

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN  
FARMACOLÓGICA DE NUEVAS  
MOLÉCULAS MULTIPOTENTES PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

TESIS DOCTORAL

**Oscar Mauricio Bautista Aguilera**

Madrid, noviembre de 2014



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS,  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN**  
**FARMACOLÓGICA DE NUEVAS**  
**MOLÉCULAS MULTIPOTENTES PARA EL**  
**TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE**  
**ALZHEIMER**

**Oscar Mauricio Bautista Aguilera**

**Madrid, Noviembre de 2014**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS,  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE NUEVAS  
MOLÉCULAS MULTIPOTENTES PARA EL TRATAMIENTO DE  
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

MEMORIA PRESENTADA POR EL LICENCIADO

**Oscar Mauricio Bautista Aguilera**

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Bajo la dirección de los Doctores

José Luis Marco Contelles, Abdelouahid Samadi, y Mourad Chioua

**Madrid, Noviembre de 2014**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS,  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE NUEVAS MOLÉCULAS  
MULTIPOTENTES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

MEMORIA PRESENTADA POR EL LICENCIADO

**Oscar Mauricio Bautista Aguilera**

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Realizada en el “Laboratorio de Química Médica” (Departamento “SEPCO”, Instituto  
de Química Orgánica General de Madrid, CSIC) bajo la dirección de los Doctores

**José Luis Marco Contelles, Abdelouahid Samadi, y Mourad Chioua**

**Madrid, Noviembre de 2014**

V.ºB.º DIRECTORES DE TESIS

V.ºB.º INTERESADO

Dr. José L. Marco Contelles

Oscar M. Bautista Aguilera

Dr. Abdelouahid Samadi

Dr. Mourad Chioua



D. JOSÉ LUIS MARCO CONTELLES, Profesor de Investigación del CSIC, D. ABDELOUAHID SAMADI, y D. MOURAD CHIOUA

CERTIFICAN:

Que D. OSCAR MAURICIO BAUTISTA AGUILERA, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad del Valle (Cali, Colombia), ha realizado bajo nuestra dirección el proyecto correspondiente a su Tesis Doctoral: “Síntesis y evaluación farmacológica de nuevas moléculas multipotentes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer”, y consideramos que reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid.

LOS DIRECTORES,

Fdo.:

D. José Luis Marco Contelles

D. Abdelouahid Samadi

D. Mourad Chioua

## AGRADECIMIENTOS

*...de los Directores de la Tesis Doctoral...*

Estamos convencidos de que es en la Biomedicina donde la Química Orgánica tiene su reto más noble, y que la salud, y el bienestar de los ciudadanos de este país bien valen ese esfuerzo, y dedicación. Sin embargo, la Química Médica, entre las muy consolidadas Química Orgánica y la Farmacología/Bioquímica/Biología Molecular, es un área de investigación escasamente representada en los medios académicos, de reparto de apoyos y financiación de este país, y por lo tanto, las más de las veces ninguneada, poco respetada, y en franco retroceso. Y para mayor inri, donde podría ejercer su liderazgo científico, entre la industria farmacéutica, tampoco acaba de encontrar su lugar, entre el recelo y la desconfianza. En este magma, sin embargo, hay gente que no se arredra, que todavía tiene la valentía de lanzarse al vacío de la incomprensión, sino del rechazo de unos y otros. Ciertamente este sombrío panorama tiene sus claros y luces, y que a veces uno encuentra gente que te acompaña en este viaje por el desierto, con incierto final. Entre éstos, y en relación con esta Memoria, hay que citar en esta página a Elena Soriano (ADMET), Francesco Ortuso, Isabel Iriepa (Modelización Molecular), Katarina Nikolic (QSAR), Irene Bolea, Esteban Gerard, Mercedes Unzeta, Matilde Yañez, Rona Ramsay (Farmacología *in vitro*, Bioquímica), Claudia Binda (rayos X), Ricardo Martínez, Raquel Herrero (estudios *in vivo*), y Agnieszka Fogel (estudios de paso de la BHE *in vivo*). También sería injusto no citar los muy magros apoyos económicos recibidos desde el MINECO (SAF2012-33304; SAF2009-07271), y los muy oportunos y por eso, más apreciados, de la Universidad Camilo José Cela, con el apoyo de los doctores y amigos Alejandro Romero y Ramón Cacabelos.

*...del Autor de la Tesis Doctoral...*

Durante el largo viaje que representa hacer una tesis Doctoral, sólo se me vienen a la mente buenos recuerdos. Parece que fue ayer cuando el Dr. José Luis Marco Contelles me envió aquel correo, dándome la *¡enhorabuena!* por superar el proceso de admisión de la beca FPI, que obtuve gracias a él, al depositar en mí su confianza de forma sincera, desinteresada y, diría yo, arriesgada. Ese fue el momento en que se cumplía para mí un sueño, ya que estaba decidido a cruzar el “charco” dejando todo atrás, sin pensar en las dificultades y vicisitudes de estar lejos de casa, estando dispuesto a dar el todo por el todo, sin dejar nada para el regreso. Ese fue el momento en el que comenzaron grandes experiencias para mí.

Una vez más, quisiera agradecer al Dr. Marco Contelles escogerme y aceptar dirigir esta tesis doctoral, y todas sus enseñanzas y consejos. Quiero expresar también mis más sinceros agradecimientos a los co-directores de esta tesis, los doctores Abdelouahid Samadi y Mourad Chioua, porque en los comienzos, fueron ellos los que tuvieron la paciencia de enseñarme todo acerca de los menesteres de la síntesis orgánica, pues mi formación en la licenciatura fue en química inorgánica, y aunque he acumulado muchas horas de vuelo, me queda mucho por aprender y sigo con la mismas ganas, como si fuera el primer día.

Agradecer a mis colegas del IQOG, con los cuales compartí risas y jolgorios y, sobre todo, por los momentos en los que intercambiamos conocimiento en pro de solucionar algún problema con la síntesis, ya que muchas veces, de esos “instantes-café” y distensión florecieron grandes ideas.

Agradecer a todo el equipo técnico del CENQUIOR, con el cual tuve contacto, porque siempre estuvieron muy atentos a prestar sus servicios de una forma eficiente.

Finalmente, debo agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación, hoy llamado Ministerio de Ciencia y Competitividad de España, por haber financiado mis estudios de postgrado y una estancia doctoral, otorgándome una beca FPI (BES-2010-037196).

La presente Memoria de Tesis Doctoral se va a presentar como un compendio de publicaciones, de acuerdo con la resolución del *Consejo de Gobierno de la Universidad Autónoma de Madrid, de fecha 1 de junio de 2012 y modificación por Acuerdo de Comisión de Estudios de Posgrado de 24 de julio de 2013*.

Por consiguiente, esta Memoria se ha estructurado en **cinco partes más un Anexo, en forma de CD, que incluye el *Material Suplementario* correspondiente a cada publicación**, tal como sigue:

- (1) **Introducción general**, en la que se han presentado los trabajos compendiados, se ha justificado la temática, y se ha explicado la aportación original del autor.
- (2) **Resumen global** de los resultados obtenidos, de la discusión de estos resultados y de las conclusiones finales.
- (3) **Conclusiones y perspectivas.**
- (4) **Otros trabajos y actividades del Autor.**
- (5) **Copia completa** de los trabajos *publicados o admitidos o enviados* para su publicación, con el nombre de todos los co-autores de los trabajos y la referencia completa de la revista en que los trabajos estén publicados o admitidos o enviados para su publicación.



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Los trabajos compendiados publicados y/o aceptados para publicar</b>	<b>1</b>
<b>I.2. Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>I.3. Situación y estado actual del tema de investigación</b>	<b>9</b>
<b>I.3.1. Enfermedades neurodegenerativas</b>	<b>9</b>
<b>I.3.2. Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>10</b>
<b>I.3.2.1. La enfermedad de Alzheimer y su impacto en la sociedad</b>	<b>10</b>
<b>I.3.2.2. Perspectiva histórica</b>	<b>11</b>
<b>I.3.2.3. Etiología de la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>11</b>
<b>I.3.2.4. Hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>12</b>
<b>I.3.3. Receptores colinérgicos</b>	<b>14</b>
<b>I.3.3.1. Receptores nicotínicos</b>	<b>14</b>
<b>I.3.3.2. Receptores muscarínicos</b>	<b>17</b>
<b>I.3.4. Inhibidores de acetilcolinesterasas (AChE)</b>	<b>19</b>
<b>I.3.5. Hipótesis de la cascada del <math>\beta</math>-amiloide</b>	<b>22</b>
<b>I.3.5.1. Proteína precursora amiloidea (PPA) y la formación de placas seniles</b>	<b>23</b>
<b>I.3.5.2. Puntos críticos de la hipótesis de la cascada del <math>\beta</math>-amiloide</b>	<b>24</b>
<b>I.3.6. Proteína tau</b>	<b>25</b>
<b>I.3.7. Coexistencia de múltiples mecanismos</b>	<b>30</b>
<b>I.3.8. Inhibición de monoamino oxidasas (MAOs) en la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>33</b>
<b>I.3.9. Nuevas terapias para la enfermedad de Alzheimer: Estrategia fármacos multipotentes</b>	<b>37</b>
<b>I.3.10. Breve resumen de las contribuciones de nuestro grupo de trabajo al desarrollo de nuevos fármacos para el posible tratamiento de la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>38</b>
<b>I.3.11. Referencias</b>	<b>39</b>
<b>I.4. Aportación original del Autor</b>	<b>47</b>
<b>II. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS</b>	<b>65</b>
<b>III. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>77</b>
<b>IV. OTROS TRABAJOS Y ACTIVIDADES DEL AUTOR</b>	<b>78</b>
<b>V. COPIA COMPLETA DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS O ADMITIDOS O ENVIADOS PARA SU PUBLICACIÓN CON EL NOMBRE DE TODOS LOS CO-AUTORES DE LOS TRABAJOS Y LA REFERENCIA COMPLETA DE LA REVISTA EN QUE LOS TRABAJOS ESTÉN PUBLICADOS O ADMITIDOS O ENVIADOS PARA SU PUBLICACIÓN</b>	<b>80</b>

# I. INTRODUCCIÓN GENERAL

## I.1. LOS TRABAJOS COMPENDIADOS PUBLICADOS Y/O ACEPTADOS PARA PUBLICAR

Los trabajos científicos que forman la base de esta Tesis Doctoral se han desarrollado en el contexto del proyecto de investigación, de título: “*Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevas moléculas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*“, dirigido por el Dr. José Luis Marco Contelles, y se podrían integrar en cuatro de los ejes clave de este programa de trabajo:

- (a) **Nuevos desarrollos de la molécula multipotente ASS234**
- (b) **Desarrollos paralelos de la molécula multipotente ASS234**
- (c) **Investigación biológica avanzada del compuesto ASS234**
- (d) **Investigación biológica avanzada de VEG8, un compuesto relacionado con ASS234.**

### (a) NUEVOS DESARROLLOS DE LA MOLÉCULA MULTIPOTENTE ASS234:

#### *Artículos científicos publicados:*

**Publicación 1. Oscar M. Bautista-Aguilera, Gerard Esteban, Irene Bolea, Katarina Nikolic, Danica Agbaba, Ignacio Moraleda, Isabel Iriepa, Abdelouahid Samadi, Elena Soriano, Mercedes Unzeta, José Marco-Contelles, Design, synthesis, pharmacological evaluation, QSAR analysis, molecular modeling and ADMET of novel donepezileindolyl hybrids as multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer’s disease, *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 75, 82-95.**

#### *Artículos científicos enviados para publicar:*

**Artículo 2. Oscar M. Bautista-Aguilera, Abdelouahid, Samadi, Mourad Chioua, Katarina Nikolic, Slavica Filipic, Danica Agbaba, Elena Soriano, Stefano Alcaro, Rona R. Ramsay, Francesco Ortuso, Matilde Yañez, José Marco-Contelles, *N-Methyl-N-((1-methyl-5-(3-(1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-yl)propoxy)-1H-indol-2-***

yl)methyl)prop-2-yn-1-amine, a New Cholinesterase and Monoamine Oxidase Dual Inhibitor, *J. Med. Chem.*

(b) **DESARROLLOS PARALELOS DE LA MOLÉCULA MULTIPOTENTE ASS234:**

*Artículos científicos publicados:*

**Publicación 3.** Li Wang, Gerard Esteban, Masaki Ojima, **Oscar M. Bautista-Aguilera**, Tsutomu Inokuchi, Ignacio Moraleda, Isabel Iriepa, Abdelouahid Samadi, Moussa B. H. Youdim, Alejandro Romero, Elena Soriano, Raquel Herrero, Ana Patricia Fernández Fernández, Ricardo-Martínez-Murillo, José Marco-Contelles, Mercedes Unzeta, **Donepezil+Propargylamine+8-Hydroxyquinoline Hybrids as New Multifunctional Metal-Chelators, ChE and MAO Inhibitors for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease**, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 543-541.

*Artículos aceptados para publicación:*

**Artículo 4.** **Oscar M. Bautista-Aguilera**, Gerard Esteban, Mourad Chioua, Katarina Nikolic, Danica Agbaba, Ignacio Moraleda, Isabel Iriepa, Elena Soriano, Abdelouahid Samadi, Mercedes Unzeta, José Marco-Contelles, **Multipotent Cholinesterase/Monoamine Oxidase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Design, Synthesis, Biochemical Evaluation, ADMET, Molecular Modeling and QSAR Analysis of Novel Donepezil-Pyridyl Hybrids**, *Drug Design, Development and Therapy*, *en prensa*.

(c) **INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA AVANZADA DEL COMPUESTO ASS234:**

*Artículos científicos publicados:*

**Publicación 5.** Javier del Pino, Eva Ramos, **Oscar M. Bautista Aguilera**, José Marco-Contelles, Alejandro Romero, **Wnt Signaling Pathway, a Potential Target for Alzheimer's Disease Treatment, is Activated by a Novel Multitarget Compound ASS234**, *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2014**, *20*, 568-570.

(d) **INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA AVANZADA DE VEG8, UN COMPUESTO RELACIONADO CON ASS234**

*Artículos científicos enviados a publicar:*

**Artículo 6.** Katarina Nikolic, Lazaros Mavridis, **Oscar M. Bautista-Aguilera**, José Marco-Contelles, Holger Stark, Maria do Carmo Carreiras, Ilaria Rossi, Paola Massarelli, Danica Agbaba, Rona R. Ramsay, John B. O. Mitchell, **Predicting targets of multipotent compounds against neurological diseases using cheminformatic methodology**, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*.

#### (e) OTROS TRABAJOS

*Artículos científicos enviados a publicar:*

**Artículo 7.** M. Chioua, M. Pérez, **O. M. Bautista-Aguilera**, M. Yañez, M. G. López A. Romero, R. Cacabelos, S. Brogi, S. Butini, J. I. Borrell, and J. Marco-Contelles, **Multipotent hupertacrines as non-toxic, cholinesterase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease**, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*.

## I.2. ANTECEDENTES

En estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio hemos identificado **ASS234**, como un *compuesto-hit*, multipotente, diseñado como un híbrido de **donepezilo** y **PF9601N**, capaz pues de inhibir las enzimas monoamino oxidasas (MAO A y MAO B) y colinesterasas [ChEs: acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BuChE)], además de mostrar un perfil biológico de interés para su posible uso en la terapia de la enfermedad de Alzheimer (EA), como se presenta de forma resumida a continuación:

**ASS234** bloquea la agregación de  $\beta$ A inducida por la AChE

**ASS234** ejerce propiedades antioxidantes en las células PC12

**ASS234** no posee propiedades anti-inflamatorias en células Bv2

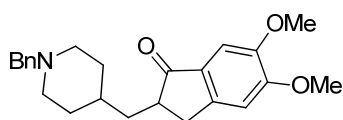
**ASS234** previene la toxicidad inducida por el  $\beta$ A en células SH-SY5Y

**ASS234** previene el efecto que tiene el  $\beta$ A en la reducción de la capacidad antioxidante de la enzima SOD-1

**ASS234** previene la apoptosis en ratones adultos inducida por el  $\beta$ A

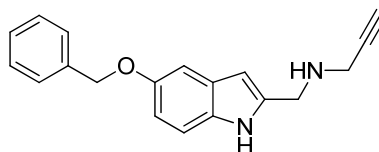
(I. Bolea, A. Gella, L. Monjas, C. Pérez, M. I. Rodríguez-Franco, J. L. Marco-Contelles, A. Samadi, M. Unzeta, **The multipotent, permeable drug ASS234 inhibits A $\beta$**

aggregation, possesses antioxidant properties and protects from A $\beta$ -induced apoptosis *Curr. Alzheimer Res.* **2013**, *9*, 797-808).



**Donepezil (ARICEPT®)**

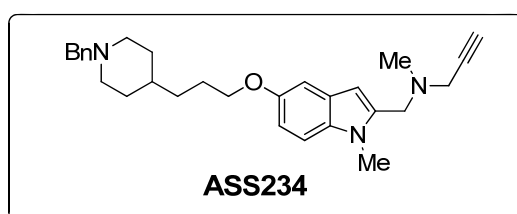
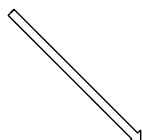
inhibidor de AChE



**PF9601N**

Potente y selectivo inhibidor de MAO B

[Pérez, V.; Marco, J. L.; Fernández-Álvarez, E.; Unzeta, M. Relevance of benzyloxy group in 2-indolyl methylamines in the selective MAO-B inhibition, *Brit. J. Pharmacol.* 1999, *127*, 869-876]



**ASS234**

IC<sub>50</sub> (hMAO-A)= 4.2 ± 0.5 nM

IC<sub>50</sub> (hAChE)= 0.38 ± 0.05 μM

IC<sub>50</sub> (hMAO-B)= 0.039 ± 0.004 μM

IC<sub>50</sub> (hBuChE)= 1.7 ± 0.2 μM

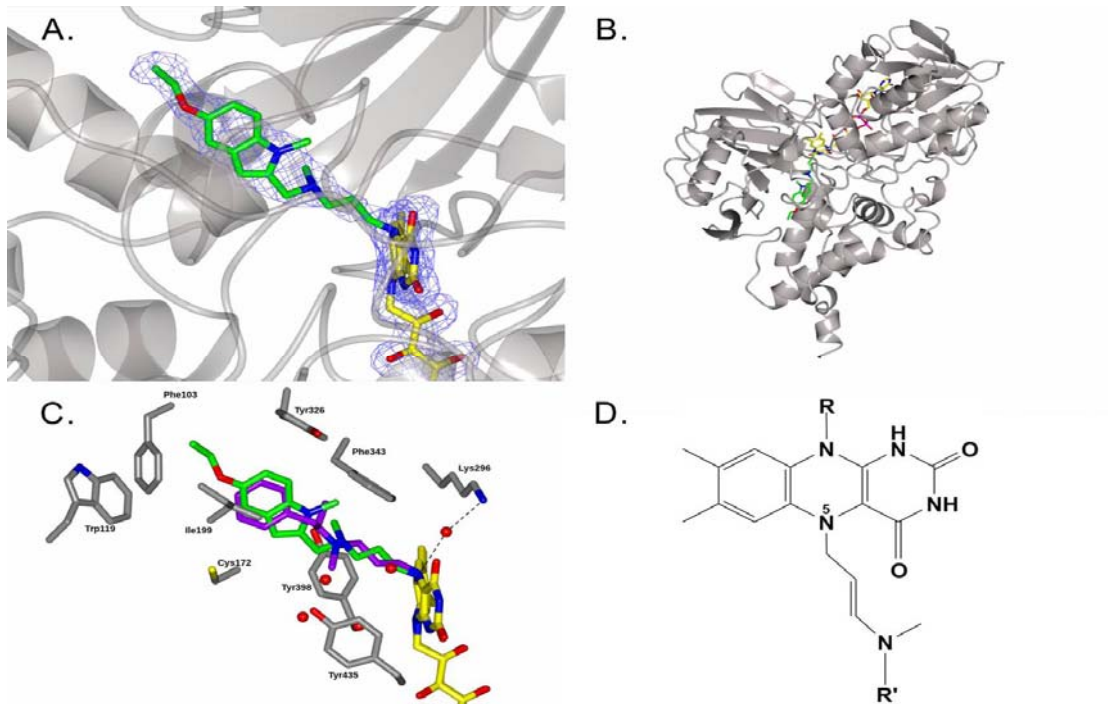
Inhibidor reversible de AChE tipo mixto.

Inhibidor irreversible de MAO A/ MAO B, e inhibidor no competitivo de MAO B

(I. Bolea, J. Juárez-Jiménez, C. de los Ríos, M. Chioua, R. Pouplana, F. J. Luque, M. Unzeta, J. Marco-Contelles, A. Samadi. **Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of donepezil and N-[(5-(benzyloxy)-1-methyl-1H-indol-2-yl)methyl]-N-methylprop-2-yn-1-amine hybrids as new multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's Disease** *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8251-8270).

**ASS234** atraviesa la barrera hematoencefálica *in vivo*

(A. Stasiak, M. Mussur, M. Unzeta, A. Samadi, J. L. Marco-Contelles and W. A. Fogel Effects of novel monoamine oxidases and cholinesterases targeting compounds on brain neurotransmitters and behavior in rat model of vascular dementia *Current Pharmaceutical Design* **2014**, *20*, 161-171).

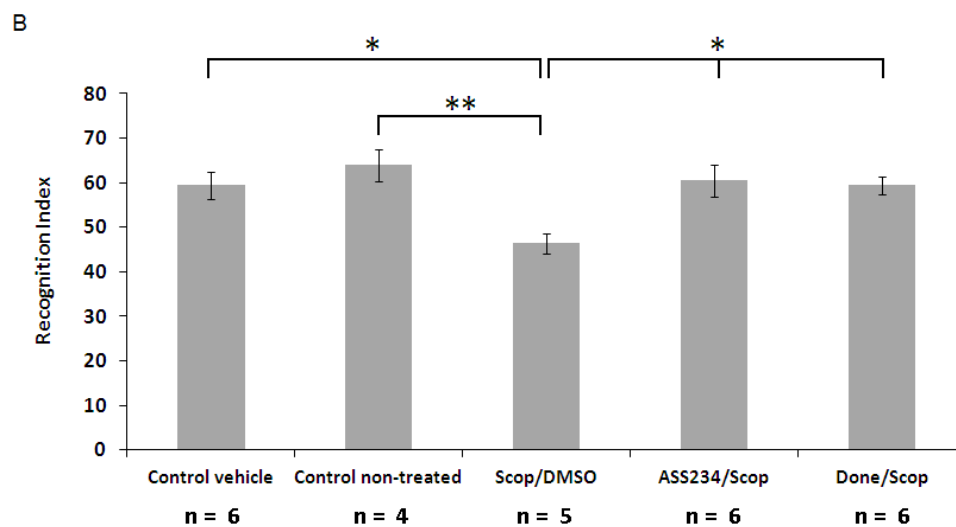
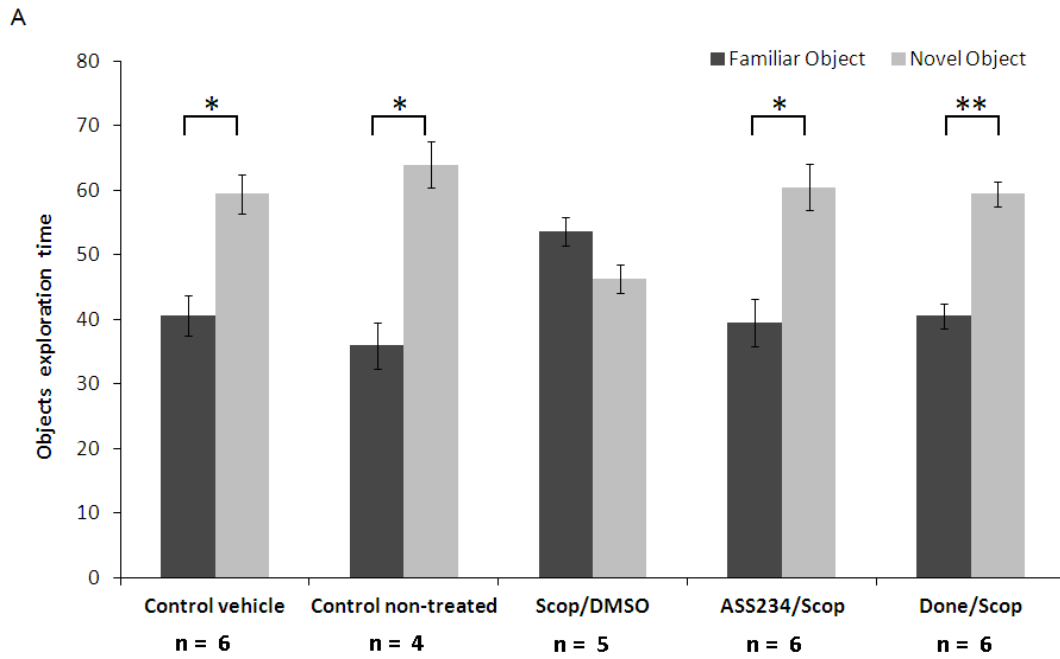


La estructura cristalina del complejo **MAO B-ASS234** muestra la interacción irreversible a través del motivo *propargilamina* del ligando con cofactor FAD del centro activo de la enzima

**ASS234** tiene una tasa de inhibición de MAO A similar a clorgilina

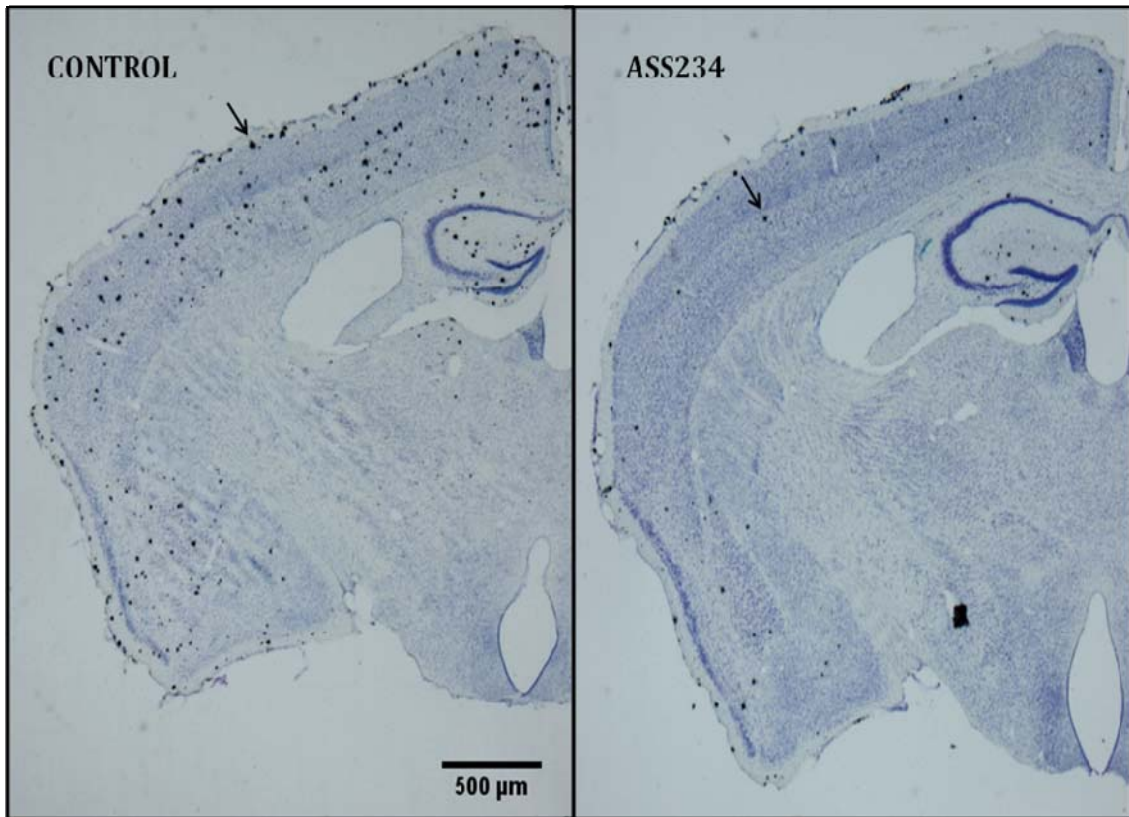
**ASS234** es  $10^5$  veces más selectivo a MAO A debido a su bajo  $K_i$  y su bajo coeficiente de partición

(G. Esteban, J. Allan, A. Samadi, A. Mattevi, M. Unzeta, J. Marco-Contelles, C. Binda, R. R. Ramsay, **Kinetic and structural analysis of the irreversible inhibition of human monoamine oxidases by ASS234, a multi-target compound designed for use in Alzheimer's disease**, *BBA: Proteins and Proteomics* **2014**, *1184*, 1104-1110).



**ASS234** disminuye significativamente los déficits inducidos en los procesos de aprendizaje por escopolamina en ratas adultas sanas, sugiriendo que ésta podría ser una molécula multipotente, muy prometedora para el potencial tratamiento de la EA

[Ricardo Martínez Murillo, Raquel Herrero-Labrador  
Neurovascular Research Group (Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain)  
(resultados no publicados)].



**Estudios *in vivo* con SEIS ratones doble-transgénicos de dos meses de edad, tratados con ASS234 I**

En corteza cerebral el número de placas seniles number disminuyó significativamente (\*\* $p < 0.002$ ) respecto del grupo control

[Ricardo Martínez Murillo, Raquel Herrero-Labrador  
Neurovascular Research Group (Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain)  
(resultados no publicados)].

Estos resultados merecían, por un lado, un análisis biológico más fino de **ASS234**, que se está llevando ya a cabo en los siguientes laboratorios, integrados en una red financiada por la UE (Acción COST CM1103), con las tareas que se citan:

**I. Smolders** (*Vrije Universiteit Brussel, Faculty of Medicine and Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis and Drug Information Center for Neurosciences, Brussels, Belgium*): Experimentos de microdiálisis en corteza prefrontal e hipocampo, para medir los niveles de dopamina, serotonina y noradrenalina.

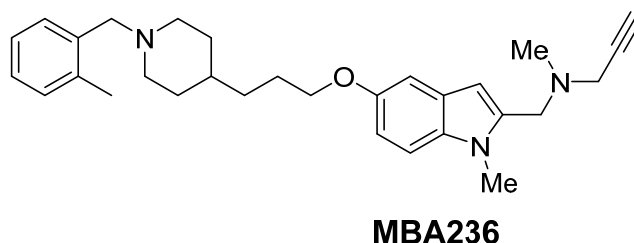


**Ph. De Deurwaerdère** (*Université de Bordeaux Institut des Maladies Neurodégénératives, Bordeaux, France*): Impacto de la actividad de MAO endógena en ratas tratadas crónicamente con L-DOPA; evaluación post-mortem de NA, DA y del contenido de 5-HT en varias regiones del cerebro.

**G. di Giovanni** (*Laboratory for the Study of Neurological Disorders Neurophysiology Unit, Department of Physiology and Biochemistry, University of Malta, Malta*): Efecto sobre las propiedades básicas involucradas en la transmisión sináptica y LTP en el *dentate gyrus* de ratones.

**G. Simic** (*Department of Neuroscience, Croatian Institute for Brain Research, University of Zagreb Medical School, Zagreb, Croatia*): Inhibición de GSK-3b, inhibición de la hiperfosforilación de la proteína tau.

**M. Valotti** (*Faculty of Pharmacy, Department of Life Sciences, Pharmacology Section, University of Siena, Siena, Italy*): Metabolismo.



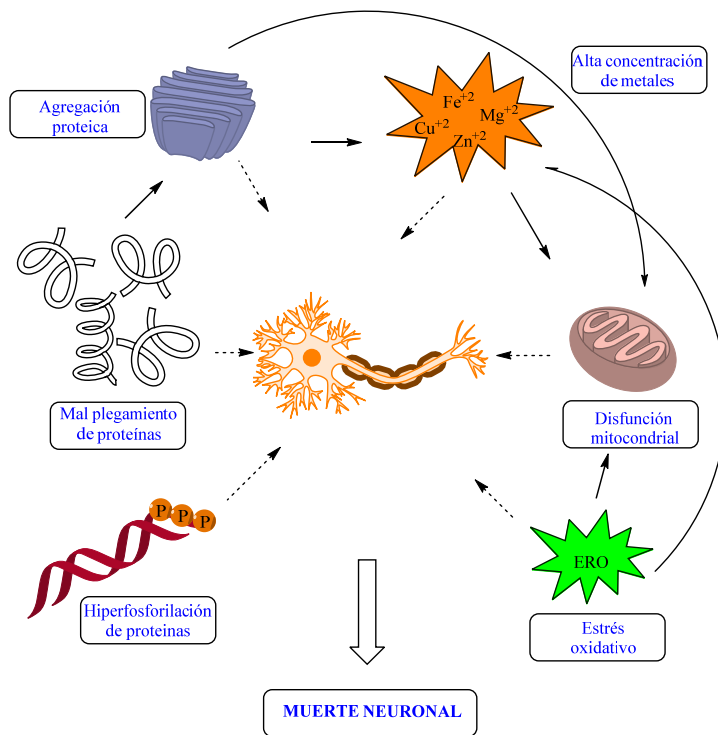
Y, por otro, simultáneamente, el diseño, síntesis y análisis de nuevos compuestos que permitieran seleccionar un *compuesto-lead*, para ulteriores ensayos pre-clínicos dirigidos a determinar su potencial uso para el tratamiento de la EA, proyecto que se ha abordado en esta Tesis Doctoral y que ha conducido a identificar el compuesto **MBA236** como esa molécula que se deseaba.

A continuación, se presentará el contexto científico y tecnológico de este proyecto de Tesis Doctoral.

### **I.3. SITUACIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN**

**I.3.1. Enfermedades neurodegenerativas.** El cerebro humano es una de las estructuras más complejas encontradas en la naturaleza. Rige las funciones vitales, como la respiración, el ritmo cardíaco, la digestión o la presión arterial, además de todos los procesos cognitivos esenciales. El cerebro está estructurado en diferentes regiones, y constituido mayormente por tejido blando, el cual contiene las células neuronales y células de soporte, entre otras.

Las enfermedades neurodegenerativas (ENs),<sup>1</sup> como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA),<sup>2</sup> se caracterizan por la pérdida progresiva de capacidades cognitivas que conllevan paulatinamente al deterioro físico y mental de los pacientes, que finalmente mueren por complicaciones secundarias asociadas a la enfermedad, como, neumopatías, septicemia, úlceras de decúbito infectadas, o accidentes cerebrovasculares.



**Figura 1.** Esquema de los eventos multifactoriales que conducen a la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas, referido y modificado de Cavalli, A. *et al.* (*J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 347-372).

Las ENs representan un reto para la biomedicina y, aunque no se conoce a ciencia cierta su etiología,<sup>1</sup> ya se han logrado grandes avances que están contribuyendo

a comprenderlas mucho mejor. Así, se ha llegado a la conclusión que las ENs tienen un origen multifactorial (Figura 1) causado por factores genéticos y endógenos.<sup>2</sup> Aunque cada una de las ENs tiene su propio mecanismo molecular y manifestaciones clínicas, comparten la disminución de la concentración de algunos neurotransmisores, mal plegamiento y agregación de proteínas en el cerebro,<sup>3</sup> estrés oxidativo (EO),<sup>4</sup> homeostasis de metales,<sup>5,6</sup> disfunción mitocondrial<sup>4</sup> y, como consecuencia de todos estos desequilibrios, muerte y pérdida progresiva de neuronas.

