



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

TRABAJO FIN DE GRADO
Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) como
diana de fármacos anti-Alzheimer

Autor: Aurora María López Martos

D.N.I.: 11086071W

Tutor: José Carlos Menéndez Ramos

Convocatoria: Junio 2015

Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	3
1. Introducción y antecedentes.....	3
1.1 Mecanismo fisiopatológico	4
1.2 Tratamiento	5
2. Objetivos	6
3. Metodología	6
4. Resultados y discusión.....	6
1. Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3).....	6
1.1 Características de la enzima	7
1.2 Mecanismo de fosforilación	7
1.3 Control de la actividad enzimática.....	8
1.4 Intervención de la GSK3 en la enfermedad de Alzheimer	8
2. GSK3 como diana terapéutica.....	10
2.1 Cationes	10
2.2 Compuestos ATP-competitivos	11
2.3 Compuestos no ATP-competitivos	14
5. Conclusiones	16
6. Bibliografía	16

Resumen

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa en la que el tratamiento actual se basa en compuestos que disminuyen los síntomas, mejorando la calidad de vida de los pacientes durante unos años, aunque no tienen acción a largo plazo.

La enzima GSK3 se ha visto que interfiere en el desarrollo de la enfermedad, interactuando tanto con las placas seniles como con los ovillos neurofibrilares, por lo que se pensó que podría ser una buena diana terapéutica para evitar el desarrollo y permitir la remisión de la enfermedad.

A día de hoy se han desarrollado numerosos compuestos que han mostrado actividad en la inhibición de la enzima. A pesar de ello, muy pocos se han llegado a desarrollar más allá de estudios preclínicos, muchas veces causado por la falta de selectividad o la excesiva inhibición. El tideglusib ha sido el que más lejos ha llegado en los estudios clínicos, aunque estudios recientes han demostrado que no existe una eficacia clínica significativa.

Probablemente, en un futuro se empleara una terapia combinada para poder conseguir revertir el desarrollo de la enfermedad.

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease whose current treatment is based on compounds which decrease the symptoms, improving the life's quality of patients for a few years, but no long-term action.

The GSK3 has been shown to interfere with the development of the disease, interacting with both senile plaques and neurofibrillary tangles, so it was thought that could be a good therapeutic target for preventing the development and for allowing remission.

Nowadays, a huge amount of compounds have been developed showing activity in inhibiting the enzyme. However, very few compounds have come to develop beyond preclinical studies, often caused by lack of selectivity or excessive inhibition. Tideglusib has been the furthest compound along in clinical trials, although recent studies have shown there is a significant clinical efficacy.

Probably in the future, the combination therapy will be employed to achieve reverse the development of the disease.

1. Introducción y antecedentes

La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes entre las personas mayores, siendo la cuarta causa de muerte en los países desarrollados y la primera de demencia, abarcando del 40 al 50 % de los casos¹. Debido al aumento de la esperanza de vida y, con ello, del número de ancianos, más personas se están viendo afectadas por esta enfermedad². En este tipo de enfermedades, se produce una disminución de la función cognitiva, con dificultad para pensar y memorizar; así como trastornos del comportamiento, lo que afecta a las actividades diarias³. Esto provoca que las personas con

neurodegeneración se vuelvan dependientes, cuyo grado dependerá de la progresión de la enfermedad, ya que no son capaces de realizar las actividades cotidianas por ellos solos⁴.

Hoy en día existen diferentes técnicas para su diagnóstico, que se realizan mediante la búsqueda de placas seniles y la presencia de ovillos neurofibrilares, características de la enfermedad⁶. Se usan biomarcadores ($A\beta_{42}$ y tau en líquido cefalorraquídeo), PET (Tomografía de emisión de positrones) y MRI (Imagen de Resonancia Magnética)⁵, aunque esto no se realiza hasta que las personas muestran los primeros síntomas, como problemas de memoria, por lo que se están buscando herramientas más eficaces³.

1.1 Mecanismo fisiopatológico

Durante los últimos años, se han desarrollado muchas teorías sobre la patología molecular de esta enfermedad, siendo las teorías de la cascada β -amiloide y la hiperfosforilación de tau las más aceptadas. Además, debido a la pérdida neuronal tanto a nivel cortical como a nivel de hipocampo, se produce una disfunción de los neurotransmisores, siendo la depleción de acetilcolina una de las más marcadas.

Los ovillos neurofibrilares están formados por filamentos de proteína tau hiperfosforilada. Esta proteína se encuentra normalmente en el organismo, tanto en las neuronas, donde es relativamente abundante, como en otras células, ya que su función fisiológica consiste en la unión a los microtúbulos para la estabilización en el ensamblaje en la polimerización⁷. Estudios recientes han hecho sospechar sobre una disfunción en el metabolismo de la proteína tau, ya que la hiperfosforilación de la proteína puede ocasionar una mayor agregación, y, con ello, la formación de los ovillos⁸. Esta hiperfosforilación se asocia a un aumento de la actividad de diferentes quinasas, como MAPK, CDK5 o GSK3, que se cree inducida por las formas fibrilares del péptido β -amiloide⁷.

Las placas seniles están compuestas por agregados fibrilares de depósitos extracelulares del péptido β -amiloide. Se ha visto que el péptido β -amiloide proviene de una escisión proteolítica secuencial de la APP (proteína precursora del β -amiloide)⁷. La APP se trata de una glicoproteína integral de la membrana plasmática con diversas isoformas, cuya función se piensa que está relacionada con la transmisión sináptica y la comunicación intercelular. Posee una pequeña porción citoplasmática, una de transmembrana y un dominio extracelular relativamente grande⁷.

La escisión proteolítica puede proporcionar fragmentos amiloidogénicos o no amiloidogénicos, en función del procesamiento que se lleve de la APP mediante diferentes secretasas. Tanto la α -secretasa como la β -secretasa producen un fragmento N-terminal soluble, que según la proteína que lo escinda se llamará $APP_{S\beta}$ o $APP_{S\alpha}$. Además, la escisión con α -secretasa originará un fragmento C83 C-terminal o, con β -secretasa, uno C99 que se unen a la membrana. Posteriormente se produce una proteólisis por γ -secretasa, que, en el caso del fragmento C83, originará un péptido p3 no patogénico que será liberado y secretado; mientras que en el caso del fragmento C99, da lugar al péptido β -amiloide, de longitud variable según el sitio de escisión. El $A\beta_{42}$ es el más propenso a formar los agregados fibrilares que se encuentran en la enfermedad⁷.

