl was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp >264 °C (dec). IR: 2941, 2930, 2871, 2851, 2634, 2530, 2451, 2401, 1471, 1455, 1351, 1333, 1187, 1124, 1016, 992, 858, 708 cm⁻¹. ¹H NMR 1.54 (dm, *J* = 13.0 Hz, 1H, 4'-H_{ax}), 1.62 (dq, *J* = 13.3 Hz, 1H, 9-H_{syn}), 1.72 [dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 3.0 Hz, 2H, 6(8)-H_γ], 1.74 (dm, *J* = 13.0 Hz, 1H, 9-H_{anti}), 1.84–2.02 [complex signal, 9H, 6(8)-H_β, 2(4)-H_β, 4'-H_{eq}, 3'(5')-H_{ax} and 3'(5')-H_{eq}], 2.15 [dm, *J* = 10.0 Hz, 2H, 2(4)-H_γ], 2.44 [broad signal, 2H, 1(5)-H], 2.65 [tt, *J* = 6.7 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, 7-H], 3.05 [broad t, *J* = 12.0 Hz, 2H, 2'(6')-H_{ax}], 3.51 [d, *J* = 12.0 Hz, 2H, 2'(6')-H_{eq}]. ¹³C NMR 23.1 (CH₂, C4'), 24.6 [CH₂, C3'(5')], 35.2 (CH₂, C9), 38.7 [CH, C1(5)], 42.0 (CH, C7), 43.7 [CH₂, C6(8)], 44.8 [CH₂, C2(4)], 51.0 [CH₂, C2'(6')], 78.8 (C, C3). MS (EI), *m/z* (%): 205 (M⁺, 15), 163 (14), 162 ([M-C₃H₇]⁺, 100), 149 (26). Anal. Calcd for C₁₄H₂₃N-HCl (241.80): C, 69.54; H, 10.00; N, 5.79. Found: C, 69.60; H, 10.0; N, 5.78.

4.1.10. N-Methyl(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)amine hydrochloride (12 HCl)

A solution of **9**-HCl (275 mg, 0.99 mmol) and 5% Pd/C (50% in water, 10 mg) in absolute EtOH (25 mL) was hydrogenated at 1 atm for 24 h. The suspension was filtered, the residue was washed with EtOH, and the organic layer was concentrated in vacuo to give a solid. Crystallization from MeOH/Et₂O gave **12**-HCl (165 mg, 89% yield), mp 165–166 °C. IR: 2947, 2922, 2870, 2856, 2763, 2728, 2692, 2587, 2516, 2458, 1466, 1420, 1348, 1332, 1311, 1258, 1160, 1111, 1094, 1060, 1018, 996, 630 cm⁻¹. ¹H NMR 1.61 (dq, *J* = 13.0 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, 9-H_{syn}), 1.71 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, 6(8)-H_γ), 1.74 (overlapped m, 1H, 9-H_{anti}), 1.96–2.03 [complex signal, 6H, 6(8)-H_β, 2(4)-H_γ, and 2(4)-H_β], 2.42 [complex signal, 3H, 1(5)-H, and 7-H], 2.68 (s, 3H, N-CH₃). ¹³C NMR 29.1 (CH₃, N-CH₃), 34.9 (CH₂, C9), 38.7 [CH, C1(5)], 43.1 (CH, C7), 43.8 [CH₂, C6(8)], 45.8 [CH₂, C2(4)], 71.5 (C, C3). MS (EI), *m/z* (%): 151 (M⁺, 15), 108 ([M-C₃H₇]⁺, 100). Anal. Calcd for C₁₀H₁₇N-HCl·0.33H₂O (193.66): C, 62.02; H, 9.71; N, 7.23. Found: C, 62.13; H, 9.63; N, 7.20.

4.1.11. [(Tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)methyl]amine hydrochloride (14 HCl)

To a cold (0 °C) solution of **13** (600 mg, 3.64 mmol) in anhyd THF (50 mL), LiAlH₄ (443 mg, 11.1 mmol) was added and the suspension was heated under reflux for 15 h. The suspension was cooled (ice bath), carefully basified with 10 N NaOH (10 mL), and stirred for 1 h at room temperature. The precipitate was filtered and washed with CH₂Cl₂ (3 × 25 mL). The combined filtrate and washings were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and excess of Et₂O-HCl was added. The solution was concentrated in vacuo to give a solid that was crystallized from MeOH/Et₂O to give **14**-HCl (613 mg, 90% yield), mp >300 °C (dec). IR: 3019, 2926, 2867, 1597, 1499, 1384, 1337, 1116, 981, 864 cm⁻¹. ¹H NMR 1.61–1.72 [complex signal, 6H, 9-H_{syn}, 9-H_{anti}, 6(8)-H_γ, and 2(4)-H_β], 1.75 [dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 3.0 Hz, 2H, 2(4)-H_γ], 1.81 [m, 2H, 6(8)-H_β], 2.18 [t, *J* = 6.7 Hz, 1H, 7-H], 2.29 [broad signal, 2H, 1(5)-H], 3.08 (s, 2H, CH₂N). ¹³C NMR 35.8 (CH₂, C9), 38.9 [CH, C1(5)], 43.2 (CH, C7), 44.6 [CH₂, C6(8)], 47.4 [CH₂, C2(4)], 48.2 (CH₂, CH₂N), 48.8 (C, C3). MS (EI), *m/z* (%): 153 (24), 152 ([M+H]⁺, 36), 151 (20), 135 [(C₁₀H₁₅)⁺, 53], 134 (70), 119 (29), 96 (45), 95 (59), 94 (33), 93 (57), 92 (100), 91 (58), 79 (74), 77 (40). Anal. Calcd for

C₁₀H₁₇N-HCl (187.71): C, 63.99; H, 9.66; N, 7.46; Cl, 18.89. Found: C, 64.07; H, 9.66; N, 7.43; Cl, 18.97.

4.1.12. N-Benzyl[(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)methyl]amine hydrochloride (15 HCl)

From **14**-HCl (500 mg, 2.67 mmol), MeOH (10 mL), NaBH₃CN (95%, 380 mg, 5.74 mmol), AcOH (0.3 mL), benzaldehyde (0.4 mL, 3.92 mmol), an additional portion of NaBH₃CN (95%, 190 mg, 2.87 mmol), and benzaldehyde (0.2 mL, 1.96 mmol) and following the procedure described for **8a**, **15**-HCl was obtained (567 mg, 77% yield). The analytical sample of **15**-HCl was obtained by crystallization from EtOAc, mp >277 °C (dec). IR: 2931, 2865, 2781, 1588, 1446, 750, 700 cm⁻¹. ¹H NMR 1.58–1.70 [complex signal, 6H, 2(4)-H_β, 6(8)-H_γ, and 9-H_{syn} and 9-H_{anti}], 1.76–1.81 [complex signal, 4H, 2(4)-H_γ and 6(8)-H_β], 2.15 [t, *J* = 7.0 Hz, 1H, 7-H], 2.27 [broad s, 2H, 1(5)-H], 3.11 (s, 2H, CH₂-N), 4.28 (s, 2H, CH₂C₆H₅), 7.45–7.50 [complex signal, 3H, Ar-4-H and Ar-3(5)-H], 7.55–7.57 [m, 2H, Ar-2(6)-H], ¹³C NMR 35.7 (CH₂, C9), 39.0 [CH, C1(5)], 44.0 (CH, C7), 44.4 [CH₂, C6(8)], 47.8 [CH₂, C2(4)], 48.4 (C, C3), 53.1 (CH₂, CH₂C₆H₅), 55.9 (CH₂, CH₂N), 130.3 [CH, Ar-C3(5)], 130.8 (CH, Ar-C4), 131.5 [CH, Ar-C2(6)], 132.0 (C, Ar-C1). MS (EI), *m/z* (%): 241 (M⁺, 6), 240 ([M-H]⁺, 8), 150 [(C₁₀H₁₆N)⁺, 10], 120 (54), 106 [(C₇H₈N)⁺, 58], 91 [(C₇H₇)⁺, 100]. Anal. Calcd for C₁₇H₂₃N·1.1HCl·0.1H₂O (283.3): C, 72.08; H, 8.65; N, 4.94; Cl, 13.77. Found: C, 72.03; H, 8.56; N, 4.85; Cl, 13.94.

4.1.13. N-Benzyl-N-methyl[(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)methyl]amine hydrochloride (16 HCl)

From **15**-HCl (465 mg, 1.67 mmol), acetonitrile (10 mL), formaldehyde (1.31 mL, 37% wt. in water solution, 16.7 mmol), and two portions of NaBH₃CN (95%, 314 mg, 4.75 mmol) and following the procedure described for **9**, the amine **16** was obtained (411 mg, 96% yield). Its hydrochloride was obtained by adding an excess of Et₂O-HCl to a solution of the amine in EtOAc, followed by concentration in vacuo to dryness. The analytical sample of **16**-HCl was obtained by crystallization from EtOAc, mp 251–252 °C. IR: 3042, 2924, 2865, 2698, 2641, 2550, 2530, 1458, 1423, 1337, 1085, 906, 745, 701 cm⁻¹. ¹H NMR 1.46 [d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 2-H_γ or 4-H_γ], 1.59–1.70 [complex signal, 4H, 6-H_γ, 8-H_γ, 9-H_{syn}, and 9-H_{anti}], 1.71–1.78 [complex signal, 3H, 4-H_γ or 2-H_γ, 6-H_β, and 8-H_β], 1.87 [m, 2H, 2-H_β and 4-H_β], 2.10 [t, *J* = 6.7 Hz, 1H, 7-H], 2.27 (broad s, 1H) and 2.30 (broad s, 1H) (1-H and 5-H), 2.94 (s, 3H, CH₃-N), 3.32 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, CH₂N), 3.46 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, CH₂N), 4.37 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, CH₂C₆H₅), 4.43 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, CH₂C₆H₅), 7.50–7.52 [complex signal, 3H, Ar-4-H and Ar-3(5)-H], 7.59 [m, 2H, Ar-2(6)H]. ¹³C NMR 35.5 (CH₂, C9), 39.1 (CH) and 39.4 [CH, C1 and C5], 43.0 (CH₃, CH₃-N), 44.0 (CH₂, C6, and C8), 46.0 (CH, C7), 48.6 (C, C3), 48.8 (CH₂, C2, and C4), 62.8 (CH₂-C₆H₅), 65.1 (CH₂, CH₂-N), 130.4 [CH, Ar-C3(5)], 130.9 (C, Ar-C1), 131.4 (CH, Ar-C4), 132.6 [CH, Ar-C2(6)]. MS (EI), *m/z* (%): 255 (M⁺, 10), 135 (17), 134 [(C₆H₅CH₂N(CH₃)=CH₂)⁺, 100], 120 [(C₆H₅CH=NCH₃)⁺, 34], 91 [(C₇H₇)⁺, 89]. Anal. Calcd for C₁₈H₂₅N-HCl (291.86): C, 74.07; H, 8.98; N, 4.80; Cl, 12.15. Found: C, 74.15; H, 8.96; N, 4.81; Cl, 12.43.

4.1.14. N,N-Dimethyl[(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)methyl]amine hydrochloride (17 HCl)

To a cold (0 °C) solution of **14** (128 mg, 0.68 mmol) in Et₂O (5 mL), formaldehyde (1.38 mL, 37% wt. in water solution, 17.6 mmol) and, dropwise, formic acid (1.17 mL, 30.5 mmol) were added and the mixture was stirred at 80 °C for 10 h. To the cold mixture Et₂O (15 mL) was added, 5 N NaOH (5 mL) was added dropwise and the suspension was stirred at room temperature for 15 min. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with Et₂O (4 × 10 mL). The combined organic phases were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and an excess of Et₂O-HCl

was added. Concentration in vacuo gave **17**-HCl (100 mg, 68% yield). The analytical sample of **17**-HCl was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp >260 °C (dec). IR (KBr): 2930, 2915, 2868, 2847, 2681, 2570, 2468, 2360, 1471, 1413, 1338, 1306, 1225, 1062, 971, 946 cm⁻¹. ¹H NMR 1.62–1.71 [complex signal, 4H, 9-H_{syn}, 9-H_{anti}, and 6(8)-H₂], 1.71–1.76 [dm, *J* = 10.5 Hz, 2H, 2(4)-H₁], 1.83 [m, 2H, 6(8)-H₁], 1.87 [dd, *J* = 10.5 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 2(4)-H₂], 2.19 [t, *J* = 6.7 Hz, 1H, 7-H], 2.32 [broad signal, 2H, 1(5)-H], 2.95 [s, 6H, N(CH₃)₂], 3.38 (s, 2H, CH₂N). ¹³C NMR 35.7 (CH₂, C9), 39.2 [CH, C1(5)], 44.1 [CH₂, C6(8)], 45.5 (CH₃, CH₃N), 46.0 (CH, C7), 48.3 [CH₂, C2(4)], 48.6 (C, C3), 67.4 (CH₂, CH₂N). MS (EI), *m/z* (%): 179 (M⁺, 16), 91 (7), 79 (8), 77 (7), 58 ([CH₂=N(CH₃)₂]⁺, 100). Anal. Calcd for C₁₂H₂₁N·1.05HCl·0.25H₂O (222.09): C, 64.90; H, 10.23; N, 6.31; Cl, 16.76. Found: C, 64.77; H, 10.42; N, 6.32; Cl, 16.70.

4.1.15. *N*-[(Tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)methyl]guanidine hydrochloride (**18** HCl)

To a cold (0 °C) solution of **14**-HCl (150 mg, 0.8 mmol) in acetonitrile (2.5 mL), anhyd Et₃N (0.2 mL, 1.45 mmol), and 1H-pyrazol-1-carboxamide hydrochloride (140 mg, 0.94 mmol) were added. The suspension was heated at 70 °C for 6 h and cooled at 0 °C for 24 h. The precipitate was filtered and washed with cold acetonitrile (2 × 5 mL) to give **18**-HCl (129 mg, 70% yield). The above product was taken in EtOAc, excess Et₂O-HCl was added, and the solvent was eliminated in vacuo. The analytical sample of **18**-HCl was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 298–299 °C. IR (KBr): 3357, 3262, 3169, 2926, 2861, 1664, 1623, 1578, 1458, 1356, 1094, 690 cm⁻¹. ¹H NMR 1.61–1.68 [complex signal, 6H, 6(8)-H₂, 2(4)-H₁, 9-H_{syn}, and 9-H_{anti}], 1.72 [dd, *J* = 10.7 Hz, *J'* = 2.7 Hz, 2H, 2(4)-H₂], 1.81 [m, 2H, 6(8)-H₁], 2.12 [t, *J* = 6.7 Hz, 1H, 7-H], 2.26 [broad s, 2H, 1(5)-H], 3.30 (s, 2H, CH₂N). ¹³C NMR (75.4 MHz) 36.1 (CH₂, C9), 38.8 [CH, C1(5)], 42.8 (CH, C7), 44.8 [CH₂, C6(8)], 47.7 [CH₂, C2(4)], 49.9 (CH₂, CH₂N), 50.2 (C, C3), 159.1 (C, C guanidine). MS (EI), *m/z* (%): 194 (12), 193 (M⁺, 60), 150 ([M-C₃H₇]⁺, 24), 93 (21), 92 (30), 91 (44), 79 (36), 77 (29), 72 ([C₃H₆N₃]⁺, 49), 60 ([CH₆N₃]⁺, 100). Anal. Calcd for C₁₁H₁₉N₃·HCl (229.75): C, 57.51; H, 8.77; N, 18.29; Cl, 15.43. Found: C, 57.65; H, 8.88; N, 18.23; Cl, 15.68.

4.1.16. *N*-Methyl[(tricyclo[3.3.1.0^{3,7}]non-3-yl)methyl]amine hydrochloride (**19** HCl)

From **16**-HCl (267 mg, 0.91 mmol), 5% Pd/C (50% in water, 10 mg), and absolute EtOH (30 mL) and following the procedure described for **12**, **19**-HCl (143 mg, 78% yield) was obtained after crystallization from MeOH/Et₂O, mp >224 °C (dec). IR: 2931, 2866, 2770, 2435, 1668, 1611, 1460, 1430, 1398, 1338, 1302, 1154, 1028, 732 cm⁻¹. ¹H NMR 1.61–1.73 [complex signal, 6H, 2(4)-H₁, 6(8)-H₂, 9-H_{syn}, and 9-H_{anti}], 1.75 [dd, *J* = 10.5 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 2(4)-H₂], 1.81 [m, 2H, 6(8)-H₁], 2.19 [t, *J* = 6.7 Hz, 1H, 7-H], 2.30 [broad s, 2H, 1(5)-H], 2.75 (s, 3H, CH₃N), 3.16 (s, 2H, CH₂-N). ¹³C NMR 35.0 (CH₃, CH₃N), 35.7 (CH₂, C9), 39.0 [CH, C1(5)], 43.7 (CH, C7), 44.5 [CH₂, C6(8)], 47.7 [CH₂, C2(4)], 48.5 (C, C3), 58.6 (CH₂, CH₂-N). MS (EI), *m/z* (%): 166 (13), 165 (M⁺, 100), 164 ([M-H]⁺, 48), 135 (20), 134 (87), 108 (54), 93 (46), 92 (86), 91 (55), 79 (60), 77 (39). Anal. Calcd for C₁₁H₁₉N·HCl·0.25H₂O (206.24): C, 64.06; H, 10.02; N, 6.79. Found: C, 64.02; H, 10.23; N, 6.86.

4.1.17. 3,7-Dimethyl(tricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)amine-HCl (**21** HCl)

To a solution of acid **20** (389 mg, 2.16 mmol) in toluene (6.5 mL), Et₃N (0.4 mL, 2.9 mmol), and diphenylphosphorylazide (875 mg, 3.18 mmol) were added and the mixture was heated under reflux for 3 h. The cold (ice-bath) solution was washed with cold 1 N HCl (10 × 5 mL). Then, 6 N HCl (9 mL) was added to the organic solution and the mixture was heated under reflux for 24 h.

The organic layer was separated, the aqueous layer was washed with Et₂O (3 × 5 mL) and the water was removed in a freeze-dryer giving **21**-HCl as a white solid (296 mg, 73% yield). The analytical sample was obtained by crystallization from water, mp 210–211 °C. IR: 2959, 2945, 2891, 2863, 2765, 2685, 2579, 1602, 1493, 1480, 1460, 1308, 1285, 1163, 984 cm⁻¹. ¹H NMR 1.20 (s, 6H, C3(7)-CH₃), 1.44 [dd, *J* = 8.5 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 4(6)-H₂], 1.70–1.73 [complex signal, 4H, 2(8)-H₂, and 2(8)-H₁], 1.75 [dd, *J* = 8.5 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 4(6)-H₁], 2.34 [t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 5-H], 4.85 (s, mobile H). ¹³C NMR 16.4 [CH₃, C3(7)-CH₃], 44.1 (CH, C5), 48.1 [C, C3(7)], 53.8 [CH₂, C4(6)], 56.7 [CH₂, C2(8)], 61.4 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 152 ([M+H]⁺, 3), 151 (M⁺, 2), 138 (14), 137 (12), 124 (27), 123 (25), 111 (57), 110 (88), 109 (53), 97 (81), 96 (100), 95 (70), 94 (29), 91 ([C₇H₇]⁺, 23), 82 (36), 81 (30), 79 (26), 77 (36), 67 (24), 55 (44), 53 (35). Anal. Calcd for C₁₀H₁₇N·HCl (187.71): C, 63.99; H, 9.67; N, 7.46; Cl, 18.89. Found: C, 63.71; H, 9.70; N, 7.48; Cl, 18.88.

4.1.18. *N*-Benzyl-3,7-dimethyl(tricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)amine hydrochloride (**22a** HCl)

To a solution of **21**-HCl (770 mg, 4.11 mmol) in MeOH (15 mL), NaBH₃CN (95%, 585 mg, 8.86 mmol), AcOH (0.3 mL), and benzaldehyde (653 mg, 6.16 mmol) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 18 h. The solution was concentrated to dryness, water (30 mL) was added to the residue and the mixture was extracted with Et₂O (3 × 25 mL). The combined organic extracts were washed with 2 N NaOH (3 × 25 mL) and brine (2 × 25 mL), dried (anhyd Na₂SO₄) and concentrated in vacuo. The residue was subjected to column chromatography (silica gel; hexane/EtOAc, 97/3) to give amine **22a** (594 mg, 60% yield). An analytical sample of **22a**-HCl was obtained by adding an excess of Et₂O-HCl to a solution of **22a** in EtOAc and filtration of the formed precipitate, mp >258 °C (dec). IR: 2957, 2934, 2917, 2911, 2759, 2739, 2732, 2725, 2626, 2619, 2578, 2423, 1459, 1452, 1308, 1160, 1028, 731, 693 cm⁻¹. ¹H NMR 1.23 (s, 6H, C3(7)-CH₃), 1.50 [dd, *J* = 9.0 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 4(6)-H₂], 1.79 [dd, *J* = 9.0 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 4(6)-H₁], 1.82–1.86 [complex signal, 4H, 2(8)-H₂, and 2(8)-H₁], 2.51 [t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 5-H], 4.21 (s, 2H, CH₂C₆H₅), 4.85 (s, mobile H), 7.42–7.48 [complex signal, 3H, Ar-3(5)-H, and Ar-4-H], 7.52 [dd, *J* = 8.0 Hz, *J'* = 2.0 Hz, 2H, Ar-2(6) H]. ¹³C NMR 16.4 [CH₃, C3(7)-CH₃], 43.6 (CH, C5), 47.8 [C, C3(7)], 49.6 (CH₂, CH₂-C₆H₅), 53.6 [CH₂, C4(6)], 54.9 [CH₂, C2(8)], 68.2 (C, C1), 130.3 [CH, Ar-C3(5)], 130.6 (CH, Ar-C4), 130.8 (CH, Ar-C2(6)), 133.1 (C, Ar-C1). MS (EI), *m/z* (%): 241 (M⁺, 2), 227 (3), 226 (3), 213 (6), 200 (34), 199 (35), 91 ([C₆H₅CH₂]⁺, 100). Anal. Calcd for C₁₇H₂₃N·HCl (277.83): C, 73.49; H, 8.71; N, 5.04; Cl, 12.76. Found: C, 73.83; H, 8.78; N, 5.02; Cl, 12.92.

4.1.19. *N*-(2-Thenyl)-3,7-dimethyl(tricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)amine hydrochloride (**22b**-HCl)

From **21**-HCl (187.7 mg, 1.00 mmol), NaBH₃CN (95%, 198 mg, 3 mmol), acetic acid (0.3 mL), and 2-thiophenecarbaldehyde (0.15 mL, 1.65 mmol) in methanol (10 mL) and following the above procedure, **22b**-HCl (196 mg, 69% yield) was obtained. The analytical sample of **22b**-HCl was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp >255 °C (dec). IR: 3062, 2952, 2919, 2887, 2727, 2689, 2549, 2451, 1583, 1477, 1440, 1375, 1307, 1280, 1247, 1159, 1068, 1007, 937, 855, 837, 731, 712, 701 cm⁻¹. ¹H NMR 1.23 (s, 6H, C3(7)-CH₃), 1.49 [dd, *J* = 8.5 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 4(6)-H₂], 1.79 [dd, *J* = 8.5 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 4(6)-H₁], 1.84 [complex signal, 4H, 2(8)-H₂, and 2(8)-H₁], 2.51 [t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 5-H], 4.46 (s, 2H, CH₂N), 4.86 (s, mobile H), 7.11 (dd, *J* = 5.0 Hz, *J'* = 4.0 Hz, 1H, Ar-4-H), 7.33 (dm, *J* = 3.5 Hz, 1H, Ar-3-H), 7.56 (dd, *J* = 5.0 Hz, *J'* = 1.0 Hz, 1H, Ar-5-H). ¹³C NMR 16.4 [CH₃, C3(7)-CH₃], 43.5 (CH₂, CH₂N), 43.6 (CH, C5), 47.8 [C, C3(7)], 53.6 [CH₂, C4(6)], 54.9 [CH₂, C2(8)], 68.0 (C, C1), 128.7 (CH, Ar-C4), 129.2 (CH, Ar-C5),

131.4 (CH, Ar-C3), 134.0 (C, Ar-C1). MS (EI), *m/z* (%): 247 (M⁺, 2), 233 (3), 219 (7), 206 (50), 205 (30), 192 (11), 97 ([C₄H₉SCH₂]⁺, 100). Anal. Calcd for C₁₅H₂₁NS·1.1HCl·0.1H₂O (289.30): C, 62.27; H, 7.77; N, 4.84; S, 11.08; Cl, 13.48. Found: C, 62.25; H, 7.69; N, 4.85; S, 10.95; Cl, 13.07.

4.1.20. N-Benzyl-N,3,7-trimethyl(tricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)amine hydrochloride (23-HCl)

From a solution of **22a**-HCl (635 mg, 2.29 mmol), acetonitrile (15 mL), formaldehyde (1.81 mL, 37% wt. in water solution, 23 mmol), two portions of NaBH₃CN (95%, 455 mg, 6.88 mmol) and following the procedure described for **9**, the amine **23** (516 mg, 88.5% yield) was obtained. An analytical sample of **23**-HCl was obtained by adding an excess of Et₂O-HCl to a solution of **23** in EtOAc followed by filtration of the obtained precipitate, mp >228 °C (dec). IR: 2952, 2886, 2680, 2439, 2372, 1456, 1310, 749, 705, 695 cm⁻¹. ¹H NMR 1.25 [s, 6H, C3(7)-CH₃], 1.56 [dd, *J* = 9.0 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 4(6)-H_γ], 1.83 [dd, *J* = 9.0 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 4(6)-H_β], 1.92–1.95 [complex signal, 4H, 2(8)-H_γ, and 2(8)-H_β], 2.71 (s, 3H, CH₃N), 2.74 [t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 5-H], 4.09 (broad signal, 1H) and 4.61 (broad signal, 1H) (CH₂C₆H₅), 4.84 (s, mobile H), 7.49–7.51 [complex signal, 3H, Ar-3(5)-H and Ar-4-H], 7.53–7.56 [m, 2H, Ar-2(6)-H]. ¹³C NMR 16.5 [CH₃, C3(7)-CH₃], 37.2 (CH₃, CH₃N), 43.3 (CH, C5), 47.6 (CH₂, CH₂C₆H₅), 53.5 [CH₂, C4(6)], 53.7 [CH₂, C2(8)], 58.7 [C, C3(7)], 76.2 (C, C1), 130.3 [CH, Ar-C3(5)], 131.1 (CH, Ar-C4), 131.2 (C, Ar-C1), 132.1 [CH, Ar-C2(6)]. MS (EI), *m/z* (%): 255 (M⁺, 3), 254 ([M-H]⁺, 3), 240 (7), 226 (7), 213 (82), 212 (28), 91 ([C₆H₅CH₂]⁺, 100). Anal. Calcd for C₁₈H₂₅N·0.95HCl (290.04): C, 74.54; H, 9.02; N, 4.83; Cl, 11.61. Found: C, 74.63; H, 9.13; N, 4.84; Cl, 11.60.

4.1.21. 1-(3,7-Dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)ethylamine hydrochloride (25-HCl)

4.1.21.1. 1-(3,7-Dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)-1-ethanone (24). To a suspension of Li₂CO₃ (189 mg, 2.55 mmol) in H₂O (40 mL) solid **20** (900 mg, 5.00 mmol) was added and the resulting suspension was stirred for 48 h at room temperature. The water of the resulting solution was removed in a freeze-dryer giving the lithium salt of **20** as a white solid. This salt was added to anhyd Et₂O (20 mL) and the resulting suspension was cooled to 0 °C. Methylolithium (18.8 mL, 1.6 M in Et₂O, 30 mmol) was added dropwise and the suspension was heated under reflux for 18 h. To the cold (ice-bath) mixture, water (15 mL) was added dropwise, and the mixture was further stirred for 15 min. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with Et₂O (3 × 15 mL). The combined organic phases were dried (anhyd Na₂SO₄) and concentrated in vacuo at room temperature to give ketone **24** (382 mg, 43% yield; 57% yield based on unrecovered starting material). The aqueous layer was made acidic and extracted with CH₂Cl₂ (4 × 10 mL). The combined organic phases were dried (anhyd Na₂SO₄), and concentrated in vacuo to give starting acid **20** (223 mg). IR: 2956, 2885, 1716, 1699, 1438, 1360, 1302, 1220 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz) 1.18 (s, 6H, C3(7)-CH₃), 1.37 [dd, *J* = 8.5 Hz, *J'* = 3.6 Hz, 2H, 4(6)-H_γ], 1.56–1.62 [complex signal, 4H, 2(8)-H_γ, and 4(6)-H_β], 1.70 [dm, *J* = 7.8 Hz, 2(8)-H_β], 2.16 (d, *J* = 0.6 Hz, 3H, CH₃CO), 2.60 [t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 5-H]. MS (EI), *m/z* (%): 178 (M⁺, 3), 163 ([M-CH₃]⁺, 7), 136 (11), 135 ([C₁₀H₁₅]⁺, 23), 123 (20), 122 (31), 107 (21), 95 (41), 93 (27), 43 ([CH₃CO]⁺, 100). Accurate mass measurement (ESI⁺) calcd for [C₁₂H₁₈O+H]⁺: 179.1430. Found: 179.1431.

4.1.21.2. 1-(3,7-Dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)-1-ethanone oxime. To a solution of ketone **24** (168 mg, 0.94 mmol) in ethanol (1 mL), hydroxylamine hydrochloride (103 mg, 1.49 mmol), water (0.1 mL), and powdered NaOH (190 mg, 4.75 mmol) were added and the mixture was heated under reflux for 5 min. The cold solu-

tion (ice-bath) was added to a cold solution (ice bath) of concd HCl (0.64 mmol, 7.72 mmol) and water (3.5 mL). The obtained precipitate was filtered, washed with cold water (2 × 2 mL) and dried in vacuo over P₂O₁₀ to give the title oxime (135 mg, 74% yield) that was used without further purification in the next step. IR: 3234, 2949, 2881, 1667, 1446, 1371, 1018, 918, 893, 775 cm⁻¹.

4.1.21.3. 1-(3,7-Dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)ethylamine hydrochloride (25-HCl).

To a suspension of LiAlH₄ (110 mg, 2.90 mmol) in anhyd Et₂O (3 mL) a solution of the above oxime (135 mg, 0.70 mmol) in anhyd THF (2 mL) was added dropwise and the mixture was heated under reflux for 16 h. To the cold mixture, water (0.1 mL, 5.55 mmol) was added dropwise and the suspension was stirred at room temperature for 1 h. The formed precipitate was filtered through Celite® and washed with Et₂O (3 × 10 mL). The filtrate was dried (anhyd Na₂SO₄), an excess of Et₂O-HCl was added and the precipitate was filtered to give **25**-HCl (66 mg, 44% global yield from **24**), mp >278 °C (dec). IR: 2952, 2932, 2881, 2567, 1601, 1511, 1479, 1458, 1386, 1320, 1292, 1202, 1162, 1062 cm⁻¹. ¹H NMR 1.192 (s, 3H) and 1.195 (s, 3H) [C3-CH₃ and C7-CH₃], 1.32 [d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH], 1.38–1.60 (complex signal, 8H, methylene protons), 2.26 [t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 5-H], 3.54 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, CHN), 4.86 (s, mobile H). ¹³C NMR 16.4 (CH₃, CH₃CH), 16.8 (CH₃) and 16.9 (CH₃) (C3-CH₃ and C7-CH₃), 42.1 (CH, C5), 48.4 (C) and 48.5 (C) (C3 and C7), 51.3 (CH, CHN), 54.5 (CH₂) and 54.6 (CH₂) (C4 and C6), 54.7 (C, C1), 55.2 (CH₂) and 55.4 (CH₂) (C2 and C8). MS (EI), *m/z* (%): 179 (M⁺, 2), 178 ([M-H]⁺, 3), 164 (36), 147 (50), 122 (36), 121 (77), 119 (37), 109 (45), 108 (32), 107 (100), 106 (63), 105 (73), 93 (34), 91 (76), 83 (69), 80 (30), 79 (46), 77 (36), 70 (51). Anal. Calcd for C₁₂H₂₁N·1.05HCl·0.1H₂O (219.39): C, 65.70; H, 10.22; N, 6.38; Cl, 16.97. Found: C, 65.53; H, 10.49; N, 6.36; Cl, 16.86.

4.1.22. N,N-3,7-Tetramethyl(tricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)amine hydrochloride (26-HCl)

From amine **21** (151 mg, 1.0 mmol) in Et₂O (5 mL), formaldehyde (1.8 mL, 37% wt. in water solution, 22.8 mmol), and formic acid (1.5 mL, 39 mmol) and following the procedure described for **17**, the amine **26** was obtained as its hydrochloride. The analytical sample of **26**-HCl (180 mg, 83.5% yield) was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 173–174 °C. IR 2999, 2955, 2933, 2886, 2628, 2569, 2540, 2518, 2468, 1472, 1455, 1439, 1312, 1054 cm⁻¹. ¹H NMR 1.22 [s, 6H, C3(7)-CH₃], 1.51 [dm, *J* = 9.0 Hz, 2H, 4(6)-H_γ], 1.75 [dd, *J* = 9.0 Hz, *J'* = 3.0 Hz, 2H, 4(6)-H_β], 1.81 [m, 4H, 2(8)-H_γ], 2.59 [t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 5-H], 2.88 (s, 6H, (CH₃)₂N). ¹³C NMR 16.5 [CH₃, C3(7)-CH₃], 40.8 (CH₃, (CH₃)₂N), 42.5 (CH, C5), 47.7 [C, C3(7)], 53.2 [CH₂, C2(8)], 53.5 [CH₂, C4(6)], 75.4 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 179 (M⁺, 2), 178 ([M-H]⁺, 4), 164 (14), 150 (18), 138 (22), 137 (100), 136 (79), 123 (46), 122 (45), 108 (35), 77 (24), 55 (35). Anal. Calcd for C₁₂H₂₁N·HCl (215.77): C, 66.80; H, 10.28; N, 6.49; Cl, 16.43. Found: C, 66.81; H, 10.30; N, 6.41; Cl, 16.65.