**I.3.2. Enfermedad de Alzheimer.** La EA es un trastorno neurológico degenerativo y la forma más común de demencia senil, que se caracteriza clínicamente por la pérdida progresiva de memoria a corto plazo y de otras funciones cognitivas, como el lenguaje, sentido de la orientación, habilidad para la ejecución de tareas,<sup>7</sup> etc. La mayoría de demencias son irreversibles,<sup>8</sup> lo cual significa que los daños en el cerebro que causa la demencia no pueden ser detenidos ni revertidos.<sup>9</sup>

La etiología de la EA no está totalmente elucidado.

La EA puede ser clasificada dentro de dos tipos: EA familiar (EAF) y EA esporádica (EAs).<sup>10</sup> La EAF es menos común, más agresiva, se presenta a edades tempranas, y se debe principalmente a mutaciones genéticas en los componentes de la vía amiloide, tales como el precursor de la proteína amiloide (PPA), la apolipoproteína E4 (ApoE4), la presenilina-1 y presenilina-2 (PS1 y PS2), que son componentes de la  $\gamma$ -secretasa, complejo enzimático que corta la PPA y produce  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), que al agregarse forma las placas seniles (PS).<sup>11,12</sup> En la EAs el mecanismo de la agregación de  $\beta$ A tiene lugar probablemente a través de una intrincada cascada de eventos moleculares distintos a los producidos por EAF.<sup>10</sup>

**I.3.2.1. La enfermedad de Alzheimer y su impacto en la sociedad.** Se estima que más de 35 millones de personas en el mundo sufren la EA, y que esta cifra podría triplicarse en 2050.<sup>13</sup> La EA es un problema sanitario de gran impacto socio-económico, en continua progresión, y exponencialmente relacionada con el proceso de envejecimiento, a medida que aumentan la calidad y expectativas de vida en nuestras sociedades avanzadas.

Según datos de la organización *Alzheimer's Disease International*, en su informe anual de 2010, el costo total estimado en todo el mundo por la demencia fue de 604

billones de dólares.<sup>13</sup> Además, según estimaciones de la misma organización se cree que en los próximos 40 años el número de personas mayores dependientes alcanzará los 277 millones, y que casi la mitad de estas personas con necesidad de atención, experimentarán los efectos de la demencia y el deterioro cognitivo, lo cual generará un gasto importante para los sistemas públicos de atención sanitaria.<sup>14</sup>

**I.3.2.2. Perspectiva histórica.** El 3 de noviembre de 1906, durante la celebración del XXXVII congreso de psiquiatría en Tübingen (Alemania), el Dr. Alois Alzheimer presentó las características clínicas y neuropatológicas de la enfermedad, que posteriormente Emil Kraepelin bautizó como la enfermedad de Alzheimer en honor a su mentor, Alois Alzheimer, que en ese momento era el director del Laboratorio de Anatomía de la Universidad de Munich.<sup>15</sup>

En noviembre de 1901, el Dr. Alzheimer internó en el hospital de Frankfurt al paciente, Auguste D, de 51 años, ya que presentaba pérdida progresiva de memoria, delirios y alucinaciones. Después de la muerte del paciente, en 1906, su cerebro fue enviado a Munich para su análisis. Alzheimer utilizó el método de tinción de plata, desarrollado por Bielschowsky, para la identificación de las PS y los ovillos neurofibrilares, que son las características histopatológicas que definen la EA.<sup>15</sup>

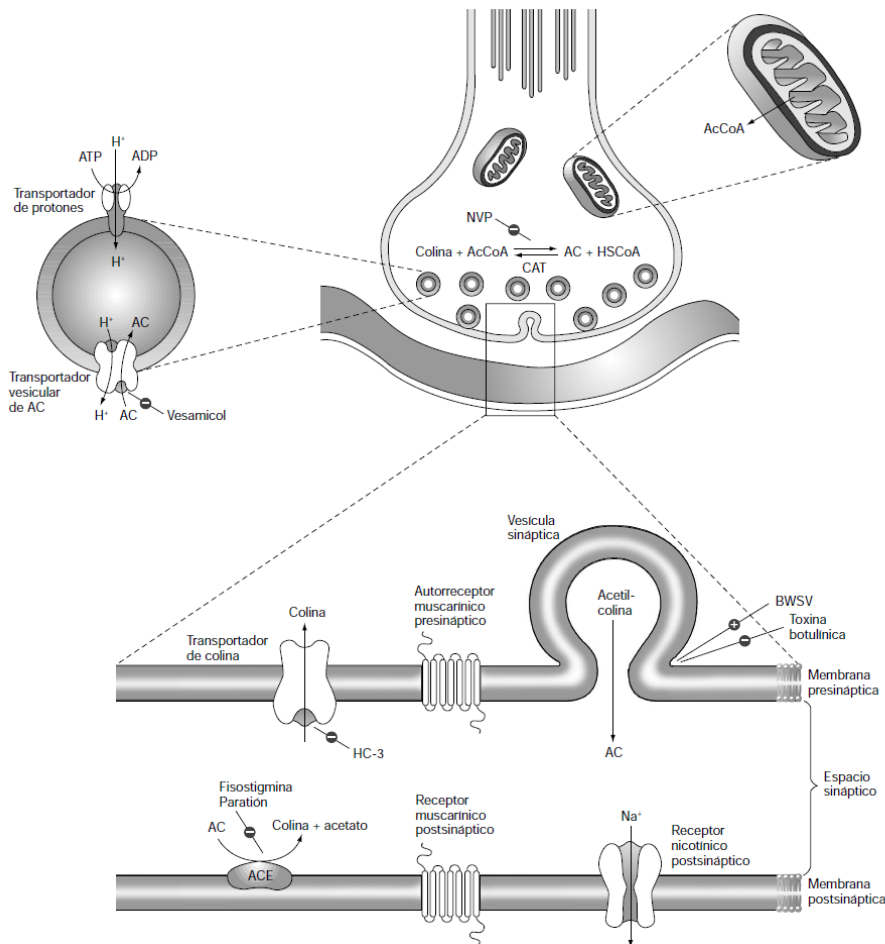
**I.3.2.3. Etiología de la enfermedad de Alzheimer.** A nivel histopatológico, la EA se caracteriza por la formación masiva de dos tipos de agregados proteicos: los ovillos neurofibrilares (ONFs)<sup>10,16</sup> y las placas seniles (PS).<sup>10,17</sup>

Los ONFs resultan de la agregación de pequeñas fibrillas, en el interior de la neurona, formadas por proteína tau hiperfosforilada.

Las PS son depósitos de  $\beta$ A, que se localiza en el espacio extracelular, y que distorsionan progresivamente los elementos estructurales de las neuronas, afectando su función.

Además, en la EA hay una disminución importante de los niveles de ciertos neurotransmisores, como acetilcolina (ACh), lo que se ha relacionado con la pérdida de neuronas colinérgicas en regiones del cerebro, como hipocampo y córtex, que están implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria.<sup>18</sup>

**I.3.2.4. Hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer.** A finales de los 60 la investigación dirigida a comprender los mecanismos bioquímicos implicados en la EA, y establecer las bases para el desarrollo de una terapia racional, en un proceso análogo al que en su momento se consiguió con levodopa para la EP,<sup>19</sup> empezó a dar sus frutos.



**Figura 2.** Esquema de la sinapsis colinérgica, tomada de González, A.; Flórez, J. en *Farmacología Humana* (ed S.A Masson) 213-227 (1997).

Así, se descubrió que en la EA el déficit neocortical de colinaacetiltransferasa (ChAT), la enzima responsable de la síntesis de ACh, junto con la reducción de la absorción de colina (Ch), la disminución de la concentración de ACh por la hidrólisis de las enzimas colinesterasas (ChEs), la pérdida de neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert y la reducción del número de receptores nicotínicos y muscarínicos de ACh, eran indicios claros de que en la EA había pérdida de **transmisión colinérgica**, y que estos procesos estaban ligados al deterioro de las capacidades cognitivas del sujeto.<sup>19,20</sup>

Éstos son, pues, los principios básicos de la hipótesis colinérgica de la EA. La ACh se forma en el citoplasma neuronal a partir de Ch y acetilcoenzima A (ACh-CoA) mediante la acción de ChAT (Figura 2). La Ch, procedente del hígado, llega al terminal presináptico como resultado del metabolismo de la fosfatidilcolina de membrana, o del espacio intersináptico, a partir de la recaptación de Ch, producto de la hidrólisis de ACh por la acción de AChE. A su vez, la ACh-CoA deriva de glucosa, citrato y acetato. La síntesis de la ACh-CoA se da en la mitocondria y está catalizada por el complejo piruvato-deshidrogenasa.<sup>21</sup> El enzima ChAT se sintetiza en las neuronas colinérgicas y se transporta a las terminales nerviosas,<sup>22</sup> aunque también se ha detectado en el resto de estructuras neuronales. Debido a la alta especificidad de ChAT en las neuronas colinérgicas, ésta puede ser un buen marcador para localizarlas. Tanto la determinación de la ChAT, por técnicas inmunohistoquímicas y la determinación de la concentración de ACh, son determinantes para la caracterización de sistemas colinérgicos en modelos de animales-transgénicos con ChAT-humana.<sup>23</sup>

Una vez sintetizada, la ACh se almacena en el terminal colinérgico presináptico. Existen tres formas de depósito de ACh: libre, disuelta en el citoplasma, en forma de vesículas sinápticas, y asociada lábilmente a membranas. La ACh se libera al espacio sináptico de forma controlada, a través de las vesículas sinápticas. Éstas tienen en su interior la cantidad mínima de ACh para generar los potenciales mínimos necesarios para la despolarización de las terminaciones colinérgicas, provocando la apertura de canales de Ca.<sup>+2</sup> La entrada de Ca<sup>+2</sup> a la membrana presináptica, a favor del gradiente electroquímico, desencadena la movilización de más ACh, libre o asociada, hacia las vesículas sinápticas del terminal colinérgico.<sup>21</sup>

La ACh pasa al interior de la vesícula sináptica mediante el transportador vesicular de ACh (VACHT). El interior de la vesícula sináptica está acidificada mediante una bomba de protones dependiente de ATP, y el VACHT es el encargado de intercambiar iones H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> por ACh desde el citoplasma al interior de la vesícula sináptica (Figura 2). Es el gradiente de pH en la interfaz, por lo tanto, la fuerza motriz necesaria para transportar ACh.<sup>24</sup> Finalmente, las vesículas sinápticas interactúan con la membrana presináptica y descargan su contenido en la hendidura sináptica, activando los receptores de ACh (AChR) postsinápticos, desencadenando una serie de reacciones o estímulos bioquímicos que se transmitirán en forma de estímulos nerviosos por todo el entramado de las complejas comunicaciones entre células nerviosas y el sistema

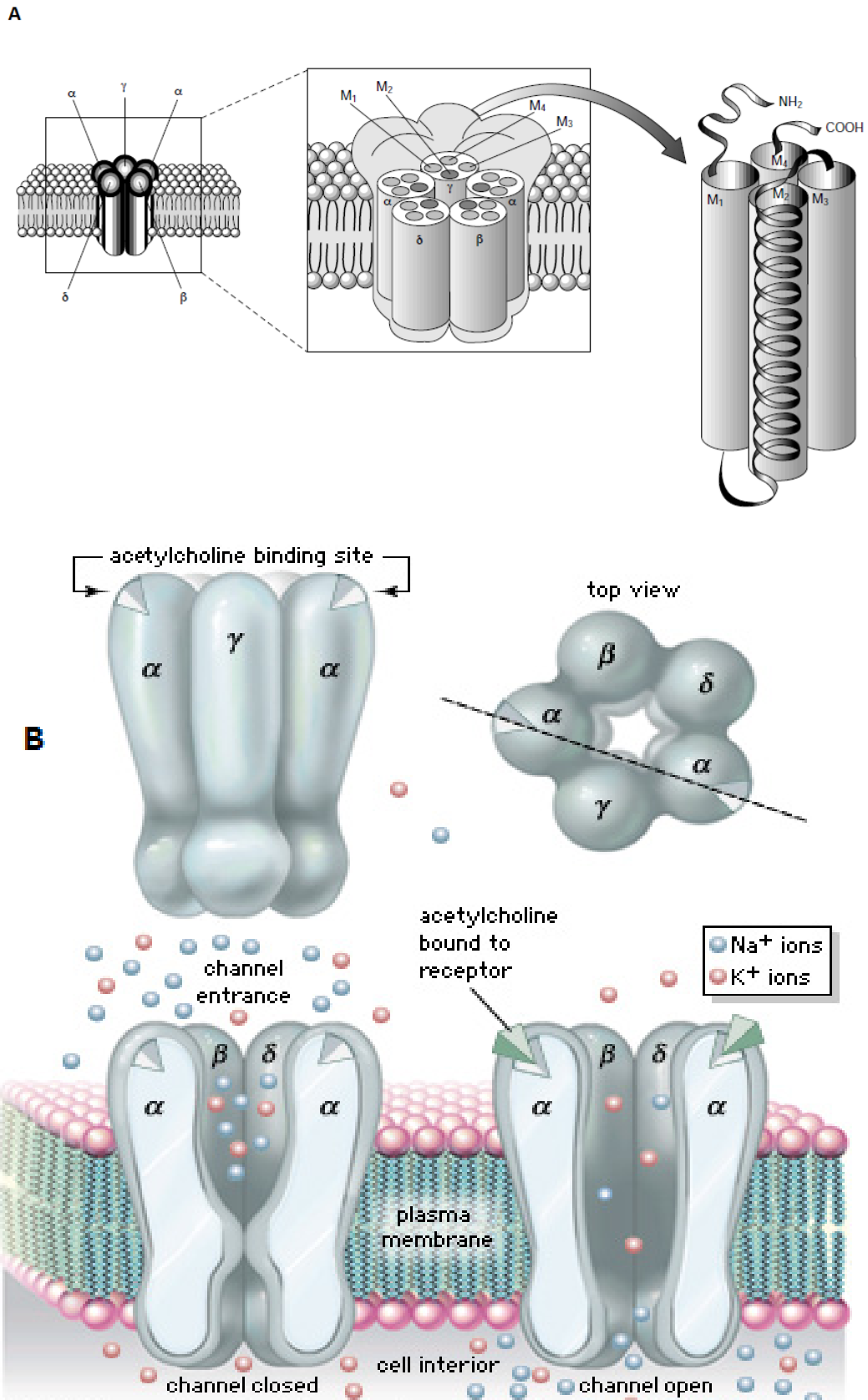
nervioso autónomo. La acción del neurotransmisor finaliza por la eliminación de éste, vía hidrólisis, mediante las enzimas colinesterásicas (ChEs), que lo degradan inmediatamente en Ch y ácido acético. La Ch resultante volverá a la neurona presináptica por un transportador de Ch de alta afinidad (HACHT), entrando de nuevo en el ciclo de producción de ACh.

Las ChEs son un grupo de estereosas capaces de hidrolizar ésteres de Ch, produciendo Ch y ácido acético. Esta degradación enzimática es una de las más conocidas y estudiadas. Hay dos tipos de ChEs, la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE). La existencia de dos proteínas con una alta homología, que interactúan con sustratos similares, ambas capaces de hidrolizar ACh, codificadas por distintos genes, induce a pensar que ambas enzimas son necesarias para los procesos bioquímicos de la sinapsis neuronal.<sup>21</sup>

La hipótesis colinérgica para la terapia de la EA para mejorar la transmisión colinérgica implica el uso de inhibidores de ACh, el desarrollo de nuevas entidades químicas agonistas, agonistas parciales, antagonistas y moduladores alostéricos, positivos y negativos, de receptores nicotínicos de ACh (nAChRs), el desarrollo de agonistas directos de receptores muscarínicos sinápticos de ACh (M<sub>1</sub>), o el desarrollo de antagonistas de receptores muscarínicos sinápticos de ACh (M<sub>2</sub>).

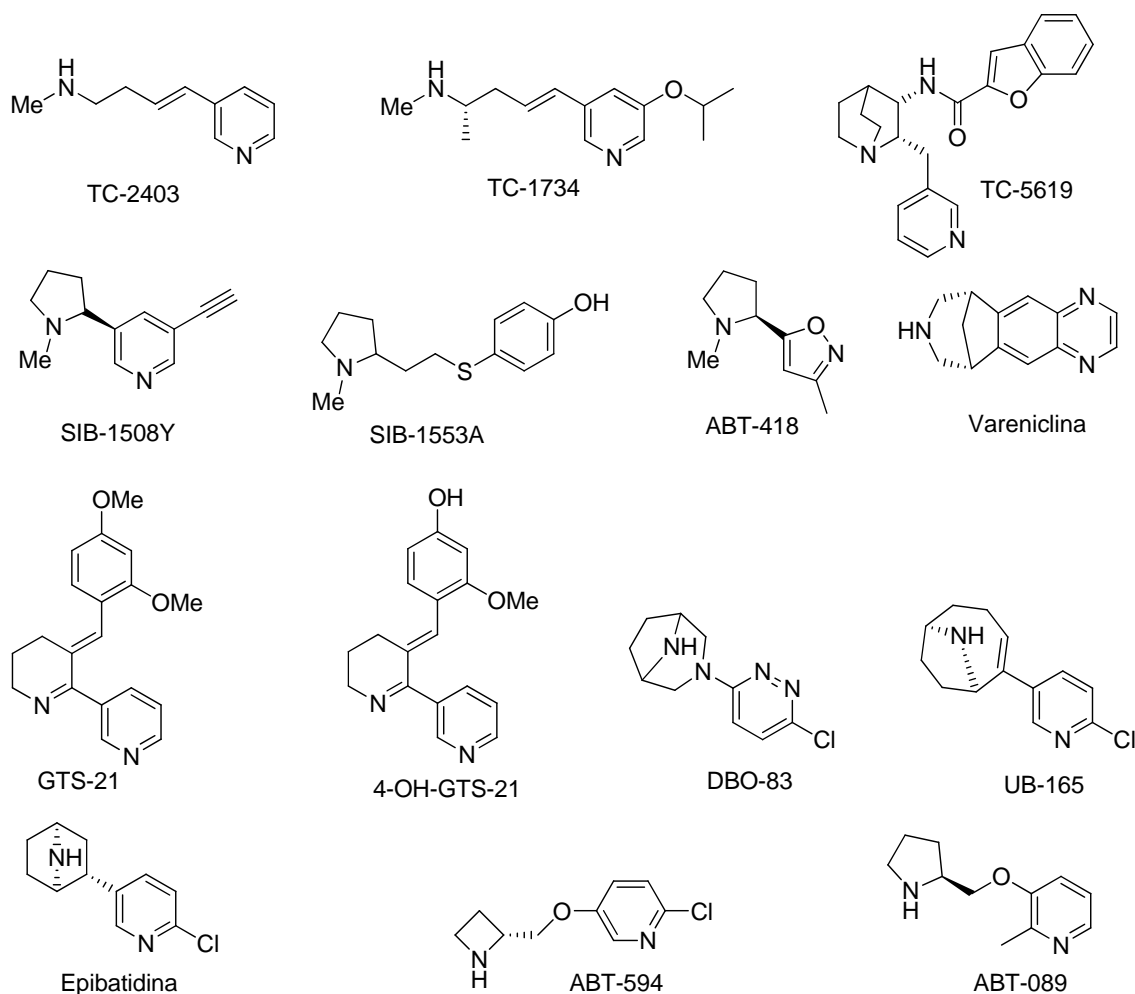
**I.3.3. Receptores colinérgicos.** Hay dos tipos de receptores colinérgicos, los muscarínicos y los nicotínicos, denominación y diferencia que procede de la observación de ciertas respuestas bioquímicas por parte de ACh, que eran estimuladas por muscarina y nicotina, respectivamente. Los estudios de fijación con radioligandos confirmaron la especificidad de dos sitios de fijación diferente, uno de carácter nicotínico y otro muscarínico.<sup>21</sup>

**I.3.3.1. Receptores nicotínicos.** Los nAChR pertenecen a la familia de los canales iónicos dependientes de receptor, y son los encargados de mediar la transmisión sináptica, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el periférico.<sup>21</sup>

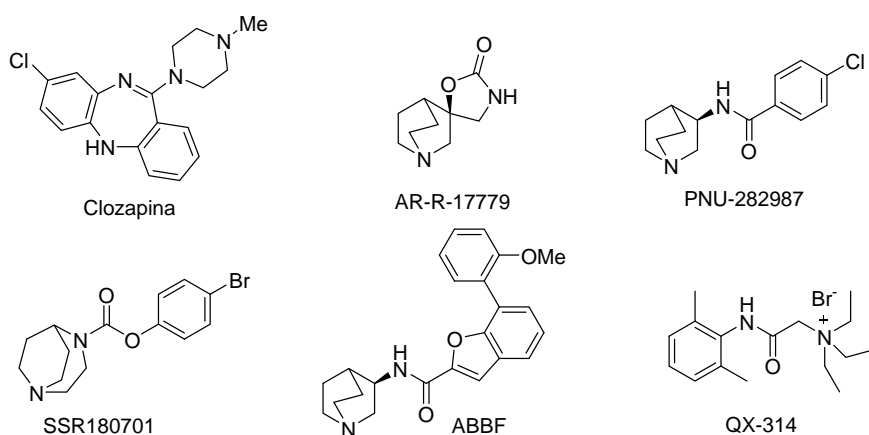


**Figura 3.** Modelo del receptor nicotínico: (A, tomado de González, A.; Flórez, J. en *Farmacología Humana*; ed S.A Masson; 213-227, 1997). (B, tomado de la Enciclopedia Británica 2002).





**Figura 4.** Agonistas de nAChRs (Arneric, S. P., Holladay, M.; Williams, M. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 74, 1092-1101).

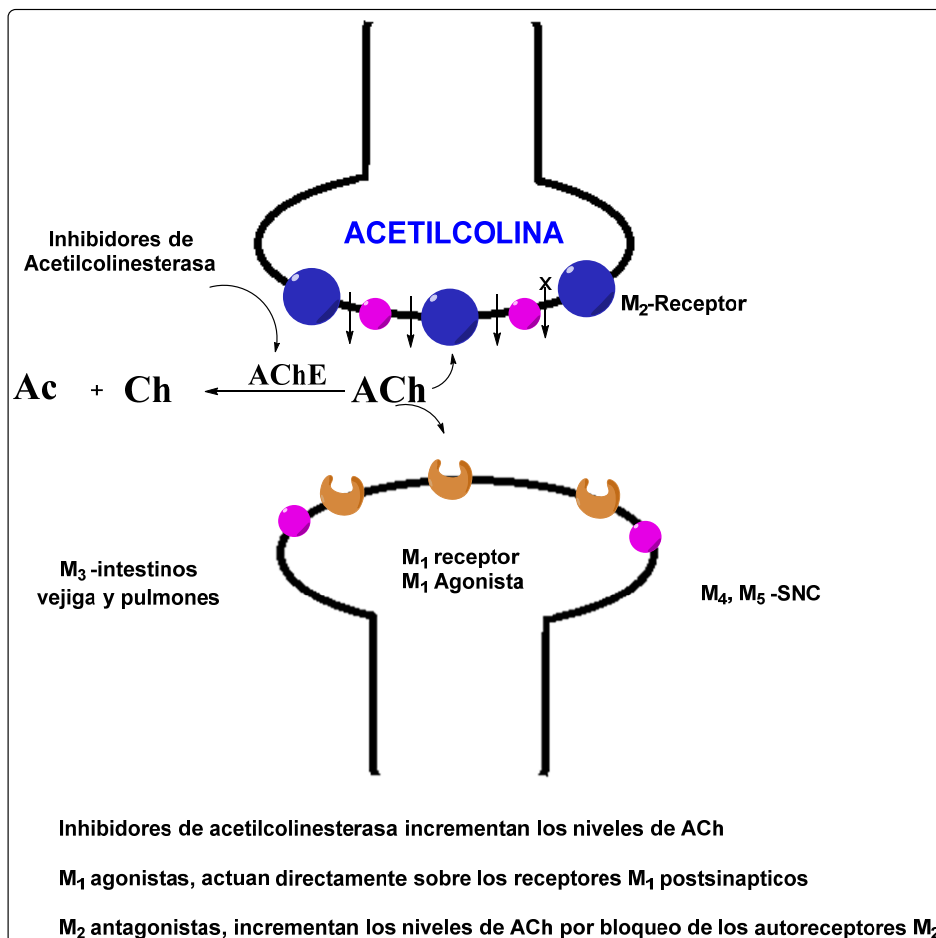


**Figura 5.** Agonistas/Agonistas parciales y antagonistas de  $\alpha 7$  nAChR (Arneric, S. P., Holladay, M.; Williams, M. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 74, 1092-1101).

Heinemann y colaboradores, tomando como modelo el pez torpeda, clonaron y expresaron el nAChR.<sup>25,26</sup> La estructura primaria del nAChR está constituida por

subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) (Figura 3). Los nAChRs están compuestos por combinaciones de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 6$ ) y  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ), homómeros de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 7$  y  $\alpha 9$ ) y subunidades  $\alpha$  heterómeras ( $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ ). Cada subunidad tiene cuatro segmentos transmembrana, un dominio extracelular *N*-terminal largo, un bucle intracelular entre el segmento transmembrana 3 y 4 y un dominio *C*-terminal corto.<sup>27</sup> Los nAChR han sido utilizados como diana para el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades donde está implicado el SNC. Es el caso de vareniclina (Chantix<sup>®</sup>) como para dejar de fumar, y otros fármacos contra el dolor, la esquizofrenia y la EA<sup>27</sup> (Figuras 4 y 5).

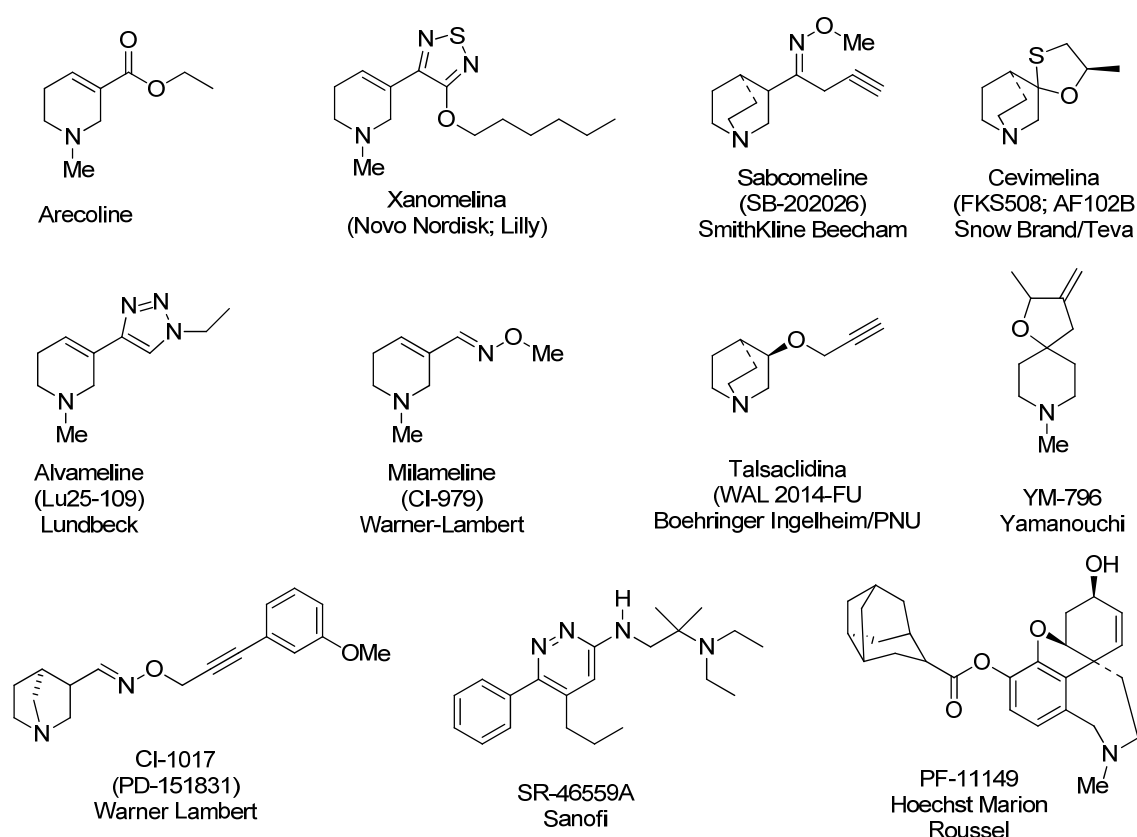
**I.3.3.2. Receptores muscarínicos.** Son receptores capaces de mediar en la respuesta de liberación de ACh por parte de los nervios parasimpáticos del SNC autónomo.<sup>28-30</sup> Su papel en la regulación inconsciente de órganos y funciones del SNC los hace potenciales dianas terapéuticas<sup>28</sup> para el tratamiento de la EA.<sup>31</sup>



**Figura 6.** Transmisión colinérgica (Greenlee, W. *et al. IL Farm.* 2001, 56, 247–250).

Los receptores muscarínicos pertenecen al grupo de proteínas G acopladas a receptores. Los receptores muscarínicos constituyen una familia de cinco subtipos ( $M_1$ - $M_5$ ). Los  $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_5$  son subtipos de receptores acoplados con proteínas  $G_q$ , proteínas G que activan a la fosfolipasa C, enzimas de la familia de la hidrolasas intracelulares que participan en los procesos de transducción de señales en células eucariotas.<sup>28</sup> Los subtipos  $M_2$  y  $M_4$  son de la familia de proteínas G acopladas a receptores  $G_i/Go$ .

Aunque se ha dedicado mucho esfuerzo al desarrollo de agonistas de receptores muscarínicos de ACh ( $M_1$ ), las expectativas no han sido totalmente satisfechas, en parte porque muchos de los agonistas  $M_1$  al no ser selectivos, generan efectos secundarios como, por ejemplo, la activación de receptores muscarínicos de ACh  $M_3$  en el intestino, la vejiga y los pulmones (Figura 6), o estimulan los receptores muscarínicos  $M_4$  y  $M_5$  en el SNC.

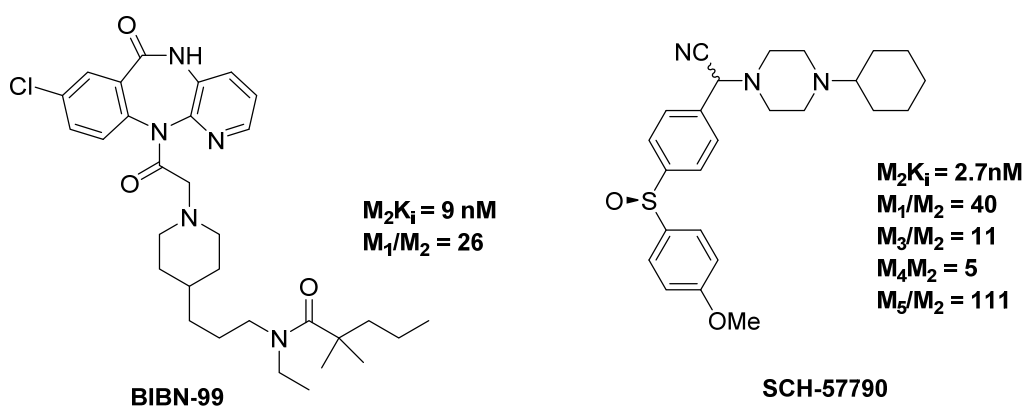


**Figura 7.** Agonistas  $M_1$  (Greenlee, W. *et al.* *IL Farm.* **2001**, 56, 247–250).

La falta de selectividad de los agonistas de  $M_1$  también activa receptores presinápticos  $M_2$ , y de este modo se reduce la liberación de ACh (Figura 6). Muchos de

los agonistas  $M_1$  son derivados de alcaloides naturales relacionados con arecolina (Figura 7), moderadamente selectivos y han demostrado su eficacia en tests de cognición y de comportamiento.<sup>31,32</sup>

Un segundo enfoque colinérgico alternativo, para el tratamiento de la EA es el desarrollo de antagonistas muscarínicos  $M_2$ , ya que incrementen la liberación de ACh.<sup>31,33-35</sup> Estudios en animales han demostrado que al bloquear estos receptores, aumentan los niveles de ACh y mejoran los resultados de los ensayos de medición cognitiva. Aunque se han descrito numerosos antagonistas  $M_2$ ,<sup>35</sup> sólo unos pocos han mostrado buena selectividad contra otros subtipos de receptores muscarínicos. De los estudios realizados, el compuesto más interesante fue BBN-99 (Figura 8), que producía liberación de ACh y mejoraba la capacidad de aprender en modelos de rata. Posteriormente, utilizando esta misma matriz y haciendo estudios de estructura-actividad, Clader y col., desarrollaron una serie de antagonistas del receptor muscarínico  $M_2$ , como SCH-57790 (Figura 8), con los que se pretendía mejorar la selectividad hasta en 100 veces respecto de  $M_1$  y  $M_3$ , y como mínimo 30 veces en los receptores  $M_4$  y  $M_5$ , manteniendo una óptima potencia, efectividad y biodisponibilidad oral del potencial fármaco.<sup>31,33-37</sup>



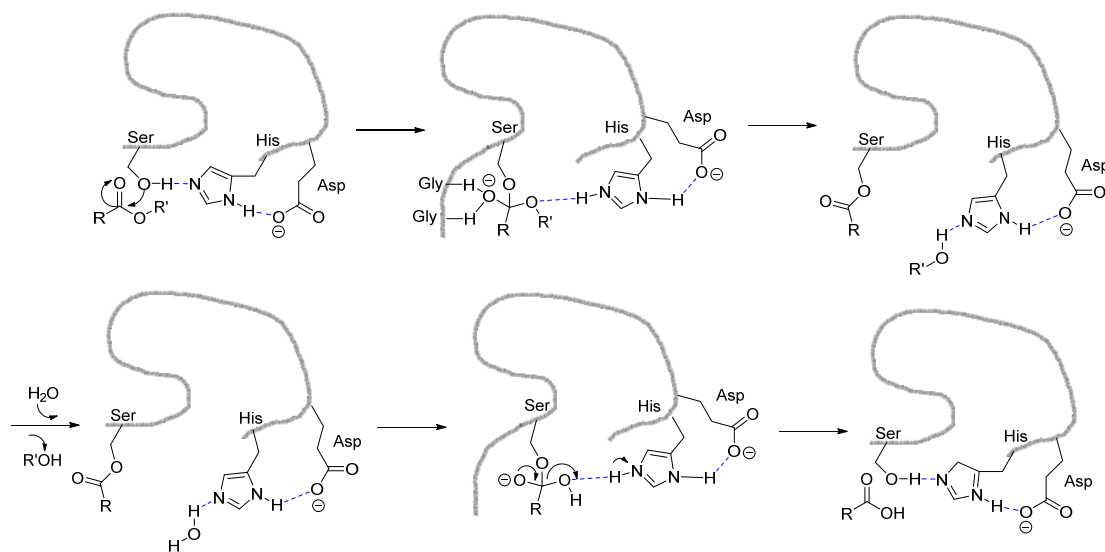
**Figura 8.** Antagonistas muscarínicos  $M_2$  (Greenlee, W. *et al. IL Farm.* 2001, 56, 247–250; Clader, J. W. *et al. Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 319–326).

