



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Descubrimiento de fármacos contra la enfermedad de Alzheimer basados en la estabilidad de la transtiretina

Ellen Yadira Cotrina Celis



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement- CompartIgual 4.0. Espanya de Creative Commons.](#)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento - CompartIgual 4.0. España de Creative Commons.](#)

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.](#)



**Descubrimiento de fármacos
contra la enfermedad de Alzheimer
basados en la estabilidad de la transtiretina**

Ellen Yadira Cotrina Celis

Barcelona, 2021

Descubrimiento de fármacos contra la enfermedad de Alzheimer basados en la estabilidad de la transtiretina

Tesis doctoral

Memoria presentada por Ellen Yadira Cotrina
para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada en el Programa de Doctorado en Biotecnología de la Universidad de Barcelona, en las instalaciones del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC)

Doctoranda:
Ellen Yadira Cotrina Celis

Directora:
Dra. Gemma Arsequell Ruiz
Investigador Científico
Dpto. Química Biológica
(IQAC-CSIC)

Tutora:
Dra. Maria Antònia Busquets Viñas
Profesora Titular
Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
y Fisicoquímica.
Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

Barcelona, 2021

Esta tesis se ha llevado a cabo en el Departamento de Química Biológica del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC), que pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a un contrato asociado al proyecto coordinado “Programa de cribado racional de compuestos estabilizadores de la unión transtiretina-A β como potenciales fármacos moduladores de la enfermedad de Alzheimer”, financiado por la Fundació Marató de TV3 (convocatoria enfermedades neurodegenerativas, referencia: 20140330-31-32-33-34, <http://www.ccma.cat/tv3/marato/en/projectes-financats/2013/212/>) y gracias a un contrato de un año de Ford España - Fundación Apadrina la Ciencia.

AGRADECIMIENTOS

En este apartado de mi tesis, me harán falta unas cuantas hojas para expresar la satisfacción y alegría que siento de haber podido participar en el proyecto AD/TTR.

En primer lugar, agradezco a la Dra. Gemma Arsequell la oportunidad que me brindó de realizar la tesis doctoral en su grupo y la confianza en mí para el desarrollo de este trabajo. Gracias por el tiempo que me has dedicado en cada explicación, por tu paciencia y tu esfuerzo por hacer que la ciencia se entienda de manera sencilla. Como científica me has dado la oportunidad de aprender guiada por excelentes profesionales y personas. He visto de cerca tu entrega en este proyecto, te admiro y me alegra de los buenos resultados que hemos conseguido. Como persona me llevo conmigo muchas enseñanzas que te aseguro no olvidaré. Aquesta tesi és de les dues Gemma.

Agradezco al Dr. Gregorio Valencia, por hacer de este pequeño grupo una familia y hacerme sentir parte de este desde el primer momento. Te agradezco también por hacerme sentir la confianza de hacer cualquier pregunta y ayudarme a apreciar la ciencia presente en todo lugar. Tengo muy bonitos recuerdos Gregorio, gracias por tu apoyo.

En nuestro centro IQAC quiero dar las gracias a la Dra. Gemma Fabrias por su colaboración y apoyo en el desarrollo de este trabajo facilitándome el acceso a las instalaciones del centro, a la Dra. Silvia Díaz, Dra. María José Bleda, Dra. Yolanda Pérez, Dra. Pilar Marco, Dr. Roger Galve, gracias por la guía profesional que me habéis brindado, muy importante para mi formación. A Sonia Pérez, Alberto Válchez, Antonio, Lara, Elvira, por facilitarme el día a día en el laboratorio.

Agradezco al Dr. Antoni Planas por ser una colaboración muy importante en mi trabajo, sin la TTR poco que discutir me hubiera quedado. En el laboratorio de bioquímica de IQS, me he convertido en un visitante recurrente y ver las caras conocidas que son parte de mi vida profesional me da alegría, gracias por su confianza Toni.

En IQS agradezco la colaboración del Dr. Xevi Biarnés, la visualización de nuestros estudios nos ha dado a Gemma y a mí un gran interés por aprender aún más de la bioinformática. También agradecer a Sergi Pascual, próximo doctor, por gestionar mis visitas a IQS, su asesoramiento en el uso de equipos y junto con Mireia hacerme sentir una más en lab. A la Dra. Magda F., Dra. Teresa P., Patricia, entre otras caras que siempre me

han recibido con mucha cordialidad. IQS me dejó también buenas amistades en especial Alba, gracias por tus llamadas y estar pendiente de mi tesis, por mantenernos unidas a las compis del lab Cristina, Marta, Caterina, Lourdes y Pamela.

He de agradecer al Dr. Rafel Prohens y al Dr. Rafael, por enseñarme todo sobre la técnica del ITC, el tiempo dedicado a las discusiones y por ayudarme a conseguir unos termogramas que con orgullo puedo decir son de los mejores que encuentro en la bibliografía.

Un agradecimiento a mi tutora la Dra. Maria Antònia por su implicación en mi trabajo y ayudarme a llevar a cabo experimentos que fueron fundamentales para seguir adelante. Le agradezco también su confianza, sus consejos y darme la oportunidad de evaluar mi capacidad de transmitir mis conocimientos con Nuria, ha sido una bonita experiencia.

Esta tesis es parte de un proyecto conformado por cinco grupos de investigación a quienes agradezco su esfuerzo y ayuda, he tenido la oportunidad de compartir con ustedes las reuniones de seguimiento, en donde he aprendido más acerca de mi trabajo, les agradezco también el soporte, sobre todo en cuanto a conseguir A β y nuestros intercambios de materiales. Gracias Dr. Jordi Quintana, Dra. Isabel Cardoso, Dr. Jordi Llop y Dr. Jesús Jiménez-Barbero.

Así mismo mi agradecimiento a la Fundació La Marató de TV3 que, con su implicación en fomentar la investigación a través de ayudas económicas, hace posibles proyectos como en el que he desarrollado mi tesis doctoral. Gracias también a la Asociación Apadrina la Ciencia por su iniciativa de ayudar a los estudiantes de doctorado a tener soporte económico durante nuestra formación y haberme otorgado el premio en su primera convocatoria de contratos doctorales.

Como lo comentaba antes los buenos resultados son producto del esfuerzo y el trabajo en equipo, el haber logrado culminar esta tesis es gracias a un excelente soporte científico y familiar. Por ello quiero agradecer a mi familia por su apoyo y su continuo esfuerzo por entender mi trabajo. A mi madre por siempre motivarnos a mí y mis hermanos a luchar por aquello que nos apasiona y que con esfuerzo se pueden alcanzar los objetivos. A mis dos hermanos de los cuales estoy muy orgullosa y les agradezco sus consejos su ayuda, me siento muy feliz de tenerles. A mi esposo gracias por tu paciencia y apoyo, cuando te conocí ya te dije que había venido a España a estudiar, de eso ya hace algunos años. A mi pequeña

que me impresiona cada día y es genial. A mis abuelos que han sido mis pilares y a quienes debo lo que soy.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia. Es una enfermedad neurodegenerativa para la cual no existe tratamiento curativo. La transtiretina (TTR) es una proteína tetramérica conocida por su función transportadora de la hormona tiroidea T4 y del retinol. También posee una función neuroprotectora que está avalada por numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, tanto de nuestro grupo como de otros grupos internacionales. Nuestro consorcio de investigación descubrió hace unos años que la estabilización del tetrámero de la TTR, mediante moléculas pequeñas, entre ellas nuestra molécula líder, el Iododiflunisal (IDIF), jugaba un rol importante en la patogénesis del Alzheimer.

Esta tesis doctoral se enmarca en un proyecto multidisciplinar de **descubrimiento de fármacos para el Alzheimer**, financiado por la Fundación Marató de TV3, cuyo objetivo principal es identificar nuevos estabilizadores de la unión entre TTR y péptidos amiloide Abeta ($A\beta$) como el IDIF.

Los objetivos específicos son:

- a) Optimizar la producción de proteína recombinante humana TTR para obtener cantidades suficientes para su uso en estudios de cribado de alto rendimiento de moléculas pequeñas
- b) Investigar las bases estructurales de las interacciones entre la TTR y diferentes péptidos amiloides, utilizando diversas moléculas que estabilizan la TTR.
- c) El diseño de un ensayo *in vitro* para el cribado de alto rendimiento (*High Throughput Screening*, HTS) de moléculas pequeñas, como potenciales chaperonas de la interacción TTR/ $A\beta$
- a) El descubrimiento de nuevas chaperonas de la interacción TTR/ $A\beta$ como potenciales candidatos a fármacos, gracias al cribado HTS de moléculas propuestas por otros grupos del consorcio.

En esta tesis se ha optimizado la producción de la proteína humana recombinante TTR, a gran escala (>600 mg), para su posterior uso en estudios estructurales y en ensayos de cribado de moléculas. Mediante la técnica de calorimetría de valoración isotérmica (ITC), se ha confirmado la base estructural de la interacción binaria de la TTR con el péptido amiloide $A\beta(1-42)$, y del efecto estabilizador de IDIF en esta interacción. Se ha diseñado y validado un ensayo de cribado de alto rendimiento (HTS), basado en una técnica turbidimétrica que utiliza $A\beta(12-28)$. Estudios complementarios (fluorescencia de Tioflavina T y de ITC) han corroborado esta validación. Con este ensayo se ha realizado el cribado *in vitro* de cada una de las 53 moléculas (*experimental hits*) propuestas por otros grupos de nuestro consorcio, obteniéndose una lista priorizada de compuestos estabilizadores. Ensayos de fluorescencia de Tioflavina T y estudios de calorimetría han corroborado la selección de estas chaperonas. Entre las mejores cabe destacar la presencia de: nuestra molécula IDIF, una molécula en fase de descubrimiento; la luteolina, producto natural que es un fármaco investigacional en fase clínica; y tres fármacos aprobados para otras enfermedades, el sulindac, la olsalazina y el ácido flufenámico, fármacos que pueden ser directamente reposicionados para su uso en fases clínicas para la enfermedad de Alzheimer. Se espera que estudios *in vivo* en ratones transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer permitan en un futuro validar la transtiretina como diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad.

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dementia. There is currently *no cure* for this neurodegenerative disease. Transthyretin (TTR) is a tetrameric protein known for its transporting function of thyroid hormone T4 and retinol. It also has a neuroprotective function that is supported by numerous *in vitro* and *in vivo* studies, both from our group and other international groups. Our research consortium discovered a few years ago that TTR tetramer stabilization using small-molecules, among them our lead molecule iododiflunisal (IDIF), played an important role in Alzheimer's pathogenesis.

This doctoral thesis is part of a multidisciplinary drug discovery project for Alzheimer's disease, funded by Fundació La Marató de TV3, with the aim of identifying potent TTR stabilizers behaving as our stabilizer IDIF enhancing the interaction between TTR and amyloid beta (A β) peptides.

The specific objectives are:

- a) Optimize the production of human recombinant protein TTR to obtain enough amounts for high-throughput screening (HTS) studies of small-molecules.
- b) Investigate the structural basis of the interactions between TTR and different amyloid peptides, using diverse molecules that stabilize TTR.
- c) The design of an *in vitro* test for the high-throughput screening of small molecules as potential chaperones of the TTR/A β interaction.
- d) The discovery of new chaperones of TTR/A β interaction as potential drug candidates

In this PhD thesis we have optimized the large-scale production of the recombinant human protein TTR (>600 mg) for later use in the structural studies and molecule screening assays. Using the isothermal titration calorimetry (ITC) technique, the structural basis of the binary interaction of TTR with A β (1-42) has been confirmed as well as the stabilizing effect of IDIF on this interaction. A high throughput screening (HTS) test, based on turbidimetric techniques, has been designed and validated using the short amyloid peptide A β (12-28). Complementary studies (Thioflavin T fluorescence assays and ITC studies) have corroborated this validation. Using this in-house designed HTS assay we have carried out the *in vitro* screening of 53 molecules (experimental hits) proposed by our collaborators in the consortia. A prioritized list of molecules has been found. Thioflavin T fluorescence assay and calorimetry studies have corroborated the selection on the chaperones from this prioritized list. Among the best chaperones we have: our molecule IDIF, a molecule in the discovery phase; the natural product luteolin, an investigational drug in clinical phases; and three registered drugs for other diseases, sulindac, olsalazine and flufenamic acid, drugs that can be directly repositioned for use in clinical phase for Alzheimer's disease. By further *in vivo* studies with these drugs in animal models of Alzheimer's disease we will validate transthyretin as a therapeutic target for Alzheimer's disease therapeutics.

RESUM

La malaltia de l'Alzheimer és la principal causa de demència. És una malaltia neurodegenerativa per a la que no existeix tractament curatiu. La transtiretina (TTR) és una proteïna tetramèrica coneguda per la seva funció transportadora de la hormona tiroide T4 i del retinol. També té una funció neuroprotectora avalada per nombrosos estudis *in vitro* e *in vivo*, tant del nostre grup com d'altres grups internacionals. El nostre consorci de investigació va descobrir fa uns anys que la estabilització del tetràmer de la TTR, mitjançant molècules petites, entre elles la nostra molècula líder, el Iododiflunisal (IDIF), jugava un rol important en la patogènesi de l'Alzheimer.

Aquesta tesi doctoral s'emmarca en un projecte multidisciplinari de **descobriment de fàrmacs pel Alzheimer**, finançat per la Fundació la Marató de TV3, l'objectiu principal del qual era identificar nous estabilitzadors de la TTR que a l'igual que l'IDIF potenciessin la interacció entre la TTR i els pèptids amiloïdes Abeta (A β).

Els objectius específics són:

- a) Optimitzar la producció de proteïna recombinant humana TTR per obtenir quantitats suficients per estudis de cribratge d'alt rendiment de molècules petites.
- b) Investigar les bases estructurals de les interaccions entre la TTR i diferents pèptids amiloïdes, utilitzant diverses molècules que estabilitzen la TTR.
- c) El disseny d'un assaig *in vitro* pel cribratge d'alt rendiment (HTS, *High Throughput Screening*) de molècules petites, com a potencials xaperones de la interacció TTR/A β .
- d) El descobriment de noves xaperones de la interacció TTR/A β com a potencials candidats a fàrmacs

En aquesta tesi s'ha optimitzat la producció de la proteïna humana recombinant TTR, a gran escala (>600 mg), per al seu posterior ús en estudis estructurals i en assaigs de cribratge de molècules. Mitjançant la tècnica de calorimetria de valoració isotèrmica (ITC), s'ha confirmat la base estructural de la interacció binaria de la TTR amb el pèptid amiloïde A β (1-42) i de l'efecte estabilitzador de IDIF en aquesta interacció. S'ha dissenyat i validat un assaig de cribratge d'alt rendiment (HTS), basat en una tècnica turbidimètrica, i que utilitza el pèptid curt A β (12-28). Estudis complementaris (assaigs de fluorescència de Tioflavina T i estudis d'ITC) han corroborat aquesta validació. Amb aquest assaig s'ha realitzat el cribratge *in vitro* de 53 molècules (*experimental hits*) proposades per altres grups del nostre consorci. S'ha obtingut una llista prioritizada de compostos. Mitjançant una combinació d'assaigs de fluorescència de Tioflavina T i estudis de calorimetria s'ha corroborat la selecció d'aquestes xaperones. Entre les millors xaperones s'hi troben: la nostra molècula IDIF, que és una molècula en fase de descobriment; el producte natural luteolina, que és un fàrmac investigacional en fase clínica; i tres fàrmacs registrats per altres malalties, el sulindac, la olsalazina i el àcid flufenàmic, fàrmacs que poden ser directament reposicionats pel seu ús en fases clíniques per a la malaltia de Alzheimer. S'espera que els estudis *in vivo* en ratolins transgènics models de la malaltia d'Alzheimer permetin en un futur validar la transtiretina com diana terapèutica pel tractament de l'Alzheimer.

ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

Esta tesis doctoral está formada por un compendio de 6 publicaciones.

Para comprender la importancia de este trabajo de tesis se recoge información actualizada en la que describe el estado del arte en la [Introducción](#). A continuación, se presenta el [Contexto de esta tesis](#), la finalidad de este trabajo y se definen los [Objetivos](#).

El capítulo [Resultados](#) se divide en 6 secciones, una por publicación. Todos los artículos han sido publicados a excepción del cuarto que está en proceso de aceptación en una revista internacional de alto índice de impacto.

Tabla 1. Publicaciones derivadas de la tesis

Descubrimiento de fármacos para la enfermedad de Alzheimer: chaperonas de la interacción TTR/A β		
1	Cotrina et al	Preparative scale production of recombinant human transthyretin for biophysical studies of protein-ligand and protein-protein interactions. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2020 , 21(24), 9640. DOI: 10.3390/ijms21249640.
2	Cotrina et al	Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between Transthyretin, A β Peptides, and Small-Molecule Chaperones toward an Alternative Strategy for Alzheimer's Disease Drug Discovery. <i>J. Med. Chem.</i> 2020 , 63(6), 3205-3214. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01970.
3	Cotrina et al	An assay for screening potential drug candidates for Alzheimer's disease that act as chaperons of the transthyretin and amyloid- β peptides interaction. <i>Chemistry</i> 2020 . DOI: 10.1002/chem.202002933.
4	Cotrina et al	Targeting transthyretin in Alzheimer's disease: drug discovery of small-molecule chaperones as disease-modifying drug candidates for Alzheimer's disease (enviado para su publicación) 2021 .
Descubrimiento de nuevos estabilizadores de la TTR		
5	Cotrina et al	Repurposing benzboromarone for Familial Amyloid Polyneuropathy: a new transthyretin tetramer stabilizer. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2020 , 21(19), 7166. DOI: 10.3390/ijms21197166
6	Cotrina et al	Optimization of Kinetic Stabilizers of Tetrameric Transthyretin: A Prospective Ligand Efficiency-guided Approach. <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 2020 , 28(23), 115794. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115794

Cada publicación va acompañada de su correspondiente [Información suplementaria](#) ([Supporting Information](#)) a excepción de las publicaciones 1 y 4.

Después de las publicaciones se presenta una [Discusión](#) en la que se tratan los resultados de forma global y tras este apartado, se presentan las [Conclusiones](#) más relevantes. Y finalmente el apartado de [Bibliografía](#).

La memoria también integra dos [Anexos](#).

[ANEXO I:](#) Supporting information

Descubrimiento de fármacos para la enfermedad de Alzheimer: chaperonas de la interacción TTR/A β Supporting information de:		
2	Cotrina et al	Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between Transthyretin, A β Peptides, and Small-Molecule Chaperones toward an Alternative Strategy for Alzheimer's Disease Drug Discovery. <i>J. Med. Chem.</i> 2020 , 63(6), 3205-3214. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01970.
3	Cotrina et al	An assay for screening potential drug candidates for Alzheimer's disease that act as chaperons of the transthyretin and amyloid- β peptides interaction. <i>Chemistry</i> 2020 . DOI: 10.1002/chem.202002933.
Descubrimiento de nuevos estabilizadores de la TTR Supporting information de:		
5	Cotrina et al	Repurposing benzboronate for Familial Amyloid Polyneuropathy: a new transthyretin tetramer stabilizer. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2020 , 21(19), 7166. DOI: 10.3390/ijms21197166
6	Cotrina et al	Optimization of Kinetic Stabilizers of Tetrameric Transthyretin: A Prospective Ligand Efficiency-guided Approach. <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 2020 , 28(23), 115794. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115794

[ANEXO II:](#)

en el que se recogen las siguientes publicaciones en las que aparece [EY Cotrina](#) como autor. Los artículos A1 a A4 han sido publicados durante el plan de investigación de esta tesis doctoral.

A1	Gimeno, A., Santos, L.M., Alemi, M., Rivas, J., Blasi, D., Cotrina, E.Y. , Llop, J., Valencia, G., Cardoso, I., Quintana, J., Arsequell, G., Jiménez-Barbero, J. Insights on the Interaction between Transthyretin and A β in Solution. A Saturation Transfer Difference (STD) NMR Analysis of the Role of Iododiflunisal. <i>J. Med. Chem.</i> 2017 , 60(13), 5749-5758. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00428.
----	--

A2	Giao, T., Saavedra, J., Cotrina, E. , Quintana, J., Llop, J., Arsequell, G., Cardoso, I. Undiscovered Roles for Transthyretin: From a Transporter Protein to a New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> , 2020 . 21(6), pii:E2075. DOI: 10.3390/ijms21062075.
A3	Rios, X., Gómez-Vallejo, V., Martín, A., Cossío, U., Morcillo, M.Á., Alemi, M., Cardoso, I., Quintana, J., Jiménez-Barbero, J., Cotrina, E. Y. , Valencia, G., Arsequell, G., Llop, J. Radiochemical examination of transthyretin (TTR) brain penetration assisted by iododiflunisal, a TTR tetramer stabilizer and a new candidate drug for AD. <i>Sci. Rep.</i> 2019 , 9 (1), 13672. DOI: 10.1038/s41598-019-50071-w
A4	Rejc, L; Gómez-Vallejo, V.; Rios, X.; Cossio, U.; Baz, Z.; Mujica, E.; Gião, T.; Cotrina, E.Y. ; Jiménez-Barbero, J.; Quintana, J; Arsequell, G.; Cardoso, I.; Llop, J. Oral treatment with iododiflunisal delays beta amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer Disease: a Longitudinal in vivo molecular imaging study. <i>J. Alzheimer's Dis.</i> 2020 (Pub Date : 2020-08-10). Dol: 10.21203/rs.2.23011/v1.

ÍNDICE:

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. La enfermedad de Alzheimer (EA)	17
1.1. Antecedentes/Historia	17
1.2. Genética de la EA	18
1.3. Patofisiología de la Enfermedad de Alzheimer: etapas	19
1.4. Avances en la detección precoz: biomarcadores	21
1.5. Hipótesis de la enfermedad de Alzheimer	23
Hipótesis de la cascada amiloide	24
Producción de A β	25
1.6. Características estructurales de A β	27
1.7. Mecanismo de agregación de A β	29
2. Estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	32
2.1. Ensayos dirigidos a A β como diana	34
Moléculas pequeñas: inhibidores de β - y γ -secretasas, moduladores de las γ -secretasas	34
Moléculas pequeñas inhibidoras de la agregación de A β	36
Inmunoterapia sobre A β	36
Mecanismo de eliminación (<i>cle</i> <i>r</i> <i>nce</i>) de A β (catabolismo de A β)	38
Proteínas que unen el péptido A β	39
La proteína albúmina (HSA) en la enfermedad de Alzheimer	40
3. La proteína transtiretina en la enfermedad de Alzheimer	43
3.1. Transtiretina síntesis, estructura y función	43
3.2. Estabilización de la transtiretina. Amiloidosis por transtiretina	45
3.3. Transtiretina y su papel en la enfermedad de Alzheimer	49
3.4. Estudios de la interacción TTR/A β <i>in vitro</i>	52
3.5. Mecanismo de interacción de la TTR con A β	56
3.6. Estudios en nuestro grupo sobre la interacción TTR-A β y su relación con la enfermedad de Alzheimer	59
<i>M</i> <i>rcio de tr</i> <i>o</i>	62
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	67

CAPÍTULO 3. RESULTADOS	71
Descubrimiento de fármacos para la enfermedad de Alzheimer: chaperonas de la interacción TTR/Aβ	
Artículo 1:	71
Preparative scale production of recombinant human transthyretin for biophysical studies of protein-ligand and protein-protein interactions	
Referencia: <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2020 , 21(24), 9640.	
Artículo 2:	85
Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between Transthyretin, A β Peptides, and Small-Molecule Chaperones toward an Alternative Strategy for Alzheimer's Disease Drug Discovery	
Referencia: <i>J. Med. Chem.</i> 2020 , 63(6), 3205-3214.	
Artículo 3:	98
An assay for screening potential drug candidates for Alzheimer's disease that act as chaperons of the transthyretin and amyloid- β peptides interaction	
Referencia: <i>Chemistry</i> 2020 , 26(72), 17462-17469.	
Artículo 4:	108
Targeting transthyretin in Alzheimer's disease: drug discovery of small-molecule chaperones as disease-modifying drug candidates for Alzheimer's disease	
Confidencial: Enviado para publicar	
Descubrimiento de nuevos estabilizadores de la TTR	
Artículo 5:	123
Repurposing benz bromarone for Familial Amyloid Polyneuropathy: a new transthyretin tetramer stabilizer	
Referencia: <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2020 , 21(19), 7166.	
Artículo 6:	141
Optimization of Kinetic Stabilizers of Tetrameric Transthyretin: A Prospective Ligand Efficiency-guided Approach	
Referencia: <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 2020 , 28(23), 115794.	
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	151
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	216
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFIA	222
ANEXOS	243

INTRODUCCION

1. La enfermedad de Alzheimer (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia en personas mayores de 65 años. Los cerebros de pacientes de Alzheimer se caracterizan por la presencia de agregados amiloides A β en diferentes conformaciones, de inclusiones intraneuronales de proteína tau fosforilada (p-Tau), la disfunción sináptica y la pérdida neuronal. Los pacientes con la EA presentan un deterioro progresivo de las funciones cognitivas, como la pérdida de memoria y el aprendizaje, desorientación en tiempo y espacio, un cuadro complejo que conduce a la muerte del paciente. Se cree que la enfermedad empieza a desarrollarse aproximadamente 15 a 25 años antes de su sintomatología. Sin embargo, el diagnóstico en la mayoría de los pacientes se da por la presencia de los síntomas, a causa del daño o muerte neuronal. Las características de la EA hacen del paciente una persona totalmente dependiente de sus cuidadores, lo que representa un alto coste social y económico (Alzheimer's Association Report, 2020; Niu, Álvarez-Álvarez, Guillén-Grima, & Aguinaga-Ontoso, 2017).

En 2018, la organización *Alzheimer's Disease International* (<https://www.alzint.org/>) estimó que la prevalencia de la EA era de 50 millones en el mundo y que esta prevalencia se triplicaría en 2050, perteneciendo dos tercios de la población a países con ingresos bajos y medios (Scheltens et al., 2021). La prevalencia en Europa se prevé que se doblará hacia el 2050 ya que aproximadamente cada 3 segundos se describe un nuevo caso de demencia en el mundo. Estos datos sugieren que ésta es una de las enfermedades de mayor impacto. La ausencia de tratamientos efectivos junto al aumento de la esperanza de vida, hace que sea una de las enfermedades más devastadoras en el presente (Cummings, Lee, Ritter, Sabbagh, & Zhong, 2020; Gulisano et al., 2018; Wimo et al., 2017; Wisniewski & Goñi, 2014).

1.1. Antecedentes/Historia

En 1906 el psiquiatra y neuropatólogo Alois Alzheimer, en una conferencia titulada “On a peculiar disease of the cerebral cortex” presentó los resultados anatómicos e histológicos del cerebro de la paciente Augustine D., fallecida tras padecer una grave demencia (Dahm, 2006). Además de la atrofia que presentaba el cerebro, Alzheimer y sus colegas observaron la presencia de unas fibras gruesas teñidas en las neuronas y depósitos de una sustancia,

entonces no identificada, en forma de placas en el córtex cerebral. El cerebro de Augustine presentaba lo que hoy se consideran las características histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer, pero en aquel momento era una nueva patología no descrita anteriormente (Figura 1) (Hippius & Neundörffer, 2003; Möller & Graeber, 1998; Stelzmann, Schnitzlein, & Murtagh, 1995).

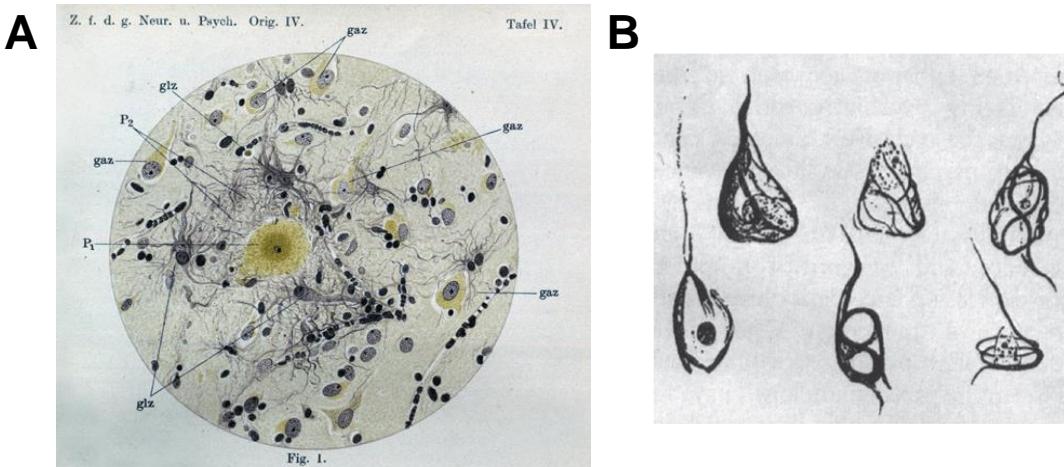


Figura 1. A) Ilustración realizada por Alois Alzheimer en la que se muestran los ovillos neurofibrilares y las placas amiloideas. Estas imágenes formaban parte del artículo en el que Alzheimer describía los casos de Augustine D. y de Johann F. B) Dibujos originales de Alois Alzheimer de los ovillos neurofibrilares (Grøntvedt et al., 2018).

Sin embargo, no fue hasta 1984, cuando se aislaron las placas ubicadas en el espacio extracelular ricas en estructura de hoja- β y se describió la composición como depósitos de péptidos denominados β -amiloideos ($A\beta$) (Glenner & Wong, 1984). Más adelante, en 1986, se identificó que la forma hiperfosforilada de la proteína Tau (h-Tau) era el componente principal de los ovillos neurofibrilares (Ihara, Nukina, Miura, & Ogawara, 1986).

1.2. Genética de la EA

Existen dos variantes principales de la EA:

- Esporádica o de aparición tardía. Representa más del 99 % de todos los casos, sus síntomas se manifiestan en edades avanzadas entre 65 y 85 años y aunque es considerada una enfermedad de causa multifactorial, aproximadamente en un 40 % de los casos tienen un factor genético vinculado a mutaciones en el alelo $\epsilon 4$ de la

apolipoproteína E (ApoE), que incrementa entre 3 y 4 veces el factor de riesgo de desarrollar la EA (Baranello et al., 2015; Jiang et al., 2008; Luo et al., 2016; Piaceri, Nacmias, & Sorbi, 2013). Estudios recientes muestran que además del polimorfismo ApoE existen otros alelos de riesgo, aunque con contribuciones menores al de ApoE.

- **Familiar o de aparición temprana:** Supone al menos el 1% de todos los casos. Se manifiesta en personas menores de 65 años, es hereditaria y de sintomatología severa. Su origen está asociado principalmente a mutaciones presentes en los genes que codifican para la proteína precursora amiloide, (APP, *amyloid precursor protein*) o las proteínas presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2), involucradas en la síntesis y proceso de A β . Por lo cual, la modificación en su rol a causa de las mutaciones, tienen un impacto sobre el incremento del nivel de A β en el cerebro lo que potencia su agregación (Duff et al., 1996; Selkoe, 1991; Waring & Rosenberg, 2008).

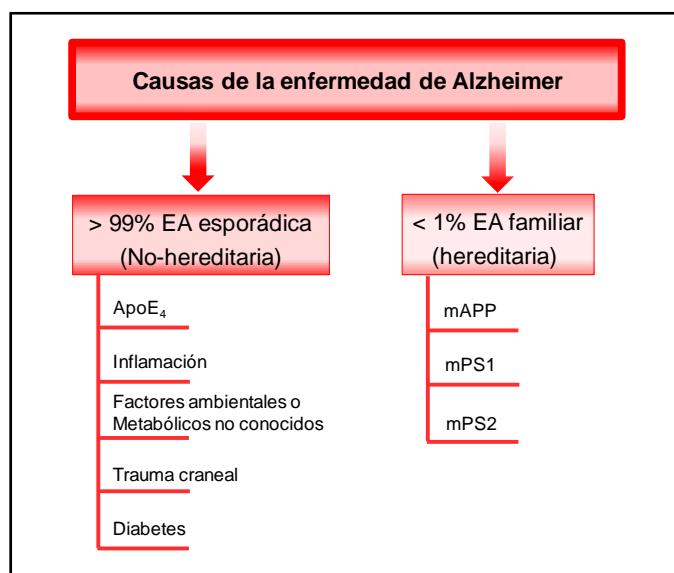


Figura 2. Genética de la enfermedad de Alzheimer.

Esquema de las principales causas de la EA, donde mAPP son mutaciones en el gen APP, mPS1 y 2 mutaciones en el gen PSEN1 y 2, ApoE4 mutaciones de la apolipoproteína alelo 4. (Adaptado de Iqbal & Grundke-Iqbal, 2010).

1.3. Patofisiología de la Enfermedad de Alzheimer: etapas

El diagnóstico de la EA en tiempos de Alois Alzheimer (1864-1915) era totalmente patológico y en 1984 pasó a ser exclusivamente clínico. El diagnóstico actual se basa en

una aproximación que combina datos clínicos y biológicos, gracias al desarrollo de biomarcadores de la enfermedad.

El desarrollo de nuevas técnicas en los últimos años para lograr un diagnóstico más específico y en estadios tempranos de la EA, constituye una importante área de investigación, debido a que de ello depende la intervención sobre la enfermedad en estadios donde las terapias modificadoras pueden ser más efectivas (Buell et al., 2011; A. D. Cohen & Klunk, 2014).

El proceso de la EA, llamado *AD continuum*, abarca un periodo largo entre 15 y 25 años.

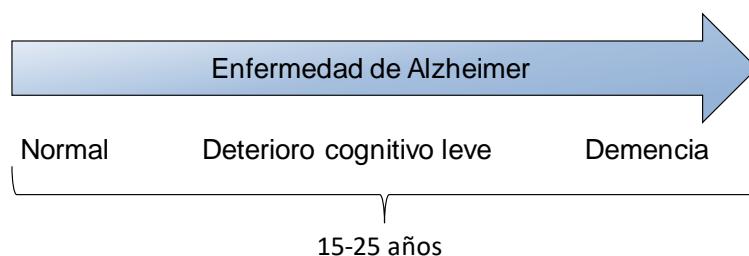


Figura 3. Etapas en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer. Adaptado de (Scheltens et al., 2021).

En este proceso se distinguen varias etapas:

- La etapa preclínica, es un estadio en donde no se presentan síntomas. Con el uso de nuevas herramientas tecnológicas se puede hacer una aproximación a un diagnóstico. Entre ellas destacan: la resonancia magnética que detecta cambios estructurales en la corteza cerebral y el hipocampo; la tomografía por emisión de positrones (PET) que permite identificar depósitos amiloides utilizando compuestos específicos de unión al péptido A β (1-42); la punción lumbar para determinar los niveles del péptido A β (1-42) y elevación de los niveles de la proteína tau hiperfosforilada en líquido cefalorraquídeo (CSF) (Mattsson et al., 2014). Además, en esta etapa se pueden considerar individuos con antecedentes de la EA familiar (mutaciones asociadas a la APP, PS1 y PS2) o mutaciones asociadas a la ApoE4.
- La etapa prodrómica o de deterioro cognitivo leve (*MCI, mild cognitive impairment*). En este estadio se presentan los primeros síntomas, como la pérdida de memoria episódica, cambios de humor, así como dificultad en las habilidades para prestar

atención y razonar. Las características de los síntomas en esta etapa no afectan la vida cotidiana del paciente.

- La etapa de demencia está caracterizada por la pérdida de memoria severa, así como problemas para sobrellevar las actividades de la vida cotidiana.

1.4. Avances en la detección precoz: biomarcadores

Los biomarcadores son una fuente de información importante, que permiten medir y evaluar procesos asociados a una enfermedad, diferenciando un desarrollo normal de un proceso patológico. Asimismo, permiten tanto el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento como también la evaluación de la respuesta biológica a estas estrategias (Jeffrey Cummings, 2017; Marrugo-Ramírez, Rodríguez-Núñez, Marco, Mir, & Samitier, 2021; Zetterberg & Bendlin, 2021).

La definición biológica de la EA se realiza mediante el uso de los biomarcadores ATN (A: amiloide; T: tau; N: neurodegeneración) que se describen a continuación (Figura 4).

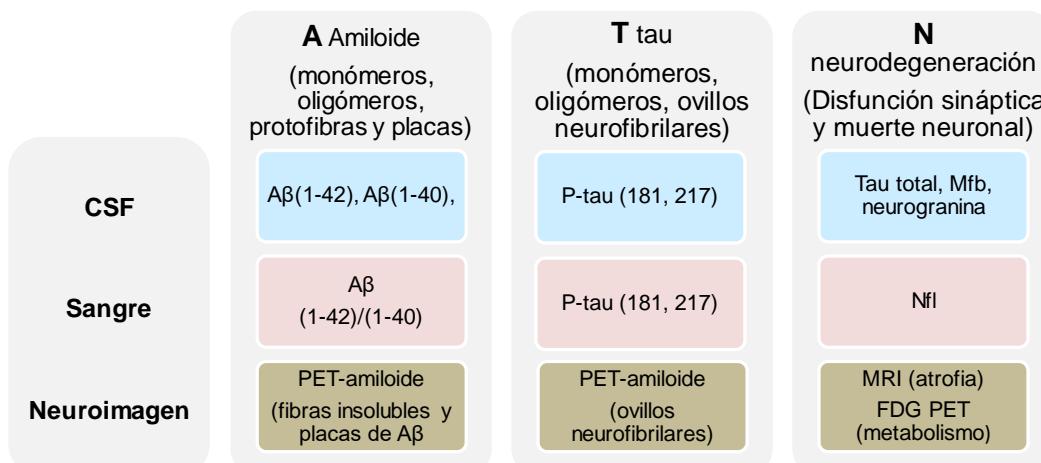


Figura 4. Biomarcadores A/T/N para el diagnóstico de la EA.

Un aspecto substancial en el diagnóstico de la EA ha sido la **identificación de biomarcadores**, asociados específicamente a la neurodegeneración, que contribuyan a un correcto diagnóstico de la EA. También han sido clave el uso de nuevas técnicas altamente sensibles de imagen, tales como la fMRI y la PET; que determinan la etapa preclínica o presintomática asociada a la EA y que además, pueden aportar información a los estudios

clínicos en la evaluación de un nuevo tratamiento contra la EA (Buell et al., 2011; Marrugo-Ramírez et al., 2021).

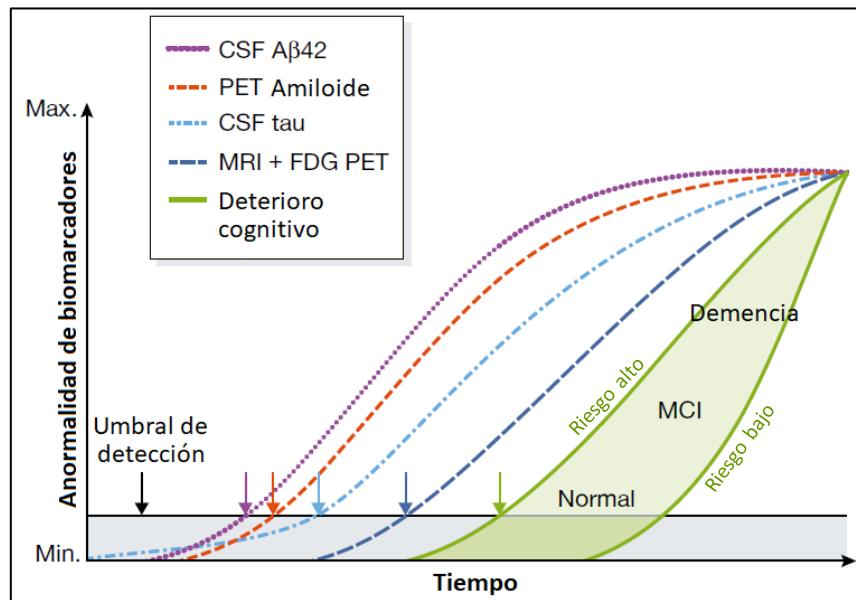


Figura 5. Biomarcadores asociados a los cambios fisiopatológicos de la EA
Modelo hipotético de los biomarcadores presentes en el tiempo que se pueden asociar a los estadios de desarrollo de la EA. (Adaptada de (Jeffrey Cummings, 2017)).

Los biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo (CSF) son el péptido A β (1-42), el A β (1-40), la proteína tau fosforilada 181 y la proteína tau total. Otros potenciales biomarcadores en estudio son las proteínas: neurogranina (Ng), SNAP25, las sinaptotagminas (Syt) y la proteína VLP1, siendo la neurogranina el biomarcador más prometedor de este grupo.

Los biomarcadores en sangre representan una alternativa con grandes ventajas, entre ellas la disponibilidad de muestras por medios menos invasivos y en mayor volumen, lo que representa un gran impacto en la reducción de costes. Algunos ejemplos son la proteína tau fosforilada 181 y 217.

1.5. Hipótesis de la enfermedad de Alzheimer

La naturaleza multifactorial de la EA ha hecho que se formularan diversas hipótesis, en base a los cambios moleculares y patofisiológicos que se observan en el cerebro de los pacientes de Alzheimer, desde su inicio y durante su progreso (Figura 6).

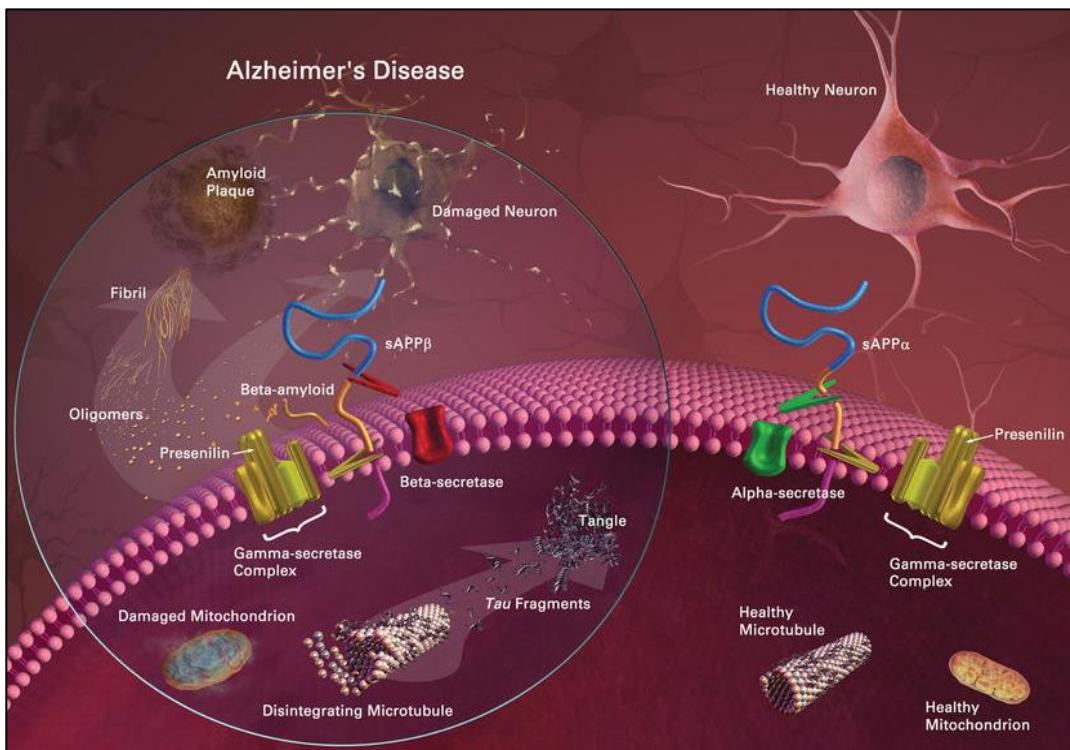


Figura 6. Principales procesos patológicos asociados a la EA.

Representación de los principales procesos que ocurren en la EA que dirigen la muerte neuronal: el proceso amiloïdogénico de A β , disfunción mitocondrial y la formación de los ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada (lado izquierdo). El proceso neurobiológico en individuos sanos (lado derecho). (Imagen de *the National Institute on Aging* (<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers>)).

Entre las distintas hipótesis que se han formulado se encuentran: la colinérgica, la cascada amiloide, la propagación de tau, la cascada mitocondrial, la homeostasis de calcio, la neurovascular, la inflamatoria, la de los iones metálicos y la del sistema linfático. En la Figura 7, se muestra el porcentaje de cada una de las estrategias que llegaron a fase clínica 3 hasta el año 2019. Se observa que es la amiloide la que ha prevalecido durante más años desde su propuesta (P. P. Liu, Xie, Meng, & Kang, 2019).

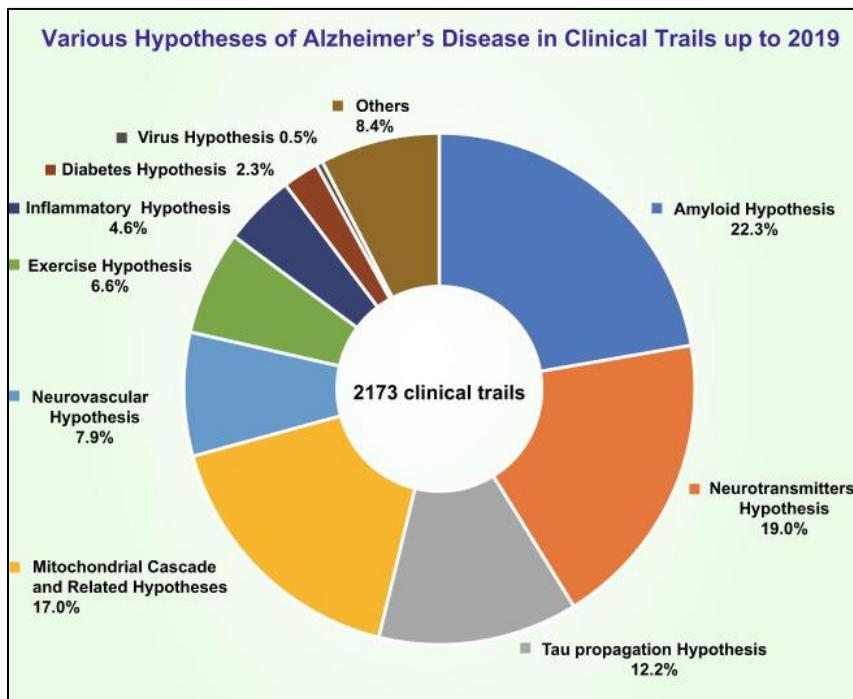


Figura 7. Ensayos clínicos realizados hasta el año 2019 clasificados según las diferentes hipótesis. (P. P. Liu et al., 2019).

La hipótesis de la cascada amiloide: propuesta en 1991 por John Hardy y David Allsop postula que la formación de depósitos de A β en el cerebro es la causa de la neurodegeneración. Fue explicada en una revisión de Hardy y Selkoe en 2002 y revisada 12 años más tarde por los mismos autores (Hardy & Selkoe, 2002; Selkoe & Hardy, 2016). Este proceso desencadena una cascada de procesos que conducen a la disfunción mitocondrial, la hiperfosforilación de la proteína tau, la formación de ovillos neurofibrilares, la disfunción neuronal, un proceso inflamatorio y finalmente la demencia (Figura 8) (Selkoe, 1991; Sorrentino & Bonavita, 2007).

Otras evidencias genéticas asociadas a la cascada amiloide son las mutaciones en la APP y los cofactores que influyen en la actividad enzimática sobre APP. Estudios recientes dirigen su interés sobre A β y las especies formadas en el inicio de su mecanismo de agregación como los oligómeros, especies que han mostrado ser altamente neurotóxicas (Campioni et al., 2010; Chiti & Dobson, 2017; De et al., 2019).

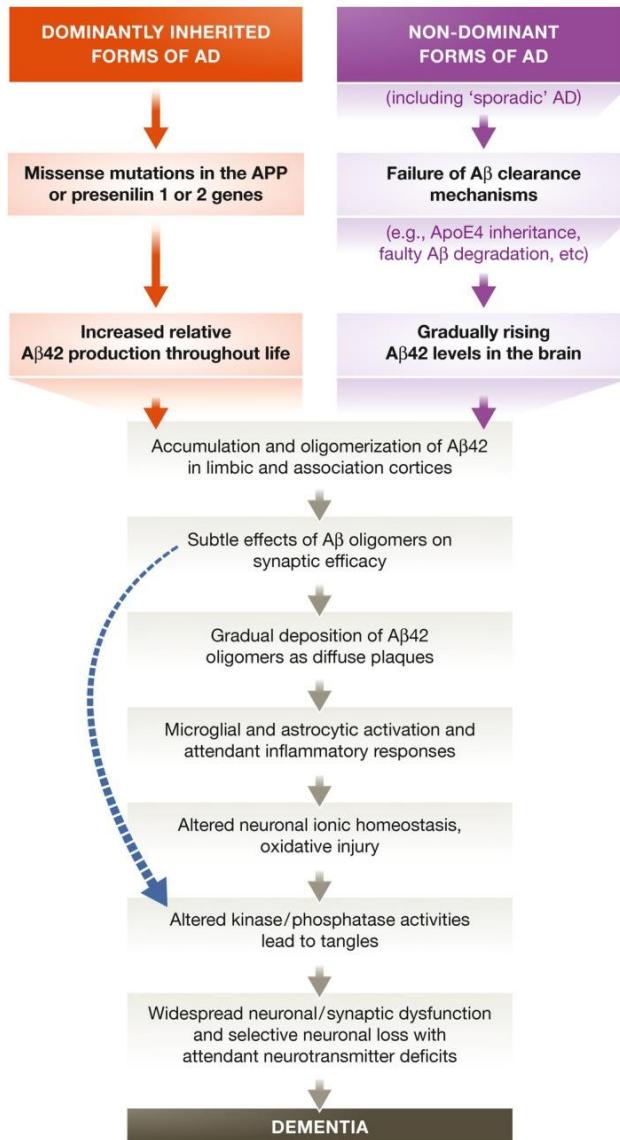


Figura 8. Procesos en la EA de acuerdo a la hipótesis de la cascada amiloide (Selkoe & Hardy, 2016).

Producción de A β

La APP es una proteína transmembrana que, por acción enzimática, sufre un procesamiento proteolítico postranscripcional que origina diferentes fragmentos, de los cuales han sido identificados al menos 10. Estos fragmentos están involucrados en procesos amiloidogénicos y no amiloidogénicos. Las enzimas α - o β -secretasas generan fragmentos largos y solubles (sAPP α y sAPP β), además de fragmentos C-terminales asociados a la membrana (CTFs). En la ruta no amiloidogénica, primero actúa la α -secretasa y después la γ -secretasa y no se producen secuencias de A β insolubles; mientras

que en la ruta amiloidogénica, la APP es hidrolizada primero por una β -secretasa y después con la γ -secretasa, lo que da lugar a secuencias insolubles de A β (Haass, Kaether, Thinakaran, & Sisodia, 2012) (Figura 9).

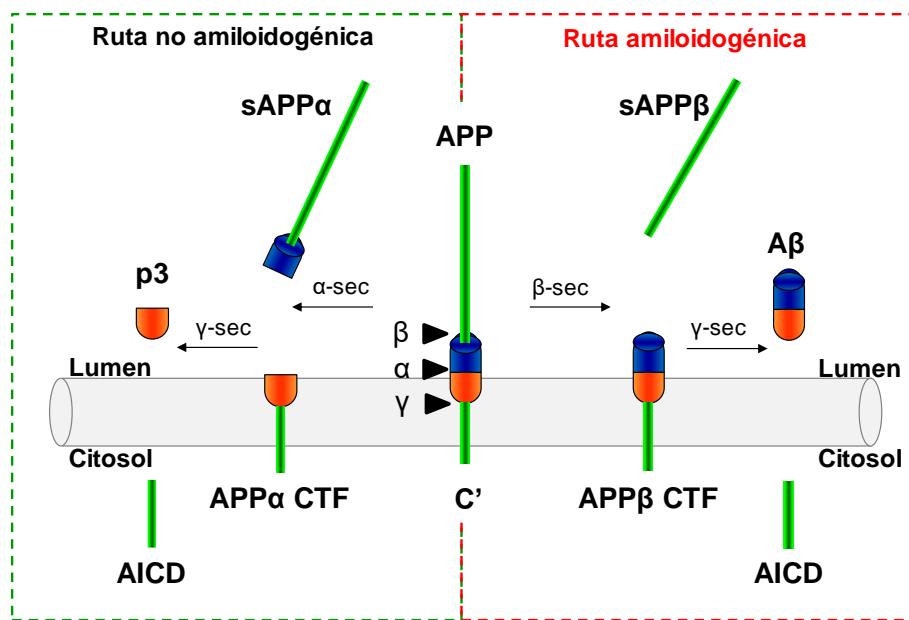


Figura 9. Procesamiento proteolítico de APP.

Esquema que describe las rutas no amiloidogénica y amiloidogénica. Adaptado de Haass et al., 2012.

La β -secretasa escinde APP en el péptido β -amiloide de 4 kDa y se generan fragmentos solubles llamados sAPP β , así como un fragmento de 99 aminoácidos (C99 o APP β CTF). En un segundo paso, la γ -secretasa escinde el fragmento C99 en diferentes puntos, dando lugar a secuencias de A β de diferentes longitudes entre 37 y 43 aminoácidos (Dobrowolska Zakaria & Vassar, 2021; Karran, Mercken, & Strooper, 2011; Nunan & Small, 2000). Estos péptidos, en especial el A β 42 son muy amiloidogénicos. Sufren plegamientos para formar estructuras de lámina- β e interacciones hidrofóbicas, dando lugar a una población de distintas especies, tales como oligómeros tóxicos, protofibras, fibras y placas seniles en regiones extracelulares del cerebro.

La principal especie aislada de CSF y de cultivos celulares es A β (1-40). Sin embargo, es la secuencia A β (1-42), la que a pesar de encontrarse en niveles hasta 10 veces más bajos que A β (1-40), tiene mayor interés debido a su fuerte relación con la EA familiar, en la cual se observa que mutaciones en el gen APP, PS1 y PS2 incrementan la concentración

extracelular de A β (1-42), promoviendo la formación de depósitos asociados a la patogénesis de la EA (Kuperstein et al., 2010; Scheuner et al., 1996).

Se ha encontrado que los oligómeros de A β (1-42), formas solubles de A β (1-42), son especies altamente tóxicas para las neuronas en concentraciones nanomolar (Klein, Krafft, & Finch, 2001; Lambert et al., 1998; Murphy & LeVine III, 2010; Shankar et al., 2008). Durante los últimos años, se han ido incrementando las evidencias que indican que las especies oligoméricas son más tóxicas que las fibras maduras. Estas especies están asociadas a estadios tempranos de la enfermedad y por lo tanto, son una posible diana en el desarrollo de terapias contra la EA (Benilova, Karran, & De Strooper, 2012; Chiti & Dobson, 2017).

1.6. Características estructurales de A β

El monómero de A β no presenta una conformación estable, es decir no tiene una conformación terciaria compacta, lo que dificulta su cristalización por métodos convencionales. La estructura tridimensional de diferentes fragmentos del péptido A β se ha determinado gracias a la aplicación de técnicas como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), la cristalografía de rayos X y a técnicas computacionales como la dinámica molecular (MD, *molecular dynamics*) (Meng et al., 2018), siendo la mayor fuente de conocimiento estructural de A β , los estudios de RMN y de MD (Chen et al., 2017).

Los primeros modelos estructurales de A β fueron propuestos tras un análisis por RMN, distancia geométrica y MD, en este análisis se utilizó la secuencia A β (1-28) en un medio tipo-membrana a pH 3, los resultados señalaron que esta secuencia se pliega en una estructura predominante de hélice α , con un giro pronunciado en el residuo 12, conformación que postulan precede a la lámina β , estructura asociada al potencial amiloidogénico de A β (Talafo, Marcinowski, Klopman, & Zagorski, 1994). Posteriormente, la secuencia A β (1-40) se analizó mediante RMN bajo condiciones similares a las descritas previamente y a pH 5.1. Los resultados mostraron que el extremo *N*-terminal (residuos 1-14) como una región desestructurada. Sin embargo, el resto de la secuencia (residuos 15-36) adoptan una conformación hélice α , con una zona de pliegue o bisagra entre los residuos 25-27. Además, en este análisis se describió un cambio conformacional dependiente del pH, el cual indica que a un pH mayor (pH≈6), se promueve la conformación

de lámina β , un estadio que precede a su agregación (Coles, Bicknell, Watson, Fairlie, & Craik, 1998).

Numerosos esfuerzos se invirtieron para conseguir un medio para el análisis del péptido A β (1-42) por RMN. Finalmente, se logró en un medio acuoso con alcoholes fluorados. El resultado señaló que existen dos regiones de conformación hélice α entre los residuos 8-25 y 28-38 (Crescenzi et al., 2002). A partir de los resultados por RMN, en el banco de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) están depositadas las estructuras con los códigos 1IYT (en entorno apolar) (Crescenzi et al., 2002) y 1Z0Q (en solución acuosa) (Tomaselli et al., 2006).

El desarrollo de un estudio que combina la técnica de RMN como referencia para la validación de un análisis de MD, define el extremo C-terminal del péptido A β (1-42) más estructurado que el péptido A β (1-40). Además se describe una estructura horquilla- β entre los residuos 31-34 y 38-41, que reduce la flexibilidad en el extremo C-terminal del péptido A β (1-42) y sugiere que podría ser responsable de su mayor propensión a la agregación (Sgourakis, Yan, McCallum, Wang, & Garcia, 2007). Estos resultados han sido corroborados por estudios posteriores (Wälti et al., 2016).

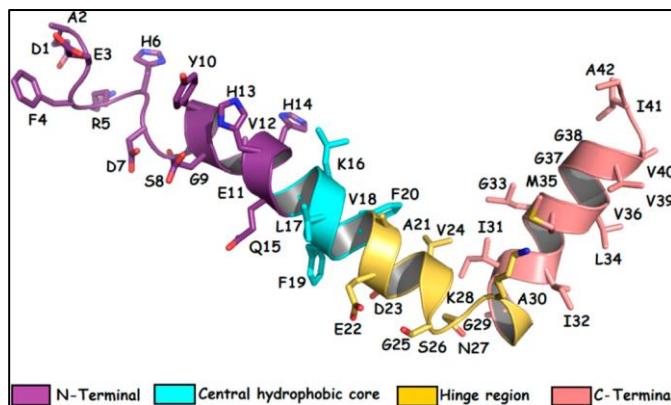


Figura 10. Representación de las regiones de la secuencia del péptido A β (1-42) (Goyal, Shuaib, Mann, & Goyal, 2017)

1.7. Mecanismos de agregación de A β

La síntesis de algunas proteínas y péptidos, incluso en condiciones fisiológicas normales, no siempre garantizan un plegamiento globular total. Este proceso puede pasar por diferentes estadios de plegamiento parcial y es durante estos procesos que se da lugar a conformaciones alternativas no nativas, que conducen a la formación de agregados. Estos agregados pueden tener conformaciones amorfas o altamente organizadas denominadas amiloides.

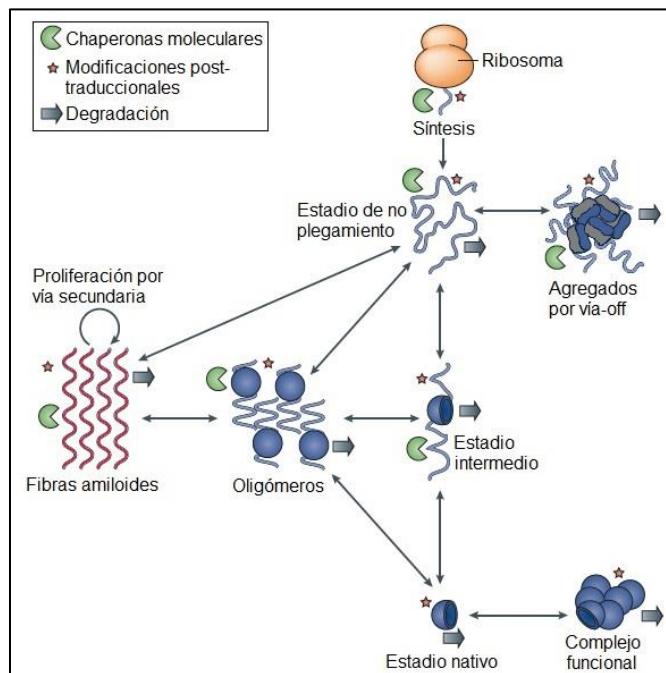


Figura 11. Múltiples poblaciones de una proteína o péptido amiloide. ((Knowles, Vendruscolo, & Dobson, 2014)

En términos energéticos, se describe que el estado nativo de una proteína es termodinámicamente estable, si su energía libre (ΔG) es más baja que la de un estado amiloide. El paso a una conformación amiloide se da, si esta tiene una energía libre (ΔG) más baja que el estado nativo (Knowles et al., 2014). Teniendo en cuenta este concepto, el mecanismo de agregación de A β es un proceso complejo, debido a que la conversión de monómeros de A β solubles en fibras, involucra varios procesos con diferentes especies intermedias. Como ya se indicó anteriormente, A β no tiene una conformación nativa estable lo que favorece estadios conformacionales que potencian su agregación. Así pues, la conformación de A β en solución es una estructura aleatoria (*random coil*), formada principalmente de hélice α , la cual sufre una transición a lámina β , en la vía de su proceso patogénico. Este cambio conformacional se ve favorecido por su alta hidrofobicidad dada

por su centro hidrofóbico K16-F20 y la región C-terminal (I31-A42) (Crescenzi et al., 2002; De et al., 2019; Ghanta, Shen, Kiessling, & Murphy, 1996).

En la última década ha surgido un creciente interés en relacionar las medidas macroscópicas con los mecanismos microscópicos de la agregación de proteínas. En este campo son destacables las aportaciones del grupo del Christopher Dobson en Oxford y de Tuomas P. J. Knowles en Cambridge (Arosio, Knowles, & Linse, 2015; S. I. A. Cohen, Vendruscolo, Dobson, & Knowles, 2012; Scheidt et al., 2019; Törnquist et al., 2018).

A nivel macroscópico la cinética de agregación de la A β tiene tres fases principales: una fase de latencia, una exponencial y finalmente una fase estacionaria (Figura 12).

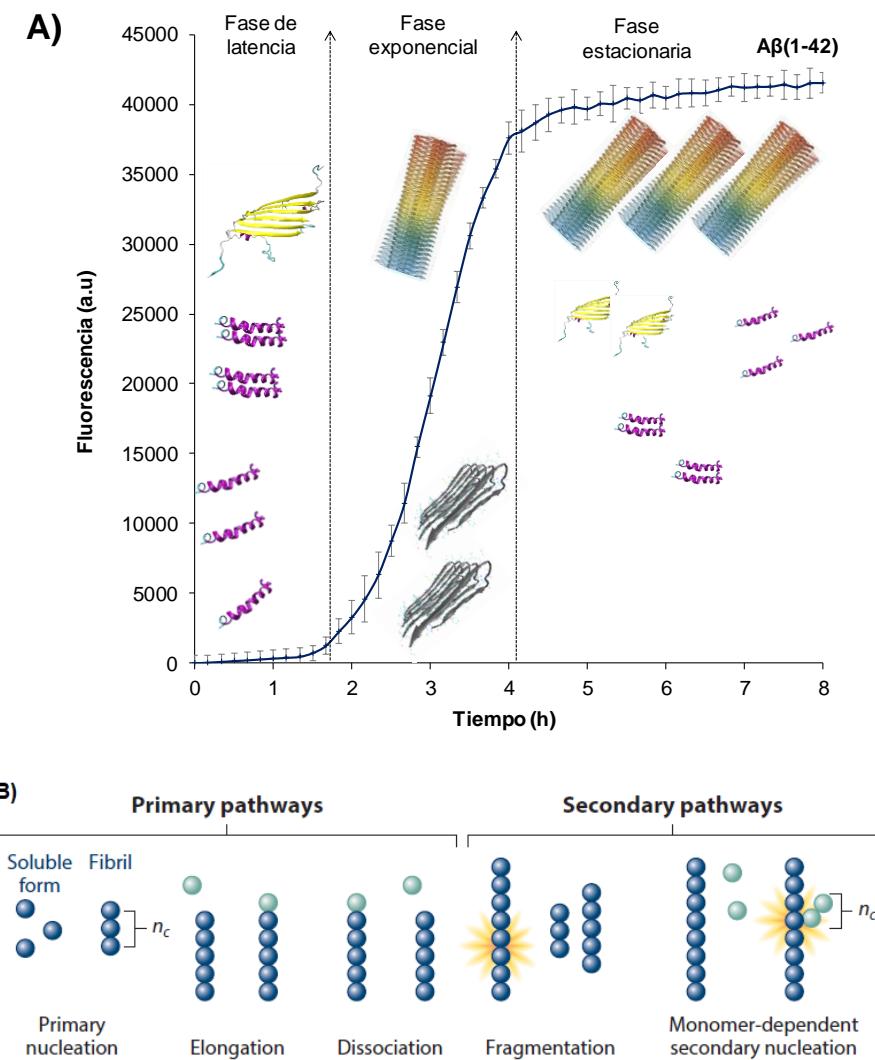


Figura 12. A) Cinética de agregación del péptido $\text{A}\beta(1-42)$. B) El proceso de agregación del péptido $\text{A}\beta$ a nivel microscópico, nucleaciones primaria y secundaria (Chiti & Dobson, 2017).

La primera fase, conocida como la fase de latencia, es dónde tiene lugar la nucleación primaria, el monómero de A β se convierte en un núcleo de crecimiento que da origen a los dímeros, trímeros, pequeños oligómeros de A β , los que durante la segunda fase conformaran agregados amorfos, pre-fibras y fibras amiloides. Este proceso no es único en esta fase, ya que cada paso puede ser reversible y conformar un nuevo proceso (Arosio et al., 2015; Knowles et al., 2014).

La segunda fase, es la exponencial o de crecimiento en al que las especies formadas durante la nucleación primaria crecen y se alargan conformando las pre-fibras y fibras de A β en una vía conocida como *on-pathway*. Estas conformaciones son estructuralmente favorables con un plegamiento en *cross- β* y una orientación de la hoja- β paralela al eje longitudinal de la fibra (Chiti & Dobson, 2017).

En el proceso de agregación de A β , se han descrito dos vías *on* y *off*, las que comprenden diferentes procesos (Dear et al., 2020). En el *on-pathway* dos procesos más destacados son: la asociación de monómeros en núcleos y la formación de pre-fibras. Estos no son los únicos, sino que son parte de una red de pasos microscópicos (Dear et al., 2020; Törnquist et al., 2018). Por otra parte, los núcleos o las especies oligoméricas formadas en la primera fase, no siempre conformaran fibras, sino que pueden coexistir en un equilibrio. La fragmentación, a su vez, también puede generar monómeros que se añaden a las fibras o tener una conformación estructuralmente diferente a la estructura de lámina β en una vía conocida como *off-pathway*, donde los oligómeros y monómeros de A β conforman estructuras desordenadas conocidas como agregados amorfos, que se han descrito como especies no tóxicas de A β (Bemporad & Chiti, 2012).

En las últimas décadas, diferentes estudios, dirigen su interés a los oligómeros de A β , especies de bajo peso molecular, que han demostrado ser las más tóxicas, y no las fibras como se había señalado inicialmente, con la habilidad de desencadenar muerte neuronal (Campioni et al., 2010). Por lo que, conocer en profundidad la vía y los pasos microscópicos que dirigen su formación, aproximan a un desarrollo mejor de estrategias terapéuticas contra la EA (Bemporad & Chiti, 2012; S. I. A. Cohen et al., 2013, 2012; Selkoe & Hardy, 2016).

2. Estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Tras más de cien años de investigación en el desarrollo de diferentes estrategias aún no existe un tratamiento que cure la enfermedad de Alzheimer. El último fármaco contra la EA, la memantina (Namenda), fue aprobado en 2003. Desde 2002 a 2012 se realizaron 413 ensayos clínicos y la tasa de fracaso en el descubrimiento de fármacos en durante esta década fue del 99.6% (J. L. Cummings, Morstorf, & Zhong, 2014).

La magnitud y complejidad del problema hace necesario meditar sobre nuevas estrategias para minimizar el riesgo e incrementar las posibilidades de éxito en programas de desarrollo de fármacos (Jeffrey Cummings, Feldman, & Scheltens, 2019).

Actualmente, solo existen 4 fármacos en el mercado, tres son inhibidores de la acetilcolinesterasa y el cuarto es un antagonista del receptor de glutamato de tipo *N*-metil-*D*-aspartato, (Figura 13) (Kandimalla & Reddy, 2017). Cabe destacar que estos fármacos disponibles contra la EA no detienen la degeneración subyacente de las células cerebrales ni revierten su progresión (Galimberti & Scarpini, 2016; Kang, Diep, Tran, & Cho, 2020; Lopez et al., 2009; Zemek et al., 2014). Estos fármacos son:

- Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI) como el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina, están dirigidos al tratamiento de una EA en estadio leve o moderado, al inhibir la degradación de la acetilcolina (ACh) asociada a la neurotransmisión colinérgica (Hampel et al., 2018).
- Antagonistas del receptor de glutamato de tipo *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA, *N*-metil-*D*-aspartate). (J. Liu, Chang, Song, Li, & Wu, 2019).

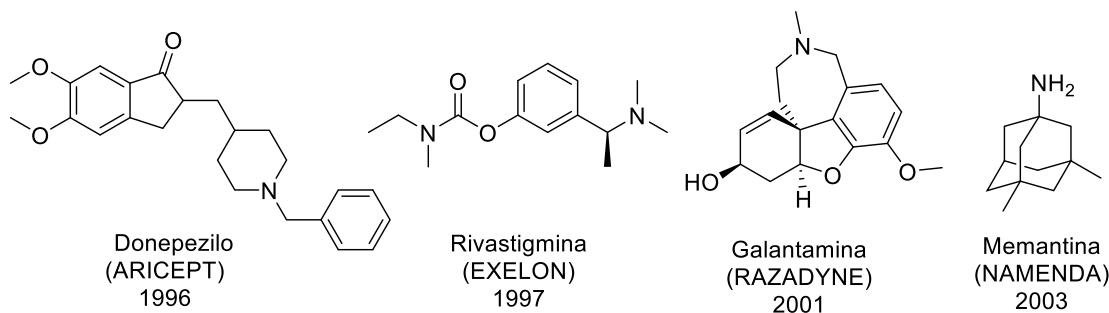
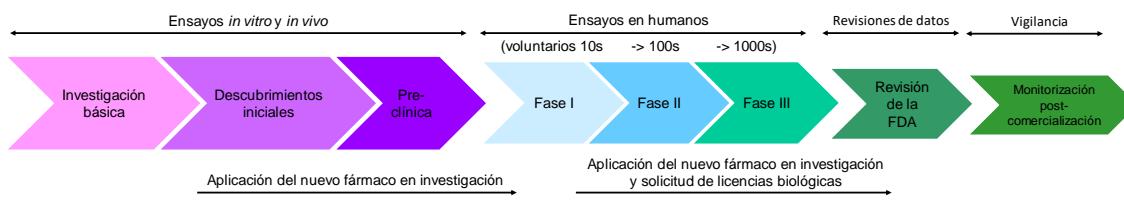


Figura 13. Fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos americana (FDA, *Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la EA (El número indica el año en que fue aprobado el fármaco).

Es urgente encontrar estrategias terapéuticas que provoquen un cambio en la progresión clínica de la enfermedad, interfiriendo en los mecanismos patofisiológicos y por tanto retrasando o previniendo su progresión. Estas terapias se llaman terapias modificadoras de la enfermedad (*Disease-modifying therapies*) (DMTs) (J Cummings & Fox, 2017).

En el proceso de desarrollo de fármacos se distinguen varias etapas, desde la identificación de la diana terapéutica hasta la aprobación del fármaco para su venta (Esquema 1).



Esquema 1. Proceso de desarrollo de un fármaco

Desde el año 2016, Cummings y colaboradores publican anualmente un análisis basado en la información de la base de datos *clinicaltrials.gov* (Jeffrey Cummings, Lee, Mortsdorff, Ritter, & Zhong, 2017; Jeffrey Cummings, Lee, Ritter, & Zhong, 2018; Jeffrey Cummings, Morstorf, & Lee, 2016; Jeffrey Cummings, Lee, Ritter, Sabbagh, & Zhong, 2019; Cummings et al., 2020) que permite visualizar no tan sólo los agentes en ensayos clínicos (fase I, II y III), sino también el interés de las nuevas estrategias.

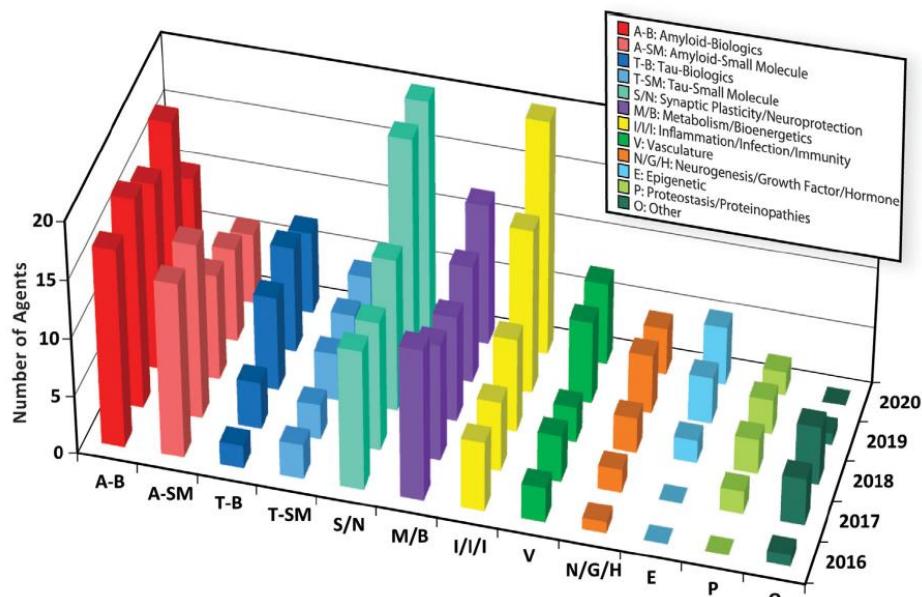


Figura 14. Principales dianas en terapias modificadoras de la EA (DMTs) entre 2016 y 2020 (Cummings et al., 2020).

En los últimos años se ha producido un aumento de tratamientos modificadores de la enfermedad. Además, se observa que existe una gran diversidad de dianas en la línea de descubrimiento de fármacos, que hay un aumento de fármacos de reposicionamiento (fármacos autorizados para otras enfermedades) y que se integran más biomarcadores en los programas de desarrollo de fármacos (Figura 14).

En concreto, en 2020 se han registrado 121 agentes en ensayos clínicos para el tratamiento de la EA. De estos, el grupo más numeroso (97 agentes) es del de agentes para terapias modificadoras de la enfermedad (DMT). Los otros 24 agentes son potenciadores cognitivos y el resto son agentes para tratar los síntomas neuropsiquiátricos. Un análisis más detallado de los estudios clínicos en fase clínica III muestra que hay un total de 29 agentes de los 17, esto es un 59%, son terapias DMTs. Y entre los 17 agentes DMTs 6 tienen como diana terapéutica la A β , esto significa un 34% del total. (Cummings et al., 2020).

El principal objetivo en el desarrollo de nuevas estrategias DMTs es su intervención en estadios tempranos de la AD, es decir, cuando aún no se presentan los síntomas. Se cree que gran parte del fracaso de las terapias anti-amiloïdes, sea debido a la acción tardía de los tratamientos y la falta de conocimiento o detección *in vivo* de la dinámica de la agregación de A β y su toxicidad.

2.1. Ensayos dirigidos a A β como diana

Los ensayos clínicos que se basan en la hipótesis amiloide tienen como agentes:

Moléculas pequeñas: Inhibidores de β - y γ -secretasas, moduladores de las γ -secretasas y moduladores de las α -secretasas

Una de las principales estrategias para prevenir la producción de A β es el desarrollo de fármacos, que sean capaces de cruzar la barrera hematoencefálica e inhiban la producción de A β , actuando sobre las enzimas β - y γ -secretasa, involucradas en el proceso proteolítico de la APP (ruta amiloidogénica). Sin embargo, lograr una especificidad de la acción de estas enzimas es muy difícil, debido a que también actúan sobre otros sustratos involucrados en procesos de maduración neuronal y de gran importancia a nivel celular.

La BACE1 (β -site APP-cleaving enzyme-1), es una aspartil proteasa monomérica de tipo I que contiene 501 aminoácidos, está anclada a la membrana a través de su dominio transmembrana y es la enzima que inicia la formación de A β (Creemers et al., 2001). Su

acción sobre APP produce un fragmento soluble (sAPP β) y un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos que se mantiene anclado a la membrana (C99). El fragmento C99 cuando se traslada al interior de la célula, está asociado a la expresión de genes que promueven apoptosis. Además, sobre este fragmento actúa la enzima γ -secretasa, que da origen a las diferentes secuencias de A β . Los agentes desarrollados dirigidos a inhibir la BACE1 no han tenido éxito (Verubecstat, Atabecstat, Elenbecestat) y todavía está por demostrar si reducir la producción de A β tiene un beneficio clínico en estadios tempranos de la EA (Checler, Afram, Pardossi-Piquard, & Lauritzen, 2021; Wessels et al., 2019).

La inhibición de γ -secretasa, una aspartil proteasa formada por cuatro proteínas, presenta las mismas complicaciones que actuar sobre la BACE1. La γ -secretasa es una enzima promiscua con múltiples sustratos. Por lo tanto, la inhibición de γ -secretasa puede dar lugar a graves efectos adversos (Golde, Koo, Felsenstein, Osborne, & Miele, 2013; Weissmiller et al., 2015).

Como una alternativa al mecanismo de acción de inhibición se han desarrollado moléculas moduladoras de la γ -secretasa (MGS). Estos compuestos modulan la actividad de la γ -secretasa, desplazando el sitio de corte sobre la APP para evitar la formación del péptido A β 42 amiloidogénico (Figura 15).

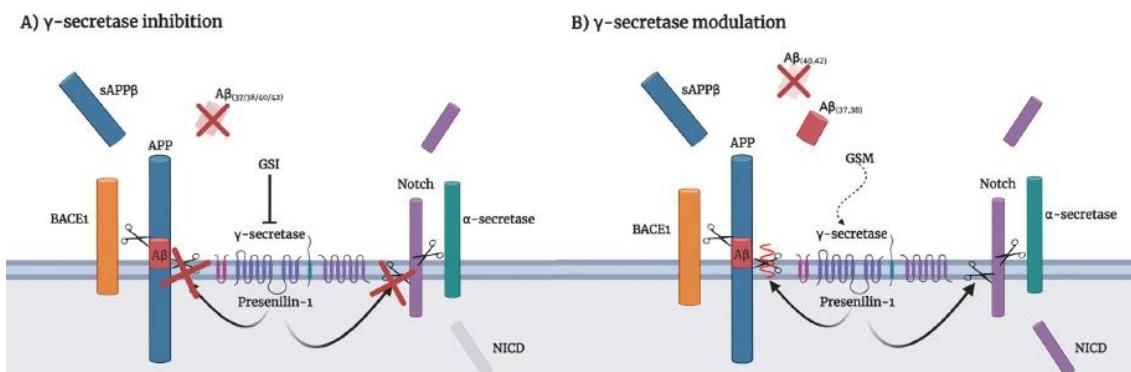


Figura 15: Principales estrategias desarrolladas con la γ -secretasa como diana. A) Estrategia inhibidora de la γ -secretasa (IGS) y B) Estrategia moduladora de la γ -secretasa (MGS). (Dobrowolska Zakaria & Vassar, 2021).

Moléculas pequeñas: inhibidores de la agregación de A_β

Otras moléculas pequeñas actúan interfiriendo en la agregación de A_β siguiendo diferentes vías que son interesantes ya sea, inhibiendo la oligomerización de A_β o suprimiendo la vía oligomérica hacia una forma no tóxica.

La primera estrategia supone bloquear la agregación del péptido A_β con moléculas de unión al monómero, previniendo su ensamblaje en oligómeros, especies potencialmente citotóxicas. Muchos compuestos han mostrado prevenir la neurotoxicidad de A_β en estudios *in vitro*. Sin embargo, una dificultad que se suma a esta estrategia, es el desorden estructural intrínseco que A_β presenta, lo que la convierte en una diana de difícil (Arosio, Vendruscolo, Dobson, & Knowles, 2014; S. I. A. Cohen et al., 2013; Knowles et al., 2009).

Recientemente, investigadores de la Universidad de Cambridge han identificado una molécula pequeña, la 10074-G5, capaz de unirse al péptido A_β en forma de monómero soluble. Estas investigaciones indican que estabilizando los estados monoméricos de A_β con moléculas pequeñas, se puede modificar su comportamiento amiloidogénico y es una estrategia que se puede utilizar con fines terapéuticos (Heller et al., 2020).

Otros estudios *in vitro* tratan de redirigir la A_β hacia una vía *off-pathway* (Bemporad & Chiti, 2012; Ladiwala, Dordick, & Tessier, 2011; Lu et al., 2019). Algunas moléculas ensayadas son el EGCG i el resveratrol, dos polifenoles bien conocidos por sus múltiples beneficios (Ahmed et al., 2017; Ladiwala et al., 2010).

Inmunoterapia sobre A_β

Además del desarrollo de los inhibidores de secretasas se han desarrollado otros compuestos de tipo biológico, para eliminar los agregados solubles e/o insolubles de la A_β mediante una respuesta inmunológica. Se han explorado dos vías de inmunoterapia contra la EA: la activa y la pasiva. (Montoliu-Gaya & Villegas, 2016).

El primer ensayo clínico de inmunoterapia fue el AN1792 (ELAN & Wyeth, 2002) y se realizó con la secuencia completa A_β(1-42) utilizando un adyuvante. Lamentablemente, en la fase clínica IIa el 6% de los pacientes tratados sufrieron una meningoencefalitis aséptica, posiblemente provocada por una fuerte respuesta inflamatoria de células T, por lo que el ensayo tuvo que abandonarse.

Uno de los problemas principales de estos anticuerpos es que entran en fase clínicas sin que se tenga evidencias firmes de que pasen a través de la barrera hematoencefálica (BBB). Por tanto, es imprescindible que estas estrategias implementen el desarrollo de tecnologías para facilitar el paso a través de la BBB (Pardridge, 2020).

En el registro del año 2020 de la base de datos *clinicaltrials.gov*, de los seis agentes en fase III que tienen como diana A β cinco son tratamientos de inmunoterapia y se describen a continuación.

- **Aducanumab** (BIIB037, Biogen, Neurimmune): Es un anticuerpo monoclonal sobre el cual existe gran expectativa debido a que sería la primera terapia modificadora de la EA. Interacciona con la región del extremo *N*-terminal A β (3-6) de agregados de A β , incluyendo oligómeros solubles y fibras insolubles, pero no interacciona con monómeros (Knopman, Jones, & Greicius, 2021; Schneider, 2019).
- **Lecanemab** (BAN2401, Biogen, Eisai Co., Ltd.): Es un anticuerpo monoclonal que reconoce una conformación específica de las protofibras insolubles de A β .
- **Gantenerumab** (RO4909832): Es un anticuerpo desarrollado bajo la estrategia de inmunoterapia pasiva que actúa desagregando y degradando las placas amiloides por activación de la fagocitosis de la microglia.
- **Solanezumab** (LY2062430, Eli Lilly): Anticuerpo monoclonal que se une a la zona media de A β (16-26). Sin embargo, el ensayo fue abandonado recientemente ya que no ha logrado frenar la progresión de la enfermedad en un ensayo clínico de fase III (Sacks, Avorn, & Kesselheim, 2017).
- **CAD106 (Novartis)**: Pertenece a una segunda generación de agentes para inmunoterapia activa diseñados para evitar la reacción adversa del primer ensayo clínico de inmunización activa. Es el único agente de inmunoterapia activa en fase III.

Los anticuerpos Aducanumab, Lecanemab y Gantenerumab reducen los niveles de placas A β , la forma fosforilada de tau, la neurogranina y los neurofilamentos de cadena ligera en el CSF. Estas observaciones sugieren que la selección de A β como diana, tiene un efecto sobre la cascada de procesos asociados a la patología de tau y la neurodegeneración (Tolar, Abushakra, Hey, Porsteinsson, & Sabbagh, 2020).

En el presente año, Eli Lilly ha confirmado que se han iniciado ensayos en fase 3 con el Donanemab (NCT04437511 and NCT04640077), un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado. (Mintun et al., 2021).

Mecanismo de eliminación de A_β (catabolismo de A_β)

La presencia del péptido A_β en el cerebro, es parte de un equilibrio de múltiples procesos, que mantienen los niveles entre su síntesis y eliminación evitando su acumulación (Baranello et al., 2015; Golabek, Marques, Lalowski, & Wisniewski, 1995; Wildsmith, Holley, Savage, Skerrett, & Landreth, 2013). Por lo tanto, la eliminación continua de A_β del cerebro es esencial para prevenir su acumulación y potencial agregación. Numerosos estudios sugieren que los principales factores que desencadenan la toxicidad de A_β, están asociados a una alteración del equilibrio entre su producción y la eliminación. A_β es transportada desde el cerebro a la sangre y viceversa a través de la BBB. La eliminación de A_β del cerebro se realiza a través de diversas vías enzimáticas y no enzimáticas.

Entre las vías no enzimáticas se incluyen: a) el paso del fluido intersticial (ISF) al CSF; b) la captura por fagocitosis realizada por la microglia y los astrocitos; y c) el transporte mediante unos receptores de eliminación como por ejemplo los LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein*) (Deane et al., 2004; Shibata et al., 2000; Spuch, Ortolano, & Navarro, 2012), así como otras proteínas transportadoras o de unión a A_β (Nalivaeva, Belyaev, Kerridge, & Turner, 2014).

Los receptores que median la eliminación de A_β son LRP1 y LRP2 (*low density lipoprotein receptor-related protein*), mientras que RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), facilita el paso de sangre al cerebro de A_β (Spuch et al., 2012).

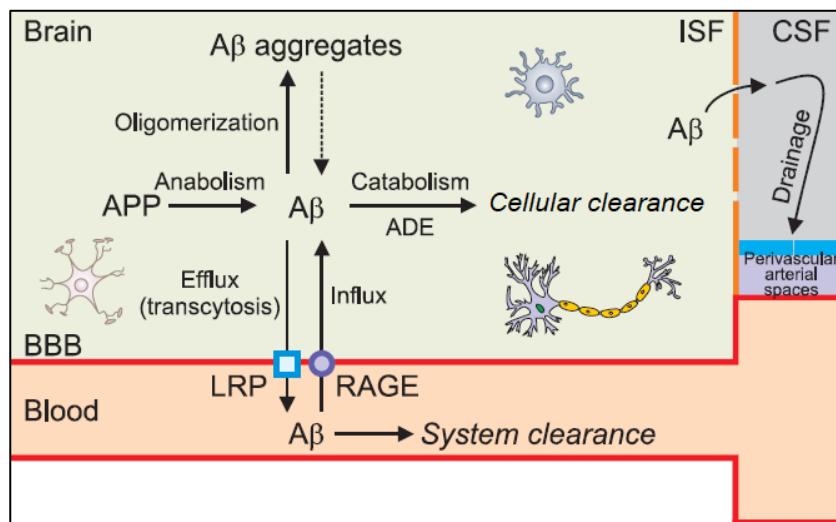


Figura 16. Mecanismo de eliminación (clearance) de A_β a través de la BBB.

La barrera hematoencefálica (BBB), fluido intersticial (ISF). Proteína precursora amiloide (APP), enzima de degradación de A_β (ADE), proteínas transportadoras (LRP, RAGE) (Yoon & Jo, 2012).

Las proteínas de unión a A β tiene la habilidad de modular las funciones fisiológicas y patológicas de A β , alterando su solubilidad, el transporte, eliminación, degradación y su potencial amiloidogénico (Calero, Rostagno, & Ghiso, 2012).

La eliminación de A β es un proceso complejo en el que además del transporte de A β mediante proteínas de unión a A β , intervienen un gran número de enzimas de degradación de A β (ADE, *amyloid degrading enzymes*) en distintos procesos proteolíticos (A Santos, Cardoso, & Goncalves, 2012; Grimm et al., 2013; Nalivaeva, Beckett, Belyaev, & Turner, 2012; Pacheco-Quinto, Herdt, Eckman, & Eckman, 2013).

En el cerebro el metabolismo de A β está regulado por la actividad de la neprilisina (NEP) y la enzima de degradación de la insulina (IDE, *insulin-degrading enzyme*) y por otras enzimas como la ECE (*endothelin converting enzyme*), la ACE (*angiotensin-converting enzyme*), así como también metaloproteinasas de matriz, entre otras (Nalivaeva et al., 2014; Tarasoff-Conway et al., 2015).

Otras proteínas como la transtiretina (TTR), la gelsolina, la alfa2-macroglobulin y la apolipoproteína E (ApoE) tienen también un papel importante en la eliminación y degradación de A β (Y. Du et al., 1998, 1997; Jiang et al., 2008; Ray, Chauhan, Wegiel, & Chauhan, 2000). Estas proteínas de unión a A β desenvuelven su rol en el sistema nervioso central (CSF) y en el plasma. Es interesante investigar los mecanismos de eliminación de A β en los que participan estas proteínas, ya que pueden representar una nueva diana en el desarrollo de estrategias terapéuticas para la EA.

Proteínas que unen péptido A β

Existe un grupo de proteínas que interaccionan con A β influyendo en su agregación. A este grupo pertenecen las chaperonas moleculares. Estas chaperonas son proteínas endógenas que intervienen en el plegamiento/despliegue y en el ensamblaje/desensamblaje de otras proteínas o de otras estructuras macromoleculares, pudiendo suprimir la formación de agregados y promover la eliminación de especies incorrectamente plegadas (S. I. A. Cohen et al., 2015; Mansson et al., 2014; Wilson, Yerbury, Wyatt, & Dabbs, 2012; Wyatt, Yerbury, Ecroyd, & Wilson, 2013).

En los últimos años se han descrito chaperonas que interaccionan con agregados solubles de A β . Estas chaperonas son muy interesantes dado que su diana terapéutica son las

formas tóxicas de A β (S. I. A. Cohen et al., 2015; Mannini et al., 2012; Narayan et al., 2012; Scheidt et al., 2019). Algunos ejemplos de chaperonas moleculares son las proteínas de choque térmico (Hsps, *heat shock proteins*) (Lackie et al., 2017) y las proteínas Bri2 y la Bri3, proteínas que presentan el dominio BRICHOS (Buxbaum & Johansson, 2017; S. I. A. Cohen et al., 2015).

Otras proteínas interaccionan también con los péptidos A β formando complejos pudiendo modificar la estabilidad/agregación, circulación o eliminación de los péptidos A β (Rahman, Zetterberg, Lendel, & Härd, 2015). Algunas de estas proteínas son: La gelsolina (Ray et al., 2000), la alfa2-macroglobulin (Y. Du et al., 1998, 1997), la ApoJ (o clusterina) (Narayan et al., 2016) y de A β (1-42) (Beeg et al., 2016); la ApoE (Deane et al., 2008; Jiang et al., 2008; Kim, Basak, & Holtzman, 2009); la humanina (Romeo et al., 2017), la proteína neuronal tau (Wallin et al., 2018), la HSA y la TTR, dos proteínas que circulan tanto en la sangre como en el CSF.

La proteína albúmina sérica (HSA)

La HSA posee 585 aminoácidos y un peso molecular de 66 KDa, representa un 60% de las proteínas plasmáticas y se encuentra en una concentración aproximada de 650 μ M, mientras que en el CSF es de aproximadamente 3 μ M, es decir 200 veces inferior. Está involucrada en numerosos procesos, dado su tamaño, tiene una gran capacidad de unión a ligandos endógenos y exógenos como los fármacos, con los que cumple un rol importante en su distribución y además participa en la regulación del potencial redox del plasma (Bode et al., 2018; Wang, Wang, & Huang, 2015). En el cerebro, regula la proliferación de las células gliales (astrocitos), mediante la estimulación de la mitosis y la liberación de calcio, manteniendo sus niveles en equilibrio (Nadal, Fuentes, Pastor, & McNaughton, 1995).

En 1999, Bohrmann et al. describieron el papel de la HSA en el control de la amiloidogenesis, tanto en plasma como en el SNC. Además dedujeron que el plasma poseía mayor capacidad inhibidora que el CSF, lo que tal vez pueda explicar que nada más hay depósitos amiloideos en el CSF (Bohrmann et al., 1999).

La HSA es una de las principales proteínas de unión a A β ; se cree que un 90% de A β en el plasma humano está unido a HSA. La HSA inhibe la agregación de A β no solo secuestra la mayoría de A β del plasma, sino que también participa en el transporte de la A β desde el

CSF hasta el plasma desplazando el equilibrio existente entre la A β en plasma y en el cerebro (*sink hypothesis*). Además, la concentración de los complejos A β -HSA decrece a medida que la EA progresá, lo que indica que el desplazamiento del equilibrio no funciona en el cerebro de pacientes con la EA.

En 2009, Boada et al. publicaron un trabajo en el que proponían un nuevo tratamiento para la EA basado en una sustitución de la albúmina del plasma por una albúmina nueva (M. Boada, Ortiz, Anaya, & Hernández, 2009). Desde entonces se han llevado a cabo diversas investigaciones con el fin de mostrar el potencial terapéutico de la HSA para el tratamiento de la EA.

Milojevic y colaboradores estudiaron la interacción entre la HSA y la A β mediante espectroscopia de RMN. Describieron la unión HSA/A β utilizando el péptido modelo A β (12-28). Según estos autores, la HSA tiene afinidad por especies oligoméricas y no se detecta interacción entre HSA y el monómero de A β (12-28) (Milojevic, Esposito, Das, & Melacini, 2007) (Algamal, Milojevic, Jafari, Zhang, & Melacini, 2013). Empleando una amplia variedad de técnicas (NMR, DLS y SPR entre otras) pudieron confirmar que la HSA se une a los oligómeros de A β con una alta afinidad de 1-100 nM, una $K_D < \mu M$, lo que impide la elongación por unión de monómeros: y que la afinidad de HSA por los monómeros, era mucho menor ($K_D > mM$) (Milojevic & Melacini, 2011; Milojevic, Raditsis, & Melacini, 2009).

En 2012, Stanyon y Viles tras investigar el efecto de la HSA en A β (1-40) y en A β (1-42) en el CSF, concluyeron que los niveles de HSA en el cerebro pueden ser un factor de riesgo y a su vez una diana terapéutica para la EA (Stanyon & Viles, 2012).

Choi y colaboradores evaluaron la influencia de metales como el Zn (II) y el Cu (II) en la interacción HSA con dos péptidos amiloides, el A β (1-40) y el A β (1-42). Estos metales alteraron la agregación y la toxicidad de los péptidos A β , así como también su transporte celular (Choi, Lee, Han, Lim, & Kim, 2017).

La HSA como una de las principales proteínas de unión a A β en plasma, este complejo interfiere con la toxicidad de A β y promueve su degradación, manteniendo el equilibrio dinámico entre los niveles de A β plasma y A β del cerebro. Esta interacción de la albúmina con la A β fue la base del ensayo clínico AMBAR (*Alzheimer Management by Albumin Replacement*), que promovió la empresa biofarmacéutica Grifols. En este ensayo se utilizó la plasmaférésis que consistía en el reemplazo de la de albumina endógena con 5% de albumina humana (Albutein® 5%) de Grifols en pacientes con grado leve o moderado de la

EA. (Mercè Boada et al., 2019, 2016; Cuberas-Borrós et al., 2018). En julio del 2020, se publicaron los primeros resultados del proyecto AMBAR (2012-2016), en el que participaron un total de 496 pacientes con la EA de distintos centros. Los resultados fueron prometedores, el tratamiento reducía el deterioro cognitivo y funcional de pacientes con la EA (Mercè Boada et al., 2020).(Mercè Boada et al., 2020, 2019, 2016; Cuberas-Borrós et al., 2018; Ortiz et al., 2020).

3. La proteína transtiretina en la enfermedad de Alzheimer

3.1. Transtiretina: síntesis, estructura y función

La transtiretina (TTR) debe su nombre a su función fisiológica, *trans*-transportador, *tir*-tiroide y *retin*-retinol. Es una proteína transportadora de la tiroxina y del complejo RBP, un complejo entre el retinol y la proteína de unión al retinol (RBP, *retinol binding protein*). Está codificada por un solo gen que se encuentra en el cromosoma 18, región 18q 11.2-q 12.1, cuya extensión es de aproximadamente 6,9 Kb (Sparkes et al., 1987). La TTR en plasma se sintetiza principalmente en el hígado, alrededor de un 90% y su concentración es de aproximadamente 3-7 μ M (0.2-0.4 mg/mL). En el fluido CSF se sintetiza en las células epiteliales de los plexos coroideos y su concentración aproximada es de 0.1-0.4 μ M (0.03-0.11 mg/mL) (Mangrolia & Murphy, 2018). Aunque en menor cantidad también se sintetiza en la retina, neuronas y en la placenta humana (Ciccone, Shi, di Lorenzo, Van Baelen, & Tonali, 2020; Li, Masliah, Reixach, & Buxbaum, 2011). Además, la TTR representa aproximadamente el 20 % de las proteínas totales presentes en el CSF (Bezerra, Saraiva, & Almeida, 2020; Giao et al., 2020).

La TTR es una proteína tetramérica de \approx 55kDa, compuesta por cuatro monómeros idénticos de 127 aminoácidos (Kanda, Goodman, Canfield, & Morgan, 1974). La estructura secundaria de TTR es rica en hojas- β , con un pequeño fragmento de α -hélice. Casi todos los aminoácidos de la secuencia de TTR participan en su conformación estructural a excepción de 10 aminoácidos en el extremo N-terminal y 5 aminoácidos en el extremo C-terminal que no tienen un rol directo en su plegamiento y actúan como cabeza y cola (Hamilton & Benson, 2001).

El análisis de su estructura cristalográfica a una resolución de 1.8 \AA , indica que cada monómero, de aproximadamente 60 aminoácidos, se encuentra dispuesto en 8 cadenas- β (A-H) antiparalelas, conectadas por *loops* que forman un sándwich de 2 hojas- β DAGH y CBEF (interna y externa respectivamente). Otra pequeña parte de los aminoácidos, 9 de ellos forman una estructura de α -hélice corta entre las cadenas E y F. La formación de los dímeros de TTR, está dada por la interacción dirigida por enlaces de hidrógeno, entre las cadenas- β F y H de cada monómero que son principalmente hidrofílicas. La asociación dímero-dímero se forma principalmente por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas AB y GH (Blake, Geisow, Oatley, Rérat, & Rérat, 1978). El alto contenido de cadenas- β en su estructura sugiere que confiere a la proteína una mayor estabilidad en medios desnaturalizantes (Branch, Robbins, & Edelhoch, 1971).

En la interfaz de estos dímeros en su conformación tetramérica, se crea un canal central con dos sitios idénticos de unión a su ligando endógeno la tiroxina (T4). Estos dos sitios presentan una cooperatividad negativa, es decir que cuando una molécula de T4 ocupa el primer lugar, su nueva conformación reduce drásticamente la afinidad de la segunda molécula. Por otro lado, el sitio de unión de la proteína RBP, está localizado en el *loop* formado por la estructura α -hélice corta entre las cadenas E y F (Blake et al., 1978).

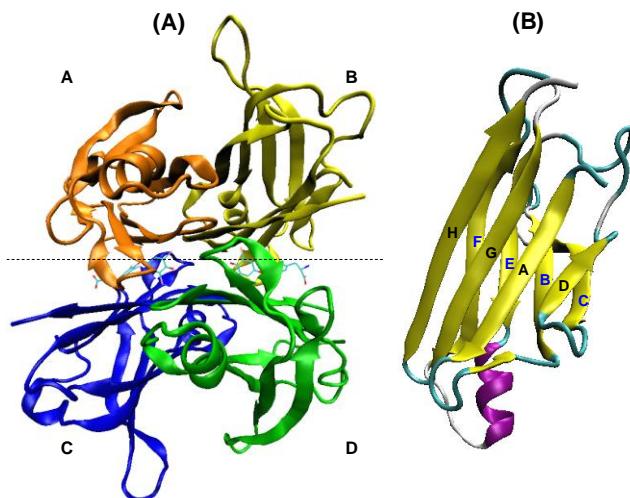


Figura 17. Estructura cristalina de la Transtiretina.

(A) El complejo TTR-T4 (PDB: 1ICT) mostrando el homotetrámero ABCD y el canal central de unión a las hormonas tiroideas. (B) Estructura tridimensional del monómero de TTR indicando las 8 cadenas- β en amarillo (A-H) y su cadena hélice- α en lila.

