



Fundació
La Marató de TV3

20^e SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



PROGRAMA DE CRIBADO RACIONAL DE COMPUESTOS ESTABILIZADORES DE LA UNIÓN TRANSTIRETINA-A β COMO POTENCIALES FÁRMACOS MODULADORES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Gemma Arsequell Ruiz

Institut Química Avançada de Catalunya CSIC

Isabel Cardoso

Institute for Molecular Biology and Cell Biology

Jordi Llop Roig

Asociación Centro de Investigación Coop. Biomateriales – CICbiomaGUNE

Jesús Jiménez Barbero

CIC bioGune

Jordi Ramon Quintana Ruiz

PCB Fundació Parc Científic de Barcelona

1. Resumen

Numerosos estudios constatan que la proteína transtiretina (TTR) juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (AD). Se había descrito que los niveles de TTR presentes en líquido cefalorraquídeo (LCR; en inglés *cerebrospinal fluid*: CSF) de pacientes de Alzheimer eran inferiores comparados con los respectivos de personas sanas. La TTR es un homotetrámero que forma dos bolsillos de unión que ocupan los ligandos endógenos, las hormonas tiroideas. La TTR transporta estas hormonas en plasma y en cerebro (LCR). Se sabe que la TTR es la principal proteína del LCR que une A β . Estudios *in vivo* utilizando anticuerpos de la TTR y otros estudios de deleciones del gen de la TTR sugieren que la TTR posee una función neuroprotectora en modelos animales de AD. La unión a TTR neutraliza *in vitro* la citotoxicidad de los oligómeros de A β . La unión de la TTR a oligómeros de A β puede ser incrementada *in vitro* mediante compuestos que se unen a la TTR y al mismo tiempo estabilizan el tetrámero de la TTR. Estudios preliminares *in vivo* en ratones transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer, a los que se había administrado uno de estos compuestos, el yododiflunisal, mostraron que los niveles de A β habían disminuido. Además se observó una reducción del número de depósitos amiloideos y los ratones mostraron una mejora en sus funciones neurocognitivas.

Los principales objetivos del proyecto eran, por una parte, investigar los mecanismos moleculares que implican a la TTR en la enfermedad de Alzheimer, y por otra parte, poner a punto un programa de descubrimiento de moléculas pequeñas, chaperonas, que mejoren la interacción TTR/A β .

Nuestro consorcio multidisciplinario está integrado por cinco grupos de investigación que han conseguido cumplir con estos objetivos, aportando a través de la investigación realizada en este proyecto nuevos conocimientos a nivel molecular. El consorcio ha descubierto también un grupo de moléculas pequeñas, entre las que se encuentran algunos fármacos registrados, que mejoran la interacción entre la TTR y la A β , siendo estas moléculas, por tanto, candidatos potenciales para terapia de la enfermedad de Alzheimer.

2. Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos se resumen a continuación en función de los objetivos del proyecto y sobre todo en relación con el programa de descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Estos resultados se han obtenido gracias al esfuerzo y la sinergia entre investigadores pertenecientes a cinco grupos de investigación que trabajan en distintas disciplinas. Los resultados se dividen entre las siguientes actividades:

- a) Cribado (*screening*) computacional
- b) Cribado biológico
- c) Estudios estructurales
- d) Cribado de alto rendimiento (*HTS: high throughput screening*)
- e) Estudios biofísicos
- f) Estudios *in vivo*

CRIBADO COMPUTACIONAL

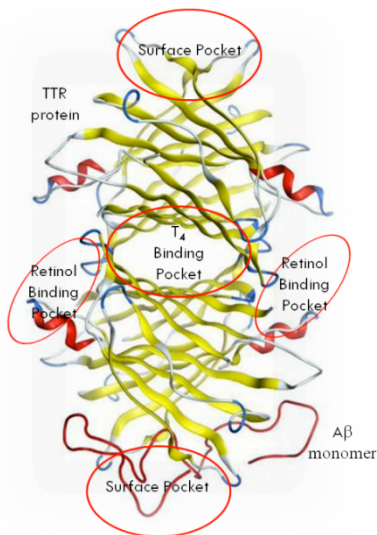


Figura 1.
Modelo del complejo entre la TTR y el monómero de la A β , enfatizando las interacciones en los bolsillos de superficie.

- a) Construcción de un modelo de la interacción TTR/A β

Se obtuvo un modelo refinado de la interacción de la TTR/A β usando técnicas computacionales de *docking* proteína-proteína (figura 1). Este modelo fue posteriormente validado mediante estudios de RMN.