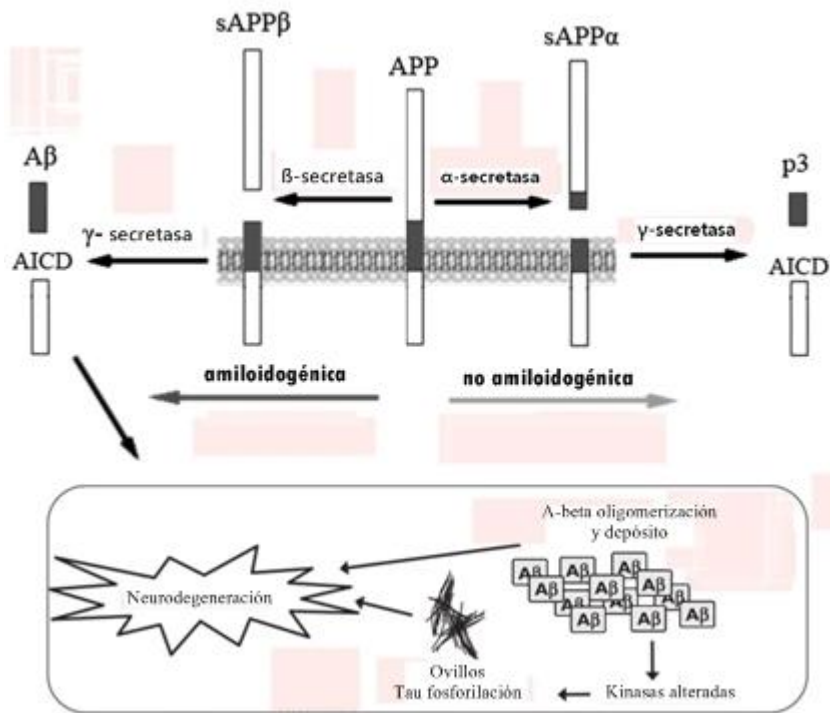
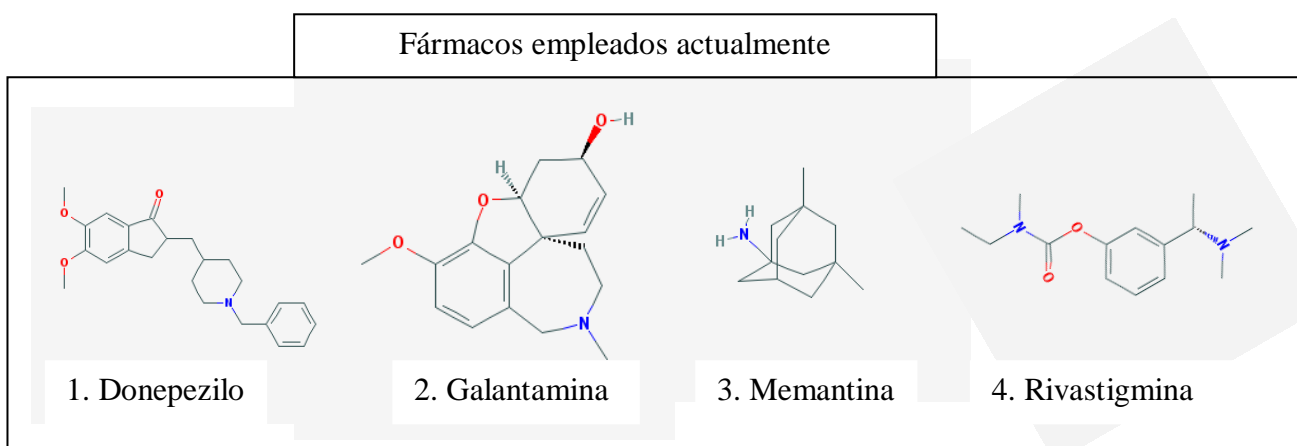


Figura 1: Metabolismo e implicación del péptido A β en la neurodegeneración ^{2,5}.

1.2 Tratamiento

Hoy en día el tratamiento empleado se basa en el uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa y antagonistas del receptor NMDA, cuya acción se basa principalmente en minimizar los síntomas sin afectar al mecanismo subyacente de la enfermedad, presentando beneficio a corto plazo y permitiendo una mayor independencia de la persona durante el periodo en el que este tratamiento sea efectivo⁵. En primera línea del tratamiento, se encuentran los inhibidores de la acetilcolinesterasa, que se emplean en estadios de leves a moderados. Éstos actúan uniéndose reversiblemente e inhibiendo la enzima que degrada la acetilcolina, lo que aumenta los niveles sinápticos del neurotransmisor. Los fármacos más empleados son donepezilo, rivastigmina y galantamina. No se han visto diferencias clínicas significativas según el empleo de unos u otros. Se ha observado que su empleo provoca una mejora ligera de la función cognitiva, del comportamiento y de las actividades diarias, que deberían verse reflejadas en un periodo de 6 a 8 semanas, aunque estos compuestos no presentan un efecto a largo plazo⁴.



También se emplean los antagonistas del receptor de NMDA, como la memantina, que se suelen emplear en estadios más avanzados y previenen la excesiva actividad glutamatérgica. Suele ser bien tolerada y se suele administrar con inhibidores de la acetilcolinesterasa. Aunque puede presentar problemas de cumplimiento terapéutico, al administrarse dos veces al día⁴.

Ahora mismo, se encuentran muchas líneas de investigación abiertas en busca de nuevos fármacos que actúen sobre la progresión de la enfermedad. Se están dando intervenciones para reducir la cantidad de APP e inhibir enzimas envueltas en la formación del péptido β -amiloide. Entre ellas se encuentra la inmunoterapia, dirigida a dificultar la agregación del péptido A β ; inhibidores/moduladores de las secretasas, para reducir la cantidad de péptido A β ; y la activación de enzimas degradadoras del péptido A β ². Otra vía de actuación son los tratamientos basados en la patología de tau, entre los que se encuentran la prevención de la fosforilación de tau, inhibiendo las quinasas que intervienen, como puede ser la GSK3, en la que nos centramos; la prevención de la agregación de tau, evitando la formación de los ovillos neurofibrilares; o la inmunoterapia, reduciendo los niveles de tau².

2. Objetivos

Revisión bibliográfica de los compuestos que puedan actuar sobre la glucógeno sintasa quinasa 3 como diana terapéutica y cuya aplicación terapéutica pueda ser el Alzheimer.

3. Metodología

Búsqueda bibliográfica en bases de datos científicas informatizadas, como Scielo, Pubmed y Medline entre otras.

4. Resultados y discusión

1. Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3)

Esta enzima actúa como una serina/treonina quinasa dirigida por prolina que toma parte de un gran número de procesos fisiológicos, desde el metabolismo glucogénico hasta la transcripción genética⁹, por lo que cualquier desregulación de su actividad puede afectar de forma importante en las vías de señalización en las que intervenga¹⁰.

Entre estos procesos se encuentran el desarrollo, el ciclo celular y la apoptosis. Además, se ha relacionado durante el desarrollo neuronal con el control de la morfogénesis y la polaridad del axón, la generación sináptica y la supervivencia¹¹.

La GSK-3 β se expresa constitutivamente en todos los tejidos, pero principalmente durante el desarrollo embrionario y en el cerebro adulto, encontrándose de manera muy abundante en las neuronas¹⁰.

Por todo ello, se ha ligada a numerosos procesos patológicos, desde la diabetes al cáncer, así como a trastornos del comportamiento, la esquizofrenia y la neurodegeneración¹⁰, hecho que ha atraído la atención para aumentar el conocimiento de su fisiopatología y su empleo como posible diana terapéutica, pero la diversidad de vías en las que interviene supone una dificultad a la hora del diseño¹¹.

1.1 Características de la enzima

Esta enzima ha sido altamente conservada durante la evolución, ya que se han reconocido genes homólogos codificadores en numerosas células eucariotas¹⁰.

En mamíferos, existen dos genes que codifican para dos isoenzimas, denominadas GSK-3 α y GSK-3 β , localizados en el cromosoma 19 y 3 respectivamente. A pesar de ello, presentan un 98% de similitud en el bolsillo de unión a ATP (dominio catalítico) y un 84% en total, ya que difieren en los dominios N y C-terminal¹¹. La GSK-3 β ha sido la más estudiada, aunque ambas enzimas comparten la mayoría de las propiedades enzimáticas con respecto a la fosforilación proteica¹⁰.

