FUNDACION
JOSE CASARES GIL
de Amigos de la
REAL ACADEMIA de FARMACIA

MESA REDONDA

El descubrimiento de nuevos fármacos en 2006

Antonio Monge Vega
María Teresa García López
Ana Martínez

4 de octubre de 2007

REAL ACADEMIA NACIONAL de FARMACIA

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de este libro puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito del editor.

© Fundación José Casares Gil
Farmacia, 11 - 28004 Madrid
Tels. 91 531 03 07 / Fax: 91 531 03 06

Depósito legal: M. 24.320-2008

Imprime Realigraf, S. A.
Pedro Tezano, 26. 28039 Madrid

ÍNDICE

Aproximaciones al descubrimiento de nuevos compuestos en el Sistema Nervioso Central. *Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega* ... 7

El potencial terapéutico del tripéptido N-terminal del IGF-1 y de sus miméticos como fármacos neuroprotectores. *Dra. Dña. María Teresa García López* 15

Fármacos modificadores de la enfermedad de Alzheimer. *Dra. Dña. Ana Martínez* 35

APROXIMACIONES AL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS COMPUESTOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

DR. ANTONIO MONGE VEGA

Director del Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada (C.I.F.A.) de la Universidad de Navarra. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

El pasado año 2006, los nuevos fármacos comercializados en el mundo fueron 41. De otra parte, el número de compuestos que se van a reposicionar en el mercado, como consecuencia de presentarse en nuevas formulaciones o nuevas indicaciones es muy importante, siguiendo una línea marcada en años anteriores [1].

La cantidad de nuevos compuestos introducidos está en un orden de magnitud relacionable en los últimos años. Situación que puede resultar sorprendente, en razón del creciente, e importante, aumento de los fondos destinados a la investigación farmacéutica.

USA representa el 54% de las novedades y Europa el 20%. Japón solamente el 0.5%. Por categorías terapéuticas, los agentes inmunológicos representan el 22% (9) y los antineoplásicos y metabólicos, el 17% (7) [2] en cada caso. No aparecen compuestos nuevos para el tratamiento de enfermedades olvidadas de países en desarrollo, como Malaria, Chagas, Leishmaniasis…

Un signo de la dificultad que representa encontrar nuevos fármacos aparece en el caso de compuestos para el sistema nervioso central, que en 1997 era del 22% (13 sobre un total de 58 nuevos fármacos) para pasar, diez años después en el 2006 a ser de un 2% (1 sobre un total de 41 nuevos fármacos). Puede concluirse que en el último cuarto de siglo pasado se logró poner a disposición de la sociedad un buen número de medicamentos para muchas enfermedades, y que, en la actualidad, la

situación está en optimizar lo mucho encontrado y en la búsqueda de nuevos compuestos para enfermedades no tratadas.

Otra consecuencia lógica de la realidad de finales del siglo pasado en el descubrimiento de fármacos está en la aparición importante de genéricos en el mercado mundial.

La relación de la investigación en biología molecular con la química médica ha llevado el año pasado al descubrimiento de cinco nuevos compuestos, en razón del mecanismo de acción sobre el que actúan para definir su actividad [3]. Son Lubiprostona (Amitiza), desarrollado por la compañía Sucampo Pharmaceuticals, activos en canales CIC-2 para el tratamiento del estreñimiento. Rimobant (Acomplia), desarrollado por SANOFI AVENTIS, es el primer antagonista CB1 con indicación para el tratamiento de la obesidad [4]. El Fosfato de Sitagliptina (Januvia), desarrollado por MSD, el primer inhibidor de dipeptidil peptidasa IV para el tratamiento de la diabetes [5]. Varenicidina (Chantex) un agente antitabaco agonista potencial del receptor nicotínico $\alpha_4\beta_2$ [6] de acetilcolina desarrollado por la compañía Pfizer. Vorinostat (Zolinza) el primer inhibidor de histona deacetiltransferasa, desarrollado por la compañía Merck [7] para el linfoma de células-T.

Sirvan estos ejemplos para insistir en la importancia que tiene la relación entre la biología molecular y la química médica para el descubrimiento de nuevos medicamentos.

EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS MEDICAMENTOS EN EL SIGLO XXI

El descubrimiento de nuevos medicamentos se está mostrando como un trabajo arduo, costoso y muy incierto.

Es en esta actividad donde, de forma importante, se deben manejar hechos y experiencia de forma coordinada. Es decir, de una parte están los aspectos ontológicos, que tratarán de la naturaleza de los compuestos

y de sus propiedades y de otra de los aspectos relacionados con el propio conocimiento que se refiere a la epistemología. Es necesario distinguir con toda claridad entre los aspectos relativos a las propiedades de las cosas y el conocimiento que se tiene de los mismos.

Es posible obtener datos sobre las características físico-químicas de los compuestos e incluso de la forma en que un organismo vivo interacciona con éstos a diferentes niveles, celular, órganos o completo. Pero otra cuestión es el entendimiento de cómo se produce la interacción de una molécula, dada con un ser vivo. Se trata de distinguir entre estructura-actividad y estructura-propiedad. La idea básica que se plantea es que la hipótesis de espacio, por ejemplo, para determinar la eficacia de un medicamento, es claramente insuficiente para determinar el interés real que éste va a tener finalmente. El problema en este punto se puede centrar en intentar relacionar con datos experimentales, por ejemplo, un efecto mutagénico potencial que ayude a definir la seguridad del nuevo compuesto sobre el que se está trabajando.

El descubrimiento del medicamento, la química médica como ciencia, se basa en el conocimiento predictivo, ya que su objetivo es el descubrimiento del nuevo medicamento, que todavía no existe.

Una necesidad moderna, admitida por todos los investigadores, en la búsqueda del medicamento es lo que se viene conociendo como «*open chemistry*» es decir, la puesta a disposición de quien lo necesite de toda una serie de datos relativos a las propiedades de los compuestos. La misma situación se da en la biología con la «*open genomics*», donde se ofrecen datos de genes y proteínas, por ejemplo. La situación final será la disponibilidad de lograr ayuda en el trabajo mediante el ordenador. Es lo que se conoce en la literatura inglesa como «*Computer aided drug design*», que resume la experiencia de los investigadores. Un ejemplo de esto último puede ser la regla del cinco de «Lypinsky», donde, a partir de datos como peso molecular, centros protonables… se deduce un conocimiento sobre características que deben presentar una molécula para ser previsiblemente activa.

Otra cuestión se trataría ahora si se quieren definir, por ejemplo, qué características debe tener un compuesto para ser activo oralmente, tener un efecto antagonista NPY a concentraciones nanomoleculares y poseer una estructura que desde el punto de vista de la toxicología no presenta ninguna característica que la haga dudosa en cuanto a unos efectos secundarios. Se trata ahora de manejar conocimientos tácitos, que son aquellos que se infieren, que no se dicen o escriben formalmente, sino que están derivados de la experiencia y de la práctica. Estas aproximaciones tienen también un componente de azar, estocásticas, y forman parte importante de las decisiones que deben tomarse en la búsqueda de la optimización.

Se trata, en definitiva, de tener muy claro lo relativo a los conocimientos necesarios para lograr un fin, lo que puede relacionarse con la eficiencia, distinguiéndola de los conocimientos relativos a lograr un aumento en el poder de hacer cosas, la eficacia, que se va a relacionar con la sabiduría.

Un reto de este nuevo siglo será lograr una automatización interactiva que los relacione, si se quiere aumentar el número de compuestos activos puestos a disposición de la persona que sufre.

La Sección 1ª de la Real Academia Nacional de Farmacia propone reflexionar sobre compuestos activos en el Sistema Nervioso Central. De una parte, se trata de considerar la situación actual en el tema que tratará la Dra. Mª. Teresa García López del Instituto de Química Médica del CSIC en representación de la Sociedad Española de Química Terapéutica y de otra, la Dra. Ana Martínez Gil del Instituto de Química Médica, CSIC, que comentará sus últimos trabajos en el descubrimiento de nuevos compuestos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Real Academia Nacional de Farmacia
Madrid, 4 de octubre de 2007

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

[1] Graul, A. I.; Sorbera, L. A.; Lozzo, J.; Serradell, N.; Level, L. and Prous, J. R. (2007) The Year's New Drugs and Biologics. 2006. *Drug News. Respect.* 20 (1): 17-44.

[2] Recogido en referencia (1) de Integrity ® http://www.integrity.prous.com

[3] Camilleri, M.; Bharucha, A. E.; Ueno, R.; Burton, D.; Thomforde, G. M.; Baxter, K.; McKinzie, S. and Zinsmeister, A. R. (2006) Effects of a selective chloride chanel activator lubiprastone on gastrointestinal transit, gastric sensory and motor functions in healthy volunteers. *Ann. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 290: G924-927.

[4] Jbilo, O.; Ravinet-Trillou, C.; Armone, M.; Buisson, I.; Bribes, E.; Péleraux, A.; Pénarier, B.; Soubrié, P.; Le Fur, G.; Galiègues, S. and Casellas, P. (2005) The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J.* 19: 1567-1569.

[5] Pei, Z.; Li, X.; Longenecker, K.; von Geldern, T. W.; Wiedeman, P. E.; Lubben, T. H.; Zinker, B. A.; Steward, K.; Ballaron, S.J.; Stashko, M.A.; Mika, A. K.; Beno, D. W.; Long, M.; Wells, H.; Kempf-Grote, A. J.; Madar, D. J.; McDermott, D. S.; Bhagavatula, L.; Fickes, M. G.; Pireh, D.; Solomon, L. R.; Lake, M. R.; Edalji, R.; Fry, E. H.; Sham, H. L and Trevillyan, J. M. (2006) Discovery structure-activity relationship and pharmacobiological evaluation of (5-substituted-pyrrolidyl-2-carbonyl)-2-cyanopyrrolidines as potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *J. Med. Chem*. 49: 3520-3335.

[6] Gonzáles, D.; Rennard, S.; Nides, M.; Oncken, C.; Azoulay, S.; Billing, C. B.; Watsky, E. J.; Gong, J.; Williams, K. E.; Reeves, K. R. and Varenicicline Phase 3 Study Group (2006) Varenecidine and $\alpha_4\beta_2$ Nicotinic Acetylchlorine receptor portal agonist vs. Sustained-release Bupropion and Placebo for Smoking cesation A. Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 296: 47-55.

[7] Mehnert, J. M. and Kelly, W. K. (2007) Histone deacetylase inhibitors: biology and Mechanism of action. *J. Cancer*. 13 (I): 23-29.