4.1.23. N,N-Dibenzyl-3,7-dimethyl(tricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)amine hydrochloride (27-HCl)

A mixture of **21**-HCl (178 mg, 0.95 mmol), K₂CO₃ (1.03 g, 7.5 mmol), benzyl chloride (0.29 mL, 2.5 mmol) and NaI (100 mg, 0.67 mmol) in acetonitrile (10 mL) was heated under reflux for 24 h. The mixture was concentrated in vacuo and EtOAc (30 mL) was added to the residue. The organic solution was washed with water (2 × 20 mL), dried (anhy Na₂SO₄) and concentrated in vacuo. The residue was subjected to column chromatography (silica gel; hexane/EtOAc, 99:1) to give amine **27** (130 mg, 41% yield). An analytical sample of **27**-HCl was obtained by adding an excess of Et₂O-HCl to a solution of **27** in EtOAc and filtration of the formed precipitate, mp 191–192 °C. IR: 3034, 2959, 2920, 2887, 2864,

2806, 2674, 2590, 2546, 1526, 1482, 1457, 1420, 1400, 1312, 1162, 1014, 921, 859, 742, 692 cm^{-1} . ^1H NMR 1.25 (s, 6H, C3(7)-CH₃), 1.55 [broad d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 4(6)-H₂], 1.86 [dd, $J = 9.0$ Hz, $J' = 3.0$ Hz, 2H, 4(6)-H₁], 2.05 [s, 4H, 2(8)-H₂], 2.73 [t, $J = 3.0$ Hz, 1H, 5-H], 4.38 [d, $J = 13.5$ Hz, 2H] and 4.60 [d, $J = 13.5$ Hz, 2H] (CH₂C₆H₅), 4.86 (s, mobile H), 7.23 [dm, $J = 8.0$ Hz, 4H, Ar-2(6)-H], 7.34 [tm, $J = 7.5$ Hz, 4H, Ar-3(5)-H], 7.39 (tt, $J = 7.5$ Hz, $J' = 2.0$ Hz, 2H, Ar-4-H). ^{13}C NMR 16.5 [CH₃, C3(7)-CH₃], 44.2 (CH, C5), 47.3 [C, C3(7)], 53.6 [CH₂, C4(6)], 54.5 [CH₂, C2(8)], 58.4 (CH₂, CH₂C₆H₅), 78.0 (C, C1), 130.2 [CH, Ar-C3(5)], 130.9 (CH, Ar-C4), 131.9 [CH, Ar-C2(6)], 132.0 (C, Ar-C1). MS (EI), m/z (%): 331 [M⁺, 1], 316 (2), 289 (43), 198 [(C₆H₅CH₂)₂NH₂]⁺, 10), 91 [(C₆H₅CH₂)⁺, 100]. Anal. Calcd for C₂₄H₂₉N·1.4HCl (382.55): C, 75.34; H, 8.01; N, 3.66; Cl, 12.99. Found: C, 75.34; H, 8.10; N, 3.60; Cl, 13.09. Accurate mass measurement (ESI⁺) calcd for [C₂₄H₂₉N+H]⁺: 332.2372. Found: 332.2382.

4.1.24. N-3,7-Trimethyl(tricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)amine hydrochloride (28-HCl)

A mixture of **23**·HCl (390 mg, 1.33 mmol) and 10% Pd/C (50% in water, 10 mg) in absolute EtOH (80 mL) was hydrogenated at 38 atm and 100 °C for 24 h. The suspension was filtered, the residue was washed with EtOH and the organic layer was concentrated in vacuo to give a solid. Crystallization from MeOH/Et₂O gave **28**·HCl (240 mg, 89% yield). An analytical sample of **28**·HCl was obtained by crystallization from THF, mp 167–168 °C. IR (KBr) 2961, 2939, 2807, 2739, 2521, 2431, 2392, 2370, 1458, 1310, 1161, 1099, 1077, 878 cm^{-1} . ^1H NMR 1.22 [s, 6H, C3(7)-CH₃], 1.47 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 2.0$ Hz, 2H, 4(6)-H₂], 1.75–1.79 [complex signal, 6H, 4(6)-H₁, 2(8)-H₂ and 2(8)-H₁], 2.47 [t, $J = 2.5$ Hz, 1H, 5-H], 2.69 (s, 3H, CH₃-N), 4.85 (s, mobile H). ^{13}C NMR (75.4 MHz) 16.5 [CH₃, C3(7)-CH₃], 30.1 (CH₃, CH₃-N), 43.0 (CH, C5), 47.7 [C, C3(7)], 53.6 [CH₂, C4(6)], 54.4 [CH₂, C2(8)], 68.1 (C, C1). MS (EI), m/z (%): 165 (M⁺, 1), 164 ([M-H]⁺, 8), 150 ([M-CH₃]⁺, 24), 136 (33), 124 (23), 123 (100), 122 (76), 109 (56), 108 (44), 94 (27). Anal. Calcd for C₁₁H₁₉N·HCl·0.15H₂O (204.44): C, 64.63; H, 10.01; N, 6.85. Found: C, 64.71; H, 9.92; N, 6.86.

4.1.25. (3,7-Dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)carboxamide (29)

A solution of acid **20** (1.12 g, 6.22 mmol) in thionyl chloride (18 mL, 0.24 mmol) was heated under reflux for 2 h. The excess thionyl chloride was removed under vacuum, the residue was taken in toluene (5 mL) and evaporated to dryness (twice). The oily yellow residue (1.16 g) was dissolved in CHCl₃, the solution was cooled to 0 °C and NH₄OH (60 mL, 25% aqueous solution) was added dropwise. After stirring for 15 h at room temperature, the suspension was extracted with CH₂Cl₂ (4 × 30 mL). The aqueous layer was made acidic with concd HCl and extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The combined EtOAc extracts were dried (anhyd Na₂SO₄) and concentrated in vacuo to give the starting acid **20** (438 mg). The combined CH₂Cl₂ extracts were washed with brine (2 × 30 mL), dried (anhyd Na₂SO₄), and concentrated in vacuo to give amide **29** (572 mg, 51% yield, 84% yield taking into account the recovered starting acid). An analytical sample of **29** was obtained by crystallization from EtOAc, mp 105–106 °C. IR, 3458, 3410, 3348, 3298, 3199, 3000, 2950, 2883, 1655, 1613, 1478, 1397, 1304, 1160, 790 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl₃) 1.17 (s, 6H, C3(7)-CH₃), 1.37 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 4(6)-H₂], 1.61 [dd, $J = 7.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 2(8)-H₂], 1.62 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 4(6)-H₁], 1.70 [dm, $J = 11.5$ Hz, 2H, 2(8)-H₁], 2.56 [t, $J = 3.0$ Hz, 1H, 5-H], 5.50 (broad signal, 1H), 5.72 (broad signal, 1H) (CONH₂). ^{13}C NMR (CDCl₃) 16.3 [CH₃, C3(7)-CH₃], 43.5 (CH, C5), 47.9 [C, C3(7)], 53.5 [CH₂, C4(6)], 54.5 (C, C1), 57.1 [CH₂, C2(8)], 177.9 (C, CO). MS (EI), m/z (%): 179 (M⁺, 4), 164 (5), 138 (24), 135 [(C₁₀H₁₅)⁺, 21], 124 (39), 123 (42), 95 (100), 93 (38), 91 (34), 81

(72), 80 (33), 79 (60), 77 (40). Anal. Calcd for C₁₁H₁₇NO (179.26): C, 73.70; H, 9.56; N, 7.81. Found: C, 73.64; H, 9.55; N, 7.74.

4.1.26. [(3,7-Dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)methyl]amine hydrochloride (30-HCl)

To a cold (0 °C) solution of **29** (570 mg, 3.18 mmol) in anhyd THF (70 mL), LiAlH₄ (388 mg, 9.72 mmol) was added and the suspension was heated under reflux for 15 h. The suspension was cooled (ice bath), carefully basified with 10 N NaOH (5 mL) and stirred for 1 h at room temperature. The precipitate was filtered and washed with CH₂Cl₂ (3 × 25 mL). The combined filtrate and washings were dried (anhyd Na₂SO₄) and excess of Et₂O·HCl was added. The solution was concentrated in vacuo to give a solid that was crystallized from MeOH/Et₂O to give **30**·HCl (534 mg, 83% yield), mp >270 °C (dec). IR 2952, 2881, 1600, 1505, 1480, 1457, 1389, 1322, 1292 cm^{-1} . ^1H NMR 1.19 (s, 6H, C3(7)-CH₃), 1.39 [dd, $J = 8.0$ Hz, $J' = 4.0$ Hz, 2H, 4(6)-H₂], 1.43 [dd, $J = 8.0$ Hz, $J' = 4.0$ Hz, 2H, 2(8)-H₂], 1.49 [dm, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2(8)-H₁], 1.62 [dd, $J = 8.0$ Hz, $J' = 3.0$ Hz, 2H, 4(6)-H₁], 2.20 [t, $J = 3.0$ Hz, 1H, 5-H], 3.19 (s, 2H, CH₂N), 4.85 (s, mobile H). ^{13}C NMR (75.4 MHz) 16.8 [CH₃, C3(7)-CH₃], 42.8 (CH, C5), 43.8 (CH₂, CH₂N), 48.6 [C, C3(7)], 49.7 (C, C1), 54.6 [CH₂, C4(6)], 56.7 [CH₂, C2(8)]. MS (EI), m/z (%): 166 (1), 165 (M⁺, 1), 152 (3), 151 (3), 148 (8), 136 (26), 135 [(C₁₀H₁₅)⁺, 46], 133 (30), 107 (82), 106 (41), 105 (43), 93 (100), 92 (38), 91 (91), 79 (49), 77 (51), 71 (41). Anal. Calcd for C₁₁H₁₉N·HCl·0.5H₂O (210.75): C, 62.69; H, 10.04; N, 6.65; Cl, 16.82. Found: C, 62.38; H, 9.71; N, 6.58, Cl, 16.55.

4.1.27. N-Benzyl[(3,7-dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)methyl]amine hydrochloride (31-HCl)

From **30**·HCl·0.5H₂O (500 mg, 2.37 mmol), MeOH (10 mL), NaBH₃CN (95%, 335 mg, 5.3 mmol), AcOH (0.3 mL), and benzaldehyde (395 mg, 3.68 mmol) and following the procedure described for **22a**, **31**·HCl (489 mg, 68% yield) was obtained, mp >270 °C (dec). IR: 2948, 2880, 2781, 2371, 1586, 1478, 1447, 1420, 1382, 1355, 1321, 1289, 1237, 1084, 1025, 748, 698 cm^{-1} . ^1H NMR 1.18 (s, 6H, 3(7)-CH₃), 1.37 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 4(6)-H₂], 1.44 [dd, $J = 8.0$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 2(8)-H₂], 1.49 [dm, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2(8)-H₁], 1.61 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.0$ Hz, 2H, 4(6)-H₁], 2.18 [t, $J = 3.0$ Hz, 1H, 5-H], 3.25 (s, 2H, CH₂N), 4.26 (s, 2H, CH₂C₆H₅), 4.86 (s, mobile H), 7.46–7.50 [complex signal, 3H, Ar-3(5)-H and Ar-4-H], 7.55 [m, 2H, Ar-2(6)-H]. ^{13}C NMR 16.7 [CH₃, C3(7)-CH₃], 43.5 (CH, C5), 48.6 [C, C3(7)], 48.9 (C, C1), 51.4 (CH₂, CH₂N), 53.1 (CH₂, C₆H₅CH₂), 54.6 [CH₂, C4(6)], 57.1 [CH₂, C2(8)], 130.3 [CH, Ar-C3(5)], 130.8 (CH, Ar-C4), 131.4 [CH, Ar-C2(6)], 132.1 (C, Ar-C1). MS (EI), m/z (%): 255 (M⁺, 3), 254 ([M-H]⁺, 2), 199 (10), 120 [(C₆H₅CH₂)⁺NH=CH₂], 67), 93 (18), 91 [(C₆H₅CH₂)⁺, 100]. Anal. Calcd for C₁₈H₂₅N·HCl·0.05 H₂O (292.76): C, 73.85; H, 8.99; N, 4.78; Cl, 12.11. Found: C, 73.58; H, 8.91; N, 4.70; Cl, 12.47.

4.1.28. N-Benzyl-N-methyl[(3,7-dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)methyl]amine hydrochloride (32-HCl)

From a solution of **31**·HCl (400 mg, 1.37 mmol), acetonitrile (10 mL), formaldehyde (1.08 mL, 37% wt. in water solution, 13.7 mmol) and two portions of NaBH₃CN (95%, 272 mg, 4.11 mmol) and following the procedure described for **9**, the amine **32** (260 mg, 70.5% yield) was obtained. Its hydrochloride was obtained by adding an excess of Et₂O·HCl to a solution of the amine in EtOAc followed by concentration to dryness in vacuo. The analytical sample of **32**·HCl was obtained by crystallization from EtOAc, mp 215–216 °C. IR: 3030, 3011, 2946, 2879, 2862, 2695, 2635, 2512, 1478, 1455, 1070, 917, 906, 746, 697 cm^{-1} . ^1H NMR 1.18 [s, 6H, C3(7)-CH₃], 1.40 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 4(6)-H₂], 1.45–1.60 [complex signal, 4H, 2(8)-H₂ and 2(8)-H₁], 1.62 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.0$ Hz, 2H, 4(6)-H₁], 2.16 [t, $J = 3.0$ Hz, 1H, 5-H], 2.89 (s, 3H, CH₃N), 3.43 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H) and 3.54 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H) (CH₂N), 4.33 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H)

and 4.43 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H) ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.49–7.52 [complex signal, 3H, Ar-3(5)-H and Ar-4-H], 7.57 [m, 2H, Ar-2(6)-H]. ^{13}C NMR 16.6 [CH_3 , C3(7)- CH_3], 42.4 (CH_3 , CH_3 -N), 44.8 (CH, C5), 48.5 [C, C3(7)], 48.7 (C, C1), 54.4 [CH_2 , C4(6)], 57.8 [CH_2 , C2(8)], 60.3 (CH_2 , CH_2N), 62.3 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 130.4 [CH, Ar-C3(5)], 130.8 (C, Ar-C1), 131.3 (CH, Ar-C4), 132.5 [CH, Ar-C2(6)]. MS (EI), m/z (%): 269 (M^+ , 7), 213 (15), 134 (87), 120 (13), 107 (10), 93 (15), 92 (13), 91 [$[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2]^+$, 100]. Anal. Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{27}\text{N}\cdot\text{HCl}$ (305.89): C, 74.60; H, 9.23; N, 4.58; Cl, 11.59. Found: C, 74.51; H, 9.26; N, 4.55; Cl, 11.74.

4.1.29. *N,N*-Dimethyl[(3,7-dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)methyl]amine hydrochloride (33 HCl)

From a cold (0 °C) solution of **30** HCl (80 mg, 0.48 mmol) in Et_2O (5 mL), formaldehyde (1.0 mL, 37% wt. in water solution, 12.7 mmol) and formic acid (0.85 mL, 22 mmol) and following the procedure described for **17**, **33** HCl was obtained. The analytical sample of **33** HCl (68 mg, 61% yield) was obtained by crystallization from THF, mp >250 °C. IR (KBr): 2952, 2884, 2691, 1479, 1412, 1316, 1211, 1136, 973, 948 cm^{-1} . ^1H NMR 1.20 [s, 6H, C3(7)- CH_3], 1.43 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 4(6)- H_α], 1.52 [dd, $J = 7.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 2(8)- H_α], 1.57 [dm, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2(8)- H_β], 1.65 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.0$ Hz, 2H, 4(6)- H_β], 2.25 [t, $J = 3.0$ Hz, 1H, 5-H], 2.93 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{N}$), 3.47 (s, 2H, CH_2N), 4.85 (s, mobile H). ^{13}C NMR 16.6 [CH_3 , C3(7)- CH_3], 44.7 (CH, C5), 45.1 (CH_3 , CH_3 -N), 48.5 [C, C3(7)], 54.5 [CH_2 , C4(6)], 57.7 [CH_2 , C2(8)], 62.5 (CH_2 , CH_2N). The signal corresponding to C1 was not observed. MS (EI), m/z (%): 193 (M^+ , 3), 137 (5), 107 (7), 93 (12), 91 (11), 58 [$[\text{Me}_2\text{NCH}_2]^+$, 100]. Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}\cdot 1.6\text{HCl}$ (251.67): C, 62.04; H, 9.85; N, 5.57. Found: C, 62.23; H, 10.16; N, 5.76. Accurate mass measurement (ESI⁺) calcd for $[\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}+\text{H}]^+$: 194.1903. Found: 194.1909.

4.1.30. *N*-[(3,7-Dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)methyl]piperidine hydrochloride (34 HCl)

From **30** HCl (201 mg, 1.00 mmol), DMF (2.5 mL), anhyd Et_3N (0.4 mL, 2.9 mmol), 1,5-dibromopentane (0.17 mL, 1.2 mmol) and following the procedure described for **11**, **34** HCl (111 mg, 41% yield) was obtained. The analytical sample of **34** HCl was obtained by crystallization from 2-propanol, mp >265 °C (dec). IR: 2948, 2879, 2857, 2644, 2580, 2534, 1477, 1455, 1438, 1376, 1318, 950 cm^{-1} . ^1H NMR 1.20 [s, 6H, C3(7)- CH_3], 1.43 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 4(6)- H_α], 1.52 [dd, $J = 7.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 3H, 2(8)- H_α], 1.50–1.55 (overlapped m, 1H, 4'- H_{ax}), 1.57 [dm, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2(8)- H_β], 1.65 [dd, $J = 9.0$ Hz, $J' = 3.0$ Hz, 2H, 4(6)- H_β], 1.75–1.97 [broad signal, 5H, 4'- H_{eq} , 3'(5')- H_{ax} , and 3'(5')- H_{eq}], 2.24 [t, $J = 2.5$ Hz, 1H, 5-H], 3.02 [broad signal, 2H, 2'(6')- H_{ax}], 3.42 (s, 2H, CH_2N), 3.53 [broad signal, 2H, 2'(6')- H_{eq}], 4.85 (s, mobile H). ^{13}C NMR 16.6 [CH_3 , C3(7)- CH_3], 22.5 (CH_2 , C4'), 23.8 [CH_2 , C3'(5')], 45.1 (CH, C5), 48.4 [C, C3(7)], 49.4 (C, C1), 54.5 [CH_2 , C4(6)], 55.3 [CH_2 , C2(6')], 58.1 [CH_2 , C2(8)], 61.5 (CH_2 , CH_2N). MS (EI), m/z (%): 233 (M^+ , 9), 177 (14), 98 [$[\text{C}_5\text{H}_{16}\text{NCH}_2]^+$, 100], 93 (13), 91 (13), 84 [$[\text{C}_5\text{H}_{16}\text{N}]^+$, 17]. Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}\cdot\text{HCl}$ (269.86): C, 71.21; H, 10.46; N, 5.19; Cl, 13.14. Found: C, 71.19; H, 10.45; N, 5.17; Cl, 13.12.

4.1.31. *N*-[(3,7-dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)methyl]guanidine hydrochloride (35 HCl)

From a solution of **30** HCl (150 mg, 0.74 mmol), acetonitrile (2.5 mL), anhyd Et_3N (0.2 mL, 1.45 mmol) and 1*H*-pyrazol-1-carboxamide hydrochloride (130 mg, 0.89 mmol) and following the procedure described for **18**, **35** HCl (139 mg, 77% yield) was obtained. The analytical sample of **35** HCl was obtained by crystallization from MeOH/ Et_2O , mp 214–215 °C. IR: 3600–3000 (max at 3376, 3247, 3170), 2948, 2879, 1646, 1456, 1354, 1319, 1291, 1160 cm^{-1} . ^1H NMR 1.18 [s, 6H, C3(7)- CH_3], 1.37 [dd, $J = 7.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 4(6)- H_α], 1.39–1.46 [complex signal, 4H, 2(8)- H_α and 2(8)- H_β], 1.61 [dd, $J = 7.5$ Hz, $J' = 3.0$ Hz, 2H, 4(6)- H_β], 2.12 [t,

$J = 2.5$ Hz, 1H, 5-H], 3.41 (s, 2H, CH_2N), 4.86 (s, mobile H). ^{13}C NMR 16.9 [CH_3 , C3(7)- CH_3], 42.7 (CH, C5), 45.6 (CH_2 , CH_2N), 48.5 [C, C3(7)], 51.5 (C, C1), 54.8 [CH_2 , C4(6)], 56.9 [CH_2 , C2(8)], 158.9 (C, C guanidine). MS (EI), m/z (%): 209 (9), 208 [$[\text{M}+\text{H}]^+$, 9], 195 (5), 194 (5), 167 (14), 166 (15), 154 (12), 153 (12), 148 (17), 133 (31), 119 (22), 107 (81), 106 (42), 105 (48), 93 (83), 92 (38), 91 (100), 79 (46), 77 (66), 75 (39), 74 (38), 63 (47), 62 (68), 61 (48). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\cdot\text{HCl}\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (270.80): C, 53.22; H, 9.30; N, 15.52. Found: C, 53.37; H, 9.03; N, 15.52.

4.1.32. *N*-Methyl[(3,7-dimethyltricyclo[3.3.0.0^{3,7}]oct-1-yl)methyl]amine hydrochloride (36 HCl)

From **32** HCl (200 mg, 0.65 mmol), 10% Pd/C (50% in water, 10 mg) and absolute ethanol (25 mL) and following the procedure described for **28**, **36** HCl (120 mg, 85% yield) was obtained after crystallization from MeOH/ Et_2O , mp >255 °C. IR: 2952, 2880, 2764, 1588, 1458, 1427, 1385, 1325, 1292, 1088, 1022, 806 cm^{-1} . ^1H NMR 1.19 [s, 6H, C3(7)- CH_3], 1.40 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 4(6)- H_α], 1.43–1.46 [dd, $J = 7.5$ Hz, $J' = 3.5$ Hz, 2H, 2(8)- H_α], 1.50 [dm, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2(8)- H_β], 1.61 [dd, $J = 8.5$ Hz, $J' = 3.0$ Hz, 2H, 4(6)- H_β], 2.22 [t, $J = 3.0$ Hz, 1H, 5-H], 2.74 (s, 3H, CH_3N), 3.27 (s, 2H, CH_2N), 4.86 (s, mobile H). ^{13}C NMR 16.7 [CH_3 , C3(7)- CH_3], 34.8 (CH_3 , CH_3N), 43.2 (CH, C5), 48.6 [C, C3(7)], 54.0 (CH_2 , CH_2N), 54.6 [CH_2 , C4(6)], 57.0 [CH_2 , C2(8)]. The signal corresponding to C1 was not observed. MS (EI), m/z (%): 179 (M^+ , 4), 165 (5), 164 (4), 148 (6), 147 (6), 136 (15), 135 [$[\text{C}_{10}\text{H}_{15}]^+$, 34], 134 (32), 133 (27), 124 (26), 123 (29), 107 (71), 106 (35), 105 (44), 93 (100), 92 (38), 91 (97), 79 (42), 77 (56). Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}\cdot\text{HCl}\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (224.77): C, 64.12; H, 10.31; N, 6.23. Found: C, 64.22; H, 10.24; N, 6.35.

4.2. Trypanosoma brucei culturing and drug test

Cultures of bloodstream form *T. brucei* (strain 427) were maintained at 37 °C in modified Iscove's medium (pH 7.4).²⁰ Trypanocidal activity was assessed by growing parasites for 48 h in the presence of various drug concentrations and determining the levels which inhibited growth by 50% (IC_{50}) and 90% (IC_{90}). In the case of untreated cultures (volume 4 mL), cell densities increased from 0.25×10^5 to 1×10^6 cells mL^{-1} over this period. Experiments were performed in triplicate. Cell densities at each drug concentration were determined using a hemocytometer (Weber Scientific International Ltd), and drug sensitivity was expressed as a percentage of growth of control cells.

4.3. NMDA receptor antagonist activity

The functional assay of antagonist activity at NMDA receptors was performed using primary cultures of cerebellar granule neurons, which were prepared according to established protocols.¹⁸ Cells were grown on 10 mm poly-L-lysine coated glass cover slips, and used for the experiments after 7–14 days in vitro. Cells were loaded with 6 μM Fura-2 AM (Invitrogen-Molecular Probes) for 45 min. Afterwards, the coverslip was mounted on a quartz cuvette containing a Locke-Hepes buffer using a special holder. Measurements were performed using a PerkinElmer LS-50B fluorometer equipped with a fast-filter accessory, under mild agitation and at 37 °C. Analysis from each sample was recorded real-time during 1200 s. After stimulation with NMDA or glutamate (100 μM , in the presence of 10 μM glycine), increasing cumulative concentrations of the compound to be tested were added. The percentages of inhibition at every tested concentration were analyzed using a non-linear regression curve fitting (variable slope) by using the software GraphPad Prism 4.0.

4.4. Antiviral evaluation

The antiviral activity of the compounds was determined in established cell culture assays using a selection of DNA and RNA viruses, including three subtypes of influenza virus [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1); A/Hong Kong/7/87 (H3N2) and B/Hong Kong/5/72].²¹ The compounds' inhibitory effect on virus replication as well as their cytotoxicity were monitored by microscopical examination, and confirmed by the colorimetric MTS cell viability assay.

4.5. Dopaminergic evaluation

4.5.1. Synaptosomal preparation

Female Wistar rats (200–250 g) were used throughout. Briefly, rats were killed by decapitation and the striatum was dissected and homogenized in 10 volumes (w/v) of 0.32 M sucrose using a Potter–Elvehjem. The resulting crude synaptosomal preparation was centrifuged at 1000g for 10 min. The supernatant was stored and the pellet was resuspended in 10 volumes of 0.32 M sucrose and recentrifuged. The two supernatants were combined and the mixture centrifuged at 16,000g for 30 min. The resultant pellet was suspended in 10 volumes of ice-cold Krebs medium. Protein concentrations were determined using the Bradford protein assay.

4.5.2. [³H]DA uptake assay

[³H]Dopamine uptake was evaluated on aliquots of the synaptosomal preparation. After a 10 min preincubation at 37 °C in Krebs buffer containing 10 μM pargyline (to block metabolism of dopamine by monoamine oxidase), [³H]dopamine (47 Ci/mmol, Amersham) was added to a final 0.5 nM concentration. Ten minute incubations were stopped by dilution into ice-cold Krebs medium. Samples were filtered rapidly through Grade 30 fiberglass filters (Schleicher & Schuell) using a Brandel cell harvester (model M-24, Biochemical Research and Development Laboratories, Inc.). Filters were washed twice with 3 mL cold Krebs medium and dried. Non-specific [³H]DA uptake was determined in duplicate samples in the presence of 10 μM nomifensine (dopamine uptake inhibitor). Filters were placed into scintillation mixture (Optiphase 'Hi-safe' 2, Perkin-Elmer) and radioactivity was determined by scintillation spectrometry.

Acknowledgments

Financial support from *Ministerio de Educación y Ciencia* (P.C. and S.V.: Project CTQ2005-02192; F.X.S. and M.P.: Project SAF 2006-13092-CO2-01; A.C.: Project SAF2005-01604; D.C. and D.I.: Project SAF 2007-63142), the *Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neuro-degenerativas (CIBERNED)* and *Comissionat per a Universitats i Recerca* (P.C. and S.V.: Project 2005-SGR-00180, F.X.S., M.P., and A.C.: Project 2005-SGR-00893) is gratefully acknowledged. M.D.D. thanks to the *Ministerio de Educación y Ciencia (FPU Program)*. S.R.P. and J.M.K. acknowledge Wellcome Trust for support.

References and notes

1. (a) Aoki, F. Textbook of Influenza. In Nicholson, K. G., Webster, R. G., Hay, A. J., Eds.; Blackwell Science: Oxford, 1998; pp 457–476; (b) De Clercq, E. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2006, 5, 1015.
2. (a) Geluk, H. W.; Schut, J.; Schlattmann, J. I. M. A. *J. Med. Chem.* 1969, 12, 712; (b) Aldrich, P. E.; Hermann, E. C.; Meier, W. E.; Paulshock, M.; Prichard, W. W.;

- Snyder, J. A.; Watts, J. C. *J. Med. Chem.* 1971, 14, 535; (c) Tilley, T. W.; Levitan, P.; Kramer, M. J. *J. Med. Chem.* 1979, 22, 1009; (d) Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Kolocouris, A.; Marakos, P.; Pouli, N.; Fytas, G.; Ikeda, S.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* 1994, 37, 2896; (e) Kolocouris, N.; Kolocouris, A.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Neyts, J.; Padalko, E.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 3307; (f) Van Derpoorten, K.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Poupert, J. H. *Biomed. Pharmacother.* 1997, 51, 464; (g) Scholtissek, C.; Quack, C.; Klenk, H. D.; Webster, R. G. *Antiviral Res.* 1998, 37, 83; (h) Burstein, M. E.; Serbin, A. V.; Khakhulina, T. V.; Alymova, I. V.; Stotskaya, L. L.; Bogdan, O. P.; Manukhina, E. E.; Jdanov, V. V.; Sharova, N. K. *Antiviral Res.* 1999, 41, 135; (i) Stylianakis, I.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Fytas, G.; Foscolos, G. B.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 1699; (j) El-Emam, A. A.; Al-Deeb, O. A.; Al-Omar, M.; Lehmann, J. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 5107.
3. (a) Danysz, W.; Parsons, C. G.; Kornhuber, J.; Schmidt, W. J.; Quack, G. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997, 21, 455; (b) Palmer, G. C. *Curr. Drug Targets* 2001, 2, 241.
4. (a) Kelly, J. M.; Miles, M. A.; Skinner, A. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43, 985; (b) Kelly, J. M.; Quack, G.; Miles, M. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 1360.
5. (a) Martínez, A. G.; Vilar, E. T.; Fraile, A. G.; Cerezo, S. D.; Herrero, M. E. R.; Ruiz, P. M.; Subramanian, L. K.; Gancedo, A. G. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 4474; (b) Miller, J. A.; Ullah, G. M.; Welsh, G. M.; Hall, A. C. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 7503; (c) Gregory, W. A. U.S. Patent 3 558 704, 1971.; (d) Aigami, K.; Inamoto, Y.; Takashi, N.; Fujikura, Y.; Takatsuki, A.; Tamura, G. *J. Med. Chem.* 1976, 19, 536.
6. Zhou, J. J. P.; Li, J.; Upadhyaya, S.; Eaton, P. E.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 1165.
7. (a) Geldenhuys, W. J.; Malan, S. F.; Bloomquist, J. R.; Marchand, A. P.; van der Schyf, C. J. *Med. Res. Rev.* 2005, 25, 21; (b) Geldenhuys, W. J.; Malan, S. F.; Bloomquist, J. R.; van der Schyf, C. J. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 1525.
8. (a) Camps, P.; Muñoz-Torrero, D. *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 3187; (b) Camps, P.; Font-Bardia, M.; Muñoz-Torrero, D.; Solans, X. *Liebigs Ann.* 1995, 523; (c) Camps, P.; Muñoz-Torrero, D.; Muñoz-Torrero, V. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 1917.
9. (a) Camps, P.; Figueredo, M. *Can. J. Chem.* 1984, 62, 1184; (b) Camps, P.; Iglesias, C.; Rodríguez, M. J.; Granchar, M. D.; Gregori, M. E.; Lozano, K.; Miranda, M. A.; Figueredo, M.; Linares, A. *Chem. Ber.* 1988, 121, 647; (c) Camps, P.; Estiarte, M. A.; Vázquez, S.; Pérez, F. *Synth. Commun.* 1995, 25, 1287; (d) Camps, P.; Font-Bardia, M.; Pérez, F.; Solans, X.; Vázquez, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 912; (e) Camps, P.; Luque, F. J.; Orzoco, M.; Pérez, F.; Vázquez, S. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 8605; (f) Camps, P.; Lukach, A.; Vázquez, S. *Tetrahedron* 2001, 57, 2419; (g) Camps, P.; Lukach, A.; Pujol, X.; Rossi, R. A. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 5366; (h) Camps, P.; Pujol, X.; Vázquez, S. *Tetrahedron* 2002, 58, 10081; (i) Ayats, C.; Camps, P.; Duque, M. D.; Font-Bardia, M.; Muñoz, M. R.; Solans, X.; Vázquez, S. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 8715; (j) Camps, P.; Muñoz, M. R.; Vázquez, S. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 1945; (k) Camps, P.; Fernández, J. A.; Font-Bardia, M.; Solans, X.; Vázquez, S. *Tetrahedron* 2005, 61, 3593; (l) Ayats, C.; Camps, P.; Font-Bardia, M.; Muñoz, M. R.; Solans, X.; Vázquez, S. *Tetrahedron* 2006, 62, 7436; (m) Camps, P.; Muñoz, M. R.; Vázquez, S. *Tetrahedron* 2006, 62, 7645; (n) Ayats, C.; Camps, P.; Fernández, J. A.; Vázquez, S. *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 1522; (o) Camps, P.; Colet, G.; Delgado, S.; Muñoz, M. R.; Pericás, M. A.; Solà, I.; Vázquez, S. *Tetrahedron* 2007, 63, 4669; (p) Ayats, C.; Camps, P.; Font-Bardia, M.; Solans, X.; Vázquez, S. *Tetrahedron* 2007, 63, 8027.
10. We found a patent that claimed antiviral activity for some bisnor- and noradamantane derivatives, but activity details are not given. See, Hoover, J. R. E. U.S. Patent 3496228, 1970. For the anti-influenza activity of **7** see Ref 2g.
11. Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*; Oxford University Press: Oxford, 2005; pp 204–205.
12. Jawdosciuk, M.; Kovacic, P. *Synth. Commun.* 1993, 13, 53.
13. Casanova, J.; Devi, P. *Synth. Commun.* 1993, 23, 245.
14. Okazaki, T.; Isobe, H.; Kitagawa, T.; Takeuchi, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1996, 69, 2053.
15. Barret, M. P. *Lancet* 2006, 367, 1377.
16. (a) Kolocouris, N.; Zoidis, G.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Prathalingam, R.; Kelly, J. M.; Naescens, L.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 4358; (b) Papanastasiou, I.; Tsoinis, A.; Kolocouris, N.; Prathalingam, R.; Kelly, J. M. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 1496.
17. Robinson, D. M.; Keating, G. M. *Drugs* 2006, 66, 1515.
18. Canudas, A. M.; Pubill, D.; Suredá, E. X.; Verdaguier, E.; Camps, P.; Muñoz-Torrero, D.; Jiménez, A.; Camins, A.; Pallàs, M. *Exp. Neurol.* 2003, 180, 173.
19. Mizoguchi, K.; Yokoo, H.; Yoshida, M.; Tanaka, T.; Tanaka, M. *Brain Res.* 1994, 662, 255.
20. Hirumi, H.; Hirumi, K. *J. Parasitol.* 1989, 75, 985.
21. (a) De Clercq, E.; Cools, M.; Balzarini, J.; Márquez, V. E.; Borcherding, D. R.; Borchardt, R. T.; Drach, J. C.; Kitaoka, S.; Konno, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, 33, 1291; (b) Setaki, D.; Tataridis, D.; Stamatou, G.; Kolocouris, A.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Kolocouris, N.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Chem.* 2006, 34, 248.