**I.3.4. Inhibidores de acetilcolinesterasas (IAChE).** La determinación de la estructura de AChE de *Torpedo californica*<sup>38</sup> por rayos-X identificó que el sitio activo del enzima consistía en una triada catalítica de aminoácidos (Ser200, His440 y Glu327) que se encuentra cerca de la parte inferior de una hendidura estrecha y profunda, que se alinea con los anillos de 14 residuos de aminoácidos aromáticos. En este proceso el grupo OH

de la serina, dado que el aspartato y la histidina están aumentando su capacidad nucleofílica, a través de la dispersión de carga en el sistema, ataca el éster formando un intermedio tetrahédrico, que al colapsar en el enzima, experimenta acilación, liberando Ch. Finalmente, el enlace de puente de hidrógeno formado con el residuo de histidina y aspartato, y la molécula de agua, en el proceso de desacilación, recicla el enzima (Figura 9).<sup>38-40</sup>

En estudios posteriores de modelización molecular (“docking”) entre AChE y diversos ligandos, se halló que el átomo de nitrógeno cuaternario de ACh, estaba estrechamente en contacto con el anillo indólico de Try84, resultado que se confirmó en determinaciones estructurales de rayos-X de los mismos complejos enzima-ligando.<sup>39</sup>

La hipótesis colinérgica de la EA, como se recordará, propone el uso de inhibidores de las ChEs, AChE y BuChE, (IChE) para, al impedir la hidrólisis de ACh, restaurar el nivel del neurotransmisor, y mejorar así, las funciones cognitivas del paciente.

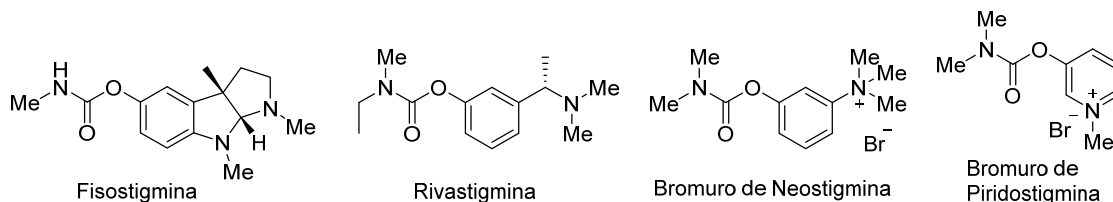


**Figura 9.** Mecanismo de la hidrólisis de los ésteres de Ch por un enzima ChE (de los Ríos, *C. Expert Opin. Therapeutic Patents* **2012**, 22, 853–869).

Hay dos grandes grupos de IChE, los que poseen un grupo carbamato, llamados *stigminas*, y los compuestos organofosforados.

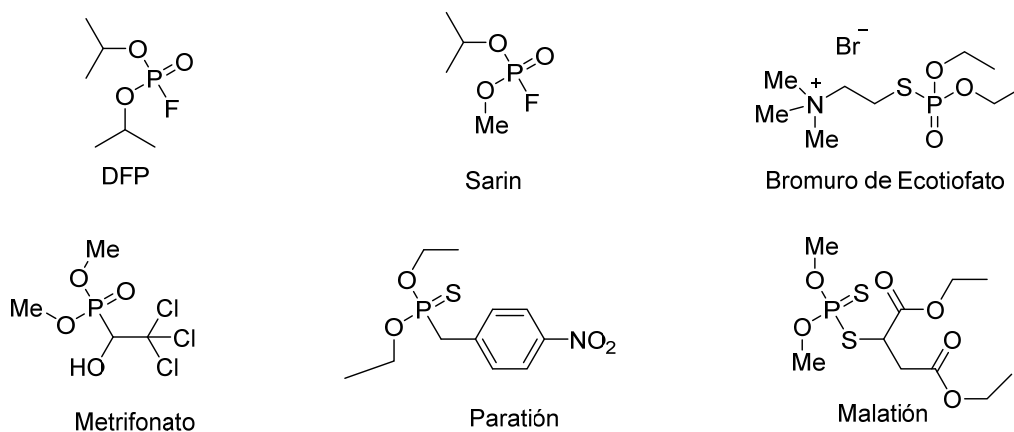
Los inhibidores tipo carbamato son análogos de fisostigmina (Figura 10), un IChE que es un producto de origen natural, extraído de *Physostigma venenosum*. La inhibición de estos compuestos es pseudo-irreversible, puesto que una vez que se produce el ataque nucleofílico por parte de la serina al carbamato, la serina se

carbamoilo, y su desprotección por una molécula de agua se hace más difícil, ya que el nitrógeno reduce el carácter electrofílico del carbonilo, y esto hace que la velocidad de la hidrólisis del carbamato sea casi un millón de veces más lenta que la de los acetatos. Rivastigmina, neostigmina y piridostigmina son un buen ejemplo de IACHe de esta familia (Figura 10).<sup>40</sup>



**Figura 10.** IACHe de tipo carbamato (de los Ríos, C. *Expert Opin. Therapeutic Patents* **2012**, 22, 853–869).

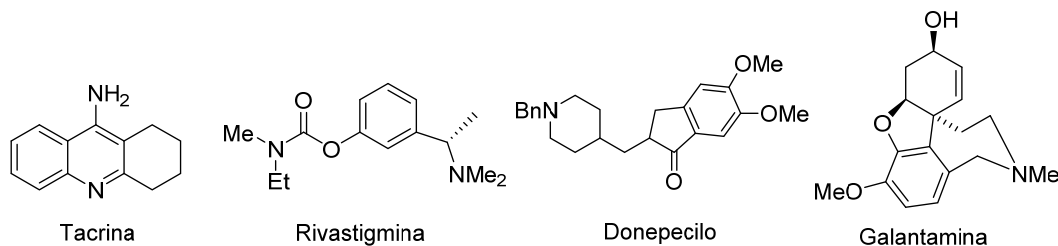
El segundo grupo, los compuestos organofosforados, reaccionan con la serina, formando intermediarios muy estables. En este caso, la hidrólisis del complejo enzima-sustrato es muy lenta, por lo que su inhibición sería irreversible, lo que limita su uso terapéutico. Ésta es la razón de que estos IACHe se hayan estudiado ampliamente como insecticidas, sobre todo aquéllos que tiene un grupo P=S en lugar del P=O, que presentan mayor toxicidad, ya que siendo inactivos, sin embargo rápidamente se metabolizan al derivado oxigenado letal, vía desulfuración oxidativa, provocando la inhibición irreversible del enzima en los insectos y su posterior muerte. Afortunadamente, en los mamíferos este proceso metabólico no tiene lugar, lo que les previene de cualquier contaminación. Paratión<sup>®</sup> y Malatión<sup>®</sup> son un buen ejemplo de estos compuestos (Figura 11).<sup>40</sup>



**Figura 11.** Inhibidores organofosforados de ChEs (de los Ríos, C. *Expert Opin. Therapeutic Patents* **2012**, 22, 853–869).

De manera idéntica, durante muchos años se ha hecho un gran esfuerzo en el diseño y desarrollo de IACHe reversibles, lo que ha proporcionado una amplia variedad de estructuras.<sup>40</sup> En este grupo, tacrina (Figura 12) fue el primer inhibidor prescrito para la EA, debido que fisostigmina no había progresado en su desarrollo clínico por su baja biodisponibilidad y corta vida media. A finales del verano de 1986, tacrina fue comercializada por Parke-Davis, bajo el nombre comercial de Cognex<sup>®</sup> 40-42 (Figura 12), aunque la FDA (US) había puesto en duda la viabilidad del fármaco. Con el tiempo se observó que el tratamiento con tacrina no impedía la progresión de la EA, aunque conseguía algunas mejoras cognitivas, comparadas con el placebo, en las primeras etapas de la demencia. Sin embargo, los efectos indeseados en hígado provocaron que este fármaco fuera retirado del mercado y remplazado por otra segunda generación de IACHe.<sup>40</sup>

Entre éstos, se encuentran rivastigmina (Exelon<sup>®</sup>),<sup>43</sup> donepezilo (Aricept<sup>®</sup>),<sup>44</sup> y galantamina (Reminyl<sup>®</sup>),<sup>45</sup> (Figura 12). Sin embargo, estos fármacos no curan, ni impiden el progreso de la enfermedad, y sólo proporcionan un tratamiento paliativo que cesa con el tiempo, y estarían indicados para casos de EA tipo media, o poco avanzada.



**Figura 12.** Inhibidores de AChE.

**I.3.5. Hipótesis de la cascada del  $\beta$ -amiloide.** La hipótesis de la cascada del  $\beta$ -amiloide (HCA) ha jugado un papel prominente en la explicación de la etiología y la patogénesis de la EA. Se ha propuesto que la deposición y agregación de  $\beta$ A es el evento patológico clave en la EA que conduce a la formación de PSs y luego, ONFs, muerte neuronal, y en última instancia, demencia.<sup>46</sup>

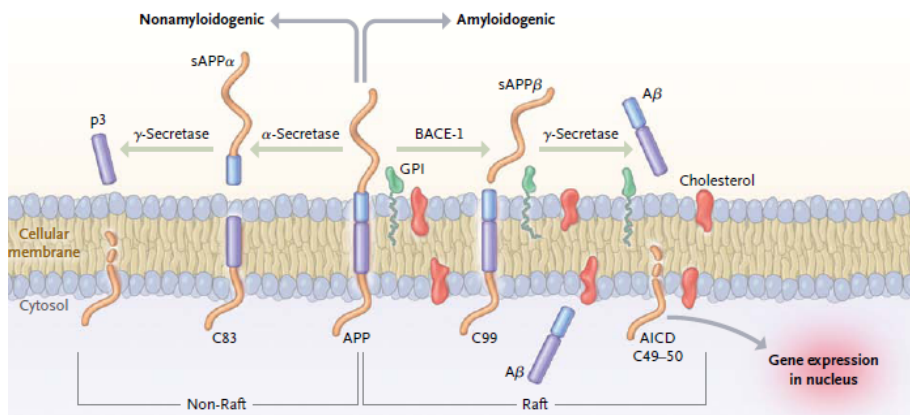
Desde la primera descripción de demencia senil en 1907, las PSs y los ONFs fueron considerados como los marcadores claves en la EA. La identificación de  $\beta$ A en PSs, y los estudios genéticos que encontraron mutaciones en PPA, y en los genes que codifican algunas proteínas transmembrana, como PS-1 y PS-2, que conducen a la

acumulación de  $\beta A$ , y a la aparición de demencia temprana, dieron lugar a la formulación de la HCA.<sup>46</sup>

**I.3.5.1. Proteína precursora amiloidea (PPA) y la formación de placas seniles.** Las PSs se forman por la acumulación extracelular de péptido  $\beta A$ , que se generan a partir de PPA.<sup>47</sup> La PPA es una glicoproteína transmembrana, expresada en muchos tipos de tejidos, sobre todo en la sinapsis neuronal. Su función no ha sido del todo elucidada. Sin embargo, se cree que está relacionada con la adhesión entre células, el crecimiento dendrítico en células neuronales, y como controladora del tráfico vesicular, a través del axón.<sup>47</sup>

PPA puede ser procesada por una ruta no-amiloidogénica (Figura 13), en la cual, la  $\alpha$ -secretasa corta la PPA generando PPA $\alpha$  y C83; posteriormente, el fragmento C-terminal (FCT $\alpha$ ) se fragmenta por la acción de la  $\gamma$ -secretasa, que a su vez está formada por complejas proteínas que contienen PS-1 y PS-2 como unidades catalíticas, para rendir el péptido p3, no patológico, y el dominio intracelular del PPA.<sup>47,48</sup>

En el proceso patológico amiloidogénico del PPA, primero, la PPA se fragmenta por la  $\beta$ -secretasa (BACE-1), seguido por la acción de la  $\gamma$ -secretasa para rendir el péptido  $\beta A$ . Dependiendo de dónde se corta el fragmento C-terminal (FCT $\beta$ ), pueden formarse fragmentos  $\beta A_{1-38}$  a  $\beta A_{1-43}$  aminoácidos.<sup>47,48</sup> Sin embargo, en las PSs se encuentran depósitos de  $\beta A_{1-40}$  y  $\beta A_{1-42}$  aminoácidos, y de  $\beta A_{1-42}$  en menos proporción, pero es más patogénico. Muchos estudios respaldan que el proceso patológico de la ruptura amiloidogénica está correlacionado con el proceso de envejecimiento y la EA<sup>47,49,50</sup>.



**Figura 13.** Producción de  $A\beta$  a partir de PPA (Henry, W.; Querfurth, F. L. *N. Engl. J. Med.* 2010, 4, 329–344).



Estudios genéticos han mostrado que mutaciones en el gen que codifica PPA,<sup>47,51,52</sup> o en genes que regulan el proceso proteolítico de la PPA,<sup>47,53,54</sup> causan un tipo de EA hereditaria de comienzo temprano. Los efectos que tienen estas mutaciones resultan en una excesiva producción de  $\beta A$ , o en un incremento de la relación  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ , facilitando la deposición  $\beta A$  y la formación de las PSs.<sup>47,55-57</sup>

**I.3.5.2. Puntos críticos de la hipótesis de la cascada del  $\beta$ -amiloide.** "¿Ha sido la HCA en la EA demostrada?" es el título con el cual Hardy y col. titulan un artículo,<sup>58</sup> en el cual demuestran que la mayoría de los experimentos citados como soporte de la HCA no intentan demostrar de forma absoluta la hipótesis, sino más bien, pretenden acumular datos experimentales consistentes con la hipótesis. Como dijo el filósofo y teórico de la ciencia Karl Popper: "En la ciencia una hipótesis puede que nunca sea demostrada. Uno puede citar observaciones (resultados experimentales) los cuales son consistentes con la hipótesis, pero éstas no constituyen una prueba."<sup>59</sup>

La HCA ha sufrido modificaciones desde que se planteó, pero ha sido la base para el desarrollo de inhibidores de enzimas que pueden limitar la producción de los elementos tóxicos  $\beta A_{1-42}$ , o inmunoterapias contra fragmentos tóxicos de  $\beta A$ .<sup>59-62</sup>

La observación de que el  $\beta A$  es tóxico fue un argumento sólido para la HCA.<sup>63</sup> Sin embargo, la relevancia de estos resultados no está totalmente clarificada, puesto que el modelo de la prueba *in vitro* es de origen artificial; además, la concentración de  $\beta A$  no es similar a la del proceso natural en cerebro, y el rango de tiempo es completamente diferente. En la vida real, incluso si hubiera daño en neuronas por  $\beta A$  debería existir un mecanismo que lo compensara, y promoviera la recuperación, lo que no se podría simular en un modelo experimental.<sup>59</sup>

El conocimiento que se tiene actualmente de los procesos moleculares y celulares implicados en la EA ha sido posible gracias a los experimentos en ratones transgénicos que llevan mutaciones de genes humanos que expresan algunas características de la patología humana. Sin embargo, éstos no son modelos ideales de la EA. Un modelo animal de la EA debería presentar las siguientes características, que son las de la EA en humanos:<sup>59</sup>

1. La pérdida sináptica debe ocurrir en las primeras etapas, en regiones específicas del cerebro, y avanzar a lo largo de la enfermedad, en correlación con el deterioro cognitivo.

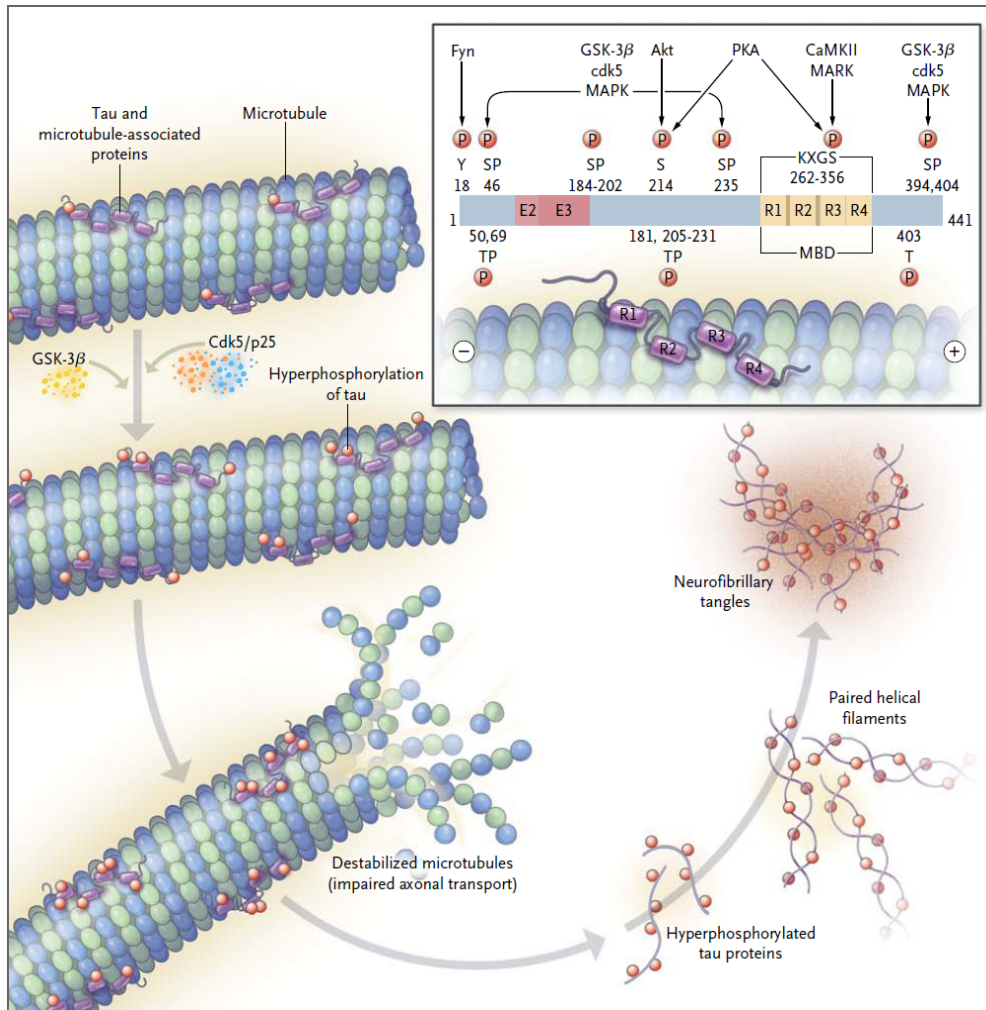
2. Debe haber pérdida neuronal marcada en áreas relevantes del cerebro.
3. Debe haber cambios marcados en el citoesqueleto, por la hiperfosforilación de la proteína tau y la formación de ONFs, comenzando en el lóbulo temporal medio e hipocampo.
4. Al depósito de  $\beta$ A debe seguir los cambios neurofibrilares en hipocampo, y también la pérdida de sinapsis y neuronas.
5. El depósito  $\beta$ A debe comenzar en la mediana edad o posteriormente, y debe producirse de una manera ordenada, comenzando en la neo-corteza.
6. Debe haber deterioro cognitivo progresivo, que termina en una criatura indefensa, incapaz de cuidar de sí mismo.

Muchas de estas características fueron examinadas, y la mayor parte no fueron observadas en el modelo animal. En particular, no se observaron cambios neurofibrilares, y el deterioro cognitivo fue más bien suave y apenas progresivo.<sup>59</sup>

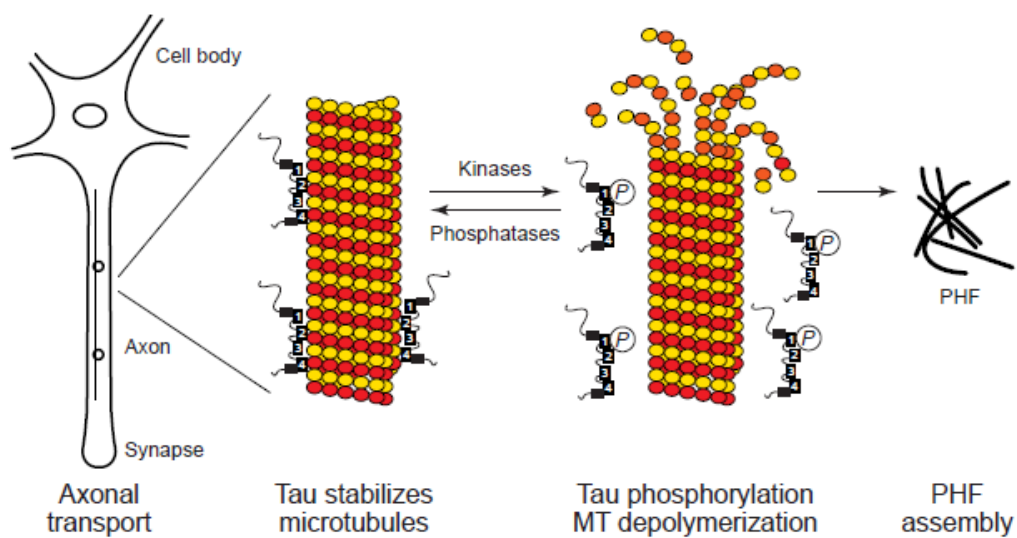
Otra cuestión fundamental se refiere al progreso y malignidad de la enfermedad en los modelos animales. En estos modelos parece que hay una discrepancia entre el grado de severidad de la agregación de  $\beta$ A, y el limitado daño cognitivo. Esto apunta de nuevo a la existencia de factores adicionales, que se producen en los seres humanos y no están presentes en los ratones transgénicos.<sup>59</sup>

Otras limitaciones importantes de la HCA son que las agregaciones proteicas SPs y ONFs se pueden desarrollar de forma independientemente, y pueden ser los productos en lugar de las causas de la neurodegeneración en la EA.

**I.3.6. Proteína tau.** Los ONFs, como marcadores histopatológicos de la EA, son inclusiones filamentosas en células neuronales que no sólo se dan en la EA, sino que aparecen en otros tipos de trastornos neurodegenerativos, denominados tauopatías,<sup>48</sup> y cuyo incremento es un marcador patológico de la gravedad de la EA.



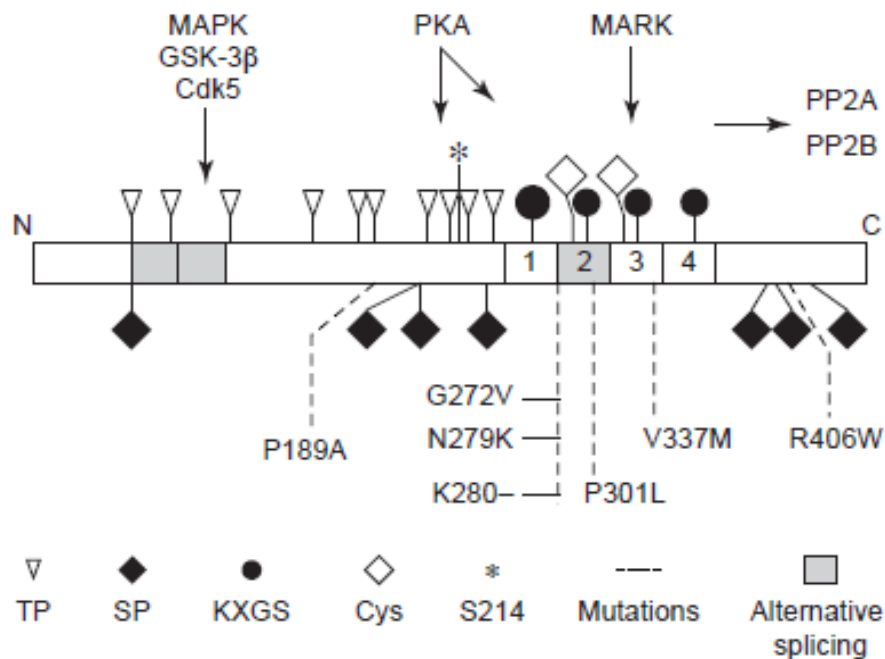
**Figura 14.** Estructura y función de la proteína tau (Henry, W.; Querfurth, F. L. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *4*, 329–344).



**Figura 15.** Modelo que muestra la relación entre el transporte axonal, los microtúbulos y la proteína tau en la EA (Mandelkow, E. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 425–427).

El principal componente de los ONFs es un agregado de proteína tau anormalmente hiperfosforilada. Normalmente, esta proteína que tiene como función estabilizar microtúbulos, que sirven como vías internas de comunicación, por donde circulan los transportadores vesiculares, y los distintos nutrientes esenciales para el buen funcionamiento interno de la neurona. La proteína tau hiperfosforilada se separa de los microtúbulos causando daños en dichas vías, y los filamentos helicoidales de estas proteínas anormales se combinan, formando agregados proteicos, los ONFs, dentro de la célula neuronal, que afectan al sistema de transporte, desestabilizan el citoesqueleto neuronal y, por ende, destruyen la neurona<sup>48</sup> (Figura 14).

La unión de la proteína tau a los microtúbulos está controlada por un equilibrio dinámico entre la proteína quinasa y la proteína fosfatasa. Estas son dos enzimas que introducen o eliminan grupos fosfatos en la proteína tau.<sup>64</sup> En condiciones patológicas se produce un desequilibrio entre estas enzimas provocando la hiperfosforilación de la proteína tau<sup>64,65</sup> (Figura 15).



**Figura 16.** Diagrama de la proteína tau, sus dominios, sitios de fosforilación y mutación (Mandelkow, E. *Trends Cell Biol.* **1998**, 8, 425–427).

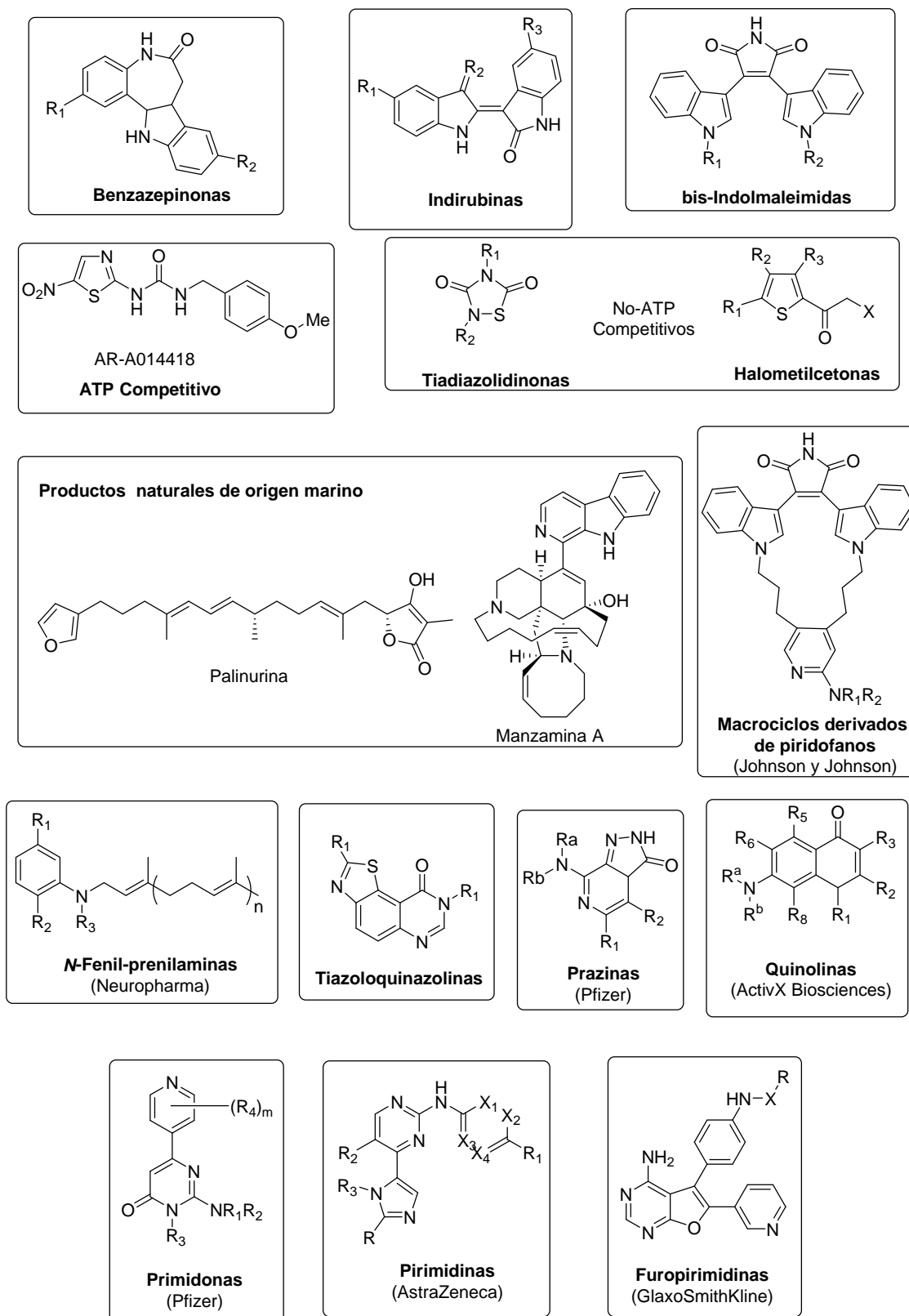
Un solo gen codifica la proteína tau, que puede generar seis isoformas, de 352 a 441 residuos de aminoácidos. La proteína tau contiene un dominio *N*-terminal, un

dominio básico rico en prolina, un dominio básico que contiene de tres a cuatro repeticiones, y un dominio C-terminal. La proteína tau se puede fosforilar en múltiples sitios, algunos de los cuales están regulando la unión de la proteína con los microtúbulos.<sup>65</sup> Estos sitios se dividen en dos clases: los motivos ricos en serina-prolina y treonina-prolina, que están presentes en ambas regiones flanqueando las repeticiones internas, que se pueden fosforilar por quinasas dirigidas por prolina, tales como la GSK3 y la CDK5 (Figura 16).<sup>65</sup> Éstas son una subclase de proteínas serina-treonina quinasas que fosforilan proteínas sobre residuos de serina o treonina que están inmediatamente precedidos por residuos de prolina.

Cuando se aislaron las quinasas responsables de la hiperfosforilación de la proteína tau se identificaron TPKI y TPKII. Después de la clonación de TPKI, se encontró que era GSK3, y que TPKII era la quinasa dependiente de ciclina5 (CDK5) más el fragmento proteico p25. Recientemente, se ha comprobado que hay una sobreexpresión de GSK3 en los cerebros de pacientes con EA, y como es una quinasa que regula el 95% de la fosforilación de la proteína tau, ha despertado, por tanto, un gran interés como diana terapéutica para el tratamiento de la EA.<sup>64</sup>

Así como los oligómeros  $\beta$ A, los agregados intermedios de proteínas tau anormales son citotóxicos y parecen afectar la capacidad cognitiva. El aumento de los niveles de proteína tau fosforilada, y el total de proteína tau en el líquido cefalorraquídeo, correlaciona con puntuaciones bajas en los tests cognitivos. Los niveles elevados de aminoácidos fosforilados, T181, T231 y proteína tau total en el fluido cefalorraquídeo constituyen un biomarcador, con buena precisión para predecir el inicio de la EA. La evidencia experimental indica que la acumulación de  $\beta$ A precede y conduce a la agregación de tau. Además, la degeneración inducida por depósitos  $\beta$ A sobre cultivos de neuronas y déficits cognitivos en ratones modelos de la EA requieren la presencia de proteína tau endógena.

A raíz del descubrimiento de la estructura cristalina de GSK3 $\beta$ <sup>66</sup> se han aplicado técnicas de diseño racional de sus inhibidores, basados en la estructura, incluyendo cribado virtual<sup>67</sup> (Figura 17). Los primeros grupos de inhibidores de GSK3 fueron las paullonas, como la palinurina, productos naturales con esqueleto de benzazepinona (Figura 17),<sup>68</sup> las indirubinas (Figura 17),<sup>69</sup> o las bis-indolmaleimidias (Figura 17),<sup>70</sup> descubiertos en un programa de cribado.<sup>67</sup> La principal desventaja de este primer grupo de inhibidores de GSK3 era su falta de selectividad y competitividad con ATP por el

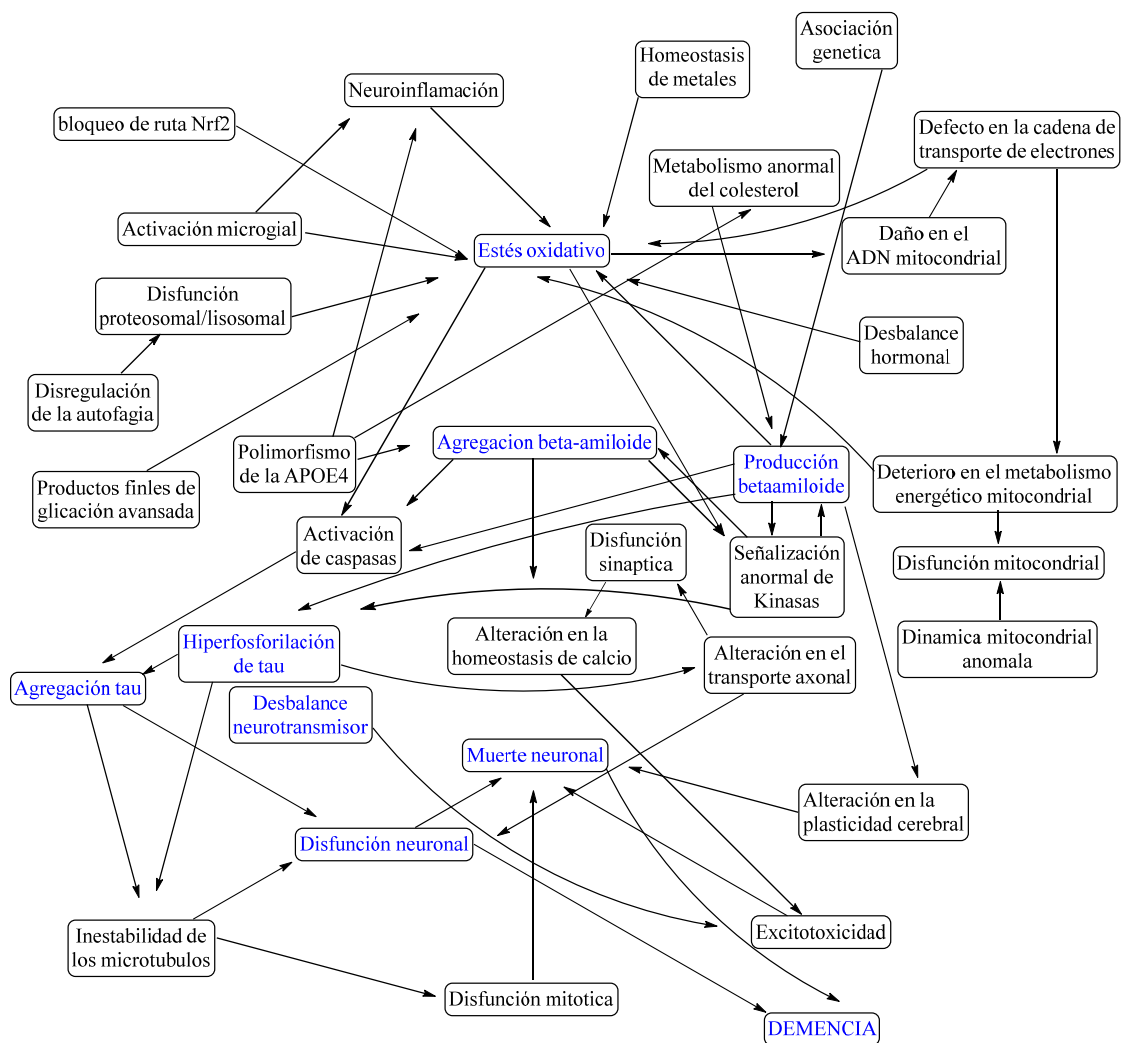


**Figura 17.** Inhibidores de GSK-3 (Martínez, A.; Pérez, D. *J. Alzheimer's Dis.* **2008**, *15*, 181-191).

sitio de unión. Además de la inhibición de GSK3, estos compuestos fueron capaces de inhibir otras quinasas tales como CDK1 o CDK2.<sup>67</sup> Por otra parte, pequeñas moléculas

como los aminotiazoles (AR-A014418) (Figura 17) se presentaban como potentes y selectivos inhibidores de GSK3 del tipo ATP-competitivo.<sup>67</sup> Otro grupo son los inhibidores de GSK3, ATP-no competitivos, como las tiadiazolidinonas, y halometilketonas (Figura 17).<sup>67</sup>

En suma, la inhibición de GSK-3 se han convertido en una pieza más del puzzle que controla la patogénesis de la EA, no sólo porque se conoce su efecto sobre la fosforilación de la proteína tau, sino porque también parece estar relacionada con la formación de  $\beta$ A, el incremento de su neurotoxicidad y otros procesos que llevan finalmente a la muerte neuronal.



