

DESARROLLO DE FÁRMACOS MULTIDIANA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

MULTITARGET DRUG DEVELOPMENT FOR THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Rafael León

Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC)

Las enfermedades neurodegenerativas (ENDs) serán el desafío en salud más importante de nuestra generación. Impulsadas por el aumento de la esperanza de vida, un número creciente de personas se ven afectadas por las ENDs. Aunque se han realizado intensos esfuerzos de investigación, la mayoría de los intentos de desarrollar un tratamiento eficaz han fracasado. Las ENDs comparten numerosas características patológicas, incluidas la agregación anormal de proteínas, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, el fallo del sistema de autofagia y la neuroinflamación crónica.

Teniendo en cuenta que el envejecimiento es el principal factor de riesgo de las ENDs y que este proceso va acompañado de un aumento progresivo en la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), parece plausible que la sobreproducción de ERO podría participar de forma temprana en el inicio de las ENDs. Las ERO aumentan la frecuencia de mutaciones del ADN mitocondrial provocando disfunción mitocondrial. El estrés oxidativo exacerbado provoca la oxidación de proteínas que lleva a un procesamiento incorrecto de estas, promoviendo la formación de agregados proteicos. Además, está bien establecido que tanto el estrés oxidativo como los agregados proteicos inducen la activación glial, lo que conduce a un estatus de neuroinflamación crónica. De hecho, diversos estudios demuestran una correlación directa entre la neuroinflamación y un peor pronóstico de muchas ENDs. Por otra parte, está demostrado que la capacidad de degradación autofágica disminuye durante el envejecimiento. Estas observaciones demostraron que existen distintos procesos de retroalimentación patológica que promueven el avance de la enfermedad culminando en un círculo fisiopatológico vicioso que acelera el avance de esta.

En respuesta al estrés oxidativo, las células han desarrollado un sistema de defensa endógeno, la vía antioxidante de fase II Nrf2-ARE. El factor de transcripción Nrf2 es un potente inductor de la respuesta celular para combatir el estrés oxidativo. Además, la vía Nrf2 regula la respuesta pro-inflamatoria, por lo que cualquier deficiencia en la señalización de Nrf2, como la que ocurre con el envejecimiento, puede empeorar el fenotipo inflamatorio. Además, Nrf2 induce la expresión de una proteína adaptadora de autofagia NDP52, lo que facilita la eliminación de agregados proteicos aberrantes, reduciendo el fallo del sistema autofágico descrito en varias ENDs.

Enfermedades de alta complejidad como las ENDs, a menudo explotan las mismas estrategias presentes en sistemas biológicos normales para favorecer su avance. Las ENDs intervienen a múltiples niveles creando una red patológica en lugar de deberse a un único evento para provocar la aparición de la enfermedad. La redundancia de los sistemas de señalización, la retroalimentación y otras estrategias de la red garantizan que las condiciones patológicas sean resistentes a las perturbaciones dentro de su arquitectura. Por lo tanto, las terapias dirigidas a una única diana fracasan, en diversos casos, porque las características de la red patológica no se tienen en cuenta durante la identificación de la diana. Por otro lado, se ha demostrado que las terapias multidiana son eficaces en diversas enfermedades complejas.

Los fármacos multidiana pueden describirse como combinaciones de terapias monodiana, en las que los distintos principios activos se integran en una única entidad química. Por tanto, en nuestra opinión fármacos multidiana basados en redes patológicas podrían ser eficaces en el tratamiento enfermedades complejas contrarrestando el avance de la red patológica. Los fármacos multidiana amplían el número de dianas farmacológicamente relevantes al introducir un conjunto de efectos indirectos dependientes de la red, aumentando así el tamaño del efecto farmacológico.

Por tanto, se describe el desarrollo de nuevos fármacos multidiana para diferentes ENDs que explotan la respuesta antioxidante y antiinflamatoria intrínseca, la respuesta de fase II Nrf2-ARE como diana principal a combinar con otras dianas terapéuticas críticas en la red patológica de las ENDs.