Artículo 2

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18 (2008) 6156–6160



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



Comparisons of the influenza virus A M2 channel binding affinities, anti-influenza virus potencies and NMDA antagonistic activities of 2-alkyl-2-aminoadamantanes and analogues

Antonios Kolocouris^{a,*}, Philip Spearpoint^b, Stephen R. Martin^b, Alan J. Hay^b,
Marta López-Querol^c, Francesc X. Sureda^c,
Elizaveta Padalko^d, Johan Neyts^d, Erik De Clercq^d

^aFaculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis-Zografou, GR-15771 Athens, Greece

^bMRC National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, UK

^cUnitat de Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, c./St. Llorenç 21, 43201 Reus.

^dCIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

^dRega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2008

Revised 29 September 2008

Accepted 2 October 2008

Available online 5 October 2008

Keywords:

Amantadine

Aminoadamantane derivatives

M2 ion channel

Influenza A

Binding affinity

Antiviral activity

NMDA antagonistic activity

ABSTRACT

The new 2-alkyl-2-aminoadamantanes and analogues **4–10** were designed and synthesized by simplification of the structure of the potent anti-influenza virus A spiranic aminoadamantane heterocycles **2** and **3**. The aim of the present work was to examine the effects of bulky and extended lipophilic moieties attached to amantadine **1** on binding to the M2 channel and the resulting antiviral potency. The binding affinities of the compounds to the M2 protein of influenza virus A/chicken/Germany/27 (Weybridge strain; H7N7) were measured for the first time using an assay based on quenching of Trp-41 fluorescence by His-37 protonation, and their antiviral potencies were evaluated against the replication of influenza virus A H2N2 and H3N2 subtypes and influenza virus B in MDCK cells. Of the various 2-alkyl-2-aminoadamantanes, and analogues, spiro[piperidine-2,2'-adamantane] **3** had the strongest M2 binding and antiviral potency, which were similar those of amantadine **1**. The relative binding affinities suggested that the rigid carbon framework provided by the pyrrolidine or piperidine rings results in a more favorable orientation inside the M2 channel pore as compared to large, freely rotating alkyl groups. The aminoadamantane derivatives exhibited similar NMDA antagonistic activity to amantadine **1**. A striking finding was the antiviral activity of the adamantanols **4**, and **6**, which lack any NMDA antagonist activity.

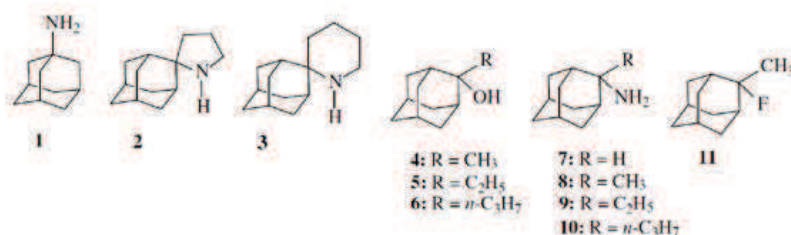
© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Influenza presents a severe threat to public health. More casualties were inflicted in Europe in the twentieth century by influenza than any other infectious disease.¹ Furthermore, although the cumulative impact of recurrent annual epidemics is greater than that of the infrequent pandemics, the specter of another influenza pandemic caused by H5N1 'Bird Flu' or other subtype highlights the importance of anti-influenza drugs as a first line of defense against such a threat. The H5N1 avian influenza virus that emerged in 1996 in southern China, and caused the deaths of six of the 18 infected individuals in Hong Kong during 1997, are now endemic in domestic poultry in many countries and have spread across three continents, Asia, Africa and Europe.² From late 2003 to date, the virus has infected 385 humans with 243 (63%) fatalities.^{2c} Infections by other influenza virus A subtypes also pose a threat. Another highly pathogenic avian influenza virus subtype

H7N7 which caused some 89 mild infections in the Netherlands in 2003 also caused the death of a veterinarian, while in the same year H9N2 viruses were isolated from individuals with mild influenza.² The M2 protein of influenza virus A is the target of one of two classes of anti-influenza drugs that could help to control influenza infections.³

Amantadine **1** (Scheme 1) was the first anti-influenza drug to be developed. It inhibits the function of the M2 proton channel of influenza virus A involved in virus entry and uncoating at micromolar concentrations.^{4,5} Acidification of the virion, mediated by the M2 H⁺ channel during endocytosis, causes the dissociation of viral ribonucleoprotein from the matrix protein, a critical early step in initiating virus replication. In addition, during infection by some highly pathogenic influenza viruses, including H5 and H7 subtypes, it regulates the pH of the *trans* Golgi to assist maturation of the haemagglutinin (HA) and the release of progeny virus from the cell.^{11,4b} During the past fourteen years we have synthesized many potent aminoadamantane derivatives.^{6,7} The proton-

* Corresponding author. Tel.: +301 210 7274834; fax: +301 210 7274747.
E-mail address: ankol@pharm.uoa.gr (A. Kolocouris).



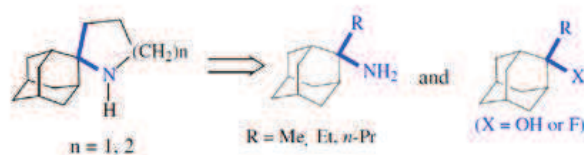
Scheme 1.

ated form of these compounds are considered to block the tetrameric M2 ion channel pore,⁸ formed by its transmembrane domain M2TM,⁹ and hence, its proton transport function.¹⁰

The desired property of new synthetic aminoadamantane derivatives is of course the effective inhibition of virus replication. However, in order to design effective inhibitors and those active against amantadine-resistant mutants, the mode of interaction of the class of compounds with their receptor should be systematically examined at the molecular level. Although we have tested the *in vitro* potencies of several aminoadamantane derivatives in cell culture⁷ our group has never applied procedures that measure directly changes in physicochemical properties of the target protein which result from drug–receptor interaction. Only recently we examined how these molecules interact with the transmembrane channel of the M2 protein using suitable probe molecules and NMR spectroscopy.¹²

A first approach to assessing the stereoelectronic characteristics of the ligand and to map the complementary M2 receptor binding site is to measure the binding constants of different derivatives. In this paper we report the binding affinities of a series of aminoadamantane compounds to the M2 protein of influenza virus A/chicken/Germany/27 (H7N7 ‘Weybridge’ strain), using an assay based on the quenching of tryptophan-41 fluorescence by histidine-37 protonation in the M2 channel pore (Table 1).¹³

Design pathway. The spiro[pyrrolidine 2^{6,7b}] and the spiro[piperidine 3^{6,7c}] represent two of the most active anti-influenza virus A M2 agents ever synthesized; the selectivity index of the spiro[piperidine-2,2’-adamantane] 3 (SI > 1034) is the highest among aminoadamantanes or other cage structure amines tested till now. In a general sense, compounds 2 or 3 are 2-adamantanamines (2-amantadines) substituted at the 2-position with a carbon chain. Simplification of this structure leads to the design of simple 2-alkyl-2-amantadines and analogues not previously synthesized or tested (Scheme 2).



Scheme 2. Design pathway of the new compounds 4–11 based on simplification of the lead structures 2 ($n = 1$) or 3 ($n = 2$).

The amantadine 1–receptor complex is probably stabilized through formation of hydrogen bonding between the drug’s ammonium group and residues, probably His-37 or Ser-31, within the M2 acceptor site.^{8,10} We examined the effect on M2 binding exerted by replacing the amino group with the hydroxyl group (compounds 4–6) or a fluorine group (compound 11); the hydroxyl group could possibly participate as donor or acceptor and fluorine as acceptor in hydrogen bonding interaction with the receptor. The binding constants of the compounds depicted in Scheme 1 were determined (Table 1).

Synthesis. The tertiary alcohol 4 was obtained after treating adamantanone 12 with CH₃MgI. This is not the preferred method for the preparation of alcohols 5 and 6 due to the bulky adamantanone 12 and to the soft carbanion character of the Grignard reagent making the hydride addition a competitive reaction to the alkyl addition; thus 2-adamantanol is also formed along with the tertiary alcohols 5 or 6.¹⁴ The preparation was effected by the reaction of the relevant organolithium reagent with adamantanone 12.¹⁴ The azides 13–15 were obtained by reaction of the alcohols 4–6 with NaN₃/H₂SO₄/CHCl₃/rt using a concentration of 78% w/w rather than the 57% w/w reported in the literature, which failed to yield 13¹⁵ quantitatively. The amines 8–10 were prepared by means of LiAlH₄/ether/rt reduction of the azides 13–15. The fluoride 11 was prepared after treating the tertiary alcohol 4 with DAST¹⁶ in CH₂Cl₂ at –78 °C (Scheme 3).¹⁷

Binding affinity to influenza virus A M2 protein. The binding affinities¹³ of compounds 4–11 to purified M2 protein of the influenza virus Weybridge strain are depicted in Table 1. 2-Amantadine 7 ($K_d = 2.36 \mu\text{M}$) has a 7.4-fold smaller binding constant compared to that of amantadine drug 1 ($K_d = 0.32 \mu\text{M}$). Spiropiperidine 3 with a K_d of 0.39 μM exhibited a binding affinity similar as to that of amantadine 1. The reduction in ring size by one methylene results in spiro[pyrrolidine 2 with a 3-fold lower binding affinity ($K_d = 1.16 \mu\text{M}$), but 2-fold higher when compared to the binding affinity of 2-amantadine 7. Thus, spiro[pyrrolidine 2 and spiro[piperidine 3, which can be considered to be 2-alkyl-2-aminoadamantanes (Scheme 2), exhibited a 3-fold and 6-fold stronger binding, respectively, with respect to 2-amantadine 7. The effect of attaching simple alkyl groups at the 2-position of 2-amantadine 7 was striking, since it did not result in a more stable complex, as was expected from the higher affinities of spiro[pyrrolidine 2 and spiro[piperidine 3 with respect to 2-amantadine 7; the methyl, ethyl and

Table 1
 Binding constants^a of some amino adamantane derivatives^b and analogues to influenza virus A M2 protein^c

| Compound | K_d (μM) ^d |
|--|--------------------------------------|
| 2-Me-2-AdOH, 4 | No effect |
| 2- <i>n</i> -Pr-2-AdOH, 6 | No effect |
| 2-Me-2-AdF, 11 | >26 |
| 2-AdNH ₂ , 7 | 2.36 |
| 2-Me-2-AdNH ₂ , 8 | 3.60 |
| 2-Et-2-AdNH ₂ , 9 | 6.70 |
| 2- <i>n</i> -Pr-2-AdNH ₂ , 10 | 8.71 |
| Spiro[pyrrolidine-2,2’-adamantane], 2 | 1.16 |
| Spiro[piperidine-2,2’-adamantane], 3 | 0.39 |
| Amantadine, 1 | 0.32 |

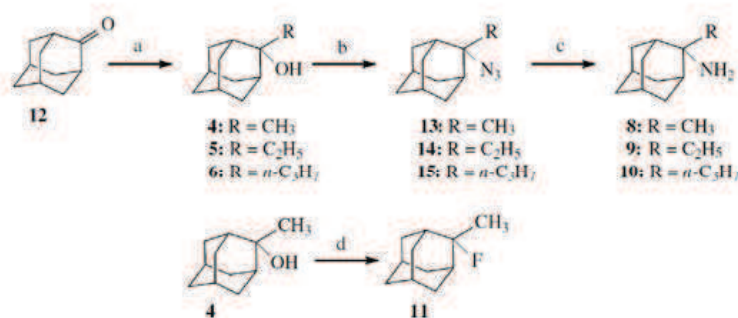
^a Dissociation constants were obtained from the kinetics of inhibition, under equilibrium conditions, of quenching of Trp-41 fluorescence of purified M2 by His-37 protonation at pH 5.¹³

^b Compounds 1–3, 7, 8–10 were tested as hydrochloride salts.

^c Purified M2 protein of influenza virus A/chicken/Germany/27 (H7N7; ‘Weybridge’ strain), expressed in *E. coli*.

6158

A. Kolocouris et al./Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 6156–6160



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) RMgI, ether, THF, rt, 2 h then NH₄Cl/H₂O for **4**, or RLi, Ar, THF, 0 °C, 2 h then NH₄Cl/H₂O for **5**, **6** (quant.); (b) NaN₃, H₂SO₄, 78% w/w, CHCl₃, 0 °C then rt (66–77%); (c) LiAlH₄, ether, rt, 24 h (74–83%); (d) DAST, CH₂Cl₂, Ar, –78 °C (69%).

n-propyl substitutions (compounds **8**, **9** and **10** respectively) reduced the affinity by 1.5-, 2.8- and 3.7-fold, respectively, with respect to 2-amantadine **7**. These findings suggest that the rigid carbon framework in the pyrrolidine and piperidine rings of **2** and **3** fit better, than a free rotating group, into a lipophilic pocket in the M2 receptor. The van der Waals interactions together with appropriate hydrogen bonding appear to result in an overall more favorable orientation of the molecule inside the M2 proton channel. Future structural studies and docking simulations should help to understand the molecular interactions through which these aminoadamantane derivatives (**2**, **3**, **7–10**) bind to M2 channel.

The adamantanol **4** and **6** or the fluoride **17**, having a hydroxyl or a fluorine group, respectively, did not inhibit the low pH-dependent quenching of Trp-41. It therefore seems that the presence of a protonated amino group is crucial for favorable interaction with the receptor using this assay.

NMDA blocking activity. One of the most serious side-effects of amantadine **1** is its CNS-activity, reflected in its anti-Parkinsonism activity, partly due to action on dopamine reuptake and partly through blockade of the NMDA receptor, which influences dopamine release.¹⁸ Also, memantine, which is the most important NMDA antagonist in the aminoadamantane series, is thought to act by blockade of the NMDA channel in exerting its neuroprotective action.¹⁹ Thus, although in developing successful anti-influenza therapeutic agents this activity should be minimized, the ability to antagonize NMDA receptors could result in new leads for further development as neuroprotective agents. For these reasons, the NMDA receptor blocking activity of some representative compounds was evaluated by measuring their ability to inhibit the intracellular calcium increase, induced either by NMDA or by the non-selective agonist glutamate, in *in vitro* cultures of neurons.²⁰

There was a fairly good correlation between results using glutamate or NMDA to stimulate the intracellular calcium increase in

Table 2

Inhibitory activity of glutamate- or NMDA-induced intracellular calcium increase (both 100 μM, in the presence of glycine 10 μM) in cultures of rat cerebellar granule neurons

| Compound ^a | Glutamate (100 μM) | NMDA (100 μM) |
|---|--------------------|---------------|
| Alcohols: 4 , 6 | >350 | >350 |
| 2-AdNH ₂ , 7 | >350 | 219.4 |
| 2-Me-2-AdNH ₂ , 8 | 305.8 | 64.4 |
| 2- <i>n</i> -Pr-2-AdNH ₂ , 10 | 257.8 | 61.3 |
| Spiro[pyrrolidine-2,2'-adamantane], 2 | 314.0 | 50.6 |
| Spiro[piperidine-2,2'-adamantane], 3 | 239.3 | 19.0 |
| Amantadine, 1 | 358.4 | 75.0 |
| Memantine | 55.4 | 1.5 |

^a Compounds **1–3**, **7**, **8**, **10** were tested as hydrochloride salts.

the neurons. The potency of all the compounds was increased using the more specific agonist NMDA. The results of Table 2 showed that all compounds were less active than memantine. The next most actives agents were compounds **3** and **10** being approximately 4.5-fold less active than memantine using glutamate as the agonist. These results showed that the attachment of the amino group to a tertiary carbon of the adamantane ring (1-position) is more favorable for the antagonistic activity than the insertion of the amino group at a secondary adamantane carbon position (2-position). However, the insertion of a carbon chain at the 2-position (compounds **2**, **3**, **8**, **10**) boosts the activity; in these compounds the amino group is therefore connected with a tertiary carbon of the adamantane system. Compared to 2-amantadine **7**, the 2-methyl substitution (compound **8**, IC₅₀ = 64.4 μM using NMDA) resulted in a 3.4-fold enhancement in activity while the 2-propyl substitution (compound **10**) increased only slightly antagonistic activity. The similarities in the activities of the 2-propyl derivative **10** and spiro[pyrrolidine-2,2'-adamantane] **2** suggest that there is not a clear advantage of a freely rotating 2-carbon substituent over a rigid structure. The similarities in the antagonistic activities of the aminoadamantane derivatives **2**, **3**, **8**, **10** against NMDA receptors to that of amantadine, may suggest that they will also cause similar CNS side-effects derived from the interaction with these receptors.

Table 3

Anti-influenza virus A activity and cytotoxicity of aminoadamantane derivatives^a and analogues in influenza A and B infected MDCK cells^b

| Compound | EC ₅₀ (μM) ^c | | | MCC ₅₀ (μM) ^d |
|---|--|--|----------------|-------------------------------------|
| | A/ H ₂ N ₂ ^b | A/ H ₂ N ₂ ^b | B ^b | |
| 2-Amantadine, 7 | 2.8 | – | Inactive | >1333 |
| 2-Me-2-AdOH, 4 | 3.0 | 10.8 | Inactive | >1506 |
| 2- <i>n</i> -Pr-2-AdOH, 6 | <2.1 | – | Inactive | >1289 |
| 2-Me-2-AdNH ₂ , 8 | 3.5 | <2.0 | Inactive | >1240 |
| 2-Et-2-AdNH ₂ , 9 | <1.9 | <1.9 | Inactive | >1159 |
| 2- <i>n</i> -Pr-2-AdNH ₂ , 10 | <1.7 | <1.7 | Inactive | >1088 |
| Amantadine, 1 | 1.1 | <0.9 | Inactive | >1333 |
| Spiro[pyrrolidine-2,2'-adamantane], 2 | 1.8 | 1.8 | Inactive | >1099 |
| Spiro[piperidine-2,2'-adamantane], 3 | 1.0 | – | 241 | >1034 |

^a The aminoadamantanes **1–3**, **7–10** were tested as hydrochlorides.

^b Abbreviations and strains used: MDCK; Madin-Darby canine kidney cells; influenza virus A H2N2: A/Japan/305/57; influenza virus A H3N2: X31(A/Hong Kong/1/68 x A/Puerto Rico/8/34 reassortant); influenza B: B/Hong Kong/5/72.

^c Effective concentration, or concentration required to reduce virus-induced cytopathogenicity by 50%.

^d Minimum cytotoxic concentration, or concentration required to cause a microscopically detectable alteration of normal cell morphology. All the data represent mean values for at least two separate experiments.

However, the replacement of the amino group with a hydroxyl group (compounds **4**, **6**) abolished activity.

Anti-influenza viral potency. The potencies of the aminoadamantane derivatives **1–3**, **7**, **8–10** and alcohols **4**, **6** in inhibiting in vitro replication of influenza virus A H₂N₂ and H₃N₂ subtypes and influenza B viruses, was determined using previously reported methods (Table 3).²¹ All compounds were shown to be active against the A/H₂N₂ and H₃N₂ strains, with corresponding low toxicity, and the amines **2**, **3**, **9**, **10** were almost equipotent to amantadine **1**. All compounds tested were inactive at low concentrations against influenza virus B in accordance with their putative mode of action, i.e., their interaction with influenza virus A M2 protein, but inactivity against the influenza B M2 protein.²² Compound **3** reduced influenza virus B cytopathogenicity but only at high concentrations. The latter effect is not specific since high concentrations of amines generally inhibit the low pH-induced, HA-mediated membrane fusion involved in uncoating of influenza virus during endocytosis.²³

Unexpectedly in view of their apparent lack of M2 binding in our in vitro assay, the alcohols **4** and **6** exhibited marked inhibitory activities against influenza virus A (but not B), which for A/Japan/305/57(H2N2) were equivalent to those for the corresponding amines, though lower for X-31(H3N2). These characteristics are consistent with a similar specific mode of action of the alcohols and amines against influenza virus A. It is therefore unlikely that the alcohols **4** and **6** exert their inhibitory activity through a mechanism which is different from inhibition of the M2 channel, and it is likely that the apparent inconsistencies in the results from the two types of experiment are due to differences in the experimental conditions. The fluorescence M2 binding assay was conducted at pH 5 in the presence of low concentrations of detergent (0.1% LDAO),¹³ which may result in lower concentrations of the water insoluble alcohols being available for interaction with the M2 protein. In this respect, recent preliminary results from electrophysiological measurements have shown that the alcohol **4** does inhibit proton currents in M2-expressing mouse erythroleukaemia (MEL) cells,²⁴ although the M2 specificity of the effect has yet to be determined.

The antiviral activities (Table 3) indicate that the 2-ethyl, 2-propyl, spiropyrrolidine and spiropiperidine derivatives **9**, **10**, **2**, **3** exhibited a small increase in potency with respect to the 2-methyl derivative **8**; it appears that enlargement of the alkyl group increases anti-influenza virus A potency. However, the results in Table 1 suggest that increase in size of the freely rotating alkyl group reduces affinity of binding to M2. Thus, as for the alcohols, the relative binding affinities are not directly comparable to the relative antiviral potencies in cell culture; while spiropyrrolidine **2** had a 3.6-fold lower binding constant than amantadine **1** their in vitro potencies were equivalent. In mechanistic terms, in order to inhibit virus replication amantadine **1** must first be solvated in the lipid bilayer²⁵ prior to the blockade of the M2 proton channel inside the acidic endosome or *trans* Golgi in which, like other acidotropic amines, amantadine **1** concentrates. Thus, the observed anti-influenza virus A potencies of the aminoadamantane derivatives can be considered to result from a combination of their ability to reach the site of interaction with the receptor, via membrane penetration, and binding affinity.

The major conclusions from this study can be summarized as follows: (a) Transposition of the amino group from adamantane C-1 in amantadine **1** to C-2 in 2-amantadine **7** resulted in a lower binding affinity to the M2 channel. For the active 2-alkyl-2-aminoadamantane analogues **8–10**, which have an extended lipophilic substituent, the binding affinity was reduced by increasing the size of the rotatable alkyl group. In contrast, on going from 2-methyl-2-amantadine **8** to the pyrrolidine **2** or the piperidine **3** derivatives, the additional lipophilic moiety boosted the binding affinity;

it therefore appears that compounds **2** and **3** bind to M2 protein in a more favorable orientation. Of the 2-alkyl-2-aminoadamantane analogues, spiro[piperidine-2,2'-adamantane] **3** had the stronger binding and antiviral potency, which were similar to those of amantadine **1**. The present SAR study indicates that large and extended lipophilic moieties in the vicinity of adamantane carbon C-2 are compatible with biological activity and suggests that there is a complementary acceptor group/site within the lumen of the M2 channel pore. Thus, the *potency of the new compounds can be rationalized in terms of a larger lipophilic cavity inside the lumen of the M2 channel that can accommodate larger entities than the adamantyl group.* (b) It is apparent that for a series of aminoadamantane compounds, the relative binding affinities to M2 protein are not directly comparable to the relative antiviral potencies in cell culture. (c) The aminoadamantane derivatives tested did not differ from amantadine **1** in their NMDA antagonistic activity. (d) Adamantanols **4**, **6** were found to be active anti-influenza virus A agents without having antagonistic activity against the NMDA receptor in the cell-based assay. The simultaneous presence of anti-influenza virus A activity with potentially no (or fewer) CNS side effects are of particular interest and merit further investigation.

Acknowledgments

This research was in part supported by the Medical Research Council (UK) and by the EU FP6 Programme VIRGIL, Contract Number 503359. F.X.S. gratefully acknowledges financial support from the Spanish *Ministerio de Educación y Ciencia* (Project SAF 2006-13092-CO2-01).

References and notes

- (a) Taubenberger, J. K.; Reid, A. H.; Lourens, R. M.; Wang, R.; Jin, G.; Fanning, T. G. *Nature* **2005**, *437*, 889; (b) Webby, R. J.; Webster, R. G. *Science* **2003**, *302*, 1519.
- (a) Russell, C. J.; Webster, R. G. *Cell* **2005**, *123*, 368; (b) Webster, R. G.; Webby, R. J.; Hoffmann, E.; Rodenberg, J.; Kumar, M.; Chu, H.-J.; Seiler, P.; Krauss, S.; Songserm, T. *Virology* **2006**, *351*, 303; (c) Abdel-Ghafar, A. N.; Chotpitayasunondh, T.; Gao, Z.; Hayden, F. G.; Nguyen, D. H.; de Jong, M. D.; Naghalyayev, A.; Peiris, J. S.; Shindo, N.; Soeroro, S.; Uyek, T. M. *N. Eng. J. Med.* **2008**, *358*, 261.
- (a) Tumpey, T. M.; García-Sastre, A.; Mikulasova, A.; Taubenberger, J. K.; Swayne, D. E.; Palese, P.; Basler, C. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 13849; (b) Ilyushina, N. A.; Bovin, N. V.; Webster, R. G.; Govorkova, E. A. *Antiviral Res.* **2006**, *70*, 121.
- (a) Hay, A. J.; Wolstenholme, A. J.; Skehel, J. J.; Smith, M. H. *EMBO J.* **1985**, *4*, 3021; (b) Hay, A. J. *Semin. Virol.* **1992**, *3*, 21.
- Pinto, L. H.; Holsinger, L. J.; Lamb, R. A. *Cell* **1992**, *69*, 517.
- In *Burger's Medicinal Chemistry*, 5th ed.; Wolff, M. E., Eds.; John Wiley & Sons: New York; Vol. 4, pp 590–591.
- (a) Kolocouris, A. Ph.D. Thesis, University of Athens, Greece, March 1995; (b) Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Kolocouris, A.; Marakos, P.; Poul, N.; Fytas, G.; Ikeda, S.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2896; (c) Kolocouris, N.; Kolocouris, A.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Neyts, J.; Padalko, E.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3307; (d) Fytas, G.; Foscolos, G.; Stamatou, G.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Witvrouw, M.; Pannecouque, C.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *1887*; (e) Kolocouris, A.; Tataridis, D.; Fytas, G.; Foscolos, G.; Mavromoustakos, T.; Kolocouris, N.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *3465*; (f) Stamatou, G.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Fytas, G.; Foscolos, G. B.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2137; (g) Zoidis, G.; Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Kolocouris, A.; Fytas, G.; Karayannis, P.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Antiviral Chem. Chemother.* **2003**, *14*, 153; (h) Stamatou, G.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Pannecouque, C.; Witvrouw, M.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5485; (i) Stylianakis, I.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Fytas, G.; Foscolos, G. B.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1699; (j) Setaki, D.; Tataridis, D.; Stamatou, G.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *34*, 248; (k) Tataridis, D.; Fytas, G.; Kolocouris, A.; Fytas, C.; Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 692.
- Recently an X-ray structure of M2TM and M2TM-amantadine complex was published from the DeGrado's group: (a) Stouffer, A. L.; Acharya, R.; Salom, D.; Levine, A. S.; Di Costanzo, L.; Soto, C. S.; Tereshko, V.; Nanda, V.; Stayrook, S.; DeGrado, W. *Nature* **2008**, *451*, 596; The first work on the amantadine location

6160

A. Kolocouris et al./Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 6156–6160

- inside the M2 protein pore was a neutron diffraction study: (b) Duff, K. C.; Gilchrist, P. J.; Saxena, A. M.; Bradshaw, J. P. *Virology* **1994**, *202*, 287; Elegant solid-state NMR studies on this system have been carried out by T. Cross lab: (c) Hu, J.; Asbury, T.; Achuthan, S.; Li, C.; Bertram, R.; Quine, J. R.; Fu, R.; Cross, T. A. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 4335; For molecular dynamics studies of the M2TM-amantadine or rimantadine complex see: (d) Sansom, M. S. P.; Kerr, I. D. *Protein Eng.* **1993**, *6*, 65; (e) Yi, M.; Cross, T. A.; Zhou, H.-X. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 7977; (f) Intharathep, P.; Laohpongspaisan, C.; Rungrotmongkol, T.; Loiruangsinn, A.; Malaisree, M.; Decha, P.; Aruksakunwong, O.; Chuenpennit, K.; Kaiyawet, N.; Sompornpisut, P.; Pianwanit, S.; Hannongbua, S. *J. Mol. Graph. Model.*, doi:10.1016/j.jmgm.2008.06.002.
9. (a) Wang, C.; Takeuchi, K.; Pinto, L. W.; Lamb, R. A. *J. Virol.* **1993**, *67*, 5585; (b) Chizhmakov, I. V.; Geraghty, F. M.; Ogden, D. C.; Hayhurst, A.; Antoniou, M.; Hay, A. J. *J. Physiol.* **1996**, *494*, 329.
 10. (a) Pinto, L.; Lamb, R. A. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8997; (b) Pinto, L.; Lamb, R. A. *FEBS Lett.* **2004**, *560*, 1; (c) Fischer, W. B.; Sansom, M. S. P. *B.B.A.* **2002**, *1561*, 27; (d) See the articles in *FEBS Lett.* **2003**, *552*, 1.
 11. Grambas, S.; Hay, A. J. *Virology* **1992**, *190*, 11.
 12. (a) Kolocouris, A.; Hansen, R.; Broadhurst, R. W. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4975; (b) Broadhurst, R. W.; Kolocouris, A.; Zikos, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3947.
 13. (a) Czabotar, P. E.; Martin, S. R.; Hay, A. J. *Virus Res.* **2004**, *99*, 57; (b) Spearpoint, P. Ph.D. Thesis, MRC National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, UK, 2007.
 14. (a) Fry, J. L.; Engler, E. M.; Schleyer, v. R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4628; (b) Duddeck, H.; Rosenbaum, D. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1700.
 15. Sasaki, T.; Egushi, S.; Toi, N. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3711.
 16. Middleton, W. J. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 574.
 17. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of all compounds were assigned using the 2D COSY, HMQC and NOESY experiments. **8**: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.44 (s, 3H, CH_3), 1.56 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.69 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 8'eq, 10'eq-H), 1.67 (~br s, 2H, 6'-H), 1.72 (~br s, 2H, 1', 3'-H), 1.81 (m, 2H, 5', 7'-H), 1.88 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.11 (d, $J \sim 12$ Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 23.3 (CH_3), 27.0, 27.4 (5', 7'-C), 33.5 (4', 9'-C), 34.0 (8', 10'-C), 36.4 (1', 3'-C), 38.4 (6'-C), 67.3 (2'-C); **10**: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.16 (s, 3H, CH_3), 1.39 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.54 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 8'eq, 10'eq-H), 1.58 (~br s, 2H, 6'-H), 1.62 (~br s, 2H, 1', 3'-H), 1.75 (~br s, 2H, 5', 7'-H), 1.94 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.0 (d, $J \sim 12$ Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 27.3 (CH_3), 27.6, 27.9 (7', 5'-C), 33.1 (4', 9'-C), 34.7 (8', 10'-C), 38.9 (1', 3'-C), 39.5 (6'-C), 52.9 (2'-C).
 18. Mizoguchi, K.; Yokoo, H.; Yoshida, M.; Tanaka, T.; Tanaka, M. *Brain Res.* **1994**, *662*, 255.
 19. Parsons, C. G.; Stöfler, A.; Danysz, W. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 699.
 20. Canudas, A. M.; Pubill, D.; Sureda, F. X.; Verdaguer, E.; Camps, P.; Muñoz-Torres, D.; Jiménez, A.; Camins, A.; Pallàs, M. *Exp. Neurol.* **2003**, *180*, 123.
 21. Shigeta, S.; Konno, K.; Yokota, T.; Nakamura, K.; De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 906.
 22. Mould, J. A.; Paterson, R. G.; Takeda, M.; Ohigashi, Y.; Venkataraman, P.; Lamb, R. A.; Pinto, L. H. *Dev. Cell* **2003**, *5*, 175.
 23. Ohkuma, S.; Poole, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, *75*, 3327.
 24. Unpublished results.
 25. Mason, R. P.; Rhodes, D. G.; Herbert, L. G. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 869.

Artículo 3

Bioorganic & Medicinal Chemistry 17 (2009) 3198–3206



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



Synthesis and pharmacological evaluation of (2-oxadamant-1-yl)amines

María D. Duque^a, Pelayo Camps^a, Lenuta Profire^a, Silvia Montaner^a, Santiago Vázquez^{a,*}, Francesc X. Sureda^b, Jordi Mallol^b, Marta López-Querol^b, Lieve Naesens^c, Erik De Clercq^c, S. Radhika Prathalingam^d, John M. Kelly^d

^aLaboratori de Química Farmacèutica (Unitat Associada al CSIC), Facultat de Farmàcia, and Institute of Biomedicine (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643, Barcelona E-08028, Spain

^bUnitat de Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, c./St. Llorenç 21, Reus E-43201, Spain

^cRega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

^dLondon School of Hygiene and Tropical Medicine, Department of Infectious and Tropical Diseases, Keppel Street, London WC1E 7HT, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2008

Revised 5 February 2009

Accepted 6 February 2009

Available online 13 February 2009

Keywords:

NMDA
Memantine
Amantadine
Adamantane
NGP1-01
Trypanosoma
Cage compounds

ABSTRACT

The synthesis of several (2-oxadamant-1-yl)amines is reported. They were evaluated as NMDA receptor antagonists and several of them were more active than amantadine, but none was more potent than memantine. None of the tested compounds displayed antiviral activity. Two of the derivatives showed a significant level of trypanocidal activity.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

1-Adamantylamine (amantadine) and its 3,5-dimethyl analogue, memantine, are NMDA receptor antagonists approved for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's disease, respectively.¹ Amantadine also has prophylactic and therapeutic activities in influenza A virus infections², and related adamantane derivatives show antiviral activity.³ Moreover, amantadine, memantine, and related polycyclic amines possess trypanocidal properties.⁴

It is well known in medicinal chemistry that substitution of a methylene unit in a bioactive compound for an oxygen atom usually leads to analogues showing similar activity to the parent compound.⁵ Indeed, NGP1-01, a brain-permeable, oxa-polycyclic cage amine, is a dual action uncompetitive NMDA receptor antagonist and blocker of L-type calcium-channels. In addition, several experiments have shown that NGP1-01 has neuroprotective activity (Fig. 1).⁶

Based on the interesting and widely observed biological activity of amantadine, memantine, and NGP1-01, we therefore sought to

explore the biological profile of (2-oxadamant-1-yl)amine derivatives.