La TTR es una de las tres principales transportadoras de la hormona T4 en plasma, entre el 10-15 % de T4 forma complejo con TTR. Sin embargo, TTR es la principal transportadora de T4 en el CSF. TTR ha sido descrita como una proteína que contribuye a mantener los niveles y distribución de entre un 60-80% de T4 en el cerebro (Kassem, Deane, Segal, & Preston, 2006). Las hormonas tiroideas tienen un rol muy importante en el desarrollo neural, así como en la regulación de la expresión de genes, por ejemplo, la T4 se ha asociado a la regulación de la organización intracelular de microfilamentos de actina en astrocitos (Merched et al., 1998). La hormona triyodotironina (T3), que es la forma biológicamente activa de T4, se une también a la proteína TTR, aunque con menor afinidad.

El retinol (vitamina A) en plasma se transporta en forma de complejo con RBP, que a su vez forma un complejo ternario con TTR, en esta conformación entre un 90-95% del retinol es transportado por TTR. Además, este complejo ternario se cree evita la pérdida de RBP

por filtración glomerular a través del riñón (Giao et al., 2020; Johnson, Connelly, Farnsworth, Powers, & Kelly, 2012).

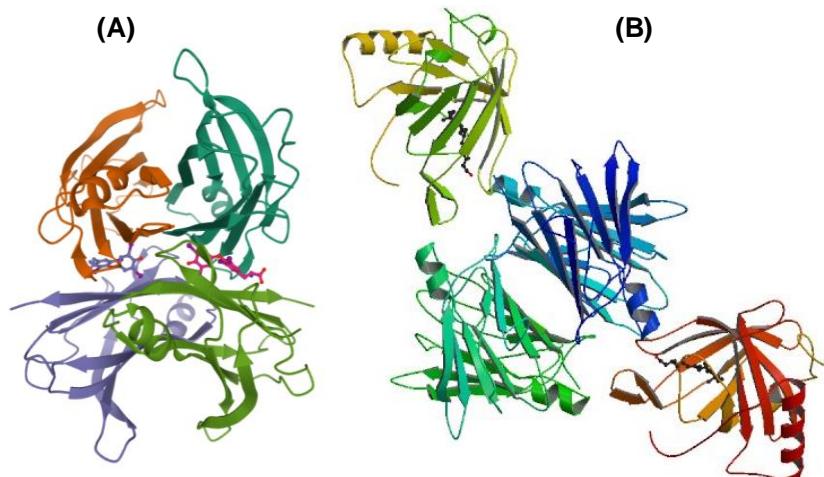


Figura 18. Estructuras cristalográficas de TTR con sus principales ligandos endógenos.

(A) Complejo binario TTR-T4 (PDB: 1ICT). (B) Complejo ternario TTR+(RBP+retinol), (PDB: 1RLB).

3.2. Estabilización de la transtiretina. Amiloidosis por transtiretina

La estructura de TTR en su forma tetramérica es rica en hojas beta, característica predominante en proteínas con potencial amiloidogénico (Blake et al., 1978; Hamilton & Benson, 2001).

La TTR es muy estable en condiciones fisiológicas normales, sin embargo, la forma wt y variantes de TTR (vTTR) se han identificado en las diferentes amiloidosis relacionadas con la TTR (Adams, Koike, Slama, & Coelho, 2019; Koike & Katsuno, 2020), como son la polineuropatía familiar amiloide (FAP, *Familial amyloid polyneuropathy*) (Plante-Bordeneuve, 2018; Saraiva, Magalhães, Ferreira, & Almeida, 2012), la cardiomiopatía familiar amiloide (FAC, *Familial amyloid cardiomyopathy*) (Grodin & Maurer, 2019; Siddiqi & Ruberg, 2018), la amiloidosis sistémica senil (SSA, *Senile systemic amyloidosis*) (Westerman, Sletten, Johansson, & Cornwell III, 1990) y la amiloidosis que afecta al sistema nervioso central (CNSA, *central nervous system selective amyloidoses*) (Sekijima et al., 2003; Ziskin et al., 2015).

Actualmente se han identificado más de 140 mutaciones en la secuencia de TTR que pueden causar ATTR (<http://amyloidosismutations.com>) que se transmiten de forma autosómica dominante (Hou, Aguilar, & Small, 2007).

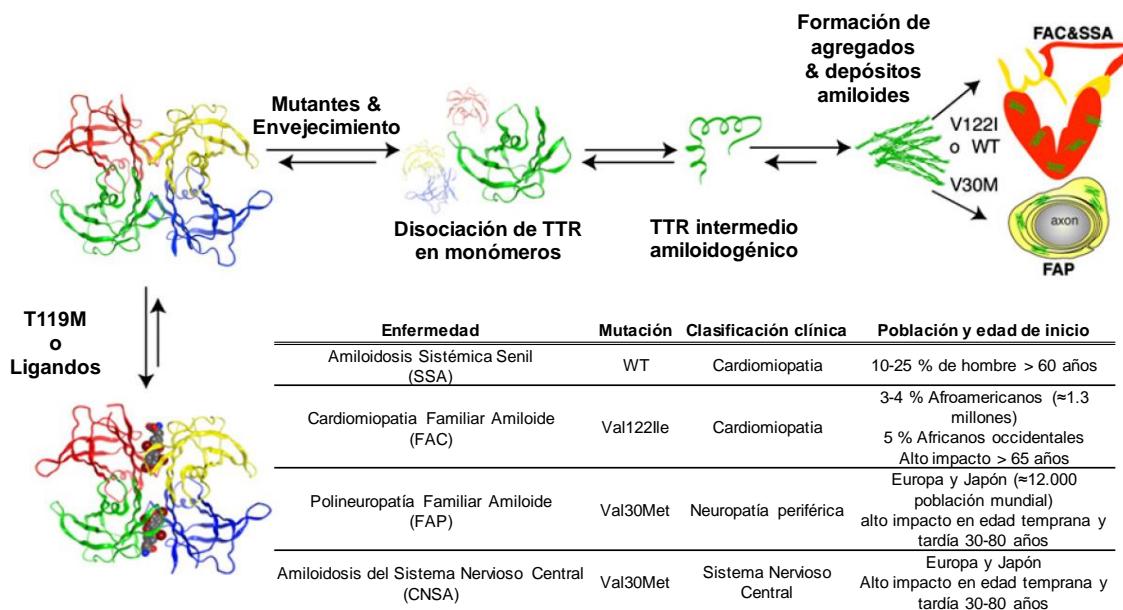


Figura 19. Cascada de procesos en la amiloidogénesis de TTR con un cuadro resumen de las amiloidosis asociadas a la TTR.

La proteína V30M TTR es la mutación más frecuente asociada a la FAP, con mayor incidencia en Portugal, Suecia, España y Japón. Sin embargo, otra variante, la L55P TTR presenta un mayor potencial amiloidogénico (Lashuel, Wurth, Woo, & Kelly, 1999). La mutación Val-30 se localiza en la cadena- β B y la Leu-55 en la cadena- β corta D. Ambas mutaciones no afectan la habilidad de TTR para adoptar la conformación tetramérica, pero ambas mutaciones incrementan su potencial amiloidogénico, a través de hacer el tetrámero de TTR más propenso a la desestabilización (Hurshman Babbes, Powers, & Kelly, 2008; Lashuel, Lai, & Kelly, 1998).

La mutación de TTR que tiene un gran interés por su mayor estabilidad en comparación a la TTR, es la T119M que ha demostrado ser paliativa en el desarrollo de amiloidosis en pacientes que presentaban la mutación V30M al mismo tiempo, los cuales se mantuvieron asintomáticos o presentaron síntomas muy leves asociados a la FAP por V30M TTR. La S52P por el contrario es una variante altamente amiloidogénica, muy agresiva que se presenta en edades tempranas, el efecto de esta mutación sobre el mecanismo de

agregación de TTR ha sido asociado también a la potenciación de la desestabilización de su forma tetramérica (Yee et al., 2019).

La mutación V122I es la causa más común de FAC y afecta a entre un 3-4% de la población americana de origen africano. Esta mutación ha sido asociada a un 47% del aumento de riesgo a desarrollar insuficiencia cardiaca (Damas, Ribeiro, Lamzin, Palha, & Saraiva, 1996; Ruberg & Berk, 2013).

La amiloidosis sistémica senil (SSA) está caracterizada por la formación de depósitos de la proteína TTR. Estos depósitos se forman principalmente en el corazón y se estima que aproximadamente el 25-30% de la población mayor de 80 años son afectados por la SSA (Westerman et al., 1990). La SSA suele tener una afectación leve, pero puede dirigir insuficiencia cardiaca congestiva. Su diagnóstico se confirma mediante el análisis histológico, donde se identifica la presencia de depósitos de TTR, en ausencia de variantes de esta (Rapezzi et al., 2010).

La amiloidosis cardiaca (FAC) produce aumento del grosor de la pared biventricular y rigidez ventricular. Además, los depósitos amiloideos de TTR pueden depositarse dentro o alrededor de las pequeñas arteriolas dando paso al síndrome clínico de angina o en algunos casos miocardio. La incidencia es de 1 por cada 100000 personas que son entre 2500 y 5000 casos nuevos al año en EE.UU. De las variantes más comunes de TTR asociadas a la FAC se encuentra la V122I (valina a isoleucina en la posición 122) y está presente en aproximadamente un 4% de la población afroamericana (Siddiqi & Ruberg, 2018).

El mecanismo más investigado para describir la patogénesis de TTR, señala que la disociación del tetrámero en dímeros predispone a disgregarse en monómeros, es esta última unidad la que adopta conformaciones potencialmente amiloidogénicas y se cree es la causa principal de la patogénesis por TTR. En resumen, el mecanismo aceptado para la agregación de la proteína TTR sugiere que la pérdida de la estructura cuaternaria es el factor limitante que desencadena su agregación, debido a que expone a los monómeros a cambios conformacionales que potencian su agregación (Bezerra et al., 2020; Foss, Wiseman, & Kelly, 2005; Johnson et al., 2005; Quintas, Saraiva, & Brito, 1999; Quintas, Vaz, Cardoso, Joa, & Saraiva, 2001).

Numerosos estudios corroboran que el complejo TTR-T4 da estabilidad a TTR y previene su disociación. Además, sus ligandos endógenos T4 y RBP, no compiten por la unión a TTR frente a posibles fármacos dirigidos al sitio de unión de T4 por ejemplo, ello debido a

que la TTR en plasma sólo transporta un 15 % de T4 (Mccammon et al., 2002; Miroy et al., 1996).

En base a este mecanismo, se desarrolló una estrategia terapéutica llamada **estrategia de la estabilización cinética** del tetrámero de la TTR (forma nativa) por la acción de moléculas pequeñas que se unen al sitio de unión de las hormonas tiroideas evitando su disociación (Bulawa et al., 2012; Dolado et al., 2005). Desde que fue propuesta esta estrategia hasta hoy, se han descrito más de mil estabilizadores de la TTR que son potentes inhibidores de la agregación de la TTR (Almeida, Gales, Damas, Cardoso, & Saraiva, 2005; Ciccone, Tonali, Nencetti, & Orlandini, 2020; Corazza et al., 2019; Nevone, Merlini, & Nuvolone, 2020; Yokoyama & Mizuguchi, 2020).

En la base de datos del *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org>) se encuentran descritas las estructuras cristalográficas de más de 400 ligandos con la TTR. Todo este trabajo ha permitido caracterizar bien la zona de unión de los ligandos a TTR. Una característica relevante del sitio de unión de TTR es que presenta tres cavidades simétricas de unión a halógeno llamadas HBPs (*halogen binding pockets*) HBP1 y HBP1', HBP2 y HBP2' y HBP3 y HBP3' donde se unen los átomos de iodo de la hormona tiroidea T4. Las cavidades HBP3 y HBP3' están situadas en el interior, HBP2 y HBP2' en la parte media y HBP1 y HBP1' en el exterior del sitio de unión de T4 (Berman et al., 2000; Guo et al., 2020).

En la actualidad, para el tratamiento de estas amiloidosis tan solo han sido aprobados dos fármacos. Uno es el Tafamidis, un fármaco de Pfizer registrado con el nombre de Vyndaqel®, que posee una estructura de benzoxazol (Bulawa et al., 2012; Coelho et al., 2012). El otro es el Diflunisal un fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAID, *non steroid antiinflammatory drug*) que ha sido reposicionado para tratar estas amiloidosis (Berk et al., 2013). Otro compuesto es el Tolcapone, un fármaco para tratar el Parkinson, que también ha sido reposicionado para la FAP (Gamez et al., 2019). El descubrimiento de fármacos para tratar las amiloidosis relacionadas con la TTR sigue muy activo. Un ejemplo de ello es el desarrollo de moléculas como AG10, un estabilizador de la TTR que se halla actualmente en fase clínica 3 (NCT03860935) (Fox et al., 2020). Existen además otras estrategias para tratar estas amiloidosis, como el uso inhibidores oligonucleótido antisentido (ASO, *antisense oligonucleotides*) y pequeños RNAs como terapia génica para bloquear la expresión de TTR. Entre ellos el Inotersen, un inhibidor oligonucleótido antisentido de segunda generación dirigido a inhibir la expresión de TTR en el hígado, mediante su unión

al microRNA de la TTR, reduce su expresión, lo que tiene un impacto sobre el desarrollo de la enfermedad (Benson et al., 2018).

Nuestro grupo también estuvo trabajando con anterioridad en un proyecto de descubrimiento de fármacos para este tipo de amiloidosis en el que se descubrió una molécula pequeña como estabilizador de la TTR, el IODODIFLUNISAL, un derivado yodado del fármaco NSAID diflunisal (Gales et al., 2005; Mairal et al., 2009; Ribeiro et al., 2014).

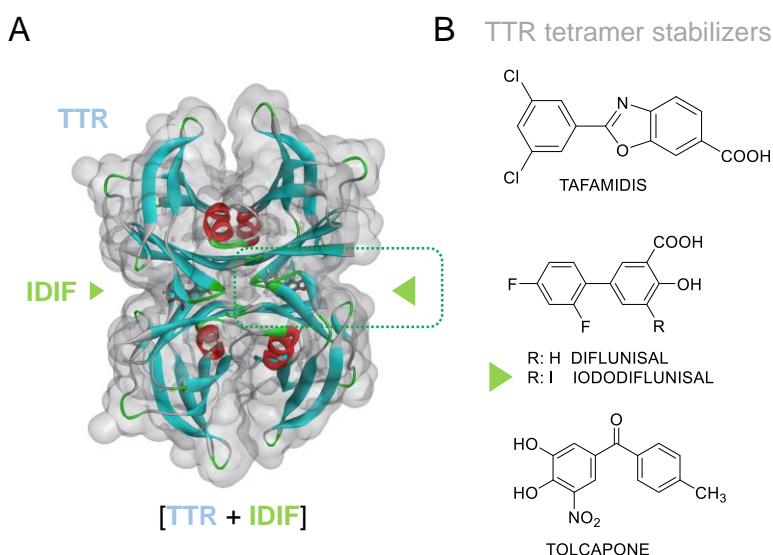


Figura 20: Estructura química de moléculas estabilizadoras de TTR. Tafamidis (medicamento huérfano), la molécula reposicionada Tolcapone para la FAP y Diflunisal, nuestro compuesto líder iododiflunisal (IDIF).

3.3. Transtiretina y su papel en la enfermedad de Alzheimer

El plexo coroide (CP, choroid plexus) es el órgano de la barrera hematoencefálica encargado de producir el fluido cerebroespinal (CSF). El CSF proporciona los nutrientes necesarios al cerebro y también elimina residuos del mismo. Es un fluido complejo que contiene sales, vitaminas, nutrientes, factores de crecimiento y proteínas. Estas proteínas se producen mayoritariamente en el CP (por ejemplo, la TTR), pero también pueden ser transportadas desde la sangre por transporte activo o pasivo. La concentración de las proteínas en el CSF depende del metabolismo la síntesis y el transporte de neuronas, la microglía y los astrocitos. La concentración total de proteínas en el CSF es inferior a la de la sangre (~0.25 mg/mL en el CSF vs. ~70 mg/mL en plasma). La TTR es una de las proteínas más abundantes en el CSF y representa el 50% de las proteínas sintetizadas en los plexos coroideos (Pate & Murphy, 2017).

Niveles de TTR en pacientes de Alzheimer

En 1993, Wisniewsky publicaron un estudio *in vitro* en el que mostraron que el CSF podía inhibir la formación de las fibras de A β (Wisniewski et al., 1993). La primera asociación de la TTR en el proceso de agregación de Ab fue descrita en 1986. Elovaara y colaboradores afirmaron que los niveles de TTR en el CSF de pacientes de Alzheimer eran inferiores respecto a los individuos sanos (Elovaara, Maury, & Palo, 1986; Riisøen, 1988).

En 1997, Serot y colaboradores analizaron 149 muestras de CSF de pacientes control y 40 de pacientes con Alzheimer y calcularon los niveles de TTR mediante un método nefelométrico automatizado. En el estudio del envejecimiento en individuos sanos demostraron que los niveles de TTR aumentaban con la edad. Sin embargo, en pacientes de la EA se observaba una disminución notable de la concentración de TTR respecto a una población control. El mismo análisis se aplicó a la proteína albúmina, otra proteína asociada al AD, pero en este caso no se observó cambios en las concentraciones de HSA (Serot et al., 1997).

Gloeckner y colaboradores llevaron a cabo un estudio similar, pero en este caso analizaron 106 muestras de CSF de pacientes con cinco tipos de demencia, entre ellas la EA. Empleando el mismo método nefelométrico de nuevo comprobaron que se observaba que los niveles de TTR en pacientes con EA severa eran inferiores en comparación con formas más suaves de la EA (Gloeckner et al., 2008). Además, un estudio dirigido al análisis de CSF de 35 pacientes con AD, 18 con demencia frontotemporal y 29 individuos sanos, indicó que la correlación positiva entre la A β (1-42) y la TTR sólo se observaba en los pacientes con AD (Hansson et al., 2009).

Esta reducción en los niveles de TTR en el CSF, también se observó en el plasma de pacientes de EA. Han et al utilizaron un ensayo ELISA para calcular los niveles de TTR en plasma de 111 pacientes y confirmaron que había una disminución en los niveles de TTR en plasma de estos pacientes en relación a los de los controles, siendo independiente de la edad del paciente (Han et al., 2011). Ribeiro et al que también corroboraron estos resultados en pacientes con deterioro cognitivo leve y en pacientes de EA, y además encontraron que los niveles en mujeres mostraban una mayor disminución de niveles de TTR respecto a la de hombres (Ribeiro et al., 2012; Velayudhan et al., 2012).

Todos estos datos en personas apuntan a que la TTR pudiese tener un rol como biomarcador en la detección precoz de la EA.

Estudios en modelos animales de la EA: *C. elegans* y ratones

Además de las evidencias anteriormente descritas acerca del papel neuroprotector de la TTR en la EA, se han realizado numerosos estudios en animales transgénicos como modelos de la EA, entre ellos el gusano *C. elegans* (Link, 2005) y distintos tipos de ratones.

Estudios realizados en ratones modelos de la enfermedad confirmaron el rol protector de la TTR. Stein y Johnson evaluaron los perfiles de expresión génica en el hipocampo y en el cerebelo de ratones transgénicos Tg2576 de 6 meses de edad. El ratón Tg2576 sobreexpresa una forma mutante de la APP, la *Swedish mutation APPsw*, que causa un aumento en los niveles de A β en el cerebro). Tras un análisis inmunohistoquímico, los resultados en los ratones Tg2576, mostraron un incremento en los niveles de TTR en neuronas del hipocampo y cerebelo de 29.5 y 3.2 veces respectivamente, que no se detectó en los ratones control. Por tanto, se sugirió que la sobreexpresión de A β , activaba la expresión de genes, entre ellos el de TTR (Stein and Johnson, 2002).

En otros estudios, ratones Tg2576 fueron tratados con anticuerpos anti-TTR en el hipocampo y como resultado se obtuvo un marcado incremento de los niveles de A β y también un aumento de la fosforilación de la proteína tau, de la apoptosis y de la pérdida neuronal, resultados que apoyaban la neuroprotección que ejercía la TTR (Stein et al., 2004).

Otras estrategias, como la delección del gen que codifica para TTR, mostraron también un incremento y formación de depósitos de A β en el hipocampo y en el córtex de ratones APPsw (Choi et al., 2007).

Se utilizaron diversos modelos de ratón transgénico para el estudio del efecto de la sobreexpresión de TTR sobre A β . Tras una evaluación de las funciones cognitivas de los ratones aplicando el test de Barnes, los resultados mostraron una mejora cognitiva en los ratones APP23/hTTR. Sin embargo, cuando el gen de TTR era silenciado, los ratones mostraban un deterioro neurológico acelerado. Además, a los 5.5 meses se examinaron muestras del córtex y del hipocampo de los ratones APP23/hTTR y no se detectaron depósitos de A β . Se realizó también otro análisis de seguimiento a los meses 15 meses y las muestras dieron una tinción de los depósitos de A β significativamente menor en comparación a los ratones APP23. (Buxbaum et al., 2008).

Alemi y colaboradores investigaron el rol de TTR como transportador de A β a través de la BBB. Para ello utilizaron el modelo *in vitro* de células hCMEC/D3 de la BBB. Con estos experimentos mostraron que TTR promovía la internalización y el flujo de A β , así como

el paso de A β de cerebro a sangre, pero no al revés. Tras este resultado, se postuló la TTR como mediadora de la eliminación (clearance) de A β a través de la LRP1 (Alemi et al., 2016).

Estudios posteriores en neuronas de hipocampo y regiones corticales de ratones modelos de la AD (ratones APP23), mostraron la presencia de ttr mARN (ARN mensajero) y la proteína TTR, lo que sugiere que la TTR es sintetizada en las neuronas. El mismo resultado fue observado en el análisis de tejido neuronal humano con AD. El incremento de la síntesis de TTR se ha asociado a la presencia de A β y precursores de A β . Este mecanismo de respuesta refuerza el rol neuroprotector de TTR y el incremento de los niveles de concentración de TTR en CSF en edades avanzadas que regulan los niveles de A β evitando su toxicidad (Li et al., 2011; Kerridge et al., 2014). Por lo tanto, la reducción o pérdida de la síntesis neuronal de TTR, podría ocasionar un mayor riesgo de desarrollo de la AD (Li and Buxbaum, 2011).

Otro posible mecanismo propuesto mediante el cual TTR interfiere con la toxicidad de A β , es la unión de TTR al fragmento C99. Estudios de NMR mostraron una unión con una estequiométría 1:1 y una KD = 86±9 μ M. En el estudio en cultivos celulares que expresaban ambas proteínas se observó que la interacción reducía la fosforilación de C99 y esto impedía la ruptura por una γ -secretasa. Estos resultados indicaron que la formación de A β decrece en presencia de TTR, lo que sugería un rol chaperona de TTR al evitar la formación de los monómeros patogénicos de A β tras su unión a C99 y A β PP (Li et al., 2016).

3.4. Estudios de la interacción TTR/A β *in vitro*

La primera asociación de la TTR con la EA fue cuando se observó que el CSF podía inhibir la formación de las fibras de A β *in vitro*. La TTR fue la tercera proteína de unión a A β identificada en CSF después de la ApoE y la ApoJ (Ghiso et al., 1993; Li & Buxbaum, 2011).

Los primeros estudios estructurales de la interacción TTR/A β fueron publicados en 1994 por Schwarzman et al. de la Universidad de Nueva York (Schwarzman et al., 1994). Estos investigadores determinaron que la TTR era la proteína que mejor unía (“secuestraba”) a A β en el CSF y sugirieron que esta interacción sería la responsable de la actividad biológica y de la eliminación de A β . Calcularon las coordenadas del

péptido A β (1-28) correspondientes a la estructura en solución obtenida a partir de los datos de RMN 2D y un alineamiento simulado (*distance geometry/simulated annealing*). A partir de estos datos y los de la estructura cristalográfica de la TTR, ya conocida, con un programa llamado GRASP construyeron el primer modelo computacional de la interacción TTR/A β (Figura 21).

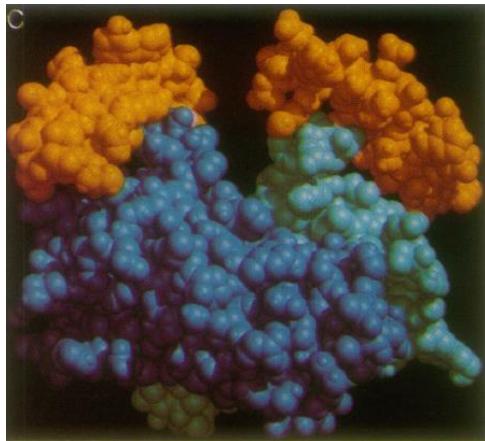


Figura 21: Primer modelo computacional de la interacción TTR/A β descrito en 1994. Los monómeros del dímero están en azul y verde. Las moléculas de A β en amarillo) (Schwarzman et al., 1994).

Para simular esta unión, utilizaron la superficie de cada subunidad de TTR independientemente. De este modo, obtienen una posible conformación del complejo, que en su unión implican los residuos en la superficie de contacto de A β (1-28): Arg (5), Ser (8), Gly (9), Val (12), His (13), Gln (15), Lys (16), Phe (19), Phe (20), Asp (23), Val (24), Asn (27) y Lys (28); y en la superficie de contacto del dímero de TTR se señalan los residuos: Arg (34, 161), Ala (37, 164), Asp (38, 165), Thr (40, 167), Glu (42, 169), Glu (62, 189), Val (65, 192) y Glu (66, 193) (el primer número entre paréntesis indica el residuo de la primera subunidad y el segundo número es el residuo de la segunda subunidad). Este artículo publicado en PNAS en 1994 acaba con la siguiente frase:

"The suggested structure of TTR-A β complex, furthermore, can provide a molecular basis for the design of drugs that could prevent amyloid formation". El diseño de fármacos propuesto en 1994 es el tema principal de la presente tesis más de 20 años después.

Diez años después de la publicación del trabajo de Schwarzman, diferentes grupos de investigación trataron de averiguar cuál era el mecanismo por el cual TTR interfería con la agregación de A β . Entre ellos, los grupos de la Dra. R. Murphy en la Universidad de

Wisconsin (USA), el de la Dra. R Cecchi en la Universidad de Milán y el de J.N. Buxbaum en Scripps Research Institute, en la Jolla. A continuación, señalaremos las aportaciones más interesantes de estos grupos:

En 2006 Liu y Murphy examinaron el tamaño y la morfología de los agregados mediante microscopía TEM así como Dispersión estática y dinámica de la luz (*Static and Dynamic light scattering: DLS*), llevaron a cabo la cinética de la agregación de A β en presencia de la TTR. Según los autores, la TTR se unía de forma preferente al monómero de A β inhibiendo su agregación. Es la primera vez que se estimó un valor para la unión entre TTR y A β , se calculó una constante de asociación de $K_s \approx 2300 \text{ M}^{-1}$ (L. Liu & Murphy, 2006). En 2008, Costa y colaboradores, calcularían Kd mediante un ensayo de competición utilizando ^{125}I -WT TTR, obteniendo un valor de Kd de 28 nM (R. Costa, Gonçalves, Saraiva, & Cardoso, 2008).

Liu y Murphy utilizaron experimentos de apantallamiento (*quenching*) de la fluorescencia por triptófano para averiguar el sitio de unión de A β . El monómero de TTR contiene dos residuos de triptófano, el Trp41 y el Trp79, según la estructura cristalográfica de la TTR el Trp41 se encuentra parcialmente expuesto y Trp79 está enterrado (*buried*). Dado que se observó un apantallamiento (*quenching*) se postuló que la interacción de TTR con A β se encontraba cerca del residuo Trp41 (L. Liu & Murphy, 2006), residuo cercano a las secuencias de interacción propuestas en los estudios previos de Schwarzman (Schwarzman et al., 1994).

Los experimentos de DLS mostraron una reducción drástica en la longitud de las especies de A β formadas en presencia de TTR y este efecto era mayor al incrementar la cantidad de TTR. La técnica de TEM se utilizó para caracterizar la morfología de las especies formadas. El resultado indicó que, en presencia de TTR, las especies no eran amorfas, sino que, mantenían una estructura lineal. Esta observación soporta la hipótesis de que TTR interfiere con la elongación de A β , pero no la formación de estructuras iniciales (L. Liu & Murphy, 2006).

Por otro lado, el grupo de Buxbaum empleando la técnica de Resonancia de plasmón superficial (SPR) observó que el tetrámero de TTR se une tanto a la A β (1-40) como a la A β (1-42), aunque con mayor afinidad a A β (1-42). En estos experimentos, TTR mostró mayor afinidad por la forma agregada de A β que por el monómero. La unión de TTR a A β era más favorable a 37°C que 25°C. Mediante experimentos de dispersión de la luz (*Light*

scattering) el tetrámero de TTR mostró mayor afinidad por formas agregadas de A β , pero no por fibras (Buxbaum et al., 2008).

En 2013, Li y colaboradores emplearon una serie de técnicas, como la ITC, para determinar la estequiometría de la interacción TTR/A β , y la RMN, para caracterizar en solución la zona de unión *in vitro*. El valor estimado para Kd, 24 μ M (Figura 22A), difería sustancialmente de los valores anteriormente descritos en la literatura, el descrito por Liu and Murphy, obtenido por apantallamiento (*quenching*) de la fluorescencia de Trp (Ks at 2300 M $^{-1}$) y el otro descrito por Costa y colaboradores, obtenido utilizando ensayos unión competitiva (Kd = 28 nM). Los estudios de NMR sugerían que la zona de unión será la zona de la TTR de unión a T4 y la zona adyacente, confirmando otros datos de la literatura (J. Du, Cho, Yang, & Murphy, 2012; Yang, Joshi, Cho, Johnson, & Murphy, 2013).

Cascella y colaboradores de la Universidad de Florencia incubaron diferentes oligómeros A β (1-42) en presencia de TTR y demostraron que *in vitro* la TTR neutralizaba de forma eficiente la toxicidad de los A β oligómeros y esto ocurría tras la conversión de los oligómeros en otras especies más grandes (Cascella et al., 2013). La unión de TTR a las especies oligoméricas como mecanismo de neuroprotección fue sugerido también en el estudio de Yang et al. (Yang et al., 2013).

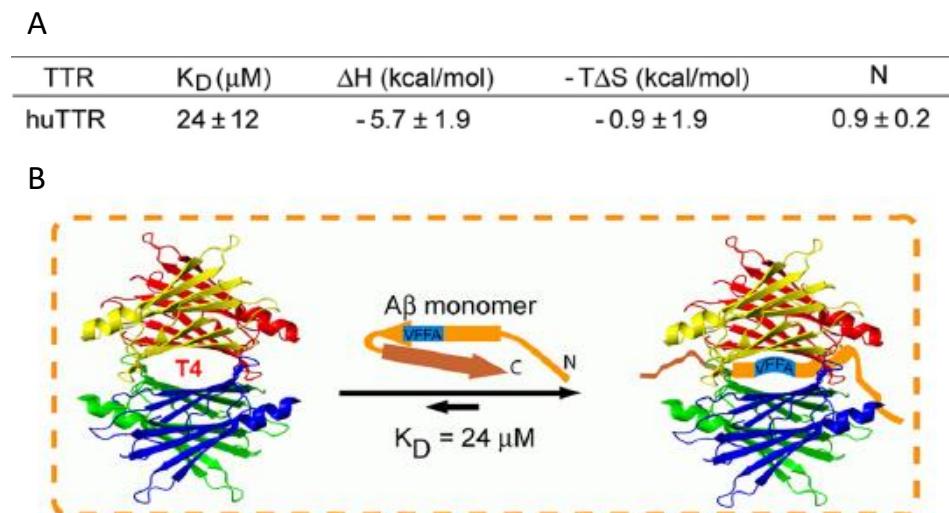


Figura 22. A) Perfil termodinámico de la interacción TTR/A β (1-40); B) Zona de interacción de la TTR propuesta por (Li et al., 2013).

3.5. Mecanismo de interacción de la TTR con A β

A pesar de conocerse que la TTR interfería en la agregación de la A β para formar agregados no fibrilares, el mecanismo todavía no era conocido. Fue en 2018, durante la realización de la presente tesis doctoral que apareció el primer artículo en el que se trataba esta cuestión, en concreto del grupo del Dr. Olofsson de la Universidad de Umeå en Suecia. Dos años después, en 2020, apareció el segundo artículo que estudiaba este mismo mecanismo. Esta investigación provenía de la colaboración de dos grupos, el de TPJ Knowles en Cambridge (UK) y el de F. Chiti de la Universidad de Florencia (Italia).

El grupo de Olofsson se propuso como objetivo elucidar el mecanismo por el cual la TTR ejercía su función y quería averiguar si éste era modulable. Demostraron que la TTR no afectaba de forma significativa la elongación de las fibras. Sin embargo, la TTR interfería directamente en la formación de los núcleos de oligómeros. Esta interferencia podía modularse alterando las condiciones de la nucleación y de la elongación. Además, sin cambiar la concentración de TTR o de A β , la actividad de TTR podía pasar de completamente inefectiva a pasar a ser una inhibición casi completa.

Técnicas de fluorescencia de tioflavina T mostraron que la TTR retarda la etapa de latencia y elimina el proceso de formación de fibras. Para dar respuesta al rol de TTR, se sugiere que interfiere en 4 procesos (Ghadami et al., 2020; Nilsson et al., 2018):

Así pues, la TTR posee la capacidad de interferir en la agregación de A β y está controlada por dos reacciones que compiten, la formación de los núcleos oligoméricos y la velocidad a la que la TTR puede inhibir su formación. Como consecuencia, los núcleos oligoméricos o bien pueden dar lugar a un ensamblaje fibrilar (vía amiloide) o convertirse en formas NO amiloides por la actividad de la TTR (vía no amiloide) (Figura 23)

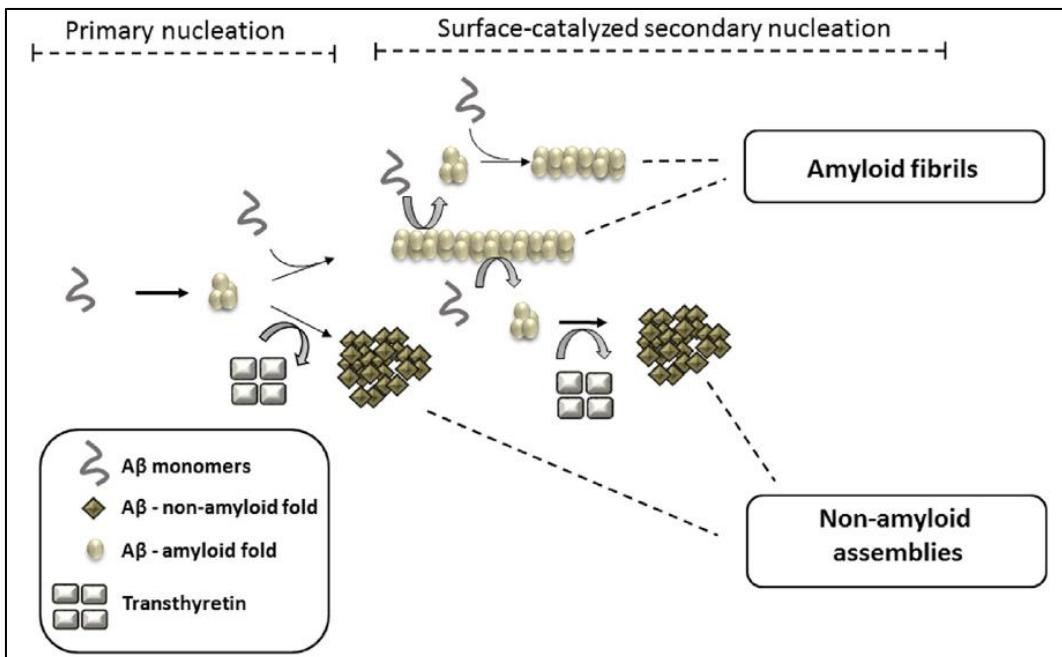


Figura 23. Esquema de los posibles procesos sobre los que actúa TTR durante la agregación de A_β (Nilsson et al., 2018).

En 2020, apareció la segunda publicación sobre el mecanismo de acción de la TTR en la agregación de A_β, utilizando diversas técnicas biofísicas describieron cuáles eran los pasos implicados a nivel microscópico en el proceso de agregación de la A_β en presencia de TTR (Ghadami et al., 2020). Según estos investigadores, la TTR inhibía unos pasos específicos de la agregación de A_β, es decir inhibía mayoritariamente la nucleación primaria y en parte la nucleación secundaria. Además, observaron que esta inhibición no afectaba a la elongación de las fibras (Figura 24).

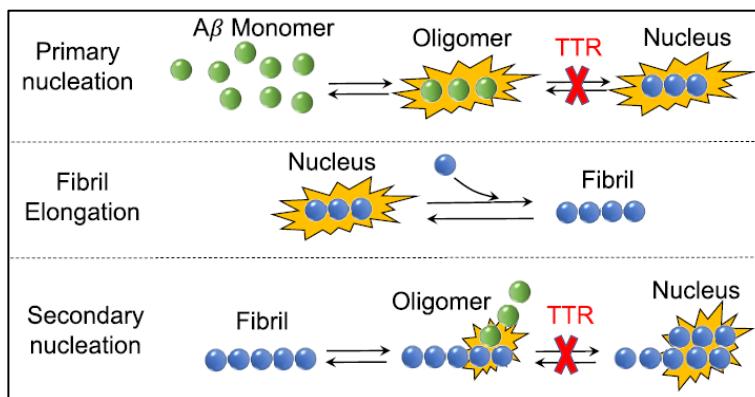


Figura 24: Mecanismo de acción de la TTR en la agregación de A_β a nivel microscópico (Ghadami et al, 2020)

Los experimentos de fluorescencia de Tioflavina T de la agregación del péptido A β (1-40) en presencia de TTR a diferentes proporciones TTR/A β 40 (Figura 25), se realizaron en ausencia y en presencia (entre un 2 y un 25%) de oligómeros preformados de A β (1-40) como semillas (“seeds”) de la agregación.

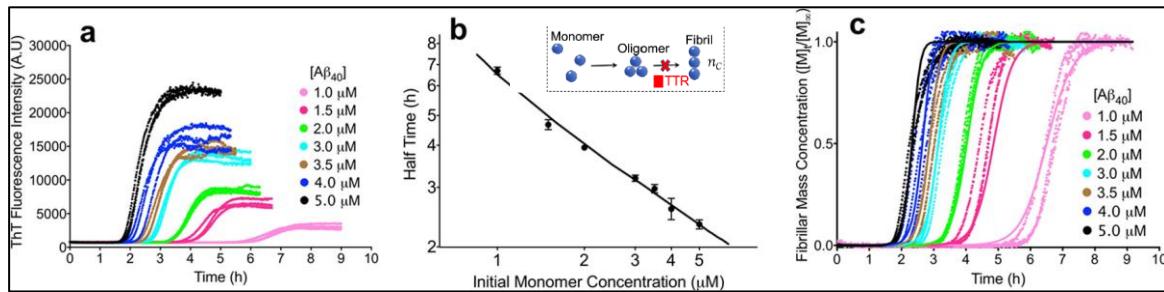


Figura 25: Ensayos de fluorescencia de Tioflavina T de la agregación del péptido A β (1-40) en presencia de TTR a diferentes proporciones TTR/Ab40. (en condiciones fisiológicas, 150 mM NaCl) (Ghadami et al., 2020).

En resumen, estos investigadores demuestran que a nivel microscópico tanto la nucleación primaria como la secundaria son inhibidas por la TTR, este es un mecanismo importante de la TTR en la agregación de A β . La TTR se une a los oligómeros de A β e inhibe la conversión de los oligómeros a fibras y esto tiene un efecto dual, ya que limita la toxicidad de los oligómeros y a su vez evita que los agregados proliferen con el tiempo.

3.6. Estudios en nuestro grupo de la interacción TTR/A β y su relación con la enfermedad de Alzheimer

Nuestro grupo había trabajado en otro proyecto de descubrimiento de fármacos dirigido a las amiloidosis relacionadas con la TTR. En este proyecto participaban cuatro grupos de investigación: el del Dr. A. Planas en el IQS-URL, el del Dr. J. Quintana de la Plataforma de Drug Discovery del Parc Científic de Barcelona (PCB) de la UB en estrecha colaboración con el grupo de investigación de la Dra. M. R. Almeida y la Dra. M. J. Saraiva del *Instituto de Investigação e Inovação em Saúde* (I3s) de la Universidad de Porto en Portugal. Dos aportaciones clave del trabajo del consorcio investigador en este proyecto fueron:

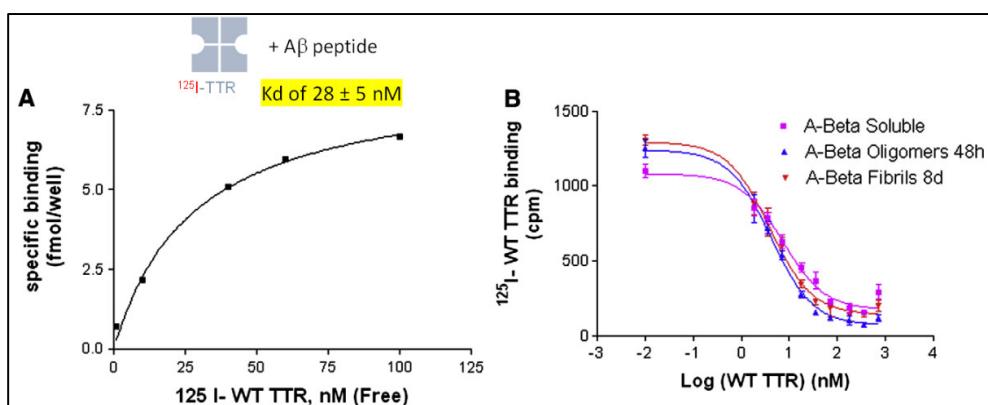
- a) El desarrollo de un ensayo de cribado de alto rendimiento para poder seleccionar entre una colección de moléculas pequeñas inhibidores de la agregación de la TTR (Dolado et al., 2005).
- b) Una base de datos con más de 900 moléculas estudiadas entre las que se encuentra nuestro compuesto líder, el iododiflunisal (IDIF) (Cotrina et al., 2013; Mairal et al., 2009; Vilaró et al., 2015).

En el mismo Instituto i3S, el grupo de investigación de la Dra. I. Cardoso estaba investigando el papel de la TTR en la fibrilogénesis de A β y en la toxicidad de la interacción. En 2008, este grupo demostró que la TTR se unía con la misma afinidad de unión tanto al monómero soluble como a los oligómeros y a las fibras (Kd, 28 nM) (Figura 26). La TTR neutralizaba la toxicidad de A β , inhibía la oligomerización de A β e interfería en el proceso de formación de fibras (Costa et al., 2008).

El efecto de distintas mutantes de TTR en la unión de TTR a A β había sido investigado en 2004 por Schwarzman et al, quienes sintetizaron más de 40 mutantes recombinantes de TTR y demostraron mediante diferentes técnicas *in vitro* que estas mutantes se unían de manera diferente a A β . Las mutantes E42GTTR y la L55P, unas variantes muy amiloidogénicas, no se unían a A β (Schwarzman et al., 2004).

El grupo de Cardoso investigó también la interacción de diferentes mutantes de TTR en la interacción con A β . Obtuvo la siguiente clasificación según la fuerza de unión a A β :T119M TTR > WT > V30M P Y78F > L55P, lo que indicaba que cuanto más amiloidogénica era la variante, menor era la interacción con el péptido A β . Dado que el potencial amiloidogénico correlaciona negativamente con la estabilidad tetramérica, estos resultados sugerían que a menor estabilidad de la TTR, la interacción TTR/A β era también menor. La variante L55P

TTR no inhibía la toxicidad en cultivo. Estos estudios sugerían que la especie necesaria para la interacción era el tetrámero. Por otra parte, se sabía que la estabilización genética de la TTR (debido a la presencia del alelo T119M que la hace muy estable) está asociada con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular y con un aumento en la esperanza de vida en la población general. Este hecho apoyaba la idea de la importancia de la estabilidad del tetrámero en la actividad biológica de la TTR (Hornstrup, Frikke-Schmidt, Nordestgaard, & Tybjaerg-Hansen, 2013; Ribeiro, Saraiva, & Cardoso, 2012).



Para probar que la estabilidad de la TTR era un factor clave en la interacción entre la TTR y el péptido A β , el grupo de la Dra. Cardoso investigó el efecto de determinados estabilizadores del tetrámero de la TTR en la unión de TTR con A β . Tras los ensayos concluyeron que un grupo de estabilizadores, entre los que se encuentra el IDIF nuestra molécula líder (Figura 27), era capaz de aumentar la unión de la TTR a A β (Ribeiro et al., 2012).

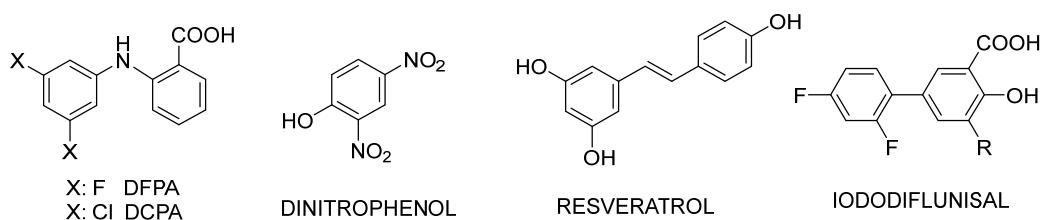


Figura 27. Compuestos estabilizadores de la TTR que potencian la unión de TTR a A β : ácido 2-[$(3,5$ -dclorofenil)amino]benzoico (DFPA); ácido 2-[$(3,5$ -difluorofenil)amino]benzoico (DCPA); dinitrofenol, resveratrol, iododiflunisal (IDIF).

Tras estos resultados, se seleccionó el IDIF para evaluar el efecto *in vivo* en un modelo de ratón de la EA caracterizado en el I3s en Portugal ($\text{A}\beta\text{PPswe/PS1A246E}$ con dos copias o una copia del gen de la TTR, AD/TTR $^{+/-}$ o AD/TTR $^{+/+}$, respectivamente). En este modelo, la formación de depósitos de A β tiene lugar a partir de los 6 meses de edad, por lo que el tratamiento oral con IDIF se inició a los 5 meses y tuvo una duración de 2 meses. En primer lugar, se corroboró que IDIF se unía a la TTR en plasma. El análisis de las muestras de CSF de ratones indicó que IDIF, tenía la habilidad de traspasar la BBB. El resultado más destacable fue que el tratamiento de los ratones AD/TTR $^{+/-}$ con IDIF reducía los niveles de A β y la formación de depósitos de A β , además los ratones mostraron una mejora en la respuesta cognitiva y la memoria. Estas mejoras no se observaron en animales AD/TTR $^{+/+}$. Por otra parte, los niveles de A β en plasma de ratones AD/TTR $^{+/-}$ se habían reducido, lo que sugería que la TTR podría promover la eliminación de la A β desde el cerebro a la periferia (Ribeiro et al., 2014).

En resumen, este estudio *in vivo* fue el punto de partida del proyecto de descubrimiento de fármacos en el que se enmarca la presente tesis doctoral.

Marco de trabajo

La presente tesis doctoral se enmarca en un proyecto multidisciplinar de **descubrimiento de fármacos** para el Alzheimer titulado “Programa de cribado racional de compuestos estabilizadores de la unión transtiretina-A β como potenciales fármacos moduladores de la enfermedad de Alzheimer”, financiado por la Fundació Marató de TV3.

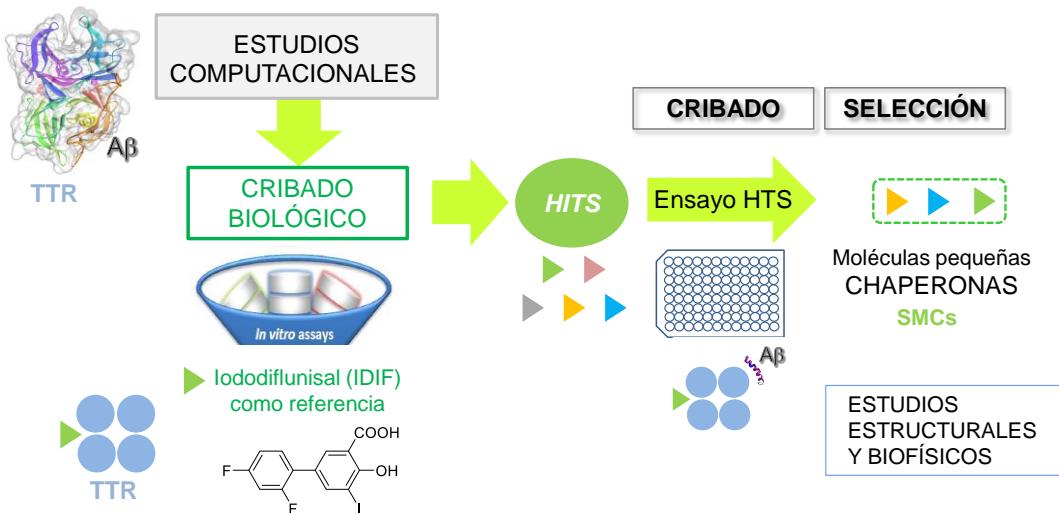
El objetivo principal del proyecto de descubrimiento de fármacos era doble. Por una parte, investigar los mecanismos moleculares de la función neuroprotectora de la TTR y los de la modulación por parte de moléculas estabilizadoras del tetramero de la TTR. Además, descubrir nuevos estabilizadores con el mismo comportamiento chaperona que nuestra molécula líder el Iododiflunisal (IDIF).

El consorcio investigador estaba formado por cinco grupos de investigación:

- Dra. I. Cardoso del Institute for Molecular Biology and Cell Biology (IBMC) del i3S-Instituto de Investigação e Inovação em Saúde de la Universidad de Porto (Porto, Portugal), para estudios biológicos *in vitro* e *in vivo*;
- Dr. J. Llop del CIC BiomaGUNE en San Sebastián, para los estudios de imagen molecular *in vivo* con animales modelo de la enfermedad;
- Dr. J. Jiménez-Barbero CIC BioGUNE en Bilbao, para estudios de biología estructural;
- Dr. J. Quintana de La Plataforma de Drug Discovery del Parc Científic de Barcelona (PCB) en la Universidad de Barcelona, para los estudios computacionales;
- Y la Dra. G. Arsequell, coordinadora del consorcio, del Institut de Química Avançada de Catalunya IQAC-CSIC (Barcelona) para los estudios en química médica.

Con el objetivo del descubrimiento de nuevas moléculas que potenciaran la unión TTR-A β , se implementó una plataforma de cribado virtual de moléculas (Dr. J. Quintana). Tras la selección virtual se llevó a cabo un cribado biológico con una batería de tests *in vitro* (Dr. I. Cardoso). Al mismo tiempo se realizaron estudios estructurales de la interacción TTR/A β y de la modulación de la interacción con nuestra molécula líder, el Iododiflunisal. Paralelamente estudios *in vivo* (Dr. J. Llop) con nuestra molécula líder el IDIF mostraban que éste aumentaba la permeabilidad de la TTR en la barrera hematoencefálica y además el tratamiento oral de los ratones con IDIF a lo largo del tiempo reducía la amiloidosis cerebral. Con estos resultados y para completar este proceso de descubrimiento de fármacos era esencial desarrollar y validar un ensayo *in vitro*, de forma que permitiese

evaluar las moléculas seleccionadas por la combinación de cribado computacional y ensayos *in vitro* biológicos. El cribado *in vitro* y estudios complementarios eran necesarios para poder priorizar una lista de nuevas chaperonas como nuestra molécula líder el Iododiflunisal (IDIF) (Esquema 2).



Esquema 2. Proyecto de descubrimiento de fármacos financiado por la Fundación Marató de TV3.

Aportaciones del grupo en el proyecto de descubrimiento de fármacos

Cabe destacar que durante el desarrollo de la presente tesis doctoral nuestro consorcio publica los siguientes trabajos (apartado de Anexos).

ESTUDIOS ESTRUCTURALES INTERACCIÓN TTR/A _β	Gimeno, A., Santos, L.M., Alemi, M., Rivas, J., Blasi, D., Cotrina, E.Y. , Llop, J., Valencia, G., Cardoso, I., Quintana, J., Arsequell, G., Jiménez-Barbero, J. Insights on the Interaction between Transthyretin and A _β in Solution. A Saturation Transfer Difference (STD) NMR Analysis of the Role of Iododiflunisal. <i>J. Med. Chem.</i> 2017 , 60(13), 5749-5758. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00428.
ESTUDIOS /IN VIVO CON IDIF EN RATONES MODELOS DE LA EA	Rios, X., Gómez-Vallejo, V., Martín, A., Cossío, U., Morcillo, M.Á., Alemi, M., Cardoso, I., Quintana, J., Jiménez-Barbero, J., Cotrina, E. Y. , Valencia, G., Arsequell, G., Llop, J. Radiochemical examination of transthyretin (TTR) brain penetration assisted by iododiflunisal, a TTR tetramer stabilizer and a new candidate drug for AD. <i>Sci. Rep.</i> 2019 , 9 (1), 13672. DOI: 10.1038/s41598-019-50071-w Rejc, L; Gómez-Vallejo, V.; Rios, X.; Cossio, U.; Baz, Z.; Mujica, E.; Gião, T.; Cotrina, E.Y. ; Jiménez-Barbero, J.; Quintana, J; Arsequell, G.; Cardoso, I.; Llop, J. Oral treatment with iododiflunisal delays beta amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer Disease: a Longitudinal in vivo molecular imaging study. <i>J. Alzheimer's Dis.</i> 2020 (Pub Date : 2020-08-10). DOI: 10.21203/rs.2.23011/v1.

Estudios estructurales interacción TTR/A β

La caracterización a nivel molecular de la interacción entre TTR y A β fue desarrollada por el grupo del Prof. J Jiménez-Barbero (CIC BioGUNE). Para este estudio estructural se utilizó la proteína recombinante TTR y diferentes secuencias cortas de péptidos A β , todas ellas preparadas en esta tesis doctoral. Se aplicaron diferentes técnicas de NMR y estos estudios se complementaron con estudios computacionales de modelización molecular.

Se estudió la interacción de diferentes secuencias peptídicas de A β con la TTR, identificándose el péptido A β (12-28) como el péptido de unión a TTR. Mediante técnicas de STD-NMR se descubrió que las secuencias específicas de reconocimiento en la A β (12-28) eran los residuos hidrofóbicos V18-F19-W20. La unión de TTR a A β fue también caracterizada en presencia de dos estabilizadores de la TTR, el EGCG y nuestra molécula líder el IDIF. EGCG interfería con la unión del péptido A β (12-28) mientras que IDIF no mostró interferencia en la formación del complejo ternario. De los estudios de NMR en combinación con los protocolos de modelización molecular se obtuvo el primer modelo virtual de la interacción TTR/A β en presencia de IDIF (Gimeno et al., 2017).

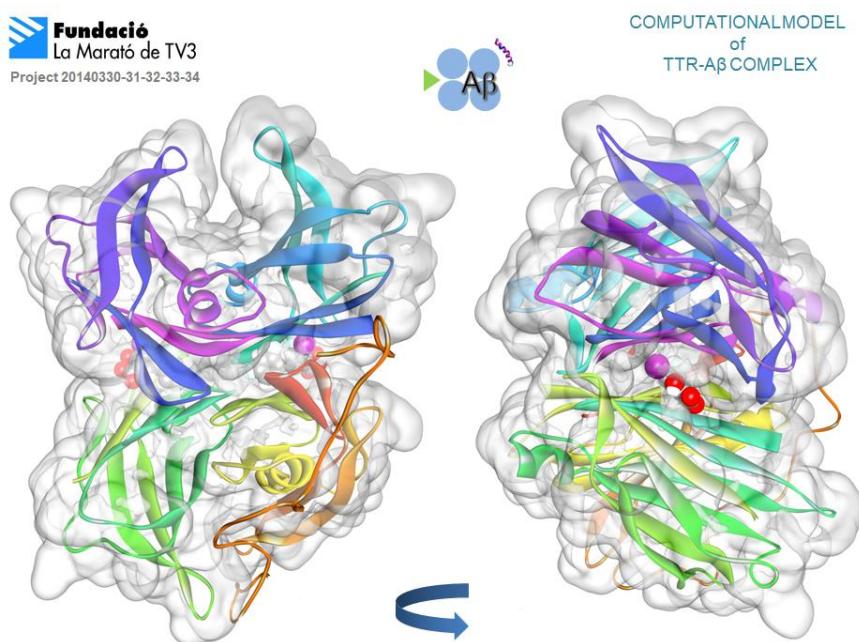


Figura 28. Modelo de interacción de TTR/A β obtenido (Gimeno et al., 2017).

Estudios *in vivo* con IDIF en modelos animales de la EA

Los estudios *in vivo* los llevaron a cabo el grupo del Dr. J. Llop (CIC BiomaGUNE) y el de la Dra. I. Cardoso (i3S).

En primer lugar, se estudió la biodistribución del IDIF *in vivo* utilizando ratones de laboratorio. Se sintetizaron para ello el IDIF y la TTR marcados con yodo radiactivo (¹³¹I) y se prepararon dos tipos de complejos radiactivos TTR/IDIF.

Tras su administración intravenosa en ratones, se utilizaron técnicas *ex vivo* e *in vivo*, para el estudio de la biodistribución de las distintas especies. Los resultados indicaron que la TTR tiene la capacidad de cruzar la BBB y que el complejo de TTR con IDIF aumenta su permeabilidad a través de la BBB. (Rios et al., 2019).

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio longitudinal de la eficacia *in vivo* de dos estabilizadores en ratones modelos de la EA mediante estudios de imagen molecular. Los animales modelos de la EA fueron suministrados por el grupo de la Dra. Cardoso del I3S (A β PPswe/PS1A246E/TTR+/-). Para el estudio un grupo de animales fueron tratados con nuestro estabilizador de la TTR, el IDIF; un segundo grupo con Tolcapone, un estabilizador de la TTR que es un fármaco para Parkinson, y un tercer grupo fue el grupo control (sin tratamiento).

La sintomatología y progresión de la EA en este modelo animal empieza a los 5 meses, momento que se inició el tratamiento y duró hasta los 14 meses de edad. En la evaluación se aplicó la técnica de imagen molecular PET empleando el radiofármaco [¹⁸F]-florbetaben, que permite identificar los depósitos de A β en el hipocampo y en la corteza cerebral. El estudio se completó con análisis inmunohistoquímico a los 14 meses. Estos resultados mostraron por primera vez que tras administración *in vivo* del IDIF, una molécula estabilizadora de la TTR, se retrasó la formación de depósitos de A β en el hipocampo del cerebro de animales modelo de la EA (Rejc et al., 2020).

Objetivos de esta tesis

Existen numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, tanto de nuestro grupo como de otros grupos internacionales, que avalan la implicación de la proteína transtiretina (TTR) en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Actualmente no existe ningún fármaco que modifique el curso de la enfermedad de Alzheimer. Los fármacos hoy en día disponibles tan solo tratan los síntomas.

Esta tesis se ha desarrollado en el marco de un proyecto multidisciplinar financiado por la Fundación Marató de TV3, para el descubrimiento de fármacos para la enfermedad de Alzheimer, y que tiene como diana terapéutica la transtiretina.

Los objetivos generales son:

- a) Estudiar la interacción entre la TTR y los péptidos Abeta amiloïdes y en particular estudiar el efecto potenciador de esta interacción con moléculas pequeñas estabilizadoras del tetrámero de la TTR, como el Iododiflunisal (IDIF), que es nuestro compuesto líder.
- b) Descubrir nuevas moléculas pequeñas, chaperonas de la interacción TTR/Abeta, que como el Iododiflunisal, sean candidatos a fármacos modificadores de la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos específicos:

Artículo I

Optimizar la producción de proteína recombinante humana TTR para obtener cantidades suficientes para su uso en estudios de cribado de alto rendimiento de moléculas pequeñas.

Artículo II

Investigar las bases estructurales de las interacciones entre la TTR y diferentes péptidos amiloïdes, mediante estudios biofísicos que permiten analizar el efecto de estabilizadores de la TTR en la potenciación de esas interacciones.

Artículo III

Diseñar un ensayo *in vitro* para el cribado de alto rendimiento (HTS, *High Throughput Screening*) de moléculas pequeñas, como potenciales chaperonas de la interacción TTR/Abeta.

Artículo IV

Descubrir nuevas chaperonas de la interacción TTR/Abeta, mediante el cribado de alto rendimiento de una serie de moléculas pequeñas, estabilizadoras de la TTR, que han sido propuestas por nuestro consorcio en este proyecto de descubrimiento de fármacos para la enfermedad de Alzheimer.

Artículos V y VI

Descubrir nuevas moléculas pequeñas estabilizadoras del tetrámero de la TTR. Nuevos inhibidores de la agregación de la TTR, como candidatos para el tratamiento de las amiloidosis relacionadas con la TTR.

La producción de wtTTR y la mutante Y78F, así como los estudios de agregación mediante turbidimetría, se han realizado en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Químico de Sarriá (IQS-URL). Los estudios de *Isothermal Titration Calorimetry* (ITC) se han realizado en el laboratorio de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona, y los estudios de agregación mediante ensayos de fluorescencia con Tioflavina T se han llevado a cabo en la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona.

Capítulo 3.

Artículo 1: Preparative scale production of recombinant human transthyretin for biophysical studies of protein-ligand and protein-protein interactions.

Cotrina, E.Y.; ^{1,2}, Vilà, M.; ¹, Nieto, J.; ¹, Arsequell, G.; ² and Planas, A. ¹

¹ Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, 08017 Barcelona, Spain.

² Institut de Química Avançada de Catalunya, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC), 08034 Barcelona, Spain.

International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(24), 9640
DOI: 10.3390/ijms21249640.

ISSN:1422-0067

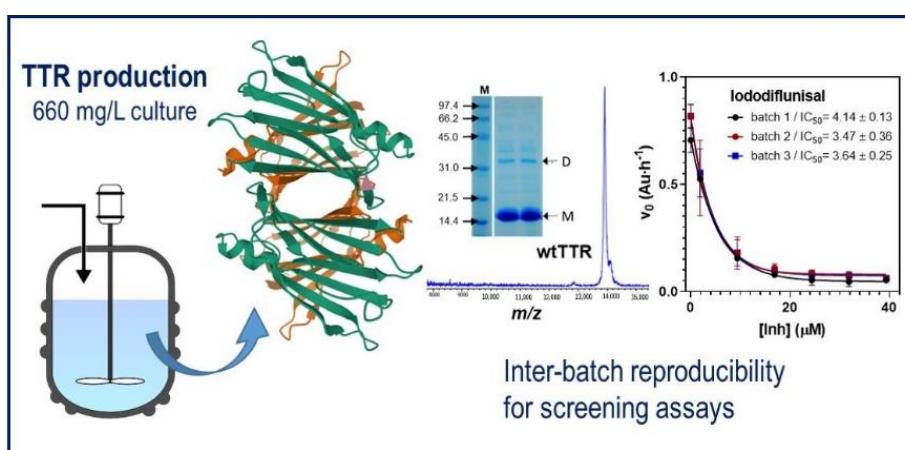
Category: Biochemistry & Molecular Biology

74/297

IF 4.653

Q1

Graphical Abstract





Article

Preparative Scale Production of Recombinant Human Transthyretin for Biophysical Studies of Protein-Ligand and Protein-Protein Interactions

Ellen Y. Cotrina ^{1,2}, Marta Vilà ^{1,†}, Joan Nieto ^{1,‡}, Gemma Arsequell ² and Antoni Planas ^{1,*}

¹ Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, 08017 Barcelona, Spain; eycc7.lost@gmail.com (E.Y.C.); martavila87@gmail.com (M.V.); z_ener@hotmail.com (J.N.)

² Institut de Química Avançada de Catalunya, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC), 08034 Barcelona, Spain; gemma.arsequell@iqac.csic.es

* Correspondence: antoni.planas@iqs.edu

† Current address: GSK, 1330 Rixensart, Belgium.

‡ Current address: Loxo Oncology at Lilly, Boulder, CO 80301, USA.

Received: 29 November 2020; Accepted: 16 December 2020; Published: 17 December 2020



Abstract: Human transthyretin (hTTR), a serum protein with a main role in transporting thyroid hormones and retinol through binding to the retinol-binding protein, is an amyloidogenic protein involved in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP), familial amyloidotic cardiomyopathy, and central nervous system selective amyloidosis. hTTR also has a neuroprotective role in Alzheimer disease, being the major A β binding protein in human cerebrospinal fluid (CSF) that prevents amyloid- β (A β) aggregation with consequent abrogation of toxicity. Here we report an optimized preparative expression and purification protocol of hTTR (wt and amyloidogenic mutants) for in vitro screening assays of TTR ligands acting as amyloidogenesis inhibitors or acting as molecular chaperones to enhance the TTR:A β interaction. Preparative yields were up to 660 mg of homogenous protein per L of culture in fed-batch bioreactor. The recombinant wt protein is mainly unmodified at Cys10, the single cysteine in the protein sequence, whereas the highly amyloidogenic Y78F variant renders mainly the S-glutathionated form, which has essentially the same amyloidogenic behavior than the reduced protein with free Cys10. The TTR production protocol has shown inter-batch reproducibility of expression and protein quality for in vitro screening assays.

Keywords: transthyretin; recombinant expression; fed-batch culture; protein yield; protein-ligand interactions; protein-protein interactions; amyloid diseases

1. Introduction

The availability of large amounts of proteins that have potential biomedical applications is often limited in the initial steps of research. Particularly demanding is the setup of in vitro screening programs to investigate protein-protein interactions, ligand binding and other properties to evaluate their potential as pharmaceutical agents [1,2]. This is the case of amyloidogenic proteins involved in several degenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases, spongiform encephalopathies and familial amyloidotic polyneuropathies [3].

Human transthyretin (hTTR) is a 55 kDa homotetrameric serum protein with a main role in transporting thyroid hormones (T4 and T3) and retinol through binding to the retinol-binding protein (RBP) [4,5]. It is involved in pathologies such as senile systemic amyloidosis (SSA) and familial amyloidotic polyneuropathy (FAP), the latter being an autosomal dominant lethal disease in which amyloid fibrils are mostly constituted by mutant TTR variants [6–8], TTR cardiac amyloidosis [9]

and other TTR-related cerebral amyloidosis [10]. One of the therapeutic strategies to ameliorate the progress of TTR-associated amyloidosis is the stabilization of the soluble tetrameric form of the protein to prevent aggregation and fibril formation [11–13]. Several screening programs have evaluated different classes of small-molecule ligands able to inhibit the amyloidogenic process at some stage. To date, only two small molecules, the orphan drug Tafamidis [14] and the NSAID diflunisal [15,16], have obtained approval for clinical use [17]. Tafamidis (Vyndaqel, Pfizer Inc., New York, NY, USA) is the only TTR tetramer stabilizer approved for use in patients with TTR polyneuropathy [18] and in patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy [19,20]. The drug Tolcapone (registered as TASMAR), an orally active catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitor approved for Parkinson's disease, is also an efficient TTR tetramer stabilizer and has been repurposed for FAP [21,22] and for cerebral amyloidosis [23]. Recently, the small-molecule AG10, a potent and highly selective TTR stabilizer that was designed to mimic the structural influence of the protective T119M mutation [24] is now in phase 3 trials [25]. Another interesting molecule is the palindromic molecule mds84 now in preclinical development [26].

hTTR has also shown to have a neuroprotective role in Alzheimer disease (AD). AD is a multifactorial neurodegenerative disorder [27] characterized by the formation and deposition of amyloid- β peptide (A β), the formation of neurofibrillary tangles in the brain [28,29], and by synaptic dysfunction accompanied with neuroinflammation [30,31]. TTR is the major A β binding protein in human cerebrospinal fluid (CSF) [32] that prevents A β aggregation with consequent abrogation of toxicity [33–36].

Studies aimed at finding TTR ligands acting as amyloidogenesis inhibitors for therapeutic intervention in TTR-associated amyloidotic polyneuropathies or acting as molecular chaperones to enhance the TTR:A β interaction and improve the neuroprotective effect in AD do require large amounts of hTTR protein to conduct in vitro screening assays. TTR expression in recombinant *Escherichia coli* is often hampered by low production yields. Few studies have reported to achieve high cell density cultures with moderate recombinant TTR productivity. The first protocols produced secreted protein into the culture medium to facilitate purification but with low production yields, in the range of 5 mg/L in flask cultures [37,38]. Intracellular expression improved production yields of purified protein after two chromatographic steps to 60 mg/L of culture. Other protocols were aimed at improving the purification process by the addition of tag extensions for affinity chromatography in the purification protocol with yields of 130 mg/L of culture [39], but the additional enzymatic steps to release the native protein lowered productivity and raised production costs [40]. We reported the production of native human TTR where a single N-terminus methionine was added for recombinant expression in *E. coli* cells as compared to the native sequence of mature human TTR after signal peptide processing with production yields of purified protein in the range of 150 mg/L [41]. Here, we optimize the production strategy initially developed in flask cultures and adapt it to fed-batch bioreactor production.

2. Results and Discussion

2.1. Culture Medium and Induction Conditions

The gene coding for human TTR was cloned in a pET38b vector for high protein expression where no tags and just an N-terminus methionine was added in order to express the closest form to mature human TTR [41]. Here, we analyze the expression and purification of wt TTR and the highly amyloidogenic Y78F mutant with the objective of defining a standardized protocol for high protein expression and purification of homogeneous protein with >98% purity.

Our initial protocol for recombinant expression in flask cultures used rich Luria broth (LB) or 2 \times YT medium supplemented with kanamycin and IPTG induction at 37 °C [41]. When modifying the inducer concentration and post-induction temperature, best results in terms of final TTR yield and reproducibility were obtained when the culture medium was inoculated with an overnight culture of fresh *E. coli* transformants and cells were grown at 37 °C until an OD600 of 0.6 before induction

(Figure 1A). IPTG induction at final concentrations of 0.3 or 1 mM gave essentially the same results but lowering the post-induction temperature to 30 °C and extending the growth up to 14–16 h gave the best results. The harvested cells by centrifugation were directly used for protein purification (see below). After purification, average protein yields were in the range of 60 to 200 mg/L of culture (wt, Y78F and other mutant variants).

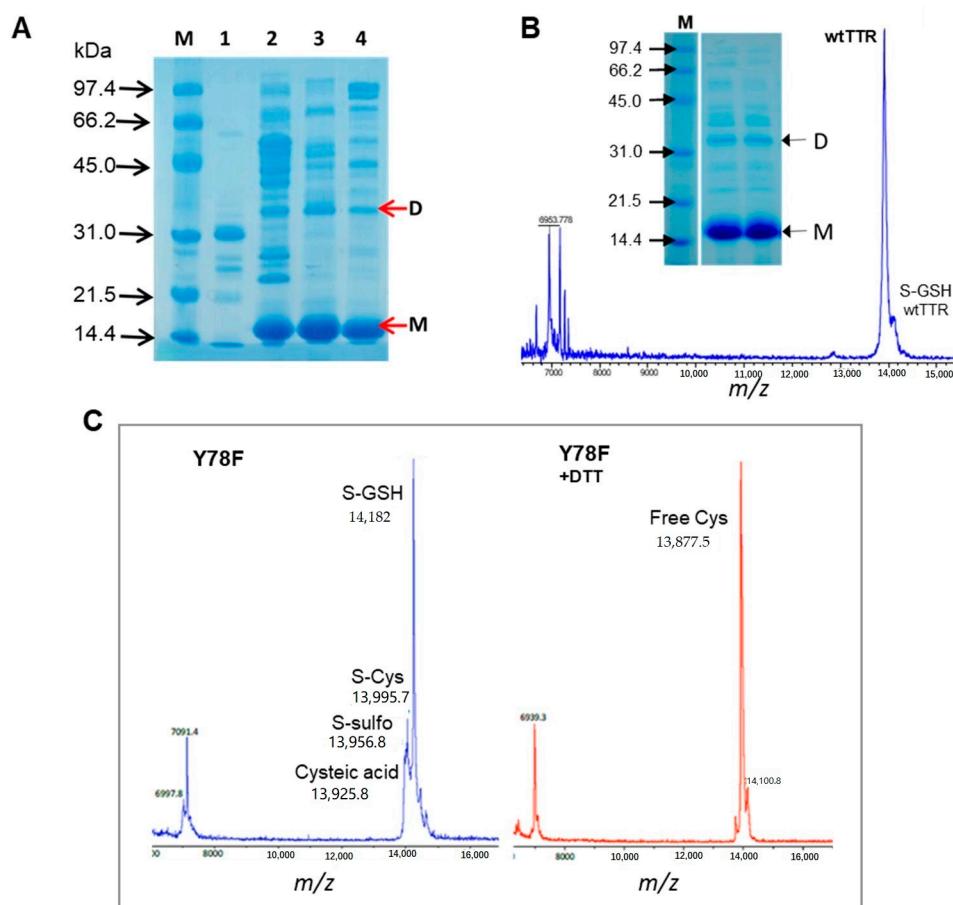


Figure 1. (A) Induction time for transthyretin (TTR) expression in flask cultures. SDS-PAGE of protein fractions after partial purification by anion exchange chromatography from cultures induced with IPTG. Lanes: M: molecular weight marker, 1. no IPTG induction (no TTR expression), 2. Induction at late exponential phase, 3. mid exponential phase, 4, beginning of the exponential growth. M: monomer, D: dimer. (B) MALDI-TOF MS and SDS-PAGE of purified wtTTR. (C) MALDI-TOF MS of Y78F TTR (left) and reduced Y78F TTR (right).

2.2. Production in Fed-Batch Bioreactor

To adapt the protocol for expression in a bioreactor, an optimized defined medium (DM) for *E. coli* BL21(DE3) cells was used [42]. A fed-batch strategy in a 10 L bioreactor was optimized. The first strategy consisted of an initial batch growth at 37 °C in DM supplemented with 25 g/L glucose until glucose was consumed (about 6 to 8 h incubation) followed by a fed-batch step for 7 h at 37 °C with glucose in DM medium. Feeding was controlled by the level of dissolved oxygen (dO₂) to keep it at 5–10%, and the pH was maintained constant at 7.0 by addition of ammonium hydroxide. Induction by IPTG was performed stepwise, with a first addition to 0.4 mM IPTG after 2 h from the beginning of the fed-batch, and two subsequent additions at 3 and 5 h to reach a total added concentration of 1 mM. Under these conditions, the cultures reached an OD of 30, and the production of isolated protein after purification was about 500 mg/L of culture.

Higher cell densities in the fed-batch step were obtained with an enriched feeding medium composed of DM with 25 g/L glucose supplemented with tryptone (8 g/L) and yeast extract (5 g/L). The fed-batch started when the initial glucose was consumed and IPTG at a final 1 mM concentration was added at the beginning of the fed-batch in a single addition. The fed-batch lasted 4.5 h before harvesting the cells. After purification (see below), the final production yield was 660 mg/L of culture for the Y78F mutant hTTR. The final protocol described in the Materials and Methods section was reproducible for the wt and different TTR mutants, with average production yield of purified proteins in the range of 200–660 mg/L of culture, depending on the protein variant. This is the highest reported production yield for recombinantly expressed hTTR enabling the application of screening protocols that demand high amounts of protein.

2.3. Protein Purification

The cells harvested by centrifugation (either from flask or bioreactor cultures) were lysed by sonication or with a cell homogenizer (in the case of large cultures). After centrifugation, the supernatant was subjected to fractional ammonium sulfate precipitation (40, 55 and 85% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). TTR precipitated in the third fractions (between 55 and 85%). The precipitate was dissolved in Tris buffer and dialyzed against the same buffer. The first chromatographic step was anion exchange chromatography with Q-Sepharose at pH 7.6. At this high pH, about 2 pH units above the TTR isoelectric point (calculated pI of 5.4), the pH may vary from 7.2 to 8.0 with no effect on final protein yields. In the standardized protocol (see methods) TTR was eluted with a gradient from 0.1 to 0.5 M NaCl in Tris buffer pH 7.6. The combined TTR-containing fractions were extensively dialyzed and lyophilized. The lyophilization step was introduced after checking that it did not affect the properties of the final protein (solubility, amyloidogenic behavior) since it simplifies the concentration of the diluted protein before gel filtration chromatography. The lyophilized protein was dissolved in a small volume of Tris buffer pH 7.6, 0.1 M NaCl and loaded into a Superdex 75 gel filtration column. The eluted protein was dialyzed against water and lyophilized for storage and dissolved in the corresponding buffer before use.

2.4. Protein Quality Assessment

The quality and performance of the different protein batches (wt and Y78F mutant hTTR) was assessed by SDS-PAGE electrophoresis, MALDI-TOF mass spectrometry, and a fibrillogenesis assay.

Native TTR is an homotetramer that appears as a dissociated monomer with traces of dimer under standard SDS-PAGE conditions with a loading buffer containing 2% (*w/v*) SDS and heating the samples at 100 °C for 2 min. An example of purified protein after the expression and purification protocol is shown in Figure 1B for wt TTR.

Native hTTR occurs *in vivo* as a very heterogeneous protein due to post-translational modifications (PTM) at Cys-10, the single Cys residue in the protein sequence. It has been reported that only around 10–15% of the circulating TTR in plasma remains unmodified at Cys-10, finding S-sulfonation (S-Sulfo), S-glycinylcysteinyl (S-CysGly), S-cysteinyl (S-Cys) and S-glutathionylation (S-GSH) as the most prevalent forms [43–45]. Despite carrying out protein expression in *E. coli*, the produced proteins, both wt and Y78F mutant, were modified at Cys-10. Figure 1B,C show two examples of MALDI-TOF mass spectra of representative batches of wt and Y78F hTTR. The wt protein consistently gives the unmodified form as the main component with minor glutathionated protein (S-GSH). However, the Y78F mutant produces mainly the glutathionated form and the S-Cys, S-Sulfo and cysteic acid forms as minor components. Treatment of Y78F hTTR with DTT reduces the S-GSH form to free TTR as shown in Figure 1C.

The amyloidogenic capacity is used as a quality parameter of the different protein batches. In vitro assays with purified TTR (wt or clinically relevant TTR mutants) monitor acid-induced aggregation and fibrillation, commonly by lowering the pH to 4.2–4.4 for wt and low amyloidogenic mutants, or higher pH values (6–7) for highly amyloidogenic mutants. These methods include turbidimetric

assays and thioflavin T binding assays (reviewed in [46]). Here, acid-induced aggregation was evaluated by a turbidimetric assay monitoring changes in absorbance at 340 nm [41]. The fibrillogenesis capacity is quantified by the initial rate of aggregate/fibril formation in a short-term assay (1.5 h), whereas an end-point assay evaluates the total aggregate formation after long incubations (72 h) at acidic pH. By initial rates, two different protein batches of Y78F hTTR are compared in Figure 2A. The variation between batches is about 15%, and the glutathionated (*S*-GSH) protein is about 1.25-fold more amyloidogenic than the reduced protein (free SH). When fibrillogenesis of *S*-GSH and reduced proteins was monitored up to 72 h, both protein forms reach the same amount of final aggregates/fibrils (Figure 2B). In conclusion, recombinant hTTR expressed and purified according to the protocol here described has the required quality for its use in fibrillogenesis assays with reproducible results with variations in the initial aggregation rate not larger than 15% between different protein batches, as assessed from more than 10 productions used in screening campaigns.

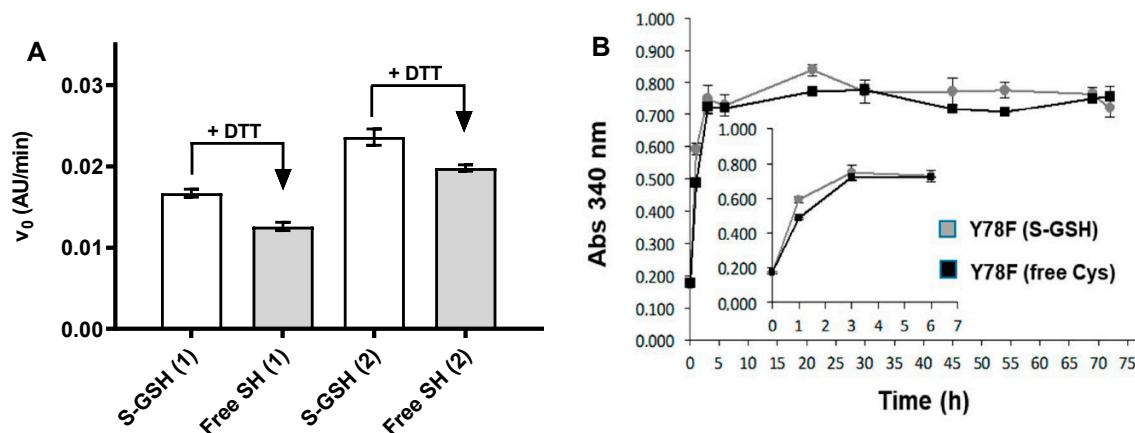


Figure 2. Acid-induced fibrillogenesis of Y78F TTR isoforms *S*-GSH (glutathionated) and free Cys (reduced with DTT). (A) Initial rate of acid-induced fibrillogenesis determined for two different protein batches (1 and 2). (B) Absorbance monitoring for 72 h. Inset. Magnification of the initial region.

2.5. Applications to Screening Assays

The high expression yields of recombinant hTTR, either wt, highly amyloidogenic variants or clinically relevant mutants obtained with our optimized protocol (200–660 mg/L of culture depending on the mutant) as homogeneous proteins have enabled their application in screening programs for the evaluation of libraries of TTR amyloidogenesis inhibitors as well as the evaluation of small-molecule chaperones enhancing the interaction between TTR and Amyloid- β (A β) peptides.

2.5.1. Kinetic Turbidimetry Assay for Screening TTR-Amyloidogenesis Inhibitors

Based on the acid-induced properties of hTTR, this assay evaluates the ability of small molecules to inhibit fibrillogenesis/aggregation in a dose-dependent manner to quantify two relevant inhibition parameters: IC₅₀, concentration of inhibitor at which the initial rate of fibril formation is one-half than that without inhibitor, and RA(%), percent reduction of fibril formation rate at high inhibitor concentration relative to the rate in the absence of inhibitor. The initial protocol reported in [41] has been extensively applied over the years [47–50]. Key for comparative evaluation of inhibitors from different screening campaigns is the homogeneity and quality of the recombinant hTTR used. Figure 3 illustrates selected examples of TTR tetramer stabilizers (diflunisal, iododiflunisal, tafamidis and tolcapone). The optimized assay protocol (see Section 3.6) has been shown to provide reproducible results with coefficients of variation (CV) ≤ 10% for IC₅₀ values in the range of 3–15 μ M and for RA(%) values in the range of 60–100% when using different protein batch productions.

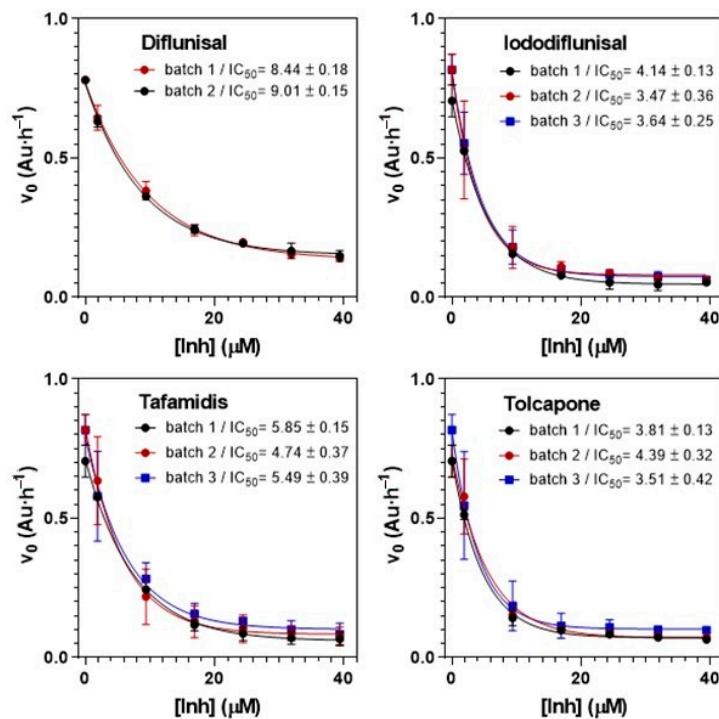


Figure 3. TTR fibrillogenesis inhibitors. Reproducibility of IC_{50} (μM) determination with different TTR Y78F protein batches. Initial rate of acid-induced fibrillogenesis at increasing concentrations of inhibitor.

2.5.2. Turbidity-Based Assay for Screening Small-Molecule Chaperones Enhancing the TTR: $\text{A}\beta$ Interaction

Inspired by the previous assay, we developed a rapid and simple high-throughput assay to screen for small-molecules that may act as chaperones of the TTR: $\text{A}\beta$ interaction. The assay monitors $\text{A}\beta(12-28)$ aggregation in the presence of both wt TTR and a small molecule compound (SMC). The small-molecule chaperones form ternary soluble complexes TTR/ $\text{A}\beta$ /SMC that prevent $\text{A}\beta$ aggregation. The method uses the shorter $\text{A}\beta(12-28)$ sequence, a cheaper model system for aggregation by $\text{A}\beta(1-40)$. The test is carried out in 96-well plates that are UV monitored for turbidity for 6 h. Figure 4 shows selected examples with TTR ligands (diflunisal, iododiflunisal and tafamidis). The aggregation kinetics can be monitored with parallel results by other assays as thioflavin T (ThT) fluorescence assays of the amyloid structures formed [36].

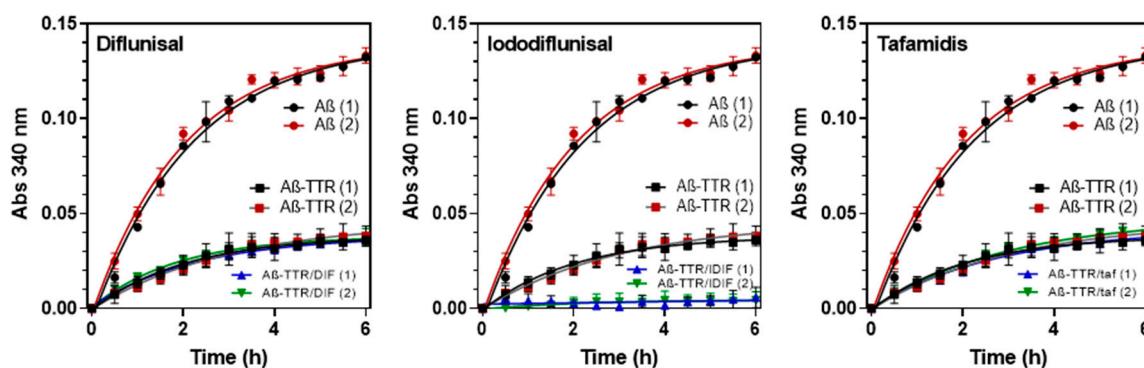


Figure 4. Small-molecule chaperones of TTR: $\text{A}\beta$ interaction. Reproducibility with two different wt TTR protein batches (1, 2). % reduction of aggregates formation (RA%) relative to $\text{A}\beta(12-28)$ after 6 h incubation: $\text{A}\beta(12-28) + \text{TTR} = 78.1 \pm 2.9$; $\text{A}\beta(12-28) + (\text{TTR} + \text{DIF}) = 78.3 \pm 2.5$; $\text{A}\beta(12-28) + (\text{TTR} + \text{IDIF}) = 96.5 \pm 3.1$; $\text{A}\beta(12-28) + (\text{TTR} + \text{tafamidis}) = 77.5 \pm 1.7$.

3. Materials and Methods

3.1. Protein Expression

Recombinant wt and Y78F mutant TTR were expressed from pHTR.wt-I and pHTR.Y78F-I plasmids based on a pET38b(+) (Novagene, Merk Biosciences, Darmstadt, Germany) vector as reported [41]. Both wt and Y78F TTR proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells harboring the corresponding plasmids with kanamycin resistance as selection marker. Final protocols for protein expression were:

3.1.1. Batch Expression in Flask Cultures

A total of 2 mL LB (or 2× YT) medium supplemented with 100 µg/mL kanamycin (Kan) was inoculated with a single colony from an LB-agar plate of freshly transformed *E. coli* cells and grown overnight at 37 °C. 100 µL of the initial culture were used to inoculate 50 mL of 2xYT+ 100 µg/mL Kan at 37 °C until an optical density (OD600) of ~4. Finally, 1.3 L of 2xYT+ 100 µg/mL Kan were inoculated with 5 mL of the previous culture in a 2 L Erlenmeyer flask with deflectors for improved aeration. Cells were grown at 37 °C with shaking at 200× rpm until an OD600 of 0.6 (about 6 h). IPTG was added to a final 1 mM concentration and the culture incubated at 30 °C for 14–16 h. Cell were harvested by centrifugation at 4 °C, 10,000× rpm for 10 min and directly used for protein purification.

3.1.2. Expression in Fed-Batch Bioreactor

The defined medium (DM) is composed of 13.23 g/L K₂HPO₄, 2.65 g/L KH₂PO₄, 2.04 g/L NaCl, 4.1 g/L (NH₄)SO₄, 0.026 g/L FeCl₃, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.01 g/L thiamine, 25 g/L glucose and 2.86 mL/L Trace Elements Solution composed of 0.04 g/L AlCl₃·6H₂O, 0.16 g/L CoCl₂·6 H₂O, 0.01 g/L H₃BO₃, 0.01 g/L NiCl₂·7H₂O, 0.87 g/L ZnSO₄·7H₂O, 1.55 g/L CuSO₄·5H₂O, 1.42 g/L MnCl₂·4H₂O, 0.02 g/L NaMoO₄, 1.44 CaCl₂·2H₂O. A 10 L bioreactor (Applikon Biotechnology, Delft, The Netherlands) containing 4 L of DM supplemented with 100 mg/L Kan was inoculated with 50 mL of freshly prepared culture in DM medium at OD600 of 0.6. The batch culture was grown at 37 °C with increasing agitation (300 to 1000 rpm) to maintain the dO₂ at 5–10%. When glucose was consumed and the dissolved oxygen increased, the fed-batch was initiated with a feeding solution of DM supplemented with 100 mg/L kanamycin, 8 g/L tryptone and 5 g/L yeast extract, the temperature was set at 30 °C and the culture induced with IPTG (1 mM final concentration) at the beginning of the fed-batch step. During all the culture the pH was maintained at 7.0 with NH₄OH (30% stock solution). During the fed-batch, agitation was maintained at 1000 rpm, and pO₂ at 5–10% by supplying additional oxygen if dO₂ < 5% or adding feeding solution if dO₂ > 5%. At 4.5 h after IPTG induction, cells were harvested by centrifugation at 4 °C, 10,000 rpm for 15 min and the pellet directly used for protein purification.

3.2. Protein Purification

All volumes in the purification steps are given for processing the cell pellet coming from 1L culture. The cell pellet was resuspended in 250 mL lysis buffer (0.5 M Tris-HCl, 1 mM PMSF, pH 7.6), and lysed with a cell disrupter at 20 kpsi (Constant Systems Ltd., Daventry, Northants, UK). Viscosity of the homogenate was reduced by applying short sonication cycles before centrifugation at 4 °C, 12,000× rpm for 30 min to collect the supernatant.

(i) Ammonium sulphate precipitation. Three precipitation steps at 4°C were performed by addition of (NH₄)₂SO₄ up to 40, 55 and 85%. The precipitate fraction after the last step (55 to 85% fraction) contained most of the TTR protein (as judged by SDS-PAGE). The precipitate was resuspended in 50 mL of buffer A (20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.6), and dialyzed (3×) against buffer A at 4 °C using a MWCO 6–8 kDa, 40 mm Cellu.Sep Regenerated Cellulose Tubular Membranes (Membrane Filtration Products, Inc., Seguin, TX, USA).

(ii) Anion exchange chromatography. The dialyzed solution was loaded to a XK 26/40 column (120 mL) with Q-Sepharose High Performance resin using an ÄKTA FPLC System (Cytiva, Marlborough,

MA, USA). Buffer A was used for column conditioning (at 1 mL/min) and protein loading (at 2 mL/min). Elution (1 mL/min) was done with a NaCl linear gradient (0.1 M to 0.5 M NaCl in Buffer A). Fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE. All fractions containing TTR were combined and dialyzed against deionized water at 4 °C (MWCO 6–8 kDa) three times for 8 h. The final solution was lyophilized.

(iii) Gel filtration chromatography. The lyophilized sample was dissolved in 4 mL of Buffer A and loaded at 2 mL/min flow rate onto a XK 26/100 column (440 mL) with Superdex 75 prep Grade resin using an ÄKTA FPLC System (GE Healthcare Life Sciences). Protein elution was performed with Buffer A at 0.3 mL/min and eluted fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE. Fractions containing TTR were combined and dialyzed against deionized water at 4 °C (MWCO 6–8 kDa, 3× for 8 h each) and lyophilized for storage at –20 °C.

3.3. Reduction with 1,4-Dithiothreitol (DTT)

A 4 mg/mL TTR solution in 20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.6 was treated with 1 mM DTT during 1 h at room temperature. Completion of the reduction reaction was checked by MALDI-TOF MS. The reduced solution was dialyzed against 20 mM K₂HPO₄, 0.1 M KCl, pH 7.6 buffer at 4 °C.

3.4. MALDI-TOF Mass Spectrometry of Purified Proteins

A saturated solution of sinapinic acid (SA) as matrix in 30:70 (v/v) acetonitrile:water, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and a protein solution in 30:70 (v/v) acetonitrile:water, 0.1% TFA were prepared and mixed in a 1:1 ratio. A total of 1 μL of the previous mixture was deposited into a polished stainless-steel target (Bruker, Bremen, Germany) and allowed to dry. Then, 1 μL of SA matrix solution was deposited into the sample and allowed to dry. The same procedure was followed for the Protein Standard Calibration I solution (Bruker) used for Calibration. The target was introduced in a Autoflex MALDI-TOF (Bruker), spectra were acquired in lineal mode (Flex control, Bruker) and processed by Flex Analysis (Bruker).

3.5. Acid-Induced TTR Fibrillogenesis Assay

TTR stock solution: 4 mg/mL in 20 mM phosphate, 100 mM KCl, pH 7.6. Incubation buffer: 10 mM phosphate, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7.6. Dilution buffer: 400 mM sodium acetate, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 4.2. The assay was performed in 96-well microplates. 20 μL of TTR stock solution were added into each well. The final DMSO content of each well was adjusted up to 5% (final assay concentration) with DMSO:H₂O (1:1). Incubation buffer was added up to a volume of 100 μL. The 96-well plate was introduced into the thermostated microplate reader for 30 min at 37 °C, with orbital shaking for 15 s every min. Fibril formation was then induced by addition of 100 μL of dilution buffer to each well. The 96-well plate was placed again into the microplate reader and incubated at 37 °C with shaking (15 s every minute) during 1.5 h. Absorbance at 340 nm was monitored at each minute. All assays were run in triplicate.

For end-point assays, the same procedure was performed in sealed HPLC vials in order to avoid evaporation. A total of 40 μL of TTR stock solution was added to each vial. The final DMSO content was then adjusted up to 5% with DMSO:H₂O (1:1). Incubation buffer was added up to a volume of 200 μL. The vials were sealed and incubated at 37 °C for 30 min. Afterwards, fibril formation was induced by addition of 200 μL of dilution buffer to each vial. After soft mixing, 200 μL of each vial were placed into a well in a 96-well plate and absorbance at 340 nm was measured (starting point, *t* = 0). After measurement, the 200 μL were placed back into its corresponding HPLC vial, which was sealed again and placed at 37 °C. Measurements were performed at 1, 3, 6, 21, 30, 45, 54, 69 and 72 h following the same procedure. All assays were run per duplicate.

3.6. Kinetic Turbidimetry Assay for Screening TTR Fibrillogenesis Inhibitors

Protein stock solution, incubation buffer and dilution buffer were prepared as above. Protocol for one inhibitor: 20 μ L of hTTR Y78F stock was dispensed into seven wells of a 96-well microplate. A total of 20 μ L of inhibitor solutions in DMSO:H₂O (1:1) was added to give final concentrations ranging from 0 to 40 μ M and DMSO final content of 5% (in the final 200 μ L assay). Incubation buffer (60 μ L) was then added up to a volume of 100 μ L. The plate was incubated at 37 °C in a thermostated microplate reader with orbital shaking 15 s every minute for 30 min. 100 μ L of dilution buffer were dispensed to each well, and the mixture was incubated at 37 °C with shaking (15 s every min) in the microplate reader. Absorbance at 340 nm was monitored for 1.5 h at 1 min intervals. Data were collected and analyzed using Microsoft Excel software. All assays were done in duplicate. From the initial rates (Abs vs. time) at different inhibitor concentrations, the inhibition parameters IC₅₀ and RA (%) were calculated as reported [41,47–51].

3.7. Turbidimetry Assay for Screening Small-Molecule Chaperones of TTR:A β Interaction

The following stock solutions were used: Buffer A: 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4. Protein (wt hTTR) stock: 9.5 mg/mL (170 μ M) in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5% DMSO (final concentration) was prepared in the absence of salt (buffer A). A β (12–28) stock: 0.4 mg/mL (200 μ M) in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5% DMSO (final concentration). For the small-molecule compound, a first 10 mM solution in DMSO was prepared and the final stock was prepared by mixing 50 μ L of the previous DMSO solution with 950 μ L of buffer A (final 5% DMSO). First, the small-molecule compound and TTR complex was formed. To this end, 60 μ L of TTR stock was dispensed into the wells of a 96-well microplate. A total of 40 μ L of small-molecule stock was added to give final concentrations of 100 μ M. The plate was introduced in the thermostated microplate reader (SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) and incubated for 1 h at 37 °C with orbital shaking 15 s every 30 min. Then, 100 μ L of A β solution was added to the well to give 100 μ M ligand:50 μ M TTR:100 μ M A β final concentrations. The plate was incubated at 37 °C in the microplate reader with orbital shaking 15 s every minute for 30 min. The absorbance at 340 nm was monitored for 6 h at 30 min intervals. Data were collected and analyzed using MS Excel software (Microsoft, Redmond, WA, USA). All assays were done in duplicate. From the different absorbance readings between sample and controls, the percent reduction of aggregates formation (RA%) in the presence and absence the small-molecule compound/TTR complex were determined.

4. Conclusions

The optimized expression and purification protocol for recombinant hTTR production (wt and amyloidogenic mutants) yields up to 660 mg of homogenous protein per L of culture in fed-batch bioreactor. Whereas the recombinant wt protein is mainly unmodified at Cys10, the highly amyloidogenic Y78F variant renders mainly the S-glutathionated form. When comparing the S-glutathionated and reduced Y78F proteins, amyloidogenicity (as determined by a turbidimetry assay) is little affected by this post-translational modification. The inter-batch reproducibility of expression and protein quality has allowed the implementation of screening assays for the evaluation of libraries of TTR amyloidogenesis inhibitors, as well as the evaluation of small-molecule chaperones of the TTR:A β interaction.

Author Contributions: E.Y.C., M.V., J.N., investigation, G.A. analysis, reviewing the manuscript, A.P., conceptualization, supervision, writing the manuscript, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Work supported in part by grant PID2019-104350RB-I00 from MINECO and grant 2017SGR-727 from the Generalitat de Catalunya (to A.P.). G.A. acknowledges a grant from Fundació Marató de TV3, Spain (Project ref. 20140330-31-32-33-34). E.Y.C. acknowledges a contract funded by the project of Fundació Marató de TV3 and a contract from Ford España—Fundación Apadrina la Ciencia.

