



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: Estudio del diseño y la síntesis de  
derivados de Tacrina en la enfermedad de Alzheimer**

Autor: Mónica Asensio Catalán

Tutor: Juan Francisco González Matilla

Convocatoria: Junio 2018

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b> .....	3
1.1. Etiología.....	3
1.2. Patogénesis.....	4
1.3. Cuadro clínico.....	7
1.4. Tratamientos actuales.....	7
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	8
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	8
4.1. Estructura de la enzima acetilcolinesterasa.....	9
4.2. Diseños de derivados de Tacrina.....	10
4.3. Heterodímeros 7-metoxitacrina-adamantilamina.....	14
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	18
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	19

## RESUMEN

La importancia social y económica de la enfermedad del Alzheimer (EA) hace que un gran número de investigadores en todo el mundo estén centrados en la búsqueda de una terapia efectiva frente a esta enfermedad. Las limitaciones de la terapia actual junto con la complejidad de EA han llevado al desarrollo de una nueva estrategia, basada en el estudio de ligandos multidiana (MTDL, Multi-Target-Directed Ligands), que permite el desarrollo de compuestos capaces de interactuar con más de una diana involucrada en la patogénesis de la EA. En este trabajo se reportan los últimos avances en el diseño y la síntesis de heterodímeros de 7-metoxitrarina-adamantilamina, como ejemplo de compuestos MTDL investigados actualmente, que muestran una acción eficaz frente a varias dianas terapéuticas de EA.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 1.1. Etiología

La enfermedad de Alzheimer fue descrita y diagnosticada por primera vez en 1906 por el Dr. Alois Alzheimer.<sup>1</sup> En la actualidad, esta enfermedad supone la forma de demencia más común a nivel mundial, se calcula que representa entre un 60% y un 70% de los casos. La demencia afecta a unos 50 millones de personas a nivel mundial y cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos. Debido al aumento de la esperanza de vida, la prevalencia de la enfermedad está al alza, la predicción de la OMS estima unos 82 millones de casos de demencia en 2030 y 152 millones en 2050, y el estudio Delphi proyecta unos 70-80 millones de pacientes con EA para 2050 (Figura 1).<sup>2,3</sup>

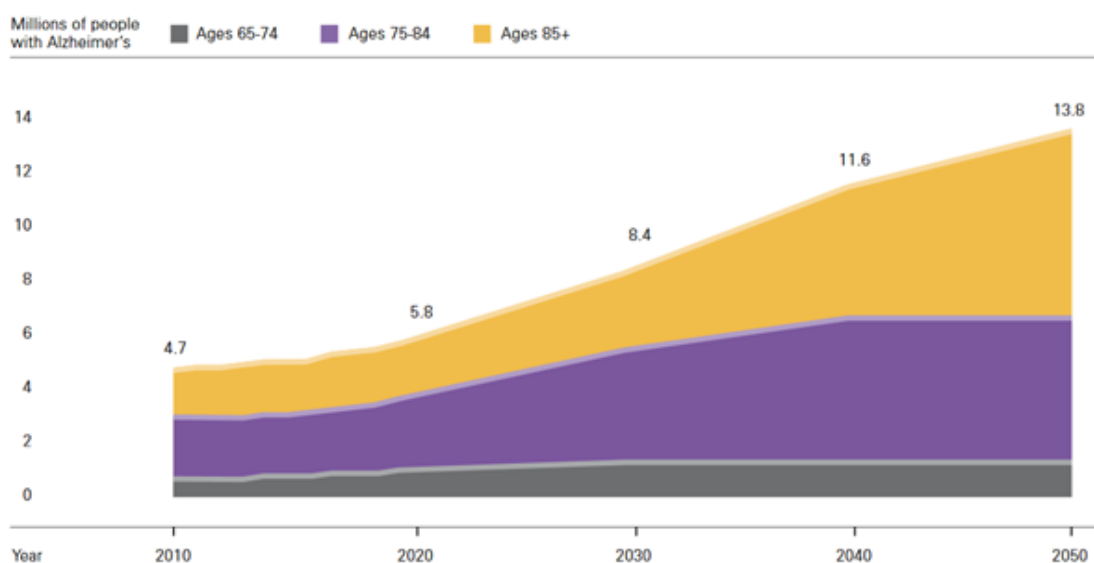


Figura 1. Proyecta el número de personas de 65 años en EE.UU. con Alzheimer desde 2010 al 2050.<sup>19</sup>

La demencia tiene importantes repercusiones sociales y económicas en lo que respecta a los costos médicos y sociales directos y a los costos referidos a la atención prestada fuera del ámbito institucional. En 2015, el costo social total de la demencia a nivel mundial se estimó en 693.500 millones de euros.<sup>2</sup>

Aunque la EA es un trastorno asociado al envejecimiento, ya que afecta principalmente a personas de edad avanzada, de entre 65 y 85 años, también puede afectar a personas más jóvenes.<sup>3</sup> Por ello, el Alzheimer se puede clasificar en dos tipos, basándose en su momento de inicio. La **EA de inicio temprano** generalmente se desarrolla antes de los 65 años y es causada por mutaciones mayoritariamente autosómicas, heredadas predominantemente en APP (cromosoma 21q), PSEN1(14q) y PSEN2 (1q). Las mutaciones dentro de estos tres genes afectan a una ruta patógena común en la síntesis y el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP), que conduce a una producción excesiva de A $\beta$  amiloide. La **EA de inicio tardío** se desarrolla en pacientes mayores de 65 años, siendo genéticamente mucho más compleja que la EA de inicio temprano con la posible participación de múltiples genes (una mutación en el alelo Apo E- $\epsilon$ 4 es el factor de riesgo genético más fuerte) y factores ambientales.<sup>4,5</sup>

Algunas investigaciones han revelado una relación entre la aparición de deterioro cognitivo y factores de riesgo relacionados con el modo de vida, como la inactividad física, la obesidad, las malas dietas, el consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol, la diabetes y la hipertensión. Otros factores de riesgo potencialmente modificables son la depresión, el bajo nivel educativo, el aislamiento social y la inactividad cognitiva.<sup>2</sup>