- b) Cribado virtual para encontrar compuestos que interaccionen con el complejo TTR/A β .

Se emplearon técnicas computacionales (cribado virtual/*docking*) y se seleccionaron compuestos que provenían de: bases de datos de compuestos conocidos por estabilizar el tetrámero de TTR, fármacos registrados o en fases clínicas, en un proceso de

descubrimiento de fármacos denominado *repurposing* o reposicionado de compuestos conocidos para el tratamiento de nuevas enfermedades. El modelo refinado obtenido del complejo TTR/A β se utilizó para seleccionar diversos compuestos que o bien se

encontrasen en fases avanzadas de ensayos clínicos o que fuesen fármacos registrados, ya sea para la enfermedad de Alzheimer o para enfermedades asociadas al envejecimiento (*age-related disorders*). También se seleccionaron compuestos descritos en la bibliografía científica por su interacción con la TTR o compuestos que fuesen similares a los que habíamos seleccionado, todo ello con el fin de expandir la lista de compuestos a ensayar en la batería de tests biológicos y en estudios estructurales posteriores.

Se ha construido un modelo computacional de la interacción TTR/A β con el que al final se han seleccionado unos 100 compuestos (*virtual hits*) a partir de un cribado virtual de más de 10.000 compuestos.

Se han adquirido u obtenido por otras vías cerca de 90 compuestos para posteriores ensayos biológicos para evaluar la afinidad por TTR, la estabilidad de la TTR, así como la selectividad por TTR.

CRIBADO BIOLÓGICO

a) Validación de los *hits* obtenidos en el cribado virtual con ensayos para evaluar la afinidad por la TTR, la estabilidad de la TTR y la selectividad por la TTR.

Para esta actividad se diseñó una batería de tests *in vitro* con el fin de seleccionar estabilizadores del tetrámero de la TTR. Esta actividad se realizó previamente a la evaluación de la interacción entre la TTR y la A β en ausencia o presencia de estas moléculas pequeñas.

Así, la batería de ensayos de los 90 compuestos estaba integrada por:

a) Análisis cualitativos: ensayos de desplazamiento de la hormona tiroxina (T4) en geles de electroforesis. Se utilizó TTR recombinante (previamente sintetizada y purificada) y también TTR de plasma humano.

b) Ensayos cuantitativos de competición por T4, utilizando la proteína recombinante wtTTR. Este tipo de ensayos se aplicó a aquellos compuestos que fueron previamente seleccionados de los análisis cualitativos.

c) Ensayos de estabilidad: para ello se utilizaron geles de electroforesis en condiciones semidesnaturalizantes. Se seleccionaron como estabilizadores de la TTR aquellos

compuestos que daban un valor más alto de la ratio tetramero/monómero (es decir, TTR plegada/TTR monomérica) que el control (sin compuesto).

b) Selección de compuestos para ensayos ternarios.

Para esta selección se aplicó una metodología cíclica (flujo de trabajo computacional, conocimiento químico, cribado biológico experimental). El resultado de esta metodología fue una lista de más de 50 compuestos que mostraban buenas interacciones con la TTR.

ESTUDIOS ESTRUCTURALES

a) Validación del modelo de la interacción TTR/A β mediante RMN

Empleando el software TANGO se llevó a cabo una predicción computacional de las posibles regiones de agregación en las secuencias de la TTR y de la A β , información que nos explicaba la contribución de cada residuo a la capacidad amiloidogénica de la molécula global. La interacción preferente encontrada se producía entre los residuos 17-21 del núcleo central hidrofóbico de la A β con la zona hidrofóbica formada por los residuos 93-97 de la secuencia de la TTR (VVFTA), localizada en el bolsillo superficial de la proteína. Posteriormente, mediante estudios de RMN se encontró que esta secuencia contenía el epítipo principal de la interacción entre la A β (12-28) y la TTR.

En el seno de este proyecto se ha combinado la metodología de la espectroscopia de RMN con protocolos computacionales, con el fin de analizar los mecanismos moleculares que subyacen en estos procesos de reconocimiento molecular.

Hemos utilizado espectroscopia RMN de diferencia de transferencia de saturación (STD-RMN) para examinar la interacción entre la TTR y diferentes secuencias peptídicas de la A β . Los resultados de los experimentos de RMN han revelado que en la interacción TTR/A β la secuencia A β (12-28) es el principal elemento de reconocimiento. Estos resultados ya habían sido propuestos por el modelo computacional del complejo TTR-A β .