**Figura 18.** Correlación de los mecanismos involucrados en la patogénesis de EA. Los principales mecanismos están remarcados en azul (Anand, R., Gill, K. D.; Mahdi, A. *Neuropharmacology* **2014**, 76, 27–50).

**I.3.7. Coexistencia de múltiples mecanismos.** La etiología de la EA es multifactorial implicando varios mecanismos biomoleculares, tales como la agregación anómala de proteínas, la disminución de algunos neurotransmisores, el estrés oxidativo (EO) crónico, los procesos inflamatorios, la disfunción mitocondrial, el desequilibrio hormonal, la disfunción en la homeostasis de algunos metales y factores genéticos. En general, todos estos procesos juegan un papel importante en la fisiopatología de la EA, y finalmente conllevan a la muerte neuronal (Figura 18).<sup>71</sup> Existe un consenso generalizado de que estos mecanismos coexisten unos con otros en múltiples niveles.

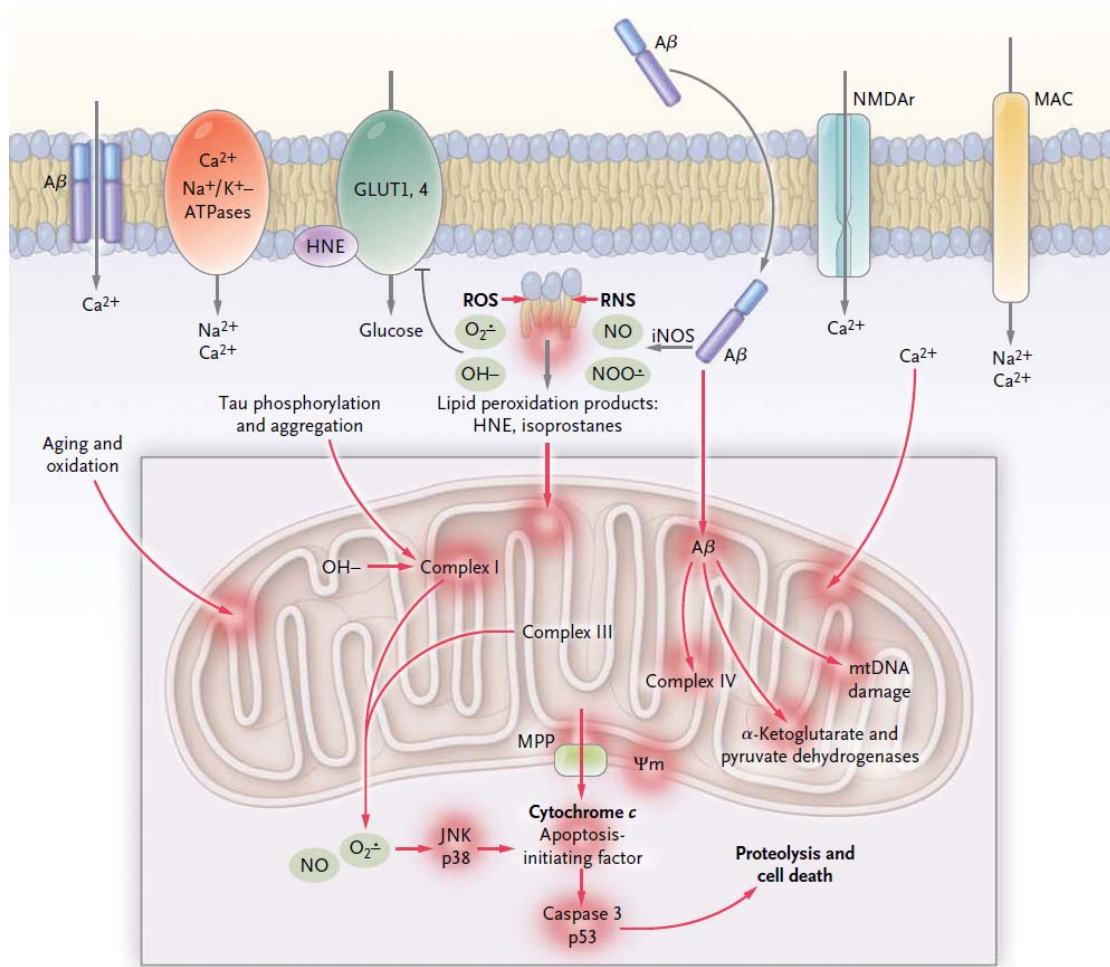
El EO juega un papel importante a la hora de articular este complejo sistema de interacciones.<sup>72</sup> La evidencia experimental indica que un deterioro de los sistema redox participa fuertemente en etapas tempranas de la EA, induciendo y activando múltiples vías de señalización celular, que contribuyen a la progresión inicial del proceso neurodegenerativo. En efecto, hay indicios, de que la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) actúan en los procesos neurodegenerativos de la EA.<sup>72</sup>

Por otro lado, la disfunción genética, la exposición ambiental, el envejecimiento, los efectos secundarios de fármacos, y una dieta incorrecta son algunos de los factores que pueden afectar al buen funcionamiento de la homeostasis de biometales, esenciales en los sistemas biológicos, y producir deterioro y neurotoxicidad.<sup>5</sup> Un aumento en la concentración de metales como Fe y Cu, produciría una hipermetalación de proteínas esenciales, que son transportadores de electrones, como la citocromo C oxidasa (esencial para los procesos mitocondriales), la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa (enzimas claves en el ciclo de Krebs). En particular, la citocromo C oxidasa se inhibe por  $\beta$ A.<sup>5,6,48</sup>

Todos estos factores perturban el buen funcionamiento de las enzimas anteriormente mencionadas, desestabilizando el transporte de electrones, la producción de ATP, el consumo de oxígeno y la producción de ERO y ERN, provocando considerable EO. La probabilidad de la implicación del EO en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas se apoya en el hecho de que las neuronas son extremadamente sensibles a los ataques de los radicales libres, como consecuencia de su bajo contenido de glutatión, la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas, y que el metabolismo cerebral requiere cantidades sustanciales de oxígeno.<sup>73-75</sup> Además, se encontró que había alteraciones en los niveles de enzimas



antioxidantes en el cerebro de pacientes con EA.<sup>76</sup> Todos estos datos soportan la hipótesis del EO de la EA.

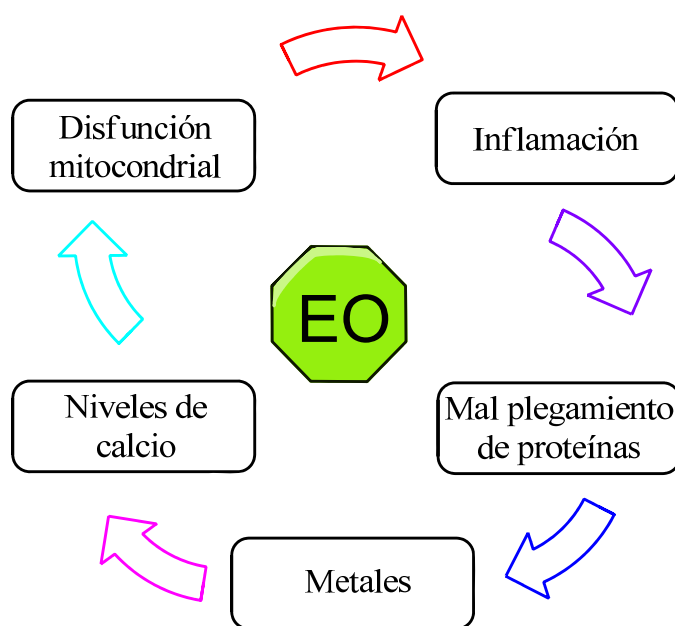


**Figura 19.** EO y fallo mitocondrial (Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. *New England Journal of Medicine* **2010**, 362, 329-344).

En la figura 19 se representa el esquema de la peroxidación lipídica por parte de las ERO y ERN en los lípidos de membranas y organelos celulares, que producen toxinas mitocondriales como hidroxinonenal y malondialdehído. El daño oxidativo daña los receptores de membrana como las ATPasas selectiva a iones, la estimulación de los mecanismos de entrada de Ca<sup>2+</sup>, los receptores de glutamato [(N-metil-D-aspartato (NMDA)], a los complejos de membrana, y a la formación de poros de βA selectivo a iones. Los productos de la peroxidación de lípidos también promueven la fosforilación anómala de la proteína tau y su agregación, que a su vez inhibe el complejo I. Cantidades exageradas de ERO y ERN se generan en los complejos I y III, por lo que el potencial de membrana mitocondrial colapsa y los poros de transmisión de

permeabilidad se abren, activando caspasas, proteínas de la familia de las cisteín-proteasas, mediadores esenciales en los procesos de apoptosis celular y la regulación de los mecanismos de la inflamación.<sup>48</sup>

En resumen, en la EA hay interconexiones establecidas entre el EO y otros eventos claves en la EA, lo cual amplifica la complejidad de la patología. (Figura 20).<sup>72</sup>



**Figura 20.** Interconexión entre el EO y otros agentes claves involucrados en la EA (Rosini, M. et al. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 2821-2831).

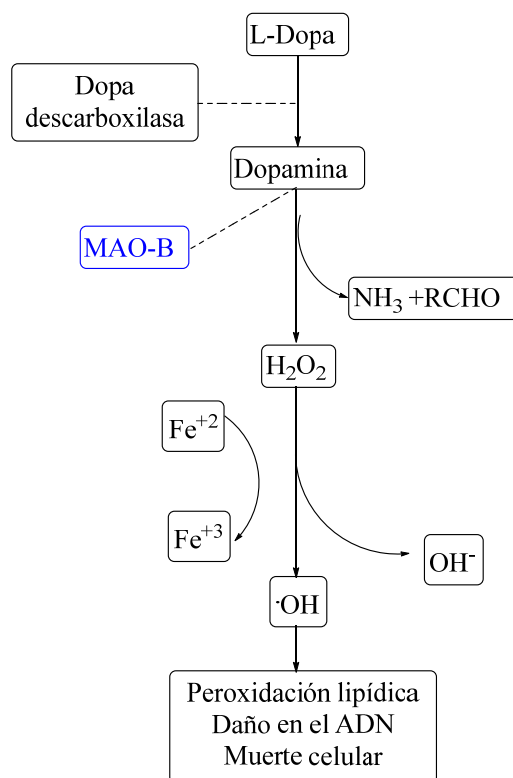
### **I.3.8. Inhibición de monoamino oxidasas (MAO'S) en la enfermedad de Alzheimer.**

Actualmente los IChE son los únicos fármacos aprobados para el tratamiento de la disfunción cognitiva en la EA, con limitaciones, aunque el beneficio sea transitorio y no contrarresta su progreso.<sup>77</sup>

Entre los potenciales fármacos que actualmente están en ensayos clínicos se encuentran agentes anti-inflamatorios no esteroideos, que parecen presentar un efecto neuroprotector;<sup>78</sup> los estrógenos,<sup>79,80</sup> los inhibidores de la producción y agregación de  $\beta A$ ,<sup>11,81,82,83,84</sup> los antagonistas de APOE4, antioxidantes y los inhibidores de monoamino oxidasa B (MAO B).

Los inhibidores de MAO B (IMAO B) han mostrado ser efectivos en el tratamiento de la EP, y pudieran serlo probablemente en la EA. De hecho, estos compuestos tienen efectos neuroprotectores, tanto en tejido vascular como neuronal.

Las ERO parecen jugar un papel importante en la cascada fisiopatológica de la EA. Los radicales oxigenados son especies químicamente inestables y altamente reactivas que se forman durante el metabolismo celular. Debido a su alta reactividad, pueden ser responsables de daño celular, por lo que la generación de ERO puede exceder la capacidad del organismo para destruirlos de forma endógena, condición conocida como EO.<sup>72,73,75,85</sup>



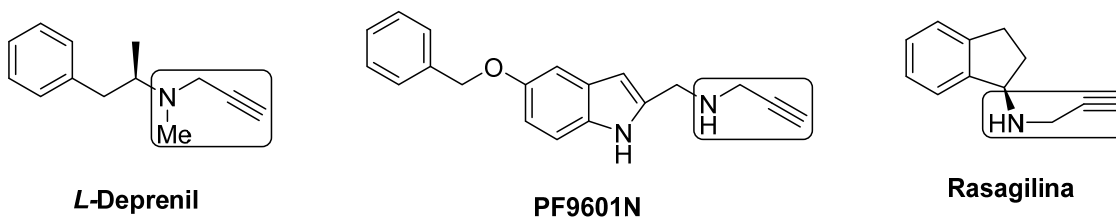
**Figura 21.** Correlación entre MAO B, la producción de ERO y el EO (Riederer, P.; Danielczyk, W.; Grünblatt, E. *NeuroToxicol.* **2004**, 25, 271-277).

Hay muchas proteínas y enzimas involucradas en el mecanismo del EO. Unas de ellas son las MAO, enzimas localizadas en la membrana externa de la mitocondria que son las responsables de catalizar la desaminación oxidativa de aminas neurotransmisoras y neuromoduladoras (noradrenalina, dopamina, serotonina y  $\beta$ -feniletilamina) y monoaminas bioactivas exógenas. Existen dos isoformas de MAO, la MAO A y MAO B, codificadas por dos genes, con diferentes patrones de distribución en tejidos y con diferente especificidad de sustrato e inhibidores,<sup>86</sup> y además, constituyen alrededor del 80% de la actividad total de la MAO en el cerebro humano y es la forma predominante de la enzima en el cuerpo estriado.<sup>87</sup> MAO A desamina

preferentemente serotonina y se inhibe con clorgilina. MAO B desamina preferentemente  $\beta$ -feniletilamina y es inhibida con selegilina (*l*-deprenil). Los IMAO A han demostrado ser eficaces antidepresivos, mientras que los IMAO B se están utilizando en el tratamiento de la EP.

Durante su actividad catalítica, se produce  $H_2O_2$  (Figura 21), como producto de la desaminación de las aminas endógenas, por lo que se puede crear un desequilibrio de ERO, las cuales por su alta reactividad pueden producir peroxidación en lípidos, daño en el ADN y muerte celular.<sup>85</sup> Por otro lado, es conocido el incremento en la actividad de MAO B en el cerebro y en plaquetas sanguíneas de pacientes con EA y EP.<sup>85,88</sup>

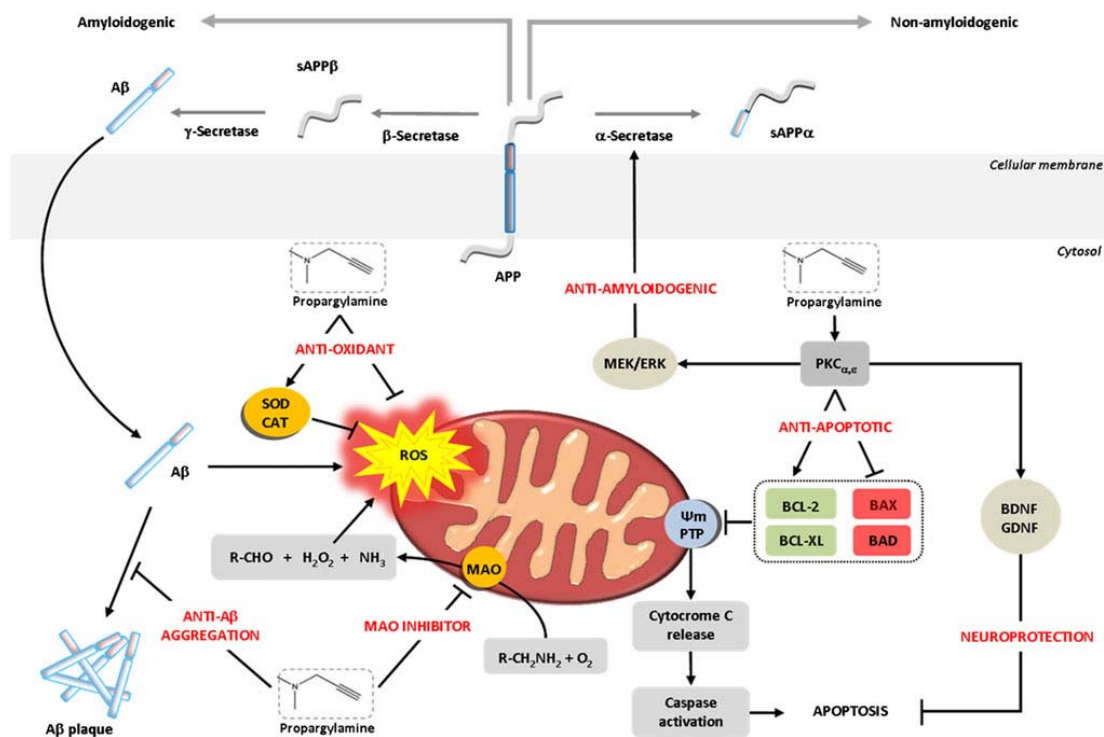
En la actualidad, compuestos derivados de propargilaminas se están estudiando por su efecto neuroprotector y su potencial terapéutico en la EA. El efecto neuroprotector de estos IMAO's se deriva de la disminución de ERO, de aldehídos tóxicos, y por otra, del incremento en la concentración de aminas neurotransmisoras como la dopamina y la serotonina, entre otras, fortaleciendo de esta forma las vías dopaminérgicas y serotoninérgicas. Adicionalmente, estos IMAO's presentan propiedades anti-apoptóticas.<sup>89,90</sup> Entre las propargilaminas como IMAO B irreversibles se encuentra selegilina (*l*-deprenil), rasagilina y PF9601N (Figura 22). Selegilina (*l*-deprenil) fue de los primeros IMAO B utilizados en clínica, mientras que la rasagilina y el PF9601N pertenecen a una segunda generación de inhibidores, que no generan anfetaminas como metabolitos secundarios.<sup>89,91,92</sup>



**Figura 22.** Algunas propargilaminas como IMAO's (Bolea, I.; Gella, A.; Unzeta, M. *J. Neural Transmission* **2013**, *120*, 893-902).

Diversos mecanismos se han postulado para explicar el efecto neuroprotector de las propargilaminas (Figura 23). Uno de estos mecanismos involucra el aumento significativo de la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y de la enzima catalasa (CAT),<sup>89,93</sup> que además de la inhibición de MAO disminuyen la formación de ERO, y por tanto contribuyen a la disminución del EO. Por

otra parte, el mecanismo que explica la actividad anti-apoptótica se atribuye a la prevención de la caída del potencial de membrana mitocondrial y del bloqueo de los poros de transmisión, los cuales activan caspasas, encargadas de estimular la muerte celular por apoptosis.<sup>48,89,94</sup> Además, todos estos mecanismos pueden estar implicados en el aumento de la liberación de  $\alpha$ -secretasa, involucrada en la producción de la forma soluble de sAPP $\alpha$  y por ende favorece la formación de fragmentos  $\beta$ A solubles, de manera que se reduce la formación de PS.<sup>89,95</sup>



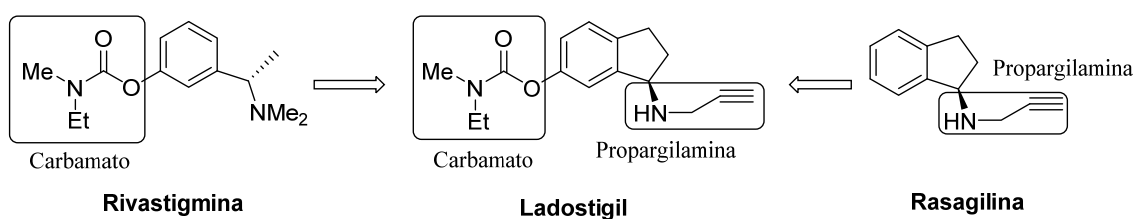
**Figura 23.** Representación esquemática de los sitios de acción donde interaccionan las aminas propargílicas, como potenciales fármacos para la EA (Bolea, I.; Gella, A.; Unzeta, M. *J. Neural Transmission* **2013**, *120*, 893-902).

Anteriormente se comentó la importancia que tenían los IMAO's en los sistemas de transmisión monoaminérgicos, y el dopaminérgico, que en particular se ha correlacionado con la incidencia de la depresión en pacientes con EA.<sup>89,96,97</sup> Curiosamente, las PS y los NFT son más pronunciados en el hipocampo de pacientes con EA a los que se les diagnosticó depresión, comparados con los que no sufrían este trastorno psiquiátrico.<sup>89,97</sup> En efecto, es sabido que la depresión puede ser uno de los tantos factores de riesgo en la EA.<sup>89,97</sup> Todos estos datos sugieren, pues, que es

preferible la inhibición dual, tanto de MAO A como de MAO B, que sólo la inhibición de MAO B, para el diseño de potenciales fármacos para la EA.<sup>77,89</sup>

**I.3.9. Nuevas terapias para la enfermedad de Alzheimer: Estrategia fármacos multipotentes.** Las aproximaciones terapéuticas que se han desarrollado hasta ahora para el tratamiento de la EA no han sido efectivas. El fracaso, pues, de las terapias muy selectivas y dirigidas a bloquear o interactuar con un receptor o sistema enzimático específico (las llamadas *balas mágicas*), se debe sin duda al carácter multifactorial y extremadamente complejo de la EA. Esta evidencia está en el origen del desarrollo de lo que se ha denominado *moléculas sucias*, es decir, fármacos no selectivos y poco potentes, pero capaces de interactuar simultáneamente con diferentes receptores implicados en la EA. Esta aproximación terapéutica es la que se conoce en la literatura anglosajona como estrategia *Multi-Target-Directed-Ligand* (MTDL)<sup>9</sup> o, más sencillamente, la que aboga por el I+D de *fármacos multipotentes*.

Una estrategia para el diseño de MTDL se basa en la yuxtaposición de diferentes farmacóforos, procedentes de diversas moléculas de referencia, de la que surgiría una molécula híbrida, de forma que cada farmacóforo retenga su capacidad para actuar específicamente, y producir la respuesta farmacológica deseada, o generar un efecto sinérgico fruto de la combinación de estos componentes activos.

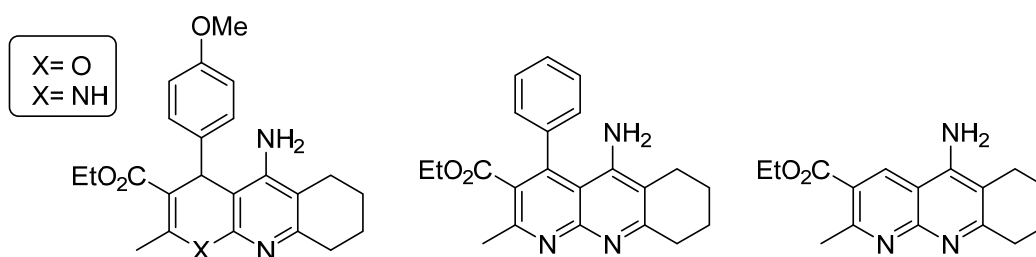


**Figura 24.** Estructura de ladostigil, como híbrido entre rivastigmina y rasagilina.

Siguiendo la estrategia MTDL, y en el contexto del desarrollo de moléculas multipotentes capaces de inhibir simultáneamente las enzimas MAO y ChEs, se diseñó ladostigil (Figura 24).<sup>98</sup> Este compuesto surgió de la combinación del grupo *carbamato* de rivastigmina con el motivo *propargilamina* de rasagilina,<sup>99</sup> conectados entre sí y sustituyendo al motivo indano (Figura 24). Ladostigil es capaz de inhibir, tanto AChE, como BuChE por más largo tiempo que su referente rivastigmina, y por otro, es un inhibidor irreversible y selectivo de MAO B. Ladostigil es un agente neuroprotector,

anti-apoptótico, reductor del EO e inhibidor de citokinas proinflamatorias.<sup>100</sup> Ladostigil, sin embargo, no cumplió los objetivos finales en un ensayo de fase II a finales del 2012 para la EA. Actualmente está en las etapas finales de un ensayo aleatorio doble ciego contra el deterioro cognitivo leve (<http://www.avphar.com/ladostigil/background>).

### I.3.10. Breve resumen de las contribuciones de nuestro grupo de trabajo al desarrollo de nuevos fármacos para el posible tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

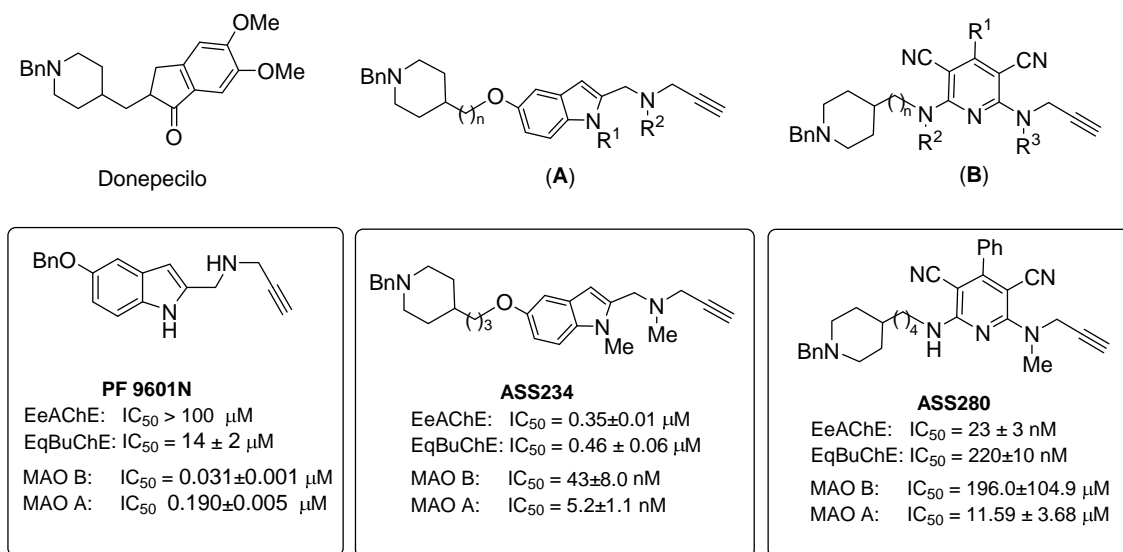


**Figura 25.** Análogos de tacrina desarrollados en nuestro equipo.

En el laboratorio de Química Médica (Instituto de Química Orgánica General, CSIC), desde 1996, se ha venido investigando en el desarrollo de compuestos multipotentes para la EA, teniendo como diana, por un lado, la capacidad para inhibir las ChEs y, por otro, el antagonismo de  $\text{Ca}^{+2}$ . En ese proyecto se identificaron los compuestos de la figura 25, que han mostrado los mejores valores de inhibición y selectividad AChE/BuChE, bloqueando además canales de  $\text{Ca}^{+2}$  voltaje dependientes, y actuando como neuroprotectores frente a radicales libres oxigenados.<sup>101,102</sup> Estas moléculas proceden de un análisis muy simple, como fue la idea de que la sustitución del anillo de benceno en tacrina por otro, semiinsaturado de 4*H*-pirano, de 1,4-dihidropiridina, o de piridina, convenientemente funcionalizados, debería preservar la potencia anti-colinesterásica, y mejorar o potenciar otros aspectos colaterales de la farmacología de tacrina, resultando en compuestos análogos de potencial interés terapéutico, pero libres tal vez de los efectos secundarios, principalmente la toxicidad en hígado, que la han retirado de la clínica en los años 90.<sup>103</sup>

Más recientemente, y perseverando en la estrategia fármacos multipotentes para la EA, se han desarrollado compuestos multipotentes, que responden a la estructura general del tipo A y B, siendo las moléculas ASS234<sup>104</sup> y ASS280<sup>105</sup> (Figura 26) las

más interesantes, y que han servido de referencia para el diseño y selección de las moléculas de la presente Tesis Doctoral.



**Figura 26.** Moléculas multipotentes como IMAO/IChe, desarrollados en el equipo del Dr. Marco-Contelles.

Estas moléculas son capaces de inhibir las enzimas MAO y ChEs, en base a la utilización extensiva y sistemática del fragmento *N*-bencilpiperidinio presente en donepezilo como IACHe de referencia, y de derivados propargílicos como PF9601N (Figura 26), un potente y selectivo IMAO B, desarrollado en nuestro laboratorio, que ha mostrado capacidad inhibitoria sobre la recaptación de dopamina en caudado humano con una potencia similar a la de *l*-deprenyl.<sup>106</sup>

### I.3.11. Referencias

1. Bredesen, D. E.; Rao, R. V.; Mehlen, P. Cell death in the nervous system, *Nature* **2006**, *443*, 796-802.
2. Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 347-372.
3. Lansbury, P. T.; Lashuel, H. A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic, *Nature* **2006**, *443*, 774-779.
4. Lin, M. T.; Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature* **2006**, *443*, 787-795.



5. Zatta, P.; Drago, D.; Bolognin, S.; Sensi, S. L. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy, *Trends in Pharmacological Sciences* **2009**, *30*, 346-355.
6. Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 205-214.
7. Association, A. s. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2011, *7*, 208-244.
8. Clarfield, A. M. Reversible dementia—the implications of a fall in prevalence. *Age and Ageing* **2005**, *34*, 544-545.
9. Pievani, M.; de Haan, W.; Wu, T.; Seeley, W. W.; Frisoni, G. B. Functional network disruption in the degenerative dementias, *The Lancet Neurology* **2011**, *10*, 829-843.
10. Selkoe, D. J. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy, *Physiological Reviews* **2001**, *81*, 741-766.
11. Haass, C.; Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid [beta]-peptide, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101-112.
12. Koffie, R. M.; Hashimoto, T.; Tai, H.-C.; Kay, K. R.; Serrano-Pozo, A.; Joyner, D.; Hou, S.; Kopeikina, K. J.; Frosch, M. P.; Lee, V. M.; Holtzman, D. M.; Hyman, B. T.; Spire-Jones, T. L. Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid- $\beta$ , *Brain* **2012**, *135*, 2155-2168.
13. Wimo, A.; Prince, M. The global economic impact of dementia. 1-9 (Alzheimer disease international, UK, 2010).
14. Prince, M.; Prina, M.; Guerchet, M. Journey of Caring An analysis of long-term care for dementia. 1-88 (Alzheimer's disease international, UK, 2013).
15. Goedert, M.; Spillantini, M. G. A. Century of Alzheimer's Disease, *Science* **2006**, *314*, 777-781.
16. Cummings, J. L. Treatment of Alzheimer's disease: current and future therapeutic approaches, *Reviews in neurological diseases* **2004**, *1*, 60-69.
17. Castro, A.; Martínez, A. Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors, *Curr. Pharm. Design* **2006**, *12*, 4377-4387.
18. Scarpini, E.; Schelterns, P.; Feldman, H. Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives, *The Lancet Neurology* **2003**, *2*, 539-547.
19. Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **1999**, *66*, 137-147.
20. Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Pontecorvo, M. J.; Flicker, C. The Cholinergic Hypothesis: A Historical Overview, Current Perspective, and Future Directions, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1985**, *444*, 332-358.
21. González, A.; Flórez, J. en *Farmacología Humana* (ed S.A Masson) 213-227 (Masson, S.A, 1997).
22. Grünblatt, E.; Reif, A.; Jungwirth, S.; Galimberti, D.; Weber, H.; Scarpini, E.; Sauer, C.; Wichart, I.; Rainer, M. K.; Huber, K.; Danielczyk, W.; Tragl, K. H.; Deckert, J.; Fischer, P.; Riederer, P. Genetic variation in the choline O-acetyltransferase gene in depression and Alzheimer's disease: The VITA and Milano studies, *Journal of Psychiatric Research* **2011**, *45*, 1250-1256..
23. Dong, Z.; Fu, A. Prevention of age-related memory deficit in transgenic mice by human choline acetyltransferase, *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *683*, 174-178.