Agradecimientos: Agradecemos la financiación recibida del IS Carlos III (Ref: PI17/01700), Comunidad de Madrid y Fondos estructurales de la UE ref: S2017/BDM-3827.

Neurodegenerative diseases (NDDs) are destined to become the most significant health challenge of our generation. Driven by the increase in life expectancy, an ever-increasing number of people are affected by NDDs. Although intense research efforts have been made, most attempts to develop a treatment have failed. NDDs share many pathological hallmarks, including abnormal protein aggregation, mitochondrial dysfunction, extensive oxidative stress, autophagy failure and neuroinflammation.

Considering that ageing is the strongest risk factor for NDDs and that this process is accompanied by a progressive increase in the generation of Reactive Oxygen Species (ROS), it seems plausible that overproduction of ROS could be an early factor in the initiation of NDDs. ROS augment the frequency of mitochondrial DNA mutations that could lead to mitochondrial dysfunction. Extensive oxidative stress induces

protein damage leading to protein misprocessing and the formation of protein aggregates. It is well established that both, extensive oxidative stress and protein aggregates induce glial activation, leading to chronic neuroinflammation. In fact, compelling studies show a direct correlation between inflammation and a worse prognosis of many NDDs. Another important point is that autophagic degradation capacity declines during ageing. These observations demonstrated that there are several pathological feedback processes that exacerbate the pathology culminating in a vicious pathophysiological cycle.

In response to oxidative stress, cells have developed an endogenous defence system, the Nrf2-ARE phase II antioxidant pathway. The mammalian nuclear transcription factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a potent inducer of cellular defence responses to combat oxidative stress. Moreover, Nrf2 signalling protects against inflammatory disorders, thereby, any deficiency in Nrf2 signalling, such as the one occurring with aging, can worsen the inflammatory phenotype. Furthermore, Nrf2 induces the expression of an autophagy adaptor protein NDP52, facilitating aberrant protein aggregates clearance, alleviating the autophagic failure described in several NDDs.

Complex diseases often exploit the same strategies present in healthy networks to gain a robust status. NDDs present multiple disruptions within the host pathological-network structure rather than single event. Signalling redundancy, feedback, and another network strategies, ensure that complex pathological conditions will be resistant to disturbances within its architecture. Hence, single-target therapies fail in many cases because pathology-network characteristics are not accounted during target identification. On the other hand, multi-target therapies have been proven to be effective for many complex diseases.

Multitarget drugs can be perceived as siblings of combinatorial therapies, where the different agents are compressed into a single, integrated chemical entity. Multitarget drug designs based on Pathological-Networks can stop complex diseases by identifying targets that can relieve the early symptoms of the disease while counteracting its pathological network advance. Multi-target drugs expand the number of pharmacologically relevant targets by introducing a set of indirect, network-dependent effects, thus, increasing the size of the druggable proteome.

Thus, here we present the development of novel multitarget drugs towards different NDDs exploiting the intrinsic Nrf2-ARE phase II antioxidant and anti-inflammatory pathway as primary target to be combined with other critical nodes at the pathological network.

Acknowledgments: We thank IS Carlos III (Ref: PI17/01700) and Comunidad de Madrid y Fondos estructurales de la UE ref: S2017/BDM-3827.

NUEVOS INDUCTORES DE NRF2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

NOVEL NRF2 INDUCERS FOR THE TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE

Pablo Duarte^{1,2}, Patrycja Michalska³, Enrique Crisman^{1,2,4}, Juan Felipe Franco-González¹, Ángel Cores⁴, José Carlos Menéndez⁴, Antonio Cuadrado⁵, and Rafael León¹

¹ Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC), 28006 Madrid, Spain.

² Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain.

³ Department of Chemistry, Imperial College London, London, UK.

⁴ Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IS), Hospital Universitario de la Princesa, 28006 Madrid, Spain.