EL POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL TRIPÉPTIDO N-TERMINAL DEL IGF-1 Y DE SUS MIMÉTICOS COMO FÁRMACOS NEUROPROTECTORES

DRA. MARÍA TERESA GARCÍA LÓPEZ

Instituto de Química Médica, CSIC en representación de la Sociedad Española de Química Terapéutica

Se ha descrito que algunos de los efectos neuroprotectores del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1) podrían deberse al tripéptido N-terminal, Gly-Pro-Glu (GPE), resultante de su ruptura enzimática. A pesar de que el mecanismo de acción de GPE no está claro, actualmente se encuentra en fase clínica III para prevenir el deterioro cognitivo en pacientes con cirugía cardiaca, utilizándose la infusión intravenosa continua como vía de administración, debido a su rápida degradación en plasma. Aunque sin aportar evidencia experimental, algunos autores han reivindicado que cyclo (Pro-Gly) (cPG) es el metabolito último de GPE, siendo este tripéptido un profármaco del dipéptido cíclico. Estos antecedentes dirigieron nuestra atención hacia dos objetivos: a) Obtener miméticos de GPE con mayor resistencia frente a peptidasas. b) Aportar algún dato indicativo de que la neuroprotección atribuída a GPE fuera debida a cPG. Para abordar el primer objetivo, sintetizamos y evaluamos en cultivos neuronales una serie de análogos de GPE que incluyen la incorporación de prolinas modificadas o de D-Pro or/and D-Glu, así como los grupos $\Psi[CH_2NH]$ y $\Psi[CH(CN)NH]$ como sustitutos del enlace peptídico. Para el segundo, comparamos la prevención del daño neuronal producido por NMDA y OGD tras la administración de GPE y cPG a varias concentraciones. El pseudotripéptido $Gl\Psi[CH_2NH]$-Glu fue el que mostró los mejores efectos frente al daño neuronal producido por OGD con porcentajes de protección muy superiores a los de GPE. Ninguno de nuestros resultados apoya que los efectos neuroprotectores mostrados por GPE se deban a cPG.

INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que las enfermedades relacionadas con procesos neurodegenerativos, tanto agudos como crónicos, constituyen un grave problema social y económico, agudizado ante el escaso arsenal de fármacos eficaces para estos procesos. En este sentido, los fármacos que actualmente se están utilizando están dirigidos esencialmente al aumento de neurotransmisores específicos, este es el caso del L-DOPA o de agonistas D1 o D2 en la aproximación dopaminérgica para el tratamiento del Parkinson o de los inhibidores de acetilcolinesterasa Tacrina y Donepecilo en la aproximación colinérgica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). Recientemente, y tras múltiples fracasos con la aproximación basada en el sistema glutamatérgico, se ha comercializado la memantina, antagonista de receptores NMDA [1]. En estos momentos, el modelo basado en el péptido β-amiloide en sus distintas vertientes y en la hiperfosforilación de la proteína tau son, quizá las estrategias a las que se le están dedicando mayores esfuerzos para combatir la EA [2]. Sin embargo, la variedad de enfermedades neurodegenerativas, tanto crónicas como agudas, y la complejidad de cada una de ellas hace que sea conveniente incidir en otras aproximaciones que, aún, están muy poco exploradas. Este es el caso del tripéptido N-terminal del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1) y de su tripéptido N-terminal, Gly-Pro-Glu (GPE, **1**), fragmento este último en el que hemos centrado nuestro interés.

El IGF-1 es un péptido de 70 aminoácidos, producido mayoritariamente en el hígado y que durante la circulación está casi en su totalidad unido a proteínas transportadoras -binding proteins (BPs)- que modulan sus efectos biológicos, los cuales ejercen a través de receptores específicos presentes en varios tejidos [3, 4]. Además de los efectos similares a insulina, el IGF-1 tiene un importante papel en el desarrollo del cerebro y potentes efectos antiapoptóticos [5]. En la última década, los efectos neuroprotectores del IGF-1 en distintos tipos de modelos experimentales de procesos neurodegenerativos han sido objeto de intensos estudios, habiéndose observado que estos procesos están asociados, entre otros factores, a cambios en los niveles de IGF-1 [6]. En este sentido, son de

destacar los resultados indicativos del papel regulador que desempeña este factor trófico en los niveles cerebrales del péptido β-amiloide [7, 8]. Asimismo, este grupo ha publicado recientemente un trabajo en el que, en ensayos con ratones, relacionan la habitual deficiencia cognitiva asociada con la edad con un déficit del IGF-1 en sangre, deficiencia que se palia con la administración de este factor [9]. Sin embargo, el uso terapéutico de este factor de crecimiento es controvertido, pues además de su limitada capacidad para atravesar la barrera sangre-cerebro, dado su elevado peso molecular, y de sus efectos en el metabolismo, se ha sugerido que aumenta el riesgo de tumorogénesis [10]. En cualquier caso, el hecho de ser un péptido grande obliga a pensar en formulaciones que faciliten su administración o a tratar de determinar el fragmento mínimo activo, responsable, en este caso, de la neuroprotección. En este sentido, existe evidencia suficiente de que el IGF-1 ejerce sus efectos centrales mediante dos mecanismos diferentes, consecuencia de su ruptura enzimática para dar lugar a dos fragmentos, ambos con efectos neuroprotectores, si bien con muy distinta potencia (Figura 1). Por una parte, el fragmento truncado (des 1-3) IGF-1, cuya acción está mediada por el IGF-1R y que muestra efectos neuroprotectores mucho menores que los del IGF-1, y, por otra, el tripéptido N-terminal H-Gly-Pro-Glu-OH (GPE), cuyo mecanismo está aún por clarificar, si bien se conoce que no interacciona con el citado receptor [11, 12]. Sara *et al* demostraron que este tripéptido es capaz de desplazar la unión de glutamato tritiado a membranas del cerebro anterior y a sinaptosomas hipotalámicos, lo que sugiere que podría actuar como ligando de receptores NMDA, habiéndose postulado posteriormente que puede actuar como antagonista de estos receptores [13, 14]. Por el contrario GPE, no interacciona directamente ni con receptores AMPA, ni de kainato, así como tampoco con los mecanismos de recaptación de glutamato. Sara *et al* también demostraron que GPE es un potente estimulador de la liberación de acetilcolina inducida por potasio en la corteza cerebral, y, aunque en menor medida, de la liberación de dopamina en el estriado [13].

FIGURA 1. *Ruptura enzimática de IGF-1 para dar lugar a GPE.*

Estudios en diversos modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Huntington y Parkinson, han puesto de manifiesto los efectos neuroprotectores de GPE frente a estos trastornos [15-17], así como los acaecidos después de procesos isquémicos [12, 18, 19]. Precisamente, en relación con estos procesos, GPE está siendo desarrollado, bajo el nombre de Glypromate®, por la compañía neozelandesa Neuren Pharmaceuticals, compañía que ha comunicado recientemente el comienzo de la fase clínica III de este fármaco, como protector de los problemas cognitivos derivados de cirugía cardiaca mediante *by pass* (CABG) [20].

El grave inconveniente que presenta GPE al plantear su posible utilización terapéutica frente a enfermedades neurodegenerativas crónicas, es su problemática administración, ya que la vía, actualmente más aconsejable, es la infusión intravenosa continua, debido a su corta vida en plasma (< 2 min), aunque en cerebro permanece hasta 4 h [21, 22]. Aunque se desconoce, hasta el momento, la presencia de un sistema enzimático específico responsable de la rápida degradación metabólica de GPE, Neuronz Ltd en colaboración con investigadores de la Universidad de Auckland han descrito que GPE se metaboliza primero a Gly-Pro y posteriormente a sus aminoácidos integrantes [22]. Sin embargo, en la patente de aplicación WO 03/041655 [23] se afirma, aunque sin aportar experimento demostrativo alguno, que el dipéptido cíclico, ciclo(Pro-Gly) (cPG, **2**, Figura 2), es, junto con el ácido glutámico, el último metabolito del GPE, reivindicando para esta dicetopiperazina potentes efectos neuroprotectores, tanto en esta patente como en otra publicada por Neuronz [24]. Es más, se llega a afirmar que cPG es el responsable del efecto neuroprotector de GPE y del IGF-1 de los que ambos son profármacos [23]. Estas patentes tienen su antecedente en resultados previos de Gudasheva *et al.*, que identifican en 1996 la presencia endógena de cPG en cerebro de ratas, y que describen su importante actividad nootrópica y ansiolítica [25-27]. Este último grupo sugiere que cPG podría ser un ligando endógeno de unos hipotéticos receptores nootrópicos de los que el piracetam (2-oxo-1-pirrolidinacetamida), prototipo de potenciador cognitivo, comercializado hace más de 30 años, sería un ligando exógeno [25].

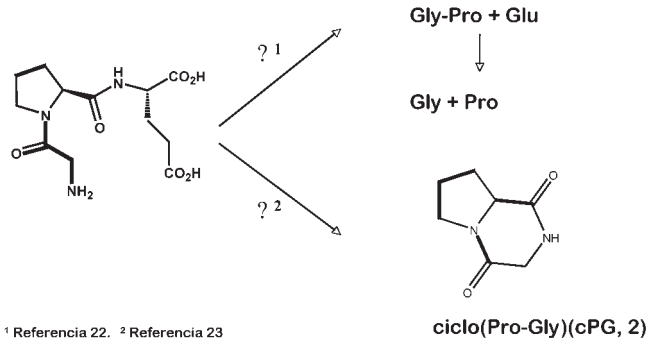

FIGURA 2. *Rutas metabólicas propuestas para GPE.*

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, en particular la rápida degradación metabólica de GPE, inherente a su naturaleza peptídica, nos hemos planteado los dos objetivos siguientes: Por una parte, la obtención de análogos o miméticos de GPE resistentes a peptidasas. Por otra, explorar la hipótesis referente a que el tripéptido GPE sea un profármaco del dipéptido cíclico cPG, siendo éste último el verdadero agente neuroprotector.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para abordar el primero de los objetivos arriba indicados, hemos llevado a cabo la síntesis de una serie de tripéptidos y pseudotripéptidos análogos de GPE, resultantes de las modificaciones representadas en la Figura 3. Como puede observarse, las modificaciones realizadas en el prototipo incluyen la incorporación de los correspondientes aminoácidos de la serie D, la sustitución de la prolina por una amplia variedad de análogos no proteinogénicos y la sustitución del enlace peptídico, CONH, por agrupamientos reconocidos como buenos miméticos de éste (ψ[ ]).

Con la selección de una amplia diversidad de aminoácidos como sustitutos del residuo de prolina, se ha pretendido variar en una buena medida las distintas características conformacionales de este aminoácido singular que nos pudieran permitir establecer relaciones conformación-

efecto neuroprotector. La particularidad de que la prolina sea el único aminoácido proteinogénico con el grupo amino endocíclico hace de este aminoácido un residuo clave para la adopción de la conformación bioactiva por parte de los péptidos portadores de la secuencia Xaa-Pro [28].

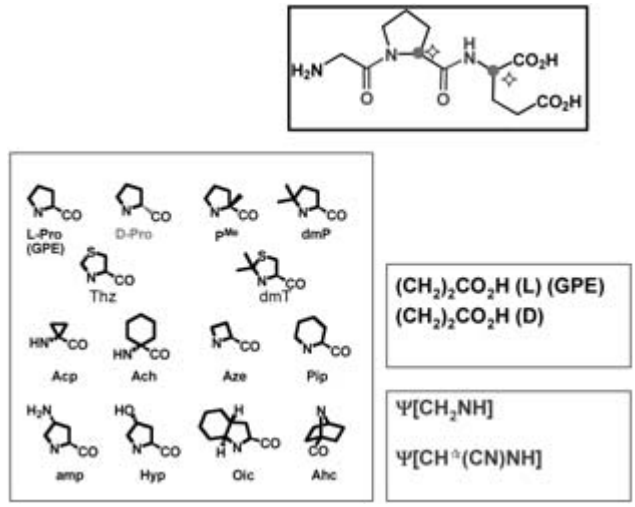

FIGURA 3. *Modificaciones sintéticas realizadas en GPE: Incorporación de D-Pro y/o D-Glu; Sustitución de Pro por otros aminoácidos no proteinogénicos.*

Por otra parte, señalar que se han sustituido cada uno de los dos enlaces peptídicos de GPE por dos tipos de agrupamientos. El primero de ellos, el metilenamino, ψ[CH_2NH], bioisóstero del grupo amida, conocido también como el enlace peptídico reducido, es el sustituto del enlace peptídico más utilizado por su facilidad sintética [29]. El segundo, el cianometilenamino ψ[CH(CN)NH], con mayor semejanza estérica y electrónica con el enlace peptídico que el ψ[CH_2NH], que ha sido descrito y utilizado ampliamente por nuestro grupo de trabajo [30].

