



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



PROGRAMA DE CRIBRATGE RACIONAL DE COMPOSTOS ESTABILITZADORS DE LA UNIÓ TRANSTIRETINA-A β COM A POTENCIALS FÀRMACS MODULADORS DE LA MALALTIA D'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. Resum

Nombrosos estudis fisiològics indiquen que la proteïna transtiretina (TTR) té un paper important en la patogènesi de la malaltia d'Alzheimer (AD). En estudis de la malaltia, s'havia descrit que els pacients d'Alzheimer tenien nivells més baixos de TTR en el líquid cefaloraquídi (LCR; en anglès *cerebrospinal fluid*: CSF) en comparació amb persones sanes, la qual cosa suggereix que la TTR podria ser un bon biomarcador del progrés de la malaltia. La TTR és un homotetràmer que forma dues butxaques d'unió ocupades pels lligands endògens, les hormones tiroïdals, les quals transporta en sang i cervell (LCR). La TTR és la principal proteïna de l'LCR que uneix Abeta ($A\beta$). Estudis *in vivo* que empen anticossos de TTR i estudis de delecions del gen de la TTR suggereixen que la TTR té una funció neuroprotectora en models animals d'AD. La unió a TTR neutralitza *in vitro* la citotoxicitat dels oligòmers d' $A\beta$. La unió de la TTR a oligòmers d' $A\beta$ pot augmentar *in vitro* amb compostos que s'uneixen a la TTR i estableixen al mateix temps el tetràmer de la TTR. Estudis preliminars *in vivo* en models d'AD en ratolins transgènics, als quals s'havia administrat un d'aquests compostos, el iododiflunisal, van mostrar no només una reducció dels nivells d' $A\beta$, sinó també una reducció del nombre de dipòsits d'aquesta, així com una millora en les funcions neurocognitives d'aquests ratolins.

Els principals objectius del projecte eren: investigar els mecanismes moleculars que impliquen la TTR en la malaltia d'Alzheimer i, al mateix temps, establir un programa de descobriment de molècules petites xaperones que millorin la interacció TTR/ $A\beta$. Gràcies a un consorci multidisciplinari integrat per cinc grups de recerca, el projecte ha assolit aquests objectius, i ha aportat a través de la recerca nous coneixements a escala molecular. S'ha descobert un grup de molècules petites, entre les quals hi ha alguns fàrmacs registrats, que milloren la interacció entre la TTR i l' $A\beta$, i que per tant són candidats potencials per a la terapèutica de la malaltia d'Alzheimer.

2. Resultats obtinguts

Els resultats obtinguts es resumeixen en funció dels objectius del projecte i en relació amb el procés de descobriment i desenvolupament de nous compostos per al

tractament de la malaltia d'Alzheimer. Aquests resultats han estat possibles gràcies a l'esforç i la coordinació de cinc grups de diverses disciplines.

El resultat es divideixen d'acord amb les activitats següents:

- a) Cribratge computacional
- b) Cribratge biològic
- c) Estudis estructurals
- d) Cribratge d'alt rendiment (*HTS: high throughput screening*)
- e) Estudis biofísics
- f) Estudis *in vivo*

CRIBRATGE COMPUTACIONAL

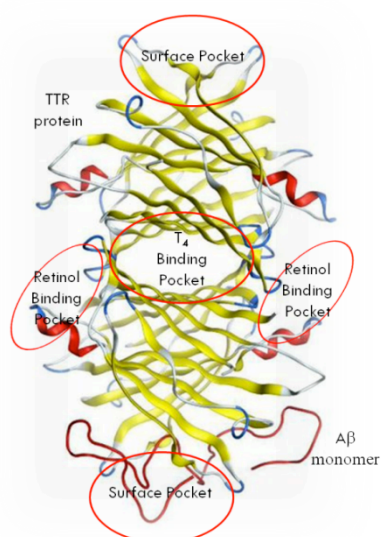


Figura 1.

Model del complex entre la TTR i el monòmer de l'Aβ, fent èmfasi en les interaccions a les butxaques de superfície.

- a) Construcció d'un model de la interacció TTR/Aβ.