24. Rand, J. B. Acetylcholine. *WormBook : The online review of C. elegans biology*, **2007**, 1-21.
25. Claudio, T.; Ballivet, M.; Patrick, J.; Heinemann, S. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Torpedo californica acetylcholine receptor gamma subunit, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1983**, *80*, 1111-1115.
26. Ballivet, M.; Patrick, J.; Lee, J.; Heinemann, S. Molecular cloning of cDNA coding for the  $\gamma$  subunit of Torpedo acetylcholine receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1982**, *79*, 4466-4470.
27. Arneric, S. P.; Holladay, M.; Williams, M. Neuronal nicotinic receptors: A perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1092-1101.
28. Haga, K.; Kruse, A. C.; Asada, H.; Yurugi-Kobayashi, T.; Shiroishi, M.; Zhang, C.; Weis, W. I.; Okada, T.; Kobilka, B. K.; Haga, T.; Kobayashi, T. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist, *Nature* **2012**, *482*, 547-551.
29. Haga, K.; Haga, T.; Ichiyama, A.; Katada, T.; Kurose, H.; Ui, M. Functional reconstitution of purified muscarinic receptors and inhibitory guanine nucleotide regulatory protein, *Nature* **1985**, *316*, 731-733.
30. Kubo, T.; Fukuda, K.; Mikami, A.; Maeda, A.; Takahashi, H.; Mishina, M.; Haga, T.; Haga, K.; Ichiyama, A.; Kangawa, K.; Kojima, M.; Matsuo, H.; Hirose, T.; Numa, S. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor, *Nature* **1986**, *323*, 411-416.
31. Greenlee, W.; Clader, J.; Asberom, T.; McCombie, S.; Ford, J.; Guzik, H.; Kozlowski, J.; Li, S.; Liu, C.; Lowe, D.; Vice, S.; Zhao, H.; Zhou, G.; Billard, W.; Binch, H.; Crosby, R.; Duffy, R.; Lachowicz, J.; Coffin, V.; Watkins, R.; Ruperto, V.; Strader, C.; Taylor, L.; Cox, K. Muscarinic agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Il Farmaco* **2001**, *56*, 247-250.
32. Fisher, A. Muscarinic Receptor Agonists in Alzheimer's Disease. *Mol. Diag. Ther.* **1999**, *12*, 197-214.
33. Doods, H.; Entzeroth, M.; Ziegler, H.; Schiavi, G.; Engel, W.; Mihm, G.; Rudolf, K.; Eberlein, W. Characterization of BIBN 99: A lipophilic and selective muscarinic M2 receptor antagonist, *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *242*, 23-30.
34. Doods, H. N.; Quirion, R.; Mihm, G.; Engel, W.; Rudolf, K.; Entzeroth, M.; Schiavi, G. B.; Ladinsky, H.; Bechtel, W. D.; Ensinger, H. A.; Mendla, K. D.; Eberlein, W. Therapeutic potential of CNS-active M2 antagonists: Novel structures and pharmacology, *Life Sci.* **1993**, *52*, 497-503.
35. Clader, J. W.; Wang, Y. Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists in the Treatment of Alzheimer's Disease, *Curr. Pharm. Design* 2005, **11**, 3353-3361.
36. Kozlowski, J. A.; Lowe, D. B.; Guzik, H. S.; Zhou, G.; Ruperto, V. B.; Duffy, R. A.; McQuade, R.; Crosby Jr, G.; Taylor, L. A.; Billard, W.; Binch Iii, H.; Lachowicz, J. E. Diphenyl sulfoxides as selective antagonists of the muscarinic M2 receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2255-2257.
37. Clader, J. W.; Billard, W.; Binch Iii, H.; Chen, L.-Y.; Crosby Jr, G.; Duffy, R. A.; Ford, J.; Kozlowski, J. A.; Lachowicz, J. E.; Li, S.; Liu, C.; McCombie, S. W.; Vice, S.; Zhou, G.; Greenlee, W. J. Muscarinic M2 antagonists:

- anthranilamide derivatives with exceptional selectivity and in vivo activity, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 319-326.
38. Sussman, J.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Science* **1991**, *253*, 872-879.
  39. Sussman, J. L.; Harel, M.; Silman, I. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs, *Chemico-Biological Interactions* **1993**, *87*, 187-197.
  40. de los Ríos, C. Cholinesterase inhibitors: a patent review (2007-2011), *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2012**, *22*, 853-869.
  41. Summers, W. K.; Majovski, L. V.; Marsh, G. M.; Tachiki, K.; Kling, A. Oral Tetrahydroaminoacridine in Long-Term Treatment of Senile Dementia, Alzheimer Type, *New England Journal of Medicine* **1986**, *315*, 1241-1245.
  42. Davis, K. L.; Powchick, P. Tacrine. *The Lancet* **1995**, *345*, 625-630.
  43. Spencer, C. M.; Noble, S. Rivastigmine. A review of its use in Alzheimer's disease, *Drugs and Aging* **1998**, *13*, 391-411.
  44. Barner, E. L.; Gray, S. L. Donepezil use in Alzheimer disease, *Annals of Pharmacotherapy* **1998**, *32*, 70-77.
  45. Sramek, J. J.; Frackiewicz, E. J.; Cutler, N. R. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine, *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2000**, *9*, 2393-2402.
  46. Reitz, C. Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: A Critical Review. *International Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, *2012*, 1-11.
  47. Bolea, I. *Study of new propargylamine and donepezil-derived compounds as multitarget agents for the treatment of alzheimer's diseases*, Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Barcelona (2011).
  48. Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **2010**, *362*, 329-344.
  49. Glabe, C. G. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiology of Aging* **2006**, *27*, 570-575.
  50. Bishop, N. A.; Lu, T.; Yankner, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* **2010**, *464*, 529-535.
  51. Chartier-Harlin, M.-C.; Crawford, F.; Houlden, H.; Warren, A.; Hughes, D.; Fidani, L.; Goate, A.; Rossor, M.; Roques, P.; Hardy, J.; Mullan, M. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the [beta]-amyloid precursor protein gene, *Nature* **1991**, *353*, 844-846.
  52. Goate, A.; Chartier-Harlin, M.-C.; Mullan, M.; Brown, J.; Crawford, F.; Fidani, L.; Giuffra, L.; Haynes, A.; Irving, N.; James, L.; Mant, R.; Newton, P.; Rooke, K.; Roques, P.; Talbot, C.; Pericak-Vance, M.; Roses, A.; Williamson, R.; Rossor, M.; Owen, M.; Hardy, J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease, *Nature* **1991**, *349*, 704-706.
  53. Levy-Lahad, E.; Wijsman, E.; Nemens, E.; Anderson, L.; Goddard, K.; Weber, J.; Bird, T.; Schellenberg, G. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1, *Science* **1995**, *269*, 970-973.
  54. Sherrington, R.; Rogaev, E. I.; Liang, Y.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Chi, H.; Lin, C.; Li, G.; Holman, K.; Tsuda, T.; Mar, L.; Foncin, J. F.; Bruni, A. C.; Montesi, M. P.; Sorbi, S.; Rainero, I.; Pinessi, L.; Nee, L.;

- Chumakov, I.; Pollen, D.; Brookes, A.; Sanseau, P.; Polinsky, R. J.; Wasco, W.; Da Silva, H. A. R.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A.; Tanzi, R. E.; Roses, A. D.; Fraser, P. E.; Rommens, J. M.; St George-Hyslop, P. H. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease, *Nature* **1995**, *375*, 754-760.
55. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid/beta-protein, *Journal of Alzheimer's Disease* **2001**, *3*, 75-80.
56. Corder, E.; Saunders, A.; Strittmatter, W.; Schmechel, D.; Gaskell, P.; Small, G.; Roses, A.; Haines, J.; Pericak-Vance, M. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science* **1993**, *261*, 921-923.
57. Hardy, J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease, *Trends in Neurosciences* **1997**, *20*, 154-159.
58. Hardy, J. Has the Amyloid Cascade Hypothesis for Alzheimer's Disease been Proved? *Current Alzheimer Research* **2006**, *3*, 71-73.
59. Korczyn, A. D. The amyloid cascade hypothesis, *Alzheimer's & Dementia* **2008**, *4*, 176-178.
60. Qu, B.; Boyer, P. J.; Johnston, S. A.; Hynan, L. S.; Rosenberg, R. N. A $\beta$ 42 gene vaccination reduces brain amyloid plaque burden in transgenic mice, *Journal of the Neurological Sciences* **2006**, *244*, 151-158.
61. Mor, F.; Monsonogo, A. Immunization therapy in Alzheimer's disease, *Expert Review of Neurotherapeutics* **2006**, *6*, 653-659.
62. Brendza, R. P.; Holtzman, D. M. Amyloid- $\beta$  Immunotherapies in Mice and Men, *Alzheimer Disease & Associated Disorders* **2006**, *20*, 118-12.
63. Archer, H. A.; Edison, P.; Brooks, D. J.; Barnes, J.; Frost, C.; Yeatman, T.; Fox, N. C.; Rossor, M. N. Amyloid load and cerebral atrophy in Alzheimer's disease: An 11C-PIB positron emission tomography study, *Annals of Neurology* **2006**, *60*, 145-147.
64. Martínez-Gil, A. *El Alzheimer* (CSIC, 2009).
65. Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. Tau in Alzheimer's disease, *Trends in Cell Biology* **1998**, *8*, 425-427.
66. Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, S. M.; Young, N.; Good, V.; Dale, T. C.; Pearl, L. H. Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ : Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition, *Cell* **2001**, *105*, 721-732.
67. Martínez, A.; Pérez, D. I. GSK-3 Inhibitors: A Ray of Hope for the Treatment of Alzheimer's Disease? *Journal of Alzheimer's Disease* **2008**, *15*, 181-191.
68. Leost, M.; Schultz, C.; Link, A.; Wu, Y.-Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Bibb, J. A.; Snyder, G. L.; Greengard, P.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Senderowicz, A. M.; Sausville, E. A.; Kunick, C.; Meijer, L. Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and cyclin-dependent kinase 5/p25, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5983-5994.
69. Leclerc, S.; Garnier, M.; Hoessel, R.; Marko, D.; Bibb, J. A.; Snyder, G. L.; Greengard, P.; Biernat, J.; Wu, Y.-Z.; Mandelkow, E.-M.; Eisenbrand, G.; Meijer, L. Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's

- Disease: A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitorS? *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 251-260.
70. Hers, I.; Tavaré, J. M.; Denton, R. M. The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity, *FEBS Lett.* **1999**, *460*, 433-436.
  71. Anand, R.; Gill, K. D.; Mahdi, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future, *Neuropharmacol.* **2014**, *76, Part A*, 27-50.
  72. Rosini, M.; Simoni, E.; Milelli, A.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Are We Connecting the Dots? *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2821-2831.
  73. Fukuda, M.; Kanou, F.; Shimada, N.; Sawabe, M.; Saito, Y.; Murayama, S.; Hashimoto, M.; Maruyama, N.; Ishigami, A. Elevated levels of 4-hydroxynonenal-histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease, *Biomed. Res.* **2009**, *30*, 227-233.
  74. Moreira, P. I.; Nunomura, A.; Nakamura, M.; Takeda, A.; Shenk, J. C.; Aliev, G.; Smith, M. A.; Perry, G. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, *44*, 1493-1505.
  75. Sultana, R.; Mecocci, P.; Mangialasche, F.; Cecchetti, R.; Baglioni, M.; Butterfield, D. A. Increased Protein and Lipid Oxidative Damage in Mitochondria Isolated from Lymphocytes from Patients with Alzheimer's Disease: Insights into the Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease and Initial Investigations into a Potential Biomarker for this Dementing Disorder, *Journal of Alzheimer's Disease* 2011, **24**, 77-84.
  76. Sultana, R.; Butterfield, D. A. Role of Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer's Disease, *Journal of Alzheimer's Disease* **2010**, *19*, 341-353.
  77. Thomas, T. Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimers disease, *Neurobiology of Aging* **2000**, *21*, 343-348.
  78. Sardi, F.; Fassina, L.; Venturini, L.; Inguscio, M.; Guerriero, F.; Rolfo, E.; Ricevuti, G. Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly, *Autoimmunity Rev.* **2011**, *11*, 149-153.
  79. Tang, M.-X.; Jacobs, D.; Stern, Y.; Marder, K.; Schofield, P.; Gurland, B.; Andrews, H.; Mayeux, R. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease, *The Lancet* **1996**, *348*, 429-432.
  80. Pike, C. J.; Carroll, J. C.; Rosario, E. R.; Barron, A. M. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease, *Frontiers in Neuroendocrinology* **2009**, *30*, 239-258.
  81. Ondrejcek, T.; Klyubin, I.; Hu, N.-W.; Barry, A.; Cullen, W.; Rowan, M. Alzheimer's Disease Amyloid  $\beta$ -Protein and Synaptic Function, *Neuromol. Med.* **2010**, *12*, 13-26.
  82. Klyubin, I.; Cullen, W.; Hu, N.-W.; Rowan, M. Alzheimer's disease Abeta assemblies mediating rapid disruption of synaptic plasticity and memory. *Mol. Brain* **2012**, *5*, 1-10.
  83. Larson, M.; Lesne, S. Soluble Abeta oligomer production and toxicity, *J. Neurochem.* **2012**, *120*, 125-139.
  84. Karran, E.; Mercken, M.; Strooper, B. D. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 698-712.
  85. Riederer, P.; Danielczyk, W.; Grünblatt, E. Monoamine Oxidase-B Inhibition in Alzheimer's Disease, *NeuroToxicology* **2004**, *25*, 271-277.

86. Johnston, J. P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue, *Biochem. Pharmacol.* **1968**, *17*, 1285-1297.
87. Riederer, P.; Youdim, M. B. H.; Rausch, W. D.; Birkmayer, W.; Jellinger, K.; Seemann, D. J. On the mode of action of L-deprenyl in the human central nervous system, *J. Neural Transmission* **1978**, *43*, 217-226.
88. Saura, J.; Andrés, N.; Andrade, C.; Ojuel, J.; Eriksson, K.; Mahy, N. Biphasic and Region-Specific MAO B Response to Aging in Normal Human Brain, *Neurobiology of Aging* **1997**, *18*, 497-507.
89. Bolea, I.; Gella, A.; Unzeta, M. Propargylamine-derived multitarget-directed ligands: fighting Alzheimer's disease with monoamine oxidase inhibitors, *J. Neural Transmission* **2013**, *120*, 893-902.
90. Tatton, W.; Chalmers-Redman, R.; Tatton, N. Neuroprotection by deprenyl and other propargylamines: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase rather than monoamine oxidase B, *J. Neural Transmission* **2003**, *110*, 509-515.
91. Chen, J. J.; Swope, D. M.; Dashtipour, K. Comprehensive review of rasagiline, a second-generation monoamine oxidase inhibitor, for the treatment of Parkinson's Disease, *Clinical Therapeutics* **2007**, *29*, 1825-1849.
92. Dragoni, S.; Materozzi, G.; Pessina, F.; Frosini, M.; Marco, J. L.; Unzeta, M.; Sgaragli, G.; Valoti, M. CYP-dependent metabolism of PF9601N, a new monoamine oxidase-B inhibitor, by C57BL/6 mouse and human liver microsomes, *J. Pharm. & Pharmacol. Sci.* **2007**, *10*, 473-485.
93. Carrillo, M. C.; Minami, C.; Kitani, K.; Maruyama, W.; Ohashi, K.; Yamamoto, T.; Naoi, M.; Kanai, S.; Youdim, M. B. H. Enhancing effect of rasagiline on superoxide dismutase and catalase activities in the dopaminergic system in the rat, *Life Sci.* **2000**, *67*, 577-585.
94. Perry, S. W.; Norman, J. P.; Barbieri, J.; Brown, E. B.; Gelbard, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide. *BioTechniques* **2011**, *50*, 98-115.
95. Youdim, M. H.; Weinstock, M. Molecular Basis of Neuroprotective Activities of Rasagiline and the Anti-Alzheimer Drug TV3326, *Cell Mol. Neurobiol.* **2001**, *21*, 555-573.
96. Dubois, B.; Feldman, H. H.; Jacova, C.; DeKosky, S. T.; Barberger-Gateau, P.; Cummings, J.; Delacourte, A.; Galasko, D.; Gauthier, S.; Jicha, G.; Meguro, K.; O'Brien, J.; Pasquier, F.; Robert, P.; Rossor, M.; Salloway, S.; Stern, Y.; Visser, P. J.; Scheltens, P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria, *The Lancet Neurology* **2007**, *6*, 734-746.
97. Caraci, F.; Copani, A.; Nicoletti, F.; Drago, F. Depression and Alzheimer's disease: Neurobiological links and common pharmacological targets, *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *626*, 64-71.
98. Fink, D. M.; Palermo, M. G.; Bores, G. M.; Huger, F. P.; Kurys, B. E.; Merriman, M. C.; Olsen, G. E.; Petko, W.; O'Malley, G. J. Imino 1,2,3,4-tetrahydrocyclopent[b]indole carbamates as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 625-630.
99. Sterling, J.; Herzig, Y.; Goren, T.; Finkelstein, N.; Lerner, D.; Goldenberg, W.; Miskolczi, I.; Molnar, S.; Rantal, F.; Tamas, T.; Toth, G.; Zagyva, A.; Zekany, A.; Lavian, G.; Gross, A.; Friedman, R.; Razin, M.; Huang, W.; Kraiss, B.; Chorev, M.; Youdim, M. B.; Weinstock, M. Novel Dual Inhibitors of AChE and

- MAO Derived from Hydroxy Aminoindan and Phenethylamine as Potential Treatment for Alzheimer's Disease, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5260-5279.
100. Weinstock, M.; Gorodetsky, E.; Poltyrev, T.; Gross, A.; Sagi, Y.; Youdim, M. A novel cholinesterase and brain-selective monoamine oxidase inhibitor for the treatment of dementia comorbid with depression and Parkinson's disease, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **2003**, *27*, 555-561.
  101. León, R.; García, A. G.; Marco-Contelles, J. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease, *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 139-189.
  102. León, R.; Marco-Contelles, J. A step further towards multitarget drugs for Alzheimer and neuronal vascular diseases: Targeting the cholinergic system, amyloid- $\beta$  aggregation and  $\text{Ca}^{2+}$  dyshomeostasis, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 552-576.
  103. Martins, C.; Carreiras, M. C.; León, R.; De Los Ríos, C.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Gálvez, E.; García, M.; Egea, J.; Samadi, A.; Chioua, M.; Marco-Contelles, J. Synthesis and biological assessment of diversely substituted furo[2,3-*b*]quinolin-4-amine and pyrrolo[2,3-*b*]quinolin-4-amine derivatives, as novel tacrine analogues, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 6119-6130.
  104. Bolea, I., Juárez-Jiménez, J.; de los Ríos, C.; Chioua, M.; Pouplana, R.; Luque, F. J.; Unzeta, M.; Marco-Contelles, J.; Samadi, A. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of donepezil and *N*-[(5-(Benzyloxy)-1-methyl-1*H*-indol-2-yl)methyl]-*N*-methylprop-2-yn-1-amine hybrids as new multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8251-8270.
  105. Samadi, A.; Chioua, M.; Bolea, I.; De Los Ríos, C.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Bastida, A.; Esteban, G.; Unzeta, M.; Gálvez, E.; Marco-Contelles, J. Synthesis, biological assessment and molecular modeling of new multipotent MAO and cholinesterase inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4665-4668.
  106. Pérez, V.; Marco, J. L.; Fernández-Álvarez, E.; Unzeta, M. Relevance of benzyloxy group in 2-indolyl methylamines in the selective MAO B inhibition, *Brit. J. Pharmacol.* **1999**, *127*, 869-876.

## I.4. APORTACIÓN ORIGINAL DEL AUTOR

### (a) NUEVOS DESARROLLOS DE LA MOLÉCULA MULTIPOTENTE ASS234

#### ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS:

**Publicación 1. Oscar M. Bautista-Aguilera, G. Esteban, I. Bolea, K. Nikolic, D. Agbaba, I. Moraleda, I. Iriepa, A. Samadi, E. Soriano, M. Unzeta, J. Marco-Contelles, Design, synthesis, pharmacological evaluation, QSAR analysis, molecular modeling and ADMET of novel donepezileindolyl hybrids as multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 75, 82-95.**

En este artículo, he realizado la Parte Experimental completa, lo que incluye la síntesis de los precursores e intermedios de reacción hasta la obtención de los productos finales deseados, los análisis de RMN e IR correspondientes, así como su interpretación, envío de muestras al servicio de RMN y masas, y recopilación de datos, así como de la elaboración de los informes periódicos y de puesta al día de esta parte proyecto en particular.

#### ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ENVIADOS PARA PUBLICAR:

**Artículo 2. Oscar M. Bautista-Aguilera, Abdelouahid, Samadi, Mourad Chioua, Katarina Nikolic, Slavica Filipic, Danica Agbaba, Elena Soriano, Stefano Alcaro, Rona R. Ramsay, Francesco Ortuso, Matilde Yañez, José Marco-Contelles, *N-Methyl-N-((1-methyl-5-(3-(1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-yl)propoxy)-1H-indol-2-yl)methyl)prop-2-yn-1-amine, a New Cholinesterase and Monoamine Oxidase Dual Inhibitor, *J. Med. Chem.****

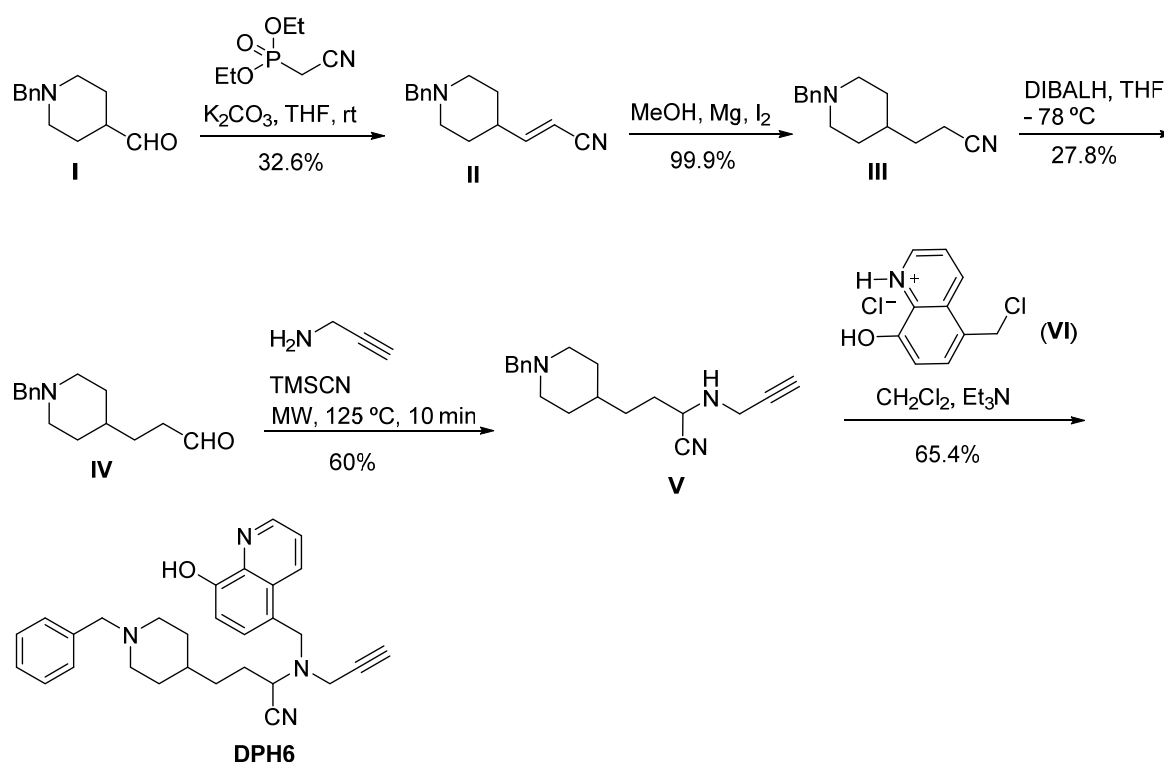
En este artículo he realizado la Parte Experimental completa, lo que incluye la síntesis de los precursores e intermedios de reacción hasta la obtención de los productos finales deseados, los análisis de RMN e IR correspondientes, así como su interpretación, envío de muestras al servicio de RMN y masas, y recopilación de datos, así como de la elaboración de los informes periódicos y de puesta al día de esta parte proyecto en particular.



(b) DESARROLLOS PARALELOS DE LA MOLÉCULA MULTIPOTENTE  
ASS234

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS:

**Publicación 3.** L. Wang, G. Esteban, M. Ojima, **Oscar M. Bautista-Aguilera**, T. Inokuchi, I. Moraleda, I. Iriepa, A. Samadi, M. B. H. Youdim, A. Romero, E. Soriano, R. Herrero, A. P. Fernández-Fernández, R. Martínez-Murillo, J. Marco-Contelles, M. Unzeta, **Donepezil+Propargylamine+8-Hydroxyquinoline Hybrids as New Multifunctional Metal-Chelators, ChE and MAO Inhibitors for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease**, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 543-541.

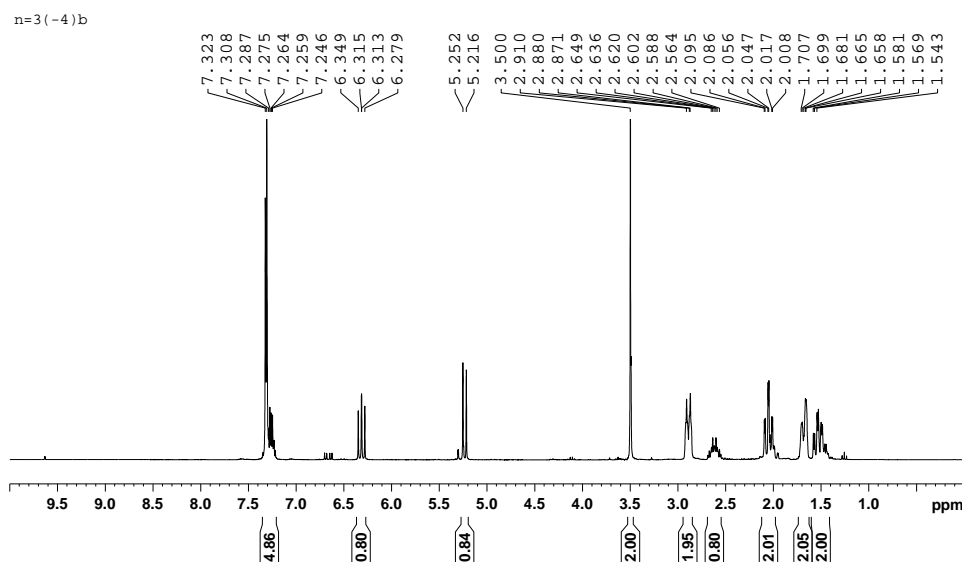


Scheme 1. Synthesis of multipotent compound **DPH6**.

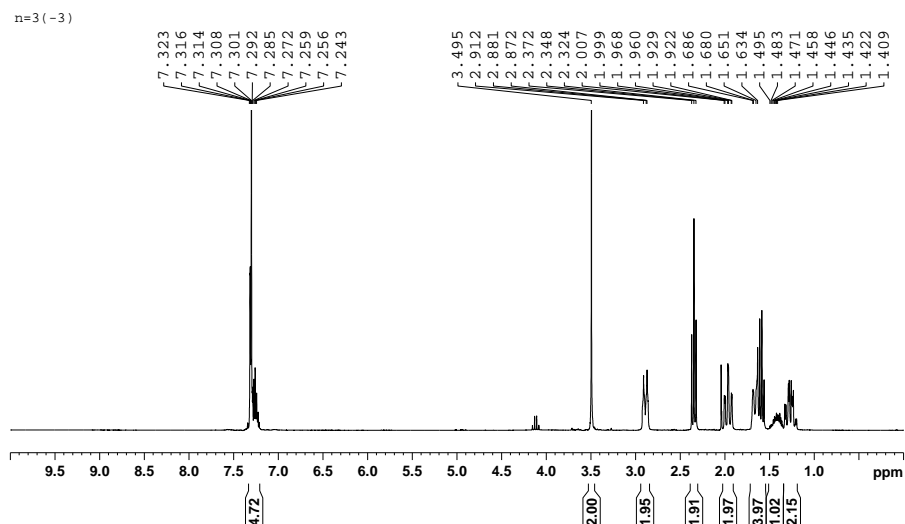
Este trabajo surgió como una colaboración entre el Prof. Inokuchi (*Division of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Natural Science and Technology Okayama University, Tsushima-naka, Kita-Ku, 3-1-1, Okayama, 700-8530, Japan*) y el Dr. Marco-Contelles para el diseño de moléculas *tripotentes*, capaces no sólo de inhibir las MAO y ChEs, sino también como agentes quelantes susceptibles de secuestrar bio-metales, cuya influencia es tan negativa y tóxica en el progreso y desarrollo de la EA, en situaciones patológicas. En este proyecto, y por los datos de inhibición de MAO/ChE, y

quelación de Cu y de Fe obtenidos, se identificó el compuesto **DPH6**, como el más interesante para estudios posteriores *in vivo*.

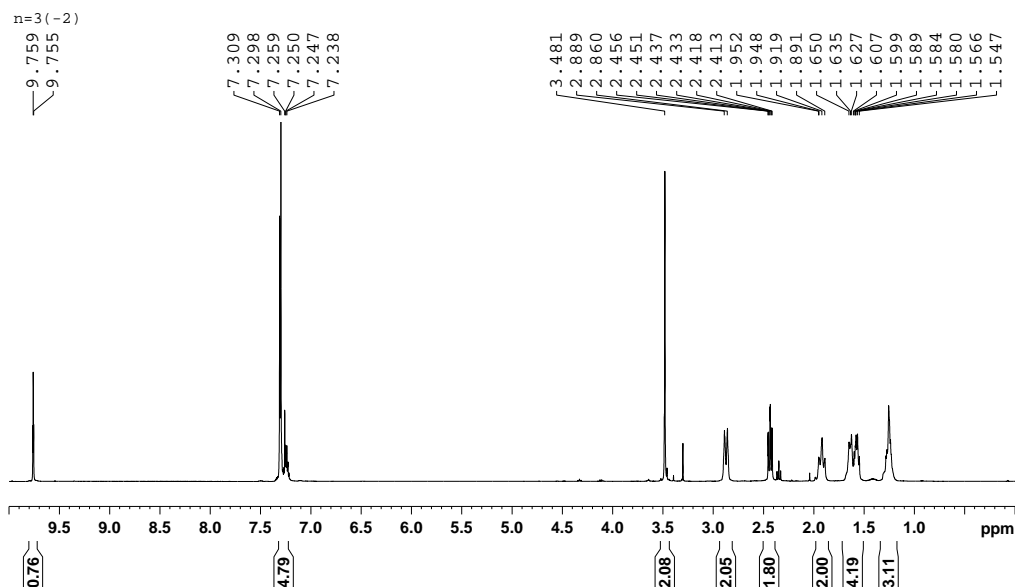
Para ello, para disponer de más de compuesto, y confirmar de paso, su inesperada estructura, por medio de una síntesis alternativa, sintetiqué dicho compuesto en Madrid, en nuestro laboratorio, de acuerdo con el esquema 1, que se muestra a continuación, y cuya parte experimental se adjunta, a partir de los productos de partida siguientes:



**(2E)-3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)prop-2-enitrile (II)** (Takasugi, H.; Kuno, A.; Ohkubo, M. WO 9313083). A mixture of diethyl (cyanomethyl)phosphonate (2.2 g, 12 mmol) and  $K_2CO_3$  (1.4 g, 10 mmol) in dry THF (100 mL) was stirred at rt for 15 min, and then heated at reflux for 20 min. After cooling down to rt, commercial 1-benzyl-4-piperidinecarboxaldehyde (**I**) (Sugimoto, H.; Imura, Y.; Yamanishi, Y.; Yamatsu, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 871-6) (2.0 g, 10 mmol) was added. The mixture was heated to reflux for 3 h. Aqueous 10%  $K_2CO_3$  water (100 mL) was added after cooling down to rt. The product was extracted with AcOEt and dried over  $MgSO_4$ . After concentrated in vacuo, the crude product was purified by column chromatography ( $SiO_2$ , hexane/AcOEt from 5:1 to 1:1 v/v) to give nitrile **II** (1.0 g, 44.5% yield,  $R_f = 0.70$ ) and (0.74 g, 32.6%) as white solid:  $R_f = 0.30$  (hexane/AcOEt= 1:2);  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.40–1.60 (m, 2 H), 1.62–1.77 (m, 2 H), 1.93–2.14 (m, 2 H), 2.51–2.71 (m, 1 H), 2.89 (d,  $J = 11.7$  Hz, 2 H), 3.50 (s, 2 H), 5.23 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1 H), 6.31 (t,  $J = 10.4$  Hz, 1 H), 7.19–7.38 (m, 5 H).



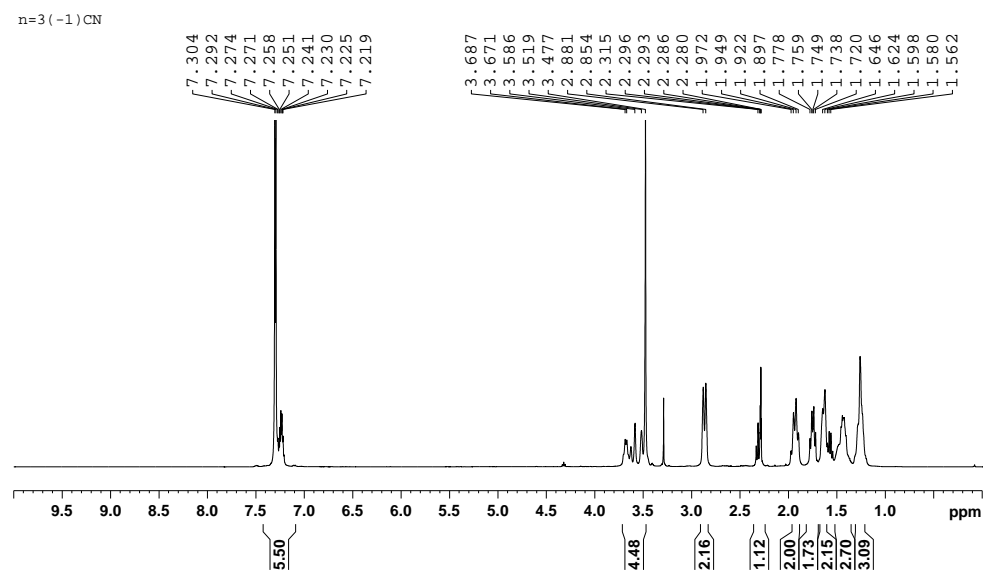
**3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)propanenitrile (III)** [(a) Takasugi, H.; Kuno, A.; Ohkubo, M. WO 9313083; (b) Sugimoto, H.; Tsuchiya, Y.; Sugumi, H.; Higurashi, K.; Karibe, N.; Iimura, Y.; Sasaki, A.; Kawakami, Y.; Nakamura, T.; et al. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1880-7]. To a solution of compound **II** (1.74 g, 7.70 mmol) in MeOH (33 mL) at rt, turning of Mg (3.70 g, 154 mmol) and infinitesimal quantity of I<sub>2</sub> was added to the mixture. The mixture was stirred until it became gray gel. After conc. HCl was added, the mixture became clear solution. Then it was treated with 10 N NaOH to alkaline. The precipitates were filtered and washed with large amount of EtOAc. The filtrate was extracted with AcOEt, and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to give the crude product **III** (1.76 g, 99.9%) as an orange oil: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.17–1.52 (m, 3 H), 1.54–1.73 (m, 4 H), 1.96 (td, *J*= 11.5, 1.9 Hz, 2 H), 2.35 (t, *J*= 7.3 Hz, 2 H), 2.89 (d, *J*= 11.8 Hz, 2 H), 3.50 (s, 2 H), 7.19–7.37 (m, 5 H).