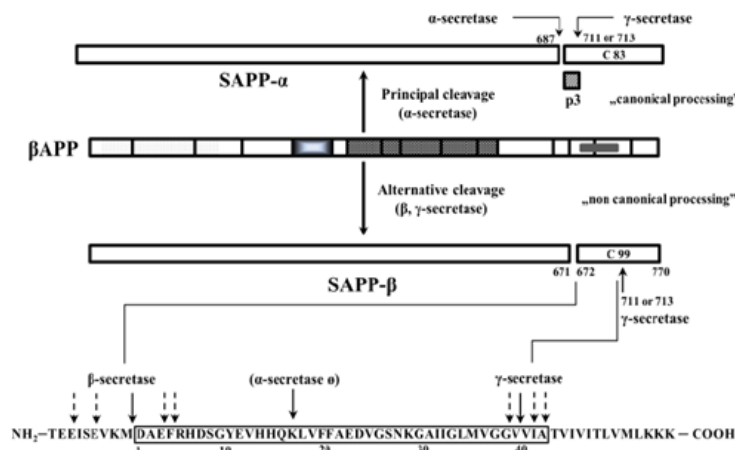
## 1.2. Patogénesis

La EA es un trastorno neurodegenerativo irreversible caracterizado por el deterioro cognitivo progresivo y la atrofia cerebral, que se inicia en el hipocampo y en las regiones temporales intermedias para posteriormente propagarse a otras áreas corticales.<sup>5</sup> Posee una patogénesis compleja, puesto que se alteran un gran número de mecanismos biológicos, entre los que se encuentran: deposición de amiloide- $\beta$ , formación de ovillos neurofibrilares intraneuronales (NTFs), neuroinflamación,<sup>1</sup> alteración de las enzimas AChE, BuChE,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa, monoaminoxidasa A y monoaminoxidasa B,<sup>6</sup> pérdida de neuronas colinérgicas y disminución de la síntesis de acetilcolina (ACh), disfunción mitocondrial, desajustes en la homeostasis del calcio y otros metales como hierro, cobre o zinc y estrés oxidativo.<sup>7</sup>

El envejecimiento es el factor de riesgo clave en esta patología multifactorial. Entre los desencadenantes más destacados encontramos la disminución progresiva de la proteostasis celular con la edad y la alteración de la capacidad del cuerpo para eliminar compuestos tóxicos (disminución del aclaramiento). La disminución de la red de proteostasis permiten la acumulación de agregados de  $\beta$ -amiloide tóxica ( $A\beta$ ) y Tau hiperfosforilado (pTau) que interactúan con los orgánulos subcelulares de las neuronas, desencadenando la disfunción neuronal y la apoptosis celular dando como resultado la disminución de la memoria y la capacidad cognitiva.<sup>4</sup> Recientemente se ha sugerido que podría ser debido a la pérdida funcional y no a la pérdida de células neuronales lo que conduce al deterioro cognitivo.<sup>8</sup>

**Mecanismo de placas  $A\beta$  amiloides:**

La proteína precursora de amiloide (APP) tiene dos vías de procesamiento: la canónica, no amiloidogénica (90%) que implica la acción de  $\alpha$ -secretasa, liberando una forma soluble de APP (SAPP $\alpha$ ) y el fragmento C-terminal (C-83) y la vía amiloidogénica no canónica (10%), que genera péptidos  $A\beta$  a través de la escisión secuencial por  $\beta$ -secretasa (BACE1) y  $\gamma$ -secretasa (Figura 2).<sup>4</sup> La escisión de APP provocada por la vía amiloidogénica no canónica da lugar a tipos diferentes de péptido  $A\beta$ , el péptido dominante  $A\beta_{1-40}$  (80-90%) y el péptido  $A\beta_{1-42}$  (5-10%), este último se considera como un agregado o la semilla para la formación de oligómeros y fibrillas más grandes, que finalmente forman las placas amiloides macroscópicas.<sup>8</sup>



**Figura 2. Mecanismo de formación de  $A\beta_{1-42}$ .**<sup>4</sup>

En la EA se encuentra alterada la catálisis de APP debido a un aumento en la actividad de  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a una alta concentración de péptidos  $A\beta_{1-42}$ . Además, los niveles de la enzima encargada de degradar el péptidos  $A\beta$  (neprilisina) disminuyen con la edad, potenciando aun más la acumulación del péptido.<sup>4,6</sup>

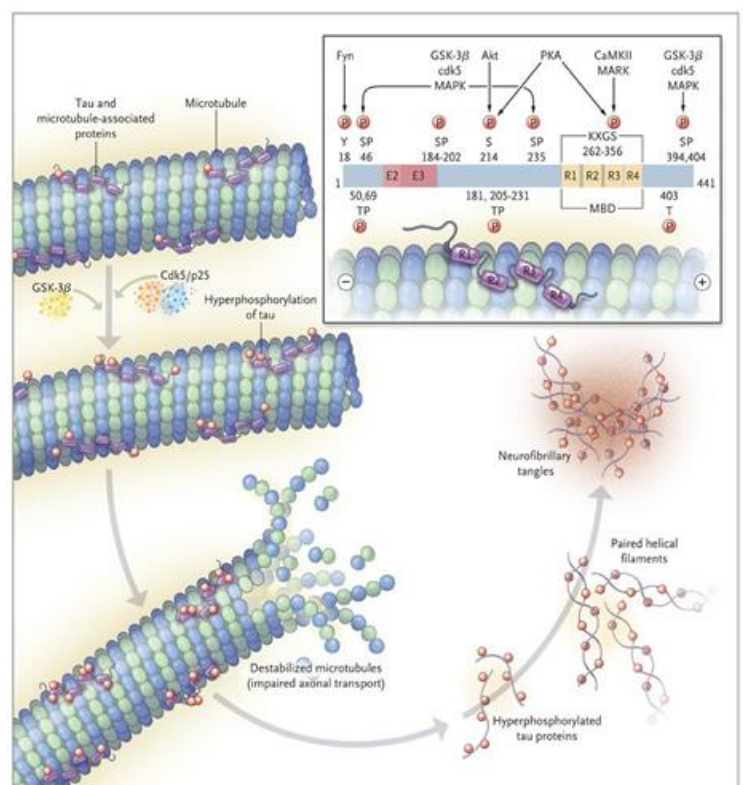
Estudios experimentales han demostrado que A $\beta$  puede estar contenido en el interior de las células (iA $\beta$ ) o en el espacio intercelular (eA $\beta$ ). Se ha demostrado que iA $\beta$  provoca el inicio de déficit cognitivo relacionado con EA. Cuando comienza la acumulación de iA $\beta$  se forman agregados insolubles en el sistema endosomal-lisosomal y se altera la permeabilidad de la membrana lisosomal causando la liberación del contenido al citoplasma, desencadenando la muerte celular apoptótica. Además, se ha visto que la deposición de eA $\beta$  es más bien el resultado de la destrucción celular.<sup>4</sup>

### ***Hiperfosforilación de la proteína Tau:***

Tau es una fosfoproteína citosólica que juega un papel importante en la promoción y estabilización del ensamblaje de los microtúbulos, uniéndose a la tubulina.<sup>9</sup> La red de microtúbulos posee un importante papel en el transporte axonal, al modular dicha red, tau tiene un efecto directo sobre el transporte axonal, ya que permite que las moléculas de señalización, los factores tróficos y los orgánulos esenciales, incluidas las mitocondrias, viajen a lo largo de los axones. Por lo tanto, tau contribuye a funciones vitales tanto estructurales como regulatorias.