La síntesis de los análogos de GPE, tanto en los que se ha incorporado D-Pro y/o D-Glu como en las que se ha reemplazado la Pro por distintos aminoácidos no proteinogénicos, se realizó por métodos convencionales de síntesis de péptidos, bien en disolución o bien en fase sólida [31, 32]. La formación de los enlaces pseudopeptídicos ψ[CH_2NH]

y ψ[CH(CN)NH], se llevó a cabo, respectivamente, mediante reacción de aminación reductiva y de Strecker modificada, utilizando cianuro de trimetilsililo (CNTMS) y $ZnCl_2$ y partiendo de los correspondientes α-aminoaldehídos convenientemente N-protegidos y ésteres de aminoácidos, en ambos casos. Como se indica de manera general en la Figura 4, en la generación del enlace cianometilenamino se crea un nuevo centro asimétrico, dando, por tanto lugar a la obtención de dos pseudopéptidos diastereoisómeros cuya asignación estructural se establece mediante ^{1}H RMN, de acuerdo con el criterio previamente descrito por Herranz *et al*. [30].

Todos los análogos de GPE sintetizados se muestran en la Tabla 1 en donde se indican los correspondientes valores de afinidad por receptores de glutamato (GluRs), determinados mediante la medida del desplazamiento de ácido L-[^{3}H]-glutámico de membranas sinápticas de corteza de rata [33, 34]. A efectos comparativos, en los ensayos se incluyeron el conocido antagonista competitivo de receptores NMDA, (*R*)-AP5 y el propio tripéptido modelo GPE (**1**). Con el fin de reflejar la necesidad del residuo de glutámico para la fijación de GPE a GluRs, también se incluye en la tabla el valor reportado en la literatura para la afinidad del dipéptido Gly-Pro, carente de este residuo [13].

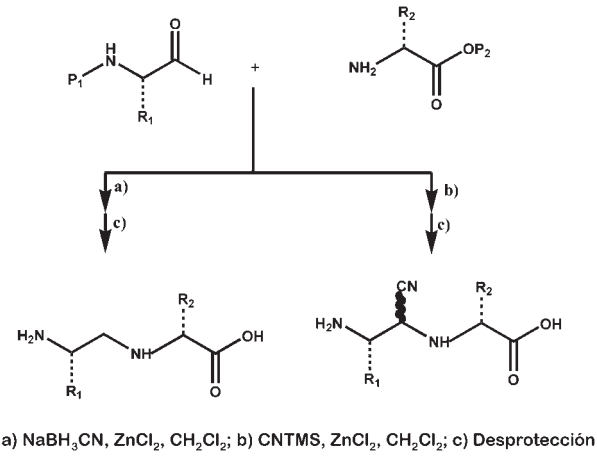

FIGURA 4. *Esquema general para la formación de enlaces pseudopeptídicos Ψ[CH_2NH] y Ψ[CH(CN)NH].*

Como se observa en la Tabla 1, la sustitución de Pro y/o Glu por sus correspondientes enantiómeros de la serie D conduce en los tres casos (compuestos **2**, **3**, y **4**) a la pérdida de afinidad por GluRs. Este resultado que parecería indicar la imposibilidad de los análogos de GPE con residuos de configuración D para fijarse a estos receptores, contrasta con que el compuesto portador del residuo de D-dimetilprolina **17** sea no sólo más afín que su isómero **16,** sino el mejor ligando de toda la serie con una afinidad 10 y 100 veces superior a (*R*)-AP5 y GPE, respectivamente. En conjunto, la sustitución de Pro por diversos aminoácidos no proteinogénicos (compuestos **5-17**) conduce a resultados también muy diversos que, en principio, podrían estar relacionados con cambios conformacionales. Así, la incorporación del 7-azabiciclo Ahc en **12** condujo al segundo mejor ligando de toda la serie con una afinidad una y dos órdenes de magnitud superior a la de (*R*)- AP5 y GPE, respectivamente, mientras que la afinidad de **11**, portador del biciclo Oic, fue del mismo orden que la del tripéptido modelo. Por su parte, el cambio de prolina por sus homólogos superior e inferior condujo a resultados opuestos entre sí. Así, mientras la afinidad del derivado de ácido pipecólico **7** fue unas 10 veces superior a la del GPE, el derivado de azetidina **8**, más restringido conformacionalmente, no mostró afinidad a concentraciones inferiores 100 μM, como tampoco la mostraron a esta concentración los tripéptidos análogos **5** y **6** que incorporan los aminoácidos carbocíclicos Acp y Ach.

El resultado más destacable que se deduce de los valores de afinidad por GluRs de los tripéptidos **1-17** es la falta de relación entre estos valores y la conformación preferente en torno al enlace Gly-Xaa [30]. Así, los compuestos portadores de los residuos de α-metilprolina y dimetilprolina **14** y **16** con poblaciones mayoritarias *trans* (*cis/trans* = 11:89) y *cis* (*cis/trans* = 69:31), respectivamente, mostraron afinidades muy similares y superiores a la de GPE (*cis/trans* = 19:81). Es también de señalar que ni el derivado de tiazolidina (Thz) **13** (23:77 *cis/trans*), ni el de 2-dimetiltiazolidina (dmT) **15** (100% conformación *cis*), fueron capaces de fijarse a GluRs. La presencia de un átomo de azufre, capaz de alterar el plegamiento adoptado por el anillo, y la hidrofobicidad de los residuos de dmT y Thz en comparación a la prolina, podrían

explicar la pérdida de afinidad de los análogos **13** y **15** con respecto a GPE y **16** respectivamente.

TABLA 1. *Desplazamiento de L-[3H]-Glu de membranas sinápticas de corteza de rata de análogos de GPE modificados.*

Nº	*Compuesto*	*Ki (μM)*	*Nº*	*Compuesto*	*Ki (μM)*
1	Gly-Pro-Glu (GPE)	31.24 ±15.65	**14**	Gly-P^{Me}-Glu	7.96 ± 1.83
2	Gly-Pro-D-Glu	>100	**15**	Gly-dmT-Glu	>100
3	Gly-D-Pro-Glu	>100	**16**	Gly-dmP-Glu	3.79 ± 0.53
4	Gly- D-Pro-Glu	>100	**17**	Gly-D-dmP-Glu	0.33 ± 0.07
5	Gly-Acp-Glu	>100	**18**	Gly-Pro Ψ[CH_2NH]Glu	>100
6	Gly-Ach-Glu	>100	**19**	Gly Ψ[CH_2N]Pro-Glu	>100
7	Gly-Pip-Glu	2.39 ± 0.17	**20**	Gly-Pro Ψ[CH_2N]Glp[1]	>100
8	Gly-Aze-Glu	>100	**21**	Gly-ProΨ[(*R*)CH(CN)NH]Glp[1]	0.70 ± 0.13
9	Gly-amp-Glu	15.54 ± 4.78	**22**	Gly-ProΨ[[(*S*)CH(CN)NH]Glp[1]	41.05 ± 1.12
10	Gly-Hyp-Glu	9.24 ± 1.74		Gly-Pro[2]	7.96 ± 1.83
11	Gly-Oic-Glu	22.37 ± 5.30		(R)AP5	3.83 ± 1.76
12	Gly-Ahc-Glu	0.48 ± 0.09		L-Glutámico	0.87 ± 0.21
13	Gly-Thz-Glu	>100			

[1] Glp=piroglutámico; [2] Referencia 13.

Por lo que se refiere a los pseudotripéptidos **18-22,** los datos de afinidad de **18** y **19** indican la intolerancia a la sustitución de cualquiera de los dos enlaces peptídicos por el enlace peptídico reducido ψ[CH_2NH] para la fijación a GluRs. Por el contrario, los pseudotripéptidos portadores del Ψ[(*R*)CH(CN)N] o Ψ[(*S*)-CH(CN)N] **21** o **22** mostraron una afinidad más de 40 veces superior o similar a la de GPE. Aunque en el caso de estos pseudopéptidos no disponemos de los análogos derivados de Glu sin lactamizar a Glp, que nos permitirían determinar la influencia en la afinidad de la sustitución del enlace peptídico Pro-Glu por (*R*) o (*S*) CH(CN)NH, sí que podemos comparar **21** y **22** con el análogo Ψ[CH_2N], **20**, y afirmar que también para la fijación de GPE a GluRs el grupo CH(CN)NH es mejor sustituto del enlace peptídico que el CH_2NH.

Uno de los resultados más interesantes de este trabajo se obtuvo tras determinar el efecto neuroprotector de estos péptidos y pseudopéptidos al daño producido por exposición a NMDA 100 μM en

cultivos neuronales primarios de hipocampo de rata [35]. Como se observa claramente al comparar la Tabla 1 con la Figura 5, no existe correlación alguna entre los datos de afinidad y el porcentaje de neuroprotección. Así, Gly-Pro-D-Glu (**2**) y Gly-D-Pro- Glu (**3**), sin afinidad detectable a 100 μM fueron los que mostraron mayor porcentaje de neuroprotección tanto a 10 μM como a 100 μM, incluso superior a la de Gly-Pro-Glu (**1**) a ambas concentraciones. Sin embargo, los tripéptidos **12** y **17**, los mejores ligandos de la serie, poseen un escaso o nulo efecto neuroprotector frente al daño provocado por NMDA. Esta falta de correlación sugiere que, al margen de su afinidad por GluRs, existen otros mecanismos adicionales responsables, en mayor o menor medida, de que esta serie de tripéptidos y pseudotripéptidos prevengan la excitotoxicidad producida por NMDA.