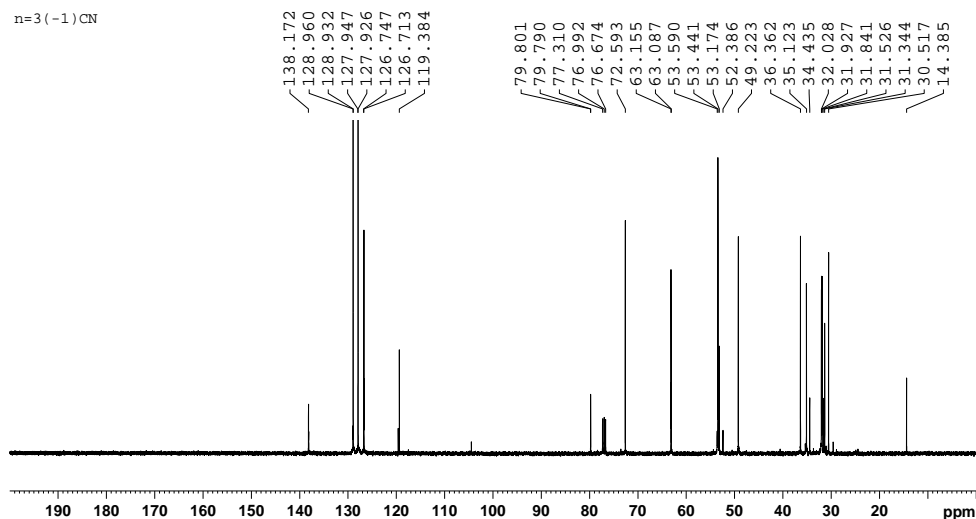


**3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)propanal (IV)** (Kitbunnadaj, R.; Zuiderveld, O. P.; De Esch, I. J. P.; Vollinga, R. C.; Bakker, R.; Lutz, M.; Spek, A. L.; Cavoy, E.; Deltent, M.-F.; Menge, W. M. P. B.; et al. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5445-5457). To an oven-

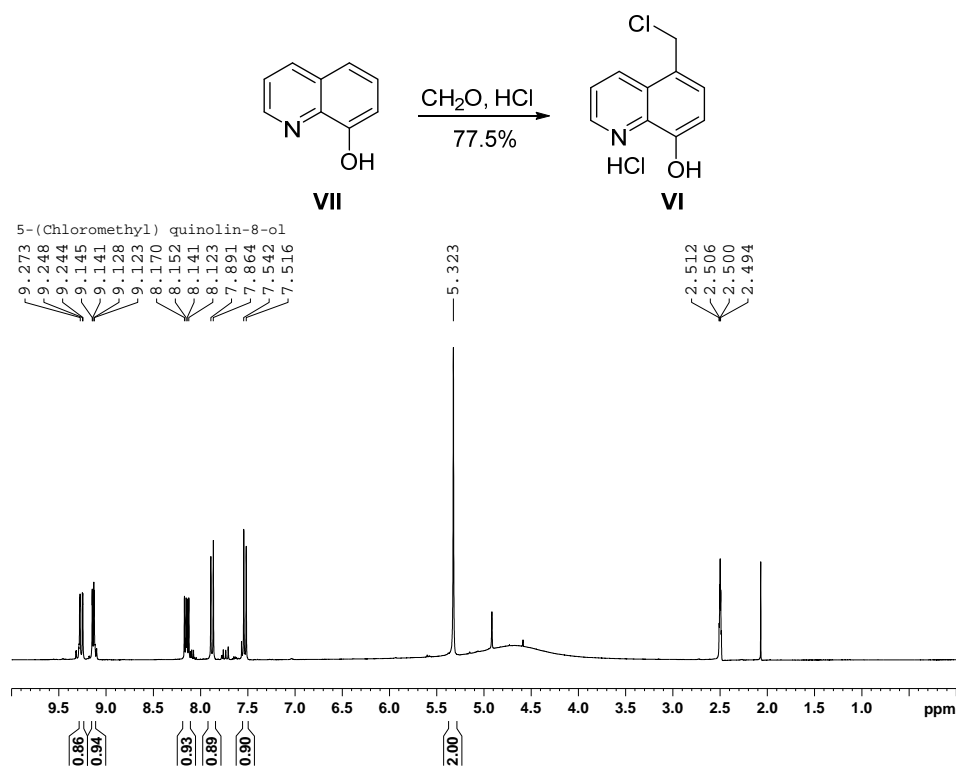
dried and argon-purged flask were added the nitrile **III** (1.00 g , 4.4mmol) and THF (10 mL). The reaction was cooled to -78 °C, and DIBAL-H (4.54 mL, 1mmol/mL) was added to the reaction *via* syringe. The mixture was stirred at -78 °C for 1 h, and then quenched with aqueous saturated NaHCO<sub>3</sub>. The precipitates were filtered and washed with large amount of EtOAc. The filtrate was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. After concentrated in vacuum, the crude product was purified by chromatography(SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH =20:1 v/v), to give aldehyde **IV** (427 mg, 42.7%) as orange oil: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.16–1.35 (m, 3 H), 1.52–1.72 (m, 4 H), 1.92 (t, *J*= 11.8 Hz, 2 H), 2.43 (td, *J*= 7.5, 1.6 Hz, 2 H), 2.87 (d, *J*= 11.1 Hz, 2 H), 3.44–3.53 (m, 2 H), 7.19–7.38 (m, 5 H), 9.76 (t, *J*= 1.6 Hz, 1 H).

Para confirmar la estructura del compuesto inesperado, el α-aminonitrilo **V**, abordé su síntesis inequívoca a partir del aldehído **IV** (Esquema 1), por reacción de Strecker (Ventosa-Andres, P.; García-López, M. T.; Herranz, R. A study on the induction of stereoselectivity in the Strecker synthesis of basic amino acid-derived α-aminonitriles *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1198-1205), tal como sigue:

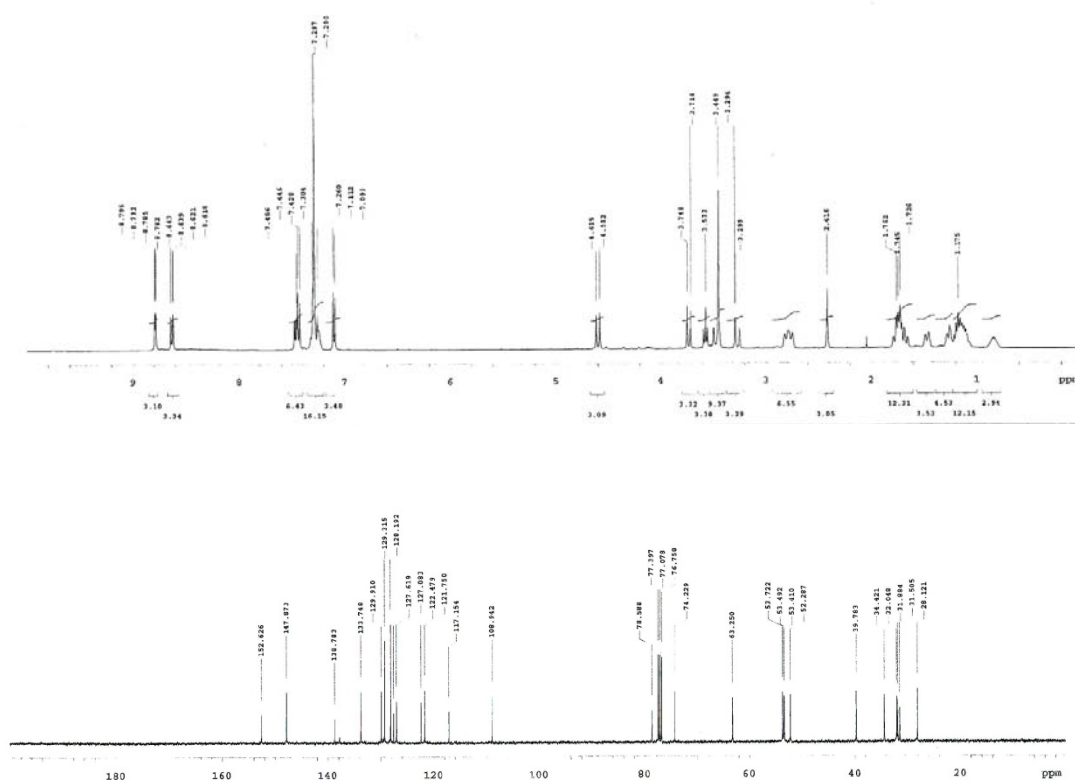




**4-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-2-(prop-2-yn-1-ylamino)butanenitrile (V).** 3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)propanal (IV) (136 mg, 0.59 mmol), prop-2-yn-1-amine (47  $\mu$ L, 0.74 mmol, 1.25 equiv) and trimethylsilyl cyanide (TMSCN) (0.14 mL, 1.1 mmol, 1.85 equiv) were mixed and submitted to microwave irradiation at 125  $^{\circ}$ C for 10 min. The crude reaction was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, hexane/AcOEt from 9:1 to 1:1 v/v) to give compound V (104 mg, 60 %): :  $R_f$  = 0.59 (MeOH/AcOEt = 1:4); IR (film)  $\nu$  3296, 2911, 2845, 2801, 2780, 1493, 1452, 1368, 1343, 1312, 1260, 1146, 1119, 1074; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.18–1.69 (m, 8 H), 1.70–1.83 (m, 2 H), 1.85–2.02 (m, 2 H), 2.23–2.37 (m, 1 H), 2.87 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 2 H), 3.29–3.76 (m, 4 H), 7.16–7.38 (m, 5 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  31.0, 31.6, 32.1, 32.2, 32.3, 35.4, 36.6, 49.5, 53.7, 63.4, 72.8, 80.0, 119.4, 126.7, 127.9, 128.9, 138.1.



**5-(Chloromethyl) quinolin-8-ol (VI).** Synthesized as reported in Moret, V.; Laras, Y.; Cresteil, T.; Aubert, G.; Ping, D. Q.; Di, C.; Barthélémy-Requin, M.; Béclin, C.; Peyrot, V.; Allegro, D.; Rolland, A.; De Angelis, F.; Gatti, E.; Pierre, Ph.; Pasquini, L.; Petrucci, E.; Testa, U.; Kraus, J-L. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 558-567). To a cooled solution of 8-hydroxyquinoline (**VII**) (14.6 g, 100 mmol) in conc. HCl (44 mL) at 0 °C, a 37% aqueous formaldehyde solution (20 mL) was added. Then HCl gas was bubbled through the solution with stirring for 2 h. The mixture was allowed to warm to rt with further stirring for 6 h and without stirring for 2 h more. The product was filtered and the solid was rinsed with conc. HCl, giving product **VII** (19.9 g, 77.5%) as light yellow solid: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 5.30 (s, 2H), 7.51 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H), 7.86 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H), 8.13 (dd, *J*= 8.7, 5.2 Hz, 1H), 9.12 (dd, *J*= 5.1, 1.3 Hz, 1H), 9.24 (dd, *J*= 8.8, 1.3 Hz, 1H).



**4-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-2-(((8-hydroxyquinolin-5-yl)methyl)(prop-2-yny)amino)butanenitrile (DPH6).** To a mixture of amine **V** (89 mg, 0.3 mmol) and Et<sub>3</sub>N (0.09 mL, 0.7 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) at 0 °C, chloride **VI** (77 mg, 0.3 mmol) was added. After being stirred at rt overnight, the reaction was quenched with aqueous 5% NaHCO<sub>3</sub> and the product was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extracts were dried Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The crude products were purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, hexane/AcOEt by increasing the gradient from 5:1 to 1:1 v/v), to give compound **DPH6** (89 mg, 65.4%) as a yellow oil: IR (film) ν 3295, 2931, 2812, 1578, 1505, 1476, 1371, 1271, 1203, 1196, 1148, 1123, 1072, 1028 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.99-0.77 (m, 1 H), 1.40-1.38 (m, 6H), 1.53-1.40 (m, 1 H), 1.84-1.60 (m, 5 H), 2.42 (t, *J*= 2.4 Hz, 1H), 2.77 (ddt, *J*= 12.0, 8.3, 2.1 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J*= 16.8, 2.4 Hz, 1H, 1 H), 3.45 (s, 2 H), 3.58 (dd, *J*= 16.8, 2.4 Hz, 1H, 1 H), 3.75 (d, *J*= 13.1 Hz, 1 H), 4.60 (d, *J*= 13.1 Hz, 1H), 7.11 (d, *J*= 7.6 Hz, 1 H), 7.32-7.22 (m, 5 H), 7.57-

7.39 (m, 2H), 8.64 (dd,  $J= 8.5, 1.6$  Hz, , 1 H), 8.78–8.80 (m, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.1, 31.5, 31.9, 32.0, 34.4, 39.8, 52.3, 53.4, 53.5, 53.7, 63.3, 74.2, 78.6, 108.9, 117.2, 121.8, 122.5, 127.1, 127.6, 128.2, 129.3, 129.9, 133.7, 138.8, 147.9, 152.6. HRMS. Calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}$  ( $\text{MH}^+$ ): 453.2654. Found: 452.2526 ( $\text{MH}^+$ ).

#### **ARTÍCULOS ACEPTADOS EN PRENSA:**

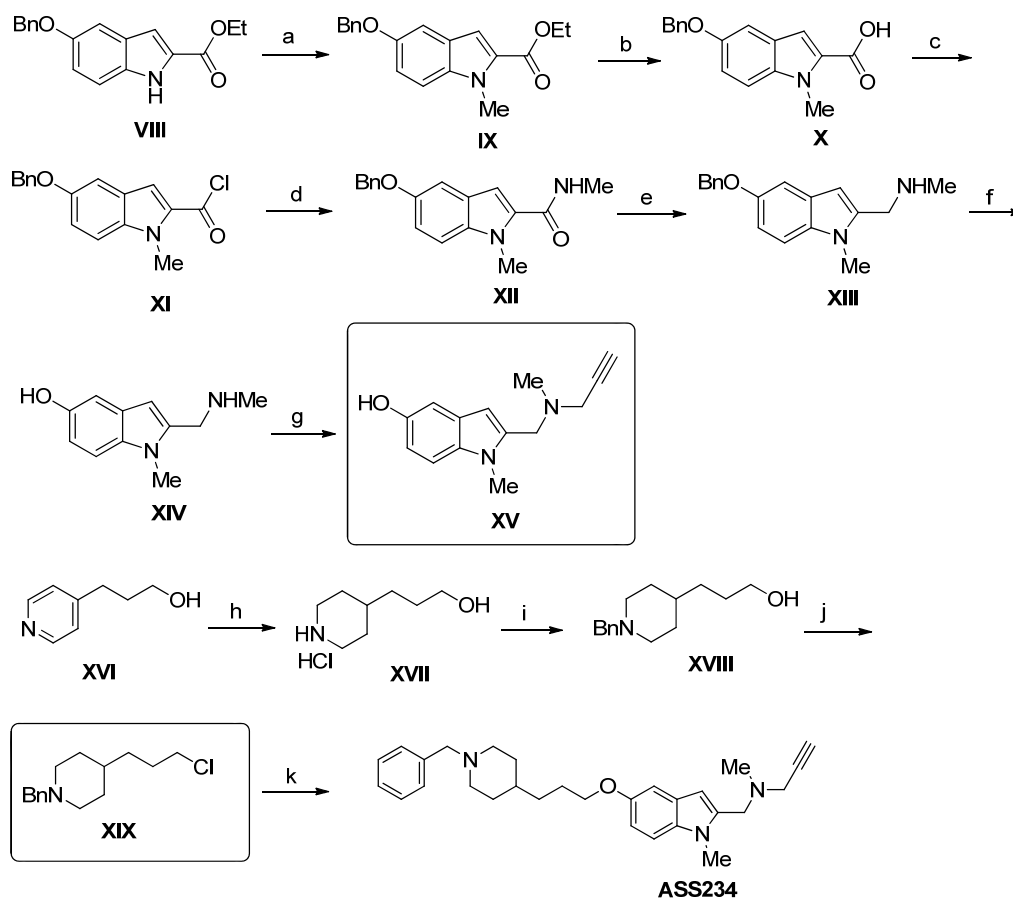
**Artículo 4. Oscar M. Bautista-Aguilera**, Gerard Esteban, Mourad Chioua, Katarina Nikolic, Danica Agbaba, Ignacio Moraleda, Isabel Iriepa, Elena Soriano, Abdelouahid Samadi, Mercedes Unzeta, José Marco-Contelles, **Multipotent Cholinesterase/Monoamine Oxidase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Design, Synthesis, Biochemical Evaluation, ADMET, Molecular Modeling and QSAR Analysis of Novel Donepezil-Pyridyl Hybrids**, *Drug, Design, Development and Therapy*, *en prensa*

En este artículo he realizado la Parte Experimental completa, lo que incluye la síntesis de los precursores e intermedios de reacción hasta la obtención de los productos finales deseados, los análisis de RMN e IR correspondientes, así como su interpretación, envío de muestras al servicio de RMN y masas, y recopilación de datos, así como de la elaboración de los informes periódicos y de puesta al día de esta parte proyecto en particular.

#### **(c) INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA AVANZADA DEL COMPUESTO ASS234**

#### **ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS:**

**Publicación 5.** J. del Pino, E. Ramos, **Oscar M. Bautista Aguilera**, J. Marco-Contelles, Al. Romero, **Wnt Signaling Pathway, a Potential Target for Alzheimer's Disease Treatment, is Activated by a Novel Multitarget Compound ASS234**, *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2014**, *20*, 568-570.



Scheme 2. Synthesis of compound **ASS234**. Reagents and conditions: (a) Dimethyl sulfate, NaOH (10N), *n*-Bu<sub>4</sub>NBr, THF, reflux (83%); (b) KOH (10N), EtOH (99%); (c) PCl<sub>5</sub>, Et<sub>2</sub>O (99%); (d) CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>·HCl, TEA, Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (85%); (e) LAH, THF (81%); (f) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, Pd/C, MeOH (99%); (g) Propargyl bromide, *t*-BuNH<sub>2</sub>, THF, rt (84%); (h) Pd/C, PtO<sub>2</sub>, AcOH (95%); (i) BnBr, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (79%); (j) SOCl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, reflux (97%); (k) **XV**, NaH, DMF, rt (63%).

Este artículo surge de la necesidad de profundizar en el conocimiento de la biología del compuesto **ASS234**, para lo que hubo que preparar más cantidad del mismo.

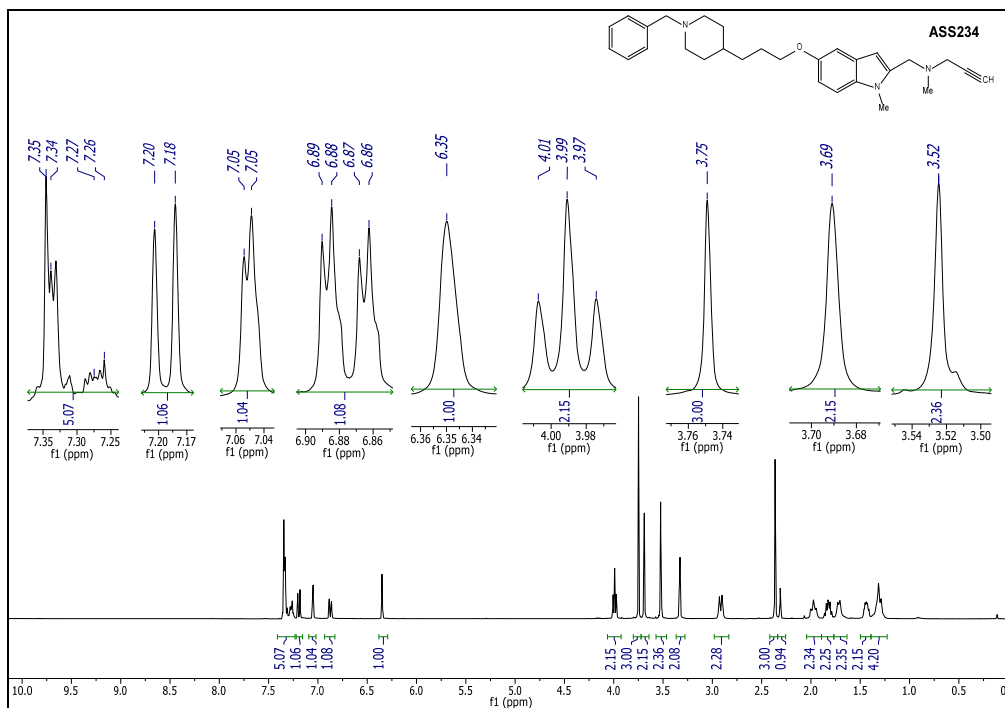
**ASS234** lo preparé con un buen rendimiento global (45%), a partir de productos de partida fácilmente asequibles, en cantidades de multigramo, como se muestra en el esquema 2, mediante la reacción de los intermedios conocidos **XV** (Cruces, M.A. et al. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 535-543) y **XIX** (Bolea, I. et al. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8251-8270). En el paso final, **ASS234** se obtuvo en un 63% de rendimiento, como un sólido, que se transformó en su dihidrocloruro, soluble en agua, químicamente puro y estable, como se determinó por los medios espectroscópicos (IR, RMN) y analíticos usuales.



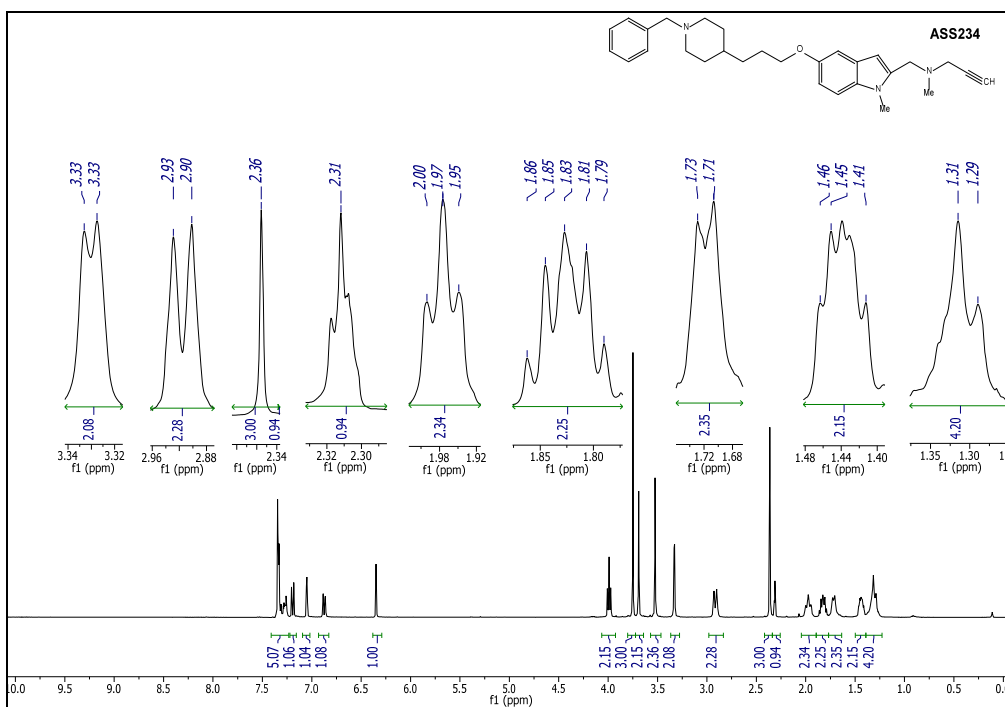
***N*-{[5-(3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)propoxy)-1-methyl-1*H*-indol-2-yl]methyl}-*N*-methylprop-2-yn-1-amine (ASS234).** To a solution of 1-methyl-2-{{ethyl(prop-2-yn-1-yl)amino}ethyl}-1*H*-indol-5-ol (**XV**) (0.22 g, 0.963 mmol) and 1-benzyl-4-(3-chloropropyl)piperidine (**XIX**) (0.36 g, 1.44 mmol, 1.5 equiv) in DMF (5 mL), NaH (69.4 mg, 1.73 mmol, 1.8 equiv, 60% /mineral) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight and then heated at 100 °C for 1 h. After complete reaction (tlc analysis), the reaction was concentrated, diluted with water, and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic phase was washed with brine, dried (MgSO<sub>4</sub>), and evaporated at reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt, 10:1 to 5/1, v/v) to give compound **ASS234** (0.268 g, 63%) as a white solid: *R*<sub>f</sub> = 0.28 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 20/1); mp 90-91 °C; IR (KBr)  $\nu$  3265, 2935, 2908, 2799, 2760, 1619, 1489, 1471, 1395, 1269, 1204, 1190, 1160, 1029 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.35 - 7.25 (m, 5H, Ph), 7.19 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH7-indole), 7.05 (d, *J* = 2.14 Hz, 1H, CH4-indole), 6.85 (dd, *J* = 8.8 and 2.3 Hz, 1H, CH6-indole), 6.35 (s, 1H, CH3-indole), 3.98 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.75 (s, 3H, indole-CH<sub>3</sub>), 3.69 (s, 2H, indole-CH<sub>2</sub>), 3.52 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 2.33 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 2.91 (d, *J* = 10.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.36 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.31 (t, *J* = 2.0 Hz, C $\equiv$ CH), 1.97 (t, *J* = 12 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.83 [m, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>O)], 1.72 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.46-1.41 [m, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O], 1.29-1.31 (m, 3H, CH+CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  153.2 (C5-indole), 138.3 (C-Ph), 136.9 (C2-indole), 133.3 (C-indole), 129.2 (2xCH-Ph), 128.0 (2xCH-Ph), 127.4 (C-indole), 126.8 (CH-Ph), 112.0 (CH6-indole), 109.5 (CH7-indole), 103.3 (CH4-indole), 102.0 (CH3-indole), 78.3 (-C $\equiv$ ), 73.4 ( $\equiv$ CH), 69.0 (CH<sub>2</sub>-O), 63.4 (CH<sub>2</sub>-Ph), 53.8 (2xCH<sub>2</sub>), 51.7 (indole-CH<sub>2</sub>), 44.6 (CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ ), 41.5 (N-CH<sub>3</sub>), 35.5 (CH-piperidine), 32.8 [CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O], 32.2 (2CH<sub>2</sub>), 29.8 (indole-N-CH<sub>3</sub>), 26.7 [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O]; MS (EI) *m/z* (%): 91 (77) [PhCH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 352 (22) [M-CH<sub>2</sub>Ph]<sup>+</sup>, 374 (100) [M-NCH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH]<sup>+</sup>, 404 (7) [M-CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH]<sup>+</sup>, 428 (5) [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 443 (40)[M]<sup>+</sup>. Anal. Calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O: C, 78.51; H, 8.41; N, 9.47. Found: C, 78.36; H, 8.31; N, 9.23.

**ASS234.2HCl:** white powder; mp 203-5 °C; IR (KBr)  $\nu$  3193, 2937, 2512, 1619, 1486, 1469, 1209 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.32-7.22 (m, 6H, CH7-indole + 5H-Ph), 7.05 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, CH4-indole), 6.83 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H, CH6-indole), 6.58 (s, 1H, CH3-indole), 4.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.90 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.83 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 3.59 (s, 3H, indole-CH<sub>3</sub>), 3.30 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.97-2.94 (m, 1H, C $\equiv$ CH), 2.81-2.72 (m 5H, CH<sub>2</sub> + N-CH<sub>3</sub>), 1.84-1.75

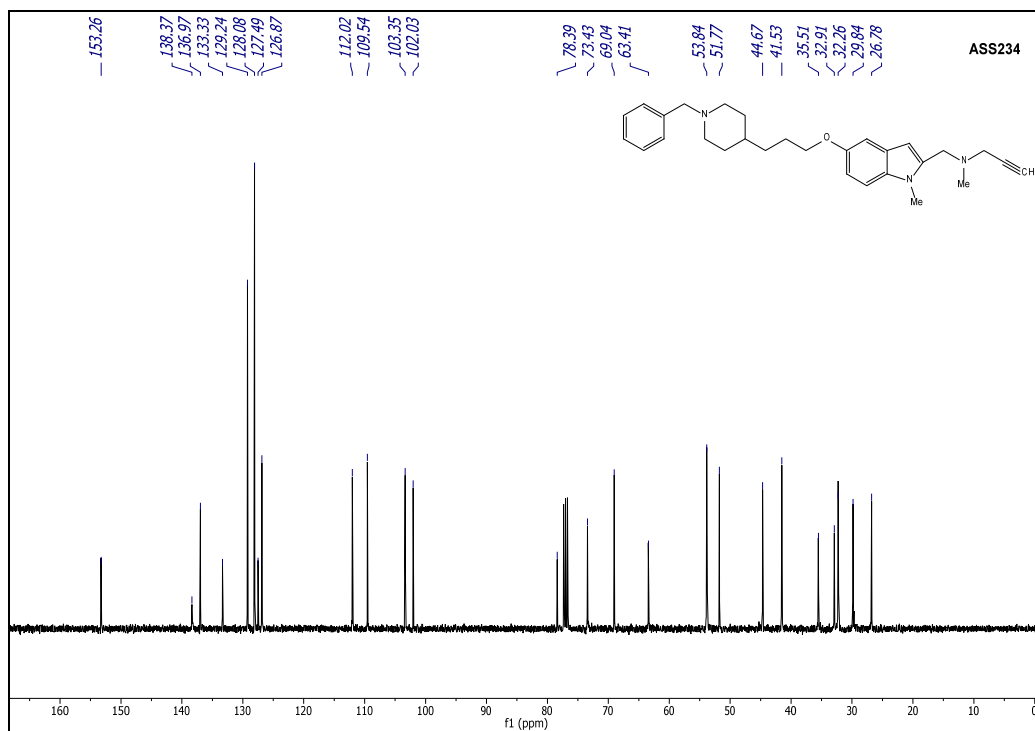
(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.65-1.55 [m, 2H, CH<sub>2</sub>], 1.49-1.36 (m, 1H, CH), 1.41-1.46 [m, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O], 1.29-1.09 (m, 4H). Anal. Calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O.2HCl: C, 67.43; H, 7.61; Cl, 13.73; N, 8.13. Found: C, 67.38; H, 7.81; Cl, 13.13; N, 8.02.



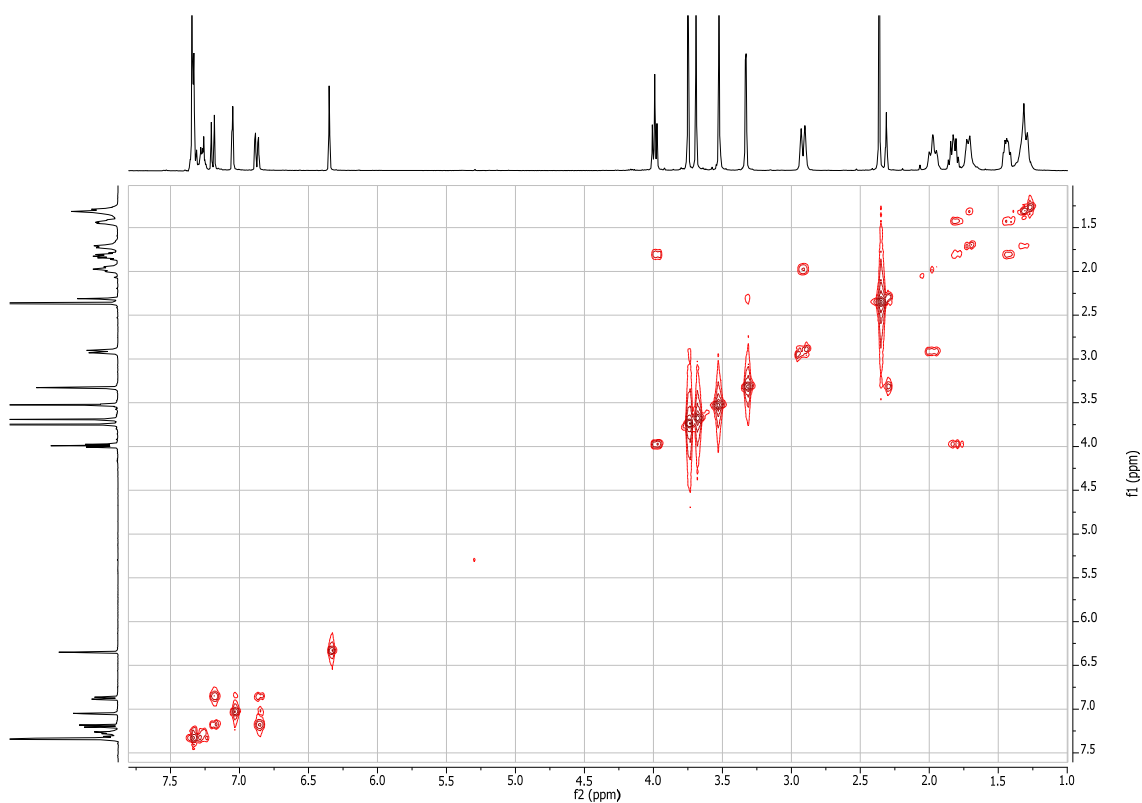
RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de ASS234



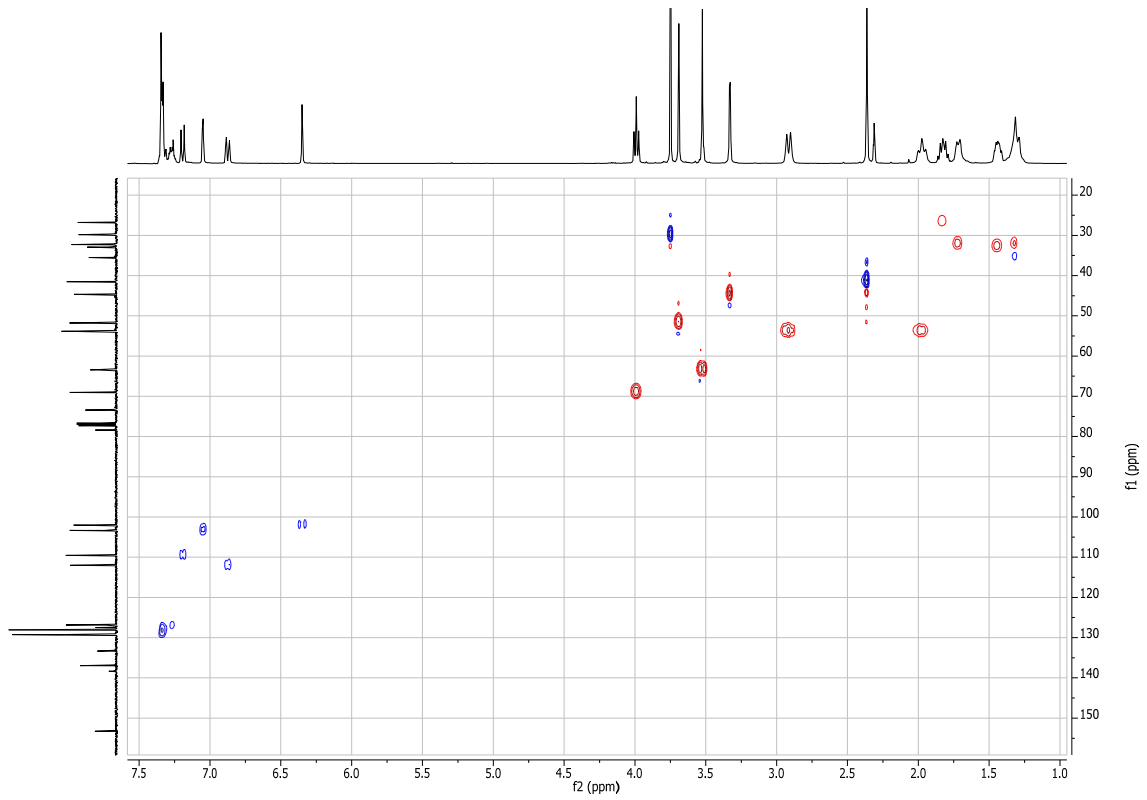
RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de ASS234