El protocolo de la RMN se ha aplicado al estudio del proceso de reconocimiento en presencia de compuestos o ligandos tipo T4, en particular de nuestro compuesto

cabeza de serie, el yododiflunisal (IDIF), y esto nos ha permitido proponer un modelo molecular para la interacción ternaria [TTR-IDIF-A β].

Este modelo nos ofrece una visión estructural de la implicación tanto de la TTR como de las moléculas que se unen al canal de la T4 de la TTR en la enfermedad de Alzheimer. Es esta una información clave en el diseño de compuestos útiles en esta área de investigación de la enfermedad de Alzheimer. Las características estructurales que son claves en la interacción entre la TTR y el péptido A β (12–28), elemento principal de reconocimiento de la A β , han sido también corroborados mediante espectroscopia STD-RMN en solución. Por otra parte, se han estudiado también los aspectos moleculares relacionados con el rol del IDIF, nuestro cabeza de serie como estabilizador del tetrámero de la TTR, en el complejo TTR-A β .

b) Análisis estructural de las interacciones SMC/TTR/A β mediante RMN

Se han aplicado las técnicas de STD-RMN al complejo TTR/A β (12-28) con el fin de obtener una base estructural que explique los efectos positivos observados en animales modelos de la enfermedad de Alzheimer tras ser tratados con IDIF. Los datos obtenidos sugieren que ambas moléculas, tanto IDIF como A β (12-28), pueden unirse de forma simultánea a la TTR, aunque en sitios diferentes. Por consiguiente, la TTR, una vez estabilizada con compuestos que se unen al mismo sitio de unión que la T4, tiene la capacidad de interactuar con el péptido, reforzando así de forma indirecta la capacidad que tienen algunos compuestos tipo T4 para mejorar la interacción TTR/A β .

Para obtener información específica de los epítomos de TTR implicados en la interacción de la TTR, tanto con monómeros de A β como con oligómeros de tamaño pequeño, se hizo uso de métodos de RMN para proteínas. En este caso se estudió el cambio que sufren las señales correspondientes a la proteína marcada con N15. Debido a las dificultades inherentes al uso de A β , en este caso se analizó la interacción entre la TTR y la secuencia corta de A β , la A β (12-28). La comparación entre los espectros 1H-15N TROSY de la proteína, en ausencia y en presencia de tres equivalentes de A β (12-28), mostró diferencias significativas. Analizando la perturbación total del desplazamiento para cada residuo se pudieron detectar aquellos aminoácidos más afectados en la unión entre la A β (12-28) y la TTR. Estos fueron mapeados en la estructura de la TTR.

c) ESTUDIOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

En este proyecto se describen por primera vez dos estructuras nuevas de dos compuestos con la TTR. Mediante difracción de rayos X se obtuvieron las estructuras de los correspondientes complejos binarios (TTR/estabilizador). Asimismo, las características estructurales de estos dos nuevos compuestos confirman el efecto estabilizador en la TTR.

En este proyecto se llevaron a cabo también numerosos experimentos de cristalización encaminados a la obtención de una estructura del complejo TTR/A β o de TTR con alguna de las secuencias de A β y del complejo ternario [TTR/estabilizador/secuencia de A β]. Entre las secuencias de A β ensayadas cabe destacar las secuencias: (1-16), (20-29), (29-40), (31-35), (1-40) y (1-42). Se obtuvieron cristales y se llevaron a cabo los estudios de difracción de rayos X mediante radiación de sincrotrón (ESRF, Grenoble, Francia y ALBA, Barcelona, España). Desafortunadamente, no se encontraron mapas de densidad electrónica correspondientes a los fragmentos de A β .

CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO (*HIGH THROUGHPUT SCREENING*) y ESTUDIOS BIOFÍSICOS

a) Validación de moléculas pequeñas chaperonas (*small-molecule chaperones, SMCs*) que incrementan la interacción TTR/A β .

Un tema central en cualquier proyecto de descubrimiento de fármacos es el desarrollo y validación de un ensayo para realizar un cribado de alto rendimiento (*high throughput screening, HTS*). El consorcio ha desarrollado en este proyecto un cribado basado en la técnica de turbidimetría. En primer lugar se sintetizó y purificó la proteína TTR recombinante, así como también la secuencia corta de la A β , la A β (12-28), que era la secuencia clave en la interacción, tal como se había encontrado en nuestros estudios de RMN. Este ensayo fue validado y optimizado para poder ser un cribado de alto rendimiento (*HTS screening assay*). Para la optimización de los parámetros experimentales relacionados con la agregación de la A β (12-28) se siguió un diseño factorial tipo 2³. Se comprobó la reproducibilidad del ensayo por análisis estadístico y se validó utilizando un pequeño grupo de compuestos controles. Gracias a disponer de este ensayo de cribado de alto rendimiento se pudo realizar el cribado de más de 50 moléculas pequeñas que habían sido previamente seleccionadas en los ensayos biológicos.