La proteína Tau presenta 6 isoformas diferentes y dependiendo de está podemos encontrar 3 ó 4 dominios de unión al microtúbulo. Los dominios de unión se encuentran ubicados en el extremo carboxi de la proteína y están cargados positivamente (lo que permite que se una al microtúbulo con carga negativa).<sup>10</sup> La acción de las quinasas es fosforilar a la proteína, permitiendo así que esta se pueda unir a la tubulina y realzar su función.<sup>11</sup> (Figura 3)

En la EA las proteínas Tau se encuentra anormalmente hiperfosforilada, dando lugar a la agregación en filamentos helicoidales emparejados, que se acumulan en las neuronas en forma de ovillos neurofibrilares. Una regulación desequilibrada en proteínas quinasas es la causa directa de la hiperfosforilación de tau. Entre las diversas quinasas, la glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) es la más implicada.<sup>12</sup>



**Figura 3. Mecanismo de formación de las neurofibrillas.<sup>20</sup>**

### 1.3. Cuadro clínico

La demencia afecta a cada persona de manera diferente, dependiendo del impacto de la enfermedad y de la personalidad del sujeto antes de empezar a padecerla.<sup>2</sup> Actualmente, hay suficientes evidencias para afirmar que existe una fase intermedia entre la normalidad y el estado de demencia, en el que hay una alteración de la memoria con o sin afectación de otras áreas cognitivas, que no interfiere con la capacidad del individuo de llevar a cabo una vida independiente.<sup>13</sup>

Una vez que se da la enfermedad, se puede dividir en tres etapas:

1. *Etapa temprana:* a menudo pasa desapercibida. Los síntomas más comunes incluyen: tendencia al olvido, pérdida de la noción del tiempo y desubicación espacial, incluso en lugares conocidos.
2. *Etapa intermedia:* las personas a estas alturas empiezan a olvidar acontecimientos recientes, así como los nombres de las personas, se encuentran desubicadas en su propio hogar, tienen cada vez más dificultades para comunicarse, empiezan a necesitar ayuda con el cuidado personal y sufren cambios de comportamiento.
3. *Etapa tardía:* es la última etapa de la enfermedad, la dependencia y la inactividad son casi totales. Los síntomas incluyen: una creciente desubicación en el tiempo y en el espacio, una necesidad cada vez mayor de ayuda para el cuidado personal, dificultades para caminar y alteraciones del comportamiento que pueden exacerbar y desembocar en agresiones.<sup>2</sup>

### 1.4. Tratamientos actuales

La terapia disponible se considera como una intervención a corto plazo, solo centrada en el tratamiento sintomático, que conduce a una desaceleración temporal de la pérdida de las funciones cognitivas. Actualmente, hay aprobados dos grupos terapéuticos para el tratamiento de EA, inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y antagonistas del receptor de ácido N-metil-D-aspartato (NMDA). Los inhibidores de AChE aprobados son tres, donepezilo, galantamina y rivastigmina (este último, inhibidor de AChE no selectivo) (figura 4), estos fármacos permiten aumentar la concentración de ACh en la hendidura sináptica, al bloquear la enzima que se encarga de su metabolización. La memantina es el único fármaco aprobado dentro de los inhibidores del receptor NMDA, que protege las células neuronales y reduce la excitotoxicidad al bloquear la estimulación patológica de los receptores NMDA. A menudo, estas 2 clases de medicamentos son recetados en combinación, ya que un ensayo clínico

demonstró que los pacientes con memantina y dosis estable de donepezilo muestran mejor respuesta clínica, que siendo tratados en monoterapia con un inhibidor de colinesterasa.<sup>7,14</sup>

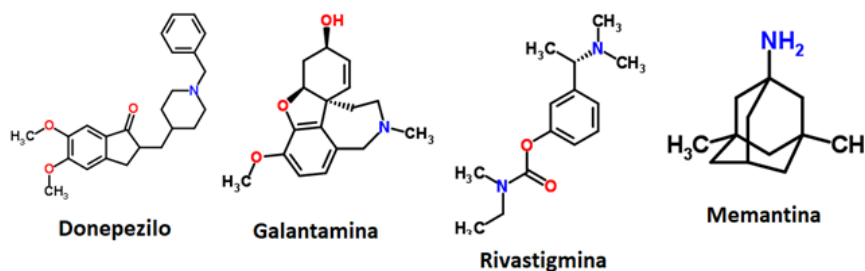


Figura 4. Estructura de los fármacos empleados en el tratamiento del Alzheimer.

## 2. OBJETIVOS

Conocer en detalle los factores desencadenantes de la enfermedad de Alzheimer así como el mecanismo patológico que se origina, para comprender mejor el diseño de los nuevos fármacos que se están investigando frente a esta enfermedad. Los fármacos MTDL actúan en más de una diana, modificando la enfermedad, y son, hoy en día, la esperanza para el tratamiento del Alzheimer. Pese a que los MTDL se encuentran en fase clínica, este trabajo pretende describir la síntesis y el mecanismo de acción, así como el impacto que estos fármacos suponen.

## 3. METODOLOGÍA

El método empleado para realizar este trabajo es exclusivamente bibliográfico. Se ha realizado una revisión bibliográfica, centrada principalmente en artículos científicos extraídos de bases de datos como PudMed y google-scholar. Adicionalmente, se han consultado revistas científicas de gran prestigio como Journal of biological chemistry, Molecules y Current Neuropharmacology.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento de la EA se han clasificado en dos grupos: sintomáticos y modificadores de la enfermedad. Los objetivos del grupo terapéutico sintomático incluyen principalmente receptores, mientras que los del grupo modificador de la enfermedad están estrechamente relacionados con la producción de A $\beta$ , la hiperfosforilación de tau y la neuroprotección.<sup>7</sup> Sin embargo, las moléculas obtenidas no pertenecen exclusivamente a uno u otro grupo y se ha encontrado que los compuestos que se dedican a mejorar la neurotransmisión también están implicados en muchos otros aspectos.<sup>8</sup>



El papel de la química médica es diseñar, sintetizar y desarrollar nuevas moléculas de baja toxicidad y con buen perfil farmacodinámico, y para este propósito se pueden aplicar diferentes estrategias de descubrimiento de fármacos. El paradigma del descubrimiento de fármacos, "una diana, un fármaco, una sola enfermedad" domina en la industria farmacéutica. Sin embargo, durante la última década, se ha desarrollado un nuevo paradigma, llamados ligandos multidiana (MTDL, Multi-Target-Directed Ligands), como enfoque innovador dedicado a enfermedades complejas.<sup>7</sup> El diseño MTDL se desarrolla a través de un único compuesto químico capaz de modular múltiples dianas simultáneamente, con perfiles de eficacia y seguridad superiores.<sup>8</sup> La etiología multifactorial de la EA y la falta de un tratamiento efectivo de la enfermedad llevaron a muchos equipos de investigación a buscar ligandos múltiples.<sup>7</sup> Además, MTDL puede ser más eficaz y menos vulnerable a la resistencia.<sup>16</sup> Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en algunos casos, el diseño de fármacos multifuncionales mediante la unión de varios farmacóforos podría ser un factor limitante, ya que podría conducir a moléculas de alto peso molecular que exhiben una "semejanza de fármaco" pobre.<sup>15</sup>

Hay dos posibilidades al diseñar moléculas MTDL, la elección de moléculas con capacidad conocida para actuar sobre dos o más dianas y unir las mediante un espaciador (linker), o combinar dos o más farmacóforos en una sola molécula. Otra dificultad que se debe resolver en la estrategia de MTDL es elegir las dianas terapéuticas más apropiadas y seleccionar una molécula base adecuada para empezar.<sup>8</sup>

Los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChEI) se plantean como una buena elección de molécula de base, ya que muchos AChEI son ya en sí compuestos multi-diana, al aumentar la cantidad de ACh y agonizar el receptor de acetilcolina muscarínica M1 en el hipocampo, que en consecuencia conduce a la regulación posterior relacionada con el procesamiento de proteína precursora de amiloide (APP), mostrando así un efecto de neuroprotección y de mejora de la memoria.<sup>8,15</sup>

#### **4.1. Estructura de la enzima acetilcolinesterasa**

La enzima acetilcolinesterasa (AChE) es una hidrolasa que pertenece a la familia de enzimas carboxilesterasas. Su función clásica es hidrolizar la acetilcolina (ACh) en la hendidura sináptica para terminar la neurotransmisión colinérgica.