Es va obtenir un model refinat de la interacció de la TTR/Aβ emprant tècniques computacionals de *docking* proteïna-proteïna (figura 1). Aquest model va ser validat posteriorment mitjançant tècniques d'RMN.

- b) Cribratge virtual per obtenir compostos que interaccionin amb el complex TTR/Aβ.

Emprant tècniques computacionals (cribratge virtual/*docking*) es van anar seleccionant tant compostos de bases de dades de compostos coneguts pel fet d'estabilitzar el tetràmer de la TTR, com fàrmacs registrats o en fases clíniques, en un procés de descobriment de fàrmacs anomenat *repurposing* o

reposicionament de compostos coneguts per al tractament de noves malalties. El model que vam refinar del complex TTR/Aβ es va emprar per seleccionar: compostos que es trobessin en fases avançades d'assaigs clínics, compostos que haguessin estat aprovats com a fàrmacs registrats per a la malaltia d'Alzheimer o per a malalties relacionades amb l'envelliment (*age-related disorders*), compostos descrits a la bibliografia científica per la seva interacció amb la TTR o compostos que fossin similars

a algun dels que havíem seleccionat, tot això amb la finalitat d'ampliar la llista de compostos a assajar en els tests biològics i en estudis estructurals.

Hem construït un model computacional de la interacció TTR/A β amb el qual hem seleccionat uns 100 compostos (*virtual hits*) a partir d'un cribratge virtual de més de 10.000 compostos.

Hem adquirit o obtingut per altres vies al voltant de 90 compostos per tal de procedir al cribratge biològic de la seva afinitat per TTR, l'estabilitat de la TTR i la selectivitat per TTR.

CRIBRATGE BIOLÒGIC

a) Validació dels *hits* obtinguts en el cribratge virtual en assaigs experimentals que avaluen l'afinitat per TTR, l'estabilitat de la TTR i la selectivitat per TTR.

Es va dissenyar una bateria de tests *in vitro* per seleccionar estabilitzadors del tetràmer de la TTR, abans d'assajar la interacció entre la TTR i l'A β en absència o presència d'aquests compostos.

Els assaigs emprats amb els 90 compostos són:

a) Anàlisis qualitatives: assaig de desplaçament de l'hormona tiroxina (T4) amb gels d'electroforesi emprant TTR recombinant (prèviament sintetitzada i purificada) i/o TTR provinent de plasma humà.

b) Assaigs quantitius de competició per T4, emprant la proteïna recombinant wtTTR. Aquesta aproximació es va aplicar a compostos prèviament seleccionats a les anàlisis qualitatives.

c) Assaig d'estabilitat fent servir una aproximació amb gels d'electroforesi en condicions semidesnaturalitzants. Els compostos que produïssin una proporció més alta de tetràmer/monòmer (és a dir: TTR plegada/TTR monomèrica) que el control (sense compost) van ser seleccionats com a estabilitzadors de la TTR.

b) Selecció de compostos per assaigs ternaris.

Es va emprar una metodologia cíclica (flux de treball computacional, coneixement químic, cribratge biològic experimental) i el resultat va ser la selecció de més de 50 compostos que van mostrar bones interaccions amb la TTR.

ESTUDIS ESTRUCTURALS

a) Validació del model de la interacció TTR/A β per RMN

Amb el programa TANGO es va dur a terme una predicció computacional de les suposades regions d'agregació en les seqüències de la TTR i de l'A β , la qual donava informació de la contribució de cada residu a la capacitat amiloidogènica de la molècula global. Es va trobar una interacció preferent entre els residus 17-21 del nucli central hidrofòbic de l'A β amb la zona hidrofòbica formada pels residus 93-97 de la seqüència de la TTR (VVFTA), localitzada en la butxaca superficial de la proteïna. Més endavant van trobar per RMN que aquesta seqüència contenia l'epítot principal de la interacció entre l'A β (12-28) i la TTR.

En aquest projecte hem combinat metodologia d'espectroscòpia d'RMN amb protocols computacionals, amb la finalitat d'analitzar els mecanismes moleculars relacionats amb aquests processos de reconeixement molecular.