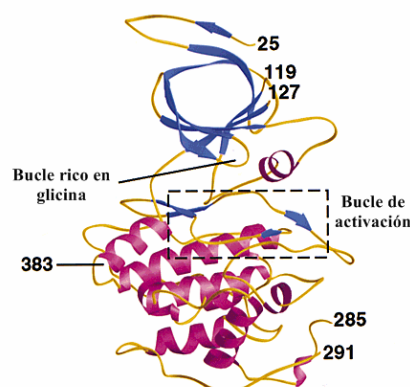


Figura 2: Estructura GSK3 β .¹²

Estudios cristalográficos han mostrado la estructura tridimensional de la GSK3- β . El conjunto es común a la mayoría de quinasas, con un lóbulo N-terminal pequeño (residuos 25-138) constituido principalmente por láminas- β , y un lóbulo C-terminal grande (residuos 344-382) formado esencialmente por hélices- α . El bolsillo de unión a ATP se encuentra entre los dos lóbulos, que suele ser conservado entre las diferentes quinasas¹¹, bordeado por un bucle rico en glicina y la región bisagra. El bucle de activación (residuos 200-226) se encuentra en la superficie del lugar de unión al sustrato.

Esta enzima posee dos lugares de fosforilación que presentan influencia en su actividad catalítica, Ser9, fosforilada por AKT, con efecto inhibitorio, y Tyr216, localizado en el bucle de activación, que incrementa la actividad catalítica¹².

1.2 Mecanismo de fosforilación

Antes de que una serina/treonina quinasa sea capaz de fosforilar, los dominios lámina- β y hélice- α deben alinearse para dar lugar a una conformación catalíticamente activa, para lo que, este tipo de enzimas emplean uno o dos residuos fosforilados en el bucle de activación. Los residuos polares, que suelen ser argininas o lisinas, unen el grupo fosfato del residuo fosforilado en el bucle de activación que permite la correcta alineación entre los dos dominios. Además, si existe un segundo residuo fosforilado, el lugar de unión al sustrato se abre y permite su unión¹².

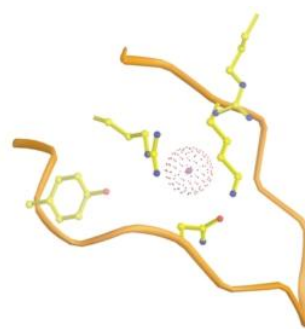


Figura 3: Estructura del bucle de activación de GSK3 β .¹²

La GSK3 β tiene diferentes sustratos pero no los fosforila a todos por igual, ni con la misma eficacia. Se ha visto que para que el sustrato sea reconocido por la enzima tiene que presentar una secuencia de fosforilación formada por dos serinas separadas por tres residuos (SXXXS). Muchas veces, existe una primera fosforilación por otra quinasa en la posición P + 4 Ser, antes de ser catalizados por la GSK3 β en la serina de la posición P, a lo que se le denomina

una fosforilación preparatoria (*primed phosphorylation*), que es muy eficaz, ya que de esta manera la enzima es capaz de alinear los dos dominios para optimizar la actividad catalítica. Existen sustratos, como axina, β -catenina o tau, en los que no es necesaria esa primera fosforilación¹².

1.3 Control de la actividad enzimática

Se conoce que su actividad es alta en células en reposo, regulado por señales extracelulares provenientes de diferentes vías, que inducen una rápida y reversible disminución de la actividad enzimática¹¹.

- Regulación por fosforilación: Existen diferentes regiones y residuos que susceptibles de ser fosforilados por otras quinasas e, incluso, por ella misma. Dependiendo del lugar de fosforilación, puede dar lugar a una activación o una inhibición¹¹.
- Regulación por asociación de complejos proteicos: La interacción de GSK3 con proteínas estructurales forma complejos multiproteicos que intervienen en diferentes vías de regulación, como puede ser el complejo formado con axina y APC (adenomatous polyposis coli) que es el núcleo de la vía de señalización Wnt¹¹.
- Regulación por localización: Dependiendo del estado de desarrollo, el lugar en el que se exprese y la localización subcelular donde se encuentre, puede intervenir en diferentes procesos que están regulados de diferente forma, activando o inhibiendo su actividad enzimática¹¹.
- Regulación por escisión proteolítica: Se ha visto que la eliminación por escisión mediada por calpaína de un fragmento de la región N-terminal induce la activación de la GSK3¹¹.

1.4 Intervención de la GSK3 en la enfermedad de Alzheimer

En la enfermedad del Alzheimer, además de la formación del péptido β -amiloide, también se produce la fosforilación de la proteína tau, una de las más importantes modificaciones post-traduccionales. Se ha visto que numerosas quinasas, como quinasa dependiente de ciclinas 5 (CDK5), la quinasa regulada por señales extracelulares 2 (ERK2) o la GSK3- β , pueden intervenir, aunque no está claro cómo actúan “in vivo”¹⁰. Al principio se pensaba que la proteína quinasa tau I (TPKI) estaba implicada. Sin embargo, en estudios posteriores se observó que la estructura y las funciones de la GSK3- β y la TPKI eran muy similares¹³.

Además de la relación vista de la GSK3 con la hiperfosforilación de tau⁹, se ha observado que Dickkopf1, un inhibidor de la vía Wnt regulado al alza en la patología, promueve la fosforilación de tau y la neurodegeneración, mediante la activación de GSK3¹⁷.

Asimismo, se ha comprobado que puede verse implicada en la expresión de diferentes genes que intervienen en la funcionalidad de tau, como en el splicing del RNA mensajero de la proteína tau, ya que se constató que la aparición del regulador de splicing SC35 coincidía con

la inhibición de la GSK3-β y el aumento de la isoforma tau-4R¹⁴. Asimismo, la actividad elevada de GSK-3β provocaba el aumento de la isoforma tau-3R, dando lugar a una reducción de la unión de los microtúbulos¹⁵.

De esta forma, a lo largo de los años, su desregulación se ha relacionado con numerosos daños patológicos del Alzheimer, como la inflamación y la pérdida de memoria¹⁰, y también con mecanismos moleculares, como la hiperfosforilación de tau, el aumento de la producción del péptido β-amiloide o la reducción de la síntesis de acetilcolina⁹. Así, se ha localizado la presencia de GSK3β junto a neuronas dañadas y ovillos neurofibrilares en cerebros que han sufrido la enfermedad⁹.

Además, últimamente se ha visto que el problema, junto al aumento de la actividad de la enzima, es el polimorfismo de un promotor de la GSK3, que alteraría su expresión, suponiendo un factor de riesgo para la aparición de la enfermedad⁹.

Asimismo, esta desregulación afecta a intermedios de las vías de las que forma parte, tanto en la de señalización Wnt como en la de la insulina, lo que provoca las alteraciones responsables de la aparición de la enfermedad, ya que muchos intervienen en el remodelado sináptico, vital para el establecimiento de las conexiones en la formación de la memoria, lo que se puede correlacionar con la intervención que tiene la GSK3 en el ensamblaje de la tubulina y la actina, requerido para la reorganización sináptica en la formación de la memoria⁹.

Mediante la supresión de las vías Wnt y PI3-quinasa se perjudica la potenciación a largo plazo (LTP), disminuyendo el aprendizaje y la memoria. Además, la GSK3 es inhibida por ambas vías, lo que se ha visto que provoca la inducción de la LTP¹⁶. De esta forma, la pérdida de memoria que se produce en el Alzheimer, puede venir como consecuencia de la hiperestimulación de la enzima, lo que provoca la inactivación de la LTP, impidiendo la reorganización sináptica necesaria para la memoria y provocando una pérdida neuronal⁹.

Se ha visto que la GSK3α interviene en la escisión de la APP, favoreciendo el aumento de la producción del péptido Aβ¹⁸. Esta exposición al péptido Aβ provoca la inhibición de la señalización de la PI3-quinasa, lo que aumenta la actividad de la GSK3β¹⁹.