La AChE posee la tríada catalítica central: Ser 203, His 447 y Trp 86, que se encuentra en el interior del estrecho desfiladero responsable de la hidrólisis de ACh (figura 5).<sup>15</sup>

Se descubrió que, aparte de su función hidrolítica, la AChE está implicada en funciones no colinérgicas como la deposición de amiloide, la adhesión celular y el crecimiento de neuritas. Se supone que estas funciones de AChE están conectadas con su sitio aniónico periférico (PAS). El sitio aniónico periférico junto con un sitio aniónico catalítico (CAS) son los principales sitios de unión de la enzima.<sup>16</sup>

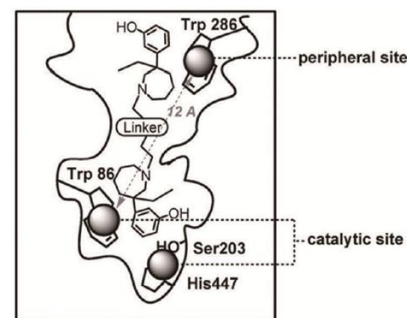


Figura 5. Muestra la estructura de AChE y la interacción de la enzima con bis-(9)-nor-meptazinaol.<sup>15</sup>

#### 4.2. Diseños de fármacos multidiana derivados de Tacrina

El grupo más grande de estos agentes comprende inhibidores de colinesterasa de sitio de unión dual y a menudo presentan propiedades adicionales tales como actividad antiagregante, actividad antioxidante y neuroprotectora, bloqueo del canal de calcio, antagonista del receptor cannabinoide CB1, inhibición de BACE1, antagonista del receptor histamínico H3, bloqueo del canal del receptor NMDA, antagonismo del receptor 5-HT<sub>3</sub> de serotonina, inhibición del transportador de serotonina (figura 6).<sup>7</sup>

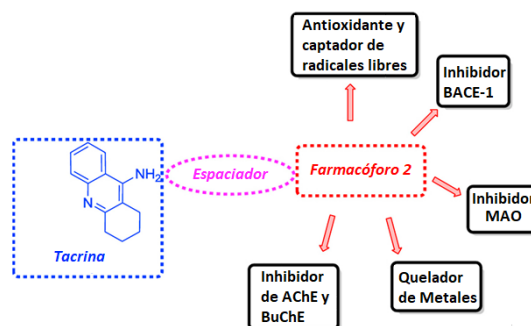


Figura 6. Diseño de moléculas derivadas de tacrina.<sup>21</sup>

A continuación se va a realizar un breve resumen de los diferentes derivados de tacrina que se están investigando en la actualidad.

#### ***Inhibidores de la colinesterasa con propiedades anti-agregación de $\beta$ -amiloide***

La AChE se co-localiza con A $\beta$  en placas neuríticas y puede aumentar la velocidad de formación de fibrillas A $\beta$ , formando complejos estables con ellas. La AChE es una chaperona patológica que induce una transición conformacional en A $\beta$  que conduce a la agregación y formación de fibrillas. La prevención de la agregación de péptido A $\beta$  es terapéuticamente atractiva ya que la agregación amiloide es un proceso exclusivamente patológico y, por lo tanto, la inhibición dirigida de la fibrilación A $\beta$  no interfiere con la función fisiológica de la proteína

precursora amiloide y otras proteínas que participan en la producción de péptido A $\beta$ . La tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina) se usa ampliamente como un resto farmacofórico en el desarrollo de MTDLs dotadas de una actividad inhibitoria contra colinesterasas y la formación de fibrillas A $\beta$ .<sup>7,15,18</sup>

### ***Moléculas híbridas con propiedades inhibitorias de AChE / BuChE y BACE1***

La  $\beta$ -secretasa (aspartil proteasa BACE1, enzima que segmenta la APP del sitio  $\beta$ 1) cataliza la etapa limitante de la producción de A $\beta$ , debido a la velocidad de reacción, lo que permite considerarla una de las principales dianas para el desarrollo de fármacos.<sup>18</sup>

De las dos  $\beta$ -secretasas humanas identificadas, la enzima 1 de escisión de APP (BACE1) es la que se expresa significativamente en el cerebro y parece ser relevante al dividir APP en A $\beta$ .<sup>8</sup> Por lo tanto, la inhibición de BACE1 se considera una diana terapéutica atractiva para el tratamiento y prevención de la EA. Los compuestos desarrollados contenían tacrina y 4-oxo-4H-cromeno conectados por espaciadores de diferentes longitudes (de 7 a 12 átomos de carbono) (Figura 7).<sup>7</sup>

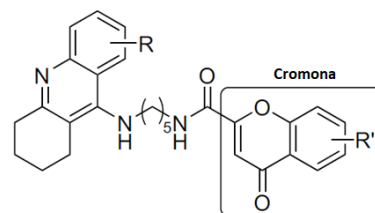


Figura 7. Híbrido de tacrina y 4-oxo-4H-cromeno inhibidor de AChE, BuChE y BACE1.<sup>7</sup>

### ***Inhibidores de colinesterasa y MAO***

Estudios recientes han demostrado que la actividad de la MAO-B aumenta en la corteza de pacientes con EA y en consecuencia, produce una elevación de los niveles cerebrales de radicales hidroxilo, los cuales están relacionados con la deposición de placas de A $\beta$ .<sup>15</sup> Se ha sugerido el potencial terapéutico de los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO) en el tratamiento de la EA debido a sus propiedades neuroprotectoras más allá de su efecto sobre la neurotransmisión monoaminérgica. El efecto neuroprotector de los IMAO puede ser el resultado no solo del aumento de la neurotransmisión, sino también por evitar la generación de peróxido de hidrógeno y la formación de especies de radicales libres, neurotóxicas. En los últimos años, se han descrito numerosos ligandos multifuncionales con actividad inhibitoria de la MAO. Cabe mencionar el diseño de un híbrido de tacrina conectado por separadores de carbono de diferentes longitudes a selegilina, un conocido inhibidor de la MAO (figura 8). Los estudios de inhibición de MAO-A y MAO-B mostraron que estos compuestos son inhibidores efectivos de ambas enzimas, además de AChE y BuChE.<sup>7,8</sup>