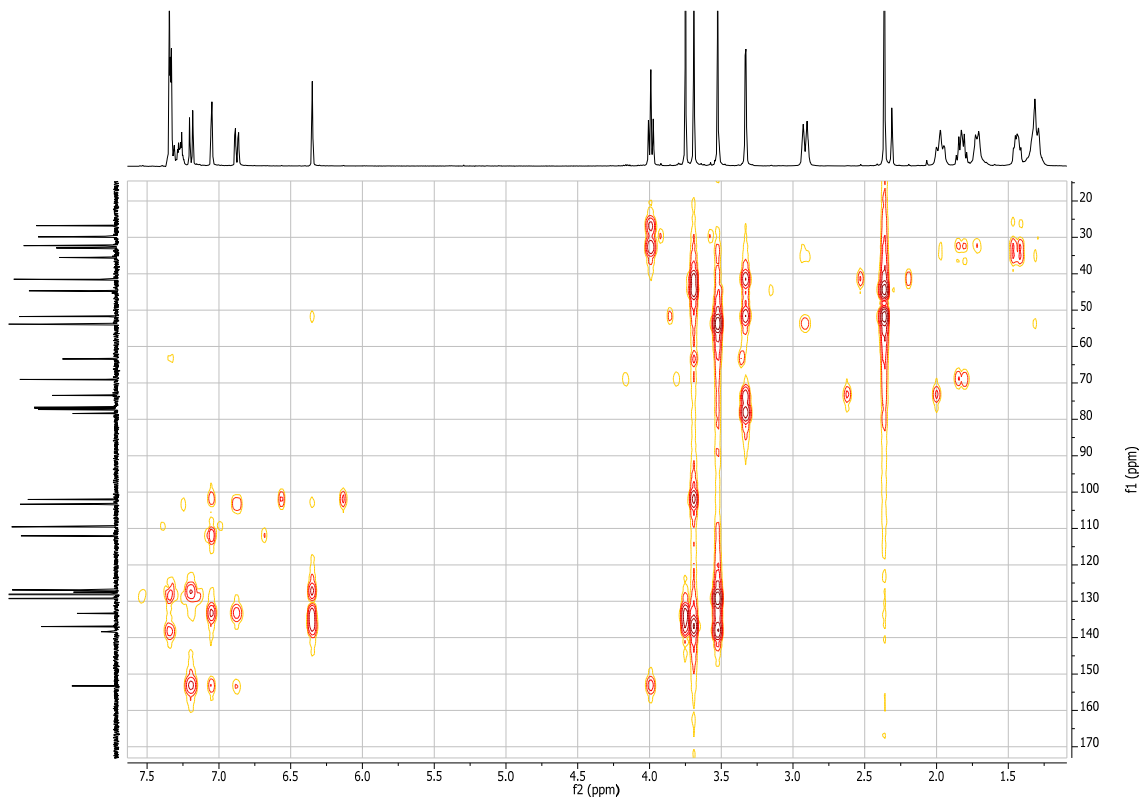
RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de ASS234



RMN de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  g-COSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de ASS234



RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  g-HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) de ASS234



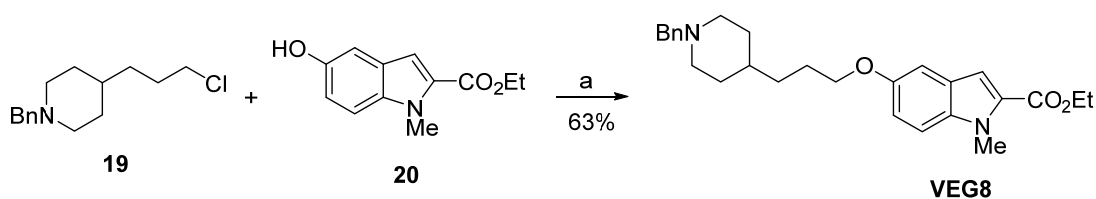
RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  g-HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) de ASS234

## (d) INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA AVANZADA DE VEG8, UN COMPUESTO RELACIONADO CON ASS234

### ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ENVIADOS A PUBLICAR:

**Artículo 6.** Katarina Nikolic, Lazaros Mavridis, **Oscar M. Bautista-Aguilera**, José Marco-Contelles, Holger Stark, Maria do Carmo Carreiras, Ilaria Rossi, Paola Massarelli, Danica Agbaba, Rona R. Ramsay, John B. O. Mitchell, **Predicting targets of multipotent compounds against neurological diseases using cheminformatic methodology**, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*

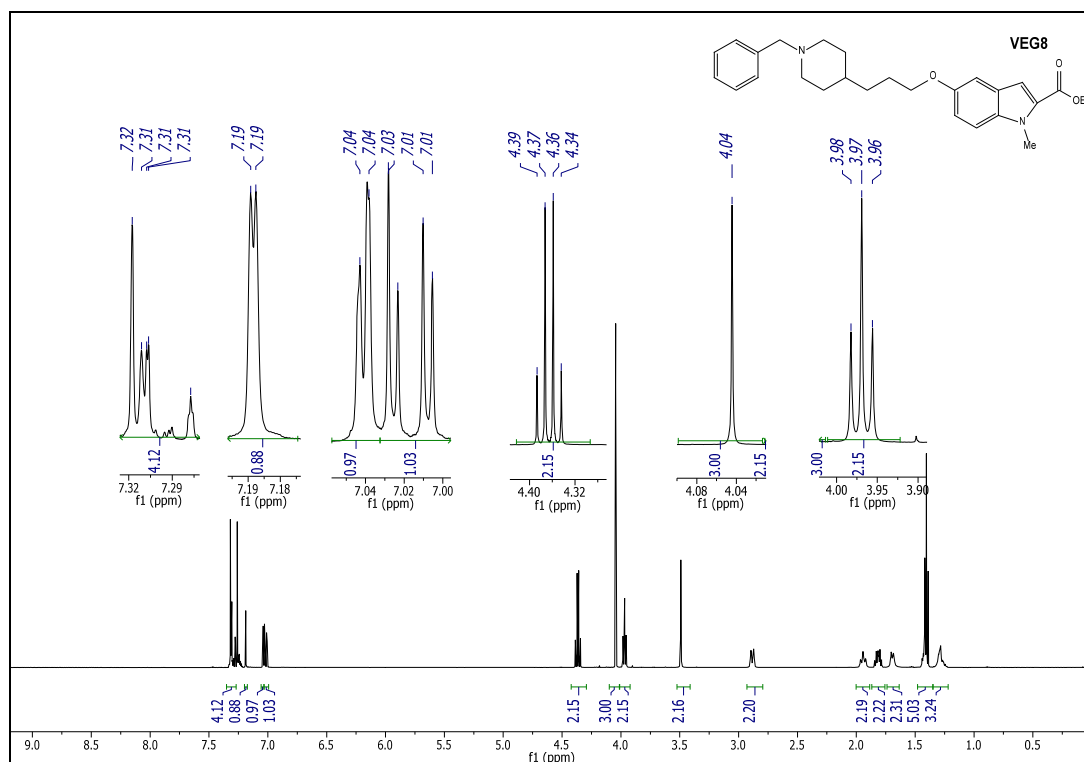
Este artículo fue consecuencia de la necesidad de profundizar en el conocimiento de la biología del compuesto **VEG8**, un compuesto relacionado con **ASS234**, para lo que tuve que preparar más cantidad del mismo, de acuerdo con el esquema 3:



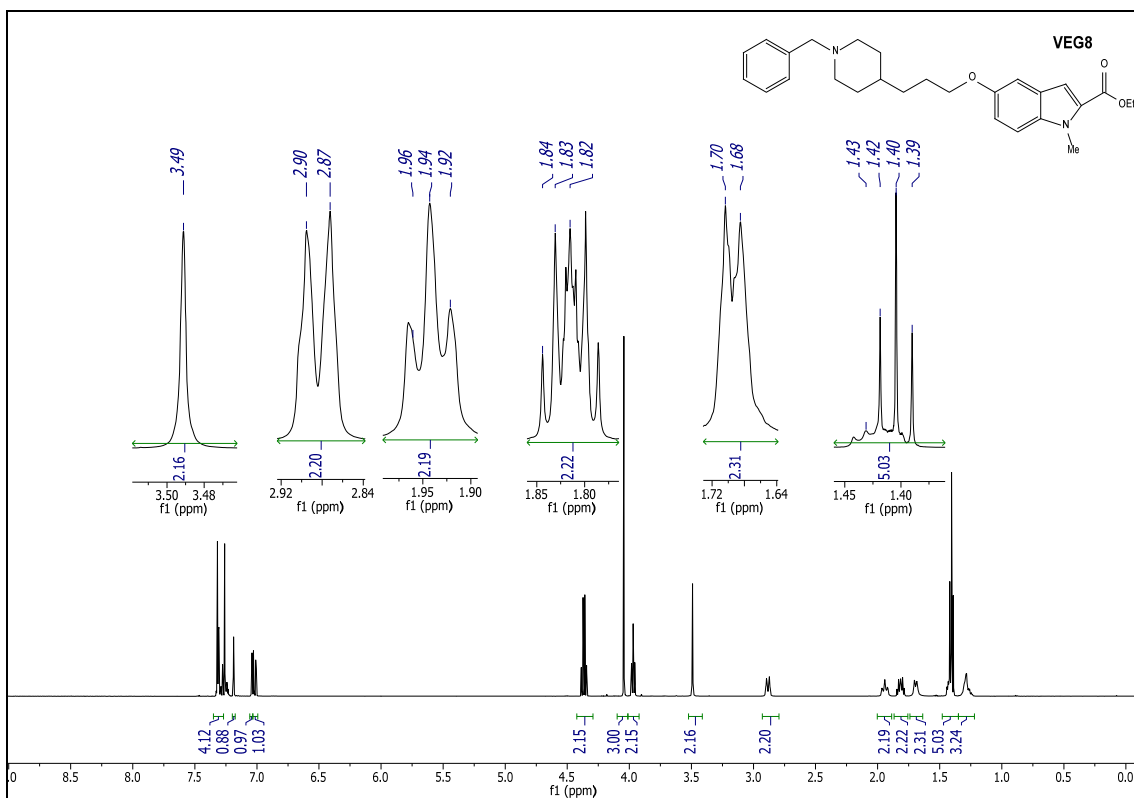
**Scheme 3.** Synthesis of compound **VEG8**. Reagents and conditions: (a)  $K_2CO_3$ , dry DMF, reflux.

**Ethyl 5-(3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propoxy)-1-methyl-1H-indole-2-carboxylate (VEG8).** To a solution of 1-benzyl-4-(3-chloropropyl)piperidine (**XIX**) (Bolea, I.; Juárez-Jiménez, J.; de los Ríos, C.; Chioua, M.; Pouplana, R.; Luque, F. J.; Unzeta, M.; Marco-Contelles, J.; Samadi, A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8251–8270) (0.419 g, 1.665 mmol) and ethyl 5-hydroxy-1-methyl-1H-indole-2-carboxylate (**XX**) (P.C. Unangst, D.Y. Connor, S.R. Miller, R. Steven, *J. Heterocyclic Chem.* **1996**, *33*, 1627-1630) (0.365 g, 1.665 mmol) in DMF (20 mL),  $K_2CO_3$  (0.92 g, 6.656 mmol, 4 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h. After complete reaction (tlc analysis), the solvent was evaporated, the crude diluted with water, and extracted with  $CH_2Cl_2$ . The organic phase was washed with brine, dried ( $MgSO_4$ ), and evaporated at reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography ( $CH_2Cl_2/EtOAc$ , 10:1 to 5/1, v/v) to give compound **5** (0.452 g, 63%) as a white solid: mp 91-4 °C; IR (KBr)  $\nu$  3435, 2937, 2917, 1713, 1518, 1471, 1220, 1204, 1087  $cm^{-1}$ ;  $^1H$

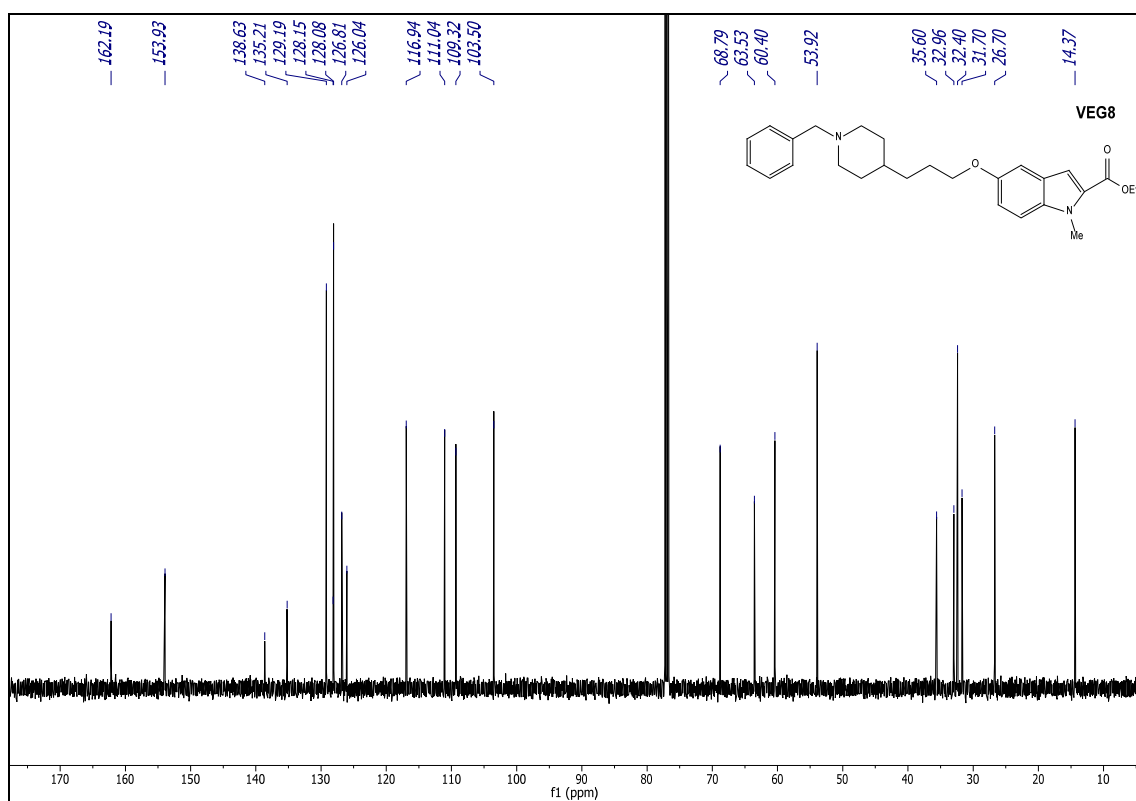
NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.32-7.29 (m, 5H, Ph), 7.26 (d, *J*= 8.9 Hz, 1H, H7-indole), 7.18 (s, 1H, H3-indole), 7.04 (d, *J*= 1.9 Hz, 1H, H4-indole), 7.01 (dd, *J*= 8.9, 1.9 Hz, 1H, H6-indole), 4.36 (q, *J*= 7.3 Hz, 2H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.04 [s, 3H, N(1)CH<sub>3</sub>], 3.97 [t, *J*= 6.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>], 3.49 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ph), 2.88 [d, *J*= 11.2 Hz, 2H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>eq</sub>], 1.93 [tm, *J*= 11.2 Hz, 2H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>ax</sub>], 1.83-1.79 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.70-1.68 [m, 2H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>eq</sub>], 1.44-1.37 {m, 5H [2H (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)+3H (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)]}, 1.32-1.25 [m, 3H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>ax</sub>CH]; <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 153.9 (C5-indole), 138.6 (C'1, Ph), 135.2 (C2-indole), 129.2 (2xCH, Ph), 128.1 (C7a-indole), 128.0 (2xCH, Ph), 126.8 (C3a-indole), 126.0 (C'4H, Ph), 119.9 (C6-indole), 111.0 (C7-indole), 109.3 (C3-indole), 103.5 (C4-indole), 68.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 63.5 (NCH<sub>2</sub>Ph), 60.4 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.9 [2xCH<sub>2</sub>, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH], 35.6 [CH, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH], 32.9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 32.4 [2xCH<sub>2</sub>, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH], 31.7 [N(1)CH<sub>3</sub>], 26.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 14.3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); MS (EI) *m/z* (%): 91 (58) [PhCH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 216 (77) [Bn-Piperidine-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 343 (7) [M - CH<sub>2</sub>Ph]<sup>+</sup>, 389 (11) [M - Ph]<sup>+</sup>, 434 (67)[M]<sup>+</sup>. Anal. Calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O: C, 74.62; H, 7.89; N, 6.45. Found: C, 74.81; H, 7.94; N, 6.74



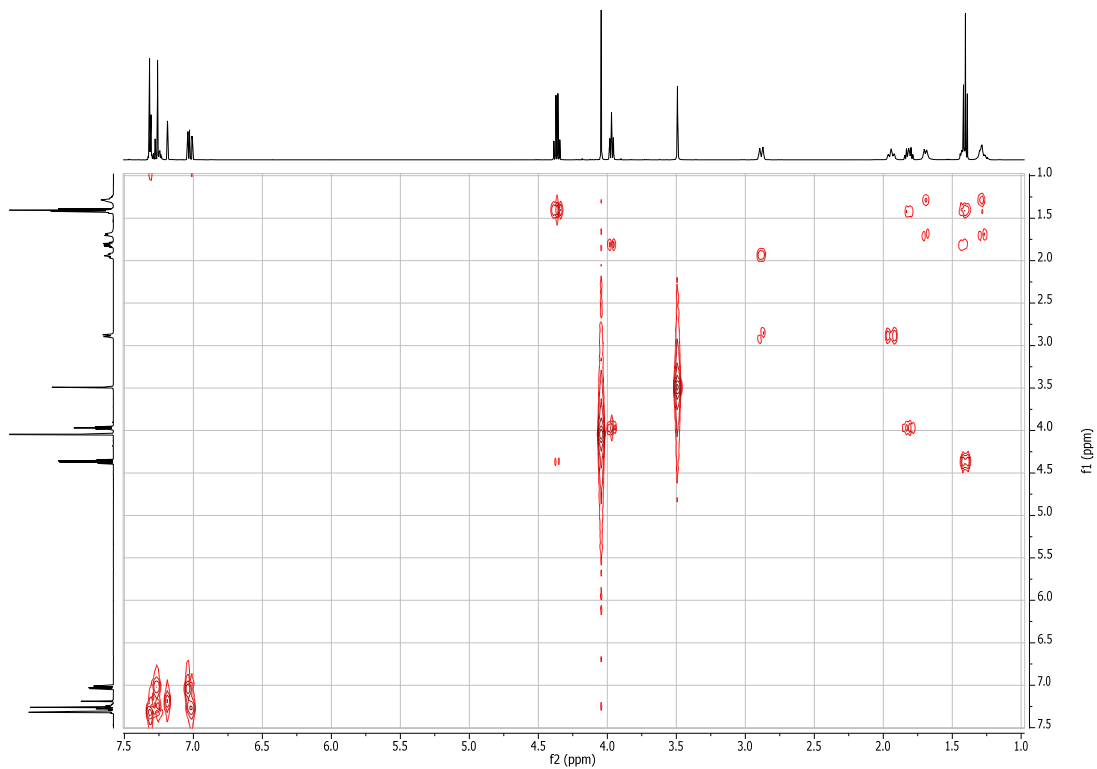
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **VEG8**



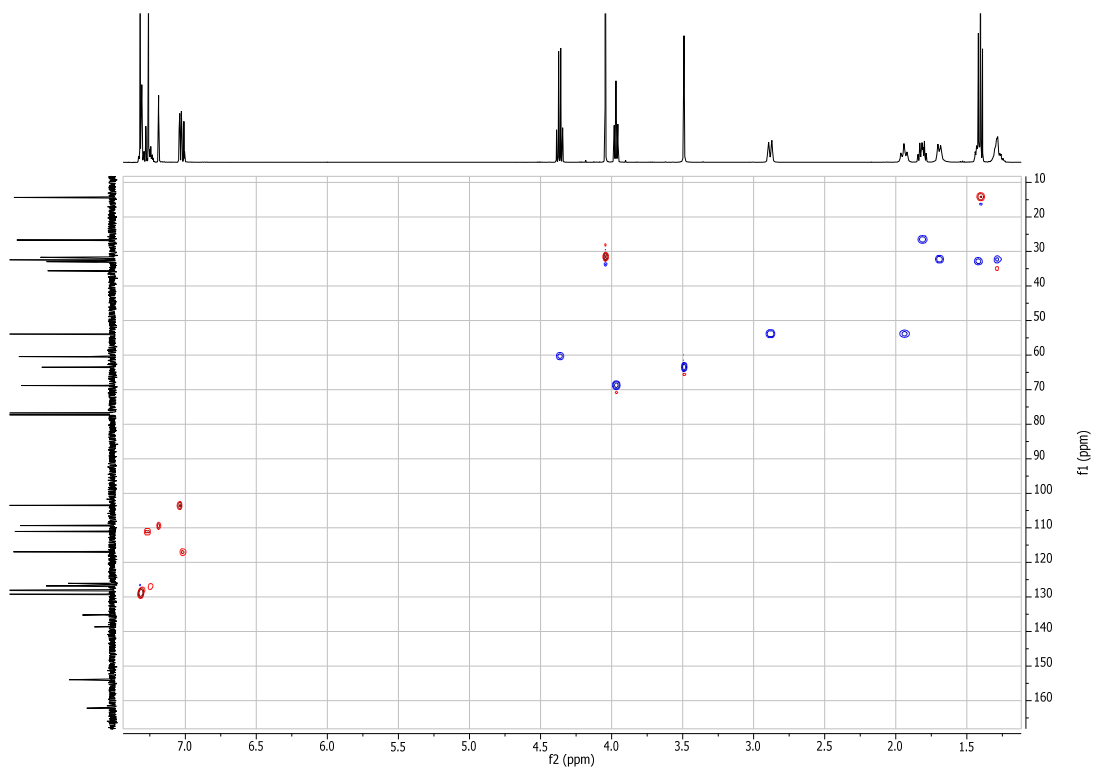
RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **VEG8**



RMN de  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **VEG8**

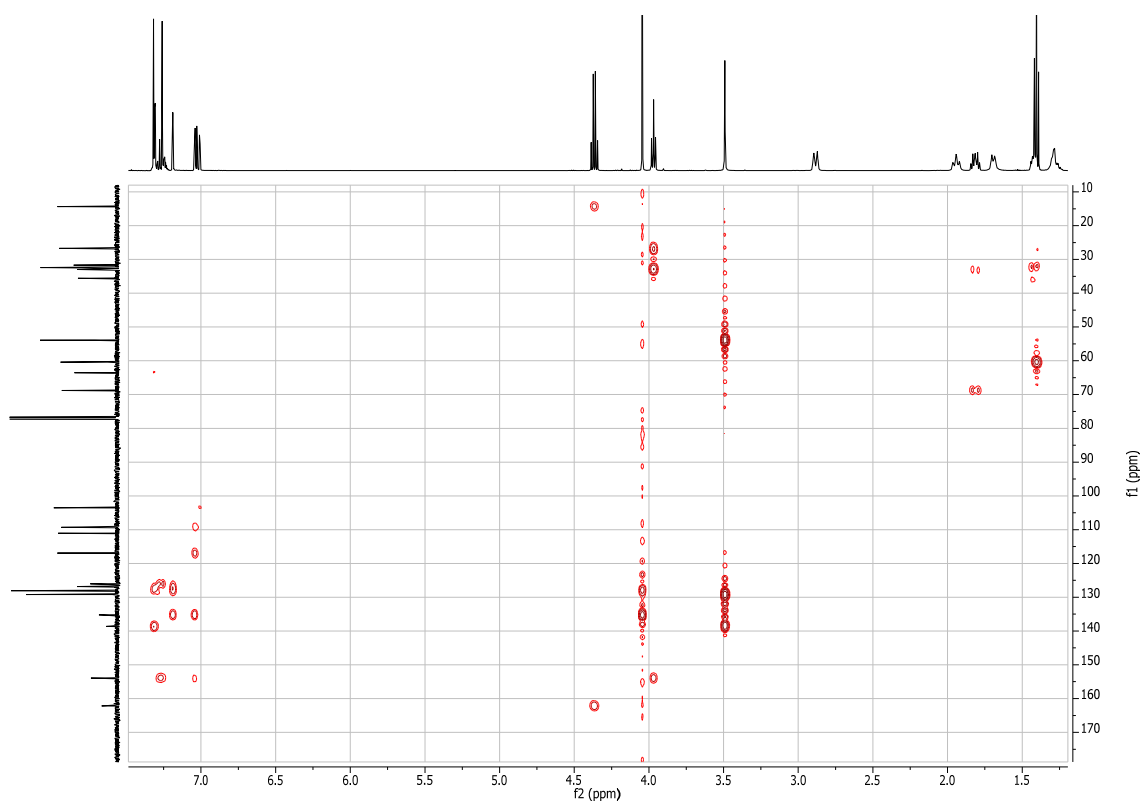


RMN de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  *g*-COSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **VEG8**



RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  *g*-HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) de **VEG8**

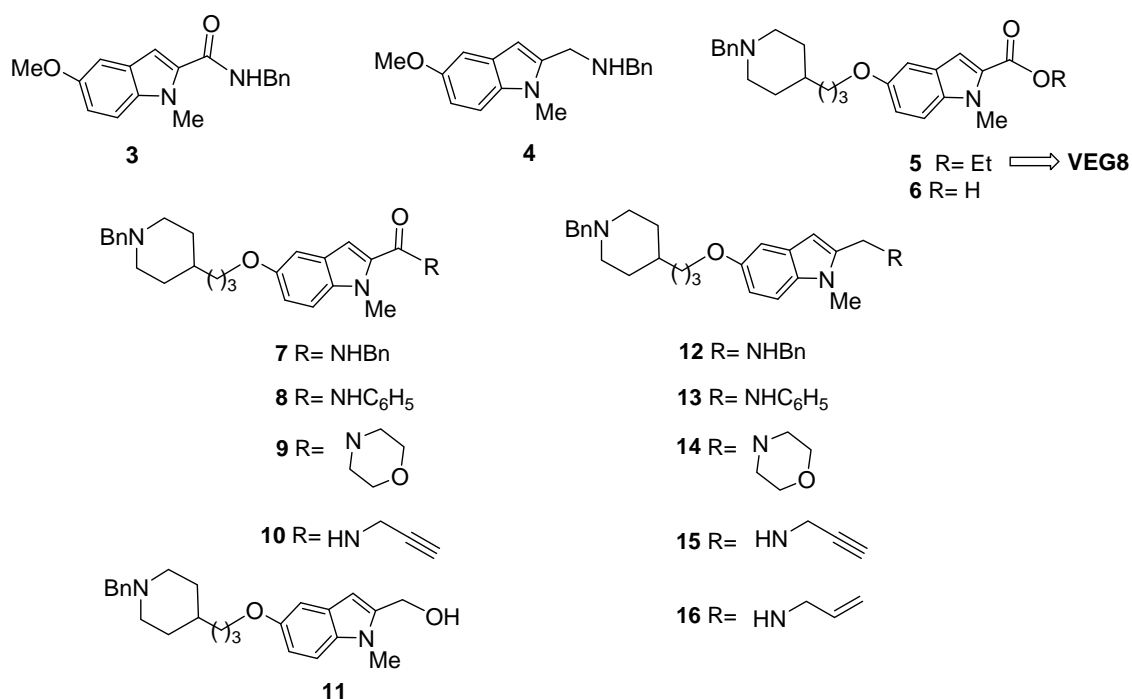




RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  *g*-HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) de **VEG8**

## II. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS, DISCUSIÓN DE ESTOS RESULTADOS Y LAS CONCLUSIONES FINALES

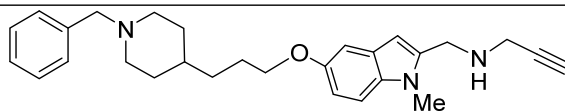
**Publicación 1.** Oscar M. Bautista-Aguilera et al. **Design, synthesis, pharmacological evaluation, QSAR analysis, molecular modeling and ADMET of novel donepezileindolyl hybrids as multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease**, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 82-95.



**Figura 27.** Estructura de aminas las **7-10**, las amidas **12-16**, y **5**, **6** y **11**, derivados del ácido 1-methyl-1*H*-indol-2-carboxílico.

En este trabajo se ha llevado a cabo el diseño, síntesis y evaluación farmacológica de las amidas **7-10**, y las aminas **12-16** (Figura 27) basadas en el motivo donepezil-indol, y los derivados de ácidos carboxílicos **5**, **6** y **11**, como análogos multipotentes de **ASS234**, capaces de inhibir simultáneamente las enzimas colinesterasas (ChE's) y monoamino oxidasas (MAOs) para el tratamiento potencial de la EA. Se han utilizado modelos teóricos (3D-QSAR) para definir los farmacóforos 3D para la inhibición de enzimas MAO A/B, y las enzimas AChE/ BuChE. Hemos

encontrado que, en general, y para el mismo sustituyente, las aminas son más potentes inhibidores de las ChEs (ver compuestos **12**, **13** frente a **7** y **8**) o equipotentes (ver compuestos **14**, **15** frente a **9** y **10**) que las correspondientes amidas, que muestran una clara selectividad para la inhibición en *EeAChE*. Para la inhibición de la MAO, se ha observado que las amidas no son activas, y entre las aminas, el compuesto **14** es totalmente selectiva para MAO A, mientras que las aminas **15** y **16** son más selectivas para MAO A que a MAO B. los derivados de ácidos carboxílicos **5** y **11** mostraron un moderado perfil multipotente selectivo como inhibidores *EeAChE* y MAO A. La propargilamina **15** [*N*-((5-(3-(1-bencilpiperidin-4-il)propoxi)-1-metil-1*H*-indol-2-il)metil)prop-2-in-1-amina] resultó ser el inhibidor más potente de hMAO A ( $IC_{50} = 5,5 \pm 1,4$  nM) e inhibidor moderadamente potente de hMAO B ( $IC_{50} = 150 \pm 31$  nM), *EeAChE* ( $IC_{50} = 190 \pm 10$  nM), y eqBuChE ( $IC_{50} = 830 \pm 160$  nM). Sin embargo, los *N*-alil, y *N*-morfolin derivados **16** y **14** también merecen atención, ya que muestran un perfil multipotentes atractivo. En resumen, el híbrido donepezilo-indol **15** es un fármaco multipotente, y prometedor para el desarrollo de la prevención y el tratamiento potencial de la EA.

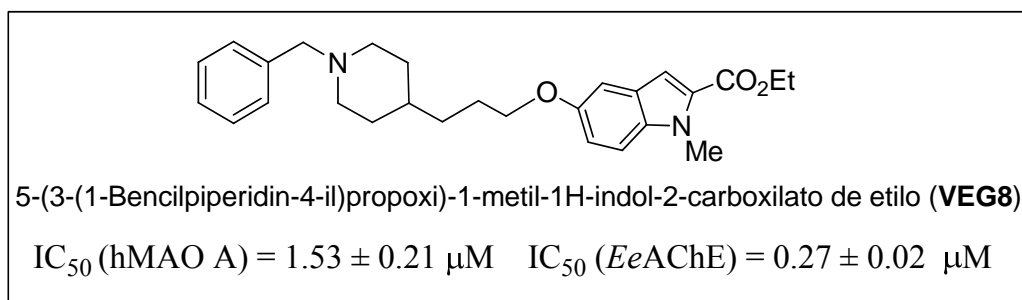


*N*-((5-(3-(1-Bencilpiperidin-4-il)propoxi)-1-metil-1*H*-indol-2-il)metil)prop-2-in-1-amina (**15**)

$$IC_{50}(\text{hMAO A}) = 5.5 \pm 1.4 \text{ nM} \quad IC_{50}(\text{EeAChE}) = 190 \pm 10 \text{ nM}$$

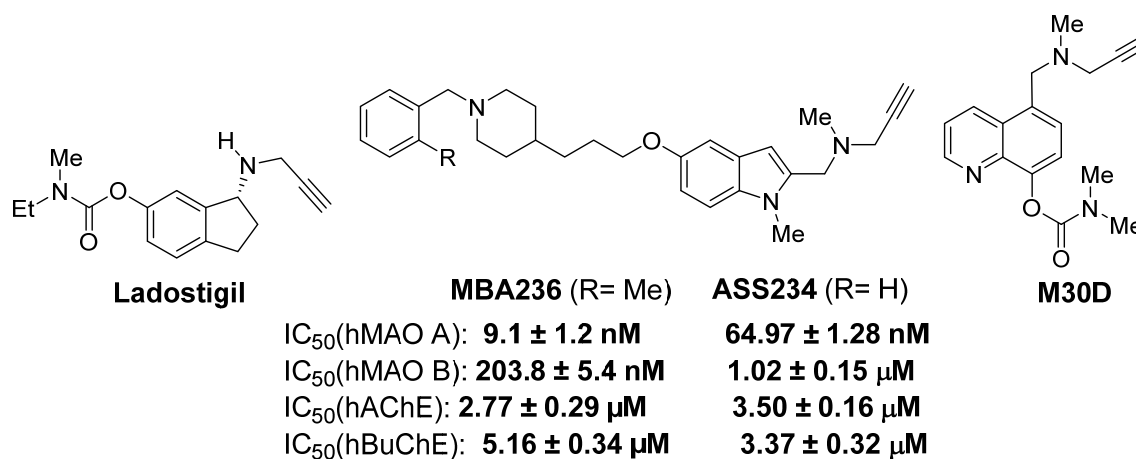
$$IC_{50}(\text{hMAO B}) = 150 \pm 31 \text{ nM} \quad IC_{50}(\text{eqBuChE}) = 830 \pm 160 \text{ nM}$$

- Nuevo inhibidor MAO+ChE
- Híbrido donepezilo-indol para la EA
- El híbrido donepezilo-indol **15** es un potente inhibidor de hMAO A
- El compuesto **15** es un inhibidor moderado de hMAO B, *EeAChE* y eqBuChE
- Se usó el modelo 3D-QSAR para definir farmacóforos 3D como inhibidores



En este trabajo también se identificó el compuesto **VEG8**, un interesante inhibidor multipotente de MAO/ChE, que se utilizó en un estudio (ver **publicación 5**) de predicción y confirmación de nuevas dianas “*off-target*”.

**Artículo 2.** Oscar M. Bautista-Aguilera et al., *N-Methyl-N-((1-methyl-5-(3-(1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-yl)propoxy)-1H-indol-2-yl)methyl)prop-2-yn-1-amine, a New Cholinesterase and Monoamine Oxidase Dual Inhibitor*, *J. Med. Chem.*



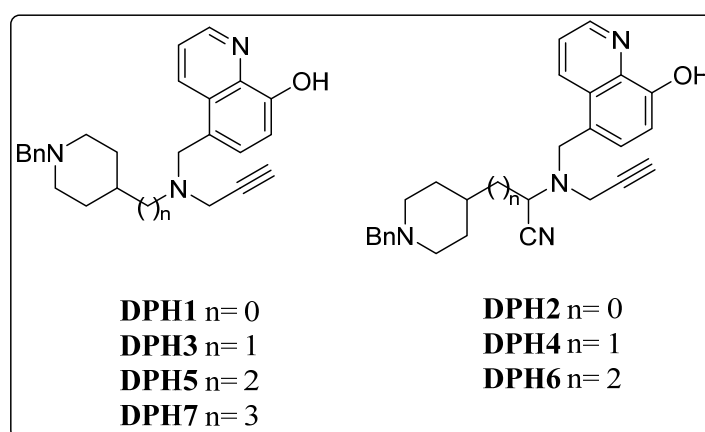
**Figura 28.** Estructura de **ladostigil**, **M30D**, **MBA236**, y **ASS234**, y valores de  $IC_{50}$  de estos dos últimos para la inhibición de las MAO y ChEs.