Hem emprat espectroscòpia RMN de diferència de transferència de saturació (STD-RMN) per examinar la interacció entre la TTR i diferents seqüències peptídiques de l'A β . Els resultats de l'RMN han revelat la interacció específica entre la TTR i la seqüència A β (12-28) com a principal element de reconeixement. Aquests resultats també havien estat proposats prèviament pel model computacional del complex TTR-A β .

El protocol de l'RMN ha estat aplicat també a l'estudi del procés de reconeixement molecular en presència de lligands tipus T4, en particular del nostre compost cap de sèrie, iododiflunisal (IDIF), la qual cosa ens ha permès proposar un model molecular per a la interacció ternària [TTR-IDIF-A β].

Aquest model ens dona una visió estructural de la implicació de la TTR i de molècules que s'uneixen al canal de la T4 de la TTR en la malaltia d'Alzheimer, essent aquesta una informació clau per al disseny de compostos útils en aquesta àrea de recerca de la malaltia d'Alzheimer. Les característiques estructurals que són claus en la interacció entre la TTR i el pèptid A β (12-28), element de reconeixement essencial de l'A β , també han estat corroborades per mètodes d'espectroscòpia STD-RMN en solució. També s'han estudiat els aspectes moleculars relacionats amb el paper de l'IDIF, el nostre estabilitzador del tetràmer de la TTR, en el complex TTR-A β .

b) Anàlisi estructural de les interaccions SMC/TTR/A β amb RMN

Hem aplicat les tècniques STD-RMN al sistema TTR/A β (12-28) amb la finalitat d'obtenir una base estructural que expliqui els efectes positius que exerceix l'IDIF en els trets de la malaltia d'Alzheimer observats en animals d'experimentació. Les dades obtingudes per RMN suggereixen que ambdues molècules, l'IDIF i l'A β (12-28), poden unir-se de forma simultània a la TTR però en llocs diferents. Per tant, la TTR, proteïna homotetramèrica estabilitzada amb lligands que s'uneixen al mateix lloc d'unió que la T4, és capaç d'interaccionar amb el pèptid, la qual cosa dona suport de forma indirecta a l'habilitat dels lligands tipus T4 per millorar la interacció TTR/A β .

Es van fer servir també mètodes d'RMN per a proteïnes amb la finalitat d'obtenir informació específica sobre els epítops de TTR implicats en la interacció amb monòmers d'A β o amb oligòmers de mida petita. Particularment per identificar els aminoàcids de la TTR que eren importants en la interacció es van fer experiments que monitoritzen els canvis dels senyals en la proteïna marcada amb ^{15}N . A causa de les dificultats inherents a l'ús d'A β , es va analitzar la interacció entre la TTR i la seqüència curta d'A β , l'A β (12-28). La comparació entre els espectres ^1H - ^{15}N TROSY de la proteïna, en absència i en presència de tres equivalents d'A β (12-28), va mostrar diferències significatives. L'anàlisi de la pertorbació total de desplaçament per residu ens va permetre detectar els aminoàcids més afectats per la unió de l'A β (12-28) a la TTR, dels quals es va fer el mapatge en l'estructura de la TTR.

c) ESTUDIS DE DIFRACCIÓ DE RAIGS X

En aquest projecte es descriuen per primer cop dues noves molècules que són estabilitzadores del tetràmer de la TTR. Mitjançant estudis de difracció de raigs X es van obtenir les estructures dels corresponents complexos binaris (TTR/estabilitzador) amb la TTR, i es van identificar les característiques estructurals d'aquests dos nous compostos que confirmen l'efecte estabilitzador en la TTR.

En aquest projecte es van realitzar nombrosos experiments per tal d'obtenir estructures dels complexos ternaris [TTR/estabilitzador/seqüència d'A β]. Entre les seqüències d'A β assajades figuren les seqüències: (1-16), (20-29), (29-40), (31-35), (1-40) i (1-42). Es van obtenir cristalls amb la TTR i les dades de difracció de raigs X es van obtenir amb la radiació de sincrotró (ESRF, Grenoble, França i ALBA, Barcelona,

Espanya). Es van resoldre les estructures, però malauradament en cap dels intents es va poder observar el mapa de densitat electrònica corresponent als fragments d'A β .