b) Selección de los candidatos SMC para ensayos *in vivo*

CALORIMETRIA DE VALORACIÓN ISOTÉRMICA

(*ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY, ITC*)

Los estudios de ITC se realizaron empleando un equipo de calorimetría MicroCal VP-ITC (www.Malvern.com). Esta técnica biofísica permite obtener una completa caracterización termodinámica de la interacción binaria [TTR + A β (1-42)] y, en su caso, de las interacciones ternarias [TTR + IDIF + A β (1-42)]. Los resultados de ITC nos confirman el efecto chaperona de nuestra molécula pequeña, el cabeza de serie IDIF, con el que se observa la mejora de la interacción TTR/A β . Estos estudios de ITC se realizaron para cada una de las moléculas de la lista priorizada de moléculas pequeñas obtenidas en el cribado de alto rendimiento.

En este proyecto se ha descubierto un grupo de diez moléculas pequeñas con efecto chaperona de la interacción TTR/A β . Cabe destacar que dentro de este grupo se encuentran algunos fármacos registrados.

c) ENSAYOS COMPLEMENTARIOS: TEM y ESTUDIOS DE TOXICIDAD

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

(*TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY, TEM*)

La TEM es una técnica de imagen de alta resolución que permite la identificación y la clasificación de diferentes tipos de agregados (protofibrillas, fibrillas amiloides que contienen diversos filamentos y agregados amorfos). Por otra parte, la TEM no da información cuantitativa ni de las cinéticas de agregación ni de las concentraciones de las fibras.

Con esta técnica hemos mostrado que algunas moléculas (SMC), cuando están formando un complejo con la TTR, previenen la agregación y la formación de fibras del péptido A β .

EFFECTO DE LAS MOLÉCULAS PEQUEÑAS CHAPERONAS (SMC) EN LA TOXICIDAD DE A β

Se evaluó la apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 inducida por el péptido A β , una vez se había incubado con la TTR sola o con la TTR formando un complejo binario con alguna de las moléculas pequeñas chaperonas (SMC). También con estos

estudios pudo observarse que la presencia de la SMC unida a la TTR aumentaba la capacidad de la TTR de prevenir la toxicidad del péptido A β .

ESTUDIOS *IN VIVO*

a) Distribución *in vivo* de la TTR y de los complejos [TTR-compuesto] con estudios de radiomarcaje y ensayos de imagen molecular en animales (*animal imaging*).

Se realizó por primera vez la radiosíntesis de nuestro estabilizador de la TTR, el IDIF, marcado con [^{131}I]. Se llevó a cabo el estudio de la biodistribución *in vivo* en ratones de los siguientes compuestos: [^{131}I]IDIF, [^{131}I]TTR y de los complejos binarios [^{131}I]TTR-IDIF (marcado en la TTR) y TTR- [^{131}I]IDIF (marcado en el IDIF).

Los resultados de biodistribución nos confirman la capacidad que posee la TTR para atravesar la barrera hematoencefálica (*blood brain barrier, BBB*). Además, estos estudios muestran que la formación de complejos binarios tipo TTR-IDIF aumentan significativamente la permeabilidad en la *BBB*, tanto del IDIF como la de la TTR.

b) Estudios longitudinales *in vivo* en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer. Se evaluó la eficacia terapéutica *in vivo* de dos compuestos, el IDIF y el fármaco tolcapone, empleando nuestros modelos de la enfermedad de Alzheimer, los ratones transgénicos (modelo A β PPswe/PS1A246E/TTR).

La síntesis del compuesto cabeza de serie iododiflunisal se escaló en el laboratorio para poder obtenerlo en cantidades suficientes para los estudios *in vivo*. La molécula tolcapone se aisló del fármaco TASMAR adquirido en farmacia. Estos estudios *in vivo* requerían que estos compuestos fuesen solubles en agua. A tal fin, se procedió a la síntesis de formas solubles de estos dos compuestos siguiendo protocolos descritos en la bibliografía científica.

Los estudios de imagen molecular con la técnica de imagen PET se realizaron empleando la sonda molecular [^{18}F]-Florbetaben, sonda que es un trazador del péptido A β . Para evaluar la eficacia de los tratamientos se calcularon las ratios de captación hipocampo-cerebelo para evaluar la presencia de placas.