En este trabajo se ha descrito la síntesis y evaluación biológica de 19 nuevos híbridos del tipo donepezilo-indol, como agentes multipotentes para la EA, capaces de inhibir simultáneamente los enzimas MAO y ChEs, y diseñados a partir de estudios QSAR, y del inhibidor de MAO B, **PF9601N**, y del compuesto-*hit* multipotente **ASS234**, híbridos utilizados como referencia en el proceso de optimización que nos debería conducir a un nuevo compuesto-*lead* para estudios *in vivo* avanzados y fase pre-

clínica del desarrollo del fármaco. Así, hemos podido identificar el híbrido *N*-metil-*N*-((1-metil-5-(3-(1-(2-metilbencil)piperidin-4-il)propoxi)-1*H*-indol-2-il)metil)prop-2-in-1-amina (**MBA236**) como un nuevo y optimizado inhibidor de MAO multipotente.

Tal como se muestra en la figura 28, por los valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición de los enzimas MAO/ChEs, se confirma la calidad y poder de predicción de los modelos 3D de farmacofóro QSAR optimizados, que podrían eventualmente ser utilizados para diseñar nuevos híbridos donepezilo-indol. Y así, el híbrido **MBA236** se comporta como un inhibidor irreversible de hMAO A, potente en el rango nanomolar, siete veces más potente que **ASS234**, y 22 veces más selectivo para hMAO A respecto de hMAO B. La inhibición de las ChEs por **MBA236** se sitúa en el rango micromolar, ligeramente mejor que **ASS234** para hAChE, aunque escasamente peor que para hBuChE. Por los valores de IC<sub>50</sub> es cierto que en **MBA236** se observa un desequilibrio entre los valores nM para MAO, y los μM para las ChEs, pero como recientemente se ha señalado en el contexto del diseño de moléculas multipotentes: “*we do not even know how much potency at each single target is required and what the desired balance is between the potencies*” (Prati, F.; Uliassib, E.; Bolognesi, M. L. Two diseases, one approach: multitarget drug discovery in Alzheimer's and neglected tropical diseases. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 853-861). De los estudios de modelización molecular se concluye que **ASS234** y **MBA236** se unen de forma muy similar a los centros activos de las cuatro enzimas investigadas. Sin embargo, en hBuChE, el grupo *o*-Me en el compuesto **MBA236** mejora el reconocimiento del ligando al aumentar la interacción hidrofóbica ligando-enzima, y la interacción  $\pi$ - $\pi$  *stacking*, en hMAO A, hMAO B y hAChE. Por lo tanto, es obvio que una modificación funcional y estructural tan simple, como ha sido la sustitución de un H por un grupo *o*-Me en el anillo de fenilo en el motivo *N*-bencilpiperidinio, resultó en cambios farmacológicos muy significativo, cualitativa y cuantitativamente, en la inhibición de las MAO y ChE. Finalmente, el análisis ADMET virtual predice que el inhibidor **MBA236** debería no ser hepatotóxico, sin incidencia cardíaca (*hERG liability*), y presentar una bio-disponibilidad buena y similar a la de **ASS234**, con mejor capacidad para penetrar la barrera hematoencefálica. En suma, con este trabajo hemos superado de largo nuestras expectativas iniciales, ya que hemos identificado un nuevo, fácilmente asequible, permeable inhibidor multipotente dual de los enzimas MAO y ChEs. De hecho, sus propiedades farmacológicas, muy próximas a

alás de **ladostigil** (Yogev-Falach, M.; Bar-Am O.; Amit, T.; Weinreb, O.; Youdim, M. B. H. A multifunctional, neuroprotective drug, ladostigil (TV3326), regulates holo-APP translation and processing. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2177–2179) y **M30D** (Zheng, H.; Fridkin, M.; Youdim, M. B. H. Site-activated chelators derived from anti-Parkinson drug rasagiline as a potential safer and more effective approach to the treatment of Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **2010**, *35*, 2117–2123) (Figure 28), nos van a permitir afrontar con cierto optimismo los estudios *in vivo*, como prueba de concepto definitiva, para la posible traslación del compuesto **MBA236**, hacia estudios pre-clínicos para el posible tratamiento de la EA o Parkinson.

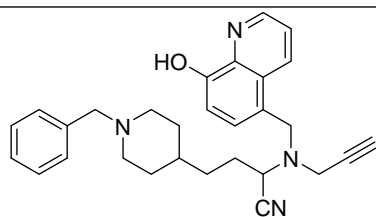


**Figura 29.** Estructura de los híbridos Donepezilo+Propargilamina + 8-Hidroxiquinolina (DPH) 1-6.

**Publicación 3.** Oscar M. Bautista-Aguilera et al. Donepezil+Propargylamine+8-Hydroxyquinoline Hybrids as New Multifunctional Metal-Chelators, ChE and MAO Inhibitors for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 543-541.

En este trabajo se describió la síntesis, evaluación bioquímica, análisis ADMET, la hepatotoxicidad y modelización molecular de los nuevos híbridos multi-target-directed Donepezilo + Propargilamina + 8-Hidroxiquinolina (DPH) 1-7 (Figura 29) para la prevención y el tratamiento potencial de la EA. El derivado más interesante fue el racémico  $\alpha$ -aminotrile4-(1-bencilpiperidin-4-il)-2-(((8-hidroxiquinolin-5-il)metil)(prop-

2-in-1-il)amino)butanenitrilo (**DPH6**) [MAO A ( $IC_{50}= 6.2 \pm 0.7 \mu M$ ; MAO B ( $IC_{50}= 10.2 \pm 0.9 \mu M$ ); *EeAChE* ( $IC_{50}= 1.8 \pm 0.1 \mu M$ ); eqBuChE ( $IC_{50}= 1.6 \pm 0.25 \mu M$ )], un inhibidor irreversible MAO A/B, e inhibidor tipo mixto de AChE con propiedad quelante de metales. Según estudios de docking, ambos enantiómeros de **DPH6** interactúan simultáneamente con el sitio catalítico y periférico de *EeAChE* a través de un espaciador de longitud apropiada. Ambos enantiómeros presentan una posición relativamente similar de los grupos hidroxiquinolina y bencilo, mientras la molécula se sitúa bien acomodado en la cavidad de entrada, relativamente grande, de MAO A. Para MAO B, el núcleo de quinolina se encuentra en la entrada de la cavidad mientras que en MAO A ocupa la cavidad del sustrato, interactuando directamente con el anillo aromático del FAD del sitio activo. También se observaron valores de la afinidad de unión muy similares para ambos enantiómeros con las enzimas ChE y MAO. Los derivados **DPH** exhiben de moderada a buenas propiedades ADMET y capacidad para pasar la barrera hematoencefálica, lo que facilita la actividad en el SNC. **DPH6** es menos tóxico que donepezilo en altas concentraciones; mientras que a bajas concentraciones, muestra un perfil de viabilidad celular similar. Finalmente, el efecto antiamnésico de **DPH6** fue probado en ratones con amnesia inducida experimentalmente, observando que **DPH6** es capaz de reducir significativamente los déficits de aprendizaje inducidos por escopolamina en ratones adultos sanos.



[ratMAO A ( $IC_{50}= 6.2 \pm 0.7 \mu M$ ; ratMAO B ( $IC_{50}= 10.2 \pm 0.9 \mu M$ )  
*EeAChE* ( $IC_{50}= 1.8 \pm 0.1 \mu M$ ); eqBuChE ( $IC_{50}= 1.6 \pm 0.2 \mu M$ )]

(±)-4-(1-Bencilpiperidin-4-il)-2-(((8-hidroxiquinolin-5-il) methyl)(prop-2-in-1-il)amino)butanenitrilo (**DPH6**) es un inhibidor irreversible de MAO-A y MAO-B, y un inhibidor mixto de AChE, además de presentar propiedades quelantes de biometales.

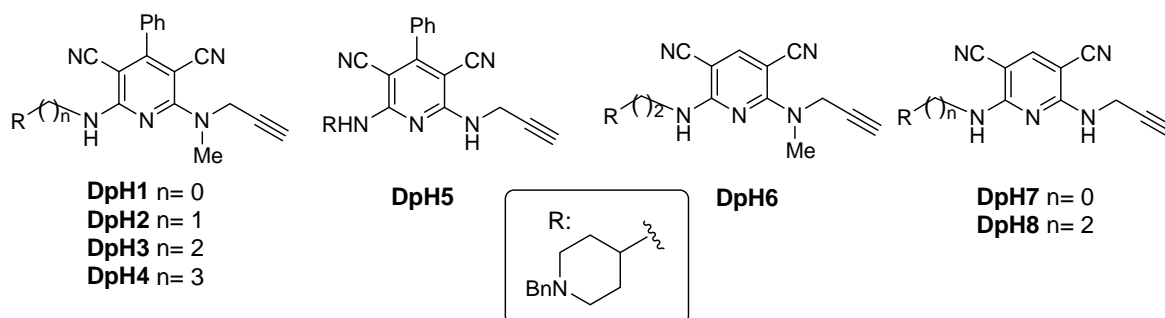
- Nuevo inhibidor MAO+ChE
- Híbrido Donepezilo+Propargil+8-Hidroxiquinolina para la EA
- **DPH6** es un inhibidor moderado MAO A/ B, *EeAChE* y eqBuChE
- **DPH6** es un inhibidor reversible MAO A/ B

- **DPH6** disminuye y revierte el déficit de aprendizaje inducido por escopolamina en ratones adultos sanos.

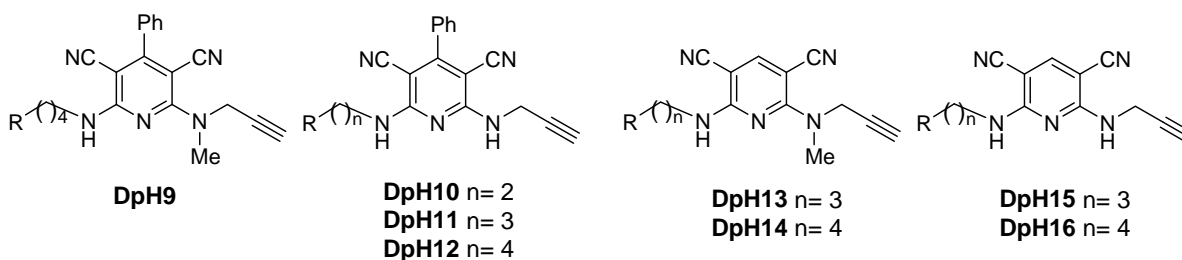
**Artículo 4.** Oscar M. Bautista-Aguilera et al. **Multipotent Cholinesterase/Monoamine Oxidase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Design, Synthesis, Biochemical Evaluation, ADMET, Molecular Modeling and QSAR Analysis of Novel Donepezil-Pyridyl Hybrids**, *Drug, Design, Development and Therapy, en prensa*

#### DpH descritos anteriormente por nuestro grupo de trabajo

Samadi A, Chioua M, Bolea I, et al. Synthesis, biological assessment and molecular modeling of new multipotent MAO and cholinesterase inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2011;46(9):4665-4668.



#### Nuevos DpH desarrollados en esta Tesis Doctoral:



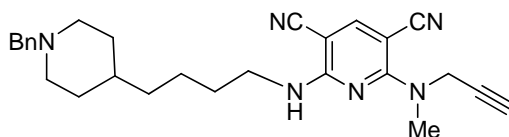
**Figura 30.** Estructura de los **Híbridos Donepezilo+piridina (DpH) 1-16.**

»

En este trabajo se ha llevado a cabo el diseño, síntesis y evaluación bioquímica de los nuevos **Híbridos Donepezilo-piridina (DpH) 9-16** (Figura 30) como inhibidores multipotentes de ChE y MAO, para el potencial tratamiento de la EA. El estudio 3D-QSAR se utilizó para definir farmacóforos 3D para la inhibición de enzimas MAO A/B, AChE, BuChE y diseñar **DpHs** como nuevos fármacos para la terapia de la EA. **DpH14** (*EeAChE*:  $IC_{50} = 0.0011 \pm 0.0003 \mu M$ ; *eqBuChE*:  $IC_{50} = 0.60 \pm 0.08 \mu M$ ) fue



318 veces más potente para la inhibición de AChE, y 1.3 veces menos potente para la inhibición de BuChE que **ASS234**, compuesto de referencia. **DpH14** es un inhibidor potente hBuChE, en el mismo rango que **DpH12** o **DpH16**, pero 13.1 veces menos potente que **DpH15** para la inhibición de hAChE. En comparación con donepezilo, **DpH14** es casi equipotente para la inhibición de hAChE, y 8.8 veces más potente para inhibir hBuChE. Para hMAO B, solo los **DpHs 13** y **14** fueron inhibidores, y moderados, y **DpH14** el más potente [ $IC_{50}$  (MAO B) =  $3.95 \pm 0.94 \mu\text{M}$ ]. El estudio de modelización molecular del inhibidor **DpH14** en *EeAChE* mostró que el compuesto se une simultáneamente a ambos sitios catalítico y periférico del enzima, gracias al espaciador de longitud apropiada. El análisis ADMET predice que las estructuras que carecen del grupo fenilo serán las que presenten mejores perfiles biológicos como fármacos; en particular, los **DpHs 13-15** son los que presentan propiedades ADMET más adecuadas. En resumen, el nuevo híbrido donepezilo-piridina **DpH14** es un potente y moderadamente selectivo inhibidor de hAChE, y un inhibidor irreversible selectivo de hMAO B, que podría considerarse como un compuesto prometedor para un mayor desarrollo, para el tratamiento de la EA.



2-((4-(1-Bencilpiperidin-4-il)butyl)amino)-6-(metil(prop-2-in-1-il)amino)piridina-3,5-dicarbonitrile (**DpH14**)

$IC_{50}$  (hMAO B)=  $3.95 \pm 0.94 \mu\text{M}$ ;

$IC_{50}$  (*EeAChE*)=  $0.0011 \pm 0.0003 \mu\text{M}$ ;  $IC_{50}$  (eqBuChE)=  $0.60 \pm 0.08 \mu\text{M}$

- Nuevo inhibidor multipotente MAO+ChE.
- Híbridos Donepezilo-piridina para la EA
- **DpH14** es un inhibidor potente de AChE y moderado de MAO B
- 3D-QSAR se usó para definir farmacóforos-3D adecuados.

**Publicación 5.** Oscar M. Bautista Aguilera, et al. **Wnt Signaling Pathway, a Potential Target for Alzheimer's Disease Treatment, is Activated by a Novel Multitarget Compound ASS234**, *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2014**, *20*, 568-570.

En este trabajo de investigación el objetivo fue determinar si el compuesto **ASS234** era capaz de actuar sobre una importante vía de señalización celular denominada *Wingless-Type MMTV integration site family (Wnt)*.

Estudios recientes han evidenciado que la *vía Wnt* tiene un destacado papel en procesos implicados en el neurodesarrollo, tales como la migración neuronal, la diferenciación y plasticidad sináptica, y la modulación de la maduración sináptica, lo cual nos induce a pensar que la activación de esta vía podría tener un potencial terapéutico frente a enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA).<sup>1</sup>

En la actualidad, no existe cura para la EA y se desconocen los mecanismos moleculares que conducen al inicio y desarrollo de la enfermedad. Estudios previos indican que la disfunción de la señalización *Wnt*, inducida por el péptido  $\beta$ -amiloide, contribuye a la progresión de la enfermedad.<sup>2,3</sup> Asimismo, la activación persistente de la señalización *Wnt* mediante ligandos o la inhibición de reguladores negativos, es capaz de revertir los efectos tóxicos inducidos por el péptido  $\beta$ -amiloide y mejorar el rendimiento cognitivo en la EA.<sup>2-4</sup> Estos datos sugieren que la vía de señalización *Wnt* puede ser una posible diana terapéutica para la EA.

La señalización *Wnt* se clasifica como canónica o no canónica en función de la participación de la vía  $\beta$ -catenina. Así, la señalización canónica *Wnt* es dependiente de la vía  $\beta$ -catenina, mientras que la señalización *Wnt* no canónica implica vías de señalización independientes de  $\beta$ -catenina, que comprenden diferentes tipos de ligandos y receptores *Wnt*, tales como *Wnt-4*, *Wnt-5*, *Wnt-11*, etc.

Así, pues, en este trabajo nos propusimos determinar si **ASS234** es capaz de activar esta vía de señalización, y por tanto evidenciar otra posible diana terapéutica que nos permitiría mitigar desde otro punto de vista los efectos deletéreos que se producen en la EA.

Para ello, se empleó un modelo *in vitro* de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, incubadas durante 24 h con el compuesto **ASS234**, a una concentración de 5  $\mu$ M. A continuación, y tras llevar a cabo la extracción de ARN en cultivo se procedió a l

un análisis de expresión génica de aquellos miembros integrantes, tanto de la vía canónica (*Wnt-1*, *Wnt-2b*, *Wnt-3a*) como de la no canónica (*Wnt-5a*, *Wnt-6*).

Tras la incubación durante 24 h de **ASS234** se observó un aumento estadísticamente significativo de los genes *Wnt-2b*, *Wnt-5a* y *Wnt-6*. Además, uno de los genes relacionados, que también pudimos explorar tras el análisis de expresión génica, el factor de transcripción nuclear PPAR $\delta$  (*peroxisome proliferator-activated receptor*) incrementó su expresión de manera estadísticamente significativamente. Esta última observación, además de la activación de la vía de señalización por parte de **ASS234**, es de gran interés, ya que se trata de un factor de transcripción clave relacionado con efectos neuroprotectores en la EA.<sup>5</sup>

El aumento de la expresión de estos genes en nuestro modelo *in vitro* corrobora datos de trabajos recientes que ponen de manifiesto las acciones neuroprotectoras que se producen como consecuencia de la activación *Wnt-5a*,<sup>6</sup> indispensable además por el factor crecimiento axonal para el buen desarrollo y ramificación axonal, y la activación de *Wnt-2b* que juega un destacado papel en procesos de neurogénesis.<sup>7</sup>

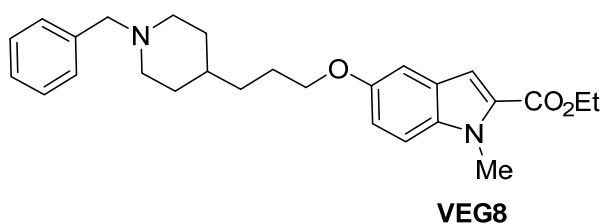
De estos resultados, se concluye que el compuesto multipotente **ASS234** es capaz de inducir la vía de señalización celular *Wnt*, lo cual representaría otro posible mecanismo a través del cual esta molécula media sus efectos neuroprotectores. Teniendo en cuenta estudios que evidencian que la activación de esta vía de señalización retarda la pérdida de memoria y mejora la disfunción sináptica en la patología de la EA,<sup>8</sup> a falta de validar estos resultados *in vivo*, se confirma que **ASS234** es una molécula prometedora para la terapia de la EA.

## Referencias

1. S. B. Rosso and N. C. Inestrosa, "WNT signaling in neuronal maturation and synaptogenesis," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 7, article 103, 2013.
2. N. C. Inestrosa, C. Montecinos-Oliva, and M. Fuenzalida, "Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia," *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, vol. 7, no. 4, pp. 788–807, 2012.
3. A. R. Alvarez, J. A. Godoy, K. Mullendorff, G. H. Olivares, M. Bronfman, and N. C. Inestrosa, "Wnt-3a overcomes  $\beta$ -amyloid toxicity in rat hippocampal neurons," *Experimental Cell Research*, vol. 297, no. 1, pp. 186–196, 2004.
4. A. Shruster, H. Eldar-Finkelman, E. Melamed, and D. Offen, "Wnt signaling pathway overcomes the disruption of neuronal differentiation of neural progenitor cells induced by oligomeric amyloid  $\beta$ -peptide," *Journal of Neurochemistry*, vol. 116, no. 4, pp. 522–529, 2011.

5. Kim HJ, Hama SA, Paek KS, et al. Transcriptional up-regulation of antioxidant genes by PPAR $\delta$  inhibits angiotensin II-induced premature senescence in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406:564–569.
6. W.Cerpa, G. G. Farias, J. A. Godoy, M. Fuenzalida, C. Bonansco, and N. C. Inestrosa, “Wnt-5a occludes A $\beta$  oligomer-induced depression of glutamatergic transmission in hippocampal neurons,” *Molecular Neurodegeneration*, vol. 5, no. 1, article 3, 2010.
7. Zhang Y, Mei P, Lou R, Zhang MQ, Wu G, Qiang B, Zhang Z, Shen Y. Gene expression profiling in developing human hippocampus. *J Neurosci Res*. 2002 Oct 15;70(2):200-8.
8. Vargas JY, Fuenzalida M, Inestrosa NC. In vivo activation of Wnt signaling pathway enhances cognitive function of adult mice and reverses cognitive deficits in an Alzheimer’s disease model. *J Neurosci* 2014;34:2191–2202.

**Artículo 6.** Oscar M. Bautista-Aguilera et al. **Predicting targets of multipotent compounds against neurological diseases using cheminformatic methodology,** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, enviado para publicar.



**Figura 31.** Estructura de 5-(3-(1-bencilpiperidin-4-il)propoxi)-1-metil-1H-indol-2-carboxilato de etilo (**VEG8**).

A partir de la base de datos de moléculas bioactivas (ChEMBL) y los protocolos usuales para la predicción de la unión proteína(diana)-ligando, en este trabajo hemos identificado las posibles dianas asociadas a 134 compuestos multipotentes, capaces de interactuar con los enzimas MAO A y B, AChE, BuChE, con la histamina N-metiltransferasa (HMT) o la el receptor de histamina H3, para el posible tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Como resultado, nos hemos encontrado con una combinación esperada e inesperada de dianas para los ligandos multipotentes ensayados. La muy buena correlación entre datos experimentales y predicciones *in silico*, entre las dianas primarias previstas y los resultados experimentales *in vitro* para

los ligandos en MAO/ChE y H3R/HMT/AChE, confirma la alta precisión y fiabilidad de la metodología quimio-informática aquí empleada.

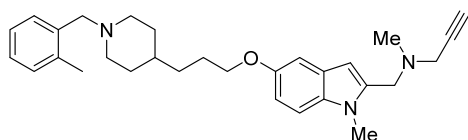
Para nuestro compuesto, el **VEG8**, por ejemplo, un inhibidor multipotente de MAO/ChE, descrito por nosotros (**ver publicación P1**), este método quimio-informático ha designado diversos receptores de serotonina (5-HT1aR, 5-HT2aR, 5-HT2cR, 5-HT5aR, D1R) como posibles dianas “*off-targets*”.

Y en efecto, el compuesto **VEG8**, con las predicciones 5-HT2aR y 5-HT1aR más altas ha sido examinado en un experimento *in vitro* para 5-HT2aR y 5-HT1aR, confirmado con los resultados [ $K_i$  (5-HT2aR) = 14,2 nM y  $K_i$  (5-HT1aR) = 108 nM] la afinidad relativamente fuerte del inhibidor con dichos receptores.

### III. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

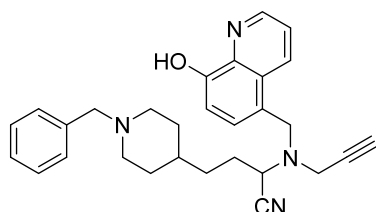
Del trabajo hecho en esta Tesis Doctoral, yo destacaría tres compuestos, a modo de resultados más interesantes, y de posible proyección futura:

#### 1.º Híbrido **MBA236**,



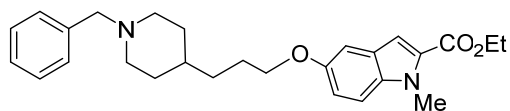
sin duda el más interesante de todos los híbridos “donepezilo+indol” que hemos sintetizado en nuestro laboratorio, hasta la fecha, ya que se comporta como un inhibidor irreversible, muy potente y selectivo de hMAO A, además de un potente, en el rango micromolar, inhibidor cuasi equipotente de hAChE, frente a hBuChE, con buena permeabilidad a la BHE. Hay que abordar a corto plazo *el estudio in vivo en ratas transgénicas (inhibición de la agregación de A $\beta$ , para dar las placas seniles), y experimentos de conducta y de reconocimiento de objetos para el estudio de la reversión del efecto de escopolamina.*

#### 2.º. Compuesto **DPH6**,



un inhibidor irreversible de MAO A y MAO B, y un inhibidor mixto de AChE, además de presentar propiedades quelantes de biometales. *Proyecto para abordar la síntesis asimétrica de cada enantiómero, o la separación de los enantiómeros a partir del racémico.*

#### 3.º Molécula **VEG8**,



un inhibidor multipotente, selectivo de hMAO A, *EeAChE* y que actúa sobre receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>2aR</sub>; 5-HT<sub>1aR</sub>). *Sería de interés la modificación apropiada y racional de este compuesto para analizar su capacidad para actuar el receptor H<sub>3</sub> de histamina (en progreso).*

## IV. OTROS TRABAJOS Y ACTIVIDADES DEL AUTOR

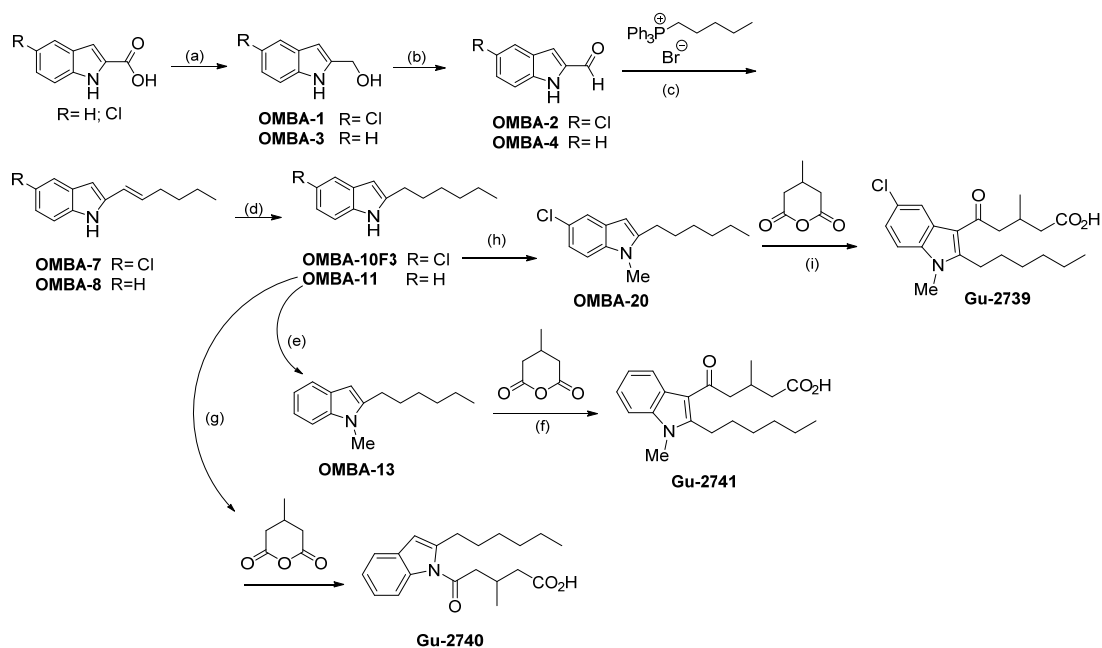
### 1. Otros trabajos científicos

Durante el desarrollo mi Tesis Doctoral, he tenido la oportunidad de colaborar en otro proyecto (“*Nuevos análogos no tóxicos de tacrina para su potencial utilización para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*”) dirigido y coordinado por el Dr. Marco-Contelles. Mi participación, junto con otros resultados se han incluido en un artículo: “M. Chioua, M. Pérez, **O. M. Bautista-Aguilera**, M. Yañez, M. G. López A. Romero, R. Cacabelos, S. Brogi, S. Butini, J. I. Borrell, and J. Marco-Contelles, **Multipotent hupertacrines as non-toxic, cholinesterase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer’ s disease**”, que ha sido sometido para su publicación en la revista *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, por invitación de los Editores Asociados Prof. M. N. D. S. Cordeiro, Dr. Alejandro Speck-Planche, para el número especial titulado: “**Multi-target Drug Discovery in Medicinal Chemistry: Current Status and Future Perspectives**”, y que en este momento se encuentra aún en revisión.

### 2. Resumen del trabajo realizado durante mi estancia (01-Marzo/30-Junio de 2014) en el laboratorio del Prof. Michael Gütschow (Instituto de Farmacia, Universidad de Bonn, Alemania)

Con la ayuda del MINECO (*Estancias breves en el Extranjero*) durante el disfrute de mi Beca pre-Doctoral, realicé una estancia de cuatro meses en el laboratorio del Prof. Gütschow, cuyo resumen adjunto a continuación, y que ha sido de gran valor para mi formación y experiencia científica.

El proyecto que se me asignó era la síntesis y evaluación biológica de nuevos antagonistas del receptor OXO. El receptor OXO, es un tipo de receptor de la familia de proteínas G, acopladas a membrana, altamente específico al 5-OXO-ETE, el cual es su ligando endógeno. Aunque el rol biológico que juega el 5-OXO-ETE no ha sido claramente demostrado, se cree que desempeña un papel importante en la entrada de calcio al interior de células como neutrófilos, basófilos y monocitos, proceso que puede afectar a diferentes patologías, como asma, cáncer y enfermedades cardiovasculares.<sup>1-4</sup>



**Scheme. Reagents and conditions:**

(a).  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 0 °C, rt; (b).  $\text{MnO}_2$ , EtOAc, rt; (c). LiHMDS, THF, -78 °C, rt; (d) 10% Pd/C,  $\text{H}_2$ , EtOH, rt; (e).  $\text{CH}_3\text{I}$ , KOH, DMSO, rt; (f)  $\text{Me}_2\text{AlCl}$  (1M in hexane), DCM, rt; (g) EtMgBr (3M in  $\text{Et}_2\text{O}$ ), THF; (h)  $\text{CH}_3\text{I}$ , NaH, DMF; (i)  $\text{Me}_2\text{AlCl}$  (1M in hexane), DCM, 0 °C-rt.

En el esquema adjunto se muestra la estructura de los compuestos sintetizados, que en estos momentos están siendo evaluados por la Dra. Evi Kostenis.

**Referencias**

- Grant, G. Roka, J & Powell, W. 5-Oxo-ETE and the OXE receptor. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* **2009**, *89*, 98-104.
- Gore, V., Patel, P., Chang, C.-T., Sivendran, S., Kang, N., Ouedraogo, Y.P., Gravel, S., Powell, W.S., Rokach, J. 5-Oxo-ETE receptor antagonista. *Journal of Medicinal Chem.* **2013**, *56*, 3725-3732.
- Horne, D.B., Tamayo, N.A., Bartberger, M.D., Bo, Y., Clarine, J., Davis, C.D., Gore, V.K., Kaller, M.R., Lehto, S.G., Ma, V.V., Nishimura, N., Nguyen, T.T., Tang, P., Wang, W., Youngblood, B.D., Zhang, M., Gavva, N.R., Monenschein, H., Norman, M.H. 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced activation of neutrophils and eosinophils by novel indole oxe receptor antagonista. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 364-377.
- Kerrigan, J & Vagoni, L. Effect of the amino versus the acylamino substituent on the product isomer distribution in the methanolysis of 5-(substituted)-2-[(methylsulfanyl)oxy]isoindole-1,3-diones. *Tetrahedron* 2001, *57*, 8227-8235 (2001).



**V. COPIA COMPLETA DE LOS TRABAJOS *PUBLICADOS* o *ACEPTADOS* o *ENVIADOS* PARA SU PUBLICACIÓN, HACIENDO CONSTAR EL NOMBRE DE TODOS LOS CO-AUTORES DE LOS TRABAJOS Y LA REFERENCIA COMPLETA DE LA REVISTA EN QUE LOS TRABAJOS ESTÉN PUBLICADOS O ADMITIDOS PARA SU PUBLICACIÓN**

### **PUBLICADOS o ACEPTADOS**

**Publicación 1.** Oscar M. Bautista-Aguilera, G. Esteban, I. Bolea, K. Nikolic, D. Agbaba, I. Moraleda, I. Iriepa, A. Samadi, E. Soriano, M. Unzeta, J. Marco-Contelles, **Design, synthesis, pharmacological evaluation, QSAR analysis, molecular modeling and ADMET of novel donepezileindolyl hybrids as multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease**, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 82-95.

**Publicación 3.** L. Wang, G. Esteban, M. Ojima, Oscar M. Bautista-Aguilera, T. Inokuchi, I. Moraleda, I. Iriepa, A. Samadi, M. B. H. Youdim, A. Romero, E. Soriano, R. Herrero, A. P. Fernández-Fernández, R. Martínez-Murillo, J. Marco-Contelles, M. Unzeta, **Donepezil+Propargylamine+8-Hydroxyquinoline Hybrids as New Multifunctional Metal-Chelators, ChE and MAO Inhibitors for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease**, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 543-541.

**Publicación 5.** J. del Pino, E. Ramos, Oscar M. Bautista Aguilera, J. Marco-Contelles, Al. Romero, **Wnt Signaling Pathway, a Potential Target for Alzheimer's Disease Treatment, is Activated by a Novel Multitarget Compound ASS234**, *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2014**, *20*, 568-570.

**Artículo 4.** Oscar M. Bautista-Aguilera, Gerard Esteban, Mourad Chioua, Katarina Nikolic, Danica Agbaba, Ignacio Moraleda, Isabel Iriepa, Elena Soriano, Abdelouahid Samadi, Mercedes Unzeta, José Marco-Contelles, **Multipotent Cholinesterase/Monoamine Oxidase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Design, Synthesis, Biochemical Evaluation, ADMET, Molecular Modeling and QSAR Analysis of Novel Donepezil-Pyridyl Hybrids**, *Drug, Design, Development and Therapy*, *en prensa*

### **ENVIADOS**

**Artículo 2.** Oscar M. Bautista-Aguilera, Abdelouahid, Samadi, Mourad Chioua, Katarina Nikolic, Slavica Filipic, Danica Agbaba, Elena Soriano, Stefano Alcaro, Rona R. Ramsay, Francesco Ortuso, Matilde Yañez, José Marco-Contelles, **N-Methyl-N-((1-methyl-5-(3-(1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-yl)propoxy)-1H-indol-2-**

**yl)methyl)prop-2-yn-1-amine, a New Cholinesterase and Monoamine Oxidase Dual Inhibitor, *J. Med. Chem.***

**Artículo 6.** Katarina Nikolic, Lazaros Mavridis, **Oscar M. Bautista-Aguilera**, José Marco-Contelles, Holger Stark, Maria do Carmo Carreiras, Ilaria Rossi, Paola Massarelli, Danica Agbaba, Rona R. Ramsay, John B. O. Mitchell, **Predicting targets of multipotent compounds against neurological diseases using cheminformatic methodology**, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*