CRIBRATGE D'ALT RENDIMENT (*HIGH THROUGHPUT SCREENING*) i ESTUDIS BIOFÍSICS

a) Validació de les molècules petites xaperones (*small-molecule chaperones, SMCs*) que augmenten la interacció TTR/A β .

Un eix central en qualsevol projecte de descobriment de fàrmacs és el desenvolupament i la validació d'un assaig per fer cribratge d'alt rendiment (*high throughput screening, HTS*). El consorci va desenvolupar un cribratge basat en la tècnica de la turbidimetria. D'una banda, es va sintetitzar i purificar la proteïna TTR recombinant i, d'altra banda, es va sintetitzar la seqüència curta de l'A β , l'A β (12-28), que era la seqüència clau en la interacció descoberta en els nostres estudis d'RMN. Aquest assaig es va validar i optimitzar per tal de ser un cribratge d'alt rendiment (*HTS screening assay*). L'optimització dels paràmetres experimentals per a l'agregació de l'A β (12-28) es va dur a terme seguint un disseny factorial 2³. Es va comprovar la reproductibilitat de l'assaig per anàlisi estadística i es va validar emprant un grup de compostos controls. Fent servir aquest cribratge d'alt rendiment, es va poder realitzar el cribratge de més de 50 molècules petites que havien estat prèviament seleccionades dels assaigs biològics.

b) Selecció d'SMC candidates per als assaigs *in vivo*

CALORIMETRIA DE VALORACIÓ ISOTÈRMICA (*ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY, ITC*)

Per fer els estudis d'ITC es va emprar un calorímetre MicroCal VP-ITC (www.Malvern.com). Aquesta tècnica biofísica permet obtenir una caracterització termodinàmica completa de la interacció binària [TTR + A β (1-42)] i de les interaccions ternàries [TTR + IDIF + A β (1-42)]. Els resultats dels estudis d'ITC confirmen l'efecte xaperona de la molècula petita IDIF que millora la interacció TTR/A β . Aquests estudis d'ITC es van emprar per estudiar cadascuna de les molècules de la llista prioritzada de molècules petites que es van obtenir en el cribratge d'alt rendiment.

En el projecte s'ha descobert un grup de deu molècules petites, algunes fàrmacs registrats.

c) ASSAIGS COMPLEMENTARIS: TEM i ESTUDIS DE TOXICITAT

MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ (TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY, TEM)

La TEM és una tècnica d'imatge d'alta resolució que ens permet la identificació i la classificació de diferents agregats (protofibril·les, fibril·les amiloides que contenen diversos filaments i agregats amorfs). La TEM no ens dona informació quantitativa de les cinètiques d'agregació o de les concentracions de les fibres.

Emprant aquesta tècnica hem pogut demostrar que algunes molècules (SMC) prevenen l'agregació i la formació de fibres del pèptid A β quan estan formant un complex amb la TTR.

EFFECTE DE LES MOLÈCULES PETITES XAPERONES (SMC) EN LA TOXICITAT D'A β

Es va avaluar l'apoptosi mesurant l'activació de la caspasa 3 induïda pel pèptid A β , un cop s'havia incubat amb la TTR o amb la TTR formant complex amb alguna de les molècules petites xaperones (SMC). Aquests estudis van mostrar que la presència de l'SMC en la TTR augmentava l'habilitat pròpia de la TTR de prevenir la toxicitat de l'A β .

ESTUDIS *IN VIVO*

a) Distribució *in vivo* de la TTR i dels complexos [TTR-compost] mitjançant estudis de radiomarcatge i assaigs d'imatge molecular en animals (*animal imaging*).

El nostre estabilitzador de la TTR, l'IDIF, es va sintetitzar marcat amb [¹³¹I] per primer cop dins d'aquest projecte. Es va procedir a l'estudi de la biodistribució *in vivo* en ratolins dels compostos següents: [¹³¹I]IDIF, [¹³¹I]TTR i dels complexos binaris [¹³¹I]TTR-IDIF (marcat a la TTR) i TTR- [¹³¹I]IDIF (marcat a l'IDIF).