Igualmente, se ha comprobado que existe una asociación de la GSK3 con la diabetes y la resistencia a la insulina²⁰, ya que mediante la vía de señalización de la insulina se mejora la expresión de APP y el procesado del péptido Aβ. De esta forma la insulina aumenta la

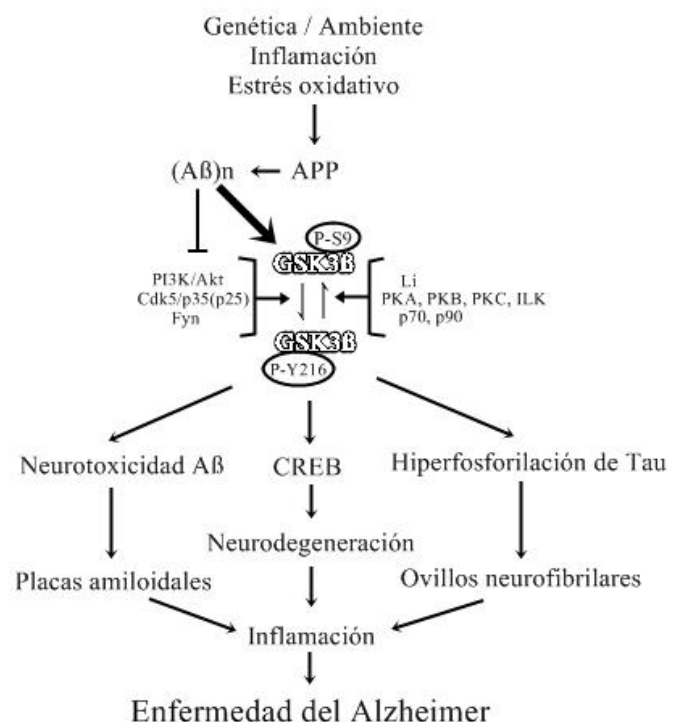


Figura 4: Representación esquemática del papel de la GSK3 en la enfermedad de Alzheimer.²³

formación del sAPP α ²¹. Así, en un estudio al probar la administración de insulina por vía intranasal en pacientes de Alzheimer, se mejoró el cociente A β _{40/42} y la cognición²².

2. GSK3 como diana terapéutica

Al principio, su inhibición se dirigió como tratamiento contra la diabetes mellitus, pero más tarde, cuando se conoció su intervención en el Alzheimer, se centró más en ella. Además, la cristalización de la estructura favoreció su conocimiento, haciendo viable el diseño de diferentes estructuras para su inhibición²⁴.

Una gran cantidad de inhibidores se han descrito, junto a muchos efectos biológicos tanto en estudios “in vitro” como celulares, descubriendo a la enzima como una diana terapéutica prometedora²⁵. Aunque todavía no se ha podido desarrollar ninguno para comercializarlo. Dentro de ellos se encuentran los cationes, entre los que podemos hallar las sales de litio, compuestos aislados de fuentes naturales y pequeñas moléculas sintéticas. Desde el punto de vista del mecanismo de acción, existen los inhibidores ATP competitivos, los no ATP competitivos y los sustrato-competitivos²⁶.

Uno de los problemas que se han encontrado ha sido la gran semejanza que presentan los bucles de unión al ATP entre las diferentes isoformas, lo que impide una inhibición selectiva, provocando la aparición de efectos adversos derivados de la inhibición de vías no patológicas en las que interviene la enzima^{24, 26}. Asimismo, los compuestos no ATP-competitivos, no interfieren con los altos niveles de ATP intracelulares. Además los que tienen una estructura semejante a los sustratos, suelen unirse de forma débil a la enzima para evitar su completa inhibición debido a su papel fundamental en muchas vías metabólicas²⁷.

2.1 Cationes

El cloruro de litio fue el primer inhibidor de la GSK3 descubierto²⁸, pero se ha excluido del tratamiento del Alzheimer debido a su estrecho margen terapéutico y a las numerosas dianas biológicas en las que puede intervenir²⁴. Sin embargo, si se suele emplear en el trastorno bipolar²⁸.

El mecanismo por el cual actúa es desconocido, pero se manejan varias hipótesis. En cuanto a la inhibición directa, el litio actuaría como un competidor del magnesio, ya que actúa como cofactor de la GSK3, desplazándolo de su unión²⁹. De forma indirecta, contrarresta la disminución intracelular de potasio que activa vías apoptóticas, activando caspasa 3, así como favoreciendo la defosforilación tanto de PKB como de GSK3³⁰. De esta forma, se sospecha que el litio activa quinasas intracelulares responsables de la fosforilación de la serina 9 de la GSK-3 β , lo que provoca un cambio de conformación y su inactivación; a lo que habría que añadir una posible regulación a nivel de expresión génica³¹.

Tras probarlo en modelos de Alzheimer y neurodegenerativos, se ha comprobado que bloquea los depósitos de APP, reduce la secreción del péptido A β , además de prevenir su neurotoxicidad y la tautopatía (anomalías en la proteína tau). De esta forma se ha visto una mejora en la cognición y memoria²⁶.

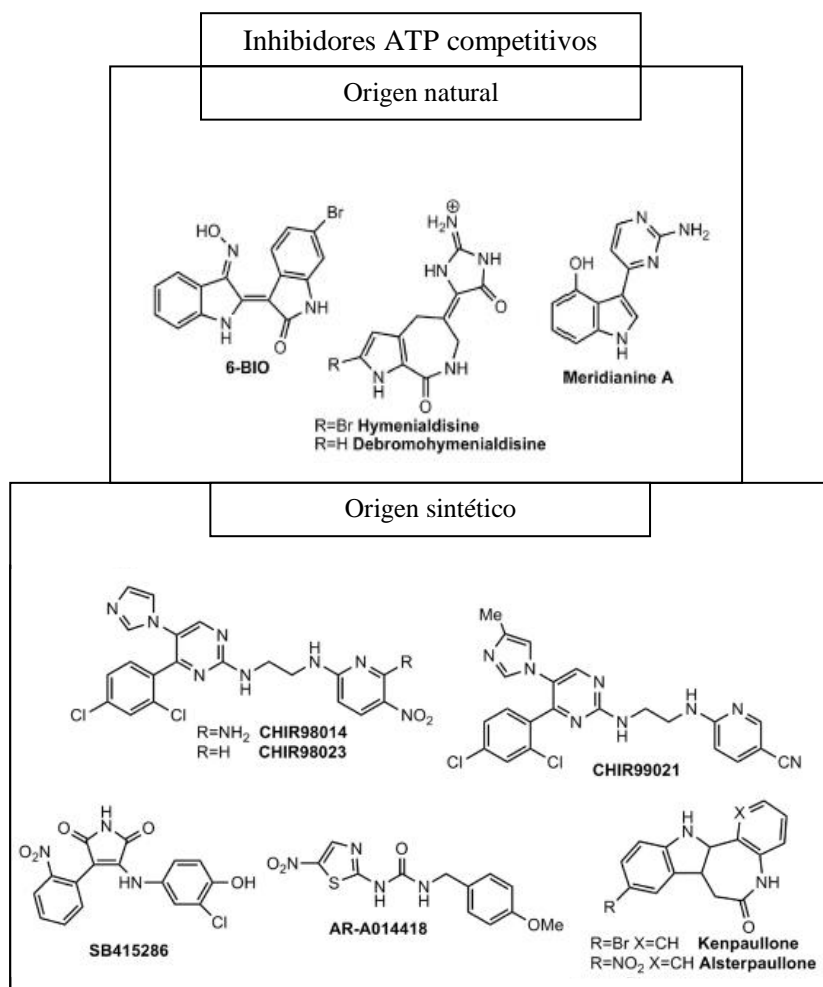
Se ha observado que otros cationes, como el zinc y el tungsteno, también pueden mejorar los signos y los síntomas de personas con Alzheimer, pero el más estudiado ha sido el litio²⁶.