Acknowledgments: We thank former students that contributed to the work by performing different batches of protein expression and purification: Ignacio Dolado, Juan Ramón La Parra, Margarita Alvira, Neus Piqué and Pilar Infesta at the Laboratory of Biochemistry, IQS.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Manning, M.C.; Chou, D.K.; Murphy, B.M.; Payne, R.W.; Katayama, D.S. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 544–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sanchez-Garcia, L.; Martín, L.; Mangues, R.; Ferrer-Miralles, N.; Vazquez, E.; Villaverde, A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microb. Cell Factories* **2016**, *15*, 1–7. [[CrossRef](#)]
3. Chiti, F.; Dobson, C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 27–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Blake, C.; Geisow, M.; Oatley, S.; Rérat, B.; Rérat, C. Structure of prealbumin: Secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* **1978**, *121*, 339–356. [[CrossRef](#)]
5. Hamilton, J.; Benson, M. Transthyretin: A review from a structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1491–1521. [[CrossRef](#)]
6. Andrade, C. A Peculiar Form of Peripheral Neuropathy. *Brain* **1952**, *75*, 408–427. [[CrossRef](#)]
7. Saraiva, M.J.; Magalhaes, J.; Ferreira, N.; Almeida, M.R. Transthyretin Deposition in Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2304–2311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Koike, H.; Katsuno, M. Transthyretin Amyloidosis: Update on the Clinical Spectrum, Pathogenesis, and Disease-Modifying Therapies. *Neurol. Ther.* **2020**, *9*, 317–333. [[CrossRef](#)]
9. Grodin, J.L.; Maurer, M.S. The Truth Is Unfolding About Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Circulation* **2019**, *140*, 27–30. [[CrossRef](#)]
10. Sekijima, Y.; Hammarström, P.; Matsumura, M.; Shimizu, Y.; Iwata, M.; Tokuda, T.; Ikeda, S.-I.; Kelly, J.W. Energetic Characteristics of the New Transthyretin Variant A25T May Explain Its Atypical Central Nervous System Pathology. *Lab. Investig.* **2003**, *83*, 409–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Almeida, M.R.; Gales, L.; Damas, A.M.; Cardoso, I.; Saraiva, M.J. Small Transthyretin (TTR) Ligands as Possible Therapeutic Agents in TTR Amyloidoses. *Curr. Drug Target CNS Neurol. Disord.* **2005**, *4*, 587–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Connelly, S.; Choi, S.; Johnson, S.M.; Kelly, J.W.; Wilson, I.A. Structure-based design of kinetic stabilizers that ameliorate the transthyretin amyloidoses. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 54–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Nevone, A.; Merlini, G.; Nuvolone, M. Treating Protein Misfolding Diseases: Therapeutic Successes Against Systemic Amyloidoses. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1024. [[CrossRef](#)]
14. Bulawa, C.; Connelly, S.; DeVit, M.; Wang, L.; Weigel, C.; Fleming, J.A.; Packman, J.; Powers, E.T.; Wiseman, R.L.; Foss, T.R.; et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 9629–9634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Berk, J.L.; Suhr, O.B.; Obici, L.; Sekijima, Y.; Zeldenrust, S.R.; Yamashita, T.; Heneghan, M.A.; Gorevic, P.D.; Litchy, W.J.; Wiesman, J.F.; et al. Repurposing Diflunisal for Familial Amyloid Polyneuropathy: A randomized clinical trial. *JAMA* **2013**, *310*, 2658–2667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wixner, J.; Westerman, P.; Ihse, E.; Pilebro, B.; Lundgren, H.-E.; Anan, I. The Swedish open-label diflunisal trial (DFNS01) on hereditary transthyretin amyloidosis and the impact of amyloid fibril composition. *Amyloid* **2019**, *26*, 39–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Yokoyama, T.; Mizuguchi, M. Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors: From Discovery to Current Developments. *J. Med. Chem.* **2020**. [[CrossRef](#)]
18. Cruz, M.W.; Benson, M.D. A Review of Tafamidis for the Treatment of Transthyretin-Related Amyloidosis. *Neurol. Ther.* **2015**, *4*, 61–79. [[CrossRef](#)]
19. Maurer, M.S.; Schwartz, J.H.; Gundapaneni, B.; Elliott, P.M.; Merlini, G.; Waddington-Cruz, M.; Kristen, A.V.; Grogan, M.; Witteles, R.; Damy, T.; et al. Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1007–1016. [[CrossRef](#)]
20. Park, J.; Egolum, U.; Parker, S.; Andrews, E.; Ombengi, D.; Ling, H. Tafamidis: A First-in-Class Transthyretin Stabilizer for Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *Ann. Pharmacother.* **2019**, *54*, 470–477. [[CrossRef](#)]

21. Gamez, J.; Salvadó, M.; Reig, N.; Suñé, P.; Casasnovas, C.; Rojas-García, R.; Boronat, R.I. Transthyretin stabilization activity of the catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone (SOM0226) in hereditary ATTR amyloidosis patients and asymptomatic carriers: Proof-of-concept study. *Amyloid* **2019**, *26*, 74–84. [CrossRef] [PubMed]
22. Sant’Anna, R.; Gallego, P.; Robinson, L.Z.; Pereira-Henriques, A.; Ferreira, N.; Pinheiro, F.; Esperante, S.; Pallares, I.; Huertas, O.; Almeida, M.R.; et al. Repositioning tolcapone as a potent inhibitor of transthyretin amyloidogenesis and associated cellular toxicity. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10787. [CrossRef] [PubMed]
23. Pinheiro, F.; Varejão, N.; Esperante, S.; Santos, J.; Velazquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Pallarès, I.; Ventura, S. Tolcapone, a potent aggregation inhibitor for the treatment of familial leptomeningeal amyloidosis. *FEBS J.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
24. Miller, M.; Pal, A.; Albusairi, W.; Joo, H.; Pappas, B.; Tuhin, T.H.; Liang, D.; Jampala, R.; Liu, F.; Khan, J.; et al. Enthalpy-Driven Stabilization of Transthyretin by AG10 Mimics a Naturally Occurring Genetic Variant That Protects from Transthyretin Amyloidosis. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7862–7876. [CrossRef] [PubMed]
25. Fox, J.C.; Hellawell, J.L.; Rao, S.; O'Reilly, T.; Lumpkin, R.; Jernelius, J.; Gretler, D.; Sinha, U. First-in-Human Study of AG10, a Novel, Oral, Specific, Selective, and Potent Transthyretin Stabilizer for the Treatment of Transthyretin Amyloidosis: A Phase 1 Safety, Tolerability, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study in Healthy Adult Volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **2020**, *9*, 115–129. [CrossRef] [PubMed]
26. Corazza, A.; Verona, G.; Waudby, C.A.; Mangione, P.P.; Bingham, R.; Uings, I.; Canetti, D.; Nocerino, P.; Taylor, G.W.; Pepys, M.B.; et al. Binding of Monovalent and Bivalent Ligands by Transthyretin Causes Different Short- and Long-Distance Conformational Changes. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8274–8283. [CrossRef]
27. 2020 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s Dement.* **2020**, *16*, 391–460. [CrossRef]
28. dos Santos, P.; Leide, C.; Ozela, P.F.; de Fatima de Brito Brito, M.; Pinheiro, A.A.; Padilha, E.C.; Braga, F.S.; de Paula, D.S.; Carlos, H.T.; dos Santos, C.B.R.; et al. Alzheimer’s Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 3141–3159. [CrossRef]
29. DeTure, M.A.; Dickson, D.W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer’s disease. *Mol. Neurodegener.* **2019**, *14*, 1–18. [CrossRef]
30. Forner, S.; Baglietto-Vargas, D.; Martini, A.C.; Trujillo-Estrada, L.; LaFerla, F.M. Synaptic Impairment in Alzheimer’s Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci.* **2017**, *40*, 347–357. [CrossRef]
31. Heneka, M.T.; Carson, M.J.; El Khoury, J.; Landreth, G.E.; Brosseron, F.; Feinstein, D.L.; Jacobs, A.H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R.M.; et al. Neuroinflammation in Alzheimer’s disease. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 388–405. [CrossRef]
32. Pate, K.M.; Murphy, R.M. Cerebrospinal Fluid Proteins as Regulators of Beta-amyloid Aggregation and Toxicity. *Isr. J. Chem.* **2017**, *57*, 602–612. [CrossRef] [PubMed]
33. Schwarzman, A.L.; Gregori, L.; Vitek, M.P.; Lyubski, S.; Strittmatter, W.J.; Enghilde, J.J.; Bhasin, R.; Silverman, J.; Weisgraber, K.H.; Coyle, P.K. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8368–8372. [CrossRef] [PubMed]
34. Li, X.; Zhang, X.; Ladiwala, A.R.A.; Du, D.; Yadav, J.K.; Tessier, P.M.; Wright, P.E.; Kelly, J.W.; Buxbaum, J.N. Mechanisms of Transthyretin Inhibition of -Amyloid Aggregation In Vitro. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 19423–19433. [CrossRef]
35. Alemi, M.; Silva, S.C.; Santana, I.; Cardoso, I. Transthyretin stability is critical in assisting beta amyloid clearance- Relevance of transthyretin stabilization in Alzheimer’s disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2017**, *23*, 605–619. [CrossRef]
36. Cotrina, E.Y.; Gimeno, A.; Llop, J.; Jiménez-Barbero, J.; Quintana, J.; Prohens, R.; Cardoso, I.; Arsequell, G. An Assay for Screening Potential Drug Candidates for Alzheimer’s Disease That Act as Chaperones of the Transthyretin and Amyloid- β Peptides Interaction. *Chemistry* **2020**, *21*. [CrossRef]
37. Furuya, H.; Nakazato, M.; Saraiva, M.J.; Costa, P.P.; Sasaki, H.; Matsuo, H.; Goto, I.; Sakaki, Y. Tetramer formation of a variant type human transthyretin (prealbumin) produced by *Escherichia coli* expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *163*, 851–859. [CrossRef]
38. Furuya, H.; Saraiva, M.J.M.; Gawinowicz, M.A.; Alves, I.L.; Costa, P.P.; Sasaki, H.; Goto, I.; Sakaki, Y. Production of recombinant human transthyretin with biological activities toward the understanding of the molecular basis of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Biochemistry* **1991**, *30*, 2415–2421. [CrossRef]

39. Matsubara, K.; Mizuguchi, M.; Kawano, K. Expression of a synthetic gene encoding human transthyretin in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **2003**, *30*, 55–61. [[CrossRef](#)]
40. Kingsbury, J.S.; Klimtchuk, E.S.; Theberge, R.; Costello, C.E.; Connors, L.H. Expression, purification, and in vitro cysteine-10 modification of native sequence recombinant human transthyretin. *Protein Expr. Purif.* **2007**, *53*, 370–377. [[CrossRef](#)]
41. Dolado, I.; Nieto, J.; Saraiva, M.J.M.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Planas, A. Kinetic Assay for High-Throughput Screening of In Vitro Transthyretin Amyloid Fibrillogenesis Inhibitors. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 246–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Vidal, L.; Durany, O.; Suau, T.; Ferrer, P.; Benaiges, M.D.; Caminal, G. High-level production of recombinant His-tagged rhamnulose 1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2003**, *78*, 1171–1179. [[CrossRef](#)]
43. Vilà-Rico, M.; Colomé-Calls, N.; Martín-Castel, L.; Gay, M.; Azorín, S.; Vilaseca, M.; Planas, A.; Canals, F. Quantitative analysis of post-translational modifications in human serum transthyretin associated with familial amyloidotic polyneuropathy by targeted LC–MS and intact protein MS. *J. Proteom.* **2015**, *127*, 234–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Poulsen, K.; Bahl, J.M.; Tanassi, J.T.; Simonsen, A.H.; Heegaard, N.H. Characterization and stability of transthyretin isoforms in cerebrospinal fluid examined by immunoprecipitation and high-resolution mass spectrometry of intact protein. *Methods* **2012**, *56*, 284–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pont, L.; Benavente, F.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V. Analysis of transthyretin in human serum by capillary zone electrophoresis electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. Application to familial amyloidotic polyneuropathy type I. *Electrophoresis* **2015**, *36*, 1265–1273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Arsequell, G.; Planas, A. Methods to evaluate the inhibition of TTR fibrillogenesis induced by small ligands. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2343–2355. [[CrossRef](#)]
47. Mairal, T.; Nieto, J.; Pinto, M.; Almeida, M.R.; Gales, L.; Ballesteros, A.; Barluenga, J.; Pérez, J.J.; Vázquez, J.T.; Centeno, N.B.; et al. Iodine Atoms: A New Molecular Feature for the Design of Potent Transthyretin Fibrillogenesis Inhibitors. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4124. [[CrossRef](#)]
48. Cotrina, E.Y.; Pinto, M.; Bosch, L.; Vilà, M.; Blasi, D.; Quintana, J.; Centeno, N.B.; Arsequell, G.; Planas, A.; Valencia, G. Modulation of the Fibrillogenesis Inhibition Properties of Two Transthyretin Ligands by Halogenation. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9110–9121. [[CrossRef](#)]
49. Vilaró, M.; Nieto, J.; La Parra, J.R.; Almeida, M.R.; Ballesteros, A.; Planas, A.; Arsequell, G.; Valencia, G. Tuning Transthyretin Amyloidosis Inhibition Properties of Iododiflunisal by Combinatorial Engineering of the Nonsalicylic Ring Substitutions. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *17*, 32–38. [[CrossRef](#)]
50. Cotrina, E.Y.; Blasi, D.; Vilà, M.; Planas, A.; Abad-Zapatero, C.; Centeno, N.B.; Quintana, J.; Arsequell, G. Optimization of kinetic stabilizers of tetrameric transthyretin: A prospective ligand efficiency-guided approach. *Bioorganic Med. Chem.* **2020**, *28*, 115794. [[CrossRef](#)]
51. Gonzalez, A.; Quirante, J.; Nieto, J.; Almeida, M.R.; Saraiva, M.J.; Planas, A.; Arsequell, G.; Valencia, G. Isatin derivatives, a novel class of transthyretin fibrillogenesis inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5270–5273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Capítulo 3

Artículo 2: Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between Transthyretin, A β Peptides, and Small-Molecule Chaperones toward an Alternative Strategy for Alzheimer's Disease Drug Discovery.

Cotrina, E.Y.;¹ Gimeno, A.;² Llop, J.;³ Jiménez-Barbero, J.;^{2,4,5} Quintana, J.;⁶ Valencia, G.;¹ Cardoso, I.;^{7,8} Prohens, R.;⁹ Arsequell, G.¹

¹ Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

² CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Bizkaia Technology Park, Building 800, 48160 Derio, Spain.

³ CIC biomaGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 20014 San Sebastian, Spain.

⁴ Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Maria Diaz de Haro 13, 48009 Bilbao, Spain.

⁵ Departament of Organic Chemistry II, Faculty of Science & Technology, University of the Basque Country, 48940 Leioa, Bizkaia, Spain.

⁶ Research Programme on Biomedical Informatics, Universitat Pompeu Fabra (UPF-IMIM), 08003 Barcelona, Spain.

⁷ IBMC-Instituto de Biología Molecular e Celular, 4200-135 Porto, Portugal.

⁸ i3S-Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, 4200-135 Porto, Portugal.

⁹ Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldíri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain.

***Journal of Medicinal Chemistry*, 2020.** 63(6), 3205-3214.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01970.

American Chemical Society

ISSN: 0022-2623

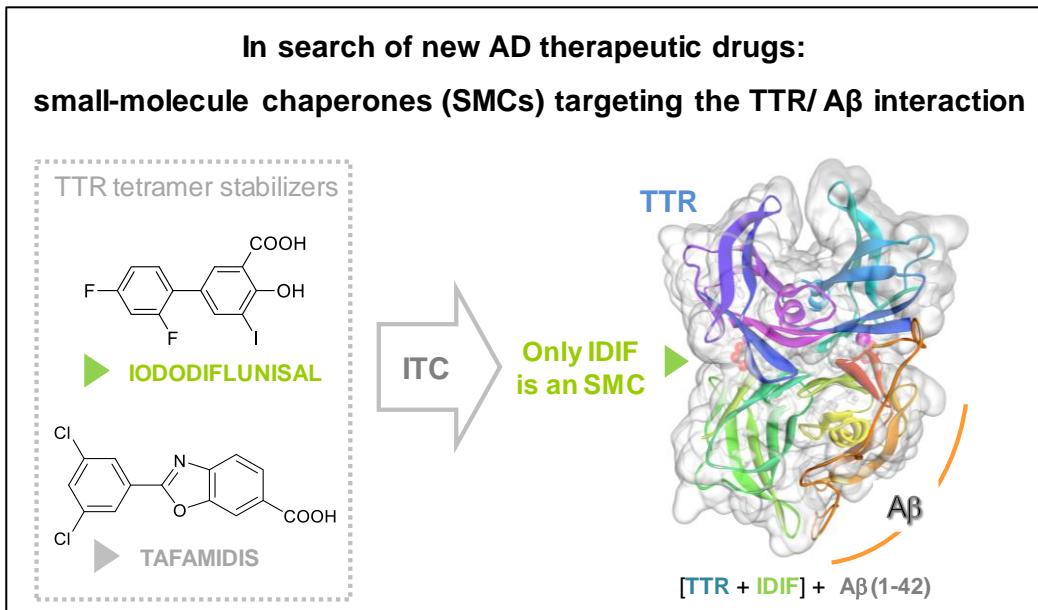
Category: Chemistry, Medicinal

3/61

IF 6.521

Q1

Graphical Abstract



Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between Transthyretin, A β Peptides, and Small-Molecule Chaperones toward an Alternative Strategy for Alzheimer's Disease Drug Discovery

Ellen Y. Cotrina, Ana Gimeno, Jordi Llop, Jesús Jiménez-Barbero, Jordi Quintana, Gregorio Valencia, Isabel Cardoso, Rafel Prohens, and Gemma Arsequell*



Cite This: *J. Med. Chem.* 2020, 63, 3205–3214



Read Online

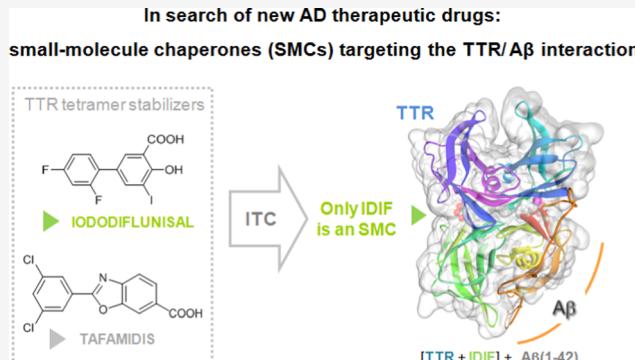
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Transthyretin (TTR) modulates the deposition, processing, and toxicity of Abeta (A β) peptides. We have shown that this effect is enhanced in mice by treatment with small molecules such as iododiflunisal (IDIF, 4), a good TTR stabilizer. Here, we describe the thermodynamics of the formation of binary and ternary complexes among TTR, A β (1–42) peptide, and TTR stabilizers using isothermal titration calorimetry (ITC). A TTR/A β (1–42) (1:1) complex with a dissociation constant of $K_d = 0.94 \mu\text{M}$ is formed; with IDIF (4), this constant improves up to $K_d = 0.32 \mu\text{M}$, indicating the presence of a ternary complex TTR/IDIF/A β (1–42). However, with the drugs diflunisal (1) or Tafamidis (2), an analogous chaperoning effect could not be observed. Similar phenomena could be recorded with the shorter peptide A β (12–28) (7). We propose the design of a simple assay system for the search of other chaperones that behave like IDIF and may become potential candidate drugs for Alzheimer's disease (AD).



INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative brain disease characterized by extracellular amyloid plaques, intracellular neurofibrillary tangles, and neuronal death.¹ The amyloid hypothesis of AD has guided a huge effort in drug discovery and development, leading to many small-molecule and biological drug candidates.^{2,3} Regrettably, only five treatment options are currently approved to treat this disease,⁴ but none is a truly disease-modifying intervention. In spite of this sad situation, a number of novel therapeutic approaches are currently being investigated. One of them is targeting protein–protein interactions (PPI) between A β and other amyloid-binding proteins such as gelsolin,⁵ ApoJ (clusterin),^{6,7} ApoE,^{8,9} human serum albumin (HSA),^{10,11} humanin,¹² the neuronal Tau protein,¹³ and transthyretin (TTR).^{14–16}

The present investigation relates to TTR, which is a 55 kDa homotetramer multifaceted protein responsible for the transport of thyroid hormones (thyroxine, T4) and retinol in plasma and cerebrospinal fluid (CSF).¹⁷ Several physiological and epidemiological clues point to a possible direct involvement of TTR in AD. One of the most significant observations is the decreased TTR levels in CSF in AD patients that parallels similar variations in CSF-A β levels^{18–20} and suggests that TTR is a biomarker of AD.²¹ TTR is the

main A β -binding protein in the CSF.^{14,22,23} This binding is believed to naturally prevent A β aggregation and toxicity in this media. This putative neuroprotective effect of TTR is also supported by a number of biochemical and animal studies, some of them, conducted in one of our consortiated laboratories.^{24–26}

TTR tetrameric stability appears as a relevant factor in its interaction with the A β peptide. Supporting this hypothesis, in vitro studies showed that amyloidogenic TTR variants bind with lower affinity to A β peptide than does the wild-type (wt) or nonamyloidogenic TTR,²⁷ also affecting the ability to avoid A β aggregation and toxicity.²⁸ Recently, some researchers have suggested that TTR interferes with A β amyloid formation by redirecting oligomeric nuclei into nonamyloid aggregates.²⁹

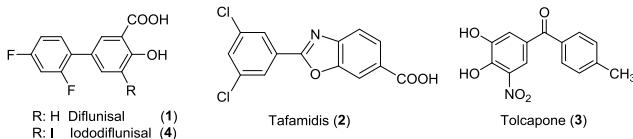
Since TTR binds T4 in its central hydrophobic channel, we have suggested that, in AD, TTR is destabilized and its clearance accelerated, thus explaining its lower levels.³⁰ TTR is

Received: November 27, 2019

Published: March 3, 2020

also an amyloidogenic protein. Thus, TTR stability is also a key factor in familial amyloid polyneuropathy (FAP),³¹ a TTR-related hereditary amyloidosis. TTR tetrameric stabilization has been defined as the basis for one of the possible therapeutic strategies in FAP.^{32–35} Some of the TTR tetramer stabilizers are drugs, such as the NSAID diflunisal (1),³⁶ the orphan drug Tafamidis (2),^{37–40} and Tolcapone (3),^{41,42} a drug for the treatment of Parkinson's disease recently repositioned for FAP (**Scheme 1**).

Scheme 1. Chemical Structures of TTR Tetramer Kinetic Stabilizers^a



^aDiflunisal (1), Tafamidis (2), and Tolcapone (3) are registered drugs.

By using in vitro studies, we have earlier demonstrated that TTR/A β interactions can be enhanced by a small set of tetramer-stabilizing compounds,²⁸ one of them being iododiflunisal (IDIF, 4), a small-molecule iodinated derivative of the NSAID diflunisal (1) (**Scheme 1**).^{43–45} Remarkably, in vivo administration of IDIF (4) to a mice model of AD resulted in the binding and stabilization of the TTR tetramer, decrease in brain A β levels and deposition, and improvement in the cognitive functions that are impaired in this AD-like neuropathology.⁴⁶

In this study, we have used isothermal titration calorimetry (ITC),^{47–49} a powerful biophysical technique for the quantitative analysis of PPIs.^{50–53} ITC provides the complete thermodynamic profile in terms of free energy (ΔG), enthalpy (ΔH), entropy (ΔS), binding constant (K_d), and stoichiometry (n) of the interaction from a single experiment. Since ITC is extremely sensitive to the energetics of conformational changes and intermolecular interactions, this technique is one of the gold standard biophysical methods that can be used to interrogate ternary molecular systems,^{54–58} such as the one formed by TTR, A β peptides, and IDIF (4). Thus, the goal of the present study was to determine the thermodynamic parameters of the intermolecular interaction in solution between TTR and A β (1–42). We also wanted to elucidate the structural bases for the enhancement of the TTR/A β interaction driven by our chaperone compound IDIF (4). With these aims and for comparative reasons, we have also assayed if other known TTR tetramer stabilizer drugs, such as the drugs diflunisal (1) and Tafamidis (2), behave as chaperones of the TTR/A β interaction. In addition and following the clues revealed by previous structural information gathered by STD-NMR experiments, we have also investigated if shorter A β peptide sequences perform similarly in stabilizing these systems.⁵⁹

RESULTS AND DISCUSSION

ITC Analysis of Binary and Ternary Complex Formation between TTR, A β (1–42), and TTR Tetramer Stabilizers. To characterize the binding process of the full-length A β (1–42) to TTR, we have used a depsipeptide precursor of A β (1–42). This depsipeptide precursor is converted into the corresponding native A β (1–42) peptide,

in situ, by a change in pH.^{60,61} This is a guarantee that A β (1–42) is in a monomeric state, free of aggregates, at the beginning of each experiment. Thus, the binary complex TTR/A β (1–42) was prepared by the titration of a solution of TTR (20 μ M) by a solution of A β (1–42) (200 μ M) yielding the diagrams and calorimetric constants reported in **Figure 1**.

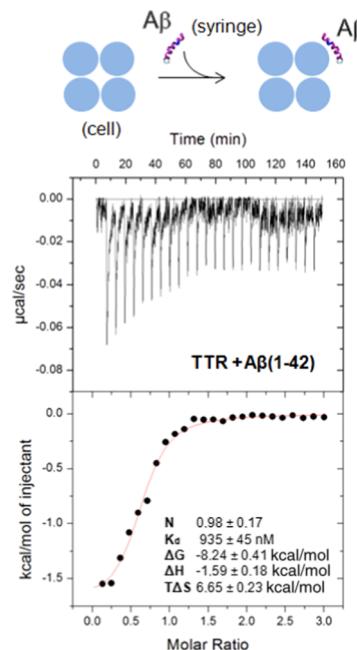


Figure 1. Isothermal titration calorimetry (ITC) studies. The binary complex [TTR + A β (1–42)] at pH 7.4 in 25 mM N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) buffer, 10 mM glycine, and 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) (final concentration) at 25 °C.

The calculated binding constant for the formation for this (1:1) TTR/A β (1–42) complex is $K_d = 0.94 \mu\text{M}$. A comparison of this figure with other literature data of K_d constants of TTR binding with other A β peptides can only be done with a TTR/A β (1–40) complex, which stands at $K_d = 24 \mu\text{M}$.⁶² Although both A β sequences are very closely related, their amyloid properties are rather different, A β (1–42) being more amyloidogenic.⁶³ This property may likely be the cause of this difference. In any event, we have also repeated this experiment with A β (1–40), which in our conditions yields $K_d = 7.1 \mu\text{M}$ (**Figure S19**).

Furthermore, to study the effect of the TTR tetramer stabilizers on the TTR/A β (1–42) complex, binary complexes of TTR/stabilizers were first prepared and analyzed (**Figure S17**). In a second set of experiments, the binary complexes were subsequently titrated with A β (1–42) solutions. In **Figure 2**, this procedure is expressed by the equation: (TTR + stabilizer) + A β (1–42). IDIF (4) (**Figure 2A**) and Tafamidis (2) (**Figure 2B**) were used as stabilizers.

The calorimetric constants for the stabilizers' interactions are reported in **Table 1**. The thermodynamic profile showed that IDIF (4) has a cooperative effect, the binding of A β (1–42) + [IDIF (4) + TTR] with $K_d = 0.32 \mu\text{M}$ is approximately threefold stronger than that of [A β (1–42) + TTR] with $K_d = 0.94 \mu\text{M}$, and again a strong enthalpy/entropy compensation is observed in this system when IDIF (4) is the ligand. These results confirm the chaperoning effect exerted by

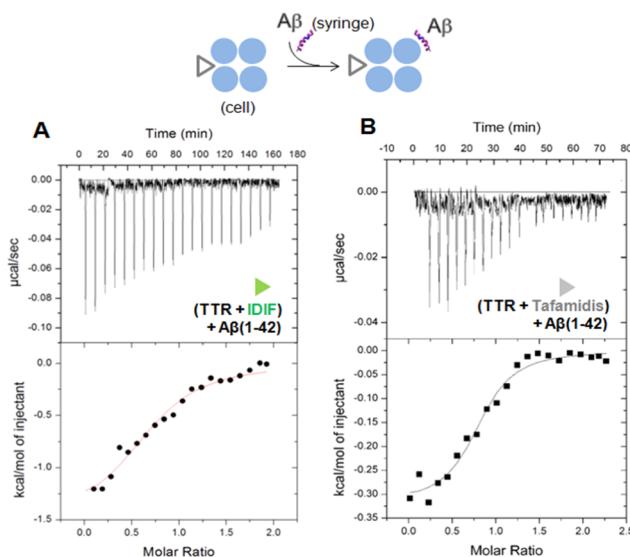


Figure 2. ITC studies. (A) Titration of [TTR + IDIF (4)] complex with A β (1–42). (B) Titration of [TTR + Tafamidis (2)] complex with A β (1–42). All of them at pH 7.4 in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, and 5% DMSO (final concentration) at 25 °C.

IDIF (4) at enhancing the TTR/A β interaction. Interestingly, an analogous stabilizing effect of IDIF (4) is observed when tested on TTR/A β (1–40) complexes (Figure S20 and Table S2). On the other hand, Tafamidis (2) falls rather behind IDIF (4), with a binding constant of $K_d = 1.05 \mu\text{M}$ that is very close to the original TTR/A β (1–42) complex ($0.94 \mu\text{M}$) indicating that Tafamidis (2) has a negligible effect.

Thioflavin T (ThT) Analysis of the Aggregation Properties of the Binary and Ternary Complexes of TTR, A β (1–42) and TTR Tetramer Stabilizers. The possible chaperoning effect of the TTR stabilizers in preventing TTR/A β (1–42) complex aggregation has been studied by ThT fluorescence assays, which monitor the increase of fluorescence during the aggregation process.⁶⁴ The ThT assays were performed to study the aggregation of A β (1–42) alone or in the presence of TTR or when TTR had been preincubated with the TTR tetramer stabilizer drugs IDIF (4) or Tafamidis (2). The results from ThT assays (Figure 3 and Table 2) corroborated our ITC results. The aggregation of A β (1–42) was reduced in the presence of TTR, and even more when TTR was complexed with IDIF (4), but not when TTR was complexed with Tafamidis (2). An almost negligible ThT signal was detected when analyzing the [TTR + IDIF (4)] complex, indicating that only the small-molecule IDIF (4) has a chaperone effect further enhancing the TTR/A β interaction. These results obtained by ThT fluorescence assays have also been corroborated by turbidity assays (Figure S6).

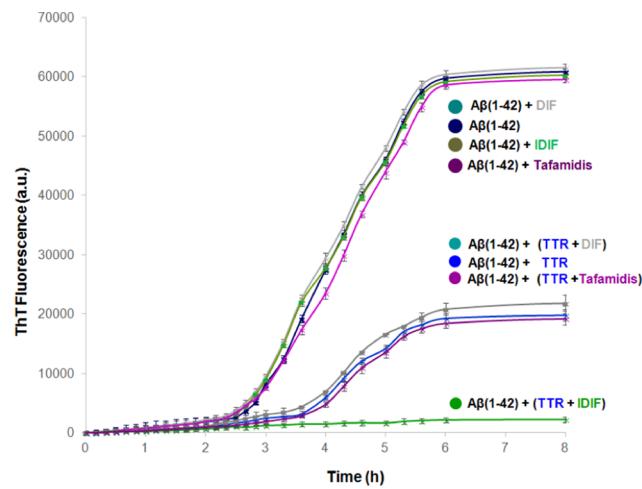


Figure 3. ThT assays of the aggregation of A β (1–42) alone ($50 \mu\text{M}$), in complex with TTR ($25 \mu\text{M}$), or in complex with TTR stabilized with different small compounds ($50 \mu\text{M}$), [TTR/IDIF (4), TTR/DIF (1), and TTR/Tafamidis (2)]. ThT fluorescence was measured at 37 °C each 10 min for 3 h, then each 20 min from 3 to 6 h, and then at 8 h.

Table 2. Percentage of Fibril Formation Obtained from ThT Assays^a

	ThT (au)	% fibril formation
A β (1–42)	$60\ 810 \pm 566$	99 ± 1
A β (1–42) + TTR	$19\ 836 \pm 913$	25 ± 1
A β (1–42) + [TTR + IDIF (4)]	2224 ± 439	6 ± 1
A β (1–42) + [TTR + DIF (1)]	$21\ 852 \pm 946$	26 ± 2
A β (1–42) + [TTR + Tafamidis (2)]	$19\ 188 \pm 923$	24 ± 2

^aThe concentrations used: A β (1–42) ($50 \mu\text{M}$) and TTR ($25 \mu\text{M}$) for the different small compounds ($50 \mu\text{M}$).

ITC Studies of the Interaction between TTR and Short A β Sequences. In our previous STD-NMR spectroscopy studies in solution,⁵⁹ we have identified structural elements implicated in the TTR/A β interaction that indicate the close proximity of the V18, F19, and F20 fragment of the A β (12–28) sequence to V94, F95, and T96 of TTR, highlighting V18 to F20 as the main structural motif for the recognition process. This A β (12–28) peptide is reported in the literature to essentially exhibit the same neurotoxic behavior and fibril formation properties as the full-length A β (1–42) peptide.^{65–67} To confirm that these are the key structural elements involved in the TTR/A β (1–42) complex, we have prepared the following short sequences of A β (1–42), namely, A β (1–11) (5), A β (10–20) (6), A β (12–28) (7), and A β (25–35) (8) and subsequently characterized their interaction with TTR (Table 3) by ITC.

Table 1. Thermodynamic Parameters for the Titration of (A) A β (1–42) and (TTR), (B) Ternary Complex of A β (1–42) and [TTR + IDIF (4)], and (C) Ternary Complex of A β (1–42) and [TTR + Tafamidis (2)] at 25 °C

Assay	n	K_d (μM)	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	T ΔS (Kcal/mol)
A TTR+A β (1–42)	0.98 ± 0.17	0.94 ± 0.04	$-8,24 \pm 0,41$	$-1,59 \pm 0,18$	$6,65 \pm 0,23$
B [TTR+IDIF (4)] + A β (1–42)	0.89 ± 0.15	0.32 ± 0.03	$-8,87 \pm 0,35$	$-1,47 \pm 0,19$	$7,39 \pm 0,17$
C [TTR+Tafamidis (2)] + A β (1–42)	0.80 ± 0.08	1.05 ± 0.05	$-8,11 \pm 0,02$	$-0,34 \pm 0,02$	$7,77 \pm 0,05$

Table 3. Sequences of Amyloid Peptides Used in This Study: $\text{A}\beta(1-42)$ and Other Short Amyloid β Sequences, Including Three $\text{A}\beta(12-28)$ Ala Mutants (9, 10, and 11)

1	42	Abeta peptide	#
DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV IA		$\text{A}\beta(1-42)$	
DAEFR HDSGY E		$\text{A}\beta(1-11)$	(5)
Y EVHHQ KLVFF		$\text{A}\beta(10-20)$	(6)
VHHQ KLVFF AEDVG SNK		$\text{A}\beta(12-28)$	(7)
EDVG SNKGA IIGLM		$\text{A}\beta(25-35)$	(8)
VHHQ KL A FF AEDVG SNK		$\text{V18A A}\beta(12-28)$	(9)
VHHQ KLV A F AEDVG SNK		$\text{F19A A}\beta(12-28)$	(10)
VHHQ KLV F A AEDVG SNK		$\text{F20A A}\beta(12-28)$	(11)

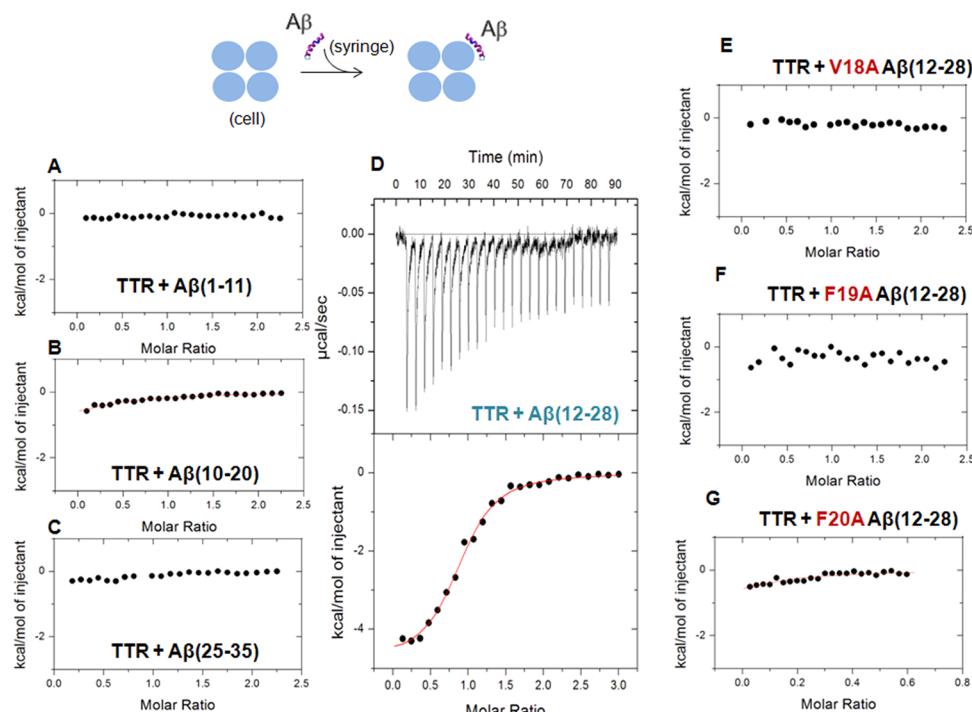


Figure 4. ITC analysis of different short sequences of amyloid β $\text{A}\beta(1-42)$ binding to TTR at pH 7.4 in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, and 5% DMSO at 25 °C. The binary systems are: (A) TTR + $\text{A}\beta(1-11)$ (5), (B) TTR + $\text{A}\beta(10-20)$ (6), (C) TTR + $\text{A}\beta(25-35)$ (8), (D) TTR + $\text{A}\beta(12-28)$ (7), (E) TTR + V18A $\text{A}\beta(12-28)$ (9), (F) TTR + F19A $\text{A}\beta(12-28)$ (10), and (G) TTR + F20A $\text{A}\beta(12-28)$ (11).

Table 4. Thermodynamic Parameters for the Complex Formation between Different Short Sequences of $\text{A}\beta$ and TTR at 25 °C

Assay	n	K_d (μM)	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	$T\Delta S$ (Kcal/mol)
TTR + $\text{A}\beta(1-11)$ (5)	-	-	-	-	-
TTR + $\text{A}\beta(10-20)$ (6)	$0,50 \pm 0,10$	$14,90 \pm 0,50$	$-6,58 \pm 0,38$	$-0,84 \pm 0,05$	$5,74 \pm 0,33$
TTR + $\text{A}\beta(25-35)$ (8)	-	-	-	-	-
TTR + $\text{A}\beta(12-28)$ (7)	$1,00 \pm 0,15$	$3,00 \pm 0,20$	$-7,76 \pm 0,41$	$-4,52 \pm 0,30$	$3,23 \pm 0,12$
TTR + V18A $\text{A}\beta(12-28)$ (9)	-	-	-	-	-
TTR + F19A $\text{A}\beta(12-28)$ (10)	-	-	-	-	-
TTR + F20A $\text{A}\beta(12-28)$ (11)	-	-	-	-	-

ITC studies for the binary complexes between different short sequences of $\text{A}\beta$ and TTR are summarized in Figure 4. Only the binding isotherm of the binary complex between $\text{A}\beta(12-28)$ (7) and TTR showed a typical thermodynamic profile (Figure 4D). Accordingly, a full thermodynamic characterization was performed (Table 4). The thermograms for the binary complexes between TTR and $\text{A}\beta(1-11)$ (5) (Figure 4A) and TTR and $\text{A}\beta(25-35)$ (8) (Figure 4C) show negligible enthalpy changes, confirming that there was no

significant interaction between each of these sequences and TTR. In the case of the binding of TTR to $\text{A}\beta(10-20)$ (6) (Figure 4B), a very low enthalpy change was observed. Thus, these results are in agreement with those from our previous STD-NMR spectroscopy studies.⁵⁹

To provide further insights into the interaction between the specific sequence $\text{A}\beta(12-28)$ and TTR, three Ala mutants in the residues V18 to F20 of the $\text{A}\beta(12-28)$ were prepared (Table 4) and ITC experiments were performed. The binding

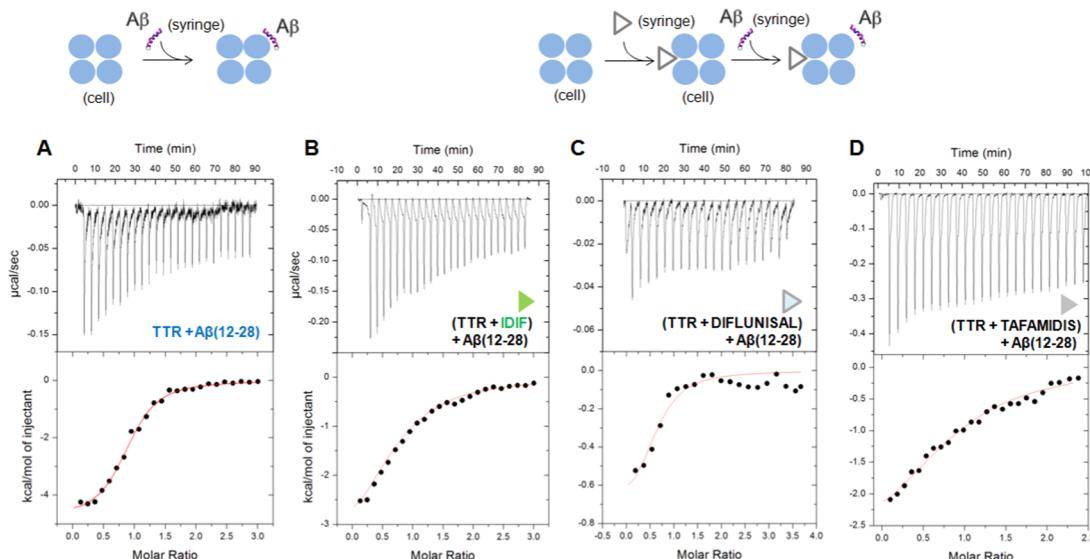


Figure 5. ITC analysis of (A) binary complex TTR + A β (12–28), (B) ternary complex [TTR + IDIF (4)] and A β (12–28), (C) ternary complex [TTR + Diflunisal (1)] and A β (12–28), and (D) ternary complex [TTR + Tafamidis (4)] and A β (12–28). All of these ITC studies were performed at pH 7.4 in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, and 5% DMSO (final concentration) at 25 °C.

Table 5. Thermodynamic Parameters for the Titration of (A) Binary Complex A β (12–28) and TTR, Ternary Complexes (B) A β (12–28) and [TTR + IDIF (4)] and (C) A β (12–28) and [TTR + Diflunisal (1)], and (D) Ternary Complex of A β (12–28) and [TTR + Tafamidis (2)] at 25 °C

Assay	n	K _d (μ M)	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	TΔS (Kcal/mol)
A TTR+A β (12–28)	1.00 ± 0.15	3.00 ± 0.20	-7.76 ± 0.25	-4.52 ± 0.12	3.23 ± 0.14
B (TTR+IDIF)+A β (12–28)	1.00 ± 0.12	0.81 ± 0.03	-8.31 ± 0.32	-2.48 ± 0.11	5.83 ± 0.21
C (TTR+Diflunisal)+A β (12–28)	0.87 ± 0.15	2.70 ± 0.14	-7.85 ± 0.44	-0.78 ± 0.18	7.07 ± 0.26
D (TTR+Tafamidis)+A β (12–28)	0.90 ± 0.10	2.80 ± 0.12	-7.22 ± 0.24	-3.13 ± 0.10	4.08 ± 0.15

isotherms obtained between Ala mutants of A β (12–28) (**9**, **10**, and **11**) and TTR are also shown in **Figure 4**.

As it can be deduced from these ITC results, replacement of any residue from V18 to F20 for Ala has a detrimental effect in the binding of A β (12–28) to TTR, indicating that these residues are essential for the interaction with TTR.⁵⁹

ITC Studies of the Binary and Ternary Complexes between TTR, A β (12–28) and IDIF (4), Diflunisal (1), and Tafamidis (2). To investigate if IDIF shows the same chaperoning character as in the previous TTR/A β (1–42) complexes against this shorter, A β (12–28) model peptide, we have performed ITC studies and compared the interaction between A β (12–28) with TTR alone or with TTR preincubated with the TTR tetramer stabilizers IDIF, diflunisal, and Tafamidis. Results are shown in **Figure 5** and the full thermodynamic characterizations are displayed in **Table 5**.

The interactions with A β (12–28), both the one with TTR and the one with TTR complexed with IDIF, are enthalpy-driven with a favorable entropic contribution. The titration of the binary complex (TTR + IDIF) with A β (12–28) has a notable improvement of binding ($K_d = 0.81 \mu\text{M}$) compared to the [TTR + A β (12–28)] binary complex ($K_d = 3.00 \mu\text{M}$) (**Table 5**). When TTR is stabilized with IDIF (4), the complex

with A β (12–28) is almost three times stronger than with TTR alone.

These results highlight that although diflunisal (1) and Tafamidis (2) are good TTR tetrameric stabilizers, these compounds do not enhance the TTR/A β interaction, and therefore not all TTR tetramer stabilizers are chaperones of the TTR/A β interaction, and they need to be assayed for this specific purpose.

Transmission Electron Microscopy (TEM) Study of the Aggregation of Complexes Formed by TTR, A β (12–28) and Either IDIF (4) or Tafamidis (2). To further confirm the chaperone effect of IDIF on the TTR/A β (12–28) interaction, as suggested by the ITC experiments, we studied the morphology of the species of A β (12–28) by transmission electron microscopy (TEM). After 48 h of incubation at 37 °C, the A β (12–28) peptide alone (**Figure 6A–C**) formed abundant, long and complex fibrils, higher-ordered structured fibrils, constituted by several protofilaments, which presented as more rigid (**Figure 6A,B**) and with twisting of the fibrils (**Figure 6B**, arrows) or as more relaxed fibrils with the protofilaments laterally assembled (**Figure 6C**).

This ultrastructural analysis showed that the presence of TTR clearly prevented A β (12–28) fibrillization, resulting in the presence of fewer, less complex fibrils and small aggregates

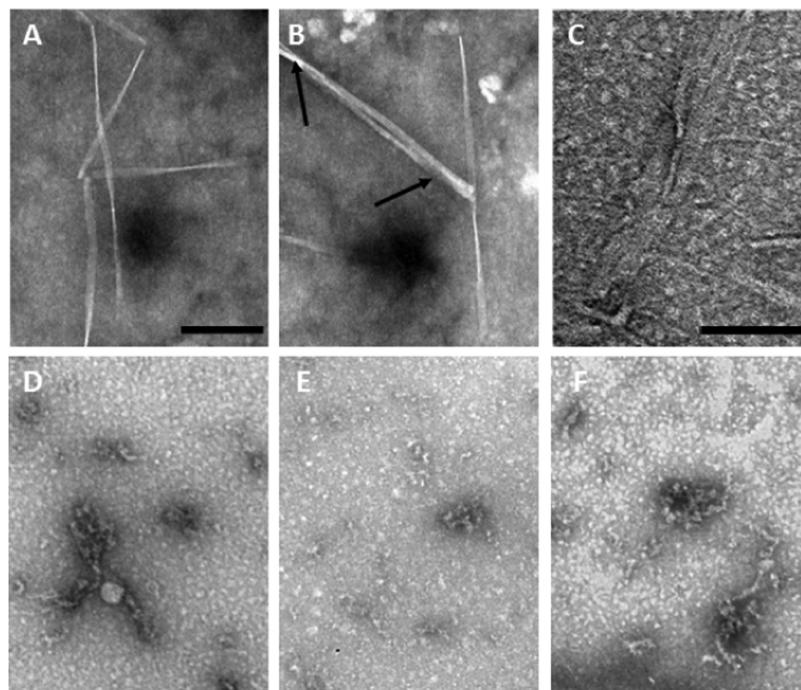


Figure 6. Morphologic assessment by TEM of the influence of TTR on $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ aggregation after 48 h of incubation at 37 °C. (A–C) $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ peptide alone, (D) $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ in the presence of TTR, (E) $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ in the presence of TTR preincubated with IDIF, and (F) $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ in the presence of TTR preincubated with Tafamidis. Scale bar (A, B, D, E, and F) = 200 nm; C = 100 nm.

(Figure 6D), compared to the control, the $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ alone (Figure 6A–C), which presented long and complex fibrils.

Importantly, here we showed that preincubation of TTR with IDIF completely abolished the presence of $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ fibrils and only round particles and prefibrillar species were visualized (Figure 6E). However, when TTR was preincubated with Tafamidis (Figure 6F), there was no significant effect beyond the effect of TTR itself, since small fibers were detected.

CONCLUSIONS

These calorimetric studies demonstrate that TTR forms (1:1) complexes with $\text{A}\beta(1\text{--}42)$ with $K_d = 0.93 \mu\text{M}$. In the presence of the TTR tetramer stabilizer IDIF, these complexes are chaperoned showing $K_d = 0.31 \mu\text{M}$. This effect was not detected when using the drug Tafamidis (2) instead of IDIF (4). In addition, it was observed that the shorter $\text{A}\beta$ sequence, $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ in complex with TTR imitates almost exactly the calorimetric behavior of the full $\text{A}\beta(1\text{--}42)$ in complex with TTR. The effect of the TTR tetramer stabilizers IDIF, diflunisal, and Tafamidis upon these later complexes is analogous to the ones formed by full $\text{A}\beta(1\text{--}42)$. The magnitude of this effect is stabilizing for IDIF but negligible for diflunisal (1) and Tafamidis (2). We hope that using this simpler and easy-handling $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ peptide, screening strategies for the identification of compounds chaperoning the TTR– $\text{A}\beta$ peptides complexes could be realized. In turn, these strategies could aid in the search for potential drug candidates in AD drug discovery.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemical Compounds. Amyloid β peptides $\text{A}\beta(1\text{--}11)$ (5), $\text{A}\beta(10\text{--}20)$ (6), $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ (7), and $\text{A}\beta(25\text{--}35)$ (8) as trifluoroacetate salts were purchased from Bachem AG (Switzerland) (ref.: H-2956, H-1388, H-7910, and H-1192, respectively). Depsi-

$\text{A}\beta(1\text{--}42)$ peptide, a chemically modified β -amyloid (1–42) precursor containing an isoacyl dipeptide at residues Gly-Ser, was available from GenScript (ref.: RP10017-1, purity by HPLC > 96%). $\text{A}\beta(1\text{--}40)$ peptide was available from rPeptide (β -amyloid (1–40), Ultra Pure, HFIP, ref: A-1153-2, purity > 97%, Lot#05271640H, www.rpeptide.com). *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N*'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), glycine, *Tris*(hydroxymethyl)-aminomethane (*Tris*), dimethyl sulfoxide (DMSO), and the NSAID drug diflunisal (DIF, 1) were purchased from Sigma-Aldrich (D3281, purity > 98%) and used without further purification. The small-molecule compound iododiflunisal (IDIF, 4) was synthesized in our lab IQAC-CSIC by iodination of the NSAID diflunisal (1) following our procedures.⁴⁴ The drug Tafamidis (2) was prepared in our lab following the procedures described in the literature.⁶⁸ Purity of all final compounds was proved to be $\geq 95\%$ by means of HPLC, HR-MS, and NMR techniques.

Solid-Phase Peptide Synthesis of $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ Peptide and Mutants of $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ Peptide. Amyloid peptide sequences $\text{A}\beta(1\text{--}11)$ (5) and $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ (7) were purchased from Bachem AG (Switzerland) as trifluoroacetate salts (H-2956 and H-7910, respectively). H-2956 showed purity by HPLC > 96%, and H-7910 showed purity by HPLC > 96%. The $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ peptide and its corresponding mutants [V18A $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ (9); F19A $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ (10); and F20A $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ (11)] were synthesized by manual Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS) using Fmoc chemistry with the corresponding Fmoc-protected amino acids. Cleavage from resin was performed using TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5) (v/v/v), and the peptides were precipitated with *tert*-butyl methyl ether. The peptides were purified by reversed-phase–high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a VersaFlash system and characterized by analytical RP-HPLC and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF-MS) (purity by HPLC > 96%). The characterization of the $\text{A}\beta(12\text{--}28)$ peptide prepared in our lab was compared to a commercial sample acquired from Bachem (H-7910).

Preparation of $\text{A}\beta(1\text{--}42)$. The native $\text{A}\beta(1\text{--}42)$ peptide was obtained from depsi- $\text{A}\beta(1\text{--}42)$ peptide (GenScript, RP10017-1, purity by HPLC > 96%), a chemically modified β -amyloid (1–42)

precursor, by a switching procedure involving a change in pH and immediate use.

Recombinant Wild-Type Human TTR (wt rhTTR) Production and Purification. Human wild-type rhTTR gene was cloned into a pET expression system and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) Star. The phTTRwt-I/pET-38b(+) plasmid was provided by Prof. Antoni Planas (IQS, URL). The production of recombinant protein was performed at the Erlenmeyer scale, and the production and purification of protein were done as described previously following an optimized version of our protocol.⁶⁹ Recombinant wild-type hTTR was produced using a pET expression system. The expressed protein only contains an additional methionine on the N-terminus compared to the mature natural human protein sequence. wt rhTTR protein was expressed in *E. coli* BL21-(DE3) cells harboring the corresponding plasmid. Expression cultures in 2xYT-rich medium containing 100 µg/mL kanamycin were grown at 37 °C to an optical density (at 600 nm) of 4 (OD₆₀₀ ≈ 4); then induced by addition of IPTG (1 mM final concentration); grown at 37 °C for 20 h; harvested by centrifugation at 4 °C, 10,000 rpm for 10 min; and resuspended in a cell lysis buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.6). Cell disruption and lysis were performed by French press followed by a sonication step at 4 °C. Cell debris was discarded after centrifugation at 4 °C, 11,000 rpm for 30 min. Intracellular proteins were fractionated by ammonium sulfate precipitation in three steps. Each precipitation was followed by centrifugation at 12 °C, 12,500 rpm for 30 min. The pellets were analyzed by SDS-PAGE (14% acrylamide). The TTR-containing fractions were resuspended in 20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.6 (buffer A) and dialyzed against the same buffer. It was purified by ion-exchange chromatography using a Q-Sepharose High-Performance (Amersham Biosciences) anion-exchange column and eluting with a NaCl linear gradient using 0.1 M NaCl in 20 mM Tris-HCl pH 7.6 (buffer A) to 0.5 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.6 (buffer B). All TTR-enriched fractions were dialyzed against deionized water in three steps and were lyophilized. The protein was further purified by gel filtration chromatography using a Superdex 75 prep grade resin (GE Healthcare Bio-Sciences AB) and eluting with 20 mM Tris pH 7.6 and 0.1 M NaCl. Purest fractions were combined and dialyzed against deionized water and lyophilized. The purity of the protein preparations was > 95% as judged by SDS-PAGE. Average production yields were 150–200 mg of purified protein per liter of culture. Protein concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm using a calculated extinction coefficient value of 17 780 M⁻¹ cm⁻¹ for wtTTR. The protein was stored at -20 °C.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) Assay. Experiments were carried out in a VP-ITC (MicroCal, LLC, Northampton, MA). In a titration experiment, the ligand in the syringe is added in small aliquots to the macromolecule, in our case the TTR protein in the calorimeter cell, which is filled with an effective volume that is sensed calorimetrically. The TTR solution of 20 µM and Aβ or ligand solutions of 200 µM were prepared in the same buffer. The titrant was injected over 20 or 30 times at a constant interval of 300 s with a 450 rpm rotating stirrer syringe into the sample cell containing its binding partner. All of the solutions were prepared with a 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4, and 5% DMSO (final concentration), and it was corroborated that in these conditions, TTR and Aβ(1–42) are stable. The Aβ(1–42) working solution was prepared at 200 µM and used immediately to avoid premature aggregate formation. The TTR stock solution was prepared at 40 µM. Ligand stock solution was prepared at 10 mM in DMSO. All solutions were prepared in the same buffer and filtered prior to use. In the control experiments, the titrant (ligand or Aβ) was injected into the buffer in the sample cell to measure the heat of dilution. This value of the heat of dilution was subtracted from the titration data. The experiments were performed at 25 °C. Titration data were analyzed by evaluation software MicroCal Origin, Version 7.0. The binding curves were fitted by the nonlinear regression method to one set of sites binding model. This leads to the calculation of K , n , ΔH , ΔS , and ΔG . Each experiment was conducted three times, and the mean value with standard deviations is provided.

Transmission Electron Microscopy (TEM). Aβ(12–28) peptide (100 µM), alone or with TTR (20 µM) (alone or preincubated with a stabilizer for 1 h at 37 °C), was incubated at 37 °C for 48 h. For visualization by TEM, 5 µL sample aliquots were absorbed to a carbon-coated collodion film supported on 200-mesh copper grids, for 5 min, and negatively stained with 1% uranyl acetate. Grids were exhaustively examined with a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope equipped with an Orius Sc1000 digital camera.

ThT Fluorescence Assay. Samples were prepared in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4, and 5% DMSO (final concentration) containing 20 µM ThT. The Aβ(1–42) peptide was adjusted to 50 µM, TTR to 25 µM, and the small-molecule compound to 50 µM as final concentrations. Briefly, samples of Aβ(1–42) alone or with TTR or with TTR preincubated with a small molecule were mixed with ThT. Fluorescence spectra were acquired in cells thermostated at 37 °C, with 15 s of shaking at 500 rpm every 30 min. ThT fluorescence assays were acquired in each cell of a 96-well plate containing 200 µL of sample. Excitation was at 430 nm, and emission spectra were recorded at 485 nm using a Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector plate reader. The results are the mean values of four replicates.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b01970>.

Recombinant wild-type human (wt rhTTR) production and purification and MALDI-TOF MS; turbidity assays of the binary and ternary assay complex formation using Aβ(1–42); synthesis of Aβ(12–28) (7) and three Ala mutants (8, 9, and 10); additional isothermal titration calorimetry (ITC) studies (binary and ternary interactions and control experiments) ([PDF](#))

Molecular formula strings of key compounds ([CSV](#))

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Gemma Arsequell — Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.), 08034 Barcelona, Spain;
✉ orcid.org/0000-0002-7009-3738;
Email: gemma.arsequell@iqac.csic.es

Authors

Ellen Y. Cotrina — Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.), 08034 Barcelona, Spain

Ana Gimeno — CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160 Derio, Spain;
✉ orcid.org/0000-0001-9668-2605

Jordi Llop — CIC biomaGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 20014 San Sebastian, Spain;
✉ orcid.org/0000-0002-0821-9838

Jesús Jiménez-Barbero — CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160 Derio, Spain; Ikerbasque, Basque Foundation for Science, 48009 Bilbao, Spain;
Department of Organic Chemistry II, Faculty of Science & Technology, University of the Basque Country, 48940 Leioa, Bizkaia, Spain; orcid.org/0000-0001-5421-8513

Jordi Quintana — Research Programme on Biomedical Informatics, Universitat Pompeu Fabra (UPF-IMIM), 08003 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0002-7059-7418

Gregorio Valencia — Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.), 08034 Barcelona, Spain

Isabel Cardoso — IBMC—Instituto de Biología Molecular e Celular, 4200-135 Porto, Portugal; i3S—Instituto de

Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto,
4200-135 Porto, Portugal

Rafel Prohens – Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres
Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028
Barcelona, Spain;  orcid.org/0000-0003-0294-1720

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01970>

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by a grant from the Fundació Marató de TV3 (Neurodegenerative Diseases Call, project reference: 20140330-31-32-33-34, <http://www.ccma.cat/tv3/marato/en/projectes-financats/2013/212/>).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

I.C. worked under the Investigator FCT Program, which is financed by national funds through FCT and cofinanced by ESF through HPOP, type 4.2—Promotion of Scientific Employment. G.A. from IQAC-CSIC acknowledges a grant from Fundació Marató de TV3, Spain (Project ref 20140330-31-32-33-34) and also acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Economy (CTQ2016-76840-R). E.Y.C. acknowledges a contract from Fundació Marató de TV3, Spain (Project ref 20140330-31-32-33-34) and a 1-year contract from Ford-Fundación Apadrina la Ciencia. The group at CIC bioGUNE acknowledges the European Research Council for financial support (ERC-2017-AdG, project number 788143-RECGLYC-ANMR), Instituto de Salud Carlos III of Spain, ISCIII (grant PRB3 IPT17/0019 to A.G.), Agencia Estatal Investigación of Spain, AEI (grants CTQ2015-64597-C2-1-P and RTI2018-094751-B-C21), and the Severo Ochoa Excellence Accreditation (SEV-2016-0644). J.L. from CIC biomaGUNE acknowledges the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for financial support through grant CTQ2017-87637-R. G.A. from IQAC-CSIC acknowledges Prof. Antoni Planas (IQS-URL) for full technical support and supervision on the TTR production.

ABBREVIATIONS

AD, Alzheimer's disease; TEM, transmission electron microscopy; ThT, thioflavin T; TTR, transthyretin; CSF, cerebrospinal fluid; IDIF, iododiflunisal; on, overnight; PPI, protein–protein interactions; SPPS, solid-phase peptide synthesis

REFERENCES

- (1) Alzheimer's Association Report. 2019 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's Dementia* **2019**, *15*, 321–387.
- (2) Selkoe, D. J.; Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 595–608.
- (3) Doig, A. J.; Del Castillo-Frias, M. P.; Berthoumieu, O.; Tarus, B.; Nasica-Labouze, J.; Sterpone, F.; Nguyen, P. H.; Hooper, N. M.; Faller, P.; Derreumaux, P. Why Is Research on Amyloid- β Failing to Give New Drugs for Alzheimer's Disease? *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 1435–1437.
- (4) Cummings, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Sabbagh, M.; Zhong, K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimer's Dementia* **2019**, *5*, 272–293.

(5) Ji, L.; Zhao, X.; Hua, Z. Potential therapeutic implications of gelsolin in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, *44*, 13–25.

(6) Nelson, A. R.; Sagare, A. P.; Zlokovic, B. V. Role of clusterin in the brain vascular clearance of amyloid- β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114*, 8681–8682.

(7) Beeg, M.; Stravalaci, M.; Romeo, M.; Carrá, A. D.; Cagnotto, A.; Rossi, A.; Diomedè, L.; Salmona, M.; Gobbi, M. Clusterin binds to $A\beta$ 1-42 oligomers with high affinity and interferes with peptide aggregation by inhibiting primary and secondary nucleation. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 6958–6966.

(8) Liu, S.; Park, S.; Allington, G.; Prelli, F.; Sun, Y.; Martá-Ariza, M.; Scholtzova, H.; Biswas, G.; Brown, B.; Verghese, P. B.; Mehta, P. D.; Kwon, Y. U.; Wisniewski, T. Targeting Apolipoprotein E/amyloid β binding by peptoid CPO- $A\beta$ 17-21 P ameliorates Alzheimer's disease related pathology and cognitive decline. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, No. 8009.

(9) Nasica-Labouze, J.; Nguyen, P. H.; Sterpone, F.; Berthoumieu, O.; Buchete, N. V.; Coté, S.; De Simone, A.; Doig, A. J.; Faller, P.; Garcia, A.; Laio, A.; Li, M. S.; Melchionna, S.; Mousseau, N.; Mu, Y.; Paravastu, A.; Pasquali, S.; Rosenman, D. J.; Strodel, B.; Tarus, B.; Viles, J. H.; Zhang, T.; Wang, C.; Derreumaux, P. Amyloid β Protein and Alzheimer's Disease: When Computer Simulations Complement Experimental Studies. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 3518–3563.

(10) Algama, M.; Ahmed, R.; Jafari, N.; Ahsan, B.; Ortega, J.; Melacini, G. Atomic-resolution map of the interactions between an amyloid inhibitor protein and amyloid β ($A\beta$) peptides in the monomer and protofibril states. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 17158–17168.

(11) Boada, M.; López, O.; Núñez, L.; Szczepiorkowski, Z. M.; Torres, M.; Grifols, C.; Páez, A. Plasma exchange for Alzheimer's disease Management by Albumin Replacement (AMBAR) trial: study design and progress. *Alzheimer's Dementia* **2019**, *5*, 61–69.

(12) Romeo, M.; Stravalaci, M.; Beeg, M.; Rossi, A.; Fiordaliso, F.; Corbelli, A.; Salmona, M.; Gobbi, M.; Cagnotto, A.; Diomedè, L. Humanin specifically interacts with amyloid- β oligomers and counteracts their in vivo toxicity. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *57*, 857–871.

(13) Wallin, C.; Hiruma, Y.; Wärmländer, S. K. T. S.; Huvent, I.; Jarvet, J.; Abrahams, J. P.; Gräslund, A.; Lippens, G.; Luo, J. The neuronal Tau protein blocks in vitro fibrillation of the amyloid- β ($A\beta$) peptide at the oligomeric stage. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 8138–8146.

(14) Schwarzman, A. L.; Gregori, L.; Vitek, M. P.; Lyubski, S.; Strittmatter, W. J.; Enghilde, J. J.; Bhasin, R.; Silverman, J.; Weisgraber, K. H.; Coyle, P. K.; Zagorki, M. G.; Talafoos, J.; Eisenberg, M.; Saunders, A. M.; Roses, A. D.; Goldgaber, D. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 8368–8372.

(15) Pate, K. M.; Kim, B. J.; Shusta, E. V.; Murphy, R. M. Transthyretin mimetics as anti- β -amyloid agents: a comparison of peptide and protein approaches. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 968–979.

(16) Garai, K.; Posey, A. E.; Li, X.; Buxbaum, J. N.; Pappu, R. V. Inhibition of amyloid beta fibril formation by monomeric human transthyretin. *Protein Sci.* **2018**, *27*, 1252–1261.

(17) Vieira, M.; Saraiva, M. J. Transthyretin: a multifaceted protein. *Biomol. Concepts* **2014**, *5*, 45–54.

(18) Serot, J. M.; Christmann, D.; Dubost, T.; Couturier, M. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatry* **1997**, *63*, 506–550.

(19) Ribeiro, C. A.; Santana, I.; Oliveira, C.; Baldeiras, I.; Moreira, J.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin decrease in plasma of MCI and AD patients: investigation of mechanisms for disease modulation. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9*, 881–889.

(20) Han, S. H.; Jung, E. S.; Sohn, J. H.; Hong, H. J.; Hong, H. S.; Kim, J. W.; Na, D. L.; Kim, M.; Kim, H.; Ha, H. J.; Kim, Y. H.; Huh, N.; Jung, M. W.; Mook-Jung, I. Human serum transthyretin levels correlate inversely with Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2011**, *25*, 77–84.

- (21) Velayudhan, L.; Killick, R.; Hye, A.; Kinsey, A.; Güntert, A.; Lynham, S.; Ward, M.; Leung, R.; Lourdusamy, A.; To, A. W.; Powell, J.; Lovestone, S. Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, *28*, 369–375.
- (22) Pate, K. M.; Murphy, R. M. Cerebrospinal fluid proteins as regulators of beta-amyloid aggregation and toxicity. *Isr. J. Chem.* **2017**, *57*, 602–612.
- (23) Davidsson, P.; Westman-Brinkmalm, A.; Nilsson, C. L.; Lindbjer, M.; Paulson, L.; Andreasen, N.; Sjögren, M.; Blennow, K. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients. *Neuroreport* **2002**, *13*, 611–615.
- (24) Stein, T. D.; Johnson, J. A. Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 7380–7388.
- (25) Buxbaum, J. N.; Ye, Z.; Reixach, N.; Friske, L.; Levy, C.; Das, P.; Golde, T.; Masliah, E.; Roberts, A. R.; Bartfai, T. Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of $\text{A}\beta$ toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 2681–2686.
- (26) Stein, T. D.; Anders, N. J.; De Carli, C.; Chan, S. L.; Mattson, M. P.; Johnson, J. A. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted Amyloid Precursor Protein (APP) in APPSw mice resulting in Tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 7707–7717.
- (27) Costa, R.; Gonçalves, A.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin binding to A-beta peptide—impact on A-beta fibrillogenesis and toxicity. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 936–942.
- (28) Ribeiro, C. A.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. stability of the transthyretin molecule as a key factor in the interaction with A-beta peptide - relevance in Alzheimer's disease. *PLoS One* **2012**, *7*, No. e45368.
- (29) Nilsson, L.; Pamréen, A.; Islam, T.; Brännström, K.; Golchin, S. A.; Pettersson, N.; Iakovleva, I.; Sandblad, L.; Gharibyan, A. L.; Olofsson, A. Transthyretin Interferes with $\text{A}\beta$ Amyloid Formation by Redirecting Oligomeric Nuclei into Non-Amyloid Aggregates. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 2722–2733.
- (30) Alemi, M.; Silva, S. C.; Santana, I.; Cardoso, I. Transthyretin stability is critical in assisting beta amyloid clearance-Relevance of transthyretin stabilization in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2017**, *23*, 605–619.
- (31) Kerschen, P.; Planté-Bordeneuve, V. Current and future treatment approaches in transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy. *Curr. Treat. Options Neurol.* **2016**, *18*, 53.
- (32) Almeida, M. R.; Gales, L.; Damas, A. M.; Cardoso, I.; Saraiva, M. J. Small Transthyretin (TTR) Ligands as Possible Therapeutic Agents in TTR Amyloidoses. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2005**, *4*, 587–596.
- (33) Almeida, M. R.; Macedo, B.; Cardoso, I.; Alves, I.; Valencia, G.; Arsequell, G.; Planas, A.; Saraiva, M. J. Selective binding to transthyretin and tetramer stabilization in serum from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by an iodinated diflunisal derivative. *Biochem. J.* **2004**, *381*, 351–356.
- (34) Johnson, S. M.; Wiseman, R. L.; Sekijima, Y.; Green, N. S.; Adamski-Werner, S. L.; Kelly, J. W. Native state kinetic stabilization as a strategy to ameliorate protein misfolding diseases: a focus on the transthyretin amyloidosis. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 911–921.
- (35) Nencetti, S.; Orlandini, E. TTR fibril formation inhibitors: is there a SAR? *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2356–2379.
- (36) Berk, J. L.; Suhr, O. B.; Sekijima, Y.; Yamashita, T.; Heneghan, M.; Zeldenrust, S. R.; Ando, Y.; Ikeda, S.; Gorevic, P.; Merlini, G.; Kelly, J. W.; Skinner, M.; Bisbee, A. B.; Dyck, P. J.; Obici, L. Familial amyloidosis consortium. the diflunisal trial: study accrual and drug tolerance. *Amyloid* **2012**, *19*, 37–38.
- (37) Coelho, T.; Merlini, G.; Bulawa, C. E.; Fleming, J. A.; Judge, D. P.; Kelly, J. W.; Maurer, M. S.; Planté-Bordeneuve, V.; Labaudinière, R.; Mundayat, R.; Riley, S.; Lombardo, I.; Huertas, P. Mechanism of action and clinical application of Tafamidis in hereditary transthyretin amyloidosis. *Neurol. Ther.* **2016**, *5*, 1–25.
- (38) Nencetti, S.; Rossello, A.; Orlandini, E. Tafamidis (Vyndaqel): A light for FAP patients. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1617–1619.
- (39) Lamb, Y. N.; Deeks, E. D. Tafamidis: A review in transthyretin amyloidosis with polyneuropathy. *Drugs* **2019**, *79*, 863–874.
- (40) Bulawa, C. E.; Connelly, S.; Devit, M.; Wang, L.; Weigel, C.; Fleming, J. A.; Packman, J.; Powers, E. T.; Wiseman, R. L.; Foss, T. R.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W.; Labaudinière, R. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 9629–9634.
- (41) Sant'Anna, R.; Gallego, P.; Robinson, L. Z.; Pereira-Henriques, A.; Ferreira, N.; Pinheiro, F.; Esperante, S.; Pallares, I.; Huertas, O.; Almeida, M. R.; Reixach, N.; Insa, R.; Velazquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Reig, N.; Ventura, S. Repositioning tolcapone as a potent inhibitor of transthyretin amyloidogenesis and associated cellular toxicity. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, No. 10787.
- (42) Gamez, J.; Salvadó, M.; Reig, N.; Suné, P.; Casasnovas, C.; Rojas-Garcia, R.; Insa, R. Transthyretin stabilization activity of the catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone (SOM0226) in hereditary ATTR amyloidosis patients and asymptomatic carriers: proof-of-concept study. *Amyloid* **2019**, *26*, 74–84.
- (43) Almeida, M. R.; Macedo, B.; Cardoso, I.; Alves, I.; Valencia, G.; Arsequell, G.; Planas, A.; Saraiva, M. J. Selective binding to transthyretin and tetramer stabilization in serum from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by an iodinated diflunisal derivative. *Biochem. J.* **2004**, *381*, 351–356.
- (44) Mairal, T.; Nieto, J.; Pinto, M.; Almeida, M. R.; Gales, L.; Ballesteros, A.; Barluenga, J.; Pérez, J. J.; Vázquez, J. T.; Centeno, N. B.; Saraiva, M. J.; Damas, A. M.; Planas, A.; Arsequell, G.; Valencia, G. Iodine atoms: a new molecular feature for the design of potent transthyretin fibrillogenesis inhibitors. *PLoS One* **2009**, *4*, No. e4124.
- (45) Gales, L.; Macedo-Ribeiro, S.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Saraiva, M. J.; Damas, A. M. Human transthyretin in complex with iododiflunisal: structural features associated with a potent amyloid inhibitor. *Biochem. J.* **2005**, *388*, 615–662.
- (46) Ribeiro, C. A.; Oliveira, S. M.; Guido, L. F.; Magalhaes, A.; Valencia, G.; Arsequell, G.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin stabilization by iododiflunisal promotes amyloid- β peptide clearance, decreases its deposition, and ameliorates cognitive deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, *39*, 357–370.
- (47) Doyle, M. L. Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 31–35.
- (48) Pierce, M. M.; Raman, C. S.; Nall, B. T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **1999**, *19*, 213–221.
- (49) Jelesarov, I.; Bosshard, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 3–10.
- (50) Brautigam, C. A.; Zhao, H.; Vargas, C.; Keller, S.; Schuck, P. Integration and global analysis of isothermal titration calorimetry data for studying macromolecular interactions. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 882–894.
- (51) Velazquez-Campoy, A.; Leavitt, S. A.; Freire, E. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *261*, 35–54.
- (52) Clavería-Gimeno, R.; Vega, S.; Abian, O.; Velazquez-Campoy, A. A look at ligand binding thermodynamics in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discovery* **2017**, *12*, 363–377.
- (53) Velazquez-Campoy, A.; Leavitt, S. A.; Freire, E. Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry in Protein–Protein Interactions: Methods and Applications. In *Methods in Molecular Biology*; Meyerkord, C.L.; Fu, H., Eds.; Springer Science + Business Media: New York, 2015; Vol. 1278, pp 183–204.
- (54) Bradrick, T. D.; Beechem, J. M.; Howell, E. E. Unusual binding stoichiometries and cooperativity are observed during binary and ternary complex formation in the single active pore of R67

dihydrofolate reductase, a D2 symmetric protein. *Biochemistry* **1996**, *35*, 11414–11424.

(55) Velazquez-Campoy, A.; Goñi, G.; Peregrina, J. R.; Medina, M. Exact analysis of heterotropic interactions in proteins: Characterization of cooperative ligand binding by isothermal titration calorimetry. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1887–1904.

(56) Verstraete, K.; van Schie, L.; Vyncke, L.; Bloch, Y.; Tavernier, J.; Pauwels, E.; Peelman, F.; Savvides, S. N. Structural basis of the proinflammatory signaling complex mediated by TSLP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 375–382.

(57) Hughes, S. J.; Ciulli, A. Molecular recognition of ternary complexes: a new dimension in the structure-guided design of chemical degraders. *Essays Biochem.* **2017**, *61*, 505–516.

(58) Houtman, J. C.; Brown, P. H.; Bowden, B.; Yamaguchi, H.; Appella, E.; Samelson, L. E.; Schuck, P. Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: application to adaptor protein complexes in cell signaling. *Protein Sci.* **2007**, *16*, 30–42.

(59) Gimeno, A.; Santos, L. M.; Alemi, M.; Rivas, J.; Blasi, D.; Cotrina, Y.; Llop, J.; Valencia, G.; Cardoso, I.; Quintana, J.; Arsequell, G.; Jiménez-Barbero, J. Insights on the interaction between transthyretin and $\text{A}\beta$ in solution. A Saturation Transfer Difference (STD) NMR analysis of the role of iododiflunisal. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5749–5758.

(60) Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. Design synthesis of a novel water-soluble $\text{A}\beta$ 1-42 isopeptide: an efficient strategy for the preparation of Alzheimer's disease-related peptide $\text{A}\beta$ 1–42 via O–N intramolecular acyl migration reaction. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5965–5968.

(61) Beeg, M.; Stravalaci, M.; Bastone, A.; Salmona, M.; Gobbi, M. A modified protocol to prepare seed-free starting solutions of amyloid- β ($\text{A}\beta$) 1-40 and $\text{A}\beta$ 1-42 from the corresponding depsipeptides. *Anal. Biochem.* **2011**, *411*, 297–299.

(62) Li, X.; Zhang, X.; Ladiwala, A. R. A.; Du, D.; Yadav, J. K.; Tessier, P. M.; Wright, P. E.; Kelly, J. W.; Buxbaum, J. N. Mechanisms of transthyretin inhibition of β -amyloid aggregation in vitro. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 19423–19433.

(63) Meisl, G.; Yang, X.; Hellstrand, E.; Frohm, B.; Kirkegaard, J. B.; Cohen, S. I.; Dobson, C. M.; Linse, S.; Knowles, T. P. Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the $\text{A}\beta$ 40 and $\text{A}\beta$ 42 peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 9384–9389.

(64) LeVine, H., 3rd Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404–410.

(65) Fraser, P. E.; Levesque, L.; McLachlan, D. R. Alzheimer $\text{A}\beta$ amyloid forms an inhibitory neuronal substrate. *J. Neurochem.* **1994**, *62*, 1227–1230.

(66) Flood, J. F.; Morley, J. E.; Roberts, E. An amyloid β protein fragment, $\text{A}\beta$ (12–28), equipotently impairs post-training memory processing when injected into different limbic system structures. *Brain Res.* **1994**, *663*, 271–276.

(67) Jarvet, J.; Damberg, P.; Bodell, K.; Eriksson, L. E. G.; Graslund, A. Reversible random coil to β -sheet transition and the early stage of aggregation of the $\text{A}\beta$ (12–28) fragment from the Alzheimer peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4261–4268.

(68) Razavi, H.; Palaninathan, S. K.; Powers, E. T.; Wiseman, R. L.; Purkey, H. E.; Mohamedmohideen, N. N.; Deechongkit, S.; Chiang, K. P.; Dendle, M. T.; Sacchettini, J. C.; Kelly, J. W. Benzoxazoles as transthyretin amyloid fibril inhibitors: synthesis, evaluation, and mechanism of action. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2758–2761.

(69) Dolado, I.; Nieto, J.; Saraiva, M. J. M.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Planas, A. Kinetic assay for high-throughput screening of in vitro transthyretin amyloid fibrillogenesis inhibitors. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 246–252.

Capítulo 3

Artículo 3: An assay for screening potential drug candidates for Alzheimer's disease that act as chaperons of the transthyretin and amyloid- β peptides interaction.

Cotrina, E.Y.;¹ Gimeno, A.;^{2,3,4} Llop, J.;⁵ Jiménez-Barbero, J.;^{2,3,4} Quintana, J.;⁶ Prohens, R.;⁷ Cardoso, I.;⁸ Arsequell, G.¹

¹ Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

² CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Bizkaia Technology Park, Building 800, 48160 Derio, Spain.

³ Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Maria Diaz de Haro 13, 48009 Bilbao, Spain.

⁴ Departament of Organic Chemistry II, Faculty of Science & Technology, University of the Basque Country, 48940 Leioa, Bizkaia, Spain.

⁵ CIC biomaGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 20014 San Sebastian, Spain.

⁶ Research Programme on Biomedical Informatics, Universitat Pompeu Fabra (UPF-IMIM), 08003 Barcelona, Spain.

⁷ Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain.

⁸ i3S-Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, 4200-135 Porto, Portugal.

Chemistry 2020.

DOI: 10.1002/chem.202002933.

Wiley-VCH GmbH

ISSN: 0947-6539

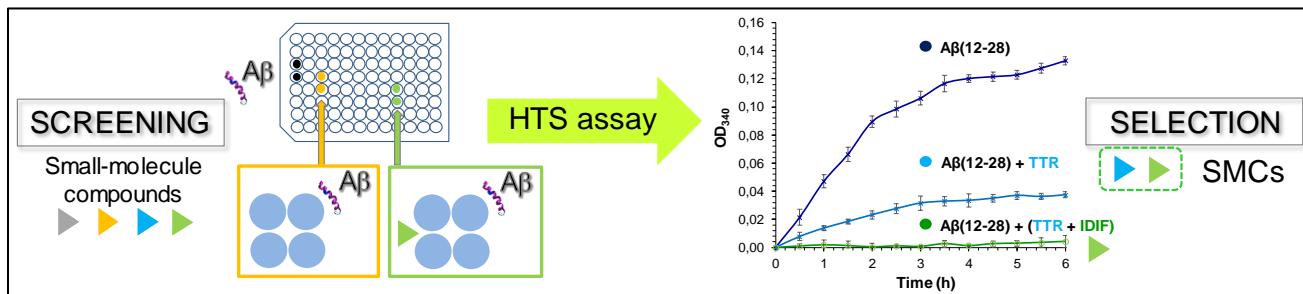
Category: Chemistry, Multidisciplinary

44/177

IF 4.636

Q1

Graphical Abstract



Drug Discovery

An Assay for Screening Potential Drug Candidates for Alzheimer's Disease That Act as Chaperones of the Transthyretin and Amyloid- β Peptides Interaction

Ellen Y. Cotrina,^[a] Ana Gimeno,^[c, d, e] Jordi Llop,^[b] Jesús Jiménez-Barbero,^[c, d, e] Jordi Quintana,^[f] Rafel Prohens,^[g] Isabel Cardoso,^[h] and Gemma Arsequell*^[a]

Abstract: The protein transthyretin (TTR) modulates amyloid- β (A β) peptides deposition and processing and this physiological effect is further enhanced by treatment with iododiflunisal (IDIF), a small-molecule compound (SMC) with TTR tetramer stabilization properties, which behaves as chaperone of the complex. This knowledge has prompted us to design and optimize a rapid and simple high-throughput assay that relies on the ability of test compounds to form ternary soluble complexes TTR/A β /SMC that prevent A β aggregation.

The method uses the shorter A β (12–28) sequence which is cheaper and simpler to use while retaining the aggregation properties of their parents A β (1–40) and A β (1–42). The test is carried out in 96-well plates that are UV monitored for turbidity during 6 h. Given its reproducibility, we propose that this test can be a powerful tool for efficient screening of SMCs that act as chaperones of the TTR/A β interaction that may lead to potential AD therapies.

Introduction

Transthyretin (TTR) is a homotetrameric protein found in the plasma and cerebrospinal fluid (CSF) that transports thyroid hormones and retinol.^[1] It is most stable as a tetramer, but many point mutations are involved in pathological conditions

caused by toxic TTR amyloid deposits in vital organs.^[2] It is relevant to note that TTR is the main amyloid- β (A β) binding protein in CSF.^[3] This binding is believed to naturally prevent A β aggregation and toxicity in this fluid. This first physiological evidence suggesting a putative neuroprotective effect of TTR has been later confirmed by a number of biochemical and animal studies as well as comparative measures of TTR levels in healthy and AD patients.^[4] The molecular mechanisms of TTR neuroprotection have not been fully elucidated. Recent data suggests that TTR interferes with A β by redirecting oligomeric nuclei into non-amyloid aggregates.^[5] Also, TTR seems to inhibit both primary and secondary nucleations of A β peptides aggregation reducing the toxicity of their oligomers.^[6]

In early in vitro studies we have gathered a first insight into the binding of TTR and A β and into this binding enhancing role of a small set of TTR tetramer-stabilizing compounds.^[7] One of the compounds is an iodinated analogue of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diflunisal namely, iododiflunisal (IDIF).^[8] Later, we have shown that in vivo administration of IDIF to AD transgenic mice, resulted in binding and stabilization of the TTR tetramer, decreasing brain A β levels and deposition and improving the cognitive functions that are impaired in this AD-like neuropathology.^[9] By recent radiochemical studies, we have proven that preformed TTR-IDIF labeled complexes better penetrate the blood brain barrier (BBB) than free TTR and IDIF.^[10] By longitudinal in vivo molecular imaging study we have shown that oral treatment with IDIF in a transgenic mouse model of AD delays hippocampal amyloid beta formation.^[11]

To elucidate at the molecular level the mechanisms involved in these TTR/A β /IDIF interactions by biophysical methods we

[a] E. Y. Cotrina, Dr. G. Arsequell

Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.)
Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona (Spain)
E-mail: gemma.arsequell@iqac.csic.es

[b] Dr. J. Llop

CIC biomaGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA)
20014 San Sebastian (Spain)

[c] Dr. A. Gimeno, Prof. Dr. J. Jiménez-Barbero

CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA)
Bizkaia Technology Park, Building 800, 48160 Derio (Spain)

[d] Dr. A. Gimeno, Prof. Dr. J. Jiménez-Barbero

Ikerbasque-Basque Foundation for Science
Maria Diaz de Haro 13, 48009 Bilbao (Spain)

[e] Dr. A. Gimeno, Prof. Dr. J. Jiménez-Barbero

Department of Organic Chemistry II, Faculty of Science & Technology
University of the Basque Country, 48940 Leioa, Bizkaia (Spain)

[f] Dr. J. Quintana

Research Programme on Biomedical Informatics
Universitat Pompeu Fabra (UPF-IMIM), 08003 Barcelona (Spain)

[g] Dr. R. Prohens

Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics
Universitat de Barcelona, Baldíri Reixac 10, 08028 Barcelona (Spain)

[h] Dr. I. Cardoso

i3S-Instituto de Investigação e Inovação em Saúde
Universidade do Porto, 4200-135 Porto (Portugal)

 The Supporting Information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:

<https://doi.org/10.1002/chem.202002933>.

have used saturation-transfer difference nuclear magnetic resonance (STD-NMR) techniques that have allowed us to identify the 17-mer peptide sequence A β (12–28) as the main structural recognition motif.^[12] Interestingly, this short A β amyloid peptide (VHHQKLVFFAEDVGSNK) has been extensively studied and is reported to exhibit essentially identical neurotoxic behavior and fibril formation features as the A β (1–42) and (1–40) peptides and thus has been used as a short model of the full A β peptides (Supporting information).^[13] Structural studies of this A β (12–28) amyloid sequence have shown to contain a domain known as the “hydrophobic core” (residues 17–21) and a β -turn (residues 22–28).^[14] These peptide stretches look essential for the formation of large aggregates and fibrils in the A β (1–40) and A β (1–42) longer peptides.^[15] Thus, mutations in the hydrophobic core such as Phe19/Pro19 have a large influence on the aggregation properties and even prevent fibrillization.^[16] Also, the aggregation characteristics of A β (12–28) have a strong pH dependence.^[17] Interestingly, this same A β (12–28) sequence has also been identified among the key determinants for the recognition of full A β s by other amyloid binding proteins, such as ApoE^[18] and human serum albumin (HAS).^[19]

Furthermore, in our biophysical studies of these ternary interactions we have also used isothermal titration calorimetry (ITC) techniques that have provided conclusive proof of stable complex formation in solution between these TTR, A β and IDIF molecular species. Thus, both A β (1–42) and A β (12–28) do not bind with IDIF but form binary complexes with TTR. In turn, binary TTR/IDIF complexes bind more effectively than TTR alone with A β species to form ternary complexes. This more effective binding provided by IDIF allow us to talk about a chaperoning effect of IDIF upon TTR/A β binding.^[20]

With this information at hand, we envisioned a simple ternary reaction system composed by TTR, A β (12–28) and a SMC acting as chaperone that could be easily monitored for aggregates formation in a high throughput screening (HTS) format that could allow to screen for other chaperones. In such a system the chaperone could prevent aggregate formation through soluble ternary complex formation and the extent of precipitate formation could be an indirect measure of the chaperone potency. To set such a system we have revisited our former turbidimetric method for screening of potential TTR fibrillogenesis inhibitors. Our method used a mutant TTR and was optimized as to carry kinetic monitoring of TTR aggregation by simply measuring the turbidity of 96-plate wells by UV. Turbidimetry kinetics were used to assess the potency of fibrillogenesis inhibition compounds.^[21] In this case, to design a simple and rapid assay, turbidity appeared again a good choice for reaction monitoring. Thus, given that native TTR is a thermostable protein that does not show amyloid properties in solution at neutral pH, we aimed at measuring the ability of a particular test compound to prevent aggregation of the A β (12–28) peptide in solutions also containing TTR. As here described, we have first optimized the operating conditions for A β (12–28) aggregation by using common methods of rational Design of Experiments (DoE).^[22] Secondly, convenient A β (12–28)/TTR/SMC molar ratios as to discriminate the effect of different SMCs acting as TTR ligands were sought. The final

assay setup comprises incubation of different test compounds with solutions containing both TTR and A β (12–28) as to allow the formation of the ternary complexes in a 96-well format and the turbidimetry of the wells monitored for 6 hours by measuring the absorbance at 340 nm. Turbidimetry is used as a measure of the chaperoning potency of the SMCs.

It is known that A β peptides interact and form complexes with proteins other than TTR such as: Gelsolin,^[23] ApoJ (clusterin),^[24] ApoE^[25] and HSA.^[26] These complexes also seem to interfere with A β aggregation and therefore may constitute a new therapeutic target for AD. Owing the urgent need to feed the exhausted pipelines of drug candidates for AD (see more info in the Supporting Information) we propose that the methodology here described, besides its potential for the discovery of TTR/A β interaction modifying SMCs, may be inspiring to settle new screening methods for potential AD therapeutic interventions based on other A β interacting proteins.

Results and Discussion

Preliminary experiments

Relative high quantities of the synthetic A β (12–28) peptide and recombinant TTR were a requisite for this study. Thus, the A β (12–28) amyloid peptide was in house synthesized at mm scale by microwave solid-phase peptide synthesis (SPPS) protocols. Preparation of recombinant TTR was achieved by expression in *Escherichia coli* following our previously described methods, with slight modifications to increase protein production.^[21] Yield of pure protein was 150 mg L⁻¹ of culture and a batch of 500 mg was produced (Supporting Information, Scheme S1). In a preliminary set of experiments the aggregation of separated A β (12–28) and TTR solutions were compared with (2:1) molar mixtures of A β (12–28) and TTR which were kept at 37 °C under stirring in a neutral buffer and monitored at 340 nm for turbidity during 6 h. It was observed that the peptide readily aggregates reaching a maximum in less than 3 h, TTR solutions remained clean and (2:1) peptide/protein mixtures produced a faint precipitate. Also, additional mixtures of A β (12–28) and TTR were challenged with IDIF. Thus, IDIF was incubated with TTR solutions at (1:2) molar ratios and then added to A β peptide solutions at (2:1) peptide/protein ratios. No aggregates could be detected after 6 h (Figure S3) and up to 18 h (Figure S6). In addition, equimolar mixtures of A β /IDIF and TTR/IDIF were prepared and monitored for turbidity to confirm that IDIF is not able to prevent A β aggregation nor to induce TTR aggregation (Figure S6).

Optimization of A β (12–28) aggregation

Having in mind that maximal sensitivity of aggregate detection by turbidimetry and minimal cost of reagents were particularly important factors, the HTS assay here described has been settled and optimized in two stages. In a first stage, the aggregation conditions of the A β (12–28) peptide were selected and optimized. Thus, the following parameters: incubation temperature, nature and ionic strength of buffer solution, concentra-

tion of A β (12–28) and selection of UV wavelength monitoring were either individually or collectively optimized by rational DoE methods. To identify the optimum wavelength that better differentiates between soluble and aggregated peptide we have performed spectral scans (260–440 nm) on 200 μ M solutions of A β (12–28). One run was performed immediately after preparation of the solution and the second after standing at 37 °C for 6 h (Figure S4). The maximum absorption difference between the initial clean solution and the turbid final solution was observed at 340 nm. This wavelength is in the 340–360 nm range, which has been used to characterize other amyloid aggregation processes and therefore was adopted as optimal for our study.^[27]

For the optimization of the rest of the factors, this is, incubation temperature, ionic strength of buffer and concentration of peptide a factorial DoE was used. Reaction temperature and ionic strength were analyzed at two levels while concentration of reagents at three resulting in a (3^{12}) factorial design (Tables S1–S3). Accordingly, a total of 12 experiments that were repeated 3 more times with a sum of 48 runs. In addition, the block effect, this is, the influence of different batches of the peptide was also taken into account.

For each experiment, the mean value of the absorbance at 340 nm after 6 hours of reaction was taken as the variable response. The design and analysis of results were performed using the JMP software package (SAS Institute),^[28] while statistical significance was assessed by ANOVA (Table S4). It was found that all the main factors (concentration, ionic strength, and temperature) and the interactions between concentration and the other two factors were statistically significant but not the temperature versus ionic strength interaction. As expected, the block factor was not statistically significant (Table S5).

As seen from prediction profiles and desirability plots (Figure S5) the most influential factor on absorbance was the peptide concentration. This can be seen from the examples of reaction profiles at different conditions provided in Figure 1. To

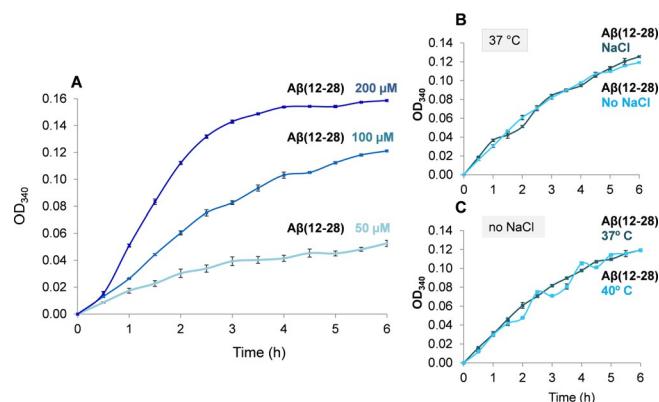


Figure 1. Aggregation kinetics of A β (12–28) peptide at 37 °C monitored by UV (340 nm) over 6 h. A) At 50, 100, and 200 μ M concentrations. B) In the absence or presence of salts ([NaCl] = 100 mM). C) At different temperatures and absence of salts. Samples were assayed in duplicate and are representative of three ($n=6$) (A) or two different experiments ($n=4$) (B and C). Studies performed at pH 7.4 in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine and 5% DMSO (final concentration) at 37 °C.

reduce economic costs a concentration of 100 μ M of the peptide was selected for subsequent experiments. The other two factors were fixed at their low level (temperature at 37 °C and low ionic strength (in the absence of NaCl salts, 0 μ M NaCl).

Assay optimization

After setting the optimal A β (12–28) aggregation conditions, in a second stage of the assay development, the most convenient peptide/protein ratio that may allow discrimination between different SMCs that act as TTR ligands was sought. Thus, in view of the preliminary experiments (Figure S3) that used a (2:1) stoichiometric peptide/protein ratio, a discrete range of A β (12–28) to TTR ratios going from an excess of peptide (4:1) to an excess of protein (1:2) were investigated (Figure 2A). Similar range of peptide/protein ratios were also studied in the presence of the TTR ligand IDIF (Figure 2B, 2C, and 2D). From Figure 2B, it appears that the (2:1) peptide/protein ratio seems rather convenient for the quantification of the chaperoning effect of IDIF. In turn, this ratio also allows for a moderate consumption of protein. In addition, we have firm evidence from isothermal titration calorimetry (ITC) experiments that in these conditions, ternary A β (12–28)/TTR/IDIF complexes are formed.^[20]

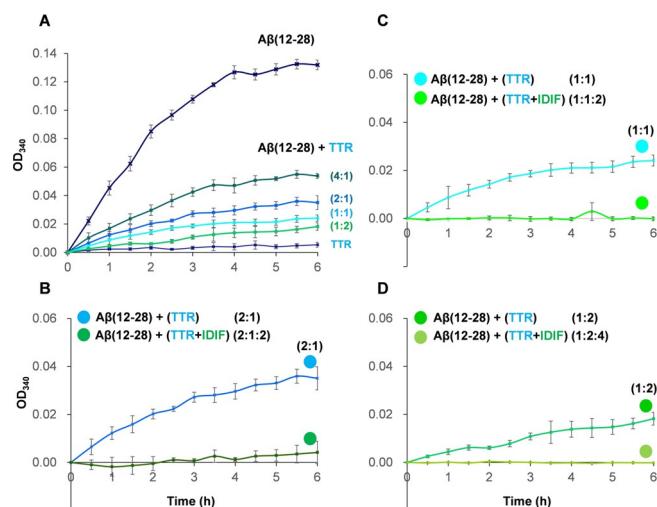


Figure 2. A) Kinetic profiles of the aggregation of A β (12–28), TTR and A β (12–28)/TTR mixtures at (4:1), (2:1), (1:1) and (1:2) molar ratios; B) A β (12–28) aggregation course at (2:1) A β (12–28)/TTR molar ratio with or without IDIF (2 molar); C) A β (12–28) aggregation course at (1:1) A β (12–28)/TTR molar ratio with or without IDIF (2 molar); D) A β (12–28) aggregation course at (1:2) A β (12–28)/TTR molar ratio with or without IDIF (4 molar), measured by turbidity at 37 °C over 6 h. Samples were assayed in duplicate and are representative of two different experiments ($n=4$). All of them performed at pH 7.4 in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine and 5% DMSO (final concentration) at 37 °C.

HTS assay development

This information was next translated into a working HTS assay using 96-well microplates (Scheme S2). In doing so, in each plate different positive and negative controls were always included. In particular, the A β (1–11) sequence which does not

show aggregation was taken as a negative control. It was always checked that TTR ligands alone do not modify the A β (12–28) aggregation process.

The concentration of the test compounds in the assay was selected based on previous knowledge of their binding stoichiometry to the tetrameric form of TTR which is either (1:1) or (1:2) protein/ligand. A small quantity of DMSO (5% final concentration) was always added to buffered stock solutions of ligands to improve their solubility. The protocol operation started with the incubation of the SMC (100 μ M) with the protein (50 μ M) for one hour at 37 °C followed by addition of A β (12–28) (100 μ M) and then the plate was incubated for 6 h at 37 °C. Profiles of control experiments as well as results from a typical experiment using IDIF as a SMC ligand using optimal assay conditions are presented in Figure 3.

Quantitative results are calculated from the UV absorbance of each well after 6 h. The potency of a test compound is expressed as the percentage of reduction of the UV absorbance observed for the compound when compared to an A β (12–28) aggregation control experiment. Thus, the potency of IDIF is 96% (Table 1). Analysis of the Z'-factor for the assay^[30] gave values of 0.9 for IDIF and of 0.87 for TTR meaning that the assay is well-suited for HTS.

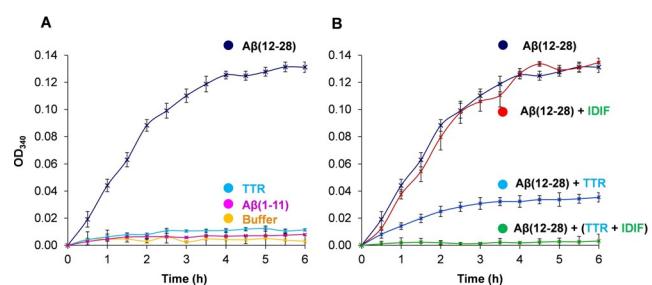


Figure 3. Aggregation kinetics of the A β (12–28) peptide measured using the HTS operating format in a 96-well plates: A) Control experiments: dark blue, A β (12–28) (100 μ M); light blue, TTR (50 μ M); pink A β (1–11) and yellow, buffer. B) Dark blue, A β (12–28); red, A β (12–28) with IDIF; light blue, A β (12–28) with TTR (binary complex); green, A β (12–28) plus TTR/IDIF mixture (ternary complex). Samples were assayed in duplicate and results are representative of three different experiments ($n=6$). Studies were performed at pH 7.4 in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine and 5% DMSO (final concentration) at 37 °C.

Table 1. Quantification of SMCs potency.

	OD340	p-value ^[a]	Reduction of aggregation (%) (RA \pm SD %)
A β (12–28)	0.131 \pm 0.009		0
A β (12–28) + TTR	0.028 \pm 0.004	0.000*	79 \pm 2.5
A β (12–28) + [TTR + IDIF]	0.006 \pm 0.005	0.000*	96 \pm 1.4

[a] Statistically significant factors and interactions are those whose p-value < 0.05; p-value obtained using the non-parametric Wilcoxon rank-sum test.^[29]

Alternative assay monitoring

Following the assumption that A β (12–28) aggregation yields amyloid structures, monitoring of the assay was also investigated using Thioflavin-T (ThT) fluorescence. Given that ThT tightly binds to amyloid structures, this method is widely accepted and used for the characterization of amyloid aggregates.^[31] As seen in Figure 4 the kinetic patterns of A β (12–28) aggregation in the different conditions of the assay are consistent with the formation of amyloid structures which are greatly reduced by TTR/IDIF complexes. These patterns are in good accordance with the ones obtained by UV monitoring.