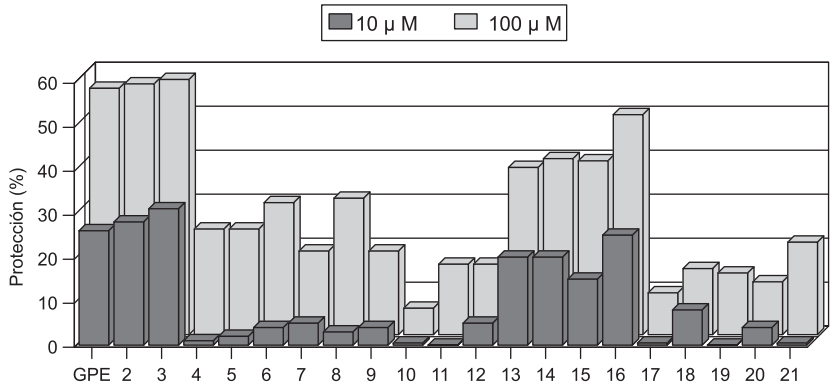

FIGURA 5. *Porcentaje de protección de cultivos neuronales de hipocampo de rata al daño excitotóxico inducido por NMDA (10 y 100 μM). La supervivencia celular se determinó por la medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre la sal de tetrazolio MTT. Los valores son la media ± la desviación estándar de 8-13 experimentos.*

Varios de estos análogos de GPE fueron también evaluados en cultivos neuronales sometidos a condiciones de privación de oxígeno y glucosa (OGD), siguiendo el método descrito [36]. Como se indica en la Figura 6, los péptidos **2-4** y los pseudotripéptidos **18-21** mostraron un porcentaje de protección similar o superior al de GPE tanto a 10 μM como a 100 μM. En esta evaluación, cabe destacar el potente efecto

neuroprotector Gly- ψ[CH_2N] Pro- Glu (**19**) con porcentajes de protección de 50 y 83% a dichas concentraciones. A diferencia de GPE, este pseudotripéptido mantuvo, a 1 μM, el mismo efecto neuroprotector que mostró a 10 μM, manteniendo aún un efecto notable a 0.1 μM (Figura 7).

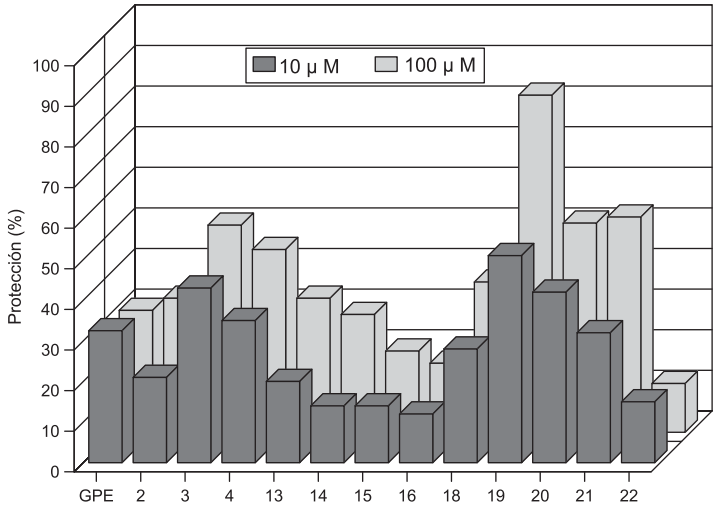

FIGURA 6. *Porcentaje de protección de cultivos neuronales de hipocampo de rata al daño inducido por OGD. La supervivencia celular se determinó por la medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre la sal de tetrazolio MTT. Los valores son la media ± la desviación estándar de 8-13 experimentos.*

Por último, y con el fin de arrojar luz sobre la hipótesis de que GPE sea un profármaco de cPG y que este dipéptido cíclico sea el auténtico agente neuroprotector evaluamos en paralelo ambos compuestos, determinando en cada uno de los ensayos el porcentaje de protección a dosis de 10 y 100 μM. Como se representa en la Figura 8A, el porcentaje de protección del daño neuronal ocasionado por NMDA es menor tras la administración de cPG que del tripéptido GPE, tanto a dosis de 100 μM como de 10 μM, siendo virtualmente inexistente la neuroprotección mostrada por el dipéptido cíclico a esta última concentración. Este resultado, parece contradecir que GPE sea un profármaco de cPG como se postula en la patente de Tran (23). Aunque en condiciones de falta de oxígeno y glucosa (Figura 8B), cPG conduce, a 100 μM, a un porcentaje de neuroprotección superior al de GPE, el hecho de que am-

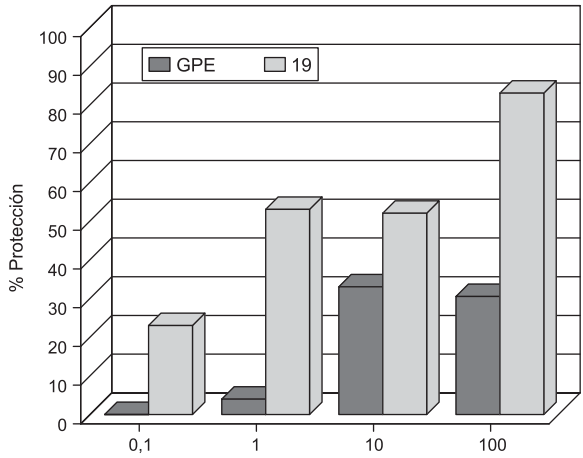

FIGURA 7. *Comparación entre el porcentaje de protección de cultivos neuronales de hipocampo de rata al daño inducido por OGD tras administración a 0.1, 1.0, 10 y 100 μM de GPE y de 19. La supervivencia celular se determinó por la medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre la sal de tetrazolio MTT. Los valores son la media ± la desviación estándar de 8-13 experimentos.*

bos porcentajes sean prácticamente idénticos a 10 μM, tampoco parece apoyar a GPE como profármaco de cPG.

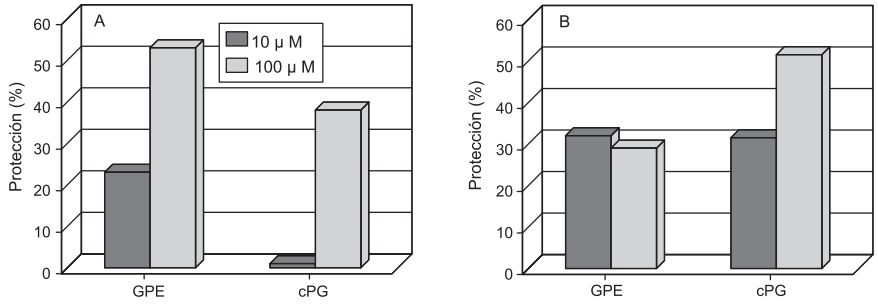

FIGURA 8. *Comparación entre el porcentaje de protección de cultivos neuronales de hipocampo de rata al daño inducido por (A) NMDA (10 y 100 μM) y (B) OGD tras administración a 10 y 100 μM de GPE y de cPG. La supervivencia celular se determinó por la medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre la sal de tetrazolio MTT. Los valores son la media ± la desviación estándar de 8-13 experimentos.*

De todos los resultados, aquí presentados, podemos concluir con que hemos obtenido análogos del tripéptido N-terminal del IGF-1, GPE,

con efecto neuroprotector similar o superior a este tripéptido endógeno que deben ofrecer mayor resistencia a peptidasas, bien por ser péptidos con aminoácidos D o pseudopéptidos en los que se ha sustituído el enlace peptídico por otros grupos. Merece destacarse el potente efecto protector de Gly-ψ[CH_2N]Pro-Glu, muy superior al de GPE, tras daño hipóxico-isquémico en cultivos neuronales.

Respecto al mecanismo de acción, los resultados aquí incluidos, indican claramente que no existe correlación alguna entre la afinidad por GluRs de esta serie de análogos de GPE y la protección de excitotoxicidad inducida por NMDA. Este resultado parece indicar que independientemente de la afinidad por GluRs deben existir otros mecanismos mediadores del efecto neuroprotector frente a este daño.

Finalmente, señalar que ninguno de los ensayos aquí descritos apoya la hipótesis de que el dipéptido cíclico CPG sea el metabolito responsable de los efectos neuroprotectores del GPE. Por tanto, el diseño de miméticos del tripéptido N-terminal del IGF-1 con mejores propiedades farmacocinéticas continúa siendo una aproximación de interés para la consecución de fármacos neuroprotectores novedosos.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo referente a análogos de GPE y cPG ha sido financiado por el proyecto coordinado del Ministerio de Educación y Ciencia SAF2003-07207 y forma parte de la Tesis Doctoral de Sergio Alvar Alonso de Diego, realizada con una Beca de este Ministerio para Unidades Asociadas al CSIC. En los aspectos de diseño y síntesis han colaborado las Dras. Rosario Herranz, Rosario González-Muñiz, Mercedes Martín Martínez y Mª Jesús Pérez de Vega del Instituto de Química Médica y la Dra. Mª Luisa Jimeno del Centro de Química Orgánica «Manuel Lora-Tamayo» en los estudios conformacionales. Los ensayos farmacológicos han sido realizados en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Navarra por los Dras. Edurne Cenarruzabeitia y Diana Frechilla, bajo la dirección del Profesor Joaquín Del Río.

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

[1] Cummings, J. L. and Zhong, K. (2006) Treatments for behavioural disorders in neurodegenerative diseases: drug development strategies. *Nat. Rev. Drug Discov*. 5: 64-74.

[2] Behl, C. (2006) The search for novel avenues for the therapy and prevention of Alzheimer's disease. *Drug News Perspect*. 19: 5-12.

[3] Sara, V. R. and Hall, K. (1990) Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Rev*. 70: 591-614.

[4] Delafontaine, P.; Song; Y-H. and Li, Y. (2004) Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 24: 435-444.

[5] Russo, V. C.; Gluckman P.D.; Feldman, E. L. and Werther, G. A. (2005) The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr. Rev.* 26:916-943.

[6] Doré, S.; Kar, S. and Quirion, R. (1998) Rediscovering an old friend, IGF-1: Potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 20: 326-331.

[7] Busiguina, S.; Fernández, A. M.; Barrios, V.; Clark, R.; Tolbert, D. L.; Berciano, J. and Torres-Alemán, I. (2000) Neurodegeneration is associated to changes in serum insuline-like growth factors. *Neurobiol. Dis*. 7: 657-665.

[8] Carro, E.; Trejo, J. L.; Gómez-Isla, T.; Le Roith, D. and Torres-Alemán, I. (2002) Serum insuline-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat. Med*. 8: 1390-1397.

[9] Trejo, J. L.; Piriz, J.; Llorens-Martin, M. V.; Fernandez, A M.; Bolós, M; Le Roith, D.; Nuñez, A. and Torres-Alemán, I. (2007) Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol. Psychiatr.* doi: 10.1038/sj.mp.4002076

[10] Fernandez, A M.; Carro, E. M.; López-López, C. and Torres-Alemán, I. (2005) Insuline-like growth factor I treatment for cerebellar ataxia: Addressing a common pathway in the pathological casacade? *Brain Res. Rev.* 50: 134-141

[11] Sara, V. R.; Carlsson-Skwirut, C.; Drakemberg, K.; Giacobini, M. B.; Hakansson, L.; Mirmiran, M.; Nordberg, A.; Olson, L.; Reinecke, M.; Stahlbom, P. A. and Nordqvist, A. C. S. (1993) The biological role of truncated insulin-like growth factor-1 and the tripeptide GPE in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 692: 183-191.

[12] Sizonenko, S. V.; Sirimanne, E. V.; Williams, C. E. and Gluckman, P. D. (2001) Neuroprotective effects of the N-terminal tripeptide of IGF-1, glycine-proline-glutamate, in the immature rat brain after hypoxic-ischemic injury. *Brain Res*. 922: 42-50 y referencias allí indicadas.

[13] Sara, V. R.; Carlsson-Skwirut, C.; Bergman, T.; Jörnvall, H.; Roberts, P. J.; Crawford, M.; Hakansson, L. N.; Civalero, I. and Nordberg, A. (1989) Identification of Gly-Pro-Glu (GPE), the aminoterminal tripeptide of insulin-like growth factor 1 which is truncated in brain, as a novel neuroactive peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 165: 766-771.