2.2 Compuestos ATP-competitivos

Datos cristalográficos han mostrado que existen interacciones específicas con este tipo de compuestos, tanto dentro del bolsillo de unión al ATP como con residuos del lóbulo C-terminal, en las que se encuentran implicados residuos como el fragmento de Lys85 a Glu 97 y los residuos Asp133, Arg141, Gln 185, Asp200 y Arg220²⁶.

El principal problema es la falta de selectividad enzimática, debido a la semejanza estructural del lugar de unión del ATP que presenta la GSK3 con otras quinasa, como las CDKs.²⁶ Aunque esta inhibición doble puede usarse como beneficio terapéutico, ya que la CDK5, esencial para la funcionalidad neuronal, puede tener una actividad anormal con posibilidad de desencadenar patologías neurológicas, además de actuar como la quinasa marcadora de los sustratos de GSK3²⁶.

Muchos de los compuestos descritos no se han podido desarrollar más allá de los análisis preclínicos debido a su elevada toxicidad o al fallo en la fase clínica²⁶.



Origen natural

Muchos han sido los inhibidores de este tipo que se han aislado del medio marino.

Los análogos de la indirrubina se pueden aislar de muchas fuentes, tanto animales como vegetales. Se empleaban en la antigua China como remedio contra la leucemia³². Estos compuestos presentan inhibición tanto a nivel de GSK3 como de CDKs³³. El compuesto denominado 6-bromoindirrubina, aislado del molusco *Murex brandaris*, presentaba cierta selectividad frente a GSK3. Al realizar un cambio estructural que permitió aumentar la permeabilidad celular, se desarrolló la 6-bromoindirrubina-3'-oxima (6-BIO) que presentaba una mayor selectividad frente a GSK3³⁴.

Mediante técnicas cristalográficas, se ha visto que el bromo establece interacciones hidrofóbicas de tipo van der Waals con Leu-132 de GSK3, que no se produce en CDKs, ya que en lugar de una leucina se encuentra una fenilalanina, que, al ser bastante voluminosa, impide esa interacción³². Además, se establecen interacciones electrostáticas entre varios átomos de nitrógeno y oxígeno presentes en el compuesto y los aminoácidos cercanos (Val-35 y Asp-133). Adicionalmente, se ha observado que inhibe la fosforilación de Tyr276/Tyr216 (GSK3 α /GSK3 β), contribuyendo a la inactivación de la enzima.³²

Se ha visto que las posiciones 5 y 6 de las indirrubinas son susceptibles de modificación para aumentar la selectividad frente a GSK3, además de mejorar las propiedades farmacocinéticas, ya que presentan problemas de solubilidad al ser unos compuestos muy hidrofóbicos, lo que es un inconveniente para su desarrollo clínico³². Existen discrepancias en cuanto a los efectos beneficioso del 6-BIO^{35, 36}.

También existen los alcaloides dibromohimendialdisina (DBH) y himendialdisina (HD), procedentes de varios poríferos, que presentan tanto grupos bromopirrólicos como guanidínicos. Éstos funcionan como potentes inhibidores de quinasas sobre GSK3- β , MEK1, CK1 y Chk1²⁶. Además, HD tiene la capacidad de inhibir la fosforilación de tau en los lugares en los que se fosforila por la GSK3³⁷. Gracias a los estudios realizados sobre la interacción de HD con CDK2 se podría deducir la posible unión del compuesto con GSK3, ya que la unión a ATP de ambas enzimas es similar³⁸.

También se pueden encontrar las meridianinas, que son 3-(2-aminopirimidin) indoles bromados, aislados de una ascidia (*Aplidium meridianum*), originales de las islas de Georgia del Sur. Son capaces de inhibir varias quinasas y pueden evitar la proliferación celular e inducir la apoptosis³⁹.

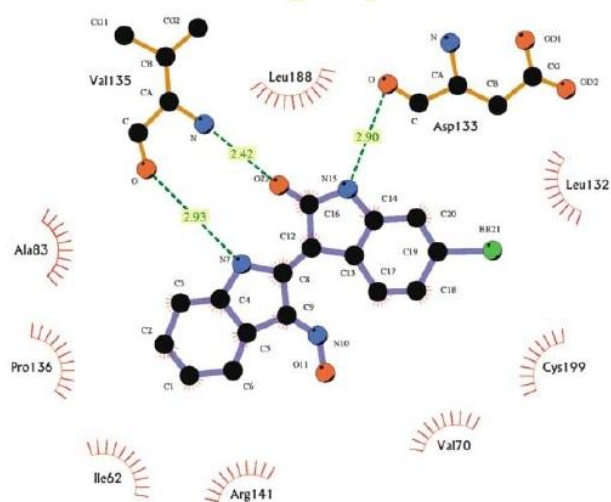


Figura 5: Interacciones entre 6-BIO y GSK3.³²

Origen sintético

Debido a la problemática de la poca selectividad de los compuestos de fuentes naturales⁴⁰, se comenzó la búsqueda sintética de inhibidores.

Entre ellos se encuentran los análogos de la purina, como las aminopirimidinas, desarrollados por Chiron. Se obtuvieron los compuestos CHIR98014, CHIR98023 y CHIR99021⁴¹, que se han probado en modelos biológicos, tanto “in vitro” como “in vivo”, observándose una potencial disminución de la fosforilación de tau³⁶, un bloqueo de la depresión a largo plazo mediada por NMDA⁴², una mejora de la pluripotencia y renovación de las células⁴³ y una disminución de la muerte neuronal⁴⁴.

Los derivados maleimídicos, como SB-216763 y SB-415286, también actúan como inhibidores. El nitrógeno maleimídico interactúa con el oxígeno carbonílico del Asp133 y el oxígeno del compuesto con el nitrógeno del esqueleto de la Val135. Además de existir dos interacciones más entre el oxígeno carboxílico con la Arg141 y la Gln185²⁴. Numerosos estudios demuestran los beneficiosos efectos neuroprotectores de estos compuestos, que reducen la neurotoxicidad causada por el péptido A β , la hiperfosforilación de tau y la actividad de la caspasa 3⁴⁴. Sin embargo, se ha demostrado con estos compuestos que la inhibición excesiva de GSK3 evita el correcto funcionamiento neuronal, que produce efectos neurodegenerativos, por lo que se debería emplear sólo en casos de sobreexpresión⁴⁵.

El compuesto aminotiazólico AR-A014418 ha mostrado ser un competidor específico de GSK3 en comparación con otras quinasas. Se ha visto que interactúa con la región bisagra mediante tres puentes de hidrógeno²⁴. En modelos “in vitro”, se ha demostrado que puede prevenir la neurodegeneración por el péptido A β ⁴⁶. A pesar de ello, se ha observado que no ha disminuido la fosforilación de tau en su administración a modelos “in vivo”³⁶.