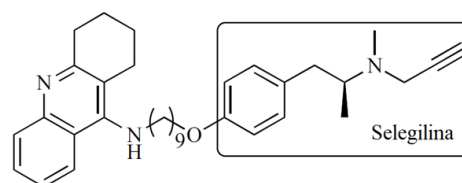


Figura 8. Híbrido de tacrina y selegilina, inhibidor de la actividad de colinesterasa y MAO.<sup>7</sup>

### ***Inhibidores de la colinesterasa con propiedades antioxidantes***

El estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su eliminación por mecanismos antioxidantes. El estrés oxidativo es importante en la EA puesto que se ha asociado con la agregación A $\beta$ , debido a su relación con la actividad de BACE1. La producción de ROS se debe a una gran variedad de fuentes, como por ejemplo, anormalidades mitocondriales, alteraciones en el nivel de metales de transición y péptidos amiloides. Por lo tanto, la terapia antioxidante en la demencia puede traer beneficios, particularmente en la etapa temprana de la EA. La tacrina fue elegida como un fármaco común en la búsqueda de ligandos multifuncionales con propiedades antioxidantes.<sup>7,8</sup>

Los derivados de carbazol, heptaflina y 7-metoxiheptaflina, se conectaron con tacrina mediante una cadena de cinco o tres átomos de carbono (figura 9). Se descubrió que los compuestos sintetizados eran inhibidores moderados de AChE y mostraban una actividad antioxidante muy potente. Además, mostraron un efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células de neuroblastoma y contra la toxicidad inducida por el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> en células de astroglioma.<sup>7</sup>

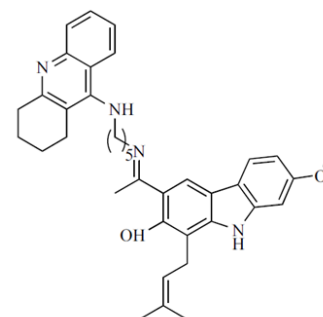


Figura 9. Híbrido de tacrina y 7-metoxiheptaflina inhibidor de AChE y con actividad antioxidante.<sup>7</sup>

También, se sintetizaron con éxito híbridos de tacrina y melatonina. La melatonina, disminuida en pacientes con la EA, posee fuertes propiedades antioxidantes, exhibe efectos protectores contra la apoptosis inducida por A $\beta$  en la microglia y mejora el aprendizaje y la memoria en ratas con EA. Además de las propiedades antioxidantes, los nuevos derivados de tacrina-melatonina exhibieron actividad inhibidora de AChE *in vivo* con selectividad para AChE sobre BuChE.<sup>15</sup>

### ***Inhibidores de colinesterasa y compuestos que evitan los derrames cerebrales***

La microglia activada por A $\beta$  provoca la liberación de varios factores inflamatorios neurotóxicos como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que a su vez conducen a la apoptosis neuronal.<sup>15</sup> Los fármacos que liberan óxido nítrico (NO) pueden ser especialmente beneficiosos para el tratamiento de la EA debido a su papel en la regulación de la circulación cerebral y las reacciones inflamatorias.<sup>7</sup>

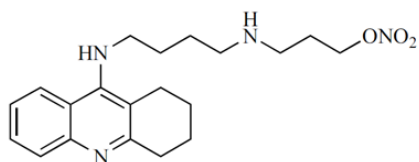


Figura 10. Compuesto derivado de tacrina con un grupo nitrato, inhibidor de colinesterasa y con acción vasorrelajante.<sup>7</sup>

Se ha diseñado una serie de híbridos tacrinos con un grupo nitrato, donador de NO (figura 10). Los compuestos desarrollados mostraron una potente inhibición de la colinesterasa en el rango nanomolar y una actividad relajante moderada de los vasos sanguíneos.

Posteriormente, se unió un grupo nitrato a los compuestos híbridos de tacrinaflurbiprofeno obtenidos previamente (figura 11). Los derivados con enlaces cortos (de dos a cuatro átomos de carbono) que conectan la tacrina con el flurbiprofeno fueron inhibidores más potentes tanto de AChE como de BuChE que la tacrina. Además, se observó un efecto vasorrelajación moderado, que podría ser el resultado de la generación de NO.<sup>7</sup>

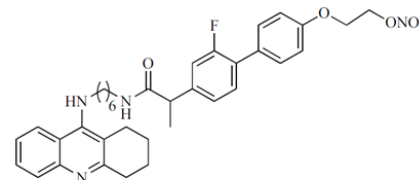


Figura 11. Compuesto híbrido de tacrinaflurbiprofeno con un grupo nitrato.<sup>7</sup>

### ***Compuestos multifuncionales con propiedades neuroprotectoras***

El péptido amiloide induce una liberación excesiva de glutamato que promueve la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células neuronales a través de los canales acoplados al receptor de glutamato, como el receptor NMDA. Este proceso termina en un aumento sustancial de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, responsable de la hiperactividad de la NO sintasa, la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) y la regulación positiva de una variedad de quinasas implicadas en la fosforilación de la proteína tau.<sup>15</sup> El objetivo de la neuroprotección es contrarrestar este proceso centrándose en los mecanismos más comunes que lo conducen, como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad, los cambios inflamatorios, la acumulación de hierro y la agregación de proteínas.<sup>7</sup> La excitotoxicidad consiste en una excesiva estimulación de los receptores de glutamato ionotrópicos (NMDA) y un desequilibrio de la homeostasis neuronal del calcio, causando daño neuronal al aumentar los ROS y originar una disfunción mitocondrial y la apoptosis por el aumento de la activación de nucleasas, proteasas y fosfolipasas.<sup>8</sup>

El ion metálico es una parte indispensable en la EA. Se ha observado una acumulación de alto nivel de iones de zinc, cobre e hierro en las placas amiloides del paciente con EA. Los iones metálicos causan cambios específicos en la cinética de la agregación de  $\text{A}\beta$  y también contribuyen a una mayor producción y toxicidad de ROS ya que los iones metálicos como el cobre pueden catalizar ROS.<sup>15</sup>

Se diseñó un nuevo agente MTDL al unir dos restos tacrinos a través de cistamina (2,2'-disulfanediyldiethanamine) (figura 12). La cistamina es conocida por sus propiedades antioxidantes, citoprotectoras y neuroprotectoras. El compuesto mostró una actividad inhibitoria contra ambas colinesterasas en el rango nanomolar y propiedades inhibitorias en la agregación A $\beta$  autoinducida y en la agregación A $\beta$  inducida por AChE. Además, posee efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>7</sup>

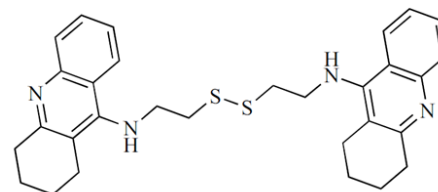


Figura 12. Compuesto formado por dos restos tacrinos unidos a través de cistamina.<sup>7</sup>

Los ensayos realizados posteriormente *in vitro* demostraron que los derivados de bis-tacrina inhiben de manera muy eficaz la AChE y la agregación de A $\beta$  inducida por AChE, y al mismo tiempo presentan una propiedad adicional como quelantes de metales.<sup>15</sup>