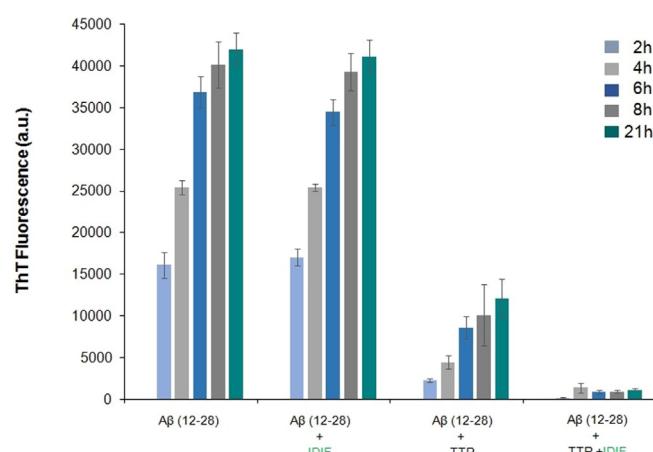


Figure 4. ThT fluorescence monitoring of the aggregation of A β (12–28). Kinetic course of A β (12–28) only; A β (12–28) in the presence of IDIF; A β (12–28) in complex with TTR and in complex with TTR stabilized with IDIF. ThT fluorescence was measured at 37 °C at different time intervals. Studies were performed at pH 7.4 in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine and 5% DMSO (final concentration) at 37 °C.

To further investigate the nature of the A β (12–28) aggregates formed in the different assay conditions a morphological analysis by transmission electron microscopy (TEM) was performed. The ultrastructural examination revealed that after 48 h of incubation at 37 °C, A β (12–28) formed highly ordered and structured fibrils. However, in the presence of TTR/IDIF complexes only round and small particles were observed (Figure S9).

It is well established that A β peptides and its oligomeric forms are toxic to neural cells leading to apoptosis and cellular death. It is also settled that TTR protects against this neurotoxicity.^[5,6,32] Caspase-3 activation is one of the methods to measure this toxicity. Using caspase-3 activation tests on the samples of our screening test we have observed that TTR can reduce up to 45% the levels of caspase-3 activation while the TTR/IDIF complex effect is about 60% (Figure S10).

Assay validation

To examine the proficiency of the assay to discriminate among structurally different SMC, a small set of TTR ligands was selected and tested (Figure 5). Two of them, tafamidis and diflunisal

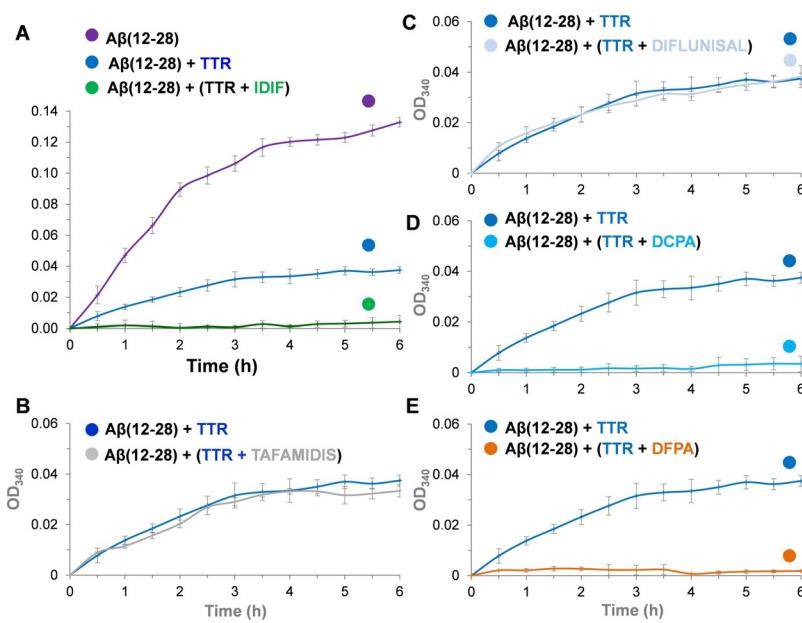


Figure 5. Aggregation kinetics of Aβ(12–28) mediated by the four selected SMC as measured by the turbidity assay at 37 °C over 6 h. Chaperoning effect of: A) IDIF, B) tafamidis, C) diflunisal, D) DCPA, and E) DFPA. Samples were assayed in duplicate and are representative of two different experiments ($n=4$). Studies were performed at pH 7.4 in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine and 5% DMSO (final concentration) at 37 °C. F) Parameters for aggregation from the turbidimetric assay. G) Chemical structures of the SMCs assayed.

are licensed drugs. The *N*-aryl anthranilic acids, *N*-(3,5-dichlorophenyl)anthranilic acid (DCPA) and the *N*-(3,5-difluorophenyl)-anthranilic acid (DFPA) were chosen because of their good TTR binding properties.^[7] As seen in Figure 5D–F, among the four products, DCPA and DFPA show extensive chaperone properties similar to IDIF. Given that these three compounds are good TTR tetramer stabilizers, this condition seems a reasonable preliminary indication for the selection of potential chaperones entering the assay. Furthermore, ITC techniques have been used to corroborate the formation of the corresponding Aβ(12–28)/TTR/SMC ternary complexes with the four selected compounds (Figures S14 and S15). In addition, the aggregation kinetics of Aβ(1–42) in the presence of the four selected SMC have been monitored by ThT assays giving coherent results with the turbidity measurements (Figure S8).

Conclusion

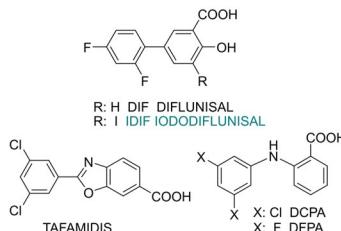
In summary, we have designed and implemented a HTS assay to search for SMCs that may also be good chaperones of the TTR/Aβ peptides interaction. The assay here described makes use of the more simple, easily handling and less costly Aβ(12–28) peptide than the full-length Aβ peptides. The assay monitors Aβ(12–28) aggregation in the presence of both TTR and a SMC, which is a TTR ligand that acts as chaperone of the Aβ(12–28)/TTR interaction. The aggregation kinetics can be monitored with parallel results by either the turbidity of the solutions as detected by UV or ThT fluorescence of the amyloid structures formed. The assay has been optimized for: 1) UV wavelength monitoring (340 nm), 2) Aβ(12–28) aggregation factors (concentration of peptide, buffer solution, incubation temperature) by using a factorial DoE of (3¹²), and 3) TTR/

Aβ(12–28) ratio as to minimize protein expenditure. The assay has been adapted to a 96-well plate format and tested using a set of 4 compounds that have different TTR binding properties. It was observed that TTR ligand ability correlates with chaperone efficiency of the Aβ(12–28)/TTR/SMC interaction. Chaperones always form ternary complexes Aβ(12–28)/TTR/SMC as seen by ITC. We propose that this assay may be a simple and effective tool for screening chaperones of the Aβ peptides/TTR interactions that may constitute potential AD therapeutic agents. We also hope that the methodology here described may be inspiring to settle screening methods for chaperones acting on other proteins interacting with Aβ peptides.

Experimental Section

Chemical compounds

Dimethyl sulfoxide (DMSO); *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N*’-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES); glycine; Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris); TFA, Trifluoroacetic acid and dimethyl sulfoxide (DMSO) were acquired from Sigma-Aldrich. The small-molecule compound iododiflunisal (IDIF), an iodinated analogue of the NSAID diflunisal, was synthesized in our lab IQAC-CSIC following our reported procedures.^[8] The NSAIDs diflunisal (DIF) and *N*-(3,5-dichlorophenyl)anthranilic acid (DCPA) were from Sigma-Aldrich (diflunisal, D3281; DCPA, D8942; purity ≥ 98%). The small-molecule *N*-(3,5-difluorophenyl)anthranilic acid (DFPA) was prepared in our lab as previously described.^[7] Purity of all final compounds was proven to be ≥ 95% by means of HPLC, HR-MS, and NMR techniques. Stocks of compounds assayed as small molecule ligands were dissolved in DMSO (ACS spectrophotometric grade, Sigma 154938) to a final 10 mM concentration. Working solutions of ligands were prepared by taking an aliquot of 50 µL of the DMSO (5%) stock solution and diluting it with 950 µL of buffer A (25 mM



HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 was prepared in the absence of salt), ratio (1:20), equivalent to a 500 μM concentration of ligand.

Amyloid peptide

The amyloid peptide sequences A β (1–11) and A β (12–28) were purchased from Bachem AG (Switzerland) as trifluoroacetate salts (ref. H-2956 and H-7910, respectively). Purity by HPLC >95%). The A β (12–28) peptide was also synthesized by Microwave Solid-Phase Peptide Synthesis (MW-SPPS) using Fmoc chemistry using the corresponding Fmoc protected amino acids. Cleavage from resin was performed using TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5) (V:V:V) and the peptide was precipitated with *tert*-butyl methyl ether. The peptide was purified by RP-HPLC using a VersaFlash® system and characterized by analytical RP-HPLC and UPLC-ToF MS and compared to the commercial sample acquired from Bachem (H-7910).

Recombinant wild-type human TTR (wt rhTTR) production and purification

Human wild type rhTTR gene was cloned into a pET expression system and transformed into *E. coli* BL21(DE3) Star. The phTTRwt-/pET-38b(+) plasmid was provided by Prof. Antoni Planas (IQS, URL). The production of recombinant protein was performed at Erlenmeyer scale, protein production and purification were done as described previously following an optimized version of our protocol (Scheme S1).^[21] wt rhTTR was produced using a pET expression System. The expressed protein only contains an additional methionine on the N-terminus if compared to the mature natural human protein sequence. wt rhTTR protein was expressed in *E. coli* BL21-(DE3) cells harboring the corresponding plasmid. Expression cultures in 2xYT rich medium containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin were grown at 37 °C to an optical density (at 600 nm) of 4 (OD600≈4), then induced by addition of IPTG (1 mM final concentration), grown at 37 °C for 20 h, and harvested by centrifugation at 4 °C, 10000 rpm for 10 min and resuspended in cell lysis buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.6). Cell disruption and lysis were performed by French press followed by a sonication step at 4 °C. Cell debris were discarded after centrifugation at 4 °C, 11 000 rpm for 30 min. Intracellular proteins were fractionated by ammonium sulfate precipitation in three steps. Each precipitation was followed by centrifugation at 12 °C, 12 500 rpm for 30 min. The pellets were analyzed by SDS-PAGE (14% acrylamide). The TTR-containing fractions were re-suspended in 20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.6 (buffer A) and dialyzed against the same buffer. It was purified by ion exchange chromatography using a Q-Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) anion exchange column and eluting with a NaCl linear gradient using 0.1 M NaCl in 20 mM Tris-HCl pH 7.6 (buffer A) to 0.5 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.6 (buffer B). All TTR-enriched fractions were dialyzed against deionized water in three steps and were lyophilized. The protein was further purified by gel filtration chromatography using a Superdex 75 prep grade resin (GE Healthcare Bio-Sciences AB) and eluting with 20 mM Tris pH 7.6, 0.1 M NaCl. Purest fractions were combined and dialyzed against deionized water and lyophilized. The purity of protein preparations was >95% as judged by SDS-PAGE. Average production yields were 150–200 mg of purified protein per liter of culture. Protein concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm using calculated extinction coefficient value of 17 780 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ for wtTTR. The protein was stored at –20 °C.

Turbidity assay

In this assay the following stock solutions were used: Buffer A: 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 was prepared in the absence of salt. Protein (TTR) stock: 9.5 mg mL^{-1} (170 μM) in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5% DMSO (final concentration) was prepared in the absence of salt (buffer A). For the A β peptide stock: 0.4 mg mL^{-1} (200 μM) in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5% DMSO (final concentration). For the small-molecule compound IDIF, a first solution of 3.76 mg mL^{-1} (10 mM) in DMSO was prepared. The final stock of the small-molecule IDIF was prepared by mixing 50 μL of the previous DMSO solution with 950 μL of buffer A (the final concentration of 5% DMSO).

First, the small-molecule compound and TTR complex was formed. To this end, 60 μL of TTR stock was dispensed into the wells of a 96-well microplate. 40 μL of small-molecule stock was added to give final concentrations of 100 μM . The plate was introduced in the microplate reader (SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices Corporation, California, USA) and incubated for 1 h at 37 °C with orbital shaking 15 s every 30 min. Then, 100 μL of A β solution was added to the well to give a final concentration of 100 μM .

Other wells of the 96-well microplate are filled with: a) Buffer alone: 200 μL of buffer A solution was added to the well; b) Negative control of A β aggregation: 200 μL of A β (1–11) stock solution in buffer A was dispensed into the wells; c) Testing TTR aggregation: 60 μL of TTR stock were dispensed into the wells of a 96-well microplate and 140 μL of buffer A were added; d) For the A β (12–28) aggregation: 100 μL of A β (12–28) stock solution is dispensed into the wells and 100 μL of buffer A were added.

The plate was incubated at 37 °C in a thermostated microplate reader with orbital shaking 15 s every minute for 30 min. The absorbance at 340 nm was monitored for 6 h at 30 min intervals. Data were collected and analyzed using Microsoft Excel software. All assays were done in duplicate. The parameter monitored in this assay was used to calculate the percent reduction of formation of aggregates (RA %) according to Equation (1), where Abs_{A β} and Abs_c are the final absorbance of the samples, in the absence or in the presence of the small-molecule compound/TTR complex; respectively.

$$RA (\%) = \left[1 - \left(\frac{Abs_c}{Abs_{A\beta} + Abs_c} \right) \right] * 100 \quad (1)$$

Statistical analysis

The quality of an assay for HTS can be evaluated based on the Z'-factor^[30] which reflects the separation in mean values for the high and low controls while taking into consideration the variability within each group. A Z' factor below zero indicates poor quality assay with no separation between the high and low controls. A Z'-factor value between 0.5 and 1 indicate an excellent quality assay with large separation between the high and low controls. Preferably, optimized assays have a Z' value above 0.5. The statistical Z'-factor can be calculated using Equation (2):

$$Z' = 1 - \frac{3SD \text{ of sample} + 3SD \text{ of control}}{|mean \text{ of sample} - mean \text{ of control}|} \quad (2)$$

where sample is the highest RA% for A β (12–28) in presence of the binary complex (TTR+IDIF) or TTR alone, and the control is the A β (12–28) aggregation. "Mean" is the mean value of the aggregation after 6 h, and SD is the standard deviation.

Design of experiments (DoE)

Factorial designs are one of the most important DoE because they produce efficient experiments that allow observation of responses to one factor at different levels of other factors in the same experiment.^[22] A factorial design of experiments was employed using the statistical software JMP 12.1.0 (SAS Institute).^[23] The variable to be maximized was the absorbance. Three factors were investigated: the concentration (μM), the temperature ($^{\circ}\text{C}$) and the ionic strength (mM of NaCl). Preliminary investigations were carried out to select initial analysis conditions, taking into account that temperature and ionic strength may have a nonlinear effect on the fibril formation, we have considered these two factors in a two-level design, the temperature at 37°C and 40°C and the ionic strength ($[\text{NaCl}]$) at 0 and 100 mM. The concentration was considered at three levels 50, 100, and 200 μM , to identify the sensitivity of our method. The UV absorption maxima for $\text{A}\beta$ -peptide fibril formation is achieved at 340, 360, and 405 nm. Specific experimental conditions tested, and the flow layout of a design of experiments can be found in the Supporting Information (Scheme S3).

Thioflavin-T fluorescence assays

The robustness of our turbidimetry-based method was further validated on the basis of comparative by Thioflavin-T (ThT) fluorescence assays on the same system. The ThT fluorescence was monitored at 37°C using Gemini XPS plate reader (Molecular Devices) at an excitation wavelength of 440 nm and an emission wavelength of 490 nm. Thioflavin-T (ThT) was dissolved in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5% DMSO to a final concentration of 25 μM . Aggregation of $\text{A}\beta(12-28)$ 50 μM was performed in the presence of 25 μM ThT. All solutions were dissolved in the same buffer. TTR was added to a final concentration of 25 μM . IDIF was added to a final concentration of 50 μM . For the ternary complex, TTR was incubated first with IDIF for 1 h, then $\text{A}\beta(12-28)$ was added. The final volume was 200 μL for all samples. Fluorescence intensity at 490 nm of each sample was monitored after each 2 h for 8 h, and then at 21 h. Measurements were performed as independent triplicates. Recorded values were averaged and background measurements (buffer containing 25 μM ThT) were subtracted. Measurements were performed as independent triplicates. Recorded values were averaged and background measurements (buffer containing 25 μM ThT) were subtracted.

Transmission electron microscopy (TEM)

$\text{A}\beta(12-28)$ peptide (100 μM), alone or with TTR (20 μM) (alone or pre-incubated with IDIF for 1 hour at 37°C) was incubated at 37°C for 48 h. For visualization by TEM, 5 μL sample aliquots were absorbed to carbon-coated collodion film supported on 200-mesh copper grids, for 5 min, and negatively stained with 1% uranyl acetate. Grids were exhaustively examined with a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope equipped with an Orius Sc1000 digital camera.

Cell culture and caspase-3 assay

SH-SY5Y cells (human neuroblastoma cell line; European Collection of Cell Cultures) were propagated in 25-cm² flasks and maintained at 37°C in a 95% humidified atmosphere and 5% CO₂. Cells were grown in Dulbecco's minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL). Activation of caspase-3 was measured using the CaspACE fluorimetric 96-well plate assay system (Sigma), following the manufacturer's instructions. Briefly,

10 μM $\text{A}\beta(1-42)$ (Genscript) pre-incubated for 48 h at 4°C with shaking, in F12 media (Gibco BRL) with or without 2 μM TTR (alone or previously incubated with IDIF (20 μM) for 1 h at 37°C), were added to 80% confluent cells, cultured in 6-well plates, in Dulbecco's minimal essential medium with 1% fetal bovine serum, and further incubated for 24 h, at 37°C . Subsequently, each well was trypsinized and the cell pellet was lysed in 100 μL of hypotonic lysis buffer (Sigma). Forty μL of each cell lysate were used in duplicates for determination of caspase-3 activation. The remaining cell lysate was used to measure total cellular protein concentration with the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad), using BSA as standard. Values shown are the mean of duplicates and the experiment was performed twice. Comparison between groups was made using the Student's t-test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgements

I.C. worked under the Investigator FCT Program which is financed by national funds through FCT and co-financed by ESF through HPOP, type 4.2—Promotion of Scientific Employment and currently works under the Program CEEC Institucional 2017. G.A. from IQAC-CSIC acknowledges a grant from Fundació Marató de TV3, Spain (Project ref. 20140330-31-32-33-34) and financial support from the Spanish Ministry of Economy (CTQ2016-76840-R). E.Y.C. acknowledges a contract from Ford-Fundación Apadrina la Ciencia. CIC bioGUNE acknowledges the European Research Council for financial support (ERC-2017-AdG, 788143-RECGLYC-ANMR), Instituto de Salud Carlos III of Spain, ISCIII (PRB3 IPT17/0019 to A.G.), Agencia Estatal Investigación of Spain, AEI (CTQ2015-64597-C2-1-P and RTI2018-094751-B-C21) and the Severo Ochoa Excellence Accreditation (SEV-2016-0644). J.L. from CIC biomaGUNE acknowledges the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for financial support through grant CTQ2017-87637. R.G.A. from IQAC-CSIC acknowledges Dr. María José Bleda (CID-CSIC, Spain) for full support on statistical analysis, and Prof. Antoni Planas (IQS-URL) for full technical support on the TTR production; and Dr. David Amabilino for language editing and revision of this manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: amyloids • drug discovery • high-throughput screening assay • small-molecule chaperones • transthyretin/amylloid-beta interactions

- [1] C. C. Blake, M. J. Geisow, S. J. Oatley, B. Rerat, C. Rerat, *J. Mol. Biol.* **1978**, *121*, 339–356.
- [2] a) M. J. Saraiva, *FEBS Lett.* **2001**, *498*, 201–203; b) V. Plante-Bordeneuve, *J. Neurol.* **2018**, *265*, 976–983.
- [3] a) K. M. Pate, R. M. Murphy, *Isr. J. Chem.* **2017**, *57*, 602–612; b) P. Davidsen, A. Westman-Brinkmalm, C. L. Nilsson, M. Lindbjer, L. Paulson, N. Andreasen, M. Sjögren, K. Blennow, *Neuroreport* **2002**, *13*, 611–615.
- [4] a) J. M. Serot, D. Christmann, T. Dubost, M. Couturier, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1997**, *63*, 506–550; b) C. A. Ribeiro, I. Santana, C. Oliveira, I. Baldeiras, J. Moreira, M. J. Saraiva, I. Cardoso, *Curr. Alzheimer Res.*

- 2012, 9, 881–889; c) S. H. Han, E. S. Jung, J. H. Sohn, H. J. Hong, H. S. Hong, J. W. Kim, D. L. Na, M. Kim, H. Kim, H. J. Ha, Y. H. Kim, N. Huh, M. W. Jung, I. Mook-Jung, *J. Alzheimers Dis.* 2011, 25, 77–84.
- [5] L. Nilsson, A. Pamréen, T. Islam, K. Bränström, S. A. Golchin, N. Pettersson, I. Iakovleva, L. Sandblad, A. L. Gharibyan, A. Olofsson, *J. Mol. Biol.* 2018, 430, 2722–2733.
- [6] S. A. Ghadami, S. Chia, F. S. Ruggeri, G. Meisl, F. Bemporad, J. Habchi, R. Cascella, C. M. Dobson, M. Vendruscolo, T. P. J. Knowles, F. Chiti, *Biomacromolecules* 2020, 21, 1112–1125.
- [7] C. A. Ribeiro, M. J. Saraiva, I. Cardoso, *PLoS One* 2012, 7, e45368.
- [8] a) M. R. Almeida, B. Macedo, I. Cardoso, I. Alves, G. Valencia, G. Arsequell, A. Planas, M. J. Saraiva, *Biochem. J.* 2004, 381, 351–356; b) T. Mairal, J. Nieto, M. Pinto, M. R. Almeida, L. Gales, A. Ballesteros, J. Barluenga, J. J. Pérez, J. T. Vázquez, N. B. Centeno, M. J. Saraiva, A. M. Damas, A. Planas, G. Arsequell, G. Valencia, *PLoS One* 2009, 4, e4124; c) L. Gales, S. Macedo-Ribeiro, G. Arsequell, G. Valencia, M. J. Saraiva, A. M. Damas, *Biochem. J.* 2005, 388, 615–662.
- [9] C. A. Ribeiro, S. M. Oliveira, L. F. Guido, A. Magalhaes, G. Valencia, G. Arsequell, M. J. Saraiva, I. Cardoso, *J. Alzheimers Dis.* 2014, 39, 357–370.
- [10] X. Rios, V. Gómez-Vallejo, A. Martín, U. Cossío, M. Á. Morcillo, M. Alemi, I. Cardoso, J. Quintana, J. Jiménez-Barbero, E. Y. Cotrina, G. Valencia, G. Arsequell, J. Llop, *Sci. Rep.* 2019, 9, 13672.
- [11] L. Rej, V. Gómez-Vallejo, X. Rios, U. Cossío, Z. Baz, E. Mujica, T. Gião, E. Y. Cotrina, J. Jiménez-Barbero, J. Quintana, G. Arsequell, I. Cardoso, J. Llop, *J. Alzheimers Dis.* 2020, 77, 99–112.
- [12] 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, *J. Med. Chem.* 2017, 60, 5749–5758.
- [13] a) P. E. Eraser, L. Lévesque, D. R. McLachlan, *J. Neurochem.* 1994, 62, 1227–1230; b) J. F. Flood, J. E. Morley, E. Roberts, *Brain Res.* 1994, 663, 271–276; c) F. Hsu, G. Park, Z. Guo, *ACS Omega* 2018, 3, 8401–8407.
- [14] a) S. Daly, A. Kulesza, F. Poussigue, A. L. Simon, C. M. Choi, G. Knight, F. Chirot, L. MacAleece, R. Antoine, P. Dugourd, *Chem. Sci.* 2015, 6, 5040–5047; b) J. Jarvet, P. Damberg, K. Bodell, L. E. G. Eriksson, A. Graslund, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 4261–4268; c) J. Jarvet, P. Damberg, J. Danielsson, I. Johansson, L. E. Eriksson, A. Graslund, *FEBS Lett.* 2003, 555, 371–374.
- [15] a) T. A. Enache, A. M. Chiorcea-Paquin, A. M. Oliveira-Brett, *Anal. Chem.* 2018, 90, 2285–2292; b) R. Liu, C. McAllister, Y. Lyubchenko, M. R. Siersk, *J. Neurosci. Res.* 2004, 75, 162–171.
- [16] S. J. Wood, R. Wetzel, J. D. Martin, M. R. Hurle, *Biochemistry* 1995, 34, 724–730.
- [17] a) P. E. Fraser, J. T. Nguyen, W. K. Surewicz, D. A. Kirschner, *Biophys. J.* 1991, 60, 1190–1201; b) P. Mandal, N. Eremina, A. Barth, *J. Phys. Chem. B* 2012, 116, 12389–12397.
- [18] a) A. A. Golabek, M. Marques, M. Lalowski, T. Wisniewski, *Neurosci. Lett.* 1995, 191, 79–82; b) M. Sadowski, J. Pankiewicz, H. Scholtzova, J. A. Rippelino, Y. Li, S. D. Schmidt, P. M. Mathews, J. D. Fryer, D. M. Holtzman, E. M. Sigurdsson, T. Wisniewski, *Am. J. Pathol.* 2004, 165, 937–948.
- [19] J. Milojevic, V. Esposito, R. Das, G. Melacini, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 4282–4290.
- [20] E. Y. Cotrina, A. Gimeno, J. Llop, J. Jiménez-Barbero, J. Quintana, G. Valencia, I. Cardoso, R. Prohens, G. Arsequell, *J. Med. Chem.* 2020, 63, 3205–3214.
- [21] I. Dolado, J. Nieto, M. J. Saraiva, G. Arsequell, G. Valencia, A. Planas, *J. Comb. Chem.* 2005, 7, 246–252.
- [22] a) R. O. Kuehl, *Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis*. 2nd ed., Duxbury/Thomson Learning, Pacific Grove, 2000; b) G. E. P. Box, J. Stuart Hunter, W. G. Hunter, *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*, 2nd ed., Wiley, Hoboken, 2005.
- [23] a) L. Ji, X. Zhao, Z. Hua, *J. Alzheimers Dis.* 2015, 44, 13–25; b) Y. Yu, L. Zhang, C. Li, X. Sun, D. Tang, G. Shi, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 12832; *Angew. Chem.* 2014, 126, 13046.
- [24] a) A. R. Nelson, A. P. Sagare, B. V. Zlokovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017, 114, 8681–8682; b) M. Beeg, M. Stravalaci, M. Romeo, A. D. Carrá, A. Cagnotto, A. Rossi, L. Diomedè, M. Salmona, M. Gobbi, *J. Biol. Chem.* 2016, 291, 6958–6966.
- [25] T. Wisniewski, E. Drummond, *Neurobiol. Dis.* 2020, 138, 104784.
- [26] a) M. Boada, O. López, L. Núñez, Z. M. Szczepiorkowski, M. Torres, C. Grifols, A. Páez, *Alzheimers Dement.* 2019, 5, 61–69; b) M. Algamal, R. Ahmed, N. Jafari, B. Ahsan, J. Ortega, G. Melacini, *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 17158–17168.
- [27] a) C. Wurth, N. K. Guimard, M. H. Hecht, *J. Mol. Biol.* 2017, 319, 1279–1290; b) A. Roostaei, S. Côté, X. Roucou, *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 30907–30916; c) L. C. López, S. Dos-Reis, A. Espargaró, J. A. Carrodeguas, M. L. Maddelein, S. Ventura, J. Sancho, *J. Med. Chem.* 2012, 55, 9521–9530.
- [28] JMP®, Version 12.1.0. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- [29] F. Wilcoxon, *Biometrics* 1945, 1, 80–83.
- [30] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. A. Oldenburg, *J. Biomol. Screening* 1999, 4, 67–73.
- [31] H. LeVine 3rd, *Protein Sci.* 1993, 2, 404–410.
- [32] R. Costa, A. Gonçalves, M. J. Saraiva, I. Cardoso, *FEBS Lett.* 2008, 582, 936–942.

Manuscript received: June 18, 2020

Revised manuscript received: August 3, 2020

Accepted manuscript online: August 6, 2020

Version of record online: November 19, 2020

Capítulo 3

Artículo 4: Targeting transthyretin in Alzheimer's disease: drug discovery of small-molecule chaperones as disease-modifying drug candidates for Alzheimer's disease.

Cotrina, E.Y.; ¹ Santos, L.M.; ² Rivas, J.; ³ Blasi, D.; ⁴ Leite, J.P.; Liz, M.A; Busquets, M.A.;⁷ Planas, A.;⁸ Prohens, R.;⁹ Gimeno, A.;¹⁰ Jiménez-Barbero, J.; ¹⁰ Gales, L.; Llop, J.; ⁶ Quintana, J.; ⁴ Cardoso, I. and Arsequell, G.¹

¹ Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

² IBMC - Instituto de Biologia Celular e Molecular, 4200-135 Porto, Portugal.

³ i3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, 4200-135 Porto, Portugal.

⁴ Plataforma Drug Discovery, Parc Científic de Barcelona (PCB), 08028 Barcelona, Spain.

⁵ Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), 4050-013 Porto, Portugal.

⁶ CIC biomaGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 20014 San Sebastian, Spain

⁷ Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació. UB. 08028 Barcelona

⁸ Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, 08017 Barcelona, Spain

⁹ Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

¹⁰ CIC biogUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Bizkaia Technology Park, Building 800, 48160 Derio, Spain.

¹¹ Ikerbasque, Basque Foundation for Science, 48009 Bilbao, Spain.

(submitted)

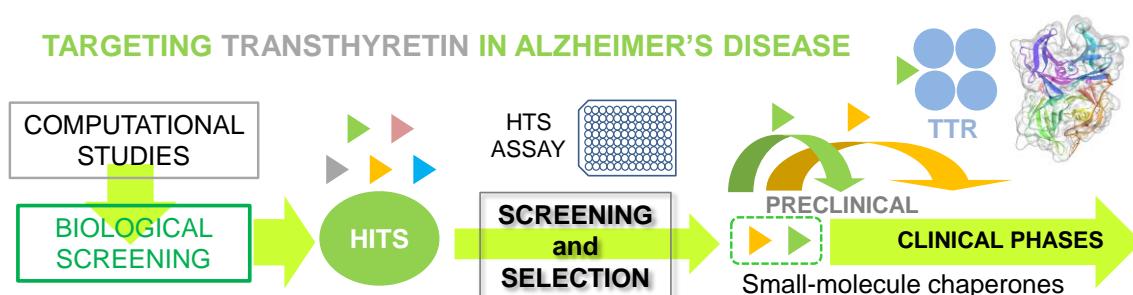
ISSN:

Category:

IF

Q

Graphical Abstract



Targeting transthyretin in Alzheimer's disease: drug discovery of small-molecule chaperones as disease-modifying drug candidates for Alzheimer's disease.

Ellen Y. Cotrina,[#] Luis Miguel Santos,^{,^{1,2}}, Josep Rivas,[†] Daniel Blasi,[†] José Pedro Leite,^{,^{1,2}}, Márcia A. Liz,^{,^{1,2}} Maria Antònia Busquets,[±] Antoni Planas,[~] Rafel Prohens,[○] Ana Gimeno,[□] Jesús Jiménez-Barbero^{□,¹}, Luis Gales,^{,^{1,2}}, Jordi Llop,[†] Jordi Quintana,^{†, *} Isabel Cardoso,^{,^{1,2}, *,[‡]}, and Gemma Arsequell,^{,^{#, *[,],[‡]}}

[#]Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.), 08034 Barcelona, Spain.

¹IBMC - Instituto de Biología Celular e Molecular, 4200-135 Porto, Portugal.

¹i3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, 4200-135 Porto, Portugal.

[†]Plataforma Drug Discovery, Parc Científic de Barcelona (PCB), 08028 Barcelona, Spain.

[□]Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), 4050-013 Porto, Portugal.

[‡]Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació. University of Barcelona. 08028 Barcelona

[~]Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, 08017 Barcelona, Spain

[○]Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

[□]CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Bizkaia Technology Park, Building 800, 48160 Derio, Spain.

[†]Ikerbasque, Basque Foundation for Science, 48009 Bilbao, Spain.

[‡]CIC biomaGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 20014 San Sebastian, Spain

[‡]Equally contributing corresponding authors

* To whom correspondence should be addressed

KEYWORDS Targeting transthyretin (TTR) • transthyretin / A β interaction • HTS screening • disease-modifying drugs • Alzheimer's Disease drug discovery

ABSTRACT: Transthyretin (TTR) has a well-established role in neuroprotection, evidenced in Alzheimer's Disease (AD). By targeting TTR we have setup a drug discovery program of small-molecule compounds that act as chaperones, enhancing TTR/amyloid- β (A β) interactions. In a first stage, we carried out two computational drug repurposing approaches. In a second stage, the computationally selected compounds were assessed for their ability to bind and stabilize the TTR tetramer, using thyroxine displacement tests, and by assessing the level of monomers, respectively. In a third stage, the selected 53 best performing molecules were run through our in-house validated high-throughput screening ternary test. By targeting transthyretin in our AD drug discovery program, small-molecule chaperones (SMCs) have been discovered, providing the basis for a novel target for Alzheimer's disease (AD) based on their enhancement of the TTR/A β interaction. Among the SMCs, we have found our lead small-molecule compound Iododiflunisal (IDIF), a molecule in the discovery phase, one investigational drug (luteolin), and 3 marketed drugs (sulindac, olsalazine and flufenamic), which could be directly repurposed or repositioned for clinical use. Importantly, we found that not all TTR tetramer stabilizers are good SMCs in vitro, emphasizing the importance of our discovery program. A small set of these SMCs will be prioritized to enter preclinical safety studies, to validate TTR as a target in vivo, and to select one repurposed drug as a candidate to enter clinical trials for AD. We envisage that this new target will feed the currently exhausted pipeline of drugs in phase I for AD with the goal of increasing AD disease-modifying therapies.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease and is the leading cause of dementia. AD is characterized by accumulation of amyloid- β (A β) aggregates in various

conformations, filamentous intraneuronal inclusions mainly constituted by hyperphosphorylated Tau protein (p-Tau), and synaptic dysfunction and neuronal loss.¹

One of the most difficult challenges in AD research is to find a disease modifying therapy (DMT),² this is, a therapy with an agent that produces an enduring (permanent) change in the course of AD. Up to now, AD has no currently approved DMTs. The five drugs available in the market are involved in only improving symptoms and are highly patient dependent, and no putative disease modifying drugs or new symptomatic treatments have achieved regulatory approval since 2003.³ There are 121 agents in the current AD treatment pipeline, 36 of them in phase III, 65 in phase II and 27 in phase I clinical trials. Out of these, 97 agents (80%) are in disease modification trials.⁴

AD drug development is not delivering new drugs in the last decades. Among the many explanations for such failure, one is the lack of new chemical entities from drug discovery approaches that reach the clinical Phase I level.⁵⁻⁸ There is an urgent need to find a treatment that prevents, delays the onset or slows the progression of this devastating disease.

With the aim of contributing with new candidate drugs that, after preclinical tests, may feed the currently exhausted pipeline of drugs in phase I for AD, we have settled a drug discovery program targeting transthyretin (TTR) and searching for small-molecule chaperones that may improve the neuroprotective function of TTR in AD.

Transthyretin (TTR), a homotetrameric protein mainly synthesized by the liver and the choroid plexus (CP), and secreted into the blood and the cerebrospinal fluid (CSF), respectively, has been specially recognised for its functions as a transporter protein of thyroxine (T_4) and retinol.⁹ The importance of TTR has also been robustly established in AD pathogenesis.¹⁰ It is most remarkable that TTR is the main $\text{A}\beta$ binding protein in the CSF.¹¹⁻¹³ This binding is believed to naturally prevent $\text{A}\beta$ aggregation and toxicity in this media. Comparative analysis of TTR evidenced decreased levels of this protein, not only in the CSF^{14,15} but also in plasma¹⁶⁻¹⁸ of AD patients, compared to controls. AD TTR-hemizygous mice showed increased $\text{A}\beta$ production and deposition, compared to AD TTR WT littermates,¹⁹ whereas overexpressing human TTR WT in an AD mouse model decreased neuropathology and $\text{A}\beta$ deposition.²⁰ Regarding the mechanisms proposed as underlying TTR neuroprotection in AD, *ex vivo* and *in vitro* studies, established that TTR has the ability to bind to $\text{A}\beta$, avoiding its aggregation and toxicity.²¹⁻²⁶ Recent reports suggest that TTR binds to $\text{A}\beta$ oligomers and inhibits primary and secondary nucleation processes.^{25,26} TTR was also shown to assist $\text{A}\beta$ brain efflux through the blood-brain barrier, and to promote its degradation in the liver. Results also revealed that TTR regulates the expression of LRP1, by increasing its levels, both in the brain and in the liver.²⁷ Recent data implicated TTR reduction in the thickening of the basement membrane of brain microvessels in AD mice,²⁸ an alteration that also occurs in the AD brain.²⁹

TTR tetrameric stability appears as a key factor in its interaction with $\text{A}\beta$ peptide. Interestingly, TTR stability is also a key factor in Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP)^{30,31} a systemic amyloidosis with a special involvement of the peripheral nerve system, which results from the aggregation, deposition and toxicity of mutated TTR. Since it is believed that tetramer dissociation into monomers is the first step leading to TTR amyloid formation,³² TTR tetrameric stabilization has been defined as the basis for one of the possible therapeutic strategies in FAP.³³⁻³⁵ Such stabilization can be achieved through the use of small compounds sharing molecular structural similarities with thyroxine (T_4) which bind in the T_4 central binding

channel.^{36,37} The search for TTR stabilizing ligands using virtual screening and computational procedures has been carried out previously³⁸⁻⁴⁰ and there is a large number of TTR and TTR-ligand three dimensional structures reported at the PDB.⁴¹ These computational and structural studies have been instrumental in the design, discovery and development of TTR stabilizing compounds that have either reached the market, like Tafamidis,^{42,43} or that have reached clinical phases, like Tolcapone, a repurposed drug approved for the treatment of Parkinson's disease (Figure 1).⁴⁴

We have demonstrated by early *in vitro* studies that TTR and $\text{A}\beta$ bind together and that this interaction can be enhanced by a small set of TTR tetramer-stabilizing compounds,⁴⁵ one of them iododiflunisal (IDIF), a iodinated analog of the NSAID diflunisal (DIF) (Figure 1).⁴⁶⁻⁴⁸ More importantly, *in vivo* administration of IDIF to a mouse model of AD, resulted in decreased brain $\text{A}\beta$ levels and deposition,^{49,50} and improving the cognitive functions that are impaired in this AD-like neuropathology.⁴⁹

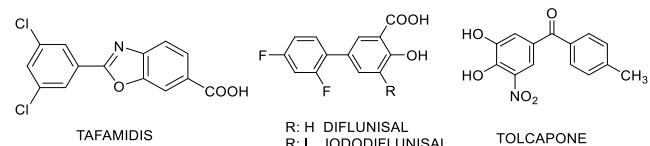


Figure 1. Chemical structures of TTR tetramer stabilizers: the orphan drug Tafamidis, the Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diflunisal (DIF), the repurposed drug Tolcapone for Familial amyloid polyneuropathy (FAP) and our lead compound iododiflunisal (IDIF).

Drug repurposing of already known drugs for new indications is a drug discovery approach increasingly being used to search for new therapies for diseases with unmet clinical needs. Both *in silico*^{51,52} and experimental⁵³ approaches on drug repurposing have been recently reviewed, as well as the application of this approach to drug discovery for AD.⁵⁴⁻⁵⁶ Furthermore, another interesting strategy in drug discovery is the multi-target approach, which aims to have a synergistic effect thanks to the interaction of a given ligand with different targets that are involved in a disease's pathway. Therefore, these synergies through target promiscuity could be translated into lower doses and reduced side effects.^{57,58}

In this paper, we report the discovery of TTR stabilizers through two complementary *in silico* drug repurposing approaches, as well as the systematic biological evaluation of the selected compounds on TTR stability, through competition with T_4 for TTR binding, and by measuring the amount of monomers. This process has led to the prioritization of a set of 53 TTR tetramer stabilizing compounds and to an analysis of their ability to enhance the TTR/ $\text{A}\beta$ interaction. Using our high throughput screening (HTS) proprietary ternary assay,²⁴ we have evaluated these 53 small-molecule compounds and have obtained a subset of small molecule chaperones (SMCs), among them our lead compound IDIF, one clinical phase compound (luteolin), and three approved drugs for other diseases (sulindac, olsalazine and flufenamic acid), that could enter clinical trials for AD as repurposed drugs.

RESULTS AND DISCUSSION

Computational studies. In order to find small molecule chaperones that enhance the TTR/ $\text{A}\beta$ interaction, two computational pipelines have been established, addressing drug

repurposing and polypharmacology, as shown in Figure 2. The first approach started with the construction of a TTR/A β model as described in the Materials and Methods section. Then, compounds from the Integrity database (<https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/>) and from the literature were selected, so as they were either (i) known TTR binders, (ii) amyloid peptide binding ligands, or (iii) both, or (iv) compounds under study in clinical phases for the treatment of Alzheimer's disease. The use of the CARLSBAD software and database⁵⁹ allowed us to find privileged scaffolds with reported biological activity against both TTR and A β systems. This scaffold hunting methodology allowed us to find a group of compounds containing the stilbene substructure and able to interact with both entities (TTR and A β). Then, this stilbene scaffold was used to select molecules by substructure search in the Integrity-derived and literature-derived databases already mentioned, and the selected compounds were then prioritized by docking into our TTR/A β model. In total, 48 compounds with docking scores similar to IDIF (used as the cross-reference compound in the docking experiments) were prioritized, and 20 of them, that were commercially available, were selected and acquired to carry out the experimental assays.

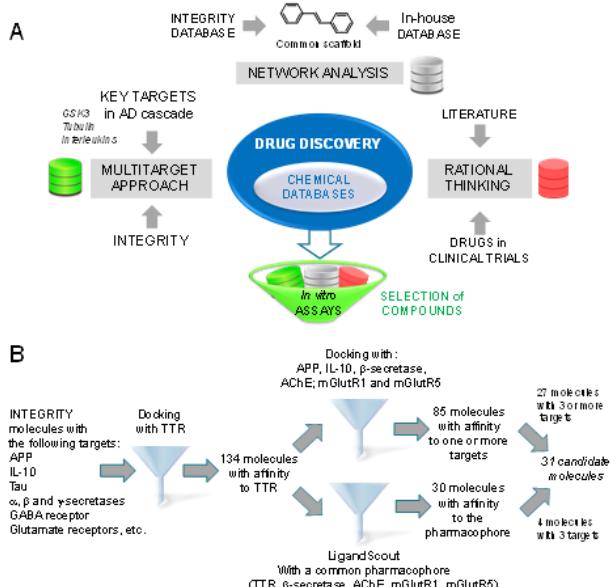


Figure 2. Computational workflows for the selection of modulators of TTR/A β interaction (A) Based on drug repurposing and multi-target approach; (B) Based on multi-target computational docking and searches on common pharmacophores for several targets.

A second computational approach was carried out in order to exploit the drug-promiscuity and polypharmacology in a multi-target-based pipeline. This methodology allowed us to identify molecules able to bind TTR that also bind additional targets that have been associated with the treatment of AD and that are relevant in its pathological pathways. As described in the Materials and Methods section in the Supporting Information, this strategy includes multi-target molecular docking and molecular searches through common pharmacophore models to a set of targets (Figure 2B). Starting from the Thomson Reuters Integrity database (<https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/>), which contains small molecules and drugs in the market or advanced clinical phases, we selected nearly 1400 compounds that were reported in preclinical, clinical or marketed phase and that had their protein target reported as one or

more of the following, which have been associated to AD: APP (amyloid precursor protein); AchE (acetylcholinesterase); IL-10 (interleukin-10); α -, β - and γ -secretases; Tau protein; GABA and glutamate receptors. All these compounds were then docked into the TTR model, prioritizing a pool of 134 molecules that would theoretically bind the TTR T₄-channel with an affinity similar to IDIF. These molecules were then analyzed theoretically through cross-docking into the following protein structures: IL-10 (Interleukin-10) (PDB code 1ILK); inhibitor domain of APP (amyloid precursor protein; β -secretase (memapsin 2) complexed with inhibitor OM99-2 (PDB code 1FKN); human acetylcholinesterase (AChE) complexed with fasciculin-II (PDB code 1B41); metabotropic glutamate receptor 1 with LY341495 antagonist (PDB code 3KS9); metabotropic glutamate receptor 5 with glutamate (PDB code 3LMK). All these docking experiments lead to a prioritized list of 85 molecules, which were filtered to 27 molecules that would theoretically bind to TTR/A β complex (by docking experiments) and 4 additional AD related targets (multi-target docking approach for ligand selection). In addition, the 134 molecules that were selected before through docking with TTR were further analyzed computationally through the software LigandScout.⁶⁰ A common pharmacophore was built starting from the binding sites of TTR, β -secretase, metabotropic glutamate receptor 1 and metabotropic glutamate receptor 5, and then the 134 molecules were screened against this pharmacophore; 13 of them coincided with the list of 27 molecules derived from the multi-target docking, but we were able to select 4 additional molecules that matched with the common pharmacophore. The Table S1 in the supplementary material contains all the chemical structures of the compounds that were selected through these computational procedures, as well as other molecules (that had been reported as TTR ligands, in the literature, and from previous studies in our laboratory), which were also selected after docking them into our TTR/A β model, and the results of the associated experimental assays for all the selected molecules, which are described hereunder.

Thyroxine binding assays and TTR stability assays. To confirm the ability of the proposed compounds to bind TTR we designed a flow chart through which all the selected compounds were experimentally assayed (Figure 3).

The first assay, to which all compounds were submitted, was a T₄ displacement assay.^{44,46} In brief, radiolabeled [¹²⁵I]-T₄ was incubated alone or in the presence of each of the compounds with TTR, and then samples were run in a native PAGE gel. Compounds that are able to bind to TTR in the T₄ central binding channel, and thus to displace [¹²⁵I]-T₄, result in decreased intensity of the [¹²⁵I]-T₄/TTR band. When using plasma as a source of TTR, which is the case of the present work, this approach also enables the visualization of the bands corresponding to the other T₄ transporter proteins, such as thyroxine-binding globulin (TBG) and albumin. IDIF was used as a reference compound (see representative example in Figure 3A). This assay, although not quantitative, is of utmost importance, in particular when using human plasma, since it also reveals the effect of the compounds in the other referred T₄ transporter proteins, and therefore, on their specificity for TTR binding. Using this approach, we characterized the behavior of the compounds regarding their ability to displace T₄ and their specificity for TTR binding (see Table S1 in the Supporting Information for a complete view of the behavior of all compounds in the qualitative T₄ displacement assay).

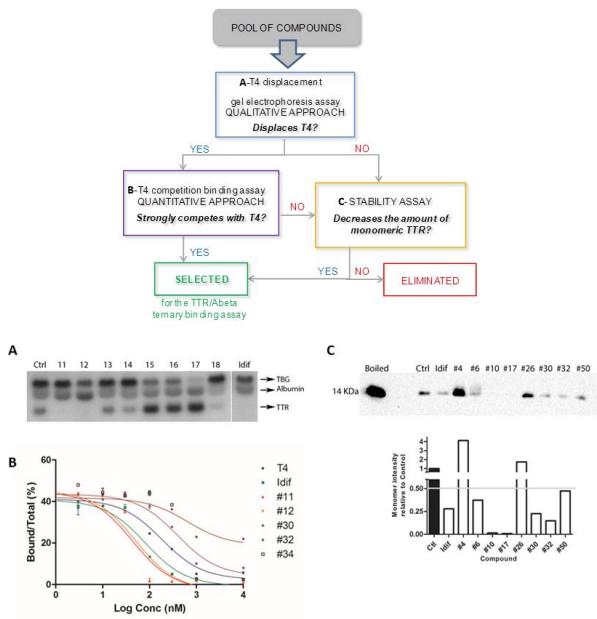


Figure 3. Flowchart to which compounds were subjected to determine experimentally which compounds bind to and stabilize TTR, and representative images of the results obtained in each assay. (A) The T₄ binding gel electrophoresis assay, using human plasma incubated with [¹²⁵I]-T₄ and with various compounds as competitors. The migration of the different plasma T₄ binding proteins is indicated. (B) The displacement of [¹²⁵I]-T₄ from WT TTR by competition with the compounds. The curves were obtained using various compounds indicated as competitive inhibitors. (C) The TTR stability assay, in which samples were analysed by Western Blot after incubation of the compounds with WT-TTR, under semi-denaturing conditions; the quantification plot presents the intensity of monomer band, relative to the control condition which was considered one. (See compounds in Table S1 at the SI).

In addition to high affinity for TTR, compounds should also be specific for this protein, since lack of specificity, together with the high abundance of other plasma proteins, such as albumin, for instance, could lead to failure in therapeutics. However, at this stage of our selection, we mainly aimed at identifying strong TTR stabilizers which will be further investigated for their capacity to enhance the TTR/A_β interaction. Thus, at this point all compounds that completely or significantly displaced T₄ from TTR, were selected for the quantitative assay regardless of their specificity (Table S1). Selected compounds were then evaluated in a quantitative T₄ assay to determine their EC₅₀ and values were compared to the EC₅₀ of T₄ (a representative example is given in Figure 3B, results in Table S2). Analysis of results enabled us to conclude that only compounds that showed complete T₄ displacement in the qualitative assay, produced EC₅₀ T₄/EC₅₀ compound ratios higher than 1, *i.e.*, with affinity to TTR higher than the one of T₄. Nevertheless, a ratio of EC₅₀ T₄/EC₅₀ compound of 0.5 or superior was used to identify a pool of compounds able to bind TTR efficiently and therefore those that should be tested in our proprietary HTS ternary assay.²⁴ In some instances, compounds revealed a non-standard or ambiguous behavior, hindering the statistical analysis performed for the rest of the compounds.

Nonetheless, and in order to avoid elimination of compounds that could stabilize TTR by pathways other than binding to the T₄ binding site, all of the non-selected compounds were assessed in a TTR stability assay.⁶¹ This approach was employed to test and to evaluate the ability of the non-selected compounds to stabilize TTR, by electrophoretic means, under semi-denaturing conditions, as described in the Material and Methods section at the Supporting Information. As readout, we assessed the levels of monomeric TTR upon incubation with each compound and values were compared to those obtained in the absence of compound.

Figure 3C displays representative results obtained in this stability assay showing different levels of the TTR monomer. The graphic represents the intensity of the monomer band, considering the value of 1 for the control. Compounds that reduced the intensity of the monomer band to at least half of the intensity in the control, were considered for the final list of the compounds to enter a future ternary assay (Table S1).

Altogether, compounds selected from the T₄ quantitative and the TTR stability assays constitute a subset of 53 molecules amenable to be screened using our proprietary HTS ternary assay (See Table S4 in Supporting Information).

Crystal structures of TTR:ligand complexes. From this final list of compounds to enter a future ternary assay, two compounds, **35** and **73**, were selected for the structure elucidation of the TTR complexes by X-ray diffraction, because their TTR-ligand structures have not been previously analyzed (See Table S3 in Supporting Information). Both compounds bind in the so-called thyroxine binding sites (Figure 4). Compound **35** (Figure 4, left panel) binds very deeply with the iodinated ring located at the outmost part of the T₄ channel. This binding induces the rotation of Ser117 side chains of the four monomers creating new strong intermonomer hydrogen bonds between these residues. The Lys15 residues, located at the entrance of the binding sites, establish interactions with the carboxylate substituents of the ligand. Compound **73** does not bind so deeply in the channel as **35** (Figure 4, right panel) and, consequently, it does not induce the formation of such strong interactions between the Ser117 residues of the TTR tetramer. The Lys15 residues, in the TTR: **73** complex, are not pointing to the center of the channel and are not involved in interactions with the compound.

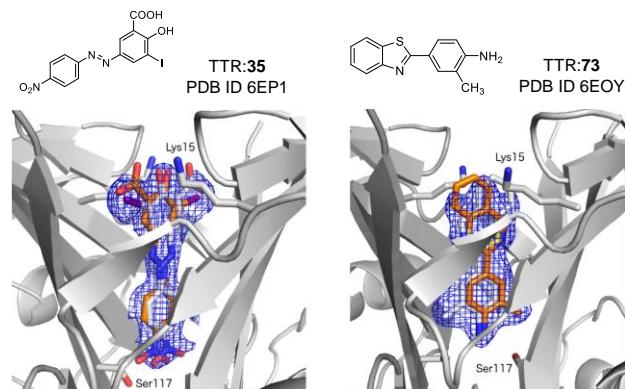


Figure 4. Close view of one binding site of the crystal structures of TTR:**35** (left, PDB ID 6EP1) and TTR:**73** (right, PDB ID 6EOY). The two-symmetry related positions of each compound are shown with carbon atoms in grey and orange. The 2Fo-Fc electron density maps at 1σ are drawn as a blue mesh around compounds **35** and **73** and residues Lys15 and Ser117 highlighted in stick representation.

Selection of small-molecule chaperones (SMCs): HTS ternary assay, ITC studies and Tht assays. To efficiently screen for potential small-molecule chaperones of the TTR/A β interaction, we have used our recently in house developed and validated high-throughput assay that relies on the ability of the test compounds to prevent A β aggregation in solutions of preformed TTR/A β complexes.²⁴ The assay makes use of A β (12-28) which has analogous properties as full length A β peptides but is a less expensive and more stable peptide. Thus, the recombinant wtTTR is incubated with the test compound (ratio TTR/compound 1:2) during 1 h and then, A β (12-28) is added to the complex and UV monitoring of turbidity for 6 h allows to

determine its potency. A complete high-throughput screening in this ternary assay was carried out for all the 53 compounds previously selected from computational and biological studies (see Table S5 and Figures S1 to S10 in the SI).

After classifying the compounds according to their potency at reducing A β aggregation a prioritized list was obtained (See Fig 5). In this list we found our lead compound IDIF, the natural product luteolin (LUT), a compound in clinical phases, and three registered drugs, olsalazine (OLS), sulindac (SUL) and flufenamic acid (FLU), among others.

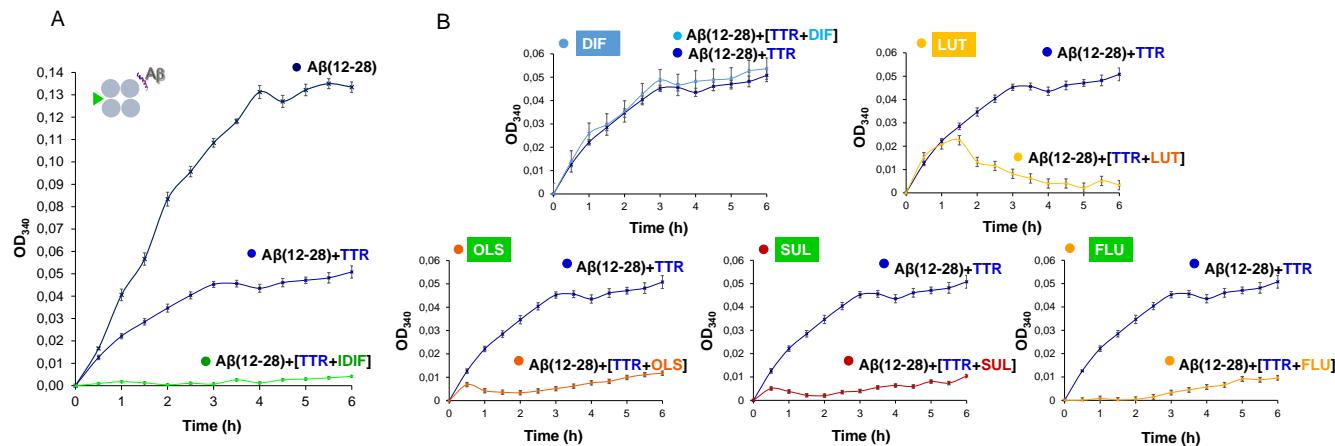


Figure 5. HTS assays. Kinetics of aggregation with best chaperones: (A) binary [A β (12-28) + TTR] and ternary interactions [A β (12-28) + (TTR+IDIF)]; (B) binary [A β (12-28) + TTR] and ternary interactions [A β (12-28) + (TTR+SMC)] with SMCs: LUT, SUL, OLS, and FLU. Ternary interactions [A β (12-28) + (TTR+DIF)] are added for comparison purposes.

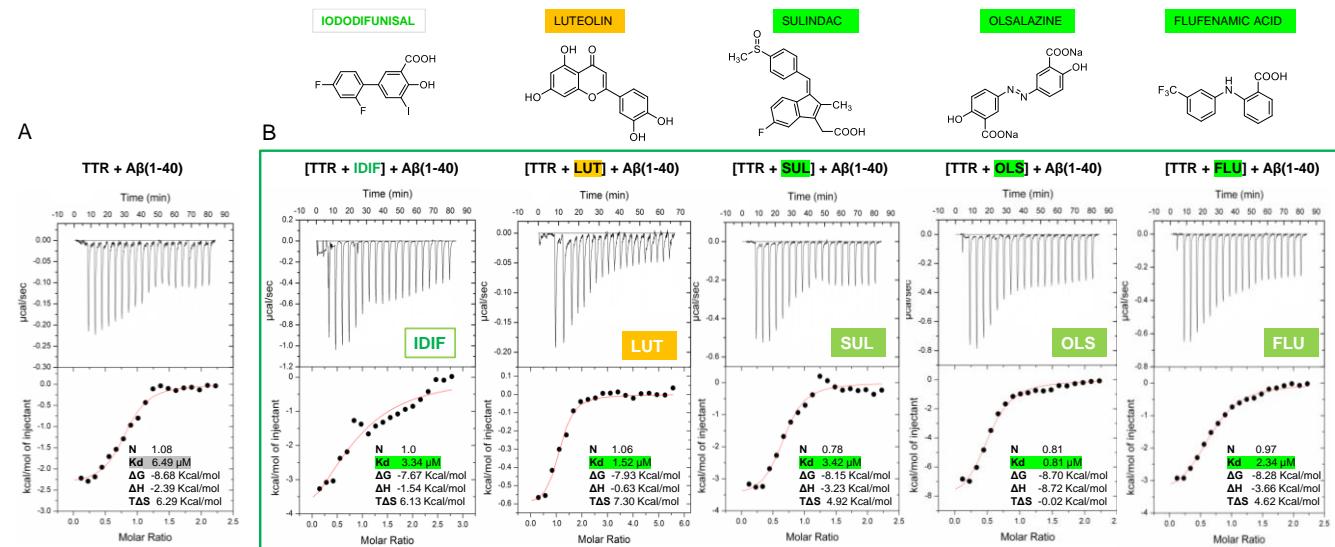


Figure 6. ITC studies of the: A) binary A β (1-40)/TTR complex; and B) of the ternary complexes A β (1-40)/(TTR/SMC) (SMC: IDIF, LUT, SUL, OLS AND FLU).

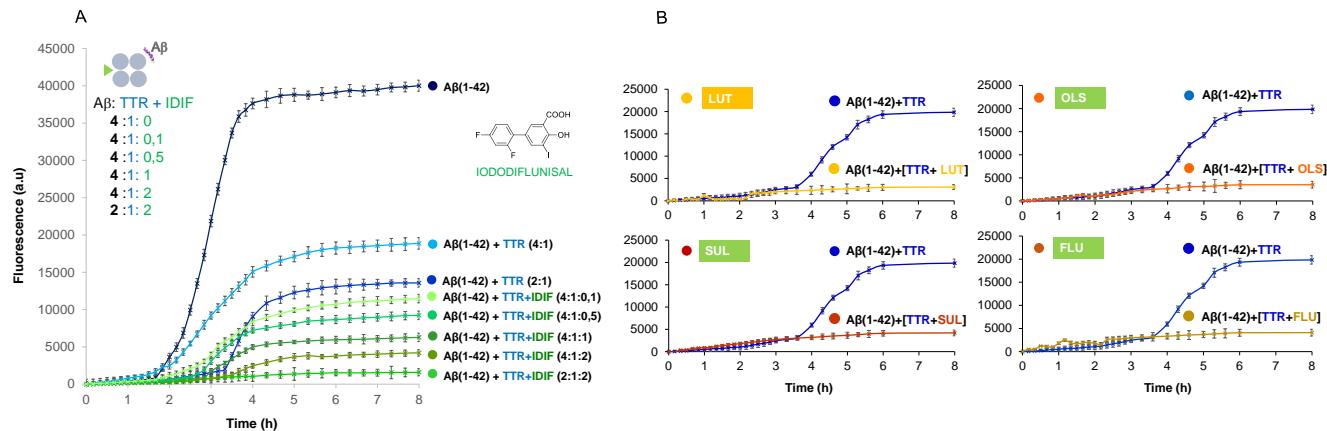


Figure 7: Aggregation kinetics of A β (1-42) monitored by ThT fluorescence assays: A) Dose/response studies: kinetics of aggregation of A β (1-42) in the presence of (TTR+IDIF), fixed ratio A β (1-42) /TTR to (4:1) and increasing the ratio of TTR /IDIF from (1:0) to (1:2); and B) binary [A β (1-42) + TTR] at a ratio (2:1) and ternary interactions [A β (1-42) + (TTR+SMC)] at a ratio (2:1:2) (SMCs: LUT, SUL, OLS, and FLU).

Furthermore, Isothermal Titration Calorimetry (ITC) technique has been used to corroborate the chaperoning effect of five of the best small-molecule compounds as described previously.²³ Thus, we have compared the binding in the A β (12-28)/TTR/SMC ternary complexes with the binary interaction A β (12-28)/TTR (Supporting Information, Figures S11 and S12). In addition, a full thermodynamic characterization of the ternary complexes with A β (1-40) and TTR and each of the five best selected SMCs was obtained (Figure 6). The binary TTR/A β (1-40) (1:1) complex formation shows a dissociation constant of K_d = 6.49 μ M, However, IDIF enhances this interaction between TTR and A β (1-40), since the K_d is reduced to 3.34 μ M when TTR in the presence of IDIF is titrated with A β (1-40). Similar improvements were observed for the ternary complexes with the best SMCs (*i.e.* K_d = 1.52 μ M (LUT); 3.42 μ M (SUL); 0.81 μ M (OLS) and 2.34 μ M (FLU)).

To complement the results gathered so far, we performed the aggregation kinetics of A β (1-42) in the presence of the five selected SMCs using by ThT assays, obtaining coherent results with the turbidity measurements observed with A β (12-28) (Figure 7). As shown in Figure 7A the aggregation kinetics of A β (1-42) in the presence of TTR complexed with IDIF are dose dependent of this small-molecule compound.

CONCLUSIONS

In this paper, we have first taken a combined computational / experimental approach to select a pool of chemically diverse compounds, that may enhance the ability of TTR to sequester the A β peptide. In order to carry out this comprehensive study, two complementary computational procedures were used: a) drug repurposing through virtual screening and pharmacophore searches, starting from a large set of compounds that have either reached the market or are in clinical phases, and docking them into our built TTR/A β molecular model; and b) a multi-target approach, where we selected molecules that were theoretically interacting with our built TTR/A β molecular model, but also would theoretically interact with a group of four protein targets that have been associated with AD.

All of the selected compounds that underwent these computational procedures, and other known TTR ligands, were

sequentially assayed in a screening cascade covering TTR binding through both a T₄ displacement assay (qualitative) and a TTR – T₄ competition assay (quantitative), followed by a TTR stabilizing assay.

The combined virtual and experimental screening approach has led to 53 highly diverse compounds that strongly stabilize TTR. Among these compounds, compound **35** and the drug olsalazine had not been previously described as TTR stabilizers and may be relevant for TTR-related therapies.

Of note, these 53 compounds were good candidates for the analysis of the modulation of the TTR/A β interactions, and they were analyzed through our robust HTS ternary assay. The results of this ternary assay show a prioritized list of small molecule chaperones (SMCs) of the TTR/A β interaction providing the basis for a novel therapeutic target for AD. Among the SMCs, we have found small-molecules as our lead small-molecule compound Iododiflunisal (IDIF) which is one of the best SMCs, and also three marketed drugs (olsalazine, sulindac, and flufenamic acid) and one investigational drug (luteolin), which could be directly repurposed or repositioned for clinical use. The orphan drug Tafamidis and the repurposed Parkinson's drug Tolcapone have been reported to be excellent TTR tetramer stabilisers, but these drugs have no chaperoning effect in our *in vitro* assays, showing that not all good TTR tetramer kinetic stabilisers are good SMCs.

Our drug discovery program offers the possibility to explore the chemical space by HTS of commercially available libraries of drugs/compounds to find new SMCs. Further work will be carried out to explore the activity of some chemical scaffolds such as the biphenyl one present in IDIF, so as to build structure-activity relationships from the HTS ternary assay results. In particular, the SMC IDIF will be optimized for ADME properties and to improve the blood-brain barrier (BBB) passage.

A small set of these SMCs will be prioritized to enter preclinical safety studies, analyzing their *in vivo* behavior, in order to select one repurposed drug as a candidate to enter clinical trials for AD.

These selected small-molecule chaperones provide the basis for a novel target for Alzheimer's disease, based on targeting transthyretin. We envisage that this new target will feed the currently exhausted pipeline of drugs in phase I for AD with the

goal of increasing AD disease-modifying therapies. In addition, the three marketed drugs reported in this work as SMCs of the TTR/A β interaction (sulindac, olsalazine and flufenamic acid) could directly enter a clinical phase program as candidate AD therapies, as an example of drug repurposing.

METHODS AND MATERIALS

General procedure for molecular models preparation

A molecular model of TTR was generated using the three-dimensional coordinates of the TTR protein structure (PDB code 1DVQ), available at the Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org). For hydrogen atoms refinement and energy minimization, the Protonate 3D package implemented in MOE 2015.10 was employed to add hydrogen atoms to TTR which were further submitted to an energy-minimization process.⁶² Partial charges were obtained by computing the electrostatic potentials in the optimized structures. The energy minimization step was carried out using a distance-dependent dielectric constant and a cut-off distance of 10 Å for the van der Waals interactions. In the final step, the refinement was accomplished using 1000 cycles of steepest descents followed by conjugate gradients until the maximum gradient of the energy was smaller than 0.05 kcal/mol Å².

The same procedure and parameters were used to compute the following proteins used in this work: IL-10 (interleukin-10) (PDB code 1ILK); inhibitor domain of APP (amyloid precursor protein (A β) (PDB code 1AAP); β secretase with inhibitor OM99-2 (PDB code 1FKN); human acetylcholinesterase with Fasciculin-II (PDB code 1B41); metabotropic glutamate receptor 1 with LY341495 antagonist (PDB code 3KS9); metabotropic glutamate receptor 5 with glutamate (PDB code 3LMK).

Docking experiments (TTR/A β computational model) procedure

The MOE 2015.10 package⁶² was used to perform the docking studies between the refined TTR X-Ray crystallographic structure (as template) and A β peptide (as ligand). Alpha Triangle was used as placement method; Alpha HB as score function, and AMBER10 as forcefield in the first refinement step of the docking solutions. A rescoring step was also implemented in this computational pipeline, using London DG as function score, and again AMBER10 as forcefield for the last refinement step of this docking study.

Docking experiments (virtual screening) general procedure

The MOE 2015.10 package was used to perform the docking studies between the refined TTR protein: A β peptide system. Molecules computed as ligand for the docking experiments were pretreated using the LygX application from the software package MOE. After that the experiment were performed as follows: Alpha Triangle was used as placement method; Alpha HB

as score function, and MMFF94x as forcefield in the first refinement step of the docking solutions. A rescoring step was also implemented in this computational pipeline, using London DG as function score, and again MMFF94x as forcefield for the last refinement step.

Pharmacophore set-up

The Ligand Scout 3.0 software package⁶⁰ was used to build-up a pharmacophore starting from the binding sites of TTR protein (T₄ binding pocket), β -secretase, metabotropic glutamate receptor 1 and metabotropic glutamate receptor 5. The pharmacophore resulting from this pocket alignment process was used to screen a set of molecules coming from the second pipeline explained in the next section.

Selection pipeline of ligands

Two complementary approaches were carried out to select the ligands to be docked in the TTR molecular model:

Pipeline A: starting from the Thomson Reuters Integrity database (<https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/>), which contains small molecules and drugs in the market or advanced clinical phases, nearly 3200 compounds were selected and sorted according to which protein or disease was their main target: Amyloid peptide, transthyretin, both or Alzheimer's disease in general. In addition, nearly 500 compounds were also added to this list that have been gathered from the literature or that had been previously explored in our laboratories, as potential TTR stabilizers.

Then the CARLSBAD database and software,⁵⁹ which contains integrated data on compounds and their target binding affinities, were used to select compounds that had experimentally shown affinity vs. both TTR and the amyloid peptide. This lead to a common stilbene substructure scaffold that was then used to carry out a substructure search among the original selection of nearly 3700 compounds. The resulting 48 compounds with the stilbene substructure were then docked into our TTR:A β computational model.⁶³

Pipeline B: starting from the Thomson Reuters Integrity database (<https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/>), which contains small molecules and drugs in the market or in advanced clinical phases, we selected nearly 1400 compounds that were reported in preclinical, clinical or marketed phase and that had their protein target reported as one or more of the following, which have been associated to AD: APP (amyloid precursor protein); AchE (acetylcholinesterase); IL-10 (interleukin-10); α , β - and γ -secretases; tau protein; GABA and glutamate receptors. All these compounds were then docked into the TTR model, prioritizing a pool of 134 molecules that would theoretically bind the TTR T₄ channel with an affinity similar to IDIF. These molecules were then virtually analyzed through docking with software MOE 2015.10 into the following protein structures: IL-10 (interleukin-10); inhibitor domain of APP (amyloid precursor protein (A β); β -secretase

with inhibitor OM99-2; acetylcholinesterase (AchE) with Fas-ciculin-II; metabotropic glutamate receptor 1 with LY341495 antagonist; metabotropic glutamate receptor 5 with glutamate. All these docking processes lead to a prioritized list of 85 molecules, which were then docked into our TTR:A β computational model, leading to 27 molecules that would theoretically bind to the TTR:A β complex and to 4 additional AD related targets (A β , IL-10, β -secretase and acetylcholinesterase). In addition, the initial set of 134 molecules that had been selected through docking with the TTR:A β model, were further analyzed computationally through the software Ligand Scout; 13 of them coincided with the list of 27 molecules derived from the multi-target docking, but we were able to select 4 additional molecules that matched with the common pharmacophore.

The compounds prioritized through these two computational (*in silico*) complementary approaches that were commercially available (Molport, <http://www.molport.com>), were acquired, in order to carry out the experimental TTR binding, competition, and stability assays (See Table S1 in Supporting Information). Just only in few cases, if a selected compound was not commercially available but another compound with a very similar structure was available, then that similar compound was processed through the computational procedures described, and acquired if it would match with either the multi-target docking or the common pharmacophore filters. Finally, some compounds in the market and/or in clinical phases, that are reported in the literature as good TTR stabilizers and/or as AD therapies under clinical studies, were also analyzed through the computational filters described above, and included in the final list of compounds to be experimentally assayed.

Recombinant wild-type human (wt rhTTR) production and purification

Human wild type rhTTR gene was cloned into a pET expression system and transformed into *E. coli* BL21(DE3) Star.⁶⁴ The phTTRwt-I/pET-38b(+) plasmid was provided by Prof. Antoni Planas (IQS, URL).⁶⁵ The production of recombinant protein was performed at Erlenmeyer scale, protein production and purification were done as described previously following an optimized version of our protocol.⁶⁶ wt rhTTR was produced using a pET expression System. The expressed protein only contains an additional methionine on the *N*-terminus if compared to the mature natural human protein sequence. wt rhTTR protein was expressed in *E. coli* BL21-(DE3) cells harboring the corresponding plasmid. Expression cultures in 2xYT rich medium containing 100 μ g/mL kanamycin were grown at 37 °C to an optical density (at 600 nm) of 4 (OD600≈4), then induced by addition of IPTG (1 mM final concentration), grown at 37 °C for 20 h, and harvested by centrifugation at 4 °C, 10000 rpm for 10 min and resuspended in cell lysis buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 7,6). Cell disruption and lysis were performed by French press followed by a sonication step at 4 °C. Cell debris were discarded after centrifugation at 4 °C, 11000 rpm for 30 min. Intracellular proteins were fractionated by ammonium sulfate precipitation

in three steps. Each precipitation was followed by centrifugation at 12 °C, 12500 rpm for 30 min. The pellets were analyzed by SDS-PAGE (14% acrylamide). The TTR-containing fractions were resuspended in 20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.6 (buffer A) and dialyzed against the same buffer. It was purified by Ion exchange chromatography using a Q-Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) anion exchange column and eluting with a NaCl linear gradient using 0.1 M NaCl in 20 mM Tris-HCl pH 7.6 buffer A to 0.5 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.6 (buffer B). All TTR-enriched fractions were dialyzed against deionized water in three steps and were lyophilized. The protein was further purified by gel filtration chromatography using a Superdex 75 prep grade resin (GE Healthcare Bio-Sciences AB) and eluting with 20 mM Tris pH 7.6, 0.1 M NaCl. Purest fractions were combined and dialyzed against deionized water and lyophilized. The purity of protein preparations was >95% as judged by SDS-PAGE. Average production yields were 150-200 mg of purified protein per liter of culture. Protein concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm using calculated extinction coefficient value of 17780 M⁻¹·cm⁻¹ for wtTTR. The protein was stored at -20 °C.

Thyroxine binding assays

Qualitative studies of the displacement of T₄ from WT TTR were carried out by incubation of 5 μ L of human plasma, with ¹²⁵I-T₄ (specific radioactivity ≈1200 μ Ci/ μ g; Perkin Elmer) in the presence of the different compounds (final concentration of 666 μ M).^{67,46} Protein separation was carried out in a native PAGE system using glycine/acetate buffer. The gel was dried and revealed using an X-ray film.

For the quantitative analysis, T₄ binding competition assays based on a gel filtration procedure was used, as previously described.⁶⁸ Briefly, 50 μ L of a diluted sample (120 nM human recombinant TTR) was incubated with 50 μ L of either cold T₄ or compound solutions of variable concentrations ranging from 0 to 1000 nM and with a constant amount of labeled ¹²⁵I-T₄ (~50,000 cpm). This solution was counted in a gamma spectrometer and incubated at 4 °C overnight. Protein bound ¹²⁵I-T₄ and free ¹²⁵I-T₄ were separated by gel filtration through a 1 ml BioGel P6DG (Bio-Rad) column. The bound fraction was eluted while free T₄ was retained on the BioGel matrix. The eluate containing the bound T₄ was collected and counted. Bound T₄ was expressed as percentage of total T₄ added. Each assay was performed in duplicate. Analysis of the binding data was performed with the GraphPad Prism program (version 5.0, San Diego, CA) and data was expressed as the EC50 ratio (EC50 T₄/EC50 compound).

TTR stability assay⁶¹

Recombinant wt-TTR (333 μ M) was incubated alone or in the presence of different compounds for 1h at 37 °C. Then, urea 8 M (used as denaturating agent) and sample buffer without

SDS were added. Samples were then run in a 15% acrylamide gel, prepared without SDS, and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham™ GE Healthcare – Prota 0.2 µm), using a wet system (Bio-Rad Criterion Blotter). The membranes were blocked 1 hour at RT with 5% non-fat dry milk (DM) in PBS containing 0,05% Tween-20 (PBS-T) and then incubated with primary antibody anti-human TTR (Dako; 1:3000) in 3% DM/PBS-T. Then, washed membranes were incubated for 1 hour at RT with sheep anti-rabbit immunoglobulins conjugated with horseradish peroxidase (The binding Site; 1:5000) in 3% DM/PBS-T. The blots were developed using ClarityTM Western ECL substrate (Bio-Rad) and levels of monomeric TTR were detected and visualized using a chemiluminescence detection system (ChemiDoc, Bio-Rad).

Crystal structures of TTR:35 and TTR:73 complexes Co-crystallization.

TTR (9.9 mg.ml⁻¹) was incubated with each compound (molar ratios 35/TTR = 20 and 73/TTR = 50) at 4 °C on, in HEPES buffer 10mM, pH = 7.5. Crystals suitable for X-ray diffraction were obtained by hanging-drop vapour-diffusion techniques at 20 °C. Crystals were grown within 1 week by mixing 2 µl of the protein:compound solutions with 2 µl of reservoir solution. The reservoir solutions used in the crystallization trials contained acetate buffer 0.2 M pH 4.8-5.4, ammonium sulfate 1.8-2.2 M, 7% glycerol. Crystals were transferred to reservoir solutions containing increasing concentrations of glycerol (10–25%) and flash frozen in liquid nitrogen.

Data collection, processing and refinement.

X-ray diffraction data sets were collected using synchrotron radiation at the XALOC beamline at the ALBA synchrotron center (Barcelona), ID30B beam line at the ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble Cedex, France) and Proxima 2 beam line at the SOLEIL synchrotron (Paris).

Diffraction images were processed with the XDS Program Package⁶⁹ and the diffraction intensities converted to structure factors in the CCP4 format.⁷⁰ A random 5% sample of the reflection data was flagged for R-free calculations⁷¹ during model building and refinement. A summary of the data collection and refinement statistics is presented in Table 2. Initial molecular replacement phases were generated with PhaserMR,⁷² using as initial model one monomer of the complex TTR:IDIF (PDB ID 1Y1D).⁴⁸ The final models were obtained after further cycles of refinement, carried out with Coot⁷³ and PHENIX.⁷⁴

HTS ternary assay

In this assay²⁴ the following stock solutions were used: Buffer A: 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 was prepared

in the absence of salt. Protein (TTR) stock: 9,5 mg/mL (170 µM) in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5% DMSO (final concentration) was prepared in the absence of salt (buffer A). For the *Aβ peptide stock*: 0,4 mg/mL (200 µM) in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5% DMSO (final concentration). For the small-molecule compound IDIF, a first solution of 3,76 mg/mL (10 mM) in DMSO was prepared. The final stock of the small-molecule IDIF was prepared by mixing 50 µL of the previous DMSO solution with 950 µL of buffer A (the final concentration of 5% DMSO).

First, the small-molecule compound and TTR complex was formed. To this end, 60 µL of TTR stock was dispensed into the wells of a 96-well microplate. 40 µL of small-molecule stock was added to give final concentrations of 100 µM. The plate was introduced in the microplate reader (SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices Corporation, California, USA) and incubated for 1h at 37 °C with orbital shaking 15 s every 30 min. Then, 100 µL of *Aβ* solution was added to the well to give a final concentration of 100 µM.

Other wells of the 96-well microplate are filled with: a) Buffer alone: 200 µL of buffer A solution was added to the well; b) Negative control of *Aβ* aggregation: 200 µL of *Aβ*(1-11) stock solution in buffer A was dispensed into the wells; c) Testing TTR aggregation: 60 µL of TTR stock were dispensed into the wells of a 96-well microplate and 140 µL of buffer A were added; d) For the *Aβ*(12-28) aggregation: 100 µL of *Aβ*(12-28) stock solution is dispensed into the wells and 100 µL of buffer A were added.

The plate was incubated at 37 °C in a thermostated microplate reader with orbital shaking 15 s every minute for 30 min. The absorbance at 340 nm was monitored for 6 h at 30 min intervals. Data were collected and analyzed using Microsoft Excel software. All assays were done in duplicate.

$$RA (\%) = \left[1 - \left(\frac{Abs_c}{Abs_{A\beta} + Abs_c} \right) \right] * 100 \quad (1)$$

The parameter monitored in this assay was used to calculate the percent reduction of formation of aggregates (RA %) according to equation 1, where $Abs_{A\beta}$ and Abs_c are the final absorbance of the samples, in the absence or in the presence of the small-molecule compound/TTR complex; respectively.

Thioflavin-T (ThT) fluorescence assays

The robustness of our HTS turbidimetry-based method was further validated on the basis of comparative by Thioflavin-T (ThT) fluorescence assays on the same system. The ThT fluorescence was monitored at 37 °C using Gemini XPS plate reader (Molecular Devices) at an excitation wavelength of 440 nm and an emission wavelength of 490 nm. Thioflavin-T (ThT) was dissolved in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5 % DMSO to a final concentration of 25 µM. Aggregation of *Aβ*(12-28) 50 µM was performed in the presence of 25 µM ThT. All solutions were dissolved in the same buffer. TTR was added

to a final concentration of 25 μ M. IDIF was added to a final concentration of 50 μ M. Aggregation of A β (1-42) 20 μ M was performed with 10 μ M TTR and 20 μ M of ligand. For the ternary complex, TTR was incubated first with IDIF for 1h, then A β (12-28) was added. The final volume was 200 μ L for all samples. Fluorescence intensity at 490 nm of each sample was monitored after each 2h for 8h, and then at 21h. Measurements were performed as independent triplicates. Recorded values were averaged and background measurements (buffer containing 25 μ M ThT) were subtracted. Measurements were performed as independent triplicates. Recorded values were averaged and background measurements (buffer containing 25 μ M ThT) were subtracted.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) studies

Experiments were carried out in a VP-ITC (MicroCal, LLC, Northampton, Ma, USA). In a titration experiment,²³ the ligand in the syringe is added in small aliquots to the macromolecule in our case TTR protein in the calorimeter cell, which is filled with an effective volume that is sensed calorimetrically. The TTR solution of 20 μ M, and A β (A β (12-28) or A β (1-40)), or ligand solutions of 200 μ M were prepared in the same buffer. The titrant was injected over 20 or 30 times at a constant interval of 300 s with a 450 rpm rotating stirrer syringe into the sample cell containing its binding partner. All solutions were prepared with 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5% DMSO (final concentration) and it was corroborated that at these conditions TTR and A β (1-40) are stable. A β (1-40) working solution was prepared at 200 μ M and used immediately, to avoid premature aggregate formation. TTR stock solution was prepared at 40 μ M. Ligand stock solution was prepared at 10 mM in DMSO. All solutions were prepared in the same buffer and filtered prior to use. In the control experiments, the titrant (ligand or A β) was injected into the buffer in the sample cell to measure the heat of dilution. This value of the heat of dilution was subtracted from the titration data. The experiments were performed at 25 °C. Titration data were analyzed by the evaluation software, MicroCal Origin, Version 7.0. The binding curves were fitted by a non-linear regression method to a one set of sites binding model. This leads to the calculation of K , n , ΔH , ΔS , and ΔG . Each experiment was conducted three times, and the mean value with standard deviations is provided.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website.

Compounds assayed in different assays; selected compounds after computational screening; T₄ displacement assays; TTR stability assays; selected compounds for ternary assays; results from the HTS assays; kinetics of aggregation of A β (12-28) peptide with TTR or TTR complexed with each of the 53 selected molecules; ITC

studies of the binary interaction A β (12-28) + TTR and the ternary interactions [A β (12-28) + [(TTR+SMC)]; ITC studies of the binary interactions (TTR+SMC) (PDF).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

* jordiramon.quintana@upf.edu.

* icardoso@ibmc.up.pt

* gemma.arsequell@iqac.csic.es

Present Addresses

† Dr. Jordi Quintana, Research Programme on Biomedical Informatics, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. / All authors have given approval to the final version of the manuscript. / ‡These authors contributed equally. (match statement to author names with a symbol)

Funding Sources

The work was supported by a grant from the Fundació Marató de TV3 (neurodegenerative diseases call, project reference: 20140330-31-32-33-34, <http://www.ccma.cat/tv3/marato/en/proyectos-financiados/2013/212/>). The group at IBMC-i3S also acknowledges for funding through grant Norte-01-0145-FEDER-000008 -Porto Neurosciences and Neurologic Disease Research Initiative at I3S, supported by Norte Portugal Regional Operational Programme (NORTE 2020), under the PORTUGAL 2020 Partnership Agreement, through the European Regional Development Fund (FEDER).

Notes

Dedicated to Dr. Gregorio Valencia

ACKNOWLEDGMENT

I. Cardoso works under the Investigator FCT Program which is financed by national funds through FCT and co-financed by ESF through HPOP, type 4.2 - Promotion of Scientific Employment. M. Alemi was a recipient of a Research Fellowship (BIM) funded by the project of Fundació La Marató de TV3, Spain, and L. M. Santos was a recipient of a fellowship from Norte 2020. J.P. Leite acknowledges the FCT fellowship SFRH/BD/129921/2017 (Portugal). IQAC-CSIC acknowledges a contract to Ellen Y. Cotrina funded by the project of Fundació Marató de TV3, Spain and a contract from Ford España - Fundación Apadrina la Ciencia. The group at CIC bioGUNE also acknowledges MINECO (Spain) for funding through grant CTQ2015-64597-C2-1-P and a Juan de la Cierva contract to A. Gimeno. We thank access to ALBA (XALOC), ESRF (ID30B) and Soleil (PROXIMA 1 and 2a) synchrotrons.

REFERENCES

- (1) 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2020 Mar 10. doi: 10.1002/alz.12068.

- (2) Cummings, J.; Fox, N. Defining Disease Modifying Therapy for Alzheimer's Disease. *J. Prev. Alzheimers Dis.* **2017**, *4*, :109-115. doi: 10.14283/jpad.2017.12.
- (3) Cummings, J. Drug Development for Psychotropic, Cognitive-Enhancing, and Disease-Modifying Treatments for Alzheimer's Disease. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2021**, *33*, 3-13.
- (4) Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimers Dement (N Y)*. **2020**, *6*:e12050 . DOI: 10.1002/trc2.12050
- (5) Cummings, J. Lessons Learned from Alzheimer Disease: Clinical Trials with Negative Outcomes. *Clin. Transl. Sci.* **2018**, *11*, 147-152. doi: 10.1111/cts.12491.
- (6) Molinuevo, J. L.; Minguillon, C.; Rami, L.; Gispert, J. D. The Rationale Behind the New Alzheimer's Disease Conceptualization: Lessons Learned During the Last Decades. *J. Alzheimers Dis.* **2018**, *62*, 1067-1077.
- (7) Friedman, L. G.; McKeehan, N.; Hara, Y.; Cummings, J. L.; Matthews, D. C.; Zhu J, Mohs R. C.; Wang, D.; Hendrix, S. B.; Quintana, M.; Schneider, L. S.; Grundman, M.; Dickson, S. P.; Feldman, H. H.; Jaeger, J.; Finger, E. C.; Michael Ryan, J.; Niehoff, D.; Dickinson, S. L.; Markowitz, J. T.; Owen, M.; Travaglia, A.; Fillit, H. M. Value-Generating Exploratory Trials in Neurodegenerative Dementias. *Neurology* **2021** Mar 5:10.1212/WNL.00000000000011774.
- (8) Cummings, J.; Ritter, A.; Zhong, K. Clinical Trials for Disease-Modifying Therapies in Alzheimer's Disease: A Primer, Lessons Learned, and a Blueprint for the Future. *J. Alzheimers Dis.* **2018**, *64*, S3-S22. doi: 10.3233/JAD-179901.
- (9) Blake, C. C.; Geisow, M. J.; Oatley, S. J.; Rerat, B.; Rerat, C. Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* **1978**, *121*, 339-356.
- (10) Gião, T.; Saavedra, J.; Cotrina, E.; Quintana, J.; Llop, J.; Arsequell, G.; Cardoso, I. Undiscovered Roles for Transthyretin: From a Transporter Protein to a New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2075. https://doi.org/10.3390/ijms21062075.
- (11) Schwarzman, A. L.; Gregori, L.; Vitek, M. P.; Lyubski, S.; Strittmatter, W. J.; Enghilde, J. J.; Bhasin, R.; Silverman, J.; Weisgraber, K. H.; Coyle, P. K.; Zagorki, M. G.; Talafous, J.; Eisenberg, M.; Saunders, A. M.; Roses, A. D.; Goldgaber, D. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 8368-8372.
- (12) Pate, K. M.; Murphy, R. M. Cerebrospinal Fluid Proteins as Regulators of Beta-amyloid Aggregation and Toxicity. *Isr. J. Chem.* **2017**, *57*, 602-612.
- (13) Davidsson, P.; Westman-Brinkmalm, A.; Nilsson, C. L.; Lindbjer, M.; Paulson, L.; Andreasen, N.; Sjögren, M.; Blennow, K. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients. *Neuroreport* **2002**, *13*, 611-615.
- (14) Serot, J. M.; Christmann, D.; Dubost, T.; Couturier, M. Cerebrospinal Fluid Transthyretin: Aging and Late Onset Alzheimer's Disease. *J. Neuro. Neurosurg. Psychiatry* **1997**, *63*, 506-550.
- (15) Gloeckner, S.F.; Meyne, F.; Wagner, F.; Heinemann, U.; Krasnianski, A.; Meissner, B.; Zerr, I. Quantitative analysis of transthyretin, tau and amyloid-beta in patients with dementia. *J Alzheimers Dis.* **2008**, *14*, 17-25.
- (16) Han, S. H.; Jung, E. S.; Sohn, J. H.; Hong, H. J.; Hong, H. S.; Kim, J. W.; Na,D. L.; Kim, M.; Kim, H.; Ha, H. J.; Kim, Y. H.; Huh, N.; Jung, M. W.; Mook-Jung, I. Human Serum Transthyretin Levels Correlate Inversely with Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *25*, 77-84. Doi: 10.3233/JAD-2011-102145.
- (17) Velayudhan, L.; Killick, R.; Hye, A.; Kinsey, A.; Güntert, A.; Lynham, S.; Ward, M.; Leung, R.; Lourdusamy, A.; To, A. W.; Powell, J.; Lovestone, S. Plasma Transthyretin as a Candidate Marker for Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2012**, *28*, 369-375.
- (18) Ribeiro, C. A.; Santana, I.; Oliveira, C.; Baldeiras, I.; Moreira, J.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin decrease in plasma of MCI and AD patients: investigation of mechanisms for disease modulation. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9*, 881-889.
- (19) Oliveira, S. M.; Ribeiro, C.A.; Cardoso, I.; Saraiva, M. J. Gender-dependent transthyretin modulation of brain amyloid-β levels: evidence from a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *27*, 429-39.
- (20) Buxbaum, J. N.; Ye, Z.; Reixach, N.; Friske, L.; Levy, C.; Das, P.; Golde, T.; Masliah, E.; Roberts, A.R.; Bartfai, T. Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of Aβ toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 2681-2686.
- (21) Costa, R.; Gonçalves, A.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I.; Transthyretin binding to A-Beta peptide - Impact on A-Beta fibrillogenesis and toxicity. *FEBS Lett* **2008**, *582*, 936-942.
- (22) Li, X.; Zhang, X.; Ladiwala, A. R. A.; Du, D.; Yadav, J. K.; Tessier, P. M.; Wright, P. E.; Kelly, J. W.; Buxbaum, J. N. Mechanisms of Transthyretin Inhibition of β-Amyloid Aggregation In Vitro. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 19423-19433.
- (23) Cotrina, E. Y.; Gimeno, A.; Llop, J.; Jiménez-Barbero, J.; Quintana, J.; Valencia, G.; Cardoso, I.; Prohens, R.; Arsequell, G. Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between TTR, Aβ Peptides, and Small-Molecule Chaperones toward an Alternative Strategy for AD Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3205-3214.
- (24) Cotrina E.; Gimeno A; Llop J; Jiménez-Barbero J.; Quintana J.; Prohens R.; Cardoso I; Arsequell G. An assay for screening potential drug candidates for Alzheimer's disease that act as chaperones of the Transthyretin and Amyloid-β peptides interaction. *Chemistry* **2020**, *26*, 17462-17469.
- (25) Nilsson, L.; Pamréen, A.; Islam, T.; Brännström, K.; Golchin, S. A.; Pettersson, N.; Iakovleva, I.; Sandblad, L.; Gharibyan, A. L.; Olsson, A. Transthyretin Interferes with Aβ Amyloid Formation by Redirecting Oligomeric Nuclei into Non-Amyloid Aggregates. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 2722-2733.
- (26) Ghadami, S. A.; Chia, S.; Ruggeri, F. S.; Meisl, G.; Bemporad, F.; Habchi, J.; Cascella, R.; Dobson, C. M.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Chiti, F. Transthyretin Inhibits Primary and Secondary Nucleations of Amyloid-β Peptide Aggregation and Reduces the Toxicity of Its Oligomers. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 1112-1125.
- (27) Alemi, M.; Gaiteiro, C.; Ribeiro, C. A.; Santos, L. M.; Gomes, J. R.; Oliveira, S. M.; Couraud, P. O.; Weksler, B.; Romero, I.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin participates in beta-amyloid transport from the brain to the liver--involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1? *Sci Rep.* **2016** Feb 3;6:20164.
- (28) Ricardo Vieira, J.; Patrícia Moreira, A.; Oliveira, Â.; Alemi, M.; Cardoso, I. Collagen type IV in brain vessels of an AD mouse model: modulation by transthyretin? *Amyloid* **2019**, *26*(sup1):138-139.
- (29) Howe, M. D.; McCullough, L. D.; Urayama, A. The Role of Basement Membranes in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front Physiol.* **2020** Nov 25;11:601320. doi: 10.3389/fphys.2020.601320.
- (30) Kerschen, P.; Planté-Bordeneuve, V. Current and Future Treatment Approaches in Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy. *Curr. Treat. Options Neurol.* **2016**, *18*(12):53.
- (31) Adams, D.; Cauquil, C.; Labeyrie, C. Familial amyloid polyneuropathy. *Curr. Opin. Neurol.* **2017**, *30*, 481-489.
- (32) Cardoso, I.; Goldsbury; C. S.; Müller, S. A.; Olivieri, V.; Wirtz, S.; Damas, A. M.; Aebi, U.; Saraiva, M. J. Transthyretin fibrillogenesis entails the assembly of monomers: a molecular model for in vitro assembled transthyretin amyloid-like fibrils. *J. Mol. Biol.* **2002**, *317*, 683-695.
- (33) Almeida, M. R.; Gales, L.; Damas, A. M.; Cardoso, I.; Saraiva, M. J. Small Transthyretin (TTR) Ligands as Possible Therapeutic Agents in TTR Amyloidoses. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2005**, *4*, 587-596.
- (34) Adams, D.; Cauquil, C.; Labeyrie, C.; Beaudonnet, G.; Algalarondo, V.; Théaudin, M. TTR kinetic stabilizers and TTR gene silencing: a new era in therapy for familial amyloidotic polyneuropathies. *Expert Opin. Pharmacother.* **2016**, *17*, 791-802.
- (35) Johnson, S. M.; Wiseman, R. L.; Sekijima, Y.; Green, N. S.; Adamski-Werner, S. L.; Kelly, J. W. Native state kinetic stabilization as a strategy to ameliorate protein misfolding diseases: a focus on the transthyretin amyloidosis. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 911-921.

- (36) Yokoyama, T.; Mizuguchi, M. Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors: From Discovery to Current Developments. *J. Med. Chem.* **2020**, *3*, 14228–14242.
- (37) Nencetti, S.; Orlandini, E. TTR fibril formation inhibitors: is there a SAR?. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2356–2379.
- (38) Ortore, G.; Martinelli, A. Identification of novel Transthyretin Fibril Formation Inhibitors using structure-based Virtual Screening. *ChemMedChem.* **2017**, *12*, 1327–1334.
- (39) Simões, C. J.; Mukherjee, T.; Brito, R. M.; Jackson, R. M. Toward the discovery of functional transthyretin amyloid inhibitors: application of virtual screening methods. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1806–1820.
- (40) Connally S.; Mortenson, D. E.; Choi, S.; Wilson, I. A.; Powers, E. T.; Kelly, J. W.; Johnson, S. M. Semi-quantitative models for identifying potent and selective transthyretin amyloidogenesis inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3441–3449.
- (41) Palaninathan, S. K. Nearly 200 X-Ray crystal structures of transthyretin: What do they tell us about this protein and the design of drugs for TTR amyloidoses?. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2324–2342.
- (42) Coelho, T.; Merlini, G.; Bulawa, C. E.; Fleming, J. A.; Judge, D. P.; Kelly, J. W.; Maurer, M. S.; Planté-Bordeneuve, V.; Labaudinière, R.; Mundayat, R.; Riley, S.; Lombardo, I.; Huertas, P. Mechanism of Action and Clinical Application of Tafamidis in Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurol. Ther.* **2016**, *5*, 1–25.
- (43) Nencetti, S.; Rossello, A.; Orlandini, E. Tafamidis (Vyndaqel): A Light for FAP Patients. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1617–1619.
- (44) Sant'Anna, R.; Gallego, P.; Robinson, L. Z.; Pereira-Henriques, A.; Ferreira, N.; Pinheiro, F.; Esperante, S.; Pallares, I.; Huertas, O.; Almeida, M. R.; Reixach, N.; Insa, R.; Velazquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Reig, N.; Ventura, S. Repositioning tolcapone as a potent inhibitor of transthyretin amyloidogenesis and associated cellular toxicity. *Nat. Commun.* **2016** Feb 23;7:10787.
- (45) Ribeiro, C. A.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Stability of the Transthyretin Molecule as a Key Factor in the Interaction with A-Beta Peptide – Relevance in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* **2012** (9):e45368. Doi: 10.1371/journal.pone.0045368.
- (46) Almeida, M. R.; Macedo, B.; Cardoso, I.; Alves, I.; Valencia, G.; Arsequell, G.; Planas, A.; Saraiva, M. J. Selective binding to transthyretin and tetramer stabilization in serum from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by an iodinated diflunisal derivative. *Biochem. J.* **2004**, *381*, 351–356.
- (47) Mairal, T.; Nieto, J.; Pinto, M.; Almeida, M. R.; Gales, L.; Ballessteros, A.; Barluenga, J.; Pérez, J. J.; Vázquez, J. T.; Centeno, N. B.; Saraiva, M. J.; Damas, A. M.; Planas, A.; Arsequell, G.; Valencia, G. Iodine atoms: a new molecular feature for the design of potent transthyretin fibrillogenesis inhibitors. *PLoS One* **2009**, *4*, e4124. Doi: 10.1371/journal.pone.0004124.
- (48) Gales, L.; Macedo-Ribeiro, S.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Saraiva, M. J.; Damas, A. M. Human transthyretin in complex with iododiflunisal: structural features associated with a potent amyloid inhibitor. *Biochem. J.* **2005**, *388*, 615–662.
- (49) Ribeiro, C. A.; Oliveira, S. M.; Guido, L. F.; Magalhaes, A., Valencia, G.; Arsequell, G.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin stabilization by iododiflunisal promotes amyloid- β peptide clearance, decreases its deposition, and ameliorates cognitive deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *39*, 357–370. Doi: 10.3233/JAD-131355.
- (50) Rej, L.; Gómez-Vallejo, V.; Rios, X.; Cossio, U.; Baz, Z.; Muñica, E.; Gião, T.; Cotrina, E.Y.; Jiménez-Barbero, J.; Quintana, J.; Arsequell, G.; Cardoso, I.; Llop, J. Oral treatment with iododiflunisal delays beta amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer Disease: a Longitudinal in vivo molecular imaging study. *J. Alzheimer's Dis.* **2020** (Pub Date: 2020-08-10). Doi: 10.21203/rs.2.23011/v1.
- (51) Martorana, A.; Perricone, U.; Lauria, A. The Repurposing of Old Drugs or Unsuccessful Lead Compounds by in Silico Approaches: New Advances and Perspectives". *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 2088–2106.
- (52) Oprea, T. I.; Overington, J. P.; Computational and Practical Aspects of Drug Repositioning. *Assay Drug Dev. Technol.* **2015**, *13*, 299–306.
- (53) Parvathaneni, V.; Kulkarni, N. S.; Muth, A.; Gupta, V. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug Discov Today.* **2019**, *24*, 2076–2085.
- (54) Corbett, A.; Williams, G.; Ballard, C. Drug repositioning in Alzheimer's disease. *Front. Biosci. (Schol Ed.)* **2015**, *7*, 184–8.
- (55) Kim, T. W. Drug repositioning approaches for the discovery of new therapeutics for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 132–142.
- (56) Rodriguez, S.; Hug, C.; Todorov, P.; Moret, N.; Boswell, S. A.; Evans, K.; Zhou, G.; Johnson, N. T.; Hyman, B. T.; Sorger, P. K.; Albers, M. W.; Sokolov, A. Machine learning identifies candidates for drug repurposing in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* **2021** Feb 15;12(1):1033. doi: 10.1038/s41467-021-21330-0.
- (57) Anighoro, A.; Bajorath, J.; Rastelli, G. Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7874–7887.
- (58) Calzà, L.; Baldassarre, V. A.; Giuliani, A.; Lorenzini, L.; Fernandez, M.; Mangano, C.; Sivilia, S.; Alessandri, M.; Gusciglio, M.; Torricella, R.; Giardino, L. From the multifactorial nature of Alzheimer's disease to multitarget therapy: the contribution of the translational approach. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *13*, 1843–1852.
- (59) Mathias, S. L.; Hines-Kay, J.; Yang, J. J.; Zahoransky-Kohalmi, G.; Bologa, C. G.; Ursu, O.; Oprea, T. I. The CARLSBAD database: a federated database of chemical bioactivities. Database (Oxford). **2013** Jun 21; 2013:bat044. <http://datascience.unm.edu/carlsbad-platform/carlsbad/>.
- (60) Wolber, G.; Langer, T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 160–169.
- (61) Santos, L. M.; Rodrigues, D.; Alemi, M.; Silva, S. C.; Ribeiro, C. A., Cardoso, I. Resveratrol administration increases Transthyretin protein levels ameliorating AD features- importance of transthyretin tetrameric stability. *Mol. Med.* **2016**, *22*, 597–607.
- (62) Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2017. URL <http://chemcomp.com/>.
- (63) Gimeno, A.; Santos, L. M.; Alemi, M.; Rivas, J.; Blasi, D.; Cotrina, Y.; Llop, J.; Valencia, G.; Cardoso, I.; Quintana, J.; Arsequell, G.; Jiménez-Barbero, J. 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.
- (64) Furuya, H.; Saraiva, M. J.; Gawinowicz, M. A.; Alves, I. L.; Costa, P. P.; Sasaki, H.; Goto, I.; Sakaki, Y. Production of Recombinant Human Transthyretin with Biological Activities toward the Understanding of the Molecular Basis of Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP). *Biochemistry* **1991**, *30*, 2415–2421.
- (65) Dolado, I.; Nieto, J.; Saraiva, M. J. M.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Planas, A. Kinetic assay for high-throughput screening of in vitro transthyretin amyloid fibrillogenesis inhibitors. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 246–252.
- (66) Cotrina, E. Y.; Vilà, M.; Nieto, J.; Arsequell, G.; Planas, A. Preparative Scale Production of Recombinant Human Transthyretin for Biophysical Studies of Protein-Ligand and Protein-Protein Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(24):9640.
- (67) Sant'Anna, R.; Gallego, P.; Robinson, L. Z.; Pereira-Henriques, A.; Ferreira, N.; Pinheiro, F.; Esperante, S.; Pallares, I.; Huertas, O.; Almeida, M. R.; Reixach, N.; Insa, R.; Velazquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Reig, N.; Ventura, S. Repositioning tolcapone as a potent inhibitor of transthyretin amyloidogenesis and associated cellular toxicity. *Nat. Commun.* **2016** Feb 23;7:10787. doi: 10.1038/ncomms10787. PMID: 26902880; PMCID: PMC4766415.
- (68) Almeida, M.R., I.L. Alves, H. Terazaki, Y. Ando, and M.J. Saraiva. Comparative Studies of Two Transthyretin Variants with Protective Effects on Familial Amyloidotic Polyneuropathy: TTR R104H and TTR T119M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *270*, 1024–1028.