También, los compuestos paullone se han probado como inhibidores, siendo los más importantes kenpaullone y alsterpaullone, que inhiben tanto la GSK3 como la CDK. Se ha visto que Alsterpaullone reduce la fosforilación de tau en cultivos neuronales³⁶, siendo su unión mediante dos puentes de hidrógeno con la Val135 y una interacción electrostática entre el grupo nitro y el grupo amino de la cadena lateral de la Lys85²⁴. Mientras que, kenpaullone disminuye la producción del péptido A β en células con

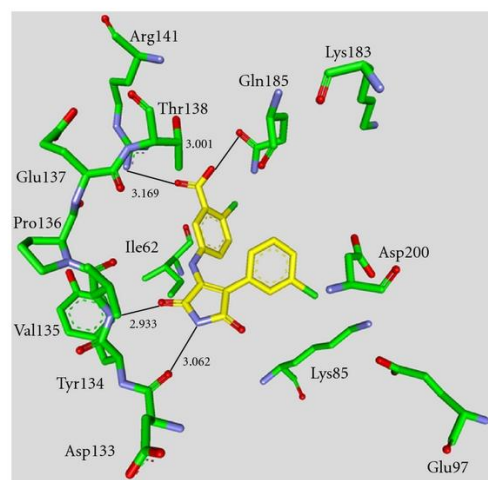


Figura 6: Interacción entre SB-216763 y GSK3.²⁴

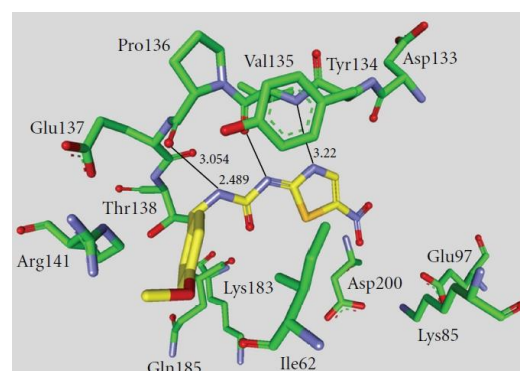


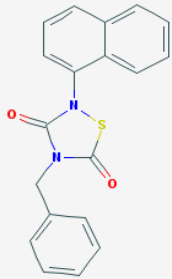
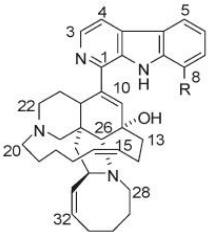
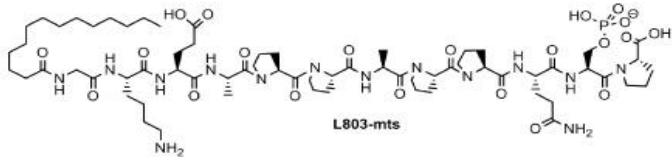
Figura 7: Interacción entre AR-A014418 y GSK3.²⁴

sobreexpresión de APP⁴⁷. Aunque estos compuestos se han dirigido más a sus acciones en otras patologías como el Parkinson debido a otros efectos que también producen²⁶.

2.3 Compuestos no ATP-competitivos

Debido a esa falta de especificidad sobre la quinasa, se comenzó con la búsqueda de compuestos no ATP competitivos que se podían unir a lugares más específicos dando una modulación más efectiva al no sólo bloquear la entrada del ATP²⁶.

El principal inconveniente que presentan es la relativa debilidad con la que se unen, lo que también puede ser beneficioso, ya que la inhibición completa produce efectos no deseados. Además en las patologías que se encuentra sobreexpresada la enzima, no presentan unos niveles muy por encima a los normales, de 2 a tres veces mayores, por lo que la búsqueda de inhibidores moderados-débiles (50% de inhibición) es la mejor opción para el uso clínico²⁶.

Inhibidores No ATP-competitivos	
Origen sintético	Origen natural
 <p>Tideglusib</p>	 <p>1 R= H 2 R= OH</p> <p>Manzamina</p>
Peptidomimético	
 <p>L803-mts</p>	

Origen natural

Las manzaminas son alcaloides complejos derivados de β -carbolina, aislados de diversos poríferos del océano indo-pacífico⁴⁸. De esta forma se encontró el compuesto manzamina A que inhibe la GSK3- β “in vitro”. Se conoce que el farmacóforo es la molécula completa, a pesar de su gran tamaño⁴⁹. A pesar de que su mecanismo no está claro, se han conocido interacciones claves en su inhibición. El nitrógeno terciario del anillo β -carbolínico interacciona mediante un puente de hidrógeno, mediada por una molécula de agua, con el grupo amino del Asp90. Además, se producen dos interacciones hidrofóbicas, una entre el

anillo formado por 8 átomos con Phe93 y otra del anillo β -carbolínico con el esqueleto de Arg96. En una variante de la manzamina A, en el que se le incluye un grupo hidroxilo en la posición 8 de la molécula, presenta una mayor unión con la enzima, ya que, además de las interacciones que presenta la manzamina A, también presenta interacciones electrostáticas con Arg96 y Ala204⁵⁰. Al probarse la manzamina A en cultivos celulares, se observó que era efectiva en la disminución de la hiperfosforilación de tau e inhibía diferentes quinasas, específicamente la GSK3- β y CDK5⁴⁹.

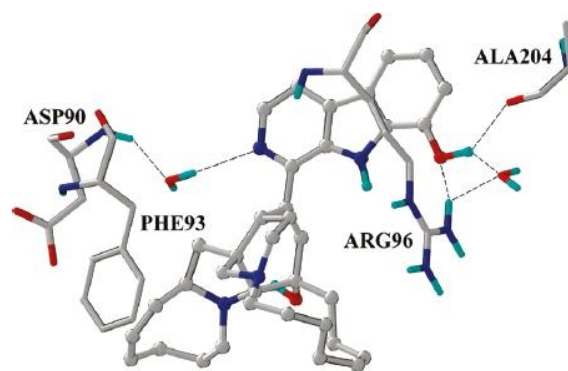


Figura 8: Manzamina interactuando con GSK3⁵⁰

También se han obtenido de otros poríferos, los compuestos como palinurina y tricatina que inhiben la GSK3- β . Son permeables a la célula y reducen la hiperfosforilación de tau en cultivos celulares. Aunque no se conoce como se unen a la enzima, se ha intentado determinar su conformación bioactiva para relacionarla con su actividad.²⁶

Origen sintético

La familia de las tiadiazolidinonas heterocíclicas presenta una gran selectividad frente a GSK3⁵¹, aunque su mecanismo de acción todavía no se conoce. Mediante técnicas SAR, se ha propuesto que interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de Arg96 y Lys205 y los carbonilos del anillo heterocíclico son esenciales para su unión. Además, la disposición hacia fuera del interior del bucle de activación del radical arilo de N4, establece interacciones hidrofóbicas con el anillo de Tyr216. Asimismo, la actividad del compuesto depende de las sustituciones que presente el anillo, ya sea por problemas estéricos con la enzima, de solubilidad o de estabilidad química⁵².

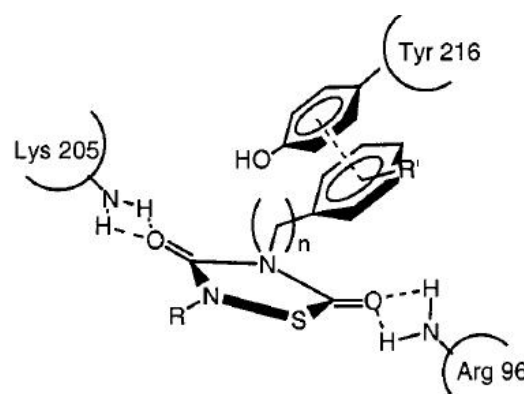


Figura 9: Posibles interacciones entre GSK3 y compuestos TDZD.⁵²

Dentro de este grupo, el compuesto NP-12 se está desarrollando para el tratamiento del Alzheimer, revelando una disminución de la placa β -amiloide, la fosforilación de tau y la muerte celular, obteniéndose una mejora en la cognición. Este compuesto, denominado tideglusib, es una molécula permeable a la barrera hematoencefálica, que se encuentra en fase II de ensayos clínicos, en la que se encontraban el estudio TAUROS y el estudio ARGO. Además, la FDA y la EMEA aprobaron el tideglusib como fármaco huérfano para el tratamiento de la tautopatía PSP (parálisis supranuclear progresiva)⁵³. A pesar de ello, los resultados del estudio clínico ARGO y del estudio TAUROS no muestran una eficacia clínica significativas, aunque no invalidan a la GSK3 como diana terapéutica y se ha propuesto desarrollar otros estudios con una selección más precisa de los pacientes⁵⁴.