[14] Bourguignon, J. P. and Gerard, A. (1999) Role of the insuline-like growth factor binding proteins in limitation of IGF-1 degradation into the *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist GPE: Evidence from gonadotrophine hormone secretion in vitro at two developmental stages. *Brain. Res*. 846: 247-252.

[15] Saura, J.; Curatolo, L.; Williams, C. E.; Gatti, S.; Benatti, L.; Peeters, C.; Guan, J.; Dragunow, M.; Post, C.; Faull, R. L. M.; Gluckman, P. D. and Skinner, S. J. M. (1999) Neuroprotective effects of Gly-Pro-Glu, the N-terminal tripeptide of IGF-1, in the hippocampus in vitro. *NeuroReport.* 10: 161-164.

[16] Alexi, T.; Hughes, P. E.; Van Roon-Mom, W. M. C.; Faull, R. L. M.; Williams, C. E.; Clark, R. G. and Gluckman, P. D. (1999) The IGF-I amino-terminal tripeptide glycine-proline-glutamate (GPE) is neuroprotective to striatum in the quinolinic acid lesion animal model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 159: 84-97.

[17] Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Clark, R. and Gluckman, P. D. (2000) N-Terminal tripeptide of IGF-1 (GPE) prevents the lost of TH positive neurons after 6-OHDA induced nigral lesion in rats. *Brain Res*. 859: 286-292.

[18] Guan, J.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Glukman, P. D. and Williams, C. E. (1999) The effects of the N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-1, glycine-proline-glutamate in different regions following hypoxic-ischemic brain injury in adult rats. *Neuroscience*. 89: 649-659.

[19] Guan, J.; Thomas, G. B.; Lin, H.; Mathai, S.; Batchelor, D. C.; George, S. and Gluckman, P. D. (2004) Neuroprotective effects of the N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-1, glycine-proline-glutamate (GPE) following intravenous infusion in hypoxic-ischemic adult rats. *Neuropharmacology*. 47: 892-903.

[20] www.neurenpharma.com

[21] Baker, A. M.; Batchelor, D. C.; Thomas, G. B.; Wen, J. Y.; Rafiee, M.; Lin, H. and Guan, J. (2005) Central penetration and stability of N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-I, glycine-proline-glutamate (GPE) in adult rat. *Neuropeptides.* 39: 81-87.

[22] Batchelor, D. C.; Lin, H.; Wen, J.-Y.; Keven, C.; Van Zijl, P. L.; Breier, B. H.; Glukman, P. D. and Thomas, G. B. (2003) Pharmacokinetics of glycine-proline-glutamate, the N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-1, in rats. *Anal. Biochem.* 323: 156-163.

[23] Tran, L. H. Therapeutic agent composition and method of use. WO 03/041655.

[24] Guan, J.; Gluckman, P. D. and Sieg, F. Ciclo(prolyl-glycine) and methods of use to treat neural disorders. PCT Int. Appl. WO 03/039487

[25] Gudasheva, T. A.; Boyko, S. S.; Akparov, V. K.; Ostrovskaya, R. U.; Skoldinov, S. P.; Rozantsev, G. G.; Voronina, T. A.; Zherdev, V. P. and Seredenin, S. B. (1996) Identification of novel endogeneous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Lett.* 391: 149-152.

[26] Gudasheva, T. A.; Ostrovskaya, R. U.; Trofimov, S. S.; Voronina, T. A.; Skoldinov, S. P. and Seredenin, S. B. (1999) New endogenous dipeptide cycloprolyl-glycine is similar to piracetam by its memotropic selectivity. *Bull. Exp. Biol. Med*. 128: 1012-1014.

[27] Seredenin, S. B.; Gudasheva, T. A.; Boiko, S. S.; Kovalev, G. I.; Voronin, M. V. and Yarkova, M. A. (2002) Endogenous dipeptide cycloprolylglycine shows selective anxiolytic activity in animals with manifest fear reaction. *Bull. Exp. Biol. Med*. 133: 360-362.

[28] Yaron, A. and Naider, F. (1993) Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 28: 31-81.

[29] Spatola, A. F. (1983) Peptide backbone modifications: A structure-activity analysis of peptides containing amide bond surrogates, conformational constraints and related backbone modifications. In: Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, vol.7, Marcel DeKKer, New York (Weinstein, B., Ed), pp.267-357.

[30] Herranz, R.; Suárez-Gea, M. L.; Vinuesa, S.; García-López, M. T. and Martínez, A. (1991) Synthesis of ψ[CH(CN)NH] pseudopeptides. A new peptide bond surrogate. *Tetrahedron Lett.* 32: 7579-7582.

[31] Alonso de Diego, S. A.; Muñoz, P.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Martín-Martínez, M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Rio, J.; Jimeno, M. L. and García-López, M. T. (2005) Analogues of the neuroprotective tripeptide Gly-Pro-Glu(GPE). Synthesis and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 15: 2279-2283.

[32] Alonso de Diego, S.A.; Gutiérrez-Rodríguez, M.; Pérez de Vega, M. J.; Casabona, D.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; del Río, J.; Jimeno, M. L. and García-López, M. T. (2006) New Gly-Pro-Glu (GPE) analogues. Expedite solid-phase synthesis and biological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 16: 1392-1396.

[33] Foster, A. C. and Fagg, G. E. (1987) Comparison of L-[^{3}H]-glutamate, D-[^{3}H]-aspartate, DL-[^{3}H]-AP5 and [^{3}H]-NMDA as ligands for NMDA receptors in crude postsynaptic densities from rat brain. *Eur. J. Pharmacol*. 113: 291-300.

[34] Monahan, J. B. and Michel, J. (1987) Identification and Characterization of N-methyl-D-Aspartate specific L-[^{3}H-]-glutamate recognition site in synaptic plasma membranes. *J. Neurochem*. 48: 1699-1708.

[35] Snider, B.J; Moss, J. L.; Revilla, F. J.; Lee, C. S.; Wheeler, V. C.; MacDonald, M. E. and Choi, D. W. (2003) Neocortical neurons cultured from mice with expanded cag repeats in the huntingtin gene: unaltered vulnerability to excitotoxins and other insults. *Neuroscience.* 120: 617-625

[36] De Cristóbal, J.; Cárdenas, A.; Lizasoain, I.; Leza, J. C.; Fernández-Tomé, P.; Lorenzo, P. and Moro, M. A. (2002) Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Stroke.* 33: 261-271.

FÁRMACOS MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

DRA. ANA MARTÍNEZ

Instituto de Química Médica, CSIC

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es un proceso neurodegenerativo del sistema nervioso central, que cursa con una pérdida progresiva de la función intelectual afectando a diferentes áreas del cerebro tales como las de la memoria, el lenguaje, el conocimiento, y la personalidad, que terminan en una amnesia total. Fue descrita por primera vez por el neuropsiquiatra alemán Alois Alzheimer en 1907, tras el análisis post-mortem el cerebro de su paciente Augusta D. (Figura 1) [1]. Para el Dr. Alzheimer esta mujer de 54 años, que falleció totalmente desorientada y dependiente de su entorno tras haber permanecido internada varios años con una demencia severa, representó un cuadro clínico especial y tras el estudio anatomo-patológico de su cerebro identificó en él dos lesiones características. Estas lesiones fueron denominadas placas seniles y ovillos neurofibrilares. La descripción fue archivada y casi olvidada hasta que en la década de los 70, tras una reclasificación de las demencias, cobró una gran relevancia, siendo hoy en día el criterio principal del diagnóstico inequívoco post-mortem de esta enfermedad neurodegenerativa. La etiología de la enfermedad, o lo que es igual, el efecto causante de la misma, es desconocido existiendo diversas hipótesis de trabajo que explican el inicio de la neurodegeneración [2].

En la actualidad existen cerca de 13 millones de pacientes en el mundo afectados de este proceso, siendo al día de hoy la tasa de diagnóstico tan solo del 57%. La enfermedad de Alzheimer es la más frecuente de

FIGURA 1. *El neuropsiquiatra alemán Alois Alzheimer y su paciente Augusta D.*

todas las demencias y su principal factor de riesgo es la edad [3]. Esta patología está intrínsecamente unida a la misma y aumenta exponencialmente con el número de años, llegando a afectar a cerca del 45% de los mayores de 85 años, y siendo más frecuente en mujeres que en varones (Figura 2). El aumento de la esperanza de vida media para los próximos años, hacen prever cifras de cerca de 60 millones de pacientes para los años 2050. Hoy en día no existe una terapia eficaz para esta patología, tan solo fármacos paliativos que mejoran parcialmente y solo durante un periodo transitorio no mayor de 18 meses los síntomas del déficit cognitivo que sufren los pacientes. Actualmente, es una necesidad urgente descubrir fármacos modificadores del proceso neurodegenerativo que puedan retrasar o evitar la muerte neuronal.

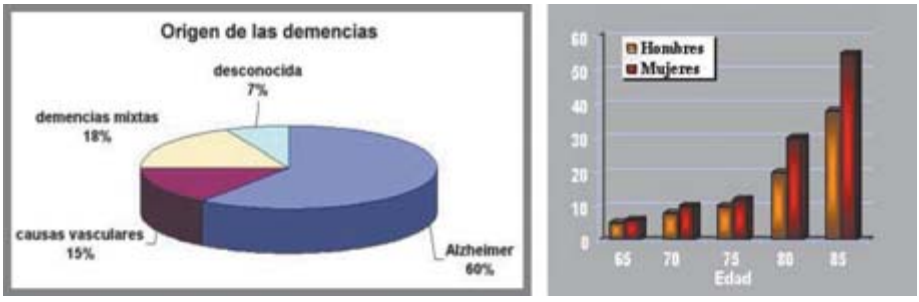

FIGURA 2. *Datos epidemiológicos de la enfermedad de Alzheimer.*

A nivel histopatológico, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de dos lesiones en el cerebro: una a nivel intraneu-

ronal denominada ovillos neurofibrilares y formada por una proteína asociada a microtúbulos denominada tau en un estado anómalo de hiperfosforilación, y otra lesión extraneuronal, denominada placa senil y formada fundamentalmente por agregados de un péptido denominado beta-amiloide (Figura 3). Estas lesiones unidas al claro déficit en numerosos neurotransmisores, fundamentalmente en el sistema colinérgico, conducen a la muerte neuronal o neurodegeneración [4].

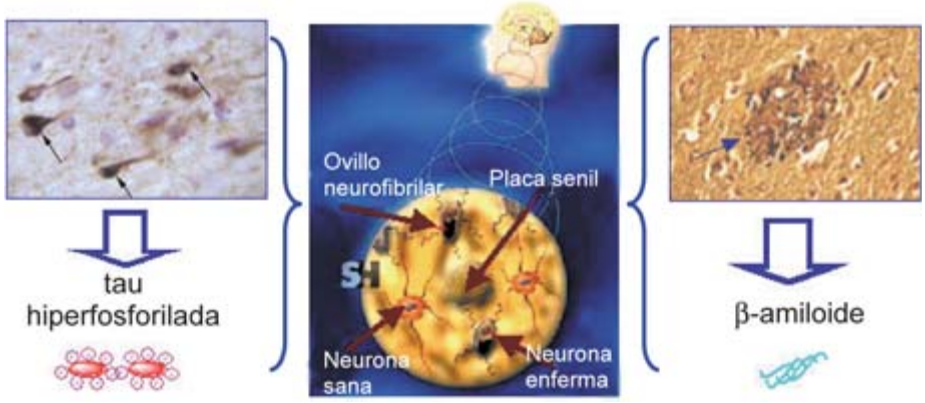

FIGURA 3. *Lesiones histopatológicas en la enfermedad de Alzheimer.*

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Aunque en la actualidad no existe un tratamiento efectivo para este proceso, a partir de los años 80 se inició intensivamente la investigación terapéutica para poder encontrar un tratamiento eficaz para la enfermedad de Alzheimer, existiendo en la actualidad diferentes hipótesis de partida [5].