(69) Kabsch, W. Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 795–800.

(70) Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760-763.

(71) Brünger, A.T. Free R Value: A Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature* **1992**, *355*, 472–475.

(72) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl Crystallogr.* **2007**, *40*, 658-674.

(73) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486-501.

(74) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486-501.

Capítulo 3

Artículo 5: Repurposing benz bromarone for Familial Amyloid Polyneuropathy: a new transthyretin tetramer stabilizer.

Cotrina, E.Y.; ¹ Oliveira, Â.; ^{2,3} Leite, J.P.; ^{2,3,4} LLop, J.; ⁵ Gales, L.; ^{2,3,4} Quintana, J.; ⁶ Cardoso, I.; ^{2,3,4} and Arsequell, G. ¹

¹ Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

² IBMC-Instituto de Biologia Molecular e Celular, 4200-135 Porto, Portugal.

³ i3S-Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, 4200-135 Porto, Portugal.

⁴ Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), 4050-013 Porto, Portugal.

⁵ CIC biomaGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 20014 San Sebastian, Spain.

⁶ Research Programme on Biomedical Informatics, Universitat Pompeu Fabra (UPF-IMIM), 08003 Barcelona, Spain.

International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(19), 7166.

DOI: 10.3390/ijms21197166.

ISSN:1422-0067

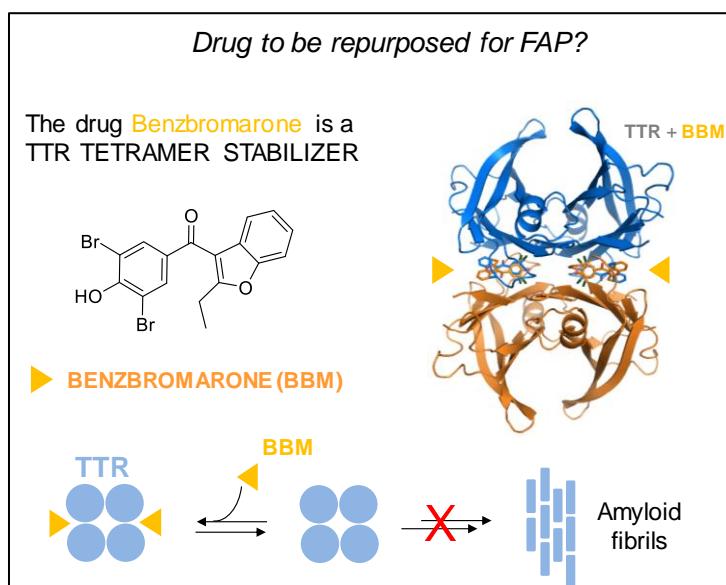
Category: Biochemistry & Molecular Biology

74/297

IF 4.653

Q1

Graphical Abstract





Article

Repurposing Benzbromarone for Familial Amyloid Polyneuropathy: A New Transthyretin Tetramer Stabilizer

Ellen Y. Cotrina ^{1,†}, Ângela Oliveira ^{2,3,†}, José Pedro Leite ^{2,3,4}, Jordi Llop ⁵, Luis Gales ^{2,3,4}, Jordi Quintana ⁶, Isabel Cardoso ^{2,3,4,*} and Gemma Arsequell ^{1,*}

¹ Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.-C.S.I.C.), 08034 Barcelona, Spain; ellen.cotrina@iqac.csic.es

² IBMC—Instituto de Biologia Molecular e Celular, 4200-135 Porto, Portugal; angela.d.a.oliveira@gmail.com (Â.O.); jose.leite@ibmc.up.pt (J.P.L.); lgales@ibmc.up.pt (L.G.)

³ i3S—Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, 4200-135 Porto, Portugal

⁴ Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), 4050-013 Porto, Portugal

⁵ CIC biomaGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 20014 San Sebastian, Spain; jllop@cicbiomagune.es

⁶ Research Programme on Biomedical Informatics, Universitat Pompeu Fabra (UPF-IMIM), 08003 Barcelona, Spain; jordiramon.quintana@upf.edu

* Correspondence: icardoso@ibmc.up.pt (I.C.); gemma.arsequell@iqac.csic.es (G.A.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 9 September 2020; Accepted: 24 September 2020; Published: 28 September 2020



Abstract: Transthyretin (TTR) is a homotetrameric protein involved in human amyloidosis, including familial amyloid polyneuropathy (FAP). Discovering small-molecule stabilizers of the TTR tetramer is a therapeutic strategy for these diseases. Tafamidis, the only approved drug for FAP treatment, is not effective for all patients. Herein, we discovered that benzbromarone (BBM), a uricosuric drug, is an effective TTR stabilizer and inhibitor against TTR amyloid fibril formation. BBM rendered TTR more resistant to urea denaturation, similarly to iododiflunisal (IDIF), a very potent TTR stabilizer. BBM competes with thyroxine for binding in the TTR central channel, with an IC₅₀ similar to IDIF and tafamidis. Results obtained by isothermal titration calorimetry (ITC) demonstrated that BBM binds TTR with an affinity similar to IDIF, tolcapone and tafamidis, confirming BBM as a potent binder of TTR. The crystal structure of the BBM-TTR complex shows two molecules binding deeply in the thyroxine binding channel, forming strong intermonomer hydrogen bonds and increasing the stability of the TTR tetramer. Finally, kinetic analysis of the ability of BBM to inhibit TTR fibrillogenesis at acidic pH and comparison with other stabilizers revealed that benzbromarone is a potent inhibitor of TTR amyloidogenesis, adding a new interesting scaffold for drug design of TTR stabilizers.

Keywords: benzbromarone; drug; transthyretin tetramer stabilizer; transthyretin; drug repurposing; native kinetic stabilization; dibromophenol scaffold

1. Introduction

Transthyretin (TTR) is a protein of 127 amino acids that self-assembles as a 55 kDa homotetramer that is secreted into the bloodstream by the liver [1,2] and into the cerebrospinal fluid (CSF) by the choroid plexus [3]. TTR transports holo-retinol-binding protein in the blood, forming a macromolecular complex [4,5]. The protein acts as a backup carrier of thyroxine (T4) in serum (crystal structure in Figure 1), where the principal transporters are thyroid-binding globulin (TBG) and albumin, while being the primary carrier of T4 in CSF. The T4-binding sites at the weaker of the two dimer–dimer interfaces of

TTR are largely unoccupied in human blood and CSF [6]. TTR likely has additional unknown functions, especially in the brain [7]. In fact, TTR is also known as a neuroprotective protein in Alzheimer's disease (AD) [8–10].

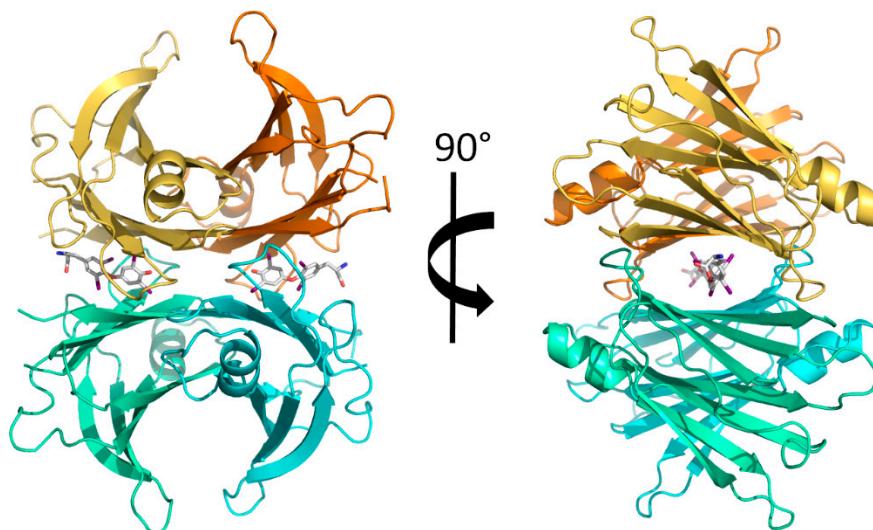


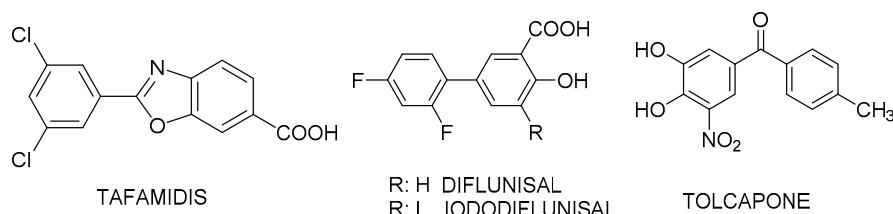
Figure 1. Crystal structure of transthyretin (TTR) bound to the natural ligand thyroxine (T4, PDB ID: 2ROX). The functional TTR homotetramer is assembled by two TTR dimers, AB in orange and A'B' in cyan.

TTR has been the subject of intensive research in the last 30 years because of its pathogenic properties. Transthyretin (TTR) amyloidoses are a group of systemic degenerative diseases involving multiple organ systems and are caused by TTR aggregation [11], such as familial amyloid polyneuropathy (FAP) [12], familial amyloid cardiomyopathy (FAC) [13], senile systemic amyloidosis [14] and leptomeningeal amyloidosis [15].

Extensive efforts have been made in the past to investigate the aggregation pathway of TTR and to discover small-molecule compounds that stabilize the natively folded, non-amyloidogenic, tetrameric structure of the protein by docking on its T4 binding pocket and preventing its aggregation. This pharmacological discovery was referred to as the native kinetic stabilization strategy [16]. The synthetic chemistry efforts ultimately yielded >1000 small-molecule TTR kinetic stabilizers that are potent aggregation inhibitors.

Currently, more than 400 crystallographic structures of TTR are deposited in the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) [17], most of them in complex with small-molecule ligands. This comprehensive work has allowed a full characterization of the TTR binding sites [18–20]. A relevant feature of these sites is the presence of three sets of symmetry-related depressions termed halogen-binding pockets (HBPs: HBP1 and HBP1', HBP2 and HBP2' and HBP3 and HBP3'), which accommodate the iodine atoms of the thyroid hormones in their complexes with TTR [21]. The innermost pockets are HBP3 and HBP3' and the outermost HBP1 and HBP1'.

To date, only tafamidis (registered as Vyndaqel®; Scheme 1) [22], a benzoxazole derivative fashioned by structure-based drug design, and a repurposed drug, the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diflunisal (Scheme 1) [23], have reached approval for clinical use. The drug tolcapone (Scheme 1), an orally active catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitor authorized in the United States and Europe as an adjunct to levodopa and carbidopa for the treatment of Parkinson's disease, has also been repurposed for FAP [24].

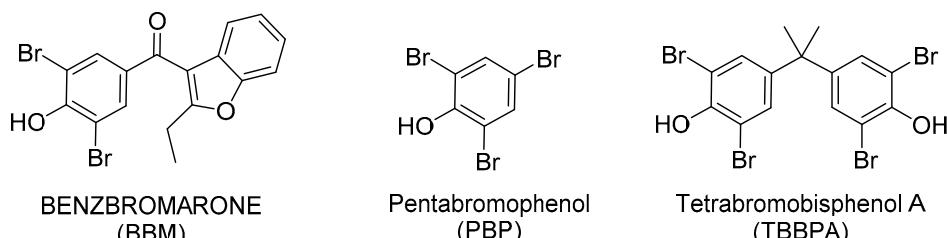


Scheme 1. Chemical structures of TTR tetramer stabilizers: the orphan drug tafamidis, the Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diflunisal, the repurposed drug tolcapone for Familial amyloid polyneuropathy (FAP) and our lead compound iododiflunisal (IDIF).

The drug discovery effort focused on TTR amyloid diseases continues, exemplified by the discovery of the small-molecule stabilizer AG10, now in a phase 3 trial (NCT03860935) [25].

One of our contributions to this ongoing drug discovery effort has been the preclinical development of iododiflunisal (IDIF, Scheme 1) [26–28] an iodinated derivative of the NSAID diflunisal.

Interestingly, a high percentage of the TTR T4-binding tetramer stabilizers reported in the Protein Data Bank [17] are halogenated phenol compounds (Supporting Information, Table S2). Some brominated ligands of TTR are pentabromophenol (PBP; Scheme 2) [29] and the flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA; Scheme 2) [30]. TBBPA binds in the thyroxine-binding pocket, with bromines occupying two of the three halogen-binding sites. According to the authors, this molecule represents an interesting scaffold. Moreover, the effect of the halogenation on the biological activity of previously reported TTR tetramer stabilizers has also been assayed to provide mechanistic insights into their binding properties [31–33].



Scheme 2. Chemical structures of the small-molecule compounds sharing a dibromophenol scaffold: the drug benzboromarone (BBM) and the TTR ligands pentabromophenol (PBP, PDB ID: IE3F) and tetrabromobisphenol A (TBBPA, PDB ID: 5HJG).

The drug benzboromarone (BBM; Scheme 2) shares with TBBPA an interesting dibromophenol scaffold for drug design, being a candidate drug for repurposing purposes [34]. BBM has been used for more than 30 years to control hyperuricemia and gout [35,36]. Interest in this drug was found in other recent research studies. BBM was reported to be an effective inhibitor of amylin aggregation [37]. BBM was shown to inhibit retinol-dependent RBP4-TTR interaction for treatment of age-related macular degeneration [38].

In the present work, we investigated the potential of the registered drug BBM as a TTR tetramer stabilizer. To this end, we report a comparative *in vitro* and *ex vivo* study of the binding affinity of BBM to TTR; a comparative ITC analysis of the thermodynamic profile of the TTR/BBM with other stabilizers; an X-ray analysis of the molecular details of the binary interaction of BBM with TTR resulting in a strong TTR tetramer stabilization; and a comparative kinetic analysis of TTR fibrillogenesis in the presence of BBM with other stabilizers.

2. Results and Discussion

2.1. Benz bromarone (BBM) Stabilizes the TTR Tetrameric Fold

To determine if BBM fits the native kinetic stabilization strategy, we investigated the effect of BBM in TTR stability by measuring TTR resistance to urea denaturation, as previously described [39]. The extent of denaturation of the TTR tetramer was evaluated by measuring how much folded TTR (tetramer, trimer and dimer) and monomer remained after urea treatment. We compared the effect of BBM to iododiflunisal (IDIF), known to be a potent TTR stabilizer, used here as a positive control, and also to sulfaquinoxaline, a compound that does not stabilize TTR and used here as a negative control.

As depicted in Figure 2, pre-incubation of TTR with BBM increased the resistance of TTR to urea denaturation, as compared to TTR alone. The level of TTR stabilization provided by BBM was comparable to the one by IDIF. As expected, the compound sulfaquinoxaline, used as a negative control, did not change the levels of folded/monomeric TTR, which were found to be similar to the ones in TTR incubated alone.

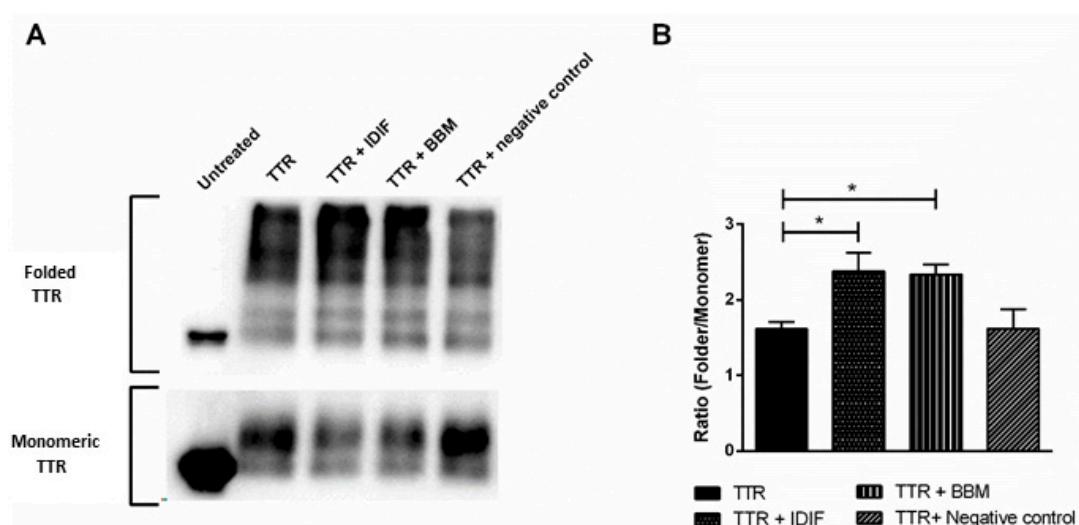


Figure 2. TTR resistance to urea denaturation. (A) TTR, alone or pre-incubated with different compounds, was subjected to urea denaturation, as described, and the generated species were detected by western blot. Incubation with iododiflunisal (IDIF) and benz bromarone (BBM) resulted in increased folded TTR, as compared to the negative control and TTR alone. (B) Quantification of results from three independent experiments. Error bars represent SEM. * $p < 0.05$.

2.2. Benz bromarone (BBM) Binds TTR in the T4 Central Binding Pocket

We then investigated if the capacity of BBM to stabilize TTR was related to its binding in the T4-binding channel, as for the other TTR stabilizers mentioned. In this qualitative assay, we used human plasma as the source of TTR and measured the degree of ^{125}I -T4 displacement by evaluating the decrease in the intensity of the TTR/ ^{125}I -T4 band. As shown in Figure 3, BBM completely displaced T4 from TTR, similarly to IDIF. The negative control (sulfaquinoxaline) did not displace T4 from TTR and thus the intensity of the TTR/T4 band was similar to the one observed for TTR incubated in the absence of stabilizer.

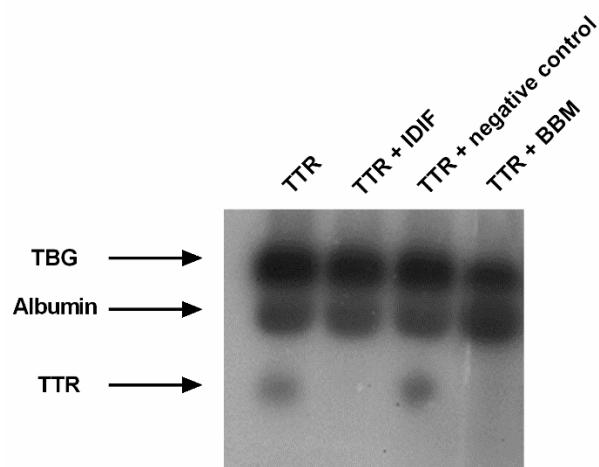


Figure 3. T4 displacement from TTR. Native gel electrophoresis of human plasma, incubated with ^{125}I -T4 and competitor, showing that IDIF and BBM can compete with T4 for its binding site, whereas the negative control could not displace T4 from TTR. The migration of the different plasma T4-binding proteins is indicated.

As for the selectivity of BBM displacement of T4, with other proteins, BBM mainly displaced T4 from TTR, although it was possible to observe a small decrease in the intensity of the TBG/T4 bands and increase in the albumin/T4 bands (Figure 3).

To characterize the TTR/BBM interaction, and since the T4 displacement gel approach is only qualitative, we quantified the interaction using competition assays as described in the Materials and Methods (Figure 4A), and calculated the EC₅₀ for each compound. The relative potency for the inhibition of the binding of T4 was defined as the ratio of (EC₅₀ T4)/(EC₅₀ small molecule) (Figure 4B). The results demonstrated that BBM had a high relative inhibition potency (1.06) similar to that of IDIF (0.96), prompting BBM as a potent TTR stabilizer. The negative control did not compete with T4 for TTR binding.

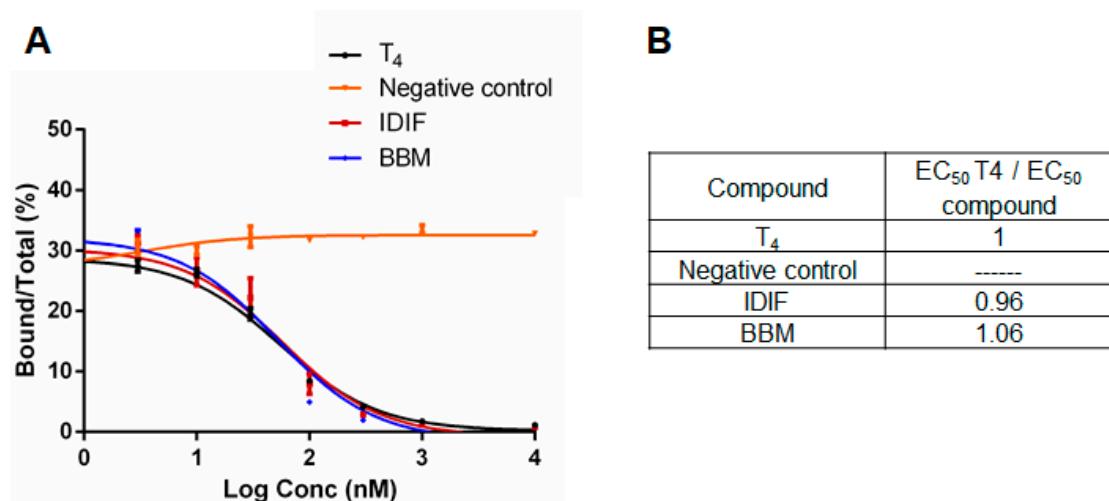


Figure 4. (A) Displacement of ^{125}I -T4 from TTR by competition with the compounds IDIF and BBM, the natural ligand T4 is used as a positive control and sulfaquinoxaline is used as a negative control; (B) relative potency for the inhibition of binding of T4.

2.3. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) Studies of the Binary Interaction between TTR and the Small-Molecule Drug Benz bromarone (BBM). Comparison with other TTR Binary Interactions with Iododiflunisal (IDIF), Tolcapone and Tafamidis

ITC is one of the gold standard biophysical methods for the quantitative analysis of intermolecular interaction, providing the complete thermodynamic profile in terms of free energy (ΔG), enthalpy (ΔH), entropy (ΔS), binding constant (K_d) and stoichiometry (n) of the interaction from a single experiment [40]. The K_d for the binding of a stabilizer to TTR is represented by the change in the Gibbs free energy of binding (ΔG), where $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. This technique has been used previously to compare small-molecule TTR stabilizers, like the small-molecule AG10 with other TTR tetramer stabilizer drugs [41].

ITC studies were performed to characterize the thermodynamic profile of the BBM binding to TTR. In this work, we compared the thermodynamic signatures of the interactions of TTR with other stabilizers, our lead compound IDIF and the TTR tetramer stabilizer drugs tolcapone and tafamidis (Figure 5).

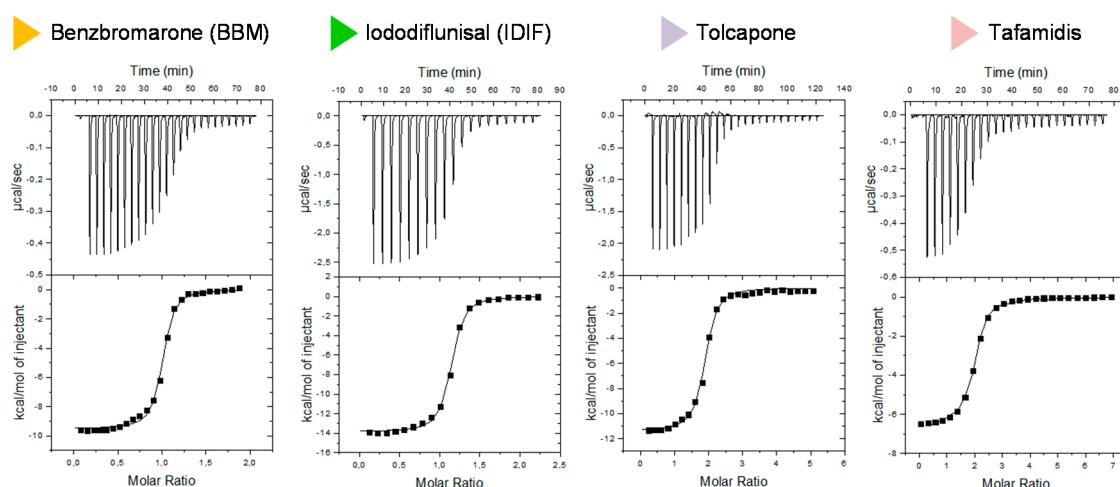


Figure 5. Thermograms of different complexes between TTR and small-molecule compounds: TTR + BBM, TTR + IDIF, TTR + tolcapone and TTR + tafamidis.

As it can be observed (Table 1), the binding stoichiometry number n is 1 both for BBM and for IDIF, whereas for tolcapone and tafamidis, n is 2. The K_d values reported in Table 1 were based on data fitted to an independent single-site binding model implemented in Origin 7.0 (OriginLab). Previous ITC studies for the binary complexes of tolcapone and tafamidis with TTR have used either a single model [42] or a two-site model to approximate binding to TTR [24,41].

Table 1. Thermodynamic parameters for interaction of TTR with small-molecule compounds including some TTR stabilizer drugs analyzed by ITC.

Assay	n	K_d (nM)	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	$T\Delta S$ (Kcal/mol)
wtTTR + BBM	1	60	-9.93	-9.94	-0.02
wtTTR + IDIF	1	120	-9.49	-13.10	-3.61
wtTTR + tafamidis	2	200	-9.16	-6.50	2.66
wtTTR + tolcapone	2	270	-8.98	-12.30	-3.36
wtTTR + diflunisal	1	900	-8.25	-11.96	-3.70

The binding interactions for BBM with TTR are enthalpy driven ($\Delta H = -9.93$ kcal/mol), similar to the binding interactions of our lead compound IDIF with TTR, but in the case of IDIF, the enthalpic contribution is higher ($\Delta H = -13.10$ kcal/mol). BBM binds to TTR with a slightly unfavorable entropy contribution ($T\Delta S = -0.02$ kcal/mol) compared to the unfavorable entropy contribution ($T\Delta S = -3.61$ kcal/mol) of

IDIF, BBM shows similar binding affinities to TTR in buffer (i.e., similar ΔG values) compared to IDIF, tolcapone and tafamidis. These ITC results confirm that BBM is a potent binder of TTR.

2.4. Crystal Structure of TTR in Complex with BBM (TTR:BBM Complex)

X-ray analysis was conducted to elucidate the molecular details of the interactions of BBM with TTR. Crystals of TTR in complex with BBM diffracted to a maximum of 1.35 Å (see Supporting Information Table S1).

The two dimers that form TTR are related by a crystallographic 2-fold axis that runs along a central channel. The channel displays two hormone-binding sites, AA' and BB', with similar topology. BBM molecules bind deeply within the thyroxine binding pocket, with bromine atoms at the inner side of the cavity (Figure 6). In the crystal structure of the apo-TTR, Ser117 side chains face the cavities and hydrogen bonded to crystallographic water molecules. BBM binding induces the rotation of the side residues of serine 117 of all four monomers, prompting the formation of strong intermonomer hydrogen bonds which presumably increase the stability of the TTR tetramer.

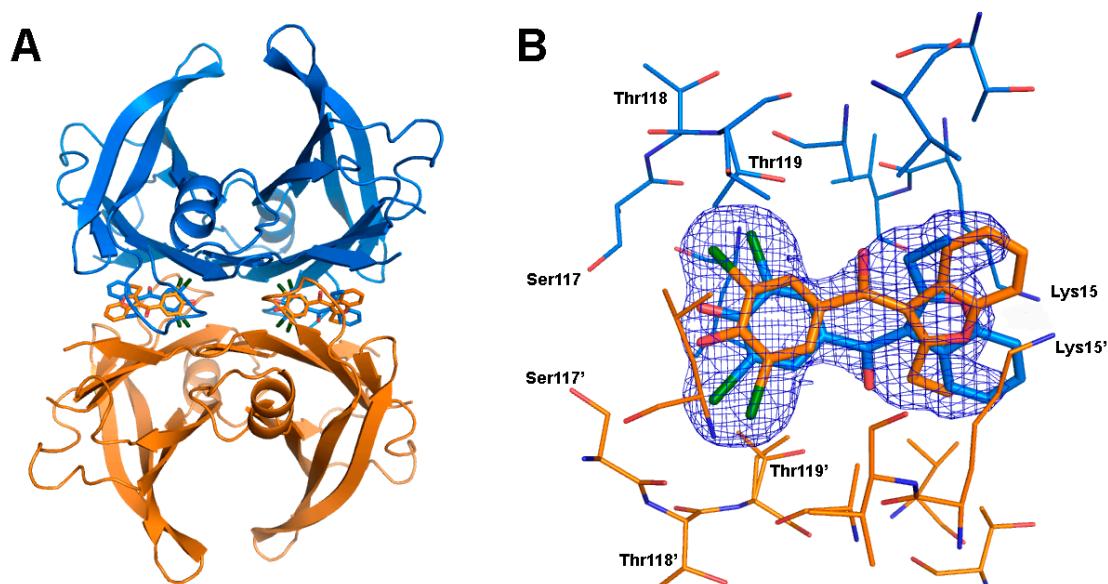


Figure 6. (A). Crystal structure of TTR in complex with benzboromarone (BBM). Monomers A and B and their symmetry-related pair (shown in light blue and brown) form a cavity in the dimer interface that can simultaneously accommodate two BBM molecules. (B) Close-up view of the BB' binding site, showing the two symmetry-related positions of BBM. 2Fo-Fc map (blue mesh) contoured around BBM at 1.0 σ . Bromine atoms in green; oxygen in red; nitrogen in dark blue.

Three pairs of symmetry-related binding pockets (HBP1 and HBP1', HBP2 and HBP2', HBP3 and HBP3') are found within each hormone-binding pocket according to the positions of the iodine atoms of T4, when bound to TTR. BBM binds TTR in forward mode (Figure 7), with the bromine-substituted ring occupying the innermost part of the T₄ binding site. The two bromine atoms are anchored in HBP3', comprising the side chains of Ser117', Leu110', Thr119' and Ala108', and in HBP2, comprising residues Leu17, Ala108, Ala109 and Leu110, respectively. Ligand binding induces the rotation of the side chains of Ser117 residues of the four monomers, leading to the formation of strong intermonomer hydrogen bonds.

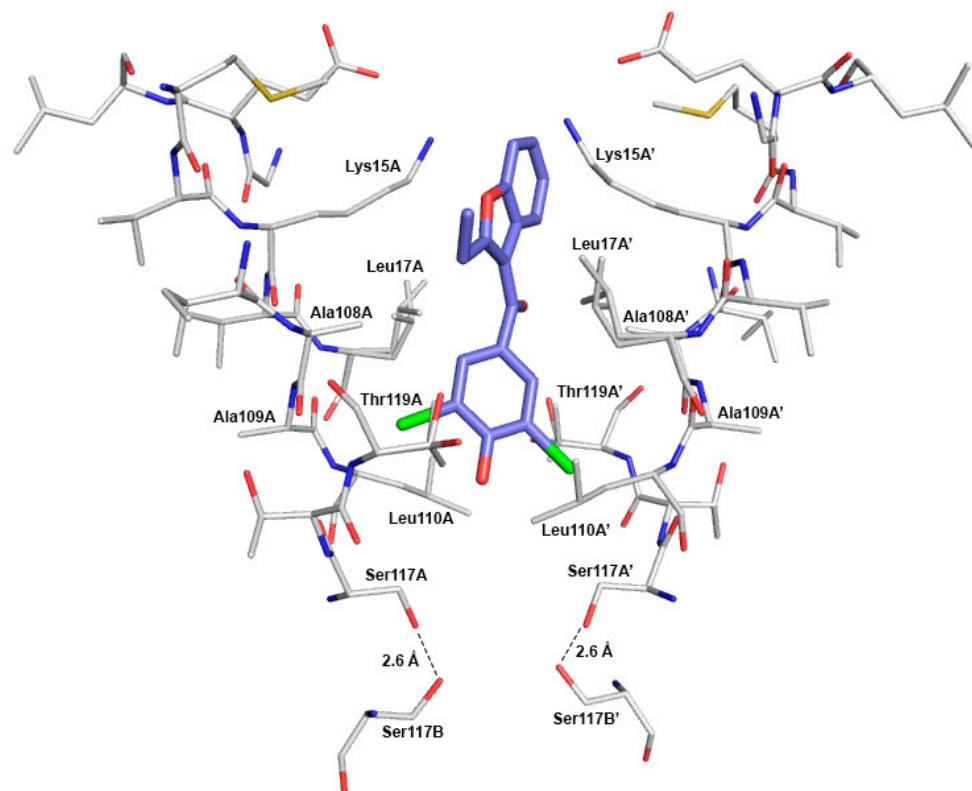


Figure 7. Close view of the interactions of benz bromarone (BBM) with the TTR AA' binding site (carbon atoms in grey, nitrogen atoms in dark blue, oxygen in red, sulfur in dark yellow and bromine atoms of BBM in green).

The binding mode of BBM to TTR is very similar to the one of the abovementioned TBBPA. Nevertheless, superposition of the two crystals structures reveals that BMM binds slightly deeper than TBBPA (Figure 8).

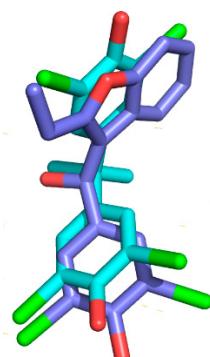


Figure 8. Close superposition of TTR AA' binding site of the complexes of TTR with BBM and with TBBPA (PDB ID: 5HJG). Only the ligands are shown to highlight the similarities of their binding modes. The orientation of the protein binding site is similar to the one in Figure 7. BBM and TBBPA atom colors as in Figure 7 except for TBBPA carbon atoms shown in light blue.

2.5. Comparative Analysis of the Ability of BBM to Inhibit TTR Fibrillogenesis at Acidic pH

Finally, to investigate the impact of BBM on TTR aggregation, we determined the effect of BBM on the aggregation of the amyloidogenic Y78F hTTR mutant, by using our kinetic assay [43] that follows turbidimetry of TTR at 340 nm (Figure 9A), and performed a comparative analysis with other TTR stabilizers, such as tafamidis (Figure 9B), tolcapone (Figure 9D) and IDIF (Figure 9C).

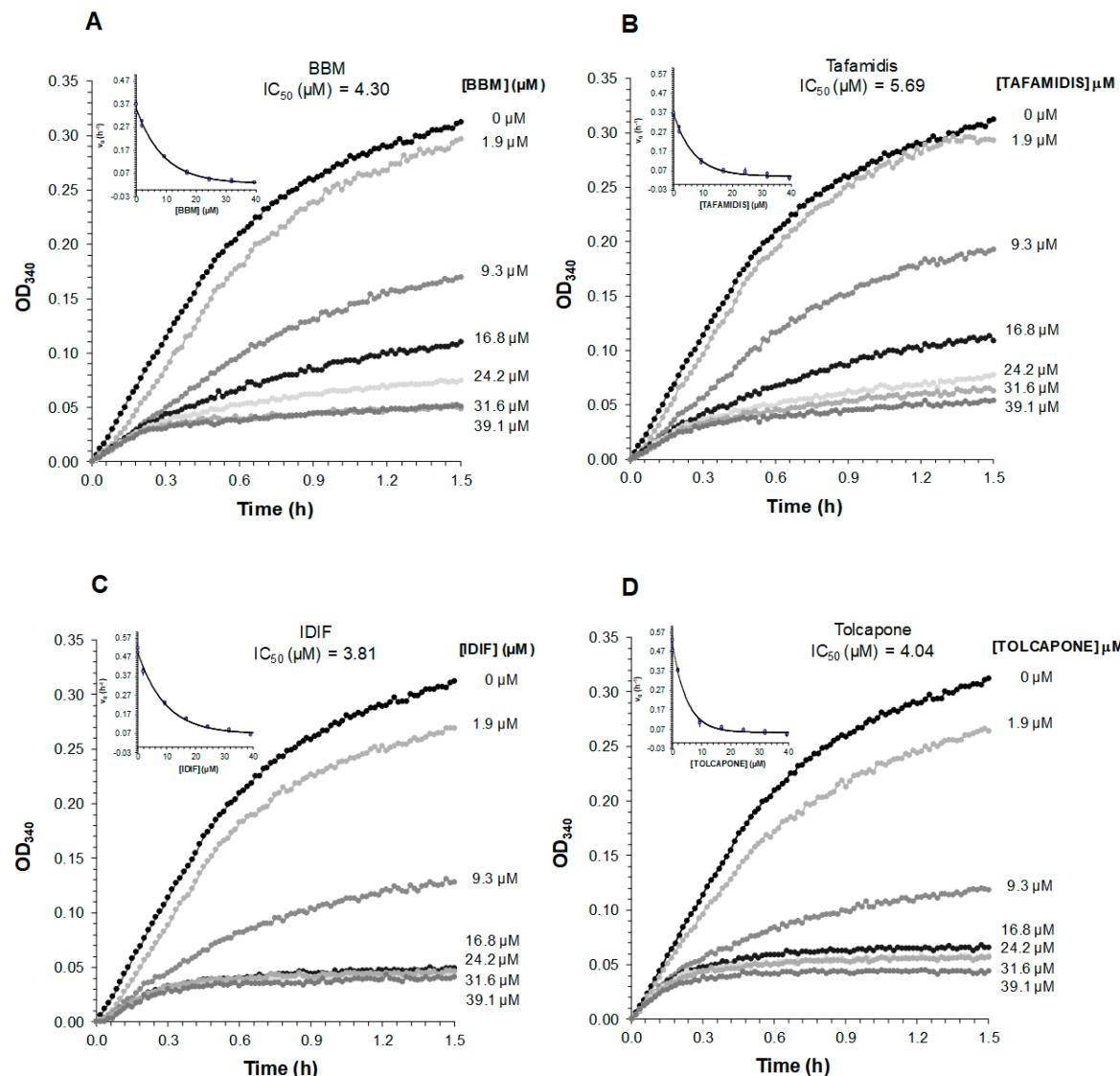


Figure 9. Time course of Y78F hTTR fibril formation at pH 4.2, 37 °C in the presence of different concentrations of: (A) BBM (inset: plot of initial rates of fibril formation (V_0) vs. BBM concentration (Figure S1). Data were fitted to eq 1); (B) tafamidis (inset: plot of initial rates of fibril formation vs. tafamidis concentration) (Figure S2); (C) IDIF (inset: plot of initial rates of fibril formation vs. IDIF concentration) (Figure S4); and (D) tolcapone (inset: plot of initial rates of fibril formation vs. tolcapone concentration) (Figure S3); for diflunisal (Figure S5); as monitored by absorbance at 340 nm at different concentrations. Experiments were performed in duplicate.

Kinetic measurements showed that BBM efficiently prevents the aggregation of Y78F hTTR at low pH, with $IC_{50} = 4.30 \mu M$, in the same order as the IC_{50} for our small-molecule IDIF ($IC_{50} = 3.81 \mu M$) and the ones for the drugs tafamidis ($IC_{50} = 5.69 \mu M$) and tolcapone ($IC_{50} = 4.05 \mu M$).

3. Materials and Methods

3.1. Compounds

Tafamidis was synthesized in our laboratory according to reported procedures in the literature [44]. HEPES, *N*-(2-Hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid); glycine; dimethyl sulfoxide (DMSO), the NSAID drug diflunisal (DIF) and the drug tolcapone were commercially available from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Iododiflunisal (IDIF) was prepared in our lab by iodination

of the NSAID diflunisal, following our previously described procedures [28]. Purity of all compounds was proved to be $\geq 95\%$ by means of analytical HPLC, NMR and UPLC-TOF-MS techniques.

3.2. TTR Production and Purification

Human recombinant wild-type TTR (wt TTR) and the mutant Y78F (Y78F hTTR) were produced in a bacterial expression system using *Escherichia coli* BL21 [45] and purified as previously described [46]. Briefly, after growing the bacteria, the protein was isolated and purified by preparative gel electrophoresis after ion exchange chromatography. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

3.3. TTR Stability Assay

Recombinant wtTTR was incubated alone or in the presence of different compounds: IDIF as a reference positive control, the veterinary drug sulfaquinoxaline as a negative control, and the BBM drug at a molar ratio of 1:10 (TTR:drug) for 1 h at 37 °C. Then, urea was added at 6 M and samples were further incubated at 37 °C, overnight. The cross-linking reaction was performed by adding 2.5% glutaraldehyde for 4 min and then the reaction was quenched by adding 0.1% sodium borohydride. Samples were then run in a 13.5% acrylamide gel prepared with SDS, and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham NC Protran™ 0.2 µm Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) using a wet system (Bio-Rad Criterion Blotter). The membranes were blocked for 1 h at RT with 5% nonfat dry milk (DM) in PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) and then incubated with primary antibody antihuman TTR (Dako; 1:1000 in 3% DM/PBS-T, Dako, Glostrup, Denmark). Then, washed membranes were incubated for 1 h at RT with sheep antirabbit immunoglobulins conjugated with horseradish peroxidase (Binding Site; 1:5000 in 3% DM/PBS-T). The blots were developed using Clarity™ Western ECL substrate (Bio-Rad), and levels of folded (tetramer + trimer + dimer) and monomeric TTR were detected and visualized using a chemiluminescence detection system (ChemiDoc, Bio-Rad).

3.4. Thyroxine Binding Assays

Qualitative studies of the displacement of T4 from TTR were carried out by incubation of 5 µL of human plasma, with ^{125}I -T4 (specific radioactivity $\approx 1200 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$; Perkin Elmer) in the presence of the different compounds (IDIF, BBM and sulfaquinoxaline) at a final concentration of 666 µM. Protein separation was carried in a native PAGE system using glycine/acetate buffer. The gel was dried and revealed using an X-ray film.

For the quantitative analysis, T4 binding competition assays based on a gel filtration procedure were used, as previously described [47]. Briefly, 30 nM human recombinant wtTTR was incubated with cold T4 or compound (IDIF, BBM and sulfaquinoxaline negative control) solutions of variable concentrations ranging from 0 to 1000 nM and with a constant amount of labeled ^{125}I -T4 ($\sim 50,000 \text{ cpm}$). This solution was counted in a gamma spectrometer and incubated at 4 °C overnight. Protein-bound ^{125}I -T4 and free ^{125}I -T4 were separated by gel filtration through a 1 mL BioGel P6DG (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) column. The bound fraction was eluted while free T4 was retained on the BioGel matrix. The eluate containing the bound T4 was collected and counted. Bound T4 was expressed as a percentage of total T4 added. The experiment was performed twice, and each assay was done in duplicate. Analysis of the binding data was performed with the GraphPad Prism program (version 5.0, San Diego, CA, USA) and data were expressed as the ratio of EC₅₀ T4/EC₅₀ compound.

3.5. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) Studies

Isothermal titration calorimetry (ITC) measurements were carried out in a VP-ITC (MicroCal, LLC, Northampton, MA, USA). In a titration experiment, the ligand in the syringe is added in small aliquots to the TTR protein in the calorimeter cell, which is filled with an effective volume that is sensed calorimetrically. All solutions, either TTR protein or drugs, were prepared in 25 mM HEPES buffer, 10 mM glycine, pH 7.4 and 5% DMSO (final concentration). The concentration of TTR solution was

5–10 μM and 50–100 μM for ligand solutions. All solutions were filtered and degassed prior to usage. The TTR protein solution was injected over 20 or 30 times at a constant interval of 300 s with a 450 rpm rotating stirrer syringe into the sample cell. In the control experiment, the ligand was injected into the buffer in the sample cell to obtain the heat of dilution. The value of the heat of dilution was subtracted from the experimental result in the final analysis. The experiments were performed at 25 °C, reference power at 10. Titration data were analyzed by the evaluation software, MicroCal Origin, Version 7.0, provided by the manufacturer. Calorimetric data were plotted and fitted using the standard single-site binding model. The binding curves were fitted to the calculations of the parameters' stoichiometry (n), dissociation constant (K_d) and the changes in the enthalpy (ΔH), entropy (ΔS) and Gibbs free energy (ΔG) during the complex formation. Each experiment was done three times.

3.6. Co-Crystallization

The wtTTR at 182 μM was incubated with BBM (molar ratio BBM/wtTTR = 13) at 4 °C for 16 h, in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5. Crystals suitable for X-ray diffraction were obtained by the hanging-drop vapor-diffusion technique at 20 °C and were grown within 2 weeks by mixing 2 μL of the protein:BBM solution with 2 μL of reservoir solution. The reservoir solution contained 0.2 M acetate buffer pH 4.8, 2.2 M ammonium sulfate and 7% glycerol. Crystals were transferred to reservoir solutions containing increasing concentrations of glycerol (10–25%) and flash frozen in liquid nitrogen.

3.7. X-Ray Diffraction Data Collection, Processing and Structure Refinement

X-ray diffraction data sets were collected using synchrotron radiation ($\lambda = 0.979 \text{ \AA}$) at the Proxima 1 beam line of the SOLEIL synchrotron (Paris, France). Preliminary data were measured in ESRF and ALBA synchrotrons. A summary of the data collection and refinement statistics is presented in Table S1 in the Supporting Information. Diffraction images were processed with the iMosflm software [48] and the scaling and merging of the reflections were performed using programs SCALA and TRUNCATE [49]. A random 5% sample of the reflection data was flagged for R-free calculations [50] during model building and refinement. Initial molecular replacement phases were generated with Phaser MR [51], using as the initial model one monomer of the complex TTR:IDIF (PDB ID: 1Y1D) [27] followed by refinement cycles performed with Refmac5 [49]. The final models were obtained after further cycles of manual model building and refinement, carried out with Coot [52] and PHENIX [53], respectively. Structural data were deposited in the Protein Data Bank (PDB) with PDB ID code 7ACU and figures of the protein model were generated with PyMol [54].

3.8. Kinetic Turbidity Assay

Protein (Y78F hTTR) stock: 4 mg/mL in 20 mM phosphate, 100 mM KCl, pH 7.6. Incubation buffer: 10 mM phosphate, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7.6. Dilution buffer: 400 mM sodium acetate, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 4.2. Protocol for one compound: 20 μL of Y78F hTTR stock was dispensed into seven wells of a 96-well microplate. Different volumes of working inhibitor solution were added to give final concentrations ranging from 0 to 40 μM , and the final DMSO content of each well was adjusted to 5% by adding the corresponding volume of a H₂O/DMSO (1:1) solution. Incubation buffer was then added up to a volume of 100 μL . The plate was incubated at 37 °C in a thermostated microplate reader with orbital shaking 15 s every minute for 30 min. A 100 μL portion of dilution buffer was dispensed to each well, and the mixture was incubated at 37 °C with shaking (15 s every min) in the microplate reader. Absorbance at 340 nm was monitored for 1.5 h at 1 min intervals. Data were collected and analyzed using Microsoft Excel software. All assays were done in duplicate.

3.9. Statistics

The data are presented as means \pm SEM and were analysed by the unpaired Student's *t*-test using GraphPad Prism 8 software for Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA), and those showing a *p*-value < 0.05 were considered significant.

4. Conclusions

We have shown that BBM stabilizes the TTR tetramer and in vitro and ex vivo approaches demonstrated that the binding occurs in the T4-binding pocket, with a capacity similar to IDIF, tafamidis and tolcapone, known as strong TTR stabilizers. A full characterization of the thermodynamic profile by ITC studies showed that the BBM enthalpically driven mode of action is through kinetic stabilization of TTR, with similar profiles to tafamidis and tolcapone.

The analysis of the crystal structure shows that BBM binds TTR in forward mode, with the bromine-substituted ring occupying the innermost part of the T4-binding site. BBM binding induces the rotation of the side residues of serine 117 of all four monomers, prompting the formation of strong intermonomer hydrogen bonds, which presumably increase the stability of the TTR tetramer.

Importantly, by a comparative kinetic analysis of the inhibition of TTR fibrillogenesis at moderately acid pH, we have concluded that BBM has similar inhibitory potency as known TTR stabilizer drugs.

On the basis of the obtained results, we can conclude that the uricosuric drug benzboromarone (BBM) presents an interesting scaffold in the quest to design of new and improved TTR stabilizers. Further studies are in progress to evaluate if this drug can be repurposed for FAP.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/19/7166/s1>. Data collection and refinement statistics; kinetics of aggregation of TTR in the presence of different stabilizers; list of organohalogen compounds among the TTR T₄ tetramer stabilizers reported in PDB.

Author Contributions: E.Y.C.: Data curation (turbidimetry/kinetics). E.Y.C., Â.O. and J.P.L.: Writing—original draft preparation. Â.O.: Data curation (T4 binding assays; TTR stability assays). J.P.L.: Data curation (X-ray). J.L.: conceptualization, Writing—reviewing and editing. L.G.: Conceptualization (X-ray), methodology (X-ray), writing—reviewing. J.Q. and I.C.: Conceptualization, methodology, writing—reviewing and editing. G.A.: Conceptualization, methodology, writing—reviewing and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: I.C. works under the Investigator FCT Program which is financed by national funds through FCT and co-financed by ESF through HPOP, type 4.2, Promotion of Scientific Employment. I.C. acknowledges a grant from Fundação Millennium bcp. G.A. acknowledges a grant from Fundació Marató de TV3, Spain (project ref. 20140330-31-32-33-34) and from Spanish MINECO (grant CTQ2016-76840-R).

Acknowledgments: E.Y.C. acknowledges a contract funded by the project of Fundació Marató de TV3, Spain (project ref. 20140330-31-32-33-34) and a contract from Ford España—Fundación Apadrina la Ciencia. J.P. Leite acknowledges the FCT PhD fellowship SFRH/BD/129921/2017 (Portugal). G.A. acknowledges Rafel Prohens from Unitat de Polimorfisme i Calorimetria, Centres Científics i Tecnològics (University of Barcelona) for his supervision and assistance in ITC studies and acknowledges Antoni Planas (IQS-URL) for full support on the TTR production. We would also like to thank the SOLEIL (Essonne, France) beam line staff for the assistance during data collection, as well as the staff of the ESRF (France) and ALBA (Barcelona, Spain) synchrotrons for assistance in the collection of preliminary data.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
BBM	Benzboromarone
BSA	Bovine serum albumin
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CSF	Cerebrospinal fluid
DIF	Diflunisal
DM	Dried milk
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAP	Familial amyloid polyneuropathy
HBP	Halogen-binding pocket
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HPLC	High-performance liquid chromatography

IDIF	Iododiflunisal
ITC	Isothermal titration calorimetry
NMR	Nuclear magnetic resonance
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
PBP	Pentabromophenol
PBS	Phosphate-buffered saline
PDB	Protein Data Bank
rpm	revolutions per minute
RT	Room temperature
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TBBPA	Tetrabromobisphenol A
T4	Thyroxine
TBG	Thyroxine-binding globulin
TTR	Transthyretin
UPLC-TOF-MS	Ultra-high performance liquid chromatography time of flight mass spectrometry

References

1. Blake, C.C.; Geisow, M.J.; Oatley, S.J.; Rerat, B.; Rerat, C. Structure of prealbumin: Secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* **1978**, *121*, 339–356. [[CrossRef](#)]
2. Hamilton, J.A.; Benson, M.D. Transthyretin: A review from a structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1491–1521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Herbert, J.; Wilcox, J.N.; Pham, K.T.; Fremeau, R.T., Jr.; Zeviani, M.; Dwork, A.; Soprano, D.R.; Makover, A.; Goodman, D.S.; Zimmerman, E.A. Transthyretin: A choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Weir Mitchell award. *Neurology* **1986**, *36*, 900–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Monaco, H.L.; Rizzi, M.; Coda, A. Structure of a complex of two plasma proteins: Transthyretin and retinol binding protein. *Science* **1995**, *268*, 1039–1041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zanotti, G.; Berni, R. Plasma retinol-binding protein: Structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam. Horm.* **2004**, *69*, 271–295.
6. Hagen, G.A.; Elliott, W.J. Transport of thyroid hormones in serum and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1973**, *7*, 415–422. [[CrossRef](#)]
7. Gião, T.; Saavedra, J.; Cotrina, E.; Quintana, J.; Llop, J.; Arsequell, G.; Cardoso, I. Undiscovered Roles for Transthyretin: From a Transporter Protein to a New Therapeutic Target for Alzheimer’s Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2075. [[CrossRef](#)]
8. Schwarzman, A.L.; Gregori, L.; Vitek, M.P.; Lyubski, S.; Strittmatter, W.J.; Enghilde, J.J.; Bhasin, R.; Silverman, J.; Weisgraber, K.H.; Coyle, P.K.; et al. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8368–8372. [[CrossRef](#)]
9. Garai, K.; Posey, A.E.; Li, X.; Buxbaum, J.N.; Pappu, R.V. Inhibition of amyloid beta fibril formation by monomeric human transthyretin. *Protein. Sci.* **2018**, *27*, 1252–1261. [[CrossRef](#)]
10. Alemi, M.; Silva, S.C.; Santana, I.; Cardoso, I. Transthyretin stability is critical in assisting beta amyloid clearance—Relevance of transthyretin stabilization in Alzheimer’s disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2017**, *23*, 605–619. [[CrossRef](#)]
11. Adams, D.; Koike, H.; Slama, M.; Coelho, T. Hereditary transthyretin amyloidosis: A model of medical progress for a fatal disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 387–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Plante-Bordeneuve, V. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy: An update. *J. Neurol.* **2018**, *265*, 976–983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Siddiqi, O.K.; Rubberg, F.L. Cardiac amyloidosis: An update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Trends Cardiovasc. Med.* **2018**, *28*, 10–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Westerman, P.; Sletten, K.; Johansson, B.; Cornwell, G.G., 3rd. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2843–2845. [[CrossRef](#)]
15. Ziskin, J.L.; Greicius, M.D.; Zhu, W.; Okumu, A.N.; Adams, C.M.; Plowey, E.D. Neuropathologic analysis of Tyr69His TTR variant meningo-vascular amyloidosis with dementia. *Acta Neuropathol. Commun.* **2015**, *3*, 43. [[CrossRef](#)]

16. Connelly, S.; Choi, S.; Johnson, S.M.; Kelly, J.W.; Wilson, I.A. Structure-based design of kinetic stabilizers that ameliorate the transthyretin amyloidoses. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 54–62. [[CrossRef](#)]
17. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [[CrossRef](#)]
18. Palaninathan, S.K. Nearly 200 X-Ray Crystal Structures of Transthyretin: What Do They Tell Us about This Protein and the Design of Drugs for TTR Amyloidoses? *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2324–2342. [[CrossRef](#)]
19. Nencetti, S.; Orlandini, E. TTR fibril formation inhibitors: Is there a SAR? *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2356–2379.
20. Guo, X.; Liu, Z.; Zheng, Y.; Li, Y.; Li, L.; Liu, H.; Chen, Z.; Wu, L. Review on the Structures and Activities of Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 1057–1081. [[CrossRef](#)]
21. Wojtczak, A.; Cody, V.; Luft, J.; Pangborn, W. Structures of human transthyretin complexed with thyroxine at 2.0 Å resolution and 3', 5'-dinitro-N-acetyl-L-thyronine at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1996**, *52*, 758–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Waddington Cruz, M.; Amass, L.; Keohane, D.; Schwartz, J.; Li, H.; Gundapaneni, B. Early intervention with tafamidis provides long-term (5.5-year) delay of neurologic progression in transthyretin hereditary amyloid polyneuropathy. *Amyloid* **2016**, *23*, 178–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Berk, J.L.; Suhr, O.B.; Obici, L.; Sekijima, Y.; Zeldenrust, S.R.; Yamashita, T.; Heneghan, M.A.; Gorevic, P.D.; Litchy, W.J.; Wiesman, J.F.; et al. Diflunisal Trial Consortium. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: A randomized clinical trial. *JAMA* **2013**, *310*, 2658–2667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sant’Anna, R.; Gallego, P.; Robinson, L.Z.; Pereira-Henriques, A.; Ferreira, N.; Pinheiro, F.; Esperante, S.; Pallares, I.; Huertas, O.; Almeida, M.R.; et al. Repositioning tolcapone as a potent inhibitor of transthyretin amyloidogenesis and associated cellular toxicity. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10787. [[CrossRef](#)]
25. Fox, J.C.; Hellawell, J.L.; Rao, S.; O'Reilly, T.; Lumpkin, R.; Jernelius, J.; Gretler, D.; Sinha, U. First-in-Human Study of AG10, a Novel, Oral, Specific, Selective, and Potent Transthyretin Stabilizer for the Treatment of Transthyretin Amyloidosis: A Phase 1 Safety, Tolerability, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study in Healthy Adult Volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **2020**, *9*, 115–129. [[CrossRef](#)]
26. Almeida, M.R.; Macedo, B.; Cardoso, I.; Alves, I.; Valencia, G.; Arsequell, G.; Planas, A.; Saraiva, M.J. Selective binding to transthyretin and tetramer stabilization in serum from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by an iodinated diflunisal derivative. *Biochem. J.* **2004**, *381*, 351–356. [[CrossRef](#)]
27. Gales, L.; Macedo-Ribeiro, S.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Saraiva, M.J.; Damas, A.M. Human transthyretin in complex with iododiflunisal: Structural features associated with a potent amyloid inhibitor. *Biochem. J.* **2005**, *388*, 615–621. [[CrossRef](#)]
28. Mairal, T.; Nieto, J.; Pinto, M.; Almeida, M.R.; Gales, L.; Ballesteros, A.; Barluenga, J.; Pérez, J.J.; Vázquez, J.T.; Centeno, N.B.; et al. Iodine Atoms: A New Molecular Feature for the Design of Potent Transthyretin Fibrillogenesis Inhibitors. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4124. [[CrossRef](#)]
29. Ghosh, M.; Meerts, I.A.; Cook, A.; Bergman, A.; Brouwer, A.; Johnson, L.N. Structure of human transthyretin complexed with bromophenols: A new mode of binding. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2000**, *56*, 1085–1095. [[CrossRef](#)]
30. Iakovleva, I.; Begum, A.; Brännström, K.; Wijsekera, A.; Nilsson, L.; Zhang, J.; Andersson, P.L.; Sauer-Eriksson, A.E.; Olofsson, A. Tetrabromobisphenol A Is an Efficient Stabilizer of the Transthyretin Tetramer. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153529. [[CrossRef](#)]
31. Ciccone, L.; Nencetti, S.; Rossello, A.; Stura, E.A.; Orlandini, E. Synthesis and structural analysis of halogen substituted fibril formation inhibitors of Human Transthyretin (TTR). *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 40–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Nilsson, L.; Larsson, A.; Begum, A.; Iakovleva, I.; Carlsson, M.; Brännström, K.; Sauer-Eriksson, A.E.; Olofsson, A. Modifications of the 7-Hydroxyl Group of the Transthyretin Ligand Luteolin Provide Mechanistic Insights into Its Binding Properties and High Plasma Specificity. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cotrina, E.Y.; Pinto, M.; Bosch, L.; Vilà, M.; Blasi, D.; Quintana, J.; Centeno, N.B.; Arsequell, G.; Planas, A.; Valencia, G. Modulation of the fibrillogenesis inhibition properties of two transthyretin ligands by halogenation. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9110–9121. [[CrossRef](#)]

34. Pushpakom, S.; Iorio, F.; Eyers, P.A.; Escott, K.J.; Hopper, S.; Wells, A.; Doig, A.; Guilliams, T.; Latimer, J.; McNamee, C.; et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 41–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Masseoud, D.; Rott, K.; Liu-Bryan, R.; Agudelo, C. Overview of hyperuricaemia and gout. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 4117–4124. [[CrossRef](#)]
36. Strilchuk, L.; Fogacci, F.; Cicero, A.F. Safety and tolerability of available urate-lowering drugs: A critical review. *Expert Opin. Drug Saf.* **2019**, *18*, 261–271. [[CrossRef](#)]
37. López, L.C.; Varea, O.; Navarro, S.; Carrodeguas, J.A.; Sanchez de Groot, N.; Ventura, S.; Sancho, J. Benzboromarone, Quercetin, and Folic Acid Inhibit Amylin Aggregation. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 964. [[CrossRef](#)]
38. Petrukhin, K. Transthyretin Ligands Capable of Inhibiting Retinol-Dependent RBP4-TTR Interaction for Treatment of Age-Related Macular Degeneration, Stargardt Disease, and Other Retinal Disease Characterized by Excessive Lipofuscin Accumulation. US 20150057320 A1, 26 February 2015.
39. Santos, L.; Rodrigues, D.; Alemi, M.; Silva, S.; Ribeiro, C.; Cardoso, I. Resveratrol administration increases Transthyretin protein levels ameliorating AD features-importance of transthyretin tetrameric stability. *Mol. Med.* **2016**, *22*, 597–607. [[CrossRef](#)]
40. Doyle, M.L. Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 31–35. [[CrossRef](#)]
41. Miller, M.; Pal, A.; Albusairi, W.; Joo, H.; Pappas, B.; Haque Tuhin, M.T.; Liang, D.; Jampala, R.; Liu, F.; Khan, J.; et al. Enthalpy-Driven Stabilization of Transthyretin by AG10 Mimics a Naturally Occurring Genetic Variant That Protects from Transthyretin Amyloidosis. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7862–7876. [[CrossRef](#)]
42. Bulawa, C.E.; Connelly, S.; Devit, M.; Wang, L.; Weigel, C.; Fleming, J.A.; Packman, J.; Powers, E.T.; Wiseman, R.L.; Foss, T.R.; et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 9629–9634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dolado, I.; Nieto, J.; Saraiva, M.J.M.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Planas, A. Kinetic assay for high-throughput screening of in vitro transthyretin amyloid fibrillogenesis inhibitors. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 246–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Razavi, H.; Palaninathan, S.K.; Powers, E.T.; Wiseman, R.L.; Purkey, H.E.; Mohamedmohaideen, N.N.; Deechongkit, S.; Chiang, K.P.; Dendle, M.T.A.; Sacchettini, J.C.; et al. Benzoazoles as Transthyretin Amyloid Fibril Inhibitors: Synthesis, Evaluation, and Mechanism of Action. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2864–2867. [[CrossRef](#)]
45. Furuya, H.; Saraiva, M.J.; Gawinowicz, M.A.; Alves, I.L.; Costa, P.P.; Sasaki, H.; Goto, I.; Sakaki, Y. Production of recombinant human transthyretin with biological activities toward the understanding of the molecular basis of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Biochemistry* **1991**, *30*, 2415–2421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Almeida, M.R.; Damas, A.M.; Lans, M.C.; Brouwer, A.; Saraiva, M.J. Thyroxine binding to transthyretin Met 119. Comparative studies of different heterozygotic carriers and structural analysis. *Endocrine* **1997**, *6*, 309–315. [[CrossRef](#)]
47. Almeida, M.R.; Alves, I.L.; Terazaki, H.; Ando, Y.; Saraiva, M.J. Comparative Studies of Two Transthyretin Variants with Protective Effects on Familial Amyloidotic Polyneuropathy: TTR R104H and TTR T119M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *270*, 1024–1028. [[CrossRef](#)]
48. Battye, T.G.; Kontogiannis, L.; Johnson, O.; Powell, H.R.; Leslie, A.G. iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 271–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Bailey, S. The Ccp4 Suite-Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.* **1994**, *50*, 760–763.
50. Brunger, A.T. Free R-Value-a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal-Structures. *Nature* **1992**, *355*, 472–475. [[CrossRef](#)]
51. McCoy, A.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Adams, P.D.; Winn, M.D.; Storoni, L.C.; Read, R.J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674. [[CrossRef](#)]
52. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W.G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Adams, P.D.; Afonine, P.V.; Bunkóczki, G.; Chen, V.B.; Davis, I.W.; Echols, N.; Headd, J.J.; Hung, L.W.; Kapral, G.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213–221. [CrossRef] [PubMed]
54. Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System Version 1.3r1. 2010. Available online: <https://pymol.org/2/> (accessed on 1 September 2020).



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Capítulo 3

Artículo 6: Optimization of Kinetic Stabilizers of Tetrameric Transthyretin: A Prospective Ligand Efficiency-guided Approach.

Cotrina, E.Y.; ^a Blasi, D.; ^b Vilà, M.; ^c Planas, A.; ^c Abad-Zapatero, C.; ^d Centeno, N.B.; ^e Quintana, J.; ^{b,e} Arsequell, G.^a

a Unit of Glycoconjugate Chemistry, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Barcelona, Spain

b Drug Discovery Platform, Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain

c Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Barcelona, Spain

d Center for Biomolecular Sciences, Chicago, IL, USA

e Research Group on Biomedical Informatics, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain

Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2020, 28(23), 115794.

DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115794

Elsevier

ISSN:0968-0896

Category: Chemistry, Medicinal

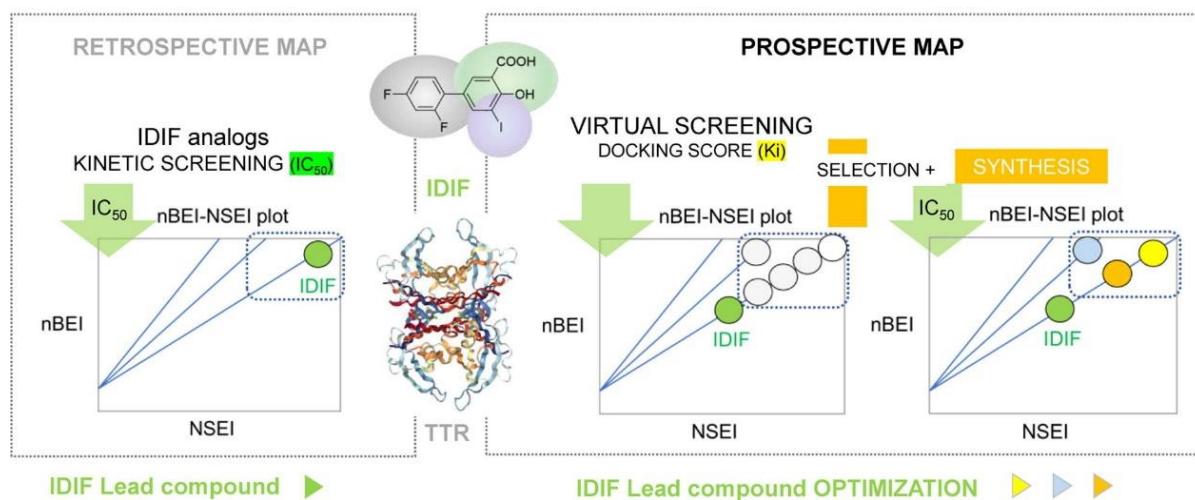
26/61

IF 2.916

Q2

Graphical Abstract

Ligand Efficiency Indices methodology: Prospective lead optimization of TTR tetramer stabilizers





Optimization of kinetic stabilizers of tetrameric transthyretin: A prospective ligand efficiency-guided approach

Ellen Y. Cotrina ^a, Daniel Blasi ^b, Marta Vilà ^c, Antoni Planas ^c, Cele Abad-Zapatero ^d, Nuria B. Centeno ^e, Jordi Quintana ^{b,e}, Gemma Arsequell ^{a,*}

^a Unit of Glycoconjugate Chemistry, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Barcelona, Spain

^b Drug Discovery Platform, Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Barcelona, Spain

^d Center for Biomolecular Sciences, Chicago, IL, USA

^e Research Group on Biomedical Informatics, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Transthyretin
Iododiflunisal
TTR tetramer stabilizer
Inhibitors
Protein-ligand interactions
Ligand efficiency indices (LEI)
LEI-based approach
Drug discovery

ABSTRACT

In the past few years, attempts have been made to use decision criteria beyond Lipinski's guidelines (Rule of five) to guide drug discovery projects more effectively. Several variables and formulations have been proposed and investigated within the framework of multiparameter optimization methods to guide drug discovery. In this context, the combination of Ligand Efficiency Indices (LEI) has been predominantly used to map and monitor the drug discovery process in a retrospective fashion. Here we provide an example of the use of a novel application of the LEI methodology for prospective lead optimization by using the transthyretin (TTR) fibrillogenesis inhibitor iododiflunisal (IDIF) as example. Using this approach, a number of compounds with theoretical efficiencies higher than the reference compound IDIF were identified. From this group, ten compounds were selected, synthesized and biologically tested. Half of the compounds (**5**, **6**, **7**, **8** and **10**) showed potencies in terms of IC₅₀ inhibition of TTR aggregation equal or higher than the lead compound. These optimized compounds mapped within the region of more efficient candidates in the corresponding experimental nBEI-NSEI plot, matching their position in the theoretical optimization plane that was used for the prediction. Due to their upstream (North-Eastern) position in the progression lines of NPOL = 3 or 4 of the nBEI-NSEI plot, three of them (**5**, **6** and **8**) are more interesting candidates than iododiflunisal because they have been optimized in the three crucial LEI variables of potency, size and polarity at the same time. This is the first example of the effectiveness of using the combined LEIs within the decision process to validate the application of the LEI formulation for the prospective optimization of lead compounds.

1. Introduction

Transthyretin (TTR) is a human tetrameric protein produced in the liver hepatocytes, choroid plexus and retina.^{1,2} TTR is involved in the extracellular transport of thyroid hormones and vitamin A, through a complex with serum retinol-binding protein (RBP). The protein

functions as backup transporter for thyroxine (T4) in plasma, and as a main transporter in cerebrospinal fluid. Interestingly, TTR has a neuroprotective role against Alzheimer's disease (AD).^{3,4,5} Several mutations in the TTR sequence are the cause of a series of rare but serious amyloid diseases.⁶ TTR tetrameric stabilization has been defined as the basis for one of the possible therapeutic strategies for the TTR-related

Abbreviations: H-β-Ala-OMe.HCl, β-alanine methyl ester; B₂PiN₂, Bis(pinacolato)diboron or 4,4',4',5,5,5',5'-octamethyl-2,2'-bi-1,3,2-dioxaborolane; B(OMe)₃, Trimethyl borate; DCC, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide; IPy₂BF₄, bis(pyridine)iodonium tetrafluoroborate; NCS, N-chlorosuccimide; DIPEA, N,N-diisopropylethylamine; DMSO, dimethylsulfoxide; EtAcO, ethyl acetate; HOBT, 1-hydroxybenzotriazol; HRMS, high-resolution mass spectrometry; HPLC, high performance liquid chromatography; ¹H NMR, proton nuclear magnetic resonance; rt, room temperature; RT, retention time; TBAI, Tetrabutyl ammonium iodide; Pd(PPh₃)₄, Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0); ²BuONO, *tert*-butyl nitrite; (Pd₂(dba)₃), *Tris*(dibenzylideneacetone)dipalladium(0); XPhos, 2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl.

* Corresponding author at: Unit of Glycoconjugate Chemistry. Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Jordi Girona-18-26, E08034 Barcelona, Spain.

E-mail address: gemma.arsequell@iqac.csic.es (G. Arsequell).

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115794>

Received 13 August 2020; Received in revised form 23 September 2020; Accepted 24 September 2020

Available online 6 October 2020

0968-0896/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

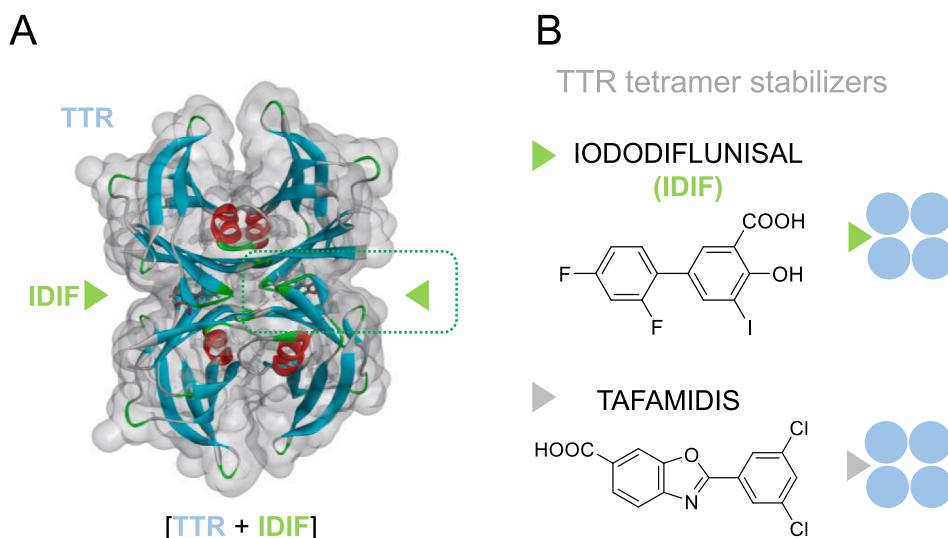


Fig. 1. a) Binary complex TTR with IDIF (PDB 1Y1D); B) Chemical structures of two TTR tetramer stabilizers, the small-molecule biphenyl compound Iododiflunisal (IDIF) and the benzoxazole drug Tafamidis, a registered drug for FAP.

amyloid diseases,^{7,8,9} which include familial amyloid polyneuropathy (FAP),^{10,11} familial amyloid cardiomyopathy (FAC),¹² senile systemic amyloidosis (SSA)¹³ and central nervous system selective amyloidoses (CNSA).¹⁴ Currently, the Protein data Bank¹⁵ contains more than 300 crystallographic structures of TTR, most of them in complex with small molecule ligands.^{16,17} Structurally diverse families of compounds are known to stabilize effectively TTR preventing its aggregation in vitro.^{18,19} The orphan drug Tafamidis (Vyndaqel®), a small-molecule obtained by a structure-base design,²⁰ was the first drug to obtain approval for FAP treatment.²¹ Another drug, Tolcapone, for the treatment of Parkinson's disease has been repositioned for FAP.²² Additional TTR tetramer stabilizers are the small-molecule AG10 now in phase 3 trial (NCT03860935)²³ and the palindromic molecule mds84 in preclinical development.²⁴ Alternative therapeutic strategies are gene-silencing therapies, as the antisense oligonucleotide inotersen²⁵ and the small interfering RNA (siRNA) patisiran.²⁶

One of our contributions to this ongoing drug discovery effort focused on TTR amyloid diseases has been the preclinical development of Iododiflunisal (IDIF, Figure 1).²⁷ Our lead compound is a iodinated

derivative of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) Diflunisal.²⁸ In vitro biochemical and biophysical evidences as well as *in vivo* animal studies support the interest on this lead.^{29,30,31}

Since the seminal work of Lipinski and collaborators³² there has been an extensive effort to optimize medicinal chemistry efficiency in order to reduce the high attrition rates of drug candidates.^{33–35} A line of research is directed towards defining and using alternative variables, more aligned with drug efficacy that the target affinity alone, which has been the dominant parameter in medicinal chemistry for decades. These so called efficiency indices or composite parameters are metric-based rules and visualization tools to help in guiding medicinal chemists in the design of new compounds with more favorable properties.^{36–39} An early example is Ligand Efficiency (LE)⁴⁰ suggested by Hopkins and collaborators⁴¹ that proposed binding energy (ΔG) per heavy atoms as a metric for lead selection. This concept has given rise to an increasing range of ligand efficiency indices (LEIs) that combine potency or affinity with molecular weight (MW), polar surface area (PSA) and other ligand properties (Table 1).⁴² Other indices such as ligand lipophilicity efficiency (LLE)^{43,44} reflect the increased risk of high lipophilicity of drug candidates. A review of the application of ligand efficiency metrics related to size and

Table 1
Ligand efficiency indices names and definitions.

Index Name ^a	Definition
BEI	$p(K_i)$, $p(K_D)$ or $p(IC_{50})/\text{MW(kDa)}$
SEI	$p(K_i)$, $p(K_D)$ or $p(IC_{50})/(\text{PSA}/100 \text{ \AA}^2)$
NSEI	$p(K_i)$, $p(K_D)$ or $p(IC_{50})$; $-\log_{10}K_i/\text{NPOL} = pK_i/\text{NPOL}$ ($\text{N} + \text{O}$)
NBEI	$p(K_i)$, $p(K_D)$, or $p(IC_{50})$; $-\log_{10}K_i/(\text{NHEAV}) = pK_i/(\text{NHEAV})$
nBEI	$-\log_{10}(K_i/\text{NHEAV})$; K_i , K_D , or IC_{50}
NHEAV	Number of heavy atoms (non-hydrogen in the compound)
NPOL	Number of polar atoms (N, O)
Efficiency plane ⁴⁶ : NSEI, nBEI (x,y).	Lines of slope NPOL and intersect $\log_{10} \text{NHEAV}$
Algebraic relationship ⁴⁶ between nBEI, NSEI	Lines: $n\text{BEI} = \text{NPOL} * \text{NSEI} + \log_{10} \text{NHEAV}$

^a Efficiency planes are defined as the combination of a polarity-based efficiency variable in the abscissa with a size-related variable in the ordinate. In these planes, polarity increases counter clockwise and in the NSEI, nBEI (x,y) planes, the slope of the lines increases by the number of polar atoms (NPOL = $\text{N} + \text{O}$) in the ligand. This quantity is equivalent to the number of hydrogen bond acceptors in the description of Lipinski's rule of 5. NPOL*NSEI stands for NPOL times NSEI; the slope of the lines is given by NPOL in the nBEI vs. NSEI plots.⁴⁶

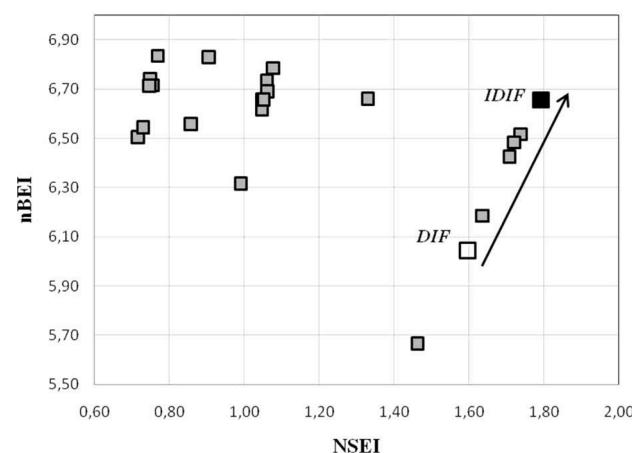


Fig. 2. Retrospective map of the Diflunisal/Iododiflunisal-based library: nBEI vs. NSEI plot shows that iododiflunisal (black square, IDIF), compared to diflunisal (white square, DIF), is the most effective TTR amyloid inhibitor for this chemical series, with optimized size and polarity parameters at the same time.

lipophilicity is provided in a previous publication by Hopkins et al.⁴⁵ A unified formulation of the LEIs, combining size and polarity in relation to a biological activity or affinity towards a biological target, has been presented in extensive detail.⁴⁶ In particular, it has been proposed that the combined variables NSEI-nBEI (x,y) (**Table 1**), can be used to map the chemico-biological space (CBS) to visualize trends across different targets and the progress of drug discovery and lead optimization projects.^{39, 47-51} The uniqueness of this pair of variables⁴⁵ is that they provide an appealing two-dimensional, vector like, representation of the drug discovery process giving a sense of ‘direction’ and ‘distance’ in a Cartesian plane,^{46,50} referred to as the ‘Efficiency plane’. The formulation is such that the ‘direction’ (slope of the lines) is given by the number of polar atoms in the molecule (NPOL = N + O, equivalent to number of hydrogen-bond donors in the Lipinski Ro5), and the ‘distance’ (from the origin) is related to the affinity or biological activity of the compounds.⁴⁶ This graphical representation is very useful in distinguishing the direction (slope of the lines) of the optimization process (given by the scaffold atoms: NPOL and NHEAV defining the lines), from the potency gains (distance from the origin) that can be achieved with that chemical scaffold.

These combined size-polarity efficiency indices (nBEI-NSEI) have been applied in an “efficiency plane” to a series of proprietary biphenyl compounds with TTR aggregation inhibitory properties, in a retrospective fashion, to monitor the optimization progress of our lead compound IDIF.⁵² In a further attempt to widen the applications of the LEIs formulation, an initial proof of the concept that the LEI metrics can be used in a prospective rather than a retrospective manner is presented in this work. Further work is encouraged to demonstrate conclusively the value of the LEIs formulation in lead optimization and preclinical candidate selection.

2. Results and discussion

Iododiflunisal optimization as a ground test. In an initial traditional optimization study of our lead compound IDIF, we examined the influence of small structural changes in the functional groups on the salicylic ring while leaving the 2,4-difluorophenyl core of the compound unchanged.²⁷ Using parallel synthesis methods, a biologically annotated

library of 46 analogs was obtained after testing their activity. Only three iodinated compounds of the library were more potent (in terms of IC₅₀ values) than iododiflunisal (IDIF) (SI Table S1). However, when these results were plotted in a nBEI (parameter relating the potency to the number of heavy atoms of the ligand) versus NSEI (parameter relating the potency to the number of polar atoms of the ligand) Cartesian plane (**Figure 2**), it emerged that the most efficient compound of the series i.e. the one with optimal size and polarity parameters at the same time, was still IDIF. As **Figure 2** shows, several analogs with increasing efficiencies are found between diflunisal and IDIF along the NPOL = 3 slope but none is superior to it.

Virtual iododiflunisal optimization guided by a LEI prospective approach. In search of more efficient IDIF analogs, a three steps workflow methodology has been developed.⁵² First, a IDIF scaffold-based search was effected on the MMsINC database⁵³ which allowed to extract 2300 virtual and commercial biphenyl compounds. Next, using an IDIF pharmacophore deduced from the crystallographic information of the complex TTR:IDIF,²⁹ this 2300 database was further filtered to a set of 1200 compounds that share the same IDIF interaction pattern with TTR. Lastly, these molecules were docked to a protein model from the IDIF:TTR X-ray crystal structure (PDB ID 1Y1D) and 80 of them were selected by their docking score value. Taking into account that the docking scores resulting from the docking calculations, using the MOE software package,⁵⁴ are an estimate of the binding free energy (herein ΔG*), it is possible to establish a relationship between K_i* (pseudo K_i) and ΔG*, through the equation: ΔG* = -RTlnK_i*. Following this approximation, K_i* values were estimated relating the docking score obtained from each best pose of the 80 selected molecules, which share the same biphenyl scaffold, and have a high similarity to IDIF and among themselves, to the free binding energy. In order to normalize these values, the experimental TTR binding K_i for IDIF obtained through an isothermal calorimetry experiment (ITC) was used (see Table S2 of S.I.).³¹

After this step, the results were plotted in a nBEI-NSEI plane.⁵² The nBEI and NSEI parameters were calculated based on the estimation of their K_i*, with reference to the experimental K_i for IDIF. **Figure 3** shows that compounds with efficiencies higher than IDIF can be found on the slope lines with NPOL = 3, 4 and 5.

To provide experimental validation of the virtual predictions on improved efficiency described above, a subset of compounds located at the region with theoretically more efficient candidates were selected, synthesized and subsequently tested for biological activity, and their experimental and theoretical efficiencies compared.

Synthesis of the selected compounds. Using criteria like minimal change on the structure, small changes in the number of polar atoms (NPOL) and ready synthesis, ten of the theoretically more efficient compounds were selected as test compounds. The structures of this subset of compounds (**1–10**) are depicted in **Figure 4**. Also, some of the corresponding non-halogenated derivatives of compounds **1–7**, in the position 5 of the biphenyl moiety (**1A, 2A, 4A, 6A**, and **7A**), were included in the synthesis plan to compare the effects of the presence or absence of this particular halogen on the biological activity and hence the experimental efficiency of these molecules.

The general synthesis scheme of the compound series is outlined in **Scheme 1**. Biphenyl analogues (5-aryl salicylic derivatives) (**1A, 2A, 4A** and **6A**) were prepared by Suzuki cross-coupling reactions (SI, **Figure S5**).⁵⁵

The iodinated biphenyl derivatives (**1, 2, 4, 6, 7**) were prepared from their parent compounds (**1A, 2A, 4A** and **6A**) by electrophilic aromatic iodination reaction using the iodinating reagent IPy₂BF₄ (Barluenga’s reagent) in CH₂Cl₂ at room temperature.⁵⁶ Brominated derivatives (**3** and **5**) were prepared by electrophilic bromination using a mixture of potassium bromide and *N*-chlorosuccinimide (NCS) at room temperature. The synthesis of the polyhalogenated compound **7A** was initially designed as the previous analogs, involving a Suzuki coupling reaction between 5-iodosalicylic acid (**11**) and a polyhalogenated boronic acid.

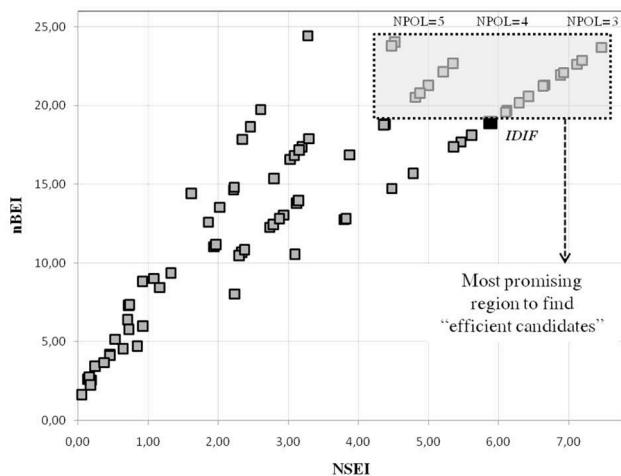


Fig. 3. nBEI vs. NSEI plot of the 80 selected docked compounds. Region highlighted shows compounds with increased efficiency (the reference compound IDIF is indicated by a black square). The direction(s) for the optimization path(s) for the different scaffolds containing NPOL values of 3, 4, 5 are indicated. The compounds with the largest NSEI, nBEI values in the North-East quadrant have combined optimum values of the NSEI, nBEI and the estimated affinity constant K_i*. Compounds with lower number NPOL atoms (NPOL < 5 following Lipinski guidelines) have higher probability of favorable permeability.

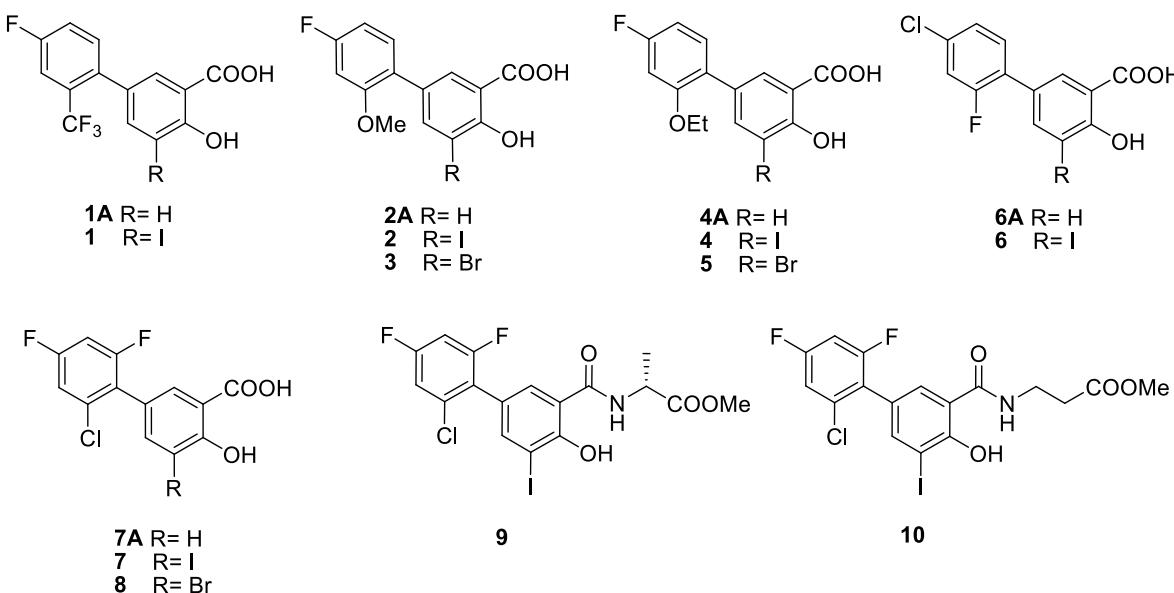
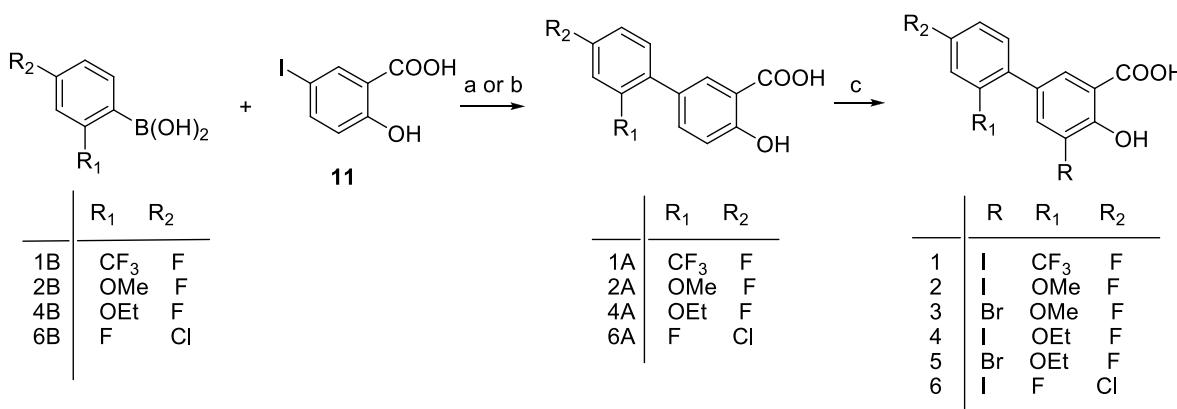
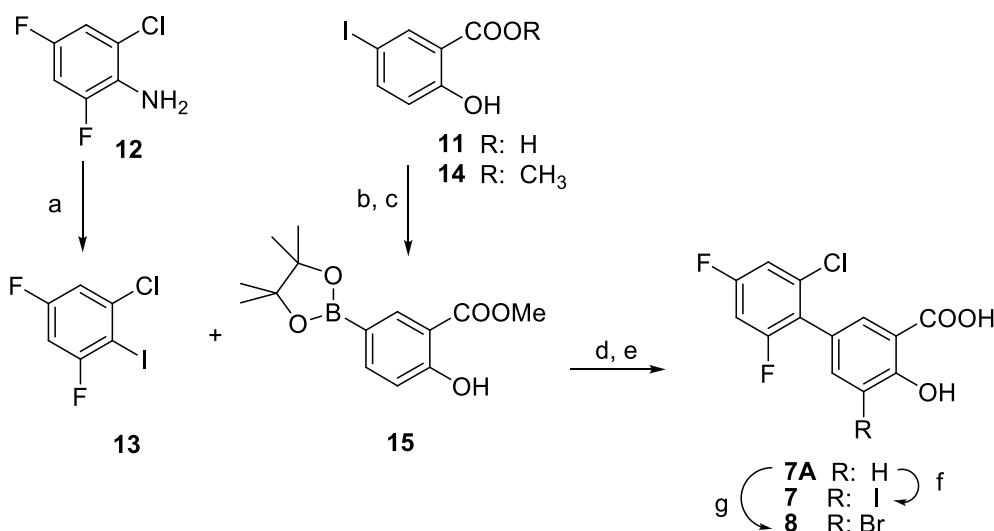


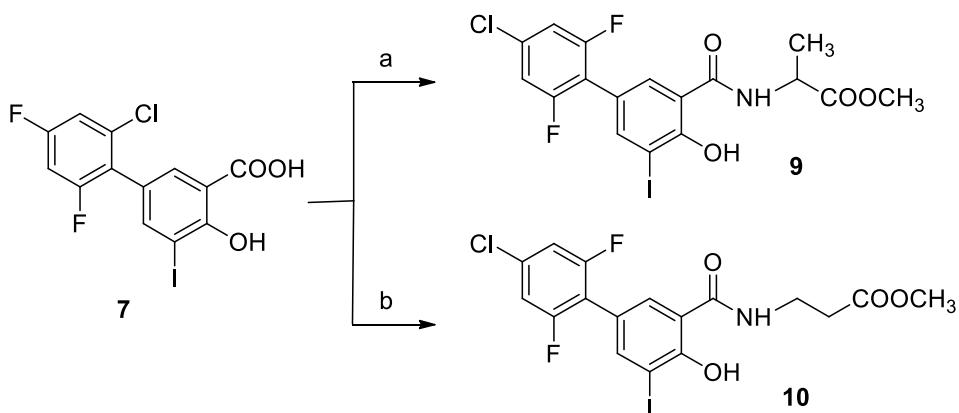
Fig. 4. Iododiflunisal analogs selected as theoretically more efficient than Iododiflunisal in terms of ligand efficiency parameters. (Some non-halogenated derivatives in the position 3 of the salicylic moiety are also shown).



Scheme 1. Synthesis of Diflunisal and IDIF analogs. ^aReagents and conditions: Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction (Condition A: in water): a) aryl boronic acid (1 equiv.); 5-iodosalicylic acid (11) (1 equiv.), Pd(OAc)₂ (1 mol%), Na₂CO₃ (3 equiv.), H₂O (degassed water), rt, 3 h.; b) Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction aryl boronic acid (1 equiv.); 5-iodosalicylic acid (11) (1 equiv.), [Pd(PPh₃)₄] (1 mol%), Na₂CO₃ (3 equiv.), dioxane/water (4:1), 80 °C; c) for iodinated derivatives: IPy₂BF₄ (Barluenga's reagent) (1.5 equiv.), dichloromethane, rt, 1 h; or d) for brominated derivatives: NCS (1 equiv.), KBr (1 equiv.), ethanol.



Scheme 2. Synthesis of polyhalogenated Diflunisal analogs. ^aReagents and conditions:
a) Tetrabutylammonium iodide (TBAI) (1.1 equiv.), CuI (1.1 equiv.), *tert*-butyl nitrite (*t*BuONO) (3 equiv.), acetone, 80 °C; b) 5-iodo salicylic acid (11), TMSCl (4 equiv.), MeOH, 110 °C, 24 h; c) methyl 5-iodosalicylate (14) (1 equiv.), bis(pinacolato)diboron (B₂Pin₂) (2 equiv.), Pd₂(dba)₃ (2 mol%), XPhos (4 mol%), KOAc (3 equiv.), dioxane, 110 °C; d) Suzuki-Miyaura coupling: boronate 15 (1 equiv.), iodinated compound 13 (1 equiv.), Na₂CO₃ (3 equiv.), Pd(PPh₃)₄ (5 mol%), dioxane, 110 °C; e) LiOH (4 equiv.), H₂O/dioxane, 80 °C, 30 min.; f) IPy₂BF₄ (Barluenga's reagent) (1.5 equiv.), CH₂Cl₂, rt, 1 h; g) NCS (1 equiv.), KBr (1 equiv.), ethanol.



Scheme 3. Synthesis of iododiflunisal amino acid conjugated analogs. ^aReagents and conditions: a) H-Ala-OMe.HCl (1 equiv.), DCC, HOBT, DIPEA, dichloromethane, rt, 50%; b) β-Ala-OMe.HCl (1 equiv.), DCC, HOBT, DIPEA, dichloromethane, rt, 77%.

Table 2

Inhibition of acid-induced fibrillogenesis by compounds under study: IC₅₀ values measured by the kinetic turbidimetric assay^a and the corresponding nBEI-NSEI indices values.^b

Compound	X	IC ₅₀ (μM)	RA (%)	nBEI	NSEI
IDIF	I	4.2 ± 0.2	94.0 ± 0.5	6.66	1.79
1A	H	23.1 ± 4.3	60.4 ± 0.3	5.96	1.55
1	I	7.2 ± 0.1	87.0 ± 1.6	6.49	1.71
2A	H	6.0 ± 0.2	87.8 ± 0.9	6.50	1.31
2	I	5.3 ± 0.3	90.3 ± 1.3	6.58	1.32
3	Br	5.2 ± 0.5	95.5 ± 1.6	6.59	1.32
4A	H	6.1 ± 0.5	88.8 ± 0.3	6.52	1.30
4	I	5.1 ± 1.1	91.1 ± 0.7	6.61	1.32
5	Br	4.3 ± 0.4	89.9 ± 0.8	6.69	1.34
6A	H	21.7 ± 1.6	77.3 ± 4.9	5.92	1.55
6	I	3.9 ± 1.7	88.5 ± 1.4	6.69	1.80
7A	H	7.2 ± 0.5	89.1 ± 1.1	6.42	1.71
7	I	4.6 ± 0.2	91.0 ± 0.4	6.64	1.78
8	Br	3.6 ± 0.2	89.0 ± 2.2	6.74	1.81
9	I	6.0 ± 0.5	89.0 ± 0.6	6.64	1.04
10	I	3.7 ± 0.3	90.0 ± 0.1	6.85	1.09

^a Kinetic turbidity assay: 0.4 mg/mL TTR-Y78F, 0–40 μM inhibitor, pH 4.2, 37 °C.

^b nBEI and NSEI values have been calculated by using the definitions listed in Table 1 using the pIC₅₀ value for the biological activity.

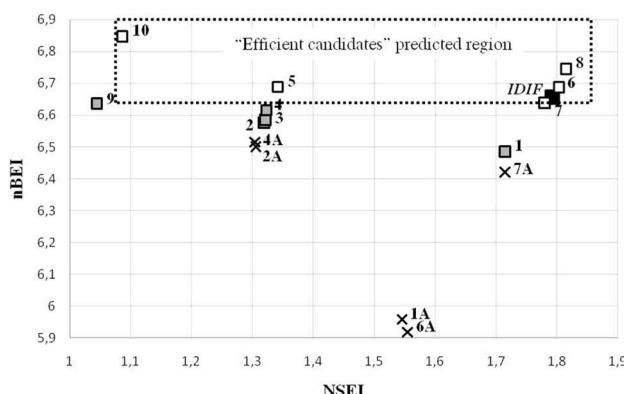


Fig. 5. nBEI vs. NSEI plot based on the experimental data (IC₅₀ values) obtained from the kinetic turbidimetry assay. Black square corresponds to the reference compound IDIF; crosses are the non-halogenated derivatives for the corresponding compounds as indicated in Figure 4; compounds with a similar or higher efficiency compared with IDIF (in good agreement with the predictions performed in this study) are highlighted in the “Efficient candidates” region as white squares; grey squares are the compounds less efficient than IDIF (in which the prediction fails).