⁴ Unidad de Química Orgánica y Farmacéutica, Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

⁵ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Centro de Investigación Biomédica en Red Sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Investigación Sanitaria La Paz (IdiPaz), Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols' UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente. La falta de tratamientos efectivos capaces de detener la progresión de la enfermedad resalta la importancia de desarrollar nuevas terapias. La depleción de dopamina y la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas, junto con la presencia de depósitos α -sinucleína, se consideran eventos principales en la EP. Además, el estrés oxidativo juega un papel importante en la progresión de la enfermedad, conduciendo a la desregulación de la homeostasis proteica, daño mitocondrial y neuroinflamación. Estos factores, a su vez, dan lugar a un aumento del estrés oxidativo generando un bucle que acelera el proceso de neurodegeneración.

El amplio espectro de funciones fisiológicas reguladas por el factor de transcripción *NF-E2-related factor 2* (NRF2) lo posiciona como una buena diana para el desarrollo de tratamientos para enfermedades multifactoriales complejas como la EP. En ese sentido, hemos desarrollado dos familias de nuevos inductores de NRF2 con actividades complementarias, teniendo en cuenta que NRF2 regula un gran número de genes citoprotectores relacionados con el estrés oxidativo, la inflamación y la homeostasis proteica. Además de esto, los nuevos compuestos están diseñados para inhibir selectivamente la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B), involucrada en el control del estrés oxidativo. Es importante destacar que los inhibidores de MAO-B se llevan utilizando años en la clínica para tratar los síntomas de la EP.

Con esta base, hemos desarrollado una primera familia de 9 nuevos compuestos multi-diana con varias actividades: inducción de NRF2, inhibición potente y selectiva de MAO-B y neuroprotección

en modelos relacionados con el estrés oxidativo. Además, llevamos a cabo un modelo de rodajas de estriado de rata adulta con rotenona y 6-hidroxidopamina como tóxicos. Los compuestos restauraron la muerte celular, estrés oxidativo y modularon proteínas relacionadas con el proceso neurodegenerativo. Fueron capaces también de revertir el proceso inflamatorio inducido por LPS en cultivos primarios de glía, disminuyendo la producción de óxido nítrico y citocinas pro-inflamatorias. Nuestro estudio también incluyó un programa *in silico* para caracterizar los mecanismos de inhibición de MAO-B.

A partir de esta información, el objetivo es tratar de mejorar la potencia de inhibición de MAO-B, reducir la toxicidad celular y mejorar las propiedades farmacológicas en cuanto a biodisponibilidad y permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los nuevos compuestos. Para ello, hemos construido una nueva quimioteca de unos 500 compuestos para llevar a cabo un proceso de cribado virtual. Tras la evaluación de los resultados, hemos seleccionado una nueva familia de 30 compuestos, que han sido sintetizados y sometidos a una evaluación farmacológica completa. Estos nuevos compuestos mostraron un mejor perfil con un aumento en la potencia de inducción de NRF2, selectividad de MAO-B y permeabilidad al sistema nervioso central por difusión pasiva. También demostraron un mejor perfil neuroprotector, una toxicidad celular reducida y mantuvieron propiedades antioxidantes y antiinflamatorias complementarias. Además de esto, hemos dilucidado los mecanismos para controlar la homeostasis proteica del compuesto líder de esta segunda familia, mostrando una activación de la vía del sistema ubiquitina-proteasoma y la macroautofagia.

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease. The lack of effective treatments able to stop the progression of the disease highlights the importance of finding new therapies. Physiopathological features such as dopamine depletion and selective destruction of dopaminergic neurons, together with the presence of α -synuclein protein deposits, are considered main events in PD. Importantly, oxidative stress plays a major role in the disease progression leading to deregulation of protein processing, mitochondrial damage, and neuroinflammation. These factors, in turn, lead to the increase of oxidative stress generating a loop that accelerates the neurodegeneration process.