Hipótesis colinérgica

La primera de ellas es la denominada hipótesis colinérgica, iniciada en los años 80, que se basa en conseguir un aumento del neurotransmisor acetilcolina, asociado a los procesos del aprendizaje y memoria,

en el espacio intersináptico [6]. Su base molecular era ya ampliamente conocida por los investigadores en neurología y el beneficio que puede aportar a los pacientes es solamente paliativo, es decir una mejora transitoria del déficit cognitivo, sin intervenir directamente en los procesos moleculares de la neurodegeneración. Siguiendo esta hipótesis, se han utilizado en terapéutica o están en desarrollo las siguientes familias de agentes terapéuticos (Figura 4):

1. Precursores de la síntesis de acetilcolina [7]. La administración de colina o de lecitina, por ejemplo, se han utilizado en clínica sin encontrar ningún efecto terapéutico. Estos datos, probablemente, son debidos a problemas de tipo metabólico.

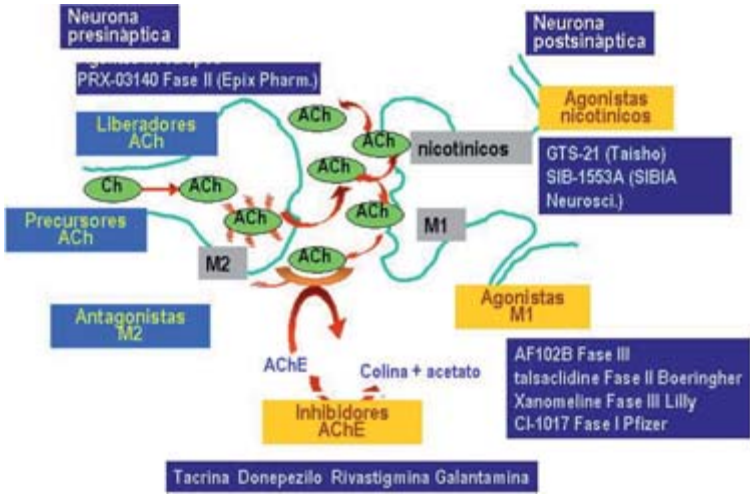

FIGURA 4. *Estrategias terapéuticas basadas en la hipótesis colinérgica.*

2. Agentes capaces de favorecer la liberación de acetilcolina al espacio intersináptico. Esta aproximación ha sido abordada por diferentes compañías farmacéuticas con un éxito muy pobre hasta el momento, si bien actualmente el compuesto denominado **PRX-03140** se encuentra en fase II de desarrollo clínico patrocinado por Epix Pharmaceuticals [8].

3. Agonistas de los receptores postsinápticos de acetilcolina para favorecer la transmisión neuronal. Al existir dos clases de receptores

postsinápticos nos podemos encontrar con dos tipos de agente terapéuticos diferentes:

3.1. Agonistas muscarínicos M1 [9], entre los que se encuentran el ***AF102B***, la ***xanomelina*** o la ***talsaclidina*** en diferentes fases de desarrollo clínico y con diferente respuesta en los estudios preclínicos llevados a cabo en animales transgénicos.

3.2. Agonistas nicotínicos como ***GTS-21*** y ***SIB-1553***, que es una de las áreas más estudiadas actualmente por su implicación en los procesos de neuroprotección [10].

4. Antagonistas de los receptores muscarínicos M2 para intentar aumentar la concentración de acetilcolina en la sinapsis [11].

5. Inhibidores de acetilcolinesterasa, que evitan la degradación de la acetilcolina en el espacio intersináptico [12]. Esta es la única estrategia terapéutica que ha llegado al mercado. A partir de 1993, se aprobaron para su uso clínico, ***tacrina*** (Cognex), ***donepezilo*** (Aricept), ***rivastigmina*** (Exelon) y ***galantamina*** (Reminyl) como fármacos paliativos de la enfermedad de Alzheimer.

Hipótesis amiloide

A partir de finales de los 80, en investigación básica, surgió una nueva hipótesis denominada la «hipótesis amiloide» y basada en la biopatología del péptido beta-amiloide, principal componente de las placas seniles [13]. La proteína precursora del péptido beta-amiloide (APP) es una proteína citoplasmática que en condiciones normales sufre una proteolisis mediada por el enzima alfa-secretasa para originar fragmentos solubles (APPs) con funciones tróficas para las neuronas. En condiciones patológicas, el APP es fragmentado por acción sucesiva de dos enzimas denominadas beta- y gamma-secretasa, generando el péptido beta-amiloide soluble compuesto por 40-42 aminoácidos. En estas condiciones el péptido no es tóxico, pero por acción de diversos agentes, como cambios en el pH, interacción con

otras proteínas, etc. el beta-amiloide cambia de conformación, pasando de una conformación aleatoria a una conformación de láminas beta que provoca su auto-agregación en fibrillas. Estas fibras precipitan en el citoplasma, formando agregados proteicos que constituyen las placas seniles con efectos neurotóxicos [14].

A partir del conocimiento de estas bases moleculares, se han puesto en marcha diferentes estrategias terapéuticas con el fin de poder intervenir de una manera efectiva en la formación de las placas seniles y por tanto poder descubrir fármacos modificadores de la enfermedad de Alzheimer. Existen distintas aproximaciones seguidas por los grupos de investigación y las compañías farmacéuticas, todas ellas todavía en fase de investigación (Figura 5) [15].

1. *Activación de la alfa-secretasa* [16]. Esta estrategia tiene una base molecular sólida estando diversas proteasas como ADAM-10 y ADAM-17(TACE) identificadas. La sobreexpresión de estas proteasas en el cerebro de animales transgénicos produce una clara disminución de la amiloidogénesis, si bien la transferencia de estos resultados a pacientes no está comprobada. El futuro desarrollo de agentes farmacológicos capaces de activar este enzima o bien que actúen sobre segundos mensajeros con la misma función fisiológica podrá darnos una respuesta. En la actualidad Torrey Pines tiene en desarrollo clínico dos agentes muscarínicos M1, NGX267 y NGX292, capaces de activar α-secretasa [17]. El primero de ellos ha iniciado recientemente la fase II de los ensayos clínicos con el fin de mostrar la seguridad en pacientes de Alzheimer y los primeros signos de eficacia en los mismos.

2. *Inhibición de beta-secretasa* [18]. Esta proteasa, implicada en la producción del péptido beta-amiloide, es una de las dianas farmacológicas más prometedoras en el futuro tratamiento de la enfermedad de Alzheimer habiéndose demostrado *in vivo* la validez de la misma con el modelo animal knock out del enzima. Beta-secretasa o BACE (beta aspartyl cleaving enzyme) tiene bastante homología con la proteasa del HIV y muchos de los inhibidores de esta última enzima son capaces también de inhibir BACE.

Hay muchas compañías farmacéuticas cuyos programas de investigación están centrados en el descubrimiento y desarrollo de inhibidores selectivos de BACE entre las que se encuentran Merck, Lilly y Takeda, pero solo CoMentis acaba de presentar los primeros resultados de fase clínica I para su inhibidor CTS-21166 [19]. En este primer estudio en humanos, CTS-21166 se ha mostrado como un fármaco seguro capaz de reducir substancialmente los niveles de beta-amiloide plasmático. El futuro dirá si la eficacia del tratamiento a largo plazo se muestra en los pacientes de Alzheimer, obteniendo así uno de los fármacos modificadores de esta neurodegeneración que los próximos años verán la aprobación comercial.

3. *Inhibición y/o modulación de gamma-secretasa* [20]. Gamma-secretasa es un complejo proteico que además de estar implicado en la producción del beta-amiloide tiene otras muchas funciones fisiológicas importantes. Por ello la inhibición o modulación de esta proteasa debe hacerse de forma selectiva con el fin de evitar efectos secundarios adversos en humanos. Es mucho el desarrollo llevado a cabo en esta área, habiéndose descubierto inhibidores selectivos de gamma-secretasa con una eficacia alta en la reducción de beta-amiloide en modelos preclínicos. Diferentes compañías han avanzado alguno de sus compuestos hacia fases clínicas. Así, el compuesto conocido como LY450139 desarrollado por Lilly, ha sido administrado a mas de 50 pacientes con enfermedad de Alzheimer leve o moderada durante 14 semanas, habiéndose demostrado la disminución del beta-amiloide plasmático [21]. Actualmente se ha iniciado la fase III de desarrollo clínico como un potencial fármaco modificador del proceso neurodegenerativo incluyéndose en el reclutamiento a más de 1.500 pacientes de Alzheimer.

Actualmente, el fármaco más avanzado dentro de esta familia es el *Flurizan*, un inhibidor indirecto de gamma secretasa desarrollado por Myriad Pharmaceuticals, que es capaz de disminuir los niveles de producción del péptido amiloide de 42 aminoácidos selectivamente [22]. Se encuentra en fase III de desarrollo clínico, habiéndose cerrado ya el reclutamiento de todos los pacientes en nueve países diferentes. El objetivo de este estudio es evaluar el cambio en las capacidades cog-

nitivas y en las actividades de la vida diaria de los pacientes después de un tratamiento de 18 meses de duración [23]. La compañía piensa poder tener este fármaco modificador del proceso degenerativo para 2011 y estima que con sólo retrasar la enfermedad 6 años se podría disminuir más de un 38% la cifra de pacientes de Alzheimer estimada actualmente para el 2050.

4. *Inhibición de la agregación del beta-amiloide* [24]. Por otra parte, también se han llevado a cabo diferentes estrategias dirigidas a evitar la agregación del péptido beta-amiloide utilizando pequeñas moléculas capaces de evitar la fibrilogénesis. El *tramiprosato* (Alzhemed) de Neurochem es el compuesto que más lejos ha llegado en el desarrollo clínico (fase clínica III) [25], sin embargo aunque se han tratado con este fármaco más de 1.000 pacientes de forma crónica durante casi dos años, los resultados poco concluyentes en relación a su eficacia modificadora del curso degenerativo del proceso hicieron que el desarrollo clínico de este compuesto fuese suspendido en verano de 2007.

5. *Estrategias basadas en la eliminación de la placa amiloide* [26]. Actualmente se están investigando diferentes abordajes terapéuticos para poder eliminar la placa amiloide formada en el cerebro. Algunas de estas líneas son la activación de neprilisina, la actuación sobre IDE (insulin degrading enzyme), la activación del receptor nuclear PPAR-γ, etc. Sin embargo no existe un consenso claro sobre si este será un mecanismo de prevención de la enfermedad de Alzheimer, ya que varios autores postulan la alta toxicidad de las protofibrillas y consideran la placa amiloide tan solo como un mecanismo de defensa endógeno que eliminaría este último agente tóxico.