Polyhalogenated boronic acids are especially challenging coupling partners for Suzuki-Miyaura reactions because they quickly deboronate under basic conditions.^{57,58}

Due to the inherent difficulties of these polyhalogenated boronic acids, an alternative pathway was designed based on a pinacol boronate ester (Scheme 2). Thus, a new pinacol boronate ester (15) was prepared. The Suzuki coupling reaction between the iodocompound 13 and the newly prepared boronate ester 15 was done in dioxane/water (9:1) at 80 °C catalyzed by tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) [Pd (PPh₃)₄] (5 mol%), in the presence of Na₂CO₃ as base providing the desired biphenyl compound 7A (Scheme 2).

Amino acid conjugates 9 and 10 were prepared through a similar method as we have reported previously,²⁷ starting from biphenyl carboxylic acid derivative 7, by a coupling reaction either with the methyl ester of L-alanine or the one from β-alanine, respectively (Scheme 3). In both reactions N,N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCC) was used as the coupling reagent used in the presence of 1-hydroxybenzotriazol (HOBT) for the amide bond formation.⁵⁹

Experimental validation of the efficiency. This set of 15 synthesized compounds and the reference IDIF, were tested in a turbidimetric in vitro assay to evaluate their potential activity as TTR fibril inhibitors.⁶⁰ The protocol uses a highly amyloidogenic TTR variant (Y78F) which enables kinetic monitoring of protein aggregation in short time under acid-induced fibrillogenesis conditions. One of the parameters that can be assessed through this method is the IC₅₀ value, which is the concentration of inhibitor at which the initial rate of fibril formation is half than in the absence of inhibitor. A second parameter is the percentage of reduction in fibril formation rate (RA%) at high concentration of test compound relative to the rate obtained in the absence of compound. RA values of 100% indicate that the inhibitor can fully prevent the formation of fibrils. Experimental IC₅₀ values are reported in Table 2, showing that compounds 5, 6, 7, 8 and 10 have a similar or even higher fibrillogenesis inhibition activity compared to iododiflunisal.

Evaluation of the LEI predictive power. To evaluate the accuracy of the LEI predictions and the extend of the optimization of iododiflunisal in terms of efficiency gain, the experimental potencies of the compounds expressed as IC₅₀ values have been used to calculate the corresponding experimental nBEI and NSEI values for each molecule (Table 2). The efficiency indices (NSEI, nBEI) for a biological assay can be calculated similarly using the IC₅₀ listed in Table 2.⁴⁶ Also, to visualize the predictive power of this methodology, the predictive map shown in Figure 3, was redrawn as the experimental map presented in Figure 5. A rough 50% matching rate was found between predicted and experimental efficiencies of compounds with five clear failures in the case of compounds 1, 2, 3, 4 and 9. However, only product 1 is rather far apart from the region selected in the prediction step. On the other hand, although product 7 is at the border of this best candidates region, an

interesting fact is that no mismatches between the efficiency maps have occurred in case of compounds **5**, **6**, **8** and **10** which, in turn, are most potent than iododiflunisal.

Appearing above IDIF in the nBEI-NSEI map and on top of the progression line of NPOL = 3, product **8** is the most efficient candidate of this series. The potency of this compound ($IC_{50} = 3.6 \mu M$), compares with the most potent TTR amyloidogenic inhibitor known up to date, triiodophenol⁶¹ ($IC_{50} = 3.2 \mu M$), and provides an approximate idea of the level of optimization achieved. This optimization capacity of the LEIs is reinforced when the comparison between the biological activities of **8** and Tafamidis, the drug marketed in Europe for the treatment of FAP, shows that product **8** has an enhanced potency and efficiency. Thus, under the kinetic turbidity assay conditions, Tafamidis presents an $IC_{50} = 6.59 \mu M$, and values of 6.48 and 1.30 for nBEI and NSEI respectively. Besides **8**, two more compounds, **6** ($3.9 \mu M$, NPOL = 3) and **5** ($4.3 \mu M$, NPOL = 4) have been identified and characterized as better and more efficient candidates than IDIF. The main feature of this triad (**5**, **6** and **8**) is that their three crucial LEI variables (potency, size and polarity) have been optimized at the same time.

Finally, it is worth noting that the non-halogenated derivatives at the position 5, that were also included among the test compounds, show lower potencies than their halogenated counterparts, and are found outside the preferred candidate efficiency region. A particular case is **6A** which shows a potency of $21.7 \mu M$ and a very poor efficiency behavior, far from its iodinated counterpart **6** ($3.9 \mu M$); this reinforces our hypothesis on the important role that halogen atoms play on TTR tetramer stabilization and prevention of fibril formation.

3. Conclusions

Here we presented the first experimental evidence of a novel application of the LEI formulation for prospective lead optimization by using the iododiflunisal chemico-biological space as example. The results also suggest that the LEI methodology, both retrospective and prospective, may be easily combined and integrated with computational workflows such as pharmacophore modeling and docking experiments. This prospective LEI approach has allowed us to identify a triad of compounds with optimized properties (potency, size and polarity) with respect to iododiflunisal. Significantly, compound **8** that maps in the extreme North-East corner of the efficiency plane, has the best combination of IC_{50} and physico-chemical properties (size, polarity) as 'combined' in the corresponding NSEI, nBEI values (Table 2). Compound **8** compares very favorably with triiodophenol ($3.2 \mu M$), one of the most potent TTR fibrillogenesis inhibitor known up to date, which may be of interest for future drug developments in the field of TTR-related amyloid diseases treatment. In contrast, compound **10** with better IC_{50} than IDIF and slightly larger values of efficiency per size ($IC_{50} = 3.7$ vs. 4.2 ; nBEI = 6.85 vs. 6.66, respectively) exhibits a significantly lower value of the polarity efficiency NSEI (NSEI = 1.09 vs. 1.79) (Table 2) making it significantly more polar and less suitable for further development.

3.1. Experimental section

3.1.1. Synthesis and characterization of compounds.

All diflunisal and IDIF analogues were prepared following the Schemes 1, 2 and 3. The synthesis and characterization are described in the SI.

Protein and inhibitors. The human TTR variant Y78F protein was recombinant expressed in *E. coli* and purified as already reported.⁶⁰ All assays were performed in buffers containing a final 5% (v/v) DMSO concentration for solubilization of the ligands.

Kinetic Turbidimetric Assay. Inhibition of fibrillogenesis was determined by the kinetic turbidimetric assay previously reported.⁶⁰ In seven different wells of a 96-well microplate, $20 \mu L$ of a 4 mg/mL TTR variant Y78F solution in 20 mM potassium phosphate buffer, 100 mM KCl, and 1 mM EDTA at pH 7.6, was mixed with an $80 \mu L$ solution of

inhibitor prepared by mixing different volumes of a stock solution of the compound in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1) to give a range of final compound concentrations of 0 – $40 \mu M$. DMSO content was adjusted to a final 5% (v/v), where all ligands tested are soluble. After 30 min incubation at 37°C with 15 s shaking every minute, $100 \mu L$ of 400 mM KAcO, 100 mM KCl, and 1 mM EDTA buffer at pH 4.2 were added to each well. The final mixture, containing 0.4 mg/mL TTR, 0 to $40 \mu M$ ligand, and 5% DMSO, was incubated at 37°C with 15 s shaking every minute. Absorbance at 340 nm was monitored for 1.5 h at 1 min intervals. A control solution of the ligands at the highest concentration ($40 \mu M$) following the same procedure in the absence of TTR was also monitored, showing that the ligands remained soluble and no turbidity due to colloidal aggregation was observed. Initial rates of protein aggregation (v_0) were obtained from the linear plot absorbance versus time. The dependence of v_0 on inhibitor concentration is defined as:

$$v_0 = A + B \cdot e^{-C[I]}$$

where v_0 is the initial rate of fibril formation (in absorbance units per hour, $\text{AU} \cdot \text{h}^{-1}$) and [I] the concentration of the inhibitor (μM). From the adjustable parameters, the IC_{50} (inhibitor concentration at which the initial rate of protein aggregation is half than that in absence of inhibitor) and RA(%) (percentage reduction of amyloidosis at high inhibitor concentration) were calculated (See SI, Fig. S3)

Crystallographic Complex. 3D atomic coordinates of the TTR-iododiflunisal complex (PDB ID: 1Y1D)²⁹ used in the present work were obtained from the structural information available in the Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>). Before the ligand-protein interactions mapping, a previous processing of the pdb file was needed. The asymmetric crystal unit of TTR complexes is formed by a dimer, two ligand molecules (one for each binding site) and water molecules; taking this into account, coordinates for the tetrameric form of TTR were obtained by applying the crystallographic symmetry transformations described in the pdb file. For residues with multiple conformations, we considered the one with the highest occupation factor.

Hydrogen Atoms Refinement. Added hydrogen atoms were energy-minimized by using the Protonate 3D package implemented in MOE 2013.08.⁵⁴ Ligand partial charges were obtained by computing the electrostatic-potentials around the optimized structures using MOE 2013.08. Minimization was carried out using a distance dependent dielectric constant and a cutoff distance of 10 \AA for Van der Waals interactions. Hydrogen atoms refinement was accomplished using 1000 cycles of steepest descents followed by conjugate gradient until the maximum gradient of the energy was smaller than $0.05 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$.

Data Set Selected. A set of 2300 biphenyllic compounds was extracted from MMsINC Database.⁵³ LigX package (MOE 2013.08) was used for the hydrogen addition and ligand preparation.

Docking Experiments. MOE 2013.08 package was used to perform the docking studies of the data set selected with the crystallographic TTR complex. Alpha Triangle was used as placement method, Alpha HB as score function and MMF94 as forcefield in the refinement step of the docking solutions.

Author contributions

Overall research design and writing of the manuscript: G.A., C.A.Z., A.P., N.B.C., J.Q., D.B. Computational studies: D.B. Chemistry experiments: G.A. Biological experiments: E.Y.C., M.V.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

We thank Dr. Lluís Bosch for help on the synthesis work. Funding

Sources. This work was supported by a Grant 080530/31/32 from the Fundació Marató de TV3, Barcelona, Spain (to G.A., A.P., and J.Q.) and a Grant from Plan Nacional, Ministerio de Economía y Competitividad (Ref: CTQ2010-20517-C02-02) to G.A.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115794>.

References

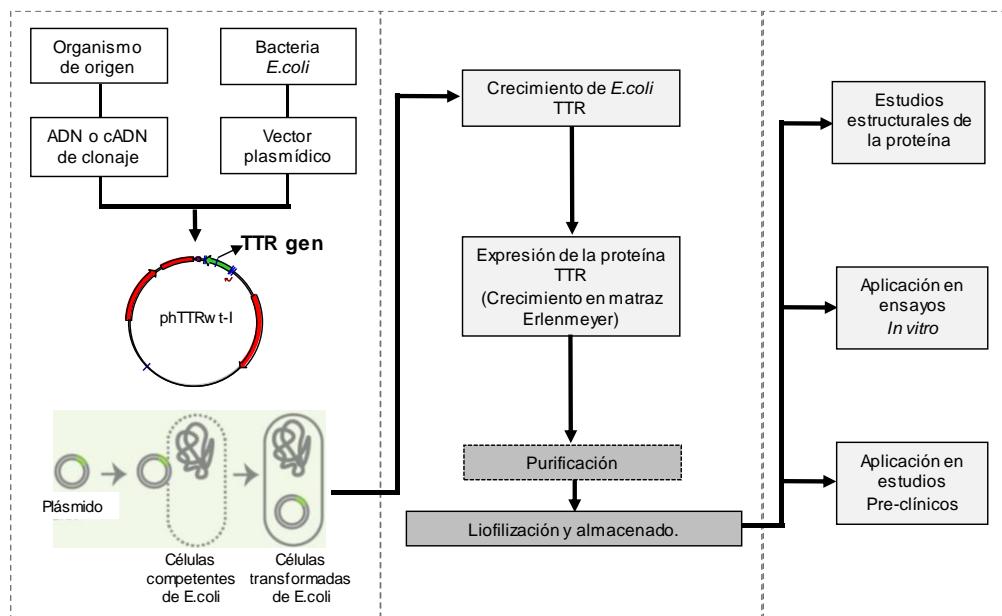
- 1 Vieira M, Saraiva MJ. Transthyretin: a multifaceted protein. *Biomol Concepts*. 2014;5: 45–54.
- 2 Hamilton JA, Benson MD. Transthyretin: a review from a structural perspective. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:1491–1521.
- 3 Gião T, Saavedra J, Cotrina E, et al. Undiscovered roles for transthyretin: from a transporter protein to a new therapeutic target for alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21:2075. <https://doi.org/10.3390/ijms21062075>.
- 4 Alemi M, Silva SC, Santana I, Cardoso I. Transthyretin stability is critical in assisting beta amyloid clearance – Relevance of transthyretin stabilization in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*. 2017;23:605–619.
- 5 Cotrina EY, Gimeno A, Llop J, et al. Calorimetric studies of binary and ternary molecular interactions between transthyretin, A β peptides and small-molecule chaperones towards an alternative strategy for Alzheimer's Disease drug discovery. *J Med Chem*. 2020;63:3205–3214.
- 6 Rowczenco DM, Noor I, Gillmore JD, Lachmann HJ, Hawkins PN, Obici L, Westermark P, Grateau G, Wechalekar AD. Online registry for mutations in hereditary amyloidosis including nomenclature recommendations. *Hum Mutat*. 2014;11. <https://doi.org/10.1002/humu.2261>, 35-E2403-E2412.
- 7 Nevone A, Merlini G, Nuvolone M. Treating protein misfolding diseases: therapeutic successes against systemic amyloidoses. *Front Pharmacol*. 2020;11:1024. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01024>.
- 8 Almeida MR, Gales L, Damas AM, Cardoso I, Saraiva MJ. Small transthyretin (TTR) ligands as possible therapeutic agents in TTR amyloidoses. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005;4:587–596.
- 9 Connelly S, Choi S, Johnson SM, Kelly JW, Wilson IA. Structure-Based Design of Kinetic Stabilizers That Ameliorate the Transthyretin Amyloidoses. *Curr Opin Struct Biol*. 2010;20:54–62.
- 10 Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy. *Brain*. 1952;75:408–427.
- 11 Saraiva MJ, Magalhaes J, Ferreira N, Almeida MR. Transthyretin deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. *Curr Med Chem*. 2012;19:2304–2311.
- 12 Griffin JM, Maurer MS. Transthyretin cardiac amyloidosis: A treatable form of heart failure with a preserved ejection fraction. *Trends Cardiovasc Med*. 2019;S1050–1738(19):30166–30175.
- 13 Manso MC, Marques DP, Rocha SL, Rodeia SC, Domingos R. Senile systemic amyloidosis: an underdiagnosed disease. *Eur J Case Rep Intern Med*. 2017;4, 000725. https://doi.org/10.12890/2017_000725.
- 14 Sekijima Y, Hammarstrom P, Matsumura M, et al. Energetic characteristics of the new transthyretin variant A25T may explain its atypical central nervous system pathology. *Lab Invest*. 2003;83:409–417.
- 15 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:235–242.
- 16 Palaninathan SK. Nearly 200 X-ray crystal structures of transthyretin: what do they tell us about this protein and the design of drugs for TTR amyloidoses? *Curr Med Chem*. 2012;19:2324–2342.
- 17 Nencetti S, Orlandini E. TTR fibril formation inhibitors: is there a SAR? *Curr Med Chem*. 2012;19:2356–2379.
- 18 Guo X, Liu Z, Zheng Y, et al. Review on the structures and activities of transthyretin amyloidogenesis inhibitors. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:1057–1081.
- 19 Ciccone L, Tonali N, Nencetti S, Orlandini E. Natural compounds as inhibitors of transthyretin amyloidosis and neuroprotective agents: analysis of structural data for future drug design. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020;35:1145–1162.
- 20 Bulawa CE, Connolly S, Devit M, et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 2012;109:9629–9634.
- 21 Coelho T, Maia LF, Martins da Silva A, et al. Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy: a randomized, controlled trial. *Neurology*. 2012;79: 785–792.
- 22 Gámez J, Salvadó M, Reig N, et al. Transthyretin stabilization activity of the catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone (SOM0226) in hereditary ATTR amyloidosis patients and asymptomatic carriers: proof-of-concept study. *Amyloid*. 2019;26:74–84.
- 23 Fox JC, Hellawell JL, Rao S, et al. First-in-human study of AG10, a novel, oral, specific, selective, and potent transthyretin stabilizer for the treatment of transthyretin amyloidosis: a phase 1 safety, tolerability, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study in healthy adult volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2020;9:115–129.
- 24 Corazza A, Verona G, Waudby CA, et al. Binding of monovalent and bivalent ligands by transthyretin causes different short- and long-distance conformational changes. *J Med Chem*. 2019;62:8274–8283.
- 25 Benson MD, Waddington-Cruz M, Berk JL, et al. Inotersen treatment for patients with hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018;379:22–31.
- 26 Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018;379:11–21.
- 27 Mairal T, Nieto J, Pinto M, et al. Iodine atoms: a new molecular feature for the design of potent transthyretin fibrillogenesis inhibitors. *PLoS ONE*. 2009;4, e4124.
- 28 Berk JL, Suhr OB, Obici L, et al. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2013;310:2658–2667.
- 29 Gales L, Macedo-Ribeiro S, Arsequell G, Valencia G, Saraiva MJ, Damas AM. Human transthyretin in complex with iododiflunisal: structural features associated with a potent amyloid inhibitor. *Biochem J*. 2005;388:615–621.
- 30 Ribeiro C, Oliveira SM, Guido LF, et al. Transthyretin stabilization by iododiflunisal promotes amyloid- β peptide clearance, decreases its deposition, and ameliorates cognitive deficits in an alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis*. 2014;39: 357–370.
- 31 Cotrina EY, Pinto M, Bosch L, et al. Modulation of the fibrillogenesis inhibition properties of two transthyretin ligands by halogenation. *J Med Chem*. 2013;56: 9110–9121.
- 32 Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;46:3–26.
- 33 Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:711–715.
- 34 Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov*. 2015; 14:475–486. <https://doi.org/10.1038/nrd4609>.
- 35 Hinkson IV, Madej B, Stahlberg EA. Accelerating Therapeutics for Opportunities in Medicine: A Paradigm Shift in Drug Discovery. *Front Pharmacol*. 2020;11:770. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00770>. Published 2020 Jun 30.
- 36 Segall M. Can we really do computer-aided drug design? *J Comput Aided Mol Des*. 2011;121–124.
- 37 Segall M. Advances in multiparameter optimization methods for de novo drug design. *Expert Opin Drug Discov*. 2014;9:803–817.
- 38 Yusof I, Shah F, Hashimoto T, Segall MD, Greene N. Finding the rules for successful drug optimisation. *Drug Discov Today*. 2014;19:680–687.
- 39 Abad-Zapatero C, Champness EJ, Segall MD. Alternative variables in drug discovery: promises and challenges. *Future Med Chem*. 2014;6:577–593.
- 40 Kuntz ID, Chen K, Sharp KA, Kollman PA. The Maximal Affinity of Ligands. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 1999;96:9997–10002.
- 41 Hopkins AL, Groom CR, Alex A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov Today*. 2004;9:430–431.
- 42 Abad-Zapatero C. Ligand efficiency indices for effective drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2007;2:469–488.
- 43 García-Sosa AT, Hetényi C, Maran U. Drug efficiency indices for improvement of molecular docking scoring functions. *J Comput Chem*. 2009;31:174–184.
- 44 Shultz MD. Setting expectations in molecular optimizations: strengths and limitations of commonly used composite parameters. *Biorg Med Chem Lett*. 2013; 23:5980–5991.
- 45 Hopkins AL, Keserü GM, Leeson PD, Rees DC, Reynolds CH. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:105–121.
- 46 Abad-Zapatero C. *Ligand efficiency indices for drug discovery: towards an atlas-guided paradigm*. Oxford, UK: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2013.
- 47 de Souza Neto LR, Moreira-Filho JT, Neves BJ, et al. Jr. *In silico* strategies to support fragment-to-lead optimization in drug discovery. *Front Chem*. 2020;8:93. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00093>.
- 48 Abad-Zapatero C, Metz JT. Ligand efficiency indices as guideposts for drug discovery. *Drug Discov Today*. 2005;10:464–469.
- 49 Abad-Zapatero C, Blasi D. Ligand efficiency indices (LEIs): more than a simple efficiency yardstick. *Mol Inform*. 2011;30:122–132.
- 50 Christmann-Franck S, Cravo D, Abad-Zapatero C. Time-trajectories in efficiency maps as effective guides for drug discovery efforts. *Mol Inform*. 2011;30:144.
- 51 Sugaya N. Ligand efficiency-based support vector regression models for predicting bioactivities of ligands to drug target proteins. *J Chem Inf Model*. 2014;54: 2751–2763.
- 52 Blasi D, Arsequell G, Valencia G, et al. Retrospective mapping of SAR data for TTR protein in chemico-biological space using ligand efficiency indices as a guide to drug discovery strategies. *Mol Inform*. 2011;30:161–167.
- 53 Masciocchi J, Frau G, Fanton M, et al. MMsINC: a large-scale chemoinformatics database. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:284–290.
- 54 Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2013.
- 55 Suzuki A. Cross-coupling reactions of organoboranes: an easy way to construct C-C bonds (nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50:6722–6737.
- 56 Barluenga J. Recent advances in selective organic synthesis mediated by transition metal complexes. *Pure Appl Chem*. 1999;71:1385–1391.
- 57 Kinzel T, Zhang Y, Buchwald SL. A new palladium precatalyst allows for the fast Suzuki–Miyaura coupling reactions of unstable polyfluorophenyl and 2-heteroaryl boronic acids. *J Am Chem Soc*. 2010;132:14073–14075.
- 58 Robbins DW, Hartwig JF. A C-H borylation approach to Suzuki-Miyaura coupling of typically unstable 2-heteroaryl and polyfluorophenyl boronates. *Org Lett*. 2012;14: 4266–4269.

- 59 Sheehan JC, Hess GP. A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 1955;77:1067–1068.
- 60 Dolado I, Nieto J, Saraiva MJM, Arsequell G, Valencia G, Planas A. Kinetic assay for high-throughput screening of in vitro transthyretin amyloid fibrillogenesis inhibitors. *J. Comb. Chem.* 2005;7:246–252.
- 61 Miroy GJ, Lai Z, Lashuel HA, Peterson SA, Strang C, Kelly JW. Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:15051–15056.

Capítulo 4. Discusión

Artículo 1: *Preparative scale production of recombinant human transthyretin for biophysical studies of protein-ligand and protein-protein interactions.*

La producción de proteínas recombinantes juega un papel relevante en el proceso de descubrimiento de fármacos en diferentes etapas del proceso (Overton, 2014). En la etapa inicial de desarrollo de fármacos se necesitan disponer de pequeñas cantidades de proteína recombinante (a escala de mg) para realizar estudios estructurales de proteínas diana y para estudios de cribado de diferentes moléculas con la proteína diana. En otras etapas posteriores del proceso de desarrollo de fármacos, como por ejemplo en ensayos preclínicos y clínicos, será necesaria la producción en cantidades mayores y en determinadas condiciones.



Esquema 3. Producción de la proteína recombinante TTR y su aplicación en la investigación.

En esta tesis doctoral se ha optimizado el proceso de producción de la TTR para poder realizar estudios estructurales y ensayos de cribado de moléculas pequeñas. Actualmente, la TTR se puede encontrar disponible en diferentes casas comerciales con un precio aproximado de 300 € cada miligramo, motivo que justifica su producción en el laboratorio. La puesta a punto de un ensayo de cribado de moléculas supone un gran número de experimentos que validen su robustez y eficacia, y por lo tanto es necesario disponer de grandes cantidades de proteína.

La producción de TTR a escala de laboratorio ha sido realizada anteriormente por diferentes grupos de investigación (Tabla 2). Uno de los primeros trabajos fue el de Furuya *et al.* que llevó a cabo la producción de la TTR y de diferentes mutantes asociadas a la FAP. Estos investigadores utilizaron un plásmido pINTR-30 para la expresión de la proteína recombinante TTR, cuya secuencia expresaba 7 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal (Figura 29A). Tras su caracterización comprobaron que estos aminoácidos extra no afectaban la función de la proteína. Sin embargo, a pesar de optimizar el vector de expresión, el rendimiento de la proteína conseguido era tan solo de 5 mg/L (Furuya *et al.*, 1989, 1991).

Nº	Plásmido de expresión TTR	Promotor de expresión	Escala de producción (matraz: L)	Secuencia de la Proteína	Rdto. (mg/L)	Referencia
1	pINTR-30	T7	0,1 L	TTR + 7AA	5	Furuya 1989, 1991
2	pMMHa	T7	1 L	L55P	60	Lashuel 1999
3	pQE30-TTR	T7	0,1 L	HisTag TTR	130	Matsubara 2003
4	rTTR-pQE30	T7	0,5 L	TTR (secuencia exacta)	80 - 100	Kingsbury 2007
5	phTTRwt-I	T7	1 L	N-Met-TTR	150 - 200	Dolado 2005

Tabla 2. Descripción de los principales métodos de producción de la proteína humana recombinante transtiretina anteriores a esta tesis.

Con la finalidad de lograr un producto homogéneo y lo más parecido a la secuencia de la proteína humana se desarrollaron nuevos sistemas de expresión de TTR. Una aportación importante fue la descrita por el Matsubara *et al* (Matsubara, Mizuguchi, & Kawano, 2003). Este equipo diseñó un plásmido que expresaba la TTR con una secuencia extra de 6 histidinas (cola de Histidinas, His-Tag) para facilitar su aislamiento en un solo paso en la etapa de purificación, mediante cromatografía de afinidad por ion metálico (IMAC: *ion metal affinity chromatography*). Este procedimiento mejoró el rendimiento de producción notablemente respecto a los protocolos previamente descritos, llegando a obtener unos 130 mg/L de proteína y tras su caracterización determinaron que la cola de histidinas no afectaba las propiedades de TTR.

En 2007, el grupo de Connors de la Universidad de Boston (Tabla 2, nº 4) optimizó el anterior sistema (Figura 29B), que consistía en introducir una modificación en la cola de histidinas, para que facilitase su eliminación de manera eficiente por tratamiento con la enzima dipeptidil aminopeptidasa I (DAPase I). De este modo se obtuvo la proteína recombinante TTR, con la secuencia exacta de la proteína humana. El rendimiento de producción fue de entre 80 y 100 mg/L (Kingsbury, Klimtchuk, Théberge, Costello, & Connors, 2007; Matsubara et al., 2003).

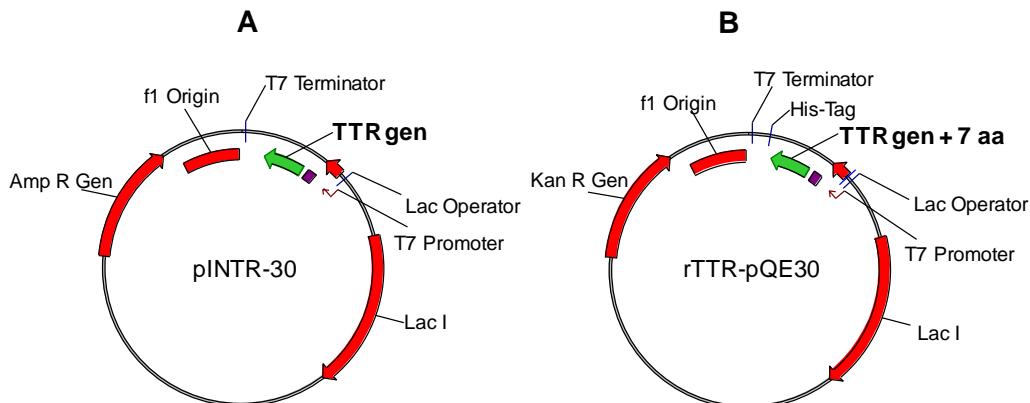


Figura 29. Diseño de los diferentes plásmidos de expresión utilizados en los principales procesos de producción de TTR. A) Furuya et al., 1991 (Furuya et al., 1991) y B) Kingsbury et al., 2007 (Kingsbury et al., 2007).

Nuestro equipo de investigación había trabajado anteriormente en un proyecto de descubrimiento de fármacos para tratar amiloidosis relacionadas con la TTR (Tabla 2, nº 5). En el contexto de este proyecto se puso a punto la expresión y purificación de la proteína humana recombinante TTR en el Laboratorio de Bioquímica del Institut Químic de Sarrià – Universitat Ramon Llull (IQS-URL), bajo la dirección del Dr. Antoni Planas. La producción de proteína permitió diseñar un ensayo cinético de cribado de moléculas como inhibidores de la agregación de la transtiretina (Dolado et al., 2005). El proceso desarrollado en el IQS, es un proceso robusto que ha sido utilizado desde su implementación por diversos investigadores del grupo.

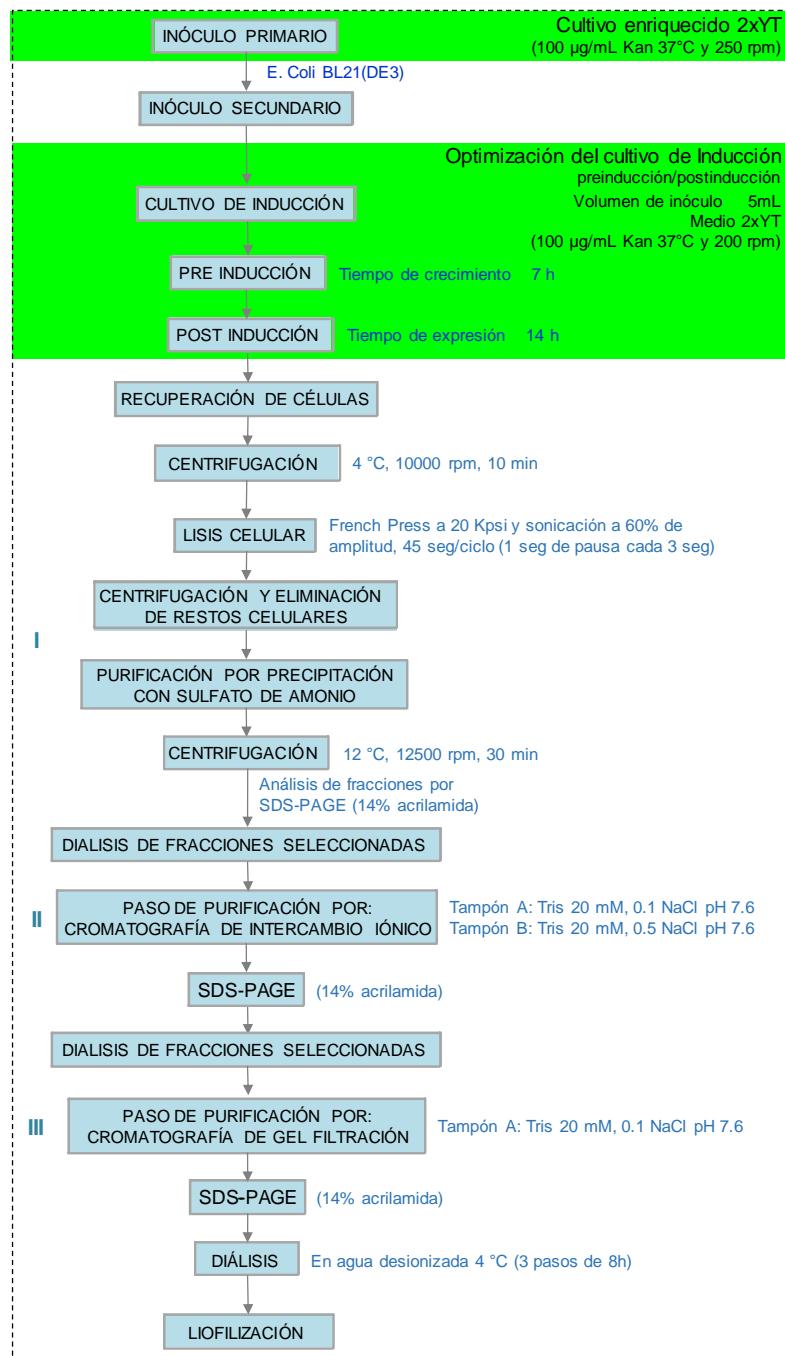
Optimización de la producción de la proteína recombinante Transtiretina

A) Plásmido pHTRwt-I

B) Expresión de la proteína recombinante de la TTR

C) Purificación y control de calidad durante la producción de la TTR

La optimización de la producción de la TTR recombinante se ha realizado en el IQS-URL bajo la supervisión del Dr. A. Planas. Cabe destacar, que se ha elaborado un protocolo optimizado de la expresión y purificación, así como la descripción de las instalaciones y los equipos necesarios, para facilitar su producción y aplicación en proyectos de investigación relacionados con la TTR (Esquema 4).



Esquema 4: Proceso de producción de la proteína recombinante TTR. (Las modificaciones introducidas durante la producción de la proteína recombinante TTR se resaltan en color verde en el esquema).

A) Plásmido phTTRwt-I

El plásmido utilizado para la expresión intracelular de la proteína es phTTRwt-I (Dolado et al., 2005), basado en un pET38b(+) (Dubendorff & Studier, 1991) en el que la secuencia codificante de la TTR está bajo el control del promotor T7 (Yin, Li, Ren, & Herrler, 2007) y el marcador de selección es la resistencia a kanamicina (Kan). La expresión requiere de una cepa que contenga una copia cromosómica de la RNA polimerasa de T7, bajo el control del operador *lac*, que, en presencia del inductor, generalmente IPTG, se inhibe el represor *lac I* y el operador *lac* inicia la síntesis de la RNA polimerasa del fago T7, que reconoce el promotor T7 y activa la maquinaria de transcripción y traducción del gen diana clonado en el vector. La proteína expresada presenta una metionina adicional en el extremo *N*-terminal comparado con la secuencia natural de la TTR humana (Dolado et al., 2005).

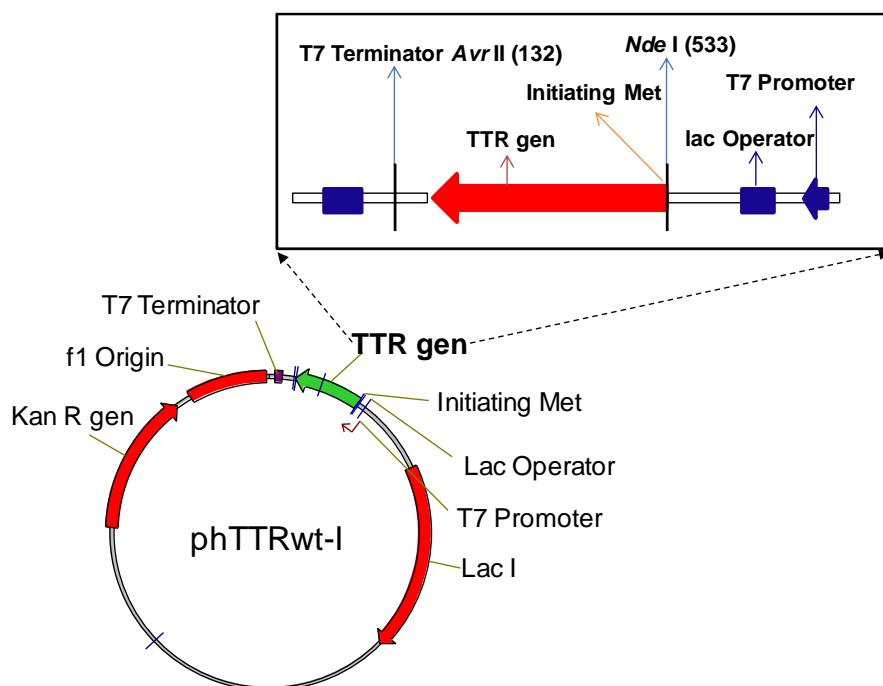


Figura 30. Plásmido phTTRwt-I diseñado en el grupo del Dr. Antoni Planas (IQS-URL). Representación del plásmido phTTRwt-I señalando la composición de la secuencia del gen que codifica para la proteína recombinante TTR.

B) Expresión de la proteína recombinante de la TTR

1. Optimización: del medio de cultivo

La expresión de la proteína recombinante TTR (forma salvaje) se realizó empleando medio de cultivo enriquecido 2xYT, en lugar del medio LB utilizado por Dolado et al (Dolado et al., 2005). El gen que codifica la proteína se encuentra en un sistema pET y en presencia del inductor IPTG se inicia la expresión de TTR. Este sistema de expresión permite la selección del tiempo de crecimiento celular antes de la inducción, a fin de maximizar la expresión de la proteína en una etapa de crecimiento exponencial. Las condiciones de crecimiento a 37 °C en la etapa de pre-inducción y post-inducción fueron las necesarias para obtener un alto rendimiento en el crecimiento y expresión de la proteína. Esto se puede atribuir a que son las condiciones óptimas para el metabolismo de *E. coli* y potencian su mecanismo de expresión. El uso de matraces Erlenmeyer con deflector contribuyó a una mejor aireación del cultivo, alcanzando una densidad celular muy alta en comparación al registro de crecimientos previos en el grupo.

Teniendo en cuenta la experiencia previa, en este proceso de optimización se modificó el volumen del inóculo en el cultivo de inducción, con el objetivo de conseguir una mayor densidad celular y corroborar su efecto sobre la concentración final de proteína y su correcta caracterización. El volumen de inóculo fue de 0.37 % (v/v) en lugar de 0.08 % (v/v). Se realizó el seguimiento del crecimiento celular a fin de definir la fase exponencial, sobre la cual se selecciona el tiempo de inducción.

1.1. Etapa de pre-inducción

El seguimiento del crecimiento celular en los diferentes medios de cultivo se realizó midiendo la densidad celular a una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}). Para caracterizar la cinética de crecimiento celular bajo las condiciones de crecimiento descritas (Esquema 4), se realizó un cultivo de referencia a 11 h. Tras el análisis se identificaron tres puntos principales en la fase exponencial de crecimiento: la fase temprana a 6h, la media a 7h y la tardía a 8h (Figura 31).

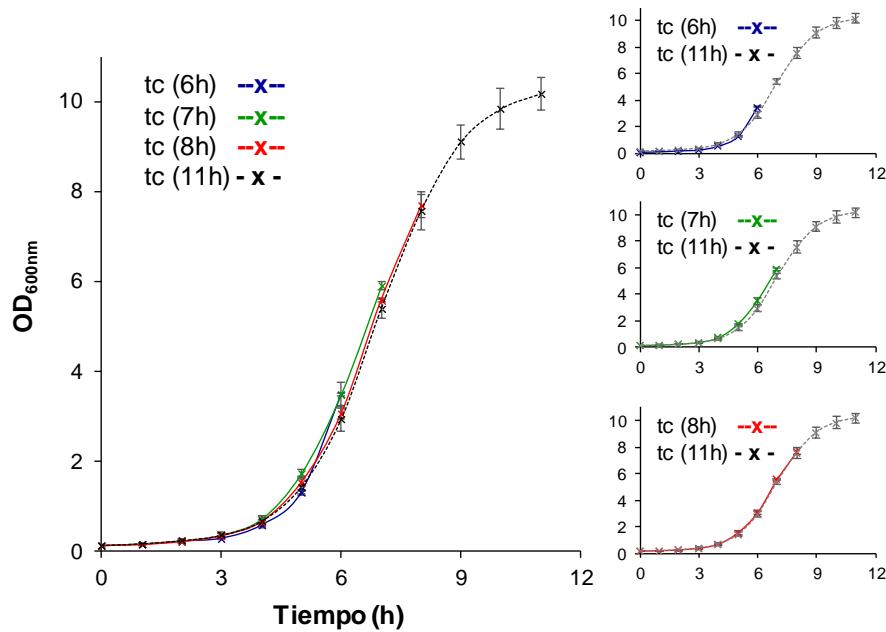


Figura 31. Crecimiento celular a 37 °C en el cultivo de inducción.

Medidas de densidad celular a OD_{600nm}, a diferentes tiempos de crecimiento (tc): tc 6h (azul), tc 7h (verde) y tc 8h (rojo), en comparación con el crecimiento de referencia a 11h (gris).

1.2. Etapa de post inducción y expresión de la proteína TTR

Tras la inducción los medios de cultivo se mantienen durante 14 h en la etapa de expresión. La tabla 3 muestra un crecimiento celular más eficiente en el cultivo inducido a las 7h. El cultivo de inducción temprana muestra que la inducción afecta a la vía de crecimiento celular, visible en la OD₆₀₀ al final de las 14h. El cultivo de inducción tardío, muestra también un efecto notable sobre el crecimiento celular. Estos resultados confirman que el cultivo más eficiente, con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.04 h⁻¹ tras la inducción, se da en el medio inducido a 7h (Figura 32).

Tiempo de crecimiento pre-inducción (h)	OD ₆₀₀ (final)	Fase de expresión (h)	OD ₆₀₀ (final)	μ (h ⁻¹) (fase de expresión)
6	3.50	14	5.03	0.03
7	5.91	14	10.13	0.04
8	7.68	14	10.92	0.02

Tabla 3. Valores de densidad óptica del crecimiento celular, etapa pre-inducción y post-inducción.

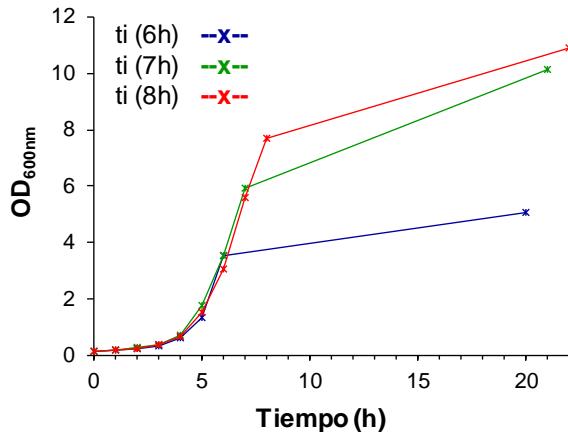


Figura 32. Crecimiento celular en la etapa pre-inducción y post-inducción.

Gráfico de seguimiento de la OD₆₀₀ total para los medios de cultivo con tiempo de inducción (ti) a 6h (azul), 7h (verde) y 8h (rojo).

La inducción temprana a las 6h muestra un impacto notable sobre el crecimiento celular, alcanzando una OD₆₀₀≈5 al final de la inducción, por razones explicadas anteriormente, el metabolismo celular se desvía de potenciar su crecimiento a la síntesis proteica. Una inducción tardía a las 8h, muestra también un efecto en el crecimiento que nos permitió alcanzar una OD₆₀₀≈10 (Tabla 3). La inducción tardía es la menos recomendada, porque el cultivo puede estar cerca de una etapa de estrés y muerte celular y esto afectaría a la síntesis de proteína y por consiguiente, se reduciría el rendimiento. Otros controles aplicados durante estudio fueron las medidas de pH del medio, así como la estabilidad del plásmido.

En base a la cinética de crecimiento a 11h, a las 7 h estamos cerca del punto medio de la fase exponencial y se decidió seleccionar ésta como la mejor para el tiempo de inducción, teniendo en cuenta la lectura al final de la etapa de expresión de OD₆₀₀≈10 (en registros previos se alcanzaba una OD₆₀₀≈5). La inducción a las 7h nos permite alcanzar una elevada densidad óptica. Además, al estar en un punto temprano de fase exponencial, la OD alcanzada al final de la etapa de expresión es óptima y como consecuencia aporta un alto rendimiento en la producción de la proteína TTR.

Por otro lado, además de las medidas de OD₆₀₀ se realizó la medida de pH, ya que permite conocer las condiciones de crecimiento del medio, evitando el estrés celular por variaciones

drásticas de éste. La tabla 4 registra los valores de pH al inicio del cultivo de inducción (inicial) y al finalizar la etapa de expresión.

Tiempo de crecimiento (tc) (h)	pH (inicial)	pH (final)
6	7.0	7.4
7	6.9	7.5
8	6.9	7.8

Table 4. pH de los diferentes cultivos de inducción.

Tras el crecimiento celular en el cultivo de inducción, realizado en 4 matraces Erlenmeyer de 1,3 L con medio 2xYT (Kan 100 µg/mL), las células que contienen nuestra proteína de interés son recuperadas mediante centrifugación. Para corroborar que la proteína TTR no se libera al medio de cultivo, se toma una muestra del medio de cultivo separado de las células de cada uno de los matraces, a estas muestras las llamamos SN1 (por 4 matraces). Tras un paso de lisis celular, se separan los restos celulares por centrifugación y se analiza el pellet (P1). El sobrenadante es recuperado para continuar el proceso de purificación, a fin de aislar la proteína del resto de las proteínas expresadas por *E. coli*.

C) Purificación y control de calidad durante la producción de la proteína TTR

La producción de TTR y el objetivo de su aplicación, exigen una proteína de alta pureza, por ello el control de calidad en cada etapa de purificación que garanticen el éxito en cada paso es un aspecto importante. Durante la producción de TTR, este control de calidad se realiza tras cada paso de purificación, mediante el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (en inglés, *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE

C.1) Precipitación fraccionada con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El sobrenadante es tratado en 3 etapas de precipitación fraccionada con sulfato de amonio al 40, 55 y 85 %, a estos les llamamos P2, P3 y P4 respectivamente. Finalmente, tras la tercera precipitación el sobrenadante es analizado y le llamamos SN2.

Como resultado del análisis por SDS-PAGE de las muestras, los carriles SN1, señalan que no existe expresión extracelular de la proteína TTR. El carril P1, muestra que se arrastra algo de nuestra proteína, pero es muy pequeña. En el carril P2, no se ven

rastros de TTR, en el carril P3 vemos trazas de TTR. Sin embargo, es en el carril P4 donde obtenemos la TTR mayoritariamente. Finalmente, la muestra SN2 no contiene proteínas con lo cual el tratamiento muestra una excelente recuperación de las proteínas.

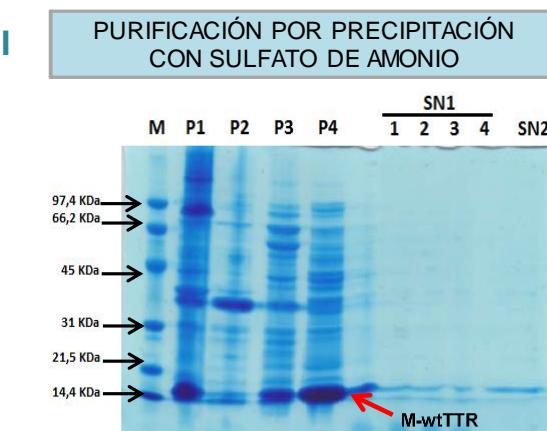


Figura 33. Análisis por SDS-PAGE de la purificación por precipitación con sulfato de amonio. M: marcador de peso molecular de referencia (Range protein Standard, Bio-Rad Laboratories); P1. *Pellet* de los restos celulares; P2: Muestra del *pellet* tras el primer paso de precipitación; P3: Muestra del *pellet* tras el segundo paso de precipitación; P4: Muestra del *pellet* tras el tercer paso de precipitación; SN1: Corresponde a las muestras de cultivo de cada Erlenmeyer; y SN2: Análisis del sobrenadante tras la tercera precipitación.

C.2) Purificación por cromatografía de intercambio iónico

En este paso de purificación analizamos por SDS-PAGE las fracciones, siguiendo el cromatograma, la proteína se observa principalmente en las fracciones D12 a G3, la suma de las fracciones nos da un volumen final de 280 mL, volumen que será acondicionado por diálisis para ser utilizado en el siguiente paso de purificación.

II PASO DE PURIFICACIÓN POR: CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

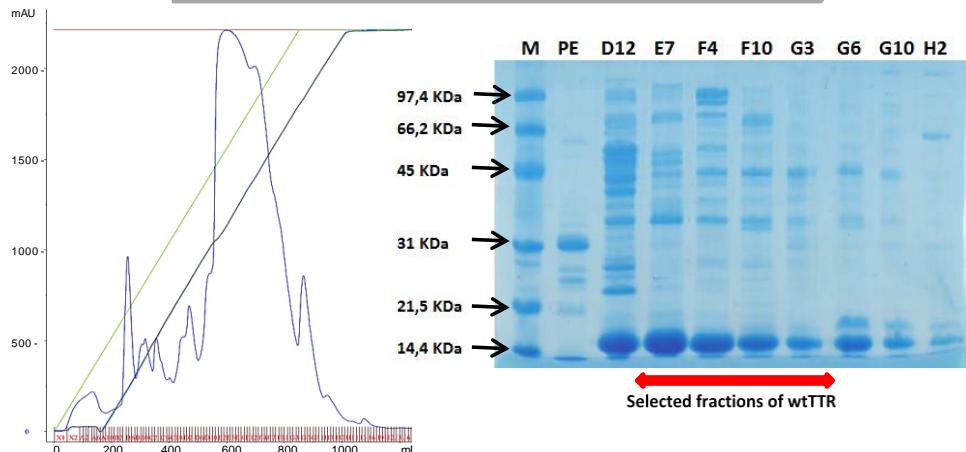


Figura 34. Cromatograma y análisis SDS-PAGE (14% acrilamida) de las fracciones obtenidas tras la purificación por cromatografía de intercambio iónico. (Columna DE 120 mL XK 26/40 de Amersham, resina Q Sepharose High Performance de Pharmacia Biotech; tampón de elución; Tris-HCl 20 mM con un gradiente de 0.1 a 0.5 M de NaCl a pH 7.6)

C.3) Purificación por cromatografía de gel filtración

El análisis de las fracciones por SDS-PAGE señalan que, nuestra proteína TTR se eluye principalmente en las fracciones F14 a I10, la suma de las fracciones

III PASO DE PURIFICACIÓN POR: CROMATOGRAFÍA DE GEL FILTRACIÓN

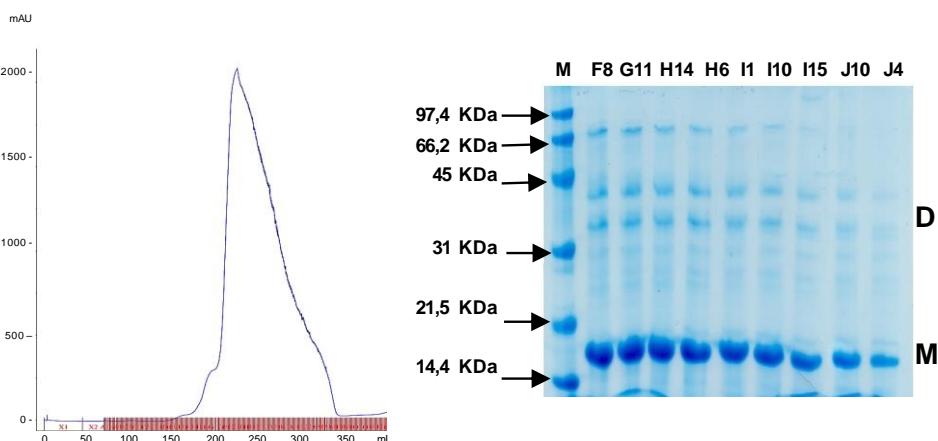


Figura 35. Cromatograma y análisis SDS-PAGE (14% acrilamida) de las fracciones obtenidas tras la purificación por cromatografía de gel filtración (Columna de 440 mL XK 26/100 de Amersham; resina Superdex 75 prep Grade de Amersham; tampón Tris-HCl 20 mMNaCl 0.1 M a pH 7.6).

En un paso final tras un proceso de liofilización de la proteína para su posterior almacenamiento (Figura 36), se realiza un análisis por espectrometría de masas (MALDI-ToF-MS). Nuestra proteína se expresa como ha sido descrito con un aminoácido adicional en el extremo *N*-terminal respecto a la secuencia nativa. La secuencia exacta de la TTR tiene una masa de 13762 Da y nuestra proteína recombinante tiene una masa final de 13910 Da (TTR+ Met).



Figura 36. Proteína liofilizada y preparada para su almacenamiento a -20 °C.

En el espectro obtenido tras el análisis por MALDI-ToF-MS, se observa un pico de 13912 Da correspondiente al monómero de nuestra proteína y también un segundo pico de 14202 Da, a este último pico se le atribuye la forma S-glutationada de la proteína TTR, una modificación post-traduccional asociada al único aminoácido cisteína (Cys-10) de la TTR.

Además, tomamos una muestra en la etapa final previa liofilización de cada cultivo para su análisis por SDS-PAGE, como resultado de este se puede apreciar que nuestra proteína TTR tiene una pureza superior al 95% y que el lote producido tras la inducción a 7h tiene mayor concentración de proteína. La pureza de la proteína es similar a la descrita en los protocolos publicados (Tabla 2, nº 3 y 4) y a los descritos por algunas casas comerciales, como por ejemplo Alexotech (www.alexotech.com).

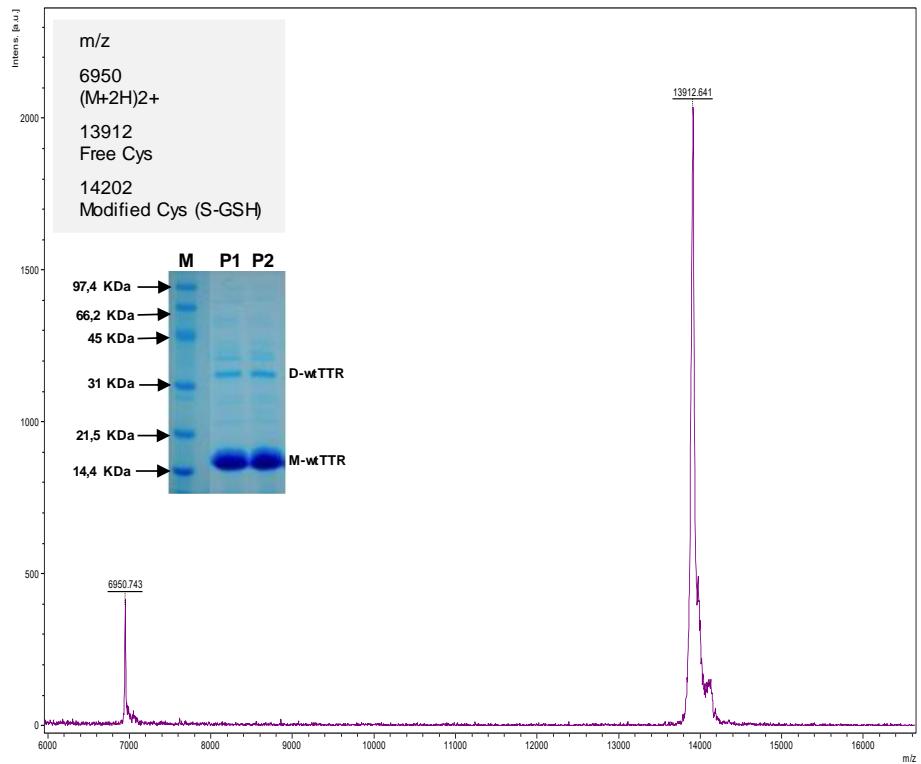


Figura 37. Espectro de masas MALDI-ToF-MS de la proteína TTR.

En este trabajo se ha optimizado la producción de la proteína recombinante TTR. Teniendo en cuenta el registro de los trabajos previos de producción de TTR a escala de matraz Erlenmeyer, se ha logrado unos valores de crecimiento celular de hasta 3 veces mayor, con lo que se ha conseguido triplicar o cuadriplicar la cantidad de proteína obtenida. Por lo tanto, la modificación introducida en esta tesis mejora de forma notable el protocolo anterior. El rendimiento en la producción de TTR en este trabajo fue de 150 a 200 mg/L y en esta tesis doctoral se prepararon más de 600 mg de proteína pura, proteína suficiente para el desarrollo de los estudios estructurales y para los ensayos de cribado a realizar en el contexto de esta tesis doctoral.

Capítulo 4. Discusión

Artículo 2: *Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between Transthyretin, A β Peptides, and Small-Molecule Chaperones toward an Alternative Strategy for Alzheimer's Disease Drug Discovery.*

Uno de los objetivos del proyecto de descubrimiento de fármacos de nuestro consorcio era elucidar las características estructurales de la interacción molecular entre la proteína TTR y el péptido amiloide A β y en particular estudiar el efecto potenciador de esta interacción con moléculas pequeñas estabilizadoras del tetrámero de la proteína TTR, como el Iododiflunisal (IDIF), que es nuestro compuesto líder.

Los primeros estudios fueron realizados por uno de los grupos de investigación del consorcio, el del Profesor Jesús Jiménez Barbero en el CIC BioGUNE. Se empleó la técnica de Espectroscopía de RMN y se combinaron diferentes aproximaciones, entre ellas la de Espectroscopía RMN de Diferencia de Transferencia de Saturación (STD-NMR), una de las aproximaciones de RMN más potentes para detectar y caracterizar interacciones receptor-ligando en disolución, observando las señales de la molécula pequeña (ligando), que presentan propiedades espectroscópicas apropiadas para estudios a alta resolución, con independencia del tamaño del receptor. Esta técnica espectroscópica es muy potente en el marco de la química del reconocimiento molecular (Bhunia, Bhattacharjya, & Chatterjee, 2012; Meyer & Peters, 2003; Walpole, Monaco, Nepravishta, & Angulo, 2019).

En este estudio de RMN de incluyeron 3 secuencias cortas del péptido A β (1-42) (Figura 38) para explorar e identificar la región de interacción específica. Con este estudio se confirmaron las características estructurales que eran clave en la interacción entre la proteína TTR y el péptido A β (12-28), siendo Val18/Phe19/Phe20 el epítopo de reconocimiento.

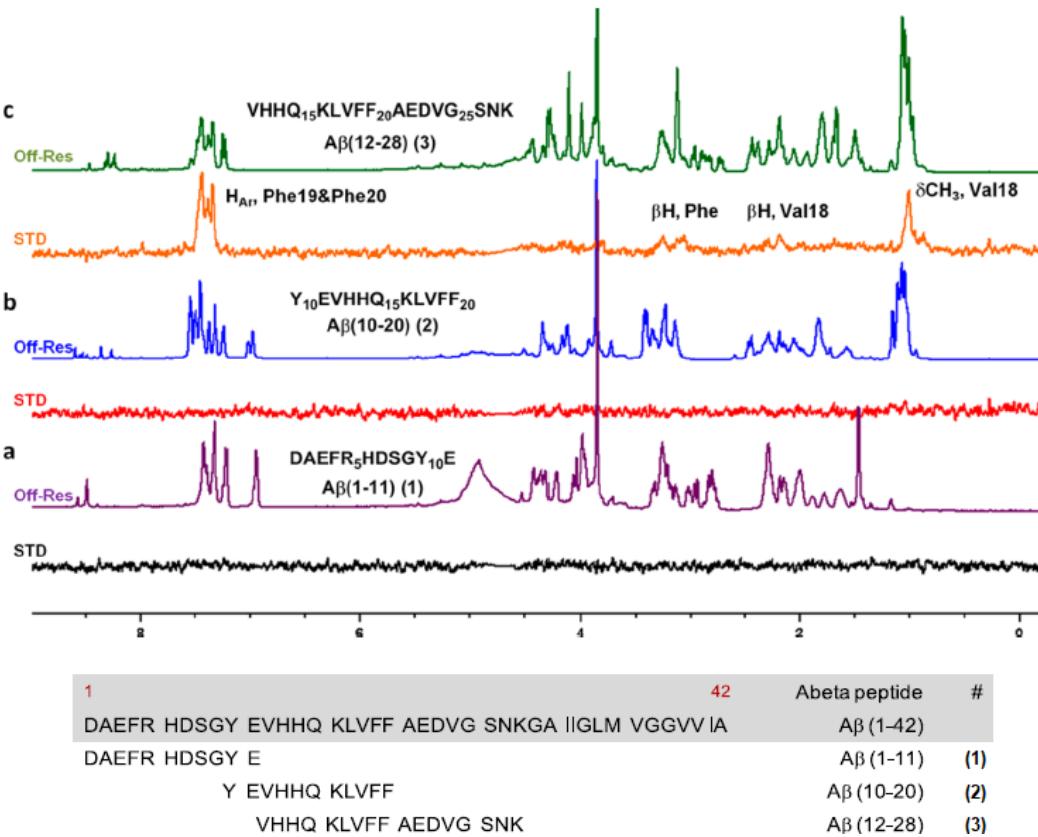


Figura 38. Espectros de STD-NMR (*on-resonance*) y de ^1H -NMR de referencia (*off-resonance*) (600 MHz) de cada una de las tres secuencias peptídicas: a) A β (1-11); b) A β (10-20) y c) A β (12-28) (Gimeno et al., 2017).

Nuevos estudios de STD-NMR de la interacción entre TTR y A β (12-28) en presencia de IDIF mostraron que la proteína TTR era capaz de interaccionar con ambos ligandos y además se comprobó que el compuesto IDIF no interfería en la unión TTR/A β , indicando que ambos ligandos debían de tener diferentes sitios de unión. Era conocido que el compuesto IDIF se unía a la proteína TTR en el sitio de unión del ligando endógeno, de manera que el péptido debía unirse a su superficie.

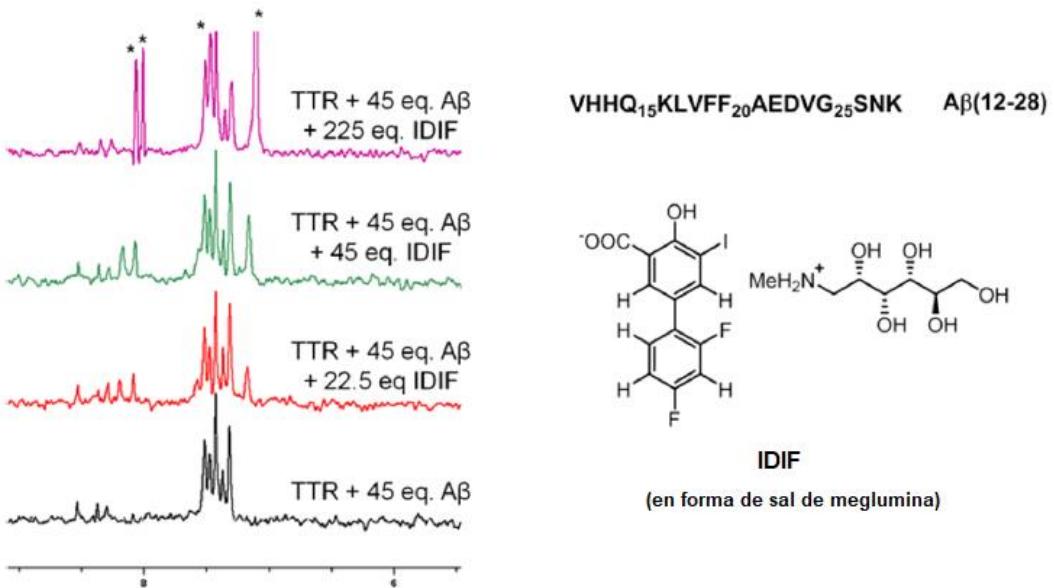


Figura 39. Espectros de STD-NMR (*on-resonance*) de TTR y A β (12-28) en presencia de IDIF en forma de sal de meglumina (sal de IDIF soluble en agua) (Gimeno et al., 2017).

Lamentablemente, no se pudo extrapolar este estudio de RMN a la interacción TTR/A β (1-42) debido a la agregación observada en el tubo de RMN en las condiciones en las que se realizaban los experimentos.

Los resultados de RMN fueron los primeros resultados estructurales de la interacción entre A β (12-28) y TTR de nuestro consorcio. Para completar esta información estructural, en la presente tesis doctoral uno de los objetivos fue investigar mediante estudios biofísicos las bases estructurales de las interacciones entre la proteína TTR y diferentes péptidos amiloides y analizar el efecto de varios compuestos estabilizadores de la proteína TTR en la potenciación de esas interacciones.

La técnica de calorimetría de valoración isotérmica (ITC, *Isothermal Titration Calorimetry*) es una técnica que permite cuantificar la energía (ΔG) de la interacción proteína/péptido, así como determinar su componente entálpica (ΔH) y entrópica (ΔS). La información que se obtiene de este análisis puede ser utilizada para clasificar y seleccionar aquellos compuestos que presenten mayor afinidad con el sistema de interés de manera eficaz (Velazquez-Campoy, Leavitt, & Freire, 2015).

En la bibliografía sólo existe un trabajo en el que se emplee la técnica ITC para caracterizar la unión entre la proteína TTR y el péptido A β (1-40). En éste se describe por primera vez el

perfil termodinámico completo de la interacción TTR/A β (1-40). Las condiciones experimentales aplicadas en este análisis se tomaron como referencia para la puesta a punto de los estudios en la presente tesis doctoral (Li et al., 2013).

En el estudio de la interacción TTR/A β (1-42) mediante ITC realizamos una serie de experimentos preliminares. En primer lugar, se analizó el efecto de distintos tampones (TRIS y HEPES) sobre la termodinámica de la interacción. El calor de la dilución de la proteína TTR en HEPES fue casi indetectable (Figura 40). Cabe señalar que el tampón contiene glicina, lo que permitiría en un futuro realizar estudios con A β en presencia de metales como el Cu $^{2+}$ o el Zn $^{2+}$. Es conocido que estos metales son muy propensos a precipitar como Zn(OH) $_2$ y Cu(OH) $_2$ y la glicina permitiría prevenir este proceso y ampliar la aplicación de nuestro método de análisis (Hatcher, Hong, Bush, Carducci, & Simon, 2008). Otros factores a tener en cuenta eran: la presencia de DMSO, la presencia de sales y la temperatura a la que se realizarían los experimentos. En cuanto al DMSO, que es el disolvente empleado en la preparación de los stocks de los compuestos a analizar, la concentración de DMSO fue del 5%, la cual permitía controlar el calor de dilución a niveles bajos. Los tampones fueron preparados con una concentración baja de sales, dado que a concentración alta la amiloidogénesis del péptido se potenciaba. La temperatura del análisis se fijó en 25 °C por el mismo motivo. Tras este análisis se seleccionaron las siguientes condiciones: tampón HEPES de concentración 25 mM, con glicina de concentración 10 mM de, a pH 7.4 y con una concentración final de DMSO del 5%.

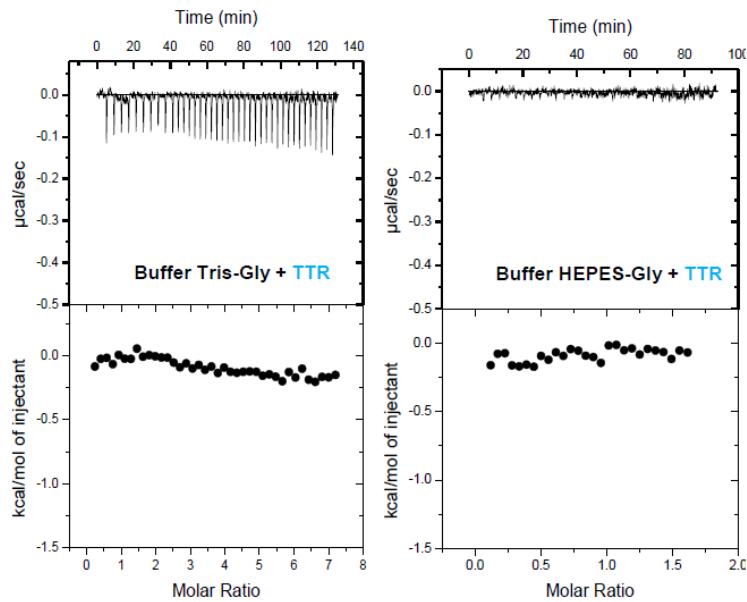


Figura 40. Termograma de ITC de los ensayos de control del calor de dilución de TTR (20 μM) en diferentes tampones. Los tampones contenían un 5% de DMSO y los experimentos se realizaron a 25 °C.

Una vez seleccionado el tampón, se procedió al estudio por calorimetría de la interacción entre TTR y A β (12-28), la interacción estudiada mediante RMN. Además, en este estudio se incluyeron distintas secuencias mutantes de A β (12-28), para verificar la importancia de determinados aminoácidos en el epítopo propuesto por el grupo de RMN de nuestro consorcio.

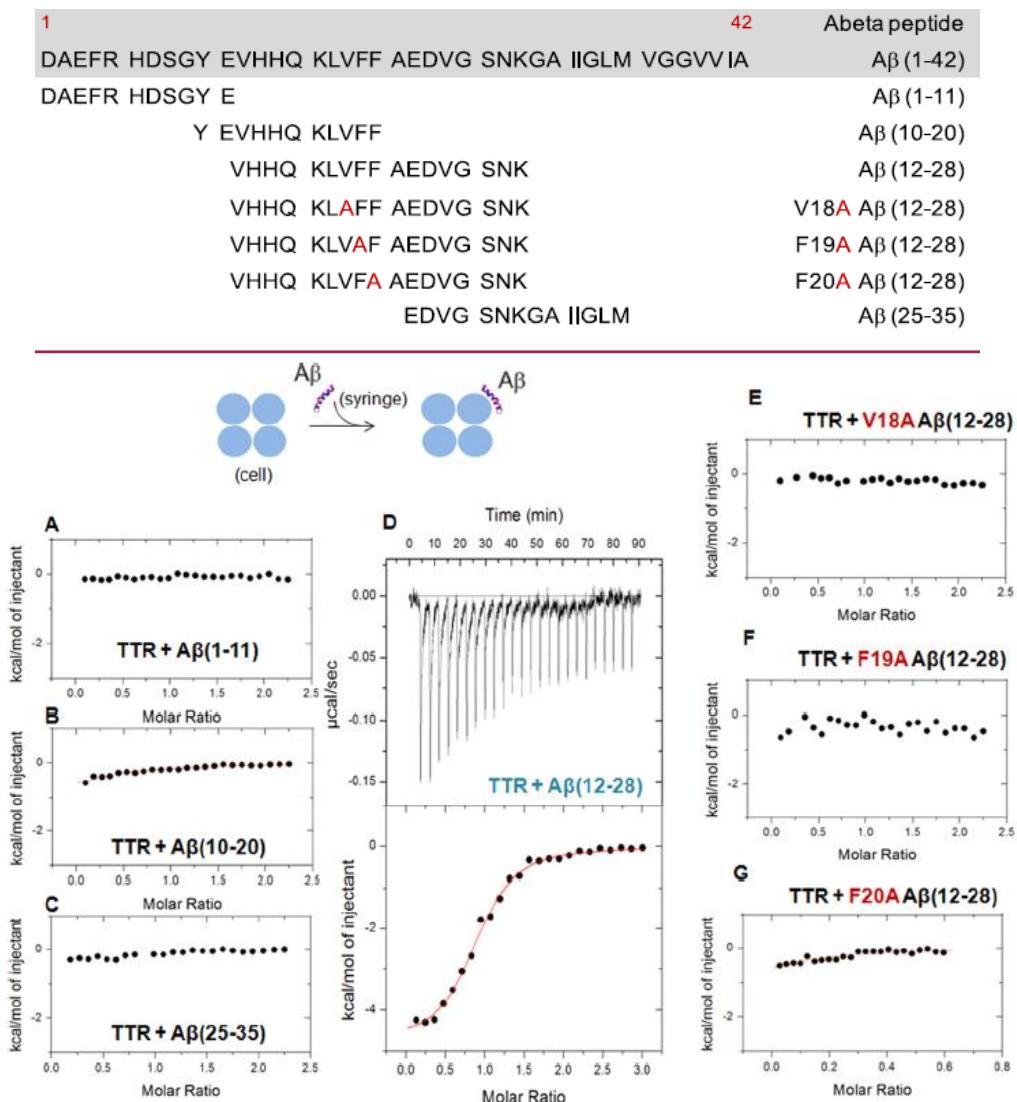


Figura 41. En la parte superior, descripción de las secuencias de A β utilizadas en el análisis de interacción sobre TTR por ITC. Termogramas de ITC de la interacción de diferentes secuencias peptídicas de A β y TTR a 25 °C (HEPES 25 mM, 10 mM glicina, pH 7.4 y 5% de DMSO).

El perfil termodinámico de la interacción entre A β (12-28) y TTR, permitió un buen ajuste para el cálculo de los parámetros termodinámicos, siendo robusto y reproducible. La afinidad de unión entre A β (12-28) y TTR presenta un valor de la constante de disociación (K_d) de 3 μ M, el cual es del mismo orden que el sugerido por nuestro consorcio ($K_d \approx 2 \mu$ M) a partir del estudio de RMN anteriormente descrito (Gimeno et al., 2017).

En un segundo paso del estudio, se procedió a la evaluación del efecto que moléculas estabilizadoras de la proteína TTR podían presentar en la unión de TTR a A β (12-28). El ensayo por ITC se desarrolló en dos pasos, en el primero se evaluó la formación del complejo binario, TTR-IDIF, y en otro, la formación del complejo ternario TTR-IDIF con A β .

Para este estudio se seleccionó IDIF, nuestro compuesto estabilizador de la proteína TTR, con la que habíamos realizado estudios *in vivo* y en los que se demostró que se reducía la agregación y la toxicidad de A β (Rejc et al., 2020; Ribeiro et al., 2014).

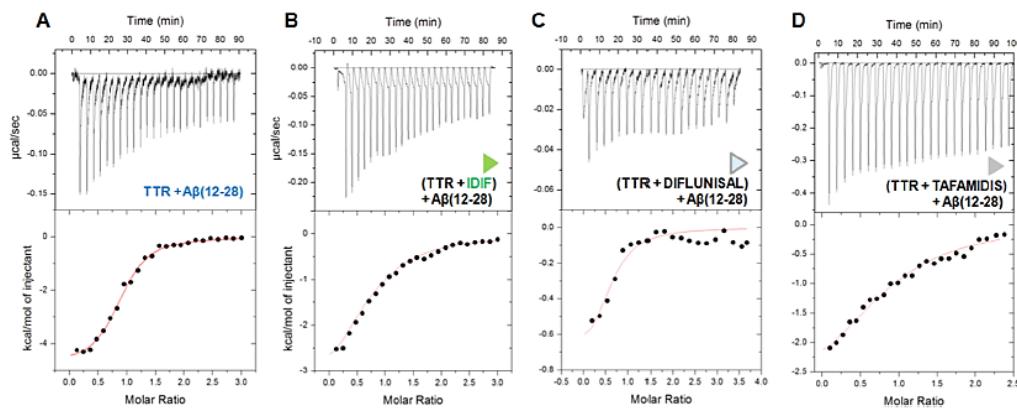


Figura 42. Termogramas de ITC de la formación de los complejos ternarios TTR/estabilizador/A β . La tabla de la parte inferior contiene los parámetros termodinámicos para cada estabilizador.

El efecto chaperona de IDIF, que incrementa de manera cooperativa la fuerza de la interacción TTR/A β (12-28), se refleja en una mayor afinidad con un valor de K_d = 0.81 μ M para el complejo ternario, comparada con la del complejo binario TTR/A β (12-28) (K_d = 3 μ M). Sin embargo, este efecto no se observa con otros compuestos estabilizadores de la proteína TTR, como son los compuestos Tafamidis y diflunisal.

Un factor limitante en los estudios en los que interviene el péptido A β (1-42) es su gran tendencia a la agregación. En la bibliografía se describen numerosos métodos de obtención de A β (1-42) y de múltiples tratamientos para asegurar que esté en forma monomérica. Uno

de los procedimientos se basa en el tratamiento con HFIP. Existen además hoy en día numerosas casas comerciales que suministran A β (1-42) aunque con precios elevados e.j. Bachem HFIP-treated (ref.: H-7442.1000), Genscript (ref.: RP10017), Abcam (ref.: 107761-42-2), Sigma-Aldrich (ref.: A9810), entre otras.

En esta tesis doctoral se escogió un depsipéptido descrito en la bibliografía por algunos investigadores, con el fin de asegurar la ausencia de agregados al inicio de los experimentos (Beeg, Stravalaci, Bastone, Salmona, & Gobbi, 2011; Sohma, Sasaki, Hayashi, Kimura, & Kiso, 2004). El precursor del péptido A β (1-42) utilizado en esta tesis doctoral es el depsipéptido de la casa Genscript (ref.: [RP10017](#)). El depsipéptido es más soluble en el medio de estudio y tan solo a pH 7.4 se convierte de forma casi instantánea en la forma nativa del péptido A β (1-42). Cabe destacar que se realizaron controles previos con este depsipéptido antes de realizar los estudios de ITC. Por un lado, se monitorizó la conversión del depsipéptido a especie nativa mediante la técnica de UPLC-ToF-MS tras el cambio de pH. Por otra parte, inmediatamente después del cambio de pH, se determinó el tamaño de partícula. Los resultados mostraron la ausencia de agregados. Se confirmó un tamaño de radio hidrodinámico de $3,23 \pm 0,75$ nm, similar al valor descrito para el péptido A β (1-40). (Ghadami et al., 2020), lo que aseguraba una especie monomérica. Se estudió también la agregación del depsipéptido a pH 6.5 y a 7.4, observándose que el depsipéptido no agrega en condiciones de pH ácido (pH = 6.5), mientras que lo hace una vez se modifica el pH (Figura 43B)

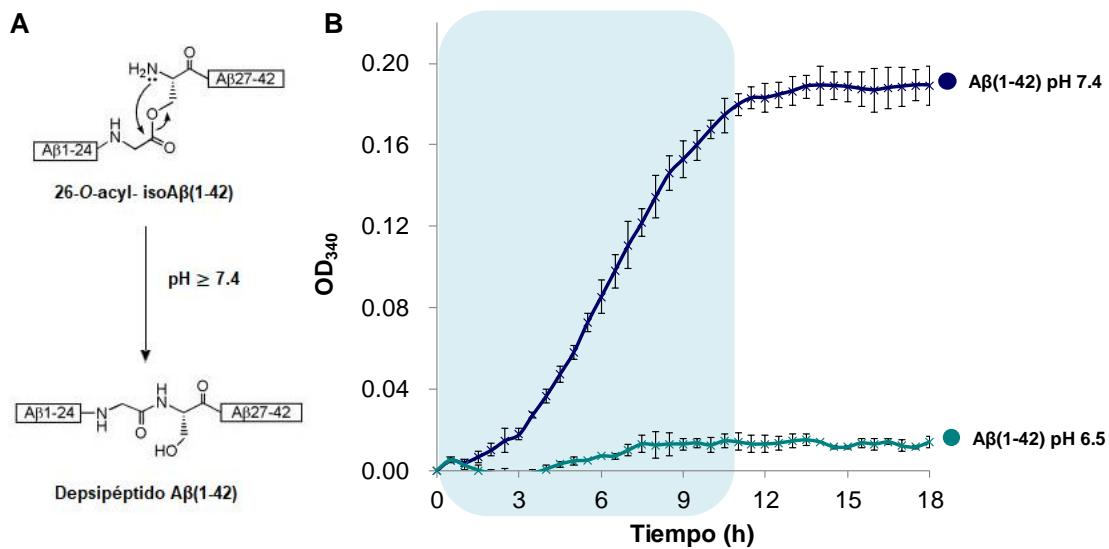


Figura 43. A) Síntesis de A β (1-42) a partir del depsipéptido A β (1-42); B) Cinética de agregación del depsipéptido A β (1-42) a pH 6.5 y pH 7.4.

En esta tesis doctoral se describe por primera vez el perfil termodinámico completo de la interacción entre la proteína TTR y el monómero de A β (1-42). El complejo tiene una estequiometría (1:1) y una constante de disociación $K_d = 0,94 \mu\text{M}$. El compuesto IDIF, aumenta la fuerza de interacción entre TTR y A β (1-42), observándose una reducción del valor de K_d del complejo ternario ($K_d = 0,32 \mu\text{M}$). Por otra parte, el compuesto Tafamidis, otro potente estabilizador de la proteína TTR, no ejerce de chaperona de la interacción puesto que no se observa disminución de la constante de disociación de su complejo ternario.

Estos resultados son similares a los que se había obtenido empleando el péptido A β (12-28), por lo que éste se utilizará en el diseño de un ensayo para cribado de nuevas chaperonas.

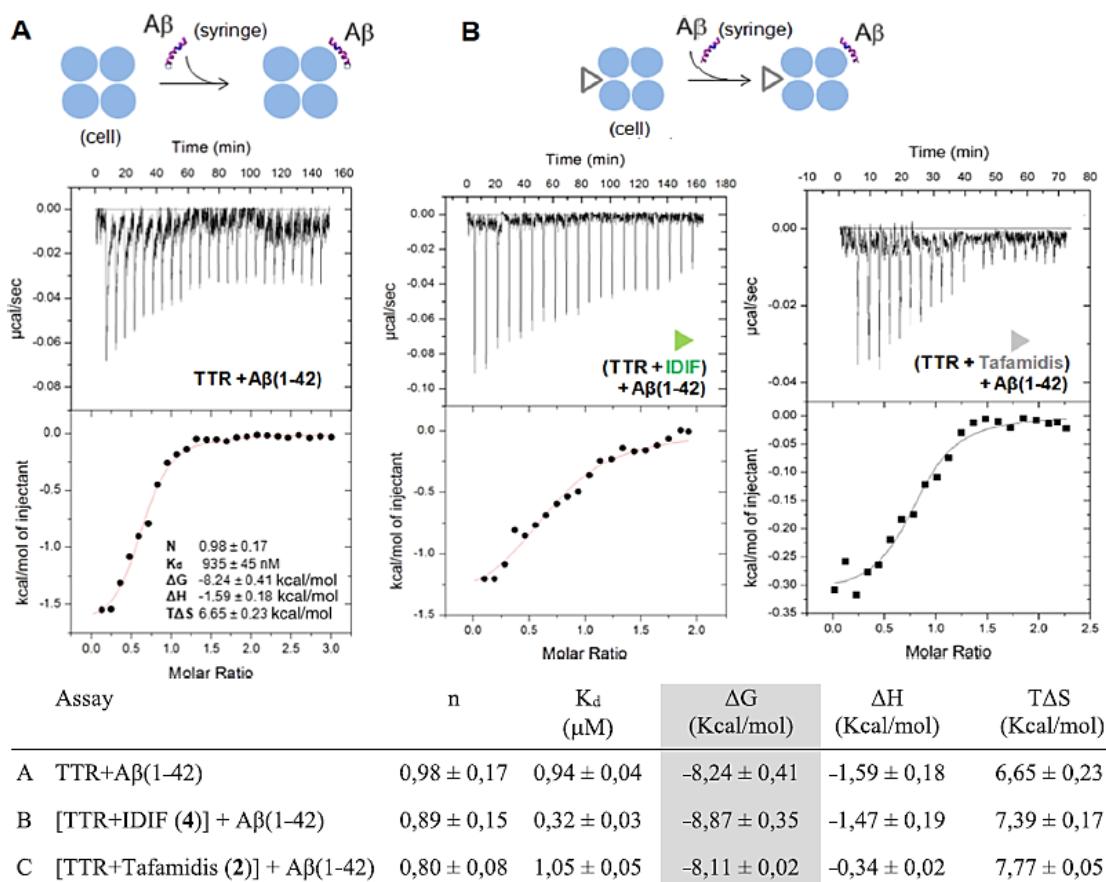


Figura 44. Termograma de ITC de la formación de los complejos ternarios TTR/estabilizador/A β . La tabla de la parte inferior contiene los parámetros termodinámicos para cada complejo.

Posteriormente, se procedió a investigar si la proteína TTR se unía con la misma afinidad de unión a ambos péptidos amiloïdes, el A β (1-42) y el A β (1-40). Para este fin, se realizaron los estudios de ITC con A β (1-40) en las mismas condiciones experimentales. En este caso, se ensayó con un péptido procedente de dos fuentes comerciales distintas. Por una parte, un péptido A β (1-40) de la casa Bachem que había sido tratado con HFIP (ref.: 4090147.1000) y por otra, un péptido A β (1-40) de Abcam (ref.: 131438-79-4). En ambos casos se formó un complejo binario (1:1) con resultados similares en cuanto a constantes de disociación ($K_d = 7.1$ y $6.9 \mu\text{M}$, para los péptidos de Bachem y de Abcam, respectivamente). Cabe recordar que los estudios de ITC de la interacción binaria TTR/A β (1-40) habían sido descritos por otros autores usando otras condiciones (valor de $K_d = 24 \mu\text{M}$) (Li et al., 2013).

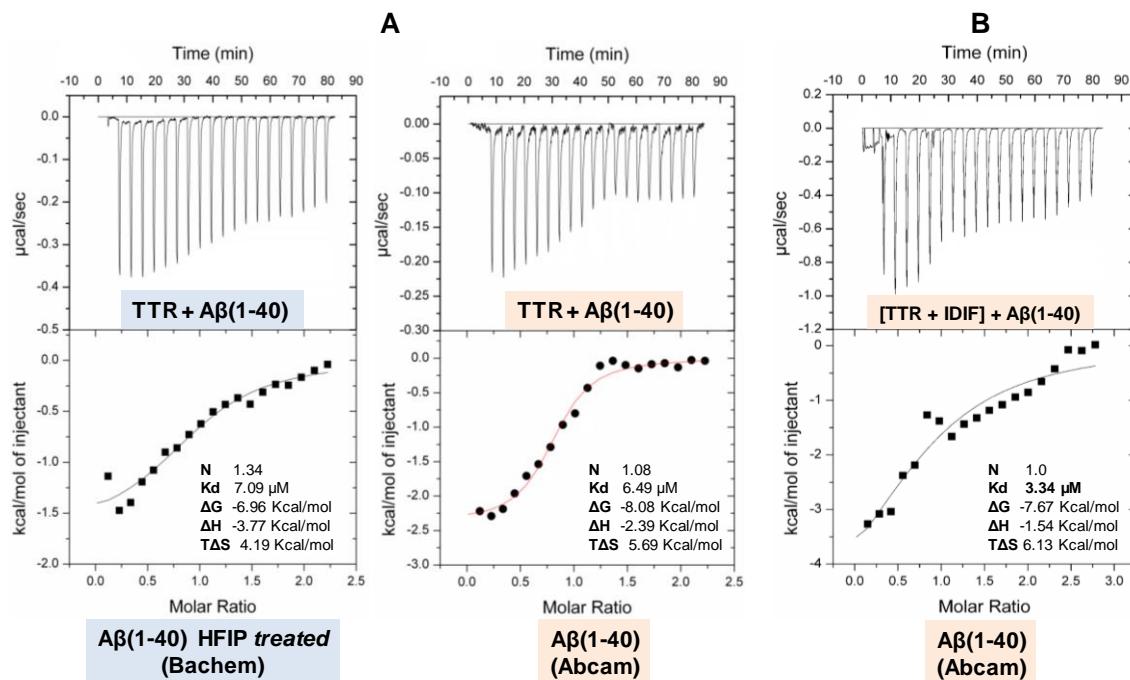


Figura 45. Termograma de ITC de la formación de: A) los complejos binarios entre TTR-A β (1-40) de distintas casas comerciales, B) del complejo ternario TTR/IDIF/A β (1-40).

Tras estos experimentos se comprobó que la proteína TTR poseía una afinidad de unión hacia A β (1-42) ($K_d = 0.94 \mu\text{M}$) notablemente mayor que la de TTR hacia A β (1-40) ($K_d = 7 \mu\text{M}$) y se comprobó que el compuesto IDIF tenía un efecto chaperona similar en ambas interacciones.

En un segundo paso se determinó el perfil termodinámico de la interacción entre la proteína TTR y A β (1-40) en presencia de IDIF. Los resultados muestran de nuevo que IDIF incrementa la fuerza de la interacción entre TTR y A β (1-40), con una reducción de la constante de disociación del complejo ternario igual a 3.34 μ M y por tanto una mayor afinidad de unión en relación al complejo binario TTR/A β (1-40) ($K_d = 6.49 \mu$ M) (Figura 45). Por último, para corroborar los resultados de ITC se determinaron las cinéticas de agregación de A β (1-42) mediante la técnica de fluorescencia de tioflavina T (ThT). Se usó el mismo tampón que en los estudios de ITC, pero en este caso las cinéticas se estudiaron a una temperatura de 37 °C. Como puede observarse en la Figura 46, los distintos estabilizadores empleados (DIF, IDIF y Tafamidis) no interferían en la agregación de A β (1-42). Sin embargo, la proteína TTR reducía la agregación de A β (1-42) alargando la fase de latencia. Este efecto fue mayor cuando la proteína TTR fue incubada previamente con IDIF y en este caso la agregación de A β (1-42) fue casi nula.

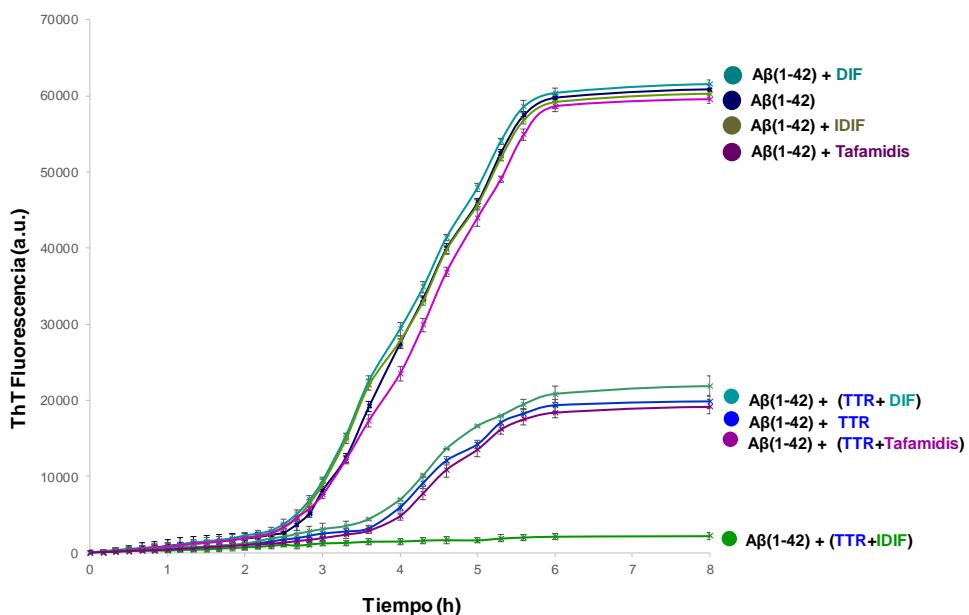


Figura 46. Cinética de agregación del péptido A β (1-42): solo; en presencia de los distintos estabilizadores; en presencia de TTR; y en presencia de TTR previamente incubada con cada estabilizador (Diflunisal, IDIF y Tafamidis)

En definitiva, en esta tesis doctoral hemos obtenido el perfil termodinámico completo de la interacción entre la proteína TTR y el péptido A β (1-42). Además, los estudios de ITC realizados nos han permitido describir por primera vez la base estructural del efecto chaperona del compuesto IDIF en la interacción entre la proteína TTR y el péptido A β (1-42)

Capítulo 4. Discusión

Artículo 3: *An assay for screening potential drug candidates for Alzheimer's disease that act as chaperones of the transthyretin and amyloid-β peptides interaction*

El diseño de un ensayo siempre es una etapa crucial en cualquier proyecto de descubrimiento de fármacos (Figura 47) (Busby et al., 2020; Hughes, Rees, Kalindjian, & Philpott, 2011).

La finalidad del ensayo es identificar compuestos con determinada actividad para una diana determinada. En el desarrollo de un ensayo es importante tener en cuenta diversos factores del mismo, como por ejemplo: la relevancia del ensayo, esto significa que tiene que permitir identificar moléculas con una determinada potencia y mecanismo de acción; la reproducibilidad a lo largo de distintos ensayos, diferentes días, etc.; la calidad del ensayo, que viene determinada por el factor Z' (Zhang, Chung, & Oldenburg, 1999); las interferencias (disolventes, presencia de DMSO, etc.); y el coste del mismo, ya que ha de ser razonable para poder ensayar múltiples moléculas.

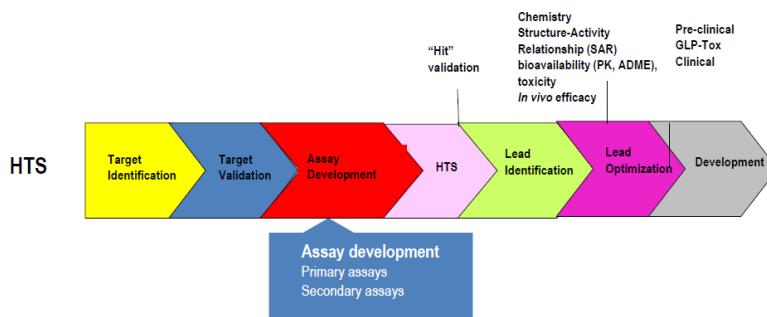


Figura 47: El desarrollo de un ensayo en la etapa de descubrimiento de fármacos

El objetivo general del siguiente trabajo es el diseño, puesta a punto y validación de un ensayo *in vitro* de cribado de alto rendimiento (HTS, *High-throughput screening*) para la evaluación de una biblioteca de moléculas.

El primer ensayo descrito para evaluar compuestos desarrollados en el consorcio utilizaba un ensayo competitivo con TTR marcada con yodo radiactivo (Ribeiro, Saraiva, & Cardoso, 2012). Dentro de nuestro consorcio se había intentado el desarrollo de una metodología

basada en la fluorescencia por anisotropía, pero los resultados no fueron alentadores (Boes, Olatunji, Mohammadi, Breukink, & Terrak, 2020).

En la literatura científica, existen pocos ejemplos de ensayos que evalúen interacciones ternarias en las que esté implicada la A β (Bode et al., 2018; Litus, Kazakov, Sokolov, Nemashkalova, & Galushko, 2019; Liu et al., 2017; Mangrolia & Murphy, 2018; Sadowski et al., 2004).

Tal como se ha citado en la introducción, nuestro grupo había participado en el desarrollo de un ensayo de cribado de alto rendimiento (HTS), en el que a través de un método turbidimétrico (A_{340}) se evaluaba la fibrilogénesis de la TTR a pH ácido en 1.5 h. En la presente tesis doctoral, nos inspiramos en este ensayo y procedimos al diseño de un ensayo *in vitro* que midiera en este caso la agregación de A β (12-28), péptido con características similares al péptido Ab(1-42).

Por tanto, para lograr este objetivo, se inició el diseño y validación de un nuevo ensayo por turbidimetría para monitorizar la cinética de agregación de A β , en presencia de TTR y en presencia del complejo binario TTR/estabilizador. Este trabajo constó de diferentes etapas (Figura X48).

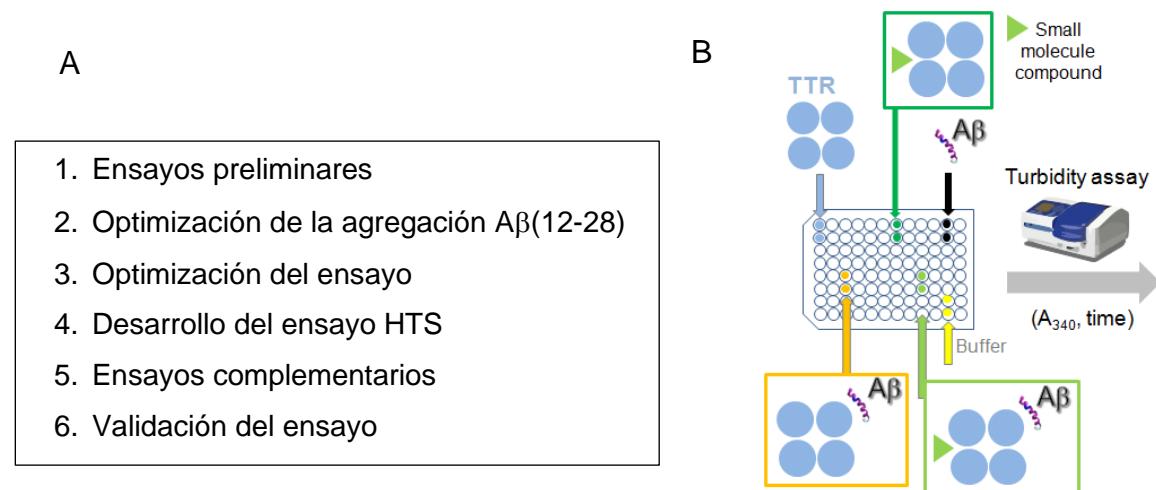


Figura 48: Diseño de un ensayo basado en la agregación de A β . A) Etapas y B) Ensayo de formación de complejos binarios (TTR/A β y A β /compuesto) y ternarios (TTR/compuesto/A β).

En la puesta a punto de la metodología de monitorización de la agregación de A β se seleccionó la técnica de turbidimetría y como péptido A β se seleccionó el péptido A β (12-

28). Cabe recordar, que en los estudios estructurales previamente realizados en el consorcio de investigación, se había confirmado que ésta era la secuencia de reconocimiento para TTR (Cotrina, Gimeno, et al., 2020; Gimeno et al., 2017). Además, se había descrito que el péptido A β (12-28) exhibía un comportamiento neurotóxico idéntico y características de formación de fibras similares al péptido A β (1-42) (Flood, Morley, & Roberts, 1994; Fraser, Lévesque, & McLachlan, 1994; Hsu, Park, & Guo, 2018). Este péptido A β (12-28) fue sintetizado en nuestro laboratorio, aunque es comercial.

Para el ensayo se mantuvo como tampón el HEPES a 25 mM, 10 mM glicina, pH 7.4 y que contenía un 5% de DMSO. En el análisis se tuvieron en cuenta dos controles negativos de agregación, por una parte la secuencia peptídica A β (1-11), péptido amiloide que no agrega; y por otra, la proteína TTR que tampoco agrega a este pH. La proporción A β /TTR se fijó en (2:1) y se realizaron experimentos preliminares.

Para definir la longitud de onda a la que se realizarían las mediciones de absorbancia, se realizó un barrido a diferentes longitudes de onda entre 260 y 440 nm y se seleccionó la longitud de onda a 340 nm (A_{340}).

Se aplicó un **diseño de experimentos (DoE)** factorial para optimizar las condiciones óptimas de trabajo. Tres fueron las variables seleccionadas a optimizar: la concentración, la fuerza iónica (presencia o ausencia de sales) y la temperatura. En este experimento se tuvieron en cuenta los parámetros a los dos niveles y se realizó una incubación de 18 h para garantizar la formación de los agregados de A β (12-28) (Milojevic, Raditsis, & Melacini, 2009).

	Parámetros	Nivel 1	Nivel 2	Unidades
1	Concentración	50	100	μM
2	Sales (NaCl)	0	100	mM
3	Temperatura	37	40	°C

Tabla 5. Selección de variables y niveles para su aplicación en el diseño de experimentos.

Tras los experimentos se determinó que las mejores condiciones para la monitorización de la agregación de A β (12-28) era: una concentración de péptido A β (12-28) de 100 μM , baja fuerza iónica (ausencia de NaCl) y una temperatura de 37 °C.

La cinética de agregación de A β (12-28) es una cinética rápida, no presenta fase de latencia y el *plateau* alcanza en aproximadamente 4h, lo que representa una ventaja al obtenerse una rápida respuesta en el cribado de moléculas.

Para la evaluación de las moléculas estabilizadoras de TTR, se diseñó un experimento en dos fases. En una primera fase, se formaba el complejo TTR/estabilizador durante 30 min y en una segunda fase, se añadía el complejo TTR/estabilizador al péptido A β (12-28). Se evaluó IDIF como estabilizador. Los resultados indicaron que la TTR reducía la agregación de A β (12-28) aproximadamente en un 70% y cuando la TTR se había incubado con IDIF se observaba una reducción casi total de la agregación de A β (12-28) (Figura 49).