### ***Inhibición de AChE y NMDA***

Esta demostrado que el receptor NMDA está implicado en la disfunción glutamatérgica de la EA, por lo que se ha convertido en un objetivo terapéutico prometedor. El éxito se ha logrado con el híbrido carbacrina (union de tacrina y carvedilol), un compuesto inhibitor de la agregación A $\beta$  y la generación de ROS, así como los receptores AChE y NMDA.<sup>15</sup>

### **4.3. Heterodímeros 7-metoxitacrina-adamantilamina**

Se diseñó, sintetizó y evaluó una serie estructural de 7-MEOTA-adamantilamina tioureas como posibles inhibidores de la acetilcolinesterasa humana (hAChE), la butirilcolinesterasa humana (hBuChE) y el receptor NMDA. Los compuestos se prepararon basándose en la estrategia del ligando dirigida a múltiples dianas, uniendo la adamantina, un antagonista de

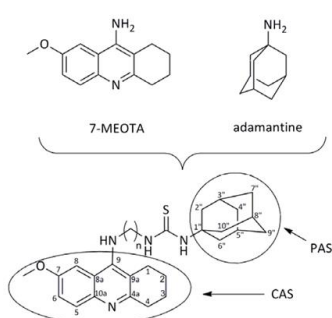


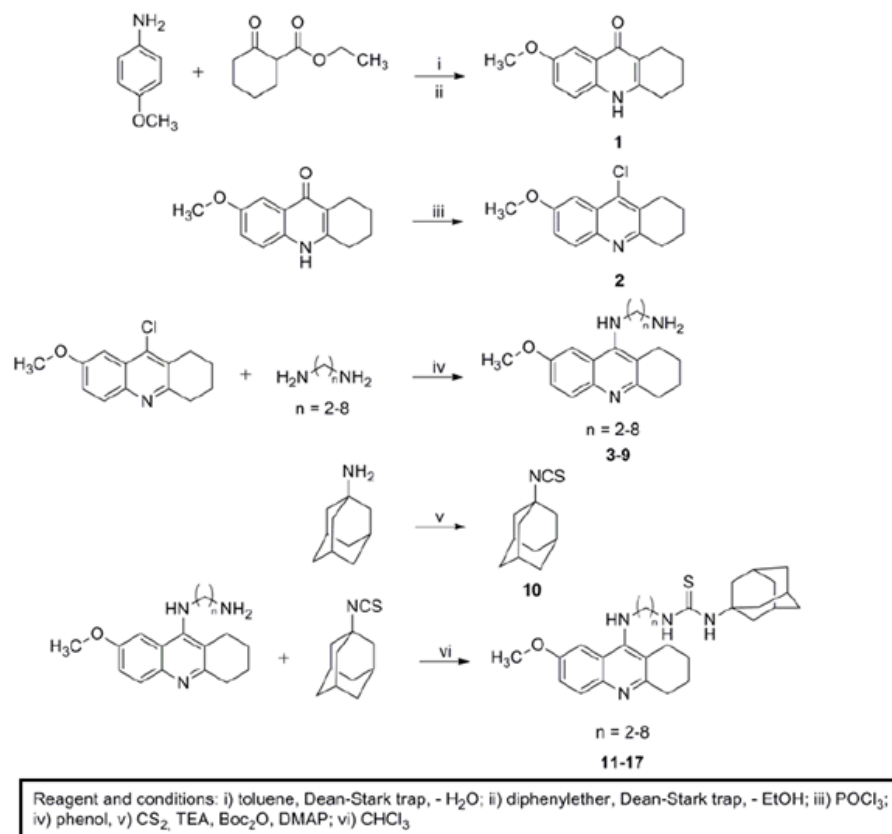
Figura 13. Híbrido de 7-MEOTA y adamantilamina.<sup>17</sup>

NMDA, y el 7-metoxitacrina (7-MEOTA), inhibidor de AChE, (figura 13). Estos inhibidores demostraron un carácter de sitio de unión dual capaz de interacción simultánea con el sitio aniónico periférico (PAS) de AChE y el sitio catalítico activo (CAS). Los derivados estructurales exhibieron una muy buena actividad inhibitoria hacia BuChE dando como resultado inhibidores más selectivos de esta enzima.<sup>17</sup>

La amantadina es un agente anti-Parkinsoniano con un mecanismo inhibitor de los receptores NMDA. De hecho, la evidencia sugiere que la amantadina puede retrasar el inicio y la gravedad de la demencia relacionada con la enfermedad del Parkinson de forma similar a su análogo memantina, que se utiliza regularmente en la terapia de la EA. El 7-metoxi derivado,

7-MEOTA (9-amino-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroacridina) resultó ser un inhibidor de AChE activo con efectos secundarios significativamente menores en comparación con Tacrina.<sup>17</sup>

### Síntesis



Esquema 1. Ruta de síntesis de las 7-MEOTA-adamantilamina tioureas.<sup>17</sup>

El procedimiento sintético general para heterodímeros de 7-MEOTA-adamantilamina se muestra en el esquema 1. El anillo fusionado de partida 7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroacridina-(10*H*)-9-ona (**1**) se preparó con buen rendimiento (80%) mediante la síntesis de Conrad-Limpack-Knorr, una reacción de 4-metoxianilina con 2-oxociclohexanocarboxilato de etilo en tolueno a reflujo usando la adición de ácido p-toluenosulfónico catalítico. Luego, se agitó con oxiclورو de fósforo para dar 9-cloro-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroacridina (**2**). El tratamiento de **2** con la correspondiente diamina en presencia de fenol produjo los intermedios **3-9** (70-95%).<sup>17</sup>

Finalmente la reacción de adición de la correspondiente amina **3** a **9**, sobre el isocianato **10** permitio obtener los compuestos **11** a **17**, en las condiciones mostradas en el esquema 1. Todos los compuestos (**11-17**) se convirtieron en sales tartáricas para aumentar la solubilidad. Los compuestos finales se obtuvieron en forma de sólidos de color blanco amarillento con un rendimiento satisfactorio (41-84%).<sup>17</sup>

### ***Estudios de actividad***

La actividad *in vitro* de los 7-MEOTA-amantadina heterodímeros (**11-17**) se determinó en el modelo de AChE humana recombinante y BuChE plasmático humano utilizando el método de Ellman con tacrina, 7-MEOTA, amantadina y **10** como compuestos de referencia. La tacrina fue un inhibidor más potente de AChE y BuChE en comparación con 7-MEOTA, amantadina y **10**. La actividad inhibidora más potente de las tioureas se demostró en el análogo **14**, con cinco átomos de carbono en el espaciador (figura 14). Los nuevos derivados de tiourea demostraron ser mejores inhibidores de ambas colinesterasas en comparación con 7-MEOTA. Sin embargo, algunos de los heterodímeros exhibieron actividades inhibitorias de AChE y BuChE ligeramente más pobres en comparación con tacrina. Todos los nuevos compuestos se pueden considerar como agentes más selectivos para BuChE. Esto podría proporcionar una ventaja terapéutica ya que la inhibición de BuChE se ha considerado recientemente beneficiosa para el tratamiento de EA. La concentración de BuChE, contrariamente a AChE, aumenta durante el curso de la EA y puede compensar el papel de AChE.<sup>17,18</sup>