En este proyecto se han ensayado dos compuestos en estudios longitudinales *in vivo* con la técnica de imagen PET en animales modelos de la enfermedad de Alzheimer, nuestros ratones transgénicos. Estos estudios no han finalizado y, por lo tanto, es pronto aún para elaborar conclusiones finales. Asimismo, en la actualidad se están realizando los estudios *ex vivo* para corroborar los estudios *in vivo*.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Nuestro consorcio ha logrado los dos retos propuestos al inicio del proyecto de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Por un lado, nos hemos adentrado en el conocimiento de la interacción TTR/A β , y, por otro lado, hemos descubierto un conjunto de moléculas pequeñas que mejoran la interacción entre la TTR y la A β . Con esto se abre una nueva ventana en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Se estima que en el año 2050 el número de personas afectadas en el mundo por la enfermedad de Alzheimer podría superar la cifra de 100 millones. La escala de gravedad de este problema contrasta notablemente con las soluciones disponibles a día de hoy para combatir esta enfermedad. La farmacoterapia existente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer tan solo ayuda a la mejora de síntomas del deterioro cognitivo y funcional, pero todavía no existe fármaco alguno que modifique el curso de la enfermedad o que la cure. Constituye, pues, un asunto de máxima urgencia encontrar nuevos tratamientos para combatir la enfermedad de Alzheimer. En este sentido, es esencial saber cómo funciona la enfermedad e identificar nuevas moléculas. Gracias a la Fundació La Marató de TV3, nuestro consorcio ha estado trabajando de forma interdisciplinar en este contexto, tratando de integrar el conocimiento y la experiencia de cinco grupos de investigación. El hecho de que se haya descubierto un grupo de moléculas pequeñas chaperonas (*SMCs: small-molecule chaperones*), compuestos que aumentan la interacción entre la transtiretina y el péptido amiloide, abre una nueva estrategia en el tratamiento terapéutico de la enfermedad de Alzheimer. En este grupo de compuestos hay fármacos reposicionados. Esto hace que si se comprobase que en el modelo de la enfermedad (ratones transgénicos) también cursan con una reducción en el depósito amiloide, podría pasarse a ensayos clínicos sin tener que realizar los estudios de toxicología, dado que estos compuestos ya han

sido aprobados para otras enfermedades. Respecto al resto de compuestos del grupo que no son fármacos, primero deberían realizarse también los estudios con animales. En caso de que sus efectos fuesen positivos (reducción de las fibras amiloides), un segundo paso sería establecer un proceso de farmacología de seguridad preclínica (*preclinical safety pharmacology*), previo a que la molécula en cuestión pueda entrar en ensayos clínicos.

4. Bibliografía científica generada

ESTUDIO DE PATENTABILIDAD (*en curso*)

Publicaciones

L. M. Santos, D. Rodrigues, M. Alemi S.C. Silva, C. A. Ribeiro, I. Cardoso.
Resveratrol administration increases Transthyretin protein levels ameliorating AD features- importance of transthyretin tetrameric stability.

Mol. Med. **2016**, 22, 597-607.

M. Alemi, S. C. Silva, I. Santana, I. Cardoso.

Transthyretin stability is critical in assisting beta amyloid clearance - Relevance of Transthyretin stabilization in Alzheimer's Disease.

CNS Neurosci. Ther. **2017**, 23, 605-619.

C.S. Silva, J. Eira, C. A. Ribeiro, Â. Oliveira, M. M. Sousa, I. Cardoso, M. A. Liz.

Transthyretin neuroprotection in Alzheimer's disease is dependent on proteolysis.

Neurobiol. Aging. **2017**, 59, 10-14.

A. Gimeno, L. M. Santos, M. Alemi, J. Rivas, D. Blasi, E.Y. Cotrina, J. Llop, G. Valencia, I. Cardoso, J. Quintana, G. Arsequell, J. Jiménez-Barbero.

Insights on the Interaction between Transthyretin and A β in Solution. A Saturation Transfer Difference (STD) NMR Analysis of the Role of Iododiflunisal.

J. Med. Chem. **2017**, 60, 5749-5758.

E. Y. Cotrina, A. Gimeno, J. Llop, J. Jiménez-Barbero, J. Quintana, G. Valencia, I. Cardoso, G. Arsequell.

A Simple Assay for Screening Chaperones of the Interaction Between Transthyretin- and beta-Amyloid Peptides to Identify Potential Alzheimer's Disease Therapeutics
(sometido a revisión).

Consortio TTRAD

Proyecto 20140330-31-32-33-34