Por último, es importante mencionar también los avances que se están llevando a cabo en la inmunización frente al beta-amiloide, también conocido como la «vacuna» del Alzheimer [27]. Aunque los primeros estudios clínicos de fase II tuvieron que ser suspendidos por encontrar casos de encefalitis, hay diversas estrategias actualmente en desarrollo para encontrar una inmunización eficaz y segura frente al péptido amiloide. Si la eliminación del mismo de nuestro cerebro evitará

la enfermedad de Alzheimer o no, solo los estudios clínicos actualmente en curso lo podrán demostrar.

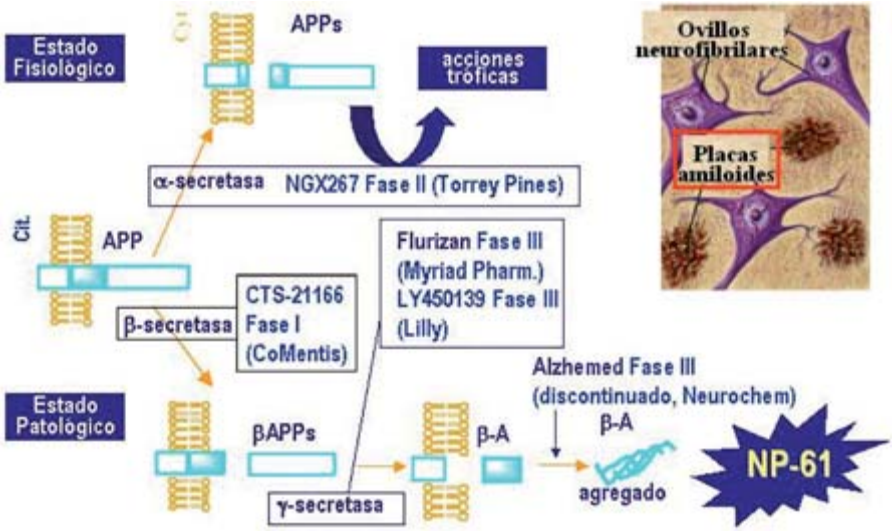

FIGURA 5. *Estrategias terapéuticas basadas en la hipótesis amiloide.*

NP-61

Es importante remarcar en este capítulo, que la empresa española NeuroPharma, perteneciente al grupo ZELTIA, realiza una importante investigación en el descubrimiento y desarrollo de fármacos activos para enfermedades del sistema nervioso central y muy especialmente en la investigación de fármacos modificadores de la enfermedad de Alzheimer. La cartera de productos actual de la compañía cuenta con dos candidatos en desarrollo clínico. Son moléculas fruto de sus programas de investigación y de transferencia de tecnología desde instituciones académicas de este país que, con mecanismos de acción novedosos y complementarios, se encuentran en la lista internacional de los fármacos en desarrollo. El compuesto denominado **NP-61** es un potente modulador del péptido beta-amiloide, con una doble acción tanto en la inhibición de la agregación del péptido como en la síntesis del APP, y por tanto podría ser clasificado en este capítulo de fármacos

modificadores de la enfermedad de Alzheimer basados en la hipótesis amiloide [28].

NP-61 es una molécula nacida a partir de un diseño racional de fármacos teniendo en cuenta los descubrimientos recientes de la biología molecular. El grupo de Inestrosa postuló hace una década la existencia de un sitio de interacción en la acetilcolinesterasa (AChE) diferente del sitio catalítico, denominado sitio periférico y situado a la entrada de la larga garganta que conduce a la triada catalítica [29]. Este sitio periférico puede interaccionar con otras proteínas, como es el caso del beta-amiloide, y provoca un cambio conformacional. De esta forma un enzima colinérgico adquiere una nueva función, la de chaperona, y promueve el paso de la conformación aleatoria del beta-amiloide a la conformación en láminas beta pro-agregante, facilitando su precipitación en el citoplasma y aumentando su neurotoxicidad. Con estos datos en la mano, nuestra hipótesis de trabajo fue la siguiente [30]: si éramos capaces de obtener inhibidores de sitio periférico de la AChE lo suficientemente voluminosos para impedir la entrada de la acetilcolina al sitio catalítico, o lo que es mejor, inhibidores duales de sitio catalítico y periférico, capaces de inhibir simultáneamente ambos sitios, podríamos tener fármacos que no solamente mejoraran los síntomas cognitivos de los pacientes sino fármacos que pudieran intervenir en el proceso de la neurodegeneración (Figura 6) [31]. De esta forma se determinaron ciertos aminoácidos claves en ambos sitios de unión enzimático y se eligieron los fragmentos químicos idóneos para poder favorecer sus interacciones, surgiendo varias familias de inhibidores duales de sitio de unión de AChE, entre los cuales el candidato más avanzado, en desarrollo clínico actualmente es **NP-61** [32].

Este compuesto es un inhibidor muy potente de AChE a nivel sub-nanomolar y bastante selectivo en relación a la butilcolinesterasa. Además es el inhibidor más potente de la agregación del péptido beta-amiloide promovido por la AChE conocido hasta el momento. Es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y puede ser administrado oralmente. Los estudios llevados a cabo con este fármaco en un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer que sobreexpresa la pro-

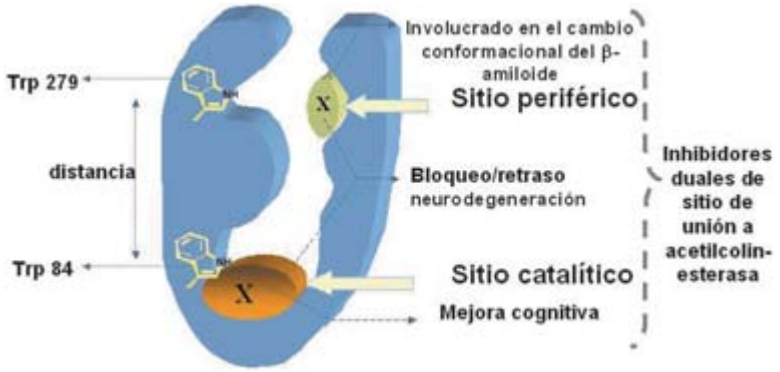

FIGURA 6. *Hipótesis de trabajo utilizada en el diseño de NP-61.*

teína precursora de amiloide (APP) humana ha probado la eficacia del compuesto en la reducción de las placas seniles así como en la mejora de la capacidad de aprendizaje utilizando el test del laberinto acuático. Además, más recientemente, se ha podido comprobar que **NP-61** es capaz de disminuir la producción de beta-amiloide en diversos cultivos celulares y las investigaciones, todavía en curso, parecen señalar hacia una interferencia en la síntesis y/o maduración del APP. Sin duda, todos estos resultados, hacen de **NP-61** un fármaco modificador del proceso neurodegenerativo con un gran potencial para el futuro tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Hasta el momento más de 70 sujetos jóvenes y adultos han sido tratados con **NP-61** en un estudio de dosis única ascendente sin haber encontrado efectos adversos relevantes. La finalización del desarrollo clínico nos demostrará si los datos encontrados en los modelos animales tienen una traslación real a los pacientes de la enfermedad de Alzheimer.

HIPÓTESIS DE LA PROTEÍNA TAU

Años más tarde, y ya en la década de los 90, se inició la investigación en otra nueva hipótesis de la etiología de la enfermedad de Alzheimer, la «hipótesis de la proteína tau» [33]. Tau es una proteína asociada a microtúbulos que en estado fisiológico normal es capaz de unirse a la tubulina y participar en la estabilización del esqueleto neuronal. Esta

unión está modulada por un equilibrio dinámico entre quinasas y fosfatasas. En procesos patológicos, como la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas denominadas tauopatías, se produce una hiperfosforilación aberrante de la proteína tau al romperse el equilibrio anterior. Cuando la proteína tau se hiperfosforila, pierde su capacidad de unirse a tubulina, se autoagrega formando pares de filamentos helicoidales apareados que son el principal componente de los ovillos neurofibrilares, una de las lesiones características de la enfermedad de Alzheimer. Los ovillos neurofibrilares parecen estar ligados a la severidad de la demencia. Recientemente, se ha descubierto en los cerebros de los pacientes de Alzheimer una sobre-expresión de la quinasa conocida como GSK-3 (glycogen syntahse kinase 3) que es responsable de más del 95% de la hiperfosforilación de la proteina tau *in vivo*. Teniendo en cuenta estos conocimientos moleculares, se han iniciado los primeros desarrollo terapéuticos encaminados a normalizar la patología de tau [34]. En ellos pueden caber estrategias tales como (Figura 7):

1. *Activación de las fosfatasas de tau* [35]. PP2A es la fosfatasa mayoritaria implicada en la defosforilación de la proteína tau. En la enfermedad de Alzheimer la actividad de esta fosfatasa se encuentra disminuida en cerebro, por lo que una activación directa o indirecta de PP2A puede tener efectos modificadores del proceso neurodegenerativo. Hasta el momento el compuesto denominado **Vel015** desarrollado por Velacor Therapeutics, con buena biodisponibilidad y penetrabilidad en el sistema nervioso central, se ha mostrado como un activador de PP2A que disminuye los niveles de tau total y fosforilada tanto en amígdala como en hipocampo de ratones transgénicos [36]. Este hecho además está correlacionado con un aumento en la capacidad de aprendizaje de los animales. El desarrollo clínico de dicho activador de PP2A no ha comenzado todavía.

2. *Inhibición de la agregación de tau* [37]. Recientemente se conoce que la agregación de la proteína tau resulta tóxica para las neuronas y ya se han podido identificar los primeros compuestos de bajo peso molecular que son capaces de prevenir esta agregación disminuyendo la toxicidad celular. En concreto el núcleo de **N-fenilamina** parece ser

FIGURA 7. *Estrategias terapéuticas basadas en la hipótesis de la proteína tau.*

uno de las estructuras privilegiadas para esta actividad biológica y representan actualmente uno de los primeros prototipos en la investigación terapéutica en esta área [38].

3. *Inhibición de quinasas de tau* [39]. Son muchas las protein quinasas capaces de fosforilar a tau, pero hay dos cuya fosforilación *in vivo* ha podido ser demostrada. Se conocieron inicialmente como TPKI y TPKII pero después de ser clonadas se comprobó que eran GSK-3 y CdK5+p25 (quinasa dependiente de ciclina 5 y la subunidad 25). Los inhibidores selectivos de ambas quinasas han sido propuestos en numerosas ocasiones como fármacos modificadores de la enfermedad de Alzheimer. Recientemente, GSK-3 está cobrando un papel central en la patología de la enfermedad de Alzheimer y se ha encontrado relación no solo con la hiperfosforilación de tau y la formación de los ovillos neurofibrilares sino también con la toxicidad y producción del beta-amiloide y con la muerte neuronal [40]. Por ello, los inhibidores de GSK-3 son uno de los fármacos actualmente más prometedores para el tratamiento eficaz de la enfermedad de Alzheimer [41]. Dos compuestos han iniciado su desarrollo clínico, **NP-12** y **AZ-180**, sin embargo los datos de seguridad obtenidos con este último compuesto han detenido su programa clínico.