Debido a que la adamantilamina se trata de un análogo de la memantina, se quiso evaluar la actividad inhibitoria que presentaban estos compuestos frente al receptor NMDA. Los datos de los experimentos llevados a cabo muestran que el mecanismo de bloqueo de los canales abiertos del receptor NMDA es similar al de la memantina. La cinética inhibidora es más lenta que la memantina, lo cual podía dar como resultado la inhibición preferencial de los receptores NMDA extrasinápticos.<sup>18</sup>

La serie de heterodímeros de 7-MEOTA-adamantilamina también se evaluó en cuanto a su potencial para afectar a la enzima BACE1. Los compuestos mostraron un perfil inhibitorio de BACE1 muy débil, que varía en un rango milimolar.<sup>18</sup>

Al caracterizar el grado de inhibición de la fibrilación amiloide de los compuestos de 7-MEOTA-adamantilamina, se pudo observar que todos los compuestos 7-MEOTA-adamantilamina estudiados inhiben la fibrilación de A $\beta$  en cierta medida. La eficacia de la inhibición se vio afectada tanto por la estructura como por la concentración de compuestos. La fibrilación amiloide A $\beta$  en presencia de 7-MEOTA-adamantilamina conduce a cambios en la cantidad de fibrilla y su morfología debido a sus actividades inhibitorias. Cabe mencionar que el derivado de memantina individual así como el 7-MEOTA individual no tienen efecto inhibitorio sobre la fibrilación de A $\beta$ , por lo que queda demostrado que la heterodimerización es beneficiosa para inhibir la actividad.<sup>18</sup>



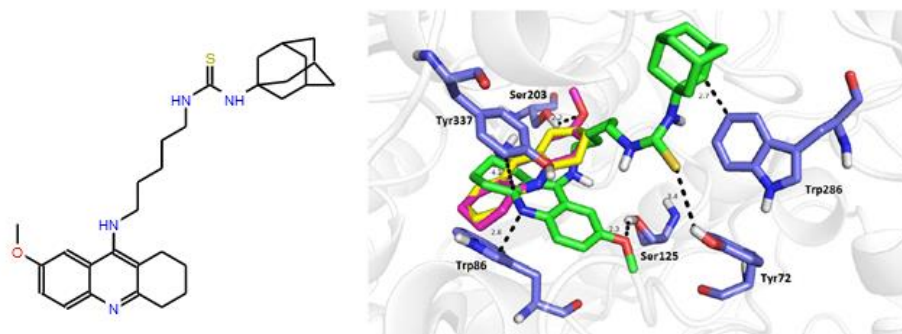
En la búsqueda de una nueva actividad de estos compuestos, se propuso la posibilidad de que actuarán como modulador alostérico positivo (PAM) de los receptores muscarínicos M1 (M1 mAChR) y nicotínicos de ACh (nAChR). Los híbridos de 7-MEOTA-adamantilamina inhibieron la respuesta, actuando como antagonistas de M1 mAChR y nAChR. Sin embargo, el impacto clínico potencial de tal propiedad no parece ser alto ya que la tacrina comercializada mostró eficacias similares.<sup>18</sup>

Finalmente, se ha evaluado la viabilidad celular y la determinación de la penetración de la barrera hematoencefálica. La evaluación de la viabilidad celular se ha realizado para estimar el potencial toxicológico *in vitro* de los compuestos. Comparando con los medicamentos estándar (tacrina y 7-MEOTA), todos los compuestos evaluados ejercieron un efecto citotóxico relativamente alto en 24h. El problema de la toxicidad se asocia con un aumento del peso molecular y una disminución de la polaridad del fármaco. La lipofilia de los compuestos también se asocia con la penetración de la barrera hematoencefálica. Estos dos factores contribuyen a la acumulación intracelular dando un desequilibrio en la homeostasis celular y una toxicidad celular agravada. El efecto citotóxico se dio en todas las líneas celulares investigadas, independientemente de si la línea era de origen hepático o no.<sup>18</sup>

Los resultados de citotoxicidad se obtuvieron de un sistema celular estático y aislado, por lo que la extrapolación de los resultados obtenidos *in vitro* a la clínica necesita experimentos adicionales con animales. Desafortunadamente, faltan datos *in vivo*, como la biotransformación, el perfil farmacodinámico / farmacocinético o los datos bioquímicos de estos compuestos.<sup>18</sup>

### ***Interacciones con las dianas***

En un estudio publicado en 2013 por Katarina Spilovska et al., se realizó un modelado de AChE para ver las interacciones entre el compuesto **14** y la enzima. Gracias al estudio, se encontró que la estructura de anillo se apila contra el anillo de fenilo de Tyr337 (3,4 Å) y muestra el enlace  $\pi$ - $\pi$  en forma de T con Trp86 (1,0 Å). El andamio 7-MEOTA ejerció un fuerte apilamiento paralelo  $\pi$ - $\pi$  a Tyr337 (4.2 Å), así como apilamiento  $\pi$ - $\pi$  en forma de T a Trp86 (2.8 Å) dentro del sitio catión- $\pi$  de AChE. El resto metoxi contribuyó a la estabilización mediante enlaces de hidrógeno con Ser125 (2.3 Å). En el medio del desfiladero, la cadena alquílica de **14** estaba rodeada por anillos de fenilo de Tyr124 (3.7 Å), Phe297 (3.5 Å) y Phe338 (4.3 Å) que proporcionaban estabilidad al complejo **14**-AChE. El grupo tiourea forma un enlace de hidrógeno muy débil con el grupo hidroxilo de Tyr72 (3.4 Å). La menor afinidad de **14** por la inhibición de AChE podría explicarse por el carácter no aromático de las interacciones con el resto adamantil entre los residuos clave en el sitio aniónico periférico (figura 14).<sup>17</sup>



**Figura 14. Compuesto 14, heterodímero 7-MEOTA-amantadina con cinco átomos de carbono en el espaciador, y su interacción en el sitio activo de AChE (molécula verde). Además, se puede ver la interacción de tacrina (amarillo) y 7-MEOTA (magenta).<sup>17</sup>**

La capacidad de los heterodímeros para inhibir la fibrilación amiloide del péptido A $\beta$  está asociada con la estructura de tres anillos de 7-metoxitrocrina que proporciona enlaces de hidrógeno de un átomo de nitrógeno y un grupo amino secundario. Además, el núcleo cíclico de 7-MEOTA también permite interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  con la región hidrófoba de A $\beta$  (aminoácidos 17-21). Estos factores proporcionan la capacidad de todos los compuestos para inhibir o evitar la formación de agregados de amiloide.<sup>17</sup>

## 5. CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo observamos que la estrategia de diseño de nuevos fármacos mediante el enfoque de "una molécula y múltiples dianas" es una poderosa herramienta para abordar de manera efectiva el tratamiento de enfermedades de naturaleza multifactorial como la EA. A diferencia de los AChEI tradicionales, la nueva generación de AChEI multi-diana han mostrado que, además de la actividad inhibidora de AChE, poseen efectos potenciados por otras funciones entre las que se incluyen la inhibición de la agregación A $\beta$  inducida por AChE y/o la autoagregación de A $\beta$ , quelación de metales, acción contra radicales libres, inhibición de la MAO, etc. Por lo tanto, su capacidad para modular varias dianas moleculares simultáneamente los convierte en agentes modificadores de la enfermedad reales con mejor resultado clínico en la EA.