In this paper, we report the synthesis of several (2-oxadamant-1-yl)amines and related compounds and their pharmacological evaluation as NMDA receptor antagonists, and antivirals and trypanocidal agents.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Starting from the known diketone **1**,⁷ we have prepared amines **2–4**, **7**, **8**, and **10–15** using classical methods in amine chemistry (see Scheme 1).

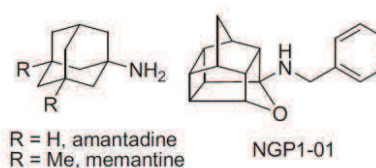


Figure 1. Amantadine, memantine, and NGP1-01 structures.

* Corresponding author. Tel.: +34 934024533; fax: +34 934035941.
E-mail address: svazquez@ub.edu (S. Vázquez).

Secondary amines **2a** and **2b** were obtained in high yields following a known general procedure that involves reductive amination of diketone **1**.⁸ Thus, reaction of **1** with benzylamine followed by reduction with LiAlH₄ led to amine **2a** in 58% yield. Similarly, reductive amination of **1** with phenethylamine furnished amine **2b** in 51% yield. Reductive alkylation of amines **2a,b** with formaldehyde and sodium cyanoborohydride afforded tertiary amines **3a,b** in high yields. Hydrogenolysis of the benzyl group of amines **2a** and **3a** led to **7** and **4**, respectively. Finally, alkylation of **2a** with benzyl chloride led to **8** in 85% yield.

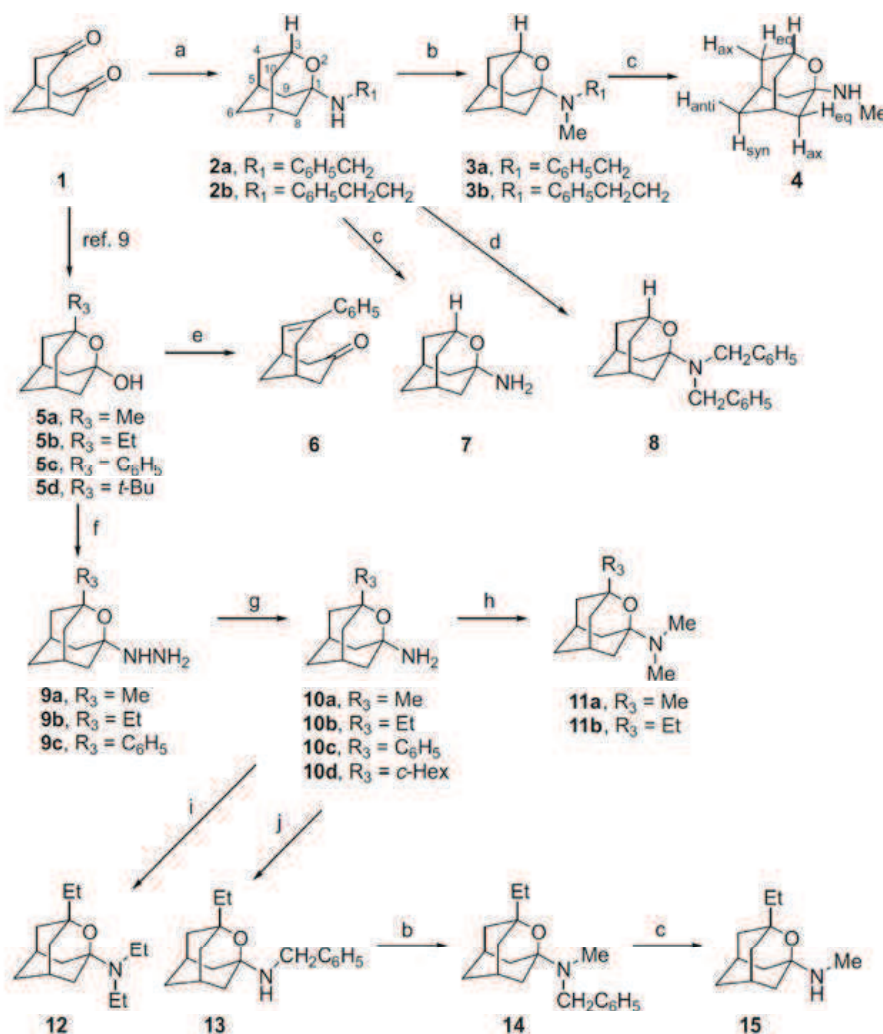
Alcohols of general structure **5** were prepared using a general method developed some time ago by our group.⁹ Several attempts to carry out the substitution of the hydroxyl group of **5** by a wide range of amines led to the recovery of the starting material. Moreover, the attempted Ritter reaction of **5c** with acetonitrile in acidic medium led to the known enone **6** in high yield.^{9c} However, reaction of **5a–c** with aqueous hydrazine led to hydrazines **9a–c** in high yields, probably due to the α -effect ensuring a higher nucleophilicity of hydrazine. Even though the reaction failed in the case of **5d**,

Catalytic hydrogenation of **9a,b** furnished amines **10a,b** in high yields. Surprisingly, **9c** led to a mixture of the expected amine **10c** and the cyclohexyl derivative **10d** in the ratio of 3:4. Both products were separated by column chromatography. Reductive methylation of amines **10a** and **10b** with formaldehyde and sodium cyanoborohydride afforded tertiary amines **11a** and **11b**, respectively. In a similar way, reductive alkylation of **10b** with acetaldehyde or benzaldehyde led to amines **12** and **13**, respectively. Finally, secondary amine **15** was synthesized from benzylamine **13** by reductive alkylation followed by catalytic debenzoylation in good overall yield.

The structure of all new compounds was confirmed by elemental analysis or by accurate mass measurement, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, and mass spectral data.

2.2. NMDA receptor antagonist activity

In the last years there has been an intensive research on the development of new NMDA receptor antagonists, since this sub-



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) Benzylamine or phenethylamine, anhyd THF, reflux, 30 min; then, LiAlH₄, anhyd Et₂O, reflux, 6 h; 58% for **2a**, 51% for **2b**; (b) formaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, acetonitrile, 4 h; 99% for **3a**, 88% for **3b**, 86% for **14**; (c) H₂ (38 atm), 100 °C, Pd/C, EtOH, 24 h; 59% for **4**, 70% for **7**, 85% for **15**; (d) benzyl chloride, K₂CO₃, NaI, acetonitrile, reflux; 18 h, 85%; (e) acetonitrile, H₂SO₄, reflux, 18 h; 90%; (f) hydrazine hydrate, concd HCl, reflux, 18 h; 84% for **9a**, 45% for **9b**, 62% for **9c**; (g) H₂ (1 atm), PtO₂, EtOH, 4 days; 58% for **10a**, 48% for **10b**, 29% for **10c** and 42% for **10d**; (h) HCO₂H, CH₂O 37% aq, 80 °C, 10 h; 51% for **11a**, 27% for **11b**; (i) acetaldehyde, NaBH₃CN, acetic acid, MeOH, 18 h, 73%; (j) benzaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, acetonitrile, 4 h, 79%.

3200

M. D. Duque et al./Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 3198–3206

Table 1
IC₅₀ (μM) values for (2-oxaadamtant-1-yl)amines as NMDA antagonists^{a,b}

| Compound | Glutamate (100 μM) | NMDA (100 μM) |
|------------|--------------------|---------------|
| 10b | 223 ± 52 | 83 ± 6 |
| 10c | 350 ± 108 | 226 ± 37 |
| 10d | >500 | 94 ± 13 |
| 11b | 106 ± 10 | 55 ± 12 |
| 12 | 22 ± 7 | 14 ± 3 |
| 15 | 108 ± 17 | 32 ± 9 |
| Amantadine | 358 ± 130 | 92 ± 29 |
| Memantine | 55 ± 12 | 1.5 ± 0.1 |

^a Functional data were obtained from primary cultures of cerebellar granule neurons using the method described in the experimental section by measuring the intracellular calcium concentration. Cells were challenged with glutamate (2nd column) or NMDA (3rd column) as indicated. Data shown are means ± SEM of at least three separate experiments carried out on three different batches of cultured cells.

^b Compounds **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4**, **7**, **8**, **9a**, **10a**, **11a**, **13**, and **14** were found to have low potency as glutamate (IC₅₀ > 500 μM) and NMDA receptor antagonists (IC₅₀ > 200 μM). Hydrazines **9b** and **9c** were not evaluated.

type of receptors has been involved in the apoptotic process that develops during neurodegenerative diseases. Memantine is a non-competitive and low affinity blocker that acts selectively on NMDA receptors that is being used in Alzheimer's disease to slow down its progression.¹⁰

The activity of the different (2-oxaadamtant-1-yl)amines was assayed on cerebellar granule neurons loaded with the calcium-sensitive probe Fura-2.¹¹ Addition of glutamate or NMDA (100 μM) in the presence of glycine (10 μM) produced a robust and stable increase in intracellular calcium that was challenged with cumulative additions of the compounds to be tested. The data presented in Table 1 indicate that the presence of a substituent in C-3 in the 2-oxaadamtantane nucleus is essential for NMDA receptor antagonism. Thus, primary amine **7** and all its N-alkylated and N-dialkylated derivatives (**2a,b**, **3a,b**, **4**, and **8**) are inactive as it is the case of the methyl derivatives **10a** and **11a**. Phenyl derivative **10c** is only a weak NMDA receptor antagonist while more lipophilic amines **10b** and **10d** show a similar potency than amantadine. Further enhancement in potency was achieved by alkylation of **10b**, the most active derivative being **12**, a tertiary amine that is seven times more potent than amantadine, but still ten times less potent than memantine. Contrary to our expectations, all the benzyl derivatives were found to be inactive. This is in striking contrast with NGP1-01 that features a benzyl group essential for NMDA receptor antagonism, and with previous work by our groups that found that benzylated ring-contracted analogues of amantadine showed NMDA receptor antagonism.¹²

2.3. Antiviral activity

Primary amines **7**, **10c**, and **10d** and secondary amines **2a**, **4**, and **15** were tested for antiviral activity. None of the tested compounds displayed activity against the enveloped DNA viruses herpes simplex virus (type 1 or type 2) or vaccinia virus; the enveloped RNA viruses feline coronavirus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus, vesicular stomatitis virus, sindbis virus, or Punta Toro virus; or the non-enveloped RNA viruses Coxsackievirus B4 and Reovirus-1. Also none of the compounds was found to be active against influenza virus A/H1N1, A/H3N2, or B.

2.4. Trypanocidal activity

Protozoan parasites of the *Trypanosoma brucei* species complex are the causative agents of African trypanosomiasis, a disease that is invariably fatal unless treated. However, current drugs are characterized by toxicity, the need for administration under medical

supervision, and in many cases, a lack of efficacy. New drugs to combat this important disease are urgently needed. A range of adamantylamine compounds have trypanocidal activity.⁴ We therefore investigated whether this property also extended to (2-oxaadamtant-1-yl)amine derivatives.

All the new derivatives described in this paper were tested for potency against cultured bloodstream form *T. brucei*. As was the case with the NMDA receptor antagonism, the presence of a substitution at the C-3 position in the 2-oxaadamtantane nucleus was found to be essential for trypanocidal activity. Of these compounds, the tertiary amines **11a,b** were found to be the most active. Amine **11b** had an IC₅₀ = 10.92 ± 0.21 μM and an IC₉₀ = 15.54 ± 1.14 μM, while the trimethyl derivative **11a** had an IC₅₀ = 3.97 ± 0.75 μM and an IC₉₀ = 6.82 ± 0.84 μM. Amine **11a** was the most potent compound tested, being approximately twice as active as rimantadine (IC₅₀ = 7.04 ± 0.12 μM; IC₉₀ = 13.97 ± 1.68 μM), and at least 30 times more active than amantadine (IC₅₀ > 130 μM). Amines **2a,b**, **3a,b**, **4**, **7**, and **8**, which lack the C3 substitution, had no activity at concentrations up to 5 mg mL⁻¹. The primary and secondary amines **10a–d**, **13**, and **15** also displayed no significant trypanocidal properties, even though they do carry a substitution at this position.

Several adamantane derivatives have previously been shown to have trypanocidal properties; however the oxanalogues reported here are the first heteroadamtantanes to show significant activity against bloodstream form *T. brucei*.⁴

3. Conclusions

In summary, we have synthesized and fully characterized several (2-oxaadamtant-1-yl)amines. The presence of a substitution at the C-3 position is essential for NMDA receptor antagonism. Although **11b**, **12**, and **15** were more potent than amantadine against NMDA-induced calcium increase in cerebellar granule neurons, they were less potent than memantine. In contrast with the model compound NGP1-01, all our benzyl derivatives were devoid of NMDA receptor antagonism activity. None of the tested compounds showed antiviral activity. Two tertiary amines, **11a** and **11b**, displayed a significant level of trypanocidal activity; **11a** was twice as active as rimantadine. The mechanism by which adamantylamine derivatives kill trypanosomes is unknown, but it has been hypothesized by analogy with the known properties of this class of compound that it may involve channel blocking activity.⁴ The data obtained with the trimethyl amine **11a** now provides a basis for exploring if related derivatives have enhanced activity.

The synthesis and pharmacological evaluation of more polycyclic cage amines are in progress.

4. Experimental

4.1. Chemistry

4.1.1. General

Melting points were determined in open capillary tubes. Unless otherwise stated, NMR spectra were recorded in CD₃OD in the following spectrometers: ¹H NMR (500 MHz), ¹³C NMR (75.4 MHz). Chemical shifts (δ) are reported in ppm are related to internal tetramethylsilane (TMS). Assignments given for the NMR spectra are based on DEPT, COSY ¹H/¹H, HETCOR ¹H/¹³C (HSQC and HMBC sequences for one bond and long range ¹H/¹³C heterocorrelations, respectively), and NOESY experiments for selected compounds. For the MS and GC/MS analyses the sample was introduced directly or through a gas chromatograph. For GC/MS analyses, a 30-meter column [5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane, conditions: 10

psi, initial temperature: 35 °C (2 min), then heating at a range of 8 °C/min till 300 °C, then isothermic at 300 °C] was used. The electron impact (70 eV) or chemical ionization (CH₄) techniques were used. Only significant ions are given; those with higher relative abundance, except for the ions with higher *m/z* values. Accurate mass measurements were obtained using ESI technic. Absorption values in the IR spectra (KBr) are given as wave-numbers (cm⁻¹). Only the more intense bands are given. Column chromatography was performed on silica gel 60 Å (35–70 mesh). For the thin layer chromatography (TLC), aluminum-backed sheets with silica gel 60 F₂₅₄ were used and spots were visualized with UV light and/or 1% aqueous solutions of KMnO₄.

4.1.2. N-Benzyl(2-oxaadmant-1-yl)amine hydrochloride, 2a HCl

To a solution of diketone **1** (6.00 g, 39.4 mmol) in anhyd THF (200 mL), benzylamine (4.29 g, 40.0 mmol) was added and the solution was refluxed for 30 min. After cooling (ice-bath), this solution was added dropwise while stirring vigorously to a suspension of LiAlH₄ (3.00 g, 79.0 mmol) in anhyd diethyl ether (80 mL). The mixture was stirred for 6 h at 40 °C and then, while cooling with an ice-bath, 1 N NaOH (19 mL) was added dropwise. The precipitate formed was filtered through Celite[®], the clear filtrate was dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo to give an oily residue (9.29 g). The residue was dissolved in acetone (120 mL), concd HCl (6 mL) was added and the solution was cooled at 4 °C, whereupon **2a** precipitated as its hydrochloride. Crystallization from 2-propanol gave pure **2a**·HCl (6.39 g, 58% yield), mp 257–259 °C (lit.^{8b} 253–255 °C). IR 2927, 2852, 2712, 2606, 2457, 2408, 2377, 1569, 1456, 1323, 1206, 1194, 1126, 1093, 1008, 994, 754, 739, 695 cm⁻¹. ¹H NMR 1.78 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.90 [dq, *J* = 14.0 Hz, *J'* = 2.5 Hz, 1H, 6-H_{syn}], 1.97 [dtt, *J* = 14.0 Hz, *J'* = 2.5 Hz, *J''* = 1.5 Hz, 1H, 6-H_{anti}], 2.01–2.06 [complex signal, 4H, 4(10)-H_{eq} and 8(9)-H_{ax}], 2.14 [dm, *J* = 11.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.40 [broad s, 2H, 5(7)-H], 4.26 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.39 (broad s, 1H, 3-H), 4.86 (broad signal, mobile H), 7.42–7.49 (complex signal, 3H, Ar-H_{meta} and Ar-H_{para}) 7.50 (m, 2 H, Ar-H_{ortho}). ¹³C NMR 29.4 [CH, C5(7)], 35.0 (CH₂, C6), 35.1 [CH₂, C4(10)], 37.8 [CH₂, C8(9)], 45.1 (CH₂, CH₂-C₆H₅), 73.6 (CH, C3), 86.6 (C, C1), 130.2 (CH, C_{meta}), 130.4 (CH, C_{para}), 131.1 (CH, C_{ortho}), 132.9 (C, C_{ipso}). MS (EI), *m/z* (%): 243 (M⁺, 26), 200 (9), 186 (36), 149 (26), 106 (16), 91 (100). Anal. Calcd for C₁₆H₂₁NO·HCl (279.81): C, 68.68; H, 7.92; N, 5.01; Cl, 12.67. Found: C, 68.51; H, 8.10; N, 5.00; Cl, 12.70.

4.1.3. N-(2-Phenylethyl)(2-oxaadmant-1-yl)amine hydrochloride, 2b HCl

From **1** (3.00 g, 19.7 mmol), phenethylamine (2.55 g, 21.1 mmol) in anhyd THF (100 mL) and following the above procedure, the amine **2b** was obtained as its hydrochloride (2.94 g, 51% yield), mp 256–259 °C (2-propanol). IR 2934, 2855, 2721, 2674, 2617, 2419, 1604, 1467, 1455, 1324, 1209, 1192, 1093, 1018, 1001, 784, 725, 698 cm⁻¹. ¹H NMR 1.74 [dm, *J* = 14.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.87 [dq, *J* = 13.0 Hz, *J'* = 2.5 Hz, 1H, 6-H_{syn}], 1.95 (overlapped dm, 1H, 6-H_{anti}), 1.96–2.03 [complex signal, 4H, 4(10)-H_{eq} and 8(9)-H_{ax}], 2.06 [dm, *J* = 11.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.38 [broad s, 2H, 5(7)-H], 2.99 (m, 2H, CH₂-C₆H₅), 3.28 (m, 2H, CH₂N), 4.33 (broad s, 1H, 3-H), 4.86 (broad signal, mobile H), 7.27 (tm, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H_{para}), 7.29 (dm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{ortho}), 7.35 (tm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{meta}). ¹³C NMR (50.3 MHz) 29.3 [CH, C5(7)], 33.6 (CH₂, CH₂-C₆H₅), 34.9 (CH₂, C6), 35.0 [CH₂, C4(10)], 37.7 [CH₂, C8(9)], 42.4 (CH₂, CH₂NH), 73.5 (CH, C3), 86.3 (C, C1), 128.2 (CH, C_{para}), 129.7 (CH, C_{ortho}), 130.0 (CH, C_{meta}), 137.8 (C, C_{ipso}). MS (EI), *m/z* (%): 257 (M⁺, 1), 200 (10), 167 (12), 166 (100), 137 (54), 105 (22), 104 (27). Anal. Calcd for C₁₇H₂₃NO·HCl (293.84): C, 69.49; H, 8.23; N, 4.77; Cl, 12.07. Found: C, 69.21; H, 8.31; N, 4.71; Cl, 11.98.

4.1.4. N-Benzyl-N-methyl(2-oxaadmant-1-yl)amine, 3a

To a solution of **2a**·HCl (838 mg, 3.00 mmol) in acetonitrile (20 mL), formaldehyde (2.36 mL, 37 wt % in water solution, 30 mmol) and NaBH₃CN (595 mg, 9.00 mmol) were added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature, acetic acid (0.6 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. An additional portion of NaBH₃CN (595 mg, 9.00 mmol) was added and the mixture was further stirred at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated to dryness, 2 N NaOH (30 mL) was added and the suspension was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 45 mL). The combined organic phases were washed with H₂O (2 × 30 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo to give **3a** (765 mg, 99% yield) as a white solid. The analytical sample was obtained by crystallization from CH₂Cl₂, mp 60–61 °C (dec.). IR 2929, 2897, 2838, 1456, 1442, 1381, 1323, 1190, 994, 972, 957, 856, 747 cm⁻¹. ¹H NMR 1.55 [dm, *J* = 13.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.67 [broad d, *J* = 12.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 1.78 (dm, *J* = 13.5 Hz, 1H, 6-H_{syn}), 1.82 (dm, *J* = 13.5 Hz, 1H, 6-H_{anti}), 1.90 [dm, *J* = 13.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 2.16 [dm, *J* = 12.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.26 [broad s, 2H, 5(7)-H], 2.29 (s, 3H, CH₃-N), 3.81 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.17 (broad s, 1H, 3-H), 4.86 (broad signal, mobile H), 7.19 (tm, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H_{para}), 7.28 (tm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{meta}), 7.32 (dm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{ortho}). ¹³C NMR (50.3 MHz) 28.5 [CH, C5(7)], 33.8 (CH₃, CH₃-N), 35.3 (CH₂, C6), 35.4 [CH₂, C4(10)], 38.4 [CH₂, C8(9)], 53.0 (CH₂, CH₂-C₆H₅), 70.2 (CH, C3), 85.4 (C, C1), 126.3 (CH, C_{para}), 128.07 (CH) and 128.12 (CH) (C_{meta} and C_{ortho}), 141.5 (C, C_{ipso}). MS (EI), *m/z* (%): 257 (M⁺, 27), 214 (15), 200 (42), 163 (41), 120 (19), 91 (100). Anal. Calcd for C₁₇H₂₃NO (257.37): C, 79.33; H, 9.01; N, 5.44. Found: C, 79.25; H, 9.11; N, 5.38.

4.1.5. N-Methyl-N-(2-phenylethyl)(2-oxaadmant-1-yl)amine hydrochloride, 3b

To a solution of **2b**·HCl (257 mg, 1.00 mmol) in acetonitrile (10 mL), formaldehyde (0.78 mL, 37 wt % in water solution, 10 mmol) and NaBH₃CN (188 mg, 3.00 mmol) were added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature, acetic acid (0.3 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. An additional portion of NaBH₃CN (188 mg, 3.00 mmol) was added and the mixture was further stirred at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated to dryness, 2 N NaOH (10 mL) was added and the suspension was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). The combined organic phases were washed with H₂O (2 × 10 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo to give **3b** (239 mg, 88% yield) as a white solid. Its hydrochloride was obtained by adding an excess of Et₂O·HCl to a solution of the amine in EtOAc. The analytical sample of **3b**·HCl was obtained by crystallization from EtOAc, mp 211–212 °C. IR 2956, 2915, 2855, 2596, 2417, 1481, 1467, 1454, 1411, 1376, 1210, 1086, 1027, 996, 749, 699 cm⁻¹. ¹H NMR (**3b** free base) 1.54 [dm, *J* = 13.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.59 [dm, *J* = 12.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 1.74 [dq, *J* = 13.0 Hz, *J'* = 2.0 Hz, 2H, 6-H_{syn}], 1.80 [dq, *J* = 13.0 Hz, *J'* = 2.0 Hz, 2H, 6-H_{anti}], 1.88 [dm, *J* = 13.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 2.07 [dm, *J* = 12.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.23 [broad s, 2H, 5(7)-H], 2.47 (s, 3H, CH₃-N), 2.79 (m, 2H, CH₂-C₆H₅), 2.89 (m, 2H, CH₂-N), 4.14 (broad s, 1H, 3-H), 4.86 (broad signal, mobile H), 7.18 (tm, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H_{para}), 7.20 (dm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{ortho}), 7.27 (tm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{meta}). ¹³C NMR (50.3 MHz) (**3b** free base) 28.4 [CH, C5(7)], 34.0 (CH₃, CH₃-N), 35.3 (CH₂, C6), 35.4 [CH₂, C4(10)], 36.1 (CH₂, CH₂-C₆H₅), 38.0 [CH₂, C8(9)], 51.6 (CH₂, CH₂N), 69.9 (CH, C3), 85.4 (C, C1), 125.7 (CH, Ar-C_{para}), 128.2 (CH) and 128.7 (CH) (Ar-C_{ortho} and Ar-C_{meta}), 140.9 (C, Ar-C_{ipso}). MS (EI), *m/z* (%): 228 (2), 214 (2), 181 (13), 180 [(M-CH₂-C₆H₅)⁺, 100], 137 (49). Anal. Calcd for C₁₈H₂₅NO·HCl (307.86): C, 70.23; H, 8.51; N, 4.55; Cl, 11.52. Found: C, 70.19; H, 8.59; N, 4.54; Cl, 11.80.

3202

M. D. Duque et al. / Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 3198–3206

4.1.6. N-Methyl(2-oxaadamant-1-yl)amine hydrochloride, 4 HCl

A mixture of **3a** (765 mg, 2.97 mmol) and 10% Pd/C (50% in water, 200 mg) in absolute EtOH (80 mL) was hydrogenated at 38 atm and 100 °C for 24 h. The suspension was filtered, the residue was washed with EtOH, and to the combined organic filtrates an excess of Et₂O·HCl was added. Evaporation of the solvents from the filtrate in vacuo followed by crystallization from MeOH/Et₂O gave **4 HCl** (357 mg, 59% yield), mp 226–230 °C. IR 2928, 2856, 2750, 2694, 2416, 2372, 1467, 1209, 1157, 1097, 1078, 1023, 998 cm⁻¹. ¹H NMR 1.75 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.88 (dq, *J* = 13.0 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, 6-H_{syn}), 1.95 (overlapped dm, 1H, 6-H_{anti}), 1.97 [overlapped dm, 4H, 8(9)-H_{eq} and 8(9)-H_{ax}], 1.99 [overlapped dm, 2H, 4(10)-H_{eq}], 2.39 [broad s, 2H, 5(7)-H], 2.64 (s, 3H, CH₃-N), 4.33 (broad s, 1H, 3-H), 4.86 (broad signal, mobile H). ¹³C NMR (50.3 MHz) 25.5 (CH₃, CH₃-N), 29.2 [CH, C5(7)], 34.9 (CH₂, C6), 35.0 [CH₂, C4(10)], 37.4 [CH₂, C8(9)], 73.4 (CH, C3), 85.6 (C, C1). MS (CI, CH₄), *m/z* (%): 169 (18), 168 ([M+H]⁺, 51), 167 (20), 125 (30), 112 (21), 111 (100), 110 (44), 75 (23), 74 (79), 73 (44), 72 (48), 59 (32). Anal. Calcd for C₁₀H₁₇NO·1.05HCl·0.25H₂O (210.04): C, 57.18; H, 8.90; N, 6.67; Cl, 17.72. Found: C, 57.36; H, 8.77; N, 6.76; Cl, 17.65.

4.1.7. (2-Oxaadamant-1-yl)amine hydrochloride, 7 HCl

A mixture of **2a**·HCl (2.20 g, 7.87 mmol) and 10% Pd/C (50% in water, 100 mg) in absolute EtOH (300 mL) was hydrogenated at 38 atm and 100 °C for 24 h. The suspension was filtered, the residue was washed with EtOH, and the combined organic filtrates were concentrated in vacuo to give a solid. 2 N NaOH (25 mL) was added to the residue which was then extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The combined organic extracts were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo to give a residue that was sublimed at 60 °C/2 Torr to give amine **7**. Its hydrochloride (1.05 g, 70% yield) was obtained by adding an excess of a solution of HCl in MeOH to the amine, followed by concentration in vacuo. The analytical sample of **7**·HCl was obtained by crystallization from MeOH, mp > 218 °C (dec.). IR 3034, 2945, 2851, 2789, 2744, 2697, 2631, 2563, 1578, 1502, 1384, 1359, 1329, 1304, 1211, 1156, 1016, 996 cm⁻¹. ¹H NMR 1.74 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.86 (dq, *J* = 13.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, 6-H_{syn}), 1.95 (overlapped dm, 1H, 6-H_{anti}), 1.96 [s, 4H, 8(9)-H_{ax} and 8(9)-H_{eq}], 1.98 [overlapped dm, 2H, 4(10)-H_{eq}], 2.35 [broad s, 2H, 5(7)-H], 4.28 (broad s, 1H, 3-H), 4.86 (broad signal, mobile H). ¹³C NMR 29.2 [CH, C5(7)], 34.7 (CH₂, C6), 35.0 [CH₂, C4(10)], 39.5 [CH₂, C8(9)], 73.0 (CH, C3), 82.3 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 153 (M⁺, 30), 136 (10), 110 (25), 96 (100), 95 (17), 94 (29), 85 (29), 67 (29), 60 (37), 59 (68), 57 (76). Anal. Calcd for C₉H₁₅NO·HCl (189.68): C, 56.99; H, 8.50; N, 7.38; Cl, 18.69. Found: C, 57.08; H, 8.61; N, 7.22; Cl, 18.54.

4.1.8. N,N-Dibenzyl(2-oxaadamant-1-yl)amine, 8

A suspension of **2a**·HCl (280 mg, 1.00 mmol), K₂CO₃ (690 mg, 5.00 mmol), benzyl chloride (0.14 mL, 1.25 mmol), and NaI (50 mg, 0.33 mmol) in acetonitrile (10 mL) was heated under reflux for 18 h. To the cold mixture, CH₂Cl₂ (20 mL) was added and the solution was washed with water (2 × 20 mL). The organic layer was dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was crystallized from EtOAc to give amine **8** (283 mg, 85% yield), mp 155–157 °C. IR 2932, 2922, 2851, 1600, 1493, 1449, 1382, 1321, 1198, 1158, 1122, 986, 959, 864, 746, 736, 699 cm⁻¹. ¹H NMR 1.54 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.59 [dm, *J* = 12.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 1.72 (broad d, *J* = 12.5 Hz, 1H, 6-H_{syn}), 1.76 (broad d, *J* = 12.5 Hz, 1H, 6-H_{anti}), 1.90 (dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}), 2.14 [dm, *J* = 12.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.18 [broad s, 2H, 5(7)-H], 4.01 (s, 4H, CH₂-C₆H₅), 4.21 (broad s, 1H, 3-H), 4.86 (broad signal, mobile H), 7.12 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{para}), 7.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H, H_{meta}), 7.30 (d, *J* = 7.5 Hz, 4H, H_{ortho}). ¹³C NMR 28.5 [CH, C5(7)],

35.2 (CH₂, C6), 35.3 [CH₂, C4(10)], 40.2 [CH₂, C8(9)], 51.9 (CH₂, CH₂-C₆H₅), 70.2 (CH, C3), 86.4 (C, C1), 126.1 (CH, C_{para}), 127.84 (CH) and 127.88 (CH) (C_{meta} and C_{ortho}), 142.2 (C, C_{ipso}). MS (EI), *m/z* (%): 333 (M⁺, 11), 276 (11), 242 (20), 148 (15), 106 (36), 91 (100). Anal. Calcd for C₂₃H₂₇NO (333.47): C, 82.84; H, 8.16; N, 4.20. Found: C, 82.59; H, 8.19; N, 4.12.

4.1.9. (3-Methyl-2-oxaadamant-1-yl)hydrazine hydrochloride, 9a HCl

A mixture of alcohol **5a** (10.5 g, 62.5 mmol), hydrazine hydrate (68.5 mL, 98% aq solution, 1.38 mol), and concd HCl (2.2 mL) was refluxed for 18 h. The suspension was cooled (ice-bath) and the solid hydrazine was filtered off and dried under reduced pressure. Its hydrochloride (11.5 g, 84% yield) was obtained by adding an excess of Et₂O·HCl to a solution of the hydrazine in EtOAc (10 mL). The analytical sample of **9a**·HCl was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 181–183 °C. IR 3180, 2923, 2681, 1690, 1611, 1528, 1509, 1497, 1383, 1106, 1077, 943, 839 cm⁻¹. ¹H NMR 1.16 (s, 3H, CH₃-C3), 1.60 [dm, *J* = 13.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.63 [overlapped dm, 2H, 4(10)-H_{eq}], 1.66 [overlapped dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 1.74 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 1.79 [complex signal, 2H, 6-H_{anti} and 6-H_{syn}], 2.31 [m, 2H, 5(7)-H], 4.86 (s, mobile H). ¹³C NMR 29.0 (CH₃, C3-CH₃), 29.7 [CH, C5(7)], 34.9 (CH₂, C6), 37.5 [CH₂, C8(9)], 41.4 [CH₂, C4(10)], 74.8 (C, C3), 84.3 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 183 (12), 182 (M⁺, 100), 167 (16), 164 (22), 151 (47), 125 (43), 109 (38), 107 (31), 100 (22), 96 (20), 95 (34), 93 (94), 91 (26), 81 (35), 79 (25), 77 (22), 74 (30), 72 (47), 67 (31), 55 (31). Accurate mass measurement (ESI⁺) calcd for [C₁₀H₁₈N₂O+H]⁺: 183.1491. Found: 183.1493.

4.1.10. (3-Ethyl-2-oxaadamant-1-yl)hydrazine hydrochloride, 9b HCl

From **5b** (5.60 g, 30.7 mmol), hydrazine hydrate (33.5 mL, 98% aq solution, 0.68 mol), and concentrated HCl (1.1 mL) and following the procedure described for **9a**, the hydrazine **9b** was obtained as its hydrochloride (3.20 g, 45% yield). The analytical sample of **9b**·HCl was obtained by crystallization from 2-propanol/hexane, mp 199–200 °C. IR 3176, 2914, 2852, 2682, 1609, 1529, 1515, 1442, 1383, 1206, 1138, 1079, 978, 956, 942, 839 cm⁻¹. ¹H NMR 0.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃-CH₂), 1.50 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂), 1.58 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.62 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 1.67 [dm, *J* = 11.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 1.74 [dm, *J* = 11.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 1.81 [complex signal, 2H, 6-H_{anti} and 6-H_{syn}], 2.33 [m, 2H, 5(7)-H], 4.86 (s, mobile H). ¹³C NMR 7.4 (CH₃, CH₂-CH₃), 29.6 [CH, C5(7)], 35.3 (CH₂, C6), 35.4 (CH₂, CH₂-CH₂), 37.8 [CH₂, C8(9)], 38.9 [CH₂, C4(10)], 77.0 (C, C3), 84.2 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 196 (M⁺, 100), 178 (16), 167 (55), 165 (50), 125 (42), 107 (61), 95 (60), 93 (28), 91 (25), 81 (34), 79 (71), 74 (38), 72 (48), 67 (30), 57 (27), 55 (33). Accurate mass measurement (ESI⁺) calcd for [C₁₁H₂₀N₂O+H]⁺: 197.1648. Found: 197.1644.