Otros de estos compuestos son las halometilcetonas, descritas como inhibidores irreversibles, cuyo mecanismo de acción se debe a la formación de un enlace covalente del compuesto con la Cys199, localizada en la entrada del sitio de unión del ATP, cuya formación está favorecida por interacciones electrostáticas con el grupo amino protonado de Lys85. Se trata de compuestos permeables a la célula capaces de disminuir la fosforilación de tau⁵⁵.

Análogos peptídicos

La principal búsqueda se ha iniciado con compuestos prefosforilados como competidores de sustrato. De esta forma, se encontró el péptido L803-mts, muy selectivo, derivado de un péptido sustrato de la GSK3 permeable a la célula⁵⁶. Se ha localizado un sitio de interacción en el que intervienen los residuos del centro catalítico Phe67, Gln89, Phe93 y Asn95, además del Asp181 como lugar adicional en el N-terminal⁵⁷. Se ha visto que no se une de igual manera que el sustrato, ya que, a diferencia del sustrato, interacciona con Phe93 y una superficie hidrofóbica alejada del lugar de unión del ATP, aunque ambos interaccionan con el bolsillo de unión del fosfato. Esto conlleva que el inhibidor no requiera una posición exacta dentro de la hendidura catalítica⁵⁸. Al probarse en modelos del SNC, se han descubierto efectos beneficiosos en la neuroprotección con potencial clínico sobre trastornos depresivos⁵⁷.

5. Conclusiones

Debido a la gran complejidad de la fisiopatología y su parcial desconocimiento, el desarrollo de fármacos dirigidos a remitir o parar el desarrollo de la enfermedad está siendo complicado.

El principal problema de los inhibidores de la GSK3 es la falta de selectividad sobre la quinasa en la que actúan. A lo que hay que añadir que su inhibición no debe ser total, ya que al actuar sobre diferentes vías y células, en las que no tiene porque encontrarse sobreexpresada, pueden producirse efectos adversos graves, incluso una progresión neurodegenerativa, que es lo que se intenta evitar. Por todo ello, muchos de los inhibidores que se han estudiado no han conseguido desarrollarse más allá de la fase preclínica. A día de hoy, el compuesto con mayor desarrollo clínico ha sido el tideglusib, aunque los estudios no han mostrado resultados satisfactorios y se ha prepuesto la realización de un nuevo estudio con una selección más estricta de los pacientes para conocer la indicación de este inhibidor.

Si se llegan a desarrollar estos inhibidores, lo más probable es que se empleen como terapias combinadas, ya que se debe evitar tanto el desarrollo de los ovillos neurofibrilares como de las placas seniles, además del déficit de acetilcolina, para evitar el progreso de la enfermedad.

6. Bibliografía

1. Álvarez Sánchez M., Pedroso I., de la Fe A., Padron Sánchez A., Álvarez Sánchez M. & Álvarez L. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. Rev. Mex. Neuroci. 2008; 9(3): 196-201.
2. National Institute on Aging. (2011, Julio). Alzheimer's Disease Fact Sheet. Disponible en <http://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-fact-sheet>
3. Xiaoning B. Alzheimer Disease: Update on Basic Mechanisms. J. Am. Osteopath. Assoc. 2010; 110(9 suppl 8): S3-S9.

4. Crews L. & Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molec. Genet.* 2010; 19(1): R12-R20.
5. Castellani R.J., Xiongwei Z., Hyoung-Gon L., Smith M. A. & Perry G. Molecular pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10: 1386-1406.
6. Hong-Qi Y., Zhi-Kun S. & Sheng-Di C. Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting A β and tau. *Trans. Neurodegen.* 2012; 1: 1-21.
7. Winslow B.T., Onysko M.K., Stob C.M. & Hazlewood K.A. Treatment of Alzheimer disease. *Amer. Fam. Phys.* 2011; 83(12): 1403-1412.
8. Salomone S., Caraci F., Leggio G.M., Fedotova J. & Drago F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2011; 73(4): 504-517.
9. Hooper C., Killick R. & Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2008; 104: 1433-1439.
10. Muyliaert D., Kremer A., Jaworski T., Borghgraef P., Devijver H., Croes S., Dewachter I. & Van Leuven F. Glycogen synthase kinase-3 β , or a link between amyloid and tau pathology? *Genes, Brain and Behavior.* 2008; 7 suppl 1: 57-66.
11. Medina M. & Wandosell F. Deconstructing GSK-3: The fine regulation of its activity. *Int. J. Alzheimer's Disease.* 2011; 2011: 1-12.
12. ter Haar E., Coll J.T., Austen D.A., Hsiao H.M., Swenson L. & Jain J. Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat. Struct. Biol.* 2001; 8(7): 593-596.
13. Ishiguro K., Shiratsuchi A., Sato S., Omori A., Arioka M., Kobayashi S., Uchida T. & Imahori K. Glycogen synthase kinase 3 β is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 1993; 325(3): 167-172.
14. Hernandez F., Perez M., Lucas J.J., Mata A.M., Bhat R. & Avila J. Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35: implications for Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 3801-3806.
15. Sennvik K., Boekhoorn K., Lasrado R., Terwel D., Verhaeghe S., Korr H., Schmitz C., Tomiyama T., Mori H., Krugers H., Joels M., Ramakers G., Lucassen P. & Van Leuven F. Tau-4R suppresses proliferation and promotes neuronal differentiation in the hippocampus of tau knock-in/knock-out mice. *FASEB J.* 2007; 21: 2149-2161.
16. Sanna P.P., Cammalleri M., Berton F., Simpson C., Lutjens R., Bloom F.E. & Francesconi W. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3359-3365.
17. Takashima A., Murayama M., Murayama O., Kohno T., Honda T., Yasutake K., Nihonmatsu N., Mercken M., Yamaguchi H., Sugihara S. & Wolozin B. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 9637-9641.
18. Phiel C.J., Wilson C.A., Lee V.M. & Klein P.S. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature.* 2003; 423: 435-439.

19. Alvarez G., Muñoz-Montano J.R., Satrustegui J., Avila J., Bogonez E. & az-Nido J. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.* 1999; 453: 260–264.
20. Zhao L., Teter B., Morihara T., Lim G.P., Ambegaokar S.S., Ubeda O.J., Frautschy S.A. & Cole G.M. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *J. Neurosci.* 2004; 24: 11120–11126.
21. Solano D.C., Sironi M., Bonfini C., Solerte S.B., Govoni S. & Racchi M. Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway. *FASEB J.* 2000; 14: 1015–1022.
22. Reger M.A., Watson G.S., Green P.S., Wilkinson C.W., Baker L.D., Cholerton B., Fishel M.A., Plymate S.R., Breitner J.C., DeGroot W., Mehta P. & Craft S. Intranasal insulin improves cognition and modulates β -amyloid in early AD. *Neurology.* 2007; 70(6): 440-8.
23. Muyliaert D., Terwel D., Borghgraef P., Devijver H., Dewachter I. & Van Leuven F. Transgenic mouse models for Alzheimer's disease: the role of GSK-3 β in combined amyloid and tau-pathology. *Rev. Neurol.* 2006; 162: 903–907.
24. Kramer T., Schmidt B. & Lo Monte F. Small-Molecule inhibitors of GSK-3: Structural insights and their application to Alzheimer's disease models. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012; 2012: 0-32.
25. Martinez A. Preclinical efficacy on GSK-3 inhibitors: towards a future generation of powerful drugs. *Medicinal Research Reviews.* 2008; 28(5): 773–796.
26. Eldar-Finkelman H. & Martinez A. GSK-3 inhibitors: preclinical and clinical focus on CNS. *Front. Mol. Neurosci.* 2011; 4(32): 1-18.
27. Eldar-Finkelman H., Licht-Murava A., Pietrokovski S. & Eisenstein M. Substrate competitive GSK-3 Inhibitors strategy and Implications. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2010; 1804(3): 598–603.
28. Klein P.S. & Melton D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 8455–8459.
29. Noble W., Planel E., Zehr C., Olm V., Meyerson J., Suleman F., Gaynor K., Wang L., LaFrancois J., Feinstein B., Burns M., Krishnamurthy P., Wen Y., Bhat R., Lewis J., Dickson D. & Duff K. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102(19): 6990-6995.
30. Martinez A. Preclinical efficacy on GSK-3 inhibitors: towards a future generation of powerful drugs. *Med. Res. Rev.* 2008; 28(5): 773-796.
31. Diniz B.S., Machado-Vieira R. & Forlenza O.V. Lithium and neuroprotection: translational evidence and implications for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Neuropsychiatr Dis. Treat.* 2013; 9: 493-500.
32. Meijer L., Skaltsounis A.L., Magiatis P., Polychronopoulos P., Knockaert M., Leost M., Ryan X.P., Vonica C.A., Brivanlou A., Dajani R., Crovace C., Tarricone C., Musacchio A., Roe S.M., Pearl L. & Greengard P. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.* 2003; 10(12): 1255-66.