Tas la realización de múltiples experimentos para profundizar en la serie de compuestos 7-MEOTA-adamantilamina, un híbrido derivado de tacrina y memantina, se ha podido confirmar su efecto multipotente. El perfil farmacológico de los derivados comprende, la inhibición eficaz de la fibrilación amiloidea del péptido A $\beta$  y la afectación de la actividad de BACE1. Además, tienen potencia inhibidora frente AChE y BuChE pero no podrían potenciar

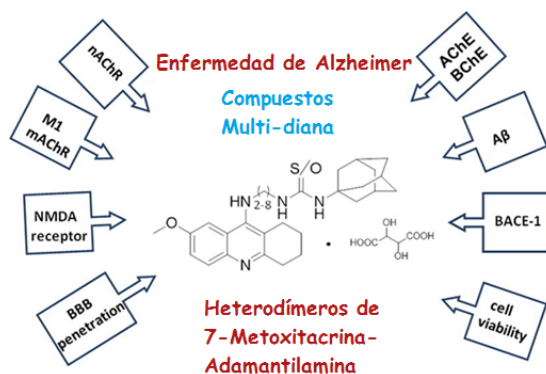


Figura 15. Dianas estudiadas en los heterodímeros 7-MEOTA-adamantilamina.<sup>18</sup>

la transmisión colinérgica por interacción directa con receptores colinérgicos (al ser antagonistas de los receptores nicotínico de tipo muscular y muscarínicos M1). Pese al efecto multi-diana que presentaron, su perfil de seguridad no llegó a ser el esperado, debido a que presentaban cierta citotoxicidad en todas las líneas celulares estudiadas (figura 15).<sup>18</sup>

Se puede concluir que los heterodímeros de 7-metoxitacrina- adamantilamina tienen un impacto clínico multifactorial con potencial de ralentización o bloqueo del proceso neurodegenerativo relacionado con esta enfermedad. Pero los hallazgos revelados en el nivel *in vitro* deben confirmarse también *in vivo*.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Hippius, H., Neundörfer, G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci.* **2003**, 5, 101-108 y referencias contenidas en el.
- Organización mundial de la salud (OMS), 2017  
Acceso: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mather, S. C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Sczufca, M.; Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **2005**, 366, 2112-2117.
- Penke, B., Bogár, F., Fülöp, L.,  $\beta$ -Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View, *Molecules*, **2017**, 22, 1692.
- Cacciaglia, R., Molinuevo, J.L., Falcón, C., Brugulat-Serrat, A., Sánchez-Benavides G., Gramunt N., Esteller M., Morán S., Minguillón C., Fauria K., Domingo J., Effects of APOE- $\epsilon$ 4 allele load on brain morphology in a cohort of middle-aged healthy individuals with enriched genetic risk for Alzheimer's disease, *Alzheimer's & Dementia*, **2018**, 1-11.
- Kimura, J., Shimizu, K., Kajima, K., Yokosuka, A., Mimaki, Y., Oku, N., Ohizumi, Y., Nobiletin Reduces Intracellular and Extracellular  $\beta$ -Amyloid in iPS CellDerived Alzheimer's Disease Model Neurons, *Biol. Pharm. Bull.*, **2018**, 41, 451-457.
- Guzior, N., Więckowska, A., Panek, D., Malawska, B., Recent Development of Multifunctional Agents as Potential Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease, *Current Medicinal Chemistry*, **2015**, 22, 373-404.
- Agis-Torres, A., Söllhuber, M., Fernandez, M., Sanchez-Montero, J.M., Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease, *Current Neuropharmacology*, **2014**, 12, 2-36.

9. Zhou<sup>1</sup>, Y., Shil, J., Chu<sup>1</sup>, D., Hu<sup>1</sup>, W., Guan<sup>1</sup>, Z., Gong, C., Iqbal, K., Liu<sup>1</sup>, F., Relevance of Phosphorylation and Truncation of Tau to the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease, *Front Aging Neurosci*, **2018**, *10*, 27.

10. Cheng, Y., Bai, F., The Association of Tau With Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease, *Front Neurosci*, **2018**, 12-163.

11. Mietelski-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A., Niewiadomska, G., Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. *International Journal of molecular Science*. **2014**. *15*. 1471 – 4713.

12. Ma, R., Zhang, Y., Hong, X., Zhang, J., Wang, J., Liu, G., Role of microtubule-associated protein tau phosphorylation in Alzheimer's disease, *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, **2017**, *37*, 307-312.

13. González, V., Marín, A., Mateos, A., Sánchez, R., Guía de Buena Práctica Clínica en Alzheimer y otras demencias, segunda edición.

Acceso:<http://www.crealzheimer.es/InterPresent2/groups/imserso/documents/binario/guabuenapractica.pdf>

14. Kim L., Factora, R., Alzheimer dementia: Starting, stopping drug therapy, *Cleveland clinic journal of medicine*, **2018**, *85*, 209-214.

15. Wang, Y., Wang, H., Chen, H.Z., AChE Inhibition-based Multi-target-directed Ligands, a Novel Pharmacological Approach for the Symptomatic and Disease-modifying Therapy of Alzheimer's Disease, *Current Neuropharmacology*, **2016**, *14*, 364-375.

16. Hebda, M., Bajda, M., Więckowska, A., Szałaj, N., Pasięka, A., Panek, D., Godyń, J., Wichur, T., Knez, D., Gobec, S., Malawska, B., Synthesis, Molecular Modelling and Biological Evaluation of Novel Heterodimeric, Multiple Ligands Targeting Cholinesterases and Amyloid Beta, *Molecules* **2016**, *21*, 410.

17. Spilovska, K., Korabecny, J., Kral, J., Horova, A., Musilek, K., Soukup, O., Drtinova, L., Gazova, Z., Siposova, K., Kuca, K., 7-Methoxytacrine-Adamantylamine Heterodimers as Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease Treatment — Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies, *Molecules*, **2013**, *18*, 2397-2418.

18. Gazova, Z., Soukup, O., Sepsova, V., Siposova, K., Drtinova, L., Jost, P., Spilovska, K., Korabecny, J., Nepovimova, E., Fedunova, D., Horak, M., Kaniakova, M., Wang, Z-J., Hamouda, A., Kuca, K., Multi-target-directed therapeutic potential of 7-methoxytacrine-adamantylamine heterodimers in the Alzheimer's disease treatment, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2017**, *1863*, 607–619.

19. 2015 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's & Dementia*, **2015**, *11*, 332–384.

20. H. Barage, S., D. Sonawane, K., Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease, *Neuropeptides*, **2015**, *52*, 1-18.

21. Sameem, B., Saeedi, M., Mahdavi, M., Shafiee, A., A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *128*, 332-345.