4.1.11. (3-Phenyl-2-oxaadamant-1-yl)hydrazine hydrochloride, 9c HCl

From **5c** (1.85 g, 8.04 mmol), hydrazine hydrate (8.8 mL, 98% aq solution, 0.18 mol), and concentrated HCl (0.3 mL) and following the procedure described for **9a**, the hydrazine **9c** was obtained as its hydrochloride (1.39 g, 62% yield). The analytical sample of **9c**·HCl was obtained by crystallization from methanol, mp 203–204 °C. IR 3219, 2948, 2851, 2669, 1573, 1514, 1209, 996, 865, 754, 702 cm⁻¹. ¹H NMR 1.78 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 1.85 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.86–1.92 [complex signal, 3H, 8(9)-H_{eq} and 6-H_{anti}], 1.98 (dm, *J* = 13.5 Hz, 1H, 6-H_{syn}), 2.07 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 2.45 [m, 2H, 5(7)-H], 4.86 (s, mobile H), 7.22 (tm, 1H, *J* = 7.5 Hz, Ar-H_{para}), 7.32 (tm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{meta}), 7.52 (dm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{ortho}). ¹³C NMR (100.6 MHz) 30.0 [CH, C5(7)], 34.8 (CH₂, C6), 37.6 [CH₂, C8(9)],

41.7 [CH₂, C4(10)], 78.1 (C, C3), 85.1 (C, C1), 125.3 (CH, Ar-C_{ortho}), 127.9 (CH, Ar-C_{para}), 129.1 (CH, Ar-C_{meta}), 147.9 (C, Ar-C_{ipso}). MS (EI), *m/z* (%): 245 (14), 244 (M⁺, 76), 213 (32), 171 (13), 169 (15), 156 (17), 155 (100), 129 (20), 125 (31), 105 (23), 95 (29), 91 (34), 77 (37), 72 (29). Anal. Calcd for C₁₅H₂₀N₂O·HCl (280.80): C, 64.16; H, 7.54; N, 9.98; Cl, 12.63. Found: C, 64.03; H, 7.42; N, 9.86; Cl, 12.51.

4.1.12. (3-Methyl-2-oxadamant-1-yl)amine hydrochloride, 10a HCl

A mixture of **9a**-HCl (6.70 g, 30.6 mmol) and PtO₂ (20 mg) in absolute EtOH (200 mL) was hydrogenated at 1 atm and room temperature for 4 days. The suspension was filtered, the residue was washed with absolute EtOH, and the combined organic filtrates were concentrated in vacuo to dryness. The obtained white residue was taken in water (100 mL), the solution was basified with 2 N NaOH, and was extracted with EtOAc (5 × 80 mL). The combined organic extracts were dried with anhyd Na₂SO₄, and concentrated in vacuo to dryness. The residue was taken in the minimum amount of AcOEt and the solution was treated with an excess of a solution of HCl in Et₂O. The precipitate was filtered and washed with Et₂O to give **10a**-HCl (3.60 g, 58% yield). The analytical sample of **10a**-HCl was obtained by crystallization from MeOH, mp 268–269 °C. IR 2966, 2924, 2852, 1582, 1516, 1379, 1235, 1060, 1038, 1005 cm⁻¹. ¹H NMR 1.18 (s, 3H, CH₃-C3), 1.66 [dm, *J* = 14.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.70 [dm, *J* = 14.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 1.81 [complex signal, 2H, 6-H_{anti} and 6-H_{syn}], 1.85 [dm, *J* = 11.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 1.90 [dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 2.38 [broad s, 2H, 5(7)-H], 4.86 (s, mobile H). ¹³C NMR 28.9 (CH₃, C3-C3), 29.8 [CH, C5(7)], 34.0 (CH₂, C6), 38.9 [CH₂, C8(9)], 40.9 [CH₂, C4(10)], 75.8 (C, C3), 83.2 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 168 (9), 167 (M⁺, 73), 152 (33), 150 (27), 124 (27), 110 (100), 109 (37), 108 (68), 106 (21), 94 (28), 93 (49), 85 (72), 81 (37), 67 (22), 60 (21), 59 (47), 57 (66). Anal. Calcd for C₁₀H₁₇NO·HCl·0.25H₂O (208.22): C, 57.69; H, 8.96; N, 6.73; Cl, 17.03. Found: C, 57.78; H, 8.92; N, 7.01; Cl, 17.34.

4.1.13. (3-Ethyl-2-oxadamant-1-yl)amine hydrochloride, 10b HCl

From **9b**-HCl (2.00 g, 8.60 mmol) and PtO₂ (5 mg) in absolute EtOH (200 mL) and following the procedure described for **10a**, the amine **10b** was obtained as its hydrochloride (900 mg, 48% yield). The analytical sample of **10b**-HCl was obtained by crystallization from MeOH, mp 218–219 °C. IR 2934, 2854, 1588, 1507, 1461, 1377, 1345, 1302, 1279, 1057, 1015, 988 cm⁻¹. ¹H NMR 0.91 (t, *J* = 7.8 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.48 (q, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₃CH₂), 1.62 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.70 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 1.82 [complex signal, 2H, 6-H_{anti} and 6-H_{syn}], 1.85 [dm, *J* = 11.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 1.91 [dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 2.39 [broad s, 2H, 5(7)-H], 4.86 (s, mobile H). ¹³C NMR 7.2 (CH₃, CH₃CH₂), 29.7 [CH, C5(7)], 34.4 (CH₂, C6), 35.3 (CH₂, CH₃CH₂), 38.5 [CH₂, C4(10)], 39.1 [CH₂, C8(9)], 77.9 (C, C3), 83.2 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 182 (15), 181 (M⁺, 76), 166 (11), 164 (31), 152 (79), 124 (39), 123 (37), 122 (69), 120 (20), 110 (100), 95 (35), 94 (55), 93 (63), 85 (81), 81 (33), 59 (43), 57 (82). Anal. Calcd for C₁₁H₁₉NO·HCl (217.74): C, 60.68; H, 9.26; N, 6.43; Cl, 16.28. Found: C, 60.78; H, 9.43; N, 6.44; Cl, 16.26.

4.1.14. (3-Phenyl-2-oxadamant-1-yl)amine hydrochloride, 10c HCl and (3-cyclohexyl-2-oxadamant-1-yl)amine hydrochloride, 10d HCl

From **9c**-HCl (1.30 g, 4.63 mmol) and PtO₂ (5 mg) in absolute EtOH (60 mL) and following the procedure described for **10a**, a mixture of amines **10c** and **10d** was obtained as their hydrochlorides. The mixture was diluted with water (25 mL) and then 2 N

NaOH was added till basic pH. The suspension was extracted with EtOAc (5 × 10 mL). The combined organic phases were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo to give a mixture of **10c** and **10d**. Column chromatography of this mixture (silica gel, hexane/EtOAc mixtures) gave amine **10d** (hexane/EtOAc, 8/2, 454 mg, 43% yield) and amine **10c** (hexane/EtOAc, 6/4, 311 mg, 29% yield). Their hydrochlorides were obtained by adding excess of a solution of HCl in Et₂O to a solution of the corresponding amine in EtOAc. **10c**-HCl, mp 254–260 °C (dec.). IR 2920, 2859, 1502, 1232, 1028, 758, 699 cm⁻¹. ¹H NMR 1.86–1.92 [complex signal, 3H, 4(10)-H_{ax} and 6-H_{anti}], 1.98–2.05 [complex signal, 5H, 8(9)-H_{ax}, 8(9)-H_{eq} and 6-H_{syn}], 2.14 [dd, *J* = 12.7 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 2.51 [m, 2H, 5(7)-H], 4.86 (s, mobile H), 7.24 (tt, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, Ar-H_{para}), 7.33 (tm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{meta}), 7.46 (dm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{ortho}). ¹³C NMR (100.6 MHz) 30.1 [CH, C5(7)], 33.9 (CH₂, C6), 39.0 [CH₂, C8(9)], 41.3 [CH₂, C4(10)], 79.0 (C, C3), 83.9 (C, C1), 125.0 (CH, Ar-C_{ortho}), 128.1 (CH, Ar-C_{para}), 129.2 (CH, Ar-C_{meta}), 147.2 (C, Ar-C_{ipso}). MS (EI), *m/z* (%): 230 (18), 229 (M⁺, 100), 212 (26), 170 (36), 155 (24), 129 (41), 110 (78), 105 (28), 91 (23), 77 (38), 57 (40). Anal. Calcd for C₁₅H₁₉NO·HCl (265.78): C, 67.79; H, 7.58; N, 5.27; Cl, 13.34. Found: C, 67.60; H, 7.70; N, 5.14; Cl, 13.37. **10d**-HCl, mp 255–256 °C. IR 2930, 2914, 2852, 1495, 1227, 1060, 1019 cm⁻¹. ¹H NMR 1.04 [dq, *J* = 2.5 Hz, *J* = 12.5 Hz, 2H, 2'(6')-H_{ax}], 1.15 [overlapped tq, *J* = 3.5 Hz, *J* = 13.0 Hz, 1H, 4'-H_{ax}], 1.15–1.25 [overlapped m, 2H, 3'(5')-H_{ax}], 1.30 [overlapped tt, *J* = 12.5 Hz, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1'-H], 1.65–1.70 [complex signal, 5H, 4'-H_{eq}, 4(10)-H_{ax} and 4(10)-H_{eq}], 1.77–1.92 [complex signal, 10H, 2'(6')-H_{eq}, 3'(5')-H_{eq}, 6-H_{anti}, 6-H_{syn}, 8(9)-H_{ax} and 8(9)-H_{eq}], 2.39 [broad s, 2H, 5(7)-H], 4.86 (s, mobile H). ¹³C NMR (100.6 MHz) 27.3 [CH₂, C2'(6')], 27.7 [CH₂, C4' and C3'(5')], 29.8 [CH, C5(7)], 34.7 (CH₂, C6), 36.5 [CH₂, C4(10)], 39.3 [CH₂, C8(9)], 49.3 (CH, C1'), 80.0 (C, C3), 83.2 (C, C1), MS (EI), *m/z* (%): 235 (M⁺, 28), 218 (11), 177 (12), 176 (60), 153 (18), 152 (100), 110 (56), 94 (38). Anal. Calcd for C₁₅H₂₅NO·HCl (271.83): C, 66.28; H, 9.64; N, 5.15; Cl, 13.04. Found: C, 66.67; H, 9.95; N, 5.01; Cl, 12.63.

4.1.15. N,N-Dimethyl(3-methyl-2-oxadamant-1-yl)amine hydrochloride, 11a HCl

To a cold (0 °C) solution of **10a** (410 mg, 2.45 mmol) in Et₂O (8 mL), formaldehyde (4.85 mL, 37 wt % in water solution, 61 mmol) and formic acid (3.8 mL, 98 mmol) were added dropwise, and the mixture was stirred at 80 °C for 10 h. The mixture was allowed to cool to room temperature, it was diluted with Et₂O (15 mL), 5 N NaOH (5 mL) was added dropwise, and the suspension was stirred at room temperature for 15 min. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with Et₂O (4 × 25 mL). The combined organic phases were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and an excess of a solution of HCl in Et₂O was added. Concentration in vacuo of this solution gave **11a**-HCl. The analytical sample of **11a**-HCl (300 mg, 51% yield) was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 174–175 °C. IR 2963, 2912, 2856, 2654, 2556, 2519, 2458, 1488, 1471, 1450, 1438, 1410, 1378, 1240, 1155, 1033, 1021, 916 cm⁻¹. ¹H NMR 1.22 (s, 3H, CH₃-C3), 1.69 [overlapped dm, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.71 [overlapped dm, 2H, 4(10)-H_{eq}], 1.82 [complex signal, 2H, 6-H_{anti} and 6-H_{syn}], 1.85 [dm, *J* = 11.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.05 [dd, *J* = 11.0 Hz, *J* = 2.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 2.46 [m, 2H, 5(7)-H], 2.83 [s, 6H, (CH₃)₂N], ¹³C NMR 28.7 (CH₃, C3-CH₃), 30.2 [CH, C5(7)], 34.1 (CH₂, C6), 34.4 [CH₂, C8(9)], 36.9 [CH₃, (CH₃)₂N], 40.7 [CH₂, C4(10)], 77.2 (C, C3), 91.8 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 196 (10), 195 (M⁺, 76), 180 (24), 152 (17), 138 (81), 122 (18), 113 (35), 109 (17), 98 (21), 88 (17), 87 (100), 85 (32), 72 (34). Anal. Calcd for C₁₂H₂₁NO·HCl·0.5H₂O (240.77): C, 59.86; H, 9.63; N, 5.82; Cl, 14.72. Found: C, 60.04; H, 9.32; N, 5.88; Cl, 14.73.

3204

M. D. Duque et al. / Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 3198–3206

4.1.16. N,N-Dimethyl(3-ethyl-2-oxaadmant-1-yl)amine hydrochloride, 11b-HCl

To a cold (0 °C) solution of **10b** (300 mg, 1.65 mmol) in Et₂O (5 mL), formaldehyde (3.5 mL, 37 wt % in water solution, 42.7 mmol) and formic acid (2.85 mL, 74 mmol) were added dropwise, and the mixture was stirred at 80 °C for 10 h. The cold mixture was diluted with Et₂O (15 mL), 5 N NaOH (5 mL) was added dropwise, and the suspension was stirred at room temperature for 15 min. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with Et₂O (4 × 15 mL). The combined organic phases were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and treated with an excess of Et₂O·HCl. Concentration of the above mixture in vacuo gave **11b-HCl**. The analytical sample of **11b-HCl** (110 mg, 27% yield) was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 129–130 °C. IR 2963, 2934, 2859, 2572, 2376, 1467, 1438, 1378, 1297, 1150, 1040, 1022, 972, 938 cm⁻¹. ¹H NMR 0.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.53 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₃CH₂), 1.64 [ddm, *J* = 13.0 Hz, *J* = 2.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.73 [broad d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 1.84 [overlapped signal, 2H, 6-H_{anti} and 6-H_{syn}], 1.85 [overlapped broad d, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.05 [broad dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 2.48 [broad s, 2H, 5(7)-H], 2.83 [s, 6H, (CH₃)₂N], 4.85 (s, mobile H). ¹³C NMR 7.2 (CH₃, CH₃CH₂), 30.1 [CH, C5(7)], 34.6 [CH₂, C6 and C8(9)], 35.1 (CH₂, CH₃CH₂), 36.8 [CH₃, (CH₃)₂N], 38.4 [CH₂, C4(10)], 79.3 (C, C3), 91.8 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 209 (M⁺, 60), 180 (59), 152 (25), 138 (39), 122 (27), 113 (33), 88 (16), 87 (100), 72 (25). Accurate mass measurement (ESI⁺) calcd for [C₁₃H₂₃NO+H]⁺: 210.1852. Found: 210.1859.

4.1.17. N,N-Diethyl(3-ethyl-2-oxaadmant-1-yl)amine hydrochloride, 12-HCl

To a solution of **10b-HCl** (350 mg, 1.60 mmol) in methanol (20 mL), NaBH₃CN (95%, 200 mg, 3.20 mmol), AcOH (0.6 mL), and acetaldehyde (0.56 mL, 9.6 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. An additional portion of NaBH₃CN (95%, 100 mg, 1.60 mmol) and acetaldehyde (0.26 mL, 4.8 mmol) was added, the mixture was stirred at room temperature for 16 h, and then it was concentrated in vacuo to dryness. Water (30 mL) was added to the residue, the suspension was basified with NaHCO₃ (saturated aqueous solution), and was extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic extracts were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was taken in EtOAc and **12-HCl** (320 mg, 73% yield) was precipitated by adding an excess of a solution of HCl in Et₂O. The analytical sample of **12-HCl** was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 195–196 °C. IR 2972, 2933, 2855, 2645, 2579, 2484, 1458, 1446, 1377, 1033, 1014, 975, 949 cm⁻¹. ¹H NMR 0.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃CH₂C3), 1.38 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, (CH₃CH₂)₂N), 1.53 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₃CH₂C3), 1.64 [dm, *J* = 13.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.75 [dm, *J* = 13.0 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 1.82 (overlapped dm, 1H, 6-H_{anti}), 1.85 (overlapped dm, 1H, 6-H_{syn}), 1.94 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.09 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 2.47 [tm, *J* = 2.5 Hz, 2H, 5(7)-H], 3.06 [broad signal, 2H] and 3.59 [broad signal, 2H] [diastereotopic (CH₃CH₂)₂N]. ¹³C NMR (100.6 MHz) 7.2 (CH₃, CH₃CH₂C3), 12.1 [CH₃, (CH₃CH₂)₂N], 30.2 [CH, C5(7)], 34.6 (CH₂, C6), 35.2 (CH₂, CH₃CH₂C3), 35.4 [CH₂, C8(9)], 38.4 [CH₂, C4(10)], 45.4 [CH₂, (CH₃CH₂)₂N], 79.3 (C, C3), 93.9 (C, C1). MS (EI), *m/z* (%): 238 (16), 237 (M⁺, 59), 222 (14), 209 (19), 208 (74), 180 (30), 166 (48), 150 (23), 126 (31), 115 (100), 100 (54). Anal. Calcd for C₁₅H₂₇NO·HCl (273.85): C, 65.79; H, 10.31; N, 5.11; Cl, 12.95. Found: C, 65.64; H, 10.50; N, 5.13; Cl, 13.01.

4.1.18. N-Benzyl(3-ethyl-2-oxaadmant-1-yl)amine hydrochloride, 13-HCl

To a solution of **10b-HCl** (400 mg, 1.84 mmol) in MeOH (10 mL), NaBH₃CN (95%, 393 mg, 5.93 mmol), AcOH (0.3 mL),

and benzaldehyde (0.42 mL, 4.12 mmol) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. An additional portion of NaBH₃CN (95%, 190 mg, 2.87 mmol) and benzaldehyde (0.21 mL, 2.06 mmol) was added, the mixture was stirred at room temperature for 16 h, and then it was concentrated in vacuo to dryness. Water (30 mL) was added to the residue, the suspension was basified with 1 N NaOH, and was extracted with EtOAc (4 × 15 mL). The combined organic extracts were washed with brine (2 × 25 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was taken in EtOAc and **13-HCl** (451 mg, 79% yield) was precipitated by adding an excess of a solution of HCl in Et₂O. The analytical sample of **13-HCl** was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 213–214 °C. IR 2922, 2851, 2725, 2656, 2619, 2414, 1566, 1463, 1056, 1042, 1007, 988, 749, 690 cm⁻¹. ¹H NMR 0.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.56 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₃CH₂), 1.67 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.77 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 1.87 [broad signal, 2H, 6-H_{anti} and 6-H_{syn}], 1.98 [dm, *J* = 11.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 2.04 [dm, *J* = 11.5 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.46 [m, 2H, 5(7)-H], 4.25 [s, 2H, NCH₂], 4.86 (s, mobile H), 7.42–7.50 (complex signal, 5H, Ar-H). ¹³C NMR 7.2 (CH₃, CH₃CH₂), 29.9 [CH, C5(7)], 34.7 (CH₂, C6), 35.2 (CH₂, CH₃CH₂), 37.3 [CH₂, C8(9)], 38.6 [CH₂, C4(10)], 45.1 (CH₂, NCH₂), 78.7 (C, C3), 87.6 (C, C1), 130.2 (CH, Ar-C_{ortho}), 130.4 (CH, Ar-C_{para}), 131.1 (CH, Ar-C_{meta}), 133.0 (C, Ar-C_{ipso}). MS (EI), *m/z* (%): 272 (15), 271 (M⁺, 71), 242 (39), 200 (22), 160 (20), 149 (62), 91 (C₇H₇⁺, 100). Anal. Calcd for C₁₈H₂₅NO·1.1HCl (311.51): C, 69.40; H, 8.44; N, 4.50; Cl, 12.52. Found: C, 69.38; H, 8.38; N, 4.43; Cl, 12.29.

4.1.19. N-Benzyl-N-methyl(3-ethyl-2-oxaadmant-1-yl)amine hydrochloride, 14-HCl

To a solution of **13-HCl** (90 mg, 0.29 mmol) in acetonitrile (10 mL), formaldehyde (0.23 mL, 37 wt % in water solution, 0.29 mmol) and NaBH₃CN (95%, 55 mg, 0.83 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 30 min, AcOH (0.2 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. An additional portion of NaBH₃CN (95%, 55 mg, 0.83 mmol) was added and the mixture was further stirred at room temperature for 16 h. The mixture was concentrated in vacuo to dryness, 1 N NaOH (15 mL) was added, and the suspension was extracted with CH₂Cl₂ (5 × 10 mL). The combined organic phases were washed with H₂O (2 × 10 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo to give the amine **14**. The amine was taken in EtOAc and was precipitated as its hydrochloride (80 mg, 86% yield) by adding an excess of a solution of HCl in Et₂O. The analytical sample of **14-HCl** was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 165–166 °C. IR 2969, 2921, 2853, 2472, 2353, 1458, 1033, 1024, 972, 938, 750, 702 cm⁻¹. ¹H NMR 0.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.60 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₃CH₂), 1.69 (dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 4-H_{ax} and 10-H_{ax}), 1.77–1.84 (broad signal, 2H, 4-H_{eq} and 10-H_{eq}), 1.87 (overlapped dm, 1H, 6-H_{anti}), 1.89 (overlapped dm, 1H, 6-H_{syn}), 1.94–2.08 [broad signal, 2H, 8-H_{ax} and 9-H_{ax}], 2.14–2.25 [broad signal, 2H, 8-H_{eq} and 9-H_{eq}], 2.53 [broad s, 2H, 5(7)-H], 2.71 (s, 3H, NCH₃), 3.93 (broad d, 1H, *J* = 8.0 Hz) and 4.85 (overlapped signal, 1H) (NCH₂Bn), 4.86 (s, mobile H), 7.50 (complex signal, 5H, Ar-H). ¹³C NMR 7.3 (CH₃, CH₃CH₂), 30.3 [CH, C5(7)], 33.5 (CH₃, CH₃N), 34.2 (CH₂) and 35.8 (CH₂) (diastereotopic C8 and C9), 34.7 (CH₂, C6), 35.2 (CH₂, CH₃CH₂), 38.3 (CH₂) and 38.5 (CH₂) (diastereotopic C4 and C10), 54.7 (CH₂, NCH₂), 79.8 (C, C3), 93.3 (C, C1), 130.3 (CH, Ar-C_{ortho}), 131.0 (CH, Ar-C_{para}), 131.5 (C, Ar-C_{ipso}), 132.4 (CH, Ar-C_{meta}). MS (EI), *m/z* (%): 286 (14), 285 (M⁺, 64), 256 (41), 228 (16), 214 (21), 174 (20), 163 (82), 91 (100). Anal. Calcd for C₁₉H₂₇NO·HCl·0.4H₂O (332.74): C, 69.34; H, 8.82; N, 4.26; Cl, 10.77. Found: C, 69.39; H, 8.73; N, 4.18; Cl, 11.05.

4.1.20. N-Methyl(3-ethyl-2-oxaadmant-1-yl)amine hydrochloride, 15-HCl

A mixture of 14-HCl (390 mg, 1.21 mmol) and 10% Pd/C (50% in water, 10 mg) in absolute EtOH (80 mL) was hydrogenated at 38 atm and 100 °C for 24 h. The suspension was filtered, the residue was washed with EtOH, and the combined organic filtrates were treated with an excess of a solution of HCl in Et₂O. The solution was concentrated in vacuo and the residue was crystallized from MeOH/Et₂O to give the analytical sample of 15-HCl (240 mg, 85% yield), mp 155–156 °C. IR 2968, 2931, 2848, 2706, 2592, 1561, 1474, 1118, 1068, 1057, 1028, 991, 972 cm⁻¹. ¹H NMR 0.92 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.50 (q, J = 7.5 Hz, 2H, CH₃CH₂), 1.63 [dm, J = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{ax}], 1.72 [dm, J = 12.5 Hz, 2H, 4(10)-H_{eq}], 1.84 [s, 2H, 6-H_{anti} and 6-H_{syn}], 1.87 [dm, J = 13.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{ax}], 1.91 [dm, J = 13.0 Hz, 2H, 8(9)-H_{eq}], 2.43 [broad s, 2H, 5(7)-H], 2.63 (s, 3H, NCH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz) 7.1 (CH₃, CH₃CH₂), 25.5 (CH₃, NCH₃), 29.8 [CH, C5(7)], 34.6 (CH₂, C6), 35.2 (CH₂, CH₃CH₂), 37.0 [CH₂, C8(9)], 38.6 [CH₂, C4(10)], 78.5 (C, C3), 86.5 (C, C1). MS (EI, CH₄), m/z (%): 196 (11), 195 (M⁺, 84), 180 (11), 166 (69), 138 (26), 124 (56), 108 (37), 99 (62), 95 (31), 74 (28), 73 (100), 71 (51). Anal. Calcd for C₁₂H₂₁NO·1.1HCl·0.5H₂O (242.60): C, 59.41; H, 9.58; N, 5.77; Cl, 15.34. Found: C, 59.41; H, 9.89; N, 6.11; Cl, 15.61.

4.2. NMDA receptor antagonist activity

The functional assay of antagonist activity at NMDA receptors was performed using primary cultures of cerebellar granule neurons, which were prepared according to established protocols.¹¹ Cells were grown on 10 mm poly-L-lysine-coated glass cover slips, and used for the experiments after 7–14 days in vitro. Cells were loaded with 6 μM Fura-2 AM (Invitrogen-Molecular Probes) for 45 min. Afterwards, the coverslip was mounted on a quartz cuvette containing a Locke-Hepes buffer using a special holder. Measurements were performed using a Perkin-Elmer LS-50B fluorometer equipped with a fast-filter accessory, under mild agitation and at 37 °C. Analysis from each sample was recorded real-time during 1200 s. After stimulation with NMDA or glutamate (100 μM, in the presence of 10 μM glycine), increasing cumulative concentrations of the compound to be tested were added. The percentages of inhibition at every tested concentration were analyzed using a nonlinear regression curve fitting (variable slope) by using the software GraphPad Prism 4.0.

4.3. Antiviral evaluation

The antiviral activity of the compounds was determined in established cell culture assays using a selection of DNA and RNA viruses, including three subtypes of influenza virus [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1); A/Hong Kong/7/87 (H3N2); and B/Hong Kong/5/72].¹³ The compounds' inhibitory effect on virus replication as well as their cytotoxicity was monitored by microscopical examination, and confirmed by the colorimetric MTS cell viability assay.

4.4. T. brucei culturing and drug test

Cultures of bloodstream form *T. brucei* (strain 427) were maintained at 37 °C in modified Iscove's medium (pH 7.4).¹⁴ Trypanocidal activity was assessed by growing parasites for 48 h in the presence of various drug concentrations to determine the levels which inhibited growth by 50% (IC₅₀) and 90% (IC₉₀). In the case of untreated cultures (volume 4 mL), cell densities increased from 0.5 × 10⁴ to 1 × 10⁶ cells mL⁻¹ over this period. Experiments were performed in triplicate. Cell densities at each drug concentration

were determined using a hemocytometer (Weber Scientific International Ltd), and drug sensitivity was expressed as a percentage of growth of control cells.

Acknowledgments

P.C., F.X.S. and S.V. gratefully acknowledge financial support from *Ministerio de Educación y Ciencia* (P.C. and S.V.: Project CTQ2005-02192; F.X.S.: Project SAF 2006-13092-C02-01) and *Comissionat per a Universitats i Recerca* (P.C. and S.V.: Project 2005-SGR-00180, F. X. S.: Project 2005-SGR-00893). M.D.D. thanks the *Ministerio de Educación y Ciencia (FPU Program)*. L.P. thanks the European Commission for a *Marie Curie Fellowship*. S.R.P. and J.M.K. acknowledge Wellcome Trust for support.

References and notes

- (a) Danysz, W.; Parsons, C. G.; Kornhuber, J.; Schmidt, W. J.; Quack, G. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1997**, *21*, 455; (b) Palmer, G. C. *Curr. Drug Targets* **2001**, *2*, 241.
- (a) Aoki, F. In *Textbook of Influenza*; Nicholson, K. G., Webster, R. G., Hay, A. J., Eds.; Blackwell Science: Oxford, 1998; pp 457–476; (b) De Clercq, E. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, *5*, 1015.
- (a) Geluk, H. W.; Schut, J.; Schlatmann, J. L. M. A. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 712; (b) Aldrich, P. E.; Hermann, E. C.; Meier, W. E.; Paulshock, M.; Prichard, W. W.; Snyder, J. A.; Watts, J. C. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 535; (c) Tilley, T. W.; Levitan, P.; Kramer, M. J. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1009; (d) Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Kolocouris, A.; Marakos, P.; Pouli, N.; Fytas, G.; Ikeda, S.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2896; (e) Kolocouris, N.; Kolocouris, A.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Neyts, J.; Padalko, E.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3307; (f) Van Derpoorten, K.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Poupaeert, J. H. *Biomed. Pharmacother.* **1997**, *51*, 464; (g) Scholtissek, C.; Quack, G.; Klenk, H. D.; Webster, R. G. *Antiviral Res.* **1998**, *37*, 83; (h) Burstein, M. E.; Serbin, A. V.; Khakhulina, T. V.; Alymova, I. V.; Stotskaya, L. L.; Bogdan, O. P.; Manukchina, E. E.; Jdanov, V. V.; Sharova, N. K. *Antiviral Res.* **1999**, *41*, 135; (i) Stamatou, G.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Fytas, G.; Foscolos, G. B.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2137; (j) Zoidis, G.; Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Kolocouris, A.; Fytas, G.; Karayannis, P.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Antiviral Chem. Chemother.* **2003**, *14*, 153; (k) Stylianakis, I.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Fytas, G.; Foscolos, G. B.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1699; (l) Stamatou, G.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Pannecouque, C.; Wytvrouw, M.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5485; (m) El-Emam, A. A.; Al-Deeb, O. A.; Al-Omar, M.; Lehmann, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5107; (n) Zoidis, G.; Fytas, G.; Papanastasiou, I.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Padalko, E.; De Clercq, E.; Naesens, L.; Neyts, J.; Kolocouris, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3341; (o) Setaki, D.; Tataridis, D.; Stamatou, G.; Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Kolocouris, N.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 248; (p) Tataridis, D.; Fytas, G.; Kolocouris, N.; Fytas, G.; Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 692.
- (a) Kelly, J. M.; Miles, M. A.; Skinner, A. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 985; (b) Kelly, J. M.; Quack, G.; Miles, M. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1360; (c) Kolocouris, N.; Zoidis, G.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Prathalingam, S. R.; Kelly, J. M.; Naesens, L.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4358; (d) Papanastasiou, I.; Tsotinis, A.; Kolocouris, N.; Prathalingam, S. R.; Kelly, J. M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1496.
- Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*; Oxford University Press: Oxford, 2005. pp 204–205.
- (a) Geldenhuys, W. J.; Malan, S. F.; Bloomquist, J. R.; Marchand, A. P.; van der Schyf, C. *J. Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 21; (b) Mdzinarishvili, A.; Geldenhuys, W. J.; Abbruscato, T. J.; Bickel, U.; Klein, J.; van der Schyf, C. *J. Neurosci. Lett.* **2005**, *383*, 49; (c) Grobler, E.; Grobler, A.; van der Schyf, C. J.; Malan, S. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1176; (d) Kiewert, C.; Hartmann, J.; Stoll, J.; Thekkumkara, T. J.; Geldenhuys, W. J.; Klein, J. *Neurochem. Res.* **2006**, *31*, 395; (e) Geldenhuys, W. J.; Malan, S. F.; Bloomquist, J. R.; van der Schyf, C. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1525; (f) Hao, J.; Mdzinarishvili, A.; Abbruscato, T. J.; Klein, J.; Geldenhuys, W. J.; van der Schyf, C. J.; Bickel, U. *Brain Res.* **2008**, *1196*, 113.
- (a) Stetter, H.; Tacke, P. *Chem. Ber.* **1963**, *96*, 694; (b) Bertz, S. H. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3585.
- (a) Geigy A. G. Patent GB 1123609, 1968; (b) Gagneux, A. R.; Meier, R. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 1365.
- (a) Stetter, H.; Gaertner, J.; Tacke, P. *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 1435; (b) Camps, P.; El Achab, R.; Font-Bardia, M.; Görbig, D. M.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Solans, X.; Simon, M. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5867; (c) Camps, P.; El Achab, R.; Görbig, D. M.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Badia, A.; Baños, J. E.; Vivas, N. M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F. J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3227.
- Robinson, D. M.; Keating, G. M. *Drugs* **2006**, *66*, 1515.
- Canudas, A. M.; Pubill, D.; Sureda, F. X.; Verdager, E.; Camps, P.; Muñoz-Torrero, D.; Jiménez, A.; Camins, A.; Pallàs, M. *Exp. Neurol.* **2003**, *180*, 123.

3206

M. D. Duque et al. / *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 3198–3206

12. Camps, P.; Duque, M. D.; Vázquez, S.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Sureda, F. S.; López-Querol, M.; Camins, A.; Pallàs, M.; Prathalingam, S. R.; Kelly, J. M.; Romero, V.; Ivorra, D.; Cortés, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9925.
13. (a) De Clercq, E.; Cools, M.; Balzarini, J.; Márquez, V. E.; Borchering, D. R.; Borchardt, R. T.; Drach, J. C.; Kitaoka, S.; Konno, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1291; (b) Setaki, D.; Tataridis, D.; Stamatou, G.; Kolocouris, A.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Kolocouris, N.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 248.
14. Hirumi, H.; Hirumi, K. *J. Parasitol.* **1989**, *75*, 985.