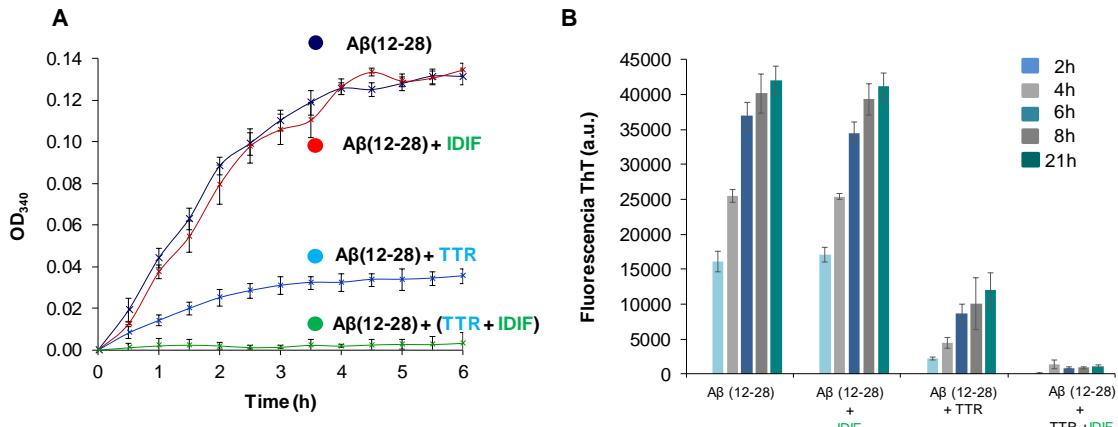


Figura 49. Cinética de agregación de A β (12-28) (100 μ M): A) Ensayos de turbidimetría, OD₃₄₀ (B) ensayos de fluorescencia ThT. Se estudian A β (12-28) en presencia de IDIF (1:1); A β (12-28) en presencia de TTR (2:1) y A β (12-28) en presencia de TTR/IDIF (2:1:2) en tampón HEPES a 25 mM, 10 mM glicina, pH 7.4, 5% DMSO (concentración final) y a 37 °C .

Ribeiro y colaboradores habían descrito un grupo de estabilizadores de la TTR que se comportaban como chaperonas (Ribeiro et al., 2012). Entre ellos estaban los ácidos 3,5-diclorofenil antranílico (DCPA) y 3,5-difluorofenyl antranílico (DFPA). Por otra parte, en el estudio de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) del artículo 2 de esta tesis doctoral habíamos observado que otros estabilizadores de la TTR, como el tafamidis o el diflunisal, no eran chaperonas. Por tanto, para la validación del ensayo se seleccionaron estas moléculas: DCPA, DFPA, el tafamidis y el diflunisal. Como puede observarse en la Figura 50 el ensayo desarrollado permitía identificar a DCPA y DFPA como moléculas chaperonas de comportamiento similar al referente IDIF. Asimismo, el ensayo permitía discriminar aquellas que no lo eran, como tafamidis y diflunisal. Los resultados de turbidimetría fueron corroborados con ensayos complementarios como fueron los ensayos de fluorescencia de tioflavina T.

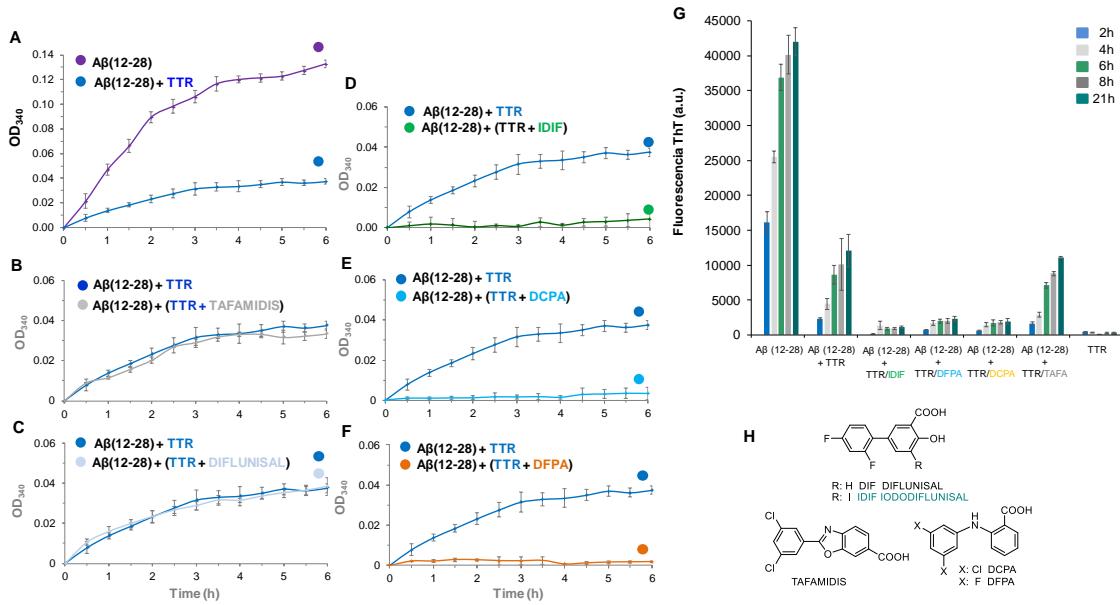


Figura X50: Estudios de agregación de A β (12-28): A) sola o en presencia de TTR; B) de TTR + IDIF; C) de (TTR + DCPA), D) (TTR + DFPA), F) Fluorescencia ThT de A β (12-28) sola, en complejo binario con TTR y en complejo ternario con TTR/IDIF, TTR/DCPA y TTR/DFPA.

La afinidad de unión en estos complejos se evaluó mediante ITC (Figura 51) y se observó que las constantes de disociación de los complejos ternarios con cada uno de los compuestos DCPA ($K_d = 1.14 \mu\text{M}$) y DFPA ($K_d = 0.56 \mu\text{M}$) eran similares a las del complejo ternario con IDIF ($K_d = 0.81 \mu\text{M}$). Lo que confirmaba de nuevo que DCPA y DFPA eran también chaperonas como el IDIF. Por el contrario, la K_d para el complejo ternario con tafamidis ($K_d = 2.8 \mu\text{M}$) y diflunisal ($K_d = 2.7 \mu\text{M}$) era similar a la del complejo binario TTR/A β (12-28) ($K_d = 3 \mu\text{M}$), lo que significaba que no eran chaperonas.

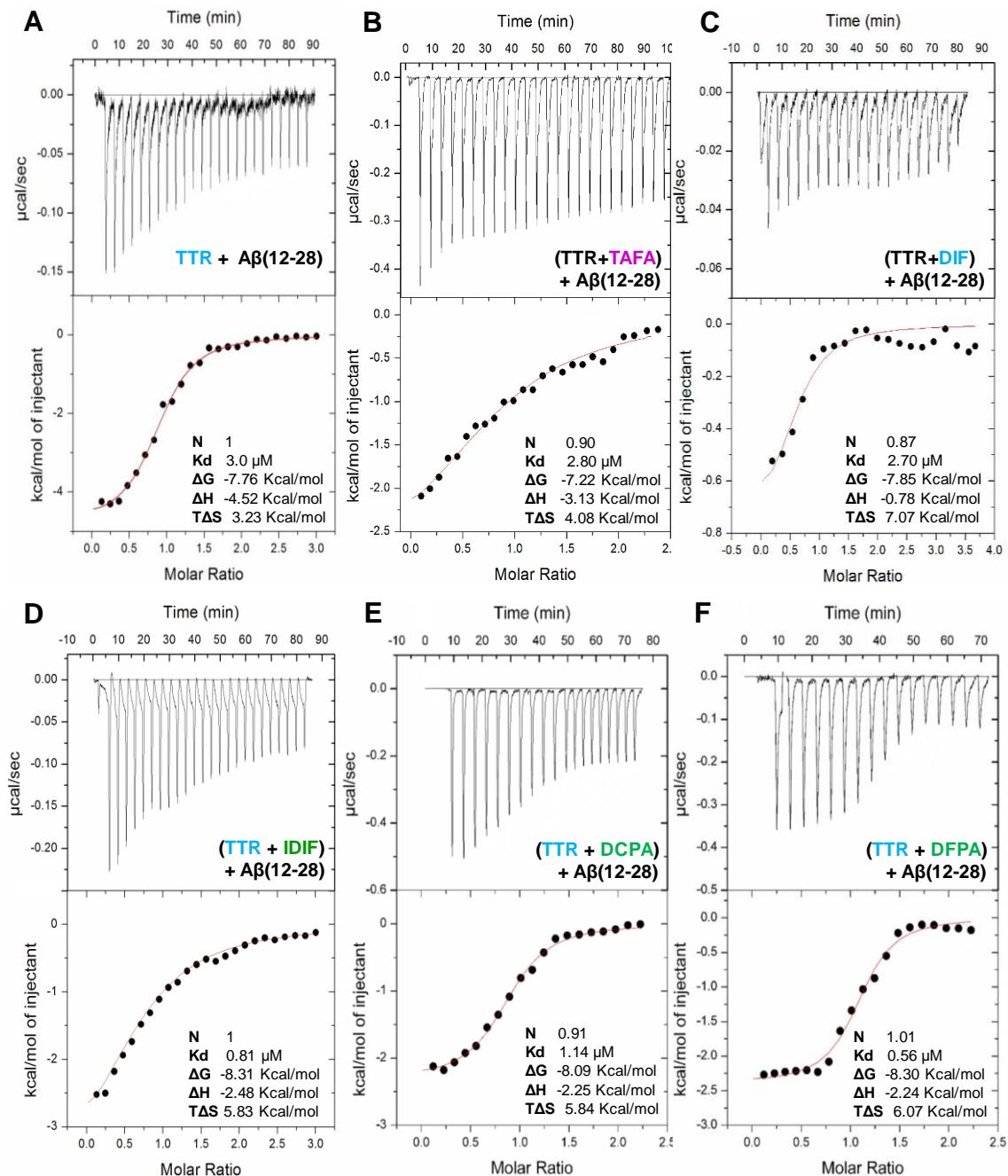


Figura X51: Termogramas de ITC de las interacciones: A) TTR/A β (12-28), B) TTR/TAFA+A β (12-28), C) TTR/DIF+A β (12-28), D) TTR/IDIF+A β (12-28), E) TTR/DCPA+A β (12-28) y F) TTR/DFPA+A β (12-28).

Tras estos resultados con la secuencia A β (12-28) empleada en el ensayo, se procedió a estudiar la agregación de A β (1-42) con ensayos de fluorescencia de tioflavina T. De nuevo, para estos estudios se optó por las ventajas de utilizar el depsipeptido A β (1-42) de la casa

comercial Genscript (ref.: RP10017) utilizado en el artículo 2 de esta tesis doctoral. Los resultados obtenidos con A β (1-42) eran similares a los de A β (12-28), los compuestos DCPA y DFPA reducían casi por completo la agregación de A β (1-42).

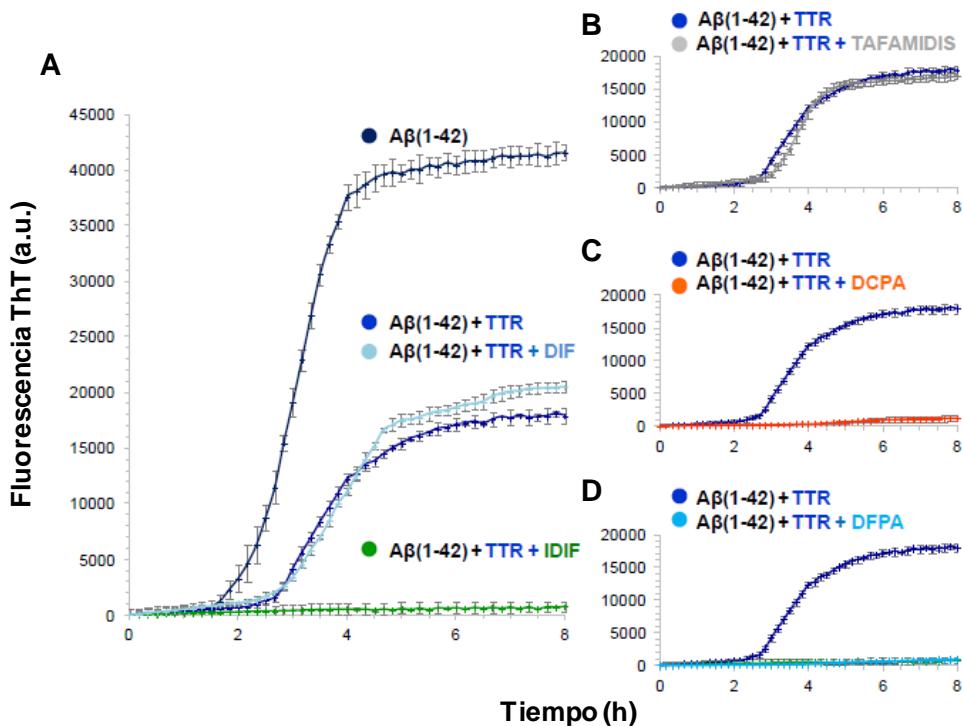


Figura 52. Ensayos de fluorescencia de thioflavina T para estudiar la agregación del péptido A β (1-42) (50 μ M), A) sólo o en presencia de TTR (2:1) o en presencia e TTR/DIF (2:1:2); B) En presencia de TTR/Tafamidis (2:1:2); C) En presencia de TTR/DCPA (2:1:2); D) En presencia de TTR/DFPA (2:1:2), en tampón HEPES a 25 mM, 10 mM glicina, pH 7.4, 5% DMSO (concentración final) y a 37 °C .

En este estudio se ha diseñado y validado un nuevo ensayo de cribado de moléculas pequeñas para saber si son chaperonas de la interacción TTR/A β . En el diseño ha sido clave el uso del péptido amiloide A β (12-28), péptido que posee características similares al péptido A β (1-42), pero es más estable y económico que el A β (1-42). El ensayo es robusto y reproducible ($Z' = 0.9$ para IDIF y $Z' = 0.87$ para TTR) y se ha adaptado en formato de cribado de alto rendimiento para su uso en microplaca de 96 pocillos. Los resultados han sido corroborados mediante ensayos de fluorescencia con Thioflavina T y estudios de ITC.

Capítulo 3. Resultados y discusión

Artículo 4: Targeting transthyretin in Alzheimer's disease: drug discovery of small-molecule chaperones as disease-modifying drug candidates for Alzheimer's disease.

Trabajo enviado para su publicación: Información confidencial.

En proyectos de descubrimiento de nuevos fármacos contra la enfermedad de Alzheimer (EA) se integran diferentes aproximaciones, ya sea experimentales como computacionales. Un punto de partida clave en el desarrollo de este trabajo ha sido el modelo virtual de la interacción TTR con la A β (1-42), creado a partir de estudios computacionales y de RMN (Gimeno et al., 2017).

En este proyecto se han empleado dos aproximaciones: el reposicionado de fármacos (utilizar fármacos conocidos para otras terapias) y la polifarmacología o aproximación multidiana (gracias a la interacción de un determinado ligando con diferentes dianas implicadas en una enfermedad).

Así pues, este trabajo parte de una selección de compuestos a partir de estas dos aproximaciones computacionales.

El punto de partida ha sido un cribado virtual de moléculas, existentes tanto en la literatura científica como en la base de datos Integrity, con estos criterios de búsqueda:

- Compuestos que se unen a TTR
- Ligandos peptídicos amiloideos
- Compuestos que a su vez pueden unirse a TTR y a péptidos amiloideos
- Compuestos en fase clínicas para el tratamiento de la EA utilizando la metodología de reposicionado.

Los estudios realizados indicaron la existencia de unas estructuras (*scaffolds*) privilegiadas. Con el modelo virtual creado para TTR/A β se realizó un primer cribado virtual. Un segundo cribado virtual complementario se llevó a cabo en base a una aproximación multidiana, con el fin de identificar moléculas que se unieran a TTR, pero también a otras dianas asociadas con la EA (p.e. acetil colinesterasa; APP; α - , β - y γ - secretasas; etc.).

Tras la obtención de una primera lista virtual de compuestos nuestro grupo hizo una selección de aquellos compuestos que o bien podían ser adquiridos a precios razonables de distintas casas comerciales o bien estaban disponibles en nuestro laboratorio, o bien

podían ser extraídos de fármacos adquiridos en una farmacia. Los 83 compuestos de esta nueva lista se enviaron al laboratorio de la Dra. Cardoso en Porto para averiguar qué compuestos se unían a TTR.

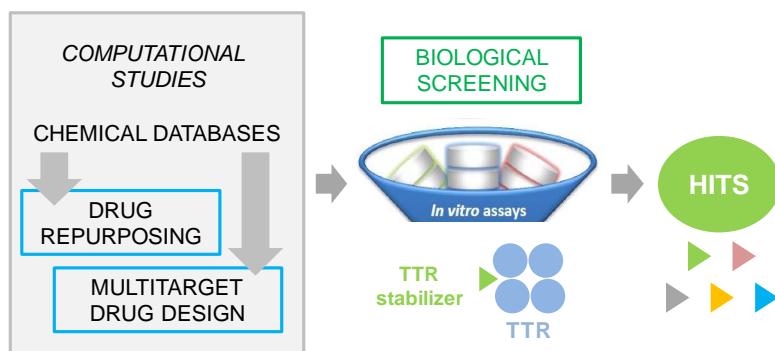


Figura 53: Combinación de estudios computacionales y ensayos biológicos para la obtención de las 53 moléculas a estudiar en esta tesis doctoral.

Se diseñó una batería de ensayos biológicos in vitro, tales como:

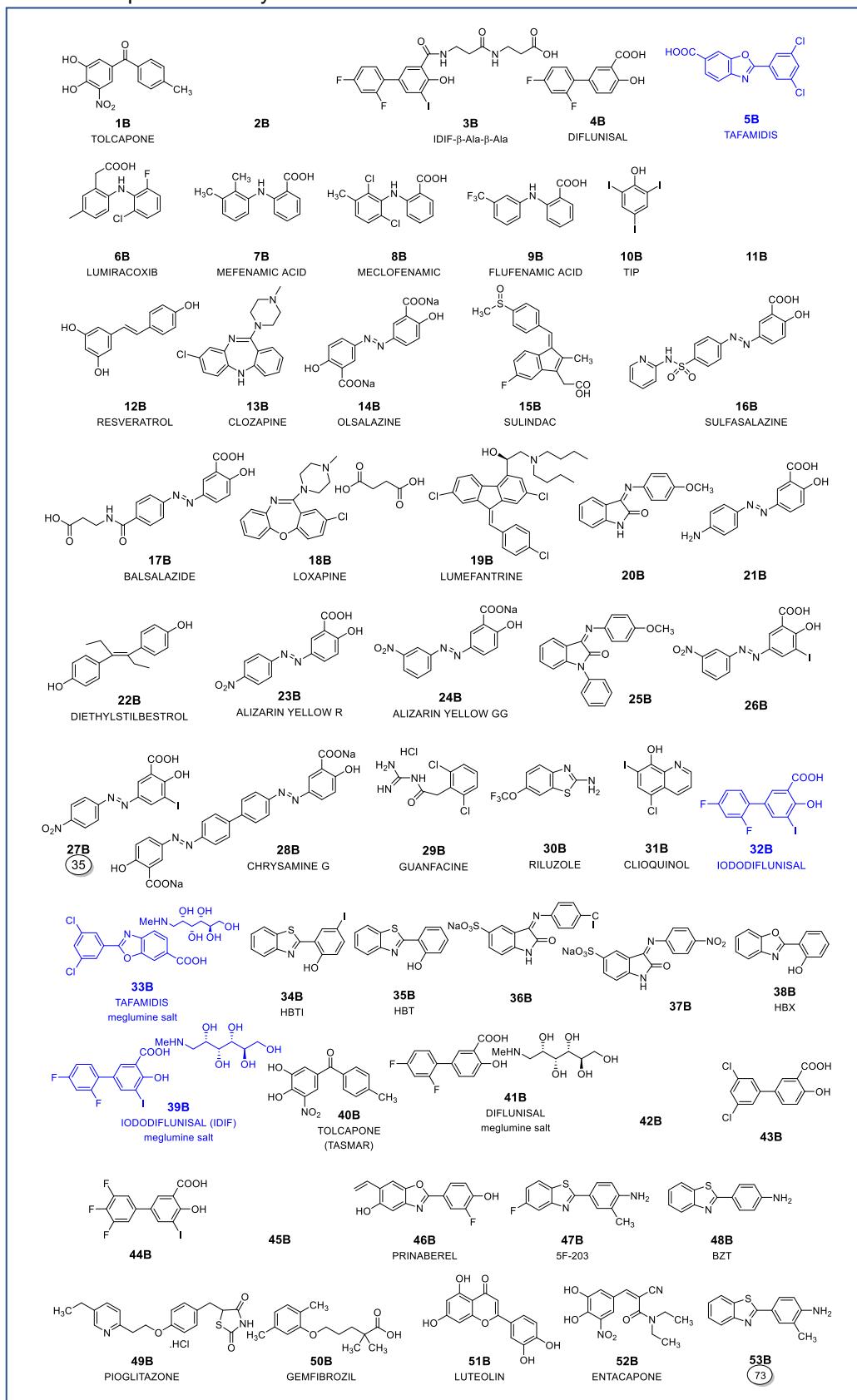
- a) Ensayo cualitativo de unión a TTR. El primer ensayo fue un ensayo competitivo cualitativo con el ligando endógeno de la TTR, la tiroxina (T4), marcado con ^{125}I . Aquellos compuestos capaces de unirse en el lugar de unión de T4 harían que la intensidad de la banda correspondiente al complejo $[^{125}\text{I}]\text{-T4/TTR}$ disminuyera. Además, al utilizar plasma humano como fuente de TTR nos permitía visualizar otras proteínas de unión a T4, tales como la albúmina (HSA) o la globulina de unión a tiroxina (TBG).
 - b) Ensayo cuantitativo para evaluar EC50 de cada compuesto. Se seleccionaron aquellas moléculas en las que la proporción EC50 T4/ EC50 era superior o igual a 0.5.
 - c) Ensayo de estabilidad de TTR. Todas aquellas moléculas que dieron resultado negativo en el ensayo competitivo a), se ensayaron en un test de estabilidad de TTR, ya que podía ser que no compitiesen en el sitio de unión de la T4 pero se unieran a TTR y la estabilizaran.



Figura 54: Tipo de compuestos que estabilizan el tetrámero de la TTR

Tras estos estudios biológicos *in vitro* se obtuvo una lista de 53 compuestos listos para ser ensayados en el ensayo desarrollado en la presente tesis doctoral (Tabla 6).

Tabla 6: Compuestos ensayados en esta tesis doctoral.



Cribado de moléculas

Las 53 moléculas fueron ensayadas utilizando el ensayo de cribado de alto rendimiento desarrollado en esta tesis doctoral (artículo 3, Figura 55).

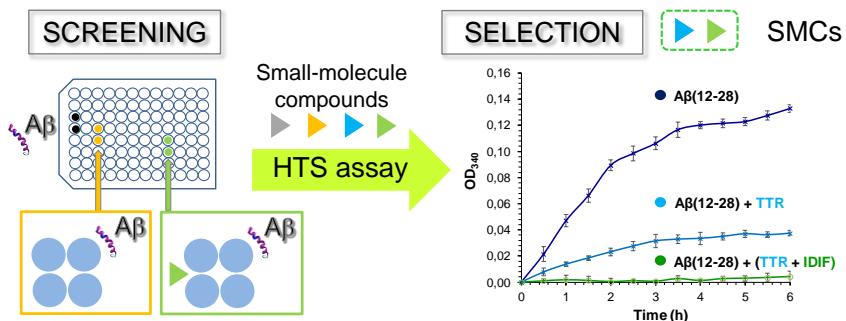


Figura 55: Cribado de alto rendimiento y selección de compuestos.

A continuación, tan solo se muestran las cinéticas de agregación de una selección representativa de los 53 compuestos (Figura 56). Los 53 compuestos fueron clasificados según la reducción de la agregación (RA (%)) (Tabla 7)

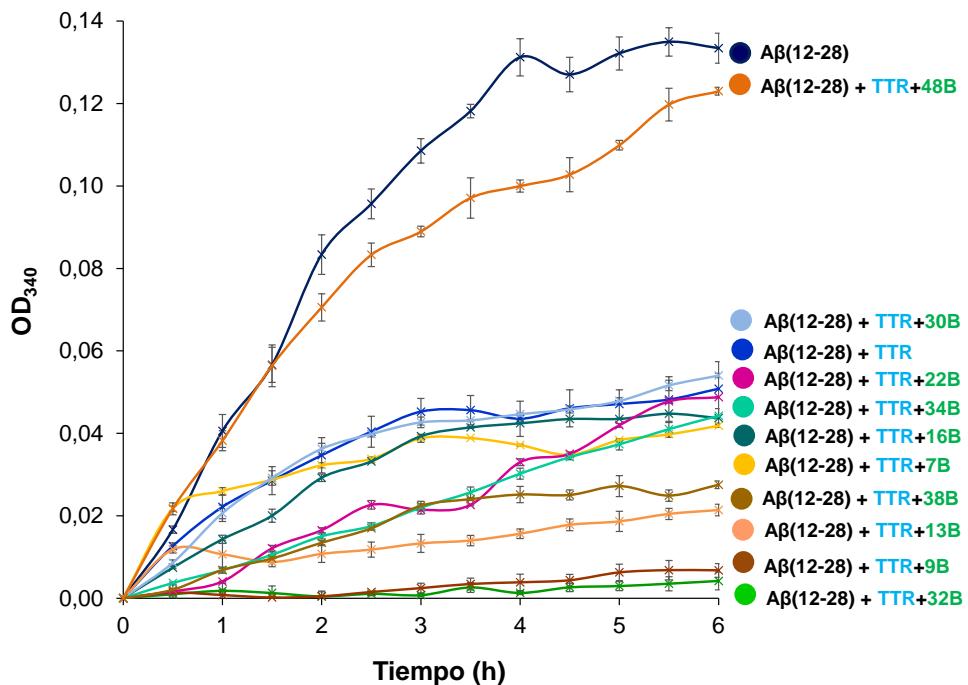


Figura 56. Cinéticas de agregación de A_β(12-28) a) el péptido solo; b) en presencia de TTR; c) en presencia de TTR tras ser incubada con una molécula pequeña. La curva representa las lecturas realizadas cada 30 min, en total 13 cada curva. El número de réplicas para los controles es n =8 y n= 5 para cada compuesto a ensayar. El análisis estadístico se ha realizado en base a un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 7: Resultados obtenidos

#	Experimento	Abs (final)	RA (%)
	Aβ(12-28)	0,124	-
	TTR +Aβ(12-28)	0,044	74
1B	TTR + 1B + Aβ(12-28)	0,032	79
2B	TTR + 2B + Aβ(12-28)	0,007	95
3B	TTR + 3B + Aβ(12-28)	0,030	81
4B	TTR + 4B + Aβ(12-28)	0,034	78
5B	TTR + 5B + Aβ(12-28)	0,043	74
6B	TTR + 6B + Aβ(12-28)	0,037	77
7B	TTR + 7B + Aβ(12-28)	0,037	77
8B	TTR + 8B + Aβ(12-28)	0,032	79
9B	TTR + 9B + Aβ(12-28)	0,014	90
10B	TTR + 10B + Aβ(12-28)	0,021	86
11B	TTR + 11B + Aβ(12-28)	0,018	88
12B	TTR + 12B + Aβ(12-28)	0,053	70
13B	TTR + 13B + Aβ(12-28)	0,014	90
14B	TTR + 14B + Aβ(12-28)	0,012	91
15B	TTR + 15B + Aβ(12-28)	0,009	93
16B	TTR + 16B + Aβ(12-28)	0,044	74
17B	TTR + 17B + Aβ(12-28)	0,054	70
18B	TTR + 18B + Aβ(12-28)	0,033	79
19B	TTR + 19B + Aβ(12-28)	0,008	94
20B	TTR + 20B + Aβ(12-28)	0,042	75
21B	TTR + 21B + Aβ(12-28)	--*	--
22B	TTR + 22B + Aβ(12-28)	0,049	72
23B	TTR + 23B + Aβ(12-28)	0,057	69
24B	TTR + 24B + Aβ(12-28)	0,047	73
25B	TTR + 25B + Aβ(12-28)	0,031	80
26B	TTR + 26B + Aβ(12-28)	0,041	75
27B	TTR + 27B + Aβ(12-28)	0,044	74
28B	TTR + 28B + Aβ(12-28)	0,043	74
29B	TTR + 29B + Aβ(12-28)	0,057	69
30B	TTR + 30B + Aβ(12-28)	0,055	69
31B	TTR + 31B + Aβ(12-28)	0,058	68
32B	TTR + 32B + Aβ(12-28)	0,001	99
33B	TTR + 33B + Aβ(12-28)	0,042	75
34B	TTR + 34B + Aβ(12-28)	0,034	78
35B	TTR + 35B + Aβ(12-28)	0,047	73
36B	TTR + 36B + Aβ(12-28)	--	--
37B	TTR + 37B + Aβ(12-28)	--	--
38B	TTR + 38B + Aβ(12-28)	0,028	82
39B	TTR + 39B + Aβ(12-28)	0,006	95
41B	TTR + 41B + Aβ(12-28)	0,037	77
42B	TTR + 42B + Aβ(12-28)	0,004	97
43B	TTR + 43B + Aβ(12-28)	0,027	82
44B	TTR + 44B + Aβ(12-28)	0,042	75
45B	TTR + 45B + Aβ(12-28)	0,007	95
46B	TTR + 46B + Aβ(12-28)	0,051	71
47B	TTR + 47B + Aβ(12-28)	0,058	68
48B	TTR + 48B + Aβ(12-28)	0,126	0
49B	TTR + 49B + Aβ(12-28)	0,097	56
50B	TTR + 50B + Aβ(12-28)	0,079	61
51B	TTR + 51B + Aβ(12-28)	0,003	98
52B	TTR + 52B + Aβ(12-28)	0,119	0
53B	TTR + 53B + Aβ(12-28)	0,061	67

*Problemas de solubilidad

Según el ensayo de cribado, entre los mejores compuestos se encontraron los siguientes cinco compuestos estabilizadores de la TTR: tres fármacos registrados, el sulindac, la olsalazina y el ácido flufenámico; el producto natural luteolina, que se encuentra en fases clínicas; y nuestra molécula líder el IDIF. Otros cuatro compuestos dieron muy buenos resultados, pero no se muestran en esta tesis por razones de protección intelectual. La Figura 57 muestra las cinéticas de agregación de los complejos ternarios TTR/compuesto/A β (12-28) con estas cinco moléculas. En la Figura 57C se presenta la cinética del complejo ternario con diflunisal (DIF), como puede observarse este compuesto no redujo la agregación del complejo binario (En la discusión de los artículos 2 y 3 se menciona que el DIF no es chaperona).

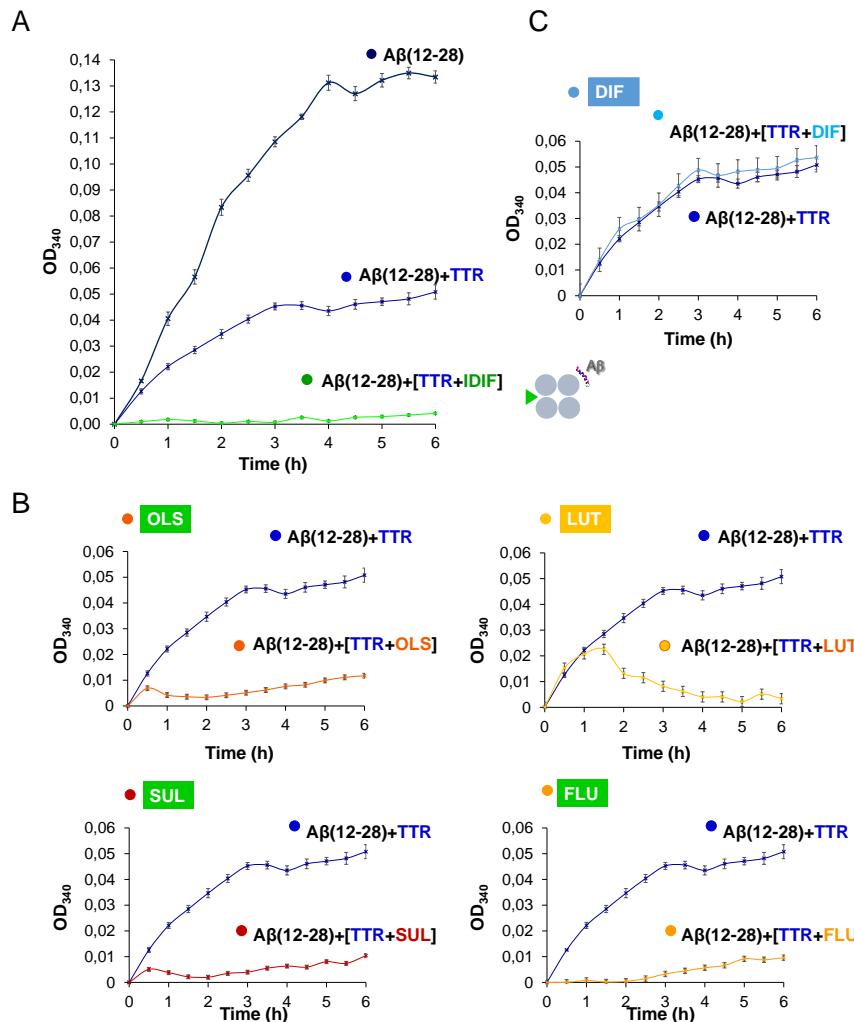


Figura 57: Cinéticas de agregación de A β (12-28) A) el péptido solo; B) en presencia de TTR tras ser incubada con cada chaperona (OLS, LUT, SUL, FLU); C) en presencia de TTR+DIF.

Para corroborar los resultados de las mejores moléculas resultantes del cribado se obtuvo el perfil termodinámico completo de las interacciones ternarias mediante ITC (Figura 58). Los resultados de ITC confirmaron que luteolina (LUT), sulindac (SUL), olsalazina (OLS) y ácido flufenámico (FLU) eran chaperonas ($K_d = 0.8$ para LUT; 0.73 para SUL; 0.97 para OLS y $1.83 \mu\text{M}$ para FLU) ya que la afinidad de unión era similar a la del IDIF en el complejo ternario ($K_d = 0.81 \mu\text{M}$).

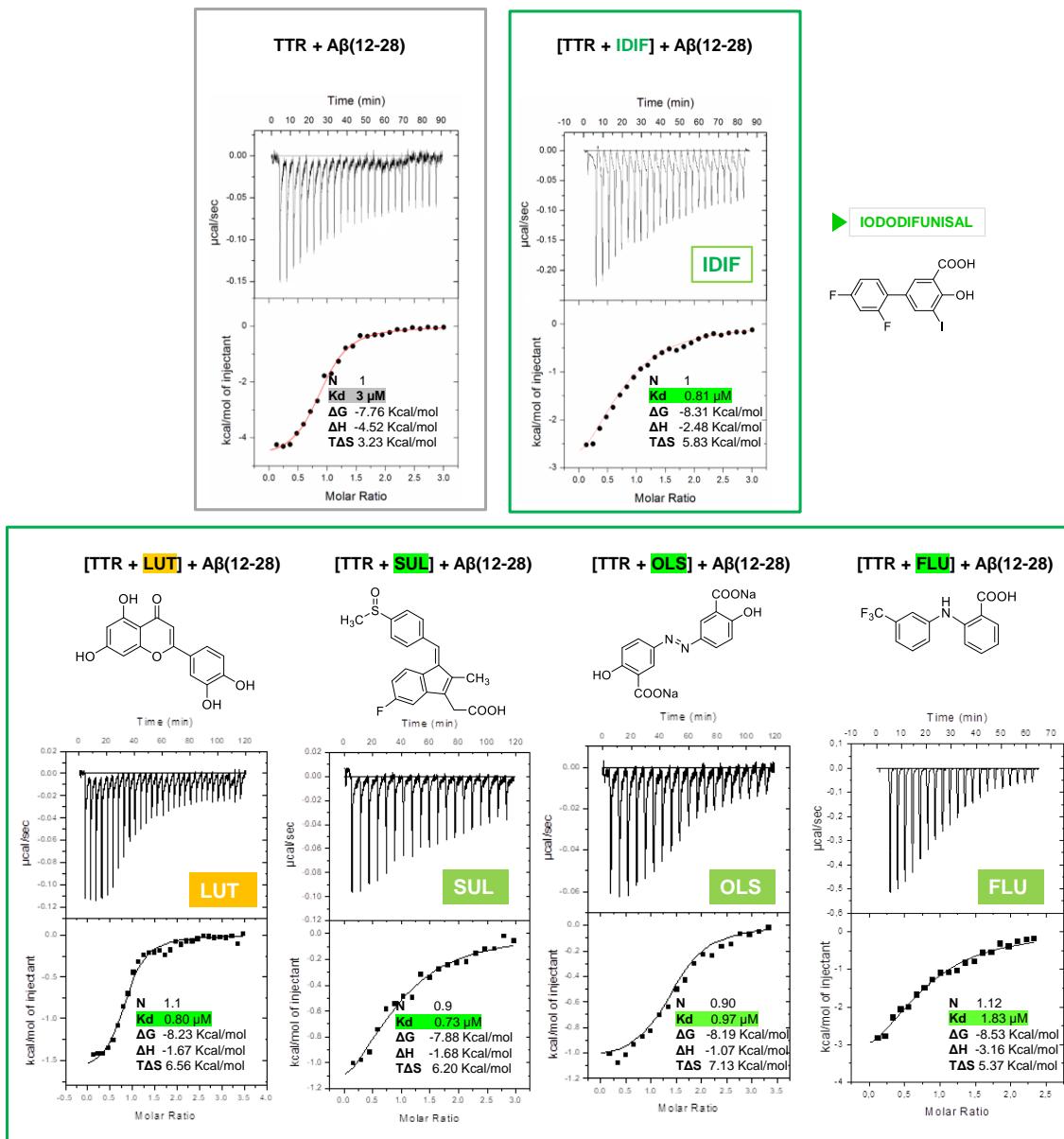


Figura 58: ITC del complejo binario A_β(12-28) + TTR; ITC de los complejos ternarios [A_β(12-28)+(TTR + SMC)] siendo las chaperonas (SMCs): IDIF, LUT, SUL, OLS, y FLU.

Cabe señalar que mediante ITC también se estudió la afinidad de unión de estas moléculas a la TTR (complejos binarios TTR/molécula) comprobándose que todas ellas poseían unas constantes de disociación ($K_d = 0.02 / 0.76$ para LUT; 0.52 para SUL; 0.48 para OLS y 0.20 μM para FLU) (Figura 59A) del mismo orden que los mejores estabilizadores de la TTR ($K_d = 0.20$ para Tafamidis; 0.27 para Tolcapone; 0.9 para DIF y 0.12 μM para IDIF) (Figura 59B). En esta tesis doctoral se describe por primera vez el perfil termodinámico de la interacción de la olsalazina con la TTR, lo que significa que se ha descubierto un nuevo estabilizador del tetrámero de la TTR.

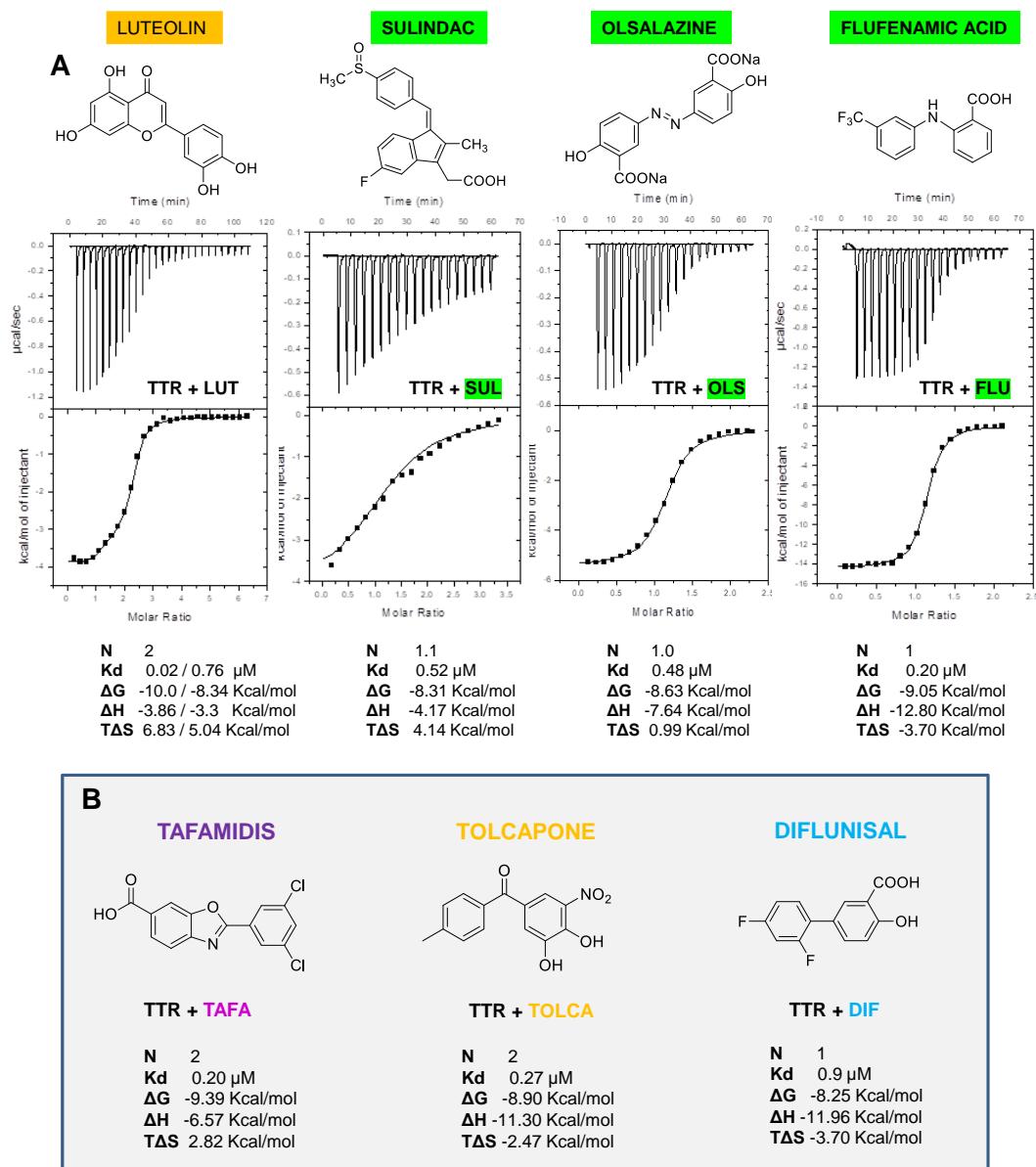


Figura 59: A) ITC de los complejos binarios TTR+ LUT; TTR+ SUL; TTR+ OLS, TTR, FLU; B) Perfil termodinámico de los complejos binarios: TTR+ TAFAMIDIS; TTR+ Tolcapone; y TTR+ Diflunisal.

Posteriormente, se valoraron las afinidades de unión de las chaperonas obtenidas en los complejos ternarios esta vez de A β (1-40) (Figura 60). El efecto chaperona observado en la interacción ternaria con A β (12-28) también se observó con A β (1-40). La interacción binaria TTR/A β (1-40) tiene una Kd = 6.49 μ M, y esta Kd se reduce en las interacciones ternarias con cada una de las chaperonas Kd = 1.52 μ M para LUT; Kd = 3.42 μ M para SUL; Kd = 0.81 μ M para OLS y Kd = 2.34 μ M para FLU).

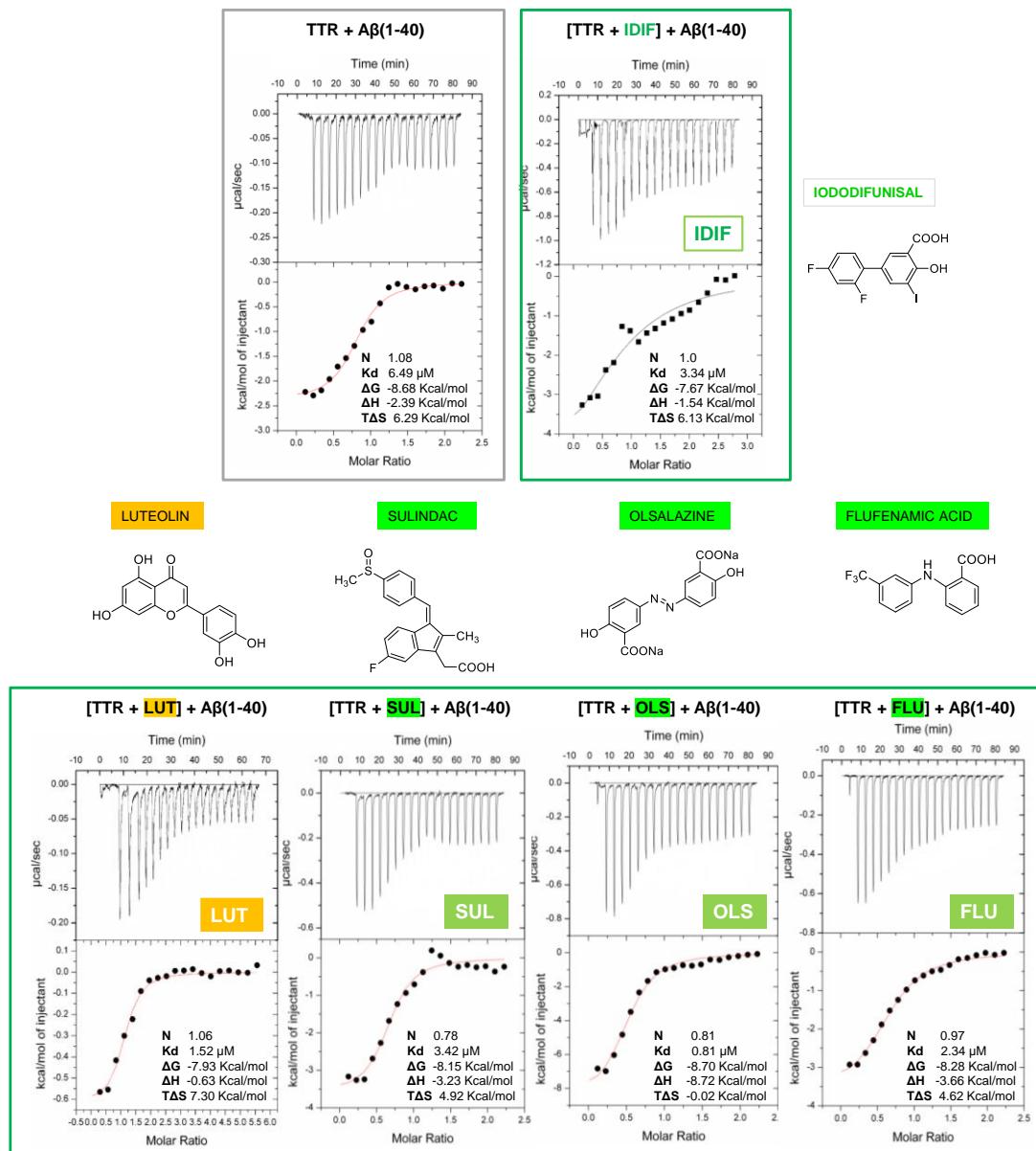


Figura 60: ITC de los complejo binario A β (1-40) + TTR; ITC de los complejos ternarios [A β (1-40)+(TTR + SMC)] siendo las chaperonas (SMCs): IDIF, LUT, SUL, OLS, y FLU.

Finalmente, se realizaron estudios complementarios de fluorescencia de Tioflavina T, para determinar las cinéticas de agregación de A β (1-42) en presencia de los complejos de TTR con cada una de las chaperonas encontradas. La proporción A β (1-42)/TTR/chaperona fue de (2:1:2) (Figura 61).

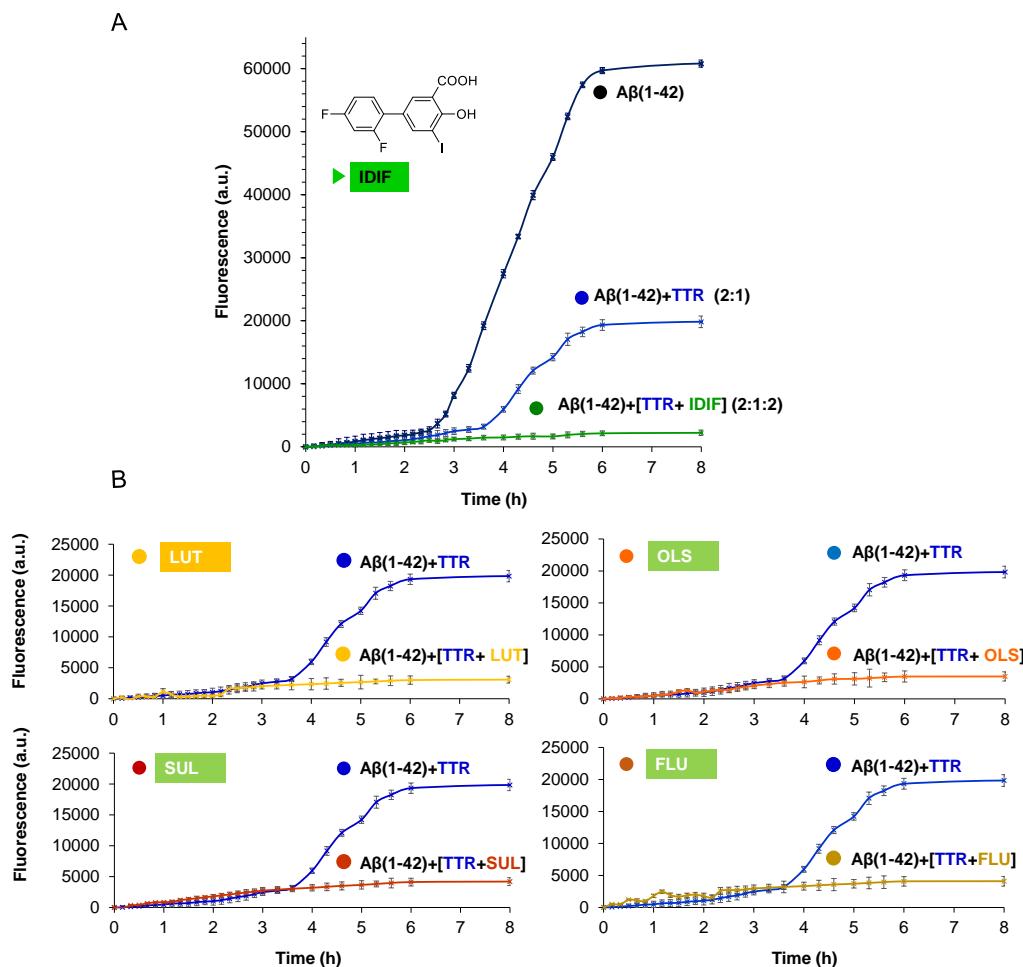
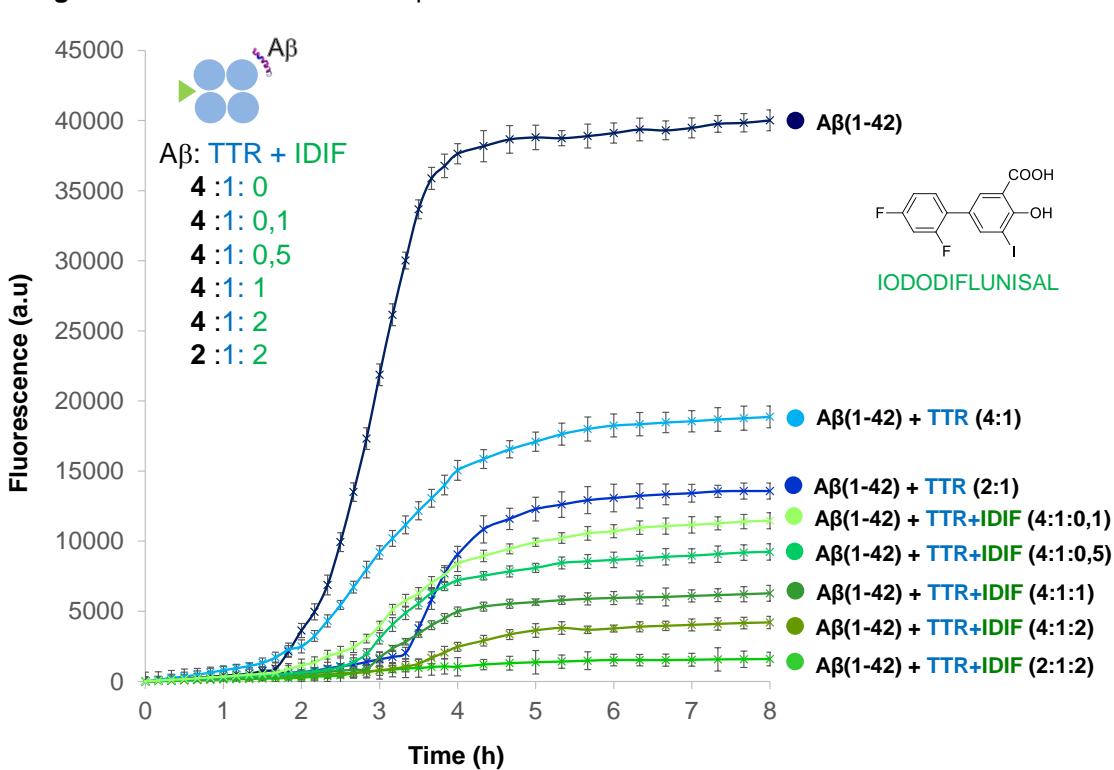
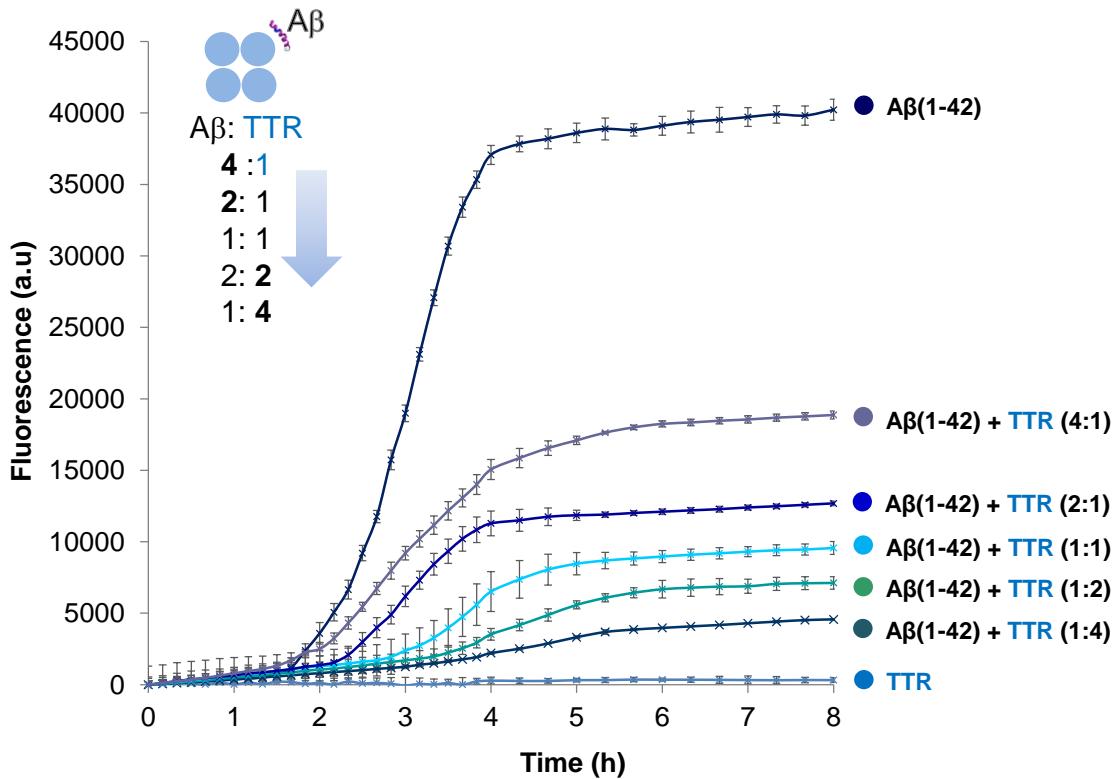


Figura 61: Cinéticas de agregación de A β (1-42) A) el péptido solo; en presencia de TTR; y en presencia de TTR+IDIF; B) en presencia de TTR tras ser incubada con cada chaperona.

Con estos resultados se abordó un estudio similar, pero en el que se estudió la variación de la concentración en cada una de las chaperonas (estudios de dosis-respuesta) (Figura 62). En este caso se optó por reducir la proporción entre la A β (1-42) y la TTR, fijándola a (4:1) y la concentración de cada chaperona se fue incrementando hasta llegar a una proporción A β (1-42)/TTR/chaperona de (4:1:2). El efecto dosis respuesta de la TTR en la interacción con A β (1-40) había sido descrito en 2020 por Ghadami y colaboradores (Ghadami et al., 2020). En esta tesis doctoral, se describe por primera vez el estudio dosis-respuesta de la TTR en la interacción con A β (1-42) y de IDIF como chaperona de TTR/A β (1-42) como chaperona dentro nuestro proyecto de descubrimiento de fármacos.



En resumen, uno de los objetivos del proyecto multidisciplinar de descubrimiento de fármacos era descubrir nuevas moléculas, que potenciasen la interacción TTR/A β , al igual que nuestra molécula líder IDIF. En una primera etapa, se seleccionaron una gran diversidad de moléculas mediante un cribado virtual que utilizó diferentes estrategias computacionales, entre ellas, el reposicionamiento de fármacos y la polifarmacología. La propuesta virtual fue evaluada para conocer la disponibilidad de las mismas en diferentes casas comerciales, así como también seleccionar aquellas que estuvieran disponibles en nuestro laboratorio gracias a un proyecto anterior. Las moléculas disponibles de la anterior selección virtual fueron evaluadas con diferentes ensayos biológicos *in vitro*, con tal de seleccionar aquellas moléculas que estabilizaran el tetrámero de la TTR, ya sea uniéndose en el lugar de unión del ligando endógeno o estabilizando a la proteína en otros puntos de unión. Tras la acción combinada de estudios computacionales y ensayos biológicos *in vitro* se obtuvo una lista de 53 de compuestos listos para su ensayo.

Colateralmente, entre estos compuestos se han encontrado tres nuevos estabilizadores de la TTR, no descritos antes (35, 73 y el fármaco olsazalina), dos de ellos con una estructura tipo azo (el compuesto 35 i la olsalazina).

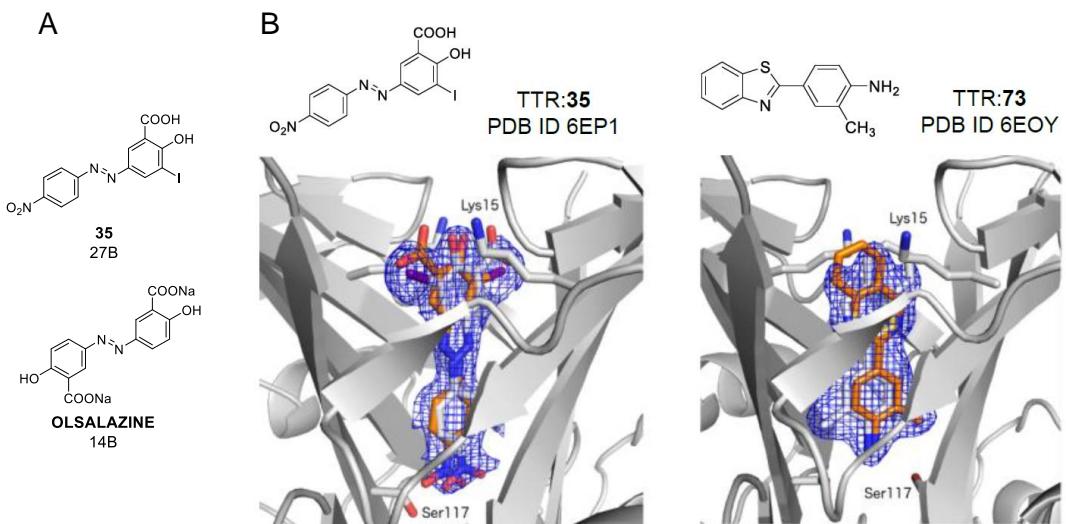


Figura 64: A) Estructuras químicas del compuesto **35** y de la olsalazina. B) Vista ampliada de las estructuras cristalinas de los complejos TTR:**35** (PDB ID 6EP1) y de TTR:**73** (PDB ID 6EOY).

En una segunda etapa, gracias al diseño y validación de un ensayo de cribado diseñado y validado en la presente tesis doctoral (artículo 3), se han ensayado cada una de las 53

moléculas provenientes de la combinación de estudios computacional y biológico. El cribado ha dado como resultado una lista priorizada de moléculas que se han estudiado mediante estudios complementarios, ya sea de ITC como de fluorescencia de ThT, no solo con el péptido A β (12-28), sino también con los péptidos A β (1-40) y A β (1-42). Entre las mejores chaperonas se encuentran: nuestra molécula líder, el IDIF, una molécula en la fase descubrimiento; el producto natural luteolina, un compuesto en estudios de fase clínica; y tres fármacos, la olsalazina, el sulindac y el ácido flufenámico, fármacos que podrían ser reposicionados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Capítulo 4. Discusión

Descubrimiento de nuevos compuestos estabilizadores de la estructura tetramérica inhibidores de la agregación de la TTR

Artículo 5: *Repurposing benz bromarone for Familial Amyloid Polyneuropathy: a new transthyretin tetramer stabilizer.*

Artículo 6: *Optimization of Kinetic Stabilizers of Tetrameric Transthyretin: A Prospective Ligand Efficiency-guided Approach*

En este apartado se presentan los puntos más importantes de los artículos publicados (artículos 5 y 6). El denominador común de ambos estudios es el descubrimiento de nuevos inhibidores de la agregación de la TTR.

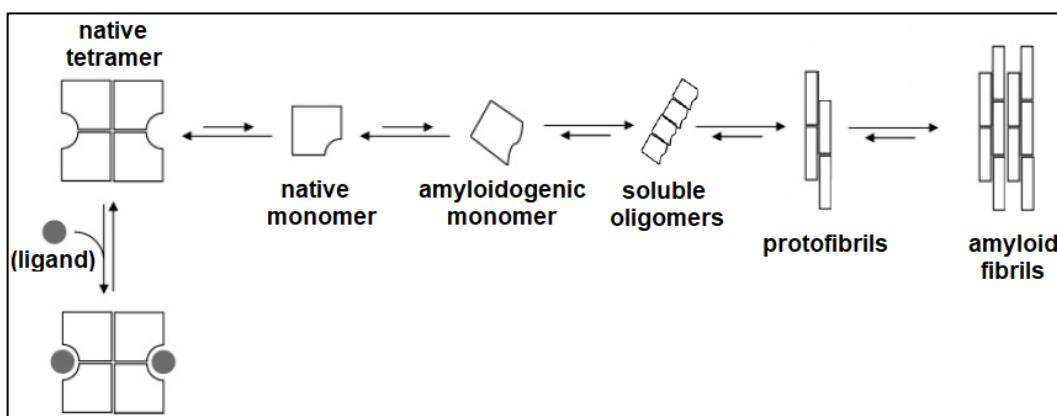


Figura 65. Mecanismo de inhibición de la formación de fibras mediante moléculas pequeñas. Las moléculas se unen a TTR en su conformación tetramérica, evitando su disociación y agregación mediante la estabilización cinética del tetrámero de TTR.

Para llevar a cabo estos estudios se han desarrollado dos objetivos:

- a) La producción de una mutante recombinante de la TTR, la Y78F rhTTR por sus propiedades amiloidogénicas.
- b) La evaluación *in vitro* de moléculas pequeñas como inhibidores de la fibrilogénesis de la TTR, mediante un ensayo cinético por turbidimetría, metodología desarrollada previamente en un proyecto anterior (Cotrina, E. Tesis de Máster IQS 2013), (Dolado et al., 2005)).

En esta tesis doctoral se han descubierto nuevos estabilizadores de la TTR y nuevos inhibidores de la fibrilogénesis de la TTR.

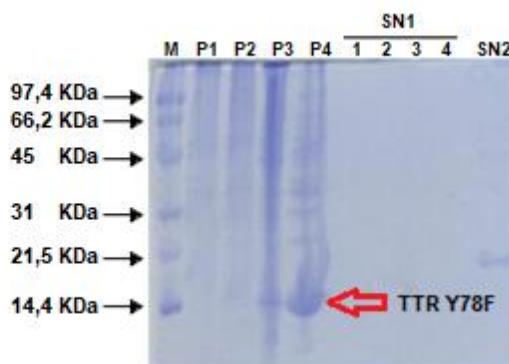
Producción de la proteína recombinante Y78F TTR

Para la producción de la proteína Y78F TTR el protocolo utilizado fue similar al que previamente se ha descrito en este trabajo para TTR (Apartado 5.1 (Cotrina, Vilà, Nieto, Arsequell, & Planas, 2020)).

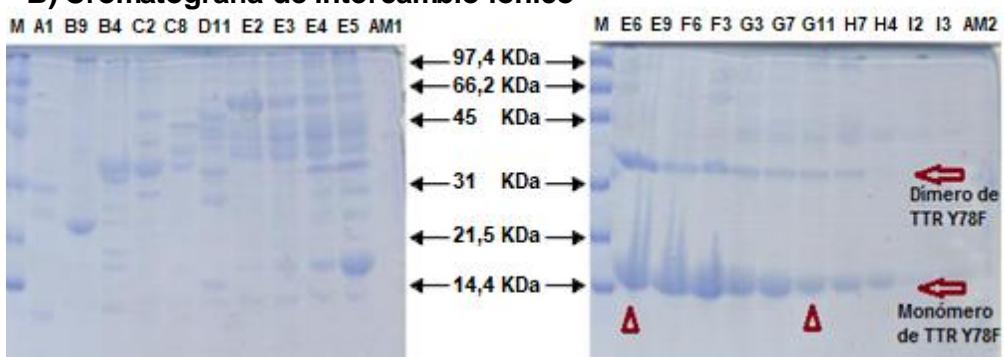
La proteína Y78F TTR es una variante altamente amiloidogénica y esta característica fue clave para poner a punto una metodología de cribado de alto rendimiento (HTS, *High throughout Screening*) para la evaluación de compuestos, en un ensayo cinético de 1.5 h de duración.

- D) La producción se llevó a cabo en el IQS-URL bajo la supervisión del Dr. A. Planas. Tras la expresión de la proteína recombinante de la Y78F TTR se procedió a su purificación. y control de calidad durante la producción de la proteína Y78F TTR. Se realizó un control de calidad por SDS-PAGE tras cada paso de purificación (Figura 66)

A) Precipitación fraccionada con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



B) Cromatografía de intercambio iónico



C) Cromatografía de gel filtración

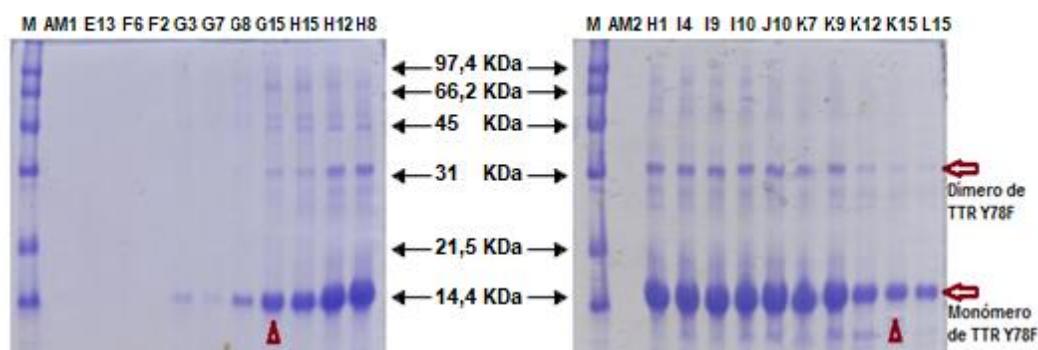


Figura 66. Análisis por SDS-PAGE (14% acrilamida) de las etapas de purificación de la proteína Y78F. M: marcador de peso molecular de referencia (Range protein Standard, Bio-Rad Laboratories). (A) Precipitación por precipitación con sulfato de amonio, P1-P4, análisis del precipitado, P4 es el precipitado a 85% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ donde se observa la proteína, SN2 es el sobrenadante del P4, SN1, sobrenadante del medio de cultivo tras la separación de las células. (B) Purificación por cromatografía de intercambio iónico, análisis de las fracciones recogidas, E6-G12 presentan mayoritariamente la proteína, el volumen de las fracciones es de 240 mL. (C) Purificación por cromatografía de gel filtración, análisis de las fracciones recogidas, G15-K15 presentan mayoritariamente la proteína, el volumen de las fracciones es de 75mL.

Antes de liofilizar la proteína (Figura 67), se realizó un análisis por espectrometría de masas (MALDI-ToF-MS). En el espectro de la proteína se observaron dos picos, uno de 13913.2 Da, que corresponde a la proteína, y otro pico a 14184.9, que corresponde a la proteína en su forma S-glutationada (modificación en el único aminoácido cisteína (Cys-10) de la TTR). El análisis por SDS-PAGE de la muestra antes de ser liofilizada mostró que la proteína mutante Y78F TTR tenía una pureza superior al 95%.

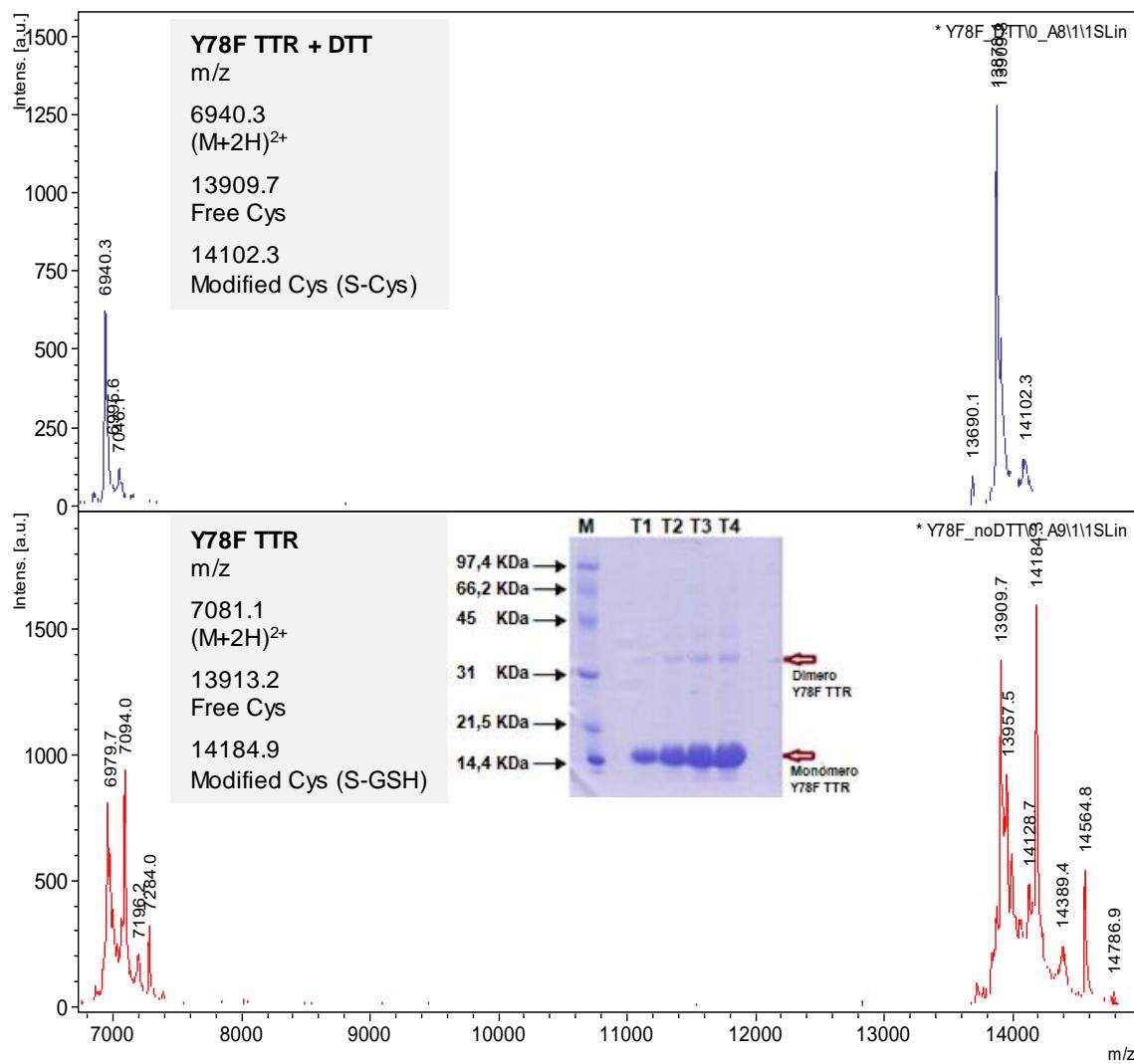


Figura 67. Espectro de masas MALDI-ToF-MS de la proteína Y78F TTR. En la parte inferior espectro de la proteína resultante y en la parte superior muestra tratada con 1,4-ditiotreitol (DTT). Dentro del espectro de la proteína no tratada con DTT, se muestra el análisis por SDS-PAGE (14% acrilamida) de la proteína Y78F TTR de pureza >95%. M: marcador de peso molecular de referencia (Range protein Standard, Bio-Rad Laboratories). De T1 a T4 diferentes concentraciones de proteína de 9, 18, 27, 36 µg/mL respectivamente.

El rendimiento en la producción de Y78F TTR fue de 80 a 90 mg/L. Para los ensayos se utilizó la Y78F TTR tal como se obtuvo, es decir en su forma modificada, ya que en estudios realizados anteriores se había observado que ambas proteínas, Y78F TTR modificada y no modificada, seguían patrones de fibrilogénesis similares (Cotrina, Vilà, et al., 2020).

Ensayos de inhibición de la fibrilogénesis de la TTR de nuevas moléculas

Las moléculas evaluadas proceden de dos estudios diferentes. El primer estudio está relacionado con un fármaco en concreto, la benzboronarona (BBM), molécula que contiene una estructura de dibromofenol. En el segundo estudio se evalúan diferentes análogos de nuestra molécula líder, el IDIF, con la finalidad de optimizar sus propiedades como inhibidor de la fibrilogénesis de la TTR. Esta optimización se realizó aplicando una nueva metodología de química médica basada en los índices LEI (*Ligand Efficiency Indexes*)

El ensayo cinético turbidimétrico

La producción de la proteína mutante Y78F TTR, una variante con una alta capacidad amiloidogénica, tiene como finalidad ser utilizada en el estudio de nuevas moléculas como potenciales inhibidores de la fibrilogénesis de TTR.

Esta característica permite obtener formación de fibras en un corto periodo de tiempo (1.5 h), además facilita calcular la velocidad inicial (v_0), de la curva de agregación ($\text{Abs}_{340\text{nm}}$ vs tiempo). Por lo tanto, es una proteína adecuada para cribado de alto rendimiento (HTS, *High Throughput Screening*) de nuevos compuestos, a partir del cual se obtiene dos parámetros el IC_{50} y el RA (%).

El ensayo se desarrolla en dos etapas: la primera es una etapa de incubación de 0.5 h y la segunda es la etapa de formación de fibras de 1.5 h, inducida por un cambio de pH. Cada etapa es monitorizada midiendo la absorbancia a 340 nm (Abs_{340}) mediante turbidimetría

Para cada compuesto se representan los datos de Abs_{340} frente al tiempo. De las curvas obtenidas se calcula la velocidad inicial (v_0) de formación de fibras, que corresponde a la pendiente del incremento lineal de la absorbancia. Los valores de velocidad inicial v_0 (AU/h) frente a la concentración (I , μM) del inhibidor se ajustan a una función exponencial inversa (ecuación 1). En esta ecuación se definen los siguientes valores como: A, la velocidad de

agregación residual a altas concentraciones de inhibidor (μM); B es la disminución máxima de la velocidad inicial de formación de fibras (uA/h); A+B es la velocidad de formación de fibras en ausencia de inhibidor; y C es la constante exponencial (μM^{-1})

$$\text{Ecuación 1} \quad V_0 = A + B \cdot e^{-C \cdot [I]}$$

Para la evaluación de los compuestos fueron aplicados dos parámetros:

- El IC_{50} (μM), que describe la concentración de inhibidor a la cual la velocidad de formación de fibras (v_0) se reduce a la mitad respecto a una en ausencia de inhibidor, (ecuación 2).

$$\text{Ecuación 2} \quad IC_{50} = -\frac{1}{C} \cdot \ln\left(\frac{B-A}{2B}\right)$$

- El RA (%), es el porcentaje de reducción de fibras a altas concentraciones de inhibidor respecto en ausencia de inhibidor.

$$\text{Ecuación 3} \quad RA \% = \left(\frac{B}{A+B} \right) \cdot 100$$

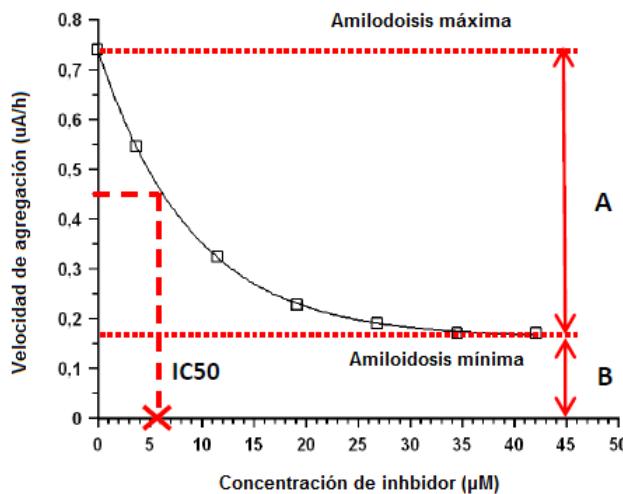


Figura 68. Gráfico de representación de la velocidad de agregación frente la concentración de inhibidor para el modelo exponencial.

El desarrollo de un método de evaluación de moléculas robusto y reproducible necesita que los componentes a analizar cumplan las mismas características. En este trabajo se quiso evaluar la reproducibilidad en la calidad y caracterización de la proteína recombinante Y78F TTR en diferentes lotes de producción.

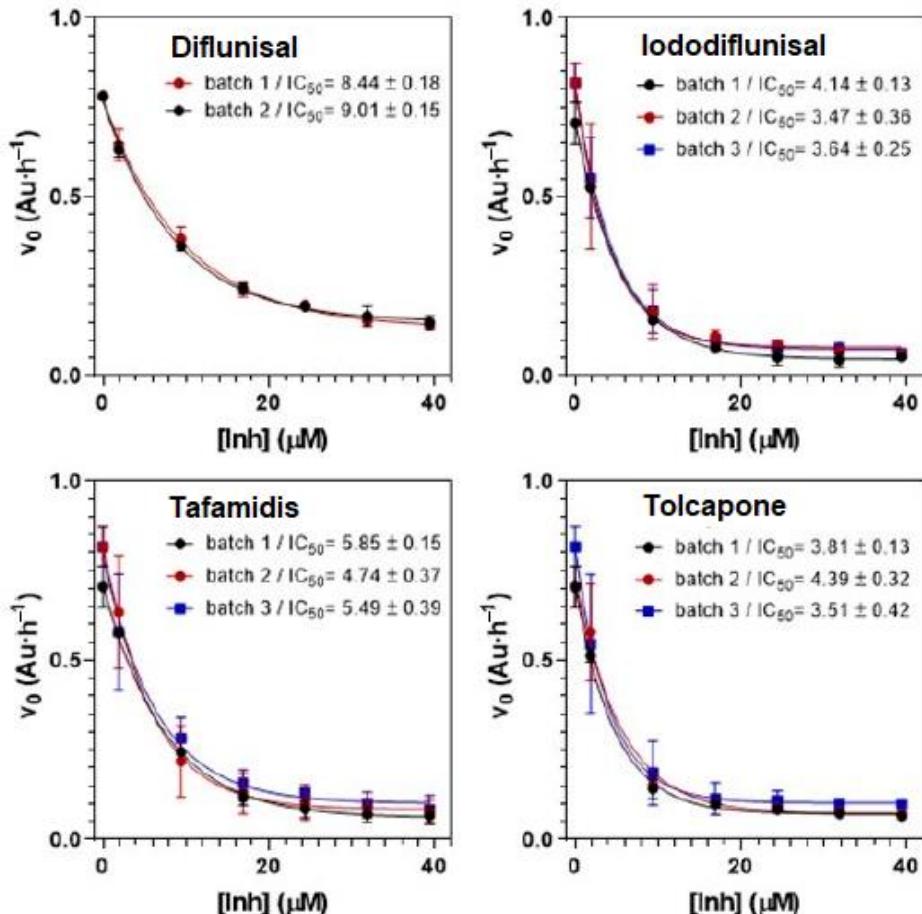


Figura 69. Inhibición de la fibrilogénesis de Y78F TTR. Análisis de IC_{50} de potentes inhibidores de la fibrilogénesis de Y78F TTR y su reproducibilidad en diferentes lotes de producción de la proteína.

Los resultados demuestran una excelente reproducibilidad en su caracterización, como su potencial amiloidogénico, cualidades necesarias para la evaluación de la capacidad de inhibición de los compuestos (Cotrina, Vilà, et al., 2020).

La benzborbromarona, un fármaco uricosúrico, nuevo estabilizador de la TTR

Tal como se ha comentado en la Introducción de esta tesis existen más de 400 estructuras cristalinas de la TTR depositadas en el banco de datos Protein Data Bank (Berman et al., 2000). La gran mayoría son estructuras de complejos binarios de la TTR con moléculas pequeñas. Todo este extenso trabajo había servido para caracterizar los puntos de unión a la TTR. Una característica principal de estos complejos, tal como se ha comentado en la Introducción, es la presencia de 3 cavidades de unión a halógeno (HBP, *halogen binding pockets*) en los que se puede acomodar el ligando endógeno, es decir, la tiroxina (hormona tiroidea). Los bolsillos más profundos son los HBP3 y HPB3' y lo los más externos los HBP1 y HPB1' (Cotrina et al., 2013).

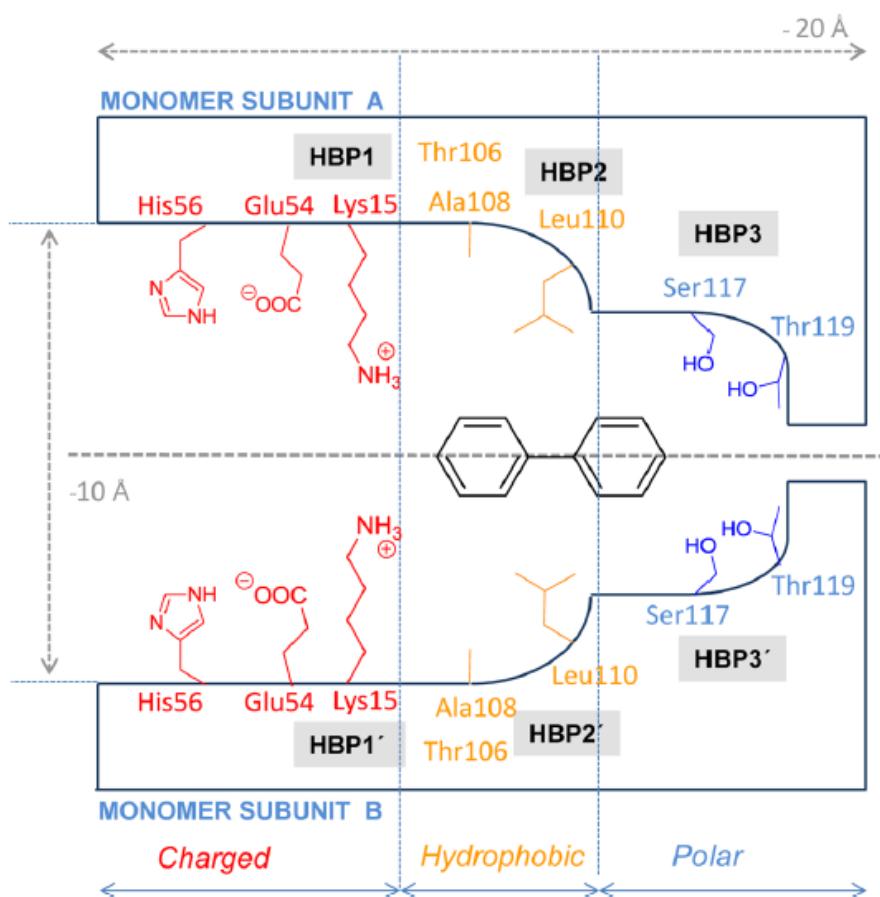


Figura 70: Representación del sitio de unión de TTR, mostrando las tres regiones químicas y sus correspondientes cavidades de unión a halógenos (HBPs) (Cotrina et al., 2013).

Tras una exploración de la base de datos se puede constatar que un buen número de estas moléculas son compuestos fenólicos halogenados. Entre ellos se encuentra un compuesto que se emplea como retardante de llamas, el tetrabromobisfenol A (TBBPA).

El TBBPA había sido estudiado por el grupo del Dr. Anders Olofsson de la Universidad de Umeå (Suecia). Estos investigadores habían descrito que el TBBPA se unía a la TTR en el sitio de unión a la T4 y que los dos átomos de bromo del dibromofenol ocupaban 2 de los 3 bolsillos de unión a halógeno. Además, el TBBPA se unía a TTR en el plasma humano de forma muy selectiva a TTR, de forma similar a Tafamidis, otro estabilizador de la TTR designado como fármaco huérfano para FAP.

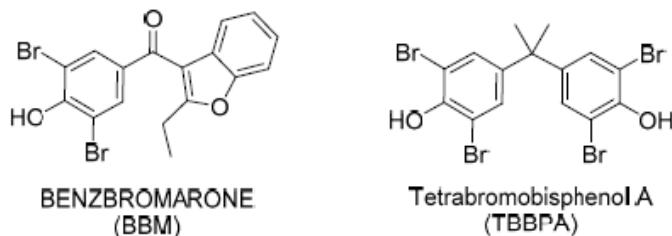


Figura 71. Estructuras químicas de las dos moléculas que comparten la estructura de dibromofenol: el fármaco benzboromarona (BBM) y el compuesto tetrabromobisfenol A.

Así pues, en nuestro trabajo seleccionamos la benzboromarona (BBM), un fármaco registrado para combatir la uricosuria, que contenía al igual que el TBBPA una estructura de dibromofenol. Con este compuesto primero queríamos averiguar si era un buen estabilizador de la forma tetramérica de la TTR, para este fin se realizaron experimentos para saber qué especies se mantenían después del tratamiento con urea. La BBM resultó ser un buen estabilizador de la TTR, similar a nuestra molécula líder el IDIF. Tras averiguar que la BBM era una molécula estabilizadora del tetrámero de la TTR, era necesario también saber si se unía en la zona de unión del ligando endógeno es decir la tiroxina. Los experimentos de competición con tiroxina radiactiva (¹²⁵I-T4) reflejaron un comportamiento similar a IDIF y, por tanto, la BBM estabilizaba la TTR uniéndose en el mismo sitio de unión que el ligando endógeno T4 (EC₅₀T4/EC₅₀ compuesto eran 1.06 y 0.96, para BBM e IDIF, respectivamente). La estructura cristalina del complejo TTR/BBM corroboró estos resultados anteriores. En comparación con la estructura del TBBPA la BBM se adentra más en la cavidad de unión a la TTR. En la BBM, los dos átomos de bromo ocupan las zonas más internas del bolsillo de la zona de unión de T4 en la TTR (HBP3-HBP3'). La unión del ligando induce una rotación de las cadenas laterales de los residuos de Ser117, lo que conduce a una mayor unión entre los monómeros.

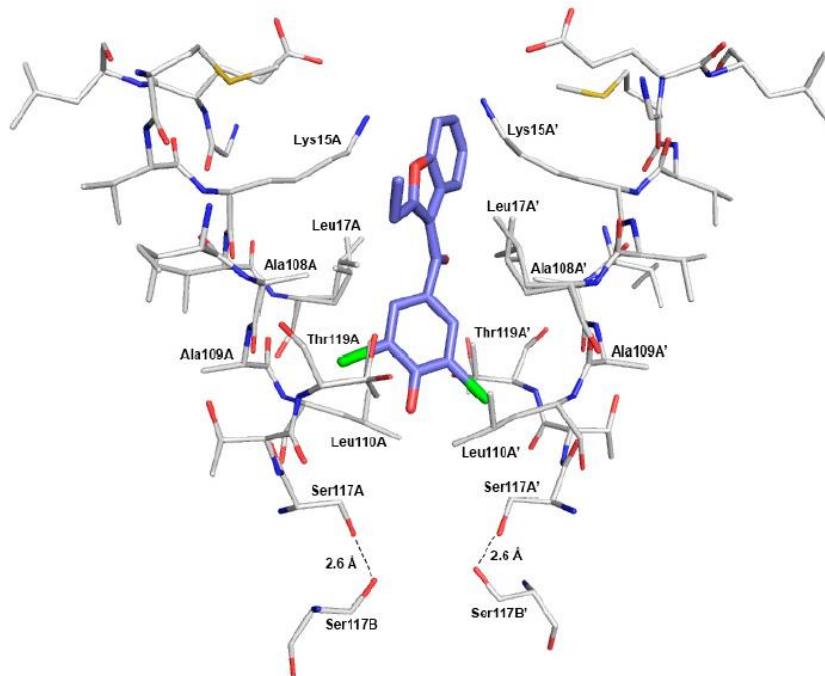


Figura 72. Representación del sitio de unión de TTR en interacción con BBM. Descripción de la posición de los aminoácidos AA' (PDB ID 7ACU)

Posteriormente, se obtuvo el perfil termodinámico de la unión de BBM a TTR mediante la técnica *Isothermal Titration Calorimetry* (ITC) y se compararon estos datos con los de los mejores estabilizadores de TTR

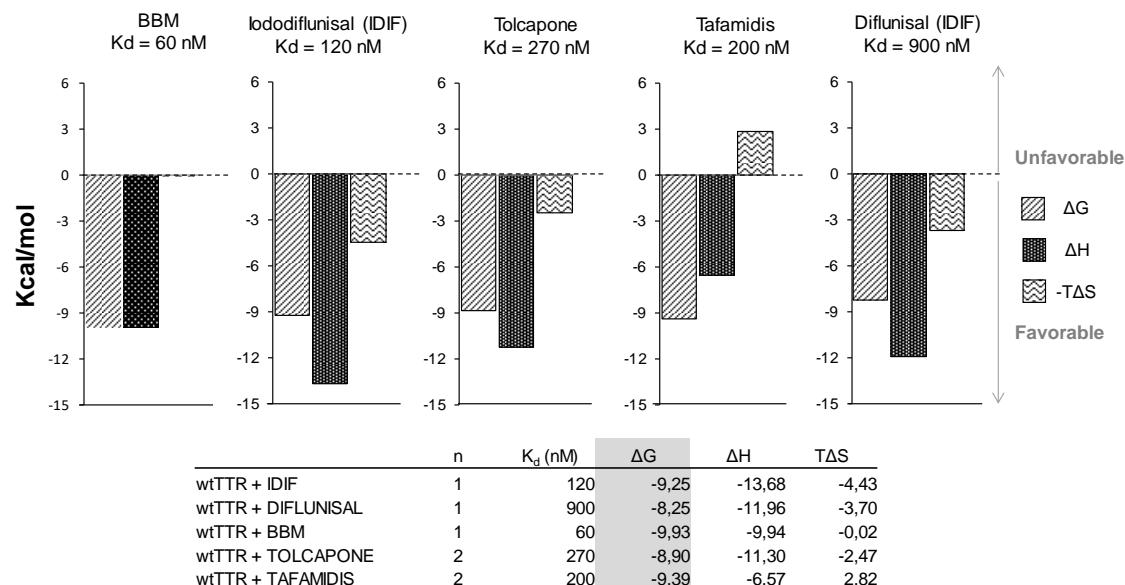


Figura 73. Perfil termodinámico obtenido por ITC de potentes estabilizadores de TTR. De izquierda a derecha: el fármaco BBM; nuestro compuesto líder, el iododiflunisal (IDIF); el Tafamidis, medicamento huérfano para la FAP; el Tolcapone, fármaco para Parkinson, reposicionado para la FAP, y por último el fármaco NSAID Diflunisal.

En estudios anteriores (Iakovleva et al., 2015; Miller et al., 2018) se había descrito la correlación entre la fuerza entálpica (ΔH) con la selectividad en plasma humano. En nuestros estudios, el IDIF sigue siendo el que posee una ΔH mayor. En este contexto no se ha podido comprobar esta correlación al no haber realizado estudios con plasma humano.

Por último, se investigaron las propiedades inhibidoras de la BBM utilizando la variante amiloidogénica Y78F TTR. El valor de IC_{50} es de 4.3 μM para BBM y por tanto del mismo orden que los mejores inhibidores, IDIF o Tafamidis (IC_{50} 3.7 y 5.4 μM , respectivamente)

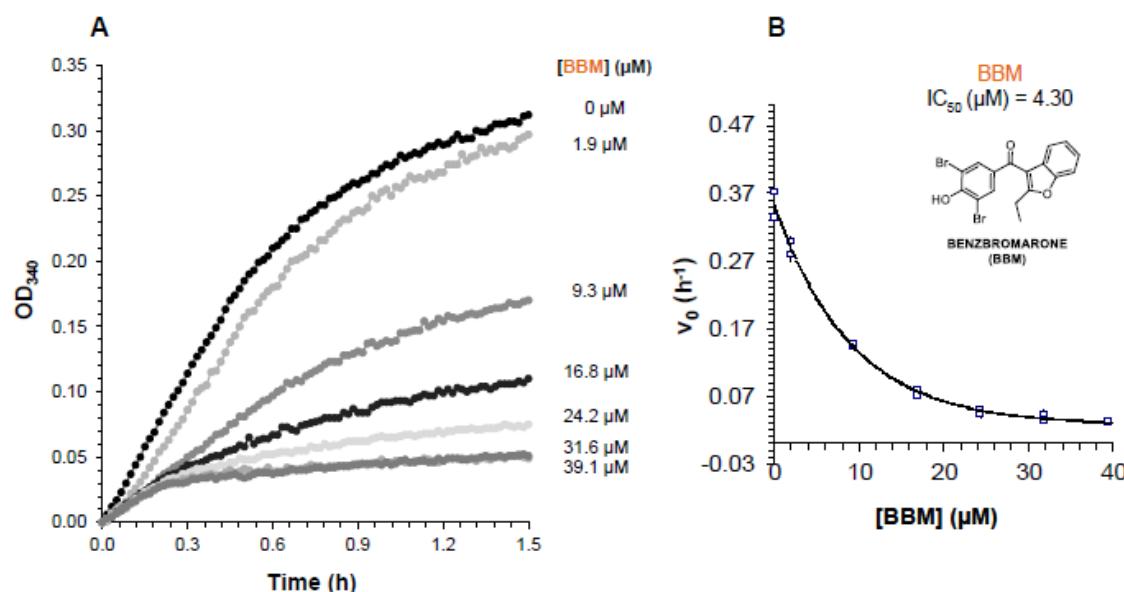


Figura 74: Monitorización de la formación de fibras de Y78F TTR a 340 nm, pH 4.2 y 37°C en presencia de diferentes concentraciones de BBM (A). Gráfica de la velocidad de agregación (V_0) frente la concentración de BBM, ajuste siguiendo la ecuación 1.

Con los experimentos anteriores se puede concluir que el fármaco benzboronarona, compuesto que contiene una estructura de dibromofenol en su estructura como el TBBPA, es un potente estabilizador de la TTR, se une a la TTR en la zona de unión de T4 y es además un buen inhibidor de la fibrilogenesis de la TTR. Dado que el TBBPA como la BBM contienen dibromofenol, se concluye que esta estructura es interesante en el diseño de nuevos estabilizadores de la TTR. La benzboronarona por tratarse de un fármaco tal vez pueda reposicionarse en un futuro para tratar este tipo de amiloidosis.

Optimización de nuestra molécula líder el IDIF

En 2004, Hopkins y colaboradores introdujeron un nuevo concepto en el área de descubrimiento de fármacos, la Eficiencia de ligando (LE, *Ligand Efficiency*), en el que se cuantificaba la energía libre en función del número de átomos (no átomos de hidrógeno) unidos a una diana determinada ($LE = \Delta G/NHA$). Desde entonces en la literatura científica se han descrito una inmensa variedad de índices de eficiencia. Estos índices son unas herramientas de visualización de la química médica aplicada al diseño de nuevos compuestos con propiedades optimizadas (Abad-Zapatero, 2021; Blasi et al., 2011; Cavalluzzi, Mangiatordi, Nicolotti, & Lentini, 2017; Hopkins, Groom, & Alex, 2004; Pesini et al., 2012).

En la presente tesis doctoral se ha aplicado esta metodología LEI para optimizar de forma prospectiva nuestra molécula líder, el iododiflunisal (IDIF), estabilizador de la TTR e inhibidor de la fibrilación de la TTR. Para este fin, ha sido necesario realizar la evaluación de la actividad biológica de una serie de moléculas, análogos del IDIF, mediante un ensayo turbidimétrico (Dolado et al., 2005). Las moléculas fueron propuestas por el grupo del Dr. Jordi Quintana del Parc Científic de Barcelona (PCB) en la Universidad de Barcelona y fueron sintetizadas en nuestro laboratorio del IQAC del CSIC.

En estudios anteriores se había explorado esta metodología de forma retrospectiva (Blasi et al., 2011). Se había obtenido las actividades biológicas de una serie de análogos de IDIF (compuestos bifenílicos) (Mairal et al., 2009) mediante el ensayo de Dolado et al. A partir de los datos de IC_{50} obtenidos se calcularon los índices LEI (Tabla 8). La representación en un plano de eficiencia de estos índices, en concreto, de NBEI (parámetro que relaciona la potencia del número de átomos pesados del ligando) frente a NSEI (parámetro que relaciona la potencia del número de átomos polares del ligando) se muestra en la Figura 75.

Nombre	Definición
BEI	$p(K_i)$, $p(K_d)$ or $p(IC_{50})/MW(kDA)$
SEI	$p(K_i)$, $p(K_d)$ or $p(IC_{50})/(PSA/100 \text{ \AA}^2)$
NSEI	$-\log_{10}K_i/(NPOL) = pK_i/NPOL (N,O)$
NBEI	$-\log_{10}K_i/(NHEAV) = pK_i/(NHEAV)$
nBEI	$-\log_{10}(K_i/NHEAV)$
NHEAV	Number of heavy atoms (non-hydrogen in the compound)
NPOL	Number of polar atoms (N,O)

Tabla 8. Nombres y definiciones de los “*Ligand efficiency indices*” (LEI).

Los mapas de eficiencia se definen como la combinación de variables de eficiencia basadas en la polaridad (abscisas) vs el tamaño de la molécula en las ordenadas. En estos planos, la polaridad se incrementa en sentido contrario a las agujas del reloj y la pendiente de las líneas se incrementa según el número de átomos polares en el ligando (NPOL).

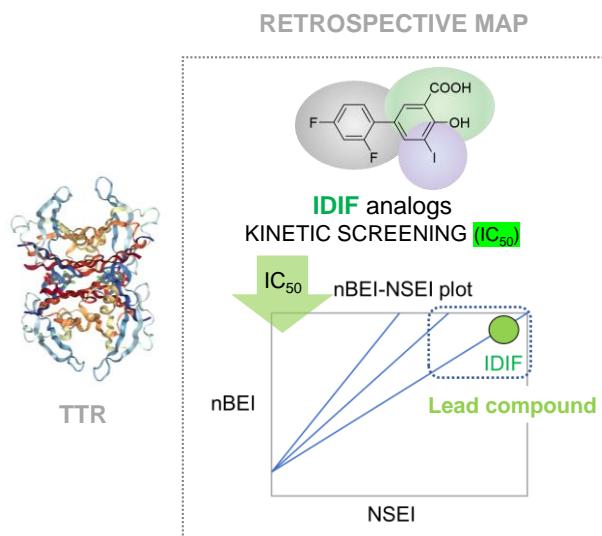


Figura 75. Mapa retrospectivo LEIs.

En esta tesis doctoral se investiga la aplicación de la metodología LEI de forma prospectiva (Figura 76).