The broad spectrum of physiological roles regulated by transcription factor NF-E2-related factor 2 (NRF2) positions it as a good target for the development of innovative treatments for chronic diseases characterized by a complex network of pathological pathways. In that sense, we have developed two families of new NRF2 inducers with complementary activities for the treatment of PD, regarding that NRF2 regulates a plethora of cytoprotective genes related to oxidative stress, inflammation, and protein homeostasis, among other processes involved in the onset of PD. Apart from this, the novel compounds are also designed to selectively inhibit monoamine oxidase B (MAO-B). This enzyme is involved in

controlling oxidative stress, regarding dopamine metabolism, and MAO-B inhibitors have been used for years in clinic to treat PD symptoms.

Based on this, we have a first small chemical library of 9 new multitarget compounds combining several activities: NRF2 inducing capacity, MAO-B potent and selective inhibition, and neuroprotective ability in oxidative stress-related models. In addition, we performed a more complex model of adult rat striatal slices treated with rotenone and 6-hydroxydopamine as toxics. Selected compounds were protective in terms of cell death, oxidative stress, and modulation of several proteins related with neurodegeneration. Hit compounds were also capable of restoring LPS-induced inflammatory conditions in primary glial cultures leading to a decrease in the production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines. Our study also included an *in silico* program to characterize the mechanisms of MAO-B inhibition.

Regarding the information from this first family of compounds, the next objective is mainly trying to improve the potency for MAO-B inhibition, reduce cell toxicity, and also improve drug-like properties regarding half-life and blood-brain barrier permeability of the novel compounds. To this end, we have built a new chemical library of almost 500 compounds and subjected it to a virtual screening program. After evaluation of the results, we selected a new family of 30 compounds, we synthesized them, and we performed a complete pharmacological evaluation. These novel compounds showed a better profile with improved NRF2 induction potency, MAO-B selectivity, and central nervous system permeability by passive diffusion. They also demonstrated a better neuroprotective profile, reduced cell toxicity, and maintained complementary antioxidant and anti-inflammatory-related properties. In addition to this, we have also elucidated the mechanisms for controlling protein homeostasis of the lead compound from this family, showing an upregulation of the ubiquitin-proteasome system pathway and activation of macroautophagy.

DESARROLLO DE NUEVOS COMPUESTOS MULTITARGET DIRIGIDOS AL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

DEVELOPMENT OF NEW MULTITARGET COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

Enrique Crisman^{1,2,3}, Sheila Abril¹, Laura Vozmediano¹, Esteban Daudén¹ and Rafael León¹

¹ Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC).

² Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

³ Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IS), Hospital Universitario de la Princesa.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que constituye la principal causa de demencia y la sexta causa de muerte a nivel mundial. La ausencia de fármacos capaces de frenar la progresión de la enfermedad convierte la búsqueda de tratamientos eficaces en uno de los grandes retos científicos del siglo XXI. Aunque la etiología de la EA no es del todo comprendida, existe evidencia de que hay varios procesos degenerativos que contribuyen a la enfermedad, como el estrés oxidativo (EO), la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial, la dishomeostasis del calcio y la desregulación de la autofagia, entre otros. Estos procesos están estrechamente interconectados, lo que pone de manifiesto la naturaleza multifactorial de la enfermedad. Dada la complejidad de la EA, los ligandos dirigidos a múltiples dianas surgen como una estrategia prometedora para su tratamiento. En esta línea, hemos considerado dos dianas que tienen un papel clave en varios de los procesos relacionados con la etiopatología de la EA: activación del *NF-E2 p45-related factor 2* (NRF2) y modulación del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR). NRF2 es un factor de transcripción que constituye el principal mecanismo de defensa celular contra el EO. Además, NRF2 juega un papel clave en la regulación de la autofagia, inflamación y proteostasis. Por otro lado, la estimulación del $\alpha 7$ -nAChR se ha relacionado con una disminución en la producción de péptido β -amiloide así como con una reducción en la hiperfosforilación de tau, neuroinflamación y pérdida de memoria a corto plazo en modelos *in vivo* de EA.