Artículo 4

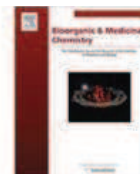
Bioorganic & Medicinal Chemistry 18 (2010) 46–57



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



New oxapolycyclic cage amines with NMDA receptor antagonist and trypanocidal activities

María D. Duque^a, Pelayo Camps^a, Eva Torres^a, Elena Valverde^a, Francesc X. Sureda^b, Marta López-Querol^b, Antoni Camins^c, S. Radhika Prathalingam^d, John M. Kelly^d, Santiago Vázquez^{a,*}

^aLaboratori de Química Farmacèutica (Unitat Associada al CSIC), Facultat de Farmàcia, and Institute of Biomedicine (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643, Barcelona E-08028, Spain

^bUnitat de Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, c/ St. Llorenç 21, Reus E-43201, Spain

^cUnitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institute of Biomedicine (IBUB) and CIBERNED, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643, Barcelona E-08028, Spain

^dLondon School of Hygiene and Tropical Medicine, Department of Infectious and Tropical Diseases, Keppel Street, London WC1E 7HT, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2009

Revised 5 November 2009

Accepted 7 November 2009

Available online 14 November 2009

Dedicated to Professor Josep Font Cierco on his 70th birth anniversary

Keywords:

NMDA

Memantine

Amantadine

Trypanosoma

Polycyclic cage compounds

NGP1-01

Indantadol

ABSTRACT

The synthesis of several (1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amines and related compounds is reported. Several of them display very similar activity to memantine as NMDA receptor antagonists. Several derivatives showed a significant level of trypanocidal activity.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neurodegenerative disorders like Parkinson's disease and Alzheimer's disease, which are caused by the degeneration of dopaminergic and cholinergic neurons, respectively, are becoming more and more problematic for the older population.¹ Unfortunately, current treatments neither prevent nor reduce the progression of neurodegeneration. Therefore, great efforts have been undertaken to develop drugs that meet this impairment.²

With regard to Alzheimer's disease, NMDA receptor antagonists act by protecting neurons from excessive pathological calcium influx, which leads to neuronal damage and finally to neuronal cell death.³ Up to now, the polycyclic amine memantine is the only NMDA receptor antagonist with low NMDA receptor affinity that has been introduced for the treatment of Alzheimer's disease.⁴ The particular advantage of memantine is the fast off-rate kinetics which prevents the drug from accumulating in the ion channel,

Therefore, memantine enters the open channel preferentially when it is pathologically activated for long periods of time. The physiological neurotransmission is not disturbed by memantine resulting in minimal adverse effects.⁵

Another polycyclic amine, amantadine, displays moderate NMDA receptor affinity and is used for the treatment of Parkinson's disease.⁶ Moreover, amantadine also has prophylactic and therapeutic activity in influenza A virus infections.⁷ Interestingly, amantadine, memantine and related polycyclic amines also possess trypanocidal activity.⁸

Biological activity has also been found with other polycyclic cage amines.⁹ For example, **1** displayed *in vivo* activity against herpes simplex-II and influenza A2 virus,¹⁰ **2** was studied as an anti-Parkinsonian agent,¹¹ and cubylamine, **3**, was found to be a MAO-B inhibitor (Fig. 1).¹² Moreover, heteroatom substituted polycyclic cage amines are an interesting and highly promising group of compounds that are receiving intense scrutiny as potential scaffolds for the development of new drugs. For example, a series of oxapentacycloundecylamines, such as NGP1-01 and related compounds, has showed neuroprotective properties through NMDA receptor

* Corresponding author. Tel.: +34 934024533; fax: +34 934035941.

E-mail address: svazquez@ub.edu (S. Vázquez).

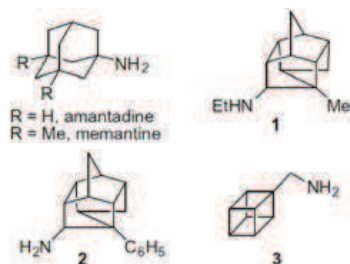


Figure 1. Polycyclic cage compounds with biological activity.

antagonist activity,¹³ and several azapentacycloundecylalcohols such as TC1 and TC4, have high affinity for sigma receptors (Fig. 2).¹⁴

Recently, we have found that several (3-alkyl-2-oxaadmant-1-yl)amines, such as **4**, showed NMDA receptor antagonist activity. They were more potent than amantadine against NMDA-induced calcium increase in cerebellar granule neurons, although they were less potent than memantine. Moreover, two tertiary amine analogs of **4** displayed a significant level of trypanocidal activity. However, they were devoid of any antiviral activity (Fig. 2).¹⁵

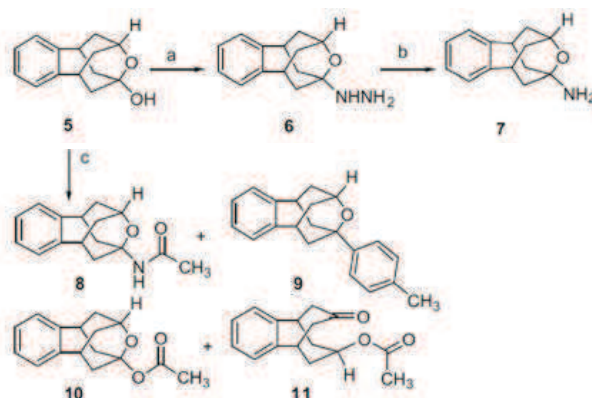
Following our work on the synthesis of oxapolycyclic compounds as analogs of amantadine and memantine, we now describe the synthesis and biological evaluation of a series of (1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amines, and show that they contain structural features necessary for NMDA receptor antagonist activity and trypanocidal activity.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis

For the synthesis of the new amines, known alcohol **5** was used as starting material.¹⁶ Reaction of alcohol **5** with several primary amines led to the recovery of the starting material. However, reaction of **5** with aqueous hydrazine led to the known hydrazine **6** in 79% yield, probably due to the α -effect ensuring a higher nucleophilicity of hydrazine.¹⁷ Catalytic hydrogenation of **6** furnished amine **7** in 82% yield (Scheme 1).

In order to explore an alternative route to amine **7** we carried out a Ritter reaction of **5** with acetonitrile in toluene in acidic medium that led, after column chromatography, to the expected amide, **8**, in 47% yield, along with the recovery of 20% of starting material and small quantities (2–3%) of compounds **9–11**. The origin of **9** can be rationalized as an electrophilic attack of the bridgehead carbocation involved in the Ritter reaction to toluene. Regarding esters **10** and **11**, their formation may involve nucleophilic attack of **5** and its corresponding keto-alcohol opened derivative, respectively, to protonated acetonitrile followed by hydrolysis of the cor-



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) NH_2NH_2 , H_2O , concd HCl, reflux, 4 h, 79%; (b) H_2 , PtO_2 , 1 atm, rt, 3 days, 82% yield; (c) acetonitrile, toluene, concd H_2SO_4 , reflux, 18 h, 47% of **8**, 3% of **9**, 2% of **10**, 3% of **11**, and 20% of recovered **5**.

responding imidate. Taking into account the medium yield of the Ritter reaction we did not carry out the hydrolysis of amide **8** (Scheme 1).

Starting from amine **7**, we have prepared amines **12–18** using classical methods in amine chemistry. Reductive alkylation of amine **7** with benzaldehyde or phenylacetaldehyde and sodium cyanoborohydride in methanol afforded secondary amines **12a** and **12b**, respectively. Reductive alkylation of benzylamine **12a** with formaldehyde led to **13a** in 91% yield, while alkylation of **12a** with benzyl chloride led to the dibenzyl derivative **13b** in 74% yield. Hydrogenolysis of amine **13a** led to secondary amine **14** in 82% yield. Moreover, reductive alkylation of amine **7** with excess formaldehyde and formic acid led to the dimethyl derivative **17a**, while reaction of **7** with excess of acetaldehyde and sodium cyanoborohydride in methanol afforded the diethyl derivative **17b**. Alkylation of **7** with propargyl bromide led to a mixture of propargylamine **15** and dipropargylamine **16**. Column chromatography of this mixture gave pure **15** and **16** in 34 and 40% yield, respectively. Finally, alkylation of **7** with 1,5-dibromopentane led to the piperidine derivative **18** in 46% yield (Scheme 2).

Recently, a new NMDA receptor antagonist, indantadol, has been introduced in clinical trials for the treatment of neuropathic pain. Worthy of note, indantadol also inhibits MAO-A and MAO-B with IC_{50} values of 7.2 and 60.3 μM , respectively.¹⁸ This compound features an indane nucleus and an aminoacetamide chain in its structure. On the other hand, another non-competitive NMDA receptor antagonist with in vitro and in vivo neuroprotective properties, N20C, also features an aminoacetamide group in its structure.¹⁹ After noticing the NMDA receptor antagonist activity of several of our new amines, we synthesized acetamide **19** that shares structural elements with both indantadol and N20C. Thus, reaction of amine **7** with chloroacetamide in the presence of sodium iodide and potassium carbonate led to acetamide **19** in 55% yield (based on recovered starting material) (Scheme 3).

Taking into account that in our previous work with 2-oxaadmant-1-ylamines we found that 3-alkyl derivatives were more potent than the corresponding 3-unsubstituted derivatives,¹⁵ we also planned to carry out the synthesis and evaluation of 5-alkyl derivatives of amine **7**.

Reaction of the known¹⁶ diketone **20** with methylmagnesium bromide and ethylmagnesium bromide led to alcohols **21a** and **21b**, respectively, in very high yields. While reaction of alcohol **21a** with refluxing acetonitrile in the presence of concd H_2SO_4 led to the expected amide **22a** in 81% yield, Ritter reaction of

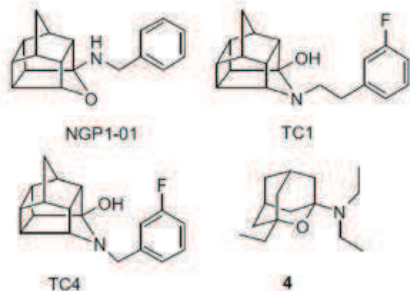
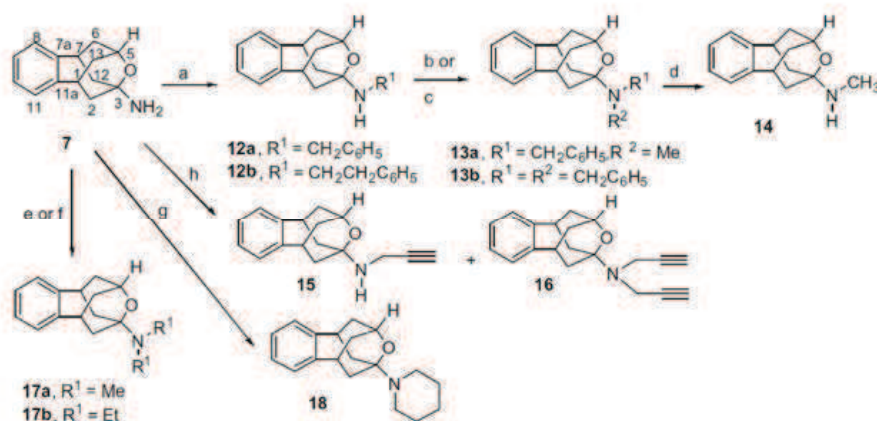


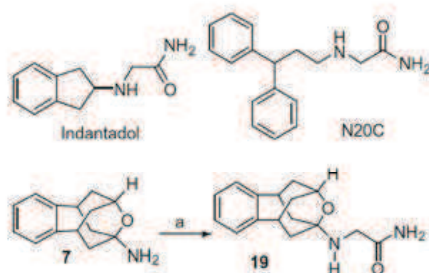
Figure 2. Heteropolycyclic cage compounds with biological activity.

48

M. D. Duque et al./Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 46–57



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) benzaldehyde or phenylacetaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, MeOH, rt, 18 h, 66% for **12a**, 60% for **12b**; (b) CH₂O, NaBH₃CN, AcOH, acetonitrile, rt, 2 h, 91% for **13a**; (c) benzyl chloride, K₂CO₃, NaI, acetonitrile, reflux, 24 h, 74% for **13b**; (d) H₂, Pd/C, 38 atm, 100 °C, 24 h, 82% yield; (e) HCO₂H, 37% aq CH₂O, 80 °C, 24 h, 92% for **17a**; (f) acetaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, acetonitrile, rt, 2 h, 91% for **17b**; (g) 1,5-dibromopentane, Et₃N, DMF, 60 °C, 26 h, 46%; (h) propargyl bromide, K₂CO₃, NaI, acetonitrile, reflux, 18 h, 34% of **15** and 40% of **16**.



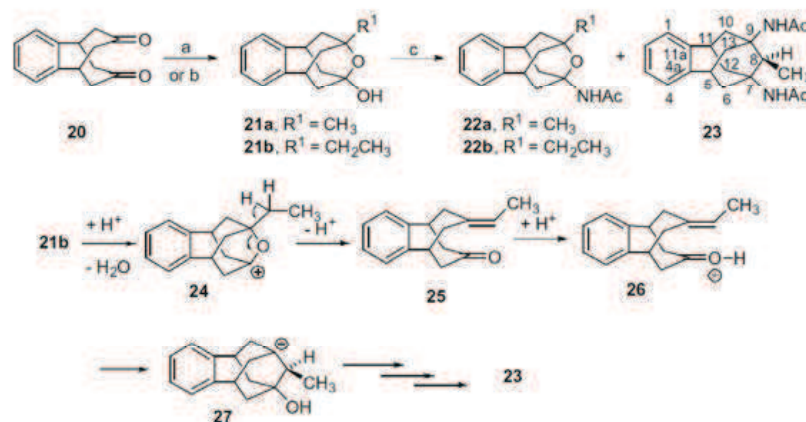
Scheme 3. Indantadol and N2OC, NMDA receptor antagonists bearing an aminoacetamide group and synthesis of analog **19**. Reagents: (a) chloroacetamide, K₂CO₃, NaI, acetonitrile, reflux, 18 h, 55% (brsm).

alcohol **21b** furnished a mixture of two products, the expected amide, **22b**, isolated after column chromatography in 22% yield, and the rearranged diamide **23**, isolated in 13% yield. The formation of diamide **23** can be explained taking into account the mechanism of the Ritter reaction that involves the formation of a carbocation at the bridgehead position. Thus, after protonation of

the alcohol group in **21b** and loss of water the carbocation **24** may rearrange to a new carbocation, **27**, through enone **25**. Acetonitrile attack to **27** followed by Ritter reaction of the remaining alcohol may lead to the diamide **23** (Scheme 4).

Acidic hydrolysis of amides **22a** and **22b** led to amines **28a** and **28b** in 87% and 90% yield, respectively. In view of the aforementioned problems for obtaining acetamide **22b**, we developed an alternative procedure for the synthesis of amine **28b** from alcohol **21b**. Thus, reaction of **21b** with urea in trifluoroacetic acid led to **28b** in 70% yield (Scheme 5).²⁰

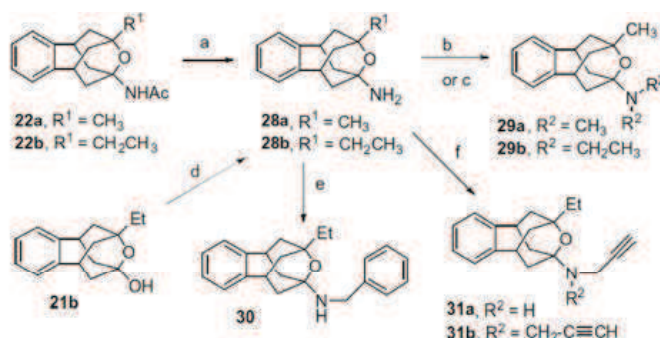
Starting from amines **28a** and **28b**, we prepared amines **29a**, **29b**, **30**, **31a** and **31b** using similar procedures to those previously described starting from amine **7**. Thus, reductive alkylation of **28a** with formaldehyde and formic acid or with acetaldehyde and sodium cyanoborohydride led to **29a** and **29b**, respectively. On the other hand, reductive alkylation of amine **28b** with benzaldehyde and sodium cyanoborohydride in methanol afforded secondary amine **30** in 81% yield. Finally, alkylation of **28b** with propargyl bromide led to a mixture of propargylamine **31a** and dipropargylamine **31b**. Column chromatography of this mixture furnished pure **31a** and **31b** in 35% and 22% yield, respectively (Scheme 5).



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) methylmagnesium bromide or ethylmagnesium bromide, anhyd toluene, 0 °C, overnight, 99% for **21a**; (b) ethylmagnesium bromide, anhyd toluene, 0 °C, overnight, 90% for **21b**; (c) acetonitrile, H₂SO₄, reflux, 18 h: 81% for **22a**; 22% for **22b** and 13% for **23**.

M. D. Duque et al. / Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 46–57

49



Scheme 5. Reagents and conditions: (a) HCl concd, reflux, 18 h, 87% for **28a**; 90% for **28b**; (b) HCO₂H, 37% aq CH₂O, 80 °C, 24 h, 72% of **29a**; (c) acetaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, acetonitrile, rt, 18 h, 91% of **29b**; (d) urea, CF₃CO₂H, 115 °C, 18 h, 70%; (e) benzaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, MeOH, rt, 18 h, 81%; (f) propargyl bromide, K₂CO₃, NaI, acetonitrile, reflux, 18 h, 35% of **31a** and 22% of **31b**.

The structures of all new compounds were confirmed by elemental analysis or accurate mass measurement, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and mass spectral data.

2.2. NMDA receptor antagonist activity

NMDA receptors mediate most of the important actions of glutamate as a neurotransmitter in the brain. The development of NMDA receptor antagonists has been intensive in the last decades due to its neuroprotective actions.³⁰ However, drug development in this area has been hindered due to important side-effects in clinical trials. Nonetheless, memantine, a non-competitive and low-affinity NMDA receptor antagonist, is being used as a neuroprotective drug in Alzheimer's disease.²¹ Memantine is an un-competitive antagonist with fast on-off kinetics. Another important feature is that glutamate has to be present to activate the NMDA receptor before memantine exerts its action as antagonist. Amantadine, a drug that is used in Parkinson's disease (PD) has also some NMDA antagonist activity and it has been proposed that part of its beneficial actions on PD are due to its effect on NMDA receptors.²² To evaluate if the synthesized compounds were able to antagonize NMDA receptors, we have measured their effect on the increase in intracellular calcium evoked by glutamate or NMDA (both 100 μM, in the presence of 10 μM of glycine) on rat cultured cerebellar granule neurons.²³ Compounds **14**, **17a**, **29a** and **29b** had IC₅₀ values (NMDA) that were in the micromolar order, similar to memantine (Table 1).

From the inspection of the results shown in Table 1 several trends are evident. First, all the benzyl derivatives, **12a**, **13a**, **13b** and **30**, and the phenethyl derivative **12b**, were devoid of activity, in striking contrast with NGP1-01, a low micromolar NMDA receptor antagonist that features a benzyl group in its structure. Also, propargyl derivatives were either inactive (compounds **16**, **31a** and **31b**) or had only a moderate activity (compound **15**, IC₅₀ = 34 μM). On the other hand, in the active compounds, the potency increases on going from primary amines to N-alkylated and N-dialkylated derivatives (e.g., series **7/14/17a** or **28a/29a/29b**), the methyl or dimethyl substituted amines being optimum for NMDA receptor antagonism.

Worthy of note, amantadine is more than 60 times less active than its dimethyl derivative, memantine, as a NMDA receptor antagonist. The positive effect of having methyl groups directly attached to the polycyclic structure was also noticed in our previous work with (2-oxaadmant-1-yl)amines,¹⁵ with the 3-methyl and 3-ethyl derivatives being much more active than the unsubstituted compounds. However, among the products reported here, the introduction of a 5-methyl or a 5-ethyl group did not increase the activity (e.g., series **7/28a/28b** or **17a/29a** or **15/31a**).

Table 1
 IC₅₀ (μM) values for (2-oxaadmant-1-yl)amines as NMDA antagonists^{a,b}

| Compound | Glutamate (100 μM) | NMDA (100 μM) |
|------------|--------------------|---------------|
| 7 | 408 ± 110 | 35 ± 6.8 |
| 14 | 28 ± 4.5 | 6.0 ± 1.3 |
| 15 | 115 ± 17 | 34 ± 2.3 |
| 16 | >500 | >200 |
| 17a | 39 ± 1.5 | 3.8 ± 0.3 |
| 17b | 96 ± 13 | 14 ± 1.1 |
| 18 | 168 ± 54 | 30 ± 1.0 |
| 28a | 167 ± 36 | 98 ± 26 |
| 28b | >500 | >200 |
| 29a | 7.7 ± 1.1 | 3.9 ± 0.4 |
| 29b | 22 ± 3.1 | 7.7 ± 1.0 |
| Amantadine | 358 ± 130 | 92 ± 29 |
| Memantine | 55 ± 12 | 1.5 ± 0.1 |

^a Functional data were obtained from primary cultures of cerebellar granule neurons using the method described in the experimental section by measuring the intracellular calcium concentration. Cells were challenged with glutamate (second column) or NMDA (third column) as indicated. Data shown are means ± SEM of at least three separate experiments carried out on three different batches of cultured cells.

^b Compounds **12a**, **12b**, **13a**, **13b**, **19**, **30**, **31a** and **31b** were found to have low potency as glutamate (IC₅₀ >500 μM) and NMDA receptor antagonists (IC₅₀ >200 μM).

2.3. MAO inhibitory activity

It is well known that rasagiline and selegiline, two clinically approved drugs for the treatment of Parkinson's disease, display monoaminoxidase (MAO) inhibitory activity.²⁴ Taking into account that both compounds feature a propargylamine unit and that structure-activity studies have shown that this moiety is associated with inhibition of MAO, we envisaged that our new derivatives **15**, **16**, **31a** and **31b**, which also include propargyl substituents, may also inhibit MAO. On the other hand, since indantadol also shows MAO inhibitory activity,¹⁸ we tested our analog **19**. However, none of the tested compounds (tested at 10 and 50 μM) showed MAO inhibitory activity. Selegiline (10 μM) was used as a positive control, yielding a 85.5 ± 5.5% inhibition of MAO activity (n = 3, mean ± SEM).

2.4. Trypanocidal activity

Human African trypanosomiasis (HAT) is caused by infection with protozoan parasites of the *Trypanosoma brucei* species complex. The disease is endemic in many parts of sub-Saharan Africa, with upwards of 60 million people at risk. A process of antigenic variation prevents elimination of the parasite by the immune sys-

Table 2IC₅₀ and IC₉₀ (μM) values for oxapolycyclic cage amines that display inhibitory activity against cultured bloodstream form *T. brucei*^a

| Compound | IC ₅₀ (μM) | IC ₉₀ (μM) |
|-------------|-----------------------|-----------------------|
| 30 | 13.86 ± 0.4 | 19.95 ± 0.42 |
| 31a | 15.23 ± 1.35 | 25.59 ± 0.94 |
| 31b | 14.63 ± 1.18 | 24.08 ± 1.07 |
| Rimantadine | 7.04 ± 0.27 | 13.97 ± 1.68 |
| Memantine | 13.75 ± 1.26 | 21.43 ± 0.55 |

^a Compounds were tested for in vitro activity against bloodstream form *T. brucei* at a range of concentrations and IC₅₀ and IC₉₀ values established (Section 4.3). Data are the mean of triplicate experiments ± SEM. Values for rimantadine and memantine are shown for comparison.

tem, and the prospects of developing a vaccine are thought to be remote. New drugs against HAT are therefore a major priority. Drugs currently available against HAT are characterized by problems including toxicity, limited efficacy, cost and the need to administer under medical supervision.

The anti-influenza virus drug rimantadine has been shown to be active in vitro against bloodstream form *T. brucei* and other amino-adamantane derivatives have even greater activity.⁸ Moreover, very recently, we found that several (3-alkyl-2-oxadamant-1-yl)amines showed significant activity against bloodstream form *T. brucei*.¹⁵ We therefore investigated if the newly synthesized oxapolycyclic cage amines reported here also displayed significant activity against this parasite.

A total of 17 compounds were tested. Of these the oxapolycyclic cage amines **7**, **12a**, **12b**, **13a**, **13b**, **14**, **15**, **16**, **17a**, **19**, **28a**, **28b**, **29a** and **29b** displayed little or no inhibitory activity against cultured bloodstream form *T. brucei* at 5 μg mL⁻¹ (15–20 μM). However, compounds **30**, **31a** and **31b** significantly inhibited parasite growth, at levels comparable to rimantadine and memantine (Table 2), and at least 10-fold lower than amantadine.⁸ As selectivity is a highly desired goal in pharmacology, it is noteworthy that the compounds with trypanocidal activity are devoid of NMDA receptor antagonist activity.

3. Conclusions

In summary, we have synthesized and fully characterized several oxapolycyclic amines. None of the tested compounds showed MAO inhibitory activity. Several derivatives were more potent than amantadine against NMDA-induced calcium increase in cerebellar granule neurons, and four compounds showed a very similar potency to memantine. All the benzyl derivatives were devoid of NMDA receptor antagonism activity, a trend previously observed in the (2-oxadamant-1-yl)amines.¹¹ In contrast with our previous work with (2-oxadamant-1-yl)amines, introduction of an alkyl group at C-5 does not increase the potency. However, the introduction of an ethyl group in C-5 increases the trypanocidal activity.

Work is in progress in order to evaluate the neuroprotective activity of compounds **14**, **17a**, **17b**, **29a** and **29b** in vitro. In addition, the synthesis and pharmacological evaluation of related polycyclic cage amines containing a methylene unit instead of the oxygen atom are currently in progress.

4. Experimental

4.1. Chemistry

4.1.1. General

Melting points were determined in open capillary tubes. Unless otherwise stated, NMR spectra were recorded in CD₃OD in the following spectrometers: ¹H NMR (500 MHz), ¹³C NMR (75.4 MHz).

Chemical shifts (δ) are reported in ppm related to internal tetramethylsilane (TMS). Assignments given for the NMR spectra are based on DEPT, COSY ¹H/¹H, HETCOR ¹H/¹³C (HSQC and HMBC sequences for one bond and long range ¹H/¹³C heterocorrelations, respectively) and NOESY experiments for selected compounds. For the MS and GC/MS analyses the sample was introduced directly or through a gas chromatograph. For GC/MS analyses a 30-meter column [5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane, conditions: 10 psi, initial temperature: 35 °C (2 min), then heating at a range of 8 °C/min till 300 °C, then isothermic at 300 °C] was used. The electron impact (70 eV) or chemical ionization (CH₄) techniques were used. Only significant ions are given: those with higher relative ratio, except for the ions with higher *m/z* values. Accurate mass measurements were obtained using ESI technic. Absorption values in the IR spectra (KBr) are given as wave-numbers (cm⁻¹). Only the more intense bands are given. Column chromatography was performed on silica gel 60 Å (35–70 mesh). For the thin layer chromatography (TLC) aluminum-backed sheets with Silica Gel 60 F₂₅₄ were used and spots were visualized with UV light and/or 1% aqueous solution of KMnO₄.

4.1.2. (1,2,3,5,6,7-Hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, **7**·HCl

A mixture of hydrazine **6** (9.19 g, 34.5 mmol)¹⁷ and PtO₂ (10 mg) in absolute EtOH (400 mL) was hydrogenated at atmospheric pressure and room temperature for three days. The suspension was filtered, the residue was washed with EtOH and concentrated in vacuo. To the obtained white solid, water (225 mL) was added, the solution was made basic with 2 N NaOH and extracted with ethyl acetate (5 × 100 mL). The combined organic extracts were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to about 25 mL. An excess of Et₂O·HCl was added and the solution was cooled at 4 °C whereupon **7** precipitated as its hydrochloride (7.17 g, 82% yield), mp 274–276 °C (EtOAc). IR 3407, 2941, 2924, 2848, 2725, 2642, 2546, 2365, 2064, 1606, 1508, 1223, 1149, 1043, 1007, 962, 770 cm⁻¹. ¹H NMR 1.73 [dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 1.98 [d, *J* = 12.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.24 [dm, *J* = 12.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 2.30 (dt, *J* = 13.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}), 3.27 [t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1(7)-H], 4.53 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 4.86 (s, 3H, mobile H), 7.13–7.16 [m, 2H, 9(10)-H], 7.17–7.19 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR 33.1 [CH₂, C6(13)], 38.0 [CH₂, C2(12)], 39.3 [CH, C1(7)], 73.6 (CH, C5), 82.5 (C, C3), 128.2 [CH, C9(10)], 129.7 [CH, C8(11)], 145.9 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), *m/z* (%): 215 (M⁺, 17), 157 (19), 156 ([M-C₃H₇O]⁺, 100), 141 (C₁₁H₉⁺, 51), 129 (23), 128 (20), 115 (22), 59 (28). Anal. Calcd for C₁₄H₁₇NO·HCl·0.25H₂O (256.26): C, 65.62; H, 7.28; N, 5.47. Found: C, 65.67; H, 7.32; N, 5.67.

4.1.3. *N*-(1,2,3,5,6,7-Hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)acetamide hydrochloride, **8**

A mixture of alcohol **5** (1.44 g, 6.67 mmol), toluene (2 mL), acetonitrile (0.68 mL, 13.4 mmol) and concentrated H₂SO₄ (1.20 mL, 22.5 mmol) was stirred under reflux for 18 h. The cold solution was concentrated in vacuo, water (40 mL) was added to the residue and extracted with EtOAc (4 × 20 mL). The combined organic extracts were washed with water (2 × 30 mL) and brine (30 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give an oily residue (1.34 g). Column chromatography [hexane/EtOAc mixtures] gave, in order of elution **9** (63 mg, 3% yield), **10** (29 mg, 2%), **11** (45 mg, 3%), **5** (282 mg, 20%) and the title acetamide, **8** (810 mg, 47%).

Compound **8**, mp 200–201 °C (CH₂Cl₂). IR 3289, 3057, 3021, 2929, 2912, 2876, 2836, 1669, 1663, 1655, 1541, 1534, 1522, 1492, 1450, 1435, 1390, 1369, 1352, 1335, 1300, 1276, 1248, 1215, 1196, 1169, 1112, 1072, 1036, 995, 865, 756, 699 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) 1.69 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 1.93 (s, 3H,

COCH₃), 2.22 [dd, *J* = 12.5 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 2.28 [dt, *J* = 13.0 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.48 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 3.12 [br s, 2H, 1(7)-H], 4.44 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 5.72 (s, 1H, NH), 7.11 [s, 4H, 9(10)-H and 8(11)-H]. ¹³C NMR (CDCl₃) 24.4 (CH₃, COCH₃), 32.8 [CH₂, C6(13)], 37.8 [CH₂, C2(12)], 38.5 [CH, C1(7)], 71.4 (CH, C5), 82.3 (C, C3), 126.6 [CH, C9(10)], 128.4 [CH, C8(11)], 145.5 [C, C7a(C11a)], 168.3 (C, CO). MS (EI), *m/z* (%): 258 (13), 257 (M⁺, 71), 198 (29), 180 (17), 157 (26), 156 (100), 155 (30), 142 (22), 141 (61), 129 (42), 128 (40), 115 (32), 43 (22). Anal. Calcd for C₁₆H₁₄NO₂ (257.33): C, 74.68; H, 7.44; N, 5.44. Found: C, 74.51; H, 7.51; N, 5.43.

1,2,3,5,6,7-Hexahydro-3-(*p*-tolyl)-1,5:3,7-dimethano-3-4-benzoxonin, **9**, mp 173–174 °C (Et₂O). IR 3042, 3017, 2922, 2907, 2866, 2835, 1509, 1493, 1452, 1431, 1334, 1322, 1284, 1230, 1213, 1196, 1182, 1099, 1069, 1037, 1013, 968, 903, 810, 784, 767, 717 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) 1.80 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.14 [complex signal, 4H, 2(12)-H_{exo} and 2(12)-H_{endo}], 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.37 [overlapped dt, *J* = 12.5 Hz, *J'* = 6.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 3.15 [m, 2H, 1(7)-H], 4.53 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 7.13–7.19 [complex signal, 6H, 9(10)-H, 8(11)-H and Ar-3(5)-H], 7.33 [dm, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-2(6)-H]. ¹³C NMR (CDCl₃) 21.0 (CH₃, Ar-CH₃), 33.2 [CH₂, C6(13)], 39.3 [CH, C1(7)], 40.1 [CH₂, C2(12)], 69.2 (CH, C5), 72.0 (C, C3), 123.5 [CH, Ar-C2(6)], 126.5 [CH, C9(10)], 128.5 [CH, C8(11)], 128.8 [CH, Ar-C3(5)], 135.9 (C, Ar-C4), 146.4 [C, C7a(C11a)], 146.9 (C, Ar-C1). MS (EI), *m/z* (%): 291 (6), 290 (M⁺, 27), 156 (100), 141 (43), 119 (25), 91 (18). Anal. Calcd for C₂₁H₂₂O (290.41): C, 86.85; H, 7.64. Found: C, 86.62; H, 7.76.

1,2,3,5,6,7-Hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl acetate, **10**, mp 99–100 °C (Et₂O). IR 3019, 2945, 2926, 2851, 1728, 1493, 1450, 1438, 1374, 1326, 1279, 1254, 1210, 1197, 1117, 1087, 1062, 1048, 1030, 1019, 977, 960, 937, 764, 741, 699 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) 1.67 [dd, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 1.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.05 (s, 3H, COCH₃), 2.21–2.26 [m, 2H, 2(12)-H_{endo}], 2.32 [dt, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.59 [d, *J* = 12.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 3.20 [t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1(7)-H], 4.61 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 7.13 [s, 4H, 9(10)-H and 8(11)-H]. ¹³C NMR (CDCl₃) 22.3 (CH₃, COCH₃), 32.5 [CH₂, C6(13)], 37.1 [CH₂, C2(12)], 39.0 [CH, C1(7)], 73.6 (CH, C5), 102.1 (C, C3), 126.8 [CH, C9(10)], 128.5 [CH, C8(11)], 145.2 [C, C7a(C11a)], 168.5 (C, CO). MS (EI), *m/z* (%): 258 (M⁺, 14), 216 (14), 198 (75), 157 (26), 156 (100), 141 (45), 129 (56), 128 (40), 115 (34), 43 (22). Anal. Calcd for C₁₆H₁₈O₃ (258.32): C, 74.40; H, 7.02. Found: C, 74.58; H, 7.12.