NP-12

NP-12 presenta un mecanismo de inhibición de GSK-3 único y diferente al de la competencia, que lo pone en cabeza del desarrollo de estos fármacos innovadores y potencialmente eficaces en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer [42]. Es una molécula de bajo peso molecular que pertenece a la familia de las tiadiazolidindionas (TDZDs) y presenta una inhibición no competitiva ni con el ATP ni con el sustrato en su unión al enzima GSK-3 [43]. Pertenece a una segunda generación de TDZDs donde las propiedades farmacocinéticas han sido mejoradas y puede ser administrado por vía oral penetrando en el sistema nervioso central. **NP-12** ha mostrado eficacia en diferentes modelos animales de la enfermedad de Alzheimer produciendo una disminución de la fosforilación de tau *in vivo*, así como una disminución de la formación de placas seniles y una potente neuroprotección [44]. Todos estos datos de eficacia han motivado el inicio de su desarrollo clínico. Hasta el momento diversos estudios de fase I con administraciones tanto de dosis única como múltiple en jóvenes y adultos están sirviendo para caracterizar el perfil de seguridad del fármaco e iniciar los estudios de fase II en los que se confirmará esta seguridad en pacientes de Alzheimer a la vez que se iniciará la búsqueda de eficacia del compuesto. Este fármaco modificador de la enfermedad de Alzheimer pertenece también a la cartera de productos de la compañía biotecnológica española NeuroPharma.

CONCLUSIONES

A lo largo de esta revisión, se han presentado numerosas estrategias terapéuticas que pueden conducir a tener en un futuro cercano fármacos modificadores de la enfermedad de Alzheimer, que resulten eficaces en el tratamiento de este proceso neurodegenerativo devastador.

La investigación nacional está involucrada activamente en esta aventura, y una biotecnológica española compite a nivel mundial, y con gran éxito hasta el momento, en el desarrollo de este tipo de fármacos.

NP-12, un inhibidor de GSK-3 que disminuye la fosforilación de la proteína tau *in vivo*, y **NP-61**, un inhibidor dual de sitio de unión catalítico y periférico de la acetilcolinesterasa que disminuye la formación de las placas seniles en modelos animales, son dos fármacos modificadores de la enfermedad de Alzheimer con mecanismos de acción diferentes y complementarios entre sí, que están actualmente en diferentes fases de desarrollo clínico.

Los estudios en pacientes mostrarán en los próximos años la potencial eficacia de todos estos fármacos que constituyen actualmente la esperanza para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

[1] Perry, G.; Ávila, J.; Kinoshita, J. and Smith, M. Eds. (2006) Alzheimer´s Disease: A centrury of scientific and clinical research. IOS Press, The Netherlands. (ISBN 1-58603-619-X).

[2] Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer´s disease. *Neuron*. 44: 181-193.

[3] Mount, C. and Downton, C. (2006) Alzheimer disease: progress or profit? *Nat. Med.* 12: 780-784.

[4] Zhu, X.; Raina, A. K.; Perry, G. and Smith, M. A. (2004) Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol*. 3: 219-226.

[5] Van Broeck, B.; Van Broeckhoven, C. and Kumar-Singh, S. (2007) Current insights into molecular mechanisms of Alzheimer disease and their implications for therapeutic approaches. *Neurodegener. Dis.* 4: 349-365.

[6] Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Beer, B. and Lippa, A. S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217: 408-414.

[7] Amenta, F. and Tayebati, S. K. (2008) Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Curr. Med. Chem*. 15: 488-498.

[8] http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00384423?term=NCT00384423&rank=1

[9] Messer, W. S. Jr. (2002) The utility of muscarinic agonists in the treatment of Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci*. 19: 187-193.

[10] Picciotto, M. R. and Zoli, M. (2008) Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease. *Front Biosci.* 13: 492-504.

[11] Clader, J. W. and Wang, Y. (2005) Muscarinic receptor agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des*. 11: 3353-3361.

[12] Lane, R. M.; Kivipelto, M. and Greig, N. H. (2004) Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clin. Neuropharmacol*. 27: 141-149.

[13] Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297: 353-356.

[14] Eckman, C. B. and Eckman, E. A. (2007) An update on the amyloid hypothesis. *Neurol. Clin*. 25: 669-682.

[15] Seabrook, G. R.; Ray, W. J.; Shearman, M. and Hutton, M. (2007) Beyond amyloid: the next generation of Alzheimer's disease therapeutics. *Mol. Interv*. 7: 261-270.

[16] Fahrenholz, F. (2007) Alpha-secretase as a therapeutic target. *Curr. Alzheimer Res.* 4: 412-417.

[17] http://www.prnewswire.com/cgi-bin/stories.pl?ACCT=104&STORY=/www/story/06-07-2005/0003821231&EDATE=

[18] Ghosh, A. K.; Bilcer, G.; Hong, L.; Koelsch, G. and Tang, J. (2007) Memapsin 2 (beta-secretase) inhibitor drug, between fantasy and reality. *Curr. Alzheimer Res*. 4: 418-422.

[19] http://www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=19173288

[20] Lundkvist, J. and Näslund, J. (2007) Gamma-secretase: a complex target for Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Pharmacol*. 7: 112-118.

[21] Siemers, E. R.; Dean, R. A.; Friedrich, S.; Ferguson-Sells, L.; Gonzales, C.; Farlow, M. R. and May, P. C. (2007) Safety, tolerability, and effects on plasma and cerebrospinal fluid amyloid-beta after inhibition of gamma-secretase. *Clin. Neuropharmacol*. 30: 317-325.

[22] Galasko, D. R.; Graff-Radford, N.; May, S.; Hendrix, S.; Cottrell, B. A.; Sagi, S. A.; Mather, G.; Laughlin, M.; Zavitz, K. H.; Swabb, E.; Golde, T. E.; Murphy, M. P. and Koo, E. H. (2007) Safety, tolerability, pharmacokinetics, and Abeta levels after short-term administration of R-flurbiprofen in healthy elderly individuals. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord*. 21: 292-299.

[23] http://www.myriad.com/alzheimers/flurizan-status.php

[24] Dobson, C. M. (2006) Protein aggregation and its consequences for human disease. *Protein Pept. Lett*. 13: 219-227.

[25] Aisen, P. S.; Gauthier, S.; Vellas, B.; Briand, R.; Saumier, D.; Laurin, J. and Garceau, D. (2007) Alzhemed: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res*. 4: 473-478.

[26] Spencer, B.; Rockenstein, E.; Crews, L.; Marr, R. and Masliah, E. (2007) Novel strategies for Alzheimer's disease treatment. *Expert. Opin. Biol. Ther*. 7: 1853-1867.

[27] Okura, Y. and Matsumoto, Y. (2007) Development of anti-Abeta vaccination as a promising therapy for Alzheimer's disease. *Drug News Perspect.* 20: 379-386.

[28] García-Palomero, E.; Muñoz, P.; Usan, P.; Garcia, P.; Delgado, E.; De Austria, C.; Valenzuela, R.; Rubio, L.; Medina, M. and Martínez, A. (2008) Potent beta-amyloid modulators. *Neurodegener. Dis.* 5: 153-156.

[29] Alvarez, A.; Opazo, C.; Alarcón, R.; Garrido, J. and Inestrosa, N. C. (1997) Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol*. 272: 348-361.

[30] Castro, A. and Martinez, A. (2001) Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease. *Mini Rev. Med. Chem*. 1: 267-272.

[31] Castro, A. and Martinez, A. (2006) Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Pharm. Des*. 12: 4377-4387.

[32] Muñoz-Ruiz, P.; Rubio, L.; García-Palomero, E.; Dorronsoro, I.; del Monte-Millán, M.; Valenzuela, R.; Usán, P.; de Austria, C.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J.; Medina, M. and Martínez, A. (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: new disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 48: 7223-7233.

[33] Iqbal, K.; Alonso, A.; Chen, S.; Chohan, M. O.; El-Akkad, E.; Gong, C. X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; Tanimukai, H. and Grundke-Iqbal, I. (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1739: 198-210.

[34] Kosik, K. S.; Ahn, J.; Stein, R. and Yeh, L. A. (2002) Discovery of compounds that will prevent tau pathology. *J. Mol. Neurosci*. 19: 261-266.

[35] Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (2007) Developing pharmacological therapies for Alzheimer disease. *Cell. Mol. Life Sci*. 64: 2234-2244.

[36] Hovens, C. (2007) Regulation of PP2A activity as treatment for Alzheimer´s disease. 4th International Winter-Conference on Alzheimer´s disease. Zurs (Austria). pp42.

[37] Iqbal, K.; Alonso, A.; El-Akkad, E.; Gong, C. X.; Haque, N.; Khatoon, S.; Pei, J. J.; Tanimukai, H.; Tsujio, I.; Wang, J. Z. and Grundke-Iqbal, I. (2003) Alzheimer neurofibrillary degeneration: therapeutic targets and high-throughput assays. *J. Mol. Neurosci.* 20: 425-429.

[38] Pickhardt, M.; Biernat, J.; Khlistunova, I.; Wang, Y. P.; Gazova, Z.; Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (2007) N-phenylamine derivatives as aggregation inhibitors in cell models of tauopathy. *Curr. Alzheimer Res*. 4: 397-402.

[39] Huang, H. C. and Klein, P. S. (2006) Multiple roles for glycogen synthase kinase-3 as a drug target in Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets*. 7: 1389-1397.

[40] Hooper, C.; Killick, R. and Lovestone, S. (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem*. 104: 1433-1439.

[41] Martinez, A.; Castro, A. and Medina, A., Eds. (2006) Glycogen synthase kinase and its inhibitors: Drug discovery and developments. John Wiley & Sons, New Jersey, (ISBN-13:978-0-471-77001-5).

[42] Martinez, A.; Alonso, M.; Castro, A. and Dorronsoro, I. (2008) GSK-3 inhibitors in Alzheimer´s disease: TDZDs from discovery to clinical trials, in Medicinal Chemistry of Alzheimer´s disease. A. Martinez, Ed. Transworld Reasearch Network, Kerala. pp 225-253 (ISBN 978-81-7895-342-7).

[43] Martinez, A.; Alonso, M.; Castro, A.; Pérez, C. and Moreno, F. J. (2002) First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem*. 45: 1292-1299.

[44] Luna-Medina, R.; Cortes-Canteli, M.; Sanchez-Galiano, S.; Morales-Garcia, J. A.; Martinez, A.; Santos, A. and Perez-Castillo, A. (2007) NP031112, a thiadiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *J. Neurosci.* 27: 5766-5776.

Socios de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia a quien expresamos nuestra sincera gratitud por su mecenazgo:

CAJA MADRID

Farmaindustria

Laboratorios Janssen-Cilag
Alcaliber S. A.
Almirall, S.A.
Bristol-Myers Squibb, S.L.
Grupo Ferrer Internacional
Laboratorios Esteve
Laboratorios MSD
Laboratorios Rovi
Novartis Farmacéutica
Tedec-Meiji Farma S.A.
Laboratorios Menarini

Aragofar

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos
Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid

Colegios Oficiales de Farmacéuticos de: A Coruña, Alicante, Badajoz, Barcelona, Bizkaia, Burgos, Cáceres, Cádiz, Ciudad Real, Girona, Palencia, Principado de Asturias, Santa Cruz de Tenerife, Tarragona, Toledo y Zaragoza.