La evaluación prospectiva consta de diferentes pasos:

1. Optimización virtual del IDIF mediante métodos computacionales
2. Obtención de un nuevo mapa nBEI-NSEI
3. Selección de compuestos propuestos por el estudio computacional
4. Síntesis de los compuestos
5. Evaluación de la actividad
- 6: Obtención de un nuevo mapa nBEI-NSEI

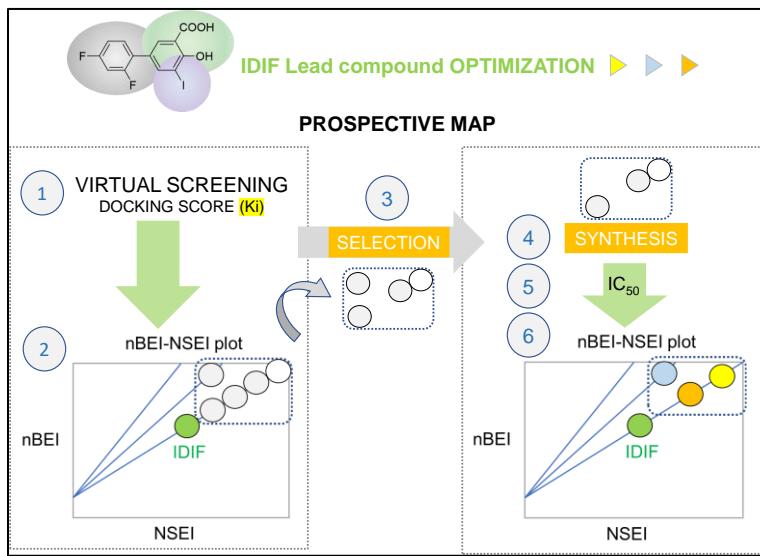


Figura X76. Mapa prospectivo

1. Optimización virtual del IDIF mediante métodos computacionales

El iododiflunisal se utilizó como *scaffold* en la base de datos MMsINC que contiene aproximadamente 4 millones de compuestos, a su vez integrada por bases de datos primarias como PubChem, *Protein Data Bank*, *the Food and Drug Administration database of approved drugs*, ZINC y también catálogos comerciales de compañías.



Esquema 5. Selección bioinformática de un nuevo fármaco utilizando la herramienta *LEI's*.

A partir de esta base de datos se seleccionaron 1800 compuestos, a los que se añadió un conjunto de 500 compuestos comercialmente viables, seleccionados en base a la estructura bifenílica del iododiflunisal, pero con sustituciones aleatorias en el anillo aromático. De esta manera se conformó una base virtual inicial de 2300 compuestos. A partir de la estructura cristalográfica del complejo TTR/IDIF se obtuvo un determinado farmacóforo para IDIF. De los 2300 compuestos, 1200 compartieron el mismo perfil de interacción de IDIF con TTR. Un estudio de *docking* posterior proporcionó 80 moléculas cada una con un “score” asociado. Con estos valores se calculó ΔG^* y a partir de ΔG^* se estimaron unos valores de Ki^* ($\Delta G^* = -RT\ln Ki^*$). Para normalizar estos valores se utilizó el valor experimental de Ki para el IDIF obtenido a partir de los datos de calorimetría (Cotrina et al., 2013).

2. Obtención de un nuevo mapa nBEI-NSEI
3. Selección de compuestos propuestos por el estudio computacional
4. Síntesis de los compuestos

Con estos datos se obtuvo un nuevo mapa nBEI vs NSEI (Figura 77) donde se podía observar una serie de compuestos propuestos obtenidos por cribado virtual que tenía mejores propiedades que el IDIF (véase recuadro en la Figura 77). Nuestro grupo hizo una selección y sintetizó algunos de los compuestos propuestos.

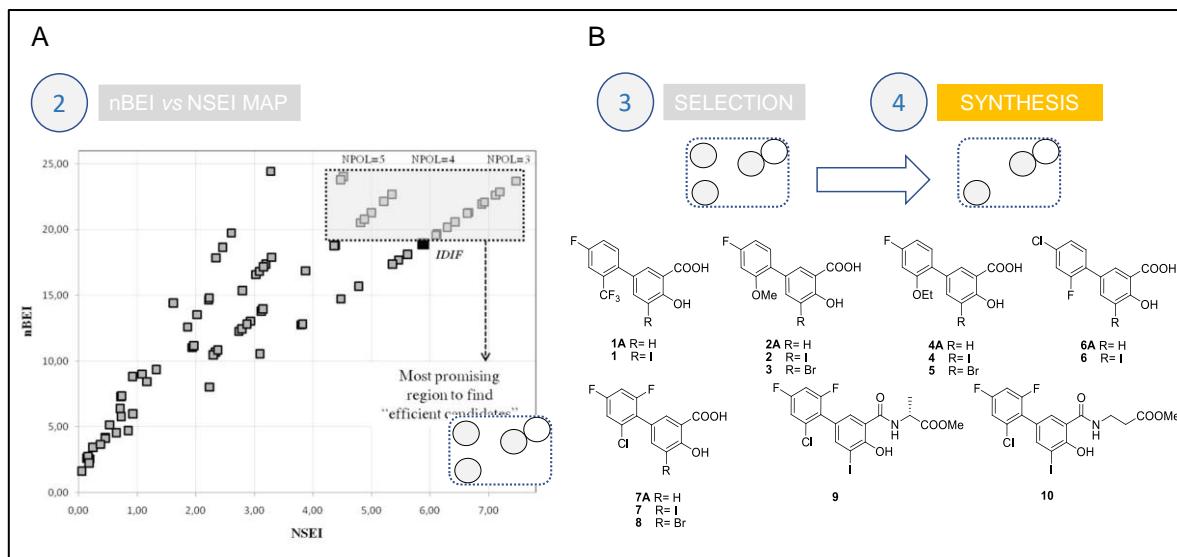


Figura 77. A) Mapa nBEI/NSEI a partir de datos de *docking* de los compuestos; B) Selección y síntesis de compuestos bifenílicos análogos de IDIF (IQAC-CSIC)

5. Evaluación de la actividad

En esta tesis doctoral se realizó la evaluación de la actividad biológica de los compuestos propuestos mediante en el ensayo turbidimétrico de (Dolado et al., 2005).

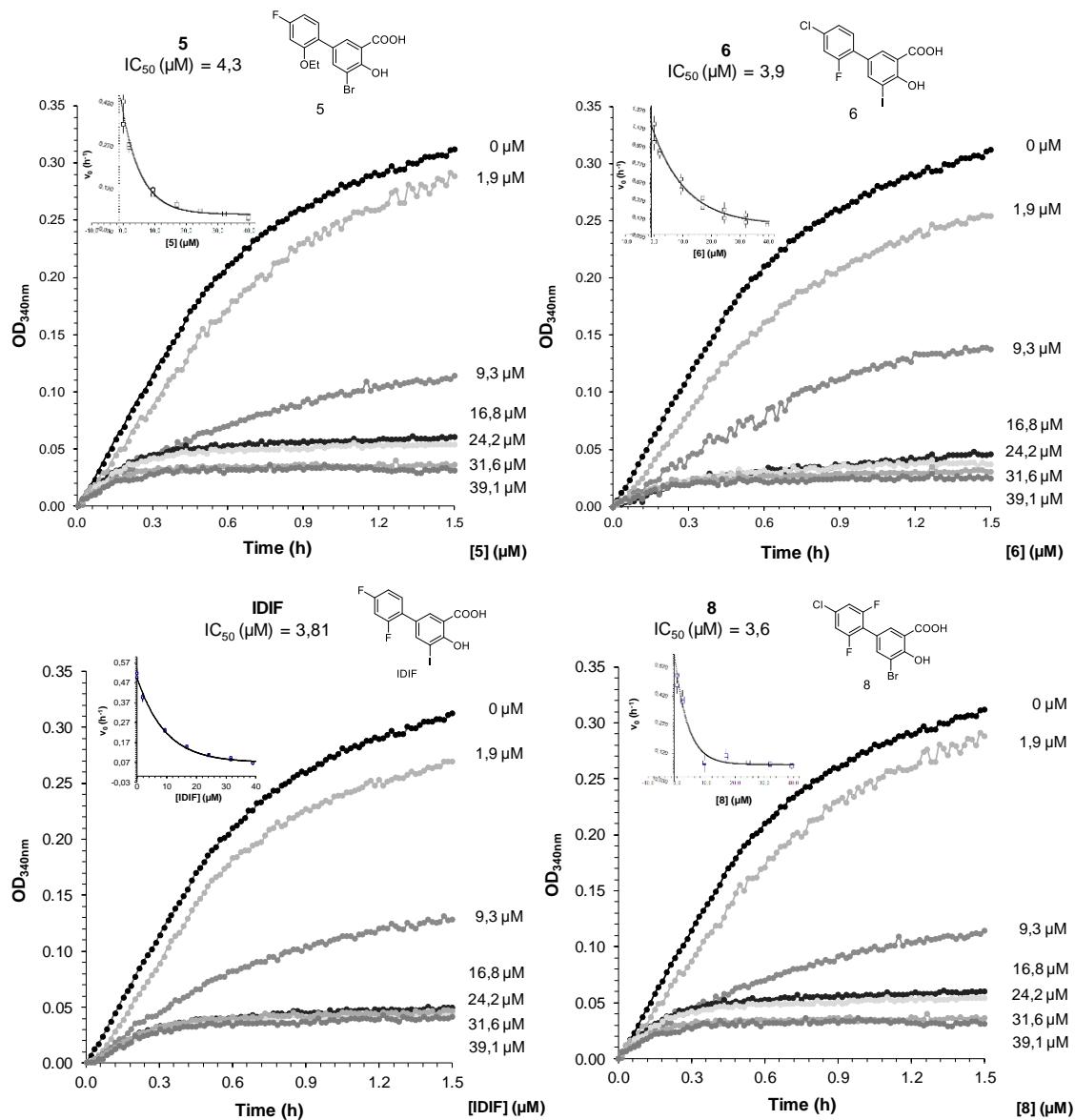


Figura 78. Cinética de agregación de la Y78F TTR a pH 4.2, 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos 5, 6, 8 y IDIF. (En el recuadro se representan la velocidad inicial de formación de fibras frente a la concentración de compuesto)

No se pudo realizar estudios de calorimetría con estos compuestos para poder calcular los LEIs correspondientes. Así que se construyó un nuevo plano nBEI vs NSEI a partir de los datos obtenidos de IC_{50} del ensayo turbidimétrico.

6: Obtención de un nuevo mapa nBEI-NSEI

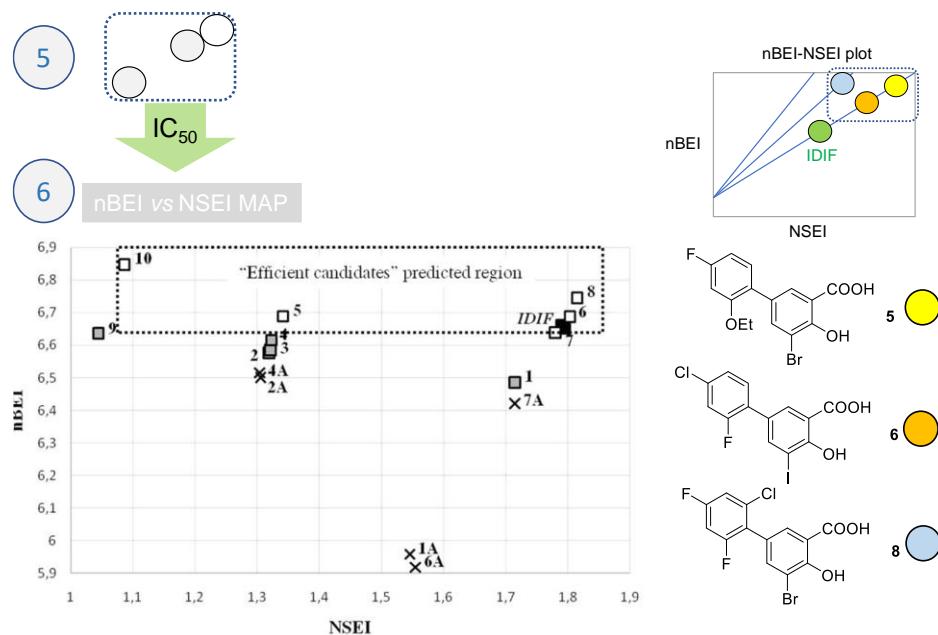


Figura 79. Mapa nBEI/NSEI a partir de datos experimentales obtenidos del ensayo turbidimétrico (Dolado et al., 2005).

Uno de los mejores compuestos es el compuesto **8**, que aparece en el plano de eficiencia en la parte superior a la derecha, por tanto, posee la mejor combinación de IC_{50} ($3.6 \mu M$) además de mejores propiedades fisicoquímicas (valores de NSEI y de nBEI) en relación al IDIF.

En resumen, la metodología LEI nos ha permitido optimizar nuestra molécula líder, el IDIF. Es el primer ejemplo de uso de la metodología LEI, tanto de forma retrospectiva como prospectiva, aplicada con éxito en la optimización de inhibidores de la agregación de TTR.

Capítulo 5. Conclusiones

Con el fin de descubrir de contribuir al descubrimiento de fármacos contra la enfermedad de Alzheimer teniendo como diana terapéutica la transtiretina (TTR), la presente tesis doctoral estudia la interacción entre la TTR y los péptidos amiloïdes A β y en particular, estudia el efecto potenciador de la interacción mediante moléculas pequeñas (chaperonas) estabilizadoras del tetramero de la TTR, como el Iododiflunisal (IDIF) y también afronta el descubrimiento de nuevas moléculas chaperonas de la interacción.

Los resultados de estos estudios permiten concluir:

Descubrimiento de fármacos contra la enfermedad de Alzheimer

1. Se ha optimizado el protocolo de expresión y purificación de la proteína recombinante humana TTR para poder realizar ensayos *in vitro* de cribado de moléculas. Con este protocolo se han preparado 660 mg de proteína. La reproducibilidad en la expresión y en la calidad de la proteína obtenida en diferentes lotes, ha facilitado la implementación de ensayos de cribado, tanto para la evaluación de bibliotecas de compuestos inhibidores de la fibrilogénesis de la TTR, así como también la evaluación de moléculas pequeñas como chaperonas de la interacción entre la TTR y los péptidos amiloïdes.
2. Mediante experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) se ha descrito por primera vez la afinidad de unión entre la TTR y el péptido A β (1-42), determinándose el perfil termodinámico completo (ΔH , ΔS , ΔG) de la interacción TTR/A β (1-42). El complejo binario de estequiométría (1:1) posee una constante de disociación $K_d = 0.93 \mu M$. El efecto chaperona del estabilizador IDIF se refleja en la reducción en el valor de la constante de disociación ($K_d = 0.31 \mu M$) en el complejo ternario.
3. Mediante experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) se ha confirmado que la afinidad de unión de TTR por el péptido A β (1-42) ($K_d = 0.93 \mu M$) es mucho mayor que la afinidad por el péptido A β (1-40) ($K_d = 7.09 \mu M$). En ambas interacciones la estequiométría es (1:1). Se observa que el IDIF ejerce al también una función chaperona sobre la interacción TTR/A β (1-40) ($K_d = 3.34 \mu M$).
4. Mediante experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) se ha confirmado la afinidad de unión de TTR al péptido A β (12-28), secuencia básica de interacción según estudios de RMN del consorcio. El comportamiento calorimétrico del péptido A β (12-28) es similar al del péptido A β (1-42). El IDIF también ejerce de chaperona en la interacción TTR y la secuencia amiloïde A β (12-28). Este es un punto clave para el desarrollo de un ensayo de cribado basado en este péptido, ya que posee características similares a A β (1-42).
5. Experimentos realizados con tres péptidos mutantes V18A, F19A and F20A de A β (12-28) han mostrado que los V18, F19 y F20 son aminoácidos esenciales en la interacción.
6. Se ha diseñado y validado un ensayo de cribado de alto rendimiento (HTS, *high throughput screening*) para encontrar nuevas chaperonas de la interacción entre la TTR y los péptidos A β . Este ensayo utiliza la secuencia corta A β (12-28), una secuencia mucho más simple y estable que los péptidos A β (1-42) o A β (1-40). El ensayo estudia mediante la técnica de

turbidimetría la agregación de A β (12-28) a 25°C, en presencia de TTR o en presencia de un complejo binario de TTR con el ligando a estudiar. Las cinéticas de agregación han sido corroboradas de forma paralela con estudios de fluorescencia de tioflavina T.

7. El ensayo ha sido optimizado para los siguientes variables: a) la longitud de onda en que se monitoriza; b) los distintos factores de agregación, como son la concentración de péptido, la solución tampón y la temperatura de agregación; para estos factores se ha utilizado un Diseño de Experimentos factorial (3¹2²); y por último, para la proporción A β (12-28)/TTR, con el objetivo de reducir el gasto de proteína a utilizar en el ensayo. El ensayo ha sido adaptado a un formato de 96 celdas y se ha probado utilizando cuatro compuestos que poseen diferentes afinidades por TTR. Se cree que esta metodología pueda utilizarse en el cribado de chaperonas que actúen sobre otras proteínas que interaccionan con A β , como por ejemplo la albúmina humana.
8. Mediante experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) complementados con espectroscopía de fluorescencia de tioflavina T, se ha confirmado que no todos los estabilizadores del tetrámero de la TTR se comportan *in vitro* como chaperonas de la interacción TTR/A β (1-42). Entre los estabilizadores de la TTR que no son chaperonas se encuentran los fármacos Tafamidis y Diflunisal.
9. Con nuestro ensayo de cribado (HTS) se ha realizado un cribado de 53 moléculas pequeñas, *hits* experimentales. Estas moléculas fueron propuestas en nuestro consorcio, tras una combinación de estudios computacionales y una batería de ensayos biológicos *in vitro*. Se ha obtenido una lista priorizada de compuestos. Estos estudios se han completado con experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) de los complejos ternarios TTR/chaperona/A β (12-28). Estos estudios han corroborado la lista priorizada de estabilizadores del tetrámero de la TTR que son chaperonas.
10. Los resultados del cribado de las mejores chaperonas han sido corroborados con ensayos de fluorescencia de tioflavina T de la agregación de A β (1-42) realizados en presencia de TTR con cada una de las mejores chaperonas. El efecto chaperona del IDIF y de las mejores chaperonas es dependiente de la dosis en todos los casos.
11. Se ha obtenido una lista de chaperonas entre las que se encuentran: nuestra molécula líder el Iododiflunisal, una molécula en la fase de descubrimiento; el producto natural luteolina que es un compuesto en fase de investigación clínica, y tres fármacos registrados, el sulindac, la olsalazina y el ácido flufenámico. Estos fármacos podrían ser reposicionados para su uso en fases clínicas. Con estos compuestos se podrá validar la transtiretina como estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer.

Descubrimiento de fármacos en amiloidosis relacionadas con la TTR

Con el fin de descubrir potenciales estabilizadores de la TTR y/o de potenciales inhibidores de la amiloidosis de la TTR, en esta tesis doctoral se han estudiado las siguientes moléculas: el fármaco uricosúrico benzboronarona (BBM), un compuesto que contiene una estructura dibromofenol, y una serie de análogos del Iododiflunisal.

Los resultados de estos estudios permiten concluir:

1. Mediante experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) se ha confirmado que la afinidad de unión de la BBM a la TTR ($K_D = 60$ nM) es similar a las afinidades de unión de otros potentes estabilizadores de la TTR, como son IDIF, Tolcapone y Tafamidis. Se ha descrito el perfil termodinámico completo del complejo binario de la TTR con la BBM. Estudios de competición competitiva con T4 y los resultados de cristalografía de Rayos X confirman que la BBM se une en el mismo sitio que el ligando endógeno T4.
2. El estudio cinético de la agregación de la TTR en presencia de BBM confirma *in vitro* que se trata de un inhibidor de la fibrilogénesis de potencia similar a otros inhibidores como el Tafamidis. Se propone que el dibromofenol es una estructura interesante a tener en cuenta en el diseño de nuevos estabilizadores de la TTR.
3. Se ha descrito la primera evidencia experimental de una nueva aplicación de la metodología LEI (Ligand Efficiency Indexes) de forma prospectiva para la optimización del compuesto líder IDIF, utilizando el espacio químico-biológico del IDIF. Esta metodología LEI, tanto retrospectiva como prospectiva, puede ser fácilmente combinada en diferentes estudios computacionales. Con esta herramienta de la química médica se han descubierto 3 nuevos estabilizadores del tetrámero de la TTR, compuestos que comparten el mismo esqueleto químico, pero tienen propiedades inhibidoras superiores al IDIF. Es el primer ejemplo que muestra la eficacia del uso de estos LEIS en el proceso de decisión y que valida la metodología LEI para la optimización prospectiva de compuestos líder. Estos compuestos podrán ser desarrollados para el tratamiento de las amiloidosis relacionadas con la TTR:

CONCLUSIONS:

Drug discovery in AD

1. We have optimized the preparative expression and purification protocol of transthyretin (wt hTTR) for the *in vitro* screening assays. The optimized protocol for recombinant hTTR production yielded up to 660 mg of homogenous protein. The inter-batch reproducibility of expression and protein quality has allowed the implementation of screening assays for the evaluation of libraries of TTR amyloidogenesis inhibitors, as well as the evaluation of small-molecule chaperones (SMCs) of the TTR/Abeta (A β) interaction.
2. Using the Isothermal Titration Calorimetry (ITC) technique, we have found for the first time the binding affinity of the TTR/A β (1-42) interaction. We have described the full thermodynamic profile (N , ΔH , ΔS , ΔG) of the TTR binding to A β (1-42). TTR forms a (1:1) complex with A β (1-42) with $K_d = 0.93 \mu\text{M}$. The chaperoning effect of our TTR tetramer stabilizer IDIF is shown by the reduction of the K_d to $0.31 \mu\text{M}$ in the ternary complex.
3. Using the Isothermal Titration Calorimetry (ITC) technique we have confirmed that the binding affinity of TTR is higher for A β (1-42) ($K_d = 0.93 \mu\text{M}$) than for A β (1-40) ($K_d = 7.09 \mu\text{M}$). TTR forms a (1:1) complex with A β (1-40) and the chaperoning effect of our TTR tetramer stabilizer IDIF is also observed in the TTR/A β (1-40) ($K_d = 3.34 \mu\text{M}$).
4. Using the Isothermal Titration Calorimetry (ITC) technique, we have shown that the short A β (12-28) peptide shows similar calorimetric behavior as the Abeta peptide A β (1-42) in these complexes with TTR. TTR forms a (1:1) complex with A β (12-28) with $K_d = 3.00 \mu\text{M}$. In a similar way, the effect of IDIF in the ternary complex reduces the K_d to $= 0.81 \mu\text{M}$. This is a key point toward the design and development of a screening assay.
5. Interestingly, V18A, F19A and F20A A β (12-28) mutant peptides show no binding to TTR, confirming that these residues are essential for the interaction with TTR corroborating previous NMR studies in our consortia.
6. We have designed and validated a High Throughput Screening (HTS) assay to search for small-molecule compounds that may also be good chaperones of the TTR/A β peptides interaction. The assay makes use of the simpler, easily handling and less costly A β (12-28) peptide than the full-length A β peptides. The turbidity-based assay monitors A β (12-28) aggregation both in the presence of TTR and once TTR is complexed with the small-molecule. The aggregation kinetics have been corroborated with parallel results monitored by Thioflavin T (ThT) fluorescence assays.
7. The HTS assay has been optimized for: 1) UV wavelength monitoring (340 nm), 2) A β (12-28) aggregation factors (concentration of peptide, buffer solution, incubation temperature) by using a factorial Design of Experiments (DoE) of $(3^{12})^2$, and 3) A β (12-28)/TTR ratio as to minimize protein expenditure. The assay has been adapted to a 96-well plate format and tested using a set of 4 compounds that have different TTR binding properties. It was observed that TTR ligand ability correlates with chaperone efficiency of the A β (12-28)/TTR interaction. The methodology may be adapted to settle screening methods for chaperones acting on other proteins interacting with Abeta peptides such as albumin (HSA).
8. By ITC studies and ThT fluorescent assays we have proved that not all TTR tetramer stabilizers have chaperoning effect on the TTR/A β interaction. Known TTR tetramer stabilizer

drugs, such as the NSAID diflunisal and the orphan drug Tafamidis, did not show SMC behavior.

9. By using our in-house validated high-throughput screening (HTS) ternary assay, we have screened 53 compounds (experimental hits) proposed by a combination of computational studies and biological in vitro assays. After Isothermal Titration Calorimetry on the best hits, we have prioritized a list of TTR tetramer stabilizers as chaperones.
10. Results have been corroborated by complementary assays such as Thioflavin T fluorescence assays. The chaperoning effect of IDIF and of a selection of the best chaperone drugs (olsalazine, sulindac and flufenamic acid) is concentration-dependent as shown by ThT fluorescence assays (dose-response studies).
11. We have obtained a prioritized list of chaperones which includes our lead compound IDIF, a molecule in the discovery phase, one investigational drug (the natural product luteolin), and 3 marketed drugs (sulindac, olsalazine and flufenamic acid), which could be directly repurposed or repositioned for clinical use.

Drug discovery in TTR amyloidosis

1. By structural and biophysical assays, we have discovered that the uricosuric drug benzboromarone (BBM) is a new TTR tetramer kinetic stabilizer and potent inhibitor of TTR amyloidogenesis. Isothermal titration calorimetry (ITC) demonstrated that BBM binds TTR with an affinity similar to IDIF, tolcapone and tafamidis, confirming BBM as a potent binder of TTR. Kinetic analysis of the ability of BBM to inhibit TTR fibrillogenesis at acidic pH and comparison with other stabilizers such as IDIF, tafamidis and tolcapone revealed that benzboromarone is a potent inhibitor of TTR amyloidogenesis. The drug presents an interesting dibromophenol scaffold in the quest to design new and improved TTR stabilizers as candidate drugs for TTR related amyloidosis.
2. We have provided the first experimental evidence of a novel application of the Ligand Efficiency indexes (LEI) formulation for prospective lead optimization by using the iododiflunisal (IDIF) chemico-biological space. The LEI methodology, both retrospective and prospective, may be easily combined and integrated with computational workflows such as pharmacophore modeling and docking experiments.

Following this medicinal chemistry approach, we have found 3 new TTR tetramer stabilizers, which share the same IDIF scaffold, but have superior in vitro fibrillogenesis inhibition properties than our lead compound IDIF. This is the first example of the effectiveness of using the combined LEIs within the decision process to validate the application of the LEI formulation for the prospective optimization of lead compounds.

These optimized compounds could be eventually developed for the treatment and/or prevention of TTR-related amyloidosis.

Capítulo 6. Bibliografía

- Abad-Zapatero, C. Ligand Efficiency Indices for Effective Drug Discovery: A Unifying Vector Formulation. *Expert Opin. Drug Discov.* **2021**, 1–13.
- Adams, D.; Koike, H.; Slama, M.; Coelho, T. Hereditary Transthyretin Amyloidosis: A Model of Medical Progress for a Fatal Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, 15 (7), 387–404.
- Ahmed, R.; VanSchouwen, B.; Jafari, N.; Ni, X.; Ortega, J.; Melacini, G. Molecular Mechanism for the (-)-Epigallocatechin Gallate-Induced Toxic to Nontoxic Remodeling of A β Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139 (39), 13720–13734.
- Alemi, M.; Gaiteiro, C.; Ribeiro, C. A.; Santos, L. M.; Gomes, J. R.; Oliveira, S. M.; Couraud, P. O.; Weksler, B.; Romero, I.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin Participates in Beta-Amyloid Transport from the Brain to the Liver- Involvement of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1? *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1–15.
- Algamal, M.; Milojevic, J.; Jafari, N.; Zhang, W.; Melacini, G. Mapping the Interactions between the Alzheimer's A β -Peptide and Human Serum Albumin beyond Domain Resolution. *Biophys. J.* **2013**, 105 (7), 1700–1709.
- Almeida, M. R.; Gales, L.; Damas, A. M.; Cardoso, I.; Saraiva, M. J. Small Transthyretin (TTR) Ligands as Possible Therapeutic Agents in TTR Amyloidoses. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2005**, 4 (5), 587–596.
- Alzheimer's Association Report. 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's Dement.* **2020**, 16, 391–460.
- Arosio, P.; Knowles, T. P. J.; Linse, S. On the Lag Phase in Amyloid Fibril Formation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, 17, 7606–7618.
- Arosio, P.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. Chemical Kinetics for Drug Discovery to Combat Protein Aggregation Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, 35 (3), 127–135.
- Baranello, R. J.; Bharani, K. L.; Padmaraju, V.; Chopra, N.; Lahiri, D. K.; Greig, N. H.; Pappolla, M. A.; Sambamurti, K. Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and Their Role in Alzheimer's Disease Pathways Responsible for A β Turnover. *Curr. Alzheimer Res.* **2015**, 12 (1), 32–46.
- Beeg, M.; Stravalaci, M.; Bastone, A.; Salmona, M.; Gobbi, M. A Modified Protocol to Prepare Seed-Free Starting Solutions of Amyloid- β (A β) 1-40 and A β 1-42 from the Corresponding Depsipeptides. *Anal. Biochem.* **2011**, 411 (2), 297–299.
- Beeg, M.; Stravalaci, M.; Romeo, M.; Carrá, A. D.; Cagnotto, A.; Rossi, A.; Diomede, L.; Salmona, M.; Gobbi, X. M. Clusterin Binds to A β 1-42 Oligomers with High Affinity and Interferes with Peptide Aggregation by Inhibiting Primary and Secondary Nucleation. *J. Biol. Chem.* **2016**, 291 (13), 6958–6966.
- Bemporad, F.; Chiti, F. Protein Misfolded Oligomers: Experimental Approaches, Mechanism of Formation, and Structure-Toxicity Relationships. *Chem. Biol.* **2012**, 19 (3), 315–327.

Benilova, I.; Karran, E.; De Strooper, B. The Toxic A β Oligomer and Alzheimer's Disease: An Emperor in Need of Clothes. *Nat. Neurosci.* **2012**, 15 (3), 349–357.

Benson, M. D.; Waddington-Cruz, M.; Berk, J. L.; Polydefkis, M.; Dyck, P. J.; Wang, A. K.; Planté-Bordeneuve, V.; Barroso, F. A.; Merlini, G.; Obici, L.; Scheinberg, M.; Brannagan, T. H.; Litchy, W. J.; Whelan, C.; Drachman, B. M.; Adams, D.; Heitner, S. B.; Conceição, I.; Schmidt, H. H.; Vita, G.; Campistol, J. M.; Gamez, J.; Gorevic, P. D.; Gane, E.; Shah, A. M.; Solomon, S. D.; Monia, B. P.; Hughes, S. G.; Kwok, T. J.; McEvoy, B. W.; Jung, S. W.; Baker, B. F.; Ackermann, E. J.; Gertz, M. A.; Coelho, T. Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 379 (1), 22–31.

Berk, J. L.; Suhr, O. B.; Obici, L.; Sekijima, Y.; Zeldenrust, S. R.; Yamashita, T.; Heneghan, M. A.; Gorevic, P. D.; Litchy, W. J.; Wiesman, J. F.; Nordh, E.; Corato, M.; Lozza, A.; Cortese, A.; Robinson-Papp, J.; Colton, T.; Rybin, D. V.; Bisbee, A. B.; Ando, Y.; Ikeda, S. I.; Seldin, D. C.; Merlini, G.; Skinner, M.; Kelly, J. W.; Dyck, P. J. Repurposing Diflunisal for Familial Amyloid Polyneuropathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2013**, 310 (24), 2658–2667.

Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G. L.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2000**, 56 (1), 235–242.

Bezerra, F.; Saraiva, M. J.; Almeida, M. R. Modulation of the Mechanisms Driving Transthyretin Amyloidosis. *Front. Mol. Neurosci.* **2020**, 13, 592644.

Bhunia, A.; Bhattacharjya, S.; Chatterjee, S. Applications of Saturation Transfer Difference NMR in Biological Systems. *Drug Discov. Today* **2012**, 17 (9–10), 505–513.

Blake, C. C. F.; Geisow, M. J.; Oatley, S. J.; Rérat, B.; Rérat, C. Structure of Prealbumin: Secondary, Tertiary and Quaternary Interactions Determined by Fourier Refinement at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* **1978**, 121 (3), 339–356.

Blasi, D.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Nieto, J.; Planas, A.; Pinto, M.; Centeno, N. B.; Abad-Zapatero, C.; Quintana, J. Retrospective Mapping of SAR Data for TTR Protein in Chemico-Biological Space Using Ligand Efficiency Indices as a Guide to Drug Discovery Strategies. *Mol. Inform.* **2011**, 30 (2–3), 161–167.

Boada, M.; López, O. L.; Olazarán, J.; Núñez, L.; Pfeffer, M.; Paricio, M.; Lorites, J.; Piñol-Ripoll, G.; Gámez, J. E.; Anaya, F.; Kiprov, D.; Lima, J.; Grifols, C.; Torres, M.; Costa, M.; Bozzo, J.; Szczepiorkowski, Z. M.; Hendrix, S.; Páez, A. A Randomized, Controlled Clinical Trial of Plasma Exchange with Albumin Replacement for Alzheimer's Disease: Primary Results of the AMBAR Study. *Alzheimer's Dement.* **2020**, 16 (10), 1412–1425.

Boada, M.; López, O.; Núñez, L.; Szczepiorkowski, Z. M.; Torres, M.; Grifols, C.; Páez, A. Plasma Exchange for Alzheimer's Disease Management by Albumin Replacement (AMBAR) Trial: Study Design and Progress. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2019**, 5, 61–69.

Boada, M.; Ortiz, P.; Anaya, F.; Hernández, I. Amyloid-Targeted Therapeutics in Alzheimer's Disease: Use of Human Albumin in Plasma Exchange as a Novel Approach for Abeta Mobilization. *Drug News Perspect.* **2009**, 22 (6), 325.

- Boada, M.; Ramos-Fernández, E.; Guivernau, B.; Muñoz, F. J.; Costa, M.; Ortiz, A. M.; Jorquerá, J. I.; Nuñez, L.; Torres, M.; Páez, A. Treatment of Alzheimer Disease Using Combination Therapy with Plasma Exchange and Haemapheresis with Albumin and Intravenous Immunoglobulin: Rationale and Treatment Approach of the AMBAR (Alzheimer Management By Albumin Replacement) Study. *Neurología* **2016**, 31 (7), 473–481.
- Bode, D. C.; Stanyon, H. F.; Hirani, T.; Baker, M. D.; Nield, J.; Viles, J. H. Serum Albumin's Protective Inhibition of Amyloid- β Fiber Formation Is Suppressed by Cholesterol, Fatty Acids and Warfarin. *J. Mol. Biol.* **2018**, 430 (7), 919–934.
- Boes, A.; Olatunji, S.; Mohammadi, T.; Breukink, E.; Terrak, M. Fluorescence Anisotropy Assays for High Throughput Screening of Compounds Binding to Lipid II, PBP1b, FtsW and MurJ. *Sci. Rep.* **2020**, 10 (1), 6280.
- Bohrmann, B.; Tjernberg, L.; Kuner, P.; Poli, S.; Levet-trafit, B.; Näslund, J.; Richards, G.; Huber, W.; Döbeli, H.; Nordstedt, C. Endogenous Proteins Controlling Amyloid β -Peptide Polymerization. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (23), 15990–15995.
- Branch, W. T.; Robbins, J. J.; Edelhoch, H. Thyroxine-Binding Prealbumin. *J. Biol. Chem.* **1971**, 246 (19), 6011–6018.
- Buell, A. K.; Esbjörner, E. K.; Riss, P. J.; White, D. A.; Aigbirhio, F. I.; Toth, G.; Welland, M. E.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. Probing Small Molecule Binding to Amyloid Fibrils. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13 (45), 20044–20052.
- Bulawa, C. E.; Connelly, S.; DeVit, M.; Wang, L.; Weigel, C.; Fleming, J. A.; Packman, J.; Powers, E. T.; Wiseman, R. L.; Foss, T. R.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W.; Labaudiniere, R. Tafamidis, a Potent and Selective Transthyretin Kinetic Stabilizer That Inhibits the Amyloid Cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109 (24), 9629–9634.
- Busby, S. A.; Carbonneau, S.; Concannon, J.; Dumelin, C. E.; Lee, Y.; Numao, S.; Renaud, N.; Smith, T. M.; Auld, D. S. Advancements in Assay Technologies and Strategies to Enable Drug Discovery. *ACS Chem. Biol.* **2020**, 15 (10), 2636–2648.
- Buxbaum, J. N.; Johansson, J. Transthyretin and BRICHOS: The Paradox of Amyloidogenic Proteins with Anti-Amyloidogenic Activity for A β in the Central Nervous System. *Front. Neurosci.* **2017**, 11 (MAR), 1–16.
- Buxbaum, J. N.; Ye, Z.; Reixach, N.; Friske, L.; Levy, C.; Das, P.; Golde, T.; Masliah, E.; Roberts, A. R.; Bartfai, T. Transthyretin Protects Alzheimer's Mice from the Behavioral and Biochemical Effects of A β Toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105 (7), 2681–2686.
- Calero, M.; Rostagno, A.; Ghiso, J. Search for Amyloid-Binding Proteins by Affinity Chromatography. *Methods Mol. Biol.* **2012**, 849, 213–223.
- Campioni, S.; Mannini, B.; Zampagni, M.; Pensalfini, A.; Parrini, C.; Evangelisti, E.; Relini, A.; Stefani, M.; Dobson, C. M.; Cecchi, C.; Chiti, F. A Causative Link between the Structure of Aberrant Protein Oligomers and Their Toxicity. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6 (2), 140–147.
- Casella, R.; Conti, S.; Mannini, B.; Li, X.; Buxbaum, J. N.; Tiribilli, B.; Chiti, F.; Cecchi, C. Transthyretin Suppresses the Toxicity of Oligomers Formed by Misfolded Proteins in Vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1832 (12), 2302–2314.

Cavalluzzi, M. M.; Mangiatordi, G. F.; Nicolotti, O.; Lentini, G. Ligand Efficiency Metrics in Drug Discovery: The Pros and Cons from a Practical Perspective. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, 12 (11), 1087–1104.

Checler, F.; Afram, E.; Pardossi-Piquard, R.; Lauritzen, I. Is γ -Secretase a Beneficial Inactivating Enzyme of the Toxic APP C-Terminal Fragment C99? *J. Biol. Chem.* **2021**, 296, 100489.

Chen, G.; Xu, T.; Yan, Y.; Zhou, Y.; Jiang, Y.; Melcher, K.; Xu, H. E. Amyloid Beta: Structure, Biology and Structure-Based Therapeutic Development. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, 38 (9), 1205–1235.

Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, 86, 27–68.

Choi, S. H.; Leight, S. N.; Lee, V. M.-Y.; Li, T.; Wong, P. C.; Johnson, J. A.; Saraiva, M. J.; Sisodia, S. S. Accelerated A Deposition in APPswe/PS1 E9 Mice with Hemizygous Deletions of TTR (Transthyretin). *J. Neurosci.* **2007**, 27 (26), 7006–7010.

Choi, T. S.; Lee, H. J.; Han, J. Y.; Lim, M. H.; Kim, H. I. Molecular Insights into Human Serum Albumin as a Receptor of Amyloid- β in the Extracellular Region. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139 (43), 15437–15445.

Ciccone, L.; Shi, C.; di Lorenzo, D.; Van Baelen, A.-C.; Tonali, N. The Positive Side of the Alzheimer's Disease Amyloid Cross-Interactions: The Case of the A β 1-42 Peptide with Tau, TTR, CysC, and ApoA1. *Molecules* **2020**, 25 (10), 2439.

Ciccone, L.; Tonali, N.; Nencetti, S.; Orlandini, E. Natural Compounds as Inhibitors of Transthyretin Amyloidosis and Neuroprotective Agents: Analysis of Structural Data for Future Drug Design. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, 35 (1), 1145–1162.

Coelho, T.; Maia, L. F.; Cruz, M. W.; Plante-Bordeneuve, V.; Lozeron, P.; Suhr, O. B.; Campistol, J. M.; Conceição, I. M.; Schmidt, H. H.-J.; Trigo, P.; Kelly, J. W.; Labaudinière, R.; Chan, J.; Packman, J.; Wilson, A.; Grogan, D. R. Tafamidis for Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy: A Randomized, Controlled Trial. *Neurology* **2012**, 79 (8), 785–792.

Cohen, A. D.; Klunk, W. E. Early Detection of Alzheimer's Disease Using PiB and FDG PET. *Neurobiol. Dis.* **2014**, 72, 117–122.

Cohen, S. I. A.; Arosio, P.; Presto, J.; Kurudenkandy, F. R.; Biverstål, H.; Dolfe, L.; Dunning, C.; Yang, X.; Frohm, B.; Vendruscolo, M.; Johansson, J.; Dobson, C. M.; Fisahn, A.; Knowles, T. P. J.; Linse, S. A Molecular Chaperone Breaks the Catalytic Cycle That Generates Toxic A β Oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, 22 (3), 207–213.

Cohen, S. I. A.; Linse, S.; Luheshi, L. M.; Hellstrand, E.; White, D. A.; Rajah, L.; Otzen, D. E.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. Proliferation of Amyloid-B42 Aggregates Occurs through a Secondary Nucleation Mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110 (24), 9758–9763.

Cohen, S. I. A.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. From Macroscopic Measurements to Microscopic Mechanisms of Protein Aggregation. *J. Mol. Biol.* **2012**, 421 (2–3), 160–171.

Coles, M.; Bicknell, W.; Watson, R. A.; Fairlie, D. P.; Craik, D. J. Solution Structure of Amyloid β -Peptide(1–40) in a Water-Micelle Environment. Is the Membrane-Spanning Domain Where We Think It Is? *Biochemistry* **1998**, *37* (31), 11064–11077.

Corazza, A.; Verona, G.; Waudby, C. A.; Mangione, P. P.; Bingham, R.; Uings, I.; Canetti, D.; Nocerino, P.; Taylor, G. W.; Pepys, M. B.; Christodoulou, J.; Bellotti, V. Binding of Monovalent and Bivalent Ligands by Transthyretin Causes Different Short- And Long-Distance Conformational Changes. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (17), 8274–8283.

Costa, R.; Gonçalves, A.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin Binding to A-Beta Peptide - Impact on A-Beta Fibrillogenesis and Toxicity. *FEBS Lett.* **2008**, *582* (6), 936–942.

Cotrina, E. Y.; Gimeno, A.; Llop, J.; Jiménez-barbero, J.; Quintan, J.; Valencia, G.; Cardoso, I.; Prohens, R.; Arsequell, G. Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between Transthyretin, A β Peptides and Small-Molecule Chaperones towards an Alternative Strategy for Alzheimer's Disease Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (6), 3205–3214.

Cotrina, E. Y.; Pinto, M.; Bosch, L.; Vilà, M.; Blasi, D.; Quintana, J.; Centeno, N. B.; Arsequell, G.; Planas, A.; Valencia, G. Modulation of the Fibrillogenesis Inhibition Properties of Two Transthyretin Ligands by Halogenation. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (22), 9110–9121.

Cotrina, E. Y.; Vilà, M.; Nieto, J.; Arsequell, G.; Planas, A. Preparative Scale Production of Recombinant Human Transthyretin for Biophysical Studies of Protein-Ligand and Protein-Protein Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (24), 9640.

Creemers, J. W. M.; Dominguez, D. I.; Plets, E.; Serneels, L.; Taylor, N. A.; Multhaup, G.; Craessaerts, K.; Annaert, W.; Strooper, B. De. Processing of β -Secretase by Furin and Other Members of the Proprotein Convertase Family. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (6), 4211–4217.

Crescenzi, O.; Tomaselli, S.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Ursi, A. M. D.; Temussi, P. A.; Picone, D. Solution Structure of the Alzheimer Amyloid β -Peptide (1–42) in an Apolar Microenvironment. Similarity with a Virus Fusion Domain. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 5642–5648.

Cuberas-Borrós, G.; Roca, I.; Boada, M.; Tárraga, L.; Hernández, I.; Buendia, M.; Rubio, L.; Torres, G.; Bittini, Á.; Guzmán-De-Villoria, J. A.; Pujadas, F.; Torres, M.; Núñez, L.; Castell, J.; Páez, A. Longitudinal Neuroimaging Analysis in Mild-Moderate Alzheimer's Disease Patients Treated with Plasma Exchange with 5 Human Albumin. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, *61* (1), 321–332.

Cummings, J. L. Disease Modification and Neuroprotection in Neurodegenerative Disorders. *Transl. Neurodegener.* **2017**, *6*, 25.

Cummings, J. L.; Feldman, H. H.; Scheltens, P. The "Rights" of Precision Drug Development for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Res. Ther.* **2019**, *11* (1), 1–14.

Cummings, J. L.; Fox, N. Defining Disease Modifying Therapy for Alzheimer's Disease. *J. Prev. Alzheimer's Dis.* **2017**, *4* (2), 109–115.

Cummings, J. L.; Lee, G.; Ritter, A.; Sabbagh, M.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2019. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2019**, *5*, 272–293.

Cummings, J. L.; Lee, G.; Ritter, A.; Sabbagh, M.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2020. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2020**, *6* (1), 1–29.

Cummings, J. L.; Lee, G.; Ritter, A.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2018. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2018**, *4* (2018), 195–214.

Cummings, J. L.; Morstorf, T.; Lee, G. Alzheimer's Drug-Development Pipeline: 2016. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2016**, *2* (4), 222–232.

Cummings, J. L.; Morstorf, T.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug-Development Pipeline: Few Candidates, Frequent Failures. *Alzheimer's Res. Ther.* **2014**, *6* (4), 37.

Cummings, J. L.; Lee, G.; Mortsdorf, T.; Ritter, A.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2017. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2017**, *3* (3), 367–384.

Dahm, R. Alzheimer's Discovery. *Curr. Biol.* **2006**, *16* (21), 906–910.

Damas, A. M.; Ribeiro, S.; Lamzin, V. S.; Palha, J. A.; Saraiva, M. J. Structure of the Val122Ile Variant Transthyretin - a Cardiomyopathic Mutant. *Acta Crystallogr.* **1996**, *52*, 966–972.

De, S.; Wirthensohn, D. C.; Flagmeier, P.; Hughes, C.; Aprile, F. A.; Ruggeri, F. S.; Whiten, D. R.; Emin, D.; Xia, Z.; Varela, J. A.; Sormanni, P.; Kundel, F.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Bryant, C.; Vendruscolo, M.; Kleinerman, D. Different Soluble Aggregates of A β 42 Can Give Rise to Cellular Toxicity through Different Mechanisms. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1541), 1–11.

Deane, R.; Sagare, A.; Hamm, K.; Parisi, M.; Lane, S.; Finn, M. B.; Holtzman, D. M.; Zlokovic, B. V. ApoE Isoform – Specific Disruption of Amyloid β Peptide Clearance from Mouse Brain. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118* (12), 4002–4013.

Deane, R.; Wu, Z.; Sagare, A.; Davis, J.; Yan, S. Du; Hamm, K.; Xu, F.; Parisi, M.; LaRue, B.; Hu, H. W.; Spijkers, P.; Guo, H.; Song, X.; Lenting, P. J.; Nostrand, W. E. Van; Zlokovic, B. V. LRP/Amyloid β -Peptide Interaction Mediates Differential Brain Efflux of A β Isoforms. *Neuron* **2004**, *43*, 333–344.

Dear, A. J.; Meisl, G.; Saric, A.; Michaels, T. C. T.; Kjaergaard, M.; Linse, S.; Knowles, T. P. J. Identification of On- and off-Pathway Oligomers in Amyloid Fibril Formation. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (24), 6236–6247.

Dobrowolska Zakaira, J. A.; Vassar, R. J. A Promising New γ -Secretase Modulator for Alzheimer's Disease. *J. Exp. Med.* **2021**, *218* (4), e20210077.

Dolado, I.; Nieto, J.; Saraiva, M. J. M.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Planas, A. Kinetic Assay for High-Throughput Screening of In Vitro Transthyretin Amyloid Fibrillogenesis Inhibitors. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7* (2), 246–252.

Du, J.; Cho, P. Y.; Yang, D. T.; Murphy, R. M. Identification of Beta-Amyloid-Binding Sites on Transthyretin. *Protein Eng. Des. Sel.* **2012**, 25 (7), 337–345.

Du, Y.; Bales, K. R.; Dodel, R. C.; Liu, X.; Glinn, M. A.; Horn, J. W.; Little, S. P.; Paul, S. M. A2-Macroglobulin Attenuates β -Amyloid Peptide 1-40 Fibril Formation and Associated Neurotoxicity of Cultured Fetal Rat Cortical Neurons. *J. Neurochem.* **1998**, 70 (3), 1182–1188.

Du, Y.; Ni, B.; Glinn, M.; Dodel, R. C.; Bales, K. R.; Zhang, Z.; Hyslop, P. A.; Paul, S. M. A2-Macroglobulin as a β -Amyloid Peptide-Binding Plasma Protein. *J. Neurochem.* **1997**, 69 (1), 299–305.

Dubendorff, J. W.; Studier, W. Controlling Basal Expression in an Inducible T7 Expression System by Blocking the Target T7 Promoter with Lac Repressor. *J. Mol. Biol.* **1991**, 219, 45–59.

Duff, K.; Eckman, C.; Zehr, C.; Yu, X.; Prada, C.-M.; Perez-tur, J.; Hutton, M.; Buee, L.; Harigaya, Y.; Yager, D.; Morgan, D.; Gordon, M. N.; Holcomb, L.; Refolo, L.; Zenk, B.; Hardy, J.; Younkin, S. Increased Amyloid- β 42(43) in Brains of Mice Expressing Mutant Presenilin 1. *Nature* **1996**, 383 (6602), 710–713.

Elovaara, I.; Maury, C. P.; Palo, J. Serum Amyloid A Protein, Albumin and Prealbumin in Alzheimer's Disease and in Demented Patients with Down's Syndrome. *Acta Neurol. Scand.* **1986**, 74 (3), 245–250.

Flood, J. F.; Morley, J. E.; Roberts, E. An Amyloid Beta-Protein Fragment, ABeta[12-28], Equipotently Impairs Post-Training Memory Processing When Injected into Different Limbic System Structures. *Brain Res.* **1994**, 663 (2), 271–276.

Foss, T. R.; Wiseman, R. L.; Kelly, J. W. The Pathway by Which the Tetrameric Protein Transthyretin Dissociates. *Biochemistry* **2005**, 44 (47), 15525–15533.

Fox, J. C.; Hellawell, J. L.; Rao, S.; O'Reilly, T.; Lumpkin, R.; Jernelius, J.; Gretler, D.; Sinha, U. First-in-Human Study of AG10, a Novel, Oral, Specific, Selective, and Potent Transthyretin Stabilizer for the Treatment of Transthyretin Amyloidosis: A Phase 1 Safety, Tolerability, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study in Healthy Adult Volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **2020**, 9 (1), 115–129.

Fraser, P. E.; Lévesque, L.; McLachlan, D. R. Alzheimer A Beta Amyloid Forms an Inhibitory Neuronal Substrate. *J. Neurochem.* **1994**, 62 (3), 1227–1230.

Furuya, H.; Nakazato, M.; Saraiva, M. J. M.; Costa, P. P.; Sasaki, H.; Matsuo, H.; Goto, I.; Sakaki, Y. Tetramer Formation of a Variant Type Human Transthyretin (Prealbumin) Produced by Escherichia Coli Expression System. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 163 (2), 851–859.

Furuya, H.; Saraiva, M. J. M.; Gawinowicz, M. A.; Alves, I. L.; Costa, P. P.; Sasaki, H.; Goto, I.; Sakaki, Y. Production of Recombinant Human Transthyretin with Biological Activities toward the Understanding of the Molecular Basis of Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP). *Biochemistry* **1991**, 30 (9), 2415–2421.

Gales, L.; Macedo-Ribeiro, S.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Saraiva, M. J.; Damas, A. M. Human Transthyretin in Complex with Iododiflunisal: Structural Features Associated with a Potent Amyloid Inhibitor. *Biochem. J.* **2005**, 388, 615–621.

Galimberti, D.; Scarpini, E. Old and New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2016**, 25 (10), 1181–1187.

Gamez, J.; Salvadó, M.; Reig, N.; Suñé, P.; Casasnovas, C.; Rojas-Garcia, R.; Insa, R. Transthyretin Stabilization Activity of the Catechol-O-Methyltransferase Inhibitor Tolcapone (SOM0226) in Hereditary ATTR Amyloidosis Patients and Asymptomatic Carriers: Proof-of-Concept Study. *Amyloid* **2019**, 26 (2), 74–84.

Ghadami, S. A.; Chia, S.; Ruggeri, F. S.; Meisl, G.; Bemporad, F.; Habchi, J.; Cascella, R.; Dobson, C. M.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Chiti, F. Transthyretin Inhibits Primary and Secondary Nucleations of Amyloid- β Peptide Aggregation and Reduces the Toxicity of Its Oligomers. *Biomacromolecules* **2020**, 21 (3), 1112–1125.

Ghanta, J.; Shen, C.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. A Strategy for Designing Inhibitors of β -Amyloid Toxicity. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (47), 29525–29528.

Ghiso, J.; Matsubara, E.; Koudinov, A.; Choi-Miura, N. H.; Tomita, M.; Wisniewski, T.; Frangione, B. The Cerebrospinal-Fluid Soluble Form of Alzheimer's Amyloid Beta Is Complexed to SP-40,40 (Apolipoprotein J), an Inhibitor of the Complement Membrane-Attack Complex. *Biochem. J.* **1993**, 293 (1), 27–30.

Giao, T.; Saavedra, J.; Cotrina, E.; Quintana, J.; Llop, J.; Arsequell, G.; Cardoso, I. Undiscovered Roles for Transthyretin: From a Transporter Protein to a New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21 (6), 2075.

Gimeno, A.; Santos, L. M.; Alemi, M.; Rivas, J.; Blasi, D.; Cotrina, E. Y.; Llop, J.; Valencia, G.; Cardoso, I.; Quintana, J.; Arsequell, G.; Jiménez-Barbero, J. 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 (13), 5749–5758.

Glenner, G. G.; Wong, C. W. Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 120 (3), 885–890.

Gloeckner, S. F.; Meyne, F.; Wagner, F.; Heinemann, U.; Krasnianski, A.; Meissner, B.; Zerr, I. Quantitative Analysis of Transthyretin, Tau and Amyloid-Beta in Patients with Dementia. *J. Alzheimer's Dis.* **2008**, 14 (1), 17–25.

Golabek, A.; Marques, M. A.; Lalowski, M.; Wisniewski, T. Amyloid β Binding Proteins in Vitro and in Normal Human Cerebrospinal Fluid. *Neurosci. Lett.* **1995**, 191 (1–2), 79–82.

Golde, T. E.; Koo, E. H.; Felsenstein, K. M.; Osborne, B. A.; Miele, L. γ -Secretase Inhibitors and Modulators. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1828 (12), 2898–2907.

Goyal, D.; Shuaib, S.; Mann, S.; Goyal, B. Rationally Designed Peptides and Peptidomimetics as Inhibitors of Amyloid- β (A β) Aggregation: Potential Therapeutics of Alzheimer's Disease. *ACS Comb. Sci.* **2017**, 19, 55–80.

- Grimm, M. O. W.; Mett, J.; Stahlmann, C. P.; Haupenthal, V. J.; Zimmer, V. C.; Hartmann, T. Neprilysin and A β Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2013**, 5, 1–27.
- Grodin, J. L.; Maurer, M. S. The Truth Is Unfolding About Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Circulation* **2019**, 140 (1), 27–30.
- Grøntvedt, G. R.; Schröder, T. N.; Sando, S. B.; White, L.; Bråthen, G.; Doeller, C. F. Alzheimer's Disease. *Curr. Biol.* **2018**, 28 (11), R645–R649.
- Gulisano, W.; Maugeri, D.; Baltrons, M. A.; Fà, M.; Amato, A.; Palmeri, A.; D'Adamio, L.; Grassi, C.; Devanand, D. P.; Honig, L. S.; Puzzo, D.; Arancio, O. Role of Amyloid- β and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, 64 (s1), S611–S631.
- Guo, X.; Liu, Z.; Zheng, Y.; Li, Y.; Li, L.; Liu, H.; Chen, Z.; Wu, L. Review on the Structures and Activities of Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, 14, 1057–1081.
- Haass, C.; Kaether, C.; Thinakaran, G.; Sisodia, S. Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, 2, a006270.
- Hamilton, J. A.; Benson, M. D. Transthyretin: A Review from a Structural Perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, 58, 1491–1521.
- Hampel, H.; Mesulam, M.-M.; Cuello, A. C.; Farlow, M. R.; Giacobini, E.; Grossberg, G. T.; Khachaturian, A. S.; Vergallo, A.; Cavedo, E.; Snyder, P. J.; Khachaturian, Z. S. The Cholinergic System in the Pathophysiology and Treatment of Alzheimer's Disease. *Brain a J. Neurol.* **2018**, 141, 1917–1933.
- Han, S.-H.; Jung, E. S.; Sohn, J.-H.; Hong, H. J.; Hong, H. S.; Kim, J. W.; Na, D. L.; Kim, M.; Kim, H.; Ha, H. J.; Kim, Y. H.; Huh, N.; Jung, M. W.; Mook-Jung, I. Human Serum Transthyretin Levels Correlate Inversely with Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2011**, 25 (1), 77–84.
- Hansson, S. F.; Andréasson, U.; Wall, M.; Skoog, I.; Andreasen, N.; Wallin, A.; Zetterberg, H.; Blennow, K. Reduced Levels of Amyloid- β -Binding Proteins in Cerebrospinal Fluid from Alzheimer's Disease Patients. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, 16, 389–397.
- Hardy, J.; Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* **2002**, 297 (5580), 353–356.
- Hatcher, L. Q.; Hong, L.; Bush, W. D.; Carducci, T.; Simon, J. D. Quantification of the Binding Constant of Copper (II) to the Amyloid-Beta Peptide. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 8160–8164.
- Heller, G. T.; Aprile, F. A.; Michaels, T. C. T.; Limbocker, R.; Perni, M.; Ruggeri, F. S.; Mannini, B.; Löhr, T.; Bonomi, M.; Camilloni, C.; de Simone, A.; Fellini, I. C.; Pierattelli, R.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Vendruscolo, M. Small-Molecule Sequestration of Amyloid- β as a Drug Discovery Strategy for Alzheimer's Disease. *Sci. Adv.* **2020**, 6 (45).
- Hippius, H.; Neundörffer, G. The Discovery of Alzheimer's Disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2003**, 5 (1), 101–108.

Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. Ligand Efficiency: A Useful Metric for Lead Selection. *Drug Discov. Today* **2004**, 9 (10), 430–431.

Hornstrup, L. S.; Frikke-Schmidt, R.; Nordestgaard, B. G.; Tybjaerg-Hansen, A. Genetic Stabilization of Transthyretin, Cerebrovascular Disease, and Life Expectancy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, 33 (6), 1441–1447.

Hou, X.; Aguilar, M. I.; Small, D. H. Transthyretin and Familial Amyloidotic Polyneuropathy: Recent Progress in Understanding the Molecular Mechanism of Neurodegeneration. *FEBS J.* **2007**, 274 (7), 1637–1650.

Hsu, F.; Park, G.; Guo, Z. Key Residues for the Formation of A β 42 Amyloid Fibrils. *ACS Omega* **2018**, 3 (7), 8401–8407.

Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. Principles of Early Drug Discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, 162 (6), 1239–1249.

Hurshman Babbes, A. R.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. Quantification of the Thermodynamically Linked Quaternary and Tertiary Structural Stabilities of Transthyretin and Its Disease-Associated Variants—the Relationship between Stability and Amyloidosis. *Biochemistry* **2008**, 47 (26), 6969–6984.

Iakovleva, I.; Brännström, K.; Nilsson, L.; Gharibyan, A. L.; Begum, A.; Anan, I.; Walfridsson, M.; Sauer-Eriksson, A. E.; Olofsson, A. Enthalpic Forces Correlate with the Selectivity of Transthyretin-Stabilizing Ligands in Human Plasma. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (16), 6507–6515.

Ihara, Y.; Nukina, N.; Miura, R.; Ogawara, M. Phosphorylated Tau Protein Is Integrated into Paired Helical Filaments in Alzheimer’s Disease. *J. Biochem.* **1986**, 99 (6), 1807–1810.

Jiang, Q.; Lee, C. Y. D.; Mandrekar, S.; Wilkinson, B.; Cramer, P.; Zelcer, N.; Mann, K.; Lamb, B.; Willson, T. M.; Collins, J. L.; Richardson, J. C.; Smith, J. D.; Comery, T. A.; Riddell, D.; Holtzman, D. M.; Tontonoz, P.; Landreth, G. E. ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of A β . *Neuron* **2008**, 58 (5), 681–693.

Johnson, S. M.; Connelly, S.; Fearn, C.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. The Transthyretin Amyloidoses: From Delineating the Molecular Mechanism of Aggregation Linked to Pathology to a Regulatory-Agency-Approved Drug. *J. Mol. Biol.* **2012**, 421, 185–203.

Johnson, S. M.; Wiseman, R. L.; Sekijima, Y.; Green, N. S.; Adamski-Werner, S. L.; Kelly, J. W. Native State Kinetic Stabilization as a Strategy To Ameliorate Protein Misfolding Diseases: A Focus on the Transthyretin Amyloidoses Introduction to the Transthyretin Amyloidoses. *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38 (12), 911–921.

Kanda, Y.; Goodman, D. S.; Canfield, R. E.; Morgan, F. J. The Amino Acid Sequence of Human Plasma Prealbumin. *J. Biol. Chem.* **1974**, 249 (21), 6796–6805.

Kandimalla, R.; Reddy, P. H. Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* **2017**, 57 (4), 1049–1069.

Kang, Y. J.; Diep, Y. N.; Tran, M.; Cho, H. Therapeutic Targeting Strategies for Early-to-Late-Staged Alzheimer’s Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21 (24), 9591.

Karran, E.; Mercken, M.; Strooper, B. De. The Amyloid Cascade Hypothesis for Alzheimer's Disease: An Appraisal for the Development of Therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, 10 (9), 698–712.

Kassem, N. A.; Deane, R.; Segal, M. B.; Preston, J. E. Role of Transthyretin in Thyroxine Transfer from Cerebrospinal Fluid to Brain and Choroid Plexus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2006**, 291, R1310–R1315.

Kerridge, C.; Belyaev, N. D.; Nalivaeva, N. N.; Turner, A. J. The A β -Clearance Protein Transthyretin, like Neprilysin, Is Epigenetically Regulated by the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain. *J. Neurochem.* **2014**, 130 (3), 419–431.

Kim, J.; Basak, J. M.; Holtzman, D. M. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron* **2009**, 63 (3), 287–303.

Kingsbury, J. S.; Klimtchuk, E. S.; Théberge, R.; Costello, C. E.; Connors, L. H. Expression, Purification, and in Vitro Cysteine-10 Modification of Native Sequence Recombinant Human Transthyretin. *Protein Expr. Purif.* **2007**, 53 (2), 370–377.

Klein, W. L.; Krafft, G. A.; Finch, C. E. Targeting Small A β Oligomers: The Solution to an Alzheimer's Disease Conundrum? *Trends Neurosci.* **2001**, 24 (4), 219–224.

Knopman, D. S.; Jones, D. T.; Greicius, M. D. Failure to Demonstrate Efficacy of Aducanumab: An Analysis of the EMERGE and ENGAGE Trials as Reported by Biogen, December 2019. *Alzheimer's Dement.* **2021**, 17, 696–701.

Knowles, T. P. J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M. The Amyloid State and Its Association with Protein Misfolding Diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, 15 (6), 384–396.

Knowles, T. P. J.; Waudby, C. A.; Devlin, G. L.; Cohen, S. I. A.; Aguzzi, A.; Vendruscolo, M.; Terentjev, E. M.; Welland, M. E.; Dobson, C. M. An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science* **2009**, 326 (5959), 1533–1537.

Koike, H.; Katsuno, M. Transthyretin Amyloidosis: Update on the Clinical Spectrum, Pathogenesis, and Disease-Modifying Therapies. *Neurol. Ther.* **2020**, 9 (2), 317–333.

Kuperstein, I.; Broersen, K.; Benilova, I.; Rozenski, J.; Jonckheere, W.; Debulpaepe, M.; Vandersteen, A.; Segers-Nolten, I.; Van Der Werf, K.; Subramaniam, V.; Braeken, D.; Callewaert, G.; Bartic, C.; D'Hooge, R.; Martins, I. C.; Rousseau, F.; Schymkowitz, J.; De Strooper, B. Neurotoxicity of Alzheimer's Disease A β Peptides Is Induced by Small Changes in the A β 42 to A β 40 Ratio. *EMBO J.* **2010**, 29 (19), 3408

Lackie, R. E.; Maciejewski, A.; Ostapchenko, V. G.; Marques-Lopes, J.; Choy, W. Y.; Duennwald, M. L.; Prado, V. F.; Prado, M. A. M. The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* **2017**, 11 (MAY), 1–23.

Ladiwala, A. R. A.; Dordick, J. S.; Tessier, P. M. Aromatic Small Molecules Remodel Toxic Soluble Oligomers of Amyloid β through Three Independent Pathways. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (5), 3209–3218.

Ladiwala, A. R. A.; Lin, J. C.; Bale, S. S.; Marcelino-Cruz, A. M.; Bhattacharya, M.; Dordick, J. S.; Tessier, P. M. Resveratrol Selectively Remodels Soluble Oligomers and Fibrils of Amyloid A β into Off-Pathway Conformers. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (31), 24228–24237.

Lambert, M. P.; Barlow, A. K.; Chromy, B. A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T. E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola, K. L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L. Diffusible, Nonfibrillar Ligands Derived from A β 1–42 Are Potent Central Nervous System Neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95 (11), 6448–6453.

Lashuel, H. A.; Lai, Z.; Kelly, J. W. Characterization of the Transthyretin Acid Denaturation Pathways by Analytical Ultracentrifugation: Implications for Wild-Type, V30M, and L55P Amyloid Fibril Formation. *Biochemistry* **1998**, 37 (51), 17851–17864.

Lashuel, H. A.; Wurth, C.; Woo, L.; Kelly, J. W. The Most Pathogenic Transthyretin Variant, L55P, Forms Amyloid Fibrils under Acidic Conditions and Protofilaments under Physiological Conditions. *Biochemistry* **1999**, 38 (41), 13560–13573.

Li, X.; Buxbaum, J. N. Transthyretin and the Brain Re-Visited: Is Neuronal Synthesis of Transthyretin Protective in Alzheimer's Disease? *Mol. Neurodegener.* **2011**, 6 (1), 1–17.

Li, X.; Masliah, E.; Reixach, N.; Buxbaum, J. N. Neuronal Production of Transthyretin in Human and Murine Alzheimer's Disease: Is It Protective? *J. Neurosci.* **2011**, 31 (35), 12483–

Li, X.; Song, Y.; Sanders, C. R.; Buxbaum, J. N. Transthyretin Suppresses Amyloid- β Secretion by Interfering with Processing of The Amyloid- β Precursor Protein. *J. Alzheimer's Dis.* **2016**, 52 (4), 1263–1275.

Li, X.; Zhang, X.; Ladiwala, A. R. A.; Du, D.; Yadav, J. K.; Tessier, P. M.; Wright, P. E.; Kelly, J. W.; Buxbaum, J. N. Mechanisms of Transthyretin Inhibition of β -Amyloid Aggregation In Vitro. *J. Neurosci.* **2013**, 33 (50), 19423–19433.

Link, C. D. Invertebrate Models of Alzheimer's Disease. *Genes, Brain Behav.* **2005**, 4 (3), 147–156.

Litus, E. A.; Kazakov, A. S.; Sokolov, A. S.; Nemashkalova, E. L.; Galushko, E. I. The Binding of Monomeric Amyloid b Peptide to Serum Albumin Is Affected by Major Plasma Unsaturated Fatty Acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 510 (2), 248–253.

Liu, J.; Chang, L.; Song, Y.; Li, H.; Wu, Y. The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* **2019**, 13 (February), 1–22.

Liu, L.; Murphy, R. M. Kinetics of Inhibition of β -Amyloid Aggregation by Transthyretin. *Biochemistry* **2006**, 45 (51), 15702–15709.

Liu, P. P.; Xie, Y.; Meng, X. Y.; Kang, J. S. History and Progress of Hypotheses and Clinical Trials for Alzheimer's Disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2019**, 4, 29.

Liu, S.; Park, S.; Allington, G.; Prelli, F.; Sun, Y.; Martá-Ariza, M.; Scholtzova, H.; Biswas, G.; Brown, B.; Verghese, P. B.; Mehta, P. D.; Kwon, Y. U.; Wisniewski, T. Targeting Apolipoprotein E/Amyloid β Binding by Peptoid CPO-A β 17-21 P Ameliorates Alzheimer's Disease Related Pathology and Cognitive Decline. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 1–12.

Lopez, O. L.; Becker, J. T.; Wahed, A. S.; Saxton, J.; Sweet, R. A.; Wolk, D. A.; Klunk, W.; DeKosky, S. T. Long-Term Effects of the Concomitant Use of Memantine with Cholinesterase Inhibition in Alzheimer Disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2009**, 80 (6), 600–607.

Lu, J.; Cao, Q.; Wang, C.; Zheng, J.; Luo, F.; Xie, J.; Li, Y.; Ma, X.; He, L.; Eisenberg, D.; Nowick, J.; Jiang, L.; Li, D. Structure-Based Peptide Inhibitor Design of Amyloid- β Aggregation. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, 12 (54), 1–10.

Luo, J.; Lee, S. H.; Vandevrede, L.; Qin, Z.; Ben Aissa, M.; Larson, J.; Teich, A. F.; Arancio, O.; D’Souza, Y.; Elharram, A.; Koster, K.; Tai, L. M.; Ladu, M. J.; Bennett, B. M.; Thatcher, G. R. J. A Multifunctional Therapeutic Approach to Disease Modification in Multiple Familial Mouse Models and a Novel Sporadic Model of Alzheimer’s Disease. *Mol. Neurodegener.* **2016**, 11 (1), 1–14.

Mairal, T.; Nieto, J.; Pinto, M.; Almeida, M. R.; Gales, L.; Ballesteros, A.; Barluenga, J.; Pérez, J. J.; Vázquez, J. T.; Centeno, N. B.; Saraiva, M. J.; Damas, A. M.; Planas, A.; Arsequell, G.; Valencia, G. Iodine Atoms: A New Molecular Feature for the Design of Potent Transthyretin Fibrillogenesis Inhibitors. *PLoS One* **2009**, 4 (1).

Mangrolia, P.; Murphy, R. M. Retinol-Binding Protein Interferes with Transthyretin-Mediated β -Amyloid Aggregation Inhibition. *Biochemistry* **2018**, 57 (33), 5029–5040.

Mannini, B.; Cascella, R.; Zampagni, M.; Van Waarde-Verhagen, M.; Meehan, S.; Roodveldt, C.; Campioni, S.; Boninsegna, M.; Penco, A.; Relini, A.; Kampinga, H. H.; Dobson, C. M.; Wilson, M. R.; Cecchi, C.; Chiti, F. Molecular Mechanisms Used by Chaperones to Reduce the Toxicity of Aberrant Protein Oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109 (31), 12479–12484.

Mansson, C.; Arosio, P.; Hussein, R. M.; Kampinga, H. H.; Hashem, R. M.; Boelens, W. C.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J.; Linse, S.; Emanuel. Interaction of the Molecular Chaperone DNAJB6 with Growing Amyloid-Beta 42 (A β 42) Aggregates Leads to Sub-Stoichiometric Inhibition of Amyloid Formation. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289 (45), 31066–31076.

Marrugo-Ramírez, J.; Rodríguez-Núñez, M.; Marco, M.-P.; Mir, M.; Samitier, J. Kynurenic Acid Electrochemical Immunosensor: Blood-Based Diagnosis of Alzheimer’s Disease. *Biosensors* **2021**, 11 (20).

Matsubara, K.; Mizuguchi, M.; Kawano, K. Expression of a Synthetic Gene Encoding Human Transthyretin in Escherichia Coli. *Protein Expr. Purif.* **2003**, 30 (1), 55–61.

Mattsson, N.; Insel, P. S.; Landau, S.; Jagust, W.; Donohue, M.; Shaw, L. M.; Trojanowski, J. Q.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Weiner, M. Diagnostic Accuracy of CSF Ab42 and Florbetapir PET for Alzheimer’s Disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2014**, 1 (8), 534–543.

Mccammon, M. G.; Scott, D. J.; Keetch, C. A.; Greene, L. H.; Purkey, H. E.; Petrassi, H. M.; Kelly, J. W.; Robinson, C. V. Screening Transthyretin Amyloid Fibril Inhibitors: Characterization of Novel Multiprotein, Multiligand Complexes by Mass Spectrometry. *Structure* **2002**, 10, 851–863.

Meng, F.; Bellaiche, M. M. J.; Kim, J.; Zerze, G. H.; Best, R. B.; Chung, H. S. Highly Disordered Amyloid- β Monomer Probed by Single-Molecule FRET and MD Simulation. *Biophys. J.* **2018**, 114, 870–884.

Merched, A.; Serot, J.-M.; Visvikis, S.; Aguillon, D.; Faure, G.; Siest, G. Apolipoprotein E, Transthyretin and Actin in the CSF of Alzheimer’s Patients: Relation with the Senile Plaques and Cytoskeleton Biochemistry. *FEBS Lett.* **1998**, 425 (2), 225–228.

Meyer, B.; Peters, T. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Molecules* **2003**, *42* (8), 864–890.

Miller, M.; Pal, A.; Albusairi, W.; Joo, H.; Pappas, B.; Haque Tuhin, M. T.; Liang, D.; Jampala, R.; Liu, F.; Khan, J.; Faaij, M.; Park, M.; Chan, W.; Graef, I.; Zamboni, R.; Kumar, N.; Fox, J.; Sinha, U.; Alhamadsheh, M. Enthalpy-Driven Stabilization of Transthyretin by AG10 Mimics a Naturally Occurring Genetic Variant That Protects from Transthyretin Amyloidosis. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (17), 7862–7876.

Milojevic, J.; Esposito, V.; Das, R.; Melacini, G. Understanding the Molecular Basis for the Inhibition of the Alzheimer's A β -Peptide Oligomerization by Human Serum Albumin Using Saturation Transfer Difference and off-Resonance Relaxation NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (14), 4282–4290.

Milojevic, J.; Melacini, G. Stoichiometry and Affinity of the Human Serum Albumin-Alzheimer's A β Peptide Interactions. *Biophys. J.* **2011**, *100* (1), 183–192.

Milojevic, J.; Raditsis, A.; Melacini, G. Human Serum Albumin Inhibits A β Fibrillization through a "Monomer-Competitor" Mechanism. *Biophys. J.* **2009**, *97* (9), 2585–2594.

Mintun, M. A.; Lo, A. C.; Duggan Evans, C.; Wessels, A. M.; Ardayfio, P. A.; Andersen, S. W.; Shcherbinin, S.; Sparks, J.; Sims, J. R.; Brys, M.; Apostolova, L. G.; Salloway, S. P.; Skovronsky, D. M. Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2021**, 1–14.

Miroy, G. j.; Lai, Z.; Lashuel, H. A.; Peterson, S. A.; Strang, C.; Kelly, J. W. Inhibiting Transthyretin Amyloid Fibril Formation via Protein Stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 15051–15056.

Möller, H. J.; Graeber, M. B. The Case Describe by Alois Alzheimer in 1911. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **1998**, *248* (3), 111–122.

Montoliu-Gaya, L.; Villegas, S. A β -Immunotherapeutic Strategies: A Wide Range of Approaches for Alzheimer's Disease Treatment. *Expert Rev. Mol. Med.* **2016**, *18* (e13), 1–15.

Murphy, M. P.; LeVine III, H. Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *J. Alzheimer's Dis.* **2010**, *19* (1), 1–17.

Nadal, A.; Fuentes, E.; Pastor, J.; McNaughton, P. A. Plasma Albumin Is a Potent Trigger of Calcium Signals and DNA Synthesis in Astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1426–1430.

Nalivaeva, N. N.; Beckett, C.; Belyaev, N. D.; Turner, A. J. Are Amyloid-Degrading Enzymes Viable Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease? *J. Neurochem.* **2012**, *120* (SUPPL. 1), 167–185.

Nalivaeva, N. N.; Belyaev, N. D.; Kerridge, C.; Turner, A. J. Amyloid-Clearing Proteins and Their Epigenetic Regulation as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*, 235.

Narayan, P.; Meehan, S.; Carver, J. A.; Wilson, M. R.; Dobson, C. M.; Kleenerman, D. Amyloid- β Oligomers Are Sequestered by Both Intracellular and Extracellular Chaperones. *Biochemistry* **2012**, *51* (46), 9270–9276.

- Narayan, P.; Orte, A.; Clarke, R. W.; Bolognesi, B.; Hook, S.; Ganzinger, K. A.; Meehan, S.; Wilson, M. R.; Dobson, C. M.; Kleinerman, D. The Extracellular Chaperone Clusterin Sequesters Oligomeric Forms of the A β 1-40 Peptide. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *19* (1), 79–83.
- Nevone, A.; Merlini, G.; Nuvolone, M. Treating Protein Misfolding Diseases: Therapeutic Successes Against Systemic Amyloidoses. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1024.
- Nilsson, L.; Pamréen, A.; Islam, T.; Brännström, K.; Golchin, S. A.; Pettersson, N.; Iakovleva, I.; Sandblad, L.; Gharibyan, A. L.; Olofsson, A. Transthyretin Interferes with A β Amyloid Formation by Redirecting Oligomeric Nuclei into Non-Amyloid Aggregates. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430* (17), 2722–2733.
- Niu, H.; Álvarez-Álvarez, I.; Guillén-Grima, F.; Aguinaga-Ontoso, I. Prevalence and Incidence of Alzheimer's Disease in Europe: A Meta-Analysis. *Neurología* **2017**, *32* (8), 523–532.
- Nunan, J.; Small, D. H. Regulation of APP Cleavage by α -, β - and γ -Secretases. *FEBS Lett.* **2000**, *483* (1), 6–10.
- Ortiz, A. M.; Minguet, C.; Mestre, A.; Orellana, A.; Núñez, L.; Boada, M.; Ruiz, A.; Páez, A.; Costa, M. Albumin Glycation in Alzheimer's Disease Patients: Results from the AMBAR Trial. *Alzheimer's Dement.* **2020**, *16*, e042836.
- Overton, T. W. Recombinant Protein Production in Bacterial Hosts. *Drug Discov. Today* **2014**, *19* (5), 590–601.
- Pacheco-Quinto, J.; Herdt, A.; Eckman, C. B.; Eckman, E. A. Endothelin-Converting Enzymes and Related Metalloproteases in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *33* (SUPPL. 1), S101–S110.
- Pardridge, W. M. Treatment of Alzheimer's Disease and Blood–Brain Barrier Drug Delivery. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (11), 394.
- Pate, K. M.; Murphy, R. M. Cerebrospinal Fluid Proteins as Regulators of Beta-Amyloid Aggregation and Toxicity. *Isr. J. Chem.* **2017**, *57* (7), 602–612.
- Pesini, P.; Pérez-Grijalba, V.; Monleón, I.; Boada, M.; Tárraga, L.; Martínez-Lage, P.; San-José, I.; Sarasa, M. Reliable Measurements of the β -Amyloid Pool in Blood Could Help in the Early Diagnosis of AD. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2012**, No. August 2012.
- Piaceri, I.; Nacmias, B.; Sorbi, S. Genetics of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Front. Biosci.* **2013**, *1* (5), 167–177.
- Plante-Bordeneuve, V. Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy: An Update. *J. Neurol.* **2018**, *265* (4), 976–983.
- Quintas, A.; Saraiva, M. J. M.; Brito, R. M. M. The Tetrameric Protein Transthyretin Dissociates to a Non-Native Monomer in Solution. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (46), 32943–32949.

Quintas, A.; Vaz, D. C.; Cardoso, I.; Joa, M.; Saraiva, M. Tetramer Dissociation and Monomer Partial Unfolding Precedes Protofibril Formation in Amyloidogenic Transthyretin Variants. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (29), 27207–27213.

Rahman, M. M.; Zetterberg, H.; Lendel, C.; Härd, T. Binding of Human Proteins to Amyloid- β Protofibrils. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10 (3), 766–774.

Rapezzi, C.; Quarta, C. C.; Riva, L.; Longhi, S.; Gallelli, I.; Lorenzini, M.; Ciliberti, P.; Biagini, E.; Salvi, F.; Branzi, A. Transthyretin-Related Amyloidoses and the Heart: A Clinical Overview. *Nat. Rev. Cardiol.* **2010**, 7 (7), 398–408.

Ray, I.; Chauhan, A.; Wegiel, J.; Chauhan, V. P. S. Gelsolin Inhibits the Fibrillization of Amyloid Beta-Protein, and Also Defibrillizes Its Preformed Fibrils. *Brain Res.* **2000**, 853 (2), 344–351.

Rejc, L.; Gómez-Vallejo, V.; Rios, X.; Cossio, U.; Baz, Z.; Mujica, E.; Gião, T.; Cotrina, E. Y.; Jiménez-barbero, J.; Quintana, J. Oral Treatment with Iododiflunisal Delays Beta Amyloid Plaque Formation in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease: A Longitudinal in Vivo Molecular Imaging Study. *J. Alzheimer's Dis.* **2020**, 77 (1), 99–112.

Ribeiro, C. A.; Oliveira, S. M.; Guido, L. F.; Magalhães, A.; Valencia, G.; Arsequell, G.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin Stabilization by Iododiflunisal Promotes Amyloid- β Peptide Clearance, Decreases Its Deposition, and Ameliorates Cognitive Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, 39 (2), 357–370.

Ribeiro, C. A.; Santana, I.; Oliveira, C.; Baldeiras, I.; Moreira, J.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Transthyretin Decrease in Plasma of MCI and AD Patients: Investigation of Mechanisms for Disease Modulation. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, 9 (8), 881–889.

Ribeiro, C. A.; Saraiva, M. J.; Cardoso, I. Stability of the Transthyretin Molecule as a Key Factor in the Interaction with A-Beta Peptide - Relevance in Alzheimer's Disease. *PLoS One* **2012**, 7 (9), e45368.

Riisøen, H. Reduced Prealbumin (Transthyretin) in CSF of Severely Demented Patients with Alzheimer's Disease. *Acta Neurol. Scand.* **1988**, 78 (6), 455–459.

Rios, X.; Gómez-Vallejo, V.; Martín, A.; Cossío, U.; Morcillo, M. Á.; Alemi, M.; Cardoso, I.; Quintan, J.; Jiménez-, J.; Cotrina, E. Y.; Valencia, G.; Arsequell, G.; Llop, J. Radiochemical Examination of Transthyretin (TTR) Brain Penetration Assisted by Iododiflunisal, a TTR Tetramer Stabilizer and a New Candidate Drug for AD. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 13672.

Romeo, M.; Stravalaci, M.; Beeg, M.; Rossi, A.; Fiordaliso, F.; Corbelli, A.; Salmona, M.; Gobbi, M.; Cagnotto, A.; Diomede, L. Humanin Specifically Interacts with Amyloid- β Oligomers and Counteracts Their in Vivo Toxicity. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, 57 (3), 857–871.

Ruberg, F. L.; Berk, J. L. Transthyretin (TTR) Cardiac Amyloidosis. *Circulation* **2013**, 126 (10), 1286–1300.

Sacks, C. A.; Avorn, J.; Kesselheim, A. S. The Failure of Solanezumab — How the FDA Saved Taxpayers Billions. *N. Engl. J. Med.* **2017**, 376 (18), 1704–1706.

Sadowski, M.; Pankiewicz, J.; Scholtzova, H.; Ripellino, J. A.; Li, Y.; Schmidt, S. D.; Mathews, P. M.; Fryer, J. D.; Holtzman, D. M.; Sigurdsson, E. M.; Wisniewski, T. A Synthetic Peptide Blocking the Apolipoprotein E/β-Amyloid Binding Mitigates β-Amyloid Toxicity and Fibril Formation in Vitro and Reduces β-Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Am. J. Pathol.* **2004**, 165 (3), 937–948.

Santos, C. R. A.; Cardoso, I.; Gonçalves, I. Key Enzymes and Proteins in Amyloid-Beta Production and Clearance. **2010**.

Saraiva, M. J.; Magalhães, J.; Ferreira, N.; Almeida, M. R. Transthyretin Deposition in Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19 (15), 2304–2311.

Scheidt, T.; Łapińska, U.; Kumita, J. R.; Whiten, D. R.; Kleinerman, D.; Wilson, M. R.; Cohen, S. I. A.; Linse, S.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J.; Arosio, P. Secondary Nucleation and Elongation Occur at Different Sites on Alzheimer's Amyloid- β Aggregates. *Sci. Adv.* **2019**, 5 (4).

Scheltens, P.; Strooper, B. De; Kivipelto, M.; Holstege, H.; Chételat, G.; Teunissen, C. E.; Cummings, J.; Flier, W. M. van der. Alzheimer's Disease. *Lancet* **2021**, 397, 1577–1590.

Scheuner, D.; Eckman, C.; Jensen, M.; Song, X.; Citron, M.; Suzuki, N.; Bird, T. D.; Hardy, J.; Hutton, M.; Kukull, W.; Larson, E.; Levy-Lahad, E.; Vitanen, M.; Peskind, E.; Poorkaj, P.; Schellenberg, G.; Tanzi, R.; Wasco, W.; Lannfelt, L.; Selkoe, D.; Younkin, S. Secreted Amyloid β -Protein Similar to That in the Senile Plaques of Alzheimer's Disease Is Increased in Vivo by the Presenilin 1 and 2 and APP Mutations Linked to Familial Alzheimer's Disease. *Nat. Med.* **1996**, 2 (8), 864–870.

Schneider, L. Insight A Resurrection of Aducanumab for Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol.* **2019**, 19 (2), 111–112.

Schwarzman, A. L.; Gregori, L.; Vitek, M. P.; Lyubski, S.; Strittmatter, W. J.; Enghilde, J. J.; Bhasin, R.; Silverman, J.; Weisgraber, K. H.; Coyle, P. K.; Zagorski, M. G.; Talafous, J.; Eisenberg, M.; Saunders, A. M.; Roses, A. D.; Goldgaber, D. Transthyretin Sequesters Amyloid Beta Protein and Prevents Amyloid Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91 (18), 8368–8372.

Schwarzman, A. L.; Tsiper, M.; Wente, H.; Wang, A.; Vitek, M. P.; Vasiliev, V.; Goldgaber, D. Amyloidogenic and Anti-Amyloidogenic Properties of Recombinant Transthyretin Variants. *Amyloid* **2004**, 11 (1), 1–9.

Sekijima, Y.; Hammarström, P.; Matsumura, M.; Shimizu, Y.; Iwata, M.; Tokuda, T.; Ikeda, S. ichi; Kelly, J. W. Energetic Characteristics of the New Transthyretin Variant A25T May Explain Its Atypical Central Nervous System Pathology. *Lab. Investig.* **2003**, 83 (3), 409–417.

Selkoe, D. J. The Molecular Pathology of Alzheimer's Disease. *Neuron* **1991**, 6, 487–498.

Selkoe, D. J.; Hardy, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, 8 (6), 595–608.

Serot, J. M.; Christmann, D.; Dubost, T.; Couturier, M. Cerebrospinal Fluid Transthyretin: Aging and Late Onset Alzheimer's Disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1997**, *63* (4), 506–508.

Sgourakis, N. G.; Yan, Y.; McCallum, S.; Wang, C.; Garcia, A. E. The Alzheimer's Peptides A β 40 and 42 Adopt Distinct Conformations in Water: A Combined MD/NMR Study. *J. Mol. Biol.* **2007**, *368* (5), 1448–1457.

Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I.; Brett, F. M.; Farrell, M. A.; Rowan, M. J.; Lemere, C. A.; Regan, C. M.; Walsh, D. M.; Sabatini, B. L.; Selkoe, D. J. Amyloid β -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *J. Nat. Med.* **2008**, *14* (8), 837–842.

Shibata, M.; Yamada, S.; Ram Kumar, S.; Calero, M.; Bading, J.; Frangione, B.; Holtzman, D. M.; Miller, C. A.; Strickland, D. K.; Ghiso, J.; Zlokovic, B. V. Clearance of Alzheimer's Amyloid-B1-40 Peptide from Brain by LDL Receptor-Related Protein-1 at the Blood-Brain Barrier. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106* (12), 1489–1499.

Siddiqi, O. K.; Ruberg, F. L. Cardiac Amyloidosis: An Update on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Trends Cardiovasc. Med.* **2018**, *28* (1), 10–21.

Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. Design and Synthesis of a Novel Water-Soluble A β 1-42 Isopeptide: An Efficient Strategy for the Preparation of Alzheimer's Disease-Related Peptide, A β 1-42, via O–N Intramolecular Acyl Migration Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (31), 5965–5968.

Sorrentino, G.; Bonavita, V. Neurodegeneration and Alzheimer's Disease: The Lesson from Tauopathies. *Neurol. Sci.* **2007**, *28* (2), 63–71.

Sparkes, R. S.; Sasaky, H.; Mohandas, T.; Yoshioka, K.; Klisak, I.; Sakaki, Y.; Heinzmann, C.; Simon, M. I. Assignment of the Prealbumin (PALB) Gene (Familial Amyloidotic Polyneuropathy) to Human Chromosome Region 18q11. 2-Q12. 1. *Hum. Genet.* **1987**, *75*, 151–154.

Spuch, C.; Ortolano, S.; Navarro, C. LRP-1 and LRP-2 Receptors Function in the Membrane Neuron. Trafficking Mechanisms and Proteolytic Processing in Alzheimer's Disease. *Front. Physiol.* **2012**, *3* (269), 1–14.

Stanyon, H. F.; Viles, J. H. Human Serum Albumin Can Regulate Amyloid- β Peptide Fiber Growth in the Brain Interstitium. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (33), 28163–28168.

Stein, T. D.; Anders, N. J.; DeCarli, C.; Chan, S. L.; Mattson, M. P.; Johnson, J. A. Neutralization of Transthyretin Reverses the Neuroprotective Effects of Secreted Amyloid Precursor Protein (APP) in APPSw Mice Resulting in Tau Phosphorylation and Loss of Hippocampal Neurons: Support for the Amyloid Hypothesis. *J. Neurosci.* **2004**, *24* (35), 7707–7717.

Stein, T. D.; Johnson, J. A. Lack of Neurodegeneration in Transgenic Mice Overexpressing Mutant Amyloid Precursor Protein Is Associated with Increased Levels of Transthyretin and the Activation of Cell Survival Pathways. *J. Neurosci.* **2002**, *22* (17), 7380–7388.

Stelzmann, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murtagh, F. R. An English Translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über Eine Eigenartige Erkrankung Der Hirnrinde." *Clin. Anat.* **1995**, 8 (6), 429–431.

Talafous, J.; Marcinowski, K. J.; Klopman, G.; Zagorski, M. G. Solution Structure of Residues 1–28 of the Amyloid β -Peptide. *Biochemistry* **1994**, 33 (25), 7788–7796.

Tarasoff-Conway, J. M.; Carare, R. O.; Osorio, R. S.; Glodzik, L.; Butler, T.; Fieremans, E.; Axel, L.; Rusinek, H.; Nicholson, C.; Zlokovic, B. V.; Frangione, B.; Blennow, K.; Ménard, J.; Zetterberg, H.; Wisniewski, T.; Leon, M. J. De. Clearance Systems in the Brain—Implications for Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2015**, 11 (8), 457–470.

Tolar, M.; Abushakra, S.; Hey, J. A.; Porsteinsson, A.; Sabbagh, M. Aducanumab, Gantenerumab, BAN2401, and ALZ-801 - The First Wave of Amyloid-Targeting Drugs for Alzheimer's Disease with Potential for near Term Approval. *Alzheimer's Res. Ther.* **2020**, 12 (1), 95.

Tomaselli, S.; Esposito, V.; Vangone, P.; Van Nuland, N. A. J.; Bonvin, A. M. J. J.; Guerrini, R.; Tancredi, T.; Temussi, P. A.; Picone, D. The α -to- β Conformational Transition of Alzheimer's A β -(1-42) Peptide in Aqueous Media Is Reversible: A Step by Step Conformational Analysis Suggests the Location of β Conformation Seeding. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, 7 (2), 257–267.

Törnquist, M.; Michaels, T. C. T.; Sanagavarapu, K.; Yang, X.; Meisl, G.; Cohen, S. I. A.; Knowles, T. P. J.; Linse, S. Secondary Nucleation in Amyloid Formation. *Chem. Commun.* **2018**, 54 (63), 8667–8684.

Velayudhan, L.; Killick, R.; Hye, A.; Kinsey, A.; Güntert, A.; Lynham, S.; Ward, M.; Leung, R.; Lourdusamy, A.; To, A. W. M.; Powell, J.; Lovestone, S. Plasma Transthyretin as a Candidate Marker for Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, 28 (2), 369–375.

Velazquez-Campoy, A.; Leavitt, S. A.; Freire, E. Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Methods Mol. Biol.* **2015**, 1278, 183–204.

Vilaró, M.; Nieto, J.; La Parra, J. R.; Almeida, M. R.; Ballesteros, A.; Planas, A.; Arsequell, G.; Valencia, G. Tuning Transthyretin Amyloidosis Inhibition Properties of Iododiflunisal by Combinatorial Engineering of the Nonsalicylic Ring Substitutions. *ACS Comb. Sci.* **2015**, 17 (1), 32–38.

Wallin, C.; Hiruma, Y.; Wärmländer, S. K. T. S.; Huvent, I.; Jarvet, J.; Abrahams, J. P.; Gräslund, A.; Lippens, G.; Luo, J. The Neuronal Tau Protein Blocks in Vitro Fibrillation of the Amyloid- β (A β) Peptide at the Oligomeric Stage. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140 (26), 8138–8146.

Walpole, S.; Monaco, S.; Nepravishta, R.; Angulo, J. STD NMR as a Technique for Ligand Screening and Structural Studies. *Methods Enzymol.* **615**, 423–451.

Wälti, M. A.; Ravotti, F.; Arai, H.; Glabe, C. G.; Wall, J. S.; Böckmann, A.; Güntert, P.; Meier, B. H.; Riek, R. Atomic-Resolution Structure of a Disease-Relevant A β (1-42) Amyloid Fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, 113 (34), E4976–E4984.

Wang, Y.; Wang, S.; Huang, M. Structure and Enzymatic Activities of Human Serum Albumin. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, 21 (14), 1831–1836.

Waring, S. C.; Rosenberg, R. N. Genome-Wide Association Studies in Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.* **2008**, 65 (3), 329–334.

Weissmiller, A. M.; Natera-naranjo, O.; Reyna, S. M.; Pearn, M. L.; Zhao, X.; Nguyen, P.; Cheng, S.; Goldstein, L. S. B.; Tanzi, R. E.; Wagner, S. L.; Mobley, W. C.; Wu, C. A γ -Secretase Inhibitor, but Not a γ -Secretase Modulator, Induced Defects in BDNF Axonal Trafficking and Signaling: Evidence for a Role for APP. *PLoS One* **2015**, 10 (2), e0118379.

Wessels, A. M.; Tariot, P. N.; Zimmer, J. A.; Selzler, K. J.; Bragg, S. M.; Andersen, S. W.; Landry, J.; Krull, J. H.; Downing, A. M.; Willis, B. A.; Shcherbinin, S.; Mullen, J.; Barker, P.; Schumi, J.; Shering, C.; Matthews, B. R.; Stern, R. A.; Vellas, B.; Cohen, S.; MacSweeney, E.; Boada, M.; Sims, J. R. Efficacy and Safety of Lanabecestat for Treatment of Early and Mild Alzheimer Disease The AMARANTH and DAYBREAK-ALZ Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol.* **2019**, 7 (22), 199–209.

Westerman, P.; Sletten, K.; Johansson, B.; Cornwell III, G. G. Fibril in Senile Systemic Amyloidosis Is Derived From Normal Transthyretin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87 (7), 2843–2845.

Wildsmith, K. R.; Holley, M.; Savage, J. C.; Skerrett, R.; Landreth, G. E. Evidence for Impaired Amyloid β Clearance in Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Res. Ther.* **2013**, 5 (4).

Wilson, M. R.; Yerbury, J.; Wyatt, A.; Dabbs, R. Roles of Extracellular Chaperones in Amyloidosis. *J. Mol. Biol.* **2012**, 421(4-5), 499–516.

Wimo, A.; Guerchet, M.; Ali, G. C.; Wu, Y. T.; Prina, A. M.; Winblad, B.; Jönsson, L.; Liu, Z.; Prince, M. The Worldwide Costs of Dementia 2015 and Comparisons with 2010. *Alzheimer's Dement.* **2017**, 13 (1), 1–7.

Wisniewski, T.; Goñi, F. Immunotherapy for Alzheimer's Disease. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, 88 (4), 499–507.

Wyatt, A. R.; Yerbury, J. J.; Ecroyd, H.; Wilson, M. R. Extracellular Chaperones and Proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, 8, 295–322.

Yang, D. T.; Joshi, G.; Cho, P. Y.; Johnson, J. A.; Murphy, R. M. Transthyretin as Both a Sensor and a Scavenger of β -Amyloid Oligomers. *Biochemistry* **2013**, 52 (17), 2849–2861.

Yee, A. W.; Aldeghi, M.; Blakeley, M. P.; Ostermann, A.; Mas, P. J.; Moulin, M.; Sanctis, D. de; Bowler, M. W.; Mueller-Dieckmann, C.; Mitchell, E. P.; Haertlein, M.; Groot, B. L. de; Erba, E. B.; Forsyth, V. T. A Molecular Mechanism for Transthyrein Amyloidogenesis. *Nat. Commun.* **2019**, 925, 1–10.

Yin, J.; Li, G.; Ren, X.; Herrler, G. Select What You Need: A Comparative Evaluation of the Advantages and Limitations of Frequently Used Expression Systems for Foreign Genes. *J. Biotechnol.* **2007**, 127 (3), 335–347.

Yokoyama, T.; Mizuguchi, M. Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors: From Discovery to Current Developments. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (23), 14228–14242.

Yoon, S.; Jo, S. A. Mechanisms of Amyloid- β Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Biomol. Ther. (Seoul)*. **2012**, 20 (3), 245–255.

Zemek, F.; Drtinova, L.; Nepovimova, E.; Sepsova, V.; Korabecny, J.; Klimes, J.; Kuca, K. Outcomes of Alzheimer's Disease Therapy with Acetylcholinesterase Inhibitors and Memantine. *Expert Opin. Drug Saf.* **2014**, 13 (6), 759–774.

Zetterberg, H.; Bendlin, B. B. Biomarkers for Alzheimer's Disease—Preparing for a New Era of Disease-Modifying Therapies. *Mol. Psychiatry* **2021**, 26 (1), 296–308.

Zhang, J.-H.; Chung, T. D. Y.; Oldenburg, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, 4 (2), 67–73.

Ziskin, J. L.; Greicius, M. D.; Zhu, W.; Okumu, A. N.; Adams, C. M.; Plowey, E. D. Neuropathologic Analysis of Tyr69His TTR Variant Meningovascular Amyloidosis with Dementia. *Acta Neuropathol. Commun.* **2015**, 3, 43.

ANEXO I.

SUPPORTING INFORMATION

Descubrimiento de fármacos para la enfermedad de Alzheimer: chaperonas de la interacción TTR/A		
2	Cotrina et al	Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between Transthyretin, A β Peptides, and Small-Molecule Chaperones toward an Alternative Strategy for Alzheimer's Disease Drug Discovery. <i>J. Med. Chem.</i> 2020 , 63(6), 3205-3214. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01970.
3	Cotrina et al	An assay for screening potential drug candidates for Alzheimer's disease that act as chaperons of the transthyretin and amyloid- β peptides interaction. <i>Chemistry</i> 2020 . DOI: 10.1002/chem.202002933.
Descubrimiento de nuevos estabilizadores de la TTR		
5	Cotrina et al	Repurposing benz bromarone for Familial Amyloid Polyneuropathy: a new transthyretin tetramer stabilizer. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2020 , 21(19), 7166. DOI: 10.3390/ijms21197166
6	Cotrina et al	Optimization of Kinetic Stabilizers of Tetrameric Transthyretin: A Prospective Ligand Efficiency-guided Approach. <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 2020 , 28(23), 115794. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115794

ANEXO 2

Artículo A1.

Gimeno, A., Santos, L.M., Alemi, M., Rivas, J., Blasi, D., **Cotrina, E.Y.**, Llop, J., Valencia, G., Cardoso, I., Quintana, J., Arsequell, G., Jiménez-Barbero, J. Insights on the Interaction between Transthyretin and A β in Solution. A Saturation Transfer Difference (STD) NMR Analysis of the Role of Iododiflunisal

Referencia: *J. Med. Chem.* **2017**

Artículo (review).

Undiscovered Roles for Transthyretin: From a Transporter Protein to a New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease

Referencia: *Int. J. Mol. Sci.* **2020**. pii

Artículo A3.

Radiochemical examination of transthyretin (TTR) brain penetration assisted by iododiflunisal, a TTR tetramer stabilizer and a new candidate drug for AD

Referencia: *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 13672.

Artículo A4.

Oral treatment with iododiflunisal delays beta amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer Disease: a Longitudinal in vivo molecular imaging study

Referencia: *J. Alzheimers Dis.* **2020**