11-endo-Acetoxi-5,6,8,9-tetrahydro-5,9-propanobenzocyclohepten-7-one, **11**, mp 186–187 °C (Et₂O). IR 3021, 2931, 1726, 1691, 1493, 1455, 1428, 1403, 1374, 1247, 1216, 1202, 1180, 1092, 1068, 1036, 1023, 978, 933, 772 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) 2.01 (s, 3H, COCH₃), 2.09 [dt, *J* = 15.0 Hz, *J'* = 3.5 Hz, 2H, 10(12)-H_{endo}], 2.16 [dt, *J* = 15.0 Hz, *J'* = 4.5 Hz, 2H, 10(12)-H_{exo}], 2.66 [dd, *J* = 17.5 Hz, *J'* = 4.5 Hz, 2H, 6(8)-H_{exo}], 2.90 [ddm, *J* = 17.5 Hz, *J'* = 4.0 Hz, 2H, 6(8)-H_{endo}], 3.22 [pseudo quint, *J* = 4.5 Hz, 2H, 5(9)-H], 5.24 (quint, *J* = 4.5 Hz, 1H, 11-H), 7.18 [m, 2H, 1(4)-H], 7.21 [m, 2H, 2(3)-H]. ¹³C NMR (CDCl₃) 21.5 (CH₃, COCH₃), 34.9 [CH₂, C10(12)], 39.6 [CH, C5(9)], 48.6 [CH₂, C6(8)], 72.1 (CH, C11), 127.6 [CH, C2(3)], 128.5 [CH, C1(4)], 143.8 [C, C4a(C9a)], 170.1 (C, COCH₃), 210.5 (C, C7). MS (EI), *m/z* (%): 258 (M⁺, 0.2), 198 ([M–AcOH]⁺, 21), 156 (17), 142 (16), 141 (100), 129 (28), 128 (28), 115 (21), 43 (16). Anal. Calcd for C₁₆H₁₈O₃ (258.32): C, 74.40; H, 7.02. Found: C, 74.10; H, 7.19.

4.1.4. N-Benzyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 12a-HCl

To a solution of amine 7-HCl (251 mg, 1.00 mmol) in MeOH (10 mL), NaBH₃CN (95%, 135 mg, 2.04 mmol), AcOH (0.3 mL) and benzaldehyde (106 mg, 1.00 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 18 h. After concentration to dryness, water (10 mL) was added to the residue and the mixture

was extracted with Et₂O (4 × 15 mL). The combined organic extracts were washed with 2 N NaOH (3 × 25 mL), brine (2 × 25 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was taken in EtOAc and the amine **12a** was precipitated as its hydrochloride (225 mg, 66% yield) by adding an excess of Et₂O-HCl. The analytical sample was obtained by crystallization from EtOAc, mp 275–276 °C. IR 3100–2300 (max. at 2952, 2926, 2784, 2687, 2612, 2548, 2366), 1564, 1495, 1456, 1437, 1360, 1335, 1302, 1200, 1075, 1040, 1004, 966, 774, 761, 700 cm⁻¹. ¹H NMR 1.78 [d, *J* = 14.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.09 [d, *J* = 12.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.37 [dt, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.41–2.45 (m, 2 H, 2(12)-H_{endo}), 3.34 [t, *J* = 5.5 Hz, 2H, 1(7)-H], 4.29 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.63 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 7.16 [m, 2H, 9(10)-H], 7.21 [m, 2H, 8(11)-H], 7.44–7.48 (complex signal, 3H, Ar-H_{meta} and Ar-H_{para}), 7.51 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J'* = 2.0 Hz, 2H, Ar-H_{ortho}). ¹³C NMR 33.2 [CH₂, C6(13)], 36.1 [CH₂, C2(12)], 39.3 [CH, C1(7)], 45.3 (CH₂, CH₂-C₆H₅), 74.1 (CH, C5), 87.0 (C, C3), 128.3 [CH, C9(10)], 129.6 [CH, C8(11)], 130.2 (CH, Ar-C_{meta}), 130.5 (CH, Ar-C_{para}), 131.1 (CH, Ar-C_{ortho}), 132.7 (C, Ar-C_{ipso}), 145.9 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), *m/z* (%): 306 ([M+H]⁺, 6), 305 (M⁺, 4), 150 (36), 149 (30), 129 (19), 128 (16), 115 (17), 91 (100), 65 (22). Anal. Calcd for C₂₁H₂₃NO-HCl (341.88): C, 73.78; H, 7.08; N, 4.10; Cl, 10.37. Found: C, 73.82; H, 7.29; N, 4.01; Cl, 9.89.

4.1.5. N-(2-Phenylethyl)-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 12b-HCl

To a solution of amine 7-HCl (251 mg, 1.00 mmol) in MeOH (20 mL), NaBH₃CN (95%, 135 mg, 2.04 mmol), AcOH (0.3 mL) and phenylacetaldehyde (120 mg, 1.00 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 18 h. After concentration to dryness, water (15 mL) was added to the residue and the mixture was extracted with Et₂O (4 × 20 mL). The combined organic extracts were washed with 2 N NaOH (3 × 20 mL), brine (2 × 20 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give a residue which was subjected to column chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 9:1) furnishing amine **12b** (192 mg, 60% yield). From a solution of **12b** in EtOAc, its corresponding hydrochloride was precipitated by adding an excess of Et₂O-HCl. The analytical sample was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 280–281 °C. IR 2951, 2921, 2900, 2786, 2753, 2720, 2439, 2362, 2340, 1579, 1484, 1456, 1361, 1332, 1218, 1100, 1065, 1041, 1004, 972, 763, 748, 702 cm⁻¹. ¹H NMR 1.74 [dd, *J* = 14.0 Hz, *J'* = 1.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.02 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.30–2.36 [complex signal, 4H, 6(13)-H_{endo} and 2(12)-H_{endo}], 3.00 (m, 2H, CH₂-C₆H₅), 3.32 [complex signal, 4H, CH₂-CH₂-C₆H₅ and 1(7)-H], 4.58 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 7.14 [m, 2H, 9(10)-H], 7.18 [m, 2H, 8(11)-H], 7.27 (tt, *J* = 7.5 Hz, *J'* = 1.5 Hz, 1H, Ar-H_{para}), 7.30 (dm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{ortho}), 7.34 (tm, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H_{meta}). ¹³C NMR 33.1 [CH₂, C6(13)], 33.6 (CH₂, CH₂-C₆H₅), 36.1 [CH₂, C2(12)], 39.2 [CH, C1(7)], 42.5 (CH₂, CH₂-CH₂-C₆H₅), 74.0 (CH, C5), 86.7 (C, C3), 128.3 [CH, C9(10) and Ar-C_{para}], 129.66 [CH, C8(11)], 129.72 (CH, Ar-C_{ortho}), 129.9 (CH, Ar-C_{meta}), 137.8 (C, Ar-C_{ipso}), 145.9 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), *m/z* (%): 320 ([M+H]⁺, 1), 319 (M⁺, 1), 230 (20), 229 (100), 228 (27), 199 (73), 157 (39), 141 (22), 129 (49), 128 (19), 115 (25), 105 (23), 104 (33), 91 (28). Anal. Calcd for C₂₂H₂₅NO-HCl (355.91): C, 74.24; H, 7.36; N, 3.94; Cl, 9.96. Found: C, 73.88; H, 7.39; N, 3.95; Cl, 10.17.

4.1.6. N-Benzyl-N-methyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 13a-HCl

To a solution of **12a**-HCl (341 mg, 1.00 mmol) in acetonitrile (10 mL), formaldehyde (0.78 mL, 37 wt % in water solution, 10 mmol) and NaBH₃CN (198 mg, 3.00 mmol) were added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature, acetic acid (0.4 mL) was added and the mixture was stirred at room tempera-

ture for 2 h. An additional portion of NaBH_2CN (198 mg, 3.00 mmol) was added and the mixture was further stirred at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated to dryness, 2 N NaOH (10 mL) was added and the suspension was extracted with CH_2Cl_2 (3×15 mL). The combined organic phases were washed with H_2O (2×10 mL), dried with anhyd Na_2SO_4 , filtered and concentrated in vacuo to give **13a** (289 mg, 91% yield) as a white solid. Its hydrochloride was obtained by adding an excess of $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{HCl}$ to a solution of the amine in EtOAc, followed by filtration of the formed precipitate. The analytical sample was obtained by crystallization from MeOH/ CH_2Cl_2 , mp 235–236 °C. IR 3500–2100 (max. at 3428, 3031, 2945, 2933, 2845, 2399, 2304), 1624, 1496, 1456, 1436, 1410, 1396, 1361, 1333, 1306, 1222, 1197, 1176, 1131, 1079, 1059, 1033, 973, 958, 910, 868, 788, 778, 759, 737, 706, 699 cm^{-1} . ^1H NMR 1.79 [dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 1.0$ Hz, 2H, 6(13)- H_{exo}], 2.18–2.48 [br signal, 6H, 2(12)- H_{exo} , 2(12)- H_{endo} and 6(13)- H_{endo}], 2.74 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 3.40 [br s, 2H, 1(7)-H], 3.96 (br signal, 1H, $\text{CH}_b\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.72 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5-H), 4.88 (br signal, 1H, $\text{CH}_b\text{-C}_6\text{H}_5$), 7.17 [m, 2H, 9(10)-H], 7.23 [m, 2H, 8(11)-H], 7.48–7.53 (complex signal, 5H, Ar-H benzyl). ^{13}C NMR 33.0 [CH_2 , C6(13)], 33.4 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-N}$), 33.8 [br CH_2 , C2(12)], 39.2 [CH, C1(7)], 54.8 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 75.0 (CH, C5), 92.3 (C, C3), 128.4 [CH, C9(10)], 129.7 [CH, C8(11)], 130.3 (CH, Ar- C_{meta}), 131.1 (CH, Ar- C_{para}), 131.3 (C, Ar- C_{ipso}), 132.6 (CH, Ar- C_{ortho}), 146.0 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), m/z (%): 319 (M^+ , 18), 164 (14), 163 (100), 162 (25), 91 (38). Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}\cdot\text{HCl}\cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$ (360.41): C, 73.32; H, 7.41; N, 3.89; Cl, 9.84. Found: C, 73.30; H, 7.44; N, 4.00; Cl, 9.69.

4.1.7. *N,N*-Dibenzyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, **13b HCl**

A suspension of **12a**-HCl (200 mg, 0.59 mmol), K_2CO_3 (70 mg, 0.5 mmol), benzyl chloride (0.11 mL, 1.00 mmol) and NaI (65 mg, 0.43 mmol) in acetonitrile (10 mL) was heated under reflux for 24 h. To the cold mixture, AcOEt (30 mL) was added and the solution was washed with water (3×20 mL). The organic layer was dried with anhyd Na_2SO_4 , filtered and concentrated in vacuo to give a residue which was subjected to column chromatography (hexane/EtOAc 99:1) gave **13b** (172 mg, 74% yield). Its hydrochloride was obtained by adding an excess of $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{HCl}$ to a solution of the amine in EtOAc, followed by filtration of the formed precipitate. The analytical sample was obtained by crystallization from MeOH/ Et_2O , mp 268–270 °C. IR 3500–2300 (max. at 3356, 3041, 2936, 2916, 2843, 2471), 1625, 1492, 1458, 1333, 1225, 1198, 1078, 1064, 1041, 964, 853, 747, 696 cm^{-1} . ^1H NMR 1.81 [d, $J = 13.5$ Hz, 2H, 6(13)- H_{exo}], 2.36–2.50 [complex signal, 4H, 2(12)- H_{exo} and 6(13)- H_{endo}], 2.60 (br s, 2H, 2(12)- H_{endo}), 3.43 [br s, 2H, 1(7)-H], 4.22 (d, $J = 12.5$ Hz, 2H, $2\text{CH}_a\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.80 (br s, 1H, 5-H), 4.89 (d, $J = 12.5$ Hz, 2H, $2\text{CH}_b\text{-C}_6\text{H}_5$), 7.13–7.20 [complex signal, 6H, 9(10)-H and 2 Ar- H_{ortho}], 7.21–7.32 [complex signal, 6H, 8(11)-H and 2 Ar- H_{meta}], 7.33–7.40 (br signal, 2H, 2 Ar- H_{para}). ^{13}C NMR 33.0 [CH_2 , C6(13)], 34.3 [CH_2 , C2(12)], 39.3 [CH, C1(7)], 54.2 (CH_2 , $2\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 75.0 (CH, C5), 94.8 (C, C3), 128.4 [CH, C9(10)], 129.7 [CH, C8(11)], 130.0 [CH, 2 Ar- C_{meta}], 130.6 (CH, 2 Ar- C_{para}), 132.4 (CH, 2 Ar- C_{ortho}), 132.0 (C, 2 Ar- C_{ipso}), 146.1 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), m/z (%): 396 ([$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 6), 395 (M^+ , 13), 239 (28), 148 (42), 129 (20), 106 (28), 91 (100). Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NO}\cdot\text{HCl}\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (441.01): C, 76.26; H, 7.09; N, 3.18; Cl, 8.04. Found: C, 76.36; H, 7.11; N, 3.23; Cl, 8.06.

4.1.8. *N*-Methyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, **14 HCl**

A suspension of **13a**-HCl $0.25\text{H}_2\text{O}$ (465 mg, 1.29 mmol) and 5% Pd/C (50% in water, 100 mg) in absolute EtOH (50 mL) was hydrogenated at 38 atm and 100 °C for 24 h. The suspension was filtered, the residue was washed with EtOH and to the combined organic filtrates an excess of $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{HCl}$ was added. Evaporation of the sol-

vents from the filtrate in vacuo followed by crystallization of the residue from MeOH/ Et_2O gave **14**-HCl $0.25\text{H}_2\text{O}$ (287 mg, 82% yield), mp 265–266 °C. IR 3500–2400 (max. at 3429, 2945, 2918, 2840, 2798, 2754, 2682, 2485, 2412), 1624, 1481, 1453, 1336, 1227, 1198, 1163, 1089, 1072, 1042, 971, 758 cm^{-1} . ^1H NMR 1.74 [dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 1.0$ Hz, 2H, 6(13)- H_{exo}], 2.00 [d, $J = 13.0$ Hz, 2H, 2(12)- H_{exo}], 2.24–2.28 [m, 2H, 2(12)- H_{endo}], 2.32 (dt, $J = 13.5$ Hz, $J' = 5.5$ Hz, 2H, 6(13)- H_{endo}), 2.67 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 3.30–3.33 [br t, $J = 5.5$ Hz, 2H, 1(7)-H], 4.57 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5-H), 7.14–7.17 [m, 2H, 9(10)-H], 7.18–7.20 [m, 2H, 8(11)-H]. ^{13}C NMR 25.7 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-N}$), 33.1 [CH_2 , C6(13)], 35.8 [CH_2 , C2(12)], 39.1 [CH, C1(7)], 74.0 (CH, C5), 85.9 (C, C3), 128.3 [CH, C9(10)], 129.7 [CH, C8(11)], 145.9 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), m/z (%): 230 ([$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 21), 229 (M^+ , 15), 156 (22), 141 (28), 129 (18), 115 (14), 75 (15), 74 (100), 73 (74). Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}\cdot\text{HCl}\cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$ (270.29): C, 66.66; H, 7.64; N, 5.18; Cl, 13.12. Found: C, 66.67; H, 7.66; N, 5.23; Cl, 13.48.

4.1.9. *N*-Propargyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, **15 HCl** and *N,N*-dipropargyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, **16 HCl**

A suspension of **7**-HCl (275 mg, 1.09 mmol), K_2CO_3 (180 mg, 1.28 mmol), propargyl bromide (0.16 mL, 80% solution in toluene, 1.44 mmol) and NaI (15 mg, 0.1 mmol) in acetonitrile (15 mL) was heated under reflux for 18 h. After concentration to dryness in vacuo, the residue was taken in CH_2Cl_2 (20 mL) and the solution was washed with water (3×10 mL). The organic layer was dried with anhyd Na_2SO_4 , filtered and concentrated in vacuo to give a residue which was subjected to column chromatography (hexane/EtOAc mixtures) affording **16** (hexane/EtOAc 97:3, 129 mg, 40% yield) and **15** (hexane/EtOAc 95:5, 108 mg, 34% yield). The hydrochlorides of **15** and **16** were obtained by adding an excess of $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{HCl}$ to a solution of the amine in EtOAc, followed by filtration of the formed precipitate. **15**: mp 230–231 °C (EtOAc/ Et_2O). IR 3500–2450 (max. at 3448, 3285, 3199, 2994, 2919, 2844, 2761, 2734, 2699, 2647, 2580, 2392), 2123, 1569, 1455, 1434, 1336, 1218, 1198, 1070, 1050, 1039, 1018, 1007, 964, 760, 740, 705 cm^{-1} . ^1H NMR 1.74 [d, $J = 14.0$ Hz, 2H, 6(13)- H_{exo}], 1.99 [d, $J = 13.0$ Hz, 2H, 2(12)- H_{exo}], 2.29–2.35 [complex signal, 4H, 2(12)- H_{endo} and 6(13)- H_{endo}], 3.20 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.31 [t, $J = 5.5$ Hz, 2H, 1(7)-H], 4.03 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.58 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5-H), 7.15 [m, 2H, 9(10)-H], 7.19 [m, 2H, 8(11)-H]. ^{13}C NMR 30.6 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 33.0 [CH_2 , C6(13)], 36.0 [CH_2 , C2(12)], 39.1 [CH, C1(7)], 74.2 (CH, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 75.3 (CH, C5), 78.6 (C, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 86.8 (C, C3), 128.4 [CH, C9(10)], 129.7 [CH, C8(11)], 145.8 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), m/z (%): 253 (M^+ , 18), 252 (14), 238 (36), 210 (19), 157 (48), 156 (63), 155 (32), 143 (25), 142 (32), 141 (100), 129 (76), 128 (70), 115 (66), 97 (87), 96 (63). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}\cdot 1.05\text{HCl}$ (291.63): C, 70.02; H, 6.93; N, 4.80; Cl, 12.76. Found: C, 69.84; H, 7.01; N, 4.72; Cl, 12.81. Compound **16**: mp 172–173 °C. IR 3276, 3227, 3167, 2930, 2911, 2429, 2221, 2117, 1731, 1491, 1452, 1433, 1358, 1335, 1260, 1218, 1135, 1122, 1075, 1065, 1034, 967, 905, 767, 729, 694 cm^{-1} . ^1H NMR 1.67 [dd, $J = 13.5$ Hz, $J' = 1.5$ Hz, 2H, 6(13)- H_{exo}], 2.06 [d, $J = 13.5$ Hz, 2H, 2(12)- H_{exo}], 2.22–2.27 [complex signal, 4H, 2(12)- H_{endo} and 6(13)- H_{endo}], 2.79 (s, 2H, $2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.22 [t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 1(7)-H], 3.97 (s, 4H, $2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.48 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5-H), 7.11 [m, 2H, 9(10)-H], 7.15 [m, 2H, 8(11)-H]. ^{13}C NMR 33.5 [CH_2 , C6(13)], 36.17 (CH_2 , $2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 36.21 [CH_2 , C2(12)], 39.8 [CH, C1(7)], 73.7 (CH, C5), 76.5 (CH, $2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 78.7 (C, $2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 88.7 (C, C3), 128.0 [CH, C9(10)], 129.5 [CH, C8(11)], 146.6 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), m/z (%): 291 (M^+ , 12), 290 (20), 276 (50), 209 (24), 195 (18), 181 (16), 169 (28), 168 (18), 167 (18), 157 (60), 155 (39), 154 (20), 153 (23), 143 (34), 142 (39), 141 (90), 135 (33), 134 (38), 130 (20), 129 (100), 128 (76), 127 (24), 116 (20), 115 (77), 91 (24). Accurate mass measurement

(ESI⁺) calcd for [C₂₀H₂₂NO+H]⁺: 292.1696. Found: 292.1689. Anal. Calcd for the free base C₂₀H₂₁NO (291.39): C, 82.44; H, 7.26; N, 4.81. Found: C, 82.12; H, 7.39; N, 4.58.

4.1.10. N,N-Dimethyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 17a HCl

To a cold (0 °C) solution of **7** (503 mg, 2.00 mmol) in Et₂O (10 mL), formaldehyde (3.5 mL, 37 wt% in water solution, 44.4 mmol) and, dropwise, formic acid (3.0 mL, 80 mmol) were added and the mixture was stirred at 80 °C for 24 h. The mixture was allowed to cool to room temperature, was diluted with Et₂O (20 mL), 5 N NaOH (10 mL) was added dropwise and the suspension was stirred at room temperature for 15 min. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with Et₂O (4 × 20 mL). The combined organic phases were washed with brine (30 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give **17a** (447 mg, 92% yield). Its hydrochloride was obtained by adding an excess of Et₂O-HCl to a solution of the amine in EtOAc, followed by filtration of the formed precipitate. The analytical sample was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 263–264 °C. IR 3500–2300 (max. at 3370, 3320, 3016, 2961, 2946, 2915, 2844, 2612, 2583, 2507, 2401), 1616, 1479, 1452, 1433, 1390, 1361, 1335, 1222, 1196, 1166, 1154, 1122, 1074, 1051, 1030, 1003, 965, 956, 909, 790, 613 cm⁻¹. ¹H NMR 1.75 [dd, *J* = 14.0 Hz, *J'* = 1.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.14 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.23–2.27 [m, 2H, 2(12)-H_{endo}], 2.32 [dt, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.85 (s, 6H, CH₃-N), 3.34–3.37 [br t, *J* = 5.5 Hz, 2H, 1(7)-H], 4.63 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 7.16 [m, 2H, 9(10)-H], 7.21 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR 32.9 [CH₂, C6(13)], 33.4 [CH₂, C2(12)], 36.8 (CH₃, CH₃-N), 39.0 [CH, C1(7)], 74.6 (CH, C5), 90.8 (C, C3), 128.3 [CH, C9(10)], 129.7 [CH, C8(11)], 145.8 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), *m/z* (%): 243 (M⁺, 19), 141 (19), 129 (17), 128 (17), 115 (19), 87 (100), 72 (24). Anal. Calcd for C₁₆H₂₁NO·HCl·0.5H₂O (288.82): C, 66.54; H, 8.03; N, 4.85; Cl, 12.28. Found: C, 66.74; H, 8.10; N, 4.93; Cl, 11.93.

4.1.11. N,N-Diethyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine (2R,3R)-tartrate, 17b (2R,3R)-tartrate

To a solution of **7**·HCl (251 mg, 1.00 mmol) in methanol (13 mL), NaBH₃CN (95%, 145 mg, 2.19 mmol), AcOH (0.4 mL) and acetaldehyde (0.33 mL, 5.9 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 8 h. An additional portion of NaBH₃CN (95%, 77 mg, 1.16 mmol) and acetaldehyde (0.16 mL, 2.9 mmol) were added, the mixture was stirred at room temperature for 10 h and then it was concentrated in vacuo to dryness. Water (20 mL) was added to the residue, the suspension was basified with 1 N NaOH (8 mL) and was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic extracts were washed with brine (2 × 10 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give **17b** as an oil (246 mg, 91% yield). An analytical sample of the (2R,3R)-tartrate of **17b** was obtained by adding 1 equiv of (2R,3R)-(+)-tartaric acid in MeOH (15 mL) to a solution of **17b** in EtOAc (15 mL), evaporation to dryness and crystallization from 2-propanol, mp 167–168 °C. IR 3600–2500 (max. at 3321, 3277, 2926, 2857, 2666), 1733, 1579, 1417, 1335, 1306, 1264, 1216, 1135, 1076, 1067, 1034, 968, 901, 789, 772, 680 cm⁻¹. ¹H NMR 1.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 1.74 [dd, *J* = 14.0 Hz, *J'* = 1.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.16 [d, *J* = 12.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.30–2.36 [complex signal, 4H, 6(13)-H_{endo} and 2(12)-H_{endo}], 3.30–3.38 [complex signal, 6H, 2CH₂-CH₃ and 1(7)-H], 4.40 (s, 2H, 2CHOH tartaric acid), 4.63 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 7.15 [m, 2H, 9(10)-H], 7.20 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR 12.4 (CH₃, CH₂CH₃), 33.0 [CH₂, C6(13)], 34.0 [CH₂, C2(12)], 39.1 [CH, C1(7)], 45.9 (CH₂, 2CH₂-CH₃), 74.0 (CH, 2CHOH tartaric acid), 74.5 (CH, C5), 93.0 (C, C3), 128.3 [CH, C9(10)], 129.7 [CH, C8(11)], 146.0 [C, C7a(C11a)], 176.5 (C, 2CO₂H). MS (EI), *m/z* (%): 272 ([M+H]⁺, 13),

271 (M⁺, 6), 141 (19), 129 (30), 128 (19), 116 (38), 115 (100), 100 (46), 72 (19). Anal. Calcd for C₁₈H₂₅NO·C₄H₆O₆·1.5H₂O (448.51): C, 58.92; H, 7.64; N, 3.12. Found: C, 58.68; H, 7.76; N, 2.79.

4.1.12. N-(1,2,3,5,6,7-Hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)piperidine hydrochloride, 18 HCl

To a solution of **7**·HCl (590 mg, 2.37 mmol) in DMF (8.0 mL), anhyd Et₃N (1.32 mL, 9.45 mmol) was added and the suspension was stirred at room temperature for 2 h. 1,5-Dibromopentane (0.53 mL, 3.88 mmol) was added and the mixture was heated at 60 °C for 26 h. To the cold mixture, water (30 mL) was added and the solution was extracted with EtOAc (4 × 30 mL). The combined organic extracts were washed with water (5 × 15 mL), dried with anhyd Na₂SO₄ and filtered. Excess of Et₂O-HCl was added and the solution was concentrated in vacuo to dryness to give **18**·HCl (348 mg, 46% yield). The analytical sample of **18**·HCl was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 187–188 °C. IR 3016, 2946, 2914, 2856, 2643, 2599, 2543, 2480, 2459, 2375, 1492, 1452, 1440, 1426, 1331, 1220, 1198, 1113, 1098, 1077, 1048, 1029, 1014, 970, 896, 753, 674 cm⁻¹. ¹H NMR 1.54 (br s, 1H, piperidine 4-H_{ax}), 1.74 [dd, *J* = 14.0 Hz, *J'* = 1.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 1.76–1.99 [complex signal, 5H, piperidine 4-H_{eq}, 3(5)-H_{ax} and 3(5)-H_{eq}], 2.14 [d, *J* = 12.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.30–2.35 [complex signal, 4H, 2(12)-H_{endo} and 6(13)-H_{endo}], 2.96 [br s, 2H, piperidine 2(6)-H_{ax}], 3.34 [t, *J* = 5.5 Hz, 2H, 1(7)-H], 3.71 [br s, 2H, piperidine 2(6)-H_{eq}], 4.63 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 7.15 [m, 2H, 9(10)-H], 7.19 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR 23.4 (CH₂, piperidine C4), 24.5 [CH₂, piperidine C3(5)], 33.1 [CH₂, C6(13)], 33.9 [CH₂, C2(12)], 39.1 [CH, C1(7)], 47.7 [CH₂, piperidine C2(6)], 74.6 (CH, C5), 91.4 (C, C3), 128.4 [CH, C9(10)], 129.7 [CH, C8(11)], 146.0 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), *m/z* (%): 283 (M⁺, 20), 141 (15), 129 (18), 128 (27), 127 (100), 115 (13), 112 (18). Anal. Calcd for C₁₉H₂₅NO·HCl (319.87): C, 71.34; H, 8.19; N, 4.38; Cl, 11.08. Found: C, 70.91; H, 8.28; N, 4.27; Cl, 10.96.

4.1.13. 2-[(1,2,3,5,6,7-Hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amino]acetamide hydrochloride, 19 HCl

A suspension of **7**·HCl (190 mg, 0.75 mmol), K₂CO₃ (123 mg, 0.88 mmol), 2-chloroacetamide (93 mg, 0.94 mmol) and NaI (15 mg, 0.1 mmol) in acetonitrile (10 mL), was heated under reflux for 18 h and then it was concentrated in vacuo to dryness. CH₂Cl₂ (20 mL) was added to the residue, the organic solution was washed with water (3 × 10 mL), was dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give an oily residue. Column chromatography (silica gel) gave starting amine **7** (hexane/EtOAc 4:6, 31 mg) and acetamide **19** (EtOAc/MeOH 95/5, 91 mg, 55% yield based on unrecovered starting material). Its hydrochloride was obtained by adding an excess of Et₂O-HCl to a solution of the amine in Et₂O, followed by filtration of the precipitated solid, mp 254–255 °C. IR 3600–2400 (max. at 3563, 3322, 3176, 3057, 2934, 2722, 2613, 2402), 1683, 1622, 1558, 1493, 1453, 1435, 1418, 1400, 1361, 1335, 1304, 1219, 1197, 1075, 1039, 969, 759 cm⁻¹. ¹H NMR 1.74 [d, *J* = 13.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 1.99 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.28–2.34 [complex signal, 4H, 2(12)-H_{endo} and 6(13)-H_{endo}], 3.30 [t, *J* = 5.5 Hz, 2H, 1(7)-H], 3.90 (s, 2H, CH₂CONH₂), 4.57 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 7.15 [m, 2H, 9(10)-H], 7.19 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR 33.1 [CH₂, C6(13)], 36.1 [CH₂, C2(12)], 39.2 [CH, C1(7)], 42.0 (CH₂, CH₂CONH₂), 74.1 (CH, C5), 86.5 (C, C3), 128.3 [CH, C9(10)], 129.7 [CH, C8(11)], 145.9 [C, C7a(C11a)], 168.9 (C, CO). MS (EI), *m/z* (%): 274 (6), 273 ([M+H]⁺, 10), 272 (M⁺, 6), 256 (12), 231 (14), 230 (45), 229 (69), 228 (41), 201 (30), 200 (49), 199 (34), 158 (46), 157 (68), 156 (41), 155 (32), 143 (23), 142 (38), 141 (80), 130 (50), 129 (100), 128 (52), 117 (38), 116 (97), 115 (59), 99 (50). Anal. Calcd for C₁₆H₂₀N₂O₂·HCl·0.75H₂O (322.32): C, 59.62; H, 7.04; N, 8.69; Cl, 11.00. Found: C, 59.94; H, 6.96; N, 8.61; Cl, 10.95.

4.1.14. 1,2,3,5,6,7-Hexahydro-5-methyl-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-ol, 21a

To a flask containing anhyd toluene (100 mL) at 0 °C, methylmagnesium bromide (84 mL, 3 M in Et₂O, 0.25 mol) was added. Then, a solution of **20** (11.00 g, 51.4 mmol) in anhyd toluene (300 mL) was added dropwise, keeping the temperature between –10 and 0 °C. The mixture was allowed to reach room temperature with stirring overnight. An aqueous solution of NH₄Cl (10%) was added until the resulting precipitate was completely dissolved. The organic phase was separated and the aqueous one was extracted with CH₂Cl₂ (4 × 20 mL). The combined organic extracts were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give a white solid (11.7 g, 99% yield), mp 169–170 (lit. 167–169).¹⁶

4.1.15. 5-Ethyl-1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-ol, 21b

To a flask containing anhyd toluene (50 mL) at 0 °C, ethylmagnesium bromide (40 mL, 3 M in Et₂O, 0.12 mol) was added. Then, a solution of **20** (5.00 g, 23.4 mmol) in anhyd toluene (150 mL) was added dropwise, keeping the temperature between –10 and 0 °C. The mixture was allowed to reach room temperature with stirring overnight. An aqueous solution of NH₄Cl (10%) was added until the resulting precipitate was completely dissolved. The organic phase was separated and the aqueous one was extracted with CH₂Cl₂ (4 × 50 mL). The combined organic extracts were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give a white solid (5.14 g, 90% yield), mp 155 °C (methanol/Et₂O). IR 3321, 3071, 3026, 2973, 2958, 2934, 2912, 2874, 2837, 1495, 1458, 1439, 1426, 1357, 1347, 1279, 1246, 1164, 1140, 1125, 1112, 1007, 970, 945, 910, 760, 662 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) 0.88 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.56 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.62 [unresolved dt, *J* = 13.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 1.84 [ddm, *J* = 13.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 1.91 [dt, *J* = 13.0 Hz, *J* = 1.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 1.99 [ddm, *J* = 13.0 Hz, *J* = 6.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 3.1–3.5 (br signal, 1H, OH), 3.22 [tt, *J* = 6.0 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, 1(7)-H], 7.14 [pseudo s, 4H, 9(10)-H and 8(11)-H]. ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) 7.4 (CH₃, CH₂CH₃), 35.9 [CH₂, C6(13)], 37.0 (CH₂, CH₂CH₃), 39.4 [CH, C1(7)], 39.8 [CH₂, C2(12)], 78.3 (C, C5), 94.7 (C, C3), 126.7 [CH, C9(10)], 128.4 [CH, C8(11)], 145.3 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), *m/z* (%): 245 (18), 244 (M⁺, 100), 215 (18), 184 (38), 172 (26), 169 (29), 157 (35), 156 (28), 155 (33), 129 (85), 128 (42), 115 (47). Anal. Calcd for C₁₆H₂₀O₂ (244.33): C, 78.65; H, 8.25. Found: C, 78.59; H, 8.20.

4.1.16. N-(1,2,3,5,6,7-Hexahydro-5-methyl-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)acetamide hydrochloride, 22a

A mixture of alcohol **21a** (500 mg, 2.17 mmol), acetonitrile (10 mL) and concentrated H₂SO₄ (0.1 mL, 1.87 mmol) was stirred under reflux for 18 h. The mixture was allowed to cool to room temperature, water (20 mL) was added and the solution was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic extracts were washed with brine (2 × 10 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give **22a** as a white solid (477 mg, 81% yield). The analytical sample of **22a** was obtained by crystallization from CH₂Cl₂, mp 172–177 °C. IR 3239, 3042, 2973, 2917, 1635, 1540, 1495, 1448, 1432, 1372, 1284, 1226, 1174, 1040, 982, 841, 762, 738, 603 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) 1.22 (s, 3H, CH₃), 1.65 [dm, *J* = 13.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 1.91 [overlapped dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 1.93 (s, 3H, COCH₃), 2.01 [dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 5.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.56 [d, *J* = 13.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 3.12 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1(7)-H], 5.76 (s, 1H, NH), 7.08–7.12 [complex signal, 4H, 9(10)-H and 8(11)-H]. ¹³C NMR (CDCl₃) 24.4 (CH₃, COCH₃), 31.4 (CH₃, C5–CH₃), 37.2 [CH₂, C2(12)], 38.68 [CH, C1(7)], 38.72 [CH₂, C6(13)], 73.7 (C, C5), 84.1 (C, C3), 126.6 [CH, C9(10)], 128.3 [CH, C8(11)], 145.1 [C, C7a(C11a)], 168.1 (C,

COCH₃). MS (EI), *m/z* (%): 272 (20), 271 (M⁺, 100), 253 (16), 212 (44), 198 (33), 197 (19), 194 (25), 170 (88), 169 (42), 157 (46), 156 (30), 155 (74), 142 (26), 129 (56), 128 (40), 115 (30). Anal. Calcd for C₁₇H₂₁NO₂·0.15CH₂Cl₂ (284.10): C, 72.51; H, 7.56; N, 4.93. Found: C, 72.16; H, 7.54; N, 4.82.