33. Leclerc S., Garnier M., Hoessel R., Marko D., Bibb J.A., Snyder G.L., Greengard P., Biernat J., Wu Y.Z., Mandelkow E.M., Eisenbrand G. & Meijer L. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 251-60.
34. Polychronopoulos P., Magiatis P., Skaltsounis A.L., Myrianthopoulos V., Mikros E., Tarricone A., Musacchio A., Roe S.M., Pearl L., Leost M., Greengard P. & Meijer L. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J. Med. Chem.* 2004; 47: 935-946.
35. Ding Y., Qiao A. & Fan G.H. Indirubin-3'-monoxime rescues spatial memory deficits and attenuates beta-amyloid-associated neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 2010; 39: 156-168.
36. Selenica M.L., Jensen H.S., Larsen A.K., Pedersen M.L., Helboe L., Leist M. & Lotharius J. Efficacy of small-molecule glycogen synthase kinase-3 inhibitors in the postnatal rat model of tauhyperphosphorylation. *Br. J. Pharmacol.* 2007; 152: 959-979.
37. Meijer L., Skaltsounis A.L., Magiatis P., Polychronopoulos P., Knockaert M., Leost M., Ryan X.P., Vonica C.A., Brivanlou A., Dajani R., Crovace C., Tarricone C., Musacchio A., Roe S.M., Pearl L. & Greengard P. GSK-3 selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.* 2003; 10: 1255-1266.
38. Lau L. & Brodney M.A. *Alzheimer's disease. 2. 1.* Heidelberg: Springer; 2008.
39. Gompel M., Leost M., DeKier Joffe E.B., Puricelli L., Franco L.H., Palermo J. & Meijer L. Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the ascidian *Aplidium meridianum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004; 14: 1703-1707.
40. Echalié A., Bettayeb K., Ferandin Y., Lozach O., Clement M., Valette A., Liger F., Marquet B., Morris J.C., Endicott J.A., Joseph B. & Meijer L. Meriolins (3-(pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles): synthesis, kinase inhibitory activity, cellular effects and structure of a CDK2/cyclin A/meriolin complex. *J. Med.Chem.* 2008; 51: 737-751.
41. Ring D.B., Johnson K.W., Henriksen E.J., Nuss J.M., Goff D., Kinnick T.R., Ma S.T., Reeder J.W., Samuels I., Slabiak T., Wagman A.S., Hammond M.E. & Harrison S.D. Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes* 2003; 52: 588-595.
42. Peineau S., Nicolas C.S., Bortolotto Z.A., Bhat R.V., Ryves W.J., Harwood A.J., Dournaud P., Fitzjohn S.M. & Collingridge G.L. A systematic investigation of the protein kinases involved in NMDA receptor dependent LTD: evidence for a role of GSK-3 but not other serine/threonine kinases. *Mol. Brain.* 2009; 2: 22.
43. Ying Q.L., Wray J., Nichols J., Battle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P. & Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 2008; 453: 519-523.
44. Kelly S., Zhao H., HuaSun G., Cheng D., Qiao Y., Luo J., Martin K., Steinberg G.K., Harrison S.D. & Yenari M.A. Glycogen synthase kinase 3 beta inhibitor Chir025 reduces neuronal death resulting from oxygen-glucose deprivation, glutamate excitotoxicity and cerebral ischemia. *Exp. Neurol.* 2004; 188: 378-386.

45. Hu S., Begum A.N., Jones M.R., Oh M.S., Beech W.K., Beech B.H., Yang F., Chen P., Ubeda O.J., Kim P.C., Davies P., Ma Q., Cole G.M. & Frautschy S.A. GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiol. Dis.* 2009; 33(2):193-206.
46. Owens D.R., Zinman B. & Bolli G. Alternative routes of insulin delivery. *Diabet.Med.* 2003; 20: 886–898.
47. Phiel C.J., Wilson C.A., Lee V.M. & Klein P.S. GSK-3 alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature.* 2003; 423: 435–439.
48. Hu J.F., Hamann M.T., Hill R. & Kelly M. Themanzamine alkaloids. *Alkaloids Chem. Biol.* 2003; 60: 207–285.
49. Hamann M., Alonso D., Martin-Aparicio E., Fuertes A., Perez Puerto M.J., Castro A., Morales S., Navarro M.L., Del Monte-Millan M., Medina M., Pennaka H., Balaiah A., Peng J., Cook J., Wahyuono S. & Martínez A. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitory activity and structure-activity relationship (SAR) studies of the manzamine alkaloids. Potential for Alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.* 2007; 70: 1397–1405.
50. Peng J., Kudrimoti S., Prasanna S., Odde S., Doerksen R.J., Pennaka H.K., Choo Y.M., Rao K.V., Tekwani B.L., Madgula V., Khan S.I., Wang B., Mayer A.M., Jacob M.R., Tu L.C., Gertsch J. & Hamann M.T. Structure activity relationship and mechanism of action studies of manzamine analogues for the control of neuroinflammation and cerebral infections. *J. Med. Chem.* 2010; 53: 61-76.
51. Mazanetz M.P. & Fischer P.M. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6: 464–479.
52. Martinez A., Alonso M., Castro A., Pérez C. & Moreno F.J. 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.* 2002; 45(6): 1292-9.
53. del Ser T. Phase II a clinical trial on Alzheimer's disease with NP12, a GSK-3 inhibitor. *Alzheimer's Dement.* 2010; 6: S147.
54. Lovestone S., Boada M., Dubois B., Hüll M., Rinne J.O., Huppertz H.J., Calero M., Andrés M.V., Gómez-Carrillo B., León T. & del Ser T. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2015; 45(1): 75-88.
55. Perez D.I., Conde S., Perez C., Gil C., Simon D., Wandosell F., Moreno F.J., Gelpi J.L., Luque F.J. & Martinez A. Thienylhalomethylketones: irreversible glycogen synthase kinase 3 inhibitors as useful pharmacological tools. *Bioorg. Med. Chem.* 2009; 17: 6914–6925.
56. Plotkin B., Kaidanovich O., Talior I., & Eldar-Finkelman H. Insulin mimetic action of synthetic phosphorylated peptide inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 305: 974–980.
57. Ilouz R., Kowelsman N., Eisenstein M & Eldar-Finkelman H. Identification of novel glycogen synthase kinase-3 beta substrate-interacting residues suggests a common mechanism for substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 30621–30630.
58. Licht-Murava A., Plotkin B., Eisenstein M. & Eldar-Finkelman H. Elucidating substrate and inhibitor binding sites on the surface of GSK-3 beta and there finement of a competitive inhibitor. *J. Mol. Biol.* 2011; 408: 366–378.