En este trabajo, hemos sintetizado y evaluado farmacológicamente una nueva familia de compuestos capaces de inducir NRF2 y modular selectivamente el $\alpha 7$ -nAChR. Adicionalmente, han mostrado un efecto neuroprotector en un modelo *in vitro* de EO así como en un modelo *in vitro* de hiperfosforilación de tau. Sin embargo, los compuestos evaluados han sido identificados como sustrato de los sistemas de eflujo de la barrera hematoencefálica (BHE) en estudios de distribución cerebral *in vivo*. Utilizando estos resultados, hemos seleccionado un compuesto *hit* con el objetivo de aumentar su potencia como modulador del $\alpha 7$ -nAChR y reducir su reconocimiento por los sistemas de eflujo. Mediante modelado por homología, *docking* y simulaciones de dinámica molecular, hemos predicho el modo de unión del compuesto *hit* al $\alpha 7$ -nAChR e identificado dos regiones (aquí denominados A y B) que no participan en su unión al receptor y que por tanto son susceptibles de modificación. Adicionalmente, hemos localizado una cavidad no ocupada cerca de la región A en la cual varios fragmentos moleculares son capaces de alojarse, identificados mediante un cribado virtual. La sustitución de la región A por estos fragmentos ha conducido a una nueva familia de derivados con una mayor afinidad teórica por el $\alpha 7$ -nAChR. Además, se han incluido varias modificaciones en la región B con el fin de mejorar la permeabilidad del compuesto a la BHE, guiadas por el algoritmo CNS-MPO. Así, mediante un diseño racional *in silico*, hemos obtenido dos nuevas familias de compuestos con mejores propiedades farmacológicas y farmacocinéticas teóricas.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that constitutes the main cause of dementia and the sixth leading cause of death worldwide. The absence of drugs able to stop disease progression makes the search for effective treatments one of the great scientific challenges of the 21st century. Although the etiology of AD is not fully understood, there is accumulating evidence that there are several degenerative events that contribute to the disease, such as oxidative stress (OS), neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, calcium dyshomeostasis and deregulation of autophagy, among others. These AD-contributing processes are tightly interconnected, which highlight the multifactorial nature of the disease. Given AD complexity, multitarget-directed ligands arise as a promising strategy for its treatment. In this line, we have considered two targets that have a key role in several of the aforementioned processes related to AD etiopathology: activation of NF-E2 p45-related factor 2 (NRF2) and modulation of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR). NRF2 is a transcription factor that constitutes the main cellular defensive mechanism against OS. Additionally, NRF2 plays a critical role in the regulation of autophagic processes, inflammatory stress and proteostasis. In a similar fashion, stimulation of $\alpha 7$ -nAChR has been related to a decrease in β -amyloid peptide production, reduction of tau hyperphosphorylation, neuroinflammation and short-term memory loss term in *in vivo* models of AD.

In this work, we have synthesized and pharmacologically evaluated a new family of compounds able to activate NRF2 and selectively modulate the $\alpha 7$ -nAChR. Furthermore, these compounds have exerted a neuroprotective effect in OS and tau hyperphosphorylation *in vitro* models. However, the evaluated compounds were identified as substrate of the efflux systems of the blood-brain barrier (BBB) in *in vivo* brain distribution studies. Using these results as a starting point, we have selected a *hit* compound for modification, aiming to increase its potency as $\alpha 7$ -nAChR modulator and reduce its recognition by the BBB efflux systems. In this line, by means of homology modeling, docking and molecular dynamics simulations, we have predicted the binding mode of the *hit* compound to the $\alpha 7$ -nAChR and identified two chemical moieties (herein named A and B) that do not drive receptor binding and are thus susceptible of modification. Based on this binding mode, we have identified a non-occupied cavity close to moiety A. Using a fragment-based virtual screening we have identified several molecular fragments able to interact with the residues of this cavity. Substitution of moiety A by these fragments has led to a new family of derivatives with a higher predicted affinity for the $\alpha 7$ -nAChR. Additionally, we have included several modifications on moiety B in order to improve compounds BBB permeability, guided by the CNS-MPO algorithm. In this fashion, we have obtained two new family of compounds with improved predicted pharmacological and pharmacokinetic properties by means of an *in silico*-guided strategy for their design.