Els resultats confirmen la capacitat que té la TTR de creuar la barrera hematoencefàlica (*blood brain barrier, BBB*) i, a més, suggereixen que la formació dels complexos binaris tipus TTR-IDIF augmenta la permeabilitat sobre la *BBB*, tant de l'IDIF com de la TTR.

b) Estudis longitudinals *in vivo* en models animals de la malaltia d'Alzheimer.

Vam avaluar l'eficàcia terapèutica *in vivo* de dos compostos, l'IDIF i el fàrmac tolcapone, en els nostres ratolins transgènics models de la malaltia d'Alzheimer (model A β PPswe/PS1A246E/TTR).

La síntesi del nostre compost iododiflunisal es va escalar per poder realitzar els estudis *in vivo*. La molècula tolcapone es va aïllar del fàrmac TASMAR adquirit a farmàcia. Els estudis *in vivo* requerien l'administració d'una forma soluble dels compostos, per la qual cosa es van preparar les seves corresponents formes solubles en aigua emprant protocols descrits a la bibliografia científica.

Els estudis d'imatge molecular amb PET es van fer emprant la sonda molecular [^{18}F]-Florbetaben que traça l'A β . Es van mesurar les ràtios de captació hipocamp-cerebel per avaluar la presència de plaques i fer el seguiment de l'eficàcia dels tractaments.

En aquest projecte s'han assajat dos compostos en estudis longitudinals *in vivo* per imatge PET en ratolins models de la malaltia d'Alzheimer. Aquests estudis *in vivo* encara estan en curs i, per tant, encara no se'n poden elaborar les conclusions finals. Així mateix, els estudis *ex vivo* per corroborar aquests estudis *in vivo* encara no han acabat.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

El nostre consorci ha assolit les dues fites proposades en aquest projecte de descobriment i desenvolupament de fàrmacs. D'una banda, aprofundir en el coneixement de la interacció TTR/A β , i, d'altra banda, el descobriment d'un conjunt de molècules petites que milloren la interacció entre la TTR i l'A β . Això obre una nova finestra en el tractament de la malaltia d'Alzheimer.

Es creu que el 2050 el nombre de persones afectades al món per la malaltia d'Alzheimer pot arribar a superar els 100 milions. L'escala d'aquest greu problema contrasta notablement amb la manca de solucions disponibles avui dia. La farmacoteràpia existent per tractar la malaltia d'Alzheimer només ajuda a alleugerir els

síntomes del deteriorament cognitiu i funcional, però encara no existeix un fàrmac que modifiqui la malaltia, i encara menys que sigui curativa. Es necessita trobar amb la màxima urgència nous tractaments per combatre la malaltia d'Alzheimer. És essencial saber com funciona la malaltia, així com també identificar noves molècules.

Gràcies a la Fundació La Marató de TV3, el nostre consorci ha estat treballant durant els darrers anys en aquest context integrant coneixement i expertesa de cinc grups multidisciplinaris. El descobriment i la selecció d'un grup de molècules petites xaperones, compostos que augmenten la interacció entre la transtiretina i el pèptid amiloide, obre una nova estratègia per al tractament terapèutic de la malaltia d'Alzheimer. Dins d'aquest grup de compostos hi ha fàrmacs reposicionats, per la qual cosa, un cop comprovat que hi hagi reducció del dipòsit amiloide en el nostre model de ratolí transgènic de la malaltia, es pot passar a assaigs clínics sense necessitat de fer anàlisis toxicològiques, ja que aquests compostos han estat aprovats per al tractament d'altres malalties. Pel que fa a la resta de compostos del grup que no són fàrmacs, primer s'haurien de fer estudis amb animals. En cas d'efectes positius en la reducció de les fibres amiloides, un segon pas seria establir un procés de farmacologia de seguretat preclínica (*preclinical safety pharmacology*), abans que la molècula en qüestió pugui entrar a assaigs clínics.

4. Bibliografia científica generada

ESTUDI DE PATENTABILITAT (*en curs*)

Publicacions

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*
(sotmès a revisió).

Consorti TTRAD

Projecte 20140330-31-32-33-34