4.1.17. N-(5-Ethyl-1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)acetamide, 22b

A mixture of alcohol **21b** (3.50 g, 14.3 mmol), acetonitrile (75 mL) and concentrated H₂SO₄ (0.6 mL, 11.3 mmol) was stirred under reflux for 18 h. The solution was allowed to cool to room temperature, water (150 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The combined organic extracts were washed with brine (2 × 50 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give a residue (1.62 g), which was subjected to column chromatography (hexane/EtOAc mixtures) to give, in order of elution, acetamide **22b** (860 mg, 22% yield) and **23** (630 mg, 13% yield) as white solids. The analytical samples of **22b** and **23** were obtained by crystallization from CH₂Cl₂.

Compound **22b**, mp 191–192 °C. IR 3219, 3029, 2919, 2841, 1639, 1537, 1493, 1451, 1435, 1369, 1347, 1279, 1220, 1199, 1166, 1145, 1056, 1045, 1028, 988, 944, 840, 833, 764, 736, 627, 609 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) 0.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.50 [q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₃], 1.64 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 1.86 [dd, *J* = 13.0 Hz, *J* = 5.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 1.93 (s, 3H, COCH₃), 1.99 [dd, *J* = 13.0 Hz, *J* = 5.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.59 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 3.14 [t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 1(7)-H], 5.78 (s, 1H, NH), 7.08–7.12 [complex signal, 4H, 9(10)-H and 8(11)-H]. ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) 7.1 (CH₃, CH₂CH₃), 24.3 (CH₃, COCH₃), 36.3 [CH₂, C6(13)], 37.1 (CH₂, CH₂CH₃), 37.6 [CH₂, C2(12)], 38.5 [CH, C1(7)], 75.7 (C, C5), 84.0 (C, C3), 126.6 [CH, C9(10)], 128.3 [CH, C8(11)], 145.3 [C, C7a(C11a)], 168.1 (C, CH₃CO). MS (EI), *m/z* (%): 286 (16), 285 (M⁺, 81), 226 (44), 208 (22), 198 (59), 197 (35), 185 (27), 184 (74), 170 (34), 169 (92), 157 (60), 156 (50), 155 (100), 154 (32), 143 (26), 142 (25), 141 (35), 129 (80), 128 (59), 115 (44), 43 (42). Anal. Calcd for C₁₈H₂₃NO₂ (285.39): C, 75.76; H, 8.12; N, 4.91. Found: C, 75.88; H, 8.22; N, 4.84.

7,9-Bisacetamido-6,7,8,9,10,11-hexahydro-8-methyl-5,9:7,11-dimethano-5H-benzocyclononene, **23**, mp 261–262 °C. IR 3406, 3291, 3081, 2969, 2923, 2862, 1662, 1560, 1496, 1446, 1368, 1348, 1320, 1297, 1130, 1074, 1034, 970, 942, 759, 657, 601 cm⁻¹. ¹H NMR 1.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H, C8–CH₃), 1.91 (s, 6H, 2COCH₃), 1.95 [d, *J* = 13.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.06 [dm, 4H, 10(12)-H_{exo} and 2(13)-H_{endo}], 2.58 [ddd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 6.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, 10(12)-H_{endo}], 3.07 (overlapped t, *J* = 7.0 Hz, 1H, 5-H), 3.09 (overlapped t, *J* = 7.0 Hz, 1H, 11-H), 3.16 (q, *J* = 7.5 Hz, 1H, 8-H), 5.09 (s, 2H, 2 NH), 7.01–7.11 (complex signal, 4H, Ar-H). ¹³C NMR 8.6 (CH₃, C8–CH₃), 24.6 (CH₃, COCH₃), 33.3 [CH₂, C6(13)], 39.0 [CH₂, C10(12)], 39.6 (CH) and 39.8 (CH) (C5 and C11), 40.9 (CH, C8), 57.7 [C, C7(9)], 126.5 (CH) and 126.7 (CH) (C2 and C3), 127.8 (CH) and 128.2 (CH) (C1 and C4), 145.3 (C) and 145.9 (C) (C4a and C11a), 169.1 (C, 2COCH₃). MS (EI), *m/z* (%): 327 (23), 326 (M⁺, 100), 283 (22), 267 (31), 224 (23), 209 (25), 208 (92), 198 (20), 193 (50), 186 (41), 179 (22), 169 (42), 168 (79), 167 (31), 156 (42), 141 (48), 129 (26), 128 (31), 115 (24). Anal. Calcd for C₂₀H₂₆N₂O₂·1.25H₂O (348.96): C, 68.84; H, 8.23; N, 8.03. Found: C, 68.98; H, 8.27; N, 8.01.

4.1.18. (1,2,3,5,6,7-Hexahydro-5-methyl-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 28a

A mixture of acetamide **22a** (4.00 g, 14.7 mmol), water (188 mL) and concentrated HCl (24 mL, 288 mmol) were heated under reflux for 24 h. The solution was cooled to 0 °C and the title compound precipitated as a white solid that was filtered and washed with cold water (2 × 20 mL) and EtOAc (1 × 20 mL) to give **28a**-HCl

(2.72 g, 87% yield, based on unrecovered starting compound). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 40 mL) and the combined organic extracts were dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give starting **22a** as a white solid (0.8 g). The analytical sample of **28a** HCl was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp >285 °C (dec). IR 3500–2500 (max. at 3439, 3187, 3131, 3075, 3019, 2985, 2924, 2845, 2731, 2666, 2621, 2554, 2504), 2039, 1602, 1516, 1490, 1451, 1286, 1236, 1214, 1177, 1046, 1020, 993, 836, 755 cm⁻¹. ¹H NMR 1.29 (s, 3H, CH₃), 1.71 [d, *J* = 14.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 1.93 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 1.98 [dd, *J* = 13.0 Hz, *J'* = 6.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.15 [dd, *J* = 11.5 Hz, *J'* = 6.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 3.30 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, 1(7)-H), 4.87 (s, mobile H), 7.14–7.19 [complex signal, 4H, 9(10)-H and 8(11)-H]. ¹³C NMR 31.3 (CH₃, C5-CH₃), 37.3 (CH₂, C2(12)), 39.0 (CH₂, C6(13)), 39.6 (CH, C1(7)), 76.5 (C, C5), 84.0 (C, C3), 129.3 (CH, C9(10)), 129.6 (CH, C8(11)), 145.7 (C, C7a(C11a)). MS (EI), *m/z* (%): 230 ([M+H]⁺, 26), 229 (M⁺, 30), 171 (25), 170 (100), 155 (67), 143 (18), 129 (27), 128 (23), 115 (21). Anal. Calcd for C₁₅H₁₉NO·1.1HCl·0.4H₂O (276.63): C, 65.13; H, 7.62; N, 5.06; Cl, 14.10. Found: C, 65.05; H, 7.66; N, 5.40; Cl, 13.84.

4.1.19. (5-Ethyl-1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 28b

(a) From **22b**: A mixture of acetamide **22b** (380 mg, 1.33 mmol), water (18 mL) and concentrated HCl (2.3 mL, 27.6 mmol) was heated under reflux for 24 h. The solution was cooled to 0 °C and the title compound precipitated as a white solid that was filtered and washed with cold water (5 mL) and EtOAc (2 × 5 mL) to give **28b** HCl (300 mg, 81% yield, 90% based on unrecovered starting compound). The combined organic phase was dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give starting **22b** as a white solid (40 mg). The analytical sample of **28b** HCl was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp >300 °C (dec). IR 3600–2500 (max. at 3501, 2967, 2879, 2676, 2623, 2535), 1592, 1508, 1494, 1465, 1453, 1436, 1354, 1335, 1286, 1237, 1218, 1174, 1057, 1033, 985, 897, 836, 754 cm⁻¹. ¹H NMR 0.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.58 [q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₃], 1.67 [d, *J* = 13.5 Hz, 2 H, 6(13)-H_{exo}], 1.93 [d, *J* = 12.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 1.97 [overlapped dd, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 6.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.14 [ddm, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 3.31 [t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1(7)-H], 4.86 (s, mobile H), 7.14 [m, 2H, 9(10)-H], 7.17 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR 7.3 (CH₃, CH₂CH₃), 36.7 (CH₂, C6(13)), 37.5 (CH₂, CH₂CH₃), 37.6 (CH₂, C2(12)), 39.4 (CH, C1(7)), 78.5 (C, C5), 84.0 (C, C3), 128.3 (CH, C9(10)), 129.6 (CH, C8(11)), 145.8 (C, C7a(C11a)). MS (EI), *m/z* (%): 243 (M⁺, 49), 185 (21), 184 (100), 172 (26), 169 (51), 156 (42), 155 (91), 143 (26), 131 (28), 129 (42), 128 (35), 115 (32). Anal. Calcd for C₁₆H₂₁NO·HCl·0.33H₂O (285.75): C, 67.25; H, 7.99; N, 4.90; Cl, 12.41. Found: C, 67.24; H, 7.87; N, 4.98; Cl, 12.41. (b) From **21b**: To a mixture of alcohol **21b** (300 mg, 1.23 mmol) and urea (148 mg, 2.46 mmol) trifluoroacetic acid (0.9 mL, 12.3 mmol) was added and the suspension was heated at 115 °C for 18 h. To the cold (0 °C) solution water (10 mL) and 1 N NaOH till basic pH were added. The solution was extracted with Et₂O (4 × 5 mL) and the combined organic extracts were washed with water (2 × 5 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give **28b** as a yellow solid (253 mg) that was crystallized from EtOAc. Its hydrochloride was obtained by adding an excess of Et₂O·HCl to a solution of the amine in Et₂O and filtration of the precipitated white solid (240 mg, 70% yield).

4.1.20. N,N-Dimethyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-5-methyl-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 29a HCl

To a cold (0 °C) solution of **28a** (343 mg, 1.50 mmol) in Et₂O (10 mL), formaldehyde (2.6 mL, 37 wt% in water solution, 33 mmol) and, dropwise, formic acid (2.3 mL, 61 mmol) were

added and the mixture was stirred at 80 °C for 24 h. The mixture was allowed to cool to room temperature, was diluted with Et₂O (20 mL), 5 N NaOH (15 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 15 min. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with Et₂O (4 × 10 mL). The combined organic phases were washed with brine (1 × 30 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give **29a** (276 mg, 72% yield). Its hydrochloride was obtained by adding an excess of Et₂O·HCl to a solution of the amine in EtOAc, followed by filtration of the precipitated solid. The analytical sample was obtained by crystallization from MeOH/Et₂O, mp 208–209 °C. IR 3014, 2974, 2924, 2840, 2588, 2532, 2509, 2436, 2306, 1499, 1474, 1454, 1434, 1345, 1239, 1219, 1183, 1163, 1132, 1076, 1062, 1022, 914, 900, 783 cm⁻¹. ¹H NMR 1.32 (s, 3H, CH₃), 1.72 [d, *J* = 14.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.00 [ddm, *J* = 14.5 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.09 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.16 [ddm, *J* = 13.0 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 2.85 [s, 6H, N(CH₃)₂], 3.38 [t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1(7)-H], 4.86 (s, mobile H), 7.16 [m, 2H, 9(10)-H], 7.20 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR 31.1 (CH₃, C5-CH₃), 32.8 (CH₂, C2(12)), 36.8 (CH₃, N(CH₃)₂), 38.9 (CH₂, C6(13)), 39.4 (CH, C1(7)), 77.9 (C, C5), 92.6 (C, C3), 128.4 (CH, C9(10)), 129.6 (CH, C8(11)), 145.6 (C, C7a(C11a)). MS (EI), *m/z* (%): 258 (11), 257 (M⁺, 58), 155 (28), 129 (15), 128 (15), 87 (100). Anal. Calcd for C₁₇H₂₃NO·HCl (293.84): C, 69.49; H, 8.23; N, 4.77; Cl, 12.07. Found: C, 69.32; H, 8.28; N, 4.58; Cl, 11.98.

4.1.21. N,N-Diethyl-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-5-methyl-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine (2R,3R)-tartrate, 29b (2R,3R)-tartrate

To a solution of **28a** HCl (265 mg, 0.9 mmol) in MeOH (15 mL), NaBH₃CN (95%, 132 mg, 2.0 mmol), AcOH (0.3 mL) and acetaldehyde (0.34 mL, 6.0 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 8 h. An additional portion of NaBH₃CN (95%, 66 mg, 1.0 mmol) and acetaldehyde (0.17 mL, 3.0 mmol) were added, the mixture was stirred at room temperature for 18 h and then it was concentrated in vacuo to dryness. Water (20 mL) was added to the residue, the suspension was basified with 1 N NaOH and was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic extracts were washed with brine (2 × 10 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give **29b** as an oil (258 mg, 91% yield). An analytical sample of the (2R,3R)-tartrate of **29b** was obtained by adding 1 equiv of (2R,3R)-(+)-tartaric acid in methanol (15 mL) to a solution of **29b** in EtOAc (15 mL), concentration to dryness and crystallization from 2-propanol, mp 111–112 °C. IR 3600–2400 (max. at 3321, 3271, 2974, 2935, 2649, 2476), 1871, 1734, 1580, 1409, 1337, 1305, 1261, 1213, 1132, 1068, 1003, 788, 763, 679, 618 cm⁻¹. ¹H NMR 1.32 (s, 3H, C5-CH₃), 1.38 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 1.72 [d, *J* = 13.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.01 [dd, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 6.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.10 [d, *J* = 13.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.24 [ddm, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 3.36 [complex signal, 6H, 2CH₂CH₃ and 1(7)-H], 4.39 (s, 2H, 2CHOH tartrate), 4.86 (s, mobile H), 7.16 [m, 2H, 9(10)-H], 7.19 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR (100.6 MHz) 12.5 (CH₃, 2CH₂CH₃), 31.1 (CH₃, C5-CH₃), 33.5 (CH₂, C2(12)), 38.9 (CH₂, C6(13)), 39.5 (CH, C1(7)), 45.9 (CH₂, 2CH₂CH₃), 74.1 (CH, 2CHOH tartrate), 77.7 (C, C5), 94.7 (C, C3), 128.4 (CH, C9(10)), 129.6 (CH, C8(11)), 145.7 (C, C7a(C11a)), 176.8 (C, 2CO₂H tartrate). MS (EI), *m/z* (%): 285 (M⁺, 23), 155 (17), 129 (15), 115 [Et₂NCH(CH₃)₂]⁺, 100, 100 (Et₂N=CHCH₃⁺, 39), 72 (11). Anal. Calcd for C₂₃H₃₃NO₇·0.5H₂O (444.53): C, 62.15; H, 7.71; N, 3.15. Found: C, 61.96; H, 7.94; N, 3.14.

4.1.22. N-Benzyl-(5-ethyl-1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 30 HCl

To a solution of amine **28b** HCl (320 mg, 1.14 mmol) in MeOH (10 mL), NaBH₃CN (95%, 152 mg, 2.30 mmol), AcOH (0.3 mL) and

benzaldehyde (0.18 mL, 1.73 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, an additional amount of NaBH₃CN (95%, 76 mg, 1.15 mmol) and benzaldehyde (0.09 mL, 0.86 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 18 h and concentrated in vacuo to dryness. Water (15 mL) was added to the residue, and the mixture was extracted with Et₂O (4 × 15 mL). The combined organic extracts were washed with 1 N NaOH (1 × 25 mL), brine (2 × 25 mL), dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was taken in EtOAc and the amine **30** was precipitated as its hydrochloride (341 mg, 81% yield) by adding an excess of Et₂O·HCl. The analytical sample was obtained by crystallization from EtOAc, mp 246–248 °C. IR 3500–2400 (max. at 3418, 3030, 2935, 2691, 2614, 2549, 2396), 1564, 1495, 1456, 1352, 1216, 1026, 999, 984, 758, 698 cm⁻¹. ¹H NMR 0.97 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.65 [q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₃], 1.71 [d, *J* = 14.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.03 [overlapped dd, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.04 [d, *J* = 12.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.34 [ddm, *J* = 13.0 Hz, *J* = 6.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 3.38 [t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1(7)-H], 4.28 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.86 (s, mobile H), 7.17 [m, 2H, 9(10)-H], 7.21 [m, 2H, 8(11)-H], 7.43–7.50 (complex signal, 5H, Ar-H benzyl). ¹³C NMR 7.4 (CH₃, CH₂CH₃), 35.8 [CH₂, C2(12)], 36.8 [CH₂, C6(13)], 37.5 (CH₂, CH₂CH₃), 39.4 [CH, C1(7)], 45.3 (CH₂, CH₂-C₆H₅), 79.2 (C, C5), 88.6 (C, C3), 128.3 [CH, C9(10)], 129.6 [CH, C8(11)], 130.3 (CH, Ar-C_{meta}), 130.5 (CH, Ar-C_{para}), 131.1 (CH, Ar-C_{ortho}), 132.9 (C, Ar-C_{ipso}), 145.8 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), *m/z* (%): 334 (15), 333 (M⁺, 49), 304 (15), 184 (14), 169 (18), 155 (23), 150 (21), 149 (100), 91 (73). Anal. Calcd for C₂₃H₂₇NO·HCl·0.4H₂O (377.14): C, 73.25; H, 7.70; N, 3.71; Cl, 9.40. Found: C, 73.23; H, 7.56; N, 3.56; Cl, 9.75.

4.1.23. N-Propargyl-(5-ethyl-1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 31a·HCl and N,N-dipropargyl-(5-ethyl-1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,5:3,7-dimethano-4-benzoxonin-3-yl)amine hydrochloride, 31b·HCl

A suspension of **28b**·HCl (920 mg, 3.29 mmol), K₂CO₃ (459 mg, 3.29 mmol), propargyl bromide (0.32 mL, 80% solution in toluene, 2.88 mmol) and NaI (40 mg, 0.27 mmol) in acetonitrile (35 mL) was heated under reflux for 18 h and concentrated in vacuo to dryness. To the residue, CH₂Cl₂ (50 mL) was added and the solution was washed with water (3 × 20 mL). The organic layer was dried with anhyd Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was subjected to column chromatography (hexane/EtOAc mixtures) to give **31b** (hexane/EtOAc 98:2, 202 mg, 22% yield) and **31a** (hexane/EtOAc 95:5, 321 mg, 35% yield). The hydrochlorides of **31a** and **31b** were obtained by adding an excess of Et₂O·HCl to a solution of the corresponding amine in EtOAc followed by filtration of the formed precipitates. The analytical samples of **31a** and **31b** were obtained by crystallization from Et₂O. **31a**: mp 186–187 °C. IR 3500–2400 (max. at 3458, 3306, 3245, 3179, 2965, 2939, 2919, 2728, 2629, 2406), 2125, 1557, 1493, 1451, 1350, 1217, 1031, 987, 764 cm⁻¹. ¹H NMR 0.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.61 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.68 [d, *J* = 13.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 1.94 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 1.99 [dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 5.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.23 [ddm, *J* = 13.5 Hz, *J* = 5.5 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 3.19 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H, CH₂C≡CH), 3.35 [t, *J* = 5.5 Hz, 2H, 1(7)-H], 4.01 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, CH₂C≡CH), 7.15 [m, 2H, 9(10)-H], 7.18 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR (100.6 MHz) 7.3 (CH₃, CH₂CH₃), 30.6 (CH₂, CH₂C≡CH), 35.7 [CH₂, C2(12)], 36.7 [CH₂, C6(13)], 37.4 (CH₂, CH₂CH₃), 39.2 [CH, C1(7)], 75.3 (CH, CH₂C≡CH), 78.5 (C, C5), 79.4 (C, CH₂C≡CH), 88.3 (C, C3), 128.4 [CH, C9(10)], 129.6 [CH, C8(11)], 145.6 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), *m/z* (%): 281 (M⁺, 29), 252 (28), 194 (25), 185 (35), 184 (82), 169 (63), 155 (100), 143 (30), 141 (35), 131 (27), 129 (62), 128 (57), 115 (47), 97 (61), 96 (34). Anal. Calcd for C₁₉H₂₃NO·HCl·0.4H₂O (325.06): C, 70.20; H, 7.69; N, 4.31; Cl,

10.91. Found: C, 70.17; H, 7.51; N, 4.21; Cl, 11.11. Compound **31b**: mp 177–178 °C. IR 3500–2150 (max. at 3428, 3180, 2967, 2948, 2925, 2880, 2418, 2385, 2355, 2203), 2119, 1494, 1463, 1454, 1435, 1350, 1222, 1202, 1028, 1006, 985, 962, 919, 837, 774, 723, 675 cm⁻¹. ¹H NMR 0.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.64 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.68 [d, *J* = 15.5 Hz, 2H, 6(13)-H_{exo}], 2.00 [dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, 2H, 6(13)-H_{endo}], 2.18 [d, *J* = 13.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{exo}], 2.30 [ddm, *J* = 13.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, 2H, 2(12)-H_{endo}], 3.25 (br s, 2H, CH₂C≡CH), 3.37 [t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1(7)-H], 4.32 (d, *J* = 2.5 Hz, 4H, CH₂C≡CH), 7.16 [m, 2H, 9(10)-H], 7.19 [m, 2H, 8(11)-H]. ¹³C NMR 7.4 (CH₃, CH₂CH₃), 34.8 [CH₂, C2(12)], 36.6 [CH₂, C6(13)], 37.5 (CH₂, CH₂CH₃), 37.6 (CH₂, CH₂C≡CH), 39.4 [CH, C1(7)], 74.6 (C, CH₂C≡CH), 80.4 (C, CH₂C≡CH and C5), 94.8 (C, C3), 128.4 [CH, C9(10)], 129.5 [CH, C8(11)], 145.7 [C, C7a(C11a)]. MS (EI), *m/z* (%): 319 (M⁺, 6), 318 (10), 290 (24), 248 (14), 237 (19), 222 (20), 185 (40), 169 (56), 155 (55), 143 (47), 141 (52), 135 (100), 134 (60), 129 (82), 128 (70), 115 (57). Anal. Calcd for C₂₂H₂₅NO·HCl·0.25H₂O (360.41): C, 73.32; H, 7.41; N, 3.89; Cl, 9.84. Found: C, 73.39; H, 7.37; N, 3.86; Cl, 9.85.

4.2. NMDA receptor antagonist activity

The functional assay of antagonist activity at NMDA receptors was performed using primary cultures of cerebellar granule neurons, which were prepared according to established protocols.²³ Cells were grown on 10 mm poly-L-lysine coated glass cover slips, and used for the experiments after 7–14 days in vitro. Cells were loaded with 6 μM Fura-2 AM (invitrogen-molecular probes) for 45 min. Afterwards the coverslip was mounted on a quartz cuvette containing a Locke-Hepes buffer using a special holder. Measurements were performed using a Perkin-Elmer LS-50B fluorometer equipped with a fast-filter accessory, under mild agitation and at 37 °C. Analysis from each sample was recorded real-time during 1200 s. After stimulation with NMDA or glutamate (100 μM, in the presence of 10 μM glycine), increasing cumulative concentrations of the compound to be tested were added. The percentages of inhibition at every tested concentration were analyzed using a non-linear regression curve fitting (variable slope) by using the software GraphPad Prism 4.0.

4.3. MAO inhibitory activity

The ability of the compounds to inhibit MAO activity was measured using the MAO-Glo™ Assay (Promega). As a tissue homogenate, we used a crude mitochondrial preparation from mice cortex (NIH Swiss, Harlan).²⁵ Compounds were tested for non-specific MAO activity at a concentration of 10 and 50 μM. The assays were carried out according to manufacturer's protocol. Readings were performed using a tube luminometer (Berthold Lumat).

4.4. T. brucei culturing and drug test

Cultures of bloodstream form *T. brucei* (strain 427) were maintained at 37 °C in modified Iscove's medium (pH 7.4).²⁶ Trypanocidal activity was assessed by growing parasites for 48 h in the presence of various drug concentrations to determine the levels which inhibited growth by 50% (IC₅₀) and 90% (IC₉₀). In the case of untreated cultures (volume 4 mL), cell densities increased from 0.5 × 10⁴ to 1 × 10⁶ cells mL⁻¹ over this period. Experiments were performed in triplicate. Cell densities at each drug concentration were determined using a hemocytometer (Weber Scientific International Ltd), and drug sensitivity was expressed as a percentage of growth of control cells.

Acknowledgements

A.C., P.C., F.X.S. and S.V. gratefully acknowledge financial support from Ministerio de Educación y Ciencia (P.C. and S.V.: Project CTQ2008-03768; F.X.S.: Project SAF 2006-13092-C02-01; A.C.: Project 2005-01604 and PI080400) and Comissionat per a Universitats i Recerca (P.C. and S.V.: Project 2005-SGR-00180, F.X.S.: Project 2009-SGR-853). M.D.D. thanks to the Ministerio de Educación y Ciencia (FPU Program).

References and notes

- (a) Lees, A. J.; Hardy, J.; Revesz, T. *Lancet* **2009**, *373*, 2055; (b) Jakob-Roetne, R.; Jacobsen, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3030.
- Duara, R.; Barker, W.; Loewenstein, D.; Bain, L. *Alzheimers Dement.* **2009**, *5*, 66.
- (a) Stone, T. W.; Addae, J. I. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *447*, 285; (b) Hynd, M. R.; Scott, H. L.; Dodd, P. R. *Neurochem. Int.* **2004**, *55*, 583.
- Raina, P.; Santaguida, P.; Ismaila, A.; Patterson, C.; Cowan, D.; Levine, M.; Booker, L.; Oremus, M. *Ann. Intern. Med.* **2008**, *148*, 379.
- (a) Parsons, C. G.; Danysz, W.; Quack, G. *Neuropharmacology* **1999**, *38*, 735; (b) Lipton, S. A. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, *5*, 160; (c) Rammes, G.; Danysz, W.; Parsons, C. G. *Curr. Neuropharmacol.* **2008**, *6*, 55; (d) Gilling, K. E.; Jatzke, C.; Hechenberger, M.; Parsons, C. G. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 866.
- Danysz, W.; Parsons, C. G.; Kornhuber, J.; Schmidt, W. J.; Quack, G. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1997**, *21*, 455.
- De Clercq, E. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, *5*, 1015.
- (a) Kelly, J. M.; Miles, M. A.; Skinner, A. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 985; (b) Kelly, J. M.; Quack, G.; Miles, M. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1360; (c) Kolocouris, N.; Zoidis, G.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Prathalingam, S. R.; Kelly, J. M.; Naesens, L.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4358; (d) Papanastasiou, I.; Tsotinis, A.; Kolocouris, N.; Prathalingam, S. R.; Kelly, J. M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1496.
- (a) Geldenhuys, W. J.; Malan, S. F.; Bloomquist, J. R.; Marchand, A. P.; van der Schyf, C. J. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 21; (b) Oliver, D. W.; Malan, S. F. *Med. Chem. Res.* **2008**, *17*, 137; (c) van der Schyf, C. J.; Geldenhuys, W. J. *Neurotherapeutics* **2009**, *6*, 175.
- Oliver, D. W.; Dekker, T. G.; Snyckers, F. O. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1991**, *41*, 549.
- Oliver, D. W.; Dekker, T. G.; Snyckers, F. O.; Fourie, T. G. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 851.
- Zhou, J. P.; Li, J.; Upadhyaya, S.; Eaton, P. E.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1165.
- (a) Geldenhuys, W. J.; Terre'Blanche, G.; van der Schyf, C. J.; Malan, S. F. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *458*, 73; (b) Geldenhuys, W. J.; Malan, S. F.; Murugesan, T.; van der Schyf, C. J.; Bloomquist, J. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1799; (c) Mdzinarishvili, A.; Geldenhuys, W. J.; Abbruscato, T. J.; Bickel, U.; Klein, J.; van der Schyf, C. J. *Neurosci. Lett.* **2005**, *383*, 49; (d) Grobler, E.; Grobler, A.; van der Schyf, C. J.; Malan, S. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1176; (e) Kiewert, C.; Hartmann, J.; Stoll, J.; Thekkumkara, T. J.; Geldenhuys, W. J.; Klein, J. *Neurochem. Res.* **2006**, *31*, 395; (f) Geldenhuys, W. J.; Malan, S. F.; Bloomquist, J. R.; van der Schyf, C. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1525; (g) Hao, J.; Mdzinarishvili, A.; Abbruscato, T. J.; Klein, J.; Geldenhuys, W. J.; van der Schyf, C. J.; Bickel, U. *Brain Res.* **2008**, *1196*, 113.
- (a) van Dijk, A.; Johnston, C.; Allbutt, H.; Kassiou, M.; Henderson, J. *Behav. Brain Res.* **2008**, *190*, 14; (b) Liu, X.; Banister, S. D.; Christie, M. J.; Banati, R.; Meikle, S.; Coster, M. J.; Kassiou, M. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *555*, 37; (c) Liu, X.; Kassiou, M.; Christie, M. J.; Hambley, T. W. *Aust. J. Chem.* **2001**, *54*, 31.
- Duque, M. D.; Camps, P.; Profire, L.; Montaner, S.; Vázquez, S.; Sureda, F. S.; Mallo, J.; López-Querol, M.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Prathalingam, S. R.; Kelly, J. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3198.
- Föhlisch, B.; Dukek, U.; Graefle, I.; Novotny, B.; Schupp, E.; Schwaiger, G.; Widmann, E. *Liebigs Ann. Chem.* **1973**, 1839.
- (a) Bishop, R. *Aust. J. Chem.* **1984**, *37*, 319; (b) Camps, P.; Görbig, D.; Muñoz-Torrero, V.; Pérez, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1997**, *62*, 1585.
- Mattia, C.; Coluzzi, F. *Drugs* **2007**, *10*, 636.
- (a) Planells-Cases, R.; Montoliu, C.; Humet, M.; Fernández, A. M.; García-Martínez, C.; Valera, E.; Merino, J. M.; Pérez-Payá, E.; Messeguer, A.; Felipo, V.; Ferrer-Montiel, A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 163; (b) Sánchez-Pérez, A. M.; Montoliu, C.; Felipo, V. C. N. S. *Drug Rev.* **2003**, *9*, 263.
- Shokova, E.; Mousoulou, T.; Luzikov, Y.; Kovalev, V. *Synthesis* **1997**, 1034.
- Lipton, S. A. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, *5*, 160.
- Greenamyre, J. T.; O'Brien, C. F. *Arch. Neurol.* **1991**, *48*, 977.
- Camps, P.; Duque, M. D.; Vázquez, S.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Sureda, F. S.; López-Querol, M.; Camins, A.; Pallàs, M.; Prathalingam, S. R.; Kelly, J. M.; Romero, V.; Ivorra, D.; Cortés, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9925.
- (a) Oldfield, V.; Keating, G. M.; Perry, C. M. *Drugs* **2007**, *67*, 1725; (b) LeWitt, P. A. *Neurology* **2009**, *72*, 1352.
- Tipton, K. F. *Eur. J. Biochem.* **1968**, *4*, 103.
- Hirumi, H.; Hirumi, K. *J. Parasitol.* **1989**, *75*, 985.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida de poblaciones específicas de neuronas. Este proceso es multifactorial, y en él interviene la excitotoxicidad, que se debe a una disfunción en la neurotransmisión glutamatérgica que produce una acumulación de glutamato en el espacio sináptico. Eso conlleva una activación prolongada de los receptores glutamatérgicos que permite una entrada masiva de calcio al interior de la neurona, que finalmente causará la muerte celular. Este influjo de calcio está mediado principalmente por receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA que se caracterizan por una elevada permeabilidad a iones calcio y una cinética de activación lenta. Por eso, los antagonistas sobre receptores NMDA son una estrategia interesante para hacer frente a este tipo de trastornos de incidencia social y económica creciente en los últimos años.

En este trabajo se han caracterizado la actividad antagonista sobre receptores NMDA de diversos compuestos de nueva síntesis, así como su capacidad neuroprotectora en cultivos de neuronas granulares de cerebelo de rata.

Debido a la similitud estructural de algunos de los compuestos evaluados con rasagilina, selegilina u otros inhibidores de la enzima monoaminoxidasa, se ha evaluado también este tipo de actividad farmacológica en una selección de los mismos.

Finalmente, se han llevado a cabo estudios de toxicidad aguda en algunos compuestos adamantánicos con la finalidad de establecer su perfil de seguridad para un posterior uso como antivíricos.

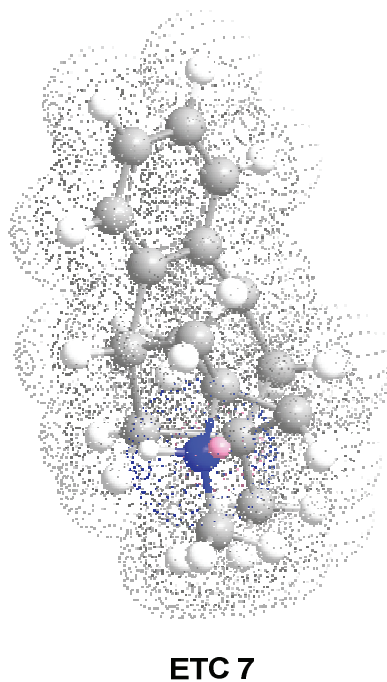
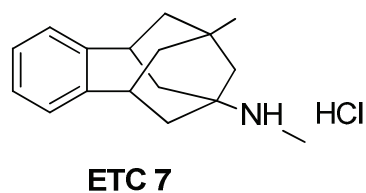
Todo ello ha permitido definir de manera más precisa el perfil de actividad de 127 compuestos investigacionales y establecer la posibilidad para un futuro desarrollo que permita la comercialización de nuevos fármacos neuroprotectores que puedan ser de ayuda en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, que requieren urgentemente de nuevas herramientas para su abordaje terapéutico.

FÈ D'ERRATA:

▪ Pàg. 180

Els tres compostos que augmenten més la seva potència al canviar d'agonista, LD45, LD49 i **ETC7** (no ETC0 com indica el text).

Imatges del compost ETC7 corresponents a les figures 4.72 i 4.73.



▪ Pàg. 181

En la figura 4.74 les concentracions indiquen **mM** quan han d'indicar **μM** , com